(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 20 日(20.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/167372 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0797 (2010.01)　*C12N 5/074* (2010.01)
A61K 35/30 (2015.01)　*C12N 5/0793* (2010.01)
A61P 25/00 (2006.01)　*C12N 5/10* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)　*A61K 35/545* (2015.01)
C12N 5/0735 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/062578

(22) 国際出願日: 2016 年 4 月 14 日(14.04.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-082497 2015 年 4 月 14 日(14.04.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

(72) 発明者: 高橋　淳(TAKAHASHI, Jun); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 元野　誠(MOTONO, Makoto); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 五百蔵　義彦(IOROI, Yoshihiko); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 平木　祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

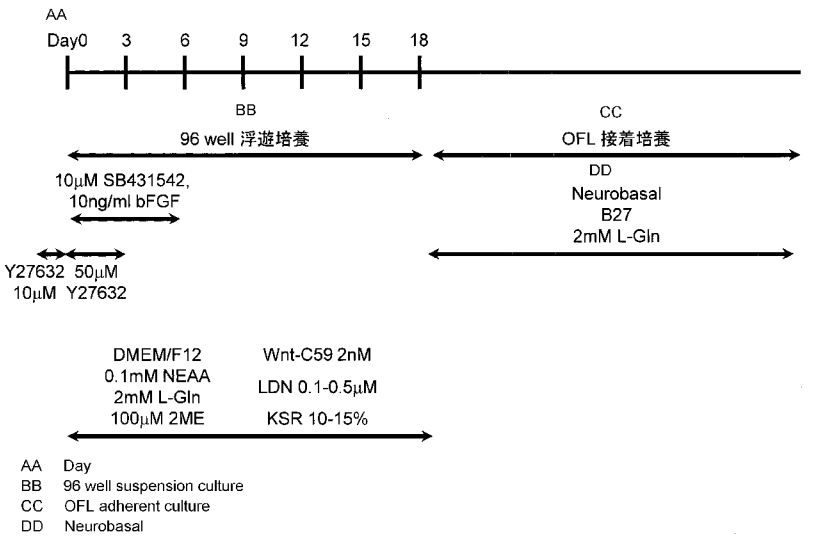
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR INDUCING CEREBRAL CORTEX NEURONS

(54) 発明の名称 : 大脳皮質ニューロンの誘導方法

図１



(57) **Abstract**: Provided is a method for producing cerebral cortex neurons from pluripotent stem cells. Provided is a method for producing cerebral cortex neurons from pluripotent stem cells, including: (i) a step for carrying out suspension culture of pluripotent stem cells in a medium that contains a TGFβ inhibitor, bFGF, a Wnt inhibitor, and a BMP inhibitor; (ii) a step for carrying out suspension culture of the cells obtained in step (i) in a medium that contains a Wnt inhibitor and a BMP inhibitor; and (iii) a step for further culturing the cells obtained in step (ii).

(57) 要約: 多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを製造する方法を提供する。　（ｉ）多能性幹細胞をＴＧＦβ阻害剤、ｂＦＧＦ、Ｗｎｔ阻害剤、およびＢＭＰ阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、（ｉｉ）前記工程（ｉ）で得られた細胞をＷｎｔ阻害剤、およびＢＭＰ阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、および（ｉｉｉ）前記工程（ｉｉ）で得られた細胞をさらに培養する工程を含む、多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを製造する方法を提供する。

WO 2016/167372 A1

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称

大脳皮質ニューロンの誘導方法

技術分野

本発明は、大脳皮質ニューロンの製造方法に関する。

背景技術

虚血により脳組織の壊死等が引き起こされる脳梗塞は、死亡原因の中でも多くを占めている高頻度な疾患である上、後遺症を残して介護が必要となることが多く福祉の面でも大きな課題を伴う疾患である。近年、脳梗塞後には、神経幹細胞が誘導され、組織の自己治癒のシステムが解明されているが、大きな梗塞巣になれば、このような自己治癒は起きないため、外来性の神経細胞を投与する移植治療が検討されている。

近年では、多能性幹細胞から様々な組織細胞へと誘導する方法が開発されており、神経細胞についても多くの報告がなされている（非特許文献１、２、３）。

しかし、このような脳梗塞後の組織再生に適した神経細胞を効率よく作製するための誘導方法については、改良の余地がある。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献１　Kim JE, et al. Proc Natl Acad Sci USA 108:3005-3010, 2011

非特許文献２　Hu BY, et al. Proc Natl Acad Sci USA 107:4335-4340, 2010

非特許文献３　Mariani J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109:12770-12775, 2012

発明の概要

本発明の目的は、多能性幹細胞から効率よく大脳皮質ニューロンを製造することである。したがって、本発明の課題は、多能性幹細胞から大脳皮質ニューロン

の製造工程または製造に必要なキットを提供することである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンの誘導工程において、培養条件を適宜検討し、得られた大脳皮質ニューロンを移植することで軸索を伸長させ、脳組織に適合することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

［１］以下の工程を含む多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを製造する方法：

(i) 多能性幹細胞をTGFβ阻害剤、bFGF、Wnt阻害剤、およびBMP阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、

(ii) 前記工程(i)で得られた細胞をWnt阻害剤、およびBMP阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、

(iii) 前記工程(ii)で得られた細胞を培養する工程。

［２］前記多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、［１］の方法。

［３］前記ヒト多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞又はヒトES細胞である、［２］の方法。

［４］前記TGFβ阻害剤が、SB431542またはA-83-01である、［１］から［３］のいずれかの方法。

［５］前記Wnt阻害剤が、PORCN阻害剤である、［１］から［４］のいずれかの方法。

［６］前記Wnt阻害剤が、C59またはLGK-974である［１］から［５］のいずれかの方法。

［７］前記BMP阻害剤が、LDN193189である、［１］から［６］のいずれかの方法。

［８］前記培養液が血清又は血清代替物をさらに含む、［１］から［７］のいずれかの方法。

［９］前記工程（i）の培養液がROCK阻害剤をさらに含む、［１］から［８］のいずれかの方法。

［１０］前記工程（iii）に続いてさらに、工程（iv）CD231、PCDH17およびCDH8から成る群より選択される少なくとも一つのマーカータンパク質が陽性である細胞を抽出する工程を含む［１］から［９］のいずれかの方法。

［１１］前記大脳皮質ニューロンが、Ctip2 陽性 CoupTF1 陰性であることを特徴とする大脳皮質の運動野の神経細胞である、［１］から［１０］のいずれかの方法。

［１２］前記工程（i）が、少なくとも３日間行われる、［１］から［１１］のいずれかの方法。

［１３］前記工程（ii）が、少なくとも６日間行われる、［１］から［１２］のいずれかの方法。

［１４］［１］～［１３］のいずれかの方法で得られる、大脳皮質ニューロンを含む細胞培養物。

［１５］TGFβ 阻害剤、bFGF、Wnt 阻害剤、及び BMP 阻害剤を含む、多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを作製するためのキット。

［１６］前記 TGFβ 阻害剤が、SB431542 または A-83-01 であり、前記 Wnt 阻害剤が、C59 または LGK-974 であり、前記 BMP 阻害剤が、LDN193189 である、［１５］のキット。

本発明によれば、脳梗塞の治療などに有用な、移植に適した大脳皮質ニューロンを効率よく得ることができる。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2015-082497 号の開示内容を包含する。

図面の簡単な説明

［図１］図１には、大脳皮質ニューロンの製造プロトコールの一例を示す。

［図２］図２は、Wnt 阻害剤として、DKK1、C59、XAV、または IWP4 を用いた場合の培養 6 日目(day6)、12 日目(day12)および 18 日目(day18)の細胞における Six3、Sox1、Foxg1、Lhx2、Emx2、CoupTF1 および Pax6 の発現量を示すグラフである。図中、無添加は、Wnt 阻害剤を用いなかった場合の結果を意味する。

［図３］図３Ａは、Wnt 阻害剤として、C59、DKK1、または XAV を用いて培養した 46 日目の細胞の Ctip2（赤色）および CoupTF1（緑色）に対する染色像を示す。図３Ｂは、Wnt 阻害剤として、C59、DKK1、または XAV を用いて 46 日間培養した後の Ctip2 陽性細胞における CoupTF1 陰性細胞の含有率（左図）および全細

胞（DAPI）におけるCtip2陽性細胞CoupTF1陰性細胞の含有率（右図）を示すグラフである。

［図４］図４Ａは、Wnt阻害剤としてC59を0nM、2.5nMまたは10nM用いて培養した18日目の細胞のDAPIおよびPax6に対する染色像を示す。図４Ｂは、Wnt阻害剤としてC59を0nM、2.5nMまたは10nM用いて培養した0日目(d0)、6日目(d6)、12日目(d12)および18日目(d18)の細胞におけるCoupTF1、Emx2、Lhx2およびFoxg1の発現量を示すグラフである。

［図５］図５Ａは、LDN193189を0.1μM、0.5μMまたは2μM用いて培養した46日目の細胞のCtip2（赤色）およびCoupTF1（緑色）に対する染色像を示す。図５Ｂは、LDN193189を0.1μM、0.5μMまたは2μM用いて培養した46日目のCtip2陽性細胞におけるCoupTF1陰性細胞の含有率（左図）および全細胞（DAPI）におけるCtip2陽性細胞CoupTF1陰性細胞の含有率（右図）を示すグラフである。図５Ｃは、LDN193189を0.1μM、0.5μMまたは2μM用いて培養した46日目の細胞におけるCoupTF1およびSfrp1の発現量を示すグラフである。

［図６］図６Ａは、KSRを10%、15%または20%用いて培養した46日目の細胞のCtip2（赤色）およびCoupTF1（緑色）に対する染色像を示す。図６Ｂは、KSRを10%、15%または20%用いて培養した46日目のCtip2陽性細胞におけるCoupTF1陰性細胞の含有率（左図）および全細胞におけるCtip2陽性細胞CoupTF1陰性細胞の含有率（右図）を示すグラフである。図６Ｃは、KSRを10%、15%または20%用いて培養した46日目の細胞におけるCoupTF1およびSfrp1の発現量を示すグラフである。

［図７］図７Ａは、SB431542の代わりにA-83-01を0.5μM、2μMまたは5μM用いて培養した46日目の細胞のCtip2（赤色）およびCoupTF1（緑色）に対する染色像を示す。図７Ｂは、SB431542の代わりにA-83-01を0.5μM、2μMまたは5μM用いて培養した46日目のCtip2陽性細胞におけるCoupTF1陰性細胞の含有率（左図）および全細胞におけるCtip2陽性細胞CoupTF1陰性細胞の含有率（右図）を示すグラフである。

［図８］図８は、マウスの脳の模式図（上図）およびマウスの運動野へ本発明の方法で得られた誘導細胞を移植後６月目の各部位におけるヒトNCAMに対す

る免疫染色像（下図）を示す。上図において丸く囲まれた領域に細胞を移植した部位を示し、また図中の番号１または２における、免疫組織を下図に示す。免疫染色像において、移植細胞由来のヒト細胞の染色が示されている。

［図９］図９は、マウスの脳の模式図（上図）およびマウスの運動野へ本発明の方法で得られた誘導細胞を移植後６月目の各部位におけるヒト NCAM に対する免疫染色像（下図）を示す。上図中の番号１または２における、免疫組織を下図に示す。免疫染色像において、移植細胞由来のヒト細胞の染色が示されている。

［図１０］図１０Ａは、マウスの運動野へ本発明の方法で得られた誘導細胞を移植後６月目の脊髄付近の位相差像（左図）およびヒト NCAM に対する免疫組織像（右図）を示す。図１０Ｂは、マウスの運動野へ本発明の方法で得られた誘導細胞を移植後６月目の延髄付近の各部位での位相差像（上図）およびヒト NCAM に対する免疫組織像（下図）を示す。位相差像における枠で囲まれた部分の免疫染色像を下図にて示す。

［図１１］図１１は、分化誘導４８日目の細胞におけるフローサイトメーターの解析結果を示す。左上図は、陰性対照の結果を示し、右上図は、CD231 抗体により染色した結果を示し、左下図は、CDH8 抗体により染色した結果を示し、右下図は、PCDH17 抗体により染色した結果を示す。横軸は、蛍光強度を示す。図中、各マーカーの陽性細胞の含有率を数字で示す。

［図１２］図１２Ａは、分化誘導４８日目の細胞から各マーカー陽性細胞（CD231、PCDH17 または CDH8）を単離し、さらに 14 日間培養した後の細胞の Ctip2（赤色）および CoupTF1（緑色）に対する染色像を示す。図中 Unsort は、分化誘導４８日目の細胞を分離し、さらに 14 日間培養した後の細胞を示す。図１２Ｂは、各マーカー陽性細胞（CD231、PCDH17 または CDH8）（図中+で示す）または各マーカー陰性細胞（図中-で示す）の再培養後 14 日目における Ctip2 陽性細胞の含有率（上図）および Ctip2 陽性細胞 CoupTF1 陰性細胞の含有率（下図）を示すグラフである。グラフ中 Unsort は、分化誘導４８日目の細胞を解離し、さらに 14 日間培養した後の細胞におけるそれぞれの含有率を示す。

［図１３］図１３Ａは、接着培養（上段）または浮遊培養（下段）にて分化誘導した 46 日目の細胞の DAPI（青）/Ctip2（赤）（左図）、DAPI（青）/CoupTF1

（緑）（中央図）およびCtip2（赤色）およびCoupTF1（緑色）（右図）に対する染色像を示す。図１３Ｂは、接着培養（Attach）または浮遊培養（Floating）にて分化誘導した４６日目におけるCtip2陽性細胞の含有率（左図）およびCtip2陽性細胞CoupTF1陰性細胞の含有率（右図）を示すグラフである。

［図１４］図１４Ａは、WNT 阻害剤として、C59、LGK-974、または ICG-001を用いて培養した 46 日目の細胞の DAPI（青色）、Ctip2（赤色）および CoupTF1（緑色）に対する染色像を示す。図１４Ｂは、WNT阻害剤として、C59、LGK-974、またはICG-001を用いて46日間培養した後の全細胞（DAPI）におけるCtip2陽性細胞の含有率（左図）および全細胞（DAPI）におけるCtip2陽性細胞CoupTF1陰性細胞の含有率（右図）を示すグラフである。

発明を実施するための形態

本発明は、次の工程を含む多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを製造する方法：

（i）多能性幹細胞をTGFβ阻害剤、bFGF、Wnt阻害剤、およびBMP阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、

（ii）前記工程(i)で得られた細胞をWnt阻害剤、およびBMP阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、

（iii）前記工程(ii)で得られた細胞をさらに培養する工程。

＜多能性幹細胞＞

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞である。それらの多能性幹細胞の具体例は、以下のものに限定されないが、胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞、精子幹細胞（「GS 細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹(iPS)細胞などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。より好ましい多能性幹細胞は、ヒト多能性幹細胞であり、特に好ましくはヒト ES 細胞、およびヒト iPS細胞である。

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚（例えば胚盤胞）の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能とを有する幹細胞である。

ES細胞は、受精卵の8細胞期または桑実胚段階の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M.J. Evans and M.H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された（J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147、J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848、J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259およびJ.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養によるES細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培地を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばH. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932、M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559、H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279およびH. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585などに記載されている。

ES細胞作製のための培地として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSR及び4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培地を使用し、37℃、5% CO_2湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる。また、ES細胞は、3～4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1mM $CaCl_2$及び20% KSRを含有するPBS（リン酸緩衝生理食塩水）中の0.25% トリプシン及び0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にして行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択で

は、OCT-3/4、NANOG、などの遺伝子マーカーの発現をReal-Time PCR法で検出したり、および/または、細胞表面抗原であるSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81を免疫染色法にて検出することで行うことができる（Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485)。

ヒトES細胞株である例えばKhES-1、KhES-2及びKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

(B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。精子幹細胞は、神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培地で自己複製可能であるし、ES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008),実験医学,26 巻,5号(増刊),41～46頁,羊土社(東京、日本))。

(C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹（iPS）細胞は、ある特定の１種もしくは複数種の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することによるか、または、ある特定の1種もしくは複数種の薬剤の使用により該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現量を上昇させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能を有する体細胞由来の人工の幹細胞である（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126: 663-676、K. Takahashi et al. (2007) Cell, 131: 861-872、J. Yu et al. (2007)

Science, 318: 1917-1920、M. Nakagawa et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 101-106、国際公開 WO 2007/069666 および国際公開 WO 2010/068955)。核初期化物質は、ES 細胞に特異的に発現している遺伝子もしくは ES 細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、またはそれらの遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, Esrrb, Esrrg および Glis1 が例示される。これらの初期化物質は、iPS 細胞樹立の際には、組み合わされて使用されてもよい。そのような組合せは、上記初期化物質を、少なくとも１種、２種もしくは３種含む組み合わせ、好ましくは３種もしくは４種を含む組み合わせとすることができる。

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒト cDNA のヌクレオチド配列情報、並びに、該 cDNA によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666 に記載の GenBank(米国 NCBI)または EMBL(ドイツ国)の accession numbers にアクセスすることによって入手可能である。また、L-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrg および Glis1 のマウスおよびヒトの cDNA 配列情報およびアミノ酸配列情報については、表１に示した NCBI accession numbers にアクセスすることにより取得できる。当業者は、該 cDNA 配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

［表１］

遺伝子名	マウス	ヒト
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
Glis1	NM_147221	NM_147193

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNA の形態で、例えば、ウイルス、プラ

スミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソームの使用、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（これらのベクターは、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007 に準ずる。）、アデノウイルスベクター(Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC および PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトもしくはポリアデニル化シグナルなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えば EF1α プロモーター、CAG プロモーター、SRα プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1α プロモーター、CAG プロモーター、MoMuLV LTR、CMV プロモーター、SRα プロモーターなどが好ましい例として挙げられる。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子またはピューロマイシン耐性遺伝子)、チミジンキナーゼ遺伝子、およびジフテリアトキシン遺伝子もしくはその断片などの選択マーカー配列、並びに、緑色蛍光タンパク質(GFP)、β グルクロニダーゼ(GUS)または FLAG などのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後に LoxP 配列を有してもよい。別の好ましい実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に

染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる(Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771-775、Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766-770、WO 2010/012077)。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソーマルに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus)、BK ウイルスおよび牛乳頭腫ウイルス (Bovine papillomavirus) の起点とその複製に関わる配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1 および oriP、または、Large T および SV40ori 配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201 および WO 2009/149233)。また、2 種またはそれ以上の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させることができる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列と配列の間は、IRES または口蹄病ウイルス (FMDV) 2A コード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008、WO 2009/092042 および WO 2009/152529)。

核初期化に際して、iPS 細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤[例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチン A、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344 等の低分子阻害剤、HDAC に対する siRNA および shRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば 5'-アザシチジン(5'-azacytidine)) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9a ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9a に対する siRNA および shRNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L-チャネルカルシウムアゴニスト(L-channel calcium agonist) (例えば Bayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53 阻害剤(例えば p53 に対する siRNA および shRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt シグナル伝達活性化因子 (例えば可溶性 Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIF または bFGF などの増殖因子、ALK5 阻害剤(例えば、SB431542)

(Nat. Methods, 6: 805-8 (2009))、有糸分裂活性化プロテインキナーゼシグナル伝達(mitogen-activated protein kinase signaling)阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ(glycogen synthase kinase)-3阻害剤 (PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461 (2009))、等を使用することができる。

薬剤によって核初期化物質の内在性のタンパク質の発現量を上昇させる方法に使用される、そのような薬剤としては、6-ブロモインジルビン-3'-オキシム、インジルビン-5-ニトロ-3'-オキシム、バルプロ酸、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、1-(4-メチルフェニル)-2-(4,5,6,7-テトラヒドロ-2-イミノ-3(2H)-ベンゾチアゾリル)エタノンHBr(pifithrin-alpha)、プロスタグランジンJ2およびプロスタグランジンE2等が例示される (WO 2010/068955)。

iPS 細胞誘導のための培養培地としては、例えば(1) 10～15%FBS を含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培地（これらの培地にはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)、(2) bFGFまたはSCFを含有するES細胞培養用培地、例えばマウスES細胞培養用培地(例えばTX-WES培地、トロンボX社)または霊長類ES細胞培養用培地(例えば霊長類(ヒトまたはサル)ES細胞用培地（販売先：リプロセル、京都、日本)、mTeSR-1)、などが含まれる。

培養法の例としては、例えば、37℃、5%CO_2存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDMEM/F12培地中で体細胞と核初期化物質（DNA、RNAまたはタンパク質）を接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞（例えば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培地で培養し、該接触から約30～約45日またはそれ以上ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5～10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

あるいは、前記細胞を、フィーダー細胞（例えば、マイトマイシンC処理STO細胞またはSNL細胞）上で10%FBS含有DMEM培地（これにはさらに、LIF、ペニ

シリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、b-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約 25～約 30 日またはそれ以上ののちに ES 様コロニーを形成させることができる。

上記培養の間には、培養開始 2 日目以降から毎日 1 回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ(100cm^2)あたり約 5×10^3～約 5×10^6 細胞の範囲である。

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む DNA を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（すなわち、選択培地）で細胞の培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、または、発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタおよびラット）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I 型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、T リンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)。具体的には、nt ES(nuclear transfer ES)細胞は、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立される。nt ES 細胞の作製のためには、核移植技術(J.B. Cibelli et al. (1998), Nat. Biotechnol., 16:642-646)と ES 細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008),実験医学,26巻,5号(増刊), 47～52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで再プログラム化することができる。

(F)融合幹細胞

融合幹細胞は、体細胞と卵子もしくはES細胞とを融合させることにより作製され、融合させたES細胞と同様な多能性を有し、さらに体細胞に特有の遺伝子も有する幹細胞である（Tada M et al. Curr Biol. 11:1553-8, 2001; Cowan CA et al. Science. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73)。

＜大脳皮質ニューロン＞

本発明において、大脳皮質ニューロンとは、特に断りがなければ、大脳皮質神経細胞、大脳皮質神経幹細胞及び大脳皮質神経前駆細胞から成る群から選択される一又は複数の細胞を含むものとする。本発明の方法によって製造される大脳皮質ニューロンは、好ましくは、Foxg1が陽性である細胞である。本発明において、Foxg1としては、NCBIアクセッション番号NM_005249で示されるポリヌクレオチドおよびこれらがコードするタンパク質が挙げられる。本発明の方法によって製造される大脳皮質ニューロンは、より好ましくは、大脳皮質の運動野の神経細胞または上位運動ニューロン、すなわち、大脳皮質の前方の神経細胞であり、さらに好ましくは大脳皮質の運動野の第V層の神経細胞である。このような神経細胞

は、Ctip2 が陽性であることを特徴とする細胞集団であり、これは CoupTF1 が陰性であることを特徴とする細胞と言い換えることができる。本発明において、Ctip2 としては、NCBI アクセッション番号 NM_001282237、NM_001282238、NM_022898 または NM_138576 で示されるポリヌクレオチドおよびこれらがコードするタンパク質が挙げられる。

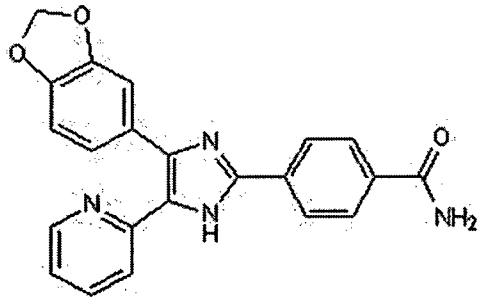
本発明において製造される大脳皮質ニューロンは、他の細胞種が含まれる細胞集団として製造されてもよく、例えば、製造された細胞集団において１５％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上または５０％以上が大脳皮質ニューロンであってもよい。本発明の方法により大脳皮質ニューロンを製造後、当該細胞を濃縮しても良い。大脳皮質ニューロンを濃縮する方法として、CD231、PCDH17 および CDH8 から成る群より選択される少なくとも一つのマーカータンパク質が陽性である細胞を抗体により標識し、フローサイトメーター（FACS）や磁気細胞分離装置（MACS）を用いて濃縮する方法が例示される。これらの抗体は、市販の抗体を適宜利用することができる。従って、工程（iv）として、工程（iii）で得られた細胞から、CD231、PCDH17 および CDH8 から成る群より選択される少なくとも一つのマーカータンパク質が陽性である細胞を抽出する工程をさらに含んでも良い。抽出後にさらに培養を継続しても良い。抽出後の培養は、例えば、工程（iii）と同様の条件で培養する方法が例示されるが、特に限定されない。

＜TGFβ 阻害剤＞

本発明において、TGFβ 阻害剤とは、TGFβ の受容体への結合から SMAD へと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体である ALK ファミリーへの結合を阻害する物質、または ALK ファミリーによる SMAD のリン酸化を阻害する物質が挙げられる。このような TGFβ 阻害剤としては、例えば、Lefty-1（NCBI Accession No. として、マウス：NM_010094、ヒト：NM_020997 が例示される）、SB431542、SB202190（以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20）、SB505124（GlaxoSmithKline）、NPC30345、SD093、SD908、SD208（Scios）、LY2109761、LY364947、LY580276（Lilly Research Laboratories）、A-83-01（WO 2009146408）およびこれらの誘導体などが例示される。本発明で使用される TGFβ 阻害剤は、好ましくは、下記の式Ｉで表される SB431542 または下記の式ＩＩで表される

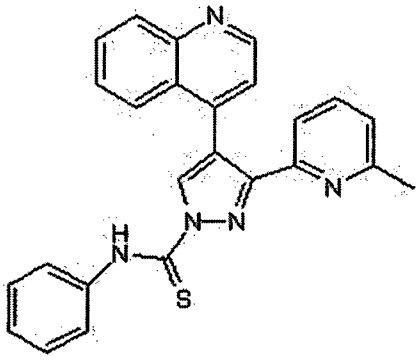
A-83-01 であり得る。

［化１］



（式Ｉ）

［化２］



（式ＩＩ）

培養液中における SB431542 の濃度は、ALK5 を阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM、100μM、500μM、1mM、であるがこれらに限定されない。好ましくは、、1μM から 100μM であり、より好ましくは、10μM である。

培養液中における A-83-01 の濃度は、ALK5 を阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μM であるがこれらに限定されない。好ましくは、500nM から 5μM であり、より好ましくは、500nM から 2μM である。

＜bFGF＞

本発明において、bFGF は、FGF2 とも称し、例えば Wako 社や Invitrogen 社等から市販されており容易に利用することが可能であるが、当業者に公知の方法によって細胞へ強制発現によって得てもよい。

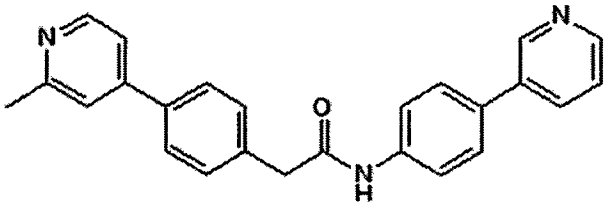
培養液中における bFGF の濃度は、例えば、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、

3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40 ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL であるがこれらに限定されない。好ましくは、1ng/mL から100ng/mL であり、より好ましくは、10ng/mL である。

＜Wnt 阻害剤＞

本発明において、Wnt 阻害剤とは、Wnt の産生を抑制する物質、または Wnt の受容体への結合から β カテニンの蓄積へと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体である Frizzled ファミリーへの結合を阻害する物質、または β カテニンの分解を促進する物質などが挙げられる。このような Wnt 阻害剤としては、例えば、DKK1 タンパク質（例えば、ヒトの場合、NCBI のアクセッション番号：NM_012242）、スクレロスチン（例えば、ヒトの場合、NCBI のアクセッション番号：NM_025237）、IWR-1（Merck Millipore）、IWP-2（Sigma-Aldrich）、IWP-3（Sigma-Aldrich）、IWP-4（Sigma-Aldrich）、IWP-L6（EMD Millipore）、C59（または、Wnt-C59）（Cellagen technology）、ICG-001（Cellagen Technology）、LGK-974（または、NVP-LGK-974）（Cellagen Technology）、FH535（Sigma-Aldrich）、WIKI4（Sigma-Aldrich）、KY02111（Minami I, et al, Cell Rep. 2:1448-1460, 2012）、PNU-74654（Sigma-Aldrich）、XAV939（Stemgent）およびこれらの誘導体などが例示される。本発明の多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを製造するにあたり、好ましい Wnt 阻害剤は、Wnt の産生を抑制する物質であり、例えば、Wnt タンパク質のプロセシングに関与する PORCN（ヒトの場合、NCBI のアクセッション番号：NP_001269096、NP_073736、NP_982299、NP_982300、または NP_982301 で表されるタンパク質が例示される）を阻害する物質が挙げられ、例えば、C59、IWP-3、IWP-4、IWP-L6 または LGK-974 である。本発明において、より好ましい Wnt 阻害剤は、下記の式ＩＩＩで表される C59 である。

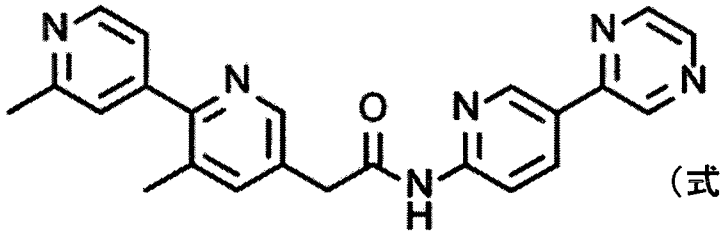
［化３］



（式ＩＩＩ）

培養液中における C59 の濃度は、Wnt を阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、0.1nM、0.5nM、1nM、2nM、2.5nM、3nM、4nM、5nM、6nM、7nM、7.5nM、8nM、9nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM であるがこれらに限定されない。好ましくは、1nM から 50nM であり、例えば、2nM から 50nM、より好ましくは 10nM から 50nM であるか、あるいは、10nM 未満の濃度であり、例えば、2nM 以上、10nM 未満である。

また、本発明において、下記の式ＶＩで表される LGK-974 も Wnt 阻害剤として好ましく利用することができる。



(式ＶＩ)

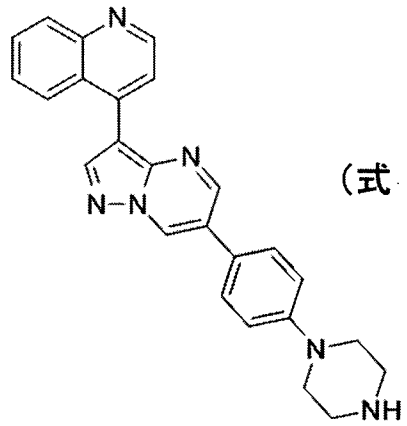
培養液中における LGK-974 の濃度は、Wnt を阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、1nM、10nM、25nM、50nM、100nM、150nM、200nM、500nM、750nM、1μM であるがこれらに限定されない。好ましくは、1nM から 1μM であり、例えば、1nM から 500nM、より好ましくは 10nM から 200nM であるか、あるいは、10nM から 150nM の濃度であり、例えば、10nM 以上、100nM 以下である。

＜BMP 阻害剤＞

本発明において、BMP 阻害剤とは、Chordin、Noggin、Follistatin、などのタンパク質性阻害剤、Dorsomorphin（すなわち、6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)、その誘導体 (P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116:II_60; P.B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4:33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3(8):e2904) および LDN193189（すなわち、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline) が例示される。Dorsomorphin および LDN193189 は市販されており、それぞれ Sigma-Aldrich社およびStemgent社から入手可能である。本発明で使用される BMP

阻害剤は、好ましくは、下記の式ＩＶで表されるLDN193189であり得る。

［化４］



（式ＩＶ）

培養液中におけるLDN193189の濃度は、BMPを阻害する濃度であれば特に限定されないが、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μMであるがこれらに限定されない。好ましくは、2μM以下の濃度であり、例えば、100nMから2μMであり、より好ましくは、500nMから2μMであるか、あるいは、2μM未満の濃度であり、例えば、100nM以上、2μM未満であり、より好ましくは、500nM以上、2μM未満である。

＜工程（i）＞

本発明の工程（i）で用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として、上述したTGFβ阻害剤、bFGF、Wnt阻害剤、BMP阻害剤を添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、Glasgow's Minimal Essential Medium(GMEM)培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (Invitrogen)およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEMとHam's F12培地を１：１で混合した培地である。基礎培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは血清に代えて血清代替物を添加してもよい。血清代替物は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント（Invitrogen)、B27サプリメント（Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素およびこれら

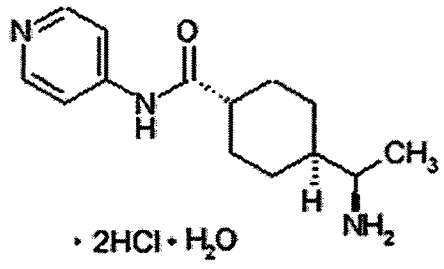
から選択される複数の組み合わせなどが挙げられる。好ましくは、血清代替物はKSRである。本発明の工程（i）において、KSRを用いる場合、基礎培地における濃度は、例えば、5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%が挙げられるが、好ましくは、20%未満、例えば10%以上15%以下の濃度である。基礎培地には、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax（Invitrogen）、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの１つ以上の物質も含有し得る。好ましい基礎培地は、KSR、2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸およびL-グルタミンを含有するDMEMとHam's F12培地を１：１で混合した培地である。

本発明の工程（i）において、多能性幹細胞を解離させて用いてもよく、細胞を解離させる方法としては、例えば、力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（例えば、Accutase(商標)およびAccumax(商標)など)またはコラゲナーゼ活性のみを有する解離溶液を用いた解離方法が挙げられる。好ましくは、Accumax が例示される）を用いて多能性幹細胞を解離する方法が用いられる。細胞を解離させた場合、ROCK阻害剤を適宜、解離後に添加して培養することが望ましい。ROCK阻害剤を添加する場合、少なくとも１日間添加して培養すればよい。多能性幹細胞を解離させる１日以上前、好ましくは１日前より、ROCK阻害剤を含有する培地で培養してもよい。

本発明において、ROCK阻害剤とは、Rhoキナーゼ(ROCK)の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632（例えば、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000)；Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284 (2000)参照)、Fasudil/HA1077(例えば、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照)、H-1152（例えば、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照)、Wf-536（例えば、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照）およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA 干渉誘導性核酸（例えば、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の低分子化合物も知られているので、本発明においてはこのような化合物またはそれらの

誘導体も使用できる（例えば、米国特許出願公開第 20050209261 号、同第 20050192304 号、同第 20040014755 号、同第 20040002508 号、同第 20040002507 号、同第 20030125344 号、同第 20030087919 号、及び国際公開第 2003/062227 号、同第 2003/059913 号、同第 2003/062225 号、同第 2002/076976 号、同第 2004/039796 号参照）。本発明では、１種または２種以上の ROCK 阻害剤が使用され得る。本発明で使用される ROCK 阻害剤は、好ましくは、下記式（Ｖ）で表される Y-27632 であり得る。

［化５］



（式Ｖ）

培地中の Y-27632 の濃度は、例えば、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM、100μM であるがこれらに限定されない。好ましくは、10μM 以上、50μM 以下である。

本発明の工程（i）の培養では、浮遊培養によって行われることが好ましい。本発明において、浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態で凝集体（スフェアとも言う）を形成させて培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）、非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127 等）またはリン脂質類似構造物（例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする水溶性ポリマー（Lipidure））によるコーティング処理した培養容器を使用することによって行う培養である。

本発明の工程（i）の培養条件について、培養温度は、特に限定されないが、約

30～40℃、好ましくは約 37℃であり、CO_2 含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO_2 濃度は、好ましくは約 2～5%である。O_2 濃度は、通常の空気中における O_2 濃度であってもよく、あるいは、通常以上の高酸素条件であっても通常以下の低酸素条件であってもよい。本発明において、高酸素条件とは、25%以上の O_2 濃度、30%以上の O_2 濃度、35%以上の O_2 濃度、または 40%以上の O_2 濃度が例示される。低酸素条件とは、10%以下の O_2 濃度、5%以下の O_2 濃度、4%以下の O_2 濃度、3%以下の O_2 濃度、2%以下の O_2 濃度、または 1%以下の O_2 濃度が例示される。

本発明の工程（i）は、特に限定されないが、例えば、3 日以上、4 日以上、5 日以上、6 日以上、7 日以上、またはそれ以上の日数が挙げられ、上限は特に限定されないが、36 日以下、30 日以下、24 日以下、18 日以下、12 日以下が挙げられる。より好ましくは、3 日以上、12 日以下であり、さらに好ましくは、6 日である。

＜工程（ii）＞

本発明の工程（ii）で用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として、上述した Wnt 阻害剤、BMP 阻害剤を添加して調製することができる。基礎培地としては、例えば、Glasgow's Minimal Essential Medium(GMEM)培地、IMDM 培地、Medium 199 培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM 培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12 培地、RPMI 1640 培地、Fischer's 培地、Neurobasal Medium (Invitrogen) およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEM と Ham's F12 培地を 1：1 で混合した培地である。基礎培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは血清に代えて血清代替物を添加してもよい。血清代替物は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES 細胞培養時の FBS の血清代替物)、N2 サプリメント(Invitrogen)、B27 サプリメント(Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素およびこれらから選択される複数の組み合わせなどが挙げられる。好ましくは、血清代替物は KSR である。本発明の工程（ii）において、KSR を用いる場合、基礎培地における濃度は、例えば、5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%が挙げられるが、好ましくは、20%未満、例えば 10%以上 15%以下の濃度である。

基礎培地には、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの１つ以上の物質も含有し得る。好ましい基礎培地は、KSR、2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸およびL-グルタミンを含有するDMEMとHam's F12培地を１：１で混合した培地である。

本発明の工程（ii）において、前記工程（i）で得られた細胞を解離させて用いてもよく、そのまま用いても良い。より好ましくは、前記工程（i）で得られたを細胞において、培養液を交換して培養を継続する方法である。従って、本発明の工程（ii）の培養では、浮遊培養によって行われることが好ましい。

本発明の工程（i）の培養条件について、培養温度は、特に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO_2含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO_2濃度は、好ましくは約2～5%である。O_2濃度は、通常の空気中におけるO_2濃度であってもよく、あるいは、通常以上の高酸素条件であっても通常以下の低酸素条件であってもよい。

本発明の工程（ii）は、特に限定されないが、例えば、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、またはそれ以上の日数が挙げられ、上限は特に限定されないが、48日以下、42日以下、36日以下、30日以下、24日以下、18日以下が挙げられる。より好ましくは、6日以上18日以下であり、さらに好ましくは、12日である。

＜工程（iii）＞

本発明の工程（iii）で用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地を用いることができる。基礎培地としては、例えば、Glasgow's Minimal Essential Medium(GMEM)培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (Invitrogen)およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、Neurobasal Mediumである。基礎培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは血清に代えて血清代替物を添加してもよい。血清代替物は、例えば、アルブミン、トランスフェ

リン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES 細胞培養時の FBS の血清代替物)、N2 サプリメント (Invitrogen)、B27 サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素およびこれらから選択される複数の組み合わせなどが挙げられる。好ましくは、血清代替物は B27 サプリメントである。基礎培地には、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましい基礎培地は、B27 サプリメントおよび L-グルタミンを含有する Neurobasal Medium である。本発明の工程 (iii) で用いる培養液は、上記基礎培地に例えば、FGF8(線維芽細胞成長因子 8(fibroblast growth factor 8))、神経栄養因子などを適宜添加したものを用いることができる。

本発明において、FGF8 とは、特に限定されないが、ヒト FGF8 の場合、FGF8a、FGF8b、FGF8e または FGF8f の 4 つのスプライシングフォームが例示され、本発明ではより好ましくは、FGF8b である。FGF8 は、例えば Wako 社や R&D systems 社等から市販されており容易に利用することが可能であるが、当業者に公知の方法によって細胞へ強制発現によって得てもよい。

培養液中における FGF8 の濃度は、例えば、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、150 ng/mL、200ng/mL、250ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、2000ng/mL、5000ng/mL であるがこれらに限定されない。好ましくは、100ng/mL である。

本発明において、神経栄養因子とは、神経細胞の生存と機能維持に重要な役割を果たしている膜受容体へのリガンドであり、例えば、神経成長因子 (Nerve Growth Factor (NGF))、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF))、ニューロトロフィン 3 (NT-3)、ニューロトロフィン 4/5 (NT-4/5)、ニューロトロフィン 6 (NT-6)、bFGF、酸性 FGF、FGF-5、上皮細胞増殖因子 (Epidermal Growth Factor (EGF))、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor (HGF))、インスリン、インスリン様増殖因子 1 (IGF 1)、インスリン様増殖因子 2 (IGF 2)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial cell line-derived Neurotrophic Factor (GDNF))、TGF-b2、TGF-b3、インターロイキン 6 (IL-6)、毛様体神経栄養因子 (Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)) および LIF などが挙げられる。神経栄

養因子は、、例えばWako社やR&D systems社等から市販されており容易に利用することが可能であるが、当業者に公知の方法によって細胞へ強制発現によって得てもよい。

本発明の工程（iii）では、前記工程（ii）で得られた細胞を培養する工程であり、当該培養は、接着培養であっても浮遊培養であっても良い。接着培養を行う場合、細胞外基質をコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行い得る。コーティング処理は、細胞外基質を含有する溶液を培養容器に入れた後、当該溶液を適宜除くことによって行い得る。

本発明において、細胞外基質とは、細胞の外に存在する超分子構造体であり、天然由来であっても、人工物（組換え体）であってもよい。例えば、ポリリジン、ポリオルニチン、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、テネイシン、エンタクチン、エラスチン、フィブリリン、ラミニンといった物質およびこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、組み合わせて用いられてもよく、例えば、BD Matrigel(商標)などの細胞からの調製物であってもよい。好ましくは、ポリオルニチン、ラミニンおよびフィブロネクチンの混合物である。

本発明の工程（iii）において、浮遊培養を行う場合、前記工程（ii）で得られた細胞の培養液を適宜、上述の本発明の工程（iii）で用いる培養液に置換することによって行い得る。本発明において、培養液を置換するにあたり、全ての培養液を置換してもよく、例えば、半量の置換を数回に分けて行っても良い。

本発明の工程（iii）の培養条件について、培養温度は、特に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO_2含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO_2濃度は、好ましくは約2～5%である。O_2濃度は、通常の空気中におけるO_2濃度であってもよく、あるいは、通常以上の高酸素条件であっても通常以下の低酸素条件であってもよい。

本発明の工程（iii）は、大脳皮質ニューロンが得られるという観点から、長期にわたって培養を継続しても特に弊害がないことから、特に上限を設定する必要はないが、例えば、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、14日以上、21日以上、28日以上、30日以上、35日以上、または

それ以上の日数が挙げられる。より好ましくは、28日以上であり、さらに好ましくは、28日または30日である。

＜大脳障害治療剤＞

本発明で得られた大脳皮質ニューロンは、製剤として大脳障害患者に投与することができる。本発明において、大脳障害とは、虚血等により神経細胞が欠落した状態を言い、例えば、脳梗塞後の障害が挙げられる。上記の方法により製造された大脳皮質ニューロンを生理食塩水等に懸濁させ、患者の神経細胞欠落部位に移植することによって行われる。従って、本発明では、上記の方法で多能性幹細胞より得られた大脳皮質ニューロンを含む大脳障害治療剤、好ましくは、脳梗塞治療剤を提供する。

本発明において、大脳障害治療剤に含まれる大脳皮質ニューロンの細胞数は、移植片が投与後に生着できれば特に限定されないが、例えば、15×10^4個以上含まれ得る。また、症状や体躯の大きさに合わせて適宜増減して調製されてもよい。

大脳皮質ニューロンの疾患部位への移植は、例えば、Nature Neuroscience,2,1137(1999)もしくはN Engl J Med. ;344:710-9(2001)に記載されるような手法によって行うことができる。

＜キット＞

本発明での他の実施態様において、多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを作製するキットが含まれる。当該キットには、上述した大脳皮質ニューロンを作製する各工程に使用する培養液、添加剤または培養容器等が含まれる。例えば、TGFβ阻害剤、bFGF、Wnt阻害剤およびBMP阻害剤から成る群より選択される試薬が挙げられる。本キットには、さらに製造工程の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

（実施例１）

細胞

ヒトES細胞（KhES-1）は、京都大学再生医科学研究所より受領した（Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345:926-32, 2006）。ヒトiPS細胞である

404C2は、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-MYC、LIN28およびp53shRNAをヒト線維芽細胞にエピソーマルベクターにより導入して得られた細胞として京都大学の山中教授らより受領した（Okita ,et al, Nat Methods. 8:409-412, 2011)。ヒトiPS細胞である836B1は、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-MYC、LIN28、GLIS1およびp53shRNAをヒト線維芽細胞にエピソーマルベクターにより導入して得られた細胞として京都大学の山中教授らより受領した。ES細胞およびiPS細胞は、SNL細胞上で培養した（Takahashi K, et al, Cell. 131:861-872, 2007)。

大脳皮質の分化誘導方法

分化誘導前日に10μM Y-27632（WAKO）を培養液へ添加して培養したES細胞またはiPS細胞をSNL feeder上から分離させるためにCTKでSNL細胞を除去した後、Accumax（ICT)を用いて解離させ、96 wellプレート（Lipidure-coat 96 wellプレート(NOF Corporation))に1well あたり9×10^3個を移し、50μM Y-27632(WAKO)、10μM SB43152（Sigma)、10ng/ml bFGF（Invitrogen)、各種Wnt阻害剤（DKK1（R&D, 500ng/ml)、C59（Cellagen Technology, 2-10nM)、XAV（Stemgent, 500nM-2μM）またはIWP4(Stemgent, 500nM-2.5μM))、LDN193189(Stemgent)、KSR(Invitrogen)、0.1mM MEM 非必須アミノ酸(Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール(WAKO)および2mM L-Gln（Invitrogen）を含有するDMEM/F12（WAKO）中で、浮遊培養を行った（分化誘導開始、day0)。3日後、培地交換に際して、Y-27632を含有しない同培地へ交換した（day3)。3日後、各種Wnt阻害剤（DKK1、C59、XAV）またはIWP4（Stemgent))、LDN193189（Stemgent)、KSR（Invitrogen)、0.1mM MEM 非必須アミノ酸（Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール（WAKO）および2mM L-Gln（Invitrogen）を含有するDMEM/F12（WAKO）へ培地を交換した（day6)。以後、3日毎に同じ培地に交換し、分化誘導開始から18日間培養を行った(day18)。

得られた細胞塊を、50μg/ml オルニチン（Sigma)、5μg/ml ラミニン（Sigma)、5μg/ml フィブロネクチン（BD Bioscience Pharmingen）でコートしたディッシュ（24well プレート（BD)）上に移し、B27（Invitrogen)、2mM L-Gln および10 units/ml ペニシリン及びストレプトマイシン（Invitrogen)を添加したNeurobasal（Invitrogen）中で、培養を継続した。最長は、分化誘導開始から46日間培養を行った。なお、培地交換は、2または3日毎にて行った。誘導工程の

プロトコールを図１に示す。

Wnt 阻害剤の検討

前期の誘導方法において、Wnt 阻害剤として、500ng/ml DKK1、2nM C59、500nM XAV または 500nM IWP4 を添加し、18 日間培養した後の細胞において、Six3（前脳マーカー）、Sox1（神経外胚葉マーカー）、Foxg1（大脳皮質形成因子）、Lhx2（大脳皮質形成因子）、Emx2（前脳の後方マーカー）、CoupTF1（前脳の後方マーカー）および Pax6（前脳の前方マーカー）の遺伝子の発現量を qPCR 法により測定した（図２）。その結果、Wnt 阻害剤として DKK１を用いた場合は、Emx2 や CoupTF1 の発現量が多く、前脳の後方の細胞が多く誘導されることが見出された。

さらに、Wnt 阻害剤として、500ng/ml DKK1、2nM C59 または 500nM XAV を添加し、上記誘導方法にて、46 日間培養した後の細胞に対して、CoupTF1 および大脳皮質ニューロンの第Ｖ層のマーカーである Ctip2 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、C59 を用いた場合、CoupTF1 陰性 Ctip2 陽性の大脳皮質ニューロンが多く誘導されることが確認された（図３）。

以上の結果より、C59 が Wnt 阻害剤として好適に用いることができることが示唆された。

C59 の濃度の検討

前期の誘導方法において、Wnt 阻害剤として C59 を用いる場合の濃度について検討を行った。詳細には、無添加、2.5nM、10nM および 1μM の C59 を用いて 18 日間培養した。このとき、1μM の C59 を用いた場合、浮遊培養において、スフェア（sphere）を形成しなかったため、以後の分析を行わなかった。得られたスフェアについて、Pax6 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、いずれの条件においても陽性細胞が確認された（図４A）。さらに、得られたスフェアについて、Foxg1、Lhx2、Emx2 および CoupTF1 の遺伝子の発現量を qPCR 法により測定した（図４B）。その結果、10nM の C59 を用いた場合に得られた細胞において CoupTF1 の発現量が低く、Lhx2 および Foxg1 の発現量が高いことから、至適な条件であったことが確認できた。しかし、ES 細胞（Kh-1）を用いた場合、10nM の C59 を用いた場合に得られたスフェアは、OFL コートディッシュへの接着が少ないことから、10nM より低い濃度の方が適している場合もあることが示唆された。従って、以下の検

討では、2nMのC59をWnt阻害剤として用いることとした。

LDN193189の濃度の検討

前期の誘導方法において、LDN193189の濃度について検討を行った。詳細には、0.1μM、0.5μMおよび2μMのLDN193189を用いて46日間培養した。得られた細胞について、CoupTF1およびCtip2に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、濃度依存的に、CoupTF1陰性Ctip2陽性細胞が得られることが確認された（図5A,B)。さらに、CoupTF1およびSfrp1の遺伝子の発現量をqPCR法により測定した（図5C)。その結果、濃度依存的に、CoupTF1の発現量が低く、Sfrp1の発現量が高い細胞が得られることが確認された。しかし、2μMのLDN193189を用いた場合、培養18日目に得られたスフェアにおいて細胞死が多く確認されたことから、細胞毒性も強く現れることが確認された。LDN193189は、2μMより低い濃度の方が以後の操作を考慮すると適していることが示唆された。従って、以下の検討では、0.1μMまたは0.5μMのLDN193189を用いることとした。

KSRの濃度の検討

前期の誘導方法において、KSRの濃度について検討を行った。詳細には、10%、15%および20%のKSRを用いて46日間培養した。得られた細胞について、CoupTF1およびCtip2に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、濃度依存的に、CoupTF1陰性Ctip2陽性細胞が減少することが確認された（図6A,B)。さらに、CoupTF1およびSfrp1の遺伝子の発現量をqPCR法により測定した（図6C)。その結果、濃度依存的に、CoupTF1の発現量が高く、Sfrp1の発現量が低い細胞が得られることが確認された。従って、KSRは、20%より低い濃度の方が大脳皮質の前方の大脳皮質ニューロンを誘導することに適していることが示唆された。以下の検討では、10%または15%のKSRを用いることとした。

SB431542の代替物の検討

前期の誘導方法において、SB431542の代替物として、A-83-01の濃度について検討を行った。詳細には、0.5μM、2μMまたは5μMのA-83-01（WAKO）を用いて46日間培養した。得られた細胞について、CoupTF1およびCtip2に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、SB431542と同様に、CoupTF1陰性Ctip2陽性細胞が得られることが確認された（図7)。また、検討したA-83-01の濃度範囲では、

大脳皮質ニューロンの誘導効率に大きな違いは見られなかった。

移植の効果

上記の方法で48日間誘導した大脳皮質ニューロンをPBSに懸濁させ、マウスの大脳皮質の運動野に移植し6月目に、摘出した脳切片をhuman NCAM抗体（Santa Cruz)で免疫染色し、解析したところ、移植細胞に由来する軸索が、中脳、橋、延髄と伸長し皮質脊髄路により、脊髄まで到達していることが確認された（図８～１０)。

（実施例２）

iPS細胞の培養

iPS細胞（836B1）は、Miyazaki T et al., Nat Commun. 3:1236, 2012に記載に準拠した方法で培養した。簡潔には、Laminin511E8でコーティングした6 well プレートにて培養した。

大脳皮質の分化誘導方法の改良

iPS細胞（836B1）をAccumaxを用いて解離させ、96 well プレート（Lipidure-coat 96 well plate)に1well あたり9×10^3個を移し、50μM Y-27632、10μM SB43152、10ng/ml bFGF、50nM C59、0.1μM LDN193189、10% KSR、0.1mM MEM非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノールおよび2mM L-Glnを含有するDMEM/F12中で、浮遊培養を行った（分化誘導開始、day0)。3日後、培地交換に際して、Y-27632を含有しない同培地へ交換した（day3)。3日後、50nM C59、0.1μM LDN193189、10% KSR、0.1mM MEM非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノールおよび2mM L-Glnを含有するDMEM/F12へ培地を交換した（day6)。以後、3日毎に同じ培地に交換し、分化誘導開始から18日間培養を行った（day18)。

得られた細胞塊を、50μg/ml オルニチン、5μg/ml ラミニン、5μg/ml フィブロネクチンをコートしたディッシュ（24well プレート）上に移し、B27、2mM L-Gln、および、10 units/ml ペニシリン及びストレプトマイシンを添加したNeurobasal中で、分化誘導開始から48日目まで培養を行った。なお、培地交換は、3または4日毎にて行った。

上述の分化誘導48日目の細胞をAccumaxを用いて解離し、抗CD231抗体（Thermo)、抗CDH8抗体（Antibodies）または抗PCDH17抗体（Thermo）を用いて

標識し、FACSを用いて解析した（図１１）。誘導後の細胞において、CD231、CDH8またはPCDH17が陽性である細胞が、それぞれ、6.9%、1.4%または8.4%を含有することが確認された。

続いて、このCD231、CDH8またはPCDH17の陽性細胞を回収し、96wellプレート（Lipidure-coat 96wellプレート）に1 wellあたり$1x10^4$個を移し、B27、2mM L-Gln、10 units/ml ペニシリン及びストレプトマイシン、および 10μM Y-27632を添加したNeurobasal中で3日間培養し、その後、Y-27632を除いた同培地で、さらに11日間培養を行った。培養後、CoupTF1およびCtip2に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Ctip2陽性細胞が、CD231、CDH8またはPCDH17の陽性細胞に多く確認された（図１２A)。また、CoupTF1が陰性でCtip2が陽性である細胞も、CD231、CDH8またはPCDH17の陽性細胞に多く含まれることが確認された。以上より、上記方法により誘導した細胞からCD231、CDH8またはPCDH17が陽性である細胞を抽出することで、大脳皮質運動野に存在する神経細胞を濃縮することができる可能性が示唆された。

（実施例３）

大脳皮質の分化誘導方法の改良

Laminin511E8を用いてフィーダーフリー条件で培養したiPS細胞（836B1）をAccumax を用いて解離させ、96 wellプレート(Lipidure-coat 96 wellプレート)に 1well あたり 9×10^3個を移し、50μM Y-27632、10μM SB43152、10ng/ml bFGF、10nM-50nM C59、0.1μM LDN193189、10% KSR、0.1mM MEM 非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノールおよび2mM L-Glnを含有するDMEM/F12中で、浮遊培養を行った（分化誘導開始、day0)。3日後、培地交換に際して、Y-27632を含有しない同培地へ交換した（day3)。3日後、10nM-50nM C59、0.1μM LDN193189、10% KSR、0.1mM MEM非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノールおよび2mM L-Glnを含有するDMEM/F12へ培地を交換した（day6)。以後、3日毎に同じ培地に交換し、分化誘導開始から18日間培養を行った（day18)。

Day18の培地を半量吸引除去し、B27、2mM L-Gln、および、10 units/mlペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した Neurobasal を除去した量だけ添加した。同様に、Day21においても半量の培地を交換した。Day24において、ペトリデ

ィッシュへ細胞を移し、以後、3 または 4 日毎に半量の培地を交換した。Day46にて、得られた細胞において、CoupTF1 および Ctip2 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、実施例１または２で得られた細胞と CoupTF1 および Ctip2 の発現において大きな違いは見られなかった(図１３Ａおよび B)。以上より、Day18 以降においても浮遊培養によって、所望の大脳皮質運動野に存在する神経細胞が誘導できることが確認された。

（実施例４）

大脳皮質の分化誘導方法の改良

分化誘導前日に 10μM Y27632 を培養液へ添加して培養した iPS 細胞（836B1）を SNL feeder 上から分離させるために CTK で SNL 細胞を除去した後、Accumax を用いて解離させ、96 well plate（Lipidure-coat 96 well plate）に 1well あたり 9×10^3 個を移し、50μM Y-27632、10μM SB43152、10ng/ml bFGF、各種 Wnt 阻害剤（C59 50nM, LGK-974 100nM, ICG-001 1μM（Cellagen Technology））、100nM LDN193189、10% KSR、0.1mM MEM 非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノールおよび 2mM L-Gln を含有する DMEM/F12 中で、浮遊培養を行った(分化誘導開始、day0)。3 日後、培地交換に際して、Y-27632 を含有しない同培地へ交換した(day3)。3 日後、各種 WNT 阻害剤（C59, LGK-974, ICG-001）、100nM LDN193189、10% KSR、0.1mM MEM 非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノールおよび 2mM L-Gln を含有する DMEM/F12 へ培地を交換した（day6)。以後、3 日毎に同じ培地に交換し、分化誘導開始から 18 日間培養を行った（day18)。

Day18 の培地を半量吸引除去し、B27、2mM L-Gln、および、10 units/ml ペニシリン及びストレプトマイシンを添加した Neurobasal を除去した量だけ添加した。同様に、Day21 においても半量の培地を交換した。Day24 において、ペトリディッシュへ細胞を移し、以後、3 または 4 日毎に半量の培地を交換した。Day46にて、得られた細胞において、CoupTF1 および Ctip2 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Ctip2 の発現において、実施例１または２で得られた細胞と大きな違いは見られなかった（図１４Ａおよび B)。また、CoupTF1 陰性で Ctip2 陽性細胞の誘導効率は C59 と類似の作用をもつ LGK-974 において、大きな違いはなかったが、C59 と異なる作用をもつ ICG-001 においては、著しく低かった（図

１４C)。以上より、C59 と類似の作用をもつ WNT 阻害剤 LGK-974 を利用しても、所望の大脳皮質運動野に存在する神経細胞が誘導できることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明は、再生医療、特に脳虚血等の傷害脳の治療に有用である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

［請求項１］

以下の工程を含む多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを製造する方法：

（i）多能性幹細胞をTGFβ阻害剤、bFGF、Wnt阻害剤、およびBMP阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、

（ii）前記工程(i)で得られた細胞をWnt阻害剤、およびBMP阻害剤を含む培養液中で浮遊培養する工程、

（iii）前記工程(ii)で得られた細胞を培養する工程。

［請求項２］

前記多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞である、請求項１に記載の方法。

［請求項３］

前記ヒト多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞又はヒトES細胞である、請求項２に記載の方法。

［請求項４］

前記TGFβ阻害剤が、SB431542またはA-83-01である、請求項１から３のいずれか１項に記載の方法。

［請求項５］

前記Wnt阻害剤が、PORCN阻害剤である、請求項１から４のいずれか１項に記載の方法。

［請求項６］

前記Wnt阻害剤が、C59またはLGK-974である請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。

［請求項７］

前記BMP阻害剤が、LDN193189である、請求項１から６のいずれか１項に記載の方法。

［請求項８］

前記培養液が血清又は血清代替物をさらに含む、請求項１から７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項９]

前記工程（i）の培養液がROCK阻害剤をさらに含む、請求項１から８のいずれか１項に記載の方法。

[請求項１０]

前記工程（iii）に続いてさらに、工程（iv）CD231、PCDH17およびCDH8から成る群より選択される少なくとも一つのマーカータンパク質が陽性である細胞を抽出する工程を含む請求項１から９のいずれか１項に記載の方法。

[請求項１１]

前記大脳皮質ニューロンが、Ctip2陽性CoupTF1陰性であることを特徴とする大脳皮質の運動野の神経細胞である、請求項１から１０のいずれか１項に記載の方法。

[請求項１２]

前記工程（i）が、少なくとも3日間行われる、請求項１から１１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項１３]

前記工程（ii）が、少なくとも6日間行われる、請求項１から１２のいずれか１項に記載の方法。

[請求項１４]

請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法で得られる、大脳皮質ニューロンを含む細胞培養物。

[請求項１５]

TGFβ阻害剤、bFGF、Wnt阻害剤、及びBMP阻害剤を含む、多能性幹細胞から大脳皮質ニューロンを作製するためのキット。

[請求項１６]

前記TGFβ阻害剤が、SB431542またはA-83-01であり、前記Wnt阻害剤が、C59またはLGK-974であり、前記BMP阻害剤が、LDN193189である、請求項１５に記載のキット。

図 1

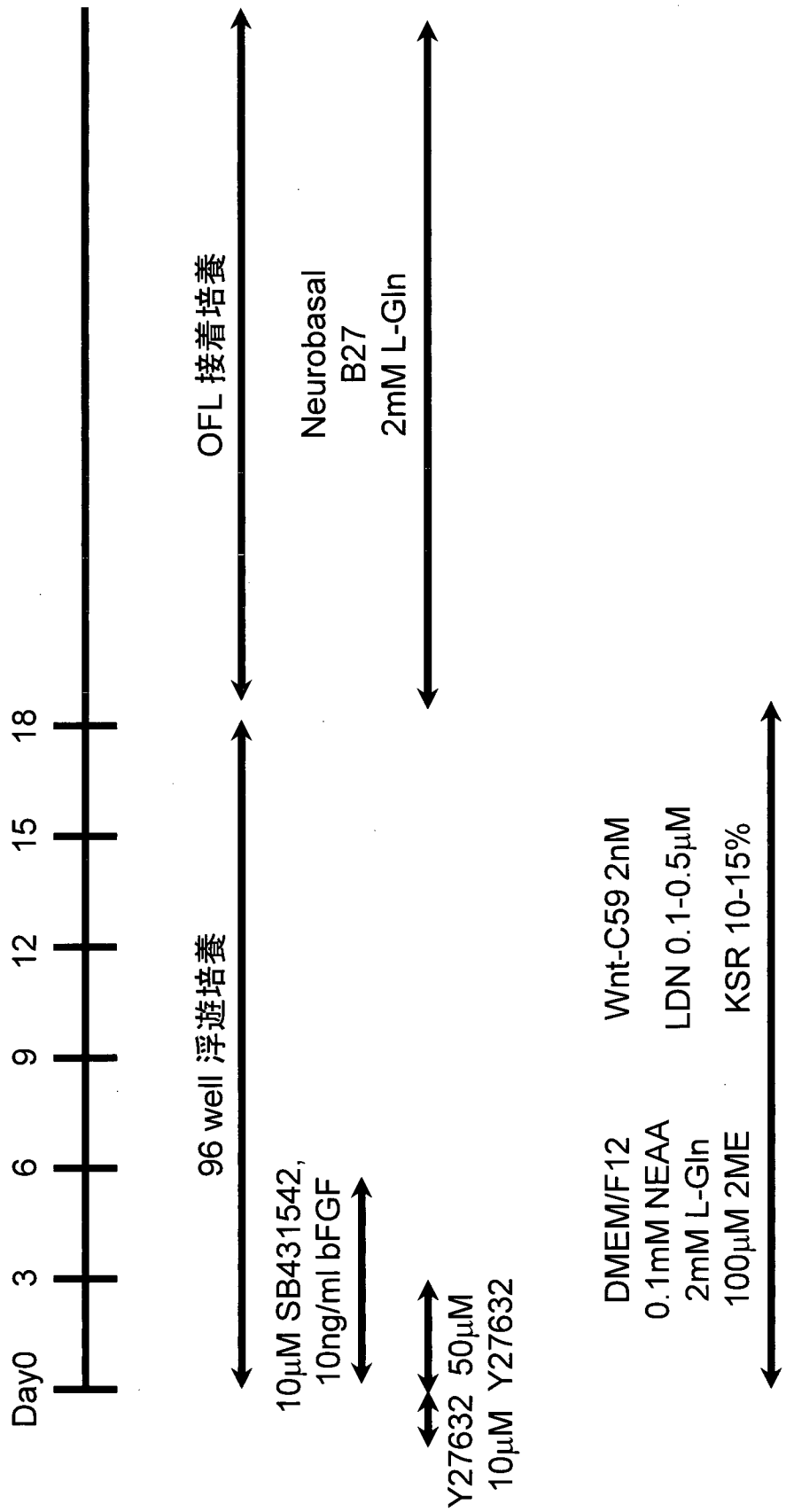

Day0
3
6
9
12
15
18
96 well 浮遊培養
OFL 接着培養
Neurobasal
B27
2mM L-Gln
10μM SB431542,
10ng/ml bFGF
Y27632 50μM
10μM Y27632
DMEM/F12
0.1mM NEAA
2mM L-Gln
100μM 2ME
Wnt-C59 2nM
LDN 0.1-0.5μM
KSR 10-15%

図 2

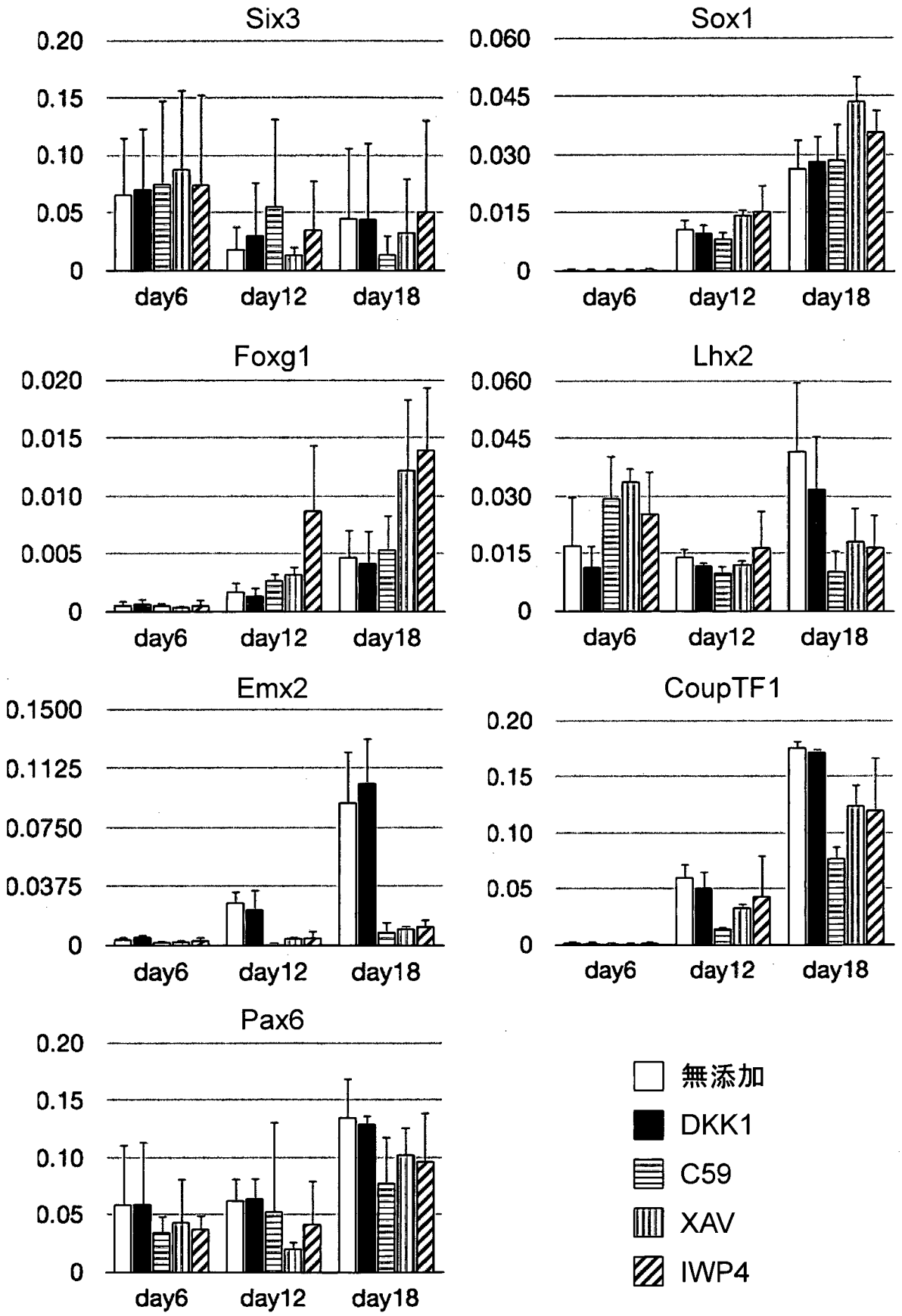
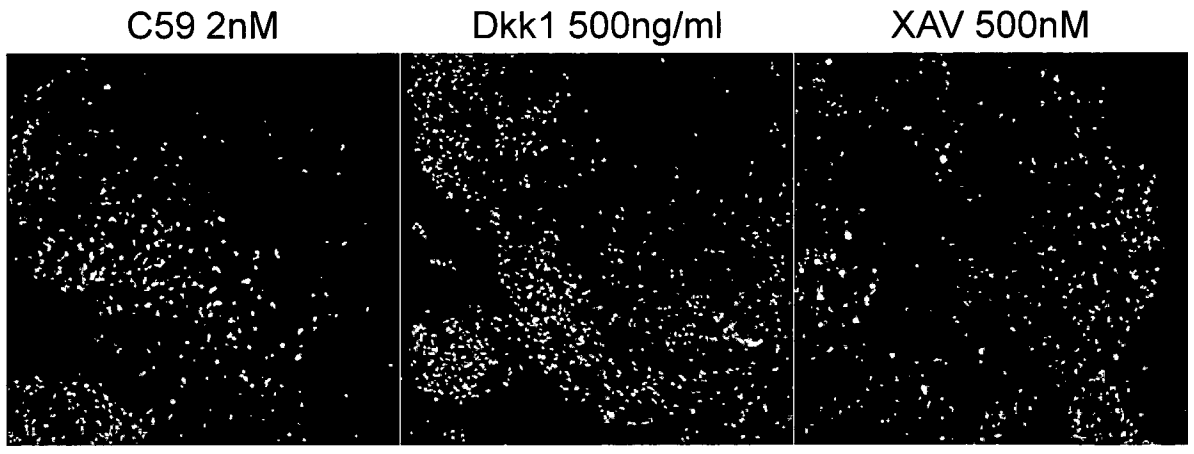

Six3
0.20
0.15
0.10
0.05
0
day6
day12
day18
Sox1
0.060
0.045
0.030
0.015
0
day6
day12
day18
Foxg1
0.020
0.015
0.010
0.005
0
day6
day12
day18
Lhx2
0.060
0.045
0.030
0.015
0
day6
day12
day18
Emx2
0.1500
0.1125
0.0750
0.0375
0
day6
day12
day18
CoupTF1
0.20
0.15
0.10
0.05
0
day6
day12
day18
Pax6
0.20
0.15
0.10
0.05
0
day6
day12
day18
無添加
DKK1
C59
XAV
IWP4

図 3

A


C59 2nM
Dkk1 500ng/ml
XAV 500nM
Ctip2/CoupTF1

B

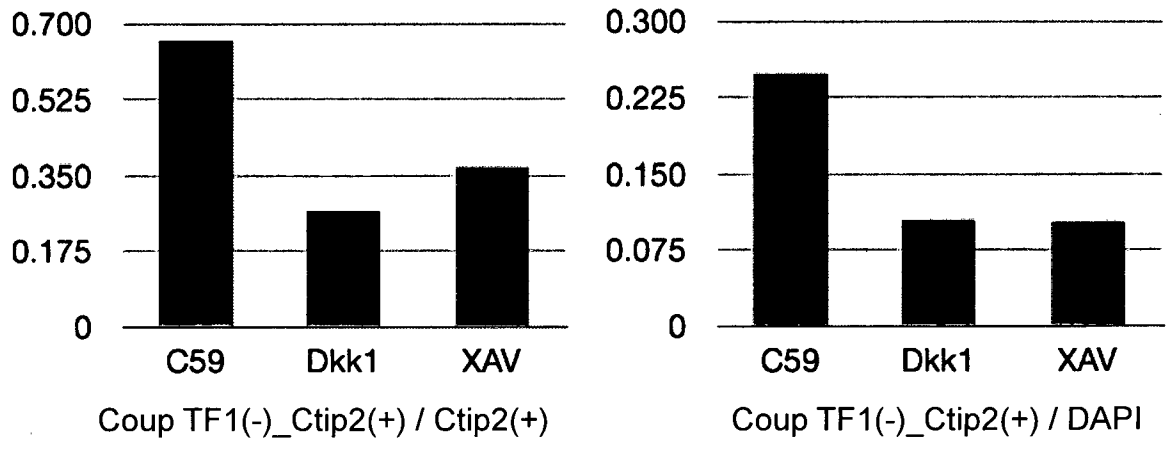

0.700
0.525
0.350
0.175
0
C59
Dkk1
XAV
Coup TF1(-)_Ctip2(+) / Ctip2(+)
0.300
0.225
0.150
0.075
0
C59
Dkk1
XAV
Coup TF1(-)_Ctip2(+) / DAPI

図4

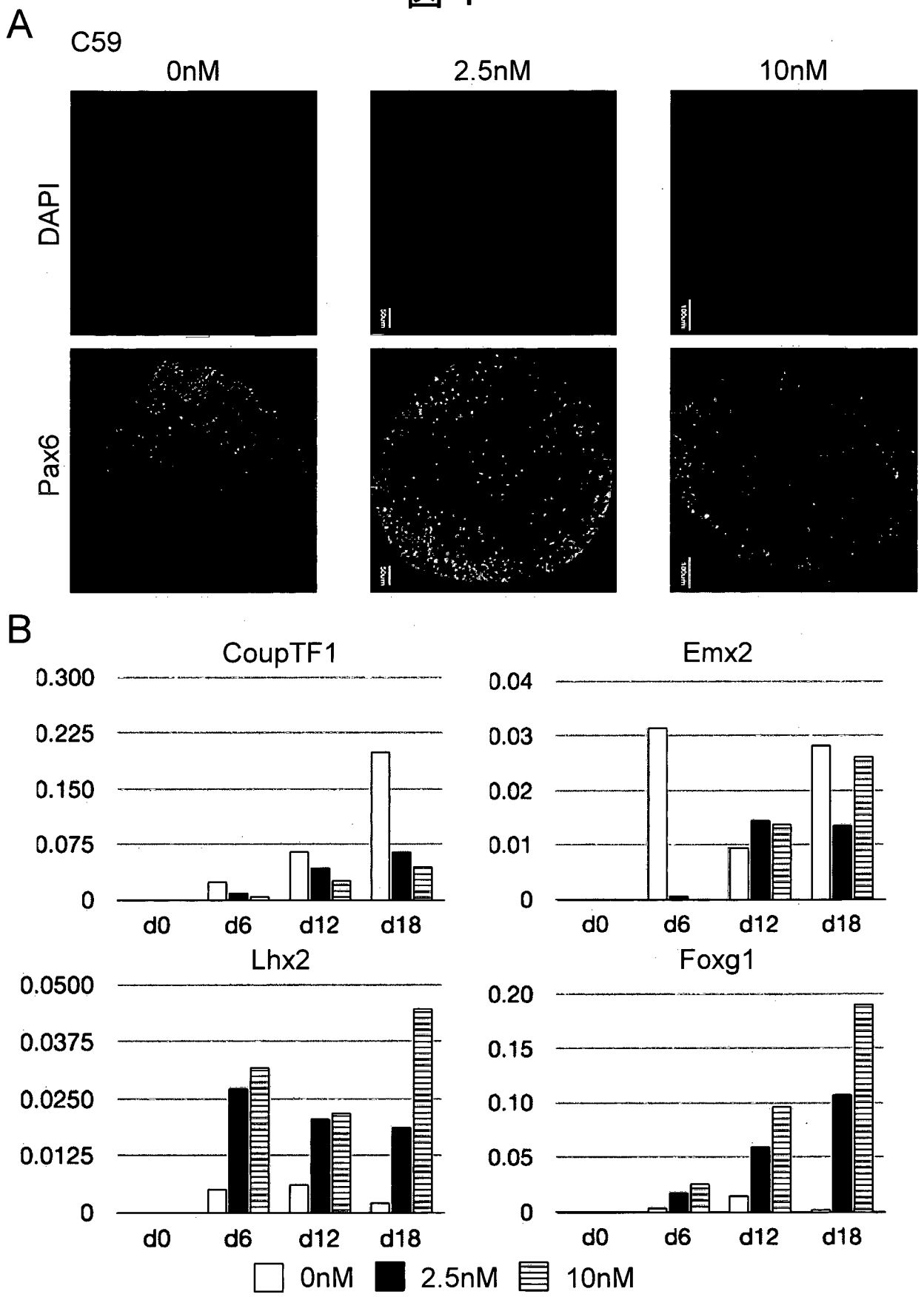
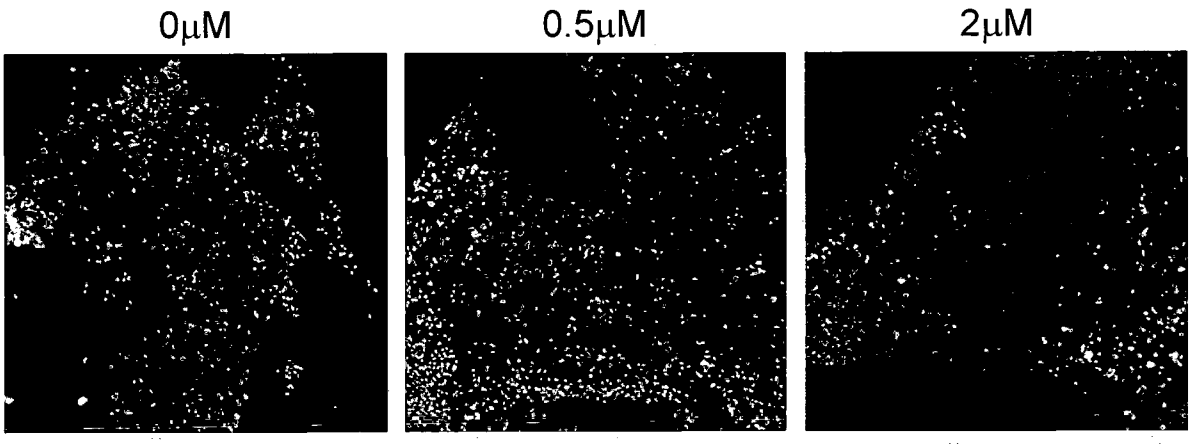
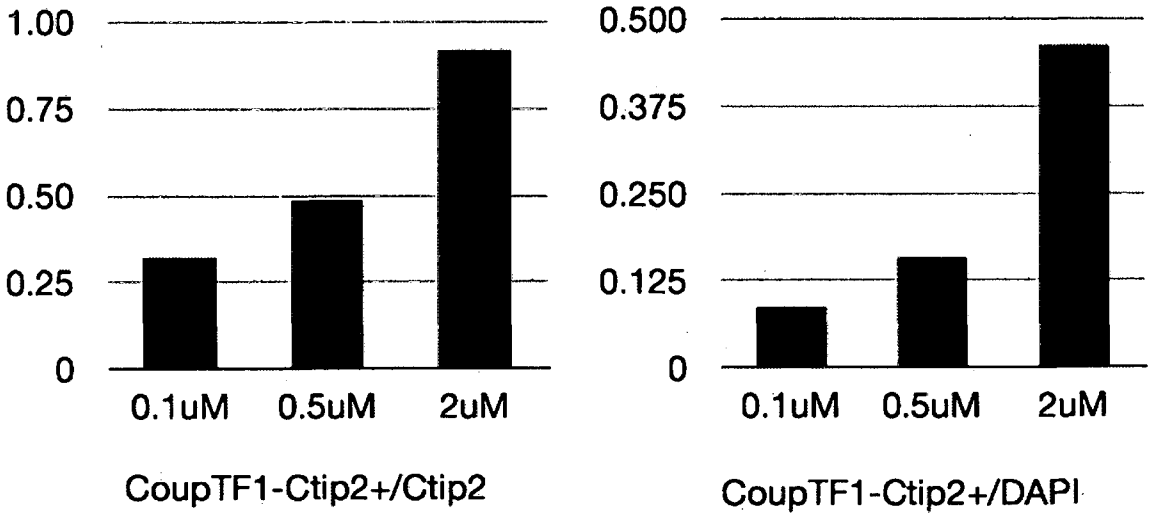

A
C59
0nM
2.5nM
10nM
DAPI
Pax6
B
CoupTF1
0.300
0.225
0.150
0.075
0
d0
d6
d12
d18
Emx2
0.04
0.03
0.02
0.01
0
Lhx2
0.0500
0.0375
0.0250
0.0125
Foxg1
0.20
0.15
0.10
0.05
0nM
2.5nM
10nM

図5

A


0μM
0.5μM
2μM
Ctip2/CoupTF1

B


1.00
0.75
0.50
0.25
0
0.1uM
0.5uM
2uM
CoupTF1-Ctip2+/Ctip2
0.500
0.375
0.250
0.125
0
0.1uM
0.5uM
2uM
CoupTF1-Ctip2+/DAPI

C

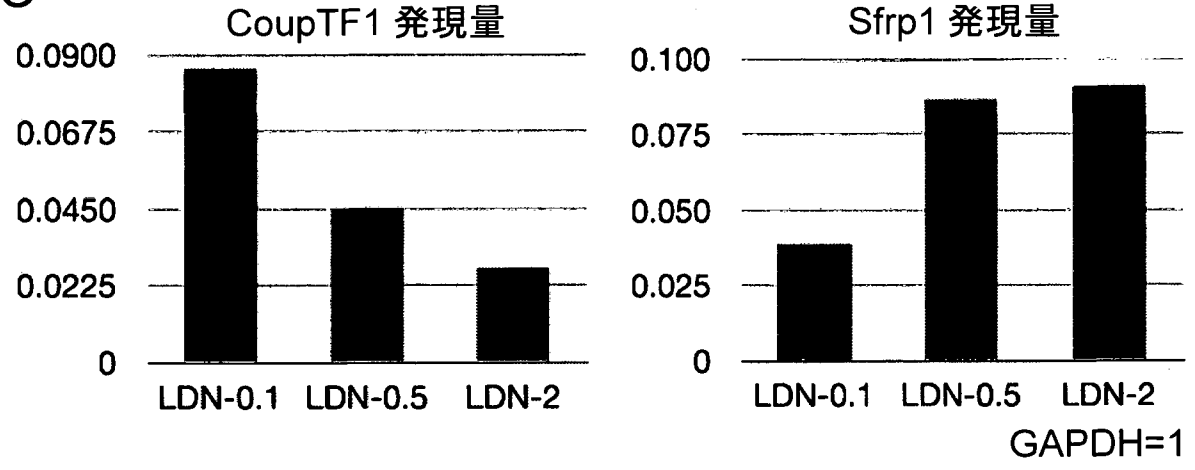
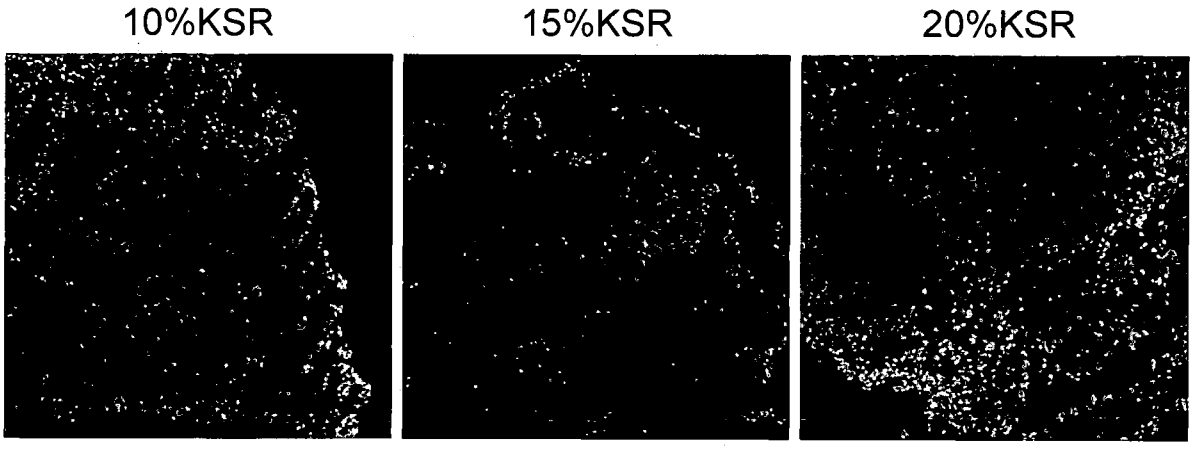
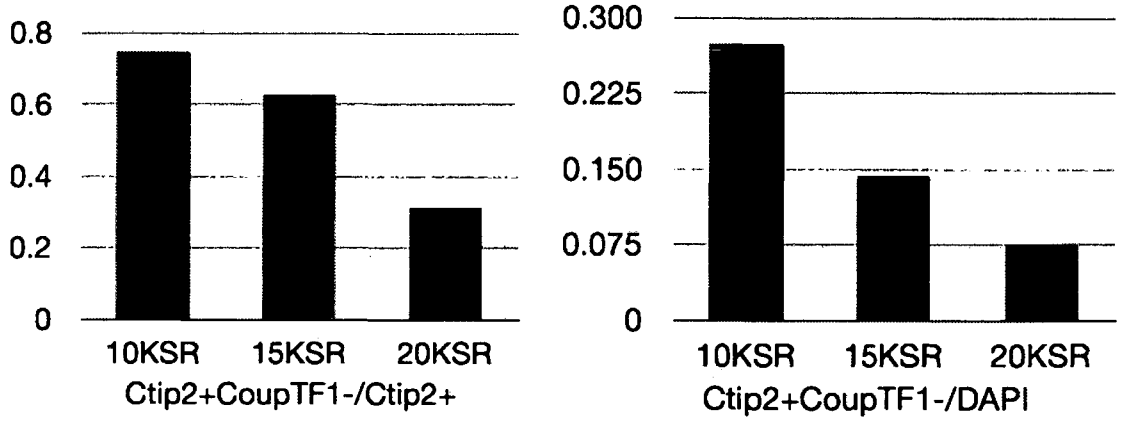

CoupTF1 発現量
0.0900
0.0675
0.0450
0.0225
0
LDN-0.1
LDN-0.5
LDN-2
Sfrp1 発現量
0.100
0.075
0.050
0.025
0
LDN-0.1
LDN-0.5
LDN-2
GAPDH=1

図6

A


10%KSR
15%KSR
20%KSR
Ctip2/CoupTF1

B


0.8
0.6
0.4
0.2
0
10KSR 15KSR 20KSR
Ctip2+CoupTF1-/Ctip2+
0.300
0.225
0.150
0.075
0
10KSR 15KSR 20KSR
Ctip2+CoupTF1-/DAPI

C

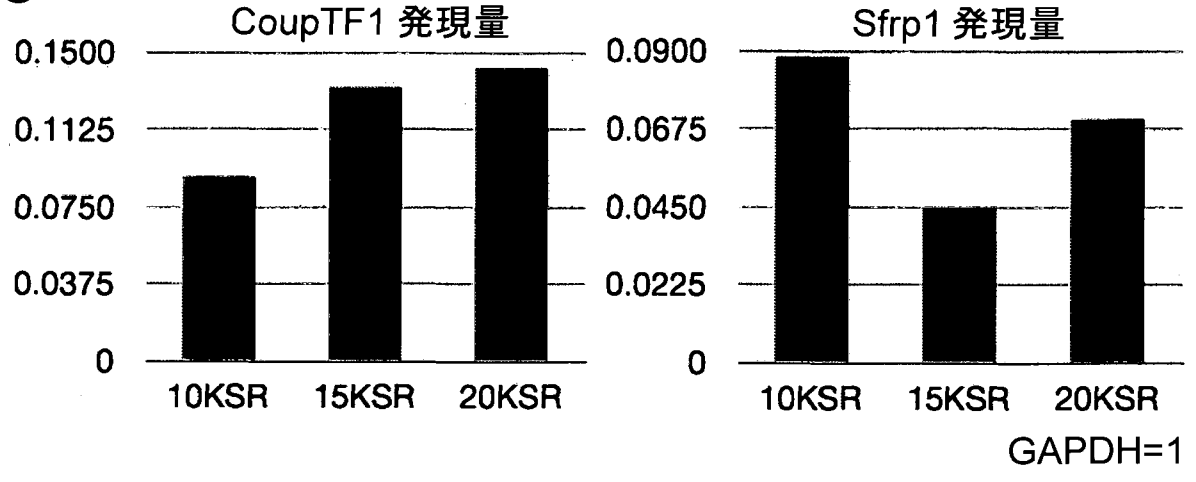

CoupTF1 発現量
0.1500
0.1125
0.0750
0.0375
0
10KSR 15KSR 20KSR
Sfrp1 発現量
0.0900
0.0675
0.0450
0.0225
0
10KSR 15KSR 20KSR
GAPDH=1

図 7

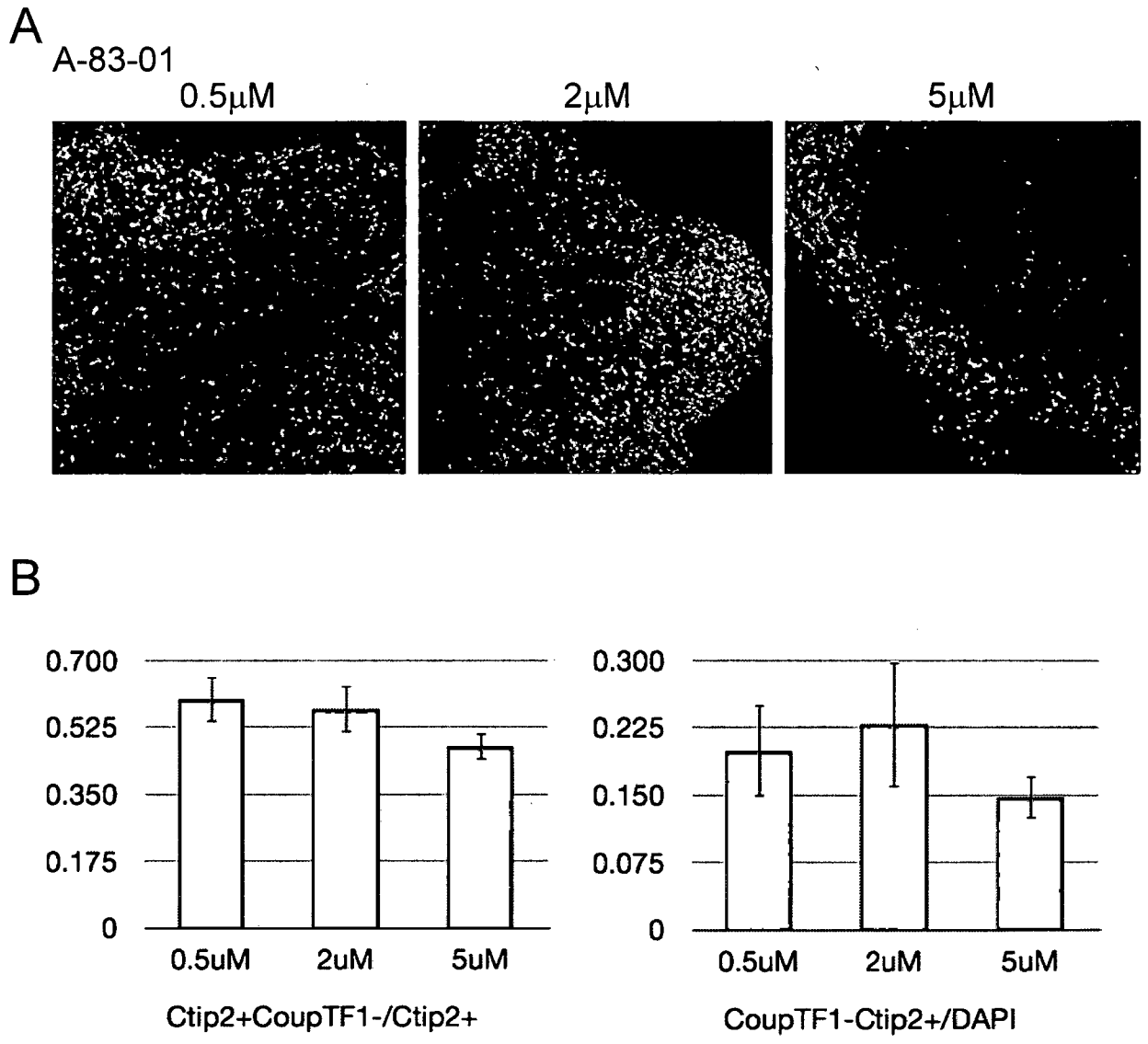
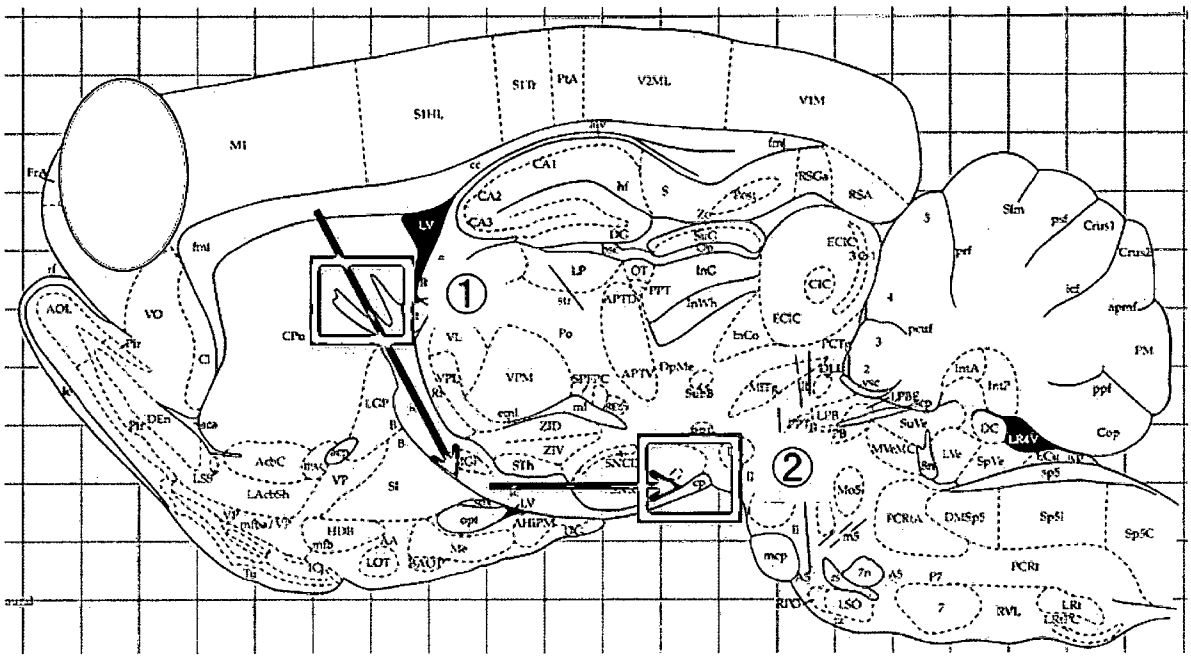
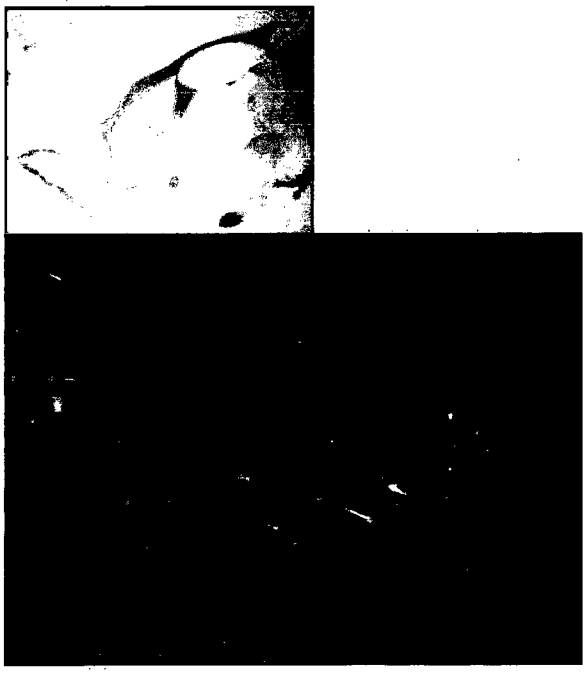

A
A-83-01
0.5μM
2μM
5μM
B
0.700
0.525
0.350
0.175
0
0.5uM
2uM
5uM
Ctip2+CoupTF1-/Ctip2+
0.300
0.225
0.150
0.075
0
0.5uM
2uM
5uM
CoupTF1-Ctip2+/DAPI

図 8


①
②
M1
S1HL
S1Tr
PtA
V2ML
VIM
CA1
CA2
CA3
RSGa
RSA
LV
CPu
LP
Po
VL
VPL
VPM
APTV
PPT
InC
ECIC
CIC
PCTg
Sim
Crus1
Crus2
PM
Cop
AOL
VO
Cl
LGP
ZID
ZIV
STh
SNCL
AcbC
LSO
VP
SI
LAcbSh
HDB
LOT
AHiPM
MoS
PCRtA
DMSp5
Sp5I
Sp5C
PCRt
LSO
RVL
LRt
LR4V
Sp1e
Int2
ppf
Cop
PM



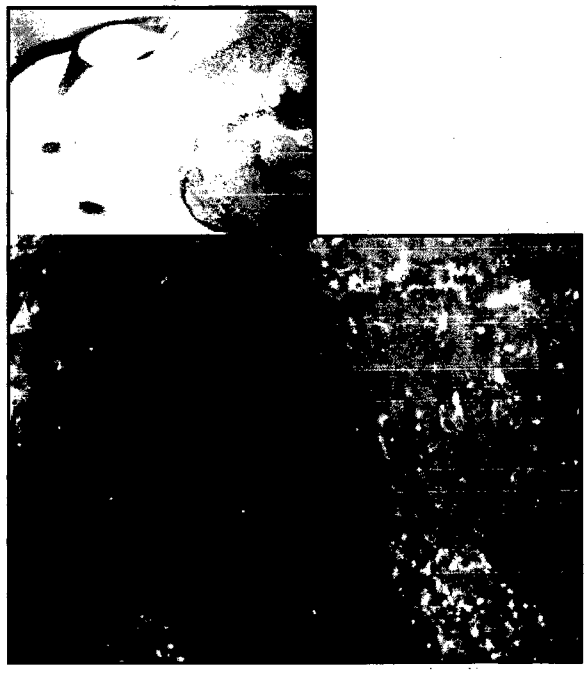


図９

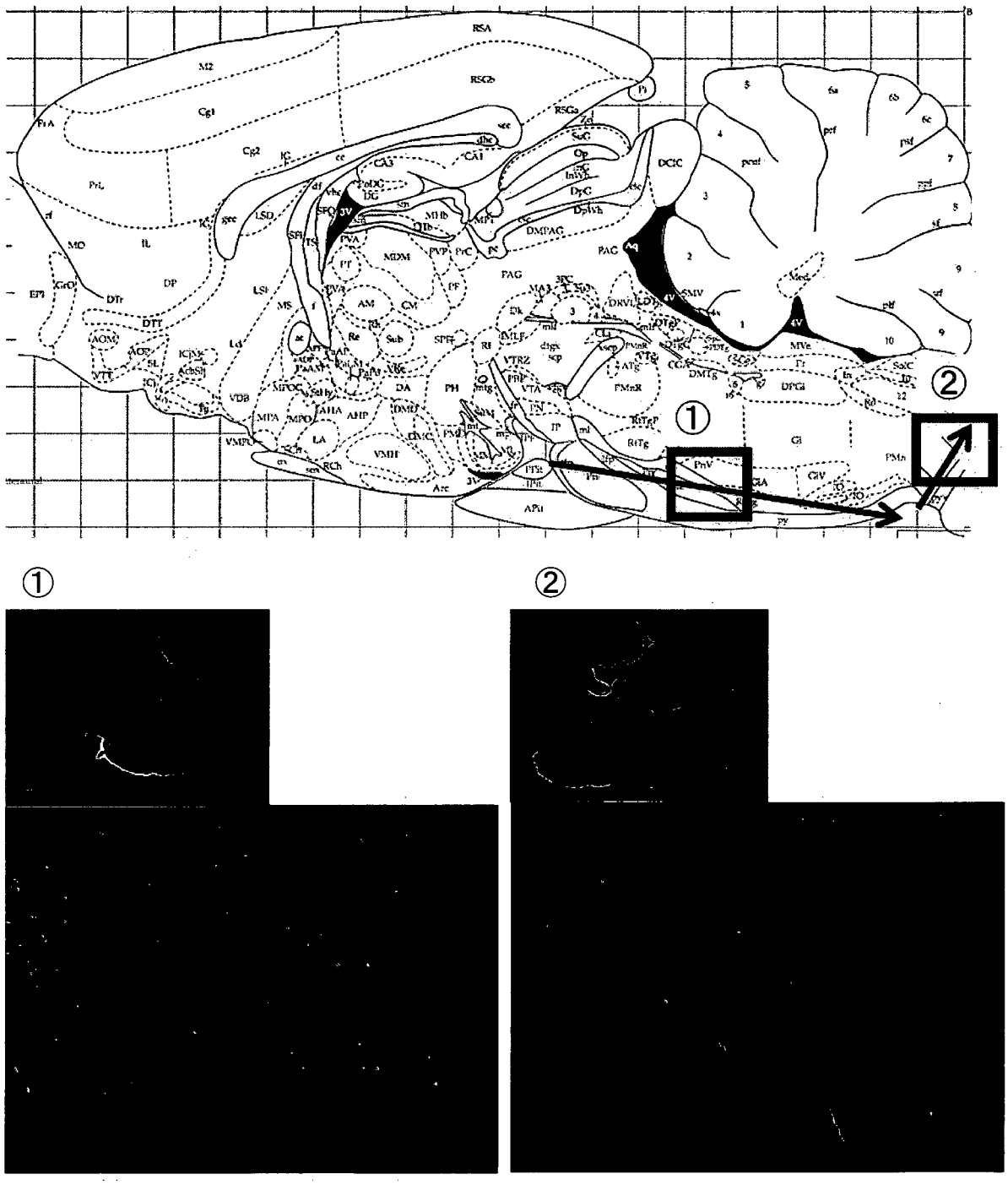


図１０

A



B

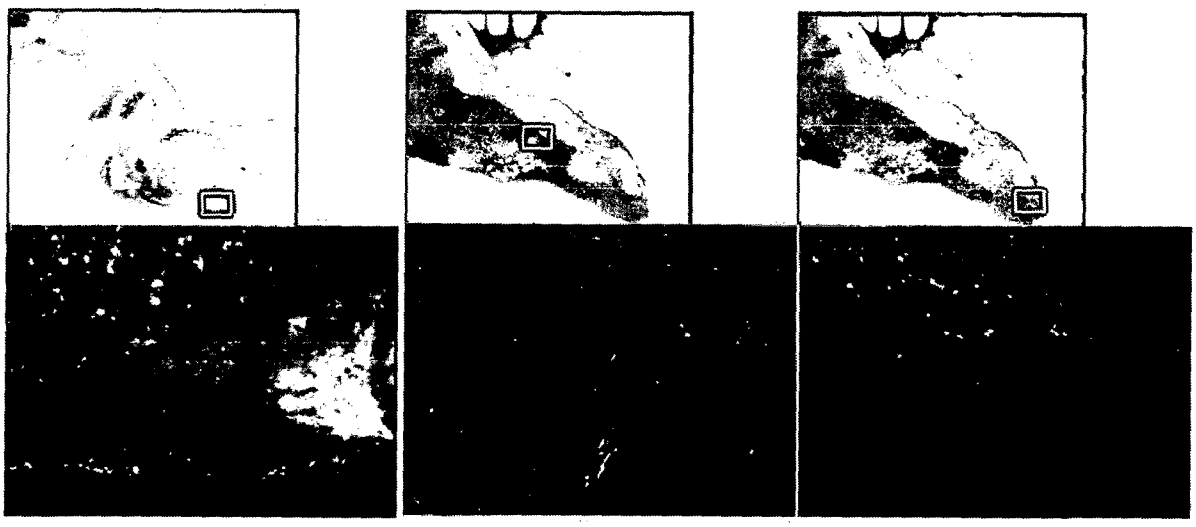
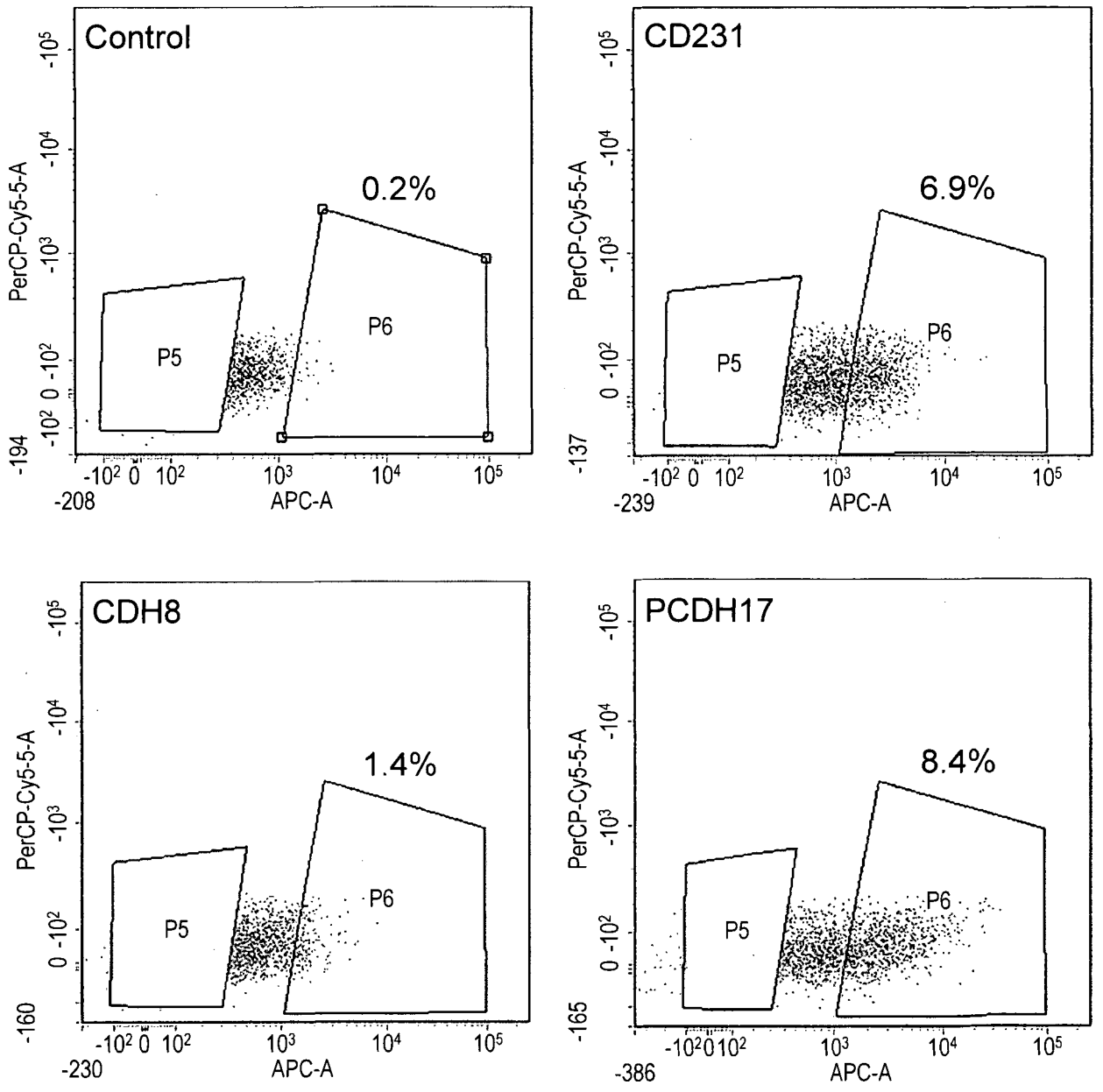
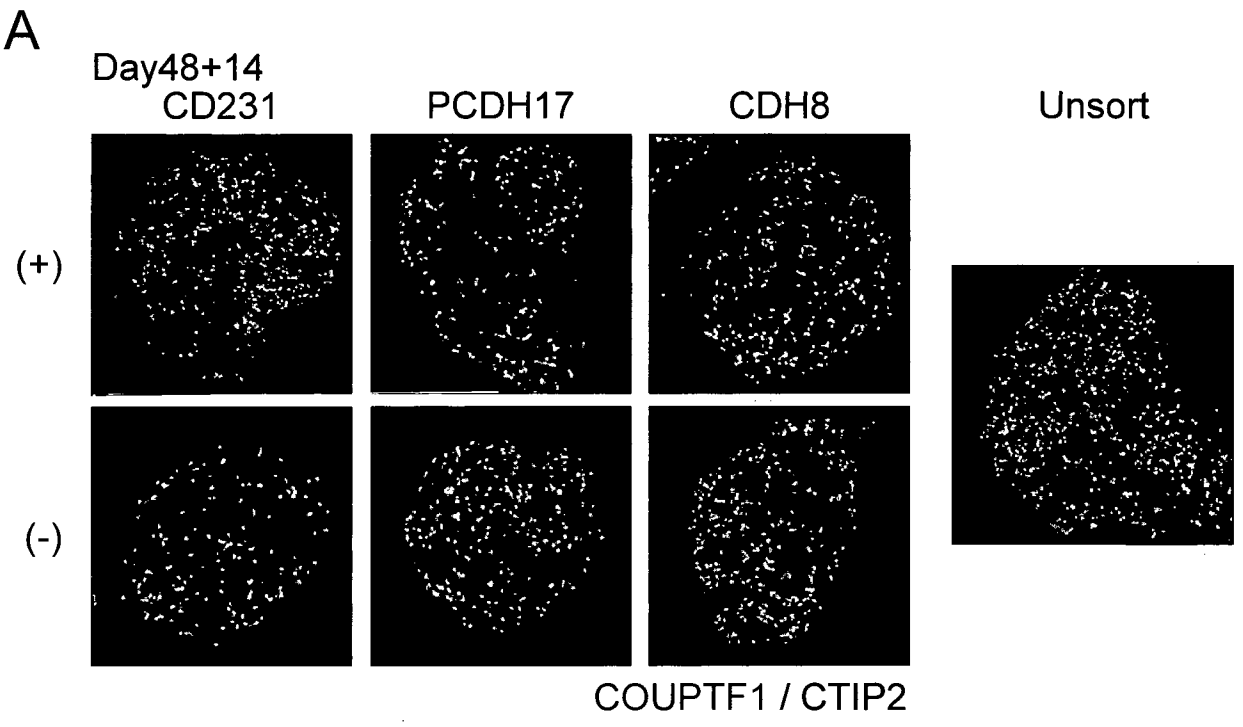


図１１


Control
0.2%
P5
P6
PerCP-Cy5-5-A
APC-A
-194
-208
CD231
6.9%
-137
-239
CDH8
1.4%
-160
-230
PCDH17
8.4%
-165
-386

48日

図１２


A
Day48+14
CD231
PCDH17
CDH8
Unsort
(+)
(-)
COUPTF1 / CTIP2

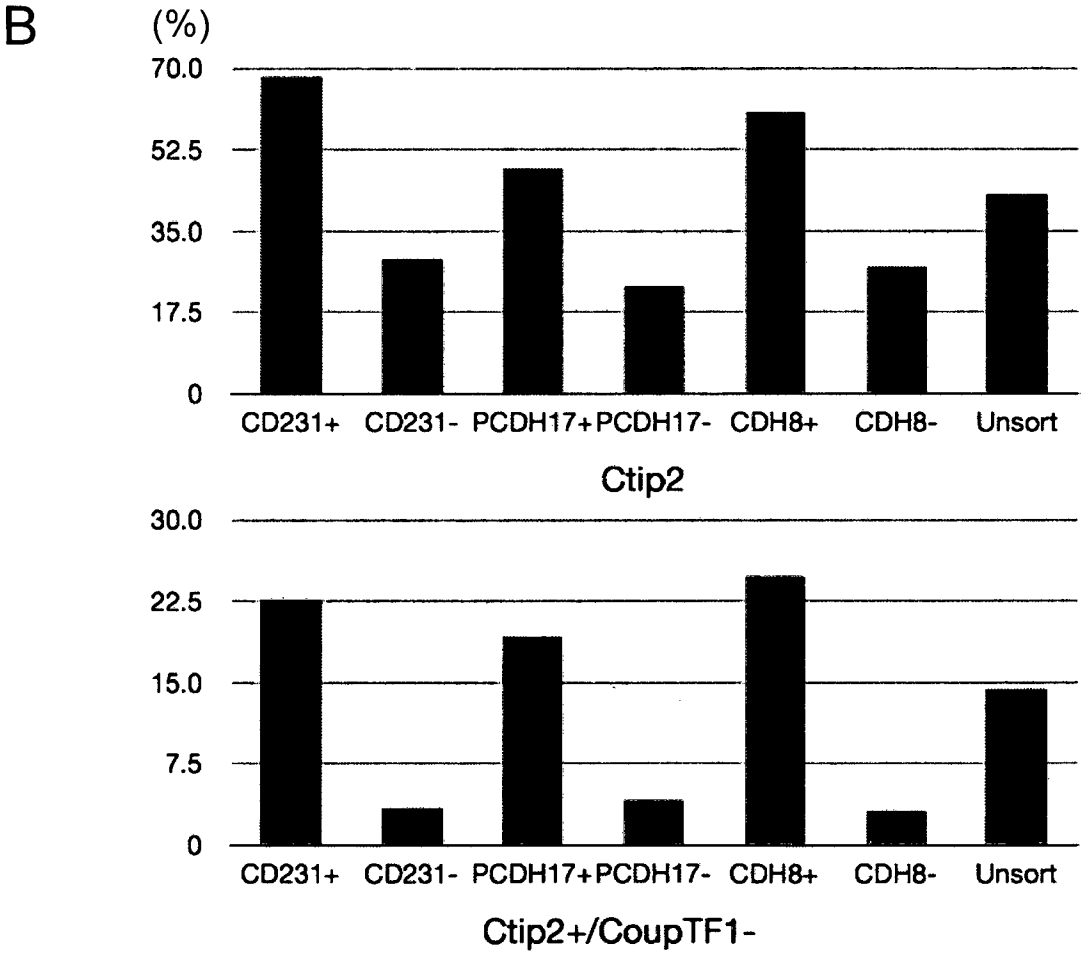
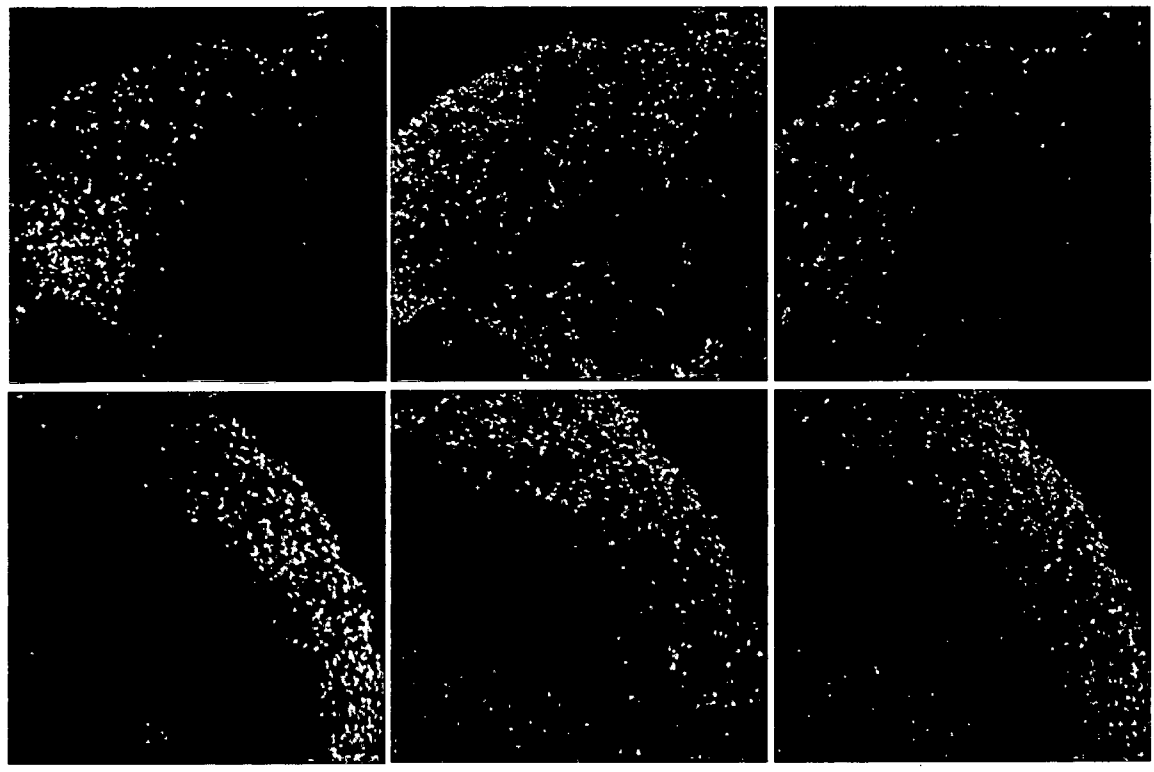

B
(%)
70.0
52.5
35.0
17.5
0
CD231+ CD231- PCDH17+ PCDH17- CDH8+ CDH8- Unsort
Ctip2
30.0
22.5
15.0
7.5
0
CD231+ CD231- PCDH17+ PCDH17- CDH8+ CDH8- Unsort
Ctip2+/CoupTF1-

図１３

A


接着培養
浮遊培養

B

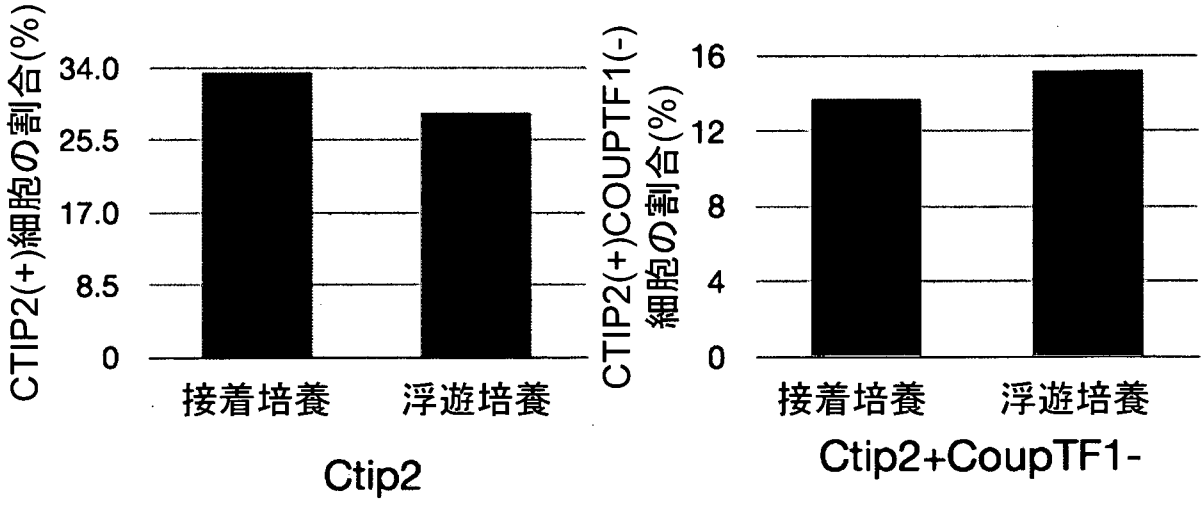
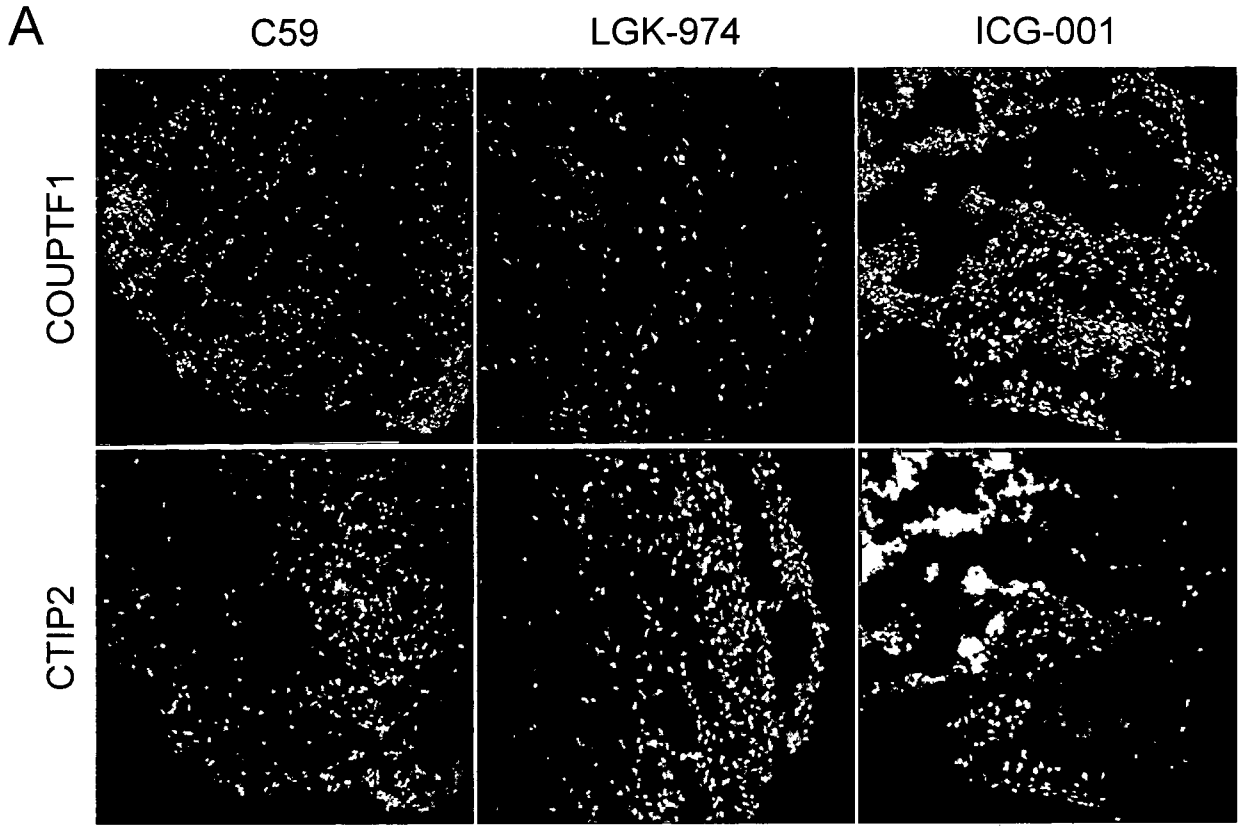
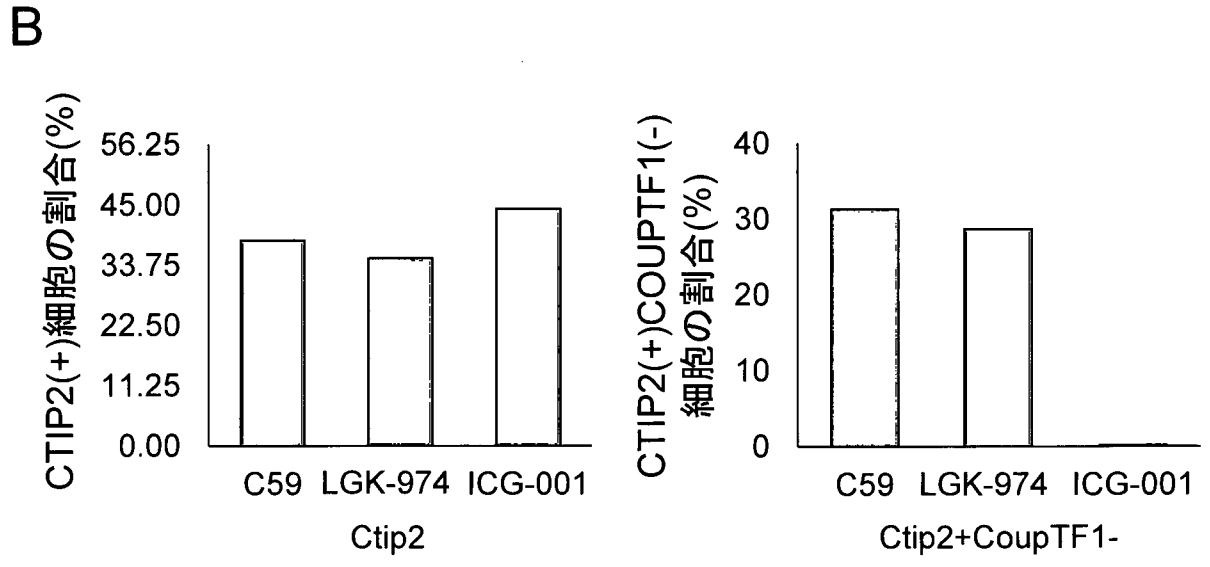

CTIP2(+)細胞の割合(%)
34.0
25.5
17.0
8.5
0
接着培養
浮遊培養
Ctip2
CTIP2(+)COUPTF1(-)細胞の割合(%)
16
12
8
4
0
接着培養
浮遊培養
Ctip2+CoupTF1-

図１４


A
C59
LGK-974
ICG-001
COUPTF1
CTIP2


B
CTIP2(+)細胞の割合(%)
56.25
45.00
33.75
22.50
11.25
0.00
C59 LGK-974 ICG-001
Ctip2
CTIP2(+)COUPTF1(-)細胞の割合(%)
40
30
20
10
0
C59 LGK-974 ICG-001
Ctip2+CoupTF1-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/062578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/0797(2010.01)i, *A61K35/30*(2015.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C12N5/0735*(2010.01)i, *C12N5/074*(2010.01)i, *C12N5/0793*(2010.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *A61K35/545*(2015.01)n
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)
C12N5/0797, A61K35/30, A61P25/00, A61P43/00, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0793, C12N5/10, A61K35/545

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/144696 A1 (BURNHUM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH), 16 December 2010 (16.12.2010), claims; page 36, lines 24 to 26 & US 2011/0002897 A1	14-15 1-14,16
X Y	Tetsuhiro KIKUCHI et al., "Fuyu Baiyoho ni yoru Hito iPS Saibo kara no Shinkei Bunka Yudo", Annual Meeting of the Japan Neurosurgical Society Abstract, 2009, vol.68th, 1Q-DP030-01, entire text	14 1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 July 2016 (14.07.16)	26 July 2016 (26.07.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/062578

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2014/176606 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANTER CENTER), 30 October 2014 (30.10.2014), claims & US 2016/0115448 A & EP 2989198 A & CA 2910394 A & AU 2014256876 A & JP 2016-518137 A	14 5-6,16
Y	JP 2015-19628 A (Keio University), 02 February 2015 (02.02.2015), claims (Family: none)	7,16
X Y	Yu Kamishibahara, et al., Promotion of mouse embryonic stem cell differentiation by Rho kinase inhibitor Y-27632, Neuroscience Letters, 2014, Vol.579, p.58-63, abstract	14 9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６２５７８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0797(2010.01)i, A61K35/30(2015.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0793(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, A61K35/545(2015.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0797, A61K35/30, A61P25/00, A61P43/00, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0793, C12N5/10, A61K35/545

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	WO 2010/144696 A1 (BURNHUM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 2010.12.16, 特許請求の範囲、36 ページ 24～26 行等 & US 2011/0002897 A1	14-15 1-14, 16
X Y	菊地哲広他，浮遊培養法によるヒト iPS 細胞からの神経分化誘導， 日本脳神経外科学会総会抄録集，2009，Vol.68th，1Q-DP030-01，全文	14 1-14

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１４．０７．２０１６	２６．０７．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３６
飯室　里美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	WO 2014/176606 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANTER CENTER) 2014.10.30, 特許請求の範囲等 & US 2016/0115448 A & EP 2989198 A & CA 2910394 A & AU 2014256876 A & JP 2016-518137 A	14 5-6,16
Y	JP 2015-19628 A (学校法人慶応義塾) 2015.02.02, 特許請求の範囲等（ファミリーなし）	7,16
X Y	Yu Kamishibahara, et al., Promotion of mouse embryonic stem cell differentiation by Rho kinase inhibitor Y-27632, Neuroscience Letters, 2014, Vol.579, p.58-63, 要約等	14 9