

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年4月8日(2010.4.8)

【公表番号】特表2006-521807(P2006-521807A)

【公表日】平成18年9月28日(2006.9.28)

【年通号数】公開・登録公報2006-038

【出願番号】特願2006-506517(P2006-506517)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/07	(2010.01)
A 6 1 K	35/48	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	25/14	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 P	25/08	(2006.01)
A 6 1 P	25/10	(2006.01)
A 6 1 P	25/12	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/30	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/00	E
A 6 1 K	35/48	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/10	
A 6 1 P	25/12	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	35/30	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年2月19日(2010.2.19)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

靈長類の多能性の幹細胞から、分化した神経細胞集団を生成する方法であつて、

(a) 細胞の多能性の幹細胞の培養を増殖させるステップと、

(b) 前記多能性の幹細胞を培養して、ネスチニンに陽性の神経前駆細胞を選択するステ

ップと、

(c) N C A M 陽性細胞をエンリッチするための前記ネスチン陽性神経前駆細胞を選別するステップと、

(d) T G F - 3 またはインターロイキン - 1 あるいは両方を含む分化培地でネスチン陽性 N C A M 陽性細胞を培養することで、N - アセチル・システインの存在下で前記ネスチン陽性 N C A M 陽性細胞を分化させて分化した神経細胞集団を生成するステップと、

を含む、分化神経細胞集団を生成するための方法。

【請求項 2】

前記多能性の幹細胞が、レーザー・アブレーション法を用いて得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記多能性の幹細胞がヒト胚幹細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記ヒト胚幹細胞がレーザー・アブレーション法を用いて得られる、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記分化した神経細胞集団が6 0 % のドーパミン作動性神経細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記分化した神経細胞集団が3 0 % のセロトニン作動性神経細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記分化した神経細胞集団が2 5 % のオリゴデンドロサイトを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (b) の前記多能性の幹細胞を培養して胚様体を形成することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記胚様体を培養して、ネスチンに対して陽性である神経前駆細胞を選択する、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

ネスチンに対して陽性である前記神経前駆細胞が、多能性の幹細胞を無血清培地で培養することによって選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記無血清培地が I T S F n 無血清合成培地である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記無血清培地が、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、およびフィプロネクチンからなる群から選択される 1 種類以上の可溶性因子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記無血清培地が、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、およびフィプロネクチンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

ネスチンに対して陽性である前記神経前駆細胞が、前記胚様体を無血清培地で培養することで、選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項 15】

前記無血清培地が I T S F n 無血清合成培地である、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

前記無血清培地が、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、塩基性線維芽細胞成長因子、ト

ランスフェリン、およびフィプロネクチンからなる群から選択される1種類以上の可溶性因子を含む、請求項1\_4に記載の方法。

【請求項17】

前記無血清培地が、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、およびフィプロネクチンを含む、請求項1\_6に記載の方法。

【請求項18】

前記神経前駆細胞が、95%のネスチン陽性細胞を含む、請求項1\_7に記載の方法。

【請求項19】

磁気細胞分離(MACS)によって、NCAM陽性細胞についてエンリッチをおこなうために、ステップ(c)の前記ネスチン陽性神経前駆細胞を選別する、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記ネスチン陽性神経前駆細胞が、50~60%のNCAM陽性細胞を含む、請求項1\_9に記載の方法。

【請求項21】

ステップ(c)の前記ネスチン陽性NCAM陽性神経前駆細胞を増殖培地で増殖させることを、さらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記増殖培地が、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、ラミニン、プロトレッシン、プロゲステロン、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、ソニック・ヘッジホッグ(SHH)、線維芽細胞増殖因子-8(FGF-8)、および脳由来神経栄養因子(BDNF)からなる群から選択される1種類以上の可溶性因子を含む、請求項2\_1に記載の方法。

【請求項23】

前記細胞が6~10日間にわたって前記増殖培地で増殖する、請求項2\_2に記載の方法。

【請求項24】

1種類以上の集団を倍加させるために、前記細胞を培養し、そして連続的に継代する、請求項2\_2に記載の方法。

【請求項25】

前記細胞が液体窒素中で凍結保存される、請求項2\_2に記載の方法。

【請求項26】

前記分化培地が、ウシ胎仔血清、B27、アスコルビン酸、およびN-アセチル・システインが補充された神経基本培地を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

前記分化培地が、アスコルビン酸、N-アセチル・システイン、グリア細胞系由来神経栄養因子(GDNF)、ジブチリル環状AMP(dB-cAMP)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューチュリン、ソニック・ヘッジホッグ・タンパク質(SHH)、および線維芽細胞増殖因子-8(FGF-8)からなる群から選択される1種類以上の分化剤を、さらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

前記ネスチン陽性NCAM陽性細胞を分化培地で30~50日間にわたり増殖させる、請求項1に記載の方法。

【請求項29】

神経前駆細胞からドーパミン作動性神経細胞を生成する方法であって、

ネスチンに陽性の細胞として、前記神経前駆細胞をエンリッチし、前記ネスチン陽性細胞をTGF-3またはインターロイキン-1あるいは両方、およびN-アセチル・システインの存在下で培養することで前記ネスチン陽性細胞を分化させて、ドーパミン作動性神経細胞を生成する、ドーパミン作動性神経細胞生成方法。

【請求項30】

N-アセチル・システインの存在下で40%の前記ネスチン陽性細胞がドーパミン作動性

神経細胞に分化する、請求項2\_9に記載の方法。

【請求項3\_1】

N C A M に陽性の細胞として、前記神経前駆細胞をエンリッチすることを、さらに含む、請求項2\_9に記載の方法。

【請求項3\_2】

前記ネスチン陽性N C A M陽性細胞を分化させてドーパミン作動性神経細胞を生成する、請求項3\_0に記載の方法。

【請求項3\_3】

6\_0 %の前記ネスチン陽性N C A M陽性細胞が、ドーパミン作動性神経細胞に分化する、請求項3\_2に記載の方法。

【請求項3\_4】

神経前駆細胞からセロトニン作動性神経細胞を生成する方法であって、

ネスチンおよびN C A M に陽性である細胞として、前記神経前駆細胞をエンリッチすること、ネスチン陽性N C A M陽性細胞を分化させて、前記ネスチン陽性N C A M陽性細胞をT G F - 3 またはインターロイキン - 1 あるいは両方の存在下で培養することで前記ネスチン陽性N C A M陽性細胞を分化させて、セロトニン作動性神経細胞を生成する、セロトニン作動性神経細胞生成方法。

【請求項3\_5】

3\_0 %の前記ネスチン陽性N C A M陽性細胞がセロトニン作動性神経細胞に分化する、請求項3\_4に記載の方法。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 0】

次に、上記ネスチン陽性神経前駆細胞を保存して、適当な免疫学的技術、例えば免疫標識および蛍光選別（ソーティング）、例えば磁気細胞分離（M A C S）、固相吸着、蛍光活性化細胞ソーティング（F A C S）、細胞表面マーカーに対するフロー免疫細胞化学、またはフロー・サイトメトリー・アッセイによって、N C A M陽性細胞をエンリッチすることが可能である。好ましい実施形態によれば、これらの方は、少なくとも約40~70%のN C A M陽性細胞、より好ましくは約50~60%のN C A M陽性細胞、および最も好ましくは約80~99%のN C A M陽性細胞を含むネスチン陽性細胞を生成する。いくつかの実施形態では、上記方法は、さらに、増殖培地中でネスチン陽性N C A M陽性神経前駆細胞を、好ましくは6~10日にわたって、増殖させるステップ（c）を含む。好ましくは、上記増殖培地は、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、ラミニン、プロトレッシン、プロゲステロン、塩基性線維芽細胞成長因子（b F G F）、上皮細胞増殖因子（E G F）、ソニック・ヘッジホッグ（S H H）、線維芽細胞増殖因子-8（F G F - 8）、および脳由来神経栄養因子（B D N F）からなる群から選択される1種類以上の可溶性因子を含む。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 1】

上記ネスチン陽性N C A M陽性神経前駆細胞を、1種類以上の集団を倍加させるために、好ましくは、培養および連続的に継代する。これらの細胞もまた、液体窒素で凍結保存する。N C A M陽性神経前駆細胞を、好ましくは、上記方法のステップ（d）に記載した

ように、30～50日間にわたって分化培地中で増殖させる。好ましい実施形態では、上記分化培地が、ウシ胎仔血清、B27、アスコルビン酸、およびN-アセチル・システインが補充された神経基本培地を含む。別の好ましい実施形態では、上記分化培地は、TGF-3またはインターロイキン-1あるいは両方を、さらに含む。好ましくは、上記分化培地は、アスコルビン酸、N-アセチル・システイン、グリア細胞系由来神経栄養因子(GDNF)、ジブチリル環状AMP(db-cAMP)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューチュリン、ソニック・ヘッジホッグ・タンパク質(SHH)、および線維芽細胞増殖因子-8(FGF-8)からなる群から選択される1種類以上の分化剤を、さらに含む。

## 【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0023

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0023】

本発明の開示は、神経前駆細胞からドーパミン作動性神経細胞を生成する方法を提供するもので、該方法は、ネスチニン陽性の細胞として上記神経前駆細胞をエンリッチし、TGF-3またはインターロイキン-1あるいはそれら両方の存在下で、細胞を培養することで、ドーパミン作動性神経細胞を生成するために、上記ネスチニン陽性細胞を分化させることを含む。好ましくは、少なくとも40～99%のネスチニン陽性細胞が、それらの方法を用いてドーパミン作動性神経細胞に分化する。別の実施形態では、これら的方法は、さらに、NCAM陽性の細胞として、上記神経前駆細胞をエンリッチし、これらのネスチニン陽性NCAM陽性細胞を好ましくは分化させてドーパミン作動性神経細胞(例えば、少なくとも60～99%の細胞をドーパミン作動性神経細胞に分化させる)を生成する。本発明の開示はまた、神経前駆細胞から神経を生成する方法を提供するもので、該方法は、神経前駆細胞を、ネスチニンおよびNCAM陽性の細胞にエンリッチし、ネスチニン陽性NCAM陽性細胞を分化させて、TGF-3またはインターロイキン-1あるいはそれら両方の存在下で細胞を培養することで、セロトニン作動性神経細胞を生成する。好ましくは、これら的方法を用いて、約30～99%のネスチニン陽性NCAM陽性細胞がセロトニン作動性神経細胞に分化する。

## 【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0045

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0045】

特に神経細胞型の分化を促進する適当な分化剤として、限定されるものではないが、プロゲステロン、プロトレッシン、ラミニン、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、ニューチュリン、ソニック・ヘッジホッグ(SHH)、ノギン、フォリスタチン、表皮増殖因子(EGF)、任意の型の線維芽細胞増殖因子(例えばFGF-4、FGF-8、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF))、増殖および分化因子5(GDF-5)、ニューロトロフィン・ファミリーのメンバー(神経増殖因子(NGF)、ニューロトロフィン3(NT-ニューロトロフィン4(NT-4)、脳由来神経栄養因子(BDNF)))、形質転換増殖因子(TGF-)、形質転換増殖因子-3(TGF-3)、血小板由来増殖因子(PDGF-AA)、インスリン様増殖因子(IGF-1)、骨形態形成タンパク質(BMP-2、BMP-4)(グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、レチノイン酸(RA)、ミドカイン、アスコルビン酸、ジブチリルcAMP、ドーパミン、ならびにgp130と複合体を形成する受容体に対するリガンド(例えば、LIF、

CNTF、SCF、IL-11、およびIL-6)が挙げられる。分化栄養培地は、神経細胞(例えばN2およびB27添加物(Gibco))の維持培養を助ける添加物を含んでもよい。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0075

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0075】

ヒトES細胞を培養することで増殖させ、定期的にES細胞を継代して分化を阻害した。ES細胞を、最初に該細胞をCa<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を含まないダルベッコのリン酸緩衝液で10秒間洗い、つぎに該細胞を0.05%トリプシンで5秒処理することで、継代をおこなった。5秒後、トリプシンのアッセイを血清含有ES培地によって阻害した。つぎに、細胞をスクラップして破壊し、小さなクラスターにした。クラスターを2枚の0.1%ゼラチン被覆100mmペトリ皿(上記したように、LIFおよびbFGFを含むES培地に含まれる支持細胞によって被覆)に植え付けた。細胞を4~6日間、増殖させた。

(3) 胚様体の生成

未分化ヒトES細胞を増殖して増やした後、該細胞を培養して胚様体を形成した。最初に、ES細胞を0.05%トリプシン-EDTAで分離した後、スクラップして細胞を小さなクラスターに破壊した。次に、これらのクラスターを約1×10<sup>5</sup>細胞/mlで、支持細胞が無い細菌学的皿上に植え付けた。使用した細菌学的皿は、付着を阻む非粘着性の表面を有することから、ES細胞の分化および胚様体形成を刺激する。これらの細胞をLIFおよびbFGFを含まないES培地での懸濁培養として培養した。これらの細胞を培養するために使用したES培地は、高グルコースのD MEMまたはノックアウトD MEMであり、10~20%FCSまたはノックアウト血清置換、同様に他のサプリメント(例えば、-メルカプトエタノール、L-グルタミン酸、および抗体)で補われている。bFGFはいっさいES培地に加えられていない。胚様体を4~8日間増殖させた。この時間のあいだ、ES培地は、沈殿法により2日毎に変えられた。この沈殿法は、凝集体の懸濁液を遠心管に移し、凝集体を遠心管の底に沈殿させ、培地を吸引し、さらにそれを新鮮な培地に置き換えた。新鮮な培地に含まれる凝集体をつぎに培養皿に移した。4~8日後、胚様体を回収し、低速で遠心し、さらにES細胞培地に再懸濁した。約20~30の胚様体を、LIF無しの0.1%ゲラチン含有ES培地で被覆された組織培養プレート上に植え付け、さらに24時間インキュベートした。

(4) ネスチング陽性神経前駆体の選択および増殖

24時間後、ネスチング陽性細胞(神経前駆細胞)を、ES培地の代わりにITSFn(ネスチング選択)無血清合成培地を用いることで、選択した。ITSFn培地は、D MEM:F12培地(Gibco)からなり、増殖因子インスリン(5~25μg/ml)(Sigma)、亜セレン酸ナトリウム(10~50nM)(Sigma)、トランスフェリン(1~10gg/ml)(Gibco)、およびフィブロネクチン(1~5μg/ml)で補った。

この培地はネスチング陽性細胞の選択を可能とし、2日毎に補充しているITSFn培地で、6~10日間、通常8~9日日にわたって実行した。選択が完了した後、上記神経前駆細胞を、免疫蛍光技術を用いてネスチング発現について特徴づけた。その結果、約95%の細胞がネスチングを発現した(図1A)。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0083

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0083】

チェンバー・スライドを蛍光顕微鏡下で観察して、免疫陽性領域の評価をおこなった。この免疫蛍光分析は、かなりの割合の分化型細胞で、神経細胞特異的マーカーN C A M (図3、M A P - 2 (図4 A )、および チューブリン (図4 B ) に対して免疫活性であったことを示した。これらのキー抗原の発現は、分化培地中のインキュベーション時間の増加をもたらした。免疫蛍光分析はまた、より少ない割合の細胞がセロトニン (図7)、同様に星状細胞に存在する非神経性のマーカーであるグリア線維酸性蛋白 (G F A P ) と、オリゴデンドロサイト (図6) に存在するG A B A およびグルタメートとを発現することを証明した。

【誤訛訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0090

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0090】

最初に、細胞を開示された方法の異なる段階で回収した。未分化E S 細胞、胚様体、ネスチニン陽性神経前駆細胞、N C A M 陽性細胞、および分化細胞は、神経基本培地で分化の7、22、および37日後に単離した。回収前に、神経基本培地で分化する細胞を、15分間にわたり、56mMのK C L を添加したH B S S によって最初に刺激し、ドーパミン分泌を誘発した。ほぼ、 $5 \times 10^6$  細胞をトリプシン処理し、遠沈殿法によってペレット化した。次に、細胞を抗酸化剤 (0.2g / l のメタ重亜硫酸ナトリウム) を含む冷1N過塩素酸で超音波処理し、4で20分間遠心 (15,000r p m / 分) した。上澄みを抽出し、以降に続くR P - H P C L による細胞内ドーパミン濃度の測定のために、-70で保存した。ドーパミン化のレベルを、細胞可溶化物と培養上澄み (最終培地変化後48時間) とによって測定した。培養上澄みは、直ちに7.5%オルトリシン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムで安定化させた。