

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-520466

(P2023-520466A)

(43)公表日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(51)国際特許分類		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 3	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 B 0 6 5	
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	4 C 0 8 7	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686		Z
C 1 2 N	5/074(2010.01)	C 1 2 N	5/074		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全68頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-559927(P2022-559927)	(71)出願人	500213834	メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター 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)(22)出願日	令和3年4月2日(2021.4.2)	(74)代理人	100078282		
(85)翻訳文提出日	令和4年11月22日(2022.11.22)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/025596	(74)代理人	100113413		
(87)国際公開番号	WO2021/203009	(74)代理人	弁理士 森下 夏樹		
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)	(74)代理人	100181674	弁理士 飯田 貴敏 100181641 弁理士 石川 大輔 230113332	
(31)優先権主張番号	63/004,138	(74)代理人	弁理士 飯田 貴敏		
(32)優先日	令和2年4月2日(2020.4.2)	(74)代理人	100181641		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 石川 大輔		
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, ,	(74)代理人	230113332		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 中脳ドーパミンニューロンの生成方法、中脳ニューロンおよびその使用

(57)【要約】

本開示は、中脳ドーパミンニューロンおよびその前駆体を生成する方法、そのような方法によって生成される中脳ドーパミンニューロンおよびその前駆体、および、そのような細胞を含む組成物、ならびに、神経障害を予防、モデリング、および／または処置するためのその使用を提供する。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との接触は、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から少なくとも約5日で開始される。

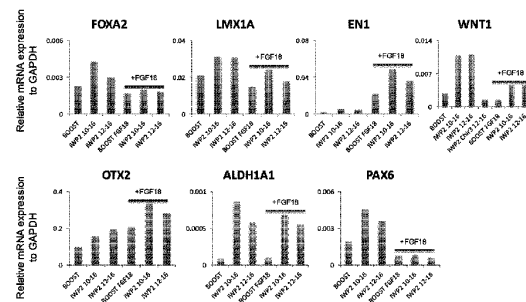


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

幹細胞の分化を誘導するためのインビトロ方法であって、

前記幹細胞を、少なくとも1つのSmall Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) シグナル伝達阻害剤、少なくとも1つのソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達活性化剤、および少なくとも1つのウィングレス (Wnt) シグナル伝達活性化剤に接触させる工程、ならびに

前記細胞を、少なくとも1つの線維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナル伝達活性化剤および少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させて、中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する分化細胞の集団を得る工程

10

を含む、方法。

【請求項 2】

前記細胞と前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との前記接触が、前記幹細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から少なくとも約5日で開始される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞と前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との前記接触が、前記幹細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約15日以内に開始される、請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記細胞と前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との前記接触が、前記幹細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約10日で開始される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞と前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との前記接触が、前記幹細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から10日、11日、12日、または13日で開始される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞を、少なくとも約1日、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記細胞を、最大約30日間または最大約25日間、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞を、約5日間、約15日間、または約20日間、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞を、4日間、5日間、6日間、7日間、14日間、15日間、19日間または20日間、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記細胞と前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との前記接触が、前記細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から少なくとも約5日または少なくとも約10日で開始される、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞と前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との前記接触が、前記細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約20日以内または18日以内に開始される、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記細胞と前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との前記接触が、前記細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約10日で開始される、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記細胞と前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との前記接触が、前記細胞と前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から10日、11日、12日、または13日で開始される、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記細胞を、少なくとも約1日および／もしくは最大約20日間、少なくとも約3日間および／もしくは最大約10日間、または少なくとも4日間および／もしくは最大7日間、前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項15】

前記細胞を、約5日間、前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記細胞を、4日間、5日間、6日間、または7日間、前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記細胞を、約5日間、前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤と接触させる、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項18】

前記細胞を、6日間または7日間、前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤と接触させる、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記細胞を、約5日間、前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記細胞を、6日間または7日間、前記少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項21】

前記細胞を、約15日間、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記細胞を、16日間または17日間、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤と接触させる、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の濃度が、前記幹細胞とのその最初の接触から約4日増加する、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の前記濃度が、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の初期濃度から約200%～約1000%増加する、請求項23に記載の方法。

40

【請求項25】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の前記濃度が、前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の初期濃度から約500%増加する、請求項23または24に記載の方法。

【請求項26】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の前記濃度が、約1 μ Mから約5 μ Mと約10 μ Mとの間に増加する、請求項23～25のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 27】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の前記濃度が、約6 μ Mの濃度に増加する、請求項23～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 28】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤が、非古典的Wntシグナル伝達および古典的Wntシグナル伝達を阻害することができる、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤が、IWP2、IWR1-endo、XAV939、IWP-O1、Wnt-C59、IWP-L6、およびICG-001、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 30】

前記少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤がIWP2を含む、請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 31】

前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤が、FGF18、FGF17、FGF8a、FGF8b、FGF4、FGF2、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 32】

前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤が、中脳の拡大を引き起こし、中脳遺伝子発現を上方制御することができる、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 33】

前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤が、FGF18、FGF17、FGF8a、FGF4、FGF2、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

前記少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤がFGF18を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤が、TGF β /Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤、骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達阻害剤、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 36】

前記少なくとも1つのTGF β /Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤が、ALK5の阻害剤を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

前記少なくとも1つのTGF β /Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤が、SB431542、SB431542の誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項35または36に記載の方法。

【請求項 38】

前記SB431542の誘導体がA83-01を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

前記少なくとも1つのTGF β /Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤が、SB431542を含む、請求項35～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 40】

前記少なくとも1つのBMPシグナル伝達阻害剤が、LDN193189、Noggin、ドルソモルフィン、LDN193189の誘導体、Nogginの誘導体、ドルソモルフィンの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

前記少なくとも 1 つの BMP 阻害剤が LDN-193189 を含む、請求項 3 5 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記少なくとも 1 つの Wnt シグナル伝達活性化剤が、グリコゲンシンターゼキナーゼ 3 β (GSK3 β) シグナル伝達阻害剤を含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記少なくとも 1 つの Wnt シグナル伝達活性化剤が、CHIR99021、CHIR98014、AMBMP 塩酸塩、LP 922056、リチウム、デオキシコール酸、BIO、SB-216763、Wnt3A、Wnt1、Wnt5a、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記少なくとも 1 つの Wnt シグナル伝達活性化剤が CHIR99021 を含む、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記少なくとも 1 つの SHH シグナル伝達活性化剤が、SHH タンパク質、Smoothed Agonist (SAG)、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 SHH タンパク質が、組換え SHH、修飾 N 末端 SHH、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記修飾 N 末端 SHH が、N 末端に 2 つのイソロイシンを含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記修飾 N 末端 SHH が、非修飾 N 末端 SHH と少なくとも約 90 % の配列同一性を有する、請求項 4 6 または 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記非修飾 N 末端 SHH が、非修飾マウス N 末端 SHH または非修飾ヒト N 末端 SHH である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

修飾 N 末端 SHH が SHH C25II を含む、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 SAG が パルモルファミンを含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記分化細胞の少なくとも約 80 % が、前記幹細胞と前記少なくとも 1 つの SMAD シグナル伝達阻害剤との最初の接触から約 15 日で FOXA2 および EN1 を発現する、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記分化細胞の約 80 % 超または約 90 % 超が、前記幹細胞と前記少なくとも 1 つの SMAD シグナル伝達阻害剤との最初の接触から 16 日で FOXA2 および EN1 を発現する、請求項 1 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも 1 つのマーカーが、EN1、OTX2、TH、NURR1、FOXA2、PITX3、LMX1A、LMO3、SNCA、ADCAP1、CHRNA4、SOX6、DAT、VMAT2、WNT1、GIRK2、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 3 のい

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 55】

前記分化細胞が、PAX6、EMX2、LHX2、SMA、SIX1、PITX2、SIM1、POU4F1、PHOX2A、BARHL1、BARHL2、GBX2、HOXA1、HOXA2、HOXB1、HOXB2、POU5F1、NANOG、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現しない、請求項 1～54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 56】

少なくとも 1 つの陽性表面マーカーを発現し、少なくとも 1 つの陰性表面マーカーを発現しない細胞を単離することをさらに含む、請求項 1～55 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 57】

前記少なくとも 1 つの陽性表面マーカーが、CD171、CD184、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記少なくとも 1 つの陽性表面マーカーが CD184 を含む、請求項 56 または 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記少なくとも 1 つの陰性表面マーカーが、CD49e、CD99、CD340、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 56～58 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 60】

前記少なくとも 1 つの陰性表面マーカーが CD49e を含む、請求項 56～59 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 61】

CD184 を発現し、CD49e を発現しない細胞を選別することを含む、請求項 56～60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記幹細胞が多能性幹細胞である、請求項 1～61 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 63】

前記幹細胞が、非胚性幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 64】

前記幹細胞が、ヒト幹細胞、非ヒト霊長類幹細胞、または齧歯類幹細胞である、請求項 1～63 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 65】

前記幹細胞がヒト幹細胞である、請求項 1～64 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 66】

請求項 1～65 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られるインビトロ分化細胞の細胞集団。

【請求項 67】

請求項 66 に記載の細胞集団を含む組成物。

40

【請求項 68】

薬学的に許容され得る担体をさらに含む医薬組成物である、請求項 67 に記載の組成物。

【請求項 69】

中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体への幹細胞の分化を誘導するためのキットであって、

- (a) 少なくとも 1 つの SMAD シグナル伝達阻害剤、
- (b) 少なくとも 1 つの SHH シグナル伝達活性化剤、
- (c) 少なくとも 1 つの Wnt シグナル伝達活性化剤、
- (d) 少なくとも 1 つの Wnt シグナル伝達阻害剤、および
- (e) 少なくとも 1 つの FGF シグナル伝達活性化剤

50

を含む、キット。

【請求項 7 0】

(f) 中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも 1 つのマーカーを発現する分化細胞の集団への幹細胞の分化を誘導するための説明書をさらに含む、請求項 6 9 に記載のキット。

【請求項 7 1】

神経障害を有する対象における少なくとも 1 つの徴候を予防、モデリングおよび／または処置する方法であって、有効量の以下：

(a) 請求項 6 6 に記載の細胞集団；または

(b) 請求項 6 7 もしくは 6 8 に記載の組成物

の 1 つを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 7 2】

前記神経障害が、中脳ドーパミンニューロン機能の低下を特徴とする、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記中脳ドーパミンニューロン機能の低下が年齢に関連する、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記神経障害が、パーキンソニズム、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 1 ～ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記神経障害が、パーキンソニズム、パーキンソン病、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 1 ～ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 6】

神経障害の前記徴候が、振戦、運動緩慢、屈曲姿勢、姿勢不安定性、強直、嚥下障害および認知症からなる群から選択される、請求項 7 1 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

対象において、神経障害を有する対象における少なくとも 1 つの徴候を予防、モデリングおよび／または処置する使用のための、請求項 6 6 に記載の細胞集団または請求項 6 7 もしくは 6 8 に記載の組成物。

【請求項 7 8】

前記神経障害が、中脳ドーパミンニューロン機能の低下を特徴とする、請求項 7 7 に記載の使用のための細胞集団または組成物。

【請求項 7 9】

前記中脳ドーパミンニューロン機能の低下が年齢に関連する、請求項 7 8 に記載の使用のための細胞集団または組成物。

【請求項 8 0】

前記神経障害が、パーキンソニズム、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 7 ～ 7 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための細胞集団または組成物。

【請求項 8 1】

前記神経障害が、パーキンソニズム、パーキンソン病、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 7 ～ 8 0 のいずれか 1 項に記載の使用のための細胞集団または組成物。

【請求項 8 2】

神経障害の前記徴候が、振戦、運動緩慢、屈曲姿勢、姿勢不安定性、強直、嚥下障害および認知症からなる群から選択される、請求項 7 7 ～ 8 1 のいずれか 1 項に記載の使用のための細胞集団または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2020年4月2日に出願された米国仮出願第63／004，138号の優先権を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれ、優先権が主張される。

【0002】

1. 序論

本開示は、中脳ドーパミン (mDA) ニューロンおよびその前駆体を生成する方法、そのような方法によって生成されるmDAニューロンおよびその前駆体、ならびにそのような細胞を含む組成物を提供する。本開示はまた、神経障害を予防、モデリングおよび／または処置するためのmDAニューロンおよびそれを含む組成物の使用を提供する。

10

【背景技術】

【0003】

2. 背景

パーキンソン病 (PD) は、振戦、硬直、および運動緩慢などの周知の運動徴候をもたらすmDAニューロンの喪失を特徴とする (Lees, et al. Lancet 373, 2055-2066 (2009))。腸ニューロン、嗅覚ニューロンまたは皮質ニューロンなどの他の細胞型も影響を受けるが (Del Tredici, et al. Neuropathol Appl Neurobiol 42, 33-50 (2016))、mDAニューロンは、新規な細胞ベース処置の開発 (Barker, et al. Nature reviews Neurology 11, 492-503 (2015); Tabar, et al. Nat Rev Genet 15, 82-92 (2014)) およびPD疾患モデリング (Sanchez-Danes, et al. EMBO Mol Med 4, 380-395 (2012); Miller, et al. Cell stem cell 13, 691-705 (2013); Chung, et al. Stem Cell Reports 7, 664-677 (2016); Reinhardt, et al. Cell stem cell 12, 354-367 (2013); Chung, et al. Science 342, 983-987 (2013); Cooper, et al. Sci Transl Med 4, 141ra190 (2012)) のための重要な焦点であり続ける。ヒトES細胞とiPS細胞の両方を含むヒト多能性幹細胞 (hPSC) は、mDAニューロンをインビトロで取得するために選択される細胞型になっている。ヒトmDA誘導の進歩にもかかわらず、新規プロトコルが必要とされている。細胞治療のために、使用されるべきmDAニューロンの最適なタイプおよび段階についての明確な一致はまだなく、初代胎児DAニューロンに対するhPSC由来DAニューロンの挙動におけるかなりの分子的小および機能的差異がインビトロ (Lamanno, et al. Cell 167, 566-580 e519 (2016)) およびインビボ (Tiklova, et al. Nature communications 10, 581 (2019)) で報告されている。さらに、信頼できる細胞精製戦略はなく、hPSC由来mDAニューロンの細胞生存率は低いままである (移植細胞の約10%) (Sanchez-Danes, et al. EMBO Mol Med 4, 380-395 (2012))。mDA生存率が低いと、臨床細胞投与に変動性が生じ、より広範なPDコミュニティに対するこの技術の日常的な適用が複雑になる可能性がある。これらの問題は、細胞治療および疾患モデリングの両方の用途にとって重要である。

20

30

40

【0004】

ヒト疾患モデリングにおいて、hPSC株にわたるmDAニューロン収量および純度の変動は、疾患関連表現型を検出するためのノイズを導入し、創薬努力を複雑にする。定義されたmDAニューロンサブタイプへのアクセスは、PDにおける細胞型特有の受攻性の機構に関する研究を可能にするであろう (Surmeier, et al. Cold Spring Harb Perspect Med 2, a009290 (2012); Anderegg, et al. FEBS Lett 589, 3714-3726 (2015); Chung, et al. Hum Mol Genet 14, 1709-1

50

725 (2005); Brichta and Greengard. Front Neuroanat 8, 152 (2014)). 規定されたよりロバストなmDAニューロン培養物へのアクセスおよびmDAニューロンサブタイプを駆動する可能性を有することは、PD疾患モデリングにおける努力を大きく加速し、将来のmDAニューロン細胞治療のための改善された製品を可能にし得る。

したがって、改善されたインビボ生存を有し、パーキンソン病などの神経障害の処置に適したmDAニューロンを生成するための改善された方法が依然として必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Lees, et al. Lancet 373, 2055-2066 (2009)

【非特許文献2】Del Tredici, et al. Neuropathol Appl Neurobiol 42, 33-50 (2016)

【非特許文献3】Barker, et al. Nature reviews Neurology 11, 492-503 (2015)

【非特許文献4】Brichta and Greengard. Front Neuroanat 8, 152 (2014)

【非特許文献5】Tabar, et al. Nat Rev Genet 15, 82-92 (2014)

Sanchez-Danes, et al. EMBO Mol Med 4, 380-395 (2012)

【非特許文献6】Miller, et al. Cell stem cell 13, 691-705 (2013)

【非特許文献7】Chung, et al. Stem Cell Reports 7, 664-677 (2016)

【非特許文献8】Reinhardt, et al. Cell stem cell 12, 354-367 (2013)

【非特許文献9】Chung, et al. Science 342, 983-987 (2013)

【非特許文献10】Cooper, et al. Sci Transl Med 4, 141ra190 (2012) La Manno, et al. Cell 167, 566-580 e519 (2016)

【非特許文献11】Tiklova, et al. Nature communications 10, 581 (2019)

【非特許文献12】Sanchez-Danes, et al. EMBO Mol Med 4, 380-395 (2012)

【非特許文献13】Surmeier, et al. Cold Spring Harb Perspect Med 2, a009290 (2012)

【非特許文献14】Anderegg, et al. FEBS Lett 589, 3714-3726 (2015)

【非特許文献15】Chung, et al. Hum Mol Genet 14, 1709-1725 (2005)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

3. 本発明の概要

本開示は、mDAニューロンおよびその前駆体を生成する方法、そのような方法によって生成されるmDAニューロンおよびその前駆体、そのような細胞を含む組成物、ならび

10

20

30

40

50

に、神経障害を予防および／または処置するためのそのような細胞および組成物の使用を提供する。

【0007】

本開示は、幹細胞の分化を誘導するためのインビトロ方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、幹細胞を、少なくとも1つのSmall Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) シグナル伝達阻害剤、少なくとも1つのソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達活性化剤、および少なくとも1つのウィングレス (Wnt) シグナル伝達活性化剤に接触させる工程、ならびに細胞を、少なくとも1つの線維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナル伝達活性化剤および少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させて、中脳ドーパミンニューロン (mDA) またはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する分化細胞の集団を得る工程、を含む。

10

【0008】

特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との接触は、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から少なくとも約5日で開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との接触は、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約15日以内に開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との接触は、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約10日で開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤との接触は、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から10日、11日、12日または13日で開始される。

20

【0009】

特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約1日、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約30日間または最大約25日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間、約15日間、または約20日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、4日間、5日間、6日間、7日間、14日間、15日間、19日間または20日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させる。

30

【0010】

特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から少なくとも約5日で開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から少なくとも約10日で開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約20日以内に開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から18日以内に開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、大部分の中脳ドーパミンニューロン前駆体がある系分裂後ニューロンに分化するまでに開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約10日で開始される。特定の実施形態では、細胞と少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から10日、11日、12日、または13日で開始される。一定の実施形態では、細胞を、少なくとも約1日および／または最大約20日間、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、少なくとも約3日間および／または最大約10日間、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、

40

50

少なくとも4日間および／または最大7日間、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、約5日間、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、4日間、5日間、6日間、または7日間、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤と接触させる。

【0011】

一定の実施形態では、細胞を、約5日間、少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、6日間または7日間、少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤と接触させる。

【0012】

一定の実施形態では、細胞を、約5日間、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、6日間または7日間、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤と接触させる。

【0013】

一定の実施形態では、細胞を、約15日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、細胞を、16日間または17日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤と接触させる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の濃度は、幹細胞との最初の接触から約4日増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の濃度は、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の初期濃度から約200%～約1000%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の濃度は、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の初期濃度から約500%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の濃度は、約1μMから約5μMと約10μMとの間に増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤の濃度は、約6μMの濃度に増加する。

【0014】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、古典的Wntシグナル伝達を阻害することができる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、非古典的Wntシグナル伝達および古典的Wntシグナル伝達を阻害することができる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、IWP2、IWR1-endo、XAV939、IWP-O1、IWP12、Wnt-C59、IWP-L6、ICG-001、LGK-974、IWR-1、ETC-159、iCRT3、IWP-4、サリノマイシン、パモ酸ピルビニウム、iCRT14、FH535、CCT251545、KYA1797K、オウゴン（Wogonin）、NCB-0846、ヘキサクロロフェン、PNU-74654、KY02111、SO3031（KY01-I）、SO2031（KY02-I）、トリプトニド、BC2059、PKF115-584、ケルセチン（Quercetin）、NSC668036、G007-LK、MSAB、LF3、JW55、イソクエルシトリン（Isoquercitrin）、WIKI4、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、IWP2、IWR1-endo、IWP-O1、IWP12、Wnt-C59、IWP-L6、LGK-974、IWR-1、ETC-159、iCRT3、IWP-4、サリノマイシン、パモ酸ピルビニウム、iCRT14、FH535、CCT251545、オウゴン（Wogonin）、NCB-0846、ヘキサクロロフェン、KY02111、SO3031（KY01-I）、SO2031（KY02-I）、BC2059、PKF115-584、ケルセチン（Quercetin）、NSC668036、G007-LK、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、XAV939、ICG-001、PNU-74654、トリプトニド、KYA1797K、MSAB、LF3、JW55、イソクエルシトリン（Isoquercitrin）、WIKI4、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。一定の実施形態では、少なくとも1つの

10

20

30

40

50

Wntシグナル伝達阻害剤は、IWP2を含む。

【0015】

特定の実施形態では、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤は、FGF18、FGF17、FGF8a、FGF8b、FGF4、FGF2、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤は、中脳の拡大を引き起こし、中脳遺伝子発現を上方制御することができる。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤は、FGF18、FGF17、FGF8a、FGF4、FGF2、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤は、FGF18を含む。

10

【0016】

特定の実施形態では、少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤は、TGFβ/Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤、骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達阻害剤、またはそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのTGFβ/Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤は、ALK5の阻害剤を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのTGFβ/Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤は、SB431542、SB431542の誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、SB431542の誘導体はA83-01を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのTGFβ/Activin-Nodalシグナル伝達阻害剤は、SB431542を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのBMPシグナル伝達阻害剤は、LDN193189、Noggin、ドルソモルフィン、LDN193189の誘導体、Nogginの誘導体、ドルソモルフィンの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態において、少なくとも1つのBMP阻害剤は、LDN-193189を含む。

20

【0017】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β(GSK3β)シグナル伝達阻害剤を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤は、CHIR99021、CHIR98014、AMBMP塩酸塩、LP922056、リチウム、デオキシコール酸、BIO、SB-216763、Wnt3A、Wnt1、Wnt5a、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤は、CHIR99021を含む。

30

【0018】

特定の実施形態では、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤は、SHHタンパク質、Smoothenedアゴニスト(SAG)、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、SHHタンパク質は、組換えSHH、修飾N末端SHH、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、N末端に2つのイソロイシンを含む。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、非修飾N末端SHHと少なくとも約90%の配列同一性を有する。特定の実施形態では、非修飾N末端SHHは、非修飾マウスN末端SHHまたは非修飾ヒトN末端SHHである。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、SHHC25IIを含む。特定の実施形態では、SAGは、パルモルファミンを含む。

40

【0019】

特定の実施形態では、分化細胞の少なくとも約80%が、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約15日でFOX A2およびEN1を発現する。特定の実施形態では、分化細胞の約80%超または約90%超が、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から16日でFOX A2およびEN1を発現する。

【0020】

特定の実施形態では、中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1

50

つのマーカーは、EN1、OTX2、TH、NURR1、FOXA2、PITX3、LMX1A、LMO3、SNCA、ADCAP1、CHRNA4、GIRK2、ALDH1A1、SOX6、WNT1、VMAT2、DAT（SLC6A3）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、分化細胞は、PAX6、EMX2、LHX2、SMA、SIX1、PITX2、SIM1、POU4F1、PHOX2A、BARHL1、BARHL2、GBX2、HOXA1、HOXA2、HOXB1、HOXB2、POU5F1、NANOG、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのマーカーを発現しない。

【0021】

特定の実施形態では、本方法は、少なくとも1つの陽性表面マーカーを発現し、少なくとも1つの陰性表面マーカーを発現しない細胞を単離することをさらに含む。特定の実施形態では、少なくとも1つの陽性表面マーカーは、CD171、CD184、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つの陽性表面マーカーは、CD184を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つの陰性表面マーカーは、CD49e、CD99、CD340、およびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つの陰性表面マーカーは、CD49eを含む。特定の実施形態では、本方法は、CD184を発現し、CD49eを発現しない細胞を選別することを含む。

【0022】

特定の実施形態では、幹細胞は、多能性幹細胞である。特定の実施形態では、幹細胞は、非胚性幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、幹細胞は、ヒト幹細胞、非ヒト霊長類幹細胞、または齧歯類幹細胞である。特定の実施形態では、幹細胞は、ヒト幹細胞である。

【0023】

本開示は、本明細書に開示される分化方法によって得られるインビトロ分化細胞の細胞集団を提供する。

【0024】

本開示はさらに、本明細書に開示される細胞集団を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容され得る担体をさらに含む医薬組成物である。

【0025】

さらに、本開示は、幹細胞の中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体への分化を誘導するためのキットを提供する。特定の実施形態では、キットは、(a) 少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤、(b) 少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤、(c) 少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤、(d) 少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤、および(e) 少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤を含む。特定の実施形態では、キットは、(f) 中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する分化細胞の集団への幹細胞の分化を誘導するための説明書をさらに含む。

【0026】

本開示はさらに、対象における神経障害を予防、モデリング、および／または処置する方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、有効量の本明細書中に開示される細胞集団または本明細書中に開示される組成物を対象に投与することを含む。本明細書に開示される細胞集団または本明細書に開示される組成物は、対象における神経障害の予防、モデリングおよび／または処置に使用することができる。特定の実施形態では、神経障害は、中脳ドーパミンニューロン機能の低下を特徴とする。特定の実施形態では、中脳ドーパミンニューロン機能の低下は年齢に関連する。特定の実施形態では、神経障害は、パーキンソニズム、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、神経障害は、パーキンソニズム、パーキンソン病、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、神経障害の徴候は、振戦、運動緩慢、屈曲姿勢、姿勢不安定性、

10

20

30

40

50

強直、嚥下障害および認知症からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

4. 図面の簡単な説明

【図1】図1は、異なるプロトコルを用いて分化させたmDA細胞におけるALDH1A1誘導に対するWntシグナル伝達の効果を示す。FOXA2、LMX1A、EN1、WNT1、OTX2、ALDH1A1およびPAX6のmRNA発現レベルを、FGF18有りまたは無しで、Wntブースト、Wntブースト+IWP2（10日目～16日目）、またはWntブースト+IWP2（12日目～16日目）プロトコルを用いて産生された16日目の分化mDA細胞において評価した。SMA mRNA発現レベルは検出できなかった。

10

【0028】

【図2-1】図2Aおよび図2Bは、FGF18およびIWP2と組み合わせたWntブーストプロトコルが最適なA/PおよびD/Vパターン化mDA前駆体を生成したことを示す。図2Aは、異なるプロトコルを用いた16日目の分化mDA前駆体のFACS分析を示す。細胞を抗EN1および抗FOXA2抗体で染色した。図2Bは、16日目の分化mDAの免疫染色画像を示す。

【図2-2】同上。

【0029】

【図3】図3は、分化細胞におけるマーカー遺伝子の発現に対するIWP2の効果を示す。FOXA2、LMX1A、OTX2、EN1、ALDH1A1、BARHL2、BARHL1、PAX6、ALDH2、およびWNT1のmRNA発現レベルを、12日目から16日目まで、FGF18および／またはIWP2を添加して、または添加せずに、Wntブーストプロトコルを使用して産生された16日目の分化細胞で測定した。

20

【0030】

【図4】図4は、分化細胞におけるマーカー遺伝子の発現に対するIWP2の効果を示す。FOXA2、LMX1A、OTX2、EN1、ALDH1A1、PAX6およびPITX3のmRNA発現レベルを、12日目から16日目まで、FGF18および／またはIWP2を添加して、または添加せずに、Wntブーストプロトコルを使用して産生された40日目の分化細胞で評価した。

30

【0031】

【図5】図5は、二重選別戦略のゲーティングパラダイムを示す。分化mDA細胞を、CD49eマーカータンパク質およびCD184マーカータンパク質の発現に基づいて選別した。

【0032】

【図6】図6は、選別された40日目の分化CD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞の形態を示す。WntブーストまたはWntブースト+FGF18/IWP2プロトコル（12日目～16日目）でのインビトロ分化の25日目に細胞を選別した。

【0033】

【図7】図7は、選別された40日目の分化CD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞におけるドーパミンニューロンマーカー遺伝子のmRNA発現を示す。WntブーストまたはWntブースト+FGF18/IWP2プロトコル（12日目～16日目）でのインビトロ分化の25日目に細胞を選別した。

40

【0034】

【図8】図8は、選別された40日目の分化CD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞における非ドーパミンニューロンマーカー遺伝子のmRNA発現を示す。WntブーストまたはWntブースト+FGF18/IWP2プロトコル（12日目～16日目）でのインビトロ分化の25日目に細胞を選別した。

【0035】

50

【図 9-1】図 9 A～図 9 C は、選別された 40 日目の分化 CD 49 弱 / CD 18 4 弱細胞および CD 49 弱 / CD 18 4 強細胞の代表的な免疫染色画像を示す。図 9 A は、FOXA 2、TH および MAP 2 の発現を示す。図 9 B は、ALDH 1 A 1、EN 1 および TH の発現を示す。図 9 C は、ALDH 1 A 1、EN 1 および TH の発現を示す。Wnt ブーストまたは Wnt ブースト + FGF 18 / IWP 2 プロトコル（12 日目～16 日目）でのインビトロ分化の 25 日目に細胞を選別した。

【図 9-2】同上。

【0036】

【図 10】図 10 A～図 10 B は、細胞をマウスに移植した後の分化細胞の代表的な免疫染色画像を示す。Wnt ブーストまたは Wnt ブースト + FGF 18 / IWP 2（12 日目～16 日目）プロトコルを用いて分化細胞を得て、マウスに移植した。移植細胞を移植の 1 ヶ月後に免疫染色した。hNCAM、TH および ALDH 1 A 1 の発現を評価した（図 10 A）。Ki 67 の発現も評価した（図 10 B）。

10

【0037】

【図 11-1】図 11 A～図 11 C は、細胞をマウスに移植した後の分化細胞の代表的な免疫染色画像を示す。Wnt ブーストまたは Wnt ブースト + FGF 18 / IWP 2（12 日目～16 日目）プロトコルを用いて分化細胞を得て、マウスに移植した。移植細胞を移植の 1 ヶ月後に免疫染色した。図 11 A は、SC 121 の発現を示す。図 11 B は、TH および Nurrl - GFP の発現を示す。図 11 C は、ALDH 1 A 1 および SOX 6 - RFP の発現を示す。

20

【図 11-2】同上。

【0038】

【図 12】図 12 は、分化細胞におけるマーカー遺伝子の発現に対する IWP 2 の効果を示す。マーカー遺伝子の mRNA 発現レベルを、12 日目から 16 日目まで、FGF 18 および / または IWP 2 を添加して、または添加せずに、Wnt ブーストプロトコルを使用して産生された 16 日目の分化細胞で測定した。

【0039】

【図 13】図 13 は、分化細胞におけるマーカー遺伝子の発現に対する IWP 2 の効果を示す。様々な遺伝子の mRNA 発現レベルを、12 日目から 16 日目まで、FGF 18 および / または IWP 2 を添加して、または添加せずに、Wnt ブーストプロトコルを使用して産生された 40 日目の分化細胞で評価した。

30

【0040】

【図 14】図 14 A および図 14 B は、12 日目から 16 日目まで、FGF 18 および / または IWP 2 を添加して、または添加せずに、Wnt ブーストプロトコルを使用して産生された 60 日目の分化細胞の免疫蛍光染色の代表的な画像を示す。図 14 A は、各条件について、FOXA 2、TH および MAP 2 を発現する 60 日目の分化細胞の免疫染色画像を示す。図 5 B は、EN 1 および TH をマークする異なる染色パネルを示し、60 日目における TH⁺ドーパミンニューロン間の EN 1 の差次的発現を示す。

【0041】

【図 15】図 15 は、選別された 40 日目の分化 CD 49 弱 / CD 18 4 弱細胞および CD 49 弱 / CD 18 4 強細胞におけるマーカー遺伝子の mRNA 発現を示す。Wnt ブーストまたは Wnt ブースト + FGF 18 / IWP 2 プロトコル（12 日目～16 日目）でのインビトロ分化の 25 日目に細胞を選別した。

40

【0042】

【図 16】図 16 は、選別された 40 日目の分化 CD 49 弱 / CD 18 4 弱細胞および CD 49 弱 / CD 18 4 強細胞におけるマーカー遺伝子の mRNA 発現を示す。Wnt ブーストまたは Wnt ブースト + FGF 18 / IWP 2 プロトコル（12 日目～16 日目）でのインビトロ分化の 25 日目に細胞を選別した。

【0043】

【図 17】図 17 は、選別された 60 日目の分化 CD 49 弱 / CD 18 4 弱細胞および C

50

D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞の代表的な免疫染色画像を示す。W n t ブーストまたはW n t ブースト + F G F 1 8 / I W P 2 プロトコル（1 2 日目～1 6 日目）でのインビトロ分化の2 5 日目に細胞を選別した。

【0 0 4 4】

【図 1 8】図 1 8 は、選別された6 0 日目の分化C D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞の代表的な免疫染色画像を示す。W n t ブーストまたはW n t ブースト + F G F 1 8 / I W P 2 プロトコル（1 2 日目～1 6 日目）でのインビトロ分化の2 5 日目に細胞を選別した。

【0 0 4 5】

【図 1 9】図 1 9 は、1 2 日目から1 6 日目までI W P 2 およびF G F 1 8 を添加して、または添加せずに、および1 7 日目から3 0 日目までI W P 2 を添加して、または添加せずに、W n t ブーストプロトコルを使用して産生された3 0 日目の分化細胞におけるマーカー遺伝子のm R N A 発現を示す。

【0 0 4 6】

【図 2 0】図 2 0 は、1 2 日目から2 5 日目まで、または1 2 日目から1 6 日目まで、I W P 2 を添加して、または添加せずに、および1 2 日目から1 6 日目までのF G F 1 8 を添加して、または添加せずに、W n t ブーストプロトコルから産生された2 5 日目の分化細胞のF A C S 媒介選別を示す。

【0 0 4 7】

【図 2 1】図 2 1 は、選別された2 8 日目の分化C D 4 9 弱 / C D 1 8 4 弱細胞およびC D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞におけるマーカー遺伝子のm R N A 発現を示す。1 2 日目から2 5 日目まで、または1 2 日目から1 6 日目まで、I W P 2 を添加して、または添加せずに、および1 2 日目から1 6 日目までF G F 1 8 を添加して、または添加せずに、W n t ブースト下でインビトロ分化の2 5 日目に細胞を選別した。

【0 0 4 8】

【図 2 2】図 2 2 は、選別された2 8 日目の分化C D 4 9 弱 / C D 1 8 4 弱細胞およびC D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞における非ドーパミンニューロンマーカー遺伝子のm R N A 発現を示す。1 2 日目から2 5 日目まで、または1 2 日目から1 6 日目まで、I W P 2 を添加して、または添加せずに、および1 2 日目から1 6 日目までF G F 1 8 を添加して、または添加せずに、W n t ブースト下でインビトロ分化の2 5 日目に細胞を選別した。

【0 0 4 9】

【図 2 3】図 2 3 は、選別された2 8 日目の分化C D 4 9 弱 / C D 1 8 4 弱細胞およびC D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞の免疫染色画像を示す。1 2 日目から2 5 日目まで、または1 2 日目から1 6 日目まで、I W P 2 を添加して、または添加せずに、および1 2 日目から1 6 日目までF G F 1 8 を添加して、または添加せずに、W n t ブースト下でインビトロ分化の2 5 日目に細胞を選別した。

【0 0 5 0】

【図 2 4】図 2 4 は、細胞をマウスに移植した後の分化細胞の代表的な免疫染色画像を示す。W n t ブーストまたはW n t ブースト + F G F 1 8 / I W P 2 （1 2 日目～1 6 日目）プロトコルを用いて分化細胞を得て、マウスに移植した。移植細胞を移植の1 ヶ月後に免疫染色した。F O X A 2、S C 1 2 1、A L D H 1 A 1、E N 1 およびK i 6 7 の発現を評価した。

【0 0 5 1】

【図 2 5】図 2 5 は、細胞をマウス脳に移植した後の分化細胞の代表的な免疫染色画像を示す。W n t ブーストまたはW n t ブースト + F G F 1 8 / I W P 2 （1 2 日目～1 6 日目）プロトコルを用いて分化細胞を得て、マウスに移植した。移植された細胞を移植の1 ヶ月後に免疫染色し、K i 6 7 によってマークされた任意の増殖細胞について評価した。

【0 0 5 2】

【図 2 6】図 2 6 は、ドーパミン前駆体の凍結バッチのマウス線条体内移植片の代表的な免疫染色画像を示す（分化1 6 日目）。W n t ブースト + F G F 1 8 / I W P 2 （1 2 日目～1 6 日目）プロトコルを用いて、1 6 日目の分化細胞を得て、制御速度凍結機を用い

10

20

30

40

50

て凍結した。凍結細胞を解凍し、NOD-SCIDマウスの線条体に直接移植した。移植細胞を移植の1ヶ月後に免疫染色した。

【0053】

【図27】図27は、細胞をマウスに移植した後の分化細胞の代表的な免疫染色画像を示す。Wntブースト+FGF18/IWP2(12日目~16日目)プロトコルを用いて分化細胞を得て、マウスに移植した。移植細胞を移植の4ヶ月後に免疫染色した。

【0054】

【図28】図28は、選別されたCD49^弱/CD184^強細胞をマウスに移植した後の分化細胞の代表的な免疫染色画像を示す。WntブーストまたはWntブースト+FGF18/IWP2プロトコル(12日目~16日目)でのインビトロ分化の25日目に細胞を選別し、マウスに移植した。移植細胞を移植の1ヶ月後に免疫染色した。

10

【0055】

【図29】図29は、TH陽性細胞のうちのPITX3およびNURR1の代表的なRNA蛍光in-situ(FISH)画像を示す。mRNAシグナルを細胞内のドットで測定し、分化中の35日目、59日目および82日目に斑点の数を定量し、Wntブースト+FGF18/IWP2(12日目~16日目)プロトコルを使用して分化細胞を得た。

【発明を実施するための形態】

【0056】

5. 詳細な説明

本開示は、mDAニューロンおよびその前駆体を生成する方法、そのような方法によって生成されるmDAニューロンおよびその前駆体、そのような細胞を含む組成物、ならびに、神経障害を予防および/または処置するためのその使用を提供する。

20

【0057】

Wntシグナル伝達は、mDAニューロンの仕様にとって重要である。本発明者らの以前の研究は、WntブーストがEN1の強い誘導ならびに後脳および視床下および前脳の両方の運命の抑制をもたらすことを示している。例えば、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第2016/196661号に開示されているWntブースト方法を参照されたい。しかしながら、長期化したWntシグナル伝達は、mDAニューロンの分化およびサブタイプの特異性を妨害し得る。さらに、PITX3およびALDH1A1の発現は、以前の分化プロトコルでは最適以下のレベルである。本開示は、Wnt阻害剤による処理がmDAニューロン誘導を改善し得るという発見に基づく。さらに、Wnt阻害剤によるそのような処理は、EN1および他のmDAニューロンマーカーの発現に悪影響を及ぼさず、例えば、Wnt阻害剤を含む本明細書に開示される分化方法は、EN1および他のmDAニューロンマーカーの持続的発現をもたらす。さらに、Wnt阻害剤による処理は、汚染マーカー(非mDAニューロンマーカー)の出現を増加させない。

30

【0058】

本開示はまた、Wnt阻害剤処理がA9サブタイプニューロンおよびA10サブタイプニューロンのより良好な分離をもたらすという発見に基づいている。特定の実施形態では、Wnt阻害剤処理は、A9サブタイプmDAを示すマーカー(例えば、ALDH1A1)のmRNA発現に影響を与える(例えば、増加させる)。A9サブタイプニューロンを示すマーカーの非限定的な例としては、LMO3、ALDH1A1、SOX6、VGUT2およびNDNFが挙げられる。特定の実施形態では、Wnt阻害剤処理は、インビトロおよびインビボで(EN1+のうちの)ALDH1A1⁺細胞の数を増加させる。ALDH1A1発現は、EN1共発現なしでは高くなり得、ALDH1A1⁺EN1⁻細胞は、必ずしもA9サブタイプニューロンではなく、明確に規定された細胞ではない。Wnt阻害剤処理を含む本明細書に開示される分化方法は、移植後にインビトロおよびインビボでALDH1A1およびEN1の両方を発現する細胞の高い生成をもたらす。特定の実施形態では、Wnt阻害剤処理は、A10サブタイプmDAを示すマーカーのmRNA発現にさらに影響を与える(例えば、増加させる)。A10サブタイプニューロンを示すマーカーの非限定的な例としては、CALB1、CALB2、OTX2、CCK、VGAT(

40

50

S l c 3 2 a 1) および V I P が挙げられる。A 9 および A 1 0 サブタイプマーカーの m R N A 発現の増加は、A 9 および A 1 0 サブタイプニューロンの適切な特定を支持する。例えば、特定の A 1 0 サブタイプニューロンマーカー（例えば、C A L B 1 および C A L B 2）は、細胞が A 9 または A 1 0 アイデンティティを示すことが適切に特定された場合にのみ見ることができる。

【0059】

さらに、W n t 阻害剤処理は、増殖を減少させ、m D A ニューロン成熟マーカーの発現を増加させることができる。m D A ニューロン成熟マーカーの非限定的な例としては、D A T、V M A T 2、P I T X 3、C H R N A 6 および C H R N B 3 が挙げられる。

【0060】

さらに、W n t 阻害剤処理は、分化を改善し、残りの K i 6 7 + 増殖細胞を減少させることができ、それにより D A ニューロンの安全性プロファイルを改善することができる。

【0061】

さらに、本明細書中に開示される分化方法（例えば、W n t 阻害剤処理を含む）によって幹細胞に由来する移植されたドーパミンニューロンは、改善された線維増殖、特に、機能的回復を最も効率的に引き起こすと予想される A L D H 1 A 1 線維を有する。

【0062】

さらに、本開示は、本開示の方法によって生成された m D A およびその前駆体がインビボ生存率を改善し、例えば、インビボ移植の数ヶ月後または数年後であっても生存することができるという発見に基づいている。

【0063】

本開示は、ヒト使用を目前とした臨床グレードのプロトコルを含む、幹細胞（例えば、ヒト多能性幹細胞（h P S C））からの神経誘導および m D A ニューロン分化のための改善されたプロトコルを提供する。改善された m D A ニューロン分化プロトコルにアクセスすることにより、当該分野がより少ない細胞数を使用して、より完全な m D A ニューロン回復を達成し、潜在的な副作用を低減することが可能になる。したがって、移植片中の細胞型を汚染する効果が不明なままであるため、本開示のプロトコルは安全性を改善する。最後に、本開示のプロトコルは、ディッシュでのヒト疾患のモデリングにおける m D A ニューロンの精度および再現性を高める。本開示のプロトコルは、m D A 分化の忠実性およびロバスト性を改善する。本開示のプロトコルは、広く適合させることができ、広く使用することができる。

【0064】

本開示の主題の非限定的な実施形態は、本明細書および実施例によって説明される。

【0065】

限定ではなく、開示を明確にする目的で、詳細な説明は以下のサブセクションに分割される。

5. 1. 定義；
5. 2. 幹細胞を分化させる方法；
5. 3. 細胞集団および組成物；
5. 4. 神経障害を予防、モデリング、および／または処置する方法；および
5. 5. キット。

【0066】

5. 1. 定義

本明細書で使用される用語は、一般に、本開示の文脈内および各用語が使用される特定の文脈内で、当該技術分野における通常の意味を有する。特定の用語は、本開示の組成物および方法ならびにそれらを作製および使用する方法を説明する際に実施者に追加の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論じられる。

【0067】

「約（a b o u t）」または「およそ（a p p r o x i m a t e l y）」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容され得る誤差範囲内を意味し、これは値がど

10

20

30

40

50

のように測定または決定されるか、すなわち測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」は、当技術分野の慣例に従って、3標準偏差以内または3標準偏差を超えることを意味することができる。あるいは、「約」は、所与の値の最大20%、例えば最大10%、最大5%、または最大1%の範囲を意味することができる。あるいは、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、一桁以内、例えば、値の5倍以内、または2倍以内を意味し得る。

【0068】

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「シグナル伝達」という用語は、膜受容体タンパク質へのリガンド結合または何らかの他の刺激によって活性化されるかまたは他の方法で影響を受けるタンパク質を指す。シグナル伝達タンパク質の例としては、SMAD、 β -カテニンを含むウィングレス (Wnt) 複合タンパク質、NOTCH、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)、Activin、Nodal、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β (GSK3 β) タンパク質、骨形成タンパク質 (BMP) および線維芽細胞増殖因子 (FGF) が挙げられるが、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の場合、リガンド-受容体相互作用は細胞の応答に直接関連していない。リガンド活性化受容体は、細胞の挙動に対するリガンドの最終的な生理学的効果が生じる前に、最初に細胞内の他のタンパク質と相互作用することができる。多くの場合、受容体の活性化または阻害後に、いくつかの相互作用する細胞タンパク質の連鎖の挙動は変化する。受容体活性化によって誘導される一連の細胞変化全体は、シグナル伝達機構またはシグナル伝達経路と呼ばれる。

【0069】

本明細書で使用される場合、「シグナル」という用語は、細胞の構造および機能の変化を制御する内部因子および外部因子を指す。それらは、本質的に化学的または物理的であり得る。

【0070】

本明細書で使用される場合、「リガンド」という用語は、受容体に結合する分子およびタンパク質、例えばトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)、Activin、Nodal、骨形態形成タンパク質 (BMP)などを指す。

【0071】

本明細書で使用される「阻害剤」は、分子または経路（例えば、Wntシグナル伝達経路、およびSMADシグナル伝達）のシグナル伝達機能を妨害する（例えば、低減させる、減少させる、抑制する、排除する、またはブロックする）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、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与する任意の分子、指定された関連分子、例えばグリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β (GSK3 β)）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。（例えば、限定されないが、本明細書に記載されるシグナル伝達分子を含む）。例えば、SMADシグナル伝達阻害剤は、例えば、SMADと直接接触させること、SMAD mRNAと接触させること、SMADの立体構造変化を引き起こすこと、SMADタンパク質レベルを低下させること、またはシグナル伝達パートナーとのSMAD相互作用を妨害すること、およびSMAD標的遺伝子の発現に影響を及ぼすことによって、機能することができる。

【0072】

阻害剤には、上流のシグナル伝達分子を遮断することによって、生物学的活性（例えばSMAD生物学的活性）を間接的に調節する分子も含まれる（例えば、細胞外ドメイン内では、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、ALK受容体1、2、3、および6の活性化を阻害し、その結果、下流のSMAD活性化を防止するNogginが含まれる。同様に、Chordin、Cerberus、FollistatinもSMADシグナル伝達の細胞外活性化剤を同様に隔離する。膜貫通タンパク質であるBambiは、細胞外TGF β シグナル伝達分子を隔離するための偽受容体とし

ても作用する)。上流または下流のタンパク質を遮断する抗体は、タンパク質シグナル伝達の細胞外活性化剤などを中和するための使用が企図される。前述の例はS M A Dシグナル伝達阻害に関するが、同様または類似の機構を使用して他のシグナル伝達分子を阻害することができる。阻害剤の例としては、S M A Dシグナル伝達阻害についてはL D N 1 9 3 1 8 9 (L D N) およびS B 4 3 1 5 4 2 (S B) (L S B)、ならびにW n t阻害についてはI W P 2が挙げられるが、これらに限定されない。阻害剤は、指定されたシグナル伝達分子の上流の分子に結合してそれに影響を及ぼし、次に指定された分子の阻害を引き起こすことによって誘導される阻害に加えて、競合阻害(別の既知の結合化合物の結合を排除または低減するような様式で活性部位に結合する)およびアロステリック阻害(タンパク質の活性部位への化合物の結合を妨げる様式でタンパク質立体構造を変化させる様式でタンパク質に結合する)に関して記載される。阻害剤は、シグナル伝達標識に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「直接阻害剤」であり得る。

10

【0073】

本明細書で使用される「活性化剤」は、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、S H Hシグナル伝達などを増加、誘導、刺激、活性化、促進または活性化を増強する化合物を指す。

【0074】

本明細書で使用される場合、リガンドに関して「W n t」または「ウィングレス」という用語は、F r i z z l e dおよびL R P D e r a i l e d / R Y K受容体ファミリーの受容体などのW n t受容体と相互作用することができる分泌タンパク質(例えば、ヒトにおけるインテグレーション1)の群を指す。本明細書で使用される場合、「W n tまたはウィングレスシグナル伝達経路」という用語は、 β -カテニンをを用いてまたは用いずに媒介される、W n tファミリーリガンドおよびW n tファミリー受容体、例えばF r i z z l e dおよびL R P D e r a i l e d / R Y K受容体から構成されるシグナル伝達経路を指す。W n tシグナル伝達経路には、古典的W n tシグナル伝達(例えば、 β -カテニンによる媒介)および非古典的W n tシグナル伝達(β -カテニンをを用いない媒介)が含まれる。

20

【0075】

本明細書で使用される場合、「誘導體」という用語は、同様のコア構造を有する化合物を指す。

30

【0076】

本明細書で使用される場合、「細胞の集団」または「細胞集団」という用語は、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個、少なくとも約100個、少なくとも約200個、少なくとも約300個、少なくとも約400個、少なくとも約500個、少なくとも約600個、少なくとも約700個、少なくとも約800個、少なくとも約900個、少なくとも約1000個の細胞を含み得る。集団は、中脳D A前駆体の集団のような1つの細胞型を含む純粋な集団、または未分化幹細胞の集団、例えばA 9サブタイプ中脳ドーパミンニューロンの集団であり得る。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A 9サブタイプ中脳ドーパミンニューロンとA 10サブタイプ中脳ドーパミンニューロンとが混合された細胞集団を含んでもよい。

40

【0077】

本明細書で使用される場合、「幹細胞」という用語は、培養中に無期限に分裂し、特殊化した細胞を生じさせる能力を有する細胞を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞」および「E S C」という用語は、埋入前段階の胚に由来し、培養中に長期間分化することなく分裂することができ、3つの初代胚葉の細胞および組織に発達することが知られている原始(未分化)細胞を指す。ヒト胚性幹細胞は、ヒト胚に由来する胚性幹細胞を指す。本明細書で使用される場合、「ヒト胚性幹

50

細胞」または「hESC」という用語は、培養中に長期間分化することなく分裂することができ、3つの初代胚葉の細胞および組織に発達することが知られている、胚盤胞期までの初期段階のヒト胚に由来する多能性幹細胞のタイプを指す。

【0079】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞株」という用語は、最大数日、数ヶ月から数年にわたって分化せずに増殖を可能にするインビトロ条件下で培養された胚性幹細胞の集団を指す。

【0080】

本明細書中で使用されるとき、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つの発生胚葉に発達する能力のことを指す。

【0081】

本明細書中で使用されるとき、用語「全能性」とは、身体すべての細胞型に加えて、胎盤などの胚体外組織を構成するすべての細胞型を生じさせる能力のことを指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、「複能性」という用語は、身体の一つよりも多い細胞型に発達する能力を指す。

【0083】

本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞」または「iPSC」という用語は、特定の胚性遺伝子（例えば、限定されないが、OCT4、SOX2およびKLF4導入遺伝子）（例えば、参照により本明細書に組み込まれるTakahashi and Yamanaka Cell 126, 663-676 (2006)を参照）を体細胞に導入することによって形成される多能性幹細胞の一種を指す。

【0084】

本明細書で使用される場合、「ニューロン」という用語は、神経系の主要な機能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—軸索および少なくとも一つの樹状突起からなる。ニューロンは、シナプスで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。

【0085】

本明細書で使用される場合、「分化」という用語は、特殊化されていない胚性細胞が、ニューロン、心臓、肝臓、または筋肉細胞などの特殊化された細胞の特徴を獲得するプロセスを指す。分化は、通常、細胞表面に埋め込まれたタンパク質が関与するシグナル伝達経路を介した、細胞の遺伝子と細胞外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。

【0086】

本明細書で使用される場合、「指向性分化」という用語は、中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体などの特定の（例えば、望ましい）細胞型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。幹細胞に関して、「指向性分化」は、幹細胞の多能性状態からより成熟したまたは特殊化した細胞運命への移行を促進するための小分子、成長因子タンパク質、および他の成長条件の使用を指す。

【0087】

本明細書で使用される場合、細胞に関して「分化を誘導する」という用語は、デフォルトの細胞型（遺伝子型および／または表現型）を非デフォルトの細胞型（遺伝子型および／または表現型）に変更することを指す。したがって、「幹細胞において分化を誘導する」とは、幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）が、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の変化）および／または表現型（例えば、mDAニューロンまたはその前駆体のタンパク質マーカー、例えばEN1、OTX2、TH、NURR1、FOXA2、LMX1A、PITX3、LMO3、SNCA、ADCAP1、CHRNA4、ALDH1A1、SOX6、WNT1、DAT、VMAT2およびGIRK2の発現の変化）を有する子孫細胞に分裂するように誘導することを指す。

10

20

30

40

50

【0088】

本明細書で使用される場合、「細胞培養物」という用語は、研究または医学的処理のための人工培地中でのインビトロでの細胞の増殖を指す。

【0089】

本明細書で使用される場合、「培養培地」という用語は、ペトリ皿、マルチウェルプレートなどの培養容器内の細胞を覆い、細胞に栄養を与えて支持するための栄養素を含む液体を指す。培養培地はまた、細胞に所望の変化を生じさせるために添加される成長因子を含み得る。

【0090】

本明細書で使用される場合、1つまたは複数の細胞を、化合物（例えば、少なくとも1つの阻害剤、活性化剤および／または誘導剤）と「接触させる」という用語は、1つまたは複数の細胞が化合物にアクセスすることを可能にする位置に化合物を提供することを指す。接触は、任意の適切な方法を使用して達成することができる。例えば、接触は、所望の濃度を達成するために、例えば細胞培養物の状況で、濃縮形態の化合物を細胞または細胞集団に添加することによって達成することができる。接触はまた、配合された培養培地の成分として化合物を含めることによって達成され得る。

10

【0091】

本明細書で使用される場合、「インビトロ」という用語は、人工環境、および人工環境内で起こるプロセスまたは反応を指す。インビトロ環境としては、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。

20

【0092】

本明細書で使用される場合、「インビボ」という用語は、自然環境（例えば、動物または細胞）、ならびに、胚発生、細胞分化、神経管形成などの自然環境内で起こるプロセスまたは反応を指す。

【0093】

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「発現する」という用語は、マイクロアレイアッセイ、抗体染色アッセイなどのアッセイを使用して観察することができるmRNAまたはタンパク質を作製することを指す。

【0094】

本明細書で使用される場合、「マーカー」または「細胞マーカー」という用語は、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。細胞のマーカーは、1つのマーカーに限定されなくてもよく、マーカーは、指定されたマーカー群が細胞または細胞型を別の細胞または細胞型から識別することができるようなマーカーの「パターン」を指し得る。

30

【0095】

本明細書で使用される場合、本明細書に開示される任意の細胞を指す場合の「に由来する」または「から確立された」または「から分化した」という用語は、任意の操作、例えば限定されないが、単一細胞単離、インビトロ培養、例えばタンパク質、化学物質、放射線、ウイルス感染を用いた処理および／または突然変異誘発、例えばモルフォゲンによるDNA配列のトランスフェクションなど、培養された親細胞に含まれる任意の細胞の選択（連続培養などによる）を使用して、細胞株、組織（解離した胚など）または流体中の最終的な親細胞から得られた（例えば、単離された、精製された、など）細胞を指す。誘導された細胞は、増殖因子に対する応答、サイトカイン、サイトカイン処理の選択された進行、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。

40

【0096】

本明細書における「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、非ヒト霊長類、家畜、スポーツ動物、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としては、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどのげっ歯類；ウサギ；イヌ；ネコ；ヒツジ；豚；ヤギ；ウシ；ウマ；および非ヒト霊長類、例えば類人猿およびサ

50

ルが挙げられる。

【0097】

本明細書で使用される場合、「疾患」という用語は、細胞、組織、または器官の正常な機能を損なうかまたは妨げる任意の症状または障害を指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、「処置する」または「処置」という用語は、処置される個体または細胞の疾患経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、予防のためまたは臨床病理の過程のいずれかで実行することができる。処置の治療効果には、限定されないが、疾患の発生または再発の予防、徴候の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解または予後改善が含まれる。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よる悪化を予防することができるが、処置はまた、障害のリスクがある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徴候の発症を予防することができる。

【0099】

5.2. 幹細胞を分化させる方法

本開示は、幹細胞を、少なくとも1つのSmall Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) シグナル伝達阻害剤（「SMAD阻害剤」と呼ぶ）、少なくとも1つのソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達活性化剤（「SHH活性化剤」と呼ぶ）、および少なくとも1つのウィングレス (Wnt) シグナル伝達活性化剤（Wnt活性化剤」と呼ぶ）に接触させる工程、ならびに細胞を、少なくとも1つの線維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナル伝達活性化剤（「FGF活性化剤」と呼ぶ）および少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤と接触させて、mDAニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する分化細胞を含む細胞集団を得る工程、を含む、肝細胞の分化を誘導する方法を提供する。

【0100】

Wntシグナル伝達阻害剤の使用は、mDAニューロン誘導を改善することができ、例えば、より広範なセットのmDAニューロンの誘導を可能にする。長期化したWntシグナル伝達は、mDAニューロンの分化およびサブタイプの特異性を妨害し得る (Anderson, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2013); 110, E602–610)。例えば、Wntシグナル伝達阻害剤を使用することによるWntシグナル伝達の阻害は、mDAニューロンマーカー (A9サブタイプmDAニューロンマーカー (例えば、ALDH1A1) およびA10サブタイプmDAニューロンマーカー (例えば、CALB1) およびmDAニューロン成熟マーカー (DAT、VMAT2、PITX3、CHRNA6、およびCHRNA3を含むがこれらに限定されない) の発現増加をもたらす。Wntシグナル伝達阻害剤は、A9サブタイプmDAニューロンマーカーの発現に影響を及ぼし得る。A9サブタイプ中脳ドーパミンニューロンを示すマーカーの非限定的な例としては、LMO3、ALDH1A1、SOX6、VGLUT2およびNDNFが挙げられる。特定の実施形態では、Wntシグナル伝達阻害剤は、A9サブタイプmDAニューロンマーカーの発現を増加させる。特定の実施形態では、Wntシグナル伝達阻害剤は、ALDH1A1の発現を増加させる。特定の実施形態では、Wntシグナル伝達阻害剤は、A10サブタイプmDAニューロンマーカーの発現を増加させる。特定の実施形態では、Wntシグナル伝達阻害剤は、CALB1の発現を増加させる。

【0101】

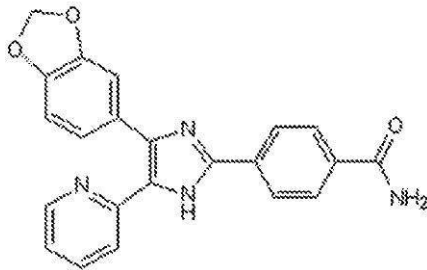
さらに、本明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、改善された線維増殖、減少した残存Ki67+増殖細胞、および改善されたインビボ生存を有し、これらの細胞を治療的使用により適したものにする。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は

き、および／または、受容体および下流エフェクターを遮断することによってそれらのシグナル経路を遮断することができる。TGFβ／Activin-Nodal阻害剤の非限定的な例としては、国際公開第2010/096496号、国際公開第2011/149762、国際公開第2013/067362号、国際公開第2014/176606号、国際公開第2015/077648号、Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar; 27 (3): 275-80, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6; 480 (7378): 547-51、およびChambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1; 30 (7): 715-20 (2012)に記載されるものが挙げられ、これらはすべて、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、少なくとも1つのTGFβ／Activin-Nodal阻害剤は、ALK5の阻害剤、ALK4の阻害剤、ALK7の阻害剤、およびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、TGFβ／Activin-Nodal阻害剤は、ALK5の阻害剤を含む。特定の実施形態では、TGFβ／Activin-Nodal阻害剤は、SB431542、その誘導体およびそれらの混合物から選択される小分子である。「SB431542」は、CAS301836-41-9の番号、C₂₂H₁₈N₄O₃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]-ベンズアミドの名前を有する分子を指し、例えば、以下の構造を参照されたい：

10

20

【化1】



30

【0105】

特定の実施形態では、TGFβ／Activin-Nodal阻害剤は、SB431542を含む。特定の実施形態では、TGFβ／Activin-Nodal阻害剤は、SB431542の誘導体を含む。特定の実施形態では、SB431542の誘導体はA83-01である。

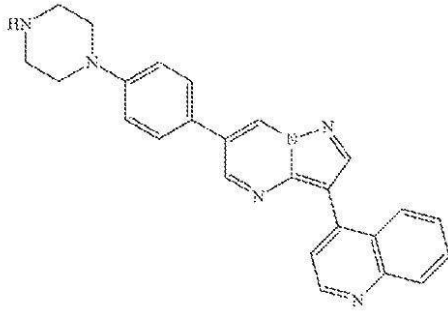
40

【0106】

特定の実施形態では、少なくとも1つのSMAD阻害剤は、BMPシグナル伝達阻害剤（「BMP阻害剤」と呼ばれる）を含む。BMP阻害剤の非限定的な例としては、国際公開第2011/149762号、Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar; 27 (3): 275-80, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6; 480 (7378): 547-51、およびChambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1; 30 (7): 715-20に記載されるものが挙げられ、これらはすべて参照によりその全体が組み込まれる。特定の実施形態では、BMP阻害剤は、LDN193189、Noggin、ドルソモルフィン、それらの誘導体、およびそれらの混合物から選択される小分子である。「LDN193189」は、以下の式を有するC₂₅H₂₂N₆の化学式を有する小分子DM-3189、IUPAC名称4-(6-(4-(ピペラジン-1-イル)フェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル)キノリンを指す。

50

【化 2】



10

【0107】

LDN193189は、SMADシグナル伝達阻害剤として機能することができる。LDN193189はまた、ALK2、ALK3およびALK6、タンパク質チロシンキナーゼ（PTK）の非常に強力な小分子阻害剤であり、I型TGFβ受容体のALK1およびALK3ファミリーのメンバーのシグナル伝達を阻害し、骨形成タンパク質（BMP）BMP2、BMP4、BMP6、BMP7およびActivinサイトカインシグナルを含む複数の生物学的シグナルの伝達の阻害、ならびにその後のSmad1、Smad5およびSmad8のSMADリン酸化をもたらす（Yu et al. (2008) Nat Med 14:1363-1369; Cuny et al. (2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18:4388-4392、参照により本明細書に組み込まれる）。

20

【0108】

特定の実施形態では、BMP阻害剤は、LDN193189を含む。特定の実施形態では、BMP阻害剤は、Nogginを含む。

【0109】

特定の実施形態では、幹細胞は、1つのSMAD阻害剤、例えば、1つのTGFβ/Activin-Nodal阻害剤に曝露される。特定の実施形態では、TGFβ/Activin-Nodal阻害剤は、SB431542である。特定の実施形態では、TGFβ/Activin-Nodal阻害剤は、SB431542の誘導体である。特定の実施形態では、TGFβ/Activin-Nodal阻害剤は、A83-01である。

30

【0110】

特定の実施形態では、幹細胞は、2つのSMAD阻害剤に曝露される。特定の実施形態では、2つのSMAD阻害剤は、TGFβ/Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤である。特定の実施形態では、幹細胞は、SB431542またはA83-01、およびLDN193189またはNogginに曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、SB431542およびLDN193189に曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、A83-01およびLDN193189に曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、SB431542およびNogginに曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、A83-01およびNogginに曝露される。

40

【0111】

特定の実施形態では、幹細胞は、少なくとも約5日間、または少なくとも約10日間、少なくとも1つのSMAD阻害剤に曝露または接触される。特定の実施形態では、幹細胞は、最大約5日間または最大約10日間、少なくとも1つのSMAD阻害剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、約5日間～約10日間、少なくとも1つのSMAD阻害剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、約5日間、少なくとも1つのSMAD阻害剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、6日間、少なくとも1つのSMAD阻害剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、幹細胞は、7日間、少なくとも1つのSMAD阻害剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、細胞は、0日目から6日目まで、少なくとも1つのSMAD阻害剤に接

50

触または曝露される。特定の実施形態では、少なくとも1つのSMA D阻害剤を、0日目から6日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのSMA D阻害剤を、0日目から6日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。

【0112】

特定の実施形態では、細胞を、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞と接触または曝露させるTGFβ / Activin-Nodal阻害剤の濃度は、約1 μM ~ 約20 μM、約1 μM ~ 約10 μM、約1 μM ~ 約15 μM、約10 μM ~ 約15 μM、約5 μM ~ 約10 μM、約5 μM ~ 約15 μM、約5 μM ~ 約20 μM、または約15 μM ~ 約20 μMである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させるTGFβ / Activin-Nodal阻害剤の濃度は、約1 μM ~ 約10 μMである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させるTGFβ / Activin-Nodal阻害剤の濃度は、約5 μMである。約10 μMである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させるTGFβ / Activin-Nodal阻害剤の濃度は、約10 μMである。特定の実施形態では、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤は、SB431542またはその誘導体（例えば、A83-01）を含む。特定の実施形態では、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤は、SB431542を含む。

10

【0113】

特定の実施形態では、細胞を、BMP阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞と接触または曝露させるBMP阻害剤の濃度は、約50 nM ~ 約500 nM、または約100 nM ~ 約500 nM、または約200 nM ~ 約500 nM、または約200 ~ 約300 nM、または約200 nM ~ 約400 nM、または約100 nM ~ 約250 nM、または約100 nM ~ 約250 nM、または約200 nM ~ 約250 nM、または約250 nM ~ 約300 nMである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させるBMP阻害剤の濃度は、約200 nM ~ 約300 nMである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させるBMP阻害剤の濃度は、約150 nM、約200 nM、約250 nM、約300 nM、または約350 nMである。特定の実施形態では、細胞と接触または曝露させるBMP阻害剤の濃度は、約250 nMである。特定の実施形態では、BMP阻害剤は、LDN193189またはその誘導体を含む。特定の実施形態では、BMP阻害剤は、LDN193189を含む。

20

30

【0114】

特定の実施形態では、細胞を、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤に同時に接触または曝露させる。特定の実施形態では、幹細胞を、約5日間、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、幹細胞を、6日間、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、幹細胞を、7日間、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、0日目から6日目まで、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤を、0日目から6日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、TGFβ / Activin-Nodal阻害剤およびBMP阻害剤を、0日目から6日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。

40

【0115】

5.2.3. Wnt 活性化剤

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、Wntシグナル伝達の活性化のためにGSK3βを低下させる。したがって、特定の実施形態では、Wnt活性化剤は、GSK3β阻害剤である。GSK3β阻害剤は、WNTシグナル伝達経路を活性化することができる（例えば、Cadigan, et al., J Cell Sci. 20

50

06; 119: 395-402; Kikuchi, et al., Cell Signaling. 2007; 19: 659-671を参照のこと。その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。本明細書で使用される場合、「グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β阻害剤」または「GSK3β阻害剤」という用語は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3β酵素を阻害する化合物を指す(例えば、Doble, et al., J Cell Sci. 2003; 116: 1175-1186を参照のこと。その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。GSK3β阻害剤の非限定的な例としては、CHIR99021、BIO((3E)-6-ブromo-3-[3-(ヒドロキシアミノ)インドール-2-イリデン]-1H-インドール-2-オン)、AMBMP塩酸塩、LP 922056、SB-216763、CHIR98014、リチウム、3F8、デオキシコール酸、および国際公開第2011/149762号、国際公開第13/067362号、Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1; 30(7): 715-20, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6; 480(7378): 547-51、およびCalder et al., J Neurosci. 2015 Aug 19; 35(33): 11462-81に記載されるもの(これらはすべて参照によりその全体が組み込まれる)が挙げられる。

10

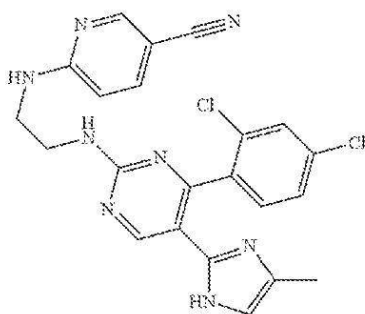
【0116】

Wnt活性化剤の非限定的な例としては、CHIR99021、Wnt3A、Wnt1、Wnt5a、BIO((3E)-6-ブromo-3-[3-(ヒドロキシアミノ)インドール-2-イリデン]-1H-インドール-2-オン)、AMBMP塩酸塩、LP 922056、SB-216763、CHIR98014、リチウム、3F8、デオキシコール酸、および国際公開第2011/149762号、国際公開第13/067362号、Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1; 30(7): 715-20, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6; 480(7378): 547-51、およびCalder et al., J Neurosci. 2015 Aug 19; 35(33): 11462-81に記載されるもの(これらはすべて参照によりその全体が組み込まれる)が挙げられる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、CHIR99021、Wnt3A、Wnt1、Wnt5a、BIO、CHIR98014、リチウム、3F8、デオキシコール酸、それらの誘導体、およびそれらの混合物から選択される小分子である。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、CHIR99021またはその誘導体を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、CHIR99021を含む。「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」としても知られている)は、以下の式を有するIUPAC名称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)ニコチンノニトリルを指す。

20

30

【化3】



40

【0117】

CHIR99021は高度に選択的であり、関連キナーゼおよび非関連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GSK3βに対してIC₅₀=6.7

50

nM、齧歯類 GSK3β ホモログに対してナノモル IC50 値を示す。

【0118】

特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約5日間、少なくとも約10日間、少なくとも約15日間、または少なくとも約20日間、少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約5日間、最大約10日間、最大約15日間、または最大約20日間、少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間～約20日間、約5日間～約15日間、約10日間～約20日間、約5日間～約15日間、または約10日間～約15日間、少なくとも1つのWnt活性化剤と接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約10日間～約20日間、少なくとも1つのWnt活性化剤に接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約15日間、少なくとも1つのWnt活性化剤に接触させる。一定の実施形態では、幹細胞を、16日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤と接触させる。一定の実施形態では、幹細胞を、17日間、少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、0日目から16日目まで、少なくとも1つのWnt活性化剤に接触させる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤を、0日目から16日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤を、0日目から16日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。

10

【0119】

特定の実施形態では、少なくともWnt活性化剤の濃度は、細胞への曝露中に増加する（「Wntブースト」とも呼ばれる）。特定の実施形態では、増加またはWntブーストは、細胞の少なくとも1つのWnt活性化剤への最初の曝露から少なくとも約2日、少なくとも約4日、または少なくとも約5日で開始される。特定の実施形態では、増加またはWntブーストは、細胞の少なくとも1つのWnt活性化剤への最初の曝露から約4日で開始される。

20

【0120】

特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約5日間、または少なくとも約10日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約5日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約5日間、最大約10日間、または最大約15日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約10日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤と接触させる。

30

【0121】

特定の実施形態では、細胞を、約5日間～約15日間、または約5日間～約10日間、または約10日間～約15日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間～約10日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間、約10日間、または約15日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、5日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、6日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、4日目から9日目まで、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約10日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、12日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、13日間、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、4日目から16日目まで、増加した濃度の少なくとも1つのWnt活性化剤

40

50

に接触または曝露させる。

【0122】

特定の実施形態では、Wntブーストの前に細胞に接触または曝露される少なくとも1つのWnt活性化剤の初期濃度は、約5 μ M未満、約3 μ M未満、または約1.5 μ M未満、または約1.5 μ M未満である（約0.01 μ M～約5 μ M、約0.01 μ M～約3 μ M、約0.05 μ M～約3 μ M、約0.1 μ M～約3 μ M、約0.5 μ M～約3 μ M、約0.5 μ M～約2 μ M、約0.5 μ M～約1 μ M、または約0.5 μ M～約1.5 μ Mを含むが、これらに限定されない）。特定の実施形態では、Wntブーストの前に細胞に接触または曝露される少なくとも1つのWnt活性化剤の初期濃度は、約1 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブーストの前に細胞に接触または曝露される少なくとも1つのWnt活性化剤の初期濃度は、約1.5 μ M未満、例えば約1 μ M、約0.1 μ M、約0.2 μ M、約0.3 μ M、約0.4 μ M、約0.5 μ M、約0.6 μ M、約0.7 μ M、約0.8 μ M、または約0.9 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブーストの前に細胞に接触または曝露される少なくとも1つのWnt活性化剤の初期濃度は、約1 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブーストの前に細胞に接触または曝露される少なくとも1つのWnt活性化剤の初期濃度は、約0.5 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブーストの前に細胞に接触または曝露される少なくとも1つのWnt活性化剤の初期濃度は、約0.7 μ Mである。

10

【0123】

特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約3 μ Mまたはそれを超える濃度、約5 μ Mまたはそれを超える濃度、約10 μ Mまたはそれを超える濃度、約15 μ Mまたはそれを超える濃度、または約20 μ Mまたはそれを超える濃度である。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約3 μ M～約15 μ M、約3 μ M～約10 μ M、または約5 μ M～約10 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約5 μ M～約10 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約3 μ M、約3.5 μ M、約4 μ M、約4.5 μ M、約5 μ M、約5.5 μ M、約6 μ M、約6.5 μ M、約7 μ M、約7.5 μ M、約8 μ M、約8.5 μ M、約9 μ M、約9.5 μ M、または約10 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約3 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約6 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約7 μ Mである。特定の実施形態では、Wntブースト後の少なくとも1つのWnt活性化剤の増加した濃度は、約7.5 μ Mである。

20

30

【0124】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約50%～約2000%、または約100%～約1500%、または約150%～約1500%、または約200%～約1500%、または約250%～約1500%、または約300%～約1500%、または約300%～約1000%、または約300%～約400%、または約500%～約1000%、または約800%～約1000%、または約900%～約1000%、または約950%～約1000%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約300%～約1000%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約300%～約500%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約900%～約1000%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約200%、約250%、約300%、約350%、約400%、約450%、約500%、約550%、約600%、約650%、約700%、約7

40

50

50%、約800%、約850%、約900%、約950%、約1000%、約1050%、または約1100%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約200%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約300%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約350%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約500%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約950%増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、細胞に接触または曝露された初期濃度から、約1000%増加する。

10

【0125】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、約1 μ Mから約5 μ M～約10 μ Mに増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、約1 μ Mから約6 μ Mに増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、約1 μ Mから約3 μ M～約5 μ Mに増加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤の濃度は、約1 μ Mから約3 μ Mに増加する。

【0126】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、GSK3 β 阻害剤を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、CHIR99021またはその誘導体を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt活性化剤は、CHIR99021を含む。

20

【0127】

5.2.4. SHH活性化剤

本明細書で使用される場合、「ソニックヘッジホッグ」、「SHH」または「Shh」という用語は、ヘッジホッグと呼ばれる哺乳動物シグナル伝達経路ファミリー内の少なくとも3つのタンパク質のうちの1つであるタンパク質を指し、別のものはデザートヘッジホッグ(DHH)であり、第3のものはインディアンヘッジホッグ(ISHH)である。SHHは、膜貫通分子Patched (PTC) およびSmoothed (SMO) と相互作用することによって、少なくとも2つの膜貫通タンパク質と相互作用する。SHHは、典型的には、PTCに結合し、次いで、シグナル伝達物質としてSMOを活性化させる。SHHの非存在下では、PTCは典型的にはSMOを阻害し、SMOは次に転写リプレッサーを活性化するので、特定の遺伝子の転写は起こらない。SHHが存在し、PTCに結合する場合、PTCはSMOの機能を妨害することができない。SMOが阻害されない場合、特定のタンパク質は、核に入り、特定の遺伝子が活性化されることを可能にする転写因子として作用することができる(Gilbert, 2000 Developmental Biology (Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc., Publishersを参照のこと。特定の実施形態では、SHH活性化剤は、PTCまたはSMOに結合することができる分子または化合物を含む、SHHシグナル伝達経路を活性化することができる任意の分子または化合物を指す。特定の実施形態では、少なくとも1つのSHH活性化剤は、PTCに結合する分子、SMOに結合する分子、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。SHH活性化剤の非限定的な例としては、国際公開第10/096496号、国際公開第13/067362号、Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar; 27(3): 275-80、およびKriks et al., Nature. 2011 Nov 6; 480(7378): 547-51に記載されるものが挙げられる。特定の実施形態では、少なくとも1つのSHH活性化剤は、SHHタンパク質、SMOアゴニスト、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、SHHタンパク質は、組換えSHH、修飾N末端SHH、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、組換えSHHは、N末端断片およびC

30

40

50

末端断片を含む。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、N末端に2つのイソロイシンを含む。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、非修飾N末端SHHと少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%の配列同一性を有する。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、非修飾ヒトN末端SHHと少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%の配列同一性を有する。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、非修飾マウスN末端SHHと少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%の配列同一性を有する。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、SHH C25IIを含む。特定の実施形態では、修飾N末端SHHは、SHH C24IIを含む。

【0128】

SMOアゴニスト(SAG)の非限定的な例としては、パルモルファミン、GSA10および20(S)-ヒドロキシコレステロールが挙げられる。特定の実施形態では、SAGは、パルモルファミンを含む。

【0129】

特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約5日間、または少なくとも約10日間、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約5日間または最大約10日間、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間～約10日間、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、6日間、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、7日間、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞は、0日目から6日目まで、少なくとも1つのSHH活性化剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、少なくとも1つのSHH活性化剤を、0日目から6日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのSHH活性化剤を、0日目から6日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に(毎日)添加する。

【0130】

特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのSHH活性化剤の濃度は、約50 ng/mL～約1000 ng/mL、約100 ng/mL～約1000 ng/mL、約20 ng/mL～約1000 ng/mL、約300 ng/mL～約1000 ng/mL、約400 ng/mL～約1000 ng/mL、約500 ng/mL～約1000 ng/mL、約400 ng/mL～約800 ng/mL、約400 ng/mL～約700 ng/mL、約400 ng/mL～約600 ng/mL、または約500 ng/mL～約600 ng/mLである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのSHH活性化剤の濃度は、約400 ng/mL～約600 ng/mLである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのSHH活性化剤の濃度は、約400 ng/mL、約450 ng/mL、約500 ng/mL、約550 ng/mL、または約600 ng/mLである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのSHH活性化剤の濃度は、約500 ng/mLである。

【0131】

特定の実施形態では、少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤は、SHH C25IIを含む。

【0132】

5.2.5. FGF活性化剤

FGFファミリーには、受容体チロシンキナーゼにシグナル伝達する分泌シグナル伝達タンパク質(分泌FGF)が含まれる。系統発生分析は、22個のFgf遺伝子が、それぞれが2～4個のメンバーを含む7つのサブファミリーに配置され得ることを示唆している。分岐の長さは、各遺伝子間の進化的距離に比例する。

【0133】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF8a、FGF17、FGF18、FGF8b、FGF2、FGF4、およびそれらの誘導体からなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF8a、FGF17、FGF18、FGF2、FGF4、およびそれらの誘導体からなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF8a、FGF17、およびFGF18からなる群から選択される。

【0134】

FGF8サブファミリーは、FGF8a、FGF8b、FGF17およびFGF18からなる。脊椎動物の中脳および小脳の初期のパターン形成は、FGF8a、FGF8b、FGF17およびFGF18を産生する中脳／後脳の形成体によって調節される。FGF8bは、FGF8a、FGF17およびFGF18とは異なって機能することが示されている(Liu et al., Development, 2003 Dec; 130(25): 6175-85)。FGF8bは、r1遺伝子Gbx2を誘導し、経路阻害剤Spry1／2を強く活性化し、中脳遺伝子Otx2を抑制することができる唯一のタンパク質である(Liu 2003)。さらに、FGF8bは、誘導されたGbx2ドメインと中脳の残りのOtx2領域との間の接合部に沿って形成体を伸長させ、小脳の発達と関連する(Liu 2003)。対照的に、FGF8a、FGF17およびFGF18は、中脳の拡大および中脳遺伝子発現の上方制御を引き起こす(Liu 2003)。

【0135】

特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、中脳の拡大を引き起こし、中脳遺伝子発現を上方制御することができる。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、中脳発達を促進することができる。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF8a、FGF17、FGF18、FGF2、FGF4、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF8a、FGF17、FGF18、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF18を含むか、またはFGF18である。

【0136】

特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約1日、少なくとも約3日間、少なくとも約5日間、少なくとも約8日間、または少なくとも約10日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約5日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、少なくとも4日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約5日間(例えば、最大5日間、最大6日間、もしくは最大7日間)、または最大約10日間(例えば、最大8日間、最大9日間、最大10日間、最大11日間、最大12日間)、または最大約15日間、または最大約20日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、少なくとも4日間および／または最大7日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約1日～約20日間、約1日～約15日間、約1日～約5日間、約5日間～約20日間、約5日間～約15日間、または約5日間～約10日間、約10日間～約20日間、少なくとも1つのFGF活性化剤と接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約1日～約10日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約3日間、約5日間、または約8日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約1日～約5日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約5日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約4日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、5日間、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露させる。

【0137】

特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から少なくとも約5日または少なくとも約10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約15日以内または約20日以内に開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から18日以内に開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から少なくとも約5日～約20日、約5日～約20日、約10日～約15日、約10日～約18日、約5日～約15日、または約10日～約20日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約5日～約10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から12日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から13日で開始される。

10

20

【0138】

特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約10日で開始され、かつ、細胞は上記の少なくともFGF活性化剤と、約5日間接触される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から12日または13日で開始され、かつ、細胞は上記の少なくとも1つのFGF活性化剤と、4日間または5日間接触される。特定の実施形態では、細胞は、12日目から16日目まで、少なくとも1つのFGF活性化剤に接触または曝露される。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤を、12日目から16日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤を、12日目から16日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。

30

【0139】

特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのFGF活性化剤の濃度は、約10ng/mL～約500ng/mL、約50ng/mL～約500ng/mL、約100ng/mL～約500ng/mL、約100ng/mL～約400ng/mL、約100ng/mL～約300ng/mL、約100ng/mL～約200ng/mL、または約100ng/mL～約250ng/mLである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのFGF活性化剤の濃度は、約100ng/mL～約200ng/mLである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのFGF活性化剤の濃度は、約100ng/mLである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露される少なくとも1つのFGF活性化剤の濃度は、約200ng/mLである。

40

【0140】

特定の実施形態では、少なくとも1つのFGF活性化剤は、FGF18を含む。

【0141】

5.2.6. Wnt阻害剤

Wntシグナリングは、古典的Wntシグナル伝達および非古典的Wntシグナル伝達

50

を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤は、古典的Wntシグナル伝達を阻害することができる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤は、古典的Wntシグナル伝達と非古典的Wntシグナル伝達の両方を阻害することができる。古典的Wntシグナル伝達と非古典的Wntシグナル伝達の両方を阻害することができるWnt阻害剤の非限定的な例としては、IWP2、IWR1-endo、IWP-O1、Wnt-C59、IWP-L6、IWP12、LGK-974、IWR-1、ETC-159、iCRT3、IWP-4、サリノマイシン、パモ酸ビルビニウム、iCRT14、FH535、CCT251545、オウゴニン (Wogonin)、NCB-0846、ヘキサクロロフェン、KY02111、SO3031 (KY01-I)、SO2031 (KY02-I)、BC2059、PKF115-584、ケルセチン (Quercetin)、NSC668036、G007-LKおよびそれらの誘導体が挙げられる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤は、IWP2、IWR1-endo、XAV939、IWP-O1、Wnt-C59、IWP-L6、LGK-974、IWR-1、Wnt-C59、ETC-159、iCRT3、IWP-4、ICG-001、サリノマイシン、パモ酸ビルビニウム、iCRT14、FH535、CCT251545、KYA1797K、オウゴニン (Wogonin)、NCB-0846、ヘキサクロロフェン、PNU-74654、KY02111、SO3031 (KY01-I)、SO2031 (KY02-I)、トリプトニド、IWP12、BC2059、PKF115-584、ケルセチン (Quercetin)、NSC668036、G007-LK、MSAB、LF3、JW55、イソクエルシトリン (Isoquercitrin)、WIKI4 (Wnt阻害剤キナーゼ阻害剤4)、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、IWP2、IWR1-endo、IWP-O1、IWP12、Wnt-C59、IWP-L6、LGK-974、IWR-1、ETC-159、iCRT3、IWP-4、サリノマイシン、パモ酸ビルビニウム、iCRT14、FH535、CCT251545、オウゴニン (Wogonin)、NCB-0846、ヘキサクロロフェン、KY02111、SO3031 (KY01-I)、SO2031 (KY02-I)、BC2059、PKF115-584、ケルセチン (Quercetin)、NSC668036、G007-LK、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤は、XAV939、ICG-001、PNU-74654、トリプトニド、KYA1797K、MSAB、LF3、JW55、イソクエルシトリン (Isoquercitrin)、WIKI4、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤は、IWP2またはその誘導体を含む。

10

20

30

40

50

【0142】

特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約1日、少なくとも約3日間、少なくとも約5日間、少なくとも約8日間、少なくとも約10日間、少なくとも約15日間、または少なくとも約20日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約5日間、または最大約10日間、または最大約15日間、最大約20日間、最大約25日間、または最大約30日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約1日～約20日間、約1日～約15日間、約1日～約5日間、約5日間～約20日間、約5日間～約15日間、または約5日間～約10日間、約10日間～約20日間、約10日間～約15日間、または約15日間～約20日間、約10日間～約30日間、約10日間～約25日間、約15日間～約30日間、約15日間～約25日間、約20日間～約30日間、約20日間～約25日間、または約25日間～約30日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約1日～約10日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約10日間～約15日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約15日間～約20日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約

実施形態では、細胞を、約5日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約15日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、約20日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、4日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、5日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、6日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、7日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、14日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、15日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、19日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、20日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、細胞を、16日間、17日間、18日間、21日間、22日間、または23日間、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。

10

【0143】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤と接触させる細胞は、mDAニューロン前駆体およびmDAニューロンを含む。

【0144】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から少なくとも約5日または少なくとも約10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約15日以内または約20日以内に開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から少なくとも約5日～約20日、約5日～約20日、約10日～約15日、約5日～約15日、または約10日～約20日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約5日～約10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から10日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から11日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から12日で開始される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から13日で開始される。

20

30

40

【0145】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から約10日で開始され、かつ、細胞は上記の少なくともWnt阻害剤と、約5日間接触される。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤との細胞の接触または細胞の曝露は、少なくとも1つのSMAD阻害剤との細胞の最初の接触または細胞の最初の曝露から12日または13日で開始され、かつ、細胞は上記の少なくとも1つのWnt阻害剤と、4日間または5日間接触される。特定の実施形態では、細胞を、12日目から16日目

50

まで、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤を、12日目から16日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤を、12日目から16日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。特定の実施形態では、細胞を、12日目から25日目まで、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤を、12日目から25日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤を、12日目から25日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。特定の実施形態では、細胞を、12日目から30日目まで、少なくとも1つのWnt阻害剤に接触または曝露させる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤を、12日目から30日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に、または1日おきに添加する。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤を、12日目から30日目まで、細胞を含む細胞培養培地に、すべての日に（毎日）添加する。特定の実施形態では、細胞を、少なくとも1つのWnt阻害剤および少なくとも1つのFGF活性化剤と同時に接触または曝露させる。特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤および少なくとも1つのFGF活性化剤と一緒に、細胞を含む細胞培養培地に添加する。

10

【0146】

特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させる少なくとも1つのWnt阻害剤の濃度は、約0.5 μ M～約20 μ M、約0.5 μ M～約10 μ M、約0.5 μ M～約5 μ M、約0.5 μ M～約1 μ M、約0.5 μ M～約2 μ M、約5 μ M～約10 μ M、約10 μ M～約20 μ M、約1 μ M～約2 μ M、または約1 μ M～約5 μ Mである。特定の実施形態では、細胞に接触または曝露させる少なくとも1つのWnt阻害剤の濃度は、約0.5 μ M～約2 μ Mである。特定の実施形態では、細胞と接触または曝露させる少なくとも1つのWnt阻害剤の濃度は、約1 μ Mである。

20

【0147】

特定の実施形態では、少なくとも1つのWnt阻害剤は、IWP2を含む。

【0148】

5.2.7. 例示的な方法

特定の実施形態では、幹細胞を、少なくとも1つのTGF β /Activin-Nodal阻害剤（例えばSB431542、例えば約10 μ Mの濃度）、少なくとも1つのBMP阻害剤（例えばLDN193189、例えば約250 nMの濃度）、および少なくとも1つのSHH活性化剤（例えばSHH C25II、例えば約500 ng/mLの濃度）と、約5日間（例えば7日間、例えば0日目から6日目まで）接触または曝露させ、細胞を、少なくとも1つのWnt活性化剤（例えばCHIR99021、例えば約1 μ Mの濃度で約5日間（例えば4日間、例えば0日目から3日目まで）、および約6 μ Mの濃度で約5日間（例えば6日間、例えば4日目から9日目まで）、および約3 μ Mの濃度で約5日間（例えば7日間、例えば、10日目から16日目まで）接触させる。細胞を、少なくとも1つのFGF活性化剤（例えばFGF18、例えば約100 ng/mLの濃度）に接触または曝露させ、ここで、細胞と少なくとも1つのFGF活性化剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMAD阻害剤との最初の接触から約10日（例えば10日または12日）で開始され、細胞を少なくとも1つのFGF活性化因子と約5日間（例えば5日間（12日目から16日目まで）または7日間（例えば10日目から16日目まで）接触させる。細胞を、少なくとも1つのWnt阻害剤（例えばIWP2、例えば約1 μ Mの濃度）に接触または曝露させ、ここで、細胞と少なくとも1つのWnt阻害剤との接触は、細胞と少なくとも1つのSMAD阻害剤との最初の接触から約10日（例えば10日または12日）で開始し、細胞を少なくとも1つのWnt阻害剤と約5日間（例えば、5日間（12日目から16日目まで）、7日間（例えば10日目から16日目まで）、約15日間（例えば14日間（12日目から25日目まで）、または約20日間（例えば19日間（12日目から30日目まで）接触させる。

30

40

50

【0149】

5.2.8. 細胞培養培地

特定の実施形態では、上記の阻害剤および活性化剤は、細胞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、限定するものではないが、Knockout（登録商標）Serum Replacement（「KSR」）培地、Neurobasal（登録商標）培地（NB）、N2培地、B-27培地、およびEssential 8（登録商標）／Essential 6（登録商標）（「E8／E6」）培地、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。KSR培地、NB培地、N2培地、B-27培地、E8／E6培地は市販されている。KSR培地は、培養中の未分化hESCを増殖および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。

10

【0150】

特定の実施形態では、細胞培養培地はKSR培地である。KSR培地の成分は、国際公開第2011／149762号に開示されている。特定の実施形態では、KSR培地は、ノックアウトDMEM、ノックアウト血清代替物、L-グルタミン、Pen／Strep、MEMおよび13-メルカプトエタノールを含む。特定の実施形態では、1リットルのKSR培地は、820mLのノックアウトDMEM、150mLのノックアウト血清代替物、10mLの200mM L-グルタミン、10mLのPen／Strep、10mLの10mM MEMおよび55μMの13-メルカプトエタノールを含む。

【0151】

特定の実施形態では、細胞培養培地はE8／E6培地である。E8／E6培地は、ヒト多能性幹細胞の成長および増殖をサポートするフィーダーフリーおよびゼノフリーの培地である。E8／E6培地は、体細胞リプログラミングをサポート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配合のためのベースとして使用することができる。E8／E6培地の一例は、Chen et al., Nat Methods 2011 May; 8(5): 424-9に記載されており、その全体が参照により組み込まれる。E8／E6培地の一例は、国際公開第15／077648号に開示されており、その全体が参照により組み込まれる。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BMP成分を含まないという点でKSR培地とは異なる。したがって、特定の実施形態では、E8／E6培地を使用して本開示の幹細胞を培養してmDAニューロンまたはその前駆体に分化させる場合、少なくとも1つのBMP阻害剤をE8／E6培地に添加する必要はない。特定の実施形態では、E8／E6培地を使用して本開示の幹細胞を培養してmDAニューロンまたはその前駆体に分化させる場合、少なくとも1つのBMP阻害剤をE8／E6培地に添加する。

20

30

【0152】

5.2.9. 分化細胞

特定の実施形態では、本方法は、分化細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%が、mDAニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する、分化細胞の細胞集団を得ることを含む。mDAニューロンまたはその前駆体を示すマーカーの非限定的な例としては、engrailed-1（EN1）、orthodenticleホメオボックス2（OTX2）、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）、核内受容体関連1タンパク質（NURR1）、フォークヘッドボックスタンパク質A2（FOXA2）、およびLIMホメオボックス転写因子1α（LMX1A）、PITX3、LMO3、SNCA、ADCAP1、CHRNA4、ALDH1A1、DAT、VMAT1、SOX6、WNT1、およびGIRK2が挙げられる。

40

【0153】

特定の実施形態では、分化細胞は、細胞と少なくとも1つのSMAD阻害剤との最初の

50

接触から少なくとも約10日（例えば約15日、約20日、約30日、約40日、または約50日）で、mDAニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する。特定の実施形態では、分化細胞は、細胞と少なくとも1つのSMA D阻害剤との最初の接触から約15日（例えば15日、16日、または17日）で、mDAニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する。

【0154】

少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、mDAニューロン誘導を改善することができる。特定の実施形態では、少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、A9サブタイプmDAニューロンマーカー、A10サブタイプmDAニューロンマーカー、およびmDAニューロン成熟マーカーの少なくとも1つの発現を増加させる。特定の実施形態では、少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、ALDH1A1の発現を増加させる。特定の実施形態では、少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、CALB1の発現を増加させる。特定の実施形態では、少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、DATの発現を増加させる。特定の実施形態では、少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、VMAT2の発現を増加させる。特定の実施形態では、少なくともWnt阻害剤による細胞の処理は、DATおよびVMAT2の発現を増加させる。

【0155】

特定の実施形態では、分化細胞の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%）が、幹細胞と少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約15日でALDH1A1を発現する。特定の実施形態では、分化細胞の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%）が、幹細胞と少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約16日でALDH1A1を発現する。特定の実施形態では、分化細胞の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%）が、幹細胞と少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約25日でALDH1A1を発現する。特定の実施形態では、分化細胞の少なくとも約50%（例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%）が、幹細胞と少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約30日でALDH1A1を発現する。

【0156】

さらに、本明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、改善された線維増殖、減少した残存Ki67⁺増殖細胞、および改善されたインビボ生存を有し、これらの細胞を治療的使用により適したものにする。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、少なくとも約2週間、少なくとも約3週間、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約1年、少なくとも約2年、少なくとも約3年、少なくとも約4年、または少なくとも約5年、少なくとも1つのmDAニューロンマーカーの検出可能な発現レベルを有する。特定の実施形態では、本明細書中に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、少なくとも約2週間、少なくとも1つのmDAニューロンマーカーの検出可能な発現レベルを有する。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、最大約1ヶ月、最大約2ヶ月、最大約3ヶ月、最大約4ヶ月、最大約5ヶ月、最大約6ヶ月、最大約1年、最大約2年、最大約3年、最大約4年、または最大約5年、少なくとも1つのmDAニューロンマーカーの検出可能な発現レベルを有することができる。特定の実施形態では、本明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、約1ヶ月、少なくとも1つのmDAニューロンマーカーの検出可能な発現レベルを有する。特定の実施形態では、本

10

20

30

40

50

明細書に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、約2ヶ月、少なくとも1つのmDAニューロンマーカーの検出可能な発現レベルを有する。特定の実施形態では、本明細書中に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、少なくとも約1ヶ月、TH、EN1、NURR1およびALDH1A1からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの検出可能な発現レベルを有する。特定の実施形態では、本明細書中に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、約2ヶ月、TH、EN1、NURR1およびALDH1A1からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの検出可能な発現レベルを有する。特定の実施形態では、本明細書中に開示される方法によって生成されたmDAニューロンまたはその前駆体は、インビボ移植後、少なくとも約2ヶ月、TH、EN1、NURR1およびALDH1A1からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの検出可能な発現レベルを有する。

10

【0157】

特定の実施形態では、本開示の方法に由来する分化細胞は、PAX6、EMX2、LHX2、SMA、SIX1、PITX2、SIM1、POU4F1、PHOX2A、BARHL1、BARHL2、GBX2、HOXA1、HOXA2、HOXB1、HOXB2、POU5F1、NANOG、およびそれらの組み合わせから選択される少なくとも1つのマーカーを発現しないかまたは低発現を有する。

【0158】

特定の実施形態では、細胞を、SMA、SIX1、PITX2、SIM1、POU4F1、および／またはPHOX2Aの発現を減少させるのに有効な濃度および時間で、本明細書に記載の活性化剤および阻害剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、PAX6、BARHL1、および／またはBARHL2の発現を減少させるのに有効な濃度および時間で、本明細書に記載の活性化剤および阻害剤と接触させる。

20

【0159】

特定の実施形態では、分化細胞の少なくとも約80%が、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から約15日でFOX A2およびEN1を発現する。特定の実施形態では、分化細胞の約80%超（例えば、約85%超または約90%超）が、幹細胞と少なくとも1つのSMADシグナル伝達阻害剤との最初の接触から16日でFOX A2およびEN1を発現する。

30

【0160】

5.2.10. 選別方法

特定の実施形態において、本明細書中に開示される分化方法は、mDAニューロンおよびその前駆体を、少なくとも1つまたは少なくとも2つの表面マーカーに基づいて単離することをさらに含む。特定の実施形態では、表面マーカーは陰性表面マーカーであり、細胞は検出可能なレベルの陰性表面マーカーを発現しない。特定の実施形態では、表面マーカーは陽性表面マーカーであり、細胞は検出可能なレベルの陽性表面マーカーを発現する。

【0161】

特定の実施形態では、本明細書中に開示される分化方法は、検出可能なレベルの少なくとも1つの陰性表面マーカーを発現しない細胞を単離することをさらに含む。特定の実施形態では、本明細書中に開示される分化方法は、検出可能なレベルの少なくとも1つの陽性表面マーカーを発現する細胞を単離することをさらに含む。特定の実施形態では、本明細書中に開示される分化方法は、検出可能なレベルの少なくとも1つの陰性表面マーカーを発現せず、かつ、検出可能なレベルの少なくとも1つの陽性表面マーカーを発現する細胞を単離することをさらに含む。

40

【0162】

特定の実施形態では、少なくとも1つの陰性表面マーカーは、CD49e、CD99、CD340、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つの陰性表面マーカーは、CD49eを含む。特定の実施形態では、少な

50

くとも1つの陽性表面マーカーは、CD171、CD184、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、少なくとも1つの陽性表面マーカーは、CD184を含む。

【0163】

特定の実施形態では、本明細書中に開示される分化方法は、検出可能なレベルのCD49eを発現せず、かつ、検出可能なレベルのCD184を発現する細胞を単離することをさらに含む。

【0164】

当技術分野で公知の任意の表面マーカーに基づく細胞単離技術を、本開示の方法において使用することができる。特定の実施形態では、フローサイトメトリーが本開示の単離方法に使用される。

【0165】

5.2.11. mDA前駆体のmDAニューロンへの分化

特定の実施形態では、細胞（例えば、mDA前駆体）を、DAニューロン系統特異的活性化剤および阻害剤、例えば、L-グルタミン、脳由来神経栄養因子（BDNF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、環状アデノシンリン酸（cAMP）、トランスフォーミング成長因子 β （TGF β 、例えばTGF β 3）、アスコルビン酸（AA）、およびDAPT（N-[(3,5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-アラニル-2-フェニル]グリシン-L, L-ジメチルエチルエステルとしても知られている；LY-374973, N-[N-(3,5-ジフルオロフェニルアセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシン-*t*-ブチルエステル；またはN-[N-(3,5-ジフルオロフェニルアセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシン-*t*-ブチルエステル）とさらに接触させる。特定の実施形態では、細胞を、少なくとも約2日間、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、または、少なくとも約10日間またはそれを超える日数、例えば約2日間～約20日間、約3日間～約19日間、約4日間～約18日間、約5日間～約17日間、約6日間～約16日間、約7日間～約15日間、約8日間～約15日間、約9日間～約14日間、または約10日間～約13日間、前述のDAニューロン系統特異的活性化剤および阻害剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、最大約2日間、最大約3日間、最大約4日間、最大約5日間、最大約6日間、最大約7日間、最大約8日間、最大約9日間、または、最大約10日間またはそれを超える期間、前述のDAニューロン系統特異的活性化剤および阻害剤と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間または約8日間、前述のDAニューロン系統特異的活性化剤および阻害剤と接触させる。

【0166】

特定の実施形態では、細胞を、約0.5mM～約5mM、または約1mM～約5mM、または約1.5mM～約2.5mM、または約1mM～約2mMの濃度でL-グルタミンと接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約2mMの濃度でL-グルタミンと接触させる。

【0167】

特定の実施形態では、細胞を、約5ng/mL～約50ng/mL、または約10ng/mL～約50ng/mL、または約10ng/mL～約40ng/mL、または約20ng/mL～約50ng/mL、または約20ng/mL～約40ng/mL、または約10ng/mL～約30ng/mL、または約10ng/mL～約20ng/mL、または約20ng/mL～約30ng/mLの濃度でBDNFと接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約20ng/mLの濃度でBDNFと接触させる。

【0168】

特定の実施形態では、細胞を、約50nM～約500nM、または約100nM～約500nM、または約100nM～約400nM、または約200nM～約400nM、または約200nM～約300nM、または約100nM～約300nMの濃度でアスコル

10

20

30

40

50

ビン酸 (AA) と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約 200 nM の濃度で AA と接触させる。

【0169】

特定の実施形態では、細胞を、約 5 ng/ml ~ 約 50 ng/mL、または約 10 ng/ml ~ 約 50 ng/mL、または約 10 ng/ml ~ 約 40 ng/mL、または約 20 ng/ml ~ 約 50 ng/mL、または約 20 ng/ml ~ 約 40 ng/mL、または約 10 ng/ml ~ 約 30 ng/mL、または約 10 ng/ml ~ 約 20 ng/mL、または約 20 ng/ml ~ 約 30 ng/mL の濃度で GDNF と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約 20 ng/mL の濃度で GDNF と接触させる。

【0170】

特定の実施形態では、細胞を、約 200 nM ~ 約 800 nM、または約 200 nM ~ 約 700 nM、または約 300 nM ~ 約 700 nM、または約 300 nM ~ 約 600 nM、または約 400 nM ~ 約 600 nM、または約 450 nM ~ 約 550 nM の濃度で cAMP と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約 500 nM の濃度で cAMP と接触させる。

【0171】

特定の実施形態では、細胞を、約 0.01 ng/ml ~ 約 5 ng/mL、または約 0.1 ng/ml ~ 約 4 ng/mL、または約 0.5 ng/ml ~ 約 5 ng/mL、または約 1 ng/ml ~ 約 3 ng/mL、または約 1 ng/ml ~ 約 2 ng/mL の濃度で TGFβ3 と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約 1 ng/mL の濃度で TGFβ3 と接触させる。

【0172】

特定の実施形態では、細胞を、約 1 nM ~ 約 50 nM、または約 5 nM ~ 約 50 nM、または約 1 nM ~ 約 20 nM、または約 5 nM ~ 約 20 nM、または約 1 nM ~ 約 10 nM、または約 5 nM ~ 約 10 nM、または約 5 nM ~ 約 15 nM、または約 10 nM ~ 約 20 nM、または約 10 nM ~ 約 30 nM、または約 30 nM ~ 約 50 nM の濃度で DAPT と接触させる。特定の実施形態では、細胞を、約 10 nM の濃度で DAPT と接触させる。

【0173】

特定の実施形態では、分化した中脳 DA 前駆体は、参照によりその全体が組み込まれる米国特許出願公開第 2015/0010514 号に記載されているようにさらに培養される。

【0174】

5.3. 細胞集団および組成物

本開示は、本明細書中、例えばセクション 5.2 に開示される方法によって得られるインビトロ分化細胞の細胞集団を提供する。

【0175】

本開示は、細胞の少なくとも約 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、mDA ニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも 1 つのマーカーを発現する、インビトロ分化細胞の細胞集団を提供する。mDA ニューロンまたはその前駆体を示すマーカーの非限定的な例としては、EN1、OTX2、TH、NURR1、FOXA2、LMX1A、PITX3、LMO3、SNCA、ADCAP1、CHRNA4、SOX6、ALDH1A1、WNT1、DAT、VMAT1、および GIRK2 が挙げられる。本開示はまた、そのような細胞集団を含む組成物を提供する。特定の実施形態において、インビトロ分化細胞は、本明細書中、例えばセクション 5.2 に記載した分化方法によって得られる。

【0176】

特定の実施形態では、分化細胞の約 50% 未満 (例えば、約 45% 未満、約 40% 未満、約 35% 未満、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10%

10

20

30

40

50

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、PAX6、EMX2、LHX2、SMA、SIX1、PITX2、SIM1、POU4F1、PHOX2A、BARHL1、BARHL2、GBX2、HOXA1、HOXA2、HOXB1、HOXB2、POU5F1、NANOG、およびそれらの組み合わせから選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する。

【0177】

さらに、本開示は、本明細書に開示される細胞集団のいずれかを含む組成物を提供する。

【0178】

特定の実施形態では、細胞は、生体適合性足場またはマトリックス、例えば、細胞が対象に埋入または移植された場合に組織再生を促進する生体適合性三次元足場をさらに含む組成物に含まれる。特定の実施形態では、生体適合性足場は、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、ポリペプチドもしくはタンパク質、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、硫酸ヘパリン、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／またはヒドロゲルを含む。(例えば、米国特許出願公開第 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。これらの各々の内容は、参照によりその全体が組み込まれる)。特定の実施形態では、組成物は、中脳 DA 細胞への埋入／移植細胞の成熟を促進するための成長因子をさらに含む。

【0179】

特定の実施形態では、組成物は、約 1×10^4 ～ 約 1×10^{10} 、約 1×10^4 ～ 約 1×10^5 、約 1×10^5 ～ 約 1×10^9 、約 1×10^5 ～ 約 1×10^6 、約 1×10^5 ～ 約 1×10^7 、約 1×10^6 ～ 約 1×10^7 、約 1×10^6 ～ 約 1×10^8 、約 1×10^7 ～ 約 1×10^8 、約 1×10^8 ～ 約 1×10^9 、約 1×10^8 ～ 約 1×10^{10} 、または約 1×10^9 ～ 約 1×10^{10} の細胞集団を含み、細胞が対象に投与される。特定の実施形態では、約 1×10^5 ～ 約 1×10^7 個のその細胞が、対象に投与される。

【0180】

特定の実施形態では、前記組成物は凍結される。特定の実施形態では、前記組成物は、少なくとも 1 つの凍結保護剤、例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO)、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、またはそれらの組み合わせをさらに含むが、これらに限定されない。

【0181】

特定の実施形態では、組成物は、生体適合性足場またはマトリックス、例えば、細胞が対象に埋入または移植された場合に組織再生を促進する生体適合性三次元足場をさらに含む。特定の実施形態では、生体適合性足場は、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、ポリペプチドもしくはタンパク質、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、硫酸ヘパリン、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／またはヒドロゲルを含む。(例えば、米国特許出願公開第 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。これらの各々の内容は、参照によりその全体が組み込まれる)。

【0182】

特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物である。組成物は、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、および多発性硬化症を含む神経変性障害を予防および／または処置するために使用することができる。

【0183】

本開示の主題はまた、本明細書に開示される分化細胞またはそれを含む組成物を含むデバイスを提供する。デバイスの非限定的な例としては、シリンジ、微細ガラス管、定位針およびカニューレが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0184】

5.4. 神経障害を予防、モデリング、および／または処置する方法

本明細書に開示される細胞集団および組成物（例えば、セクション5.3に開示されているもの）は、神経障害を有する対象における少なくとも徴候を予防、モデリングおよび／または処置するために使用することができる。本開示の主題は、神経障害を有する対象における少なくとも徴候を予防、モデリングおよび／または処置する方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、神経障害に罹患している対象に、有効量の本開示の幹細胞由来mDAニューロンまたはその組成物を投与することを含む。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容され得る担体をさらに含む医薬組成物である。

【0185】

特定の実施形態では、神経障害は、中脳ドーパミンニューロン機能の低下を特徴とする。中脳ドーパミンニューロン機能の低下は、年齢に関連し得る。

【0186】

特定の実施形態では、神経障害の徴候は、振戦、運動緩慢、屈曲姿勢、姿勢不安定性、強直、嚥下障害および認知症からなる群から選択される。

【0187】

神経障害の非限定的な例としては、パーキンソニズム、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病および多発性硬化症が挙げられる。特定の実施形態では、神経障害はパーキンソニズムまたはパーキンソン病である。

【0188】

特定の実施形態では、神経障害はパーキンソン病である。パーキンソン病の主な運動徴候には、例えば、手、腕、脚、顎および顔の振戦、運動緩慢または動きの遅さ、四肢および体幹の強直または凝り、ならびに姿勢不安定性またはバランスおよび協調障害が含まれるが、これらに限定されない。

【0189】

特定の実施形態では、神経障害は、運動を制御する脳の一部である基底核におけるドーパミンの欠乏に関連する疾患を指すパーキンソニズム疾患である。徴候としては、振戦、運動緩慢（極端な動きの遅さ）、屈曲姿勢、姿勢不安定性、および強直が挙げられる。パーキンソニズム疾患の非限定的な例としては、皮質基底核変性症、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、および進行性核上性麻痺が挙げられる。

【0190】

細胞または組成物は、神経障害を予防、モデリングおよび／または処置するために、対象に全身的にまたは直接投与または提供することができる。特定の実施形態では、細胞または組成物は、目的の器官（例えば、中枢神経系（CNS））に直接注入される。特定の実施形態では、細胞または組成物は、線条体に直接注射される。

【0191】

細胞または組成物は、任意の生理学的に許容され得るビヒクル中で投与することができる。細胞または組成物は、局所注射、同所性（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。特定の実施形態では、細胞または組成物を、同所性（OT）注射を介して神経変性障害に罹患している対象に投与する。

【0192】

細胞または組成物は、滅菌液体製剤、例えば、選択されたpHに緩衝され得る等張水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液または粘性組成物として適宜提供され得る。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のに幾分便利である。一方、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、適切な粘度範囲内で配合することができる。液体または粘性組成物は担体を含むことができ、担体は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、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有する溶媒または分散媒体であり得る。滅菌注射用溶液は、本開示の主題の組成物、例えば、本開示の幹細胞

10

20

30

40

50

胞由来前駆体を含む組成物を、必要な量の適切な溶媒に、必要に応じて様々な量の他の成分と共に組み込むことによって調製することができる。そのような組成物は、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの適切な担体、希釈剤、または賦形剤と混合していてもよい。組成物を凍結乾燥することもできる。組成物は、投与経路および所望の調製物に応じて、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、ゲル化または増粘添加剤、保存剤、香味剤、着色剤などの補助物質を含有することができる。参照により本明細書に組み込まれる「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE」、第17版（1985）などの標準的なテキストを参照して、過度の実験を行うことなく適切な調製物を調製することができる。

【0193】

抗菌保存剤、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高める様々な添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗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確実にすることができる。注射用医薬形態の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム（aluminum monostearate）およびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0194】

組成物の粘度は、所望であれば、薬学的に許容され得る増粘剤を使用して選択されたレベルに維持することができる。メチルセルロースは、容易かつ経済的に入手可能であり、取り扱いが容易であるため、使用することができる。他の適切な増粘剤としては、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが挙げられる。増粘剤の濃度は、選択された薬剤に依存し得る。重要な点は、選択された粘度を達成する量を使用することである。適切な担体および他の添加剤の選択は、正確な投与経路および特定の剤形、例えば液体剤形の性質（例えば、組成物が、溶液、懸濁液、ゲルまたは他の液体形態、例えば、時間放出形態または液体充填形態に製剤化されるかどうか）に依存する。

【0195】

当業者は、組成物の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、本開示の幹細胞由来前駆体の生存率または有効性に影響を与えないことを認識するであろう。これは、化学的および薬学的原理の当業者にとって、問題を提示しないか、または本開示および本明細書に引用された文献から、標準的なテキストを参照することによって、または単純な実験（過度の実験を含まない）によって問題を容易に回避することができる。

【0196】

細胞の治療的使用に関する1つの考慮事項は、最適な効果を達成するために必要な細胞の量である。最適な効果には、神経変性障害に罹患している対象のCNS領域の再増殖、および／または対象のCNSの機能の改善が含まれるが、これらに限定されない。

【0197】

「有効量」（または「治療有効量」）は、処置時に有益なまたは所望の臨床結果に影響を及ぼすのに十分な量である。有効量は、少なくとも1つの用量で対象に投与することができる。処置に関して、有効量は、神経変性障害の進行を緩和、改善、安定化、逆転もしくは遅延させるか、または神経変性障害の病理学的結果を他の方法で軽減するのに十分な量である。有効量は、一般に、症例ごとに医師によって決定され、当業者の技術の範囲内である。有効量を達成するための適切な投与量を決定するとき、いくつかの要因が通常考慮される。これらの因子には、対象の年齢、性別および体重、処置する症状、症状の重症度、ならびに投与する細胞の形態および有効濃度が含まれる。

【0198】

特定の実施形態では、細胞の有効量は、神経障害に罹患している対象のCNS領域を再増殖させるのに十分な量である。特定の実施形態では、細胞の有効量は、神経変性障害に罹患している対象のCNSの機能を改善するのに十分な量であり、例えば、機能の改善は、正常者のCNSの機能の約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%

10

20

30

40

50

、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約99%または約100%であり得る。

【0199】

投与される細胞の量は、処置される対象によって異なる。特定の実施形態では、約 1×10^4 ～約 1×10^{10} 、約 1×10^4 ～約 1×10^5 、約 1×10^5 ～約 1×10^9 、約 1×10^5 ～約 1×10^6 、約 1×10^5 ～約 1×10^7 、約 1×10^6 ～約 1×10^7 、約 1×10^6 ～約 1×10^8 、約 1×10^7 ～約 1×10^8 、約 1×10^8 ～約 1×10^9 、約 1×10^8 ～約 1×10^{10} 、または約 1×10^9 ～約 1×10^{10} 個の細胞が対象に投与される。特定の実施形態では、約 1×10^5 個～約 1×10^7 個の細胞が、神経障害に罹患している対象に投与される。特定の実施形態では、約 1×10^6 個～約 1×10^7 個の細胞が、神経障害に罹患している対象に投与される。特定の実施形態では、約 1×10^6 個～約 4×10^6 個の細胞が、神経障害に罹患している対象に投与される。有効用量と考えられるものの正確な決定は、特定の対象のサイズ、年齢、性別、体重および症状を含む、各対象に個別の因子に基づいてもよい。投与量は、本開示および当該分野の知識から当業者によって容易に確認することができる。

10

【0200】

5.5. キット

本開示の主題は、幹細胞のmDAニューロンまたはその前駆体への分化を誘導するためのキットを提供する。特定の実施形態では、キットは、(a)少なくとも1つのSMA Dシグナル伝達阻害剤、(b)少なくとも1つのWntシグナル伝達活性化剤、(c)少なくとも1つのSHHシグナル伝達活性化剤、(d)少なくとも1つのFGFシグナル伝達活性化剤、および(e)少なくとも1つのWntシグナル伝達阻害剤を含む。特定の実施形態では、キットは、(f) mDAニューロンまたはその前駆体を示す少なくとも1つのマーカーを発現する分化細胞の集団への幹細胞の分化を誘導するための説明書をさらに含む。

20

【0201】

特定の実施形態では、説明書は、特定の順番で幹細胞を阻害剤（複数可）および活性化剤（複数可）と接触させることを含む。阻害剤（複数可）および活性化剤（複数可）と接触させる順序は、幹細胞の培養に用いられる細胞培養培地によって決定することができる。

30

【0202】

特定の実施形態において、説明書は、幹細胞を、本開示の方法（セクション5.2参照）によって記載されるような阻害剤（複数可）および活性化剤（複数可）と接触させることを含む。

【0203】

特定の実施形態では、本開示は、有効量の本明細書に開示される細胞集団または組成物を単位剤形で含むキットを提供する。特定の実施形態では、キットは、治療用組成物を含有する滅菌容器を含む。そのような容器は、箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスターパック、または当技術分野で公知の他の適切な容器形態であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔、または薬剤を保持するのに適した他の材料で作ることができる。

40

【0204】

特定の実施形態では、キットは、神経障害に罹患している対象に細胞集団または組成物を投与するための説明書を含む。説明書は、神経障害を有する対象における少なくとも徴候を予防、モデリングおよび／または処置するための細胞または組成物の使用に関する情報を含み得る。特定の実施形態では、説明書は、少なくとも1つの以下を含む：治療剤の説明；神経障害またはその徴候を有する対象における少なくとも徴候を予防、モデリングおよび／または処置するための投薬スケジュールおよび投与；注意；警告；適応症；禁忌；過剰投与量情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；および／または参考文献。説明書は、容器に直接（存在する場合）、または容器に貼付されたラベルとして、または容器内

50

または容器と共に供給される別個のシート、パンフレット、カード、またはフォルダとして印刷することができる。

【実施例】

【0205】

6. 実施例

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することによってよりよく理解されるであろう。

【0206】

実施例1：例示的な中脳DAニューロン分化プロトコル

以下は、特定の実施形態による本開示の方法の例示的なプロトコルである。

【0207】

0日目：細胞に、単一細胞でhPSC/hiPSC由来のAccutaseを供給し、Y-薬物を含む培地1にプレーティングしたGeltrexコーティング上に400,000細胞/cm²の密度でプレートした。

【0208】

1日目～2日目：細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地1を二重に供給した。

【0209】

3日目：細胞に培地1を供給した。

【0210】

4日目：細胞に培地2を供給した。CHIRブーストプロトコルについて、CHIR濃度を、WA-09 hESC株媒介性分化のために1μMから6μMに変更した（これは、hPSC/hiPSC株に依存してわずかに変動し得る）。

【0211】

5日目～6日目：細胞に培地2を二重に供給した。

【0212】

7日目：細胞に培地3を供給した。

【0213】

8日目～9日目：細胞に培地3を毎日供給した。

【0214】

10日目：細胞に培地4を供給した。

【0215】

11日目：細胞を37℃で30分間Accutaseとインキュベートした。培地4中、800,000細胞/cm²の密度で細胞をプレートする。

【0216】

12日目：細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地5を供給した。

【0217】

12～16日目：細胞に培地5を毎日供給した。16日目に、FACS分析によって測定して90%を超える細胞がFOXA2⁺/EN⁺であった。

【0218】

16日目～100日目：細胞に培地6を毎日供給した。

【0219】

培地1の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10μM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C5II、および1μM CHIR。

【0220】

培地2の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10mM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C5II、および6μM CHIR。

10

20

30

40

50

【0221】

培地3の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、および6 μ M CHIR。

【0222】

培地4の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、3 μ M CHIR、20 ng/ml BDNF、0.2 μ M アスコルビン酸 (AA)、20 ng/ml GSNF、0.5 mM dcAMP、および1 ng/ml TGF- β 3。

【0223】

培地5の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、3 μ M CHIR、20 ng/ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng/ml GDNF、0.5 mM dcAMP、1 ng/ml TGF- β 3、1 μ M IWP2、および100 ng/ml FGF18。

【0224】

培地6の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20 ng/ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng/ml GDNF、0.5 mM dcAMP、1 ng/ml TGF- β 3、および10 nM DAPT。

【0225】

本実施例に記載のプロトコルを、実施例3において「Wntブースト+FGF18（12日目～16日目）+IWP2（12日目～16日目）」と記す。

【0226】

実施例2：例示的な中脳DAニューロン分化プロトコル

以下は、特定の実施形態による本開示の方法の例示的なプロトコルである。

【0227】

0日目：細胞に、単一細胞でhPSC/hiPSC由来のAccutaseを供給し、Y-薬物を含む培地1にプレーティングしたGeltrexコーティング上に400,000細胞/cm²の密度でプレートした。

【0228】

1日目～2日目：細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地1を二重に供給した。

【0229】

3日目：細胞に培地1を供給した。

【0230】

4日目：細胞に培地2を供給した。CHIRブーストプロトコルについて、CHIR濃度を、WA-09 hESC株媒介性分化のために1 μ Mから6 μ Mに変更した（これは、hPSC/hiPSC株に依存してわずかに変動し得る）。

【0231】

5日目～6日目：細胞に培地2を二重に供給した。

【0232】

7日目：細胞に培地3を供給した。

【0233】

8日目～9日目：細胞に培地3を毎日供給した。

【0234】

10日目：細胞に培地4を供給した。

【0235】

11日目：細胞を37°Cで30分間Accutaseとインキュベートした。培地4中、800,000細胞/cm²の密度で細胞をプレートする。

【0236】

12日目：細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地5を供給した。

10

20

30

40

50

【0237】

12～16日目：細胞に培地5を毎日供給した。16日目に、FACS分析によって測定して90%を超える細胞がFOXA2⁺/EN⁺であった。

【0238】

16日目～100日目：細胞に培地6を毎日供給した。

【0239】

培地1の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10μM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C25II、および1μM CHIR。

【0240】

培地2の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10mM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C25II、および6μM CHIR。

【0241】

培地3の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、および6μM CHIR。

【0242】

培地4の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、1μM IWP2、20ng/ml BDNF、0.2μM アスコルビン酸(AA)、20ng/ml GDNF、0.5mM dbcAMP、および1ng/ml TGF-β3。

【0243】

培地5の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20ng/ml BDNF、0.2μM AA、20ng/ml GDNF、0.5mM dbcAMP、1ng/ml TGF-β3、1μM IWP2、および100ng/ml FGF18。

【0244】

培地6の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20ng/ml BDNF、0.2μM AA、20ng/ml GDNF、0.5mM dbcAMP、1ng/ml TGF-β3、およびDAPT(10nM)。

【0245】

本実施例に記載のプロトコルを、実施例3において「Wntブースト+FGF18(12日目～16日目)+IWP2(10日目～16日目)」と記す。

【0246】

実施例3：mDAニューロン分化中のWnt阻害剤処理

異なるWNTシグナル伝達遺伝子は、ドーパミンニューロンのサブタイプに関連している。アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーA1(ALDH1A1)は、マウスおよびヒトmDAニューロン発達中のhDA2サブタイプ(A9型)のマーカーである((La Manno, et al. Cell 167, 566-580 e519 (2016); Toledo, et al. Br J Pharmacol 174 (24), 4716-4724 (2017))。ALDH1A1は、アルデヒド脱水素酵素ファミリーのタンパク質に属し、アルコール代謝の主要な酸化経路の第2の酵素である。

【0247】

hPSCおよびhiPSCを分化方法に使用した。最初に、異なるプロトコルを用いて分化させたmDA細胞におけるALDH1A1誘導に対するWntシグナル伝達の効果を評価した。FOXA2、LMX1A、EN1、WNT1、OTX2、ALDH1A1およびPAX6のmRNA発現レベルを、FGF18有りまたは無しで、Wntブースト、Wntブースト+IWP2(10日目～16日目)、およびWntブースト+IWP2(12日目～16日目)プロトコルを用いて産生された16日目の分化mDA細胞において評価した(12日目～16日目)(図1)。

10

20

30

40

50

【0248】

「Wntブースト+FGF18（12日目～16日目）+IWP2（12日目～16日目）」プロトコルを実施例1に記載する。

【0249】

「Wntブースト+FGF18（12日目～16日目）+IWP2（10日目～16日目）」プロトコルを実施例2に記載する。

【0250】

本実施例で言及する「Wntブースト」プロトコルを以下に提供する。

【0251】

0日目：細胞に、単一細胞でhPSC／hiPSC由来のAccutaseを供給し、Y-薬物を含む培地1にプレーティングしたGeltrexコーティング上に400,000細胞／cm²の密度でプレートした。

【0252】

1日目～2日目：細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地1を二重に供給した。

【0253】

3日目：細胞に培地1を供給した。

【0254】

4日目：細胞に培地2を供給した。CHIRブーストプロトコルについて、CHIR濃度を、WA-09 hESC株媒介性分化のために1μMから6μMに変更した（これは、hPSC／hiPSC株に依存してわずかに変動し得る）。

【0255】

5日目～6日目：細胞に培地2を二重に供給した。

【0256】

7日目：細胞に培地3を供給した。

【0257】

8日目～9日目：細胞に培地3を毎日供給した。

【0258】

10日目：細胞に培地4を供給した。

【0259】

11日目：細胞を37℃で30分間Accutaseとインキュベートした。培地4中、800,000細胞／cm²の密度で細胞をプレートする。

【0260】

12日目：細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地5を供給した。

【0261】

12～16日目：細胞に培地5を毎日供給した。16日目に、FACS分析によって測定して90%を超える細胞がFOXA2⁺であった。

【0262】

16日目～100日目：細胞に培地6を毎日供給した。

【0263】

培地1の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen／Strept、L-グルタミン、10μM SB、250nM LDN、500ng／ml SHH C25II、および1μM CHIR。

【0264】

培地2の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen／Strept、L-グルタミン、10mM SB、250nM LDN、500ng／ml SHH C25II、および6μM CHIR。

【0265】

培地3の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen／Strept

10

20

30

40

50

rep、L-グルタミン、および6 μ M CHIR。

【0266】

培地4の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、3 μ M CHIR、20 ng/ml BDNF、0.2 μ M アスコルビン酸(AA)、20 ng/ml GDNF、0.5 mM dbcAMP、および1 ng/ml TGF- β 3。

【0267】

培地5の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20 ng/ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng/ml GDNF、0.5 mM dbcAMP、1 ng/ml TGF- β 3。

【0268】

培地6の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20 ng/ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng/ml GDNF、0.5 mM dbcAMP、1 ng/ml TGF- β 3、および10 nM DAPT。

【0269】

SMA mRNA発現レベルは検出できなかった。FGF18およびIWP2と組み合わせたWntブーストプロトコルは、最適なA/PおよびD/Vパターン化前駆体を生成し、90%を超える細胞がFOXA2/EN1二重陽性である(図2A)。図2Aは、異なるプロトコルを用いた16日目の分化mDA前駆体のFACS分析を示す。異なるプロトコルを使用した16日目の分化mDAの免疫染色画像を図2Bに示す。さらに、FGF18有りまたは無しで、Wntブースト、Wntブースト+IWP2(12日目~16日目)プロトコルを用いて産生された分化mDA細胞において、FOXA2、LMX1A、OTX2、EN1、ALDH1A1、BARHL2、BARHL1、PAX6、ALDH2、およびWNT1のmRNA発現レベルを16日目に評価した(図3)。分化細胞におけるマーカー遺伝子の発現に対するIWP2の効果を決定した。図4に示されるように、FOXA2、LMX1A、OTX2、EN1、ALDH1A1、PAX6およびPITX3のmRNA発現レベルを、12日目から16日目まで、FGF18および/またはIWP2を添加して、または添加せずに、Wntブーストプロトコルを使用して40日目の分化細胞で評価した。本開示は、16日目に非常に高い四重極陽性細胞の存在を観察した(FOXA2/LMX1A, OTX2/EN1)。さらに、EN1の高発現はFGF18によって駆動された。さらに、ALDH1A1、WNT1、PITX3、DAT、DDC、VMAT2の発現は、IWP2およびFGF18の添加によって増加したが、IWP2は、Ki67、SMAおよびSIX1の発現を低下させた。60日目の分化細胞の免疫染色画像を収集し、FOXA2、THおよびMAP2(図14A)、ならびにEN1およびTH(図14B)の発現を示した。

【0270】

FGF18およびIWP2を添加して、または添加せずに、Wntブーストプロトコルを使用した25日目の分化細胞のFACS媒介選別を行った(図5)。分化mDA細胞を、CD49eマーカータンパク質およびCD184タンパク質マーカーの発現に基づいて選別した。選別された40日目の分化CD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞の形態を図6に示す。選別された40日目の分化したCD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞において、FOXA2、LMX1A、EN1、NURR1、ALDH1A1、PITX3、DAT、VMAT2、CALB1、CALB2、PITX2、BARHL1、SIM1、PHOX2A、POU4F1のmRNA発現レベルを評価し、分析した(図7および図8)。選別された40日目の分化したCD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞の免疫染色画像を収集し、FOXA2、THおよびMAP2(図9A)、ならびにALDH1A1、EN1およびTH(図9B~9C)の発現を示した。さらに、選別された60日目の分化したCD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞の免疫染色画像を収集し、THおよびEN1(図17)、ならびにALDH1A1、EN1およびTH(図1

10

20

30

40

50

8) の発現を示した。

【0271】

次に、「Wntブースト」プロトコルまたは「Wntブースト+FGF18(12日目～16日目)+IWP2(12日目～16日目)」プロトコルを用いて細胞を分化させ、マウスに移植した。移植細胞を移植の1ヶ月後に免疫染色した。hNCAM、TH、ALDH1A1、FOXA2、SC121、EN1、Ki67の発現を評価した(図10A、10B、および図24)。さらに、移植細胞を移植の2ヶ月後に免疫染色した。SC121、TH、Nurr1、ALDH1A1およびSOX6の発現レベルを決定した(図11A～図11C)。

【0272】

実施例4：WNT阻害の最適化

この実施例は、WNT処置の時間窓および濃度を最適化し、非古典的なシグナル伝達の再活性化が、mDAニューロンの分化または成熟の最適なレベルのために必要であるかどうかを試験するために設計される。予備的データ(図示せず)は、古典的なシグナル伝達のみが阻害が(例えば、古典的なシグナル伝達の選択的阻害剤(例えば、XAV939; タンキラーゼ阻害剤安定化AXIN)を使用することによる)、IWP2処置に匹敵する結果を得るのに十分でないかもしれないことを示唆している。IWP2は、非古典的なシグナル伝達および古典的なシグナル伝達の両方を阻害する。PITX3、DATおよびVMAT2の発現を、qRT-PCRおよび免疫細胞化学(ICC)によって定量する。IWP2(または他の候補WNT阻害剤)は、EN1の発現または汚染マーカー(SIX1およびSMA)の出現に悪影響を及ぼさないことが確認される。最適化された条件を、雄性および雌性を含むhPSC株(3つのhESC株および3つのiPSC株;それぞれ独立した3回以上の分化)(Zimmer, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115, E8775-E8782(2018))で検証する。

【0273】

実施例5：生成されたmDAニューロンのインビトロでの詳細な分子的小および機能的評価

本開示の分化方法によって生成されたmDAニューロン同一性を検証する。この検証には、i) ICCおよびin situ発現によるマーカー発現(ALDH1A1およびPITX3を含む)の詳細な一時的特徴づけ; ii) 経時的バルクRNAseq(0日目、11日目、16日目、25日目、40日目、60日目)の分析; iii) 本開示の分化方法が臨床グレードのmDAニューロンについて以前に確立されたQC(「放出基準」と合致するかまたはそれを超えるかを評価するために、臨床グレードのmDAニューロン分化を最適化するために開発された42個のアレイ化されたqRT-PCRマーカーのセットの使用; iv) 分化の30、50、および70日目に、以前に記載されたように(Krinks, et al. Nature 480, 547-551(2011))、HPLC(電気化学的検出)によってDA放出を測定することによる、mDAニューロンの生化学的成熟度の評価; v) インビトロ電気生理学的試験による、および自律ペースメーカーまたはSag電流の存在を含むmDAニューロン特異的パラメータにおける成熟レベル(例えば、静止膜電位、入力抵抗)の差の決定が含まれる。本開示の分化方法によって開発されたmDAニューロンにおいて放出されるKCL誘発DAは、従来の方法よりも早く、細胞ごとにより高いレベルで起こると予想される。自発的なインビトロネットワーク活性の出現は、高密度マイクロ電極アレイシステム(MEA)を使用して検証される。

【0274】

実施例6：生成されたmDAニューロンのインビボ機能評価

インビボでの生存および機能の評価するために、細胞を16日目に移植する。機能研究を開始する前に、各処置群についてロバストな短期生存を確認するために、非病変NSGマウスの線条体への短期移植(1ヶ月)を行う(n=5/群)。機能的な研究のために、6

10

20

30

40

50

ヶ月の移植研究を6 O H D A 病変ラット宿主 (n u / n u ラット) において行う。群は、i) 生理食塩水対照、i i) W n t ブースト、i i i) W n t ブースト+ F G F 1 8、i v) W n t ブースト+ F G F 1 8 / I W P 2 (n = 1 0 / 群) である。ラットは、前述のように (K r i k s, e t a l. N a t u r e 4 8 0, 5 4 7 - 5 5 1 (2 0 1 1))、移植前に内側前脳束 (M F B) を標的とする片側6 O H D A 病変に供される。回転行動 (> 6 回転 / 分; 毎週2回の連続試験) が安定している動物のみが含まれる。アンフェタミン誘発回転 (毎月) に加えて、ステッピング試験およびシリンダー試験 (K r i k s, e t a l. N a t u r e 4 8 0, 5 4 7 - 5 5 1 (2 0 1 1)) を含むいくつかの非薬物誘発アッセイ (移植前および移植後3ヶ月および6ヶ月) をモニターする。移植は、定位手術および宿主線条体への200x10³細胞 (2μl容量) の注入を介して前述のように行われる (K r i k s, e t a l. N a t u r e 4 8 0, 5 4 7 - 5 5 1 (2 0 1 1))。すべての条件がアンフェタミン誘発行動の有意な回復 (生理食塩水対照と比較して) を誘発するが、F G F 1 8 および F G F 1 8 / I W P 2 プロトコルはより迅速な回復を誘発し、おそらく後期の時点で回転アッセイで過補償 (陰性スコア) を示すと予想される。さらに、本開示の分化方法によって生成されたm D A ニューロンの移植片は、ステッピング試験およびシリンダー試験において向上した回復を示し、これは典型的にはアンフェタミン回転よりも回復が困難なことである。

10

【0275】

実施例7: 組織学的分析

i) 生存しているm D A ニューロンの総数 (移植片中のT H + 細胞の立体的計数); i i) ヒト核抗原 (h N A) との共発現によって確認されたT H + 細胞のヒト同一性; i i i) m D A ニューロン同一性、サブタイプおよび生化学的成熟のマーカー (T H / E N 1 / F O X A 2、T H / D A T / V M A T 2、T H / G I R K 2 / C A L B); i v) 線維増殖の程度 (T H / h N C A M および / または T H / S C 1 2 1 による線条体再神経支配の%); v) 非ドーパミンニューロン (G A B A、セロトニン、グルタミン酸) 11のパーセンテージおよびv i) グリア細胞 (G F A P、オリゴ2) および他の増殖 (K i 6 7) 細胞のパーセンテージに差があるかどうかを調べるために組織学的分析を行う。

20

【0276】

実施例8: m D A ニューロン分化中のW n t 阻害剤処理

この実施例は、実施例3の更新された実験を示す。F G F 1 8 有りまたは無しで、W n t ブースト、W n t ブースト+ I W P 2 (12日目~16日目) プロトコルを用いて産生された分化m D A 細胞において、F O X A 2、L M X 1 A、O T X 2、E N 1、A L D H 1 A 1、W N T 1、B A R H L 1、P A X 6、O T X 2、およびN K X 2 - 2 のm R N A 発現レベルを16日目に評価した。本開示は、I W P 2 曝露が、W n t ブースト条件およびW n t ブースト+ F G F 1 8 条件の両方において、16日目にA L D H 1 A 1 の増加ならびに高い内因性W N T 1 発現をもたらすことを発見した。さらに、I W P 2 曝露はP A X 6 およびN K X 2 - 2 発現を低下させた (図12)。同様の変化が40日目の分化細胞において観察された (図13)。12日目から16日目まで、F G F 1 8 および / または I W P 2 を添加して、または添加せずに、W n t ブーストプロトコルを使用して産生された60日目の分化細胞の免疫染色により、F G F 1 8 および I W P 2 曝露がF O X A 2 およびT H 発現の高い割合を維持し (図14A)、細胞におけるE N 1 およびT H の発現を増加させる (図14B) ことが確認された。

30

40

【0277】

F G F 1 8 および I W P 2 を添加して、または添加せずに、W n t ブーストプロトコルを使用した25日目の分化細胞のF A C S 媒介選別を行った。分化m D A 細胞を、C D 4 9 e マーカータンパク質およびC D 1 8 4 タンパク質マーカーの発現に基づいて選別した。選別された40日目の分化したC D 4 9 弱 / C D 1 8 4 弱細胞およびC D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞において、F O X A 2、L M X 1 A、E N 1、N U R R 1、A L D H 1 A 1、P I T X 3、D A T、V M A T 2、C A L B 1、P I T X 2、B A R H L 1、S I M 1、およびP H O X 2 A のm R N A 発現レベルを評価した (図15および図16)。選別さ

50

れた60日目の分化CD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞の免疫染色画像は、ALDH1A1、EN1、およびTHの発現を示した(図17および図18)。

【0278】

実施例9:Wnt阻害剤への曝露の増加

Wnt阻害剤への曝露の増加を試験した。12日目から25日目までのWnt阻害剤曝露を用いた例示的な中脳DAニューロン分化プロトコルは以下の通りである。

【0279】

0日目:細胞に、単一細胞でhPSC/hiPSC由来のAccutaseを供給し、Y-薬物を含む培地1にプレーティングしたGeltrexコーティング上に400,000細胞/cm²の密度でプレートした。

【0280】

1日目~2日目:細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地1を二重に供給した。

【0281】

3日目:細胞に培地1を供給した。

【0282】

4日目:細胞に培地2を供給した。CHIRブーストプロトコルについて、CHIR濃度を、WA-09 hESC株媒介性分化のために1μMから6μMに変更した(これは、hPSC/hiPSC株に依存してわずかに変動し得る)。

【0283】

5日目~6日目:細胞に培地2を二重に供給した。

【0284】

7日目:細胞に培地3を供給した。

【0285】

8日目~9日目:細胞に培地3を毎日供給した。

【0286】

10日目:細胞に培地4を供給した。

【0287】

11日目:細胞を37°Cで30分間Accutaseとインキュベートした。培地4中、800,000細胞/cm²の密度で細胞をプレートする。

【0288】

12日目:細胞は100%コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地5を供給した。

【0289】

12~16日目:細胞に培地5を毎日供給した。16日目に、FACS分析によって測定して90%を超える細胞がFOXA2⁺/EN⁺であった。

【0290】

16日目~25日目:細胞に培地6を毎日供給した。

【0291】

25日目~100日目:細胞に培地7を毎日供給した。

【0292】

培地1の組成:神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10μM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C25II、および1μM CHIR。

【0293】

培地2の組成:神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10mM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C25II、および6μM CHIR。

【0294】

10

20

30

40

50

培地 3 の組成：神経基礎培地、N 2 サプリメント、B 2 7 サプリメント、Pen / Strep、L-グルタミン、および 6 μ M CHIR。

【0295】

培地 4 の組成：神経基礎培地、B 2 7 サプリメント、Pen / Strep、L-グルタミン、1 μ M IWP 2、20 ng / ml BDNF、0.2 μ M アスコルビン酸 (AA)、20 ng / ml GDNF、0.5 mM dcAMP、および 1 ng / ml TGF- β 3。

【0296】

培地 5 の組成：神経基礎培地、B 2 7 サプリメント、Pen / Strep、L-グルタミン、20 ng / ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng / ml GDNF、0.5 mM dcAMP、1 ng / ml TGF- β 3、1 μ M IWP 2、および 100 ng / ml FGF 18。

【0297】

培地 6 の組成：神経基礎培地、B 2 7 サプリメント、Pen / Strep、L-グルタミン、20 ng / ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng / ml GDNF、0.5 mM dcAMP、1 ng / ml TGF- β 3、1 μ M IWP 2、および DAPT (10 nM)。。

【0298】

培地 7 の組成：神経基礎培地、B 2 7 サプリメント、Pen / Strep、L-グルタミン、20 ng / ml BDNF、0.2 μ M AA、20 ng / ml GDNF、0.5 mM dcAMP、1 ng / ml TGF- β 3、および DAPT (10 nM)。

12 日目から 30 日目までの Wnt 阻害剤曝露を用いた例示的な中脳 DA ニューロン分化プロトコルは以下の通りである。

【0299】

0 日目：細胞に、単一細胞で hPSC / hiPSC 由来の Accutase を供給し、Y-薬物を含む培地 1 にプレーティングした Geltrex コーティング上に 400,000 細胞 / cm^2 の密度でプレートした。

【0300】

1 日目～2 日目：細胞は 100 % コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地 1 を二重に供給した。

【0301】

3 日目：細胞に培地 1 を供給した。

【0302】

4 日目：細胞に培地 2 を供給した。CHIR ブーストプロトコルについて、CHIR 濃度を、WA-09 hESC 株媒介性分化のために 1 μ M から 6 μ M に変更した（これは、hPSC / hiPSC 株に依存してわずかに変動し得る）。

【0303】

5 日目～6 日目：細胞に培地 2 を二重に供給した。

【0304】

7 日目：細胞に培地 3 を供給した。

【0305】

8 日目～9 日目：細胞に培地 3 を毎日供給した。

【0306】

10 日目：細胞に培地 4 を供給した。

【0307】

11 日目：細胞を 37 °C で 30 分間 Accutase とインキュベートした。培地 4 中、800,000 細胞 / cm^2 の密度で細胞をプレートする。

【0308】

12 日目：細胞は 100 % コンフルエンスに達しているはずである。細胞に培地 5 を供給した。

10

20

30

40

50

【0309】

12～16日目：細胞に培地5を毎日供給した。16日目に、FACS分析によって測定して90%を超える細胞がFOXA2⁺/EN⁺であった。

【0310】

16日目～30日目：細胞に培地6を毎日供給した。

【0311】

30日目～100日目：細胞に培地7を毎日供給した。

【0312】

培地1の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10μM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C25II、および1μM CHIR。

10

【0313】

培地2の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、10mM SB、250nM LDN、500ng/ml SHH C25II、および6μM CHIR。

【0314】

培地3の組成：神経基礎培地、N2サプリメント、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、および6μM CHIR。

【0315】

培地4の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、1μM IWP2、20ng/ml BDNF、0.2μM アスコルビン酸(AA)、20ng/ml GDNF、0.5mM dcAMP、および1ng/ml TGF-β3。

20

【0316】

培地5の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20ng/ml BDNF、0.2μM AA、20ng/ml GDNF、0.5mM dcAMP、1ng/ml TGF-β3、1μM IWP2、および100ng/ml FGF18。

【0317】

培地6の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20ng/ml BDNF、0.2μM AA、20ng/ml GDNF、0.5mM dcAMP、1ng/ml TGF-β3、1μM IWP2、およびDAPT (10nM)。

30

【0318】

培地7の組成：神経基礎培地、B27サプリメント、Pen/Strep、L-グルタミン、20ng/ml BDNF、0.2μM AA、20ng/ml GDNF、0.5mM dcAMP、1ng/ml TGF-β3、およびDAPT (10nM)。

【0319】

本開示は、30日目までIWP2への曝露を継続すると、ALDH1A1の発現がさらに誘導されることを発見した(図19)。図20は、12日目から25日目まで、または12日目から16日目まで、IWP2を添加して、または添加せずに、および12日目から16日目までのFGF18を添加して、または添加せずに、Wntブーストプロトコルから産生された25日目の分化細胞のFACS媒介選別戦略を示したものである。選別された28日目の分化CD49^弱/CD184^弱細胞およびCD49^弱/CD184^強細胞におけるマーカー遺伝子のmRNA発現を測定した(図21および図22)。図19の結果と一致して、12日目から25日目までのIWP2への曝露は、ALDH1A1の発現をさらに誘導した。この結果は、免疫蛍光染色を使用して確認された(図23)。

40

【0320】

実施例10：分化細胞のインビボ移植

実施例3の反復インビボ移植実験を行った。IWP2およびFGF18プロトコルでW

50

n t ブーストに従って生成された分化細胞は、線条体神経支配の改善、E N 1 発現の維持、A 9 型 A L D H 1 A 1 + 細胞の増加、ならびに増殖細胞 (K i 6 7 + 細胞) の数の減少などの多くの移植片の利点を有していた (図 2 4 および図 2 5) 。

【0321】

移植の4ヶ月後、I W P 2 および F G F 1 8 プロトコルで W n t ブーストに従って生成された移植細胞は、A 9 型 D A ニューロンの軸索投射を有し、線条体全域のほぼ全体をカバーした (図 2 7) 。

【0322】

次に、選別した C D 4 9 弱 / C D 1 8 4 強細胞をマウスに移植した。W n t ブーストまたは W n t ブースト + F G F 1 8 / I W P 2 プロトコル (12日目~16日目) でのインビトロ分化の25日目に細胞を選別した。移植細胞を移植の1ヶ月後に免疫染色した。移植された細胞は、良好な生存を示し、両方の条件において T H および F O X A 2 を発現する均質な D A 集団を有していた (図 2 8) 。また、P I T X 3 発現を、R N A i n s i t u アッセイを使用して、I W P 2 および F G F 1 8 有り / 無しの W n t ブースト下で (12日目~16日目)、インビトロ分化細胞においても測定した (図 2 9) 。

【0323】

実施例 11 : 分化細胞のインビボ移植

凍結された分化細胞 (既製の細胞源) の移植を調べて、本開示のプロトコルによって生成された細胞の臨床的妥当性を試験した。2つの凍結バッチ細胞を移植し、免疫染色し、移植1ヶ月後に T H および H N A によって評価した (図 2 6) 。移植された細胞は、2つの異なるバッチにおいて T H および F O X A 2 などの m D A マーカーを発現させることによって優れた移植片生存を示し、本開示の方法が臨床的に妥当であることが実証された (図 2 6) 。

【0324】

本開示の主題およびその利点を詳細に説明してきたが、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書において様々な変更、置換および変更を行うことができることを理解されたい。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載のプロセス、機械、製造、ならびに組成物、手段、方法およびステップの特定の実施形態に限定されることを意図しない。当業者であれば、本明細書に記載された対応する実施形態と実質的に同じ機能を実行するかまたは実質的に同じ結果を達成する、現在存在するかまたは今後開発される本開示の主題、プロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、またはステップを本開示の主題に従って利用することができることを本開示から容易に理解するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、そのようなプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法、またはステップをその範囲内に含むことを意図している。

【0325】

様々な特許、特許出願、刊行物、製品説明、プロトコルおよび配列アクセッション番号が本出願全体にわたり引用され、その本開示は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

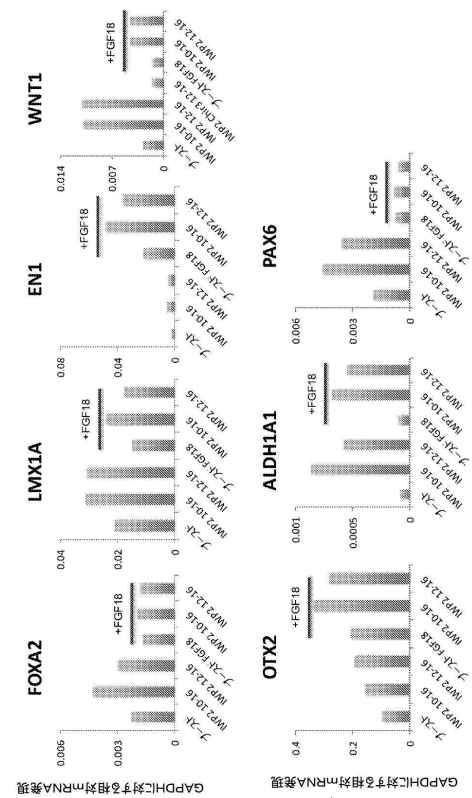


Figure 1

【図 2 - 1】

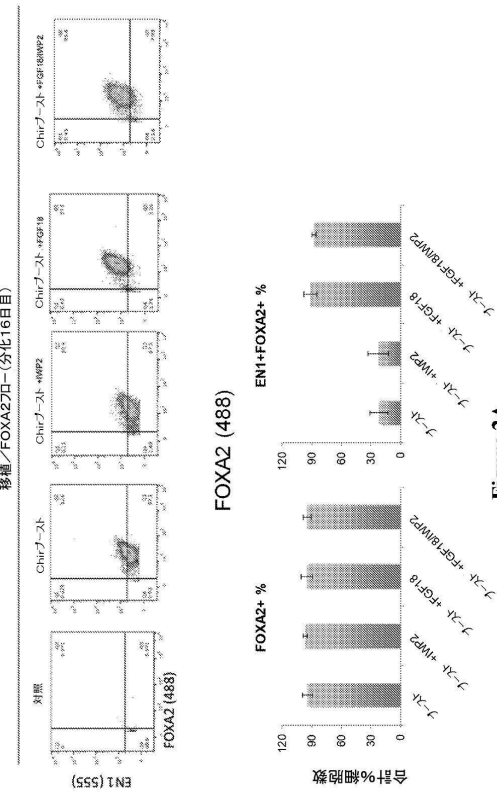


Figure 2A

【図 2 - 2】

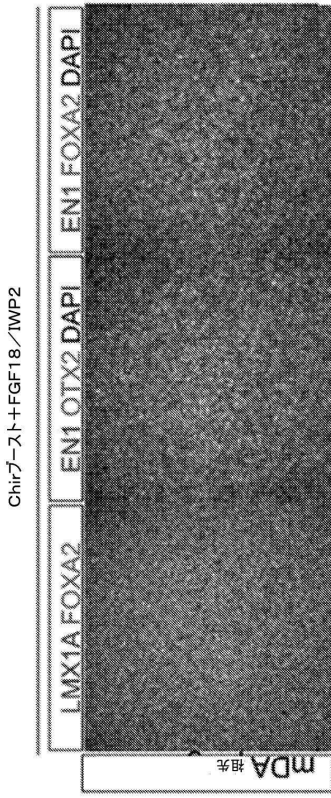


Figure 2B

【図 3】

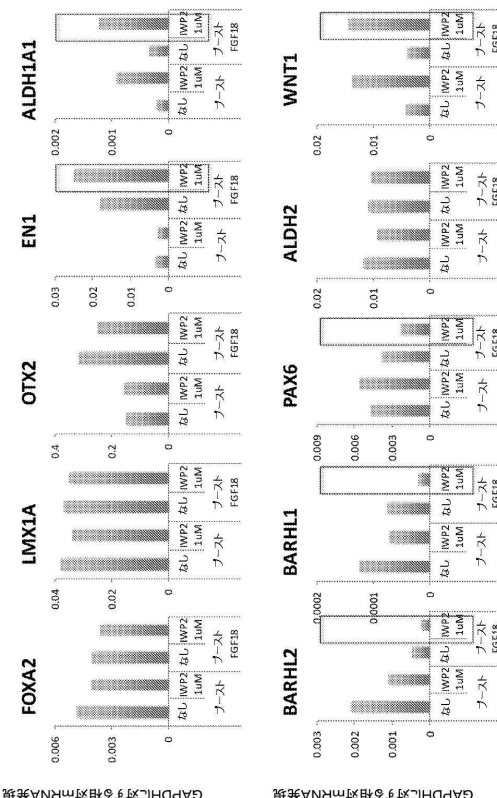


Figure 3

Chirp-18+FGF18+IMR2

【図 4】

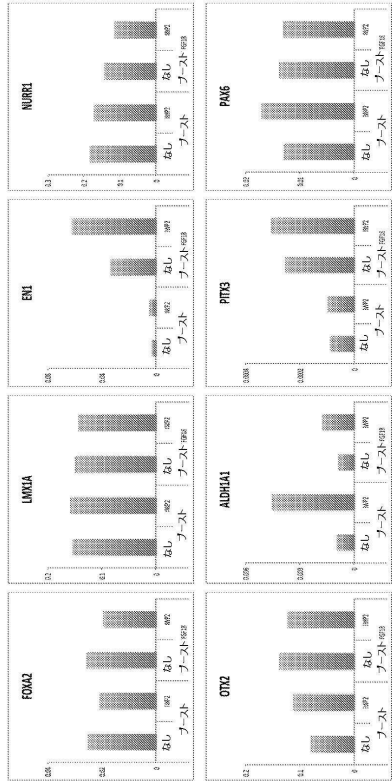
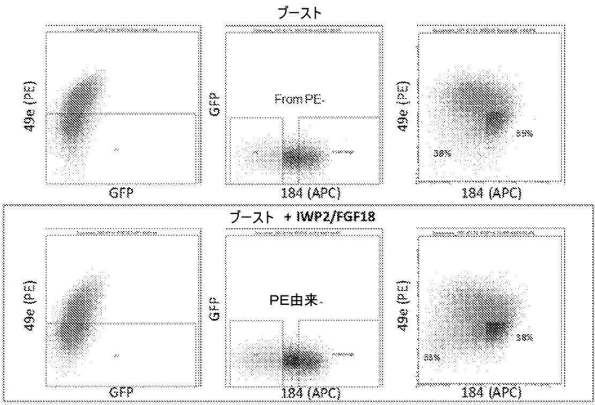


Figure 4

【図 5】

Figure 5

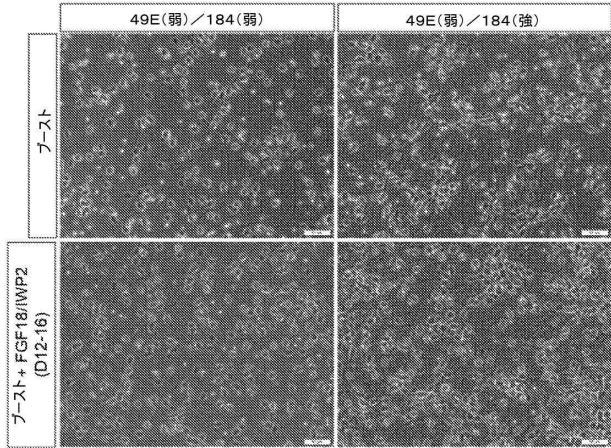


10

20

【図 6】

Figure 6



【図 7】

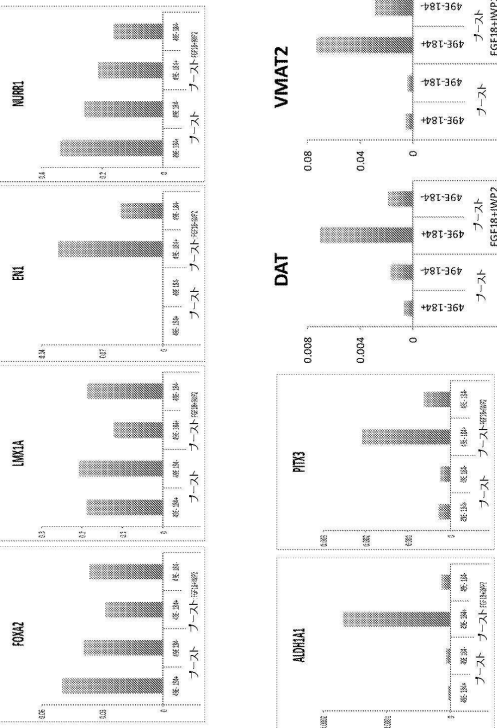


Figure 7

30

40

50

【図 8】

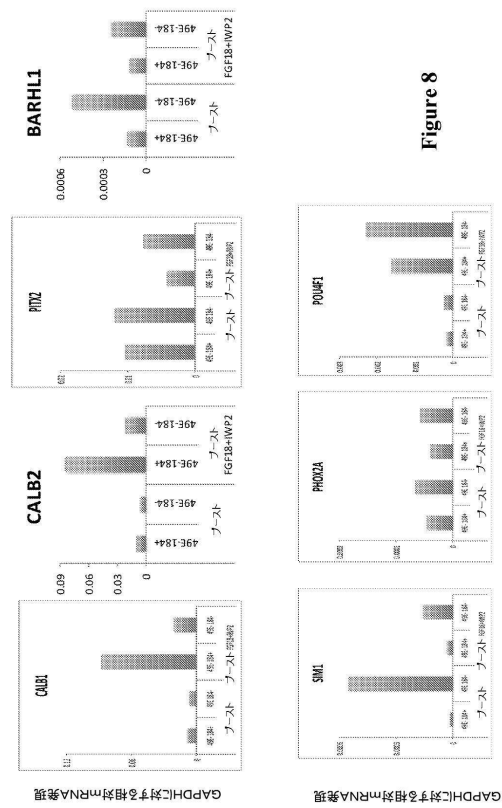


Figure 8

【図 9 - 1】

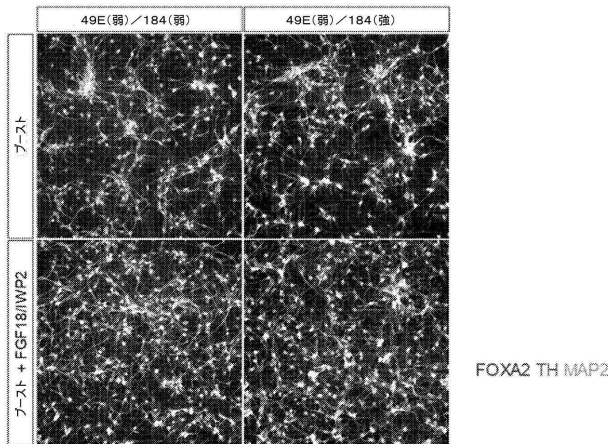


Figure 9A

【図 9 - 2】

Figure 9B

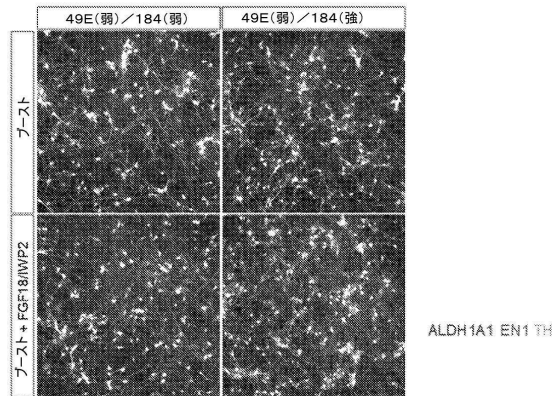
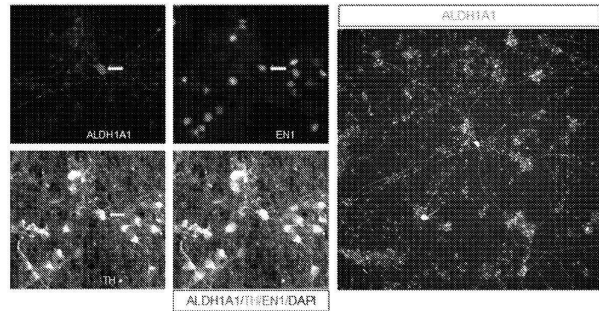


Figure 9C



【図 10】

Figure 10A

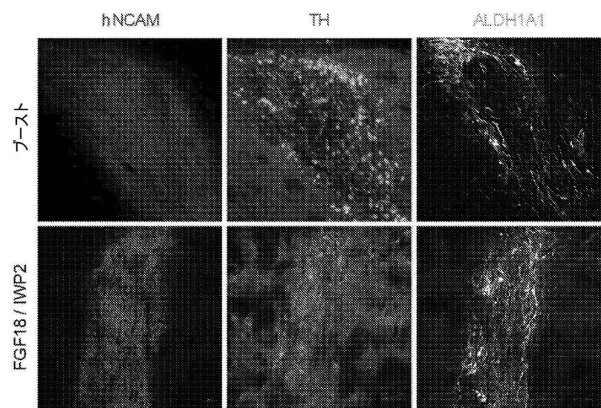
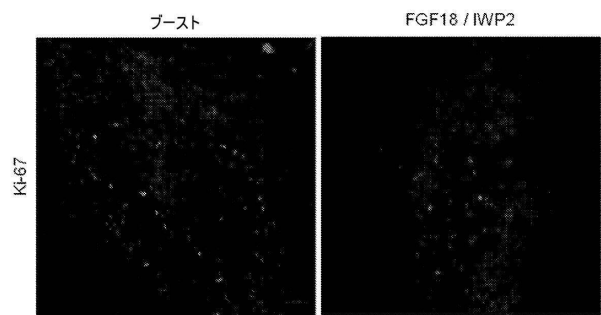


Figure 10B



10

20

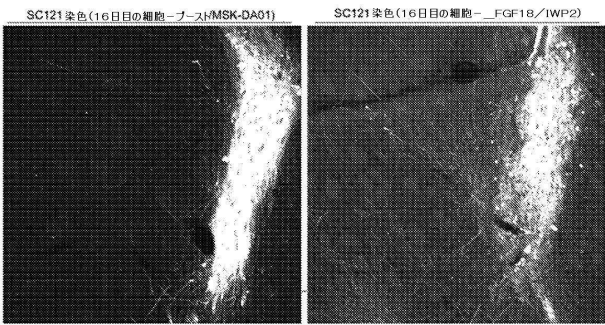
30

40

50

【図 1 1 - 1】

Figure 11A



【図 1 1 - 2】

Figure 11C

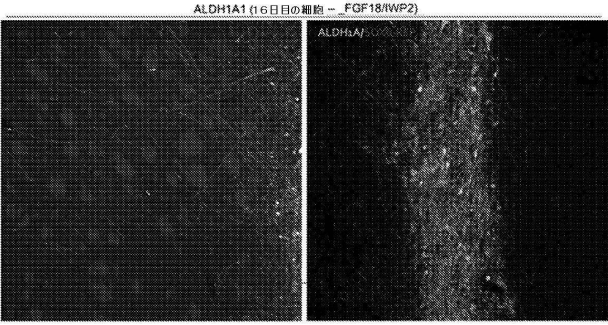
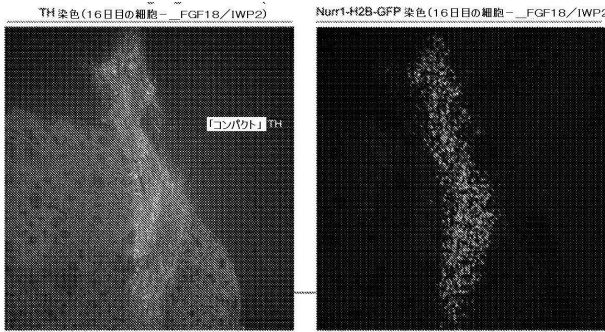


Figure 11B



【図 1 2】

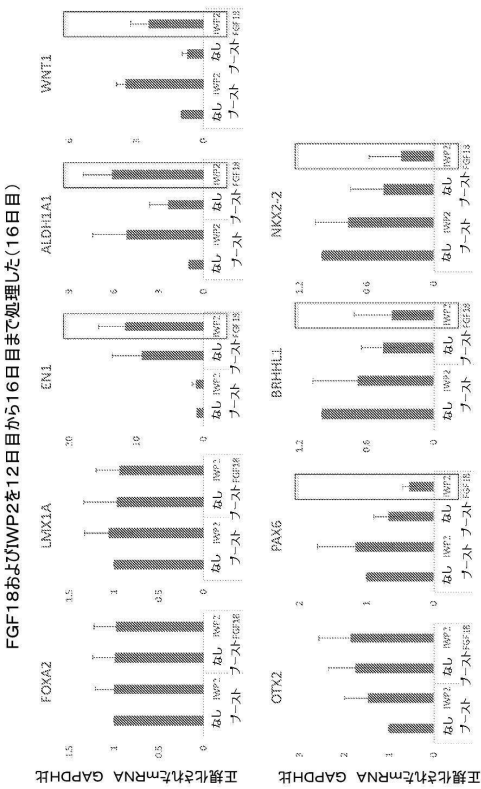


Figure 12

【図 1 3】

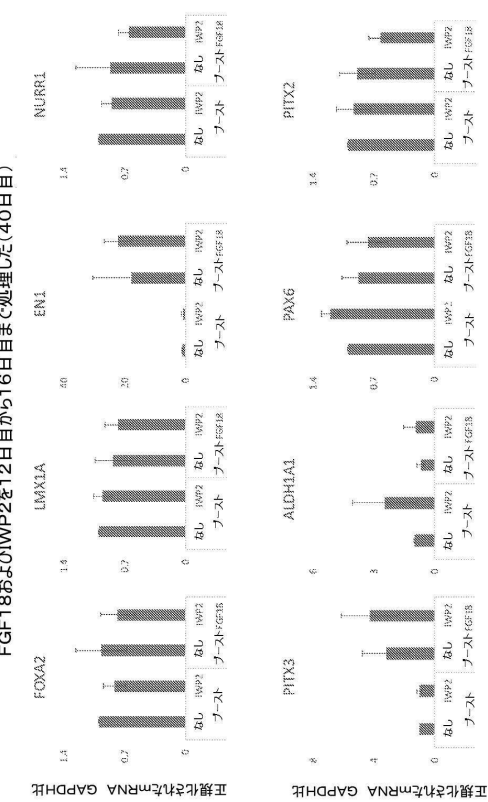


Figure 13

【図 2 2】

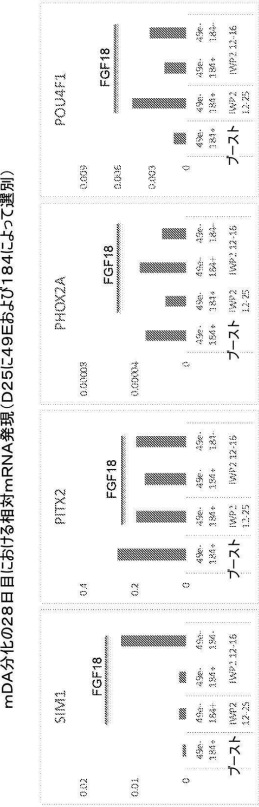
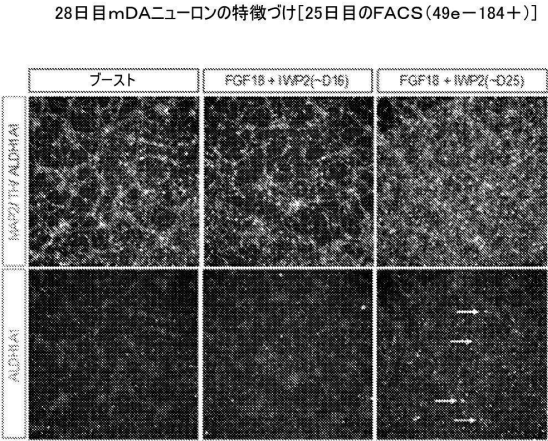


Figure 22

【図 2 3】

Figure 23

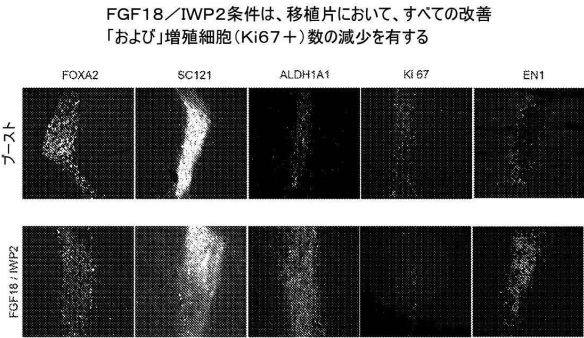


10

20

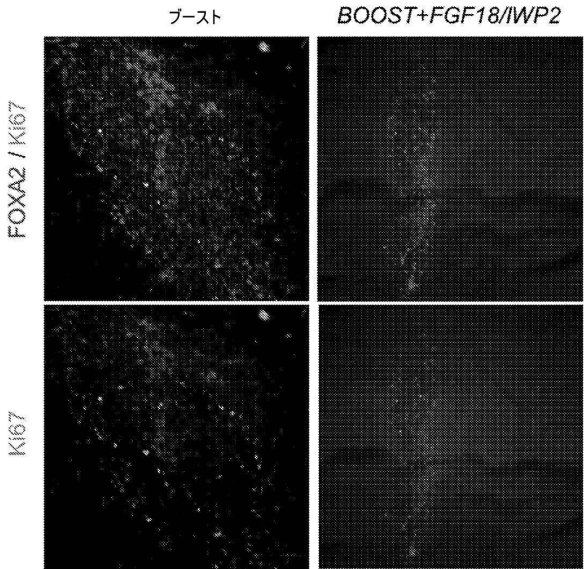
【図 2 4】

Figure 24



【図 2 5】

Figure 25



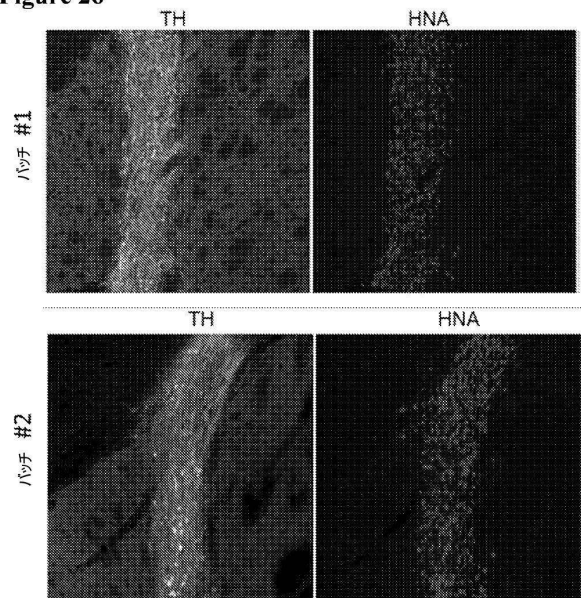
30

40

50

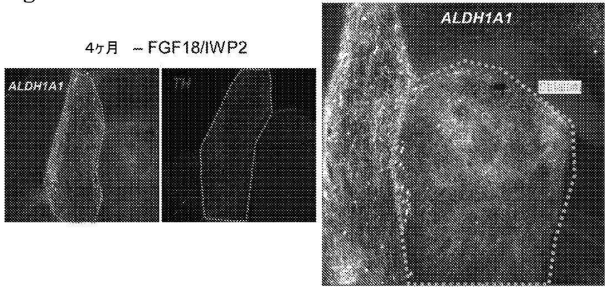
【図 2 6】

Figure 26



【図 2 7】

Figure 27

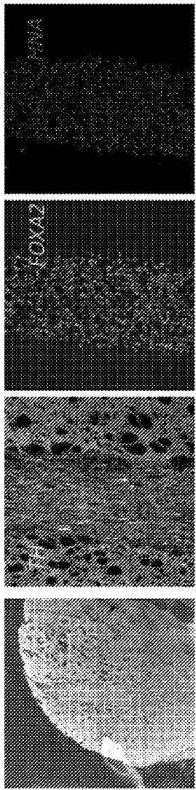


10

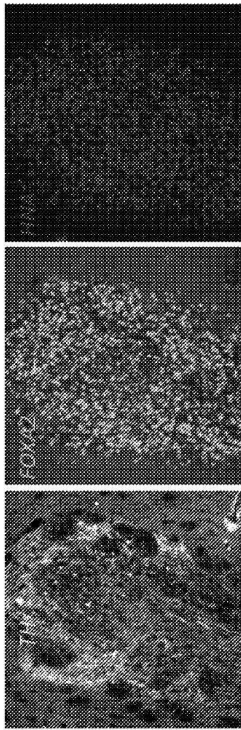
【図 2 8】

Figure 28

CD選別ブースト

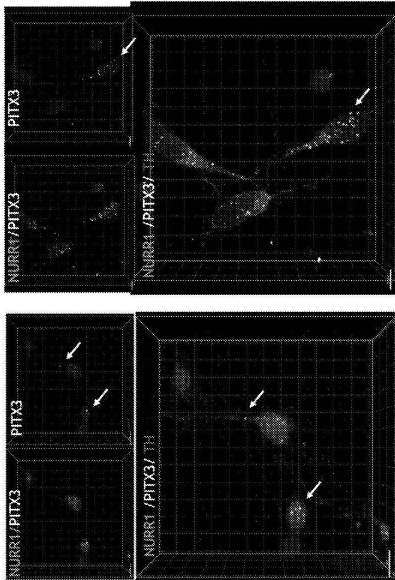


CD選別 FGF18+IWP2



【図 2 9】

ブースト + FGF18/IWP2



ブースト

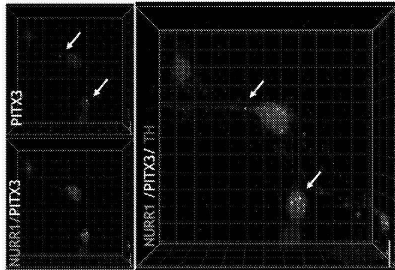


Figure 29

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 21/25596
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12N 5/0735; C12N 5/0797; C07K 14/475; A61P 25/16 (2021.01) CPC - C12N 5/0606; C12N 5/0623; C07K 14/475; A61P 25/16 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 See Search History document		
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.
Y	US 2015/0010514 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 08 January 2015 (08.01.2015). para [0008]- para [0010], para [0012].	1-3, 69, and 70
Y	US 2016/0115448 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER et al.,) 28 April 2016 (28.04.2016). claim 7, para [0017], para [0100].	1-3, 69, and 70
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 17 June 2021		Date of mailing of the international search report JUL 26 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/25596

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. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ 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. ☒ Claims Nos.: 4-68 and 71-82
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. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ 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. ☐ 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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ 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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/0775(2010.01)	C 1 2 N	5/0775
C 1 2 N	5/0789(2010.01)	C 1 2 N	5/0789
C 1 2 N	5/0797(2010.01)	C 1 2 N	5/0797
C 1 2 N	5/095(2010.01)	C 1 2 N	5/095
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	35/30 (2015.01)	A 6 1 K	35/30
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28

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,N
E,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,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者

ステューダー, ローレンツ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 1 2 8, ニューヨーク, イースト 8 8 ティーエイチ スト
リート 3 6 0

(72)発明者

キム, テーワン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 4 4, ニューヨーク, メイン ストリート 4 2 5, ナン
バー 1 0 エフ

(72)発明者

ク, ソーヨン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 1 2 8, ニューヨーク, 3 アールディー アベニュー 1 6
1 9, アpartment 6 ビー

F ターム (参考)

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ53 QR06 QR08 QR32 QR56 QR62
QS25 QS34 QX02

4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 NA14 ZA02 ZA16 ZA22