



(10) 申请公布号 CN 118302517 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 05

(21) 申请号 202280076250.6

(22) 申请日 2022.11.18

(30) 优先权数据

2021-188941 2021.11.19 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/042876 2022.11.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/090427 JA 2023.05.25

(71) 申请人 国立研究开发法人理化学研究所

地址 日本

申请人 住友制药株式会社

(72) 发明人 万代道子 高桥政代 山崎优

堀内茉莉

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

专利代理师 鲁雯雯 金龙河

(51) Int.Cl.

*C12N 5/071* (2010.01)

*A61K 35/30* (2015.01)

*A61L 27/36* (2006.01)

*A61L 27/38* (2006.01)

*A61L 27/52* (2006.01)

*A61L 27/58* (2006.01)

*A61P 27/02* (2006.01)

*C07K 14/78* (2006.01)

*C12M 3/00* (2006.01)

*C12N 5/074* (2010.01)

权利要求书3页 说明书64页 附图111页

(54) 发明名称

片状视网膜组织的制造方法

(57) 摘要

一种含有具有层结构的视网膜组织的细胞聚集体的制造方法,其包括在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中对被分散的视网膜系细胞群进行悬浮培养或粘附培养的步骤,上述视网膜系细胞群含有选自由视网膜前体细胞和视网膜前体细胞组成的组中的1种以上细胞。

1. 一种具有上皮结构的视网膜组织的制造方法,其包括在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中对被分散的视网膜系细胞群进行悬浮培养或粘附培养的步骤,

所述视网膜系细胞群含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞。

2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,所述Wnt信号转导途径作用物质为选自由CHIR99021、BIO、Wnt2b和Wnt3a组成的组中的1种以上物质。

3. 根据权利要求1或2所述的制造方法,其中,所述培养基还含有选自由ROCK抑制剂、SHH信号转导途径作用物质和FGF信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上物质。

4. 根据权利要求3所述的制造方法,其中,所述ROCK抑制剂为选自由Y-27632、法舒地尔(HA1077)和H-1152组成的组中的1种以上物质。

5. 根据权利要求3或4所述的制造方法,其中,所述SHH信号转导途径作用物质为选自由SAG、PMA和SHH组成的组中的1种以上物质。

6. 根据权利要求3~5中任一项所述的制造方法,其中,所述FGF信号转导途径作用物质为选自由FGF2、FGF4和FGF8组成的组中的1种以上成纤维细胞生长因子。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的制造方法,其中,包括在所述含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中进行粘附培养的步骤,所述具有上皮结构的视网膜组织为片状视网膜组织。

8. 根据权利要求7所述的制造方法,其中,所述粘附培养使用利用胞外基质和/或温度应答性聚合物进行了包被的培养容器来进行。

9. 根据权利要求8所述的制造方法,其中,所述培养容器的培养面利用所述温度应答性聚合物进行了包被,所述温度应答性聚合物的上表面利用所述胞外基质进行了包被。

10. 根据权利要求8或9所述的制造方法,其中,所述胞外基质为选自由胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、基质胶和玻连蛋白组成的组中的1种以上物质。

11. 根据权利要求8~10中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述步骤:使利用所述温度应答性聚合物进行了包被的培养容器暴露于该温度应答性聚合物的性质发生变化的温度下,由此使所述片状视网膜组织从该培养容器剥离。

12. 根据权利要求1~11中任一项所述的制造方法,其中,包括下述步骤:使含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞的细胞聚集体分散,得到所述被分散的视网膜系细胞群。

13. 根据权利要求12所述的制造方法,其中,包括下述步骤:使多能干细胞进行分化,得到所述含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞的细胞聚集体。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述步骤:在对所述被分散的视网膜系细胞群进行悬浮培养或粘附培养之前,提高所述被分散的视网膜系细胞群中含有的视网膜前体细胞的比例。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中,视网膜色素上皮细胞的混入或分化被抑制。

16. 根据权利要求14或15所述的制造方法,其中,提高所述视网膜前体细胞的比例的步骤包括下述步骤:使所述被分散的视网膜系细胞群接触与选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质,得到表达该抗原的细胞群。

17. 根据权利要求16所述的制造方法,其中,提高所述视网膜前体细胞的比例的步骤包括下述步骤:使所述被分散的视网膜系细胞群还接触与选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原结合的物质,得到该抗原的表达量为基准值以下的细胞群。

18. 根据权利要求14~17中任一项所述的制造方法,其中,提高所述视网膜前体细胞的比例的步骤包括以下步骤:

(1) 在选自由Shh信号转导途径作用物质、ATP和A2A受体作用物质组成的组中的1种以上的存在下培养多能干细胞而制造细胞聚集体的步骤;

(2) 使细胞聚集体向视网膜前体细胞分化诱导的步骤;

(3) 使细胞聚集体分散并使其接触与CD39结合的物质步骤。

19. 根据权利要求1~18中任一项所述的制造方法,其中,所述视网膜前体细胞和/或所述视细胞前体细胞占所述视网膜系细胞群所含的全部细胞数的50%以上。

20. 根据权利要求1~18中任一项所述的制造方法,其中,所述视网膜前体细胞和/或所述视细胞前体细胞占所述视网膜系细胞群所含的全部细胞数的80%以上。

21. 根据权利要求1~20中任一项所述的制造方法,其中,从所述悬浮培养或粘附培养开始时起,在所述含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中培养所述被分散的视网膜系细胞群。

22. 根据权利要求1~21中任一项所述的制造方法,其中,所述上皮结构中,细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向。

23. 根据权利要求1~22中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述步骤:将通过悬浮培养或粘附培养得到的具有上皮结构的视网膜组织切成移植所需的大小。

24. 根据权利要求1~23中任一项所述的制造方法,其中,所述上皮结构为多层结构。

25. 一种片状视网膜组织,其是包含具有多层结构的视网膜系细胞层的片状视网膜组织,其中,

(1) 该具有多层结构的视网膜系细胞层具有基底面和顶端面的极性,

(2) 所述具有多层结构的视网膜系细胞层含有选自由视网膜前体细胞、视细胞前体细胞和视细胞组成的组中的1种以上细胞,

(3) 在所述视网膜系细胞层的各层中,细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向,且

(4) 直径为8mm以上。

26. 根据权利要求25所述的片状视网膜组织,其中,所述具有多层结构的视网膜系细胞层还含有接合于所述视网膜系细胞层的片状视网膜色素上皮细胞,所述视网膜系细胞层与所述片状视网膜色素上皮细胞各自的表面的切线方向大致平行,所述视网膜系细胞层的顶端面与所述片状视网膜色素上皮细胞的顶端面彼此相对,并且所述视网膜系细胞层与所述片状视网膜色素上皮细胞通过两者之间所存在的粘附因子而接合。

27. 根据权利要求26所述的片状视网膜组织,其中,所述粘附因子为胞外基质或水凝胶。

28. 根据权利要求27所述的片状视网膜组织,其中,所述粘附因子为选自明胶、纤维蛋白、纤连蛋白、透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和巢蛋白中的1种以上物质。

29. 根据权利要求27所述的片状视网膜组织,其中,所述粘附因子为明胶或纤维蛋白。

30. 一种药物组合物,其含有权利要求25~29中任一项所述的片状视网膜组织。

31. 一种治疗基于视网膜系细胞或视网膜组织的障碍或者视网膜组织的损伤的疾病的方法,其包括将权利要求25~29中任一项所述的片状视网膜组织移植到需要移植的对象的步骤。

32. 一种提高细胞群中的视网膜前体细胞的比例的方法,其包括使含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由CD9、CD24、CD29、CD39、CD47、CD49b、CD49c、CD49f、CD57、CD73、CD82、CD90、CD164、CD200、CD340和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质步骤。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,包括使所述含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质步骤。

34. 根据权利要求32或33所述的方法,其中,还包括使所述含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原结合的物质步骤。

35. 一种细胞群,其中,选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的至少1种因子为阳性,并且相对于细胞群的全部细胞数含有90%以上的Rx阳性的视网膜前体细胞。

36. 根据权利要求35所述的细胞群,其中,所述视网膜前体细胞的选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原为阴性。

## 片状视网膜组织的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及片状视网膜组织的制造方法和片状视网膜组织。

### 背景技术

[0002] 近年有报道指出,若在小鼠活体的正常视网膜中移植适当分化阶段的视细胞前体细胞,可功能性地成活(非专利文献1),显示出移植治疗对视网膜色素变性等视细胞变性疾病的可能性。

[0003] 由通过自体组织化培养得到的多能干细胞分化诱导立体视网膜组织的方法已有很多报道,逐渐能够制造具有层结构的立体视网膜组织并进行移植。例如,报道了下述方法:由多能干细胞得到多层视网膜组织的方法(非专利文献2和专利文献1);在含有Wnt信号转导途径抑制物质的无血清培养基中形成均匀的多能干细胞的聚集体,在基底膜标准品存在下对得到的聚集体进行悬浮培养后,在血清培养基中进行悬浮培养而得到多层视网膜组织的方法(非专利文献3和专利文献2);和,通过在含有BMP信号转导途径作用物质的培养基中对多能干细胞的聚集体进行悬浮培养而得到视网膜组织的方法(非专利文献4和专利文献3)等。但是,这些视网膜组织是以球(sphere)状的细胞聚集体形式制造的,制造片状的(平坦化的)视网膜组织的方法尚属未知。

[0004] 另一方面,据报道在鸡中Wnt2b对于视网膜上皮结构的形成显示出效果(非专利文献5),在鸡以外的生物中的同样的效果尚无报道。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开第2011/055855号

[0008] 专利文献2:国际公开第2013/077425号

[0009] 专利文献3:国际公开第2015/025967号

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Maclaren RE et al.,“Retinal Repair by Transplantation of Photoreceptor Precursors”,Nature,444,203-207,(2006)

[0012] 非专利文献2:Eiraku M.et al.,“Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture”,Nature,472,51-56,(2011)

[0013] 非专利文献3:Nakano T.et al.,“Self-formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina From Human ESCs”Cell Stem Cell,10(6),771-785,(2012)

[0014] 非专利文献4:Kawahara A.et al.,“Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue”Nature Communications,6,6286,(2015)

[0015] 非专利文献5:Nakagawa,S.et al.,“Identification of the laminar-inducing factor Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of

the neural retina in vitro.”Developmental Biology,260,414-425, (2003)

## 发明内容

[0016] 发明所要解决的问题

[0017] 因此,鉴于上述情况,本发明的目的在于提供由视网膜系细胞重新形成视网膜组织的神经上皮结构的方法、应用该方法的片状视网膜组织的制造方法、以及片状视网膜组织。另外,次要目的是提供更优选作为起始细胞的视网膜前体细胞的纯化方法和利用上述而制造的宽大的片状视网膜组织的剥离方法。

[0018] 用于解决问题的方法

[0019] 本发明人设想以被分散的视网膜系细胞为起始细胞来重新形成神经上皮结构、制造片状视网膜组织。但是,获知存在如下课题:通过对视网膜系细胞进行分散化,细胞的顶端-基底(Apical-Basal)的极性会遭到破坏,不能重新形成神经上皮结构。

[0020] 对于该课题,本发明人进行了深入研究,结果获知,通过向被分散的视网膜系细胞中添加Wnt信号转导途径作用物质,可解决上述课题。另外,为了重新形成更良好的神经上皮结构,本发明人进行了深入研究。结果还发现,通过(1)进一步添加ROCK抑制剂、SHH信号转导途径作用物质和/或成纤维细胞生长因子;(2)特别地,为了重新形成片状的良好神经上皮结构,在包被有成为细胞粘附的支架的胞外基质的培养平板上进行培养;以及(3)提高作为起始细胞的视网膜前体细胞的纯度,由此,可除去视网膜色素上皮细胞(RPE)等杂细胞,从而完成了本发明。

[0021] 即,本发明涉及以下的各发明。

[0022] [1]一种具有上皮结构的视网膜组织的制造方法,其包括在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中对被分散的视网膜系细胞群进行悬浮培养或粘附培养的步骤,

[0023] 上述视网膜系细胞群含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞。

[0024] [2]根据[1]所述的制造方法,其中,上述Wnt信号转导途径作用物质为选自由CHIR99021、BIO、Wnt2b和Wnt3a组成的组中的1种以上物质。

[0025] [3]根据[1]或[2]所述的制造方法,其中,上述培养基还含有选自由ROCK抑制剂、SHH信号转导途径作用物质和FGF信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上物质。

[0026] [4]根据[3]所述的制造方法,其中,上述ROCK抑制剂为选自由Y-27632、法舒地尔(HA1077)和H-1152组成的组中的1种以上物质。

[0027] [5]根据[3]或[4]所述的制造方法,其中,上述SHH信号转导途径作用物质为选自由SAG、PMA和SHH组成的组中的1种以上物质。

[0028] [6]根据[3]~[5]中任一项所述的制造方法,其中,上述FGF信号转导途径作用物质为选自由FGF2、FGF4和FGF8组成的组中的1种以上成纤维细胞生长因子。

[0029] [7]根据[1]~[6]中任一项所述的制造方法,其中,包括在上述含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中进行粘附培养的步骤,上述具有上皮结构的视网膜组织为片状视网膜组织。

[0030] [8]根据[7]所述的制造方法,其中,上述粘附培养使用利用胞外基质和/或温度应答性聚合物进行了包被的培养容器来进行。

[0031] [9]根据[8]所述的制造方法,其中,上述培养容器的培养面利用上述温度应答性聚合物进行了包被,上述温度应答性聚合物的上表面利用上述胞外基质进行了包被。

[0032] [10]根据[8]或[9]所述的制造方法,其中,上述胞外基质为选自由胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、基质胶(Matrigel)和玻连蛋白组成的组中的1种以上物质。

[0033] [11]根据[8]~[10]中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述步骤:使利用上述温度应答性聚合物进行了包被的培养容器暴露于该温度应答性聚合物的性质发生变化的温度下,由此使上述片状视网膜组织从该培养容器剥离。

[0034] [12]根据[1]~[11]中任一项所述的制造方法,其中,包括下述步骤:使含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞的细胞聚集体分散,得到上述被分散的视网膜系细胞群。

[0035] [13]根据[12]所述的制造方法,其中,包括下述步骤:使多能干细胞进行分化,得到上述含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞的细胞聚集体。

[0036] [14]根据[1]~[13]中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述步骤:在对上述被分散的视网膜系细胞群进行悬浮培养或粘附培养之前,提高上述被分散的视网膜系细胞群中含有的视网膜前体细胞的比例。

[0037] [15]根据[14]所述的方法,其中,视网膜色素上皮细胞的混入或分化被抑制。

[0038] [16]根据[14]或[15]所述的制造方法,其中,提高上述视网膜前体细胞的比例的步骤包括下述步骤:使上述被分散的视网膜系细胞群接触与选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质,得到表达该抗原的细胞群。

[0039] [17]根据[16]所述的制造方法,其中,提高上述视网膜前体细胞的比例的步骤包括下述步骤:使上述被分散的视网膜系细胞群还接触与选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原结合的物质,得到该抗原的表达量为基准值以下的细胞群。

[0040] [18]根据[14]~[17]中任一项所述的制造方法,其中,提高上述视网膜前体细胞的比例的步骤包括:

[0041] (1)在选自由Shh信号转导途径作用物质、ATP和A2A受体作用物质组成的组中的1种以上的存在下培养多能干细胞而制造细胞聚集体的步骤;

[0042] (2)使细胞聚集体向视网膜前体细胞分化诱导的步骤;

[0043] (3)使细胞聚集体分散并使其接触与CD39结合的物质步骤。

[0044] [19]根据[1]~[18]中任一项所述的制造方法,其中,上述视网膜前体细胞和/或上述视细胞前体细胞占上述视网膜系细胞群所含的全部细胞数的50%以上。

[0045] [20]根据[1]~[18]中任一项所述的制造方法,其中,上述视网膜前体细胞和/或上述视细胞前体细胞占上述视网膜系细胞群所含的全部细胞数的80%以上。

[0046] [21]根据[1]~[20]中任一项所述的制造方法,其中,从上述悬浮培养或粘附培养开始时起,在上述含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中培养上述被分散的视网膜系细胞群。

[0047] [22]根据[1]~[21]中任一项所述的制造方法,其中,上述上皮结构中,细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向。

[0048] [23]根据[1]~[22]中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述步骤:将通过悬

浮培养或粘附培养得到的具有上皮结构的视网膜组织切成移植所需的大小。

[0049] [24]根据[1]~[23]中任一项所述的制造方法,其中,上述上皮结构为多层结构。

[0050] [25]一种片状视网膜组织,其是包含具有多层结构的视网膜系细胞层的片状视网膜组织,其中,

[0051] (1)该具有多层结构的视网膜系细胞层具有基底面和顶端面的极性,

[0052] (2)上述具有多层结构的视网膜系细胞层含有选自由视网膜前体细胞、视细胞前体细胞和视细胞组成的组中的1种以上细胞,

[0053] (3)在上述视网膜系细胞层的各层中,细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向,且

[0054] (4)直径为8mm以上。

[0055] [26]根据[25]所述的片状视网膜组织,其中,上述具有多层结构的视网膜系细胞层还含有接合于上述视网膜系细胞层的片状视网膜色素上皮细胞,上述视网膜系细胞层与上述片状视网膜色素上皮细胞各自的表面的切线方向大致平行,上述视网膜系细胞层的顶端面与上述片状视网膜色素上皮细胞的顶端面彼此相对,并且上述视网膜系细胞层与上述片状视网膜色素上皮细胞通过两者之间所存在的粘附因子而接合。

[0056] [27]根据[26]所述的片状视网膜组织,其中,上述粘附因子为胞外基质或水凝胶。

[0057] [28]根据[27]所述的片状视网膜组织,其中,上述粘附因子为选自明胶、纤维蛋白、纤连蛋白、透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和巢蛋白中的1种以上物质。

[0058] [29]根据[27]所述的片状视网膜组织,其中,上述粘附因子为明胶或纤维蛋白。

[0059] [30]一种药物组合物,其含有[25]~[29]中任一项所述的片状视网膜组织。

[0060] [31]一种治疗基于视网膜系细胞或视网膜组织的障碍或者视网膜组织的损伤的疾病的方法,其包括将[25]~[29]中任一项所述的片状视网膜组织移植到需要移植的对象的步骤。

[0061] [32]一种提高细胞群中的视网膜前体细胞的比例的方法,其包括使含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由CD9、CD24、CD29、CD39、CD47、CD49b、CD49c、CD49f、CD57、CD73、CD82、CD90、CD164、CD200、CD340和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质步骤。

[0062] [33]根据[32]所述的方法,其中,包括使上述含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质步骤。

[0063] [34]根据[32]或[33]所述的方法,其中,还包括使上述含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原结合的物质步骤。

[0064] [35]一种细胞群,其中,选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的至少1种因子为阳性,并且相对于细胞群的全部细胞数含有90%以上的Rx阳性的视网膜前体细胞。

[0065] [36]根据[35]所述的细胞群,其中,上述视网膜前体细胞的选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原为阴性。

[0066] [37]根据[25]~[29]中任一项所述的片状视网膜组织,其用于治疗基于视网膜系细胞或视网膜组织的障碍或者视网膜组织的损伤的疾病。

[0067] [38][25]~[29]中任一项所述的片状视网膜组织在用于制造基于视网膜系细胞

或视网膜组织的障碍或者视网膜组织的损伤的疾病的的治疗药中的应用。

[0068] 发明效果

[0069] 根据本发明,能够提供由视网膜系细胞重新形成视网膜组织的层结构的方法和用该方法的片状视网膜组织的制造方法、以及片状视网膜组织。

#### 附图说明

[0070] 图1为示出实施例1中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第1天的聚集体的重新形成状态的明视场显微镜照片。

[0071] 图2为示出实施例1中将来自1231A3的聚集体分散成单细胞并接种后第1天的聚集体的重新形成状态的明视场显微镜照片。

[0072] 图3为示出实施例2中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第1天重新形成的聚集体的形态的明视场显微镜照片。

[0073] 图4为示出实施例2中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第7天重新形成的聚集体的形态的荧光显微镜照片。

[0074] 图5为示出实施例2中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第14天重新形成的聚集体的形态的荧光显微镜照片。

[0075] 图6为示出利用Image J测定实施例2中来自KhES-1的单细胞重新形成的聚集体的面积而得到的结果的图。(A) 示出接种后第1天、第7天和第14天的聚集体的面积,(B) 示出接种后第7天和第14天的聚集体的面积相对于第1天的聚集体的面积的比(面积比)。

[0076] 图7为示出实施例2中将来自1231A3的聚集体分散成单细胞并接种后第1天所形成的聚集体的形态的明视场显微镜照片。

[0077] 图8为示出实施例3中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第1天所形成的聚集体的形态的明视场显微镜照片。

[0078] 图9为示出实施例3中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第14天所形成的聚集体的形态的荧光显微镜照片。

[0079] 图10为示出实施例3中将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天所形成的聚集体的形态的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0080] 图11为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第15天的聚集体的经免疫染色(DAPI、Rx: Venus、Chx10)的切片而得到的结果的照片。

[0081] 图12为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第15天的聚集体的经免疫染色( $\beta$ -连环蛋白)的切片而得到的结果的照片。

[0082] 图13为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第15天的聚集体的经免疫染色(IV型胶原蛋白、Zo-1)的切片而得到的结果的照片。

[0083] 图14为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的经免疫染色(DAPI、Chx10、Ki67、Pax6)的切片而得到的结果的照片。

[0084] 图15为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的切片的Rx::Venus荧光而得到的结果的照片。

[0085] 图16为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的经免疫染色(IV型胶原蛋白、Zo-1)的切片而得到的结果的照片。

[0086] 图17为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的经免疫染色(DAPI、Rx::Venus、IV型胶原蛋白、Zo-1)的切片而得到的结果的照片。

[0087] 图18为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的经免疫染色(DAPI、Chx10、Ki67、Pax6)的切片而得到的结果的照片。

[0088] 图19为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的经免疫染色(CRX、RxRg、NRL、恢复蛋白)的切片而得到的结果的照片。

[0089] 图20为示出实施例3中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察将来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第28天的聚集体的经免疫染色(DAPI、Islet-1、Brn3、钙网膜蛋白)的切片而得到的结果的照片。

[0090] 图21为示出实施例4中将分化天数为第18天、第25天、第40天、第61天和第75天的来自KhES-1的聚集体分散成单细胞并接种后第3天、第15天、第21天重新形成的聚集体的状态的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0091] 图22为示出实施例5中将分化天数为第40天的来自KhES-1的聚集体(BMP4+/BMP4-)分散成单细胞并接种后第3天、第15天、第21天重新形成的聚集体的状态的明视场显微镜和荧光显微镜(Rx::Venus)照片。

[0092] 图23为实施例6中将各种冻存液中冷冻保存的被分散的视网膜系细胞接种、并且在1天后和7天后观察所形成的聚集体的形态而得到的荧光显微镜照片。

[0093] 图24为示出实施例6中使各种冻存液中冷冻保存的被分散的视网膜系细胞复苏后的活细胞率(A)和使用经复苏的视网膜系细胞重新形成的聚集体的面积(B)的图。

[0094] 图25为实施例7中使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察通过悬浮培养而形成的视网膜组织中表达的基底膜的免疫染色切片而得到的结果的照片。

[0095] 图26为示出实施例7中调查在胎鼠神经视网膜组织中表达的层粘连蛋白的同源异构体而得到的结果的免疫组织染色图像。

[0096] 图27为示出实施例8中在条件1~3下由视网膜系细胞的单细胞悬浮液确认粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0097] 图28为示出实施例8中在条件1~3下由视网膜系细胞的单细胞悬浮液确认粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0098] 图29为示出实施例9中确认各种因子对粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成的效果而得到的结果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0099] 图30为示出实施例9中确认粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的各种因子的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0100] 图31为示出实施例10中粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的浓度和添加时期的研究结果的明视场显微镜照片、荧光显微镜照片和共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0101] 图32为示出实施例10中粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的浓度和添加时期的研究结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0102] 图33为示出实施例11中对粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的接种于Transwell上的时的支架进行研究而得到的结果的明视场显微镜照片、明视场和荧光显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0103] 图34为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0104] 图35为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0105] 图36为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0106] 图37为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0107] 图38为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0108] 图39为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0109] 图40为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0110] 图41为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0111] 图42为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0112] 图43为示出实施例12中确认在粘附培养中的片状视网膜组织的重新形成中的CHIR99021的效果而得到的结果的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0113] 图44为示出实施例13中对各种因子所带来的视网膜细胞的维持效果进行研究而得到的结果的荧光显微镜照片。

[0114] 图45为示出实施例14中对视网膜前体细胞的维持培养有效的条件的研究结果的荧光显微镜照片。

[0115] 图46为示出实施例15中在胶原蛋白上重新片状化的结果的体视显微镜照片。

[0116] 图47为示出实施例16中由重新片状化的视网膜细胞片制作的移植用移植物的荧光显微镜照片。

[0117] 图48为示出实施例16中移植后视网膜的眼底的观察结果的荧光体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0118] 图49为示出实施例17中用于从分散成单细胞的细胞群中分选Rx::Venus阳性级分的FACS分析结果的图。(A)为点状图,(B)为柱状图。

- [0119] 图50为示出实施例17中观察有分选/无分选的细胞群而得到的体视显微镜和荧光体视显微镜照片。
- [0120] 图51为示出实施例17中观察有分选/无分选的细胞群而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。
- [0121] 图52为示出实施例17中观察有分选/无分选的细胞群而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。
- [0122] 图53为示出实施例17中观察经分选的细胞群而得到的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。
- [0123] 图54为示出实施例18中观察添加了各种蛋白质时的Rx::Venus阳性细胞群而得到的荧光显微镜照片。
- [0124] 图55为示出实施例18中观察添加了各种低分子化合物时的Rx::Venus阳性细胞群而得到的荧光显微镜照片。
- [0125] 图56为示出实施例18中观察添加了不同浓度的FGF2、FGF4和FGF8时的Rx::Venus阳性细胞群而得到的荧光显微镜照片。
- [0126] 图57为示出实施例19中由分选和添加FGF8带来的聚集体重新形成和视网膜分化效果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。
- [0127] 图58为示出实施例19中由分选和添加FGF8带来的聚集体重新形成和视网膜分化效果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片以及示出FACS分析结果的图。
- [0128] 图59为示出实施例19中由添加FGF8带来的聚集体重新形成和视网膜分化效果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片以及示出FACS分析结果的图。
- [0129] 图60为示出实施例20中添加FGF8对重新片状化时的影响的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。
- [0130] 图61为示出实施例20中添加FGF8对重新片状化时的影响的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。
- [0131] 图62为示出实施例20中由添加FGF8带来的重新片状化和视网膜分化效果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片以及示出FACS分析结果的图。
- [0132] 图63为示出实施例21中重新片状化的视网膜片的经时变化的体视显微镜照片、荧光体视显微镜照片。
- [0133] 图64为示出实施例22中表面抗原筛选中所关注的标志物的图。
- [0134] 图65为示出实施例22中使用各种表面抗原的细胞分选结果的图。
- [0135] 图66为示出实施例22中使用各种表面抗原的细胞分选结果的图。
- [0136] 图67为示出实施例22中使用各种表面抗原的细胞分选结果的图。
- [0137] 图68为示出实施例22中使用各种表面抗原的细胞分选结果的图。
- [0138] 图69为示出实施例22中使用各种表面抗原的细胞分选结果的图。
- [0139] 图70为示出实施例23中观察向脑类器官分化的状态而得到的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。
- [0140] 图71为示出实施例23中观察向脑类器官分化的状态而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。
- [0141] 图72为示出实施例23中针对脑类器官中的CD39和CD73、CXCR4的表达的FACS分析

结果的图。

[0142] 图73为示出实施例24中利用不同浓度的SAG的分化诱导的结果的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0143] 图74为示出实施例24中针对利用不同浓度的SAG的分化诱导后的CD39表达和CXCR4表达的FACS分析结果以及经数字化而得到的图。

[0144] 图75为示出实施例24中观察利用不同浓度的SAG的分化诱导而成的组织的免疫染色图像而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0145] 图76为示出实施例24中观察利用不同浓度的SAG的分化诱导而成的组织的免疫染色图像而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0146] 图77为示出实施例24中针对利用不同浓度的SAG的后的CD39表达和BV421表达的FACS分析结果以及观察利用不同浓度的SAG分化诱导而成的组织的免疫染色图像而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0147] 图78为示出实施例24中观察利用不同浓度的SAG分化诱导而成的组织的免疫染色图像而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0148] 图79为示出实施例24中观察利用不同浓度的SAG分化诱导而成的组织的免疫染色图像而得到的共聚焦激光扫描荧光显微镜照片。

[0149] 图80为示出显示实施例25中可增强CD39表达的物质的研究结果的FACS分析结果的图。

[0150] 图81为将示出实施例25中可增强CD39表达的物质的研究结果的FACS分析结果数字化而得的图。(A)为CD39阳性且RX::venus阳性的结果,(B)为CXCR4阴性且RX::venus阳性的结果。

[0151] 图82为示出实施例26中观察用FGF8-和FGF8+制作的Islet-1 KO hESC-视网膜片(dd74)并切出移植用移植物的步骤的明视场显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0152] 图83为实施例27中与脑类器官进行对比并示出NR的各种表面抗原的筛选的结果的FACS点状图。

[0153] 图84为示出实施例27中NR的各种表面抗原的筛选的结果的FACS点状图。

[0154] 图85为示出实施例28中hESC-视网膜中的CD9表达的经时变化的结果的FACS点状图。

[0155] 图86为示出实施例29中hESC-视网膜中的CD9和SSEA-1的的分析结果的FACS点状图。

[0156] 图87为示出实施例30中使用hESC-视网膜中的CD9、CD90、CXCR4和SSEA-1的纯化研究的结果的FACS点状图。

[0157] 图88为示出实施例30中使用hESC-视网膜中的CD9、CD90、CXCR4和SSEA-1的纯化研究的结果的FACS点状图。

[0158] 图89为示出实施例30中使用hESC-视网膜中的CD9、CD90、CXCR4和SSEA-1的纯化研究的结果的图。

[0159] 图90为示出实施例30中使用hESC-视网膜中的CD9、CD90、CXCR4和SSEA-1的纯化研究的结果的照片。

[0160] 图91为示出实施例30中使用hESC-视网膜中的CD9、CD90、CXCR4和SSEA-1的纯化研

究的结果的照片。

[0161] 图92为示出实施例31中hESC-视网膜中的CD9和SSEA-1的表达的经时变化的结果的FACS图。

[0162] 图93为示出实施例32中使用明胶进行RPE片与视网膜片的复合化研究的过程的示意图。

[0163] 图94为示出实施例32中观察使用明胶的复合化中所使用的Transwell上培养的RPE片和重新片状化的神经视网膜而得到的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0164] 图95为示出实施例32中将RPE片和重新片状化的神经视网膜从Transwell剥离、添加明胶的过程的体视显微镜照片。

[0165] 图96为示出实施例32中向RPE片和重新片状化的神经视网膜添加明胶的过程的体视显微镜照片。

[0166] 图97为示出实施例32中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化的过程的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0167] 图98为示出实施例32中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化后用镊子夹起的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0168] 图99为示出实施例32中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化后用剪子切出的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0169] 图100为示出实施例32中观察复合化RPE片和重新片状化的神经视网膜的切出截面而得到的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0170] 图101为示出实施例32中观察所切出的复合化RPE片和重新片状化的神经视网膜的吸入/吐出而得到的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0171] 图102为示出实施例33中观察使用纤维蛋白的复合化中所使用的在Transwell上培养的RPE片和重新片状化的神经视网膜而得到的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0172] 图103为示出实施例33中将RPE片和重新片状化的神经视网膜从Transwell剥离的复合化研究的过程的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0173] 图104为示出实施例33中对回收的RPE片和重新片状化添加纤维蛋白原和凝血酶的复合化研究的过程的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0174] 图105为示出实施例33中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化的过程的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0175] 图106为示出实施例33中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化的过程的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0176] 图107为示出实施例33中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化后用镊子夹起的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0177] 图108为示出实施例33中使RPE片与重新片状化的神经视网膜复合化的状态的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0178] 图109为示出实施例33中将RPE片从Transwell的网剥离的复合化研究的过程的体视显微镜照片和荧光显微镜照片。

[0179] 图110为示出实施例34中使用CellShifter除去不要的水凝胶的研究结果的示意图和照片。

[0180] 图111为示出实施例35中在温度应答性培养皿上制作平面化片并剥离的过程的照片。

### 具体实施方式

[0181] [定义]

[0182] “干细胞”是指具有分化能力和增殖能力(特别是自我复制能力)的未分化的细胞。干细胞中,根据分化能力,包括多能干细胞(pluripotent stem cell)、专能干细胞(multipotent stem cell)、单能干细胞(unipotent stem cell)等亚群。多能干细胞是指能够在体外培养、并且具有能够分化成属于三胚层(外胚层、中胚层、内胚层)和/或胚胎外组织的全部细胞谱系的能力(多能分化性(pluripotency))的干细胞。专能干细胞是指具有可分化成两种以上的组织或细胞而非所有种类的组织或细胞的能力的干细胞。“单能干细胞”是指具有可分化成特定的组织或细胞的能力的干细胞。

[0183] “多能干细胞”可以由受精卵、克隆胚胎、生殖干细胞、组织内干细胞、体细胞等进行诱导。作为多能干细胞,可列举胚胎干细胞(ES细胞:Embryonic stem cell)、胚胎生殖细胞(EG细胞:Embryonic germ cell)、诱导性多能干细胞(iPS细胞:induced pluripotent stem cell)等。由间充质干细胞(mesenchymal stem cell;MSC)得到的Muse细胞(多系分化持续应激细胞,Multi-lineage differentiating stress enduring cell)、由生殖细胞(例如精巢)制作的GS细胞也包含在多能干细胞中。

[0184] 在1998年建立了人胚胎干细胞,也开始利用于再生医学。胚胎干细胞可以通过将内部细胞聚集体在饲养细胞上或含有bFGF的培养基中进行培养来制造。胚胎干细胞的制造方法例如记载在W096/22362、W002/101057、US5843780、US6200806、US6280718等中。胚胎干细胞可以从规定的机构获得,另外也可以购入市售品。例如,人胚胎干细胞KhES-1、KhES-2和KhES-3可以从京都大学再生医科学研究所获得。人胚胎干细胞Crx::Venus株和Rx::Venus株(均来自KhES-1)可以从国立研究开发法人理化学研究所获得。

[0185] “诱导性多能干细胞”是通过利用公知方法等对体细胞进行重编程(reprogramming)来诱导多能性而成的细胞。

[0186] 诱导性多能干细胞于2006年由山中等人用小鼠细胞建立(Cell,2006,126(4),pp.663-676)。诱导性多能干细胞于2007年还由人成纤维细胞建立,与胚胎干细胞同样具有多能性和自我复制能力(Cell,2007,131(5),pp.861-872;Science,2007,318(5858),pp.1917-1920;Nat.Biotechnol.,2008,26(1),pp.101-106)。

[0187] 具体而言,诱导性多能干细胞可列举通过使成纤维细胞、外周血单核细胞等已分化体细胞通过选自包括Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc(c-Myc、N-Myc、L-Myc)、Glis1、Nanog、Sall4、lin28、Esrrb等在内的重编程基因组中的多种基因的任意组合的表达而重编程、诱导出多分化能力的细胞。作为优选的重编程因子的组合,可列举(1)Oct3/4、Sox2、Klf4和Myc(c-Myc或L-Myc)、(2)Oct3/4、Sox2、Klf4、Lin28和L-Myc(Stem Cells,2013;31:458-466)。

[0188] 作为诱导性多能干细胞,除了利用基于基因表达的直接重编程来制造的方法以外,还可以通过化合物的添加等由体细胞来诱导诱导性多能干细胞(Science,2013,341,pp.651-654)。

[0189] 另外,也可以获得已株化的诱导性多能干细胞,例如,由京都大学建立的201B7细胞、201B7-Ff细胞、253G1细胞、253G4细胞、1201C1细胞、1205D1细胞、1210B2细胞、1231A3细胞等人诱导性多能性细胞株可以从京都大学和iPSアカデミアジャパン株式会社获得。作为已株化的诱导性多能干细胞,例如,由京都大学建立的Ff-I01细胞和Ff-I14细胞和QHJI01s04细胞可以从京都大学获得。

[0190] 本说明书中,多能干细胞优选为胚胎干细胞或诱导性多能干细胞,更优选为诱导性多能干细胞。

[0191] 本说明书中,多能干细胞为人多能干细胞,优选为人诱导性多能干细胞(iPS细胞)或人胚胎干细胞(ES细胞)。

[0192] 人iPS细胞等多能干细胞可以通过本领域技术人员公知的方法供于维持培养和扩大培养。

[0193] “神经组织”是指由发生期或成体期的大脑、中脑、小脑、脊髓、视网膜、末梢神经、前脑、后脑、端脑、间脑等的神经系细胞构成的组织。神经组织有时形成具有层结构的上皮结构(神经上皮),细胞聚集体中的神经上皮可以通过使用光学显微镜的明视场观察来评价存在量。

[0194] “神经系细胞(Neural cell)”是指来自外胚层的组织中除表皮系统细胞以外的细胞。即,包括神经系前体细胞、神经元(神经细胞)、胶质细胞、神经干细胞、神经元前体细胞和胶质细胞前体细胞等细胞。神经系细胞还包括构成下述视网膜组织的细胞(视网膜细胞)、视网膜前体细胞、视网膜层特异性神经细胞、神经视网膜细胞、视网膜色素上皮细胞。神经系细胞可以以神经上皮干细胞蛋白(Nestin)、TuJ1、PSA-NCAM、N-钙粘蛋白等为标志物来鉴定。

[0195] “神经细胞(Neuron • Neuronal cell)”是形成神经回路并有助于信息转导的功能性细胞,可以以TuJ1、Dcx、HuC/D等未成熟神经细胞标志物和/或Map2、NeuN等成熟神经细胞标志物的表达为指标来鉴定。

[0196] “神经系前体细胞(Neural Precursor cell)”为包括神经干细胞、神经元前体细胞和胶质细胞前体细胞的前体细胞群,具有增殖能力以及产生神经元和胶质细胞的能力。神经系前体细胞可以以神经上皮干细胞蛋白、GLAST、Sox2、Sox1、Musashi、Pax6等为标志物来鉴定。或者,也可以将神经系细胞的标志物阳性且增殖标志物(Ki67、pH3、MCM)阳性的细胞鉴定为神经系前体细胞。

[0197] “视网膜组织(Retinal tissue)”是指生物体视网膜中构成各视网膜层的视网膜系细胞中的一种或两种以上按照一定秩序存在的组织,“神经视网膜(Neural Retina)”是指作为视网膜组织的、含有后述视网膜层中除视网膜色素上皮层以外的内侧的神经视网膜层的组织。

[0198] “视网膜系细胞(Retinal cell)”是指生物体视网膜中构成各视网膜层的细胞或其前体细胞。视网膜系细胞包括视细胞(视杆细胞、视锥细胞)、水平细胞、无长突细胞、中间神经细胞、视网膜神经节细胞(神经节细胞)、双极细胞(视杆双极细胞、视锥双极细胞)、缪勒胶质细胞、视网膜色素上皮(RPE)细胞、睫状体、这些的前体细胞(例如视细胞前体细胞、双极细胞前体细胞、视网膜色素上皮前体细胞等)、神经视网膜前体细胞、视网膜前体细胞等细胞,但是不限于这些。视网膜系细胞中,作为构成神经视网膜层的细胞(也称为神经

视网膜细胞或神经视网膜系细胞 (Neural retina-related cell), 具体而言, 可列举视细胞 (视杆细胞、视锥细胞)、水平细胞、无长突细胞、中间神经细胞、视网膜神经节细胞 (神经节细胞)、双极细胞 (视杆双极细胞、视锥双极细胞)、缪勒胶质细胞和这些的前体细胞 (例如视细胞前体细胞、双极细胞前体细胞等) 等细胞。即, 神经视网膜系细胞不包括视网膜色素上皮细胞和睫状体细胞。

[0199] “成熟视网膜系细胞”是指人类成年人的视网膜组织中可含有的细胞, 具体而言, 是指视细胞 (视杆细胞、视锥细胞)、水平细胞、无长突细胞、中间神经细胞、视网膜神经节细胞 (神经节细胞)、双极细胞 (视杆双极细胞、视锥双极细胞)、缪勒胶质细胞、视网膜色素上皮 (RPE) 细胞、睫状体细胞等已分化细胞。“未成熟视网膜系细胞”是指确定会分化为成熟视网膜系细胞的前体细胞 (例如视细胞前体细胞、双极细胞前体细胞、视网膜前体细胞等)。

[0200] 视细胞前体细胞、水平细胞前体细胞、双极细胞前体细胞、无长突细胞前体细胞、视网膜神经节细胞前体细胞、缪勒胶质细胞前体细胞、视网膜色素上皮前体细胞分别是指确定会分化为视细胞、水平细胞、双极细胞、无长突细胞、视网膜神经节细胞、缪勒胶质细胞、视网膜色素上皮细胞的前体细胞。

[0201] “视网膜前体细胞”是指: 可分化为视细胞前体细胞、水平细胞前体细胞、双极细胞前体细胞、无长突细胞前体细胞、视网膜神经节细胞前体细胞、缪勒胶质细胞、视网膜色素上皮前体细胞等任一未成熟视网膜系细胞的前体细胞, 并且是最终可分化为视细胞、视杆细胞、视锥细胞、水平细胞、双极细胞、无长突细胞、视网膜神经节细胞、视网膜色素上皮细胞等任一成熟视网膜系细胞的前体细胞。“神经视网膜前体细胞”是指: 可分化为视细胞前体细胞、水平细胞前体细胞、双极细胞前体细胞、无长突细胞前体细胞、视网膜神经节细胞前体细胞、缪勒胶质细胞等任一未成熟神经视网膜系细胞的前体细胞, 并且是最终可分化为视细胞、视杆细胞、视锥细胞、水平细胞、双极细胞、无长突细胞、视网膜神经节细胞等任一成熟神经视网膜系细胞的前体细胞。神经视网膜前体细胞不具有分化为视网膜色素上皮细胞的能力。

[0202] “视细胞 (photoreceptor cell)”在生物体中存在于视网膜的视细胞层, 具有吸收光刺激并转化为电信号的作用。视细胞包括在明亮处起作用的视锥 (cone) 和在暗处起作用的视杆 (或杆状体、rod) 这两种 (分别称为视锥细胞、视杆细胞)。另外, 作为视锥细胞, 可列举表达S-视蛋白且接收蓝色光的S视锥细胞、表达L-视蛋白且接收红色光的L视锥细胞和表达M-视蛋白且接收绿色光的M视锥细胞。视细胞是由视细胞前体细胞分化并成熟而来的。关于细胞是否为视细胞或视细胞前体细胞这一点, 本领域技术人员例如可以通过后述细胞标志物 (视细胞前体细胞中表达的Crx和Blimp1、视细胞中表达的恢复蛋白 (Recoverin)、成熟视细胞中表达的视紫红质、S-视蛋白和M/L-视蛋白等) 的表达、外节结构的形成等来容易地确认。一个方式中, 视细胞前体细胞为Crx阳性细胞, 视细胞为视紫红质、S-视蛋白和M/L-视蛋白阳性细胞。一个方式中, 视杆细胞为NRL和视紫红质阳性细胞。一个方式中, S视锥细胞为S-视蛋白阳性细胞, L视锥细胞为L-视蛋白阳性细胞, 并且M视锥细胞为M-视蛋白阳性细胞。

[0203] 神经视网膜系细胞的存在可以通过神经视网膜系细胞相关基因 (以下有时称为“神经视网膜系细胞标志物”或“神经视网膜标志物”) 的表达有无来确认。本领域技术人员可以容易地确认神经视网膜系细胞标志物的表达有无或者细胞群或组织中的神经视网膜

系细胞标志物阳性细胞的比例。可列举例如使用抗体的方法、使用核酸引物的方法、使用测序反应的方法。作为使用抗体的方法,例如可以利用使用市售抗体的流式细胞术(FACS)、免疫染色等方法,将特定神经视网膜系细胞标志物阳性细胞数除以全部细胞数,由此来确认神经视网膜系细胞标志物的蛋白质的表达。作为使用核酸引物的方法,例如可以用PCR法、半定量PCR法、定量PCR法(例如实时PCR法)确认神经视网膜系细胞标志物的RNA表达。作为使用测序反应的方法,例如可以使用核酸测序仪(例如下一代测序仪)来确认神经视网膜系细胞标志物的RNA表达。

[0204] 作为神经视网膜系细胞标志物,可列举在视网膜前体细胞中表达的Rx(也称为Rax)和PAX6、在神经视网膜前体细胞中表达的Rx、PAX6和Chx10(也称为Vsx2)、在视细胞前体细胞中表达的Crx和Blimp1等。另外,可列举在双极细胞中强表达的Chx10、在双极细胞中表达的PKC $\alpha$ 、Go $\alpha$ 、Vsx1和L7、在视网膜神经节细胞中表达的TuJ1和Brn3、在无长突细胞中表达的钙网膜蛋白和HPC-1、在水平细胞中表达的钙结合蛋白、在视细胞和视细胞前体细胞中表达的恢复蛋白、在视杆细胞中表达的视紫红质、在视杆细胞和视杆细胞前体细胞中表达的Nr1、在视锥细胞中表达的S-视蛋白和LM-视蛋白、在视锥细胞、视锥细胞前体细胞和神经节细胞中表达的RXR- $\gamma$ 、在视锥细胞中出现于分化初期的视锥细胞或其前体细胞中表达的TR $\beta$ 2、OTX2和OC2、在水平细胞、无长突细胞和神经节细胞中共同表达的Pax6等。也可以使用本申请实施例中鉴定出的视网膜前体细胞或神经视网膜前体细胞的表面抗原作为视网膜前体细胞或神经视网膜前体细胞的标志物。详细情况如后所述。

[0205] “阳性细胞”是指在细胞表面上或细胞内表达特定标志物的细胞。例如,“Chx10阳性细胞”是指表达Chx10蛋白的细胞。

[0206] “视网膜色素上皮细胞”是指生物体视网膜中存在于神经视网膜外侧的上皮细胞。关于细胞是否为视网膜色素上皮细胞这一点,本领域技术人员例如可以通过细胞标志物(MITF、Pax6、PMEL17、TYRP1、TRPM1、ALDH1A3、GPNMB、RPE65、CRALBP、MERTK、BEST1、TTR等)的表达、黑素颗粒的存在(黑褐色)、细胞间的紧密连接、多边形/铺路石状的特征性细胞形态等容易地确认。关于细胞是否具有视网膜色素上皮细胞的功能这一点,可以通过VEGF和PEDF等细胞因子的分泌能力、视细胞外节的吞噬能力等容易地确认。一个方式中,视网膜色素上皮细胞为RPE65阳性细胞、MITF阳性细胞、或者RPE65阳性且MITF阳性的细胞。

[0207] “视网膜色素上皮细胞片”是指视网膜色素上皮细胞至少沿着二维方向通过生物学结合而相互粘附、并由多个或两个以上的细胞构成的单层或多层的片状结构体。

[0208] “视网膜层”是指构成视网膜的各层,具体而言,可列举视网膜色素上皮层、视细胞层、外界膜、外颗粒层、外网层、内颗粒层、内网层、神经节细胞层、神经纤维层和内界膜。

[0209] “神经视网膜层”是指构成神经视网膜的各层,具体而言,可列举视细胞层、外界膜、外颗粒层、外网层、内颗粒层、内网层、神经节细胞层、神经纤维层和内界膜。“视细胞层”是指形成于神经视网膜的最外侧、含有大量选自由视细胞(视杆细胞、视锥细胞)、视细胞前体细胞和视网膜前体细胞组成的组中的1种以上细胞的视网膜层。将视细胞层以外的各层称为内层。关于各细胞是构成哪个视网膜层的细胞这一点,可以通过公知的方法、例如细胞标志物的表达有无或表达程度等来确认。

[0210] 在视细胞或视细胞前体细胞出现比例少的阶段的视网膜组织的情况下,将含有要增殖的神经视网膜前体细胞的层称为“成神经细胞层(neuroblastic layer)”,存在内成神

经细胞层(inner neuroblastic layer)和外成神经细胞层(outer neuroblastic layer)。本领域技术人员可以通过公知的方法、例如明视场显微镜下颜色的深浅(外成神经细胞层为浅,内成神经细胞层为深)来判断。

[0211] “睫状体”包括发生过程和成体的“睫状体”、“睫状体边缘区”、“Ciliary body”。作为“睫状体”的标志物,可列举Zic1、MAL、HNF1beta、FoxQ1、CLDN2、CLDN1、GPR177、AQP1和AQP4。作为“睫状体边缘区(ciliary marginal zone;CMZ)”,可列举例如作为生物体视网膜中存在于神经视网膜与视网膜色素上皮的边界区域的组织、并且含有视网膜的组织干细胞(视网膜干细胞)的区域。睫状体边缘区也被称为睫状缘(ciliary margin)或视网膜缘(retinal margin),睫状体边缘区、睫状缘和视网膜缘为同等的组织。已知睫状体边缘区在向视网膜组织供给视网膜前体细胞、分化细胞、维持视网膜组织结构等方面发挥着重要的作用。作为睫状体边缘区的标志基因,可列举例如Rdh10基因(阳性)、Otx1基因(阳性)和Zic1(阳性)。“睫状体边缘区样结构体”是指与睫状体边缘区类似的结构体。

[0212] “大脑组织”是指构成胚胎期或成体的大脑的细胞(例如大脑神经系前体细胞(cortical neural precursor cell)、背侧大脑神经系前体细胞、腹侧大脑神经系前体细胞、大脑层结构特异性神经细胞(神经元)、第一层神经元、第二层神经元、第三层神经元、第四层神经元、第五层神经元、第六层神经元、胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)、这些的前体细胞等)中的一种或至少两种以上以层状立体地排列而形成的组织。胚胎期的大脑也被称为前脑或端脑。各细胞的存在可以通过公知的方法、例如细胞标志物的表达有无或其程度等来确认。

[0213] “大脑层”是指构成成体大脑或胚胎期大脑的各层,具体而言,可列举分子层、外颗粒层、外视锥细胞层、内颗粒层、神经细胞层(内视锥细胞层)、多形细胞层、第一层、第二层、第三层、第四层、第五层、第六层、皮质区、中间区、脑室下区和脑室区(ventricular zone)。

[0214] 作为“大脑神经系前体细胞”,可列举神经元前体细胞、第一层神经元前体细胞、第二层神经元前体细胞、第三层神经元前体细胞、第四层神经元前体细胞、第五层神经元前体细胞、第六层神经元前体细胞、星形胶质细胞前体细胞、少突胶质细胞前体细胞等。各细胞为确定会分化为第一层神经元、第二层神经元、第三层神经元、第四层神经元、第五层神经元、第六层神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的前体细胞。

[0215] “大脑神经系前体细胞”包括具有分化为第一层神经元、第二层神经元、第三层神经元、第四层神经元、第五层神经元、第六层神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞中的至少两种以上分化谱系的能力(多分化能力)的专能性干细胞(专能神经干细胞、multipotent neural stem cell)。

[0216] “大脑层特异性神经细胞”是指作为构成大脑层的细胞的、大脑层特异性的神经细胞。作为大脑层特异性神经细胞,可列举第一层神经元、第二层神经元、第三层神经元、第四层神经元、第五层神经元、第六层神经元、大脑兴奋性神经元、大脑抑制性神经元等。

[0217] 作为大脑细胞标志物,可列举在大脑细胞中表达的FoxG1(别名Bf1)、在大脑神经系前体细胞中表达的Sox2和神经上皮干细胞蛋白、在背侧大脑神经系前体细胞中表达的Pax6和Emx2、在腹侧大脑神经系前体细胞中表达的Dlx1、Dlx2和Nkx2.1、在神经元前体细胞中表达的Tbr2、Nex、Svet1、在第六层神经元中表达的Tbr1、在第五层神经元中表达的Ctip2、在第四层神经元中表达的ROR $\beta$ 、在第三层神经元或第二层神经元中表达的Cux1或

Brn2、在第一层神经元中表达的颤蛋白 (Reelin) 等。

[0218] “细胞聚集体”(Cell Aggregate) 只要是两个以上细胞彼此粘附而形成了立体结构则没有特别限定,例如是指分散在培养基等介质中的细胞集合而形成的块或经过细胞分裂而形成的细胞块等。细胞聚集体也包括形成了特定组织的情形。

[0219] “球(sphere)状细胞聚集体”是指具有接近球状的立体形状的细胞聚集体。接近球状的立体形状可列举:具有三维结构、且在投影于二维平面时显示例如圆形或椭圆形的球形以及两个以上球形融合而形成的形状(例如投影于二维时显示2~4个圆形或椭圆形重叠而成的形状)。一个方式中,聚集体的核心部具有囊泡性层状结构,具有在明视场显微镜下观察到中央部暗、外缘部亮的特征。

[0220] “上皮组织”是指细胞无间隙地覆盖体表面、管腔(消化道等)、体腔(心包腔等)等的表面而形成的组织。将形成上皮组织的细胞称为上皮细胞。对于上皮细胞,细胞具有顶端(apical)-基底(basal)方向的极性。上皮细胞通过粘附连接(adherence junction)和/或紧密连接(tight junction)而在上皮细胞彼此间形成牢固的连接,可以形成细胞层。一层至十几层该细胞层重叠而形成的组织为上皮组织。可形成上皮组织的组织还包括胚胎期和/或成体的视网膜组织、脑脊髓组织、眼球组织、神经组织等。本说明书中的神经视网膜也为上皮组织。“上皮结构”是指特征性地具有上皮组织的结构(例如具有基底面和顶端面的极性)。

[0221] “连续上皮组织”是指具有连续上皮结构的组织。连续上皮结构处于上皮组织连续的状态。上皮组织连续例如是指沿着相对于上皮组织的切线方向排列有10个细胞~ $10^7$ 个细胞的状态,优选沿着切线方向排列有30个细胞~ $10^7$ 个细胞的状态,进一步优选排列有 $10^2$ 个细胞~ $10^7$ 个细胞的状态。

[0222] 例如,视网膜组织中形成的连续上皮结构中,视网膜组织具有上皮组织特有的顶端面,顶端面与形成神经视网膜层的各层中至少视细胞层(外颗粒层)等大致平行且连续地形成于视网膜组织的表面。例如,在含有由多能干细胞制作的视网膜组织的细胞聚集体的情况下,在聚集体的表面形成顶端面,沿着相对于表面的切线方向规则且连续地排列有10个细胞以上、优选30个细胞以上、更优选100个细胞以上、进一步优选400个细胞以上的视细胞或视细胞前体细胞。

[0223] 一个方式中,上皮组织发生极性化,形成“顶端面(apical surface)”以及“基底面”和“基底膜”。“基底膜”是指上皮细胞所产生的基底(basal)侧的层(基底膜),含有大量层粘连蛋白和IV型胶原蛋白且具有50~100nm的厚度。“基底面”是指形成于“基底膜”侧的表面(表层面)。“顶端面”是指形成于与“基底膜”相反的一侧的表面(表层面)。一个方式中,“顶端面”是指:在发生阶段进行至观察到视细胞或视细胞前体细胞的程度的视网膜组织中,形成外界膜且与视细胞、视细胞前体细胞所在的视细胞层(外颗粒层)相接触的面。另外,这样的顶端面可以使用针对顶端面的标志物(例如非典型PKC(以下简称为“aPKC”)、紧密连接标志物(Zo-1)、作为ERM蛋白的埃兹蛋白、E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白)的抗体通过本领域技术人员公知的免疫染色法等来鉴定。

[0224] [细胞聚集体的制造方法]

[0225] 本发明的一个方式为用于由被分散的视网膜系细胞群制造含有具有上皮结构(或多层结构)的视网膜组织的细胞聚集体(本说明书中,有时将“含有视网膜组织的细胞聚集

体”简称为“视网膜组织”)的制造方法。该方法包括在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中对被分散的视网膜系细胞群进行悬浮培养或粘附培养的步骤。在此,被分散的视网膜系细胞群含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞。视网膜组织如上述所定义的那样。作为一个方式,视网膜组织含有神经视网膜组织,另外,可以含有神经视网膜组织和视网膜色素上皮组织这两者。

[0226] 视网膜系细胞如上述所定义的那样,一个方式中,视网膜系细胞含有选自由视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞,此外可以含有视细胞(视杆细胞、视锥细胞)、水平细胞、无长突细胞、视网膜神经节细胞(神经节细胞)、双极细胞(视杆双极细胞、视锥双极细胞)、缪勒胶质细胞等细胞。视网膜系细胞优选为神经视网膜系细胞。使用的视网膜系细胞群可以来自生物体组织,也可以来自多能干细胞,优选为对多能干细胞进行分化诱导而得到的视网膜系细胞群。

[0227] 来自生物体组织的视网膜系细胞可以由本领域技术人员通过公知技术由来自生物体的视网膜组织来制备。例如有:摘出眼球后与RPE剥离并回收的方法、直接摘出神经视网膜的方法。

[0228] 本发明的一个方式为由被分散的神经系细胞群制造含有具有上皮结构(或多层结构)的神经组织(例如大脑(端脑)组织)的细胞聚集体的方法。该方法包括在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中对被分散的神经系细胞群进行粘附培养或悬浮培养的步骤。神经系细胞优选含有神经系前体细胞(例如大脑神经系前体细胞)。所使用的神经系细胞群可以来自生物体组织,也可以来自多能干细胞,优选为对多能干细胞进行分化诱导而得到的神经系细胞群。

[0229] (作为起始细胞的视网膜系细胞群的分化诱导方法)

[0230] 本发明的制造方法的作为起始细胞的来自多能干细胞的视网膜系细胞可以通过对多能干细胞进行分化诱导来得到。作为一个方式,可以使用分化诱导因子对多能干细胞进行分化诱导而得到视网膜系细胞的聚集体。作为分化诱导因子,可列举基底膜标准品、BMP信号转导途径作用物质、Wnt信号转导途径抑制物质、IGF信号转导途径作用物质等。作为一个方式,可列举基于自组织化的视网膜系细胞的聚集体的制造方法。自组织化是指细胞群自主地产生复杂的结构的机制。例如,可以通过SFEB(Serum-free Floating culture of Embryoid Bodies-like aggregates,胚状体样聚集体的无血清悬浮培养)法(WO2005/12390)、SFEBq法(WO2009/148170)进行自组织化。

[0231] 作为具体的分化诱导方法,可列举WO2011/055855、WO2013/077425、WO2015/025967、WO2016/063985、WO2016/063986、WO2017/183732、PLoS One.2010Jan 20;5(1):e8763.、Stem Cells.2011Aug;29(8):1206-18.、Proc Natl Acad Sci USA.2014Jun 10;111(23):8518-23或Nat Commun.2014Jun 10;5:4047中公开的方法,但是没有特别限定。

[0232] 作为一个具体方式,可通过包括下述步骤(A)、(B)和(C)的方法来制备视网膜系细胞的聚集体。

[0233] (A) 在不存在饲养细胞的条件下在含有未分化维持因子的培养基中培养多能干细胞的步骤;

[0234] (B) 通过对步骤(A)中得到的细胞进行悬浮培养而形成细胞聚集体的步骤;

[0235] (C) 在含有BMP信号转导途径作用物质的培养基中对步骤(B)中得到的细胞聚集体

进一步进行悬浮培养的步骤。

[0236] 需要说明的是,步骤(A)可以还含有TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质。

[0237] 另外,如后所述,步骤(B)可以含有音猬因子信号转导途径作用物质和/或Wnt信号转导抑制物质。

[0238] 本方法例如在W02015/025967、W02016/063985、W02017/183732中也有公开,更详细而言,可参照W02015/025967、W02016/063985、W02017/183732。

[0239] 制备视网膜系细胞的聚集体时使用的培养基只要没有特别记载则可以使用细胞增殖用基础培养基(也称为基础培养基)。细胞增殖用基础培养基只要能够培养细胞则没有特别限定,可以适当使用作为细胞增殖用培养基销售的基础培养基。具体而言,可列举例如BME培养基、BGJb培养基、CMRL 1066培养基、Glasgow MEM(GMEM)培养基、改良的MEM锌选择培养基、IMDM培养基、Medium 199培养基、MEM培养基、Eagle MEM培养基、 $\alpha$ MEM培养基、DMEM培养基、F-12培养基、DMEM/F12培养基、IMDM/F12培养基、Ham培养基、RPMI 1640培养基、Fischer's培养基、Leibovitz's L-15培养基或这些的混合培养基等能够用于培养动物细胞的培养基。另外,也可以使用添加了作为辅助培养基的N2培养基的培养基。

[0240] TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质是指抑制TGF $\beta$ 家族信号转导途径、即由Smad家族来转导的信号转导途径的物质,具体而言,可列举TGF $\beta$ 信号转导途径抑制物质(例如SB431542、LY-364947、SB505124、A-83-01等)、Nodal/激活素信号转导途径抑制物质(例如SB431542、A-83-01等)和BMP信号转导途径抑制物质(例如LDN193189、多索吗啡等)。这些物质有市售,可以获得。

[0241] 音猬因子(以下有时记作“Shh”或“SHH”)信号转导途径作用物质为可增强由Shh介导的信号转导的物质。作为Shh信号转导途径作用物质,可列举例如SHH、SHH的部分肽、PMA(嘌吗啡胺)、SAG(Smoothened Agonist)等。

[0242] TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和音猬因子信号转导途径作用物质的浓度只要为能够诱导向视网膜系细胞的分化的浓度即可。例如,SB431542通常以0.1~200 $\mu$ M、优选2~50 $\mu$ M的浓度来使用。A-83-01通常以0.05~50 $\mu$ M、优选0.5~5 $\mu$ M的浓度来使用。LDN193189通常以1~2000nM、优选10~300nM的浓度来使用。SAG通常以1~2000nM、优选10~700nM的浓度来使用。PMA通常以0.002~20 $\mu$ M、优选0.02~2 $\mu$ M的浓度来使用。

[0243] 未分化维持因子只要为具有抑制多能干细胞分化的作用的物质则没有特别限定。作为本领域技术人员广泛使用的未分化维持因子,可列举FGF信号转导途径作用物质、TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质、胰岛素等。作为FGF信号转导途径作用物质,具体而言,可列举成纤维细胞生长因子(例如bFGF、FGF4、FGF8)。另外,作为TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质,可列举TGF $\beta$ 信号转导途径作用物质、Nodal/激活素信号转导途径作用物质。作为TGF $\beta$ 信号转导途径作用物质,可列举例如TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2。作为Nodal/激活素信号转导途径作用物质,可列举例如Nodal、激活素A、激活素B。培养人多能干细胞(人ES细胞、人iPS细胞)的情况下,步骤(A)中的培养基优选含有bFGF作为未分化维持因子。

[0244] 步骤(A)中使用的培养基中的未分化维持因子浓度为能够维持所培养的多能干细胞的未分化状态的浓度,本领域技术人员可以适当设定。例如,具体而言,在不存在饲养细胞的条件下使用bFGF作为未分化维持因子时,其浓度通常为4~500ng/mL左右、优选为10~

200ng/mL左右、更优选为30~150ng/mL左右。

[0245] 作为含有未分化维持因子的能够用于培养多能干细胞的无饲养细胞培养基,已经开发并销售了多种合成培养基,可列举例如Essential 8培养基(Life Technologies公司制)。Essential 8培养基为在DMEM/F12培养基中含有作为添加剂的L-抗坏血酸-2-磷酸镁(64mg/L)、亚硒酸钠(14 $\mu$ g/L)、胰岛素(19.4mg/L)、NaHCO<sub>3</sub>(543mg/L)、转铁蛋白(10.7mg/L)、bFGF(100ng/mL)和TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质(TGF $\beta$ 1(2ng/mL)或Nodal(100ng/mL))(Nature Methods、8、424-429(2011))。作为此外的市售的无饲养细胞培养基,可列举S-medium(DSファーマバイオメディカル公司制)、StemPro(Life Technologies公司制)、hESF9(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2008Sep 9;105(36):13409-14)、mTeSR1(STEMCELL Technologies公司制)、mTeSR2(STEMCELL Technologies公司制)、TeSR-E8(STEMCELL Technologies公司制)或StemFit(味之素公司制)。通过在上述步骤(A)中使用这些,可以简便地实施本发明。通过使用这些培养基,能够在无饲养细胞条件下培养多能干细胞。作为一例,步骤(A)中使用的培养基为未添加BMP信号转导途径作用物质、Wnt信号转导途径作用物质和Wnt信号转导途径抑制物质中的任一者的无血清培养基。

[0246] 在步骤(A)中的无饲养细胞条件下的多能干细胞的培养中,为了对多能干细胞提供代替饲养细胞的支架,可以使用合适的基质作为支架。作为可用作支架的基质,可列举层粘连蛋白(Nat Biotechnol 28,611-615,(2010))、层粘连蛋白片段(Nat Commun 3,1236,(2012))、基底膜标准品(Nat Biotechnol 19,971-974,(2001))、明胶、胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、巢蛋白、玻连蛋白(Vitronectin)等。

[0247] 关于步骤(A)中的多能干细胞的培养时间,在TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质(例如100nM~700nM)存在下进行培养时,只要为能够实现提高步骤(B)中形成的细胞聚集体的质量的效果的范围则没有特别限定,通常为0.5~144小时。一个方式中,优选为2~96小时、更优选为6~48小时、进一步优选为12~48小时、更进一步优选为18~28小时(例如24小时)。

[0248] 步骤(B)中使用的培养基可以为含血清培养基或无血清培养基。从避免混入化学上不确定的成分的观点出发,优选使用无血清培养基。为了避免制备的繁杂性,可列举例如适量添加了市售的KSR等血清替代物的无血清培养基。作为无血清培养基中的KSR的添加量,通常为约1%至约30%,优选为约2%至约20%。

[0249] 在形成聚集体时,首先,通过步骤(A)中得到的细胞的分散操作,制备被分散的细胞。通过分散操作得到的“被分散的细胞”可列举例如7成(优选8成以上)以上为单细胞、存在3成以下(优选2成以下)的2~50个细胞的块的状态。被分散的细胞可列举几乎不存在细胞彼此的粘附(例如面粘附)的状态。

[0250] 将被分散的细胞的悬浮液接种在培养器中,在对培养器为非粘附性的条件下培养被分散的细胞,由此使两个以上细胞聚集而形成聚集体。作为一个方式,向96孔板之类的多孔板(U形底、V形底)的各孔中加入一定数量的被分散的干细胞,对其进行静置培养则细胞迅速聚集,由此在各孔中形成1个聚集体(SFEBq法)。使用96孔板对细胞进行悬浮培养时,以每1个孔为约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^5$ 个细胞(优选为约 $3 \times 10^3$ 至约 $5 \times 10^4$ 个细胞、约 $4 \times 10^3$ 至约 $2 \times 10^4$ 个细胞)的方式将制备的液体添加到孔中,将板静置而形成聚集体。

[0251] 一个方式中,步骤(B)中使用的培养基含有音猬因子信号转导途径作用物质。

[0252] 即,作为一个具体方式,可以通过包括下述步骤(A)、(B)和(C)的方法制备视网膜系细胞的聚集体:

[0253] (A)在不存在饲养细胞且可以任选含有TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质的含有未分化维持因子的培养基中培养多能干细胞的步骤;

[0254] (B)通过在含有音猬因子信号转导途径作用物质的培养基中对步骤(A)中得到的细胞进行悬浮培养而形成细胞聚集体的步骤;

[0255] (C)在含有BMP信号转导途径作用物质的培养基中进一步对步骤(B)中得到的细胞聚集体进行悬浮培养的步骤。

[0256] 作为步骤(B)中的音猬因子信号转导途径作用物质,可以以上述浓度(例如10nM~300nM)使用上述音猬因子信号转导途径作用物质。音猬因子信号转导途径作用物质优选从悬浮培养开始时含有在培养基中。培养基中可以添加ROCK抑制剂(例如Y-27632)。培养时间例如为12小时~6天。一个例子中,步骤(B)中使用的培养基为未添加选自由BMP信号转导途径作用物质、Wnt信号转导途径作用物质、TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上(优选全部)的培养基。

[0257] 步骤(B)中,通过在含有音猬因子信号转导途径作用物质的培养基中进行培养,从而后述的视网膜前体细胞或神经视网膜前体细胞(Rx阳性细胞)的细胞表面标志物CD39的表达增加。作为一个方式,通过从步骤(B)的悬浮培养开始时(第0天)起添加高浓度(100nM~1000nM、例如300nM)的SAG,CD39的表达增加。通过使用该方法,在使用CD39进行视网膜前体细胞或神经视网膜前体细胞的纯化步骤时,可以纯化出更多的CD39阳性细胞,制造效率提高。需要说明的是,添加300nM SAG而得到的含有CD39阳性细胞的组织为Chx10阳性且Lhx2阳性、NKX2.1阴性,因此为视网膜组织。特别地,可诱导腹侧(CoupTF1阳性)的视网膜组织。需要说明的是,步骤(B)中不添加SAG而得到的视网膜组织可诱导背侧(ALDH1A1阳性)的视网膜组织。

[0258] 步骤(B)中,通过在含有选自由ATP、ATP类似物(AMP-PNP等)和A2A受体激动剂(腺苷、CGS21680(3-[4-[2-[[6-氨基-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(乙基氨基甲酰基)-3,4-二羟基-氧戊环-2-基]嘌呤-2-基]氨基]乙基]苯基]丙酸)等)组成的组中的1种以上的培养基中进行培养,所诱导的组织中的CD39阳性细胞的比例也增加。

[0259] BMP信号转导途径作用物质为可增强由BMP介导的信号转导途径的物质。作为BMP信号转导途径作用物质,可列举例如BMP2、BMP4或BMP7等BMP蛋白、GDF7等GDF蛋白、抗BMP受体抗体或BMP部分肽等。BMP2蛋白、BMP4蛋白和BMP7蛋白例如可以由R&D Systems公司获得,GDF7蛋白例如可以由和光纯药获得。

[0260] 步骤(C)中使用的培养基可列举例如添加了BMP信号转导途径作用物质的无血清培养基或血清培养基(优选为无血清培养基)。无血清培养基、血清培养基可以如上所述地准备。在一个例子中,步骤(C)中使用的培养基为未添加选自由Wnt信号转导途径作用物质、TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上(优选全部)的培养基。另外,在一个例子中,步骤(C)中使用的培养基为未添加音猬因子信号转导途径作用物质的培养基。另外,步骤(C)中使用的培养基为可以添加Wnt信号转导途径作用物质的培养基。

[0261] BMP信号转导途径作用物质的浓度只要为能够诱导向视网膜系细胞的分化的浓度

即可。例如,人BMP4蛋白的情况下,以约0.01nM~约1 $\mu$ M、优选约0.1nM~约100nM、更优选约1nM~约10nM、进一步优选约1.5nM(55ng/mL)的浓度的方式添加于培养基。

[0262] BMP信号转导途径作用物质在步骤(A)的悬浮培养开始起约24小时后以后进行添加即可,可以在悬浮培养开始后数天以内(例如15天以内)添加于培养基。优选在悬浮培养开始后第1天~第15天之间、更优选在第1天~第9天之间、最优选在第3天向培养基中添加BMP信号转导途径作用物质。

[0263] 作为具体方式,例如,可以在步骤(B)的悬浮培养开始后第1~9天、优选第1~3天将培养基的一部分或全部交换为含有BMP4的培养基,将BMP4的终浓度调整为约1~10nM,在BMP4存在下培养例如1~12天、优选2~9天、进一步优选2~5天。其中,为了使BMP4的浓度维持相同浓度,可以进行1次或2次左右将培养基的一部分或全部交换为含有BMP4的培养基的操作。或者,也可以分阶段降低BMP4的浓度。例如,可以在步骤(B)的悬浮培养开始后第2~10天维持BMP信号转导途径作用物质(BMP4)的浓度,然后在步骤(B)的悬浮培养开始后第6~20天分阶段降低BMP信号转导途径作用物质(BMP4)的浓度。

[0264] 上述步骤(A)~步骤(C)中的培养温度、CO<sub>2</sub>浓度等培养条件适当设定。培养温度例如为约30 $^{\circ}$ C~约40 $^{\circ}$ C、优选为约37 $^{\circ}$ C。另外,CO<sub>2</sub>浓度例如为约1%~约10%、优选为约5%。

[0265] 通过改变上述步骤(C)中的培养时间,可以制造各种分化阶段的视网膜系细胞作为细胞聚集体中所含的视网膜系细胞。即,可以制造以各种比例含有未成熟视网膜系细胞(例如视网膜前体细胞、视细胞前体细胞)和成熟视网膜系细胞(例如视细胞)的细胞聚集体中的视网膜系细胞。通过延长步骤(C)的培养时间,可以增加成熟视网膜系细胞的比例。

[0266] 上述步骤(B)和/或步骤(C)也可以使用W02017/183732中公开的方法。即,步骤(B)和/或步骤(C)中,可以在还含有Wnt信号转导途径抑制物质的培养基中进行悬浮培养而形成细胞聚集体。

[0267] 作为步骤(B)和/或步骤(C)中使用的Wnt信号转导途径抑制物质,只要可抑制由Wnt介导的信号转导则没有特别限定,可以为蛋白质、核酸、低分子化合物等中的任一种。由Wnt介导的信号借助以Frizzled(Fz)与LRP5/6(low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6,低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6)的异源二聚体形式存在的Wnt受体来转导。作为Wnt信号转导途径抑制物质,可列举例如直接作用于Wnt或Wnt受体的物质(抗Wnt中和抗体、抗Wnt受体中和抗体等)、抑制编码Wnt或Wnt受体的基因的表达的物质(例如反义寡核苷酸、siRNA等)、抑制Wnt受体与Wnt的结合的物质(可溶型Wnt受体、显性负型Wnt受体等、Wnt拮抗剂、Dkk1、Cerberus蛋白质等)、抑制起因于Wnt受体所介导的信号转导的生理活性的物质[CKI-7(N-(2-氨基乙基)-5-氯异喹啉-8-磺酰胺)、D4476(4-[4-(2,3-二氢-1,4-苯并二噁英-6-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺)、IWR-1-endo(IWR1e)(4-[(3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-六氢-1,3-二氧代-4,7-甲桥-2H-异吲哚-2-基]-N-8-喹啉基-苯甲酰胺)、以及IWP-2(N-(6-甲基-2-苯并噻唑基)-2-[(3,4,6,7-四氢-4-氧代-3-苯基噻吩并[3,2-d]嘧啶-2-基)硫基]乙酰胺)等低分子化合物等等,但是不限于于这些。作为Wnt信号转导途径抑制物质,可以含有这些中的一种或两种以上。CKI-7、D4476、IWR-1-endo(IWR1e)、IWP-2等为公知的Wnt信号转导途径抑制物质,可适当地得到市售品等。作为Wnt信号转导途径抑制物质,优选使用IWR1e。

[0268] 步骤(B)中的Wnt信号转导途径抑制物质的浓度只要为能够良好地诱导细胞聚集

体的形成的浓度即可。例如,在IWR-1-endo的情况下,以达到约0.1 $\mu$ M至约100 $\mu$ M、优选约0.3 $\mu$ M至约30 $\mu$ M、更优选约1 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、进一步优选约3 $\mu$ M的浓度的方式添加于培养基。使用IWR-1-endo以外的Wnt信号转导途径抑制物质的情况下,期望以显示与上述IWR-1-endo的浓度同等的Wnt信号转导途径抑制活性的浓度来使用。

[0269] 步骤(B)中,将Wnt信号转导途径抑制物质添加于培养基的时机越早越优选。在步骤(B)中的悬浮培养开始起通常6天以内、优选3天以内、更优选1天以内、更优选12小时以内、进一步优选在步骤(B)中的悬浮培养开始时将Wnt信号转导途径抑制物质添加于培养基。具体而言,例如可以添加添加有Wnt信号转导途径抑制物质的基础培养基、将一部分或全部培养基交换成该基础培养基。步骤(B)中Wnt信号转导途径抑制物质作用于步骤(A)中得到的细胞的时间没有特别限定,优选在步骤(B)中的悬浮培养开始时添加于培养基后至步骤(B)结束时(即将添加BMP信号转导途径作用物质之前)进行作用。进一步优选如后述那样在步骤(B)结束后(即,步骤(C)的期间内)也持续暴露于Wnt信号转导途径抑制物质。作为一个方式,如后述那样在步骤(B)结束后(即,步骤(C)的期间内)也持续地使Wnt信号转导途径抑制物质进行作用,可以作用至视网膜组织形成为止。

[0270] 步骤(C)中,作为Wnt信号转导途径抑制物质,可以使用上述Wnt信号转导途径抑制物质中的任一者,优选将与步骤(B)中使用的Wnt信号转导途径抑制物质相同的种类的物质用于步骤(C)。

[0271] 步骤(C)中的Wnt信号转导途径抑制物质的浓度只要为能够诱导视网膜前体细胞和视网膜组织的浓度即可。例如,在IWR-1-endo的情况下,以达到约0.1 $\mu$ M至约100 $\mu$ M、优选约0.3 $\mu$ M至约30 $\mu$ M、更优选约1 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、进一步优选约3 $\mu$ M的浓度的方式添加于培养基。使用IWR-1-endo以外的Wnt信号转导途径抑制物质的情况下,期望以显示与上述IWR-1-endo的浓度同等的Wnt信号转导途径抑制活性的浓度来使用。关于步骤(C)的培养基中的Wnt信号转导途径抑制物质的浓度,将步骤(B)的培养基中的Wnt信号转导途径抑制物质的浓度设为100时,优选为50~150、更优选为80~120、进一步优选为90~110,更优选与步骤(B)的培养基中的Wnt信号转导途径抑制物质的浓度同等。

[0272] 向培养基添加Wnt信号转导途径抑制物质的时期只要为能够形成含有视网膜系细胞或视网膜组织的聚集体的范围则没有特别限定,优选越早越好。优选在步骤(C)开始时将Wnt信号转导途径抑制物质添加于培养基。更优选在步骤(B)中添加Wnt信号转导途径抑制物质后,在步骤(C)中也持续(即,从步骤(B)开始时起)包含在培养基中。进一步优选在步骤(B)的悬浮培养开始时添加Wnt信号转导途径抑制物质后,在步骤(C)中也持续包含在培养基中。例如,可以向步骤(B)中得到的培养物(含有Wnt信号转导途径抑制物质的培养基中的聚集体的悬浮液)中添加BMP信号转导作用物质(例如BMP4)。

[0273] 使Wnt信号转导途径抑制物质作用的时间没有特别限定,优选在步骤(B)中的悬浮培养开始时添加Wnt信号转导途径抑制物质的情况下,以步骤(B)中的悬浮培养开始时为起算点,为2天至30天、更优选6天至20天、8天至18天、10天至18天或10天至17天(例如10天)。另一方式中,在步骤(B)中的悬浮培养开始时添加Wnt信号转导途径抑制物质的情况下,以步骤(B)中的悬浮培养开始时作为起算点,使Wnt信号转导途径抑制物质作用的时间优选为3天至15天(例如5天、6天、7天),更优选为6天至10天(例如6天)。

[0274] 将通过上述方法得到的细胞聚集体在含有Wnt信号转导途径作用物质和/或FGF信

号转导途径抑制物质的无血清培养基或血清培养基中培养2天至4天左右的时间(步骤(D))后,在不含Wnt信号转导途径作用物质和FGF信号转导途径抑制物质的无血清培养基或血清培养基中培养30天~200天左右(30天~150天、50天~120天、60天~90天)(步骤(E)),由此也可以制造含有睫状体边缘区样结构体的神经视网膜。

[0275] 作为一个方式,可以通过上述步骤(D)和步骤(E),由步骤(A)~(C)中得到的、步骤(B)的悬浮培养开始后第6~30天、第10~20天(第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天、第16天、第17天、第18天、第19天或第20天)的细胞聚集体制造含有睫状体边缘区样结构体的神经视网膜。

[0276] 作为Wnt信号转导途径作用物质,只要是可增强由Wnt介导的信号转导的物质则没有特别限定。作为具体的Wnt信号转导途径作用物质,可列举例如GSK3 $\beta$ 抑制剂(例如6-溴化靛玉红-3'-脞(BIO)、CHIR99021、肯帕罗酮。例如,在CHIR99021的情况下,可列举约0.1 $\mu$ M~约100 $\mu$ M、优选约1 $\mu$ M~约30 $\mu$ M的范围。

[0277] 作为FGF信号转导途径抑制物质,只要是可抑制由FGF介导的信号转导的物质则没有特别限定。作为FGF信号转导途径抑制物质,可列举例如SU-5402、AZD4547、BGJ398等。例如,在SU-5402的情况下,以约0.1 $\mu$ M~约100 $\mu$ M、优选约1 $\mu$ M~约30 $\mu$ M、更优选约5 $\mu$ M的浓度来添加。

[0278] 在一个例子中,步骤(D)中使用的培养基为未添加选自由BMP信号转导途径作用物质、Wnt信号转导途径抑制物质、SHH信号转导途径作用物质、TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上(优选全部)的培养基。

[0279] 上述步骤(E)的一部分或全部步骤可以使用W02019/017492中公开的连续上皮组织维持用培养基来进行培养。即,通过使用连续上皮组织维持用培养基进行培养,可以维持神经视网膜的连续上皮结构。作为一例,可列举向Neurobasal培养基(例如赛默飞世尔科技公司制、21103049)中配合了B27补充剂(例如赛默飞世尔科技、12587010)的培养基作为连续上皮组织维持用培养基。

[0280] 上述步骤(E)中的培养中,为了兼顾视网膜系细胞(特别是视细胞)的分化和/或成熟化以及连续上皮结构的维持,优选分阶段交换为连续上皮组织维持用培养基。例如,最初的10天~30天使用细胞增殖用基础培养基(例如向DMEM/F12培养基中添加了10%胎牛血清、1%N2补充剂和100 $\mu$ M牛磺酸的培养基)、接下来的10天~40天使用细胞增殖用基础培养基与连续上皮组织维持用培养基的混合培养基(将向DMEM/F12培养基中添加了10%胎牛血清、1%N2补充剂和100 $\mu$ M牛磺酸的培养基与向Neurobasal培养基中添加了10%胎牛血清、2%B27补充剂、2mM谷氨酰胺和100 $\mu$ M牛磺酸的培养基以1:3的比率混合而成的培养基)、接下来的20天~140天使用连续上皮组织维持用培养基(例如向Neurobasal培养基中添加了10%胎牛血清、2%B27补充剂、2mM谷氨酰胺和100 $\mu$ M牛磺酸的培养基)来培养。

[0281] 上述步骤(E)的一部分或全部步骤中,使用细胞增殖用基础培养基、连续上皮组织维持用培养基或这些的混合培养基中的任一培养基的情况下,均可以还含有甲状腺激素信号转导途径作用物质。通过用含有甲状腺激素信号转导途径作用物质的培养基来进行培养,可以制造神经视网膜所含的双极细胞、无长突细胞、神经节细胞或水平细胞等的比例低且视细胞前体细胞的比例增大的视网膜系细胞的聚集体。

[0282] 本说明书中,甲状腺激素信号转导途径作用物质是可增强由甲状腺激素介导的信

号转导的物质,只要可增强甲状腺激素信号转导途径则没有特别限定。作为甲状腺激素信号转导途径作用物质,可列举例如三碘甲状腺原氨酸(以下有时简称为T3)、甲状腺素(以下有时简称为T4)、甲状腺激素受体(优选TR $\beta$ 受体)激动剂等。

[0283] 另外,作为本领域技术人员公知的甲状腺激素受体激动剂,可列举国际公开第97/21993号小册子、国际公开第2004/066929号小册子、国际公开第2004/093799号、国际公开第2000/039077号小册子、国际公开第2001/098256号小册子、国际公开第2003/018515号小册子、国际公开第2003/084915号小册子、国际公开第2002/094319号小册子、国际公开第2003/064369号小册子、日本特开2002-053564号公报、日本特开2002-370978号公报、日本特开2000-256190号公报、国际公开第2007/132475号小册子、国际公开第2007/009913号小册子、国际公开第2003/094845号小册子、国际公开第2002/051805号小册子或国际公开第2010/122980号小册子中记载的二苯基甲烷衍生物、二芳基醚衍生物、哒嗪衍生物、吡啶衍生物或吡啶衍生物等化合物。

[0284] 使用T3作为甲状腺激素信号转导途径作用物质时,例如以达到0.1~1000nM范围的方式添加于培养基。可列举具有与优选1~500nM、更优选10~100nM、进一步优选30~90nM、进一步更优选60nM左右的浓度的T3相当的甲状腺激素信号转导亢进活性的浓度。使用T4作为甲状腺激素信号转导途径作用物质时,例如可以以成为1nM~500 $\mu$ M范围的方式添加于培养基。优选为50nM~50 $\mu$ M、更优选为500nM~5 $\mu$ M范围。使用其它甲状腺激素受体激动剂时,只要为显示与上述浓度的T3或T4所显示的激动剂活性同等程度的活性的浓度即可。

[0285] 步骤(E)中使用的培养基可以适当含有L-谷氨酰胺、牛磺酸、血清等。在一个例子中,步骤(E)中使用的培养基为未添加选自由BMP信号转导途径作用物质、FGF信号转导途径抑制物质、Wnt信号转导途径作用物质、Wnt信号转导途径抑制物质、SHH信号转导途径作用物质、TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和TGF $\beta$ 家族信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上(优选全部)的培养基。

[0286] 作为一个具体方式,可以通过包括下述步骤(A)~(E)的方法来制备视网膜系细胞的聚集体:

[0287] (A) 在不存在饲养细胞的条件下,用含有未分化维持因子且任选含有TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质的培养基进行培养的步骤;

[0288] (B) 通过在可含有Wnt信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质的培养基中对步骤(A)中得到的细胞进行悬浮培养而形成细胞聚集体的步骤;

[0289] (C) 在含有BMP信号转导途径作用物质的培养基中进一步对步骤(B)中得到的细胞聚集体进行悬浮培养的步骤;

[0290] (D) 在含有Wnt信号转导途径作用物质和/或FGF信号转导途径抑制物质的无血清培养基或血清培养基中培养步骤(C)中得到的细胞聚集体2天至4天左右时间的步骤;和

[0291] (E) 在不含Wnt信号转导途径作用物质和FGF信号转导途径抑制物质、可含有甲状腺激素信号转导途径作用物质的无血清培养基或血清培养基中培养步骤(D)中得到的细胞聚集体30天~200天左右的步骤。

[0292] 作为一个具体方式,可以通过包括下述步骤(A')~(E')的方法制备视网膜系细胞的聚集体:

[0293] (A') 在不存在饲养细胞的条件下,用含有未分化维持因子且含有TGF $\beta$ 家族信号转

导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质的培养基培养多能干细胞12小时~48小时的步骤;

[0294] (B')通过在含有Wnt信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质的培养基中将步骤(A')中得到的细胞悬浮培养12小时~72天(24小时~48小时)而形成细胞聚集体的步骤;

[0295] (C')在含有BMP信号转导途径作用物质的培养基中进一步将步骤(B')中得到的细胞聚集体悬浮培养8天~15天(10天~13天)的步骤;

[0296] (D')在含有Wnt信号转导途径作用物质和/或FGF信号转导途径抑制物质的无血清培养基或血清培养基中将步骤(C')中得到的细胞聚集体培养2天至4天的步骤;和

[0297] (E')在不含Wnt信号转导途径作用物质和FGF信号转导途径抑制物质、可含有甲状腺激素信号转导途径作用物质的无血清培养基或血清培养基中将步骤(D')中得到的细胞聚集体培养10天~200天左右的步骤。

[0298] 在此,步骤(E')可以包括下述步骤:10天~30天用细胞增殖用基础培养基进行培养,接着10天~40天用细胞增殖用基础培养基与含有甲状腺激素信号转导作用物质的连续上皮组织维持用培养基的混合培养基进行培养,进而20天~140天用含有甲状腺激素信号转导作用物质的连续上皮组织维持用培养基进行培养。

[0299] 一个方式中,步骤(E')包括在甲状腺激素信号转导途径作用物质存在下培养20天~60天(30天~50天)的步骤。

[0300] 一个方式中,步骤(B')~步骤(E')的培养时间为70天~100天(80天~90天)。

[0301] 含有作为起始细胞的视网膜系细胞的视网膜组织的回收时期只要为该视网膜组织中含有选自由视网膜前体细胞、神经视网膜前体细胞和视细胞前体细胞组成的组中的1种以上细胞的时期则没有特别限定。优选该视网膜组织中含有大量视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞的时期。上述方法中,例如可以由悬浮培养开始后10天~100天后(优选9天~45天后)的视网膜组织如后所述地制备作为起始细胞的被分散的视网膜系细胞群。

[0302] (作为起始细胞的神经系细胞群的分化诱导方法)

[0303] 本发明的制造方法的作为起始细胞的来自多能干细胞的神经系细胞可以通过对多能干细胞进行分化诱导来诱导。作为通过悬浮培养将多能干细胞的聚集体诱导为神经系细胞或神经组织的方法,已报道了多种方法。例如,已知有W02005/123902、W02009/148170、W02008/035110、W02011/055855、W02016/063985、Cell Stem Cell,3,519-32(2008)、Nature,472,51-56(2011)、Cell Stem Cell,10(6),771-775(2012)、Nature Biotechnology,27(3),275-80(2009)、Proc Natl Acad Sci USA,110(50),20284-9(2013)等中记载的方法,但是不限于于这些。将这样的各种神经系细胞或神经组织的诱导方法应用于步骤(B)中得到的聚集体,在合适的神经分化诱导条件下培养步骤(B)中得到的聚集体,由此可以制造含有神经系细胞或神经组织的聚集体。

[0304] 以下示出本发明的制造方法的作为起始细胞的神经细胞(例如大脑细胞(大脑组织))的制造方法的一例。

[0305] 一种大脑组织的制造方法,其包括下述步骤(A'')~(C''):

[0306] (A'')在不存在饲养细胞的条件下,在含有1) TGFβ家族信号转导途径抑制物质和/或音猬因子信号转导途径作用物质、以及2)未分化维持因子的培养基中培养多能干细胞的

步骤;

[0307] (B”) 对步骤(A”) 中得到的细胞进行悬浮培养而形成细胞的聚集体的步骤;和

[0308] (C”) 在不存在分化诱导剂(例如BMP信号转导途径作用物质)或存在分化诱导剂(例如TGFβ家族信号转导途径抑制物质和/或Wnt信号转导途径抑制物质)的条件下对步骤(B”) 中得到的聚集体进行悬浮培养而得到含有神经组织(大脑组织)的聚集体的步骤。

[0309] 步骤(A”) 和(B”) 可以与上述视网膜组织的制造方法的步骤(A) 和(B) 同样地实施。

[0310] 步骤(C”) 中,可以在未添加分化诱导剂、例如BMP信号转导途径作用物质等活化或抑制特定信号转导的物质的培养基中进行培养。通过步骤(A”) 和(B”), 该细胞聚集体注定要分化为神经,因此通过在基础培养基中进行培养而自发地分化为神经(例如大脑)。

[0311] 步骤(C”) 中,作为分化诱导剂,可以将TGFβ家族信号转导途径抑制物质或Wnt信号转导途径抑制物质单独添加于培养基,但是优选将两者组合的方式。可以从步骤(B”) 起加入这些分化诱导因子。

[0312] 作为步骤(B”) 和(C”) 中使用的TGFβ家族信号转导途径抑制物质,可列举TGFβ信号转导途径抑制物质、Nodal/激活素信号转导途径抑制物质和BMP信号转导途径抑制物质。这些因子与上述因子相同。TGFβ家族信号转导途径抑制物质优选为SB431542、A-83-01或LDN193189。

[0313] 作为步骤(B”) 和(C”) 中使用的Wnt信号转导途径抑制物质,只要为可抑制由Wnt介导的信号转导的物质则没有特别限定,可以为蛋白质、核酸、低分子化合物等中的任一种。由Wnt介导的信号借助以Frizzled (Fz) 与LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6, 低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6) 的异源二聚体形式存在的Wnt受体来转导。作为Wnt信号转导途径抑制物质,可列举例如直接作用于Wnt或Wnt受体的物质(抗Wnt抗体、抗Wnt受体抗体等)、抑制编码Wnt或Wnt受体的基因的表达的物质(例如反义寡核苷酸、siRNA等)、抑制Wnt受体与Wnt的结合的物质(可溶型Wnt受体、显性负型Wnt受体等、Wnt拮抗剂、Dkk1、Cerberus蛋白质等)、抑制起因于Wnt受体所介导的信号转导的生理活性的物质[CKI-7 (N-(2-氨基乙基)-5-氯异喹啉-8-磺酰胺)、D4476 (4-[4-(2,3-二氢-1,4-苯并二噁英-6-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺)、IWR-1-endo (IWR1e) (4-[(3aR, 4S, 7R, 7aS)-1,3,3a,4,7,7a-六氢-1,3-二氧化-4,7-甲桥-2H-异吲哚-2-基]-N-8-喹啉基-苯甲酰胺)、以及IWP-2 (N-(6-甲基-2-苯并噻唑基)-2-[(3,4,6,7-四氢-4-氧代-3-苯基噻吩并[3,2-d]嘧啶-2-基) 硫基]乙酰胺) 等低分子化合物等]等,但是不限于这些。CKI-7、D4476、IWR-1-endo (IWR1e)、IWP-2等为公知的Wnt信号转导途径抑制物质,可适当地获得市售品等。作为Wnt信号转导途径抑制物质,优选列举IWR1e。

[0314] Wnt信号转导途径抑制物质的浓度只要为能够诱导形成多能干细胞的聚集体的细胞向大脑细胞分化的浓度即可。例如,在IWR-1-endo的情况下,以达到约0.1μM至约100μM、优选约0.3μM至约30μM、更优选约1μM至约10μM、进一步优选约3μM的浓度的方式添加于培养基。使用IWR-1-endo以外的Wnt信号转导途径抑制物质时,期望以显示与IWR1e的浓度同等的Wnt信号转导途径抑制活性的浓度来使用。

[0315] 通过所述培养,诱导由形成步骤(B”) 中得到的聚集体的细胞向大脑神经系前体细胞的分化,可以得到含有大脑神经系前体细胞的聚集体。关于得到含有大脑神经系前体细胞的聚集体这一点,例如可以通过检测聚集体中含有表达作为大脑神经系前体细胞的标志

物的FoxG1、Lhx2、PAX6、Emx2等的细胞来确认。作为步骤(C”)的实施方式之一,可以列举将步骤(B”)中形成的聚集体在无血清培养基或血清培养基中进行悬浮培养至开始出现表达FoxG1基因的细胞为止的步骤。一个方式中,步骤(C”)的培养实施至聚集体所含的细胞的20%以上(优选为30%以上、40%以上、50%以上、60%以上)表达FoxG1的状态为止。

[0316] 含有作为起始细胞的神经系细胞的神经组织的回收时期只要是该神经组织(大脑组织)中含有神经系前体细胞或大脑神经系前体细胞的时期则没有特别限定,优选该组织中含有大量这些细胞的时期。上述方法中,例如由悬浮培养开始后10天~100天后(优选为15天~40天后)的神经组织(大脑组织)如后所述地制备作为起始细胞的被分散的神经系细胞群即可。

[0317] (被分散的视网膜系或神经系细胞群)

[0318] “分散”是指通过酶处理、物理处理等分散处理将细胞、组织分离至小的细胞片或细胞的集合体(Cell clump)(2个细胞以上且100个细胞以下、优选为50个细胞以下、30个细胞以下、20个细胞以下、10个细胞以下、5个细胞以下;例如2~5个细胞的集合体)或单细胞。被分散的细胞群是指一定数量的细胞片或细胞的集合体或单细胞汇集而成的物质。“被分散的视网膜系细胞群”是指分散状态的细胞群,可以通过对生物体组织或细胞聚集体等的细胞的集合体进行分散而得到。被分散的视网膜系细胞群优选通过对上述视网膜系细胞的聚集体进行分散而得到。

[0319] 一个方式中,分散方法只要为能够在存活状态下将细胞分散的方法即可,可列举例如机械分散处理、细胞分散液处理、细胞保护剂添加处理。也可以组合进行这些处理。优选地,进行细胞分散液处理、接着进行机械分散处理即可。

[0320] 作为机械分散处理的方法,可列举吹打处理或利用刮刀的刮取操作。

[0321] 作为细胞分散液处理中使用的细胞分散液,可列举例如含有胰蛋白酶、胶原蛋白酶、透明质酸酶、弹性蛋白酶、链霉菌蛋白酶、DNA酶、木瓜蛋白酶等酶类以及乙二胺四乙酸等螯合剂中的任一种的溶液。可以使用市售的细胞分散液,例如TrypLE Select(Life Technologies公司制)、TrypLE Express(Life Technologies公司制)、神经细胞分散液(FujiFilm)。

[0322] 在分散细胞时,通过用细胞保护剂进行处理,可以抑制细胞的细胞死亡。作为细胞保护剂处理中使用的细胞保护剂,可列举FGF信号转导途径作用物质、肝素、IGF信号转导途径作用物质、血清或血清替代物。另外,为了抑制因分散而诱导的细胞死亡(特别是人多能干细胞的细胞死亡),可以在分散时添加Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rho-associated coiled-coil Containing Protein Kinase(“ROCK”或“Rho激酶”))的抑制物质(ROCK抑制剂)或肌球蛋白的抑制物质。作为ROCK抑制剂,可列举Y-27632、法舒地尔(HA1077)、H-1152等。作为肌球蛋白的抑制物质,可列举布比他汀。作为优选的细胞保护剂,可列举ROCK抑制剂。

[0323] 被分散的视网膜系细胞群(或神经系细胞群)可列举下述状态:含有单细胞(single cell),例如相对于细胞群的全部细胞数而言70%以上、优选80%以上为单细胞,另外,相对于细胞群的全部细胞数而言存在30%以下、优选为20%以下的2~50个细胞的块。被分散的视网膜系细胞群(或神经系细胞群)中,细胞彼此的粘附(例如面粘附)基本消失。另外,被分散的视网膜系细胞群(或神经系细胞群)更优选尽可能由单细胞构成,这样的

被分散的视网膜系细胞群(或神经系细胞群)可以通过在分散处理后除去未变成单细胞的细胞块而得到。除去细胞块的方法没有特别限定,可列举例如通过滤膜(细胞滤网)来除去块等。一个方式中,被分散的细胞可列举细胞-细胞间连接(例如粘附连接)基本消失的状态。

[0324] 由视网膜组织准备作为起始细胞的视网膜系细胞群时,有时视网膜组织含有视网膜色素上皮细胞等不需要的细胞。例如,可列举从生物体采集视网膜组织的情况、由上述多能干细胞制造视网膜组织的方法中的步骤(D)和步骤(E)的情况等。这种情况下,可以切除视网膜色素上皮细胞等不需要的细胞所在的区域,再对视网膜系细胞群进行分散。在视网膜色素上皮细胞的情况下,可以通过形态、色素来判别,本领域技术人员可容易地进行切除。

[0325] 在后述的含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中开始培养之前,可以如后所述地实施用于提高视网膜前体细胞或神经视网膜前体细胞的纯度的步骤(纯化步骤),进而可以实施被分散的视网膜系细胞群(或神经系细胞群)的维持·扩大培养。培养基只要为视网膜系细胞(或神经系细胞)可生存和增殖的培养基(DMEM培养基等)则没有特别限定。由于经冷冻熔融的视网膜系细胞群也可以用作本发明的制造方法的起始细胞,因此也可以将被分散的视网膜系细胞群进行冷冻保存。冻存液没有特别限定,可以使用市售的冻存液。

[0326] [视网膜前体细胞的纯化]

[0327] 在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中开始培养上述被分散的视网膜系细胞群之前,可以对被分散的视网膜系细胞群实施用于提高视网膜前体细胞的比例(纯度)、优选神经视网膜前体细胞的比例(纯度)的步骤(纯化步骤)。纯化步骤中,可以使用视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞中表达的特定标志物来实施细胞分选等操作。细胞分选可以使用FACS、MACS等公知技术来实施。通过实施视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞的纯化步骤,能够减少本说明书记载的制造方法中RPE细胞、目标外细胞的混入。通过提高被分散的视网膜系细胞群中含有的视网膜前体细胞的比例的步骤,可抑制视网膜色素上皮前体细胞和/或视网膜色素上皮细胞的生成。关于是否抑制了视网膜色素上皮前体细胞和/或视网膜色素上皮细胞的生成这一点,可以在通过后述培养方法培养被分散的视网膜系细胞群后,基于上述视网膜色素上皮细胞的标志物、形态、性质等判断是否生成了视网膜色素上皮细胞。抑制视网膜色素上皮前体细胞和/或视网膜色素上皮细胞的生成可以是指:相较于未实施提高视网膜前体细胞的比例的步骤时而言,抑制了视网膜色素上皮细胞相对于上述培养后的全部细胞数的比例。如果是第0175段记载的程度的视网膜色素上皮细胞的比例,则可以判断为抑制了视网膜色素上皮前体细胞和/或视网膜色素上皮细胞的生成。

[0328] 作为视网膜前体细胞的细胞标志物(阳性标志物),Rx、Chx10等为人所熟知。但是,这些基因在细胞内表达,因此例如需要使用利用基因重组技术将该基因与荧光蛋白连接的细胞或将该基因用荧光蛋白置换的细胞等(例如Rx::Venus细胞)。因此,对视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞的阳性标志物进行了探索,发现CD9(Genbank ID:NM\_\_001769.4、NM\_\_001330312.2)、CD24(Genbank ID:NM\_\_001291737.1、NM\_\_001291738.1、NM\_\_001291739.1、NM\_\_001359084.1、NM\_\_013230.3)、CD29(Genbank ID:NM\_\_002211.4、NM\_\_033668.2、NM\_\_133376.2)、CD39(Genbank ID:NM\_\_001098175.2、NM\_\_001164178.1、NM\_\_

001164179.2、NM\_001164181.1、NM\_001164182.2、NM\_001164183.2、NM\_001312654.1、NM\_001320916.1、NM\_001776.6)、CD47 (Genbank ID:NM\_001777.3、NM\_198793.2)、CD49b (Genbank ID:NM\_002203.4)、CD49c (Genbank ID:NM\_002204.4)、CD49f (Genbank ID:NM\_000210.4、NM\_001079818.3、NM\_001316306.2、NM\_001365529.2、NM\_001365530.2)、CD57 (Genbank ID:NM\_001367973.1、NM\_018644.3、NM\_054025.3)、CD73 (Genbank ID:NM\_001204813.1、NM\_002526.4)、CD82 (Genbank ID:NM\_001024844.2、NM\_002231.4)、CD90 (Genbank ID:NM\_001311160.2、NM\_001311162.2、NM\_001372050.1、NM\_006288.5)、CD164 (Genbank ID:NM\_001142401.2、NM\_001142402.2、NM\_001142403.3、NM\_001142404.2、NM\_001346500.2、NM\_006016.6)、CD200 (Genbank ID:NM\_001004196.3、NM\_001318826.1、NM\_001318828.1、NM\_001318830.1、NM\_001365851.2、NM\_001365852.1、NM\_001365853.1、NM\_001365854.1、NM\_001365855.1、NM\_005944.7)、CD340 (Genbank ID:NM\_001005862.2、NM\_001289936.1、NM\_001289937.1、NM\_001289938.1、NM\_004448.3) 和CXCR4 (Genbank ID:NM\_001008540.2、NM\_001348056.2、NM\_001348059.2、NM\_001348060.2、NM\_003467.3) 在这些细胞的细胞表面表达。作为优选的细胞表面标志物,可列举例如CD9、CD39、CD90和CXCR4。作为一个方式,可以在上述含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中开始培养之前实施提高细胞群中的视网膜前体细胞的比例的方法,所述方法包括下述步骤:使上述含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质(例如抗体、肽等)并分取阳性级分。通过该方法,能够减少本说明书记载的制造方法中RPE细胞的混入。

[0329] 进而,作为这些细胞的阴性标志物、即在这些细胞中未见表达的标志物,发现了SSEA1 (Genbank ID:NM\_002033.3)、CD66b (Genbank ID:NM\_001816.4)、CD69 (Genbank ID:NM\_001781.2) 和CD84 (Genbank ID:NM\_001184879.2、NM\_001184881.2、NM\_001184882.1、NM\_001330742.2、NM\_003874.4) 等。通过与上述阳性标志物组合,能够进一步提高视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞的纯度。作为一个方式,可以在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中开始培养之前实施提高细胞群中的视网膜前体细胞的比例的方法,所述方法包括下述步骤:使上述含有视网膜前体细胞的细胞群接触与选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的1种以上抗原结合的物质(例如抗体)、优选还接触与选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原结合的物质(例如抗体),并分取前者的标志物的阳性级分和后者的标志物的阴性级分。使上述被分散的视网膜系细胞群接触与选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上抗原结合的物质(例如抗体)并分取这些标志物的阴性级分的步骤是得到该抗原的表达量为基准值以下的细胞群的步骤。在此,基准值可以由本领域技术人员任意设定。例如,通过得到与用荧光标记的同型对照抗体处理细胞群时的荧光强度同等强度的用荧光标记的针对上述抗原的抗体处理细胞群后到细胞群,可以分取阴性的级分。

[0330] 需要说明的是,上述使用与阳性标志物和阴性标志物结合的物质(例如抗体)来提高细胞群中的视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞的比例的方法不限于作为本说明书记载的制造方法的一个步骤的方法。使用细胞表面标志物来提高视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞的比例的方法例如也可以作为其它视网膜组织的制造方法的一个步骤来使用。

[0331] 一个方式中,在被分散的视网膜系细胞群中,视网膜前体细胞和/或神经视网膜前体细胞例如可以占全部细胞数的30%以上,优选占全部细胞数的50%以上,更优选占全部细胞数的80%以上,进一步优选占全部细胞数的90%以上。进而,例如被分散的视网膜系细胞群中可以相对于细胞群的全部细胞数含有50%以上、优选含有80%以上、85%以上、90%以上、95%以上的选自由CD9、CD39、CD90和CXCR4组成的组中的至少1种标志物为阳性且Rx和/或Chx10阳性的细胞(视网膜前体细胞或神经视网膜前体细胞)。进而,上述细胞群优选选自由SSEA1、CD66b、CD69和CD84组成的组中的1种以上、优选2种以上、3种以上或全部抗原为阴性。在此所称的阴性只要为上述基准值以下即可。

[0332] 一个实施方式中,提高视网膜前体细胞的比例的步骤(纯化步骤)包括以下步骤:

[0333] (1) 在选自由Shh信号转导途径作用物质、ATP和A2A受体作用物质组成的组中的1种以上存在下培养多能干细胞而制造细胞聚集体的步骤;

[0334] (2) 使细胞聚集体向视网膜前体细胞分化诱导的步骤;

[0335] (3) 使细胞聚集体分散,使其接触与CD39结合的物质(例如抗体)的步骤。

[0336] 步骤(1)和(2)的详细情况如“作为起始细胞的视网膜系细胞群的分化诱导方法”所记载的那样。

[0337] (通过培养被分散的视网膜系细胞群或神经系细胞群来重新形成层结构)

[0338] 本发明的视网膜组织的制造方法包括在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中对被分散的视网膜系细胞群进行粘附培养或悬浮培养的步骤。利用任一培养方法均能够由被分散的视网膜系细胞群重新形成上皮结构(多层结构)。为了制造具有上皮结构(或多层结构)的片状视网膜组织,优选粘附培养。本发明的制造方法也可以以被分散的神经系细胞群为起始细胞并同样实施。以下记载使用被分散的视网膜系细胞群作为起始细胞的情况,但是只要没有特别记载,则以被分散的神经系细胞群为起始细胞时也同样。

[0339] 被分散的视网膜系细胞群的培养中使用的培养基只要为视网膜系细胞可生存和增殖的培养基则没有特别限定。一个方式中,作为被分散的视网膜系细胞群的培养中使用的培养基,可列举连续上皮组织维持用培养基。作为一例,可列举在Neurobasal培养基(例如赛默飞世尔科技公司制、21103049)中配合有B27补充剂(例如赛默飞世尔科技、12587010)的培养基作为连续上皮组织维持用培养基。

[0340] 作为培养基中含有的Wnt信号转导途径作用物质,只要为可增强由Wnt介导的信号转导的物质则没有特别限定。作为具体的Wnt信号转导途径作用物质,可列举例如GSK3 $\beta$ 抑制剂(例如6-溴化靛玉红-3'-脞(BIO)、CHIR99021、肯帕罗酮、作为Wnt蛋白的Wnt2b、Wnt3a等和其部分肽等,可以为1种物质,也可以为2种以上物质。作为Wnt信号转导途径作用物质,优选为选自由CHIR99021、BIO、Wnt2b和Wnt3a组成的组中的1种以上物质、2种以上物质或3种以上物质。Wnt信号转导途径作用物质能够在使被分散的视网膜系细胞群再聚集化的过程中使聚集体变大且重新形成具有顶端面/基底膜的极性的上皮结构(或多层结构)。通过Wnt信号转导途径作用物质,还能够抑制玫瑰花样结构的形成。

[0341] Wnt信号转导途径作用物质的浓度只要为能够诱导期望的细胞聚集体的形成(例如上皮结构(或多层结构)的重新形成)的浓度即可。关于Wnt信号转导途径作用物质的浓度,例如使用CHIR99021时可以为0.01 $\mu$ M~100 $\mu$ M,优选为0.1 $\mu$ M~10 $\mu$ M、更优选为1 $\mu$ M~10 $\mu$ M。使用其它Wnt信号转导途径作用物质时,只要为显示与上述浓度的CHIR99021同等程度的

Wnt信号活化作用的浓度即可。本领域技术人员例如能够通过确认 $\beta$ -连环蛋白的表达等方法来测定Wnt信号活化作用。

[0342] Wnt信号转导途径作用物质的添加时机没有特别限定,优选在用于重新片状化的悬浮培养或粘附培养开始后尽量早的时期添加。作为一个方式,优选从培养开始时起在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中培养。在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中的培养天数只要为可观察到重新形成具有顶端面/基底膜的极性的上皮结构(或多层结构)的效果的范围则没有特别限定,例如为1天~14天。

[0343] 一个方式中,培养基可以还含有选自由ROCK抑制剂、SHH(音猬因子)信号转导途径作用物质和成纤维细胞生长因子(FGF)信号转导途径作用物质组成的组中的1种以上物质。例如,通过添加ROCK抑制剂,可观察到促进被分散的视网膜前体细胞群的再聚集化的效果,通过添加SHH信号转导途径作用物质,可观察到促进细胞聚集体的增殖、使细胞聚集体变大的效果,通过添加FGF信号转导途径作用物质(例如FGF2、FGF8),可观察到减轻细胞损伤、另外向RPE细胞的分化诱导得到抑制的效果。

[0344] ROCK抑制剂只要为能够抑制Rho激酶(ROCK)的功能的物质则没有特别限定,可列举例如Y-27632(例如参照Ishizaki et al.,Mol.Pharmacol.57,976-983(2000);Narumiya et al.,Methods Enzymol.325,273-284(2000))、法舒地尔/HA1077(例如参照Uenata et al.,Nature 389:990-994(1997))、H-1152(例如参照Sasaki et al.,Pharmacol.Ther.93:225-232(2002))、Wf-536(例如参照Nakajima et al.,Cancer Chemother Pharmacol.52(4):319-324(2003))和它们的衍生物、以及针对ROCK的反义核酸、RNA干扰诱导性核酸(例如siRNA)、显性负型突变体和它们的表达载体。另外,作为ROCK抑制剂,也已知其它低分子化合物,因此本发明中也可以使用这样的化合物或它们的衍生物(例如,参照美国专利申请公开第20050209261号、美国专利申请公开第20050192304号、美国专利申请公开第20040014755号、美国专利申请公开第20040002508号、美国专利申请公开第20040002507号、美国专利申请公开第20030125344号、美国专利申请公开第20030087919号和国际公开第2003/062227号、国际公开第2003/059913号、国际公开第2003/062225号、国际公开第2002/076976号、国际公开第2004/039796号)。ROCK抑制剂可以使用1种或2种以上的ROCK抑制剂。ROCK抑制剂优选含有选自由Y-27632、法舒地尔(HA1077)、H-1152组成的组中的1种以上物质。

[0345] ROCK抑制剂的浓度可由本领域技术人员根据实验条件适当设定。作为一个方式,只要为能够促进被分散的视网膜前体细胞群的再聚集化的浓度即可。例如,使用Y-27632时,可以为0.1 $\mu$ M~1mM,优选为1 $\mu$ M~100 $\mu$ M、更优选为5 $\mu$ M~20 $\mu$ M。使用Y-27632以外的ROCK抑制剂时,只要为显示与上述浓度的Y-27632同等程度的ROCK抑制作用的浓度即可。本领域技术人员例如可通过MLC2的磷酸化的表达分析等方法来测定ROCK抑制作用。

[0346] SHH(音猬因子)信号转导途径作用物质是指可增强由SHH(有时也记作Shh)介导的信号转导的物质。作为SHH信号转导途径作用物质,可列举例如属于刺猬蛋白家族的蛋白质(例如Shh、Ihh)、SHH受体、Shh受体激动剂、PMA(Purmorphamine;9-环己基-N-[4-(4-吗啉基)苯基]-2-(1-萘氧基)-9H-嘌呤-6-胺)或SAG(Smoothened Agonist;N-甲基-N'(3-吡啶基苄基)-N'(3-氯苯并[b]噻吩-2-羰基)-1,4-二氨基环己烷)等。作为Shh信号转导途径作用物质,可以含有这些中的一种或两种以上。Shh信号转导途径作用物质优选为选自由Shh

(Genbank登录号:NM\_000193、NP\_000184)、SAG或PMA组成的组中的1种以上物质。

[0347] SHH信号转导途径作用物质的浓度可以由本领域技术人员根据实验条件适当设定。作为一个方式,只要为可观察到增大细胞聚集体的效果的范围的浓度即可。例如,SAG通常以1~2000nM、优选10~700nM的浓度来使用。PMA通常以0.002~20 $\mu$ M、优选0.02~2 $\mu$ M的浓度来使用。SHH通常以4~500ng/mL、优选10~200ng/mL来使用。使用其它SHH信号转导途径作用物质时,只要为显示与上述浓度的SAG同等程度的SHH信号活化作用的浓度即可。本领域技术人员例如可以通过下游信号(SMO、GLI)的表达分析等方法来测定SHH信号活化作用。

[0348] FGF信号转导途径作用物质只要为可增强由FGF介导的信号转导的物质则没有特别限定。作为FGF信号转导途径作用物质,具体而言,可列举成纤维细胞生长因子(例如bFGF、FGF4、FGF8和FGF9)。FGF信号转导途径作用物质优选为选自由FGF2、FGF4和FGF8组成的组中的1种以上成纤维细胞生长因子。

[0349] FGF信号转导途径作用物质的浓度可由本领域技术人员根据实验条件适当设定。作为一个方式,只要为可观察到抑制向RPE细胞的分化诱导的效果的范围的浓度即可。例如,使用FGF2、4或8时,为4~500ng/mL左右、优选为10~200ng/mL左右、更优选为25~100ng/mL左右。使用其它FGF信号转导途径作用物质时,只要为显示与上述浓度的FGF8同等程度的FGF信号活化作用的浓度即可。本领域技术人员例如可通过下游信号(Akt、MEK)的表达分析等方法来测定FGF信号活化作用。

[0350] 添加ROCK抑制剂、SHH(音猬因子)信号转导途径作用物质和/或FGF信号转导途径作用物质的时机没有特别限定,优选从培养开始时起在含有ROCK抑制剂、SHH(音猬因子)信号转导途径作用物质和/或FGF信号转导途径作用物质的培养基中进行培养。这些物质优选同时添加于培养基,进一步优选与Wnt信号转导途径作用物质同时添加于培养基。作为一个方式,可以在含有这些物质的培养基中培养被分散的视网膜系细胞1天~14天。

[0351] 悬浮培养是指以不粘附于培养容器的状态培养细胞,没有特别限定,可以使用如下培养容器来进行:未经为了提高与细胞的粘附性而进行人工处理(例如,利用细胞外基质等的包被处理)的培养容器;或者,进行了人工抑制粘附的处理(例如,聚甲基丙烯酸羟乙酯(poly-HEMA)、进行了基于非离子性的表面活性多元醇(Pluronic F-127等)或磷脂类似结构物(例如,以2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱为结构单元的水溶性聚合物(Lipidure))的包被处理的培养容器。

[0352] 悬浮培养例如以被分散的视网膜系细胞为起始细胞,使用SFEB(Serum-free Floating culture of Embryoid Bodies-like aggregates,胚状体样聚集体的无血清悬浮培养)法(WO2005/12390)、SFEBq法(WO2009/148170)来进行。

[0353] 粘附培养是指以粘附于培养容器的状态来培养细胞,没有特别限定,可以使用为了提高与细胞的粘附性而进行了人工处理的培养容器等来进行。粘附培养优选使用利用胞外基质和/或温度应答性聚合物进行了包被的培养容器等来进行。作为一个实施方式的视网膜组织的制造方法,包括下述步骤:使利用温度应答性聚合物进行了包被的培养容器暴露于该温度应答性聚合物的性质发生变化的温度,从而使片状视网膜组织从该培养容器剥离。

[0354] 通过用胞外基质进行了包被的培养容器上进行粘附培养,从而可以制造后述的

片状视网膜组织。

[0355] 通过在胞外基质存在下进行培养,细胞能够识别基底膜侧,因此容易形成顶端面,另外,细胞朝向大致垂直于层方向的方向,可得到具有更好的层结构的视网膜组织。通过使用利用温度应答性聚合物进行了包被的培养容器等,仅通过温度变化就能够使形成的具有上皮结构(或多层结构)的视网膜组织容易地从培养容器等剥离,不需要酶处理,因此能够在不因酶处理而减弱细胞间连接的情况下回收结实的片状的视网膜组织。因此,优选使用利用胞外基质和/或温度应答性聚合物、特别是胞外基质和温度应答性聚合物这两者进行了包被的培养容器等,可列举例如培养容器的培养面用上述温度应答性聚合物进行了包被、该聚合物的上表面用上述胞外基质进行了包被的方式。在此,培养面是指培养容器中细胞所粘附的面,聚合物的上表面是指聚合物涂层的与培养面相接触的面相反面。

[0356] 胞外基质是指构成细胞外侧空间的生物高分子,可列举纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白等细胞粘附性蛋白质、胶原蛋白、弹性蛋白等纤维性蛋白质、这些蛋白质的片段、透明质酸、硫酸软骨素等糖胺聚糖或蛋白聚糖、基质胶等。胞外基质优选为选自胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、基质胶、玻连蛋白和这些蛋白质的片段组成的组中的1种以上物质。作为层粘连蛋白片段,可列举例如iMatrix-511、iMatrix-411、iMatrix-221等市售品。

[0357] 基质胶是来源于Engelbreth Holm Swarn(EHS)小鼠肉瘤的基底膜制备物。基质胶可以通过例如US patent No.4829000中公开的方法制备,也可以购买市售品。基质胶的主要成分为层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和巢蛋白。

[0358] 温度应答性聚合物是聚合物的性质根据温度变化而改变的聚合物。即,在水中具有下限临界溶液温度(Lower Critical Solution temperature,LCST),以某一温度为临界而显示出下述相变行为:在高于该温度的温度下,其分子内或分子间的疏水键增强,聚合物链发生聚集,相反,在低于该温度的温度下,聚合物链结合水分子而发生水合。具体而言,可列举例如在培养温度(约37℃)下保持器材表面的疏水性状态且在低于培养温度的温度、例如20~30℃左右时器材表面变为亲水性、培养细胞容易剥离的温度应答性聚合物。因此,在剥离细胞时无需酶处理,能够在不因酶处理而破坏细胞中的处于细胞与细胞间的蛋白质的情况下以一片较大的片的形式回收。作为这样的温度应答性聚合物,优选使用例如聚-N-异丙基丙烯酰胺(PIPAAm)(LCST为32℃)。通常细胞培养在约37℃的条件下进行,如果也考虑低温对细胞造成的损伤,则优选LCST为约20℃~35℃范围的温度应答性聚合物。作为市售品,也可获得在表面固定有温度应答性聚合物的细胞片回收用温度应答性细胞培养器材(セルシード公司:UpCell(注册商标))等。

[0359] 关于培养条件,培养温度没有特别限定,为约30~40℃、优选为约37℃,在含有CO<sub>2</sub>的空气气氛下进行培养,CO<sub>2</sub>浓度优选为约2~5%。

[0360] 对于片状视网膜组织中的层结构的形成、特别是顶端面/基底面(顶端/基底的极性)的形成而言,Wnt信号转导途径作用物质是必需的。

[0361] Wnt信号转导途径作用物质的浓度只要为能够诱导具有层结构和顶端面的片状视网膜组织的浓度即可。关于Wnt信号转导途径作用物质的浓度,例如使用CHIR99021时,可以为0.01μM~100μM,优选为0.1μM~10μM、更优选为1μM~10μM。使用其它Wnt信号转导途径作用物质时,只要为显示与上述浓度的CHIR99021同等程度的Wnt信号活化作用的浓度即可。关于是否形成了层结构这一点,本领域技术人员例如可以通过显微镜下的观察、利用OCT等

装置测定厚度来容易地判断。关于是否形成了顶端面这一点,例如可以通过使用抗Zo-1抗体、抗埃兹蛋白抗体、抗非典型PKC抗体进行染色来确认。

[0362] 添加Wnt信号转导途径作用物质的时机没有特别限定,优选在粘附培养开始后尽量早的时期添加。作为一个方式,优选从培养开始时起在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中进行培养。在含有Wnt信号转导途径作用物质的培养基中的培养天数只要为可观察到重新形成具有顶端面/基底膜的极性的多层结构(或多层结构)的效果的范围则没有特别限定,例如为1天~15天、优选为1天~9天。

[0363] 可以在除去了Wnt信号转导途径作用物质等的培养基中持续培养。通过持续培养,层结构变厚,视网膜系细胞的分化进行。培养时间没有特别限定,只要为至接种的被分散的视网膜系细胞群增殖并至少形成上皮结构(或多层结构)为止的时间即可,可以培养至制造出目标分化阶段的片状视网膜组织。从形成上皮结构(或多层结构)的观点出发,期望至少培养7天。培养时间可以为例如7天至60天以下,可以为40天以下、30天以下、20天以下、16天以下(例如16天)。

[0364] 在形成上皮结构(或多层结构)之后,为了使细胞增殖、分化或成熟,可以进一步持续培养。进一步培养时使用的培养基可以含有或不含Wnt信号转导途径作用物质、ROCK抑制剂、SHH(音猬因子)信号转导途径作用物质和/或整联蛋白转导途径作用物质。

[0365] “多层结构”是指在具有基底膜侧和顶端侧的极性的(即,具有上皮结构的)组织中,2层以上的细胞沿着同一方向排列的细胞层重叠而成的结构,为不同的层彼此之间各自的表面的切线方向大致平行的结构。该多层结构优选具有基底面和顶端面的极性,在基底膜和一个方式中,具有多层结构的视网膜组织可以为片状视网膜组织,含有具有多层结构的视网膜组织的细胞聚集体可以为片状细胞聚集体。另外,在一个方式中,细胞层可以为神经视网膜前体细胞层、神经节细胞层或视细胞层。

[0366] 本发明的一个方式中,在多层结构中,细胞的朝向可以为大致垂直于层方向的方向。在此,“细胞的朝向”表示核的形状、细胞体的朝向沿着基底膜侧和顶端侧延伸的方向性。另外,大致垂直于层方向的方向是指与多层结构中的层中一个一个细胞接触并排列的方向(即,层表面的切线方向)正交的方向,是指垂直于层的方向或纵向。

[0367] 本发明的一个方式中,可以还包括下述步骤:将通过悬浮培养或粘附培养得到的具有上皮结构(或多层结构)的视网膜组织(特别是片状视网膜组织)切成移植所需的大小。例如,可以使用镊子、刀子、剪子等切出。

[0368] 另一方面,发现了如下课题:在通过上述方法制造片状视网膜组织时,会以一定比例制造并混入RPE细胞。这些RPE细胞虽然也可以通过目视确认并除去,但是从品质、制造效率的观点出发,优选从最初起不含RPE细胞。因此,为了解决该课题进行了深入研究,结果,通过使用以下公开的方法,可大幅减少RPE细胞的混入。

[0369] [片状视网膜组织]

[0370] 本发明的一个方式为具有上皮结构的片状视网膜(神经视网膜)组织。该片状视网膜组织的一个方式中,包含具有多层结构的视网膜系细胞层,该多层结构具有基底面和顶端面的极性,上述具有多层结构的视网膜系细胞层含有选自由视网膜前体细胞、视细胞前体细胞和视细胞组成的组中的1种以上细胞,上述视网膜系细胞层中,细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向。在此,“片状”是指由至少在二维方向上具有生物学结合的单个或两个

以上细胞构成的单层或复层的结构体。

[0371] 可以根据使用的培养器材而制造任意大小的片状视网膜组织,这是本发明的优点之一。即,能够制造以往无法制造的大小的片状视网膜组织,疾病波及较大范围时,能够通过移植1片来进行治疗。

[0372] 一个方式中,本发明的片状视网膜组织的长径(也称为直径)例如为2mm以上、4mm以上、5mm以上、7.5mm以上、10mm以上。一个方式中,本发明的片状视网膜组织的短径例如为2mm以上、3mm以上、4mm以上、5mm以上。原理上长径和短径没有上限,但是受培养中使用的培养皿等的大小的限制。作为一个方式,长径可以为10cm以下、5cm以下、4cm以下、3cm以下、2cm以下、1cm以下。一个方式中,本发明的片状视网膜组织的高度例如可以为50 $\mu\text{m}$ ~1500 $\mu\text{m}$ ,优选为200 $\mu\text{m}$ ~700 $\mu\text{m}$ 。

[0373] 片状视网膜组织的长径、短径和高度的测定方法没有特别限定,例如可以由在显微镜下拍摄的图像来测定。例如,对于片状视网膜组织,可以用体视显微镜拍摄正面图像和横面图像并由拍摄的图像来测定,所述正面图像以顶端面朝向物镜侧的状态拍摄而得,所述横面图像以从物镜观察截面时垂直的方式以倾斜状态拍摄而得。在此,长径是指正面图像中连接该片截面上的2个端点的线段中最长的线段和其长度。短径是指正面图像中连接该片截面上的2个端点的线段中与长径正交的线段中最长的线段和其长度。高度是指与该片截面正交、并且以与该片截面的交点和视网膜片的顶点为端点的线段中最长的线段和其长度。

[0374] 基底面和顶端面如上述定义所记载的那样。“多层结构具有基底面和顶端面的极性”是指在多层结构的一侧存在基底面、在另一侧存在顶端面。基底面上可以存在基底膜。

[0375] “细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向”是指视网膜系细胞层的各层中存在的细胞的长径朝向大致垂直于层方向的方向。大致垂直方向是指层方向与细胞的长径所形成的锐角为约75°(或80°)以上且90°以下。本说明书中,如果各层中存在的细胞的约50%以上、优选60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上朝向大致垂直于层方向的方向,则判定为“细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向”。

[0376] 片状视网膜组织优选不含RPE细胞。一个方式中,片状视网膜组织中的RPE细胞数相对于总细胞数的比例为10%以下、优选9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下。关于片状视网膜组织中的RPE细胞数相对于总细胞数的比例,例如可使用流式细胞术(FACS)等测定表达上述RPE细胞的标志物的细胞的比例。一个方式中,RPE细胞的面积在片状视网膜组织的总面积中所占的比例为10%以下、优选为9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下。RPE细胞呈黑色,因此RPE细胞的面积在片状视网膜组织的总面积中所占的比例可以由显微镜下呈黑色的面积的比例来计算。另外,也可通过PCR等来检测表达RPE细胞的标志物的细胞。需要说明的是,减少片状视网膜(神经视网膜)组织中的RPE细胞的比例的方法如上所述。

[0377] 一个实施方式的由具有多层结构的视网膜系细胞层构成的片状视网膜组织中,

[0378] (1) 该具有多层结构的视网膜系细胞层具有基底面和顶端面的极性,

[0379] (2) 上述具有多层结构的视网膜系细胞层含有选自由视网膜前体细胞、视细胞前体细胞和视细胞组成的组中的1种以上细胞,

[0380] (3) 上述视网膜系细胞层的各层中,细胞的朝向为大致垂直于层方向的方向,并且

[0381] (4) 直径为8mm以上。

[0382] (片状视网膜系细胞层(神经视网膜)-视网膜色素上皮细胞的复合体(复合片))

[0383] 作为本发明的一个方式,上述具有多层结构的视网膜系细胞层可以还含有接合于上述视网膜系细胞层的片状视网膜色素上皮细胞,可列举上述视网膜系细胞层与上述片状视网膜色素上皮细胞各自的表面的切线方向大致平行、上述视网膜系细胞层的顶端面与上述片状视网膜色素上皮细胞的顶端面彼此相对、并且上述视网膜系细胞层与上述片状视网膜色素上皮细胞通过存在于两者之间的粘附因子而接合的复合体(复合片)。片状神经视网膜也称为神经视网膜片或NR片,片状视网膜色素上皮细胞也称为视网膜色素上皮细胞片或RPE细胞片(RPE片)。即,本发明的一个方式还提供神经视网膜与RPE细胞的复合体(复合片)。作为本发明的另一方式,还可列举在片状视网膜系细胞层(片状神经视网膜)的顶端面侧通过粘附因子接合有被分散的视网膜色素上皮细胞的复合体(复合片)。

[0384] 本说明书的复合体中,神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞片各自的切线方向大致平行。“切线方向大致平行”是指神经视网膜与视网膜色素上皮细胞片的彼此相对的面切线方向平行。另外,本发明的复合体中,神经视网膜的顶端面与视网膜色素上皮细胞的顶端面彼此相对。即,神经视网膜的顶端面与视网膜色素上皮细胞的顶端面以靠近的状态存在。

[0385] 如后所述,神经视网膜与RPE细胞的复合体(复合片)可以通过在粘附因子存在下使片状视网膜系细胞层(片状神经视网膜)与RPE细胞片或被分散的RPE细胞接合来准备。片状视网膜系细胞层(片状神经视网膜)可以通过上述含有具有上皮结构(或多层结构)的视网膜组织的细胞聚集体的制造方法来制造。RPE细胞片可以通过后述的视网膜色素上皮细胞片的制造方法来制造。

[0386] (视网膜色素上皮细胞片的制造方法)

[0387] 视网膜色素上皮(RPE)细胞来自多能干细胞,具体而言可以提供对多能干细胞进行分化诱导来得到。制造视网膜色素上皮细胞的方法可列举W02005/070011、W02006/080952、W02011/063005、W02012/173207号、W02015/053375号、W02015/053376号、W02015/068505号、W02017/043605、Stem Cell Reports,2(2),205-218(2014)和Cell Stem Cell,10(6),771-785(2012)中公开的方法,但是没有特别限定。另外,通过对上述W02016/063985中记载的方法进行改良,也可以制备视网膜色素上皮(RPE)细胞片。视网膜色素上皮细胞可以以细胞片或球状细胞聚集体形式来制造。以球状细胞聚集体形式制造时,例如可以通过用镊子、刀子、剪子等切开细胞聚集体来制备RPE细胞片。

[0388] 作为W02016/063985中记载的方法的改良方法,在上述方法中,对于多能干细胞,在不存在饲养细胞的条件下,1)在分化诱导前一天用TGF $\beta$ 家族信号转导途径抑制物质和音猬因子信号转导途径作用物质进行处理,2)在分化诱导开始时,在未经音猬因子信号转导途径作用物质处理的条件下进行培养。之后进行上述步骤(B)和(C)。进而优选提前上述步骤(D)的开始时期。具体而言,在步骤(B)的悬浮培养开始起9天左右(例如7天、8天、9天、10天、11天后)开始步骤(D)。之后实施上述步骤(E)即可。通过本方法,可得到球状的RPE细胞的细胞聚集体。可以使该细胞聚集体分散而制成细胞悬浮液,也可以用镊子、刀子、剪子等切开细胞聚集体而制备RPE细胞片。也可以通过粘附培养来培养被分散的细胞悬浮液而制备RPE细胞片。另外,通过对RPE细胞片或RPE细胞的聚集体进行分散,也可以得到被分散的

RPE细胞。

[0389] 视网膜色素上皮细胞片在与神经视网膜的细胞聚集体接触之前,可以进一步培养至具有多边形或铺路石状的细胞形态。此时的培养基没有特别限定,可以交换为视网膜色素上皮细胞的维持培养基(以下有时也记作RPE维持培养基)并进一步进行培养。由此,可以更清晰地观察黑色素沉积细胞群、粘附于基底膜的具有多角扁平状形态的细胞群。利用RPE维持培养基的培养只要可形成在维持视网膜色素上皮细胞性质的状态下增殖的集落则没有限定,例如可以在以3天1次以上的频率进行全部培养基交换的同时培养5天以上(例如5~20天左右)。本领域技术人员可以一边确认其形态一边容易地设定培养时间。视网膜色素上皮细胞的维持培养基例如可以使用IOVS, March 2004, Vol. 45, No. 3, Masatoshi Haruta等, IOVS, November 2011, Vol. 52, No. 12, Okamoto等, Cell Science 122 (17), Fumitaka Osakadar等, ebruary 2008, Vol. 49, No. 2, Gamm等中记载的培养基。

[0390] 视网膜色素上皮细胞片的长径可以与片状视网膜组织(神经视网膜片)的长径相同。一个方式中,视网膜色素上皮细胞片的长径可以为例如3mm~50mm、5mm~30mm、10mm~20mm等范围。

[0391] 视网膜色素上皮细胞片的短径可以与片状视网膜组织(神经视网膜片)的短径相同。一个方式中,视网膜色素上皮细胞片的短径可以为例如2mm~40mm、5mm~30mm、10mm~20mm等范围。

[0392] 视网膜色素上皮细胞片的黑色素沉积程度没有特别限定。视网膜色素上皮细胞片中含有的视网膜色素上皮细胞中的黑色素沉积程度优选在细胞间为同等程度。作为一个方式,视网膜色素上皮细胞片的平均黑素含量可以为小于20pg/细胞、小于15pg/细胞、小于10pg/细胞、小于8pg/细胞、小于7pg/细胞、小于6pg/细胞、小于5pg/细胞、小于4pg/细胞、小于3pg/细胞、小于2pg/细胞、小于1pg/细胞。另外,视网膜色素上皮细胞片的平均黑素含量可以为0.1pg/细胞以上、0.5pg/细胞以上、1pg/细胞以上、2pg/细胞以上、5pg/细胞以上。

[0393] 视网膜色素上皮细胞片中的黑素含量例如可以如下测定:使视网膜色素上皮细胞片分散后,使用利用NaOH等提取而得的细胞提取物,使用分光光度计等进行测定。平均黑素含量可以通过将黑素含量除以视网膜色素上皮细胞片所含有的全部细胞数来求出。

[0394] 上述的复合体可以通过使神经视网膜片与被分散的RPE细胞或RPE细胞片接合来制造。优选为使神经视网膜片与RPE细胞片接合而得的复合片。上述的神经视网膜片和RPE细胞片可以通过使用镊子、刀子、剪子等从培养器材上容易地取出。可以将取出的两种片转移到新的容器(培养器材等),也可以使一种片留在培养器材中且将另一种片转移到该培养器材中。通过用同样大小的培养器材来制造,可以使要接合的片状组织的大小一致。另外,使用在上述制造方法中培养天数不同的神经视网膜片和视网膜色素上皮细胞作为相接触的神经视网膜片和视网膜色素上皮细胞时,可以使开始制造的日期错开。

[0395] 优选使上述的神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞在粘附因子存在下接触。粘附因子是指具有使细胞彼此粘附的作用的物质,没有特别限定,可列举例如上述胞外基质、人工水凝胶等。粘附因子并非必需为经分离的单一物质,也包括例如基质胶、视细胞间基质、血清等来自生物体或细胞的制备物。基质胶为来自Engelbreth Holm Swarn(EHS)小鼠肉瘤的基底膜制备物。基质胶例如可以通过US patent No. 4829000中公开的方法来制备,也可以购买市售品。基质胶的主要成分为层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和巢

蛋白。视细胞间基质为生物体视网膜中的视细胞等视网膜系细胞之间存在的胞外基质的总称,包含例如透明质酸。视细胞间基质可由本领域技术人员通过例如将视网膜置于蒸馏水中使其膨胀并分离的方法从生物体视网膜采集,也可以购买市售品。作为粘附因子,优选为胞外基质或水凝胶。进而,作为胞外基质,优选为选自自由透明质酸、纤维蛋白、层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、巢蛋白组成的组中的1种或两种以上胞外基质。作为水凝胶,优选为选自自由明胶、纤维蛋白、胶原蛋白、果胶、透明质酸、海藻酸组成的组中的1种或两种以上水凝胶。也存在既被分类为胞外基质又被分类为水凝胶的物质,本说明书中,作为凝胶状的粘附因子使用时作为水凝胶来处理。作为市售的胞外基质,可列举Corning(注册商标)基质胶基底膜基质、iMatrix511等。作为粘附因子,可以为选自明胶、纤维蛋白、纤连蛋白、透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和巢蛋白中的1种以上物质,特别优选为明胶或纤维蛋白。

[0396] 纤维蛋白凝胶是指通过使纤维蛋白原溶液与凝血酶溶液反应而得到的凝胶状纤维蛋白。也可以使用市售的BOLHEAL(注册商标)组织粘附用。可以通过使纤维蛋白原溶液与凝血酶溶液接触或混合而使两者反应。

[0397] “明胶”是指对不溶于水的胶原蛋白用例如酸或碱进行前处理、热水解等而使其可溶化的物质。也可以获得市售的明胶,可列举例如明胶LS-H(新田明胶公司、猪皮碱处理明胶、非加热处理明胶、高冻胶强度)、明胶LS-W(新田明胶公司、猪皮碱处理明胶、加热处理明胶、低冻胶强度)。优选碱处理(石灰处理)明胶(B型明胶),优选加热处理明胶。

[0398] 对于水凝胶而言,通过加热或冷却,溶液由凝胶相变为溶胶、由溶胶相变为凝胶。水凝胶可通过冷却、丧失流动性而凝胶(冻胶)化,通过加热、获得流动性而溶胶(水溶液)化。在此,“熔点”是指在一定压力下发生溶胶化的温度,“凝固点”是指在一定压力下发生凝胶化的温度。水凝胶优选生物体中可降解的水凝胶。作为一个方式,优选熔点为体温附近的温度(25℃~40℃)的水凝胶(例如明胶)。本说明书中的水凝胶的熔点可以为20℃~40℃(例如20℃~35℃、25℃~35℃、30℃~40℃、35℃~40℃)。通常,凝胶的熔点为网络强度的尺度,随着水凝胶的浓度和分子量的上升,水凝胶(例如明胶)的熔点也上升。另外,例如具有通过糖类来增加固体成分时熔点和凝固点上升的倾向。由此可以在一定范围内改变熔点和凝固点。水凝胶的熔点的测定方法没有特别限定,例如可以通过JIS K6503中规定的方法来测定。

[0399] 水凝胶的强度只要为用于移植的操作中水凝胶不崩解的程度即可。作为水凝胶的强度的指标,有“冻胶强度”。水凝胶的“冻胶强度”是指形成凝胶的物体的机械强度。通常以使一定形状的凝胶变形所需要的力或使凝胶断裂所需要的力(单元:g·达因(s)/cm<sup>2</sup>或g/cm<sup>2</sup>)来表示,主要为凝胶硬度的尺度。需要说明的是,1达因(达因(s))定义为作用于质量1克(g)的物体时沿着其方向提供1厘米每秒每秒(cm/s<sup>2</sup>)的加速度的力。例如,明胶的冻胶强度可以通过JIS K6503中规定的方法来测定。本说明书中,例如水凝胶(例如明胶)凝胶的冻胶强度可以为50g以上、100g以上、200g以上、500g以上、1000g以上、1200g以上、1300g以上、1400g以上或1500g以上。另外,水凝胶(明胶)的冻胶强度可以为3000g以下、2500g以下或2000g以下。

[0400] 粘附因子(胞外基质)的浓度根据神经视网膜片或视网膜色素上皮细胞片的大小、视网膜色素上皮细胞的细胞数而不同,本领域技术人员可以通过确认RPE细胞的粘附状态

来容易地设定。例如在基质胶的情况下,优选以将现有制品(Corning公司)稀释200~10000倍的浓度来添加,在iMatrix511的情况下,优选以0.1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度来添加。

[0401] 作为使用胞外基质制造上述复合体的方法的一个方式,可以在含有粘附因子(胞外基质)的介质中进行用于使神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞片粘附的培养。作为使用的介质,没有特别限定,可列举例如培养视网膜色素上皮细胞或神经视网膜时使用的培养基(例如DMEM/F12培养基、Neurobasal培养基、这些的混合培养基、RPE维持培养基等)。另外,可以在与胞外基质一起还存在EGF等生长因子等其它成分的条件下进行用于粘附的培养。在用于使上述神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞片粘附的培养时间内,可以持续地在含有粘附因子的上述介质中进行培养,也可以在含有粘附因子的上述介质中培养一定时间(例如1天~10天)后交换为不含粘附因子的介质并持续进行培养。

[0402] 在进行用于使神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞片粘附的培养之前,可以用粘附因子包被神经视网膜片或视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞片。具体而言,可以在含有粘附因子的上述介质中培养神经视网膜片或视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞片。本领域技术人员可适当设定培养时间,可以培养10分钟~5小时(例如10分钟~60分钟)左右。培养后,可以用PBS等介质进行清洗。

[0403] 粘附因子、水凝胶或基质胶优选为纤维蛋白凝胶。纤维蛋白凝胶为通过使纤维蛋白原溶液与凝血酶溶液反应而得到的凝胶状纤维蛋白。本说明书中,将具有通过反应而形成凝胶的性质的物质称为基质前体,例如通过反应而形成纤维蛋白凝胶的凝血酶和纤维蛋白原为基质前体的一例。纤维蛋白原溶液可以通过将纤维蛋白原粉末等溶解于含有抑蛋白酶多肽的能够溶解纤维蛋白原的溶解液中而制作,其浓度没有特别限定,例如为40~480 $\text{mg}/\text{mL}$ 、优选为80 $\text{mg}/\text{mL}$ ~320 $\text{mg}/\text{mL}$ (例如160 $\text{mg}/\text{mL}$ )。另外,将正常人血浆1 $\text{mL}$ 中含有的凝血因子VIII活性设为1单位时,可以为37.5单位/ $\text{mL}$ ~225单位/ $\text{mL}$ (例如75单位/ $\text{mL}$ )。凝血酶溶液可以通过将凝血酶粉末等溶解于含有氯化钙水合物的凝血酶溶解液来制作,其浓度没有特别限定,例如为125单位/ $\text{mL}$ ~750单位/ $\text{mL}$ (例如75单位/ $\text{mL}$ )。通过使纤维蛋白原溶液与凝血酶溶液接触或混合,可以使两者反应,此时优选按照以活性比计为1:1~1:9、优选1:3~1:4的范围来使用纤维蛋白原溶液和凝血酶溶液。

[0404] 作为使用水凝胶制造上述复合体的方法的一个方式,以下示出使用纤维蛋白凝胶制造复合体的方法。具体而言,通过使纤维蛋白原与凝血酶反应而生成的纤维蛋白凝胶来粘附神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞片。

[0405] 一个方式中,可以通过使上述2个组织中与纤维蛋白原溶液接触后的1个组织(神经视网膜或视网膜色素上皮细胞)和与凝血酶溶液接触后的另1个组织(视网膜色素上皮细胞或神经视网膜)相互接触,从而使纤维蛋白原和凝血酶反应而发生凝胶化。在此,与溶液的接触是指:使至少组织的粘附面(利用纤维蛋白凝胶与其它组织粘附时,朝向其它组织的面)与纤维蛋白原溶液或凝血酶溶液以溶液附着于组织的粘附面的程度进行接触。

[0406] 更具体而言,例如使神经视网膜片与视网膜色素上皮细胞片粘附时,可以将神经视网膜片浸渍于纤维蛋白原溶液、将视网膜色素上皮细胞片浸渍于凝血酶溶液(溶液可以反过来)。优选按照以体积比计为3:1~1:3的范围来使用纤维蛋白原溶液和凝血酶溶液。在粘附之前,可以将组织上附着的多余的纤维蛋白原或凝血酶去除。通过该操作,可以调整纤

维蛋白凝胶的厚度。

[0407] 为了使接触纤维蛋白原溶液后的神经视网膜片和与凝血酶溶液接触后的视网膜色素上皮细胞片粘附,可以使两者接触。在此,使组织接触是指使附着有纤维蛋白原溶液的面与附着有凝血酶溶液的面进行接触、即重叠。另外,优选以视网膜色素上皮细胞片和神经视网膜各自的表面的切线方向大致平行、并且神经视网膜的顶端面与视网膜色素上皮细胞片的顶端面彼此相对的方式使两者粘附。

[0408] 一个方式中,可以使上述组织与纤维蛋白原溶液接触、接着向纤维蛋白原溶液中添加凝血酶溶液而使纤维蛋白原与凝血酶反应。这种情况下,上述组织被包埋于纤维蛋白凝胶。

[0409] 一个方式中,本发明的制造方法可以还包括从复合体中切出移植所需的大小的复合体的步骤。由于2个以上组织通过纤维蛋白凝胶牢固地粘附,因此从复合体中切出移植片时可以在组织不从复合体剥离的情况下容易地切成期望尺寸。切出时可以使用镊子、刀子、剪子等。

[0410] [药物组合物、治疗方法、治疗药和应用]

[0411] 作为本发明的一个方式,可列举含有片状视网膜组织的药物组合物。药物组合物优选除了含有本发明的片状视网膜组织以外还含有作为药物可允许的载体。药物组合物可用于治疗基于神经视网膜系细胞或神经视网膜的障碍或神经视网膜的损伤的疾病。作为基于神经视网膜系细胞或神经视网膜的障碍的疾病,可列举例如视网膜变性疾病、黄斑变性、老年黄斑变性、视网膜色素变性、青光眼、角膜疾病、视网膜剥离、中心性浆液性视网膜脉络膜病变、视锥营养不良、视锥视杆营养不良等眼科疾病。作为神经视网膜的损伤状态,可列举例如视细胞变性死亡的状态等。

[0412] 关于作为药物可允许的载体,可以使用生理性水性溶剂(生理盐水、缓冲液、无血清培养基等)。根据需要,药物组合物中可以配合移植医疗中通常用于含有所移植的组织或细胞的药物的保存剂、稳定剂、还原剂、等渗化剂等。

[0413] 作为本发明的一个方式,提供含有本发明中得到的片状视网膜组织的基于神经视网膜的障碍的疾病的的治疗药。另外,作为本发明的一个方式,可列举包括将本发明中得到的片状视网膜组织移植于需要移植的对象(例如发生了眼科疾病的眼的视网膜下)的步骤的、治疗基于神经视网膜系细胞或神经视网膜的障碍或神经视网膜的损伤的疾病的方法。作为基于神经视网膜的障碍的疾病的的治疗药、或者为了在该神经视网膜损伤状态下补充该损伤部位,可以使用本发明的片状视网膜组织。通过对于需要移植的、具有基于神经视网膜系细胞或神经视网膜的障碍的疾病的患者或神经视网膜的损伤状态的患者移植本发明的片状视网膜组织来补充该神经视网膜系细胞或发生了障碍的神经视网膜,可以治疗基于神经视网膜系细胞或神经视网膜的障碍的疾病或神经视网膜的损伤状态。作为移植方法,可列举例如通过切开眼球等向损伤部位的视网膜下移植片状视网膜组织的方法。作为移植方法,可列举例如使用细管进行注入的方法、用镊子夹持并移植的方法,作为细管,可列举注射针等。

[0414] 作为本发明的一个方式,提供用于治疗基于视网膜系细胞或视网膜组织的障碍或者视网膜组织的损伤的疾病的、本发明中得到的片状视网膜组织。另外,作为本发明的一个方式,提供本发明中得到的片状视网膜组织在制造基于视网膜系细胞或视网膜组织的障碍

或者视网膜组织的损伤的疾病的的治疗药中的应用。

[0415] 实施例

[0416] 以下列举实施例详细地说明本发明,但是本发明不受这些例子的任何限定。

[0417] <实施例1聚集体重新形成因子的探索>

[0418] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株(非专利文献3))和人iPS细胞(1231A3株、由京都大学获得),按照“Scientific Reports,4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制)、作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0419] 具体的人ES和人iPS细胞(人ES/iPS细胞)的维持培养操作如下进行。首先,将达到亚汇合(培养面积的6成被细胞覆盖的程度)的人ES/iPS细胞用PBS清洗后,用TrypLE Select(商品名、Life Technologies公司制)分散成单细胞。需要说明的是,在此,分散成单细胞是指以成为单细胞的方式进行分散,分散成单细胞的细胞群中除了含有单细胞以外还可含有2~50个细胞的块。之后,将分散成单细胞的人ES细胞接种于用层粘连蛋白511-E8进行了包被的塑料培养皿,在Y-27632(ROCK抑制剂、10 $\mu$ M)存在下在StemFit培养基中在无饲养细胞条件下进行培养。作为上述塑料培养皿,使用6孔板(イワキ公司制、细胞培养用、培养面积9.4cm<sup>2</sup>)的情况下,上述分散成单细胞的人ES/iPS细胞的接种细胞数为每1孔0.4~1.2 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞。接种1天后,交换为不含Y-27632的StemFit培养基。此后1~2天1次地用不含Y-27632的StemFit培养基进行培养基交换。之后,在无饲养细胞条件下培养至达到亚汇合的前一天。将该亚汇合的前一天的人ES细胞在存在SB431542(TGF $\beta$ 信号转导途径抑制物质、5 $\mu$ M)和SAG(Shh信号转导途径作用物质、300nM)的条件下(Precondition处理)在无饲养细胞条件下培养1天。

[0420] 将人ES/iPS细胞用PBS清洗后,用TrypLE Select进行细胞分散液处理,再通过吹打操作分散成单细胞,然后将分散成单细胞的人ES细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中以每1孔1.2 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞的方式悬浮于100 $\mu$ L的无血清培养基,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。此时的无血清培养基(gfCDM+KSR)使用向F-12培养基与IMDM培养基的1:1混合液中添加10%KSR、450 $\mu$ M 1-硫代甘油、1 $\times$ 化学成分明确的脂质浓缩液而成的无血清培养基。

[0421] 在悬浮培养开始时(分化诱导开始时、第0天),向上述无血清培养基中添加Y-27632(ROCK抑制剂、终浓度10 $\mu$ M或20 $\mu$ M)和SAG(Shh信号转导途径作用物质、300nM或30nM或0nM)。在悬浮培养开始后第3天,使用50 $\mu$ L不含Y-27632和SAG且以终浓度1.5nM含有外源性人重组BMP4(商品名:Recombinant Human BMP-4、R&D Systems公司制)的培养基。从悬浮培养开始后第6天以后,3天1次地用不含Y-27632和SAG和人重组BMP4的培养基进行半量交换。

[0422] 对于来自KhES-1的细胞聚集体,进一步将该悬浮培养开始后第14天至第18天的聚集体转移到90mm的低粘附培养皿(悬浮培养用皿90 $\Phi$ (深型)、住友电木公司制)中,用含有Wnt信号转导途径作用物质(CHIR99021、3 $\mu$ M)和FGF信号转导途径抑制物质(SU5402、5 $\mu$ M)的无血清培养基(向DMEM/F12培养基中添加1%N2补充剂而成的培养基)在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养3~4天。之后,在90mm的低粘附培养皿(悬浮培养用皿90 $\Phi$ (深型)、住友电木公司制)中用不含Wnt信号转导途径作用物质和FGF信号转导途径抑制物质的血清培养基(NucT0

培养基)长期培养。

[0423] 将悬浮培养开始后第16天(来自1231A3)或第27天(来自KhES-1)的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育20~30分钟后,通过吹打分散成单细胞。将这些细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中以每1孔 $2 \times 10^5$ 个细胞(来自KhES-1)或 $5 \times 10^5$ 个细胞(来自1231A3)的方式悬浮于100 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。在添加细胞的同时,(1)无添加(对照)、(2)添加10 $\mu$ M或20 $\mu$ M(来自1231A3)Y-27632(Wako公司)、(3)添加300nM SAG(Enzo公司)、(4)添加10 $\mu$ g/mL bFGF(Wako公司)、(5)添加1 $\mu$ M LDN193189(Stemgent公司)、(6)添加3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)、(7)添加10 $\mu$ M SB431542(Wako公司)、(8)添加3 $\mu$ M IWR-1(Wako公司)。

[0424] 在(1)~(8)中任一条件下培养2周左右时,均确认到重新形成聚集体(参照实施例3的结果),在添加Y-27632的情况下,确认从用于重新形成聚集体的悬浮培养后第1~2天(第1天~第2天)起重新形成了聚集体(图1:KhES-1、图2:1231A3)。另一方面,在Y-27632以外的化合物的情况下,未见早期的聚集体的重新形成促进效果(图1和图2)。因此,可知通过向分散成单细胞的视网膜前体细胞中添加Y-27632,可从早期起促进聚集体的重新形成。

[0425] <实施例2层结构形成促进因子和聚集体增殖促进因子的探索>

[0426] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports,4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0427] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第20天(1231A3)和第27天(KhES-1)的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。将这些细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中,以每1孔 $2 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)的100 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。在添加细胞的同时,(1)无添加(仅10 $\mu$ M Y-27632)、(2)添加30nM SAG(Enzo公司)、(3)添加300nM SAG(Enzo公司)、(4)添加10ng/mL bFGF(Wako公司)、(5)添加1 $\mu$ M LDN193189(Stemgent公司)、(6)添加3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)、(7)添加10 $\mu$ M SB431542(Wako公司)、(8)添加3 $\mu$ M IWR-1(来自KhES-1)或10ng/mL EGF(来自1231A3)。

[0428] 在用于重新形成聚集体的悬浮培养后第1天、第7天和第14天,利用明视场显微镜和荧光显微镜(Keyence公司制BZ-X810)观察聚集体的重新形成状态。将来自KhES-1的细胞的结果示于图3~5。另外,利用Image J测定聚集体的面积。将来自KhES-1的细胞的结果示于图6(测定12个而得到的平均值)。另外,将观察悬浮培养后第1天的聚集体的重新形成状态的、来自1231A3的细胞的结果示于图7。根据图3~7,确认在Y-27632的基础上添加SAG(300nM)或CHIR99021(3 $\mu$ M)的组与仅添加Y-27632的组相比,重新形成了更大的聚集体。由此确认了SAG和CHIR99021的促进聚集体的增殖、重新形成的效果。

[0429] <实施例3层结构形成促进因子和聚集体增殖促进因子的探索>

[0430] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports,4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞

条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0431] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第26天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。将这些细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中,以每1孔 $3.0 \times 10^4$ 个细胞的方式悬浮于100 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。在添加细胞的同时,(1)无添加(对照)、(2)添加10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)、(3)添加300nM SAG(Enzo公司)、(4)添加10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)和300nM SAG(Enzo公司)、(5)添加3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)、(6)添加10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)、(7)添加300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)、(8)添加10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)、300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)。

[0432] 在用于重新形成聚集体的悬浮培养后第1天、第14天和第28天(第1天、第14天、第28天)、即用于分化诱导的悬浮培养开始后第27天、第40天和第54天(dd27、dd40、dd54)观察聚集体的重新形成状态,将所得结果示于图8、图9、图10。根据图8、图9、图10,确认添加CHIR99021时重新形成了聚集体。另外,确认在CHIR99021的基础上添加SAG时聚集体更大。

[0433] 将用于重新形成聚集体的悬浮培养后第15天(相当于分化第41天)和第28天(相当于分化第54天)的聚集体用4%PFA固定,制作冷冻切片。对于这些冷冻切片,用DAPI和抗Chx10抗体(商品名:Anti CHX10Antibody、EX alpha公司)、抗 $\beta$ -连环蛋白抗体(R&D Systems公司)、抗IV型胶原蛋白抗体(Abcam公司)、抗Zo-1抗体(Invitrogen公司)、抗Ki67抗体(BD公司)、抗Pax6抗体(BioLegend公司)、抗RxR- $\gamma$ (RxRg)抗体(Spring Bioscience公司)、抗CRX抗体(Abnova公司)、抗NRL抗体(R&D Systems公司)、抗恢复蛋白抗体(Proteintech公司制)、抗Islet-1抗体(DSHB公司)、抗GS抗体(Sigma公司)、抗Brn3抗体(Santa Cruz公司)、抗钙网膜蛋白抗体(R&D Systems公司)进行免疫染色。

[0434] 用明视场显微镜和荧光显微镜观察(Keyence公司制BZ-X810)、共聚焦激光扫描荧光显微镜(Leica公司制SP-8)观察这些经免疫染色的切片,将其结果示于图11~20。根据图11、图14、图15、图18,确认添加CHIR99021的情况下在聚集体的最外侧形成了含有Rx::Venus阳性、Chx10阳性的神经视网膜前体细胞的层结构。另外,根据图12、图16、图17,添加CHIR99021的情况下,在聚集体的最外侧形成了Zo-1阳性的顶端面且在内部形成了胶原蛋白阳性的基底面,确认形成了具有顶端和基底的极性的上皮组织。另一方面,特别是如图17所示,未添加CHIR99021的组中,观察到无细胞的极性或显示玫瑰花样结构。进而,根据图19、图20,确认分化出RxR- $\gamma$ (RxRg)阳性和CRX阳性的视锥前体细胞、恢复蛋白阳性和CRX阳性的视细胞前体细胞,还确认分化出Islet-1阳性和Brn3阳性的视网膜神经节细胞、钙网膜蛋白阳性无长突细胞。

[0435] 由这些结果可知,通过向暂时分散的视网膜系细胞的单细胞悬浮液中添加CHIR99021,可以进行重新组织化·视网膜分化而形成作为具有顶端基底的极性的上皮组织的视网膜组织。

[0436] <实施例4关于聚集体重新形成的分化时期>

[0437] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports,4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞

条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0438] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第18天、第25天、第40天、第61天和第75天(dd18、dd25、dd40、dd61、dd75)的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(WAKO公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。将这些细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中,以每1孔 $2 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)、300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)的100 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。

[0439] 在用于重新形成聚集体的培养的第3天、第15天、第21天(第3天、第15天、第21天),用明视场显微镜和荧光显微镜观察聚集体的重新形成状态,将所得结果示于图21。根据图21,确认在dd18、dd25、dd40、dd61、dd75中的任一分化天数的细胞聚集体中均重新形成了聚集体、形成了层结构。另外,观察到Rx::Venus阳性的视网膜组织的特性得到维持(图21)。

[0440] 由这些结果可知,通过向任一分化阶段的视网膜组织中添加Y-27632以及SAG和CHIR99021,均能够重新形成聚集体。

[0441] <实施例5关于脑类器官的聚集体重新形成>

[0442] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports,4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0443] 在悬浮培养开始后第3天,使用50 $\mu$ L不含Y-27632和SAG、以终浓度1.5nM含有外源性人重组BMP4(商品名:Recombinant Human BMP-4、R&D Systems公司制)的培养基。另外,为了制作脑类器官,设置不添加BMP4的组。从悬浮培养开始后第6天以后,3天1次地用不含Y-27632和SAG和人重组BMP4的培养基进行半量交换。

[0444] 将如此制作的悬浮培养开始后第40天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(WAKO公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。将被分散的细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中,以每1孔 $5 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有10mM Y-27632(Wako公司)、300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)的100 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。

[0445] 在用于重新形成聚集体的培养的第3天、第15天、第21天,用明视场显微镜和荧光显微镜观察聚集体的重新形成状态,将所得结果示于图22。根据图22,确认在Rx::Venus阴性的端脑类器官中也与视网膜类器官同样地重新形成了聚集体、形成了层结构。

[0446] 由这些结果可知,不仅在视网膜类器官中,在端脑类器官等的神经上皮组织中也能够重新形成聚集体。

[0447] <实施例6冷冻保存研究>

[0448] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0449] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第31天的聚集体用PBS清洗,添加神经细

胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。

[0450] 分散后,对于非冷冻组,在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中,以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)、300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)的100 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。

[0451] 分散后,对于冷冻组,对于阴性对照的PBS(Gibco公司)和用以下冻存液、Cell Banker 1(TaKaRa公司)、Stem Cell Banker(TaKaRa公司)、CultureSure(注册商标)冻存溶液(CultureSure(注册商标)冻存液;富士胶片和光纯药株式会社)、STEMdiff(商标)Neural Progenitor冻存液(Stemcell公司)、StemSure(注册商标)冻存溶液(富士胶片和光纯药株式会社)、Bambanker(日本Genetics株式会社)以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL的方式悬浮上述单细胞,使用バイセル在-80℃下冷冻保存。

[0452] 在冷冻保存1天后复苏,确认活细胞率。关于刚复苏后的活细胞率,PBS组急剧下降,但任一冻存液中活细胞率均高,STEMdiff以外的冻存液(Cell Banker 1、Stem Cell Banker、CultureSure、StemSure、Bambanker)中显示出逊色于非冷冻的90%以上(图24(A))。

[0453] 将这些细胞在非细胞粘附性的96孔培养平板(商品名:PrimeSurface 96孔V底板、住友电木公司制)中,以每1孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)、300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)的100 $\mu$ L的NucT0培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下悬浮培养。

[0454] 接种1天后,确认任一冻存液(Cell Banker 1、Stem Cell Banker、CultureSure、STEMdiff、StemSure、Bambanker)的情况下均不逊色于非冷冻地重新形成了聚集体(图23、图24(B))。特别是Cell Banker 1,未确认到其它冻存液中观察到的存在于聚集体周边部的小的Rx::Venus阳性的细胞聚集体,得到接近于非冷冻的观察图像(图23)。

[0455] 可知用于重新形成聚集体的培养7天后任一冻存液的情况下均不逊色于非冷冻地重新形成了聚集体。

[0456] 由这些结果可知,即使将暂时分散而得到的视网膜系细胞的单细胞悬浮液冷冻保存,复苏后通过添加Y-27632、SAG和CHIR99021并培养也能够重新形成聚集体。

[0457] <实施例7关于视网膜聚集体的表达的支架蛋白>

[0458] 通过实施例1~6的研究可知,将视网膜系细胞分散、使多能干细胞进行视网膜分化而得到含有视网膜系细胞的细胞聚集体,将细胞聚集体分散而得到单细胞悬浮液,接种该单细胞悬浮液时添加Y-27632(Wako公司)、SAG(Enzo公司)和CHIR99021(Wako公司)并进行悬浮培养,能够进行具有层结构、具有极性的视网膜组织的重新组织化。然后,作为用于制作宽大的片状视网膜组织的研究,想到了进行粘附培养。并且研究了用于进行粘附培养的胞外基质。

[0459] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports,4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0460] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始起25~35天后的聚集体用4%PFA固定,制

作冷冻切片。对于这些冷冻切片,用DAPI和抗层粘连蛋白抗体(商品名:抗层粘连蛋白抗体、Abcam公司)、抗纤连蛋白抗体(R&D systems公司)、抗IV型胶原蛋白抗体(Abcam公司)进行免疫染色。用共聚焦激光显微镜观察这些经免疫染色的切片。其结果是,确认聚集体至少表达作为基底膜构成成分的层粘连蛋白、纤连蛋白、IV型胶原蛋白(图25)。即,可知该自组织化培养体系中,人视网膜组织自动形成基底膜并表达层粘连蛋白、纤连蛋白、IV型胶原蛋白。

[0461] 由公知的关于特化为基底膜的小鼠胚胎组织染色的数据库(MOUSE BASEMENT MEMBRANE BODYMAP;<http://dbarchive.biosciencedbc.jp/archive/matrixome/bm/home.html>)的信息,调查胎鼠神经视网膜组织中表达的层粘连蛋白的同源异构体。其结果是,作为层粘连蛋白的同源异构体,获知层粘连蛋白 $\alpha$ 有1、4、5,层粘连蛋白 $\beta$ 有1、2,层粘连蛋白 $\gamma$ 有1(图26)。

[0462] 该结果暗示了,作为适合于神经视网膜组织的胞外基质,层粘连蛋白 $\alpha$ 、层粘连蛋白 $\beta$ 、层粘连蛋白 $\gamma$ 的组合中,层粘连蛋白的511、521、411、421、111、121(特别是511、521、411)可能有用。

[0463] 即暗示了,作为用于通过粘附培养重新形成片状视网膜片的胞外基质,层粘连蛋白511、层粘连蛋白521、层粘连蛋白411、纤连蛋白、IV型胶原蛋白等可能有用。

[0464] <实施例8在Transwell上的接种胞外基质研究>

[0465] 在实施例1~6的研究中,研究了由视网膜系细胞的单细胞悬浮液通过悬浮培养重新形成含有具有层结构的视网膜组织的聚集体的方法。实施例7中研究了粘附培养中使用的胞外基质的候补。将这些组合,研究由视网膜系细胞的单细胞悬浮液通过粘附培养重新形成片状视网膜组织的方法(重新片状化)。

[0466] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0467] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第16天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。

[0468] 作为促进重新片状化的胞外基质,使用基质胶(Corning公司)和层粘连蛋白511-E8(商品名iMatrix511、ニッピ公司制)。将上述被分散的视网膜系细胞的单细胞按照以下3种条件以每1孔 $0.5 \sim 4 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有 $10 \mu\text{M}$  Y-27632(Wako公司)、 $300 \text{ nM}$  SAG(Enzo公司)和 $3 \mu\text{M}$  CHIR99021(Wako公司)的 $300 \mu\text{L}$ 的无血清培养基中并接种于24孔Transwell(Corning公司)。在接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(gfCDM)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0469] 条件1:接种于用基质胶预先包被的24孔Transwell(基质胶(预涂))

[0470] 条件2:接种于用层粘连蛋白511-E8预先包被的24孔Transwell(iMatrix511(预涂))

[0471] 条件3:在未预先包被的24孔Transwell中,使用添加有层粘连蛋白511-E8的培养液接种细胞(Mix法)。

[0472] 在用于重新形成聚集体的培养14天以后,任一条件下均形成了片状的细胞聚集体

(细胞片)。将片状的细胞聚集体用4%PFA固定,制作冷冻切片。对于这些冷冻切片,用DAPI和抗Chx10抗体(ExAlpha公司)、抗Zo-1抗体(商品名:Anti Zo-1 Antibody、Invitrogen公司)、抗IV型胶原蛋白抗体(Abcam公司)进行免疫染色。使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察这些经免疫染色的切片。其结果是,在基质胶(预涂)、iMatrix511(预涂)、Mix法情况下均确认到Chx10阳性的神经视网膜前体细胞的存在(图27)。进而,在基质胶(预涂)和iMatrix511(预涂)的条件下,在片状的细胞聚集体的上侧(不与孔接触的一侧)确认到作为顶端面(上皮组织的紧密连接形成于顶端面)标志物的Zo-1、在片状的细胞聚集体的下侧(与孔接触的一侧)确认到作为基底面标志物的IV型胶原蛋白(图28)。确认到重新形成了具有顶端和基底的极性的Rx::Venus阳性的视网膜前体细胞的片。另一方面,确认在同时给予胞外基质的Mix法的情况下未形成极性。

[0473] 由这些结果可知,对于分散成单细胞的视网膜系细胞(NR)而言,通过事先包被层粘连蛋白511-E8或基质胶来作为支架,可以再次制作具有顶端-基底的极性的片状视网膜组织(重新片状化)。

[0474] <实施例9在Transwell上的接种·重新片状化CHIR99021的效果确认>

[0475] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0476] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第15~30天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在用层粘连蛋白511-E8包被的12孔Transwell中,以每1孔 $8 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于(1)含有10 $\mu$ M MY-27632(Wako公司)的300 $\mu$ L的无血清培养基、(2)含有10 $\mu$ M MY-27632(Wako公司)和300nM SAG(Enzo公司)的300 $\mu$ L的无血清培养基、(3)含有10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)和5 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)的300 $\mu$ L的无血清培养基、(4)含有10 $\mu$ M Y-27632(Wako公司)、300nM SAG(Enzo公司)和3 $\mu$ M CHIR99021(Wako公司)的300 $\mu$ L的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下进行粘附培养。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(NucT0)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0477] 对用于重新形成聚集体的培养14天得到的细胞片进行观察,结果,在全部条件下均观察到细胞成活(图29)。因此,将这些细胞片用4%PFA固定,制作冷冻切片。对于这些冷冻切片,用DAPI和抗Zo-1抗体(商品名:Anti Zo-1 Antibody、Invitrogen公司制)、抗IV型胶原蛋白抗体(Abcam公司)进行免疫染色。使用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察这些经免疫染色的切片。其结果是,确认在添加CHIR99021的情况下再次形成了具有顶端和基底的极性的Rx::Venus阳性的视网膜前体细胞的片。另一方面,确认未添加CHIR99021的情况下未构成顶端面、未形成极性(图30)。

[0478] 由这些结果可知,对于分散成单细胞的视网膜系细胞(NR)而言,通过添加CHIR99021,能够再次制作具有顶端-基底的极性的视网膜片。

[0479] <实施例10在Transwell上的接种·重新片状化CHIR99021的浓度·添加时期的研究>

[0480] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、

(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0481] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后33天(dd33)的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在用层粘连蛋白511-E8包被的24孔Transwell中以每1孔 $2 \sim 4 \times 10^5$ 个细胞的方式接种,添加除含有10μM Y-27632(Wako公司)和300nM SAG(Enzo公司)以外还含有1μM、3μM或9μM CHIR99021(Wako公司)的300μL的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下粘附培养3天(第0~3天)或6天(第0~6天)或9天(第0~9天)。接种3天以后,3~4天1次地进行培养基交换。

[0482] 在用于重新形成聚集体的培养14天后(第14天、dd47),观察所得到的细胞片,结果观察到除了以9μM添加6天、9天CHIR99021的组以外均成活(图31)。因此,将这些细胞片用4%PFA固定,制作冷冻切片。对于这些冷冻切片,用DAPI进行免疫染色。确认通过以1μM至9μM添加3天至9天CHIR99021,重新形成了较厚的Rx::Venus阳性的视网膜前体细胞的片(图32)。

[0483] 由这些结果可知,对于分散成单细胞的视网膜系细胞(NR)而言,通过至少以1~9μM添加3~9天CHIR99021,能够再次制作视网膜片。

[0484] <实施例11在Transwell上的接种时的支架的研究>

[0485] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0486] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后24天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在(1)无包被(Non Coat)以及(2)用2μL的iMatrix511(商品名、ニッピ公司制)包被、(3)用2μL的iMatrix411(商品名、ニッピ公司制)包被、(4)用2μL的iMatrix211(商品名、ニッピ公司制)包被、(5)用2μL的玻连蛋白(VTN-N)人重组蛋白(Thermo公司)包被、(6)用2μL的Cell Start(Thermo公司)包被、(7)用5μL的层粘连蛋白111、5μL的层粘连蛋白121、5μL的层粘连蛋白211、5μL的层粘连蛋白221、5μL的层粘连蛋白411、5μL的层粘连蛋白421、5μL的层粘连蛋白511、5μL的层粘连蛋白521(BioLamina公司)包被、(8)用5μL的层粘连蛋白332包被、(9)用2μL的基质胶(Corning)包被的24孔Transwell中,以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞的方式接种,添加除含有10μM Y-27632(Wako公司)和300nM SAG(Enzo公司)以外还含有3μM CHIR99021(Wako公司)、100μg/mL FGF8(Wako公司)的200μL的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下粘附培养3天。接种3天以后,3~4天1次地进行培养基交换。

[0487] 接种22天后观察所得到的细胞片,结果除了Cell Start以外的支架的情况下均得到了良好的神经视网膜片(图33)。

[0488] 由这些结果可知,对于分散成单细胞的聚集体(NR)而言,不仅iMatrix511、基质胶,对于各种支架蛋白而言,也能够再次制作视网膜片。

[0489] <实施例12在Transwell上的接种·重新片状化·视网膜分化的确认>

[0490] 对于以具有Crx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、

(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0491] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第15天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在用层粘连蛋白511-E8包被的24孔Transwell中,以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有 $10 \mu\text{M}$  Y-27632、 $300 \text{ nM}$  SAG和 $3 \mu\text{M}$  CHIR99021的 $200 \mu\text{L}$ 的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养3天。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(NucT0)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0492] 接种44天后(第44天、dd59)观察所得到的细胞片,结果观察到分化出Crx::Venus阳性的视细胞(图34)。

[0493] 进而,使用悬浮培养开始后第29天的聚集体,同样地重新片状化。将重新组织化培养第28天(第67天)的细胞片用4%PFA固定,制作冷冻切片。对于这些冷冻切片,用DAPI和抗Ki67抗体(R&D Systems公司)、抗Chx10抗体(商品名:Anti CHX10 Antibody、EX alpha公司)、抗Pax6抗体(BD Pharmingen公司)、抗Brn3抗体(Santa Cruz公司)、抗RxR- $\gamma$ (RxRg)抗体(Spring Bioscience公司)、抗Crx抗体(abnova公司)进行免疫染色。作为对照,对未经平面化(重新片状化)的dd70的3D Retina(细胞聚集体)也进行染色(图35~37)。

[0494] 另外,将第57天的细胞片用4%PFA固定后,不制作切片而是进行整体免疫染色。用DAPI和抗Chx10抗体(商品名:Anti CHX10 Antibody、EX alpha公司)、抗Sox2抗体(BD Pharmingen公司)、抗Ki67抗体(BD公司)、抗Pax6抗体(BioLegend公司)、抗Brn3抗体(Santa Cruz公司)、抗TUJ1抗体(Millipore公司)、抗Islet-1抗体(R&D Systems公司)、抗Crx抗体(abnova公司)、抗恢复蛋白抗体(Proteintech公司)、抗Zo-1抗体(Invitrogen公司)、抗IV型胶原蛋白抗体(Abcam公司)进行免疫染色。

[0495] 其结果是,Chx10阳性、Pax6阳性和Ki67阳性的视网膜前体细胞、Brn3阳性的视网膜神经节细胞、RxRg阳性、Crx::Venus阳性和Crx阳性的视锥细胞前体细胞不逊色于对照的3D Retina地发生了分化。另外,在透射光下观察与Transwell的位置关系,结果确认在Transwell上形成了视网膜片,局部存在于基底侧的Pax6强阳性、Chx10阴性的视网膜神经节细胞局部存在于Transwell侧(图38)。进而,不制作切片而是用共聚焦显微镜观察整体,结果确认具有顶端和基底的极性、根据极性而分化出各种视网膜细胞(图39、图40、图41)。

[0496] 进一步进行长期培养,对于dd112的细胞片,不制作切片而是以片的状态进行免疫染色。用抗Ribeye抗体(CtBP2、BD公司)和抗恢复蛋白抗体(Proteintech公司)、抗Pax6抗体(BioLegend公司)和抗Chx10抗体(商品名:Anti CHX10 Antibody、SantaCruz公司)进行染色,结果在同一细胞中观察到Crx::Venus和恢复蛋白的表达,确认了表达Ribeye(图42)。由此确认,由重新片状化的视网膜分化出的视细胞成熟至表达突触蛋白的程度。另外确认,以Crx::Venus局部存在于顶端侧、Chx10、Pax6局部存在于内侧的状态形成了片(图43)。

[0497] 根据这些结果,在Transwell上重新组织化而成的视网膜片中确认到视网膜细胞的分化,观察到极性得到维持。

[0498] <实施例13用Rx::Venus株进行视网膜系细胞的维持培养>

[0499] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、

(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0500] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第31天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37°C下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在用10 $\mu$ L的层粘连蛋白511-E8包被的12孔Transwell中,以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞的方式,在向含有10 $\mu$ M Y-27632、300nM SAG和3 $\mu$ M CHIR99021的500 $\mu$ L的不含血清的DMEM/F12中添加N2而成的培养基中添加(1)对照、(2)20ng/mL FGF2、(3)20ng/mL EGF、(4)100nM SAG、(5)1单位LIF、(6)10ng/mL IGF-1、(7)100ng/mL PDGF-AA、(8)100ng/mL PDGF-AB、(9)10 $\mu$ g/mL GDNF、(10)20 $\mu$ g/mL BDNF、(11)2 $\mu$ M Pyrintegrin、(12)1 $\mu$ M BMP4,在37°C、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养3天。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(向DMEM/F12中添加N2)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0501] 34天后,将细胞片用4%PFA固定,用DAPI进行核染色。着眼于Rx::Venus阳性细胞的面积而进行观察,研究视网膜系细胞的维持状态。使用荧光显微镜(Keyence公司制BZ-X810)进行观察,结果确认持续添加20ng/mL EGF和FGF2时,Rx::Venus阳性细胞广泛得到维持(图44)。

[0502] 由此可知,如果在视网膜的重新组织化时添加EGF、FGF,则对维持Rx::Venus阳性细胞有效。

[0503] <实施例14平面化培养时的视网膜前体细胞的维持培养>

[0504] 对于以具有Crx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0505] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第27天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37°C下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在用10 $\mu$ L的层粘连蛋白511-E8包被的12孔Transwell中,以 $8.0 \times 10^5$ 个细胞/孔的方式悬浮于含有10 $\mu$ M Y-27632、300nM SAG和3 $\mu$ M CHIR99021的以下的培养基,接种细胞。为了研究维持视网膜前体细胞的培养基,在(1)NeuroCult NS-A(STEMCELL Technologies公司)、(2)STEMdiff Neural Progenitor(STEMCELL Technologies公司)、(3)StemPro NSC SFM(Thermo Fisher公司)、(4)RHB-A(TaKaRa公司)的培养基中添加20ng/mL LFGF2和20ng/mL LEGF并培养1个月。作为对照,设置NucT0培养基。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0506] 用于重新形成聚集体的培养16天后,以视细胞前体细胞标志物Crx::Venus为指标调查不分化的条件(用荧光显微镜观察时,Crx::Venus不发光的条件),结果确认NeuroCult NS-A和RHB-A培养基具有一定程度的推迟分化的效果(图45)。

[0507] 由此可知,如果在重新片状化时添加NeuroCult NS-A和RHB-A培养基和EGF、FGF,则具有维持视网膜前体细胞、推迟分化的效果。

[0508] <实施例15在胶原蛋白凝胶上培养>

[0509] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、

(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0510] 使用beMatrix低内毒素化胶原蛋白液(新田明胶公司)制作胶原蛋白凝胶。作为具体的操作,将胶原蛋白AT与5xDME、再构成用缓冲液以7:2:1的比例混合,包被于Transwell的网上,在37°C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育30分钟。孵育后,向嵌入物的内外添加培养基。

[0511] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第26天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37°C下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在12孔的Transwell的胶原蛋白凝胶上,以 $8.0 \times 10^5$ 个细胞/孔的方式接种细胞。最初的3天在10 $\mu$ M Y-27632、300nM SAG和3 $\mu$ M CHIR99021的存在下进行培养。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(NucT0培养基)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0512] 用于重新形成聚集体的培养33天后,用体视显微镜以Rx::Venus为指标观察重新片状化的情况,结果确认在Transwell的胶原蛋白凝胶上在前面存在Rx::Venus阳性细胞(图46)。

[0513] 由此可知,在胶原蛋白凝胶上,通过添加Y-27632和SAG和CHIR99021也能够重新片状化。

[0514] <实施例16移植研究>

[0515] 对于以具有Crx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0516] 将如实施例15那样制作的胶原蛋白凝胶上的第26天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37°C下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在12孔的Transwell的胶原蛋白凝胶上,以 $8.0 \times 10^5$ 个细胞/孔的方式接种细胞。最初的3天在10 $\mu$ M Y-27632、300nM SAG和3 $\mu$ M CHIR99021的存在下进行培养。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(NucT0培养基)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0517] 对于用于重新形成聚集体的培养37天和44天的分化第63天和第70天的视网膜细胞片,使用胶原酶(Roche公司)在37°C下处理30分钟,进行剥离。将剥离下来的视网膜片用镊子和剪子切成细长条,由此准备长度1.8cm左右的移植用的移植物(图47)。

[0518] 对于准备的移植物,使用玻璃巴斯德移液管移植到免疫缺陷视网膜缺陷大鼠(SD Foxn)的视网膜下。

[0519] 取出移植后1年的大鼠的眼,用4%PFA固定。用荧光体视显微镜和荧光显微镜(Keyence BZ-X810)观察,结果确认Crx::Venus阳性的移植物已成活(图48)。

[0520] 由此可知,重新片状化的视网膜片在移植后能够成活。

[0521] <实施例17分选研究>

[0522] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司

制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0523] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第14~25天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,使用细胞分选仪ARIAII(BD公司)通过FSC和SSC分选出目标细胞群后,分取Rx::Venus阳性级分(图49)。

[0524] 将分取而得的细胞以每1孔 $1.6 \sim 8.0 \times 10^5$ 个细胞的方式接种于用层粘连蛋白511-E8包被的12孔Transwell(Corning公司)。作为对照,也制作了未经分选的片。最初的3天在 $10\mu\text{M}$  Y-27632、 $300\text{nM}$  SAG和 $3\mu\text{M}$  CHIR99021的存在下进行培养。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021的无血清培养基(NucT0培养基)培养基3~4天1次地进行培养基交换。在接种后第26天用荧光体视显微镜进行观察(图50)。

[0525] 另外,将分化第82天的通过分选以Rx::Venus纯化的细胞片用4%PFA固定后,不制作切片而是以片的状态进行免疫染色。用DAPI和抗恢复蛋白抗体(Proteintech公司)进行免疫染色。作为对照,对未经分选的视网膜片也进行染色(图51、图52、图53)。之后,制作冷冻切片,用DAPI和抗Ki67抗体(BD公司)、抗Chx10抗体(商品名:Anti CHX10 Antibody、Santa Cruz公司)、抗CRX抗体(TaKaRa公司)进行免疫染色。(图53)。

[0526] 其结果是,如果不对Rx::Venus阳性级分进行分选而直接接种,则在一部分观察到RPE细胞的块。不过,为了可以通过目视来确认,可将RPE细胞除去。另一方面,对Rx::Venus阳性级分进行分选时,观察到能够制作Rx::Venus阳性视网膜片。进而确认能够除去大部分RPE细胞(图49、图50)。但是,即使进行分选,有时也混入RPE细胞,不清楚这是由于通过分选无法完全除去RPE细胞、或者在分选后发生了分化。但是,可确认混入的RPE细胞未与神经视网膜组织混杂(图52)。由于能够通过目视来确认,因此能够将RPE细胞除去。

[0527] 另外确认,进行了分选的视网膜片可以不逊色于作为对照的无分选的视网膜片地分化出恢复蛋白阳性视细胞(图51、图53)。根据Z Stack分析和切片的免疫组织学分析,确认重新形成了视网膜组织的层结构且存在Chx10阳性和Ki67阳性的视网膜前体细胞、Crx阳性的视细胞前体细胞(图53)。

[0528] 因此观察到,通过以FSC和SSC分选出目标细胞群后以Rx::Venus为指标进行分选,可以除去大部分RPE细胞,并且在重新片状化时没有问题地分化出视网膜细胞。

[0529] <实施例18重新片状化时的维持视网膜性质的因子的探索>

[0530] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0531] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第25天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,使用细胞分选仪ARIAII(BD公司)以Rx::Venus为指标实施分选。对于分选后的细胞,在使用Easy iMatrix进行层粘连蛋白511-E8包被的96孔玻璃底平板(グライナー公司)中,向 $100\mu\text{L}$ 的NucT0中添加Y-27632、CHIR99021、SAG并以每1孔 $5 \times 10^4$ 个细胞的方式接种。在接种的同时,添加表1所示的蛋白质或表2所示的低分子化合物。

[0532] [表1]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS/0.1% BSA			Endorepellin (ng/ml)			IGF-1 (ng/ml)			SCF (ng/ml)		
				100	50	25	40	20	10	100	50	25
B	激活素 A (ng/ml)			FGF2 (ng/ml)			LIF (Unit)			TGF-b1 (ng/ml)		
	100	50	25	40	20	10	x500	x1000	x2000	100	50	25
C	BDNF (ng/ml)			FGF4 (ng/ml)			NGF (ng/ml)			TGF-b2 (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	40	20	10	100	50	25
D	BMP2 (ng/ml)			FGF8 (ng/ml)			PDGF-AB (ng/ml)			Thbs1 (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
E	BMP4 (ng/ml)			GDF7 (ng/ml)			PDGF-BB (ng/ml)			Thbs 2 (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
F	BMP7 (ng/ml)			GDF11 (ng/ml)			PEDF (ng/ml)			SAG (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
G	CXCL12 (ng/ml)			GDF15 (ng/ml)			PODN (ng/ml)			VEGF (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
H	EGF (ng/ml)			GDNF (ng/ml)			R-Spondin (ng/ml)			Wnt2b (ng/ml)		
	100	50	25	40	20	10	100	50	25	100	50	25

[0533] [表2]

[0534]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO			S1P			XMU MP 1(XMU)			抗坏血酸 (Asco)		
				(μM)			(μM)			(μM)		
				20	10	5	10	5	2.5	400	200	100
B	Y-27632(Y)			FTY 720(FTY)			腺苷 (Ade)			Go 6983(Go)		
	(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		
	40	20	10	20	10	5	200	100	50	4	2	1
C	SB-431542(SB)			VPC-23019(VPC)			ATP			PMA		
	(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		
	20	10	5	20	10	5	200	100	50	0.5	0.25	0.125
D	LDN-193189(LDN)			AMD-3100(AMD)			ZM-241385(ZM)			PD-0325901(PD)		
	(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		
	2	1	0.5	10	5	2.5	10	5	2.5	2	1	0.5
E	环巴胺 KAAD			LPA			CP-724714(CP)			TSA		
	(Cyc) (nM)			(μM)			(μM)			(μM)		
	40	20	10	20	10	5	5	2.5	1.25	0.2	0.1	0.05
F	GI-254023X(GI)			DHA			马立马司他 (Mari)			OAC2		
	(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		
	2	1	.5	20	10	5	5	2.5	1.25	20	10	5
G	IWR1 endo(IWR)			SF-1670(SF)			AGN-193109(AGN)			毛壳菌素 (CTM)		
	(μM)			(μM)			(μM)			(nM)		
	6	3	1.5	20	10	5	0.2	0.1	0.05	80	40	20
H	吡啶型整合素 (Pyr)			雷帕霉素 (Rapa)			视黄酸 (RA)			ML-792(ML)		
	(μM)			(μM)			(μM)			(μM)		
	4	2	1	1	0.5	0.25	1	0.5	0.25	5	2.5	1.25

[0535] 接种3天后,为了同样维持表1和2记载的低分子化合物或蛋白质的浓度而进行培养基交换。之后在第7天用不含表1和2记载的低分子化合物或蛋白质的NucT0培养基实施培养基交换。接种10天后用4%PFA固定,用荧光显微镜(Keyence公司制BZ-X810)以Rx::Venus为指标进行分选后的细胞的评价。其结果是,蛋白质中,添加了FGF2、FGF4、FGF8的片与作为对照的PBS相比,观察到Rx::Venus的表达强度高(图54)。另外,低分子化合物中,添加了IWR1 endo的片观察到Rx::Venus的表达强度高(图55)。进而确认到浓度依赖性,添加100μg/mL的FGF8时,观察到Rx::Venus的表达强度最高(图56)。

[0536] 由此可知,通过在刚接种细胞后活化FGF信号,可以维持Rx::Venus阳性的细胞群。

[0537] <实施例19添加FGF8所引起的聚集体重新形成、视网膜分化的确认>

[0538] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0539] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第24天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细

胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,使用细胞分选仪ARIAII(BD公司)以Rx::Venus为指标实施分选。对于分选后的细胞,以每1孔 $2.0 \sim 5.0 \times 10^4$ 个细胞接种于低粘附V平板。作为对照,还设置了未添加FGF8的组(FGF8-)、未进行分选的组(无分选)。

[0540] 3~4天1次地实施培养基交换。需要说明的是,培养基交换时也添加FGF8。在重新接种后第10天用显微镜进行观察,结果无分选、FGF8-的组中观察到Rx::Venus阴性细胞块或RPE细胞(图57)。另一方面,添加FGF8的组(FGF8+)中观察到这些细胞块减少。有分选、FGF8-的组中,在局部观察到RPE细胞。由于通过分选除去了RPE细胞,因此暗示了Rx::Venus阳性细胞的一部分的群分化成了RPE细胞。另一方面,有分选、FGF8+的组中形成了Rx::Venus阳性的聚集体,未观察到RPE细胞、Rx::Venus阴性的块。

[0541] 由这些结果可知,通过添加FGF8,可减少RPE细胞或Rx::Venus阴性细胞的分化。

[0542] 进而,将用于重新形成聚集体的培养第54天(重新接种后第30天)的聚集体用PBS清洗,使用神经细胞分散液(Wako公司制)分散成单细胞后,用固定缓冲液(BD公司)进行甲醛固定。之后,用Perm/清洗缓冲液(BD公司)进行清洗后,用抗CHX10-Alexa Fluor 647缀合抗体(Santacruz公司)、抗Sox2-BV421抗体(Biolegend公司)、抗Ki67-Alexa Fluor 647缀合抗体(BD公司)、抗CRX-Alexa Fluor 647缀合抗体(Santacruz公司)进行染色。用Perm/清洗缓冲液(BD公司)清洗抗体后,用FACSCantoII(BD Bioscience公司)进行测定,用FlowJo进行分析。需要说明的是,作为对照,还设置了未重新组织化的分化天数相同的神经视网膜组织。

[0543] 其结果是,无分选且未添加FGF8的组中,观察到较多Rx::Venus阴性细胞群,具有Rx::Venus阳性率低的倾向。另一方面表明,虽然无分选但添加了FGF8的组中,具有Rx::Venus阳性率高的倾向(图58)。

[0544] 另外,进行分选时未添加FGF8的组中,也具有Rx::Venus阳性率高的倾向(图58)。另一方面,进行分选且添加了FGF8的组中,具有Chx10阳性和Sox2阳性的神经视网膜前体细胞的比例高、Crx阳性的视细胞前体细胞的比例低的倾向(图59)。

[0545] 由这些结果可知,通过不仅进行分选还添加FGF8,能减少RPE、Rx::Venus阴性细胞的分化,得到均匀且良好的聚集体。

[0546] <实施例20重新片状化时的FGF8的效果的确认>

[0547] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0548] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第24天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,使用细胞分选仪ARIAII(BD公司)以Rx::Venus为指标实施分选。对于分选后的细胞,在24孔Transwell(Corning公司)中,以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞悬浮、接种于含有Y-27632、CHIR99021和SAG、FGF8的NucT0培养基。作为对照,还设置了未添加FGF8的组(FGF8-)。

[0549] 3~4天1次地实施培养基交换。需要说明的是,培养基交换时也添加FGF8。用荧光体视显微镜观察分化63天、重新接种后经过40天的片(图60、图61)。另外,为了进行FACS分

析,将分化64天、重新接种后41天的聚集体用PBS清洗,使用神经细胞分散液(Wako公司制)分散成单细胞后,用固定缓冲液(BD公司)进行甲醛固定。之后,用固定缓冲液(BD公司)BD公司)进行固定,用Perm/清洗缓冲液(BD公司)清洗后,用抗CHX10-Alexa Fluo 647缀合抗体(Santacruz公司)、抗Sox2-BV421缀合抗体(Biolegend公司)、抗Ki67抗体(BD公司)、抗CRX-Alexa Fluo 647缀合抗体(Santacruz公司)进行染色。用Perm/清洗缓冲液(BD公司)清洗抗体后,用FACSCantoII(BD Bioscience公司)进行测定,使用FlowJo进行分析。需要说明的是,作为对照,也设置了未进行重新组织化、分化天数相同的神经视网膜组织(图62)。

[0550] 其结果是,进行分选后未添加FGF8的片的情况下,观察到较多Rx::Venus阴性细胞群,具有Rx::Venus阳性细胞群集中在孔的周边部、存在于块上的倾向。另一方面,分选后添加FGF8的片的情况下,观察到Rx::Venus阳性细胞在孔整体中均匀存在,能够制作良好的片(图60、图61)。另外,未添加FGF8的片的情况下,观察到黑色的RPE(图61、箭头),另一方面,添加了FGF8的片的情况下则几乎未观察到。

[0551] 另外,FACS分析中,未添加FGF8的片的情况下,Rx::Venus阳性率减少到60%,而添加了FGF8的组中为95%以上,可知能够维持不逊色于神经视网膜组织的阳性率(图62)。进而,Chx10阳性和Sox2阳性的神经视网膜前体细胞、Crx阳性的视细胞前体细胞的比例与神经视网膜组织相比也为同等程度。具有Rx::Venus阳性且Ki67阳性的有增殖性的视网膜系细胞的比例多于神经视网膜组织的倾向(图62)。

[0552] 由这些结果可知,进行重新片状化时,通过在分选后添加FGF8,可减少RPE、Rx::Venus阴性细胞的分化、得到均匀且良好的片。

[0553] <实施例21在Transwell上的接种·重新片状化后的经时变化的确认>

[0554] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0555] 将如实施例1那样制作的悬浮培养开始后第27天的聚集体用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞。分散后,在用层粘连蛋白511-E8包被的24孔Transwell中,以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞的方式悬浮于含有 $10 \mu\text{M}$  Y-27632、 $300 \text{ nM}$  SAG和 $3 \mu\text{M}$  CHIR99021、 $100 \text{ ng/mL}$  FGF8的 $200 \mu\text{L}$ 的无血清培养基,在37℃、5%  $\text{CO}_2$ 的条件下培养3天。接种3天以后,用不含Y-27632、SAG和CHIR99021、FGF8的无血清培养基(NucT0)培养基3~4天1次地进行培养基交换。

[0556] 在用于重新形成聚集体的培养3天、6天、9天、12天、22天、40天后(dd30、dd33、dd36、dd39、dd49、dd67),将得到的细胞片用4%PFA固定后,用荧光体视显微镜和荧光显微镜以Rx::Venus为指标观察片化,结果观察到Rx::Venus阳性的视网膜细胞增殖并形成了具有厚度的片(图63)。特别是22天至40天后,确认到整面被Rx::Venus阳性细胞覆盖的厚的细胞片。

[0557] 根据这些结果,观察到在22天至40天后得到了可用于移植、分析等的重新组织化视网膜片。

[0558] <实施例22 RPC表面抗原筛选~hES细胞与NR的比较~>

[0559] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、

(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0560] 使用上述细胞,如实施例1记载那样开始进行用于分化诱导的悬浮培养。需要说明的是,分化诱导开始时添加SAG 300nM。将悬浮培养开始后第19天和第26天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37°C下孵育后,通过吹打分散成单细胞,使用表面抗原筛选试剂盒MACS(注册商标)Marker Screen, human(Miltenyi公司)实施表面抗原筛选(Alexa 647,荧光色素缀合抗体组)。作为对照,对人ES细胞(hESC)进行染色。需要说明的是,筛选中使用的标志物总计为371个(图64~69)。

[0561] FACS分析中使用MACS Quant10(Miltenyi公司)进行测定,使用FlowJo进行分析。用图65所示的以FSC和SSC表示的群进行设门并进行分析。首先,用hESC中表达且一旦分化则表达消失的E-钙粘蛋白、SSEA-4、SSEA-5确认正确地进行了染色和分析(图66)。将此后的分析结果汇总于图64。需要说明的是,“hESC:高”是指在人ES细胞中表达水平高或有表达,“hESC:低”是指在人ES细胞中表达水平低或不表达,“NR:高”是指在神经视网膜细胞中表达水平高,“NR:低”是指在神经视网膜细胞中表达水平低或不表达。

[0562] 探索了在hESC中不表达(或有表达)、悬浮培养开始后第19天或第26天在Rx::Venus阳性群中表达(或不表达)的表面抗原,结果暗示了,CD39、CD73、CXCR4、进而CD29、CD49b、CD49c、CD49f、CD57、CD82、CD90、CD200可能为能够区分Rx::Venus阳性细胞与其它细胞(Rx::Venus阴性细胞、hESC)的标志物(图67)。

[0563] 进而,使用小鼠IgG1-APC缀合抗体(Miltenyi公司)、抗CD39-APC缀合抗体(Miltenyi公司)、抗CD73-APC缀合抗体(Miltenyi公司)、抗CD184(CXCR4)-APC缀合抗体(Miltenyi公司),进行悬浮培养开始后dd18、dd25、dd53、dd81(图68中,d18、d25、d53、d81)的CD39、CD73、CD184(CXCR4)表达的FACS分析(图68)。

[0564] 其结果是,获知dd25时表达CD39和CD73的细胞的比例最高,dd18和dd25时CD184表达低的细胞的比例高。

[0565] 由此可知,为了纯化神经视网膜前体细胞而使用表面抗原CD39、CD73、CD184时,较佳为悬浮培养开始后第18天以后、第25天附近(图68)。

[0566] <实施例23中的CD39和CD73、CXCR4的表达分析>

[0567] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0568] 在悬浮培养开始时(分化诱导开始时)添加SAG 300nM,在悬浮培养开始后的第3天不添加BMP4,由此制作脑类器官。作为对照,设置了添加BMP4的组。对于如此制作的悬浮培养开始后第26天的脑类器官,进行荧光显微镜观察(图70)。其结果是,添加了BMP4的组中观察到分化出Rx::Venus阳性视网膜组织,另一方面,未添加BMP4的组中观察到分化出Rx::Venus阴性神经上皮细胞。进而,将这些聚集体用4%PFA固定,制作切片,用DAPI和抗FoxG1抗体(TaKaRa公司)染色,用荧光显微镜(Keyence公司制BZ-X810)进行观察。其结果是,确认添加了BMP4的组中为FoxG1阴性,另一方面,未添加BMP4的组中侵入到FoxG1阳性,确认分化

出脑类器官(图71)。

[0569] 将如此制作的悬浮培养开始后第25天的脑类器官用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,用抗CD39-APC缀合抗体(Miltenyi公司)、抗CD73-APC缀合抗体(Miltenyi公司)和抗CXCR4-APC缀合抗体(Miltenyi公司)染色,FACS测定中使用FACSCantoII(BD Bioscience公司)测定表达细胞群的比例,使用FlowJo进行分析。

[0570] 其结果是,观察到脑类器官中不表达CD39和CD73,另一方面,在脑类器官的大部分细胞中表达CXCR4(图72)。

[0571] 由此确认,通过以CD39阳性、CD73阳性和CXCR4阴性的细胞群为指标而与脑类器官相区分,可以分取Rx::Venus阳性细胞群。

[0572] <实施例24 CD39表达分析>

[0573] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0574] 在开始分化诱导时,用显微镜观察以(1)0nM、(2)30nM、(3)300nM添加SAG而制作的悬浮培养开始后第26天的聚集体(NR)的形态。其结果是,确认与悬浮培养开始时(dd0)添加SAG 300nM的情况相比,添加SAG 0nM和SAG 30nM时聚集体更大,另外可知,层结构也更清晰(图73)。

[0575] 进而,对于上述聚集体,使用神经细胞分散液分散成单细胞,用抗CD39-APC缀合抗体(Miltenyi公司)和抗CXCR4-APC缀合抗体(Miltenyi公司)对CD39和CXCR4的表达进行FACS分析。使用FACSCantoII(BD Bioscience公司)测定表达细胞群的比例,使用FlowJo进行分析。另外,将这些聚集体用4%PFA固定,制作切片后,用抗ALDH1A1抗体(R&DSystems公司)、抗CoupTF1抗体(PPMX公司)、抗LHX2抗体(Millipore公司制)、抗Chx10抗体(ExAlpha公司制)、抗Pax2抗体(Covance公司制)、抗NKX2.1抗体(Leica公司制)进行染色。

[0576] 其结果是,观察到在悬浮培养开始时(dd0)添加SAG 300nM的聚集体中,有CD39的表达,CXCR4的表达低(图74)。另外,通过在dd0添加SAG,观察到背侧标志物ALDH1A1的表达降低和腹侧标志物CoupTF1的表达上升(图75、图76)。另外判明,不施加SAG刺激时细胞聚集体中的Rx的表达度均匀(图77)。但是,对于LHX2和Chx10、Pax2,添加300nM的聚集体中在Rx表达低的区域中也确认到表达,NKX2.1为阴性,因此确认为神经视网膜组织(图78、图79)。

[0577] 由此可知,通过在开始分化诱导时添加SAG 300nM,可以得到CD39阳性且CXCR4阴性的神经视网膜前体细胞群。

[0578] <实施例25 CD39表达增强研究>

[0579] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0580] 对于分化诱导开始时(dd0)添加SAG 300nM而制作的聚集体(NR),在悬浮培养开始后第17天将10个神经视网膜组织转移到低粘附悬浮培养用皿60mmDish(住友电木公司制),

在4mL的NucT0培养基中添加1mM、0.2mM腺苷(A2A受体激动剂、Sigma公司制)、1mM、0.2mM、0.04mM AMP-PNP(Tocris公司制)、5mM、1mM、0.2mM、0.04mM ATP二钠盐(Tocris公司制)和1 $\mu$ M、0.2 $\mu$ M、0.04 $\mu$ M CGS21680(腺苷A2A受体激动剂、Tocris公司制),培养至悬浮培养开始后第25天,关于CD39和CXCR4的表达变化,使用小鼠IgG1-APC缀合抗体(Miltenyi公司)、抗CD39-BV421缀合抗体(BD Bioscience公司)和抗CXCR4-APC缀合抗体(Miltenyi公司)染色,使用FACSCantoII(BD Bioscience公司)测定,使用FlowJo进行分析。需要说明的是,作为对照,设置了DMSO添加组。

[0581] 其结果是,可知ATP和A2A受体激动剂具有增强CD39的表达、减少CXCR4的表达的效果(图80、图81)。

[0582] 由此可知,可通过添加ATP和A2A受体激动剂来增强CD39的表达。

[0583] <实施例26用CD39分选并添加FGF8而制作的Islet-1 KO hESC-视网膜片的移植>

[0584] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行基因改造且敲除了Islet-1基因的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”和W02018/097253中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0585] 对于悬浮培养开始时(分化诱导开始时、dd0)用SAG 300nM进行分化而得的聚集体,将悬浮培养开始第25天的聚集体(NR)分散成单细胞,用抗CD39-APC缀合抗体(Miltenyi公司)在37℃下染色15分钟后,使用细胞分选仪ARIAII(BD公司)以CD39-APC为指标实施分选。将分选后的细胞以每1孔 $8.0 \times 10^5$ 个细胞的方式接种于包被有胶原蛋白凝胶的12孔Transwell。接种时添加Y-27632(Wako公司)和SAG(Enzo公司)、CHIR99021(Wako公司)、50ng/mL FGF8(Wako公司)。另外,作为对照,还设置了不添加FGF8的组(FGF8-)。

[0586] 3~4天一次地实施培养基交换。需要说明的是,培养基交换时也添加FGF8。悬浮培养开始后第73天用显微镜进行观察,结果,未添加FGF8的组中稀疏地观察到Crx::Venus细胞群,与此相对,添加FGF8的组中观察到Crx::Venus细胞群均匀地存在(图82)。

[0587] 对于如此制作的片,在悬浮培养开始后第88天使用胶原酶将片回收后,使用微型剪将移植用移植物切成长条(图82),移植至免疫缺陷视网膜缺陷大鼠(SD Foxn)的视网膜下。

[0588] 由此确认,由用CD39进行了分选的细胞制造的视网膜片能进行移植。

[0589] <实施例27 RPC表面抗原筛选~脑类器官与NR的比较~>

[0590] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0591] 对于悬浮培养开始时(分化诱导开始时、dd0)添加SAG 30nM而制作的悬浮培养开始后第24~26天的聚集体(NR),使用神经细胞分散液(Wako公司)分散成单细胞,使用表面抗原筛选试剂盒MACS(注册商标)Marker Screen, human(Miltenyi公司)进行染色,实施表面抗原筛选(Alexa 647、荧光色素缀合抗体组)。作为对照,对于分化诱导开始后第3天不添

加BMP4而制作的脑类器官进行染色。

[0592] FACS分析使用MACS Quant10 (Miltenyi公司) 来进行测定,使用FlowJo进行分析。探索脑类器官中不表达(或有表达)且悬浮培养开始后第24~26天的Rx::Venus阳性群表达的(或不表达的)表面抗原,结果显示CD9、CD15、CD49c、CD66b、CD69、CD82、CD164、EpCAM、ErbB2 (CD340) 中可能能够与脑类器官相区分(图83)。

[0593] 另外显示,作为区分Rx::Venus阳性细胞与阴性细胞的标志物,CD9、CD24、CD49c、CD90、CXCR4、EpCAM可能是有用的(图84)。

[0594] <实施例28 CD9的表达经时变化的确认>

[0595] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0596] 对于hESC和悬浮培养开始时(分化诱导开始时、dd0)添加SAG 30nM而制作的dd4、dd11、dd18、dd25、dd32、dd46的聚集体(NR),用神经细胞分散液(Wako公司)分散成单细胞,用缀合有APC的抗CD9抗体(BioLegend公司)进行染色,清洗抗体后,进行FACS分析。FACS分析中使用MACS Quant10(Miltenyi公司)进行测定并使用FlowJo进行分析。

[0597] 其结果是,获知CD9在hESC中表达,但是分化开始第4天表达一度丢失,第11天(图85中d11)左右起开始表达,dd18(图85中d18)至dd25(图85中d25)、dd32(图85中d32)左右阳性细胞率变高。确认到作为进行纯化的时期,较佳为dd11以后,更优选在dd18至dd32以后进行纯化(图85)。

[0598] <实施例29以SSEA1为指标的除去目标外细胞的研究>

[0599] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0600] 对于悬浮培养开始时(分化诱导开始时、dd0)添加SAG 30nM而制作的第25天的聚集体(NR),用神经细胞分散液(Wako公司)分散成单细胞,在用缀合有APC的抗CD9抗体(BioLegend公司)染色的基础上,用缀合有BV421的抗SSEA1抗体(BioLegend公司)染色,使用FACSCantoII(BD Bioscience公司)进行测定,使用FlowJo进行分析。

[0601] 其结果是,获知聚集体整体中Rx阳性细胞为约87%,但对CD9阳性细胞设门时Rx阳性细胞提高到94%。还获知对CD9阳性且SSEA1阴性的细胞设门时Rx阳性细胞提高到约96%(图86)。

[0602] 由此可知,通过在CD9的基础上组合SSEA1,可以进一步纯化视网膜系细胞。

[0603] <实施例30 CD9、CD90、CXCR4、SSEA1的组合的研究>

[0604] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0605] 对于200个悬浮培养开始时(分化诱导开始时、dd0)添加SAG 30nM而制作的第25天

的聚集体(NR),用神经细胞分散液(Wako公司)分散成单细胞,将细胞分成7等份,按照下述的7个条件在4℃下对表面抗原染色1小时。(1)不染色(以Rx::Venus为指标进行纯化)、(2)用抗CD9-APC缀合抗体(BioLegend公司)染色、(3)用抗CD90-APC缀合抗体(BD公司)染色、(4)用抗CD184(CXCR4)-APC缀合抗体(Miltenyi公司)染色、(5)用抗CD9-APC缀合抗体(BioLegend公司)和抗SSEA1-BV421缀合抗体(BioLegend公司)染色、(6)用抗CD9-APC缀合抗体(BioLegend公司)和抗CD90-BV421缀合抗体(BioLegend公司)染色、以及(7)用抗CD90-APC缀合抗体(BD公司)和抗SSEA1-BV421缀合抗体(BioLegend公司)染色。染色后,用ARIA II(BD公司)以图87所示的框为指标实施分选。将通过分选而回收的细胞用MACS Quant10(Miltenyi公司)进行FACS分析,确认能够利用目标细胞级分进行纯化(图87)。测定纯化后的细胞群中的Rx::Venus阳性细胞的比例,结果与分选前相比,通过(1)利用Rx::Venus阳性级分分选而得的样品的纯度最高,但是利用CD9阳性且SSEA-1阴性的级分而纯化的样品不逊色于利用Rx::Venus进行纯化的样品,Rx::Venus阳性率高(图88、图89)。

[0606] 将这些分选后的细胞以每1孔 $2.0 \times 10^5$ 个细胞接种于包被有层粘连蛋白511-E8的24孔Transwell。接种时添加 $10\mu\text{M}$  Y-27632(Wako公司)、 $300\text{nM}$  SAG(Enzo公司)、 $3\mu\text{M}$  CHIR99021(Wako公司)和 $100\text{ng/mL}$  FGF8(Wako公司)。接种后3~4天一次地实施培养基交换。

[0607] 在开始重新片状化培养后第1天和第12天,用荧光显微镜进行明视场和荧光观察,结果观察到,接种后第1天时任一纯化后细胞均在Transwell的网上成活(图90)。进而,在12天后的观察中,利用Rx::Venus阳性纯化而得的样品中观察到一些黑色的RPE,与此相对,CD9阳性和CD9阳性/SSEA1阴性(CD9/SSEA1)群、CD9阳性/CD90阳性(CD9/CD90)群的利用CD9纯化的片中未观察到黑色的RPE(图91)。

[0608] 由此确认,利用CD9以及CD9与SSEA1阴性或CD90阳性的级分进行分选的视网膜片与利用Rx::Venus阳性进行分选相比,能够除去RPE级分,更良好。

[0609] <实施例31 CD9和SSEA1的表达的经时变化的确认>

[0610] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0611] 对于hESC和悬浮培养开始时(分化诱导开始时、dd0)添加SAG  $30\text{nM}$ 而制作的dd4、dd11、dd18、dd25、dd32、dd46的聚集体(NR),用神经细胞分散液(Wako公司)分散成单细胞,用抗CD9-APC缀合抗体(BioLegend公司)和抗SSEA1-BV421缀合抗体(BioLegend公司)染色,进行FACS分析。使用FACSCantoII(BD Bioscience公司)进行测定,使用FlowJo进行分析。

[0612] 其结果是,hESC中CD9为阳性且SSEA1为阴性,但是在分化开始后第4天时变成CD9阴性且SSEA1阳性(图92)。进而获知,分化第11天起开始出现CD9阳性且SSEA1阴性的群,第18天、第25天目标群的比例增加。第32天、第46天也测定到在持续表达。

[0613] 由此确认,作为进行纯化的时期,较佳为dd11(图92中d11)以后,尤其是在dd18(图92中d18)至dd32(图92中d32)以后进行纯化(图92)。

[0614] 对于如此地以CD9和SSEA1为指标进行分选并添加 $10\mu\text{M}$  Y-27632、 $3\mu\text{M}$  CHIR99021、 $300\text{nM}$  SAG和 $100\text{ng/mL}$  FGF8而制作的12孔Transwell上的视网膜片,在悬浮培养开始后第

48天和第62天用手术刀、剪子将片回收后,用微型剪将移植用移植物切成长条,移植于免疫缺陷视网膜缺陷大鼠(SD Foxn)的视网膜下(无图示)。

[0615] 由此确认,使用利用CD9和SSEA1进行分选而得的细胞制造的视网膜片能够进行移植。

[0616] <实施例32使用明胶的RPE-视网膜组织复合化的研究>

[0617] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0618] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第18~30天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,以每1孔 $4.0 \sim 8.0 \times 10^5$ 个细胞接种于12孔Transwell。接种时向NucT0培养基中添加Y-27632和SAG、CHIR99021。之后,用不含Y-27632和SAG、CHIR99021的NucT0培养基3~4天一次地实施培养基交换,培养1个月以上。

[0619] 对于实施例1中制作的悬浮培养开始后80天以后的RPE同时进行分化而得的聚集体,在包被有层粘连蛋白511-E8的培养皿中,接种于向DMEM(SIGMA公司)和F12 Ham(SIGMA公司)培养基添加B27(Gibco公司)、L-谷氨酰胺、10ng/mL FGF2、SB431542而成的培养基中并进行培养。RPE在粘附后会增殖并逐渐铺开,因此用1mL的枪头仅剥取RPE并接种于其它包被有层粘连蛋白511-E8的培养皿,由此进行纯化。之后在扩大培养后,将 $1.0 \times 10^6$ 个细胞的RPE接种于包被有层粘连蛋白511-E8的12孔Transwell,3~4天1次地实施培养基交换,培养1个月以上。

[0620] 用BeMatrix LS-W明胶(新田明胶公司)进行如上培养而得的RPE片与片状视网膜组织的粘附操作。作为具体操作,使用镊子、剪子从Transwell回收各片,用10%(w/v)的明胶融合片状视网膜组织、RPE片后,用20%明胶融合,最终添加30%的明胶使片状视网膜组织与RPE片粘附。粘附后骤冷至4℃,孵育20分钟而使其牢固并回收,由此制作片状视网膜组织与RPE片粘附而成的复合片(图93~图98)。

[0621] 将如此制作的视网膜组织-RPE复合片用镊子和剪子剪切。首先将复合片对半分割,然后沿着切出的面切成长条(图99)。其结果是,能够以两个片借助明胶而粘附的状态切出。观察该切出的复合片的截面,在一侧确认到具有黑色色素的RPE,在相反侧确认到Rx::Venus阳性的片状视网膜组织,在其间填充有明胶(图100)。该切出的复合片不会因移植操作即吸入、吐出的动作而剥离,或者用切掉了前端的1mL的枪头进行吸入、吐出的操作。其结果是,复合片不分离,能够反复进行吸入、吐出(图101)。

[0622] 由此可知,通过使用片状视网膜组织、RPE片和明胶,能够制作可移植的视网膜组织-RPE复合片。

[0623] <实施例33使用纤维蛋白的RPE-视网膜组织复合化的研究>

[0624] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0625] 将实施例1中制作的悬浮培养开始后第18~30天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,以每1孔 $4.0 \sim 8.0 \times 10^5$ 个细胞接种于12孔Transwell。接种时向NucT0培养基中添加Y-27632和SAG、CHIR99021。之后,用不含Y-27632和SAG、CHIR99021的NucT0培养基3~4天一次地实施培养基交换,培养1个月以上(图102)。

[0626] 对于实施例1中制作的悬浮培养开始后80天以后的RPE同时进行分化而得的聚集体,在包被有iMatrix511的培养皿中,接种于向DMEM(SIGMA公司)和F12 Ham(SIGMA公司)培养基中添加B27(Gibco公司)、L-谷氨酰胺、10ng/mL FGF2、SB431542而成的培养基并进行培养。RPE在粘附后会增殖并逐渐铺开,因此用枪头仅剥取RPE并接种于其它包被有iMatrix511的培养皿,进行纯化。之后在扩大培养后,将 $1.0 \times 10^6$ 个细胞的RPE接种于包被有iMatrix511的12孔Transwell,3~4天一次地实施培养基交换,培养1个月以上(图102)。

[0627] 使用BOLHEAL组织粘附用(帝人ファーマ公司)进行如上培养而得的片状视网膜组织与RPE片的粘附操作。作为具体的操作,使用镊子、剪子从Transwell回收各片,向片状视网膜组织添加纤维蛋白原100 $\mu$ L,向RPE片添加凝血酶100 $\mu$ L,融合后除去(图103~104)。再次向片状视网膜组织添加纤维蛋白原100 $\mu$ L、向RPE片添加凝血酶100 $\mu$ L(图104)。在培养皿上,以顶端侧朝向上侧的方式将RPE片的网侧置于培养皿侧,以顶端面朝向RPE侧的方式从上方放置片状视网膜组织(图105)。粘附后在室温下孵育5分钟而使其牢固并进行回收,由此制作粘附而成的片(图106~107)。将如此制作的视网膜组织-RPE复合片用镊子翻转,以片状视网膜组织朝向下侧、视网膜色素上皮片朝向上侧的方式设置并观察(图108)。另外,将粘附着的Transwell的网剥离(图109)。

[0628] 由此可知,通过使用片状视网膜组织、RPE片和纤维蛋白,能够制作视网膜组织-RPE复合片。

[0629] <实施例34使用CellShifter除去两个片间的不需要的明胶的研究>

[0630] 已知实施例32所研究的复合化的片中,两个片间含有较多的明胶而变得较厚。因此,为了在复合化步骤时将两个片间的不需要的明胶挤出、除去,研究了形成有明胶逃出的通道的复合化设备。

[0631] 在载玻片上使用硅片制作2个、4个、5个通道且形成堤坝状,使用在中间添加有明胶的2片CellShifter(Cell Seed公司),从上方挤出,观察明胶是否流出。

[0632] 其结果是,获知将流路设为5个且以堤坝状设置硅片的设备中,多余的明胶最容易流出(图110)。

[0633] <实施例35在温度应答性培养皿上制作平面化片并剥离·移植的研究>

[0634] 对于以具有Rx::Venus报告基因的方式进行了基因改造的人ES细胞(KhES-1株、(非专利文献3)),按照“Scientific Reports4,3594(2014)”中记载的方法在无饲养细胞条件下进行培养。作为无饲养细胞培养基,使用StemFit培养基(商品名:AK03N、味之素公司制),作为代替饲养细胞的支架,使用层粘连蛋白511-E8(商品名、ニッピ公司制)。

[0635] 将实施例1中制作的第18~30天的聚集体(NR)用PBS清洗,添加神经细胞分散液(Wako公司制)。在37℃下孵育后,通过吹打分散成单细胞,以 $8.0 \times 10^5$ 个细胞/孔将细胞接种于包被有层粘连蛋白511-E8的24孔的7个等级的剥离度的不同温度应答性培养皿(Cell seed公司)。3~4天一次地实施培养基交换,接种起30天以后,较厚地形成了片,然后,降低

至室温并孵育2小时,进行观察。其结果是,7个等级的剥离度的温度应答性培养皿中,在2b、2c、3、4和多个孔中观察到可通过设为室温来剥离视网膜片(图111)。

[0636] 由此可知,通过在温度应答性培养皿中进行培养,可以回收视网膜片。

[0637] 对于这样以Rx::Venus为指标进行分选并添加10 $\mu$ M Y-27632、3 $\mu$ M CHIR99021、300nM SAG和100ng/mL FGF8而制作的温度应答性培养皿上的视网膜片,在悬浮培养开始后第62天在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时并回收后,使用微型剪将移植用移植物切成长条,移植于免疫缺陷视网膜缺陷大鼠(SD Foxn)的视网膜下(无图示)。

[0638] 由此确认,在温度应答性培养皿上培养而得的视网膜片能够进行移植。

ESC KhES-1株

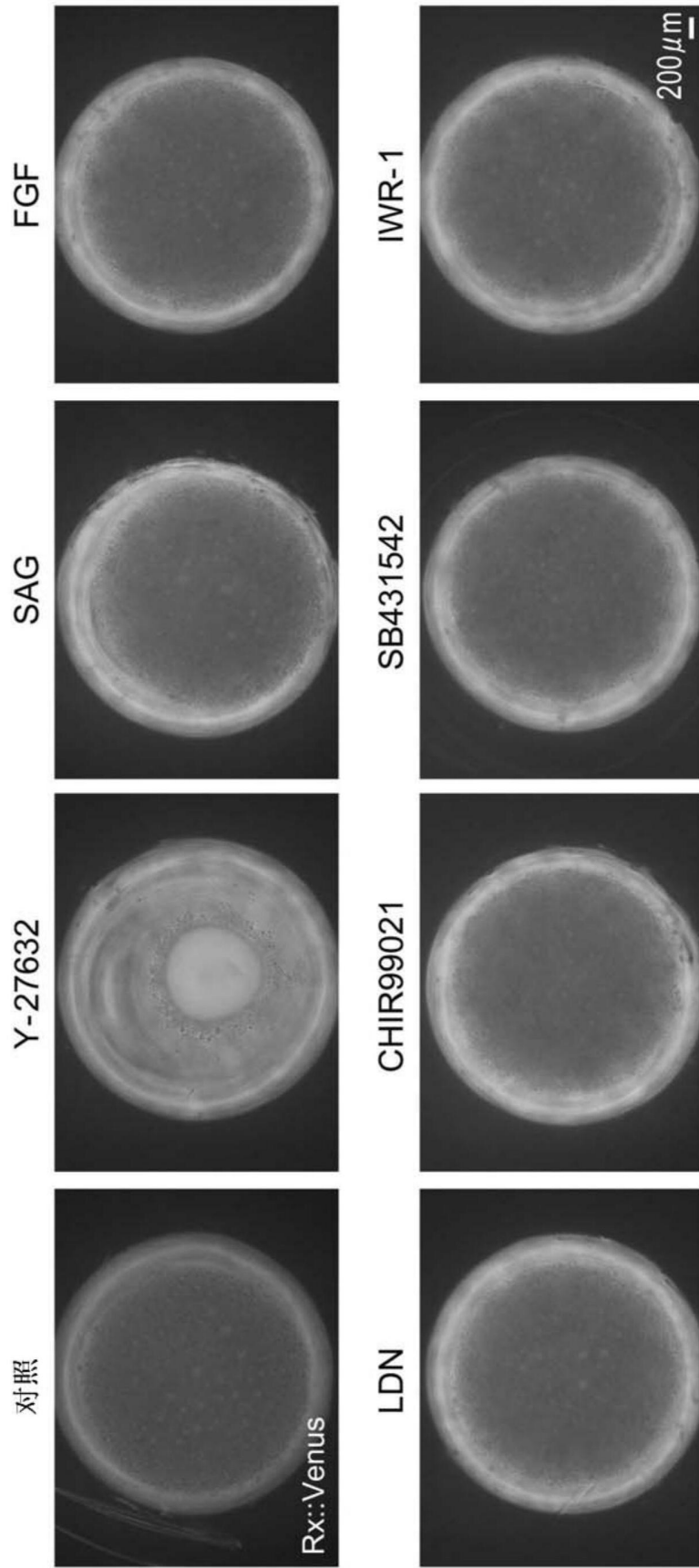


图1

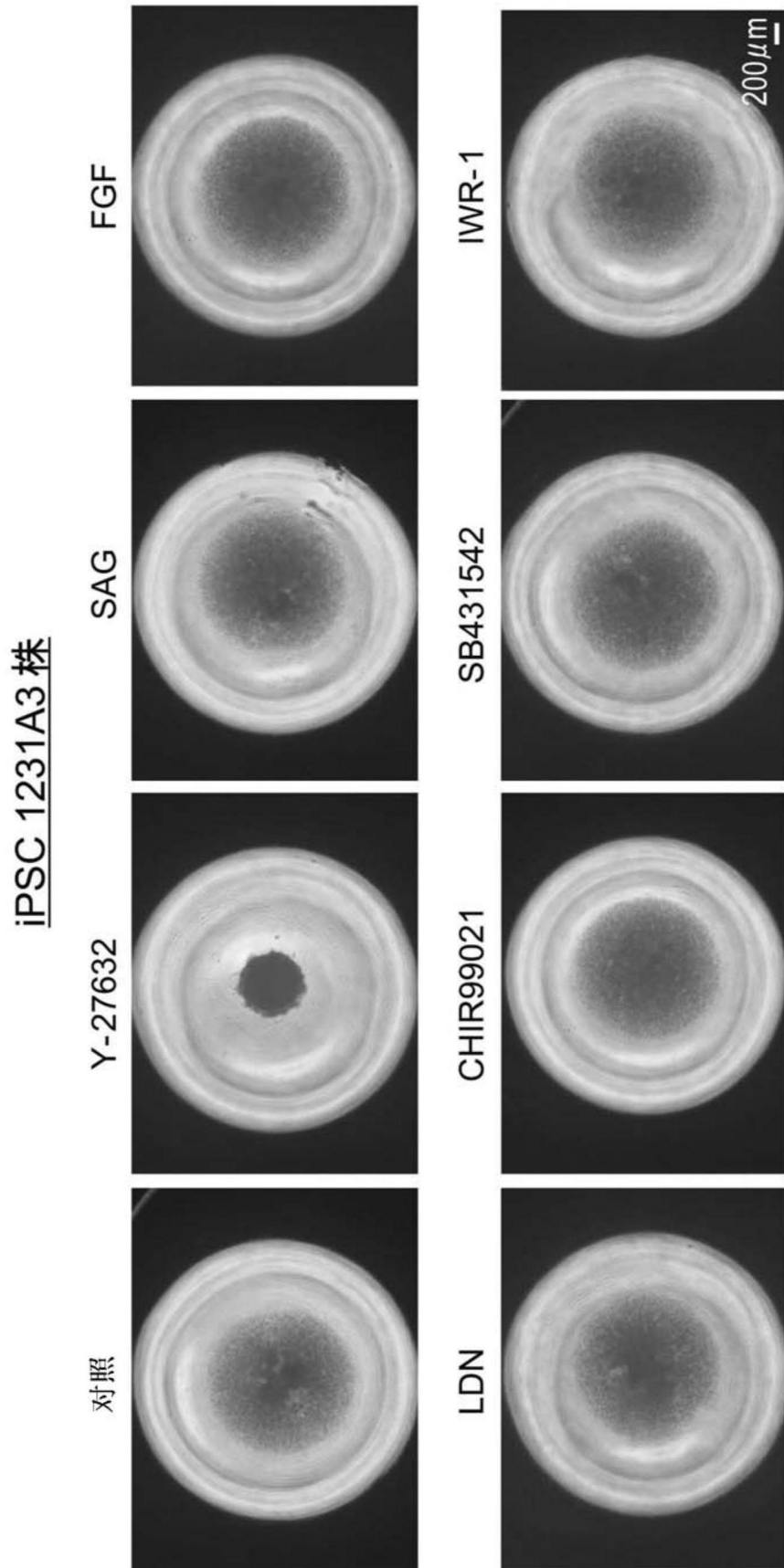


图2

ESC KhES-1株 分散并再次接种后第1天

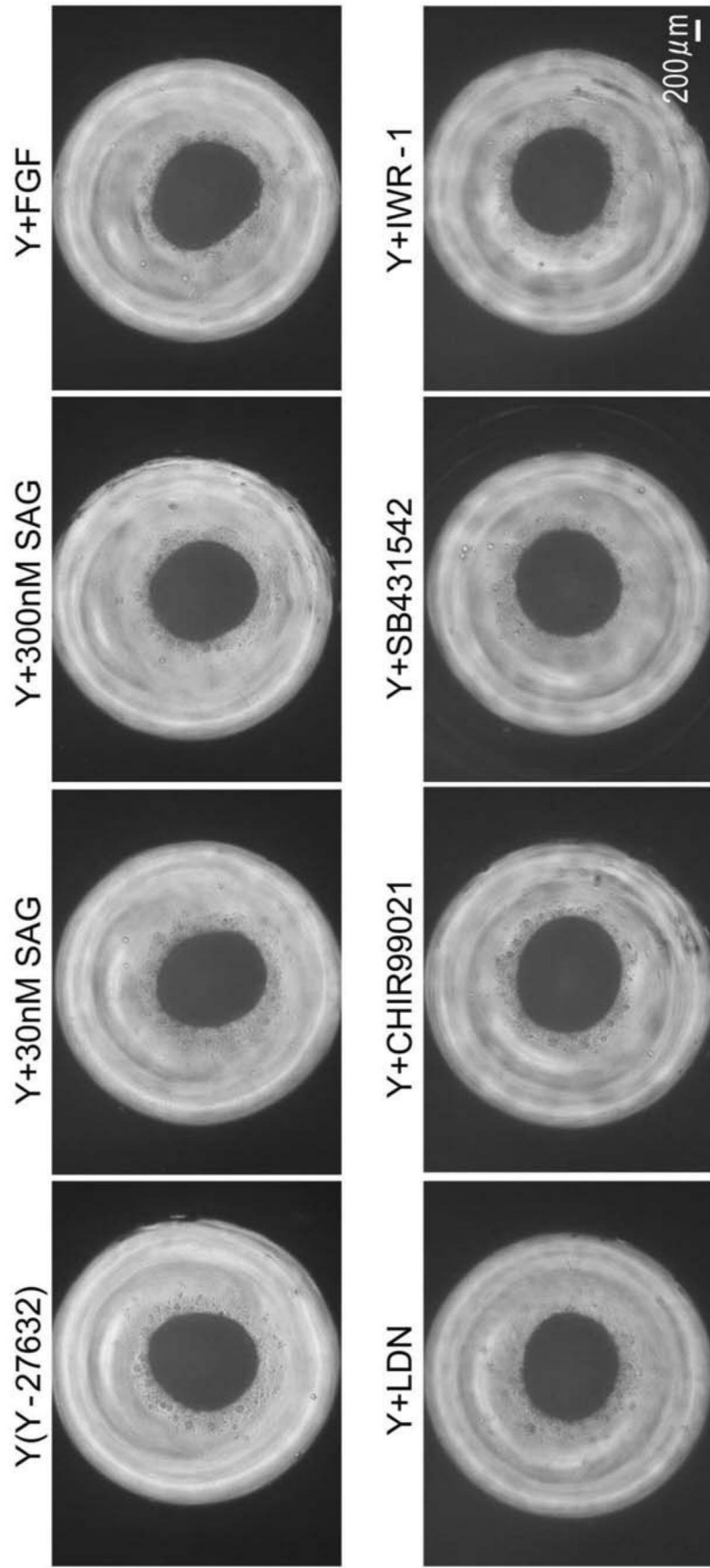


图3

ESC KhES-1株 分散并再次接种后第7天

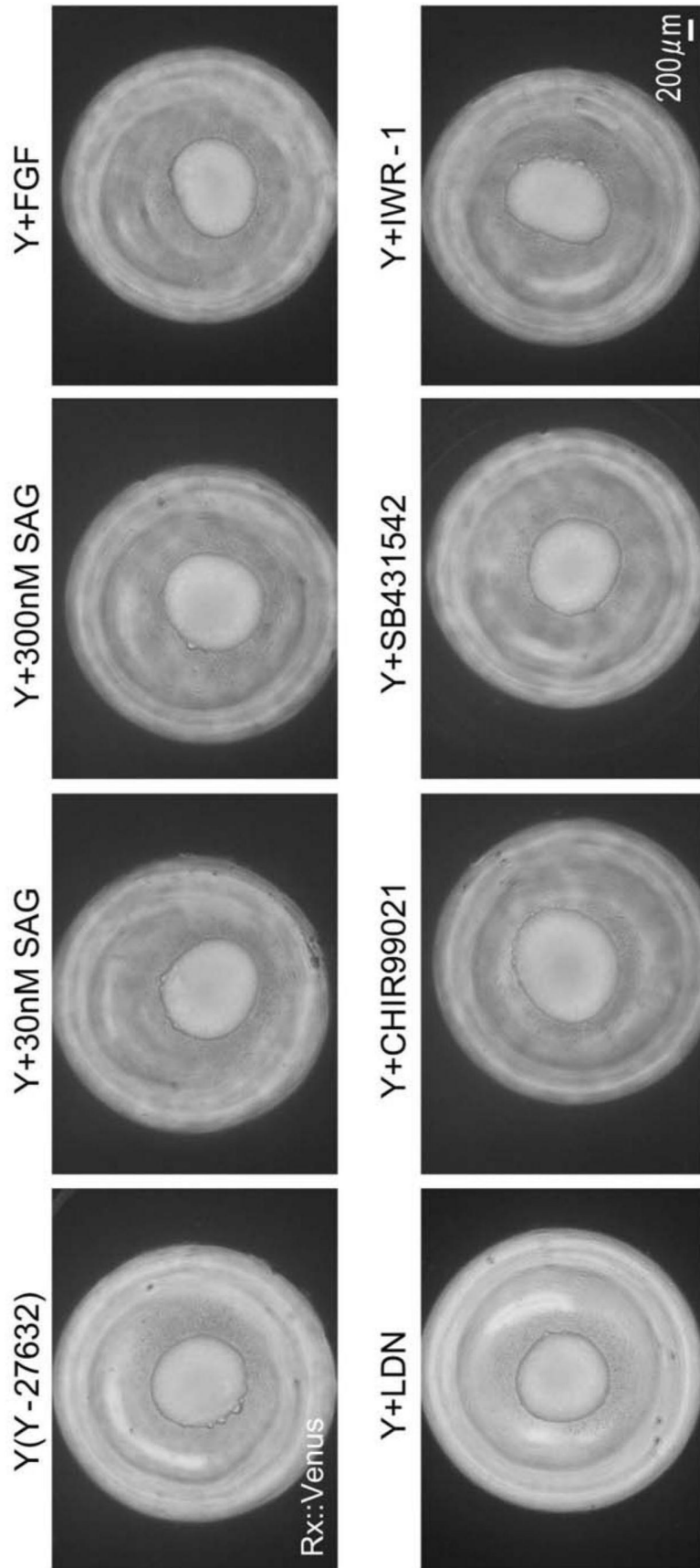


图4

ESC KhES-1株 分散并再次接种后第14天

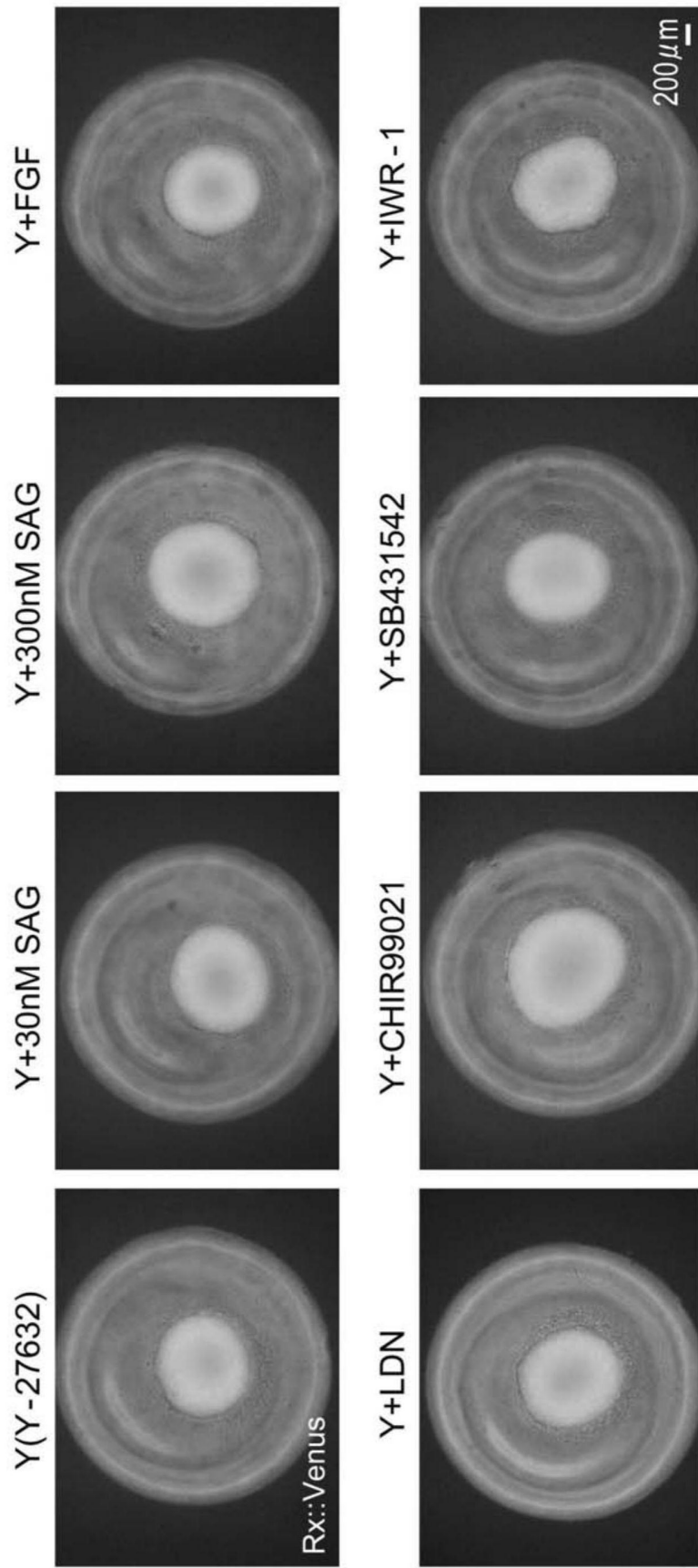


图5

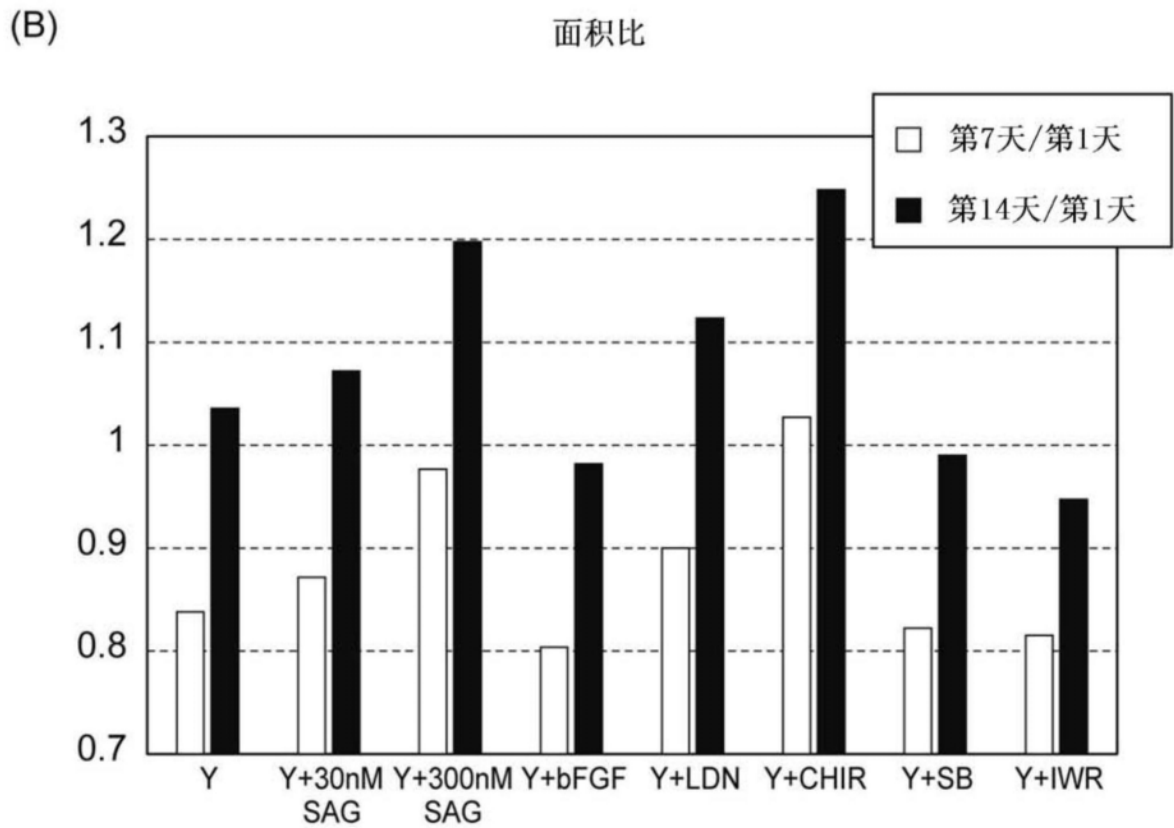
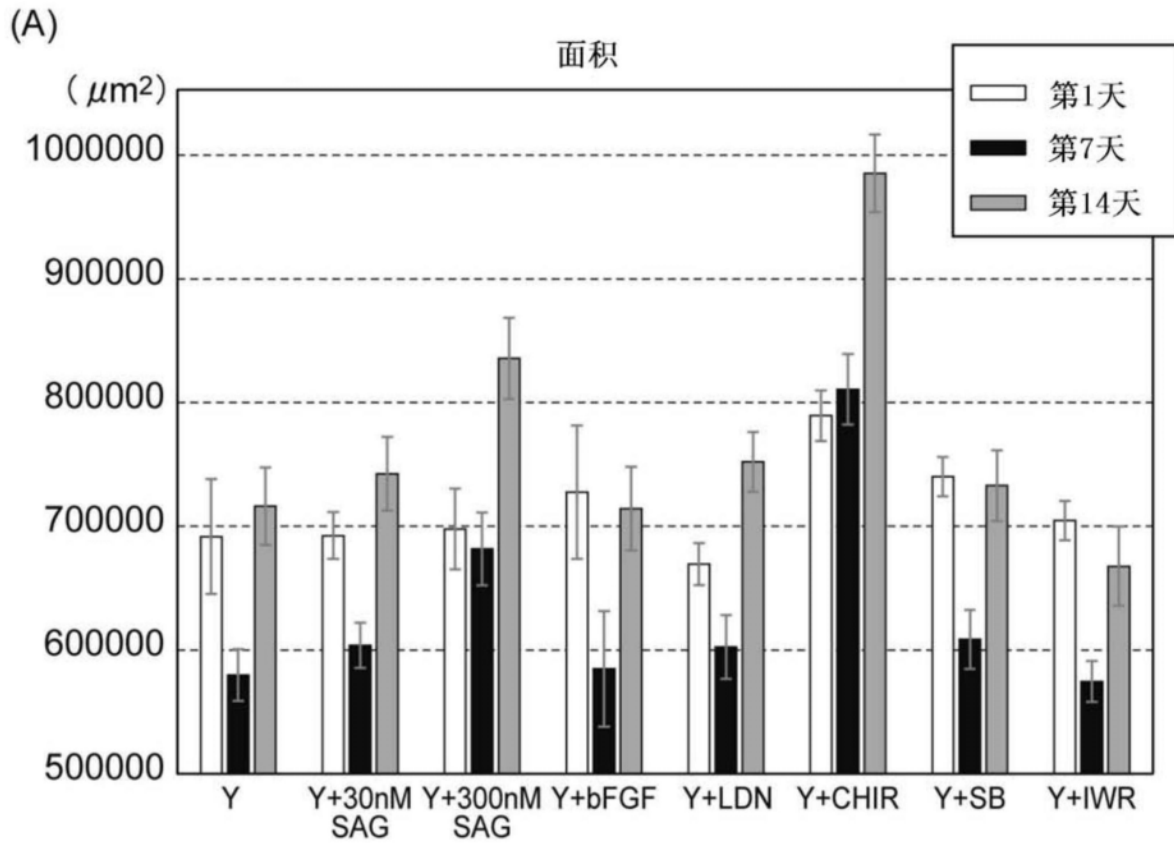


图6

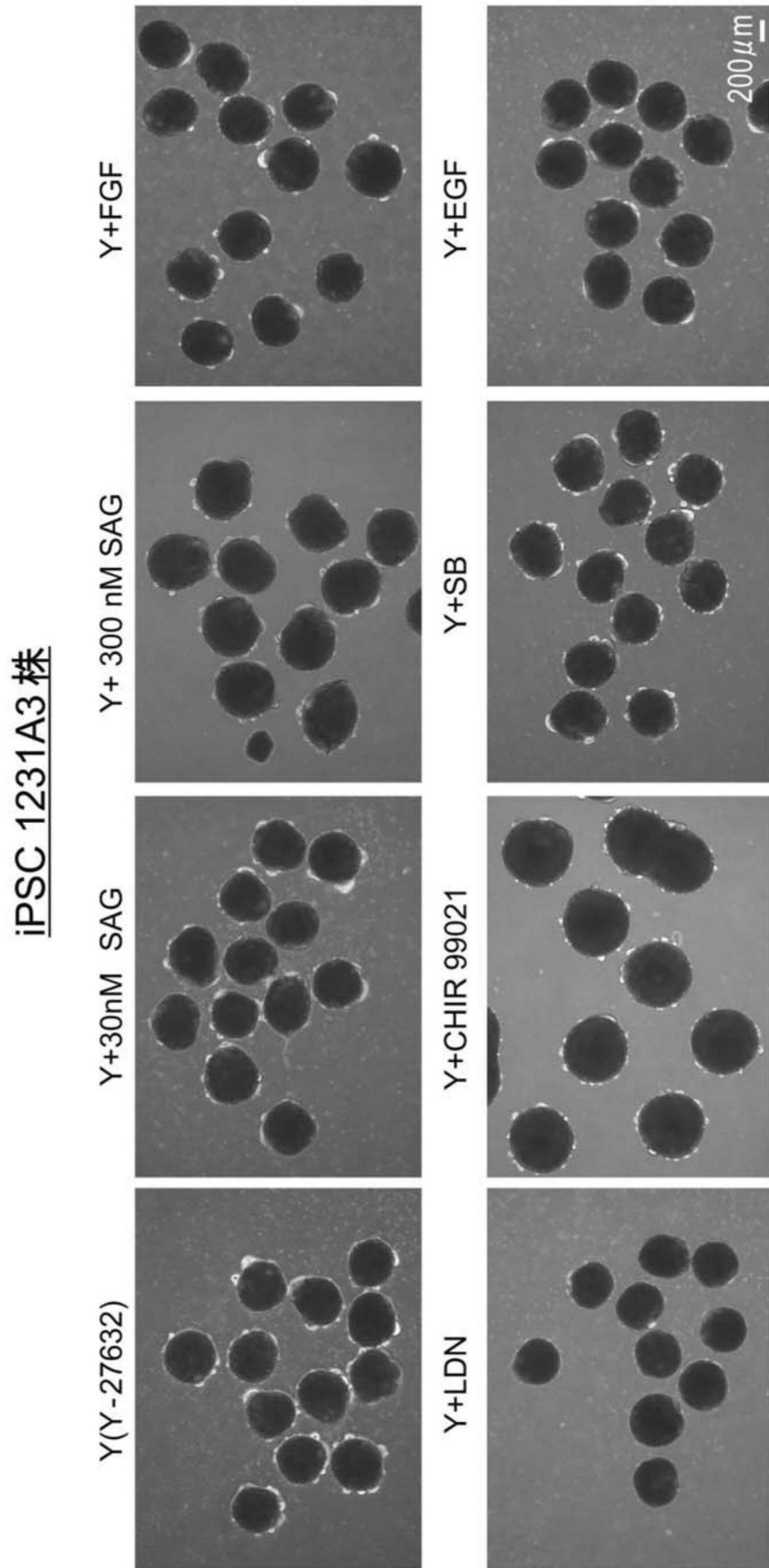


图7

接种后第1天 (dd27)

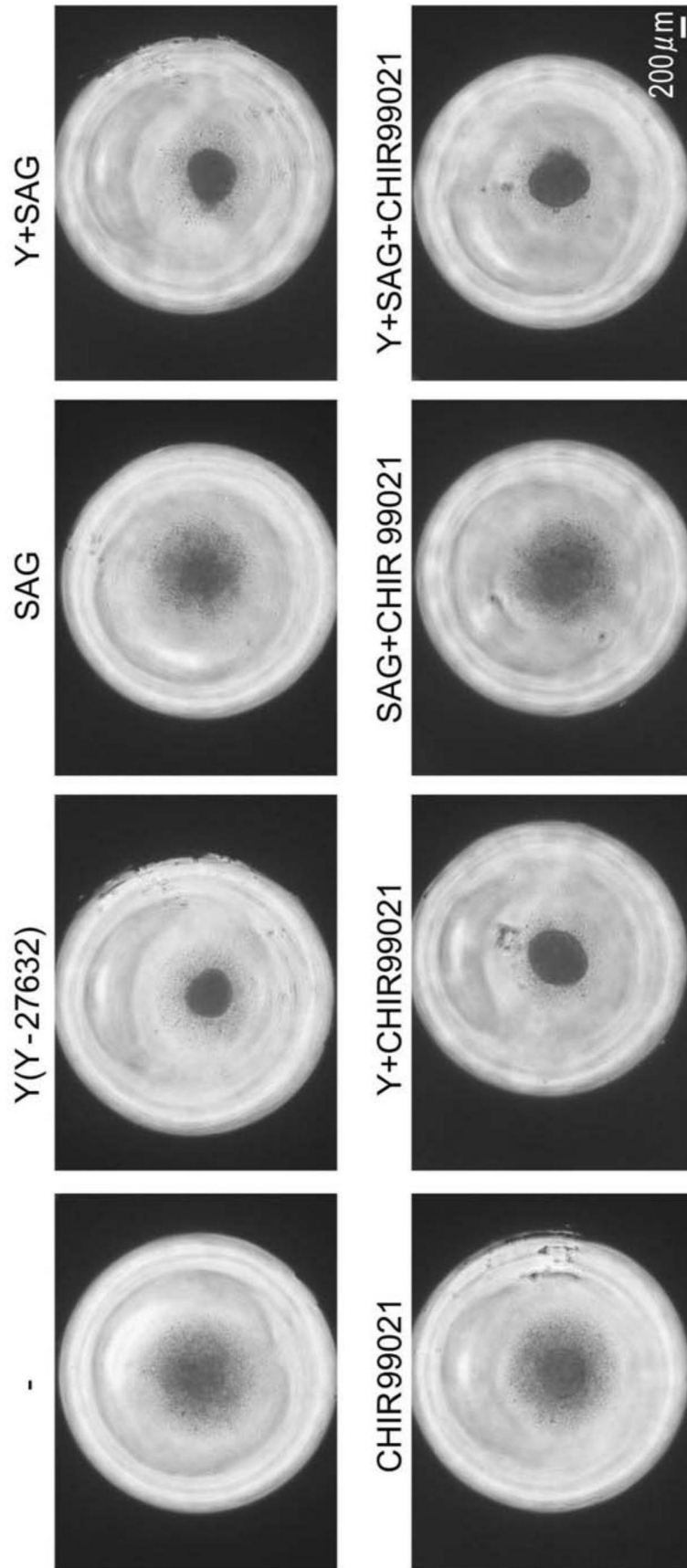


图8

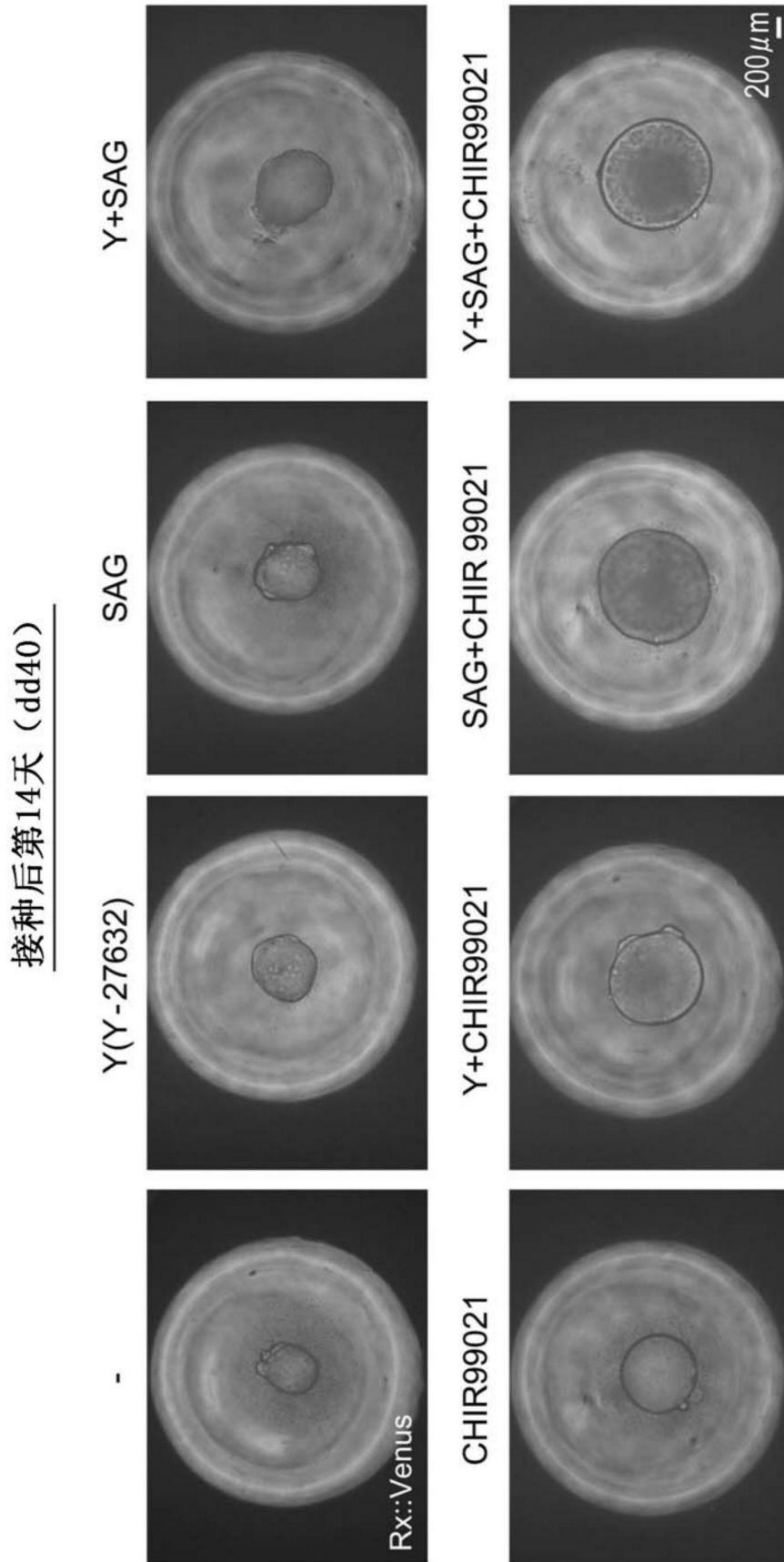


图9

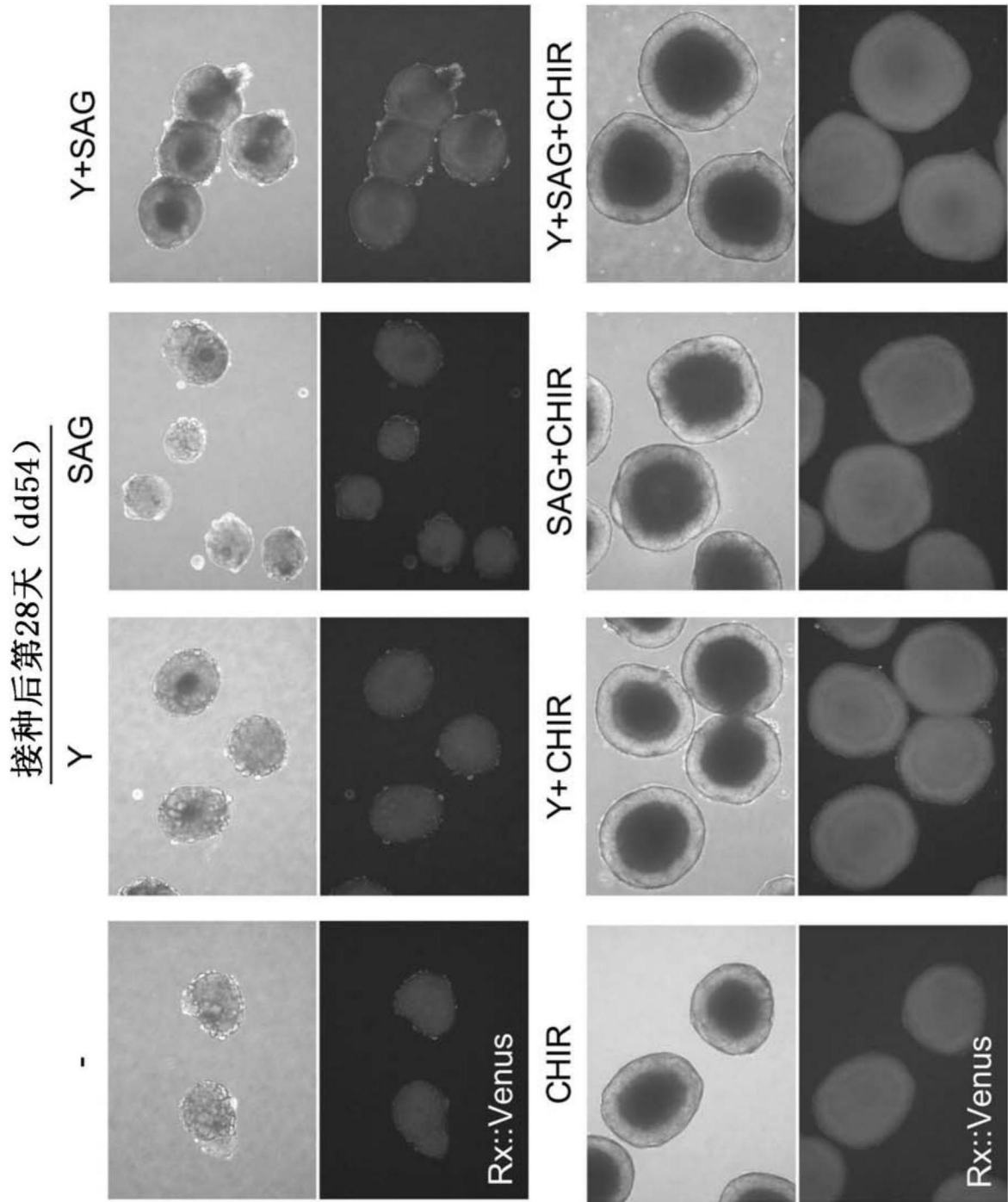


图10

接种后第15天 (dd41)

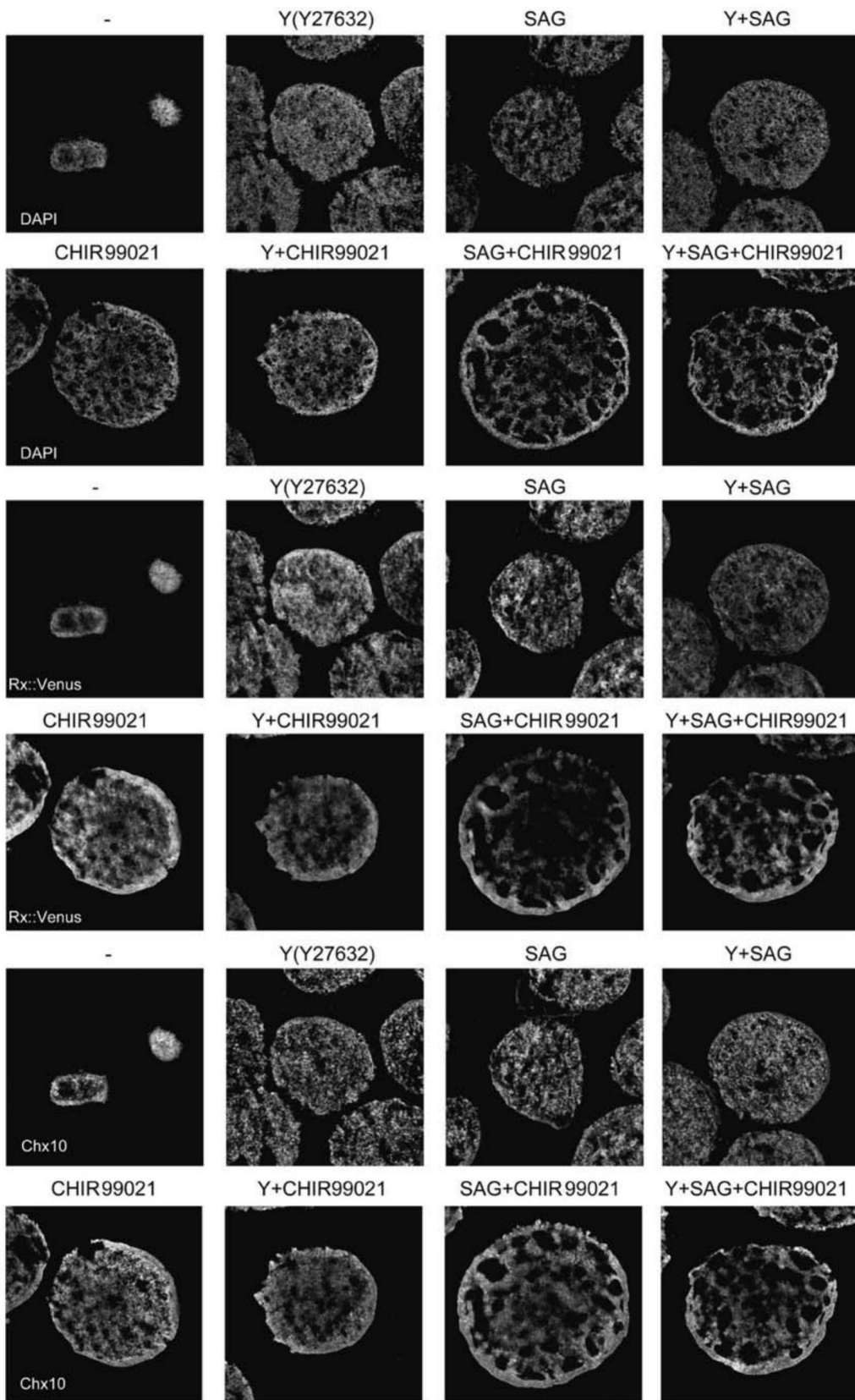


图11

接种后第15天 (dd41)

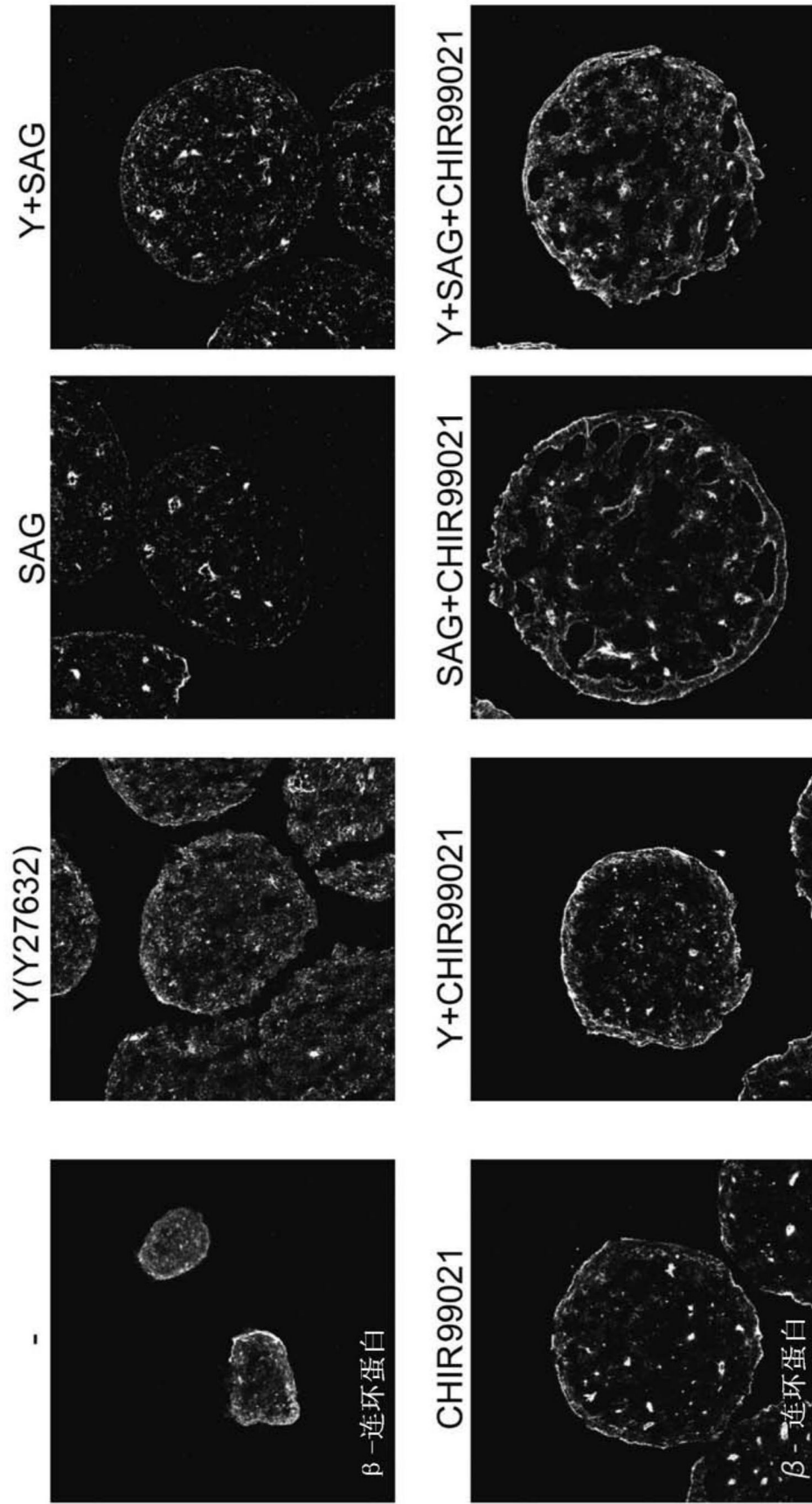


图12

接种后第15天 (dd41)

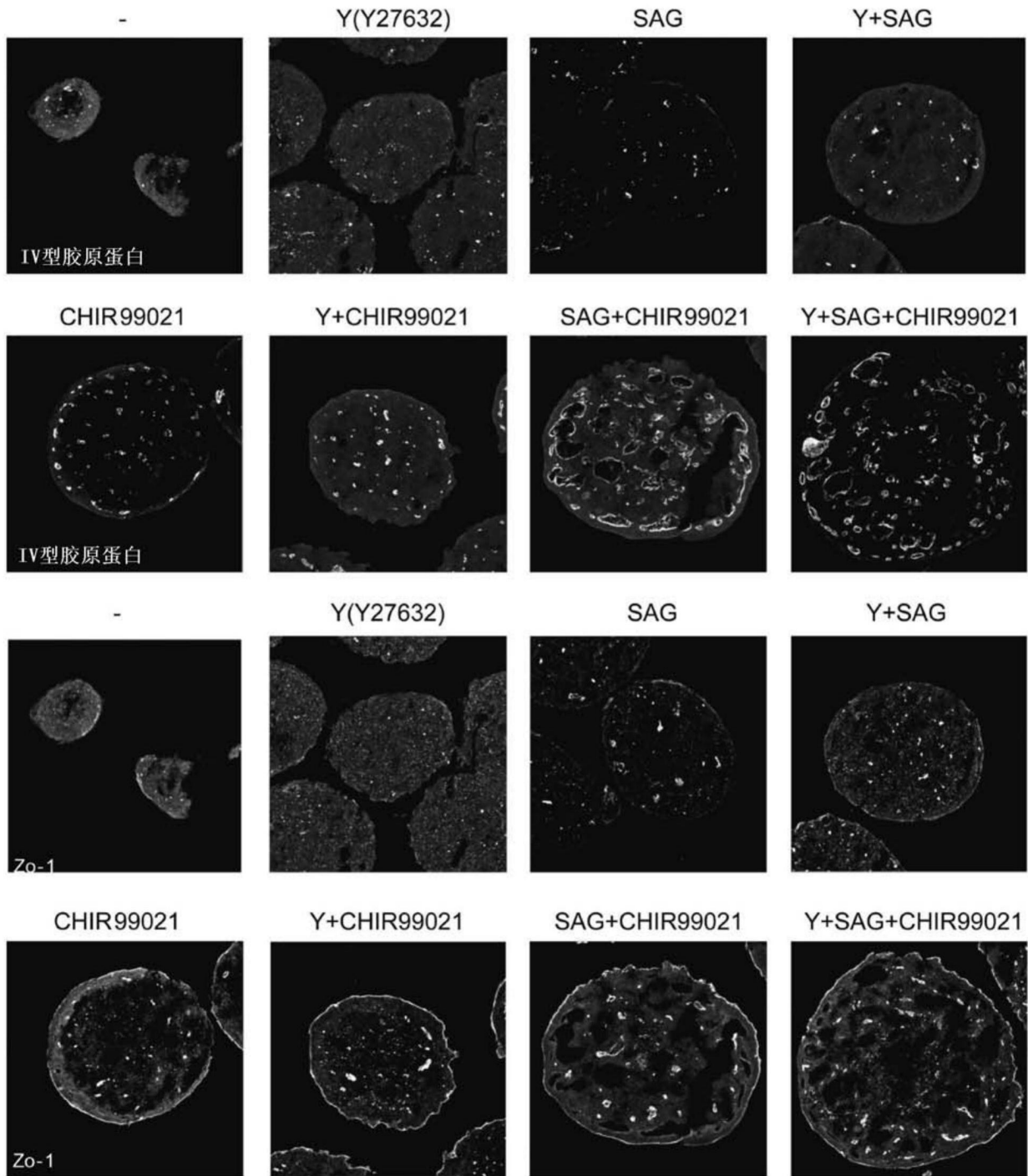


图13



接种后第28天 (dd54)

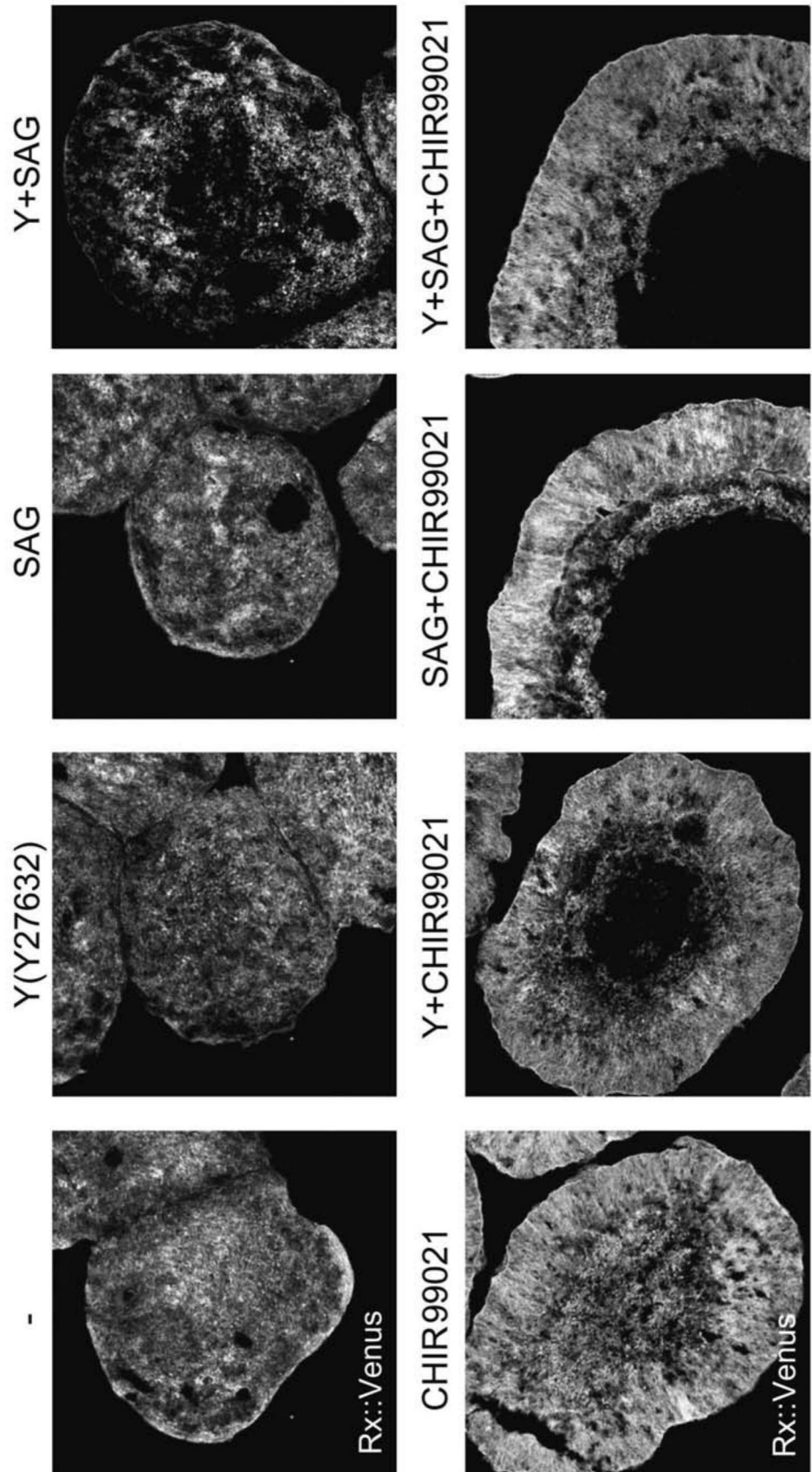


图15

接种后第28天 (dd54)

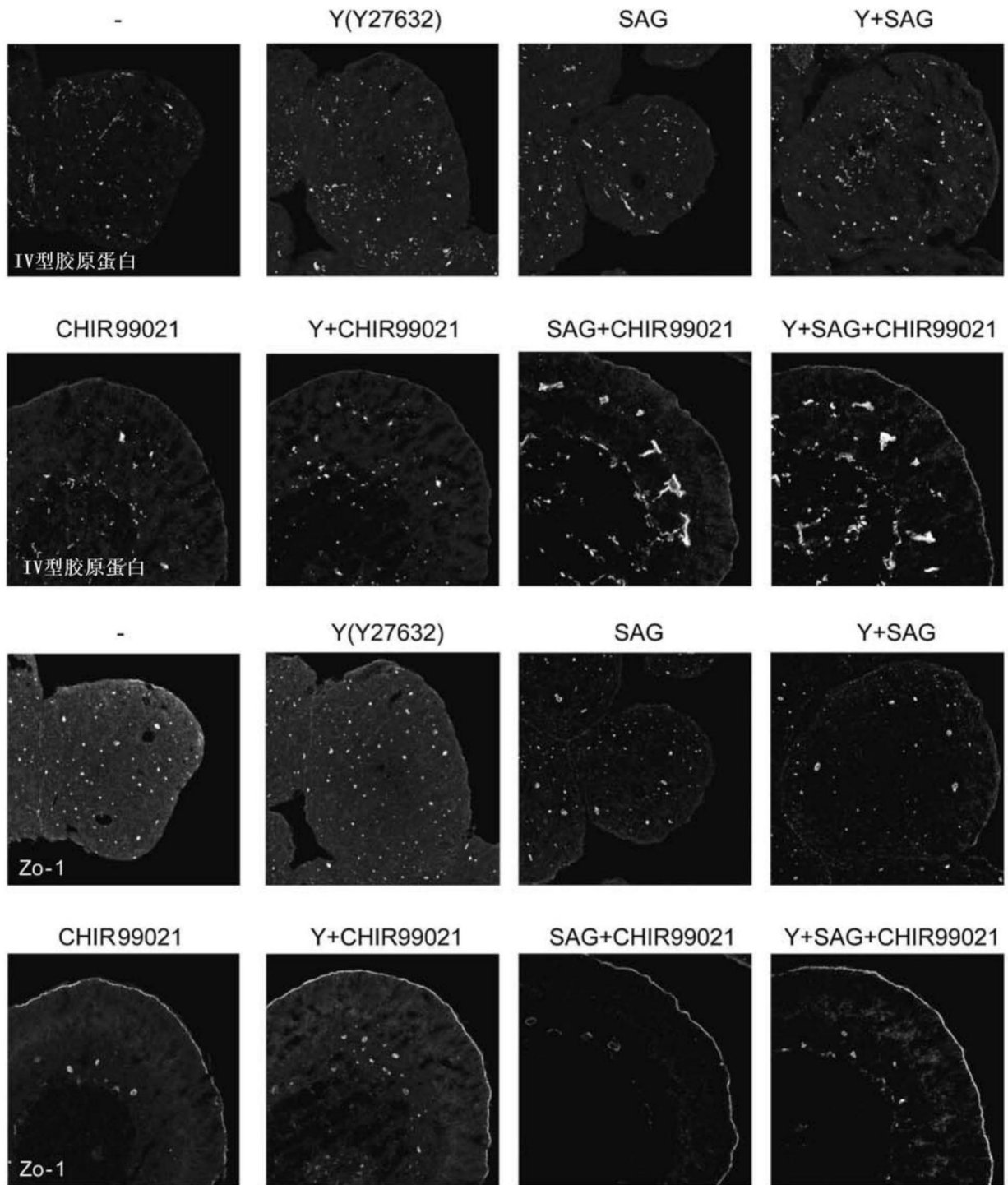


图16

接种后第28天 (dd54)

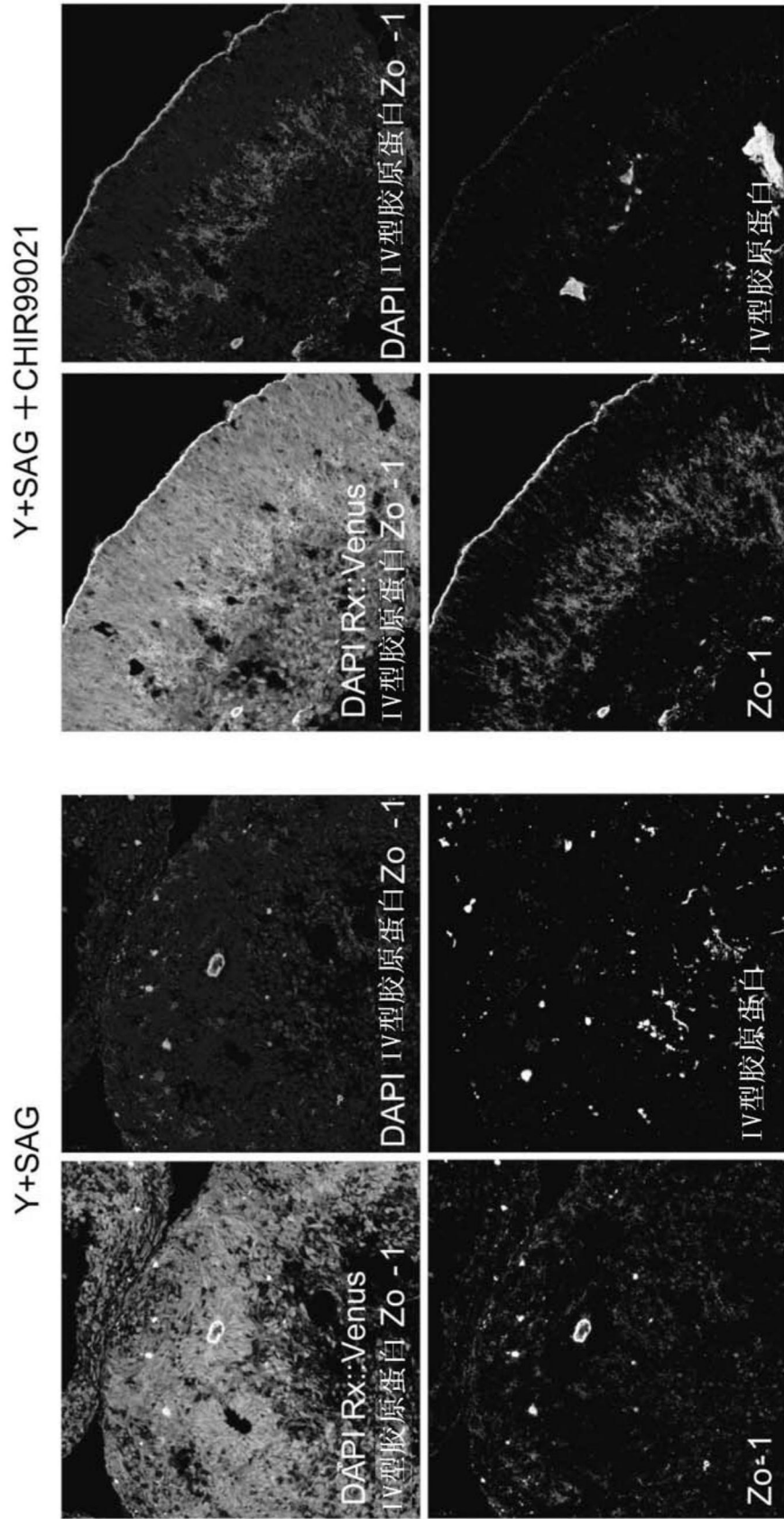


图17

接种后第28天 (dd54)

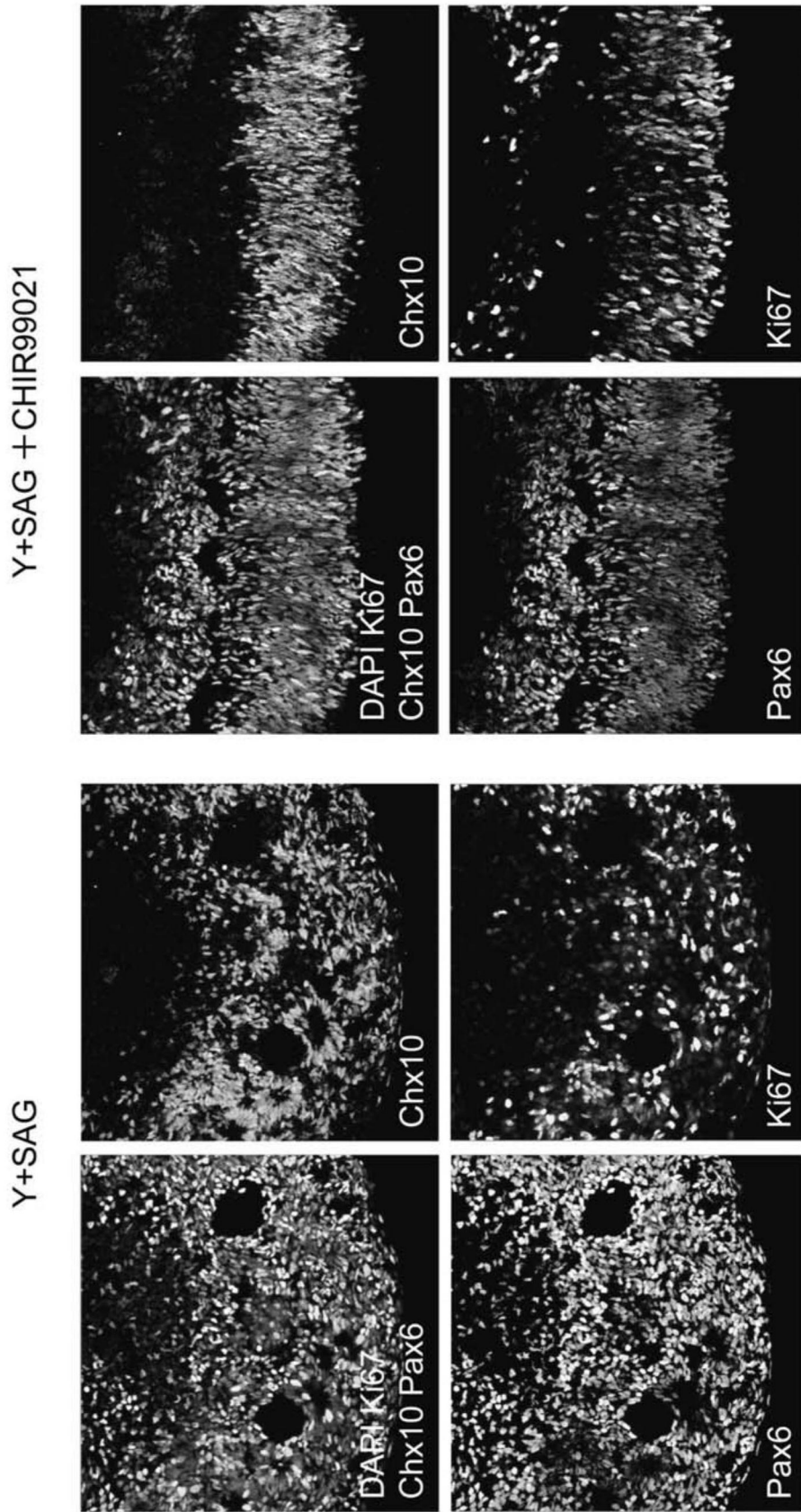


图18

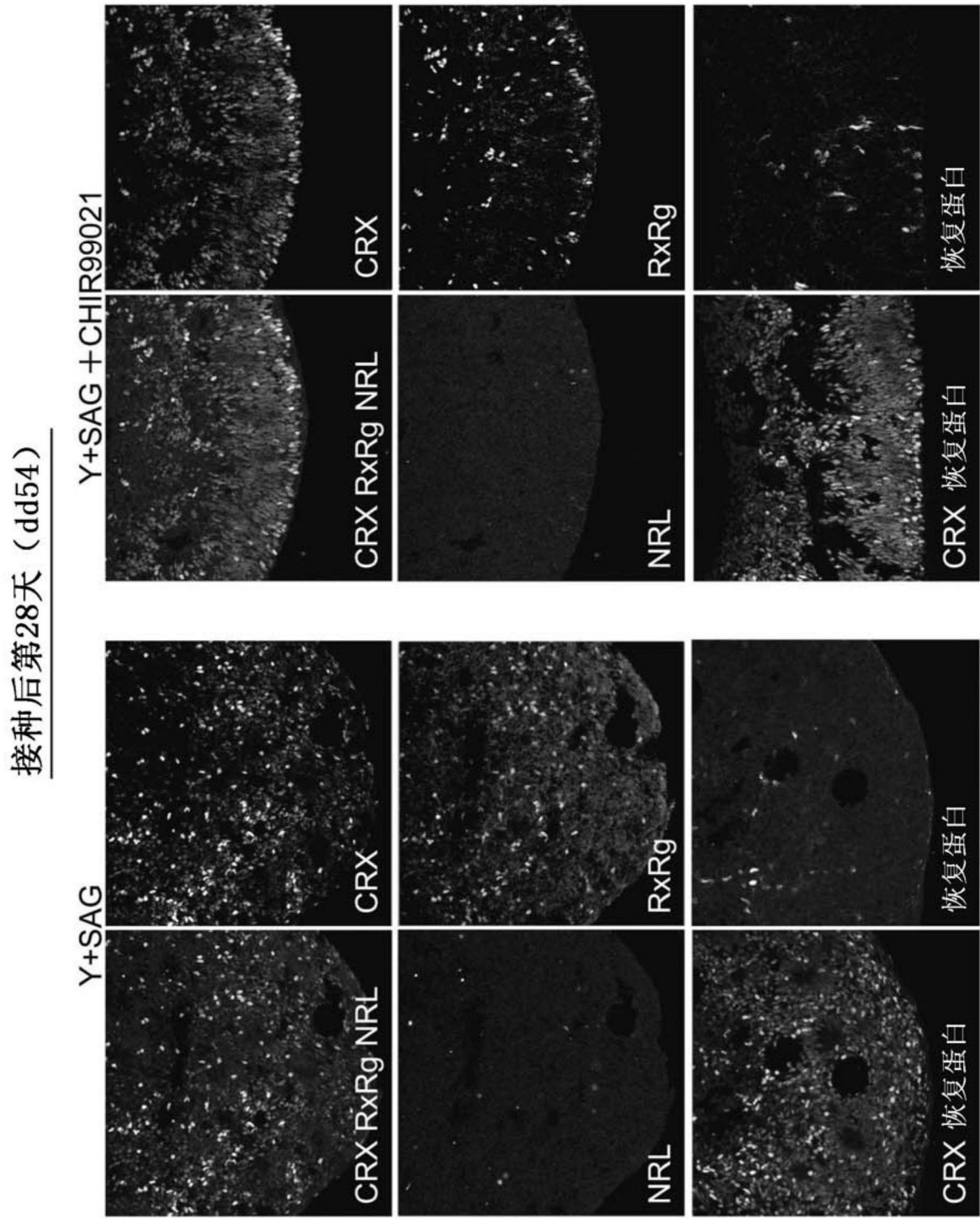


图19

接种后第28天 (dd54)

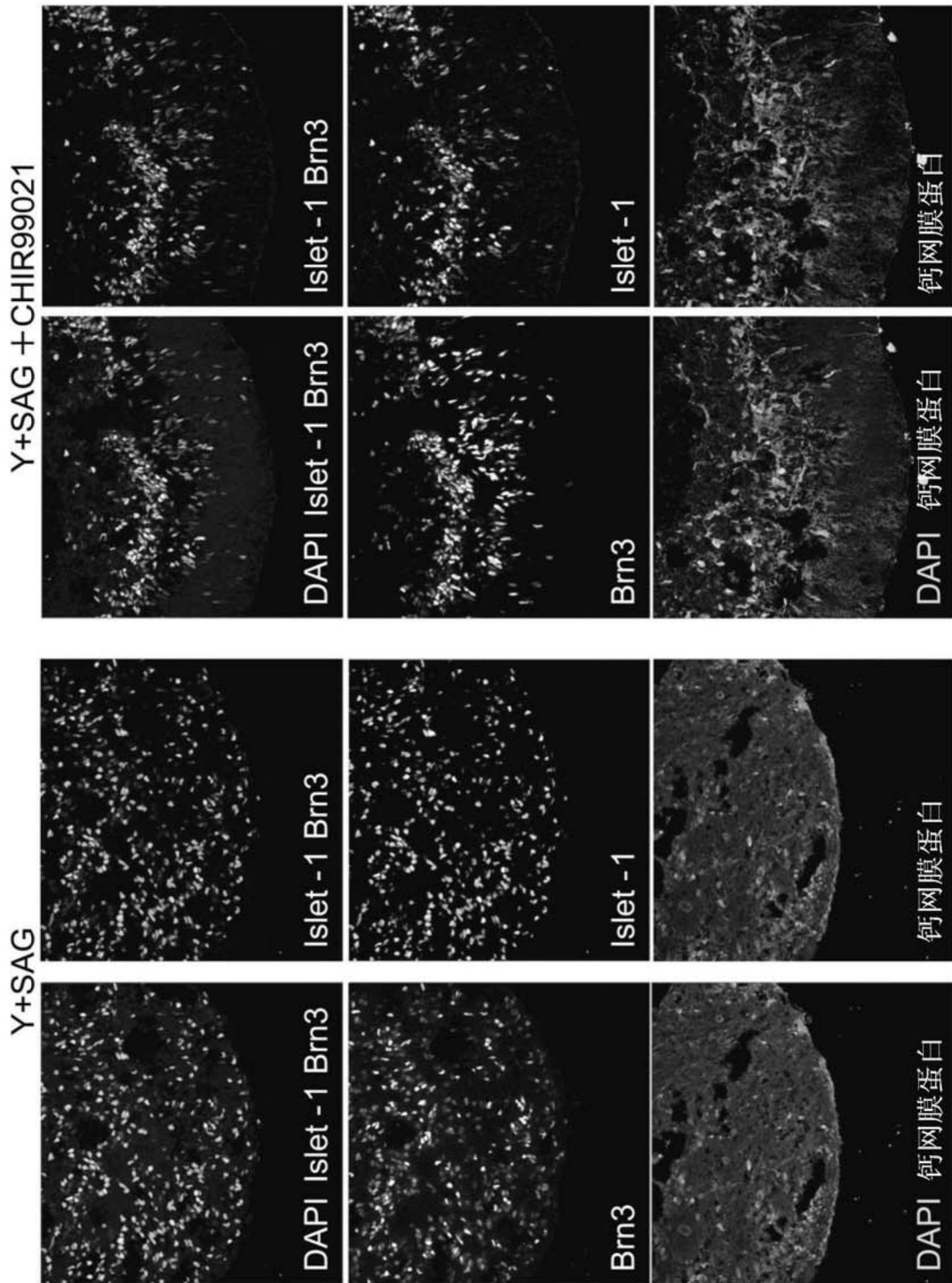


图20

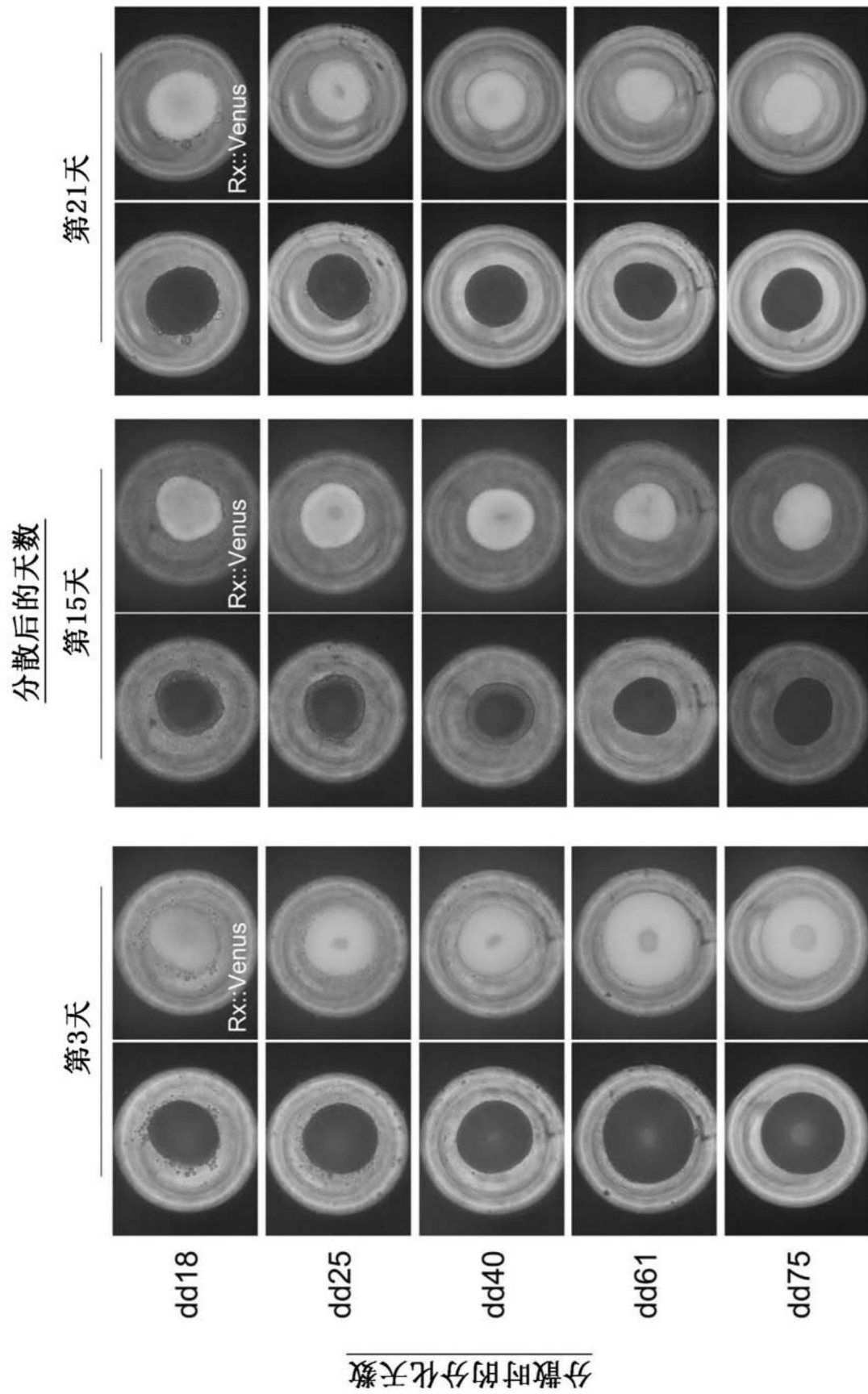


图21

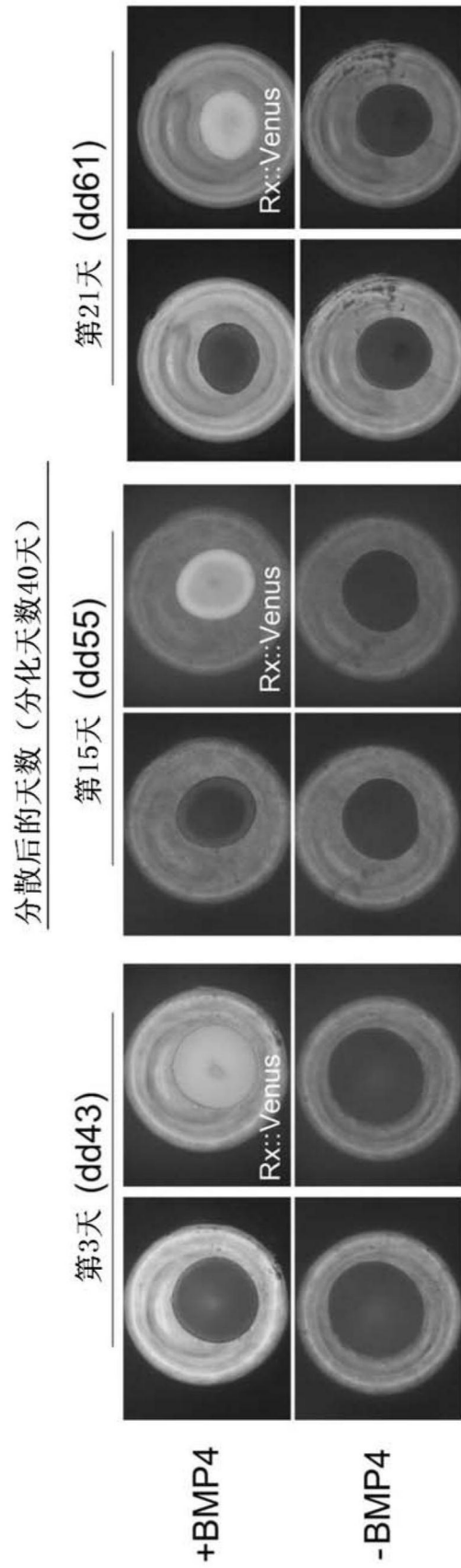


图22

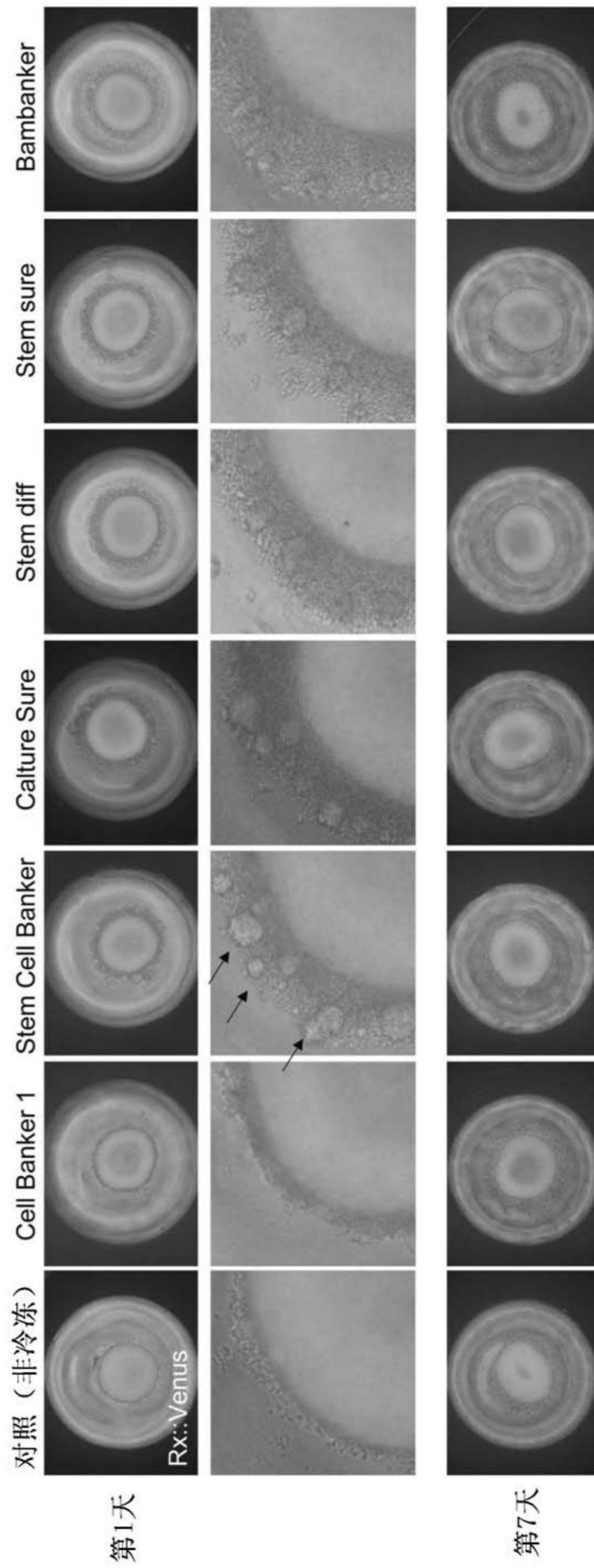


图23

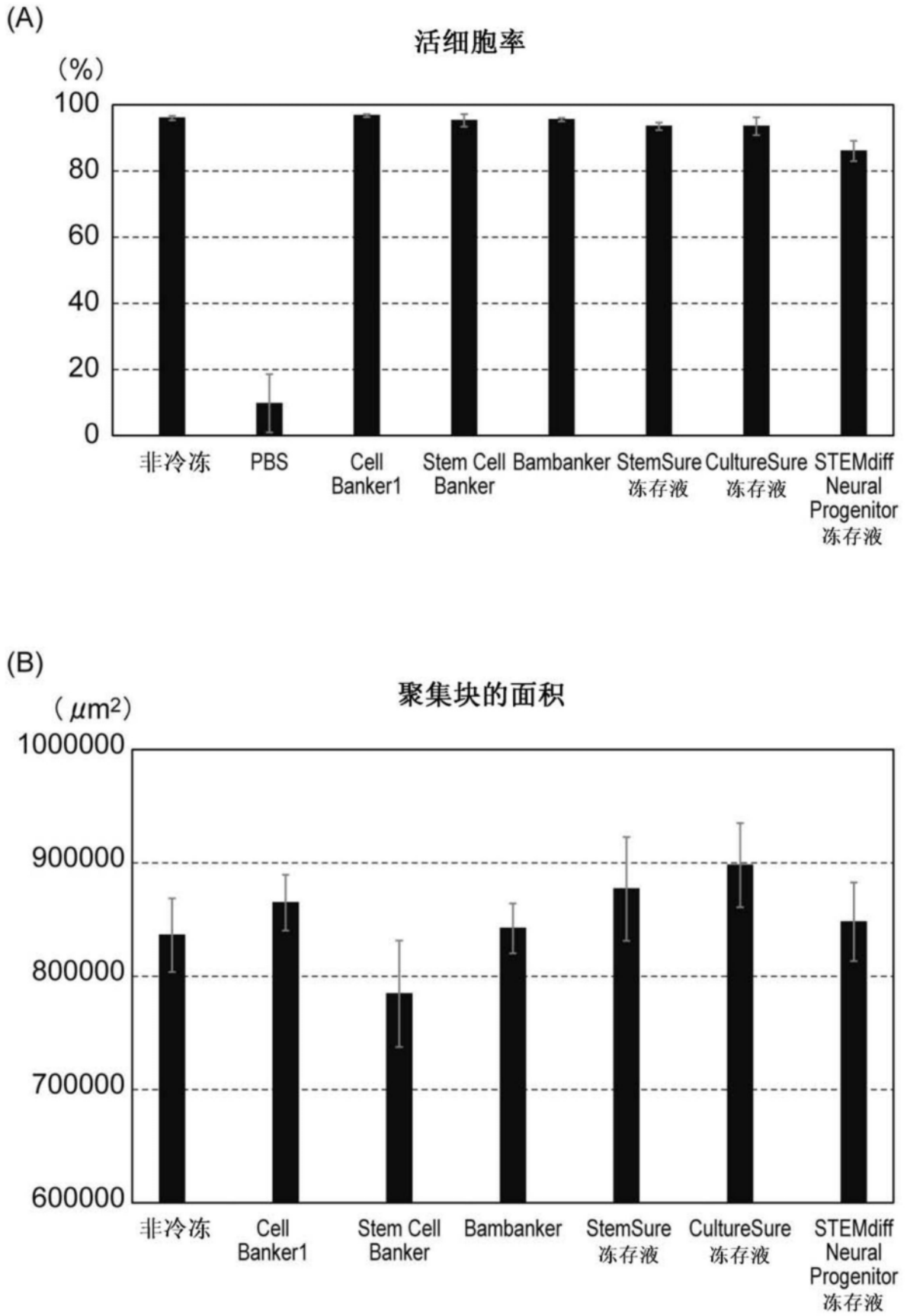


图24

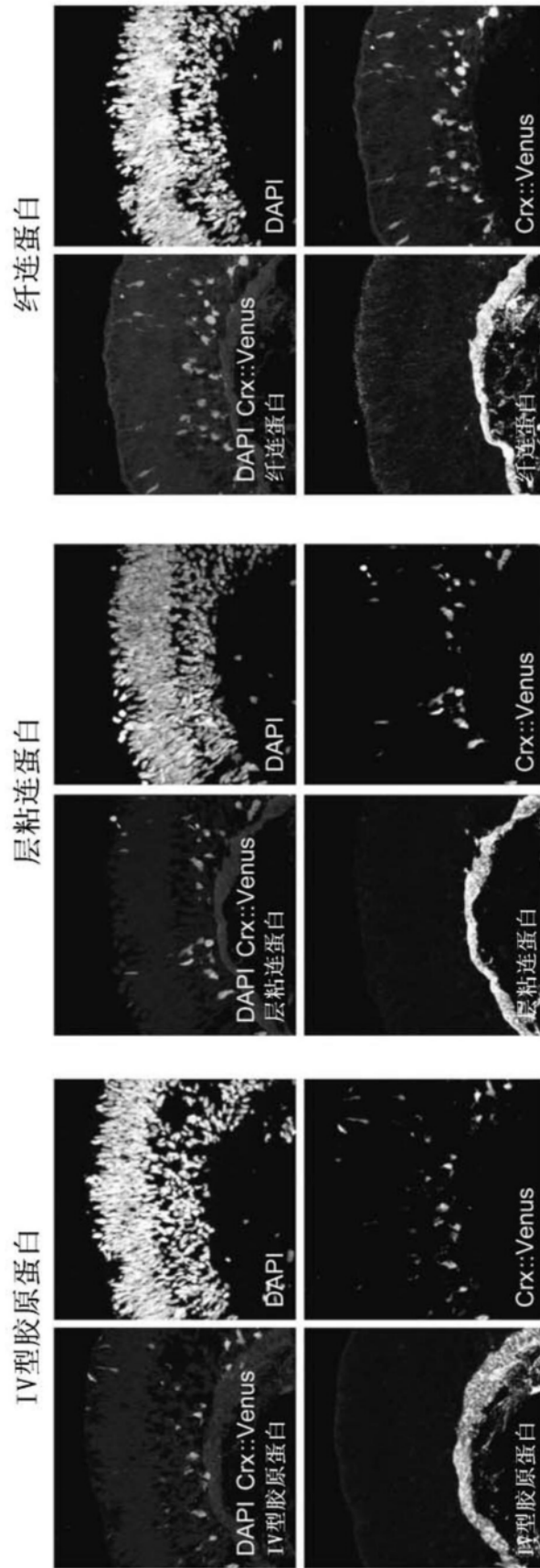


图25

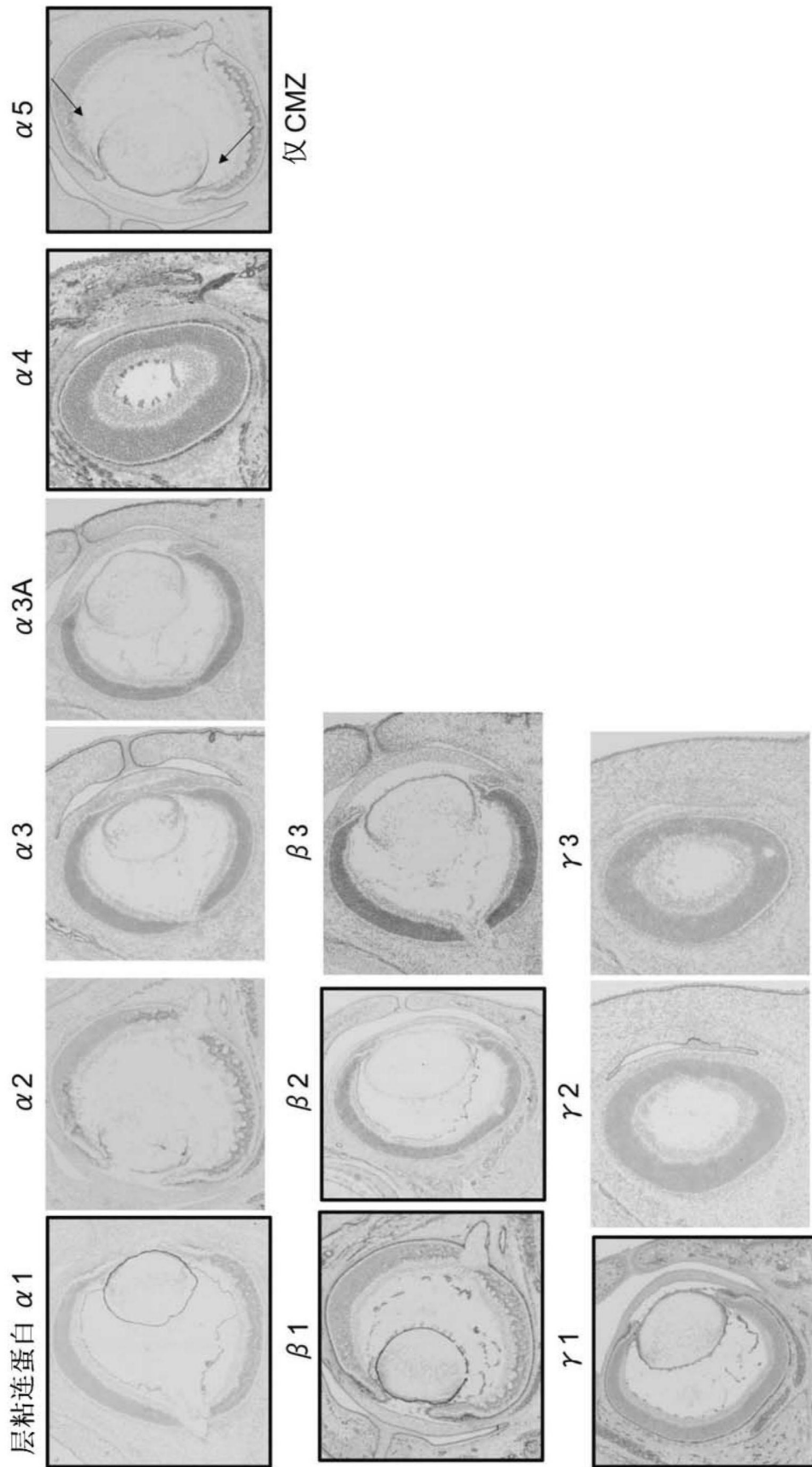


图26

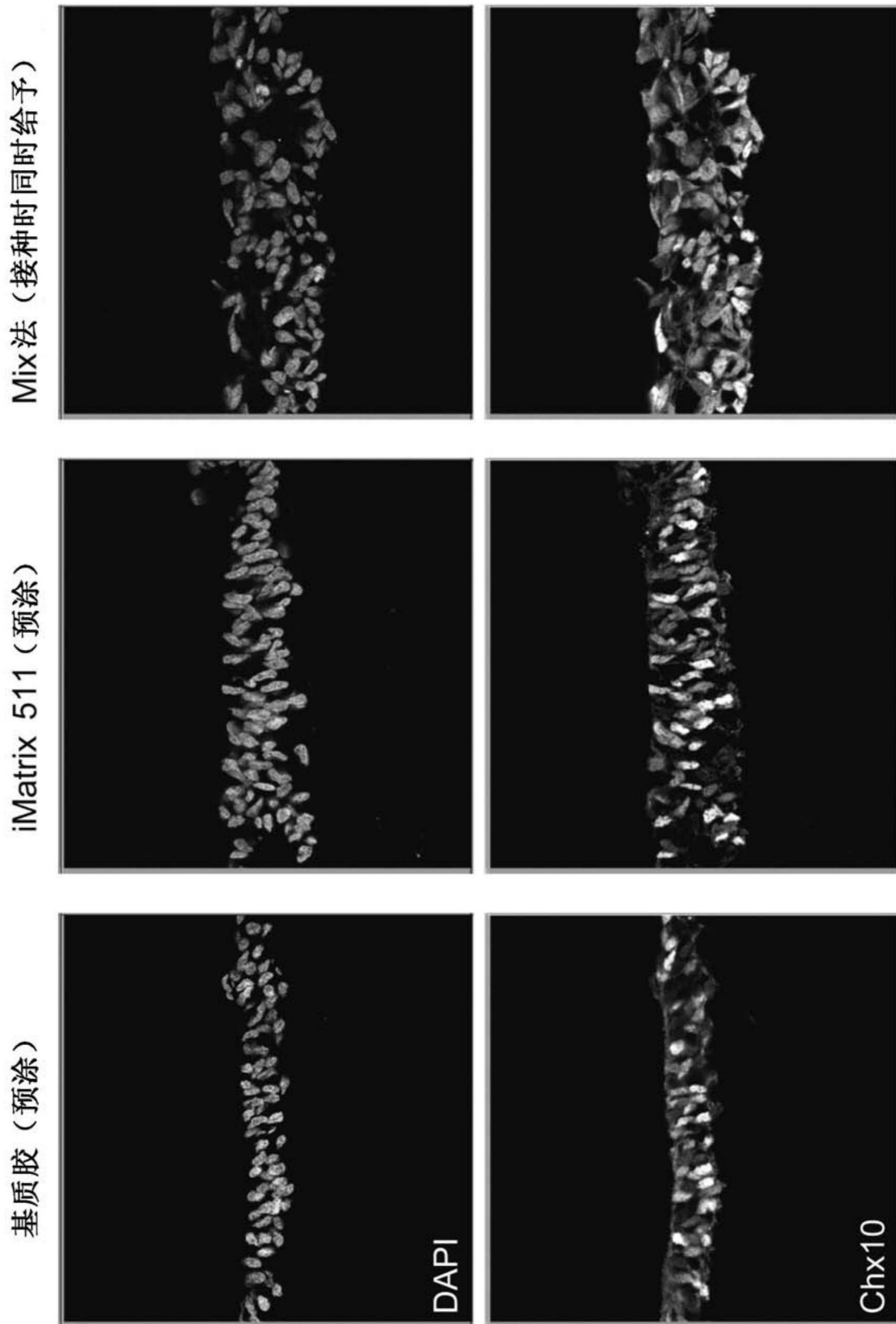


图27



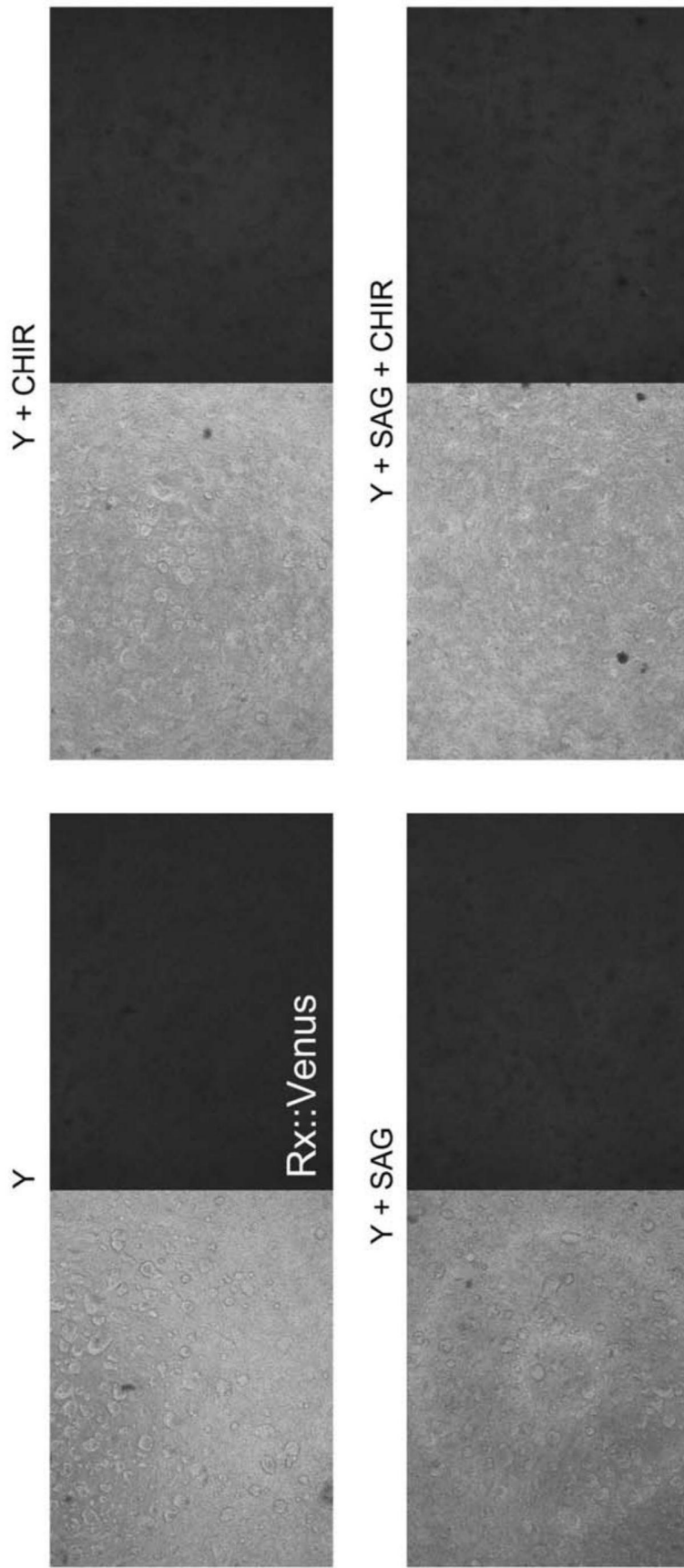


图29

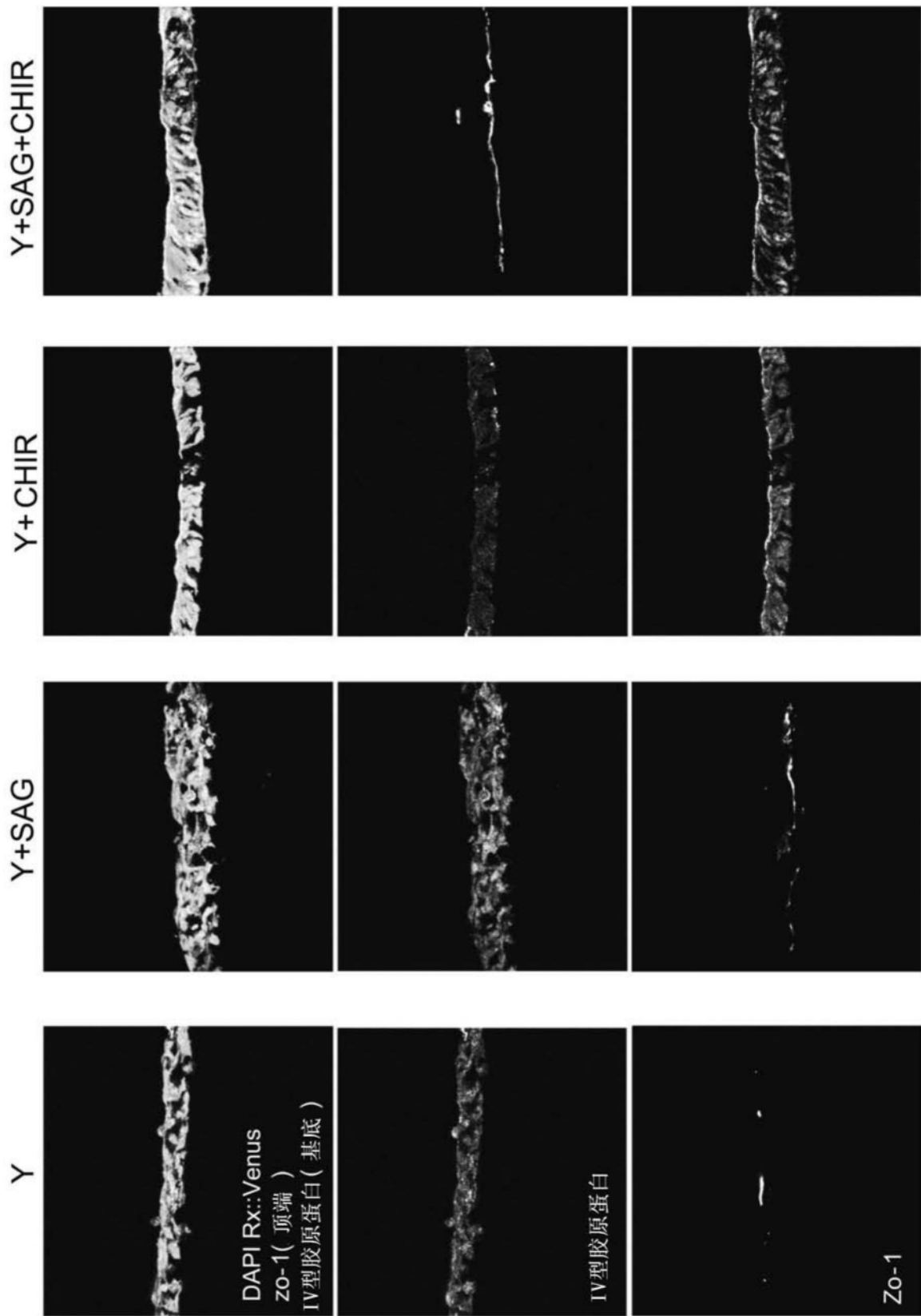


图30

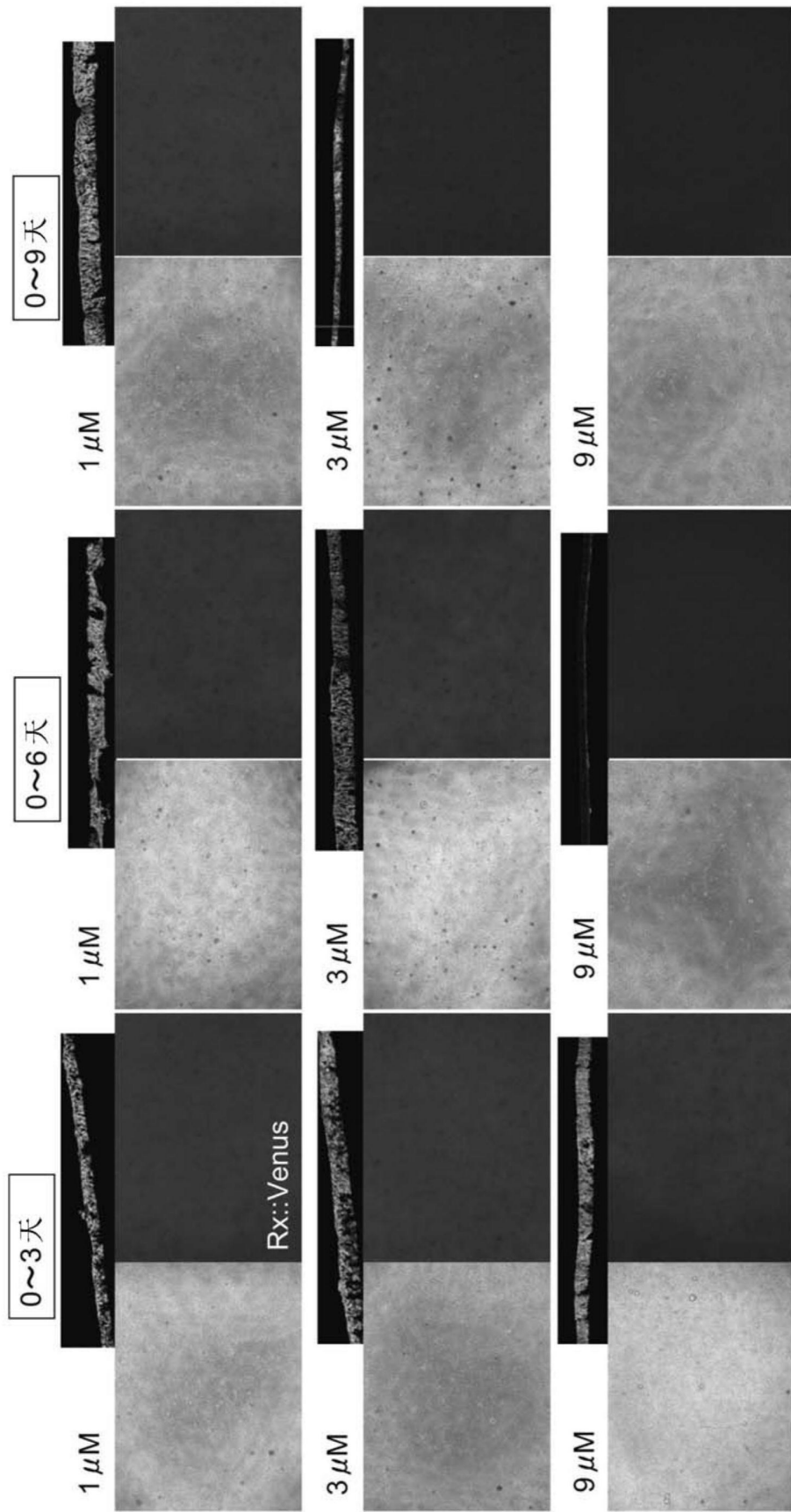


图31

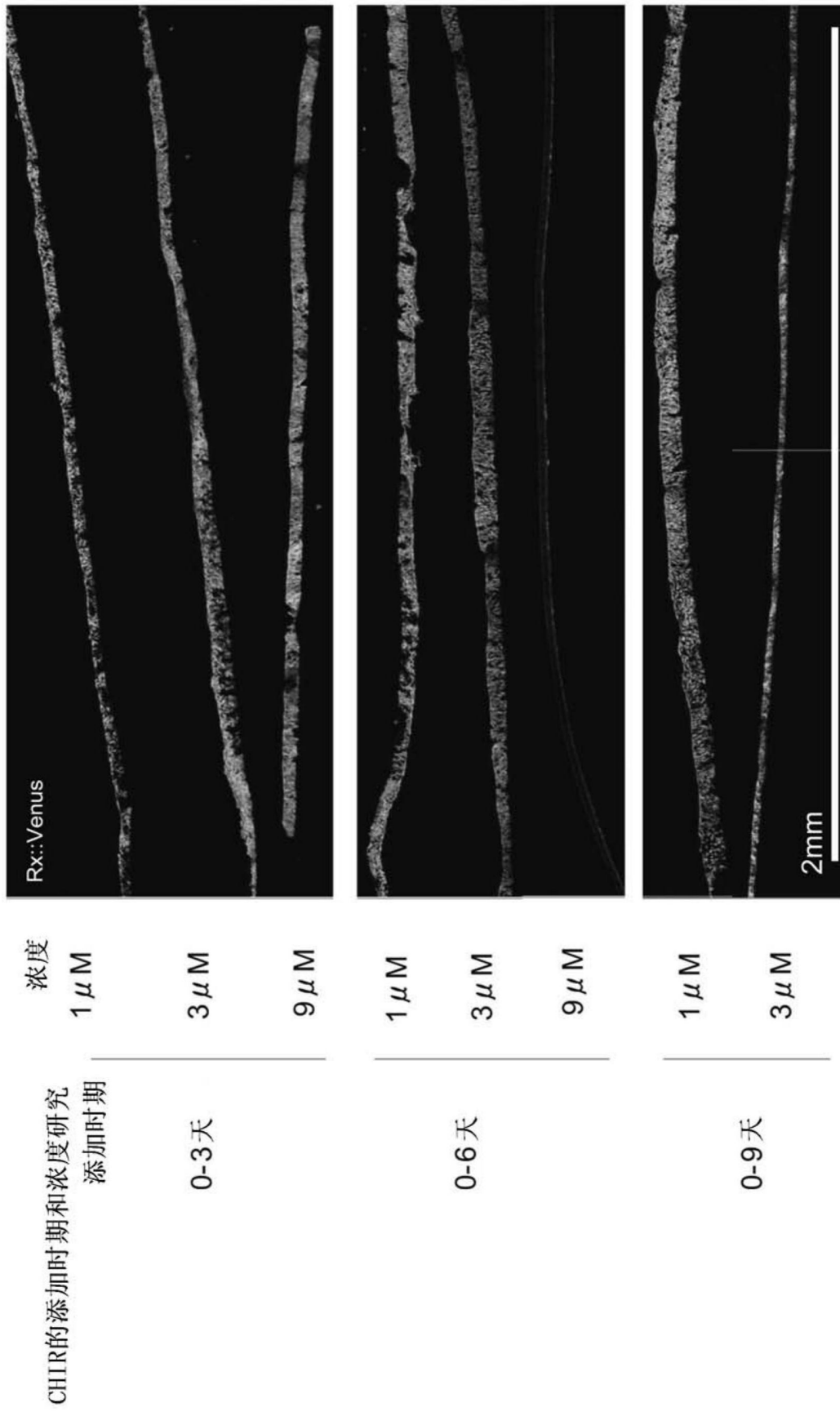


图32



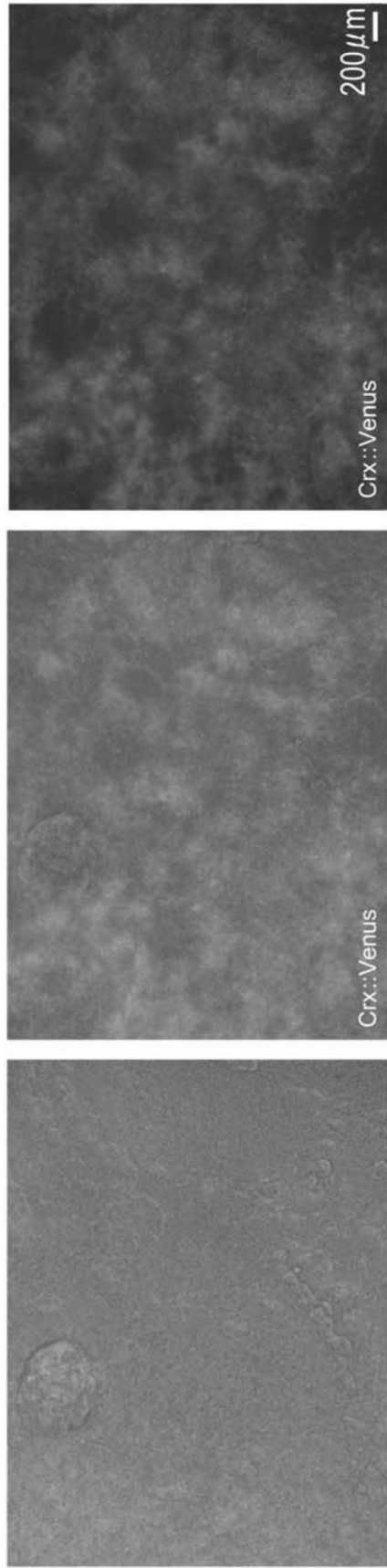


图34

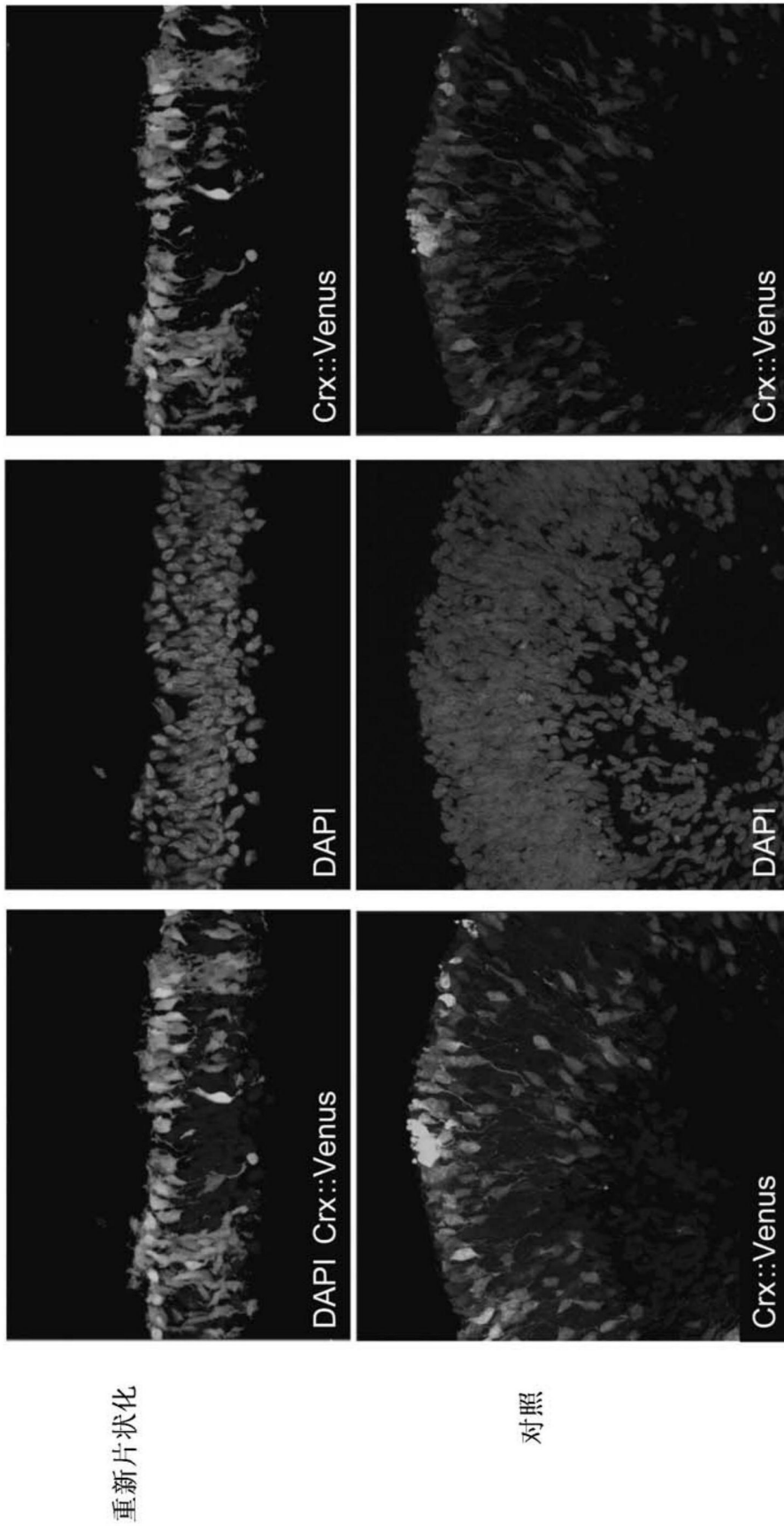


图35

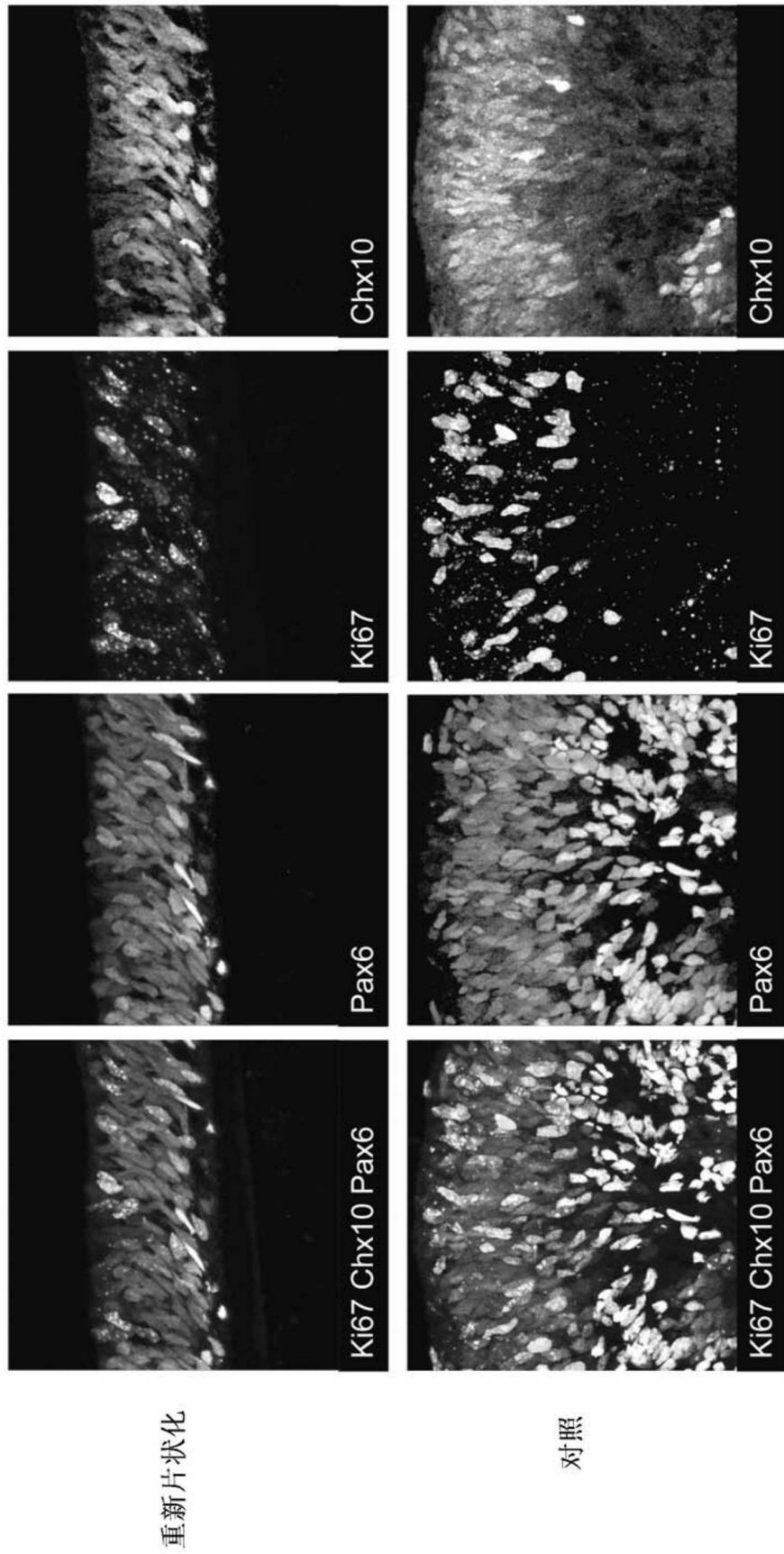


图36

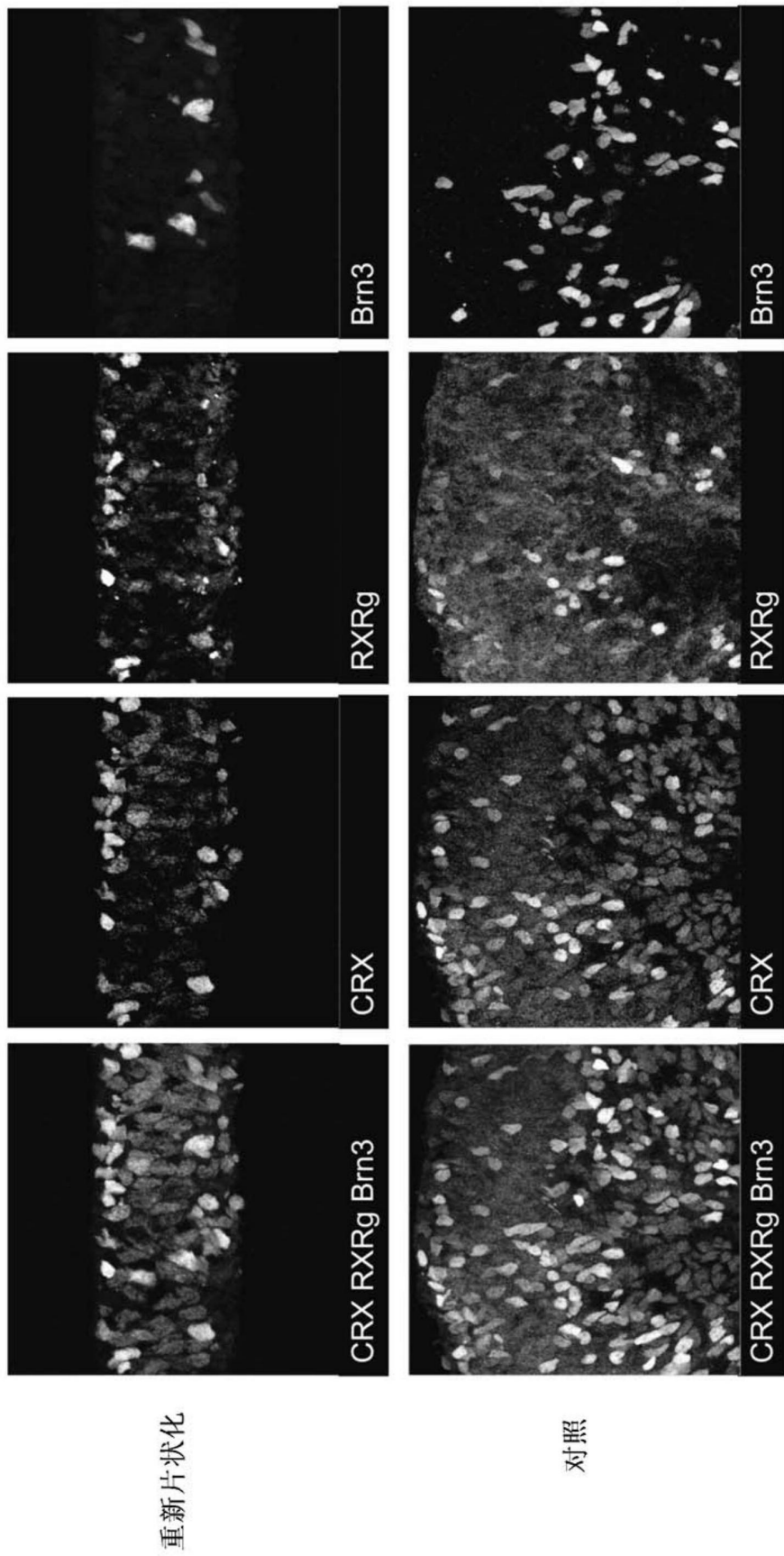


图37

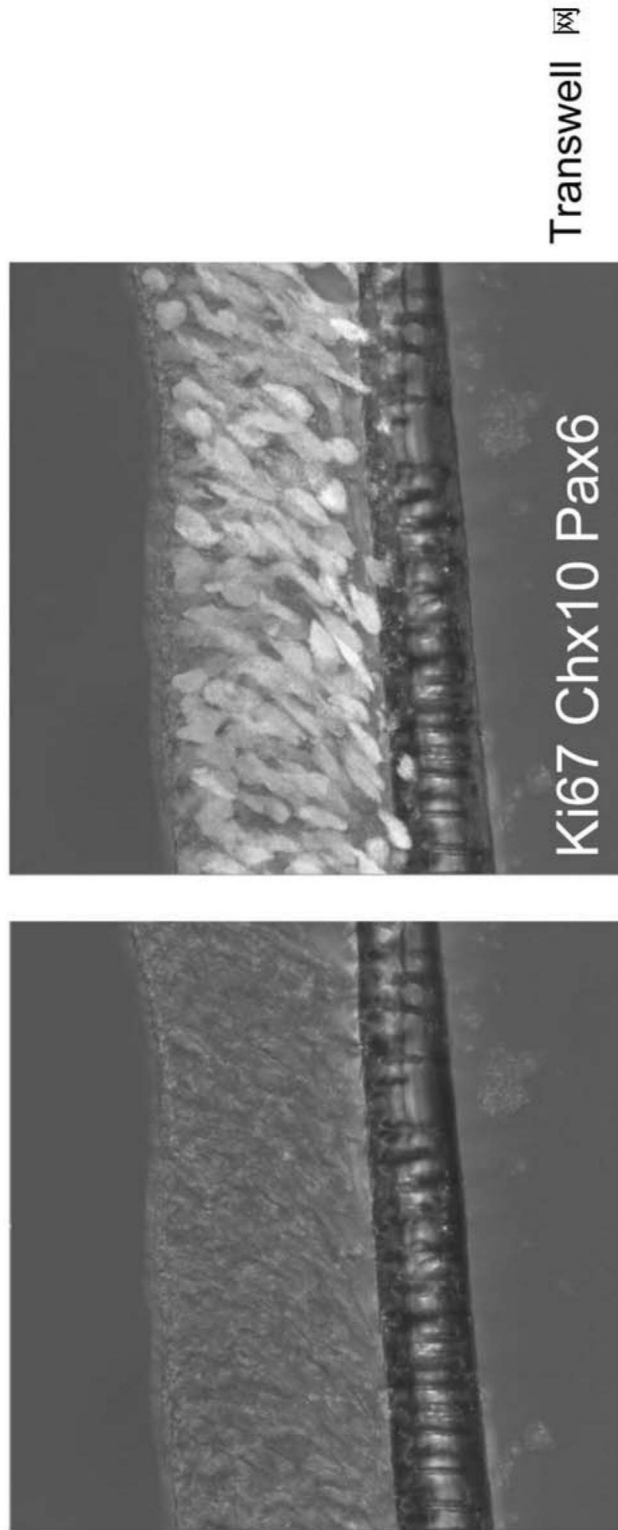


图38

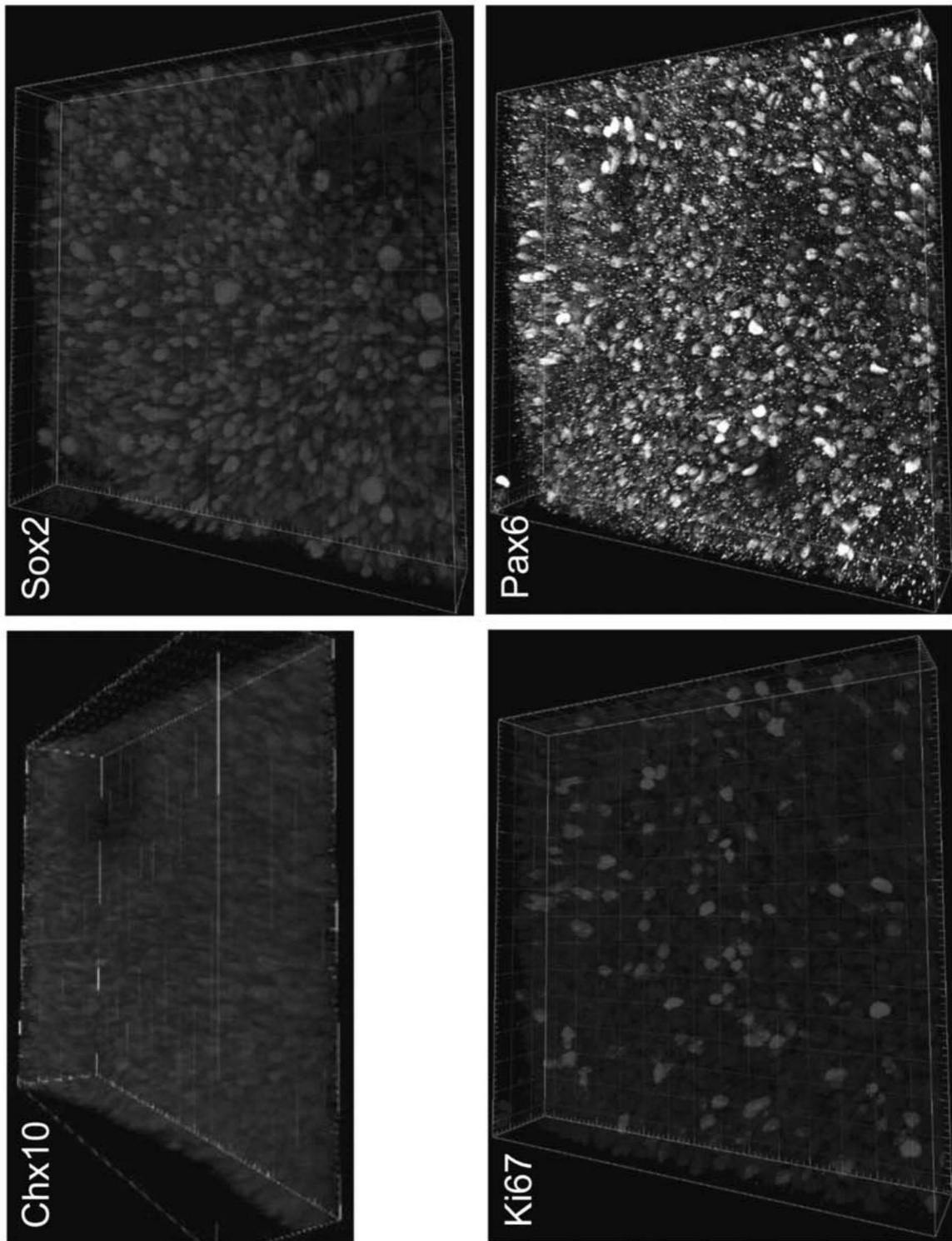


图39

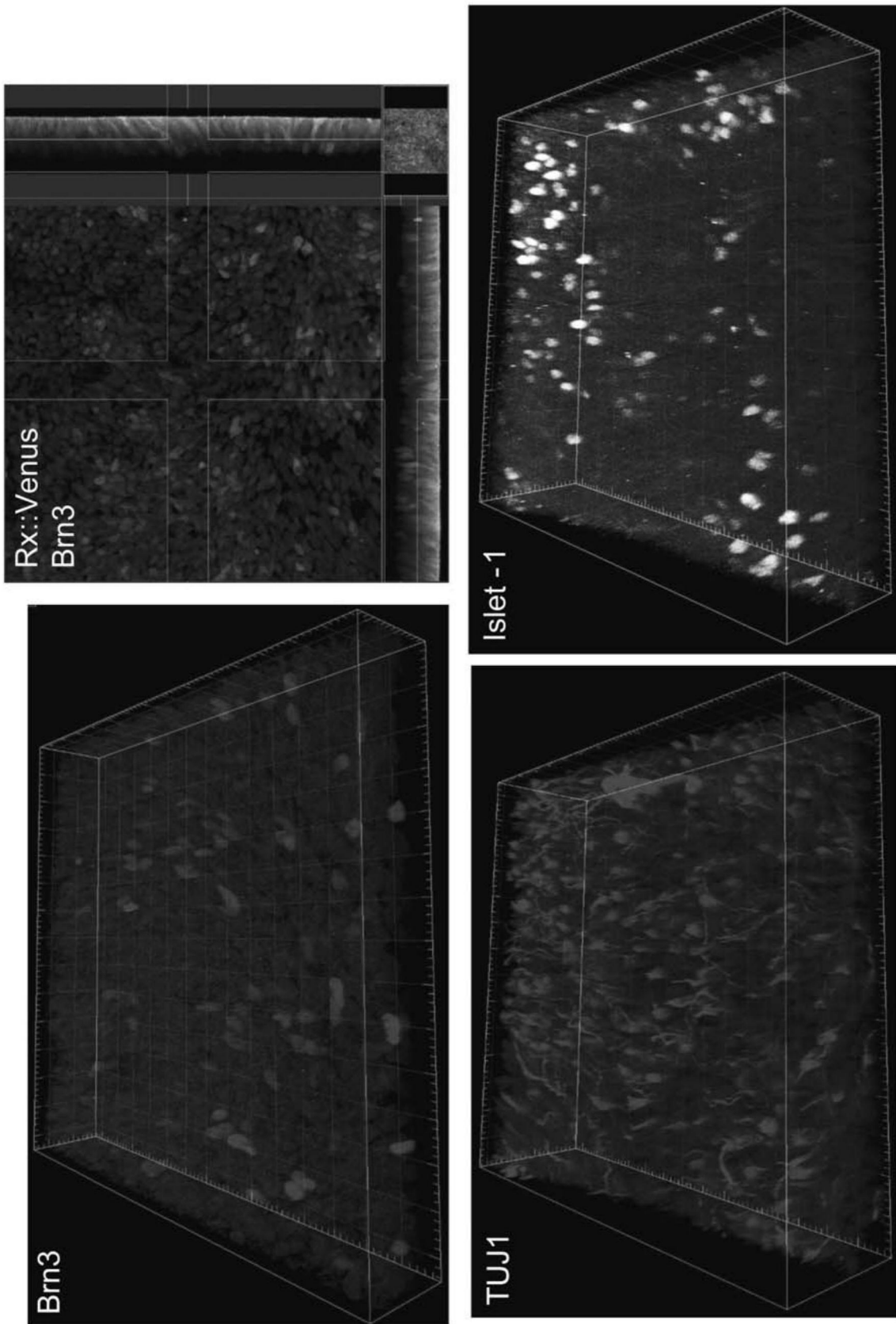


图40

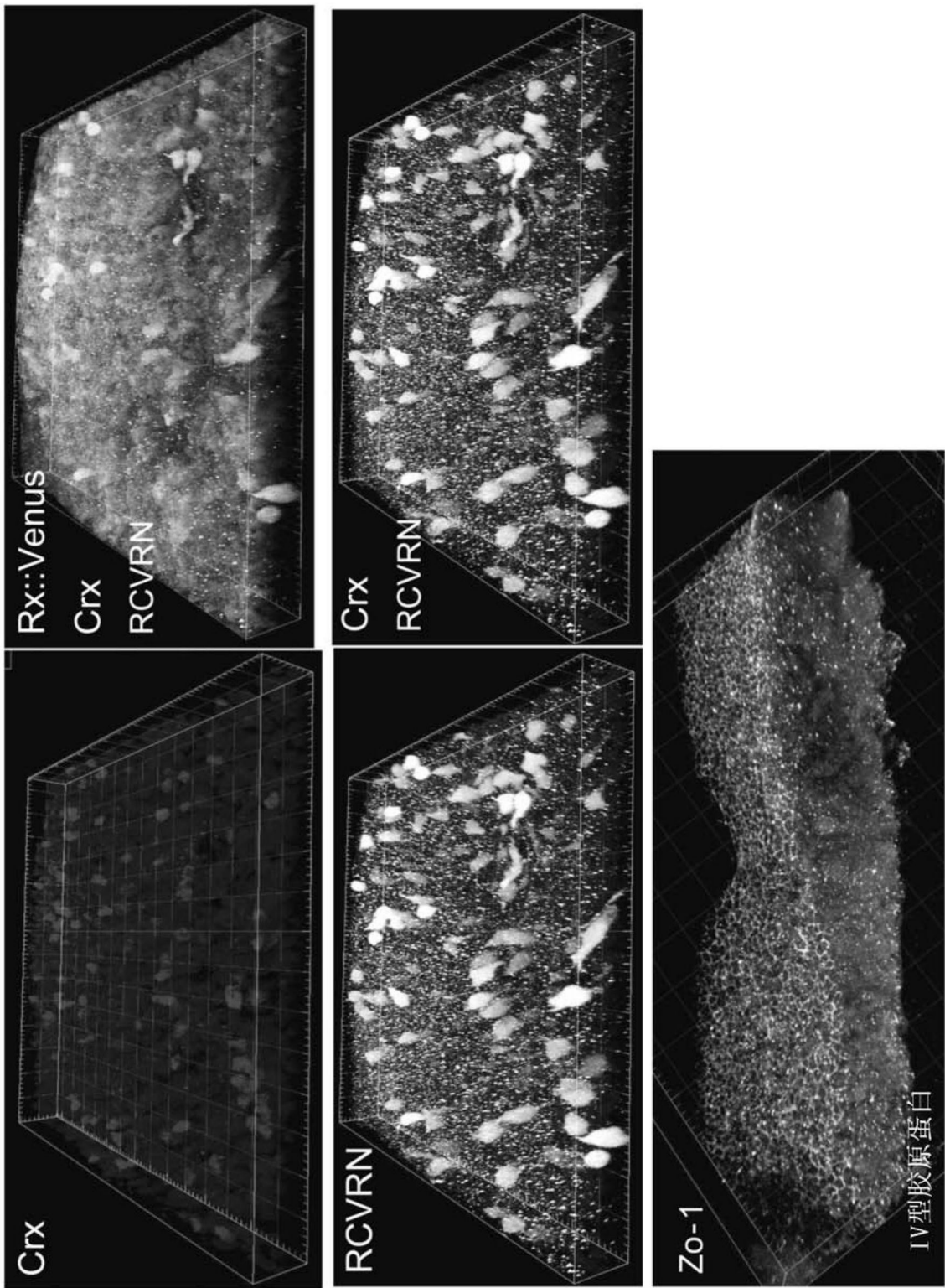


图41

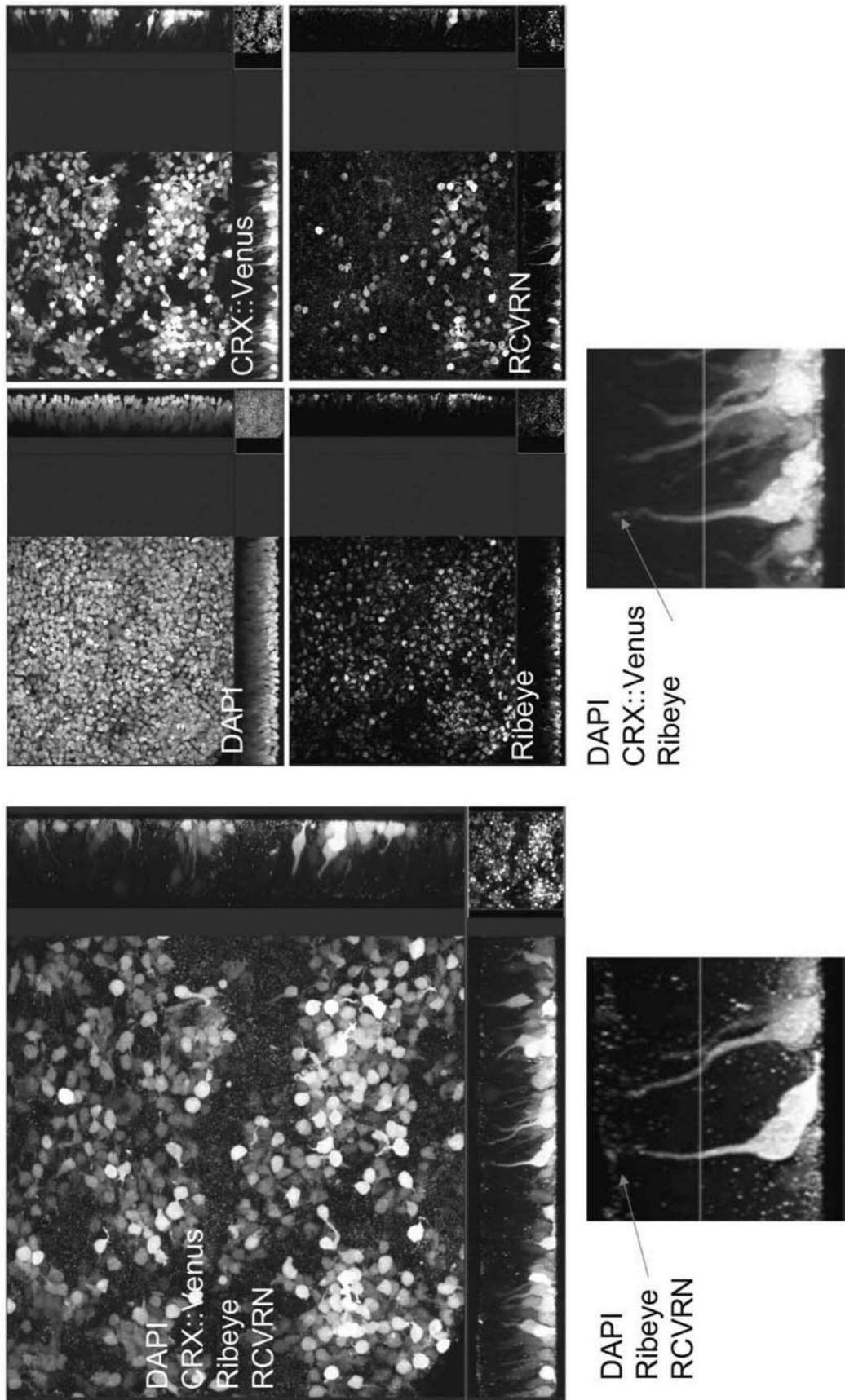


图42

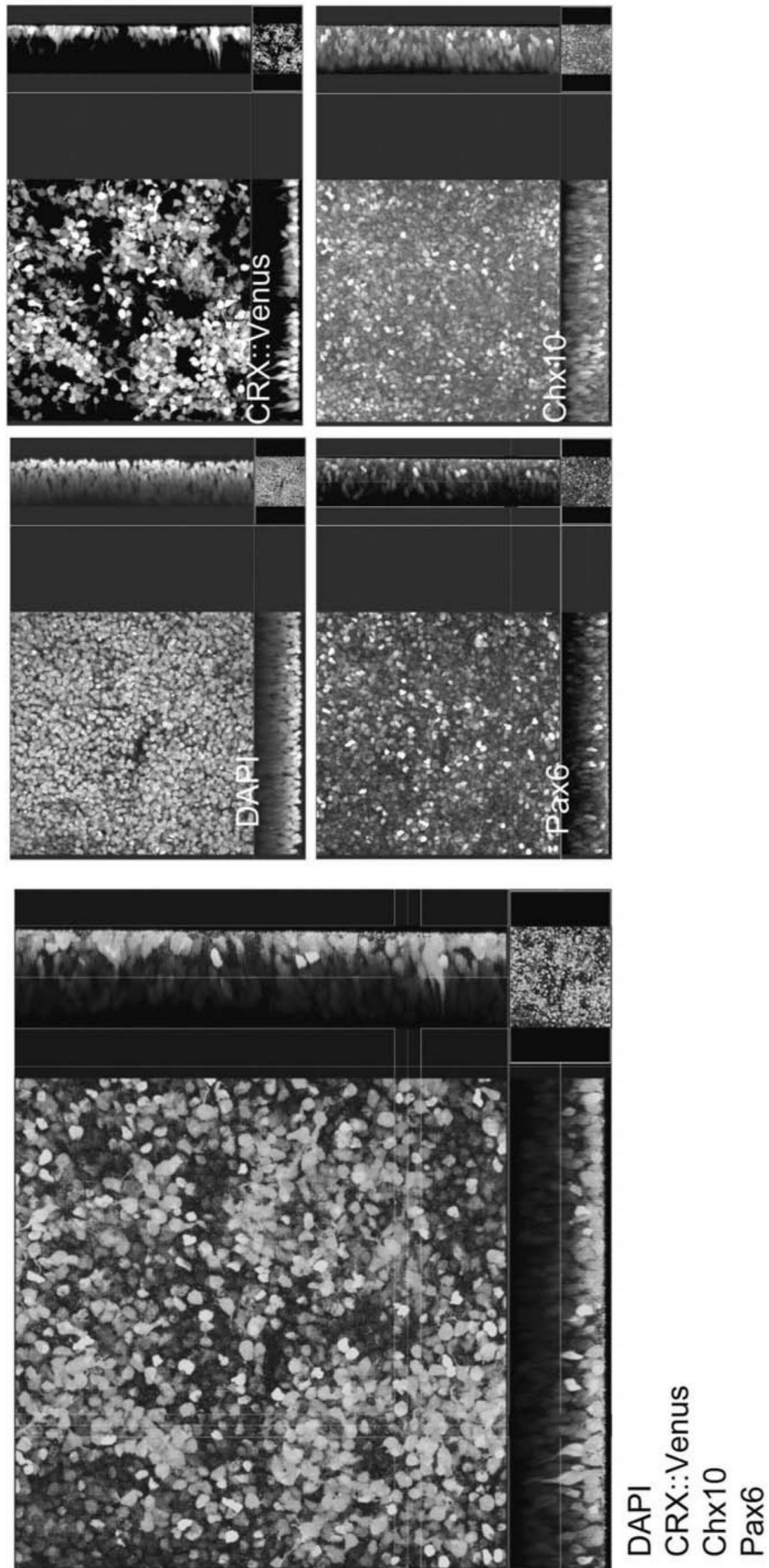


图43

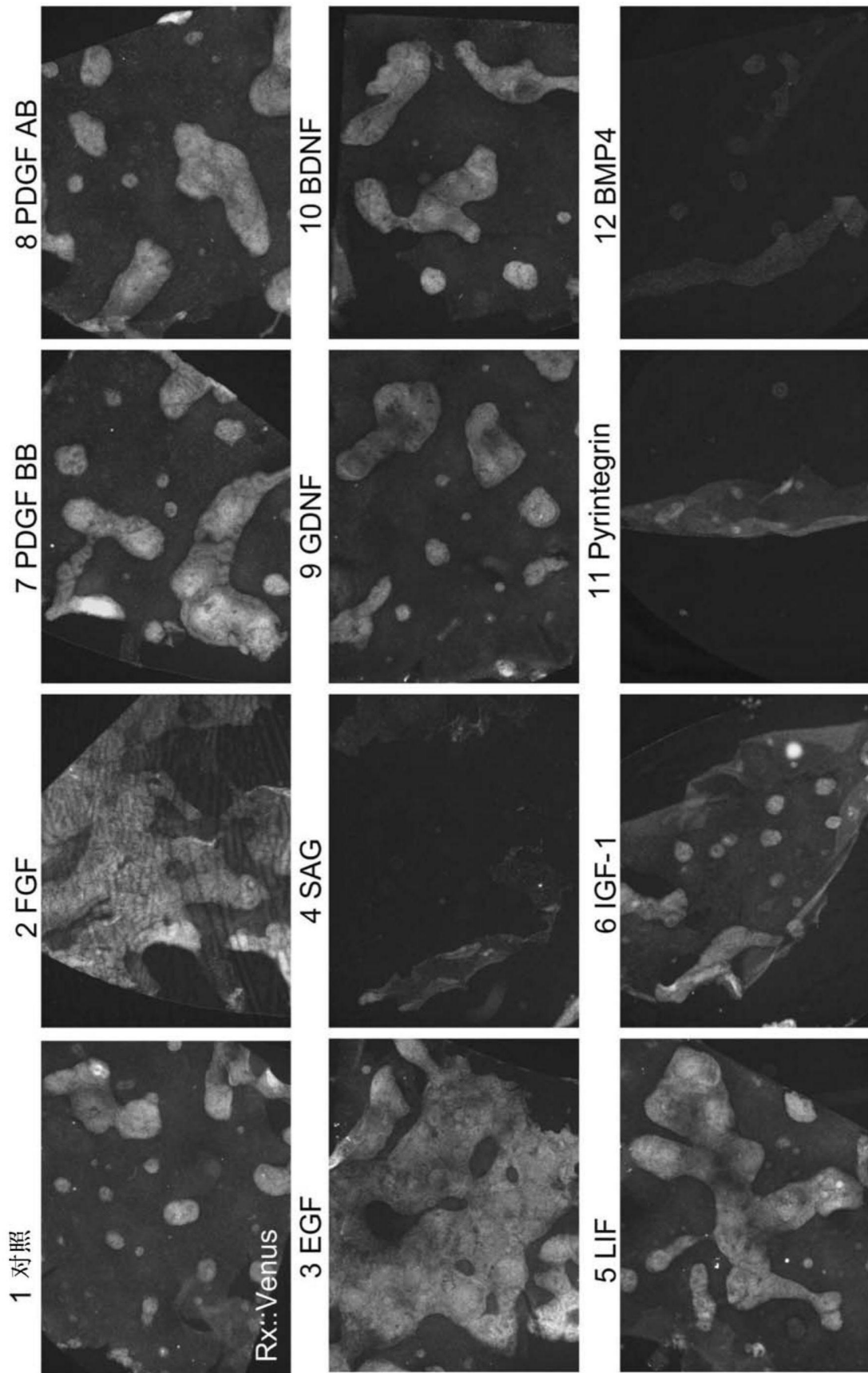


图44

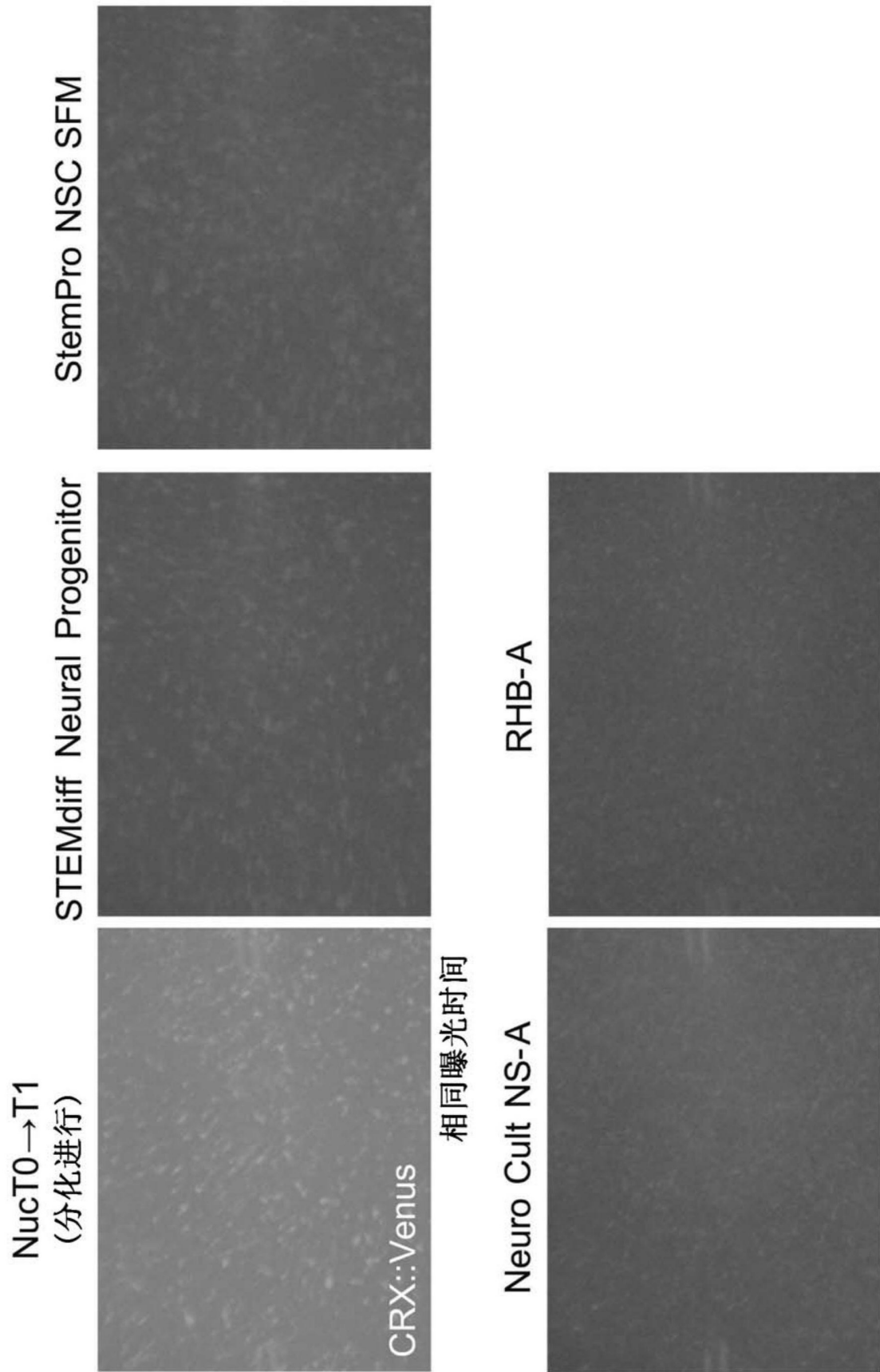


图45

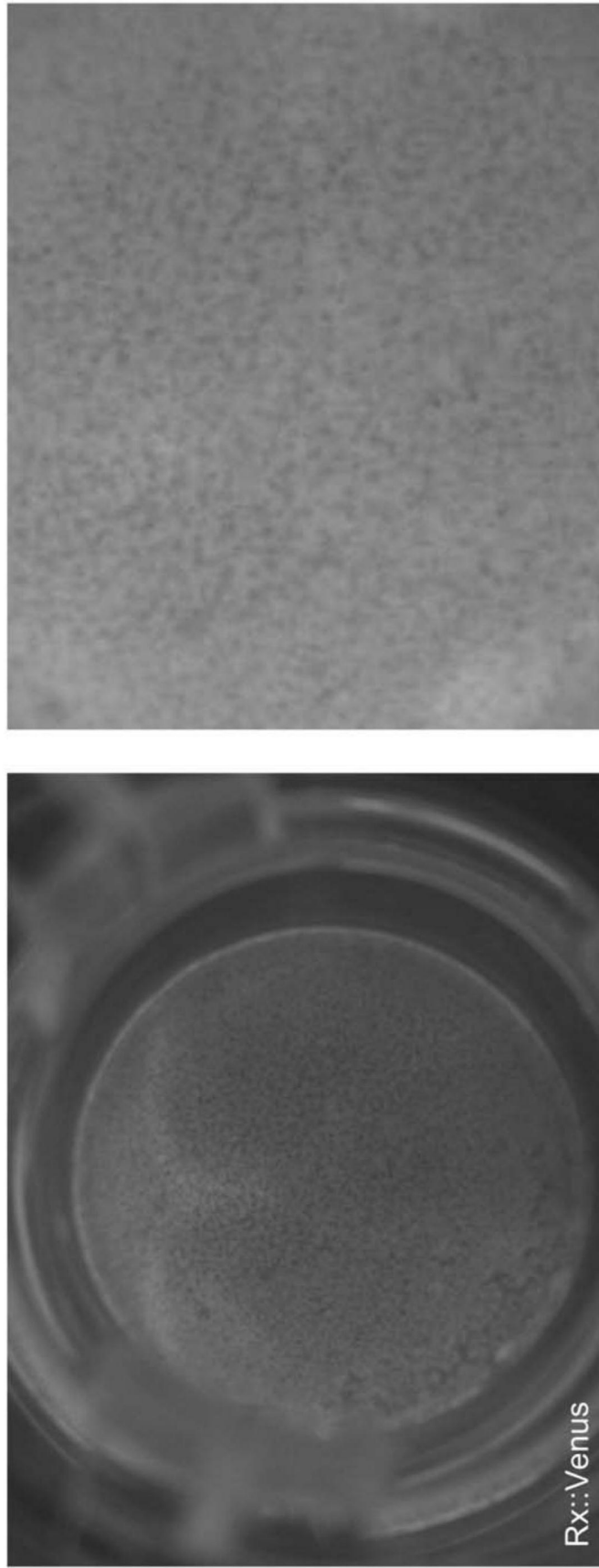


图46

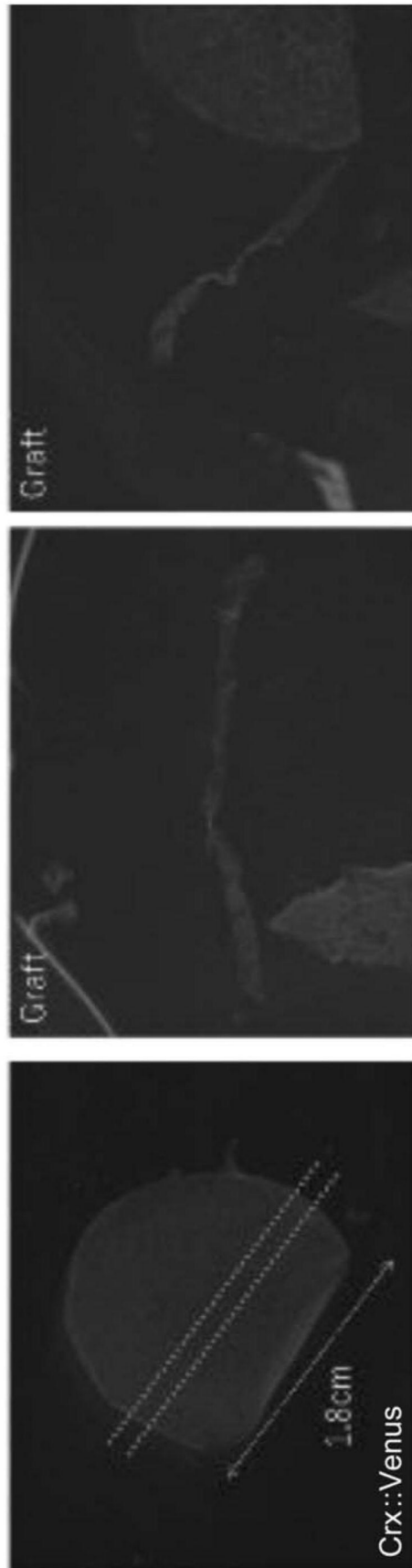


图47

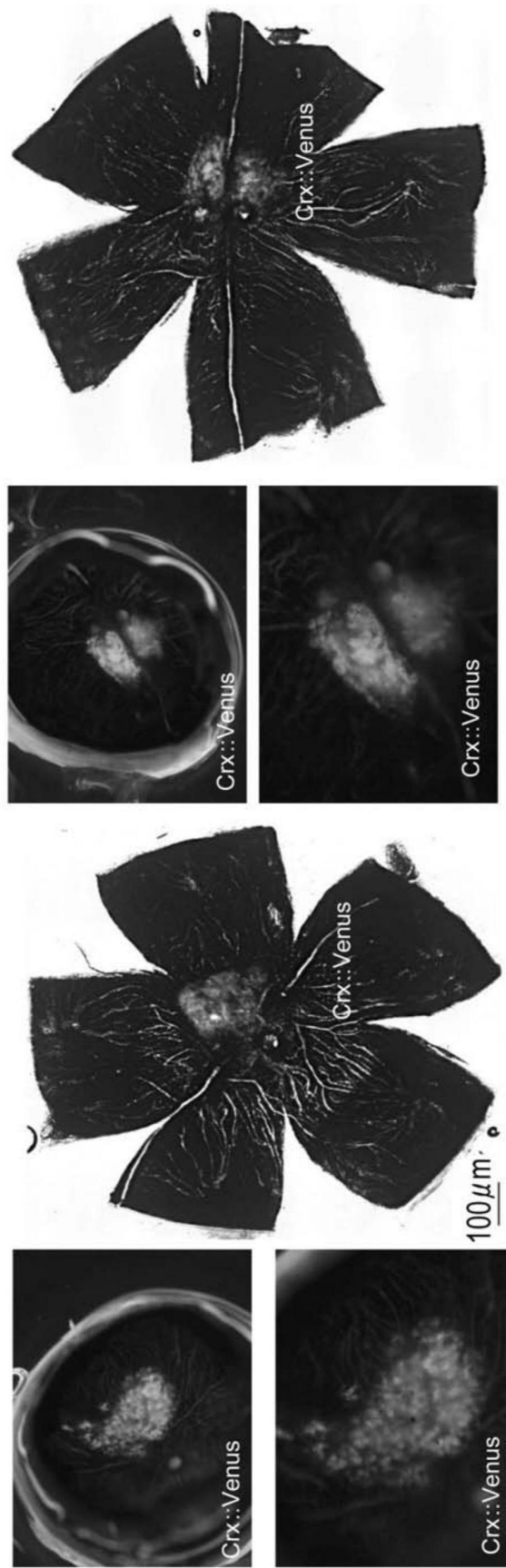
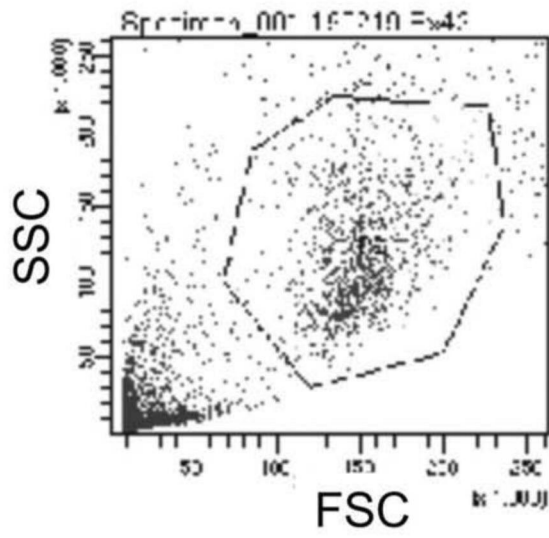


图48

(A)



(B)

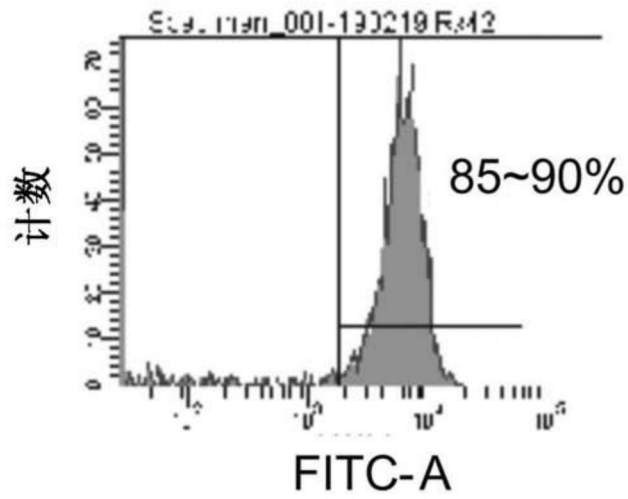


图49

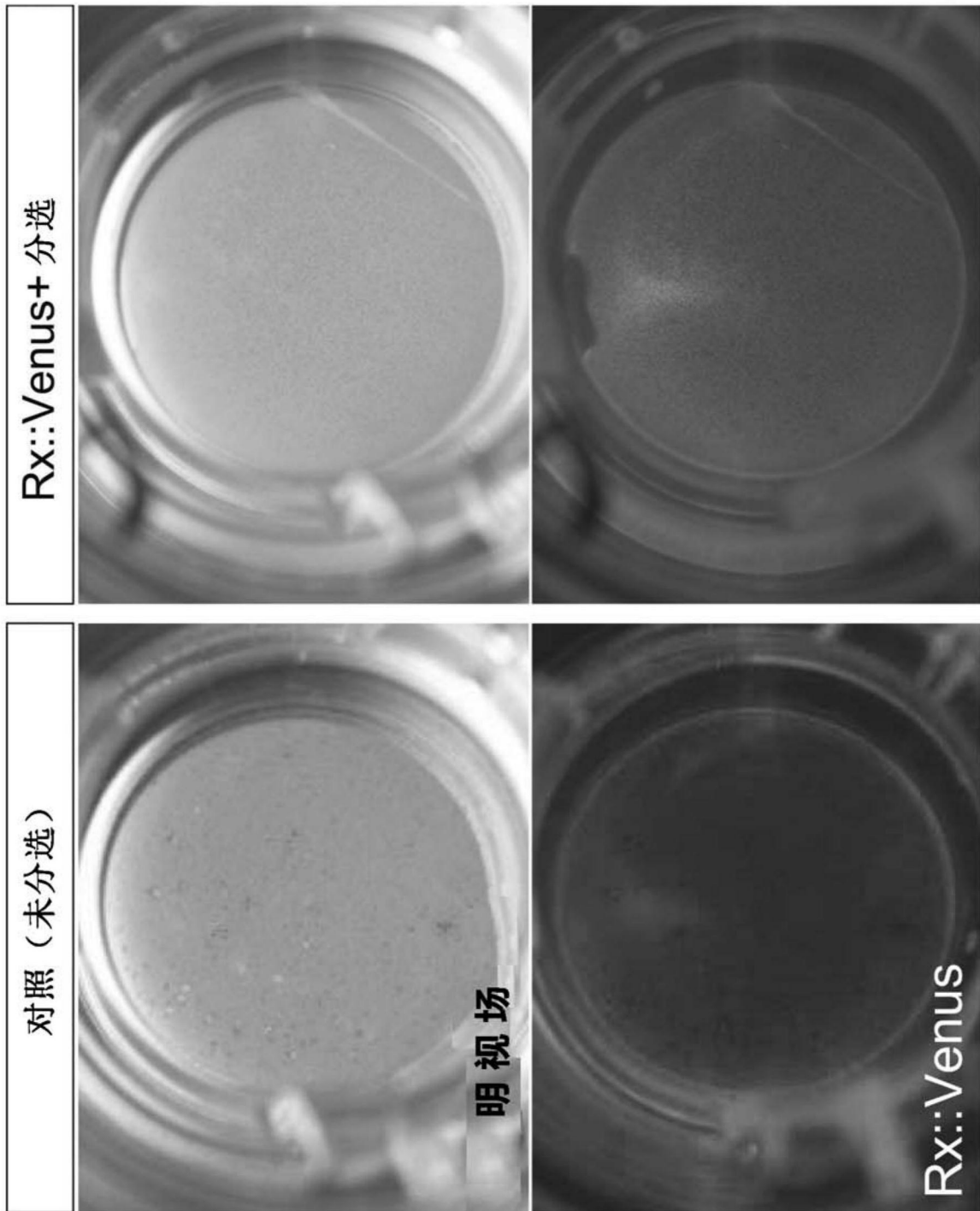


图50

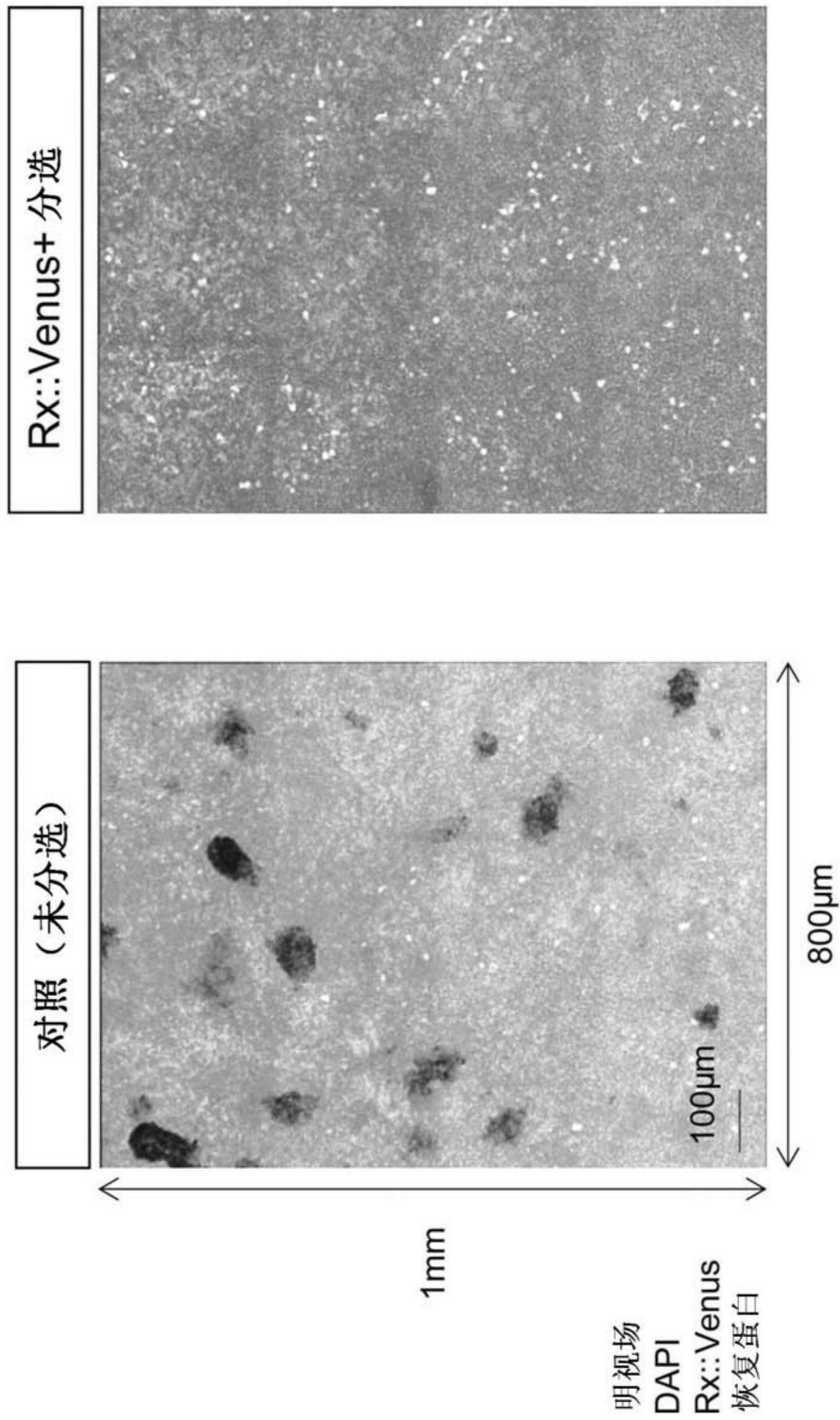


图51

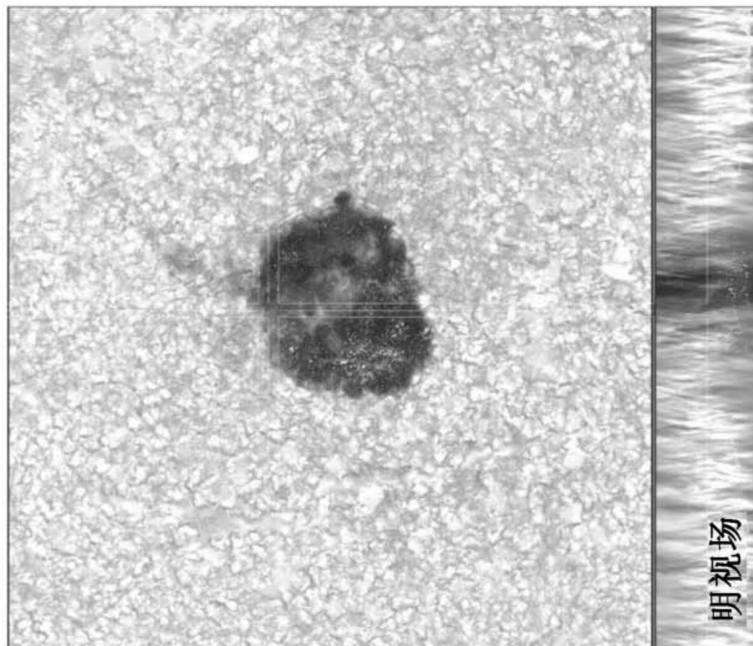
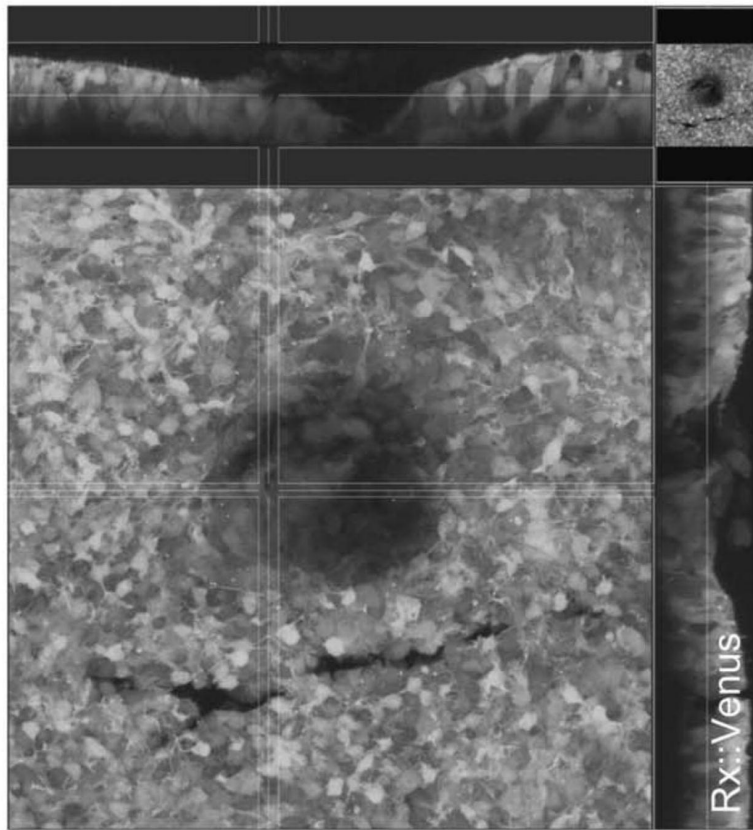


图52

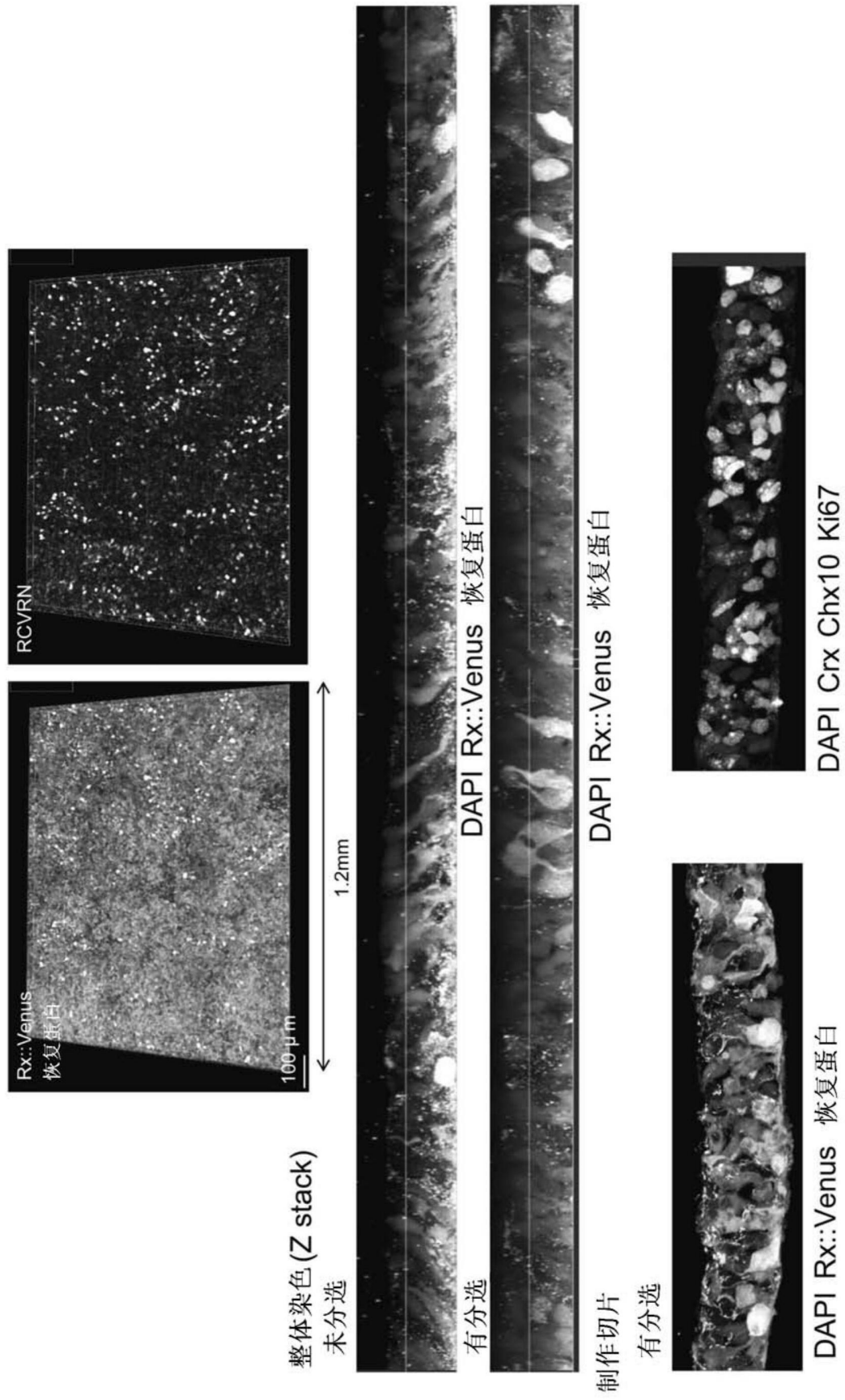


图53

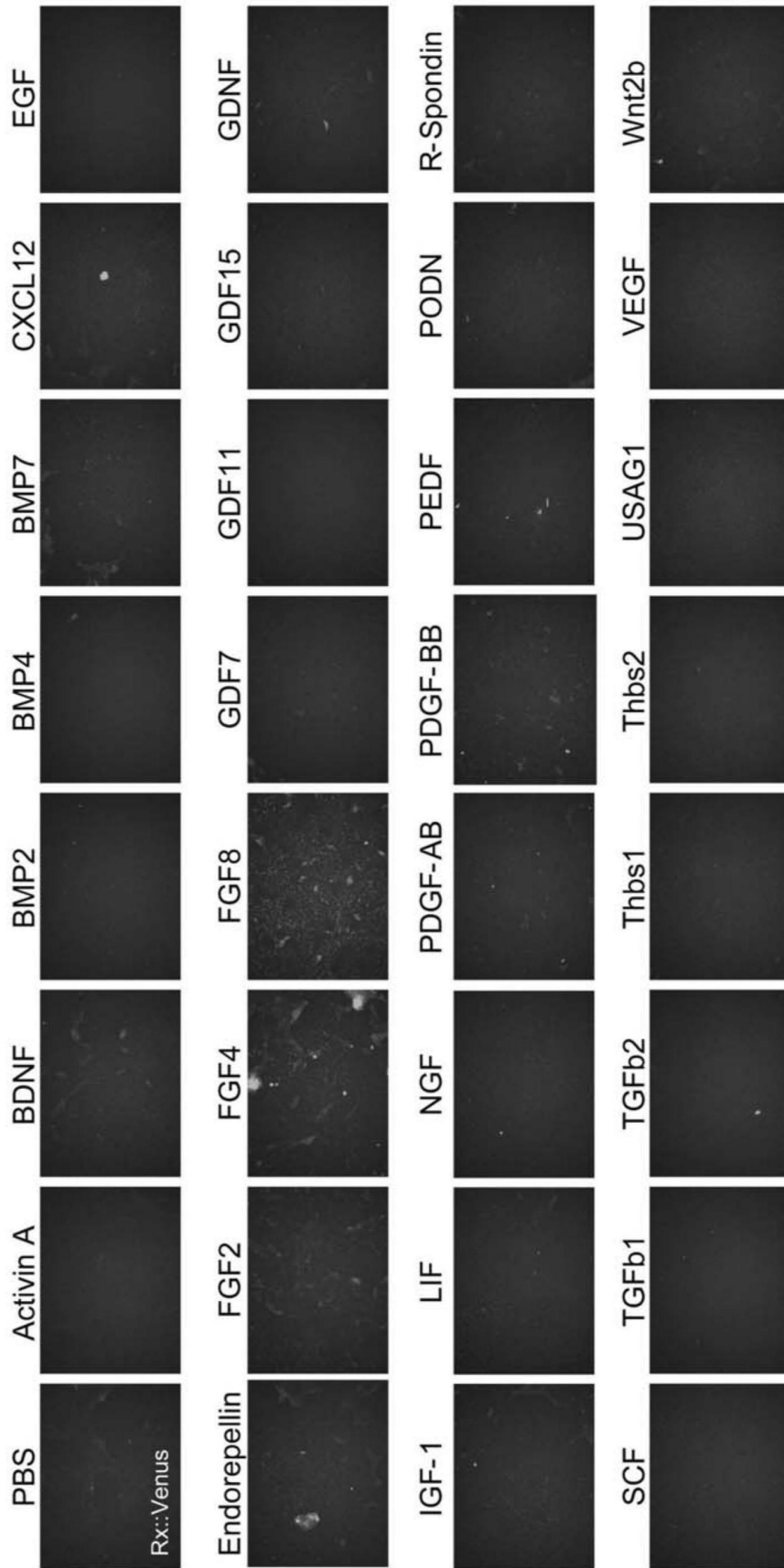


图54

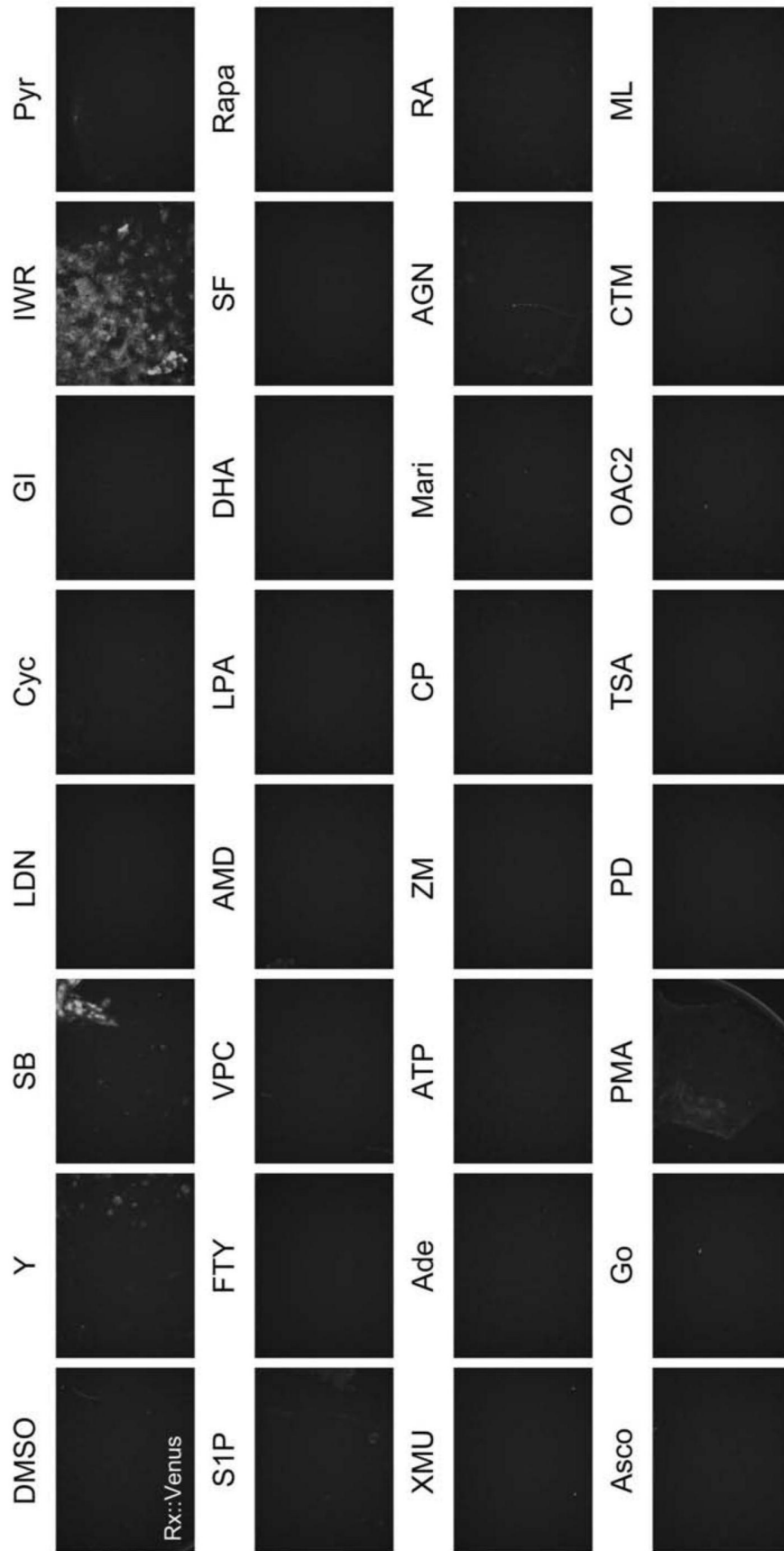


图55

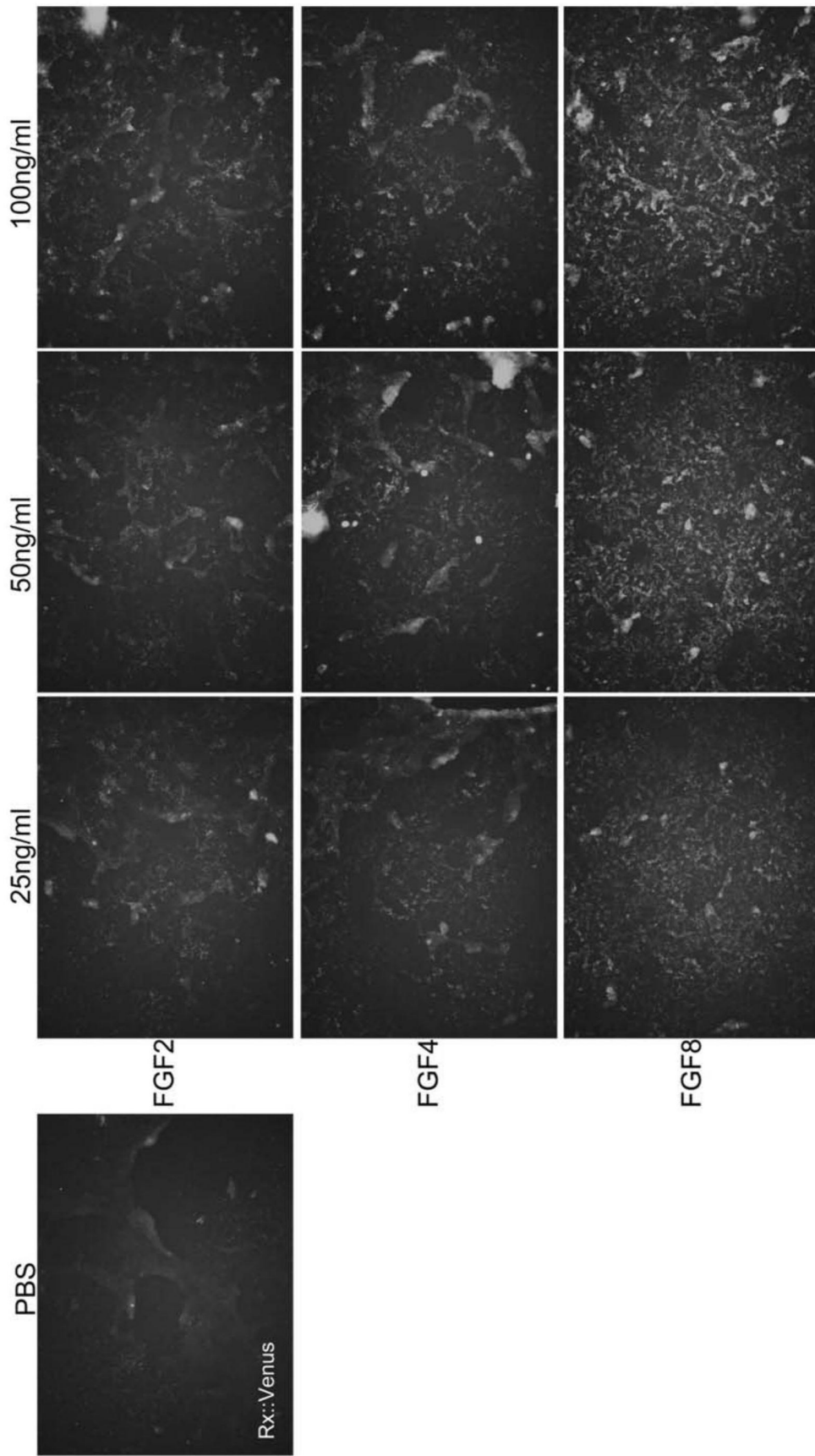


图56

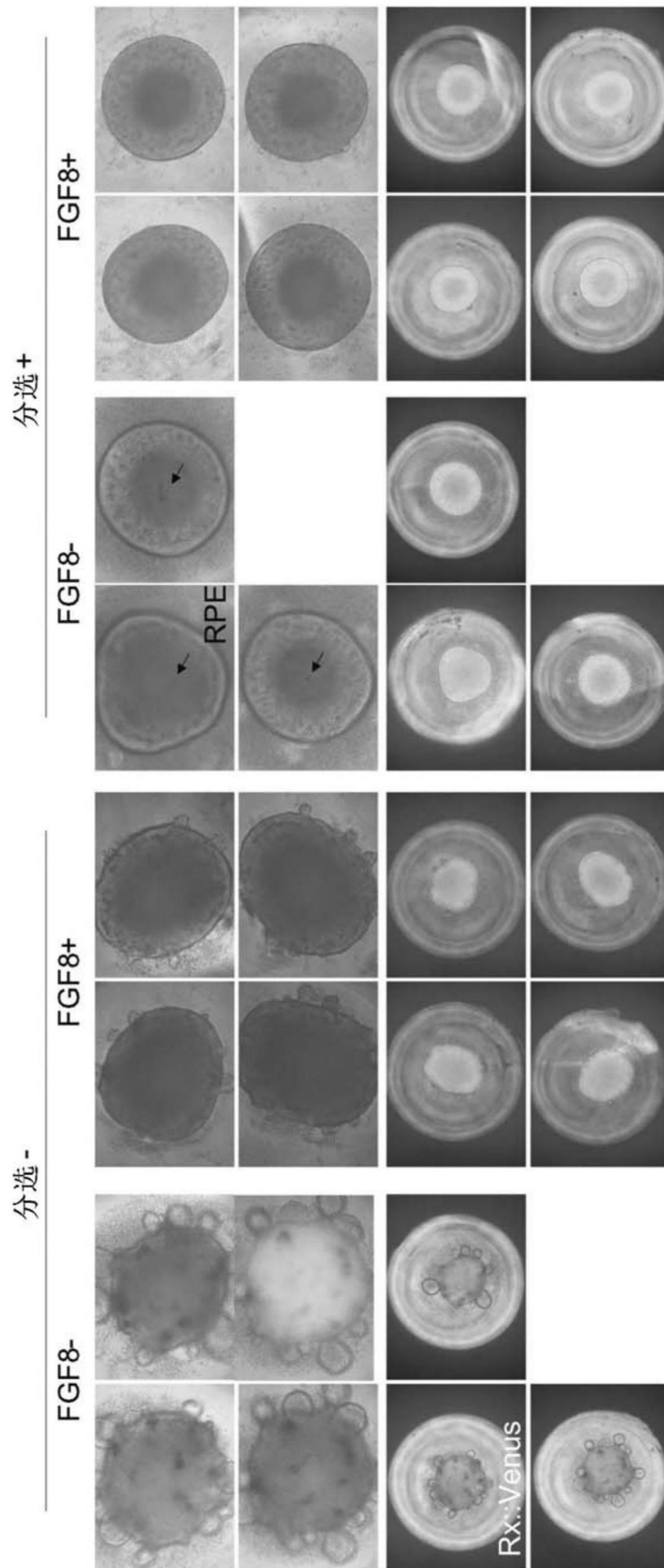


图57

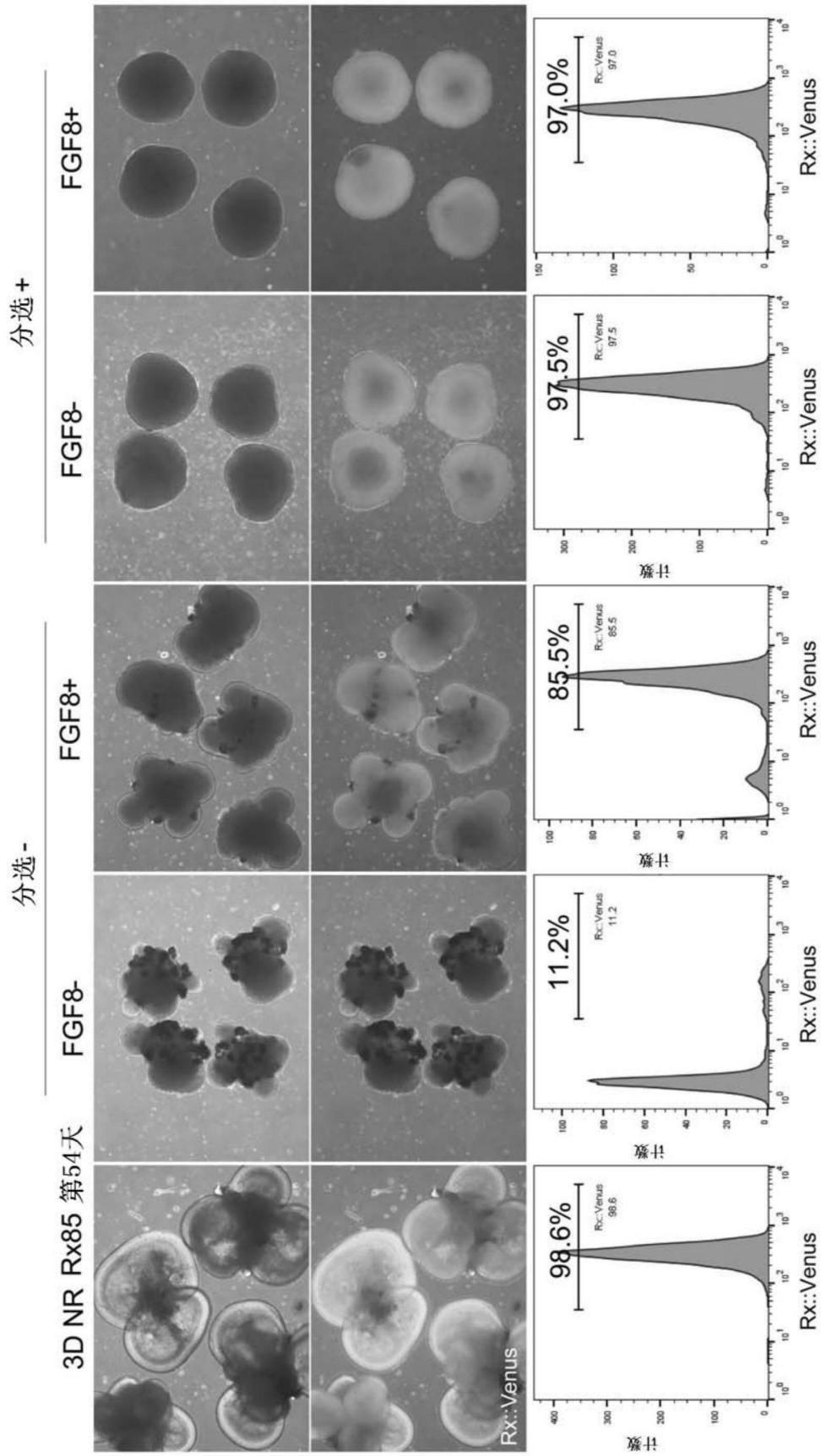


图58

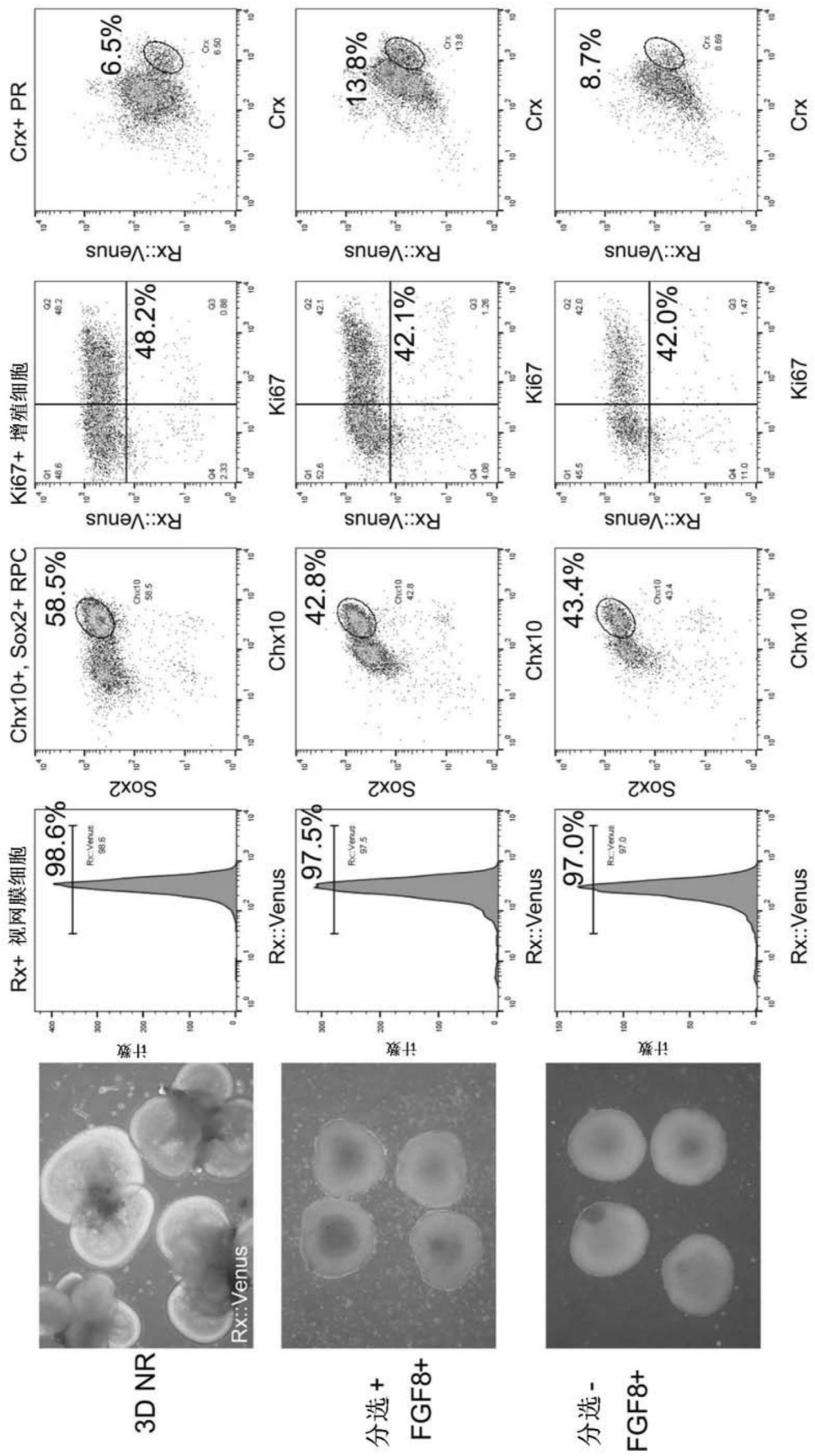


图59

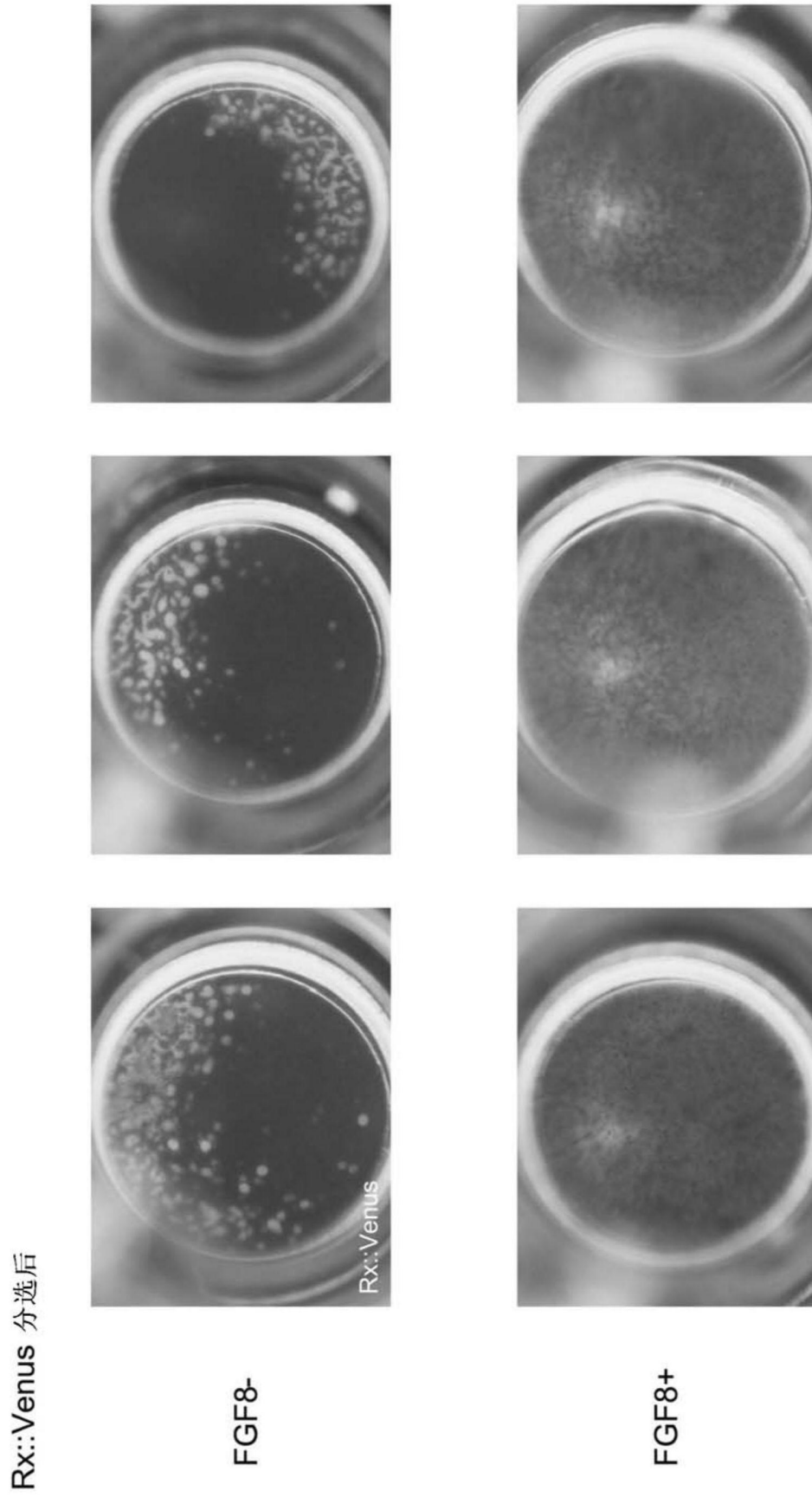


图60

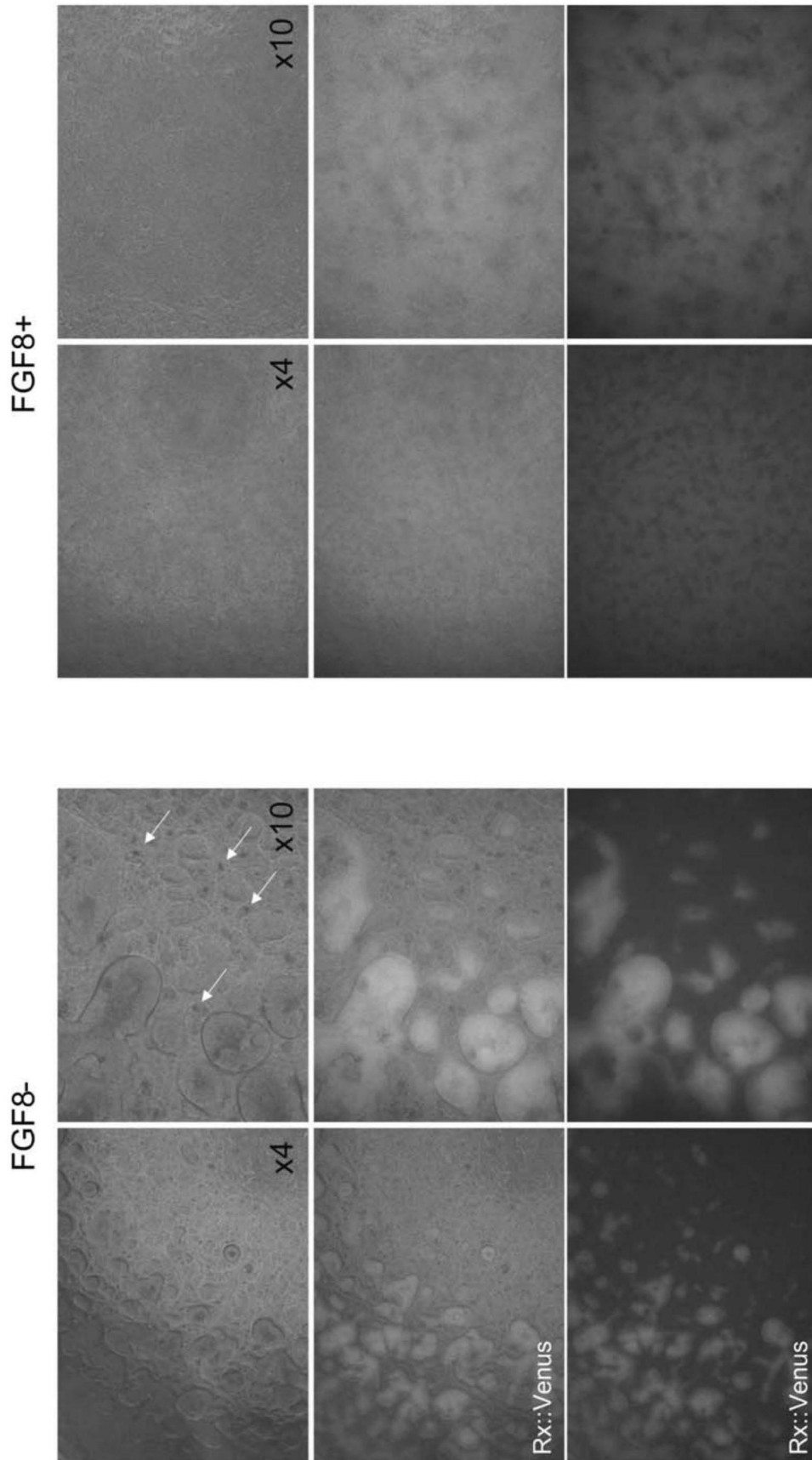


图61

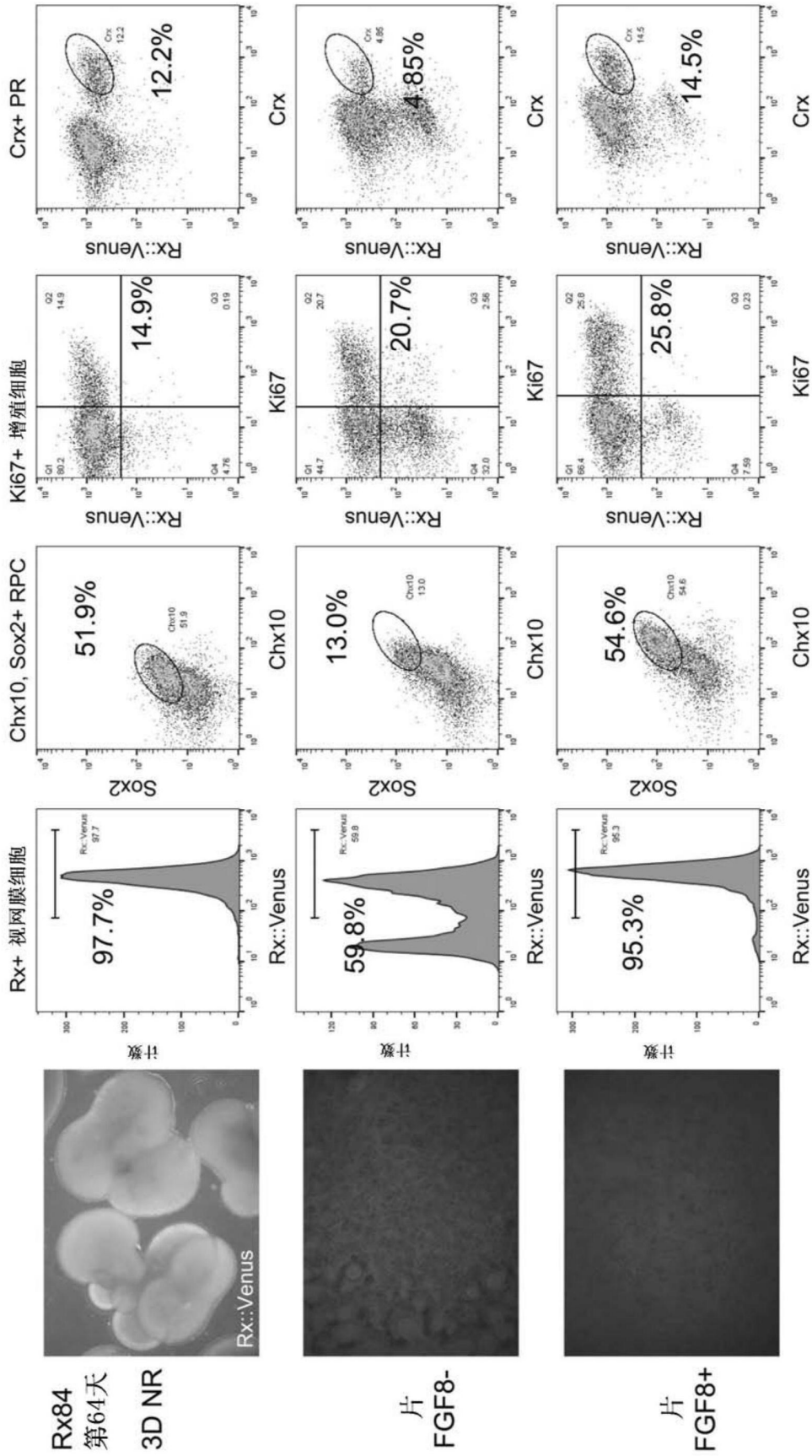


图62

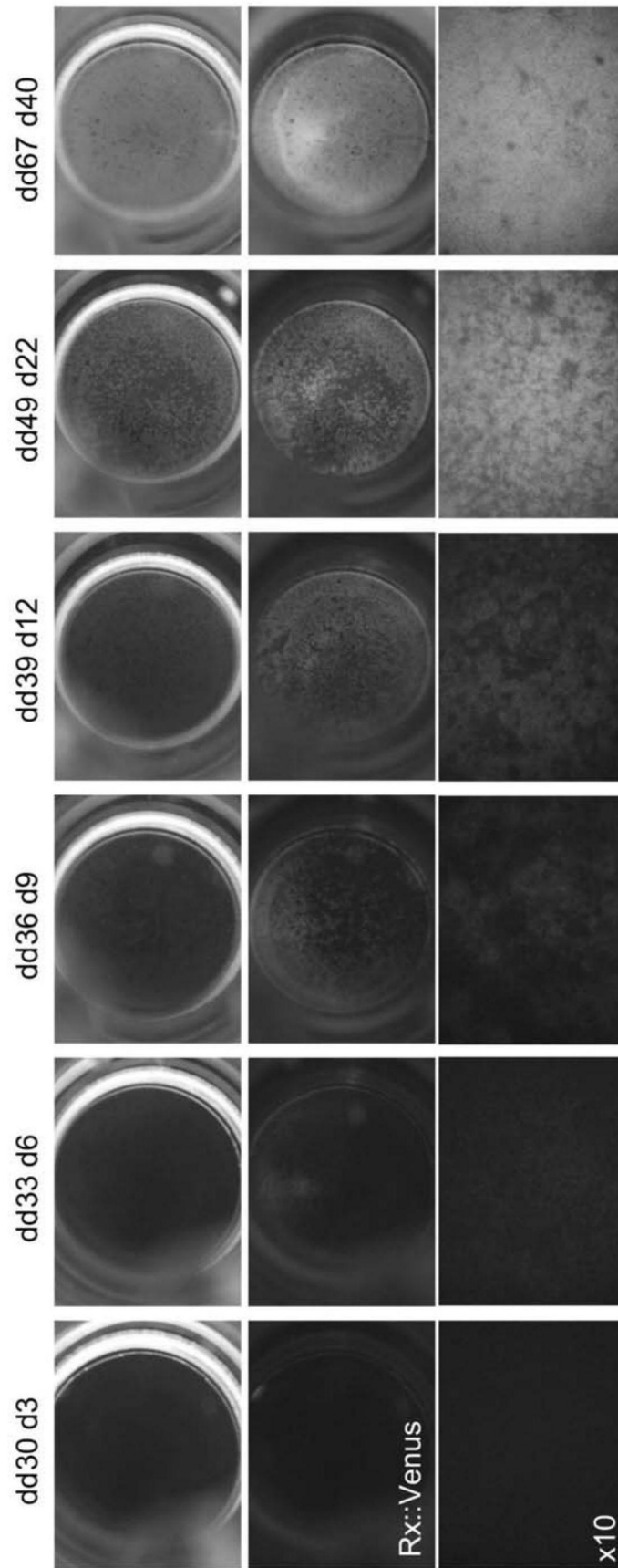


图63

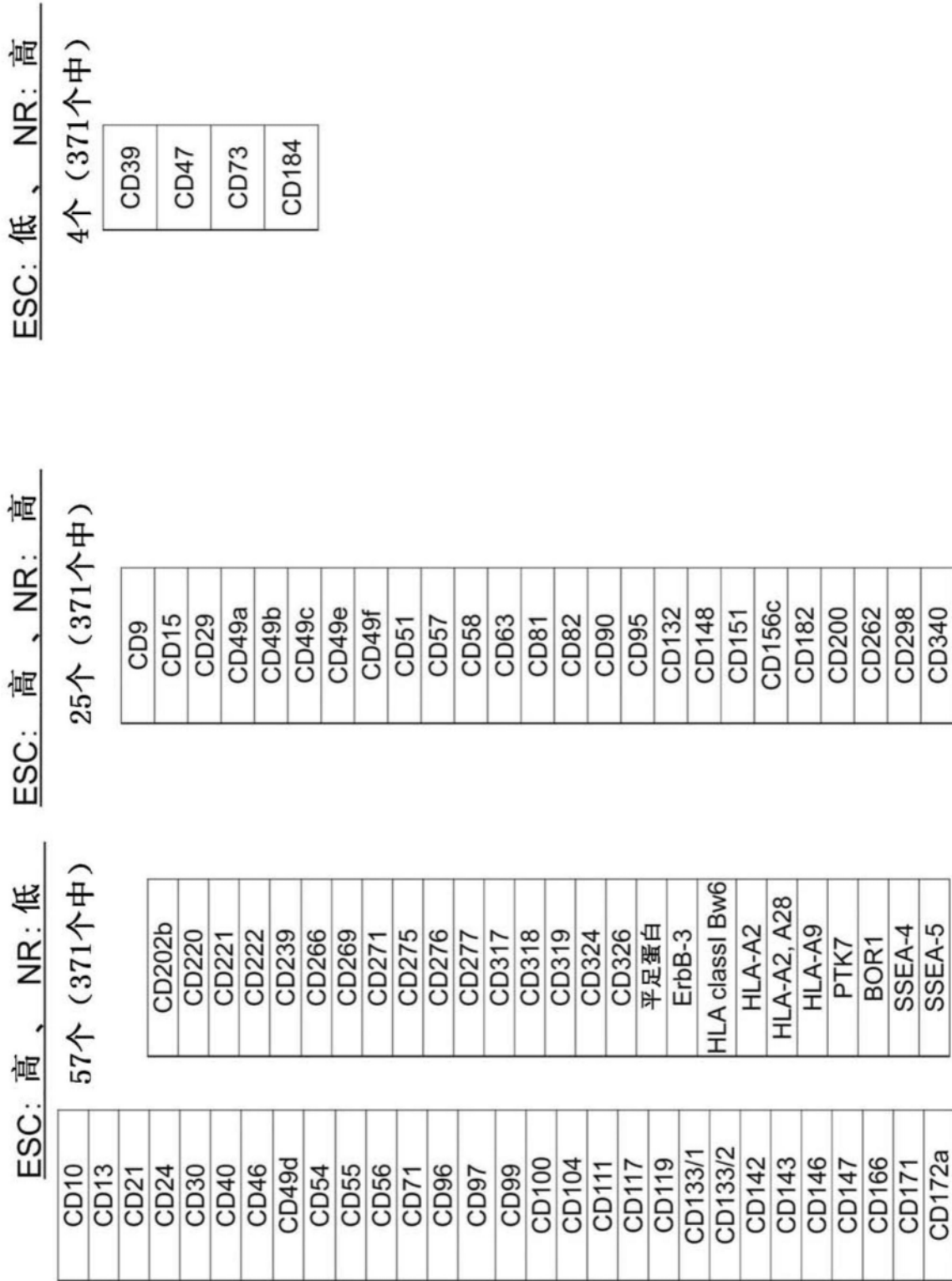


图64

表面抗原筛选 (MACS标志物筛选, 人)

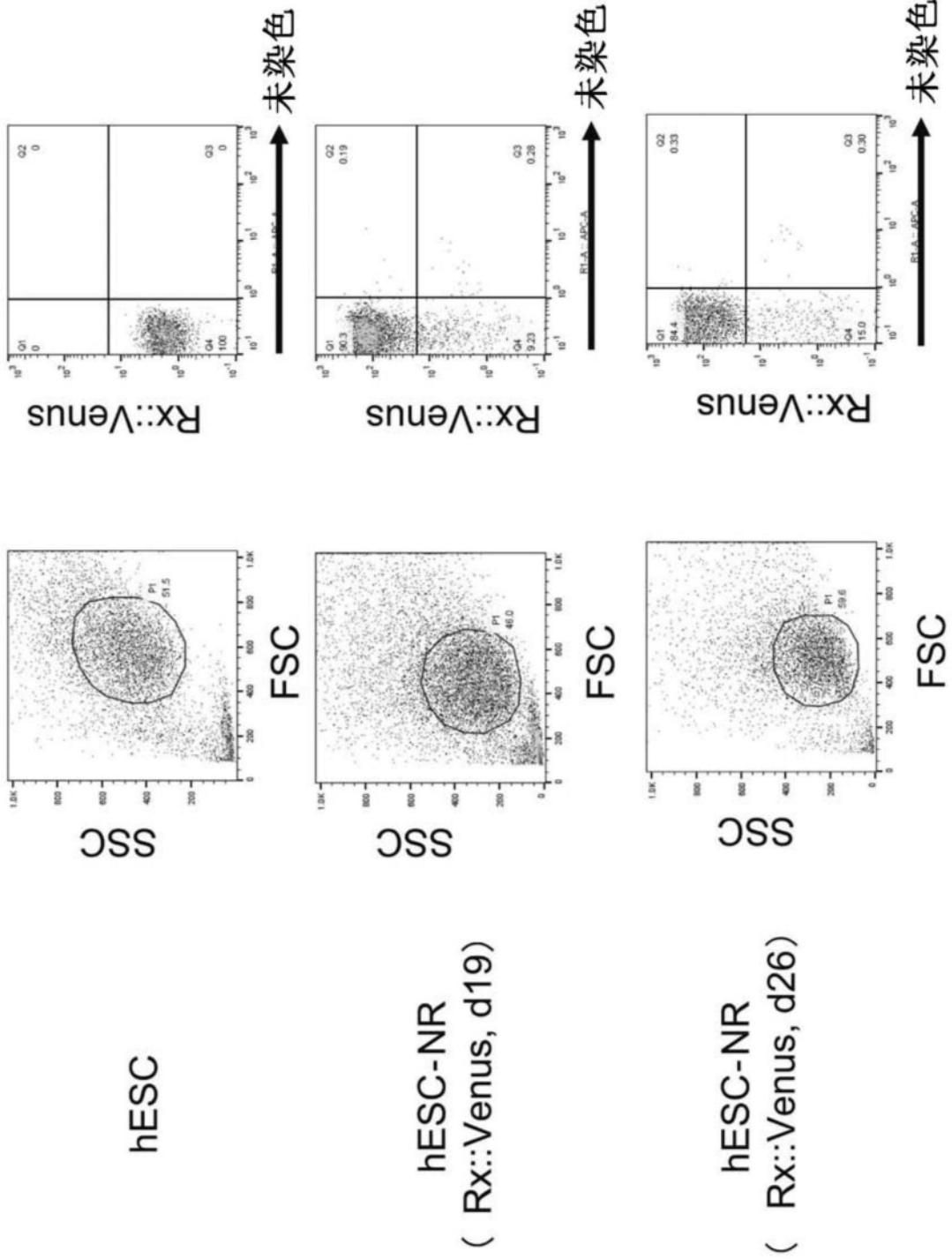


图65

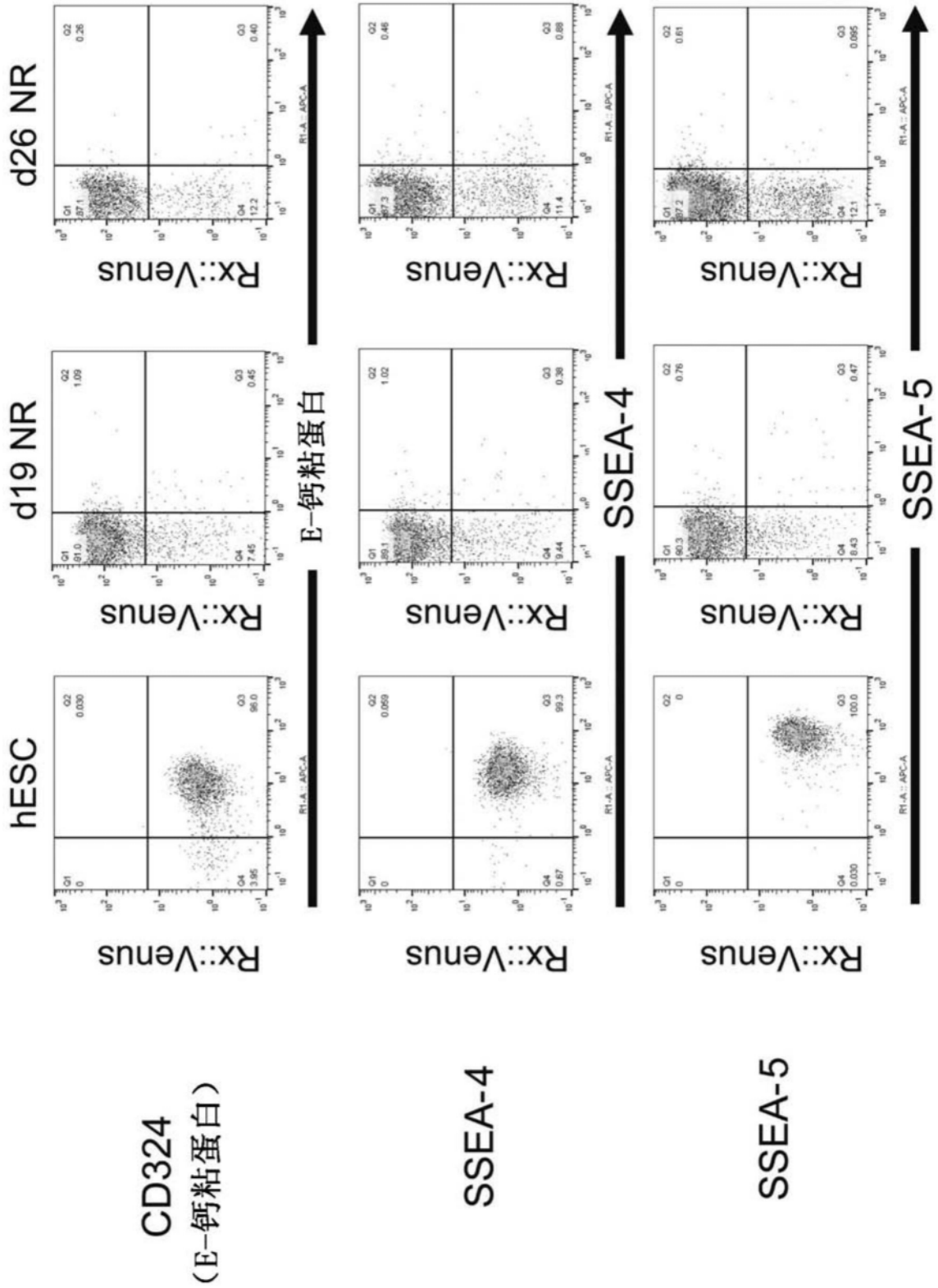


图66

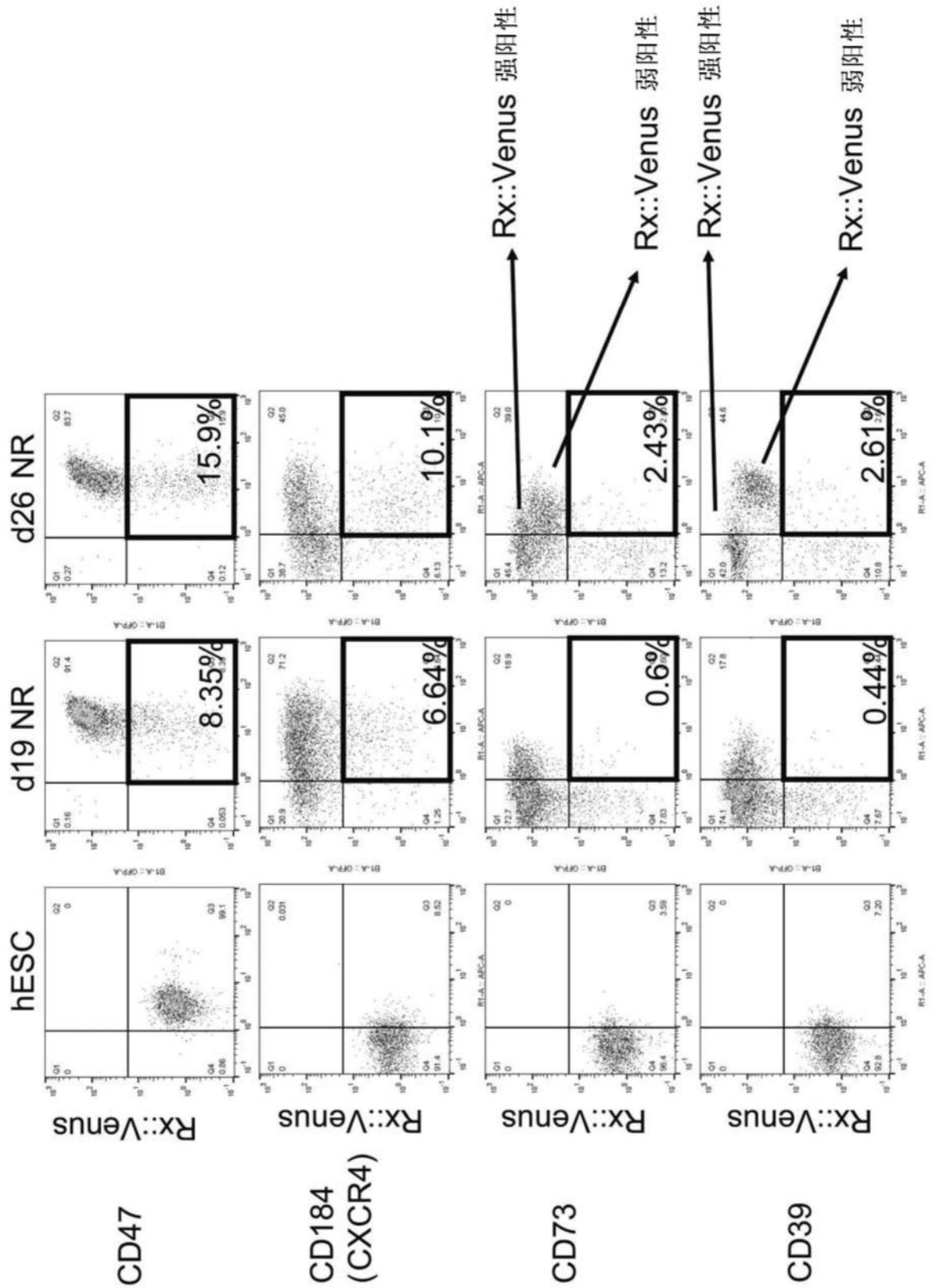


图67

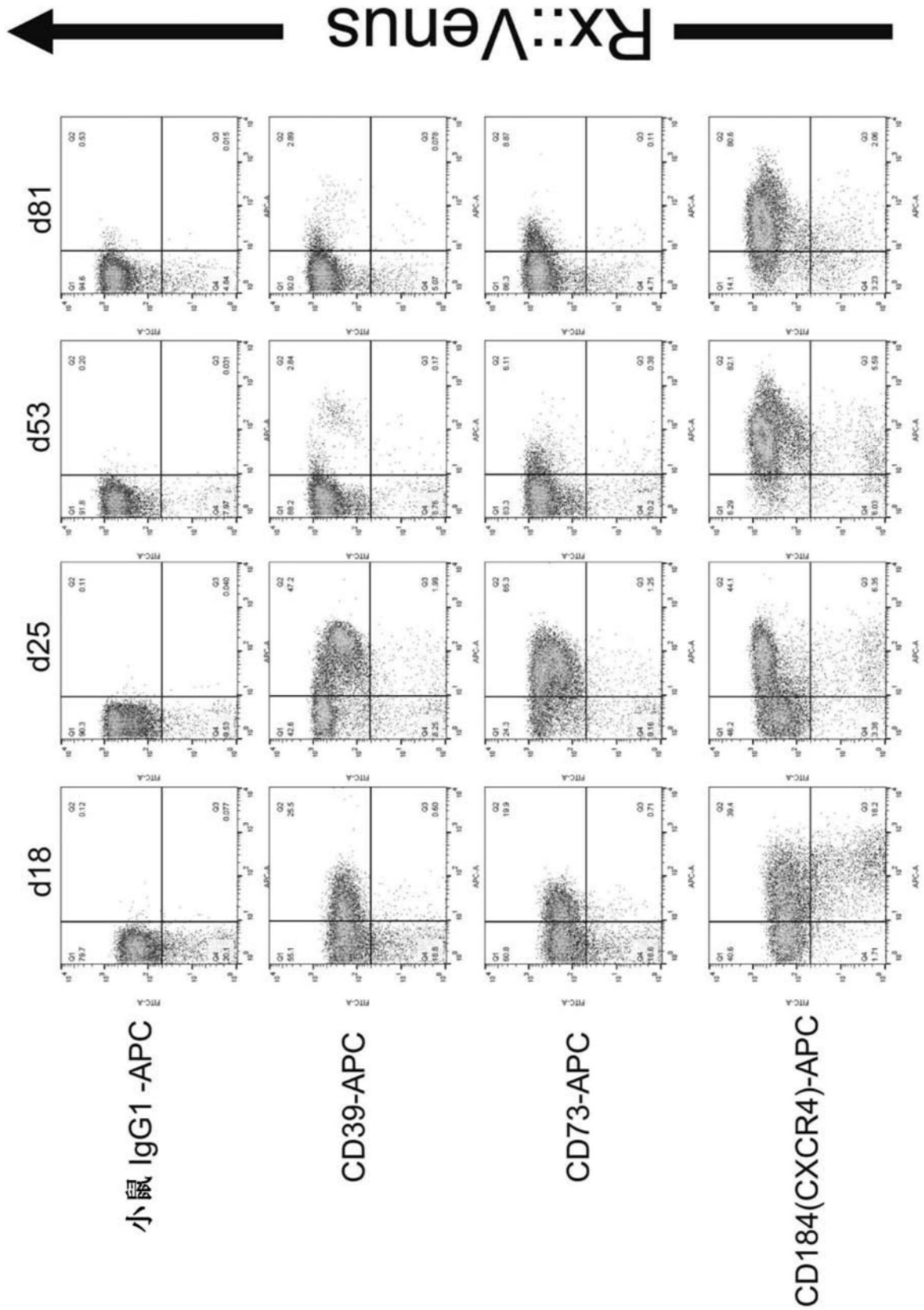


图68

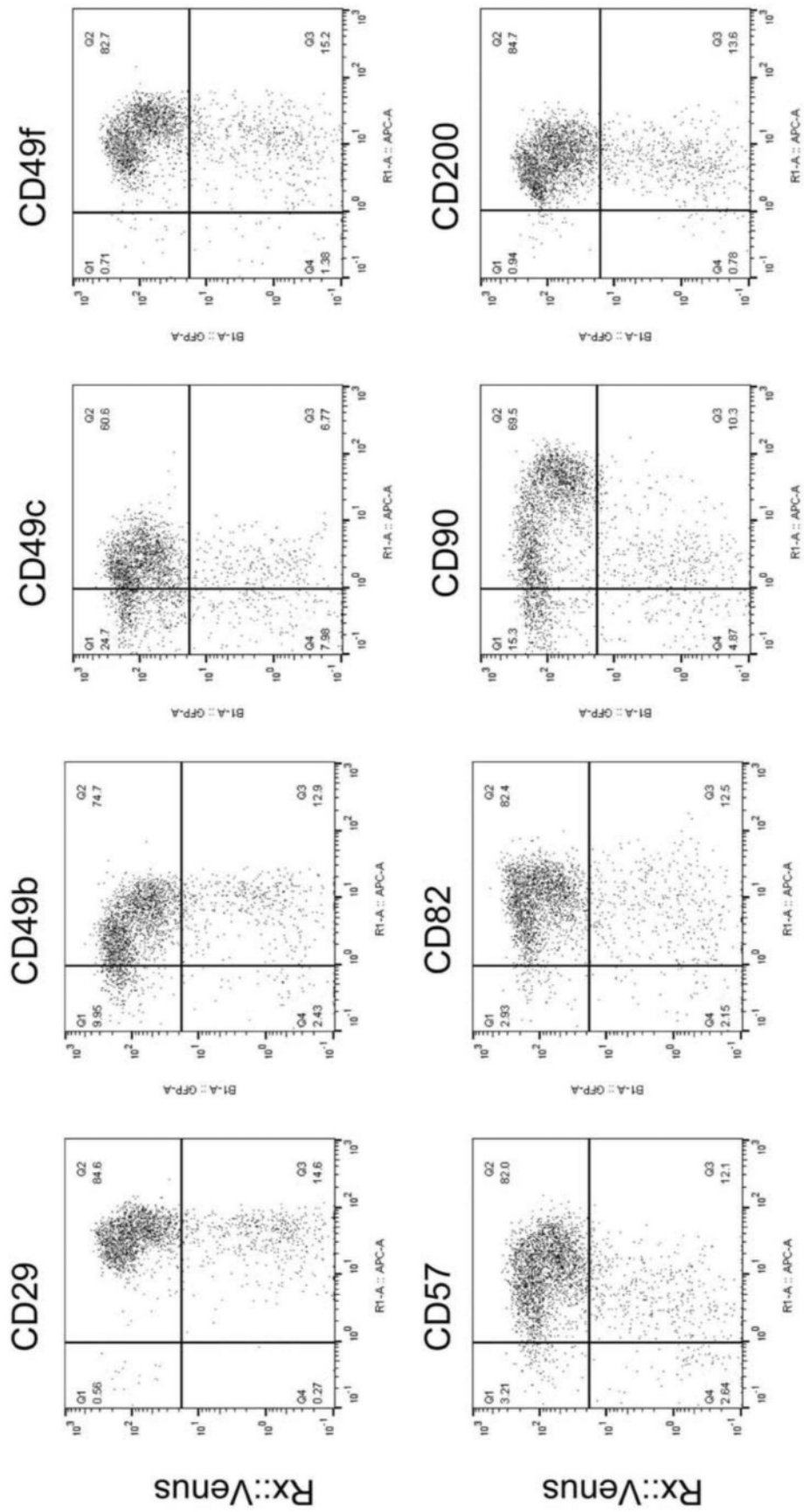


图69

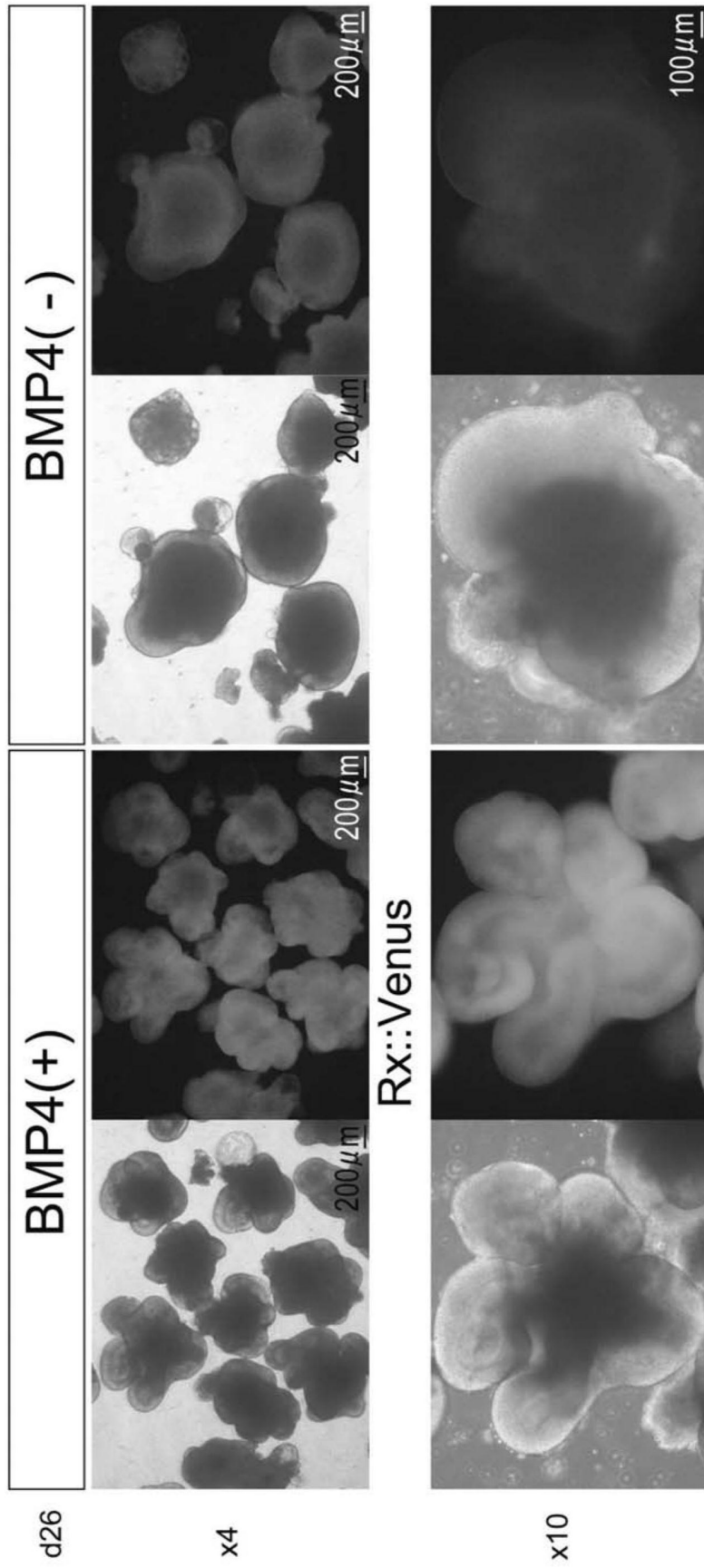


图70

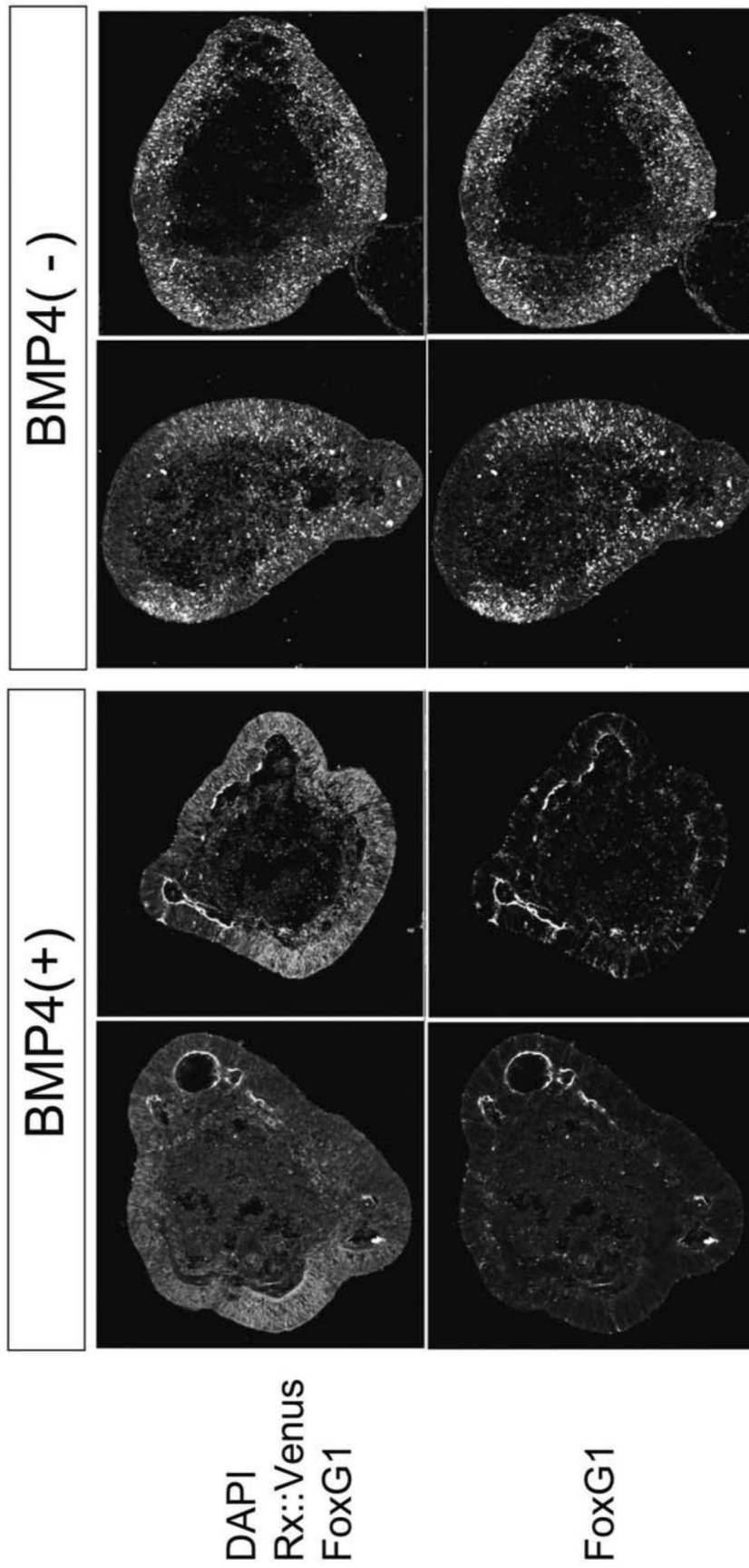


图71

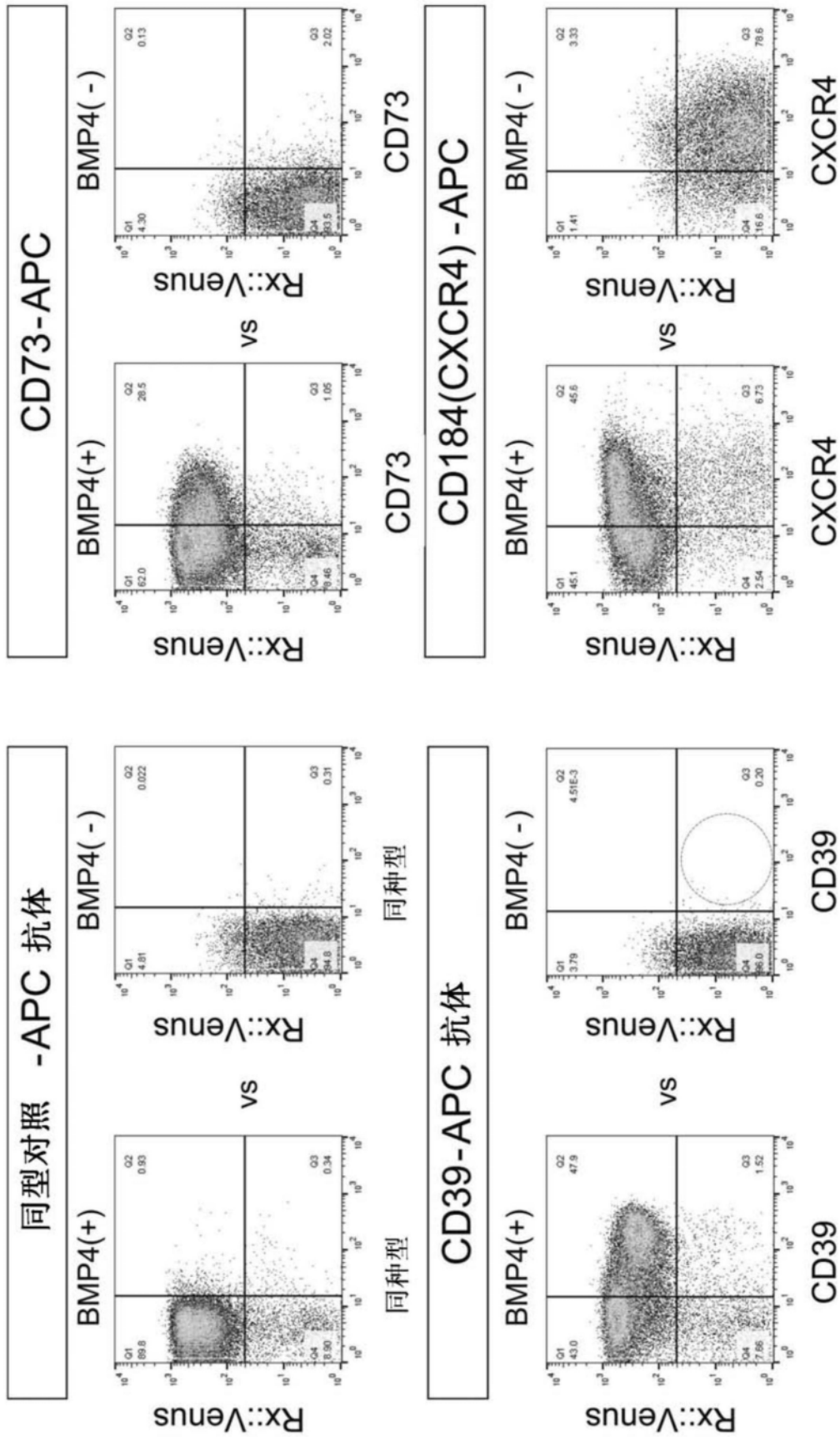


图72

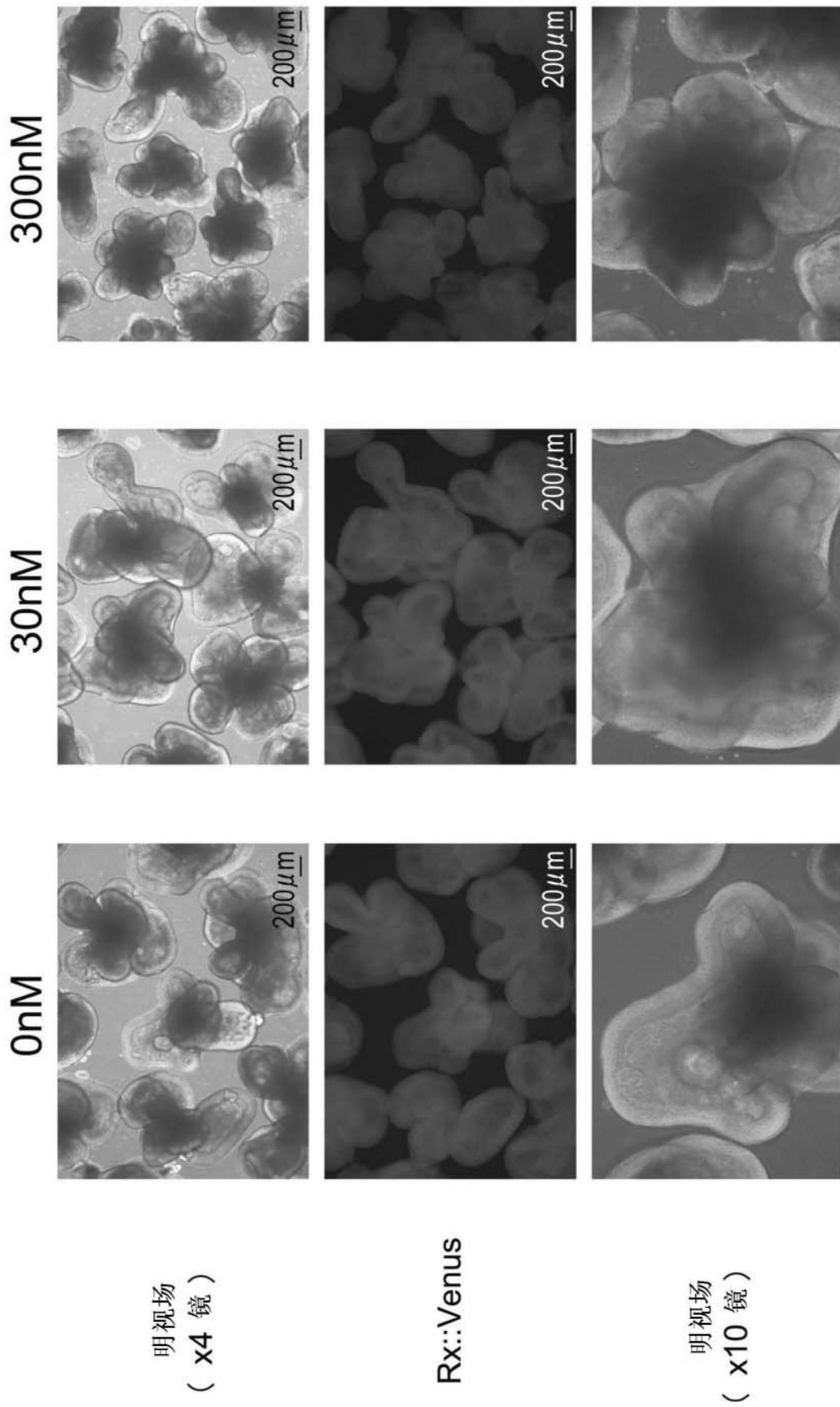


图73

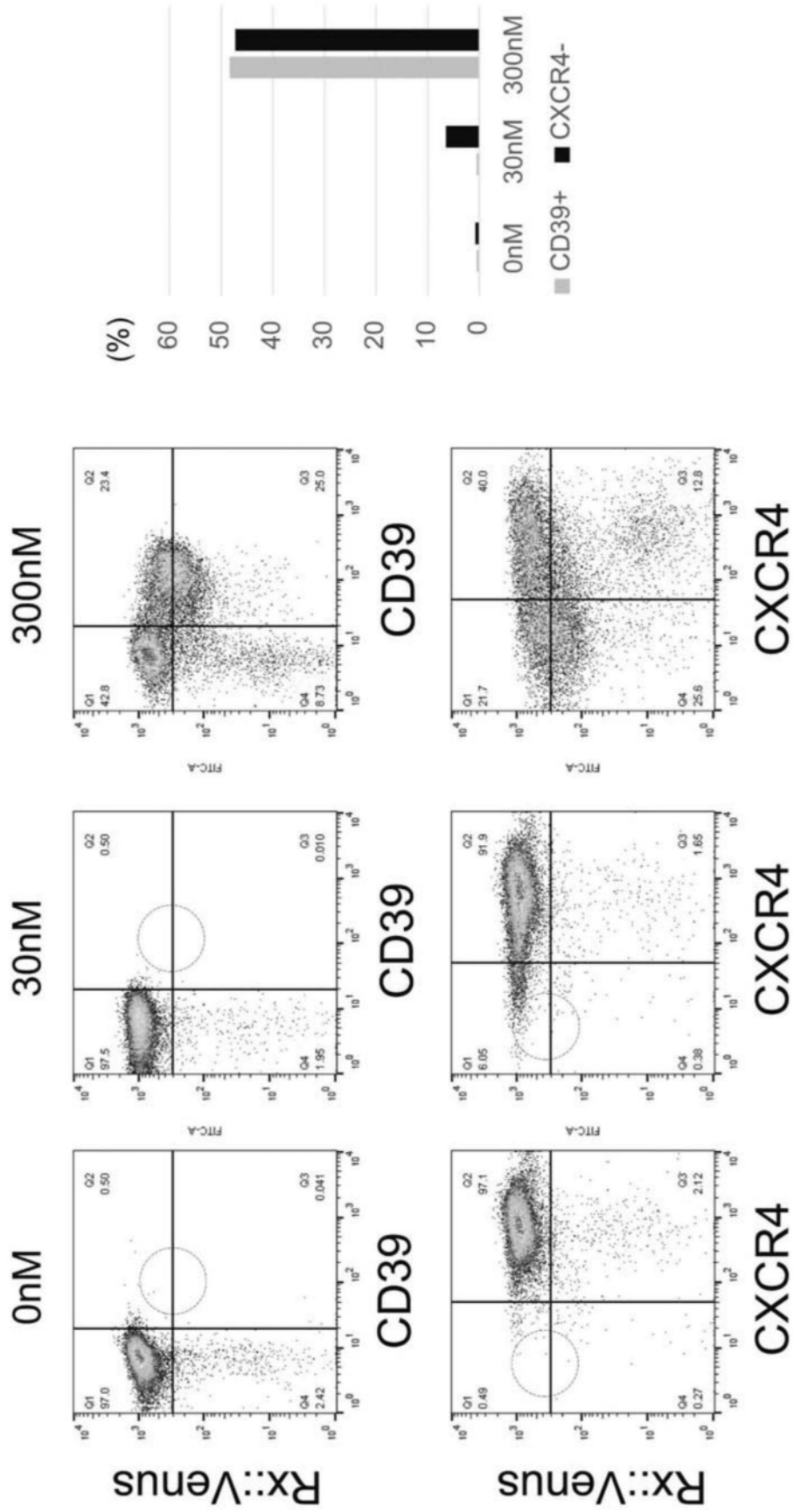


图74

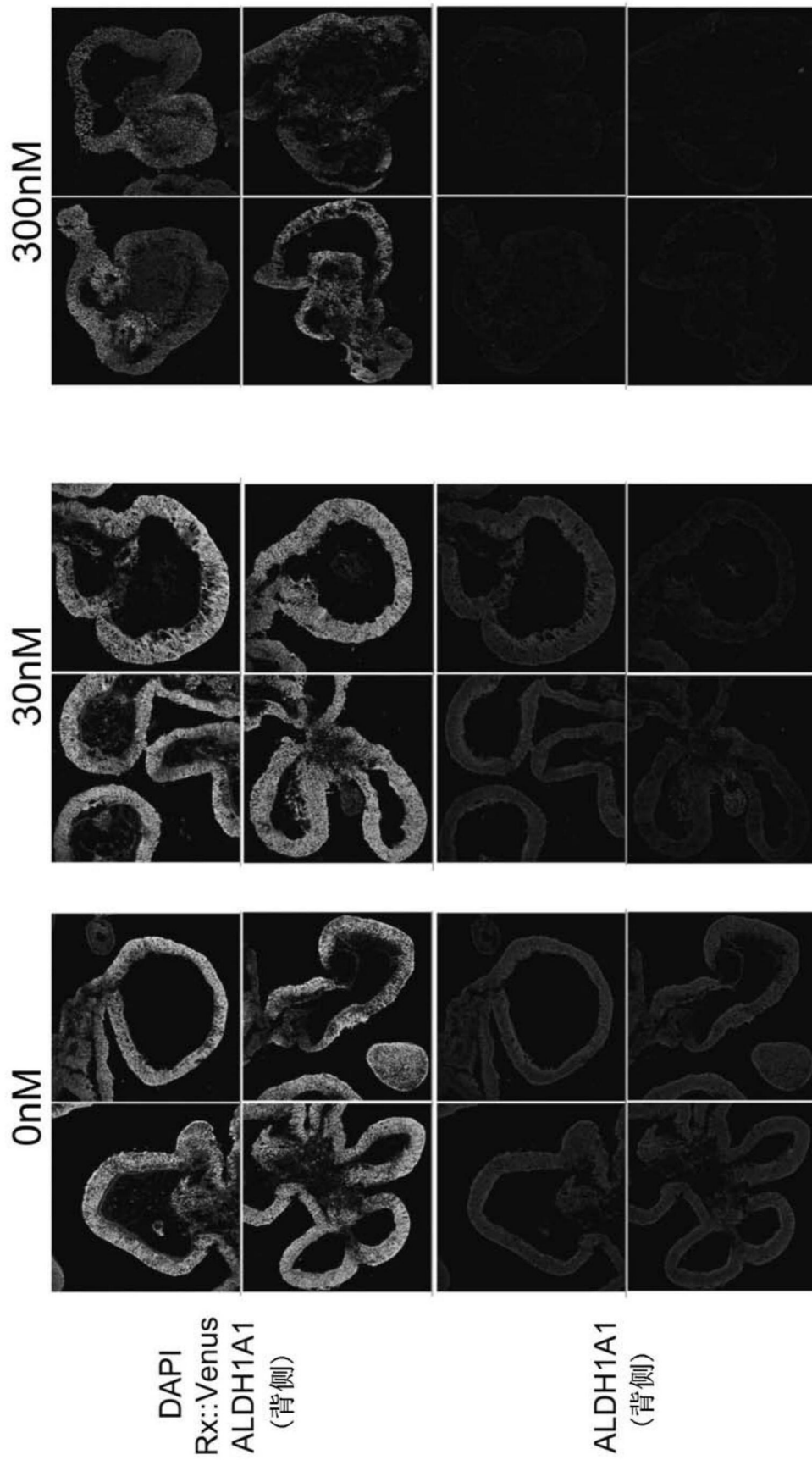


图75

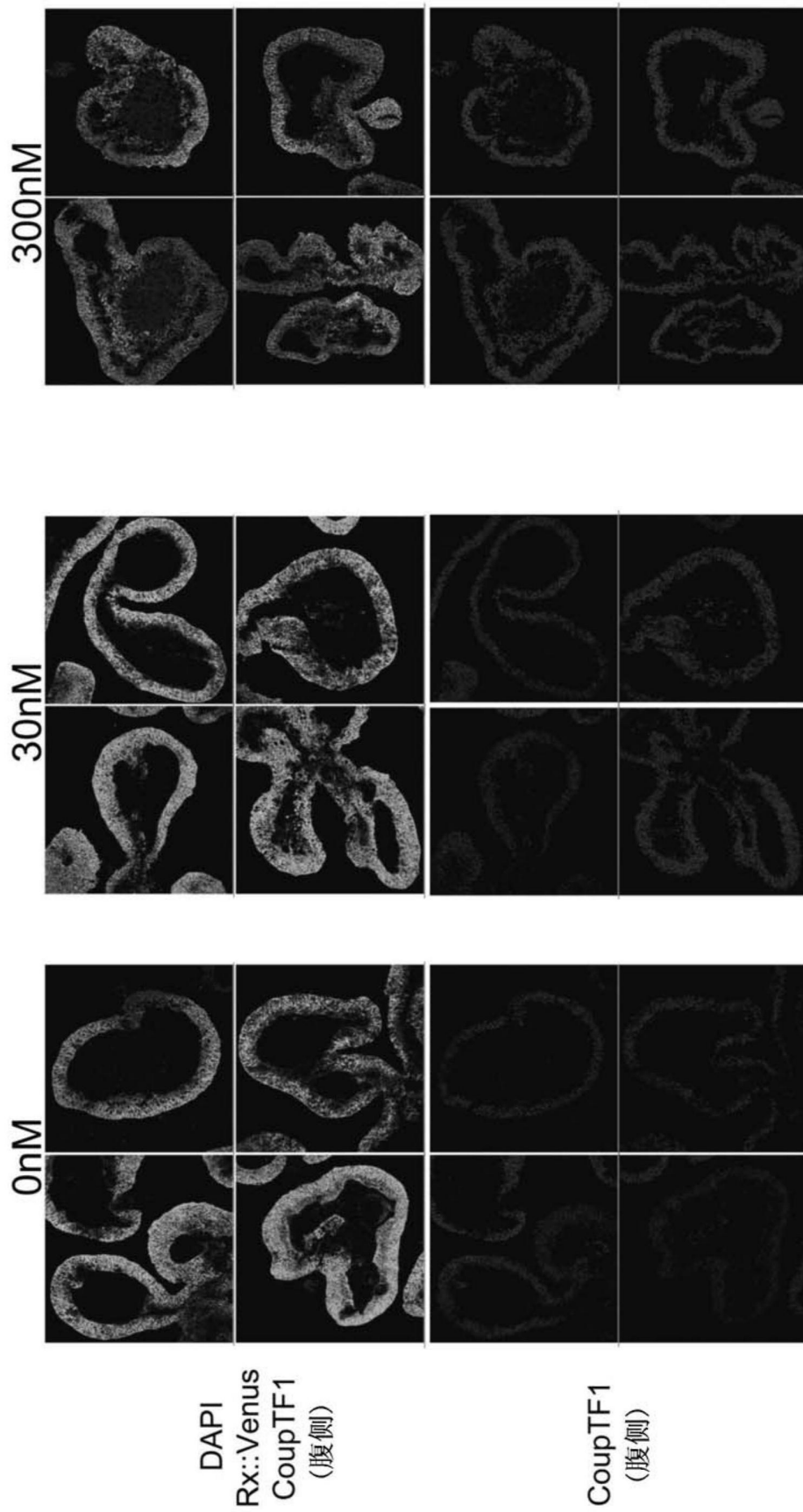


图76

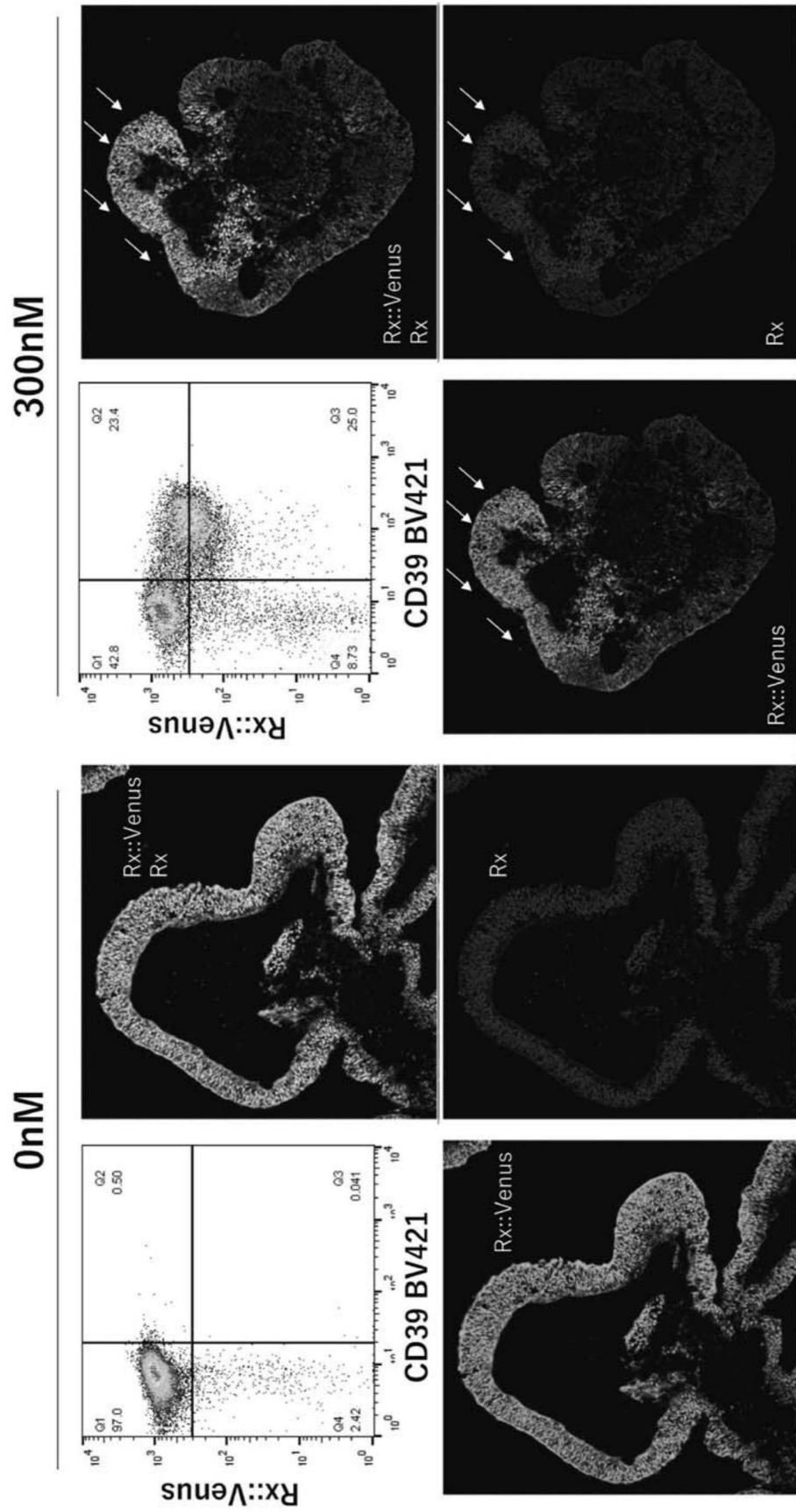


图77

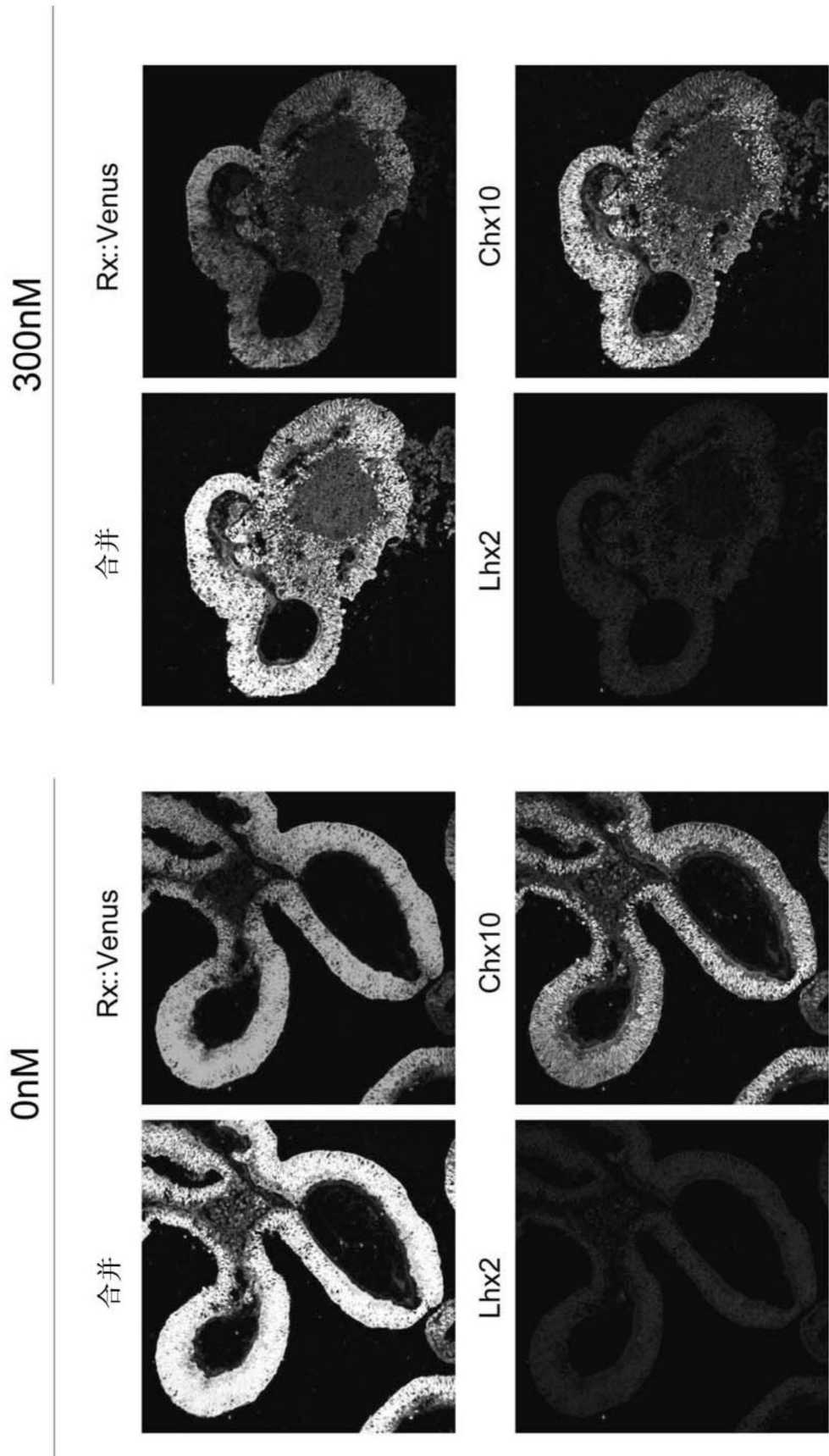


图78

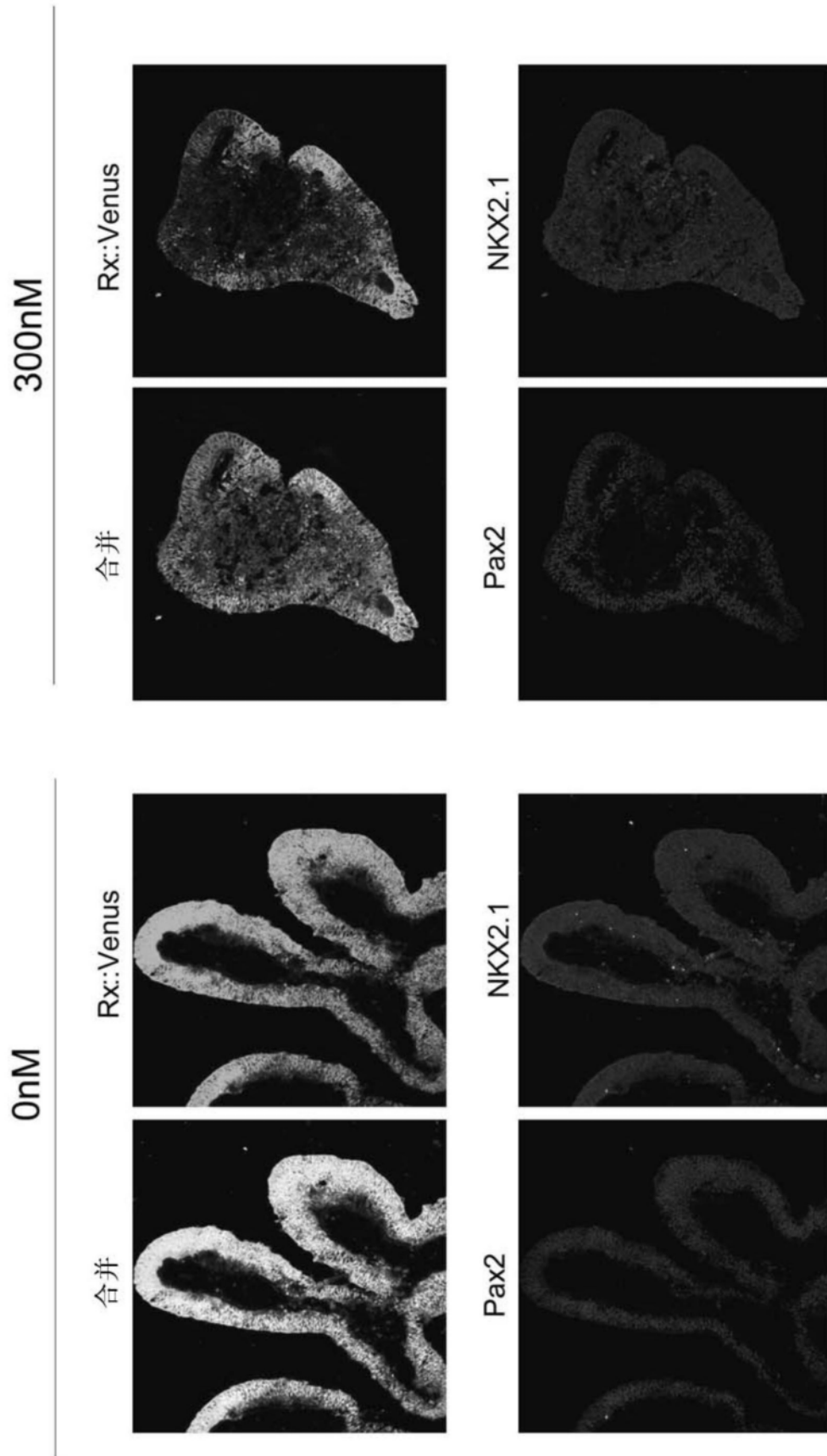


图79

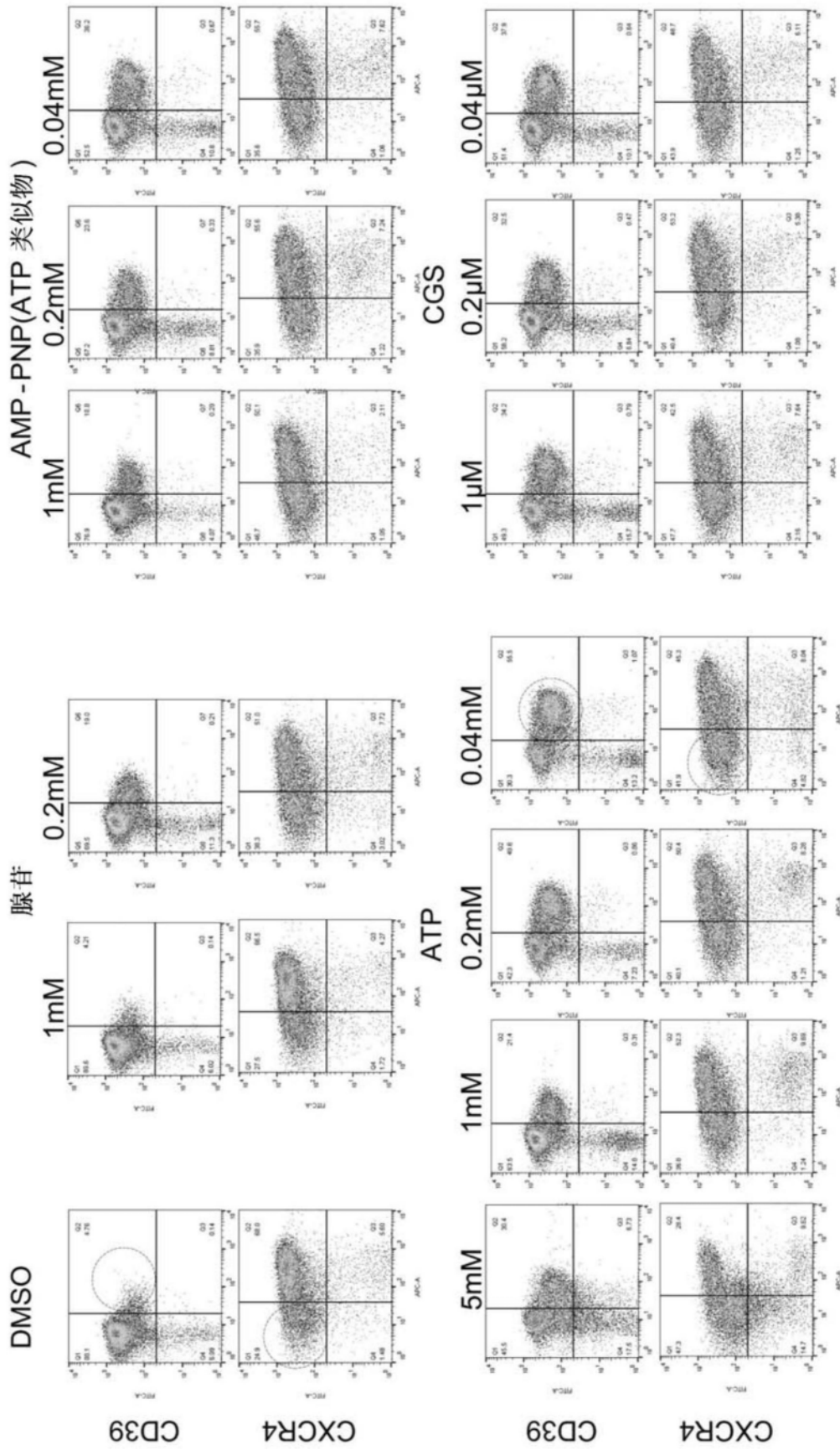


图80

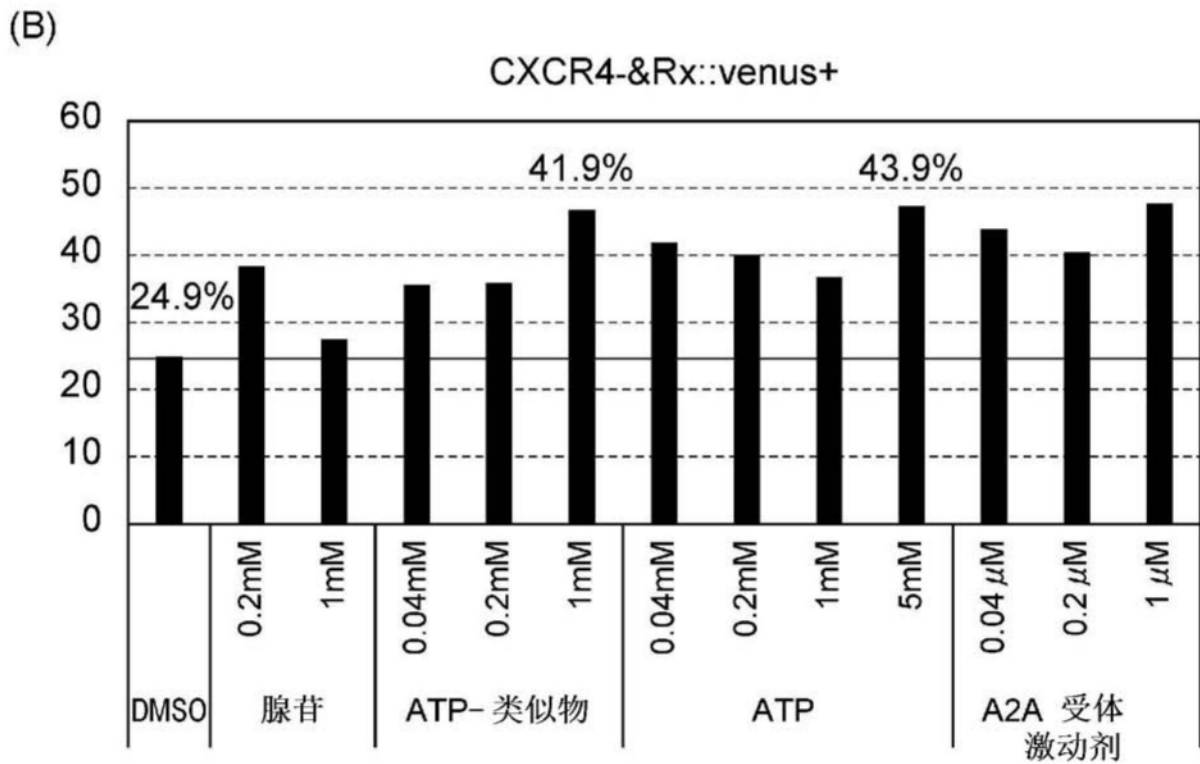
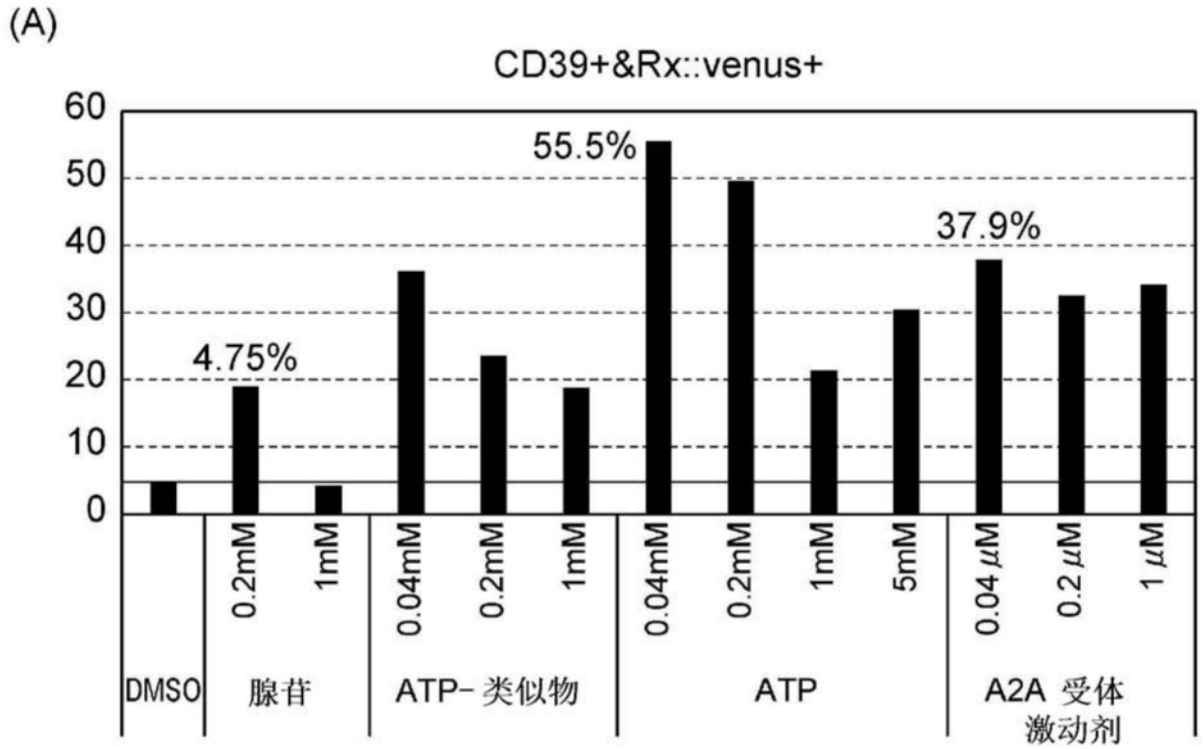


图81

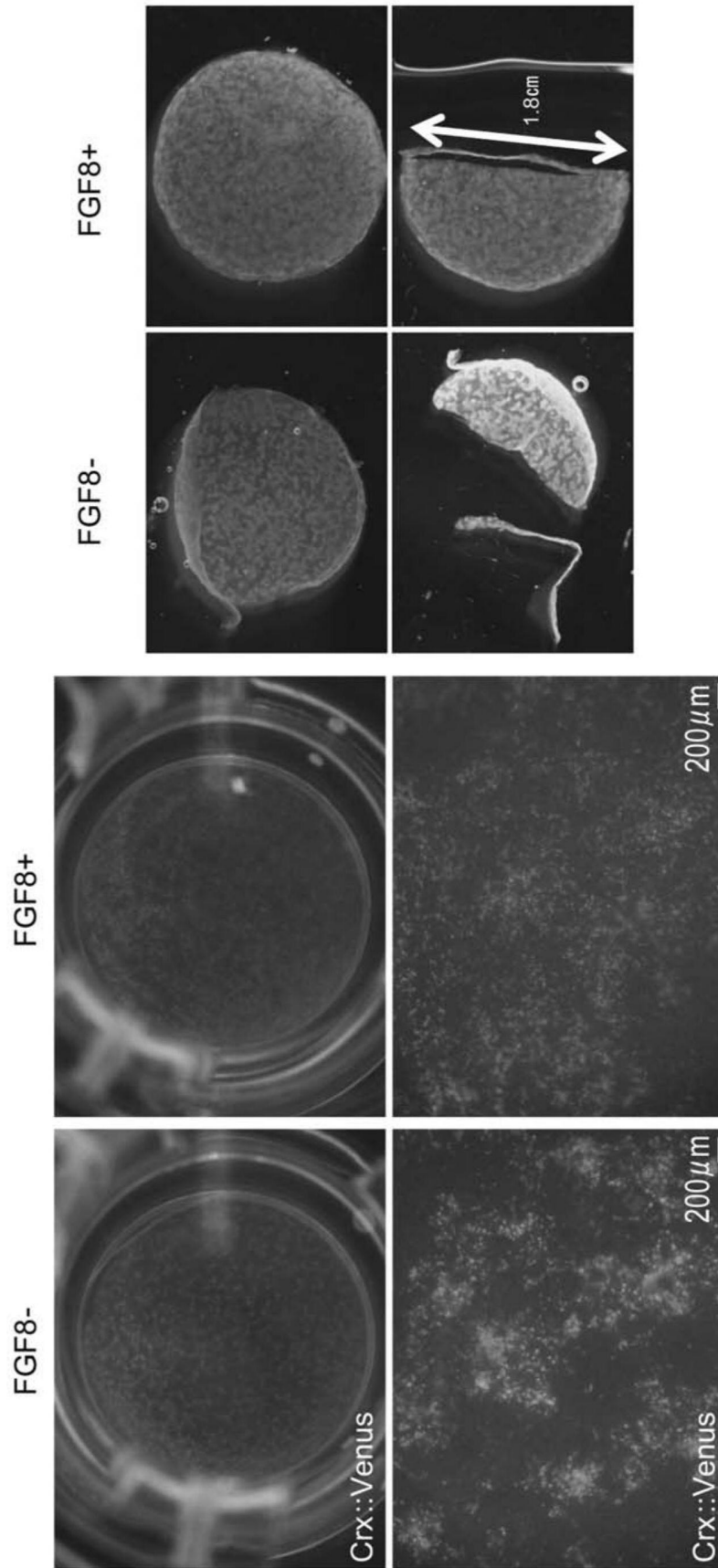


图82

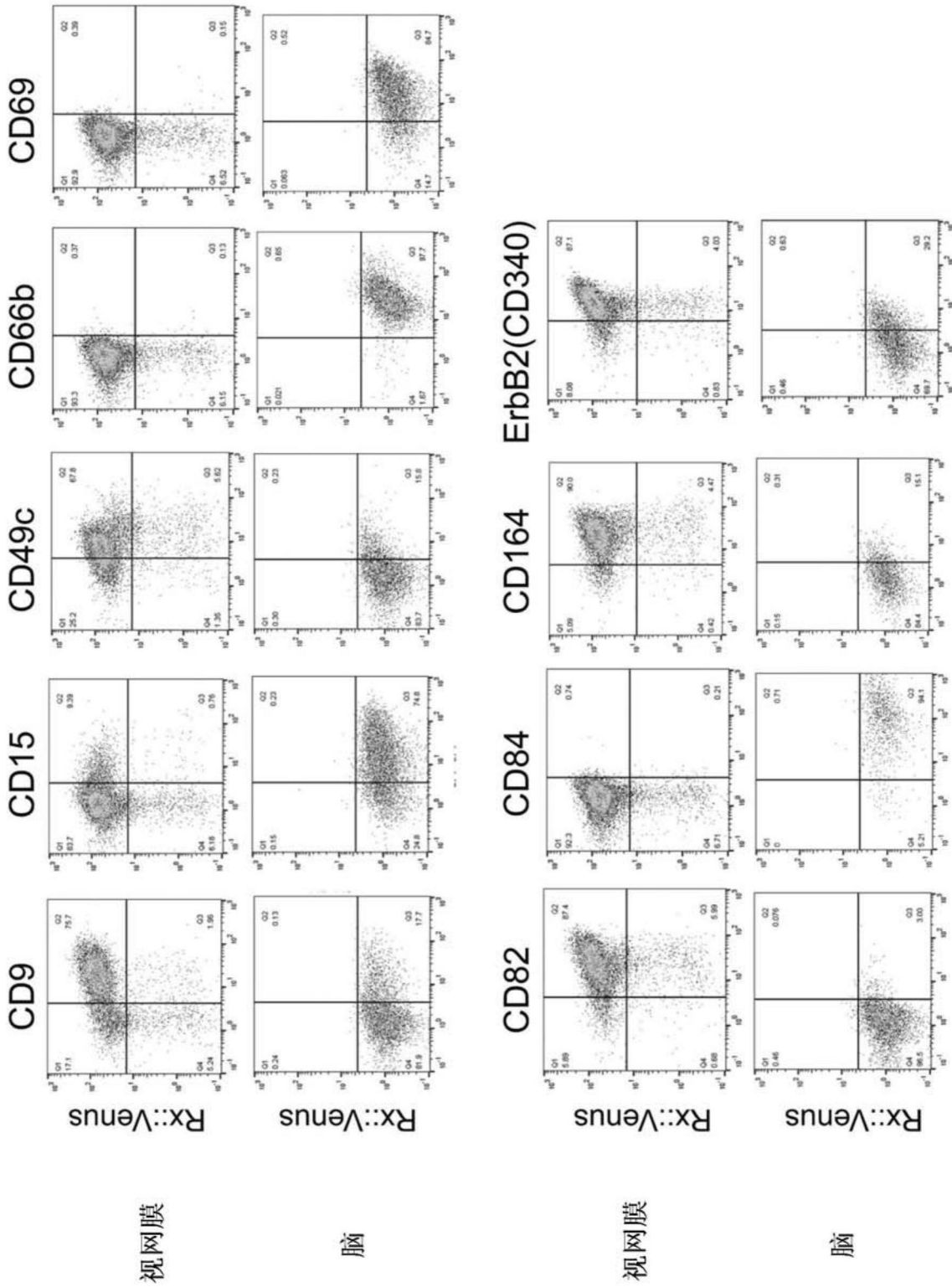


图83

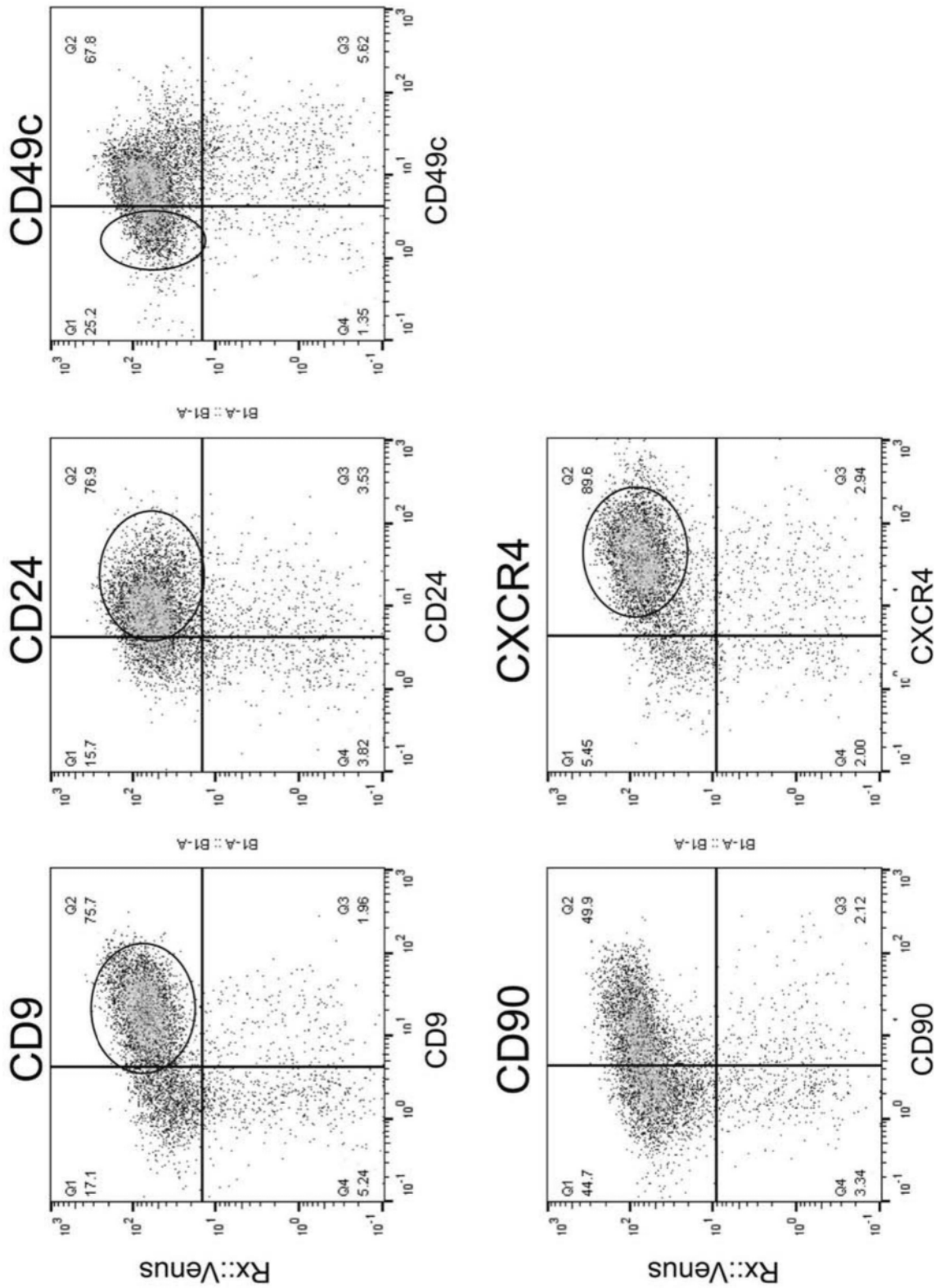


图84

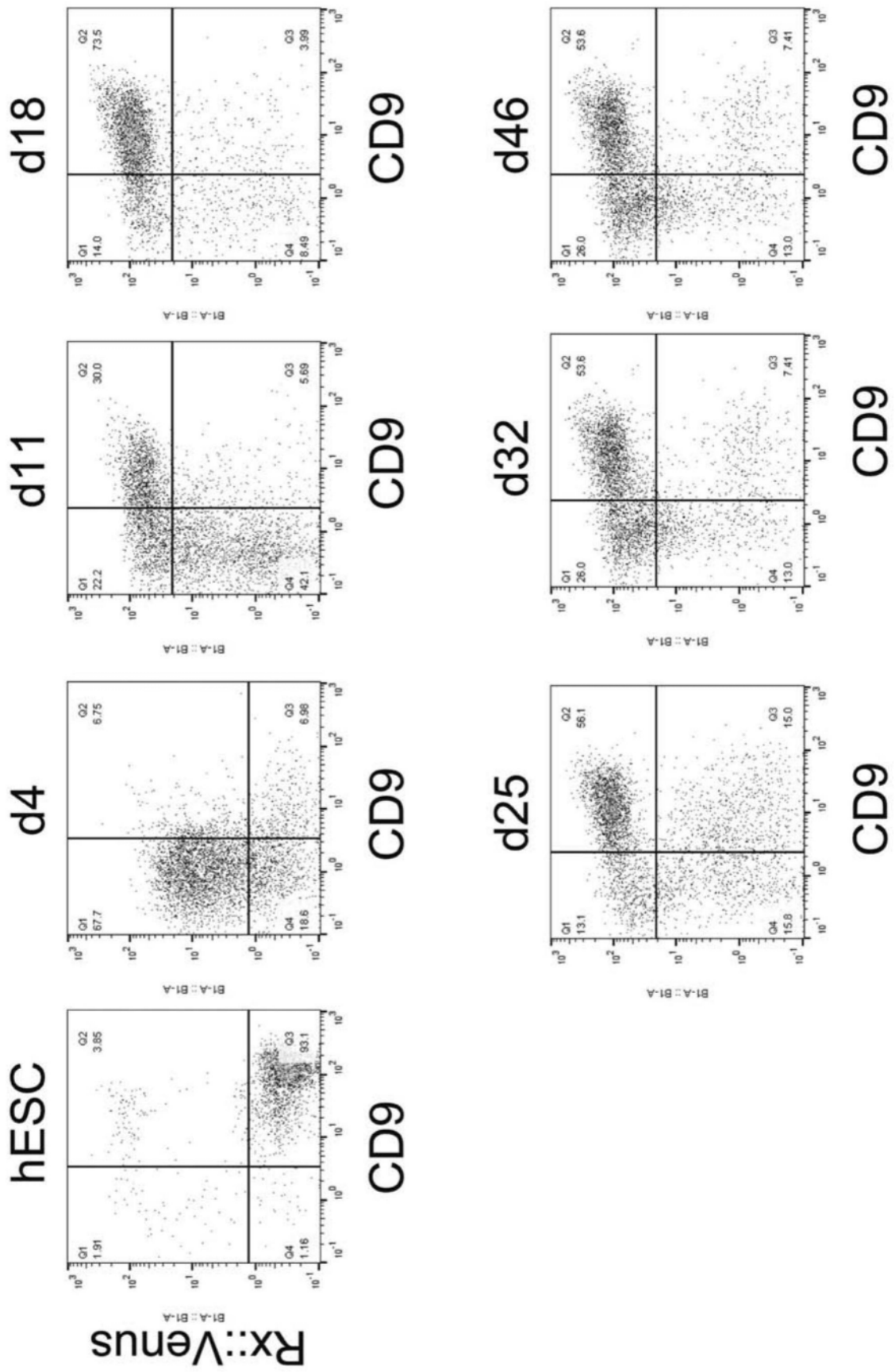


图85

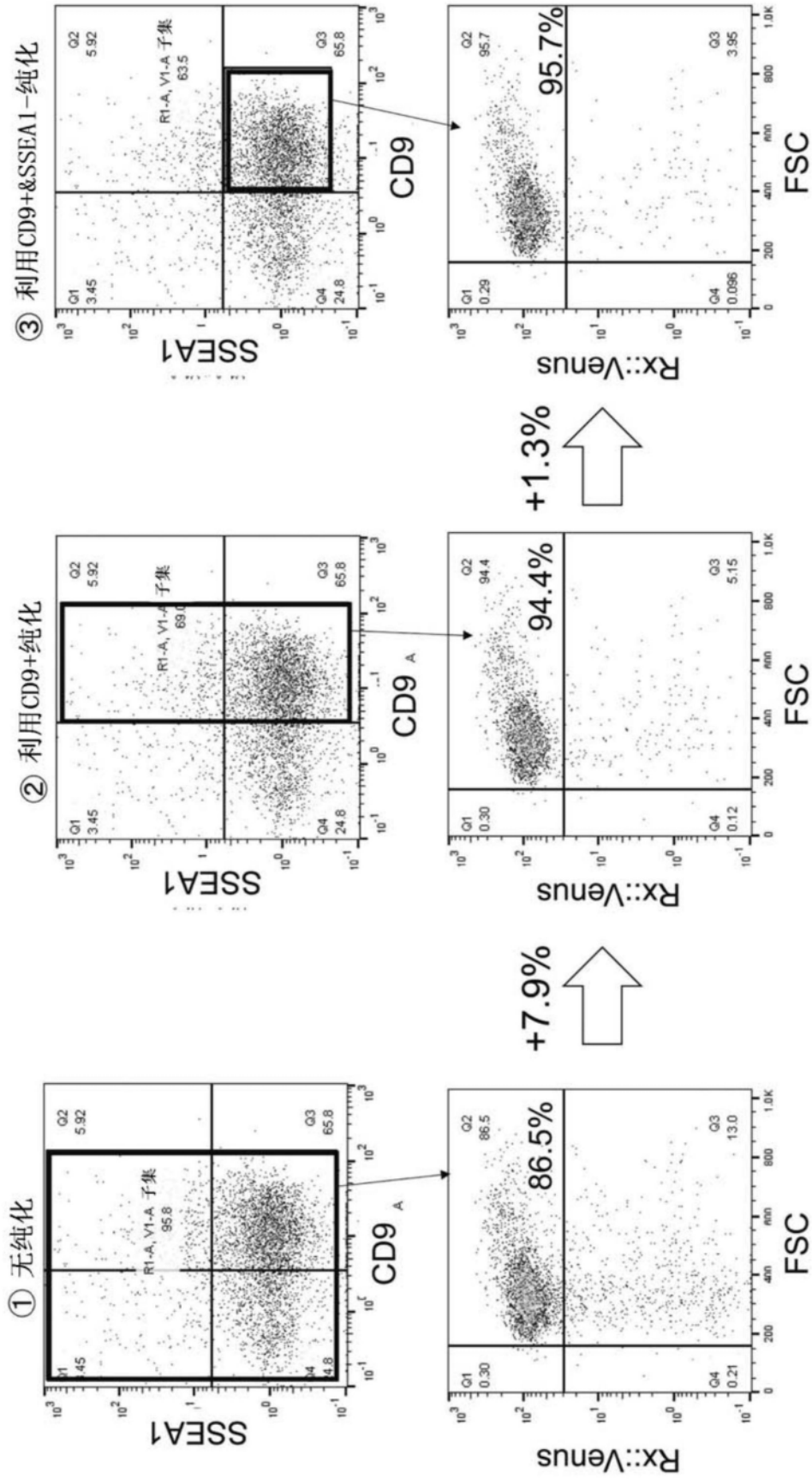


图86

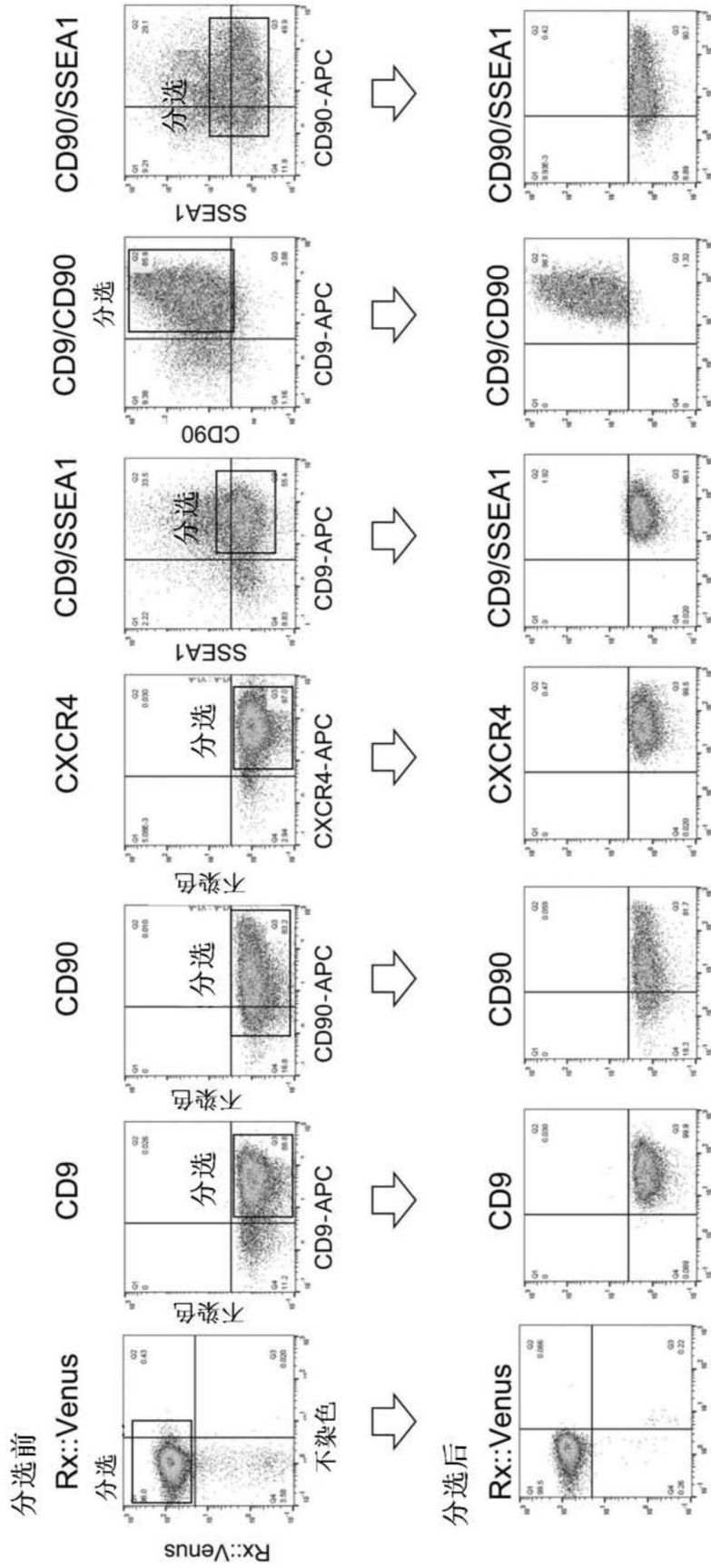


图87

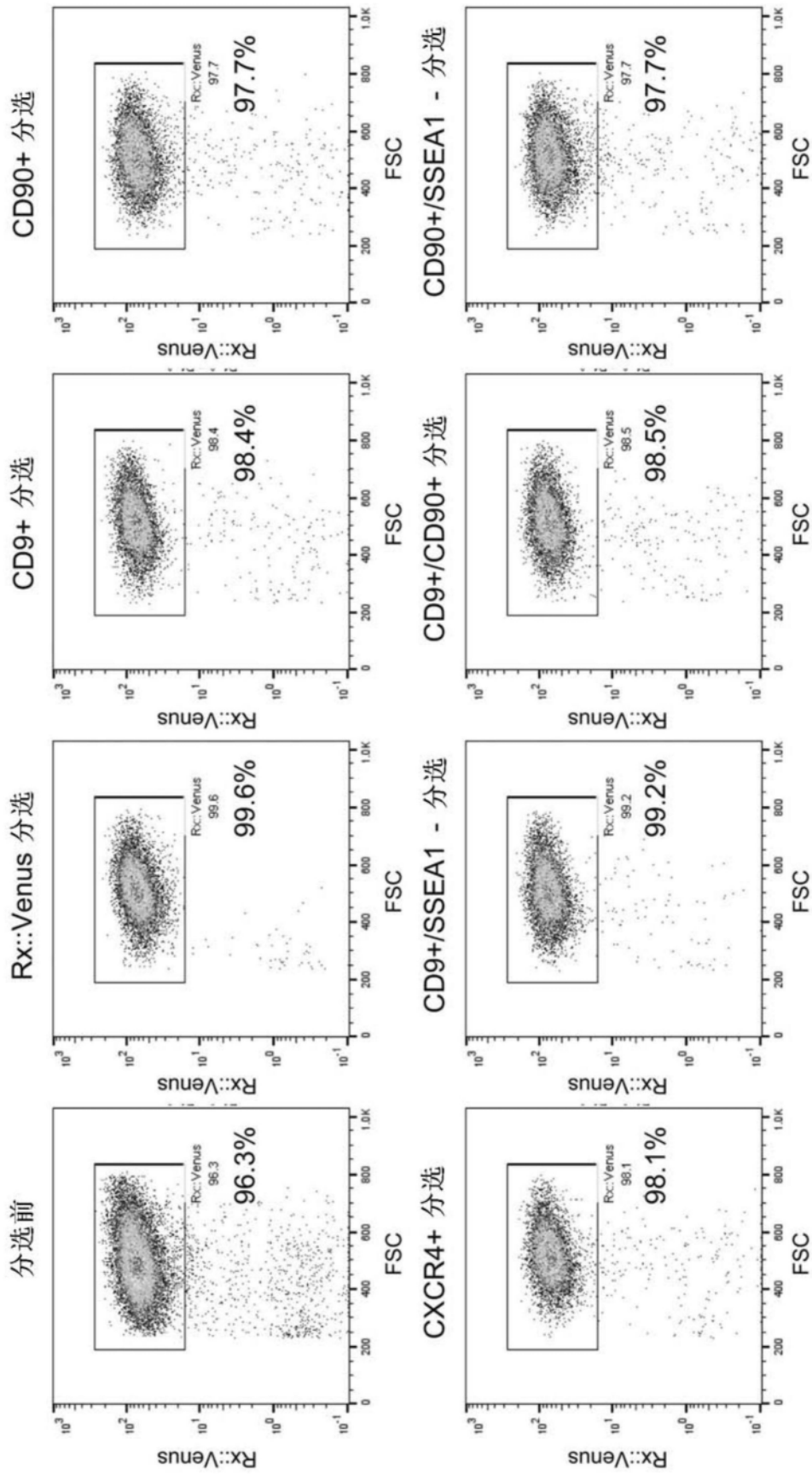


图88

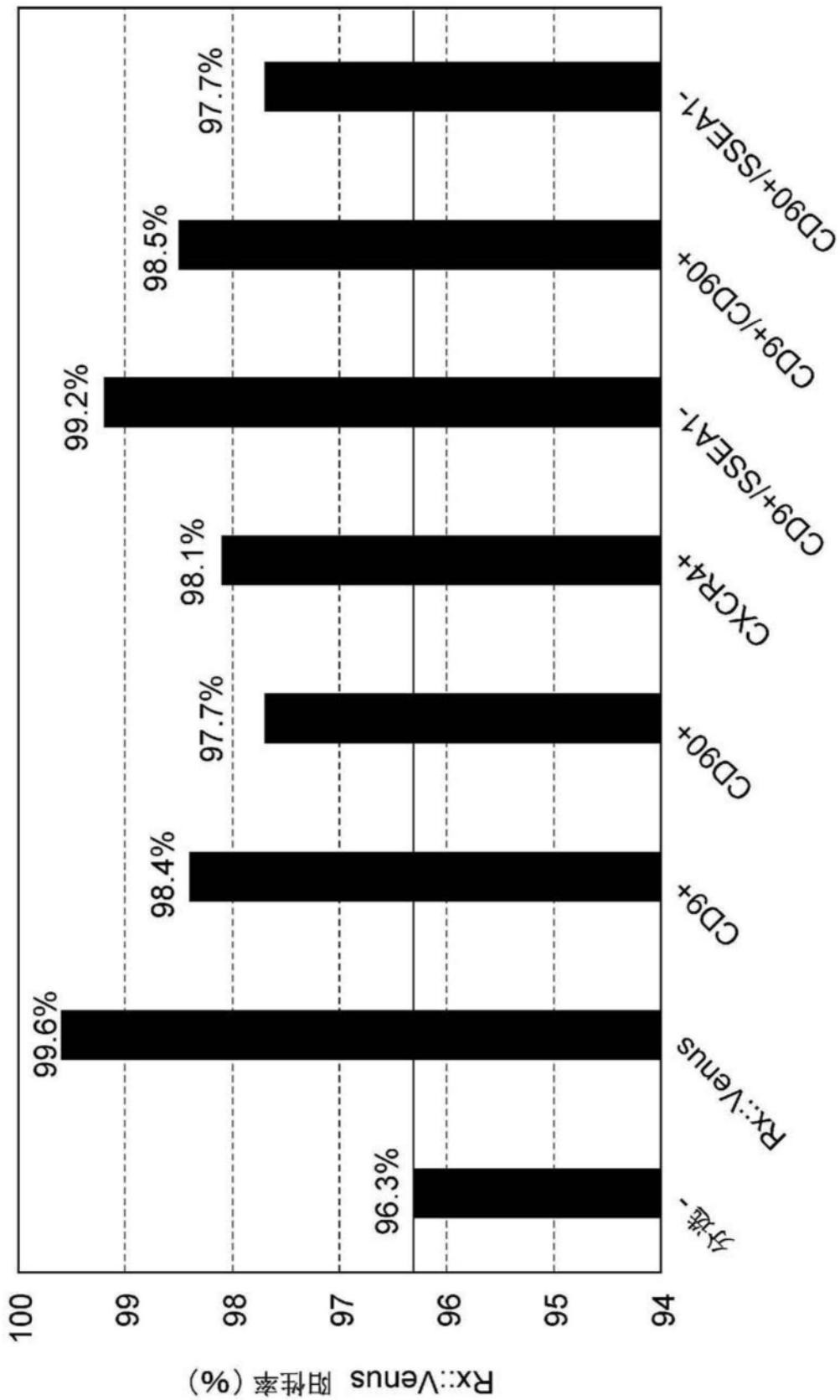


图89

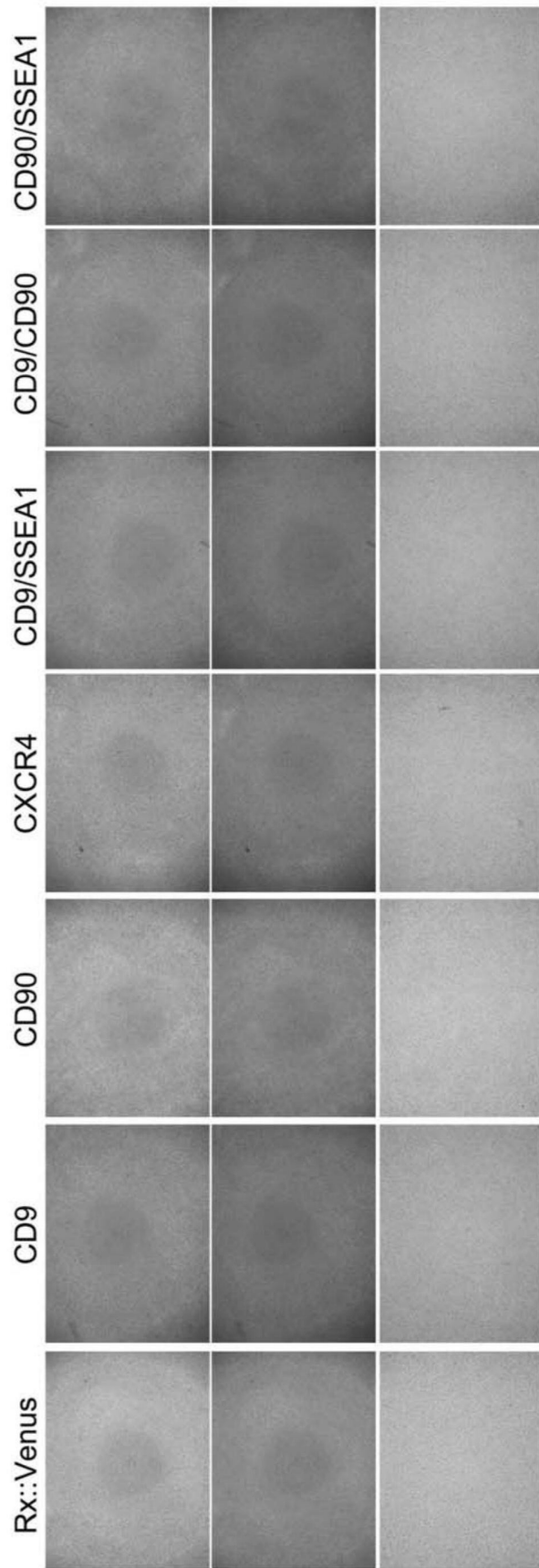


图90

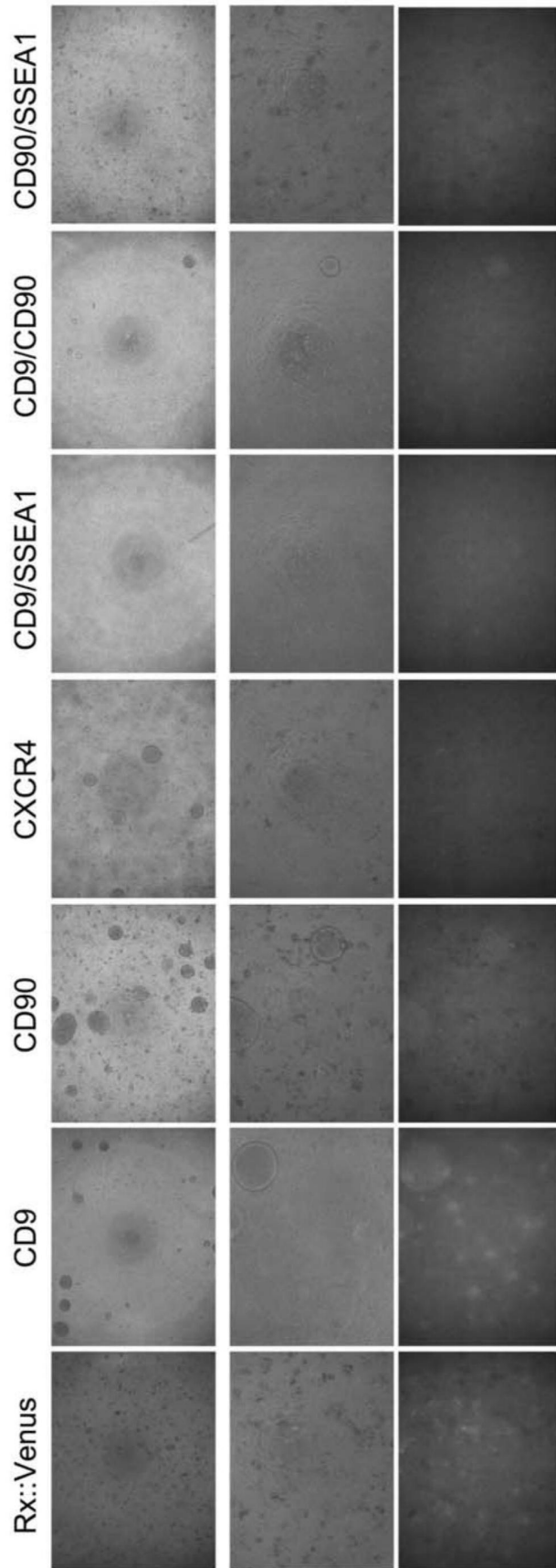


图91

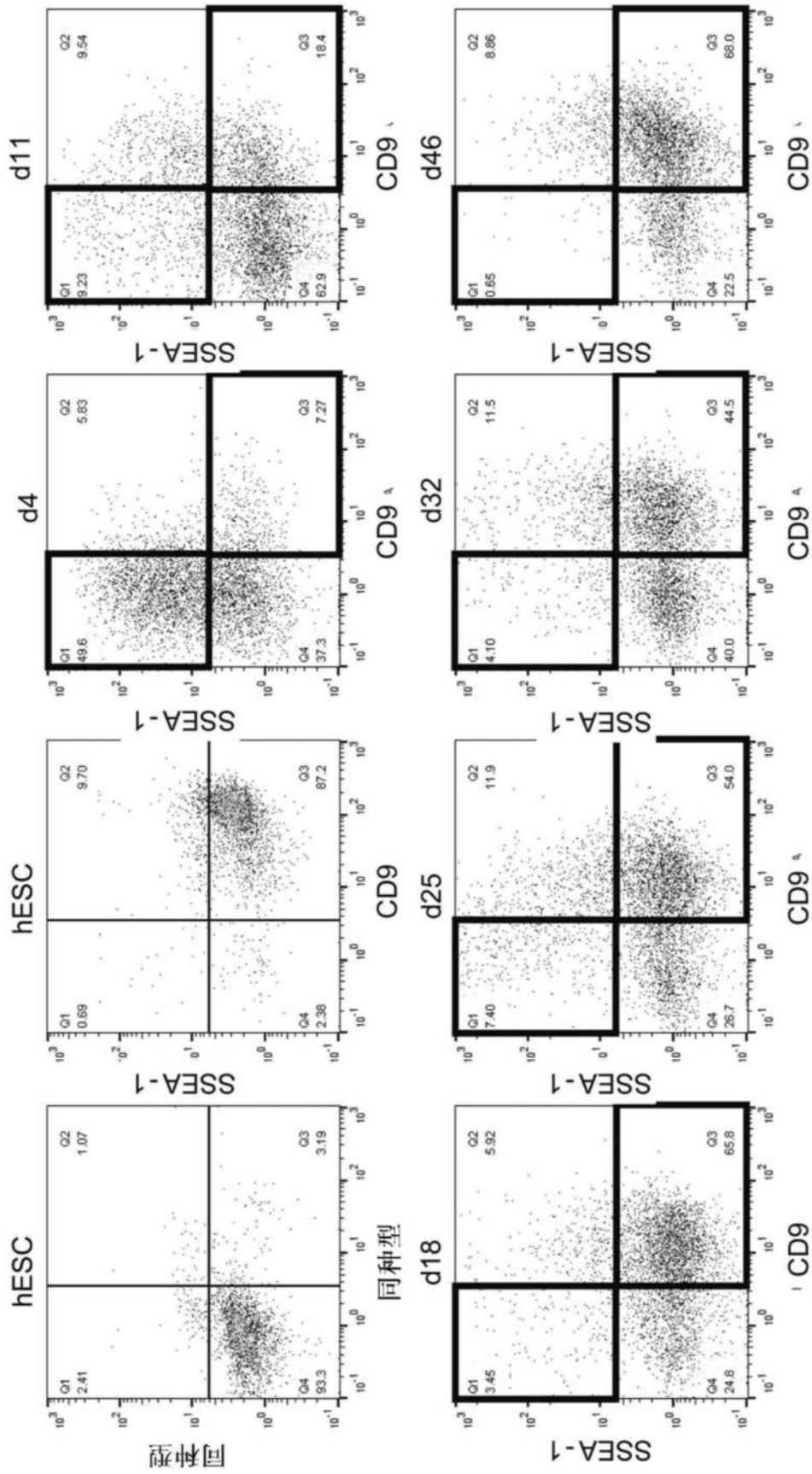


图92

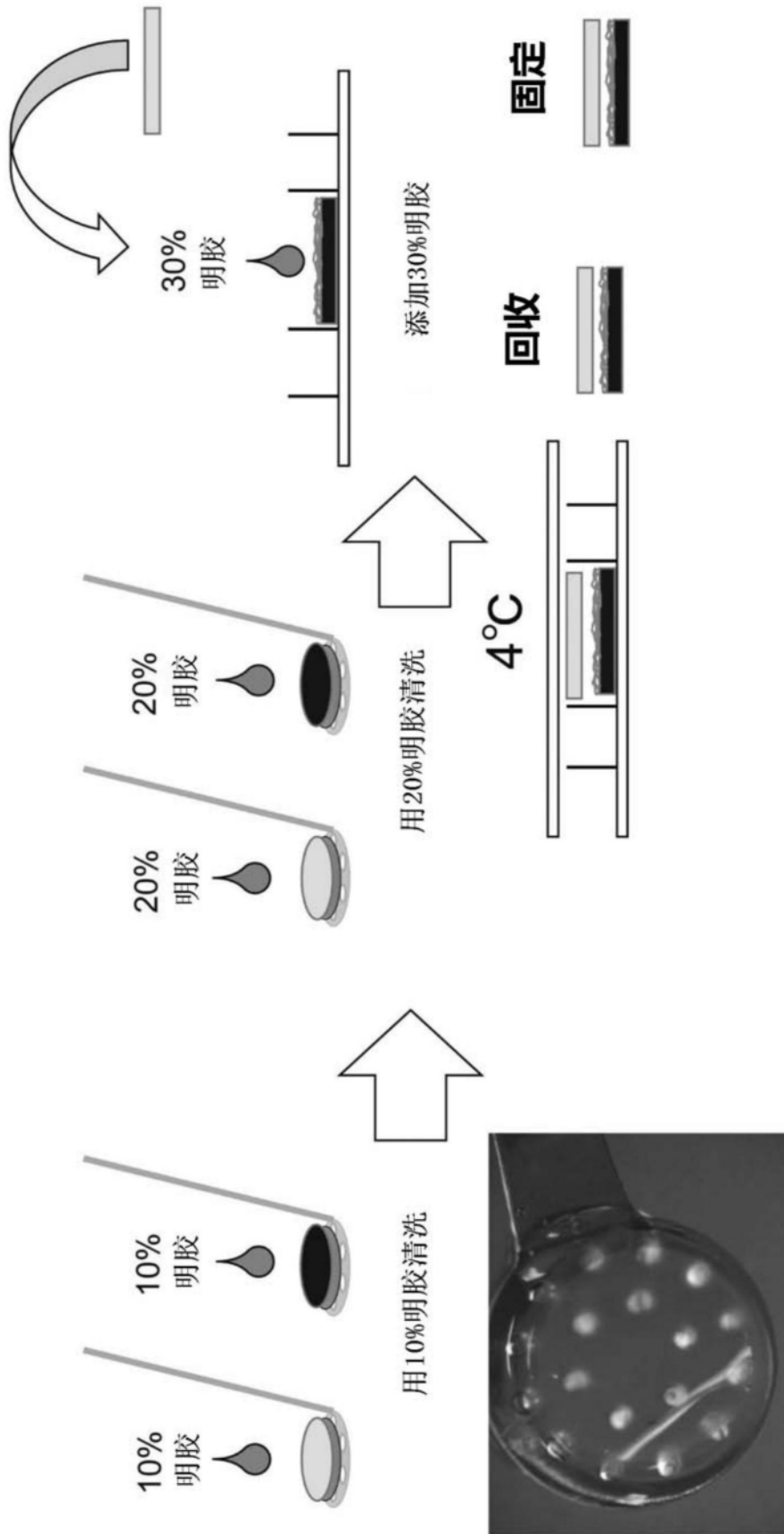


图93

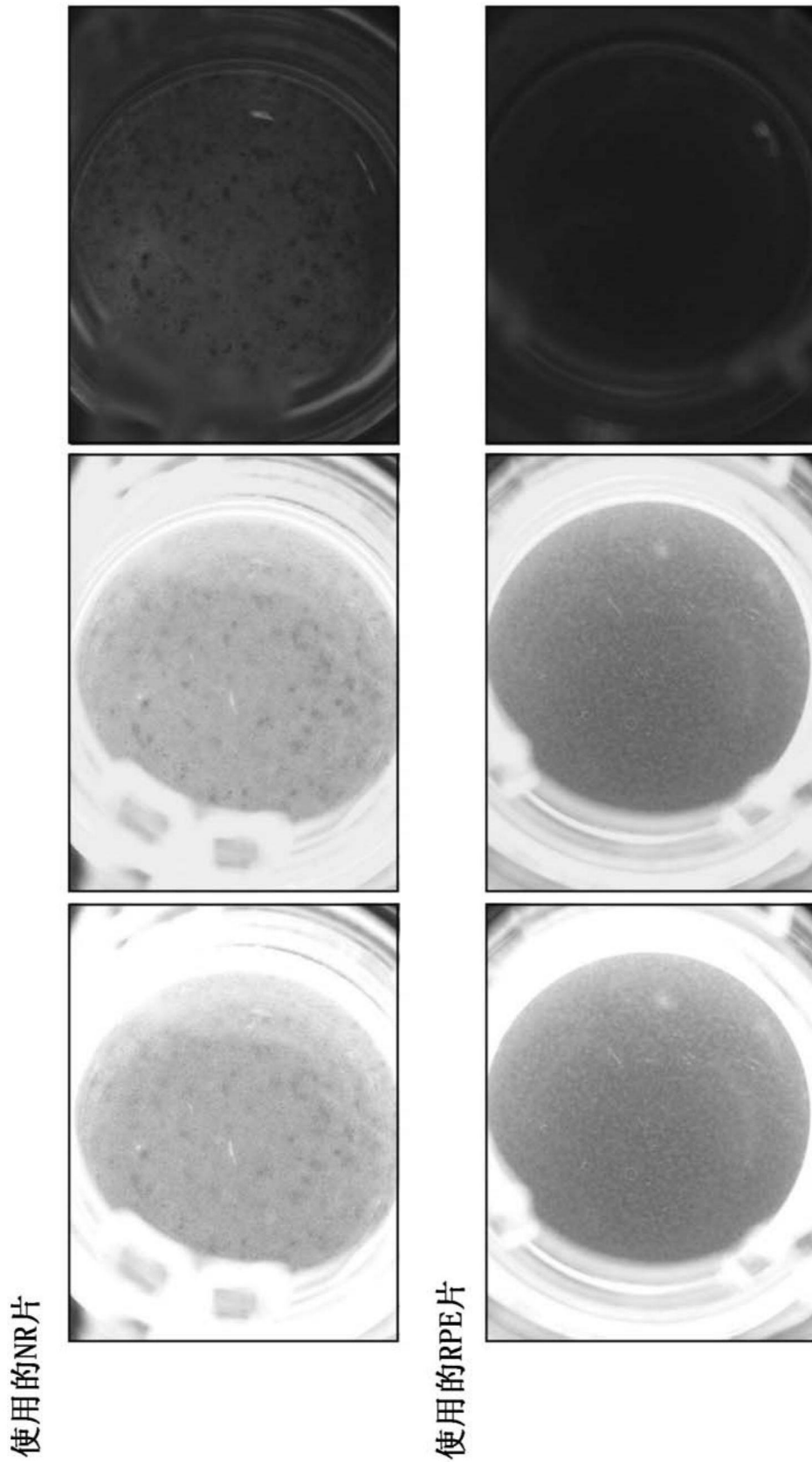


图94

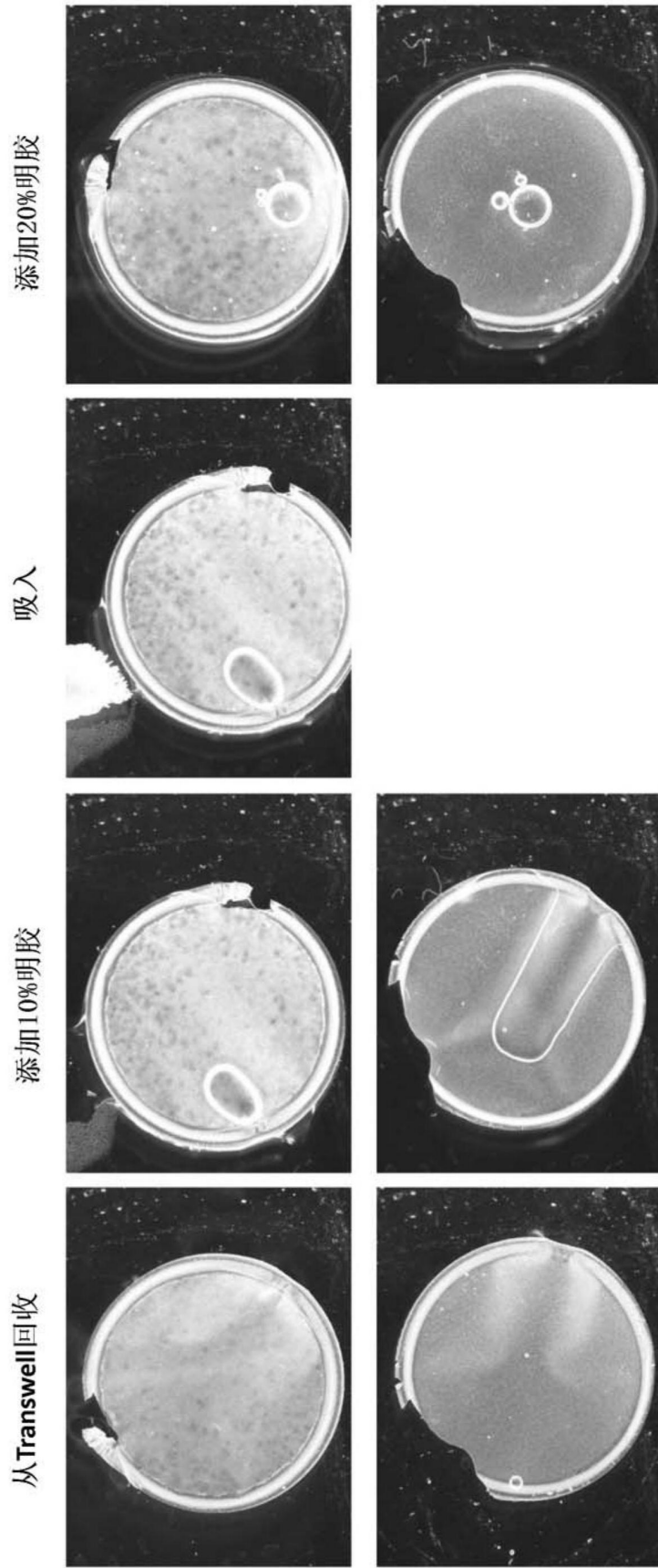


图95

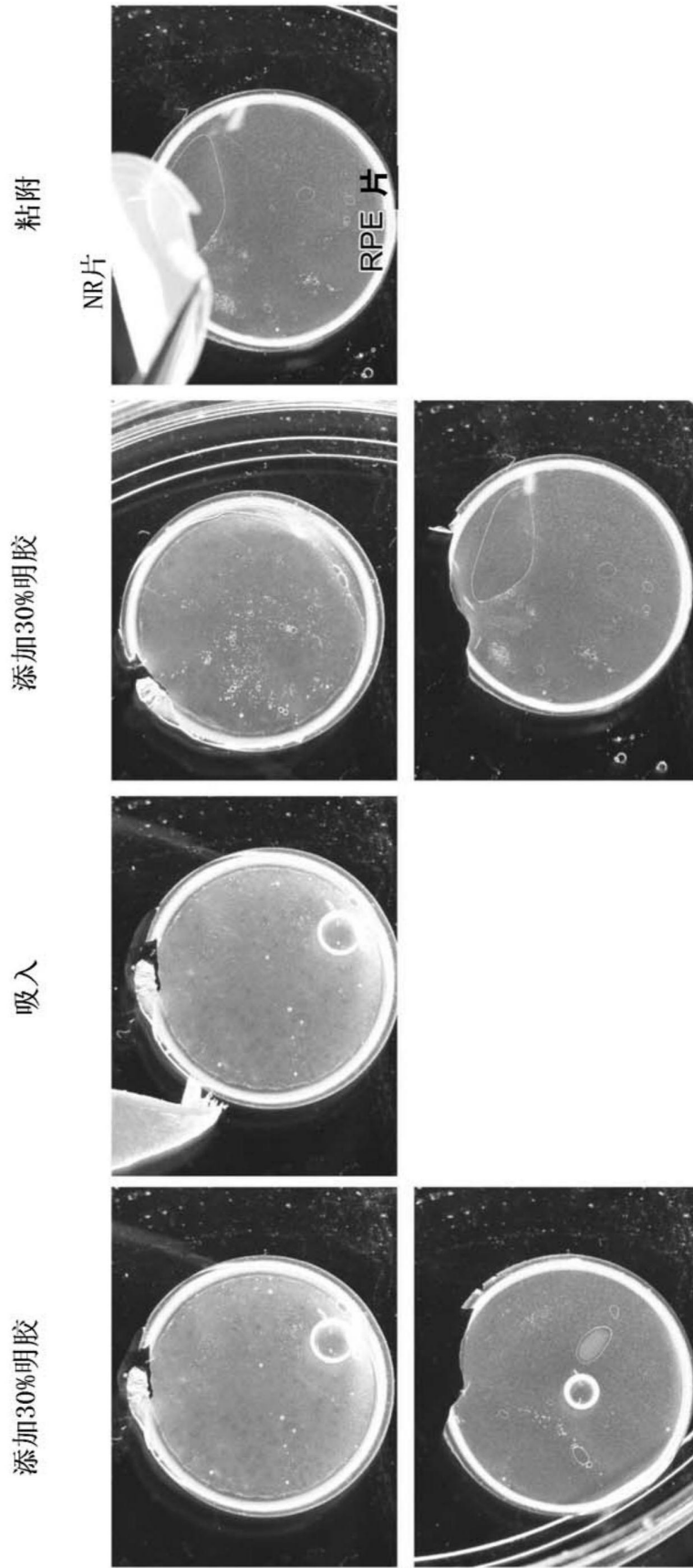


图96

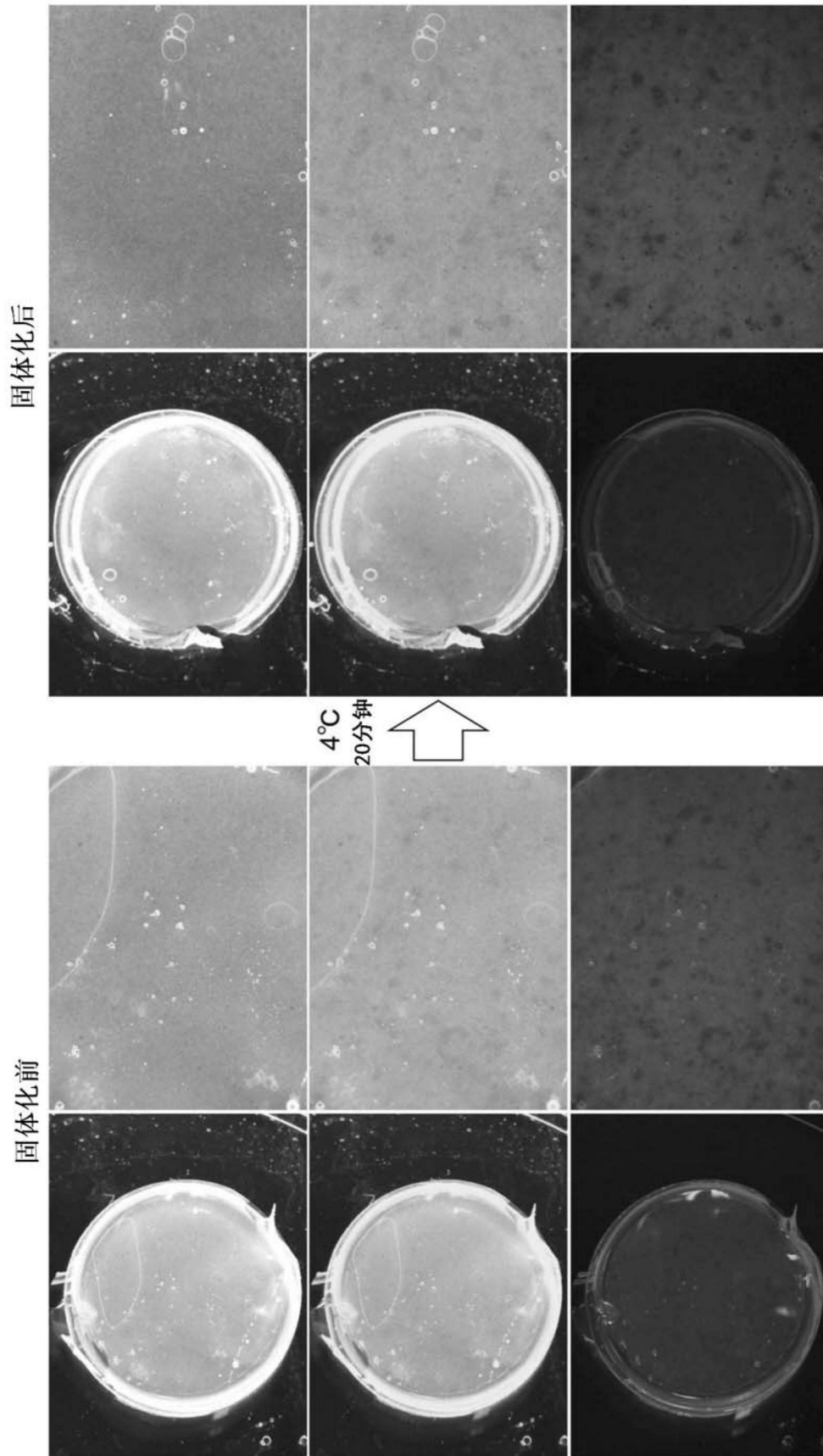


图97

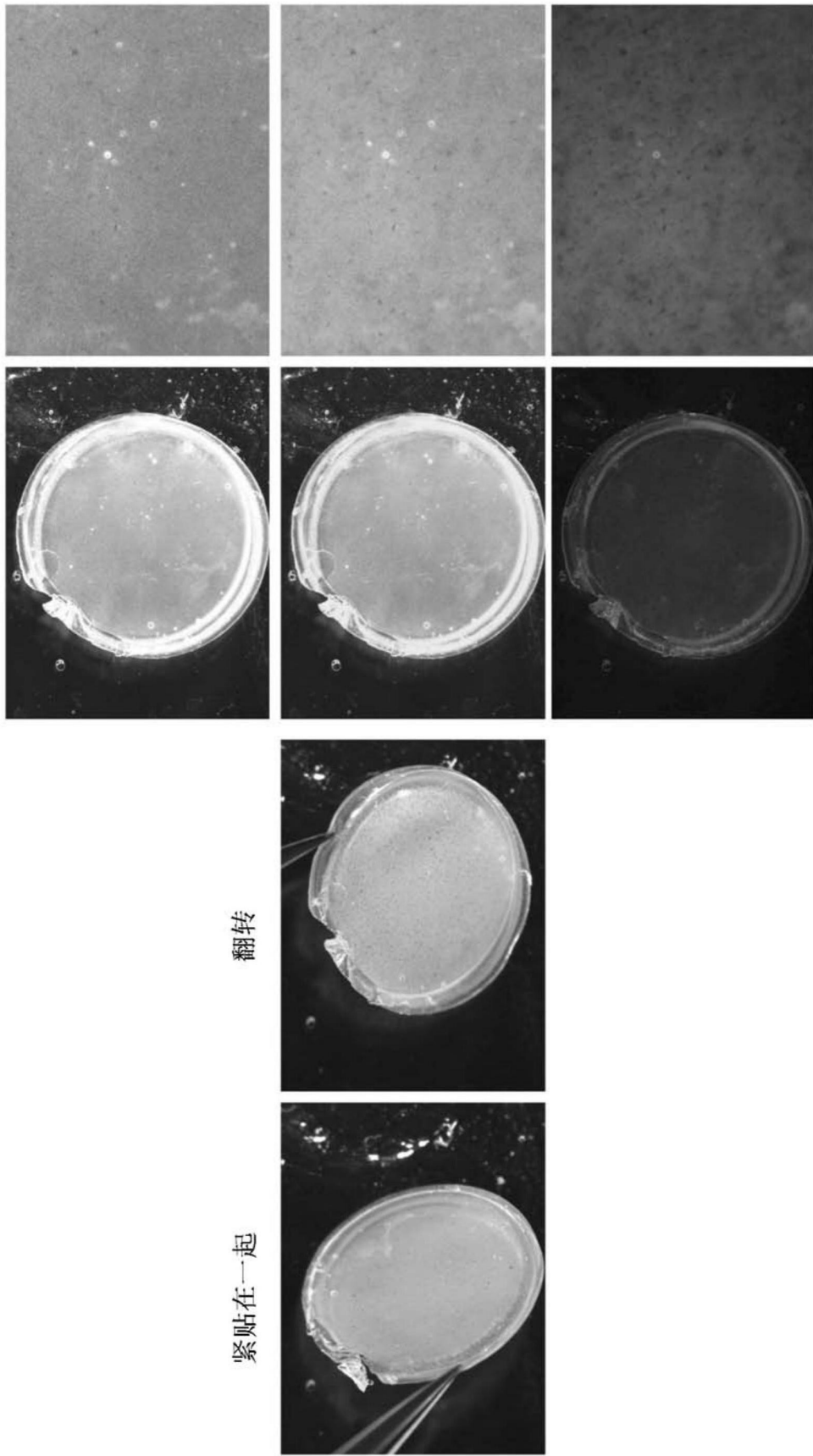


图98

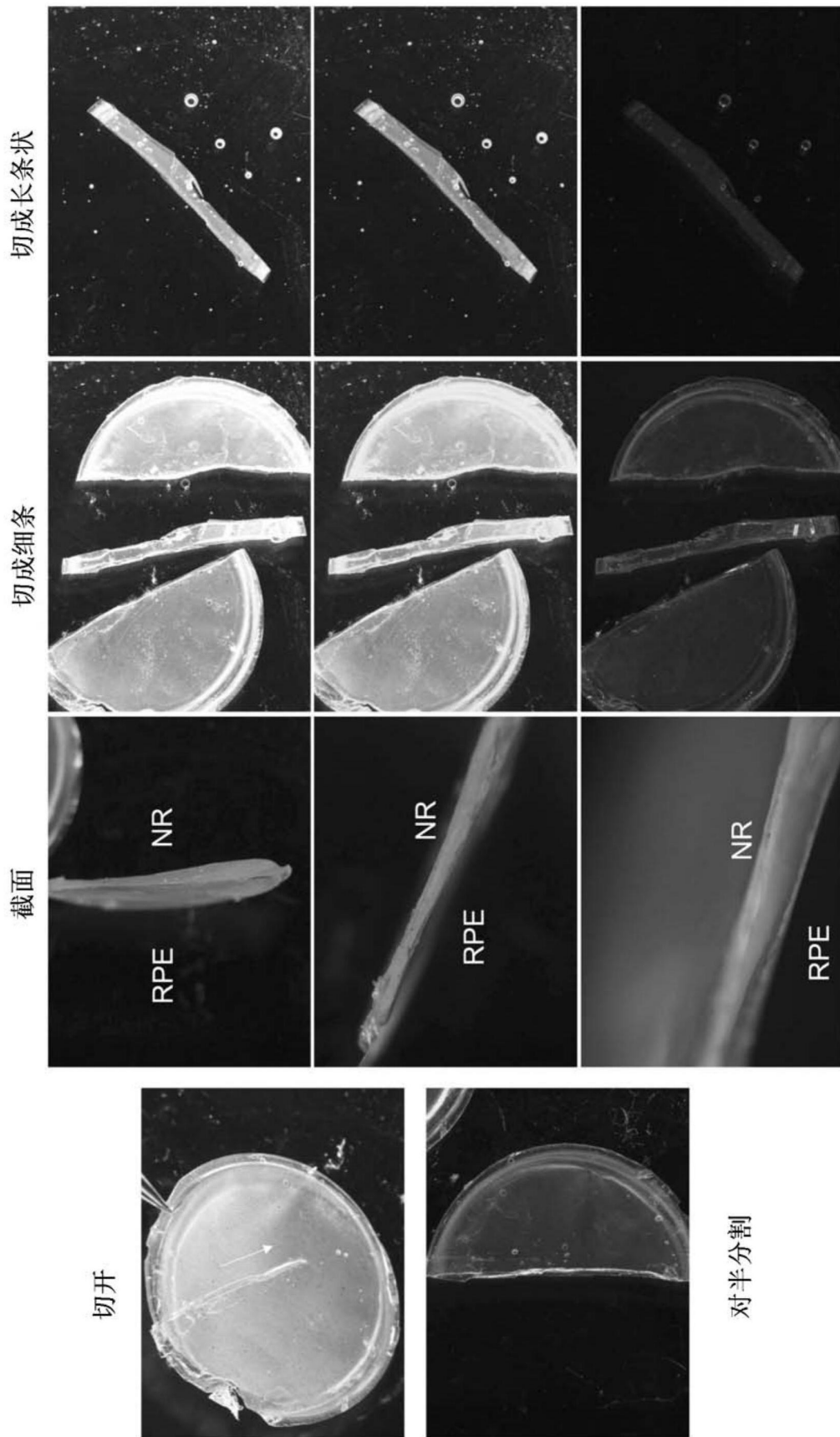


图99

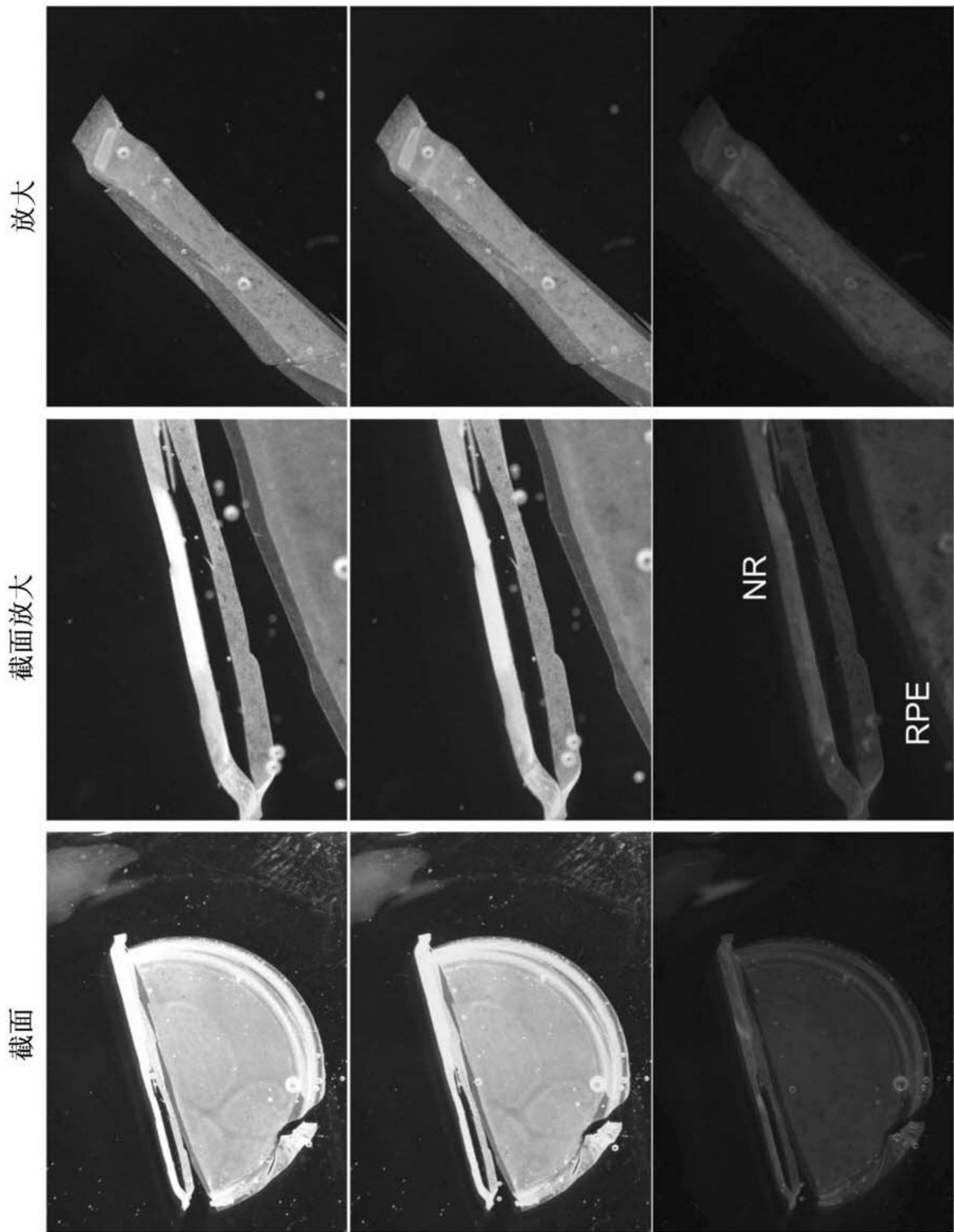


图100

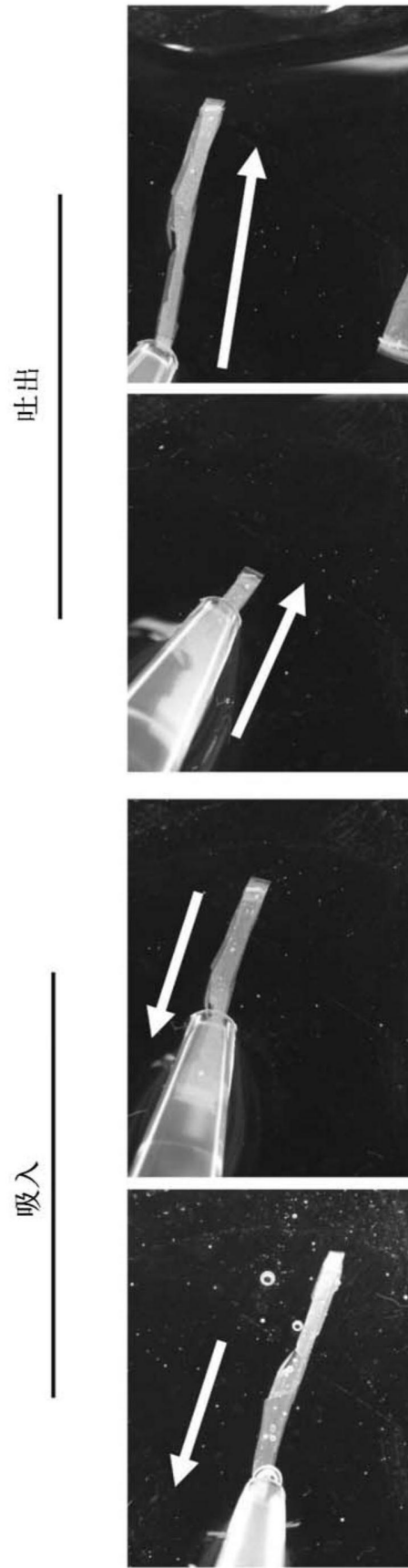


图101

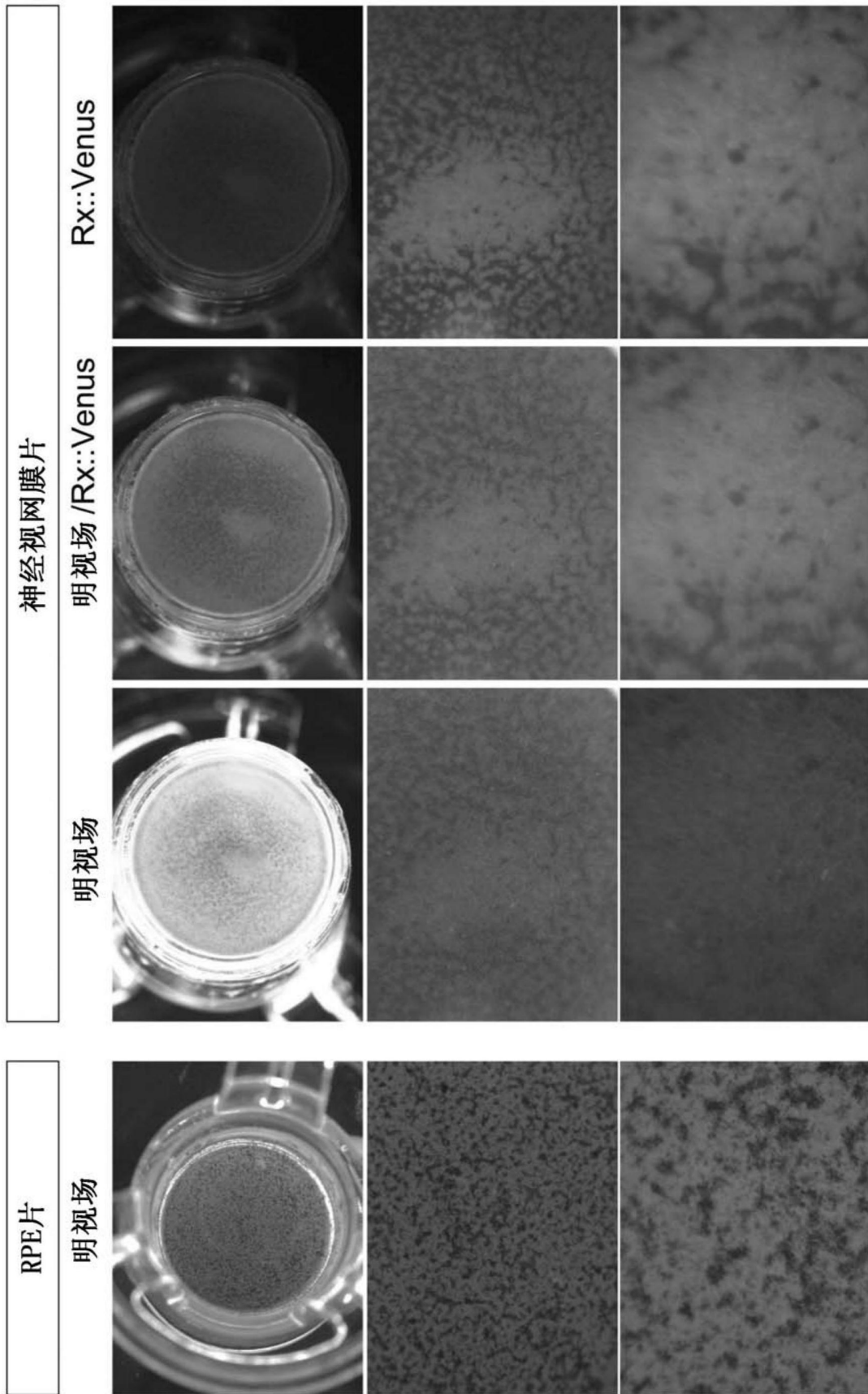


图102

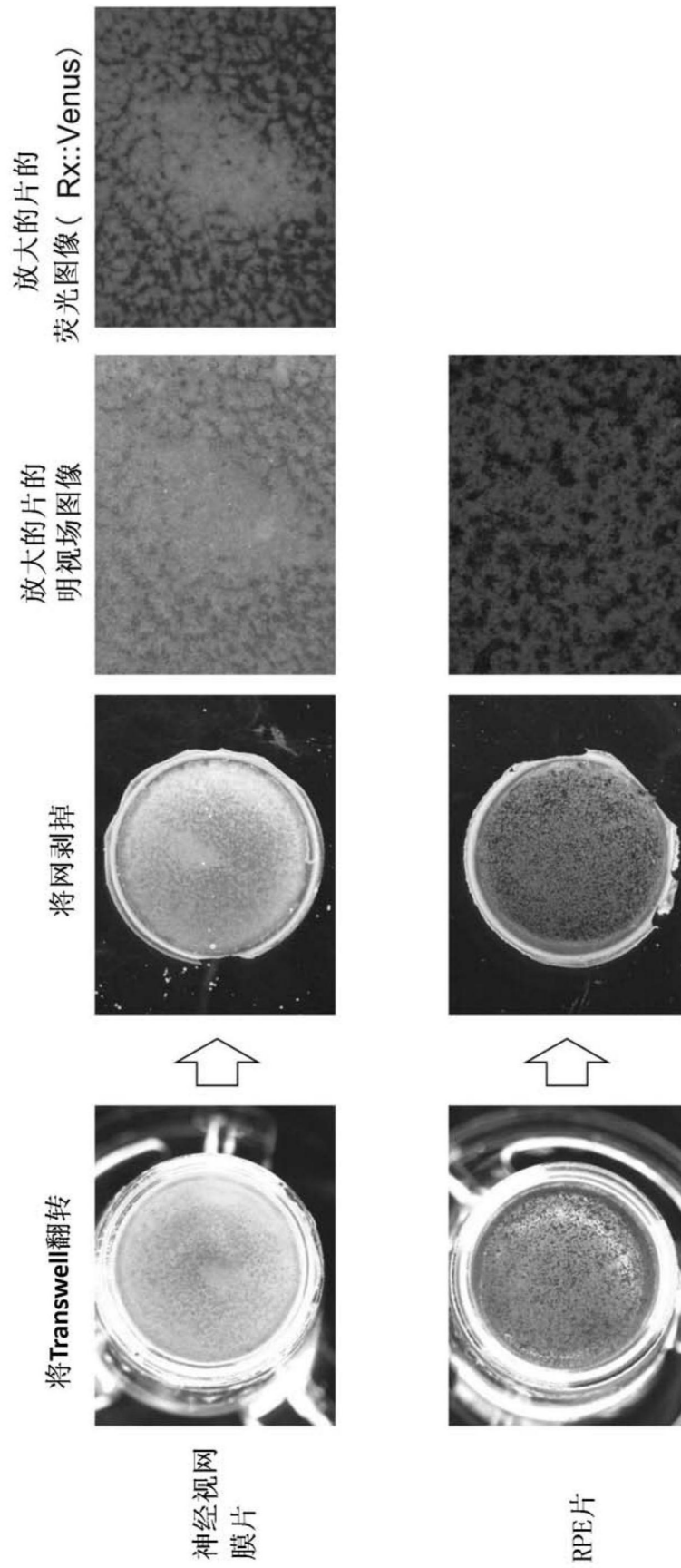


图103

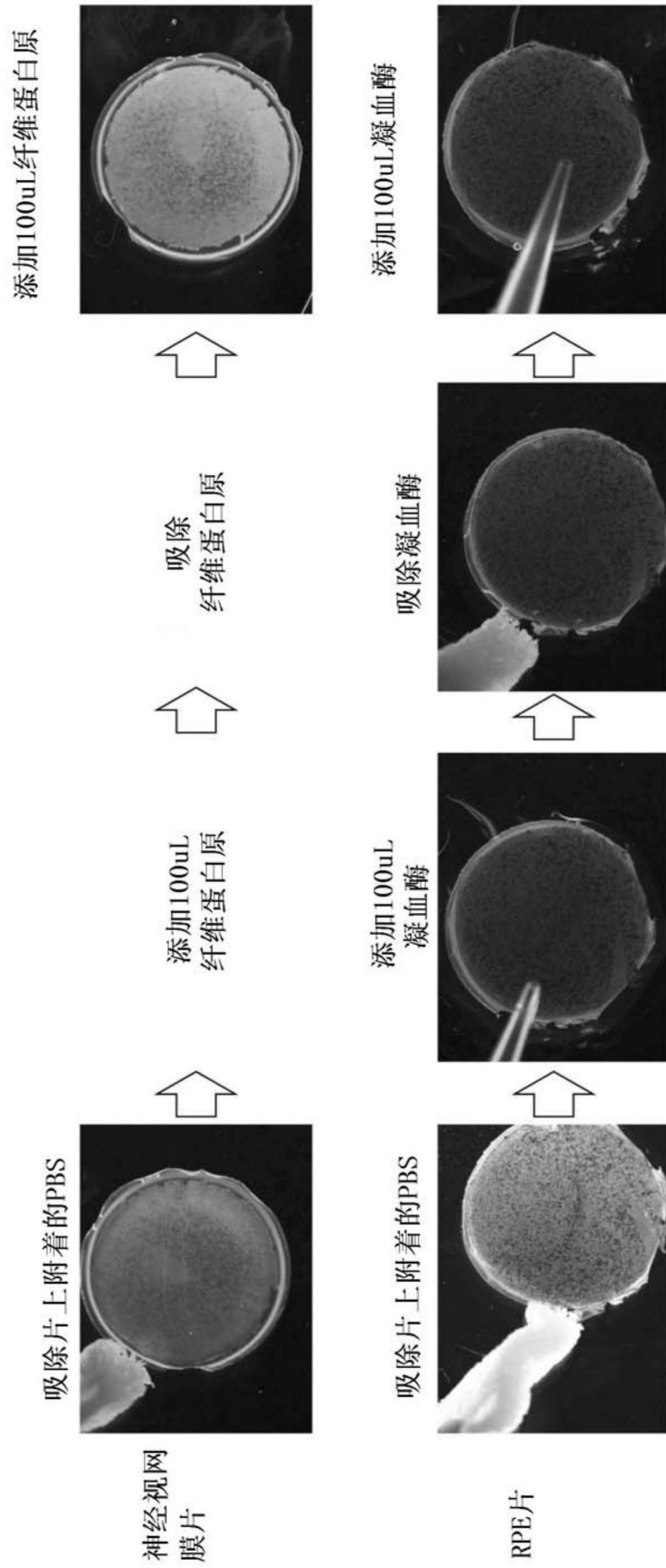


图104

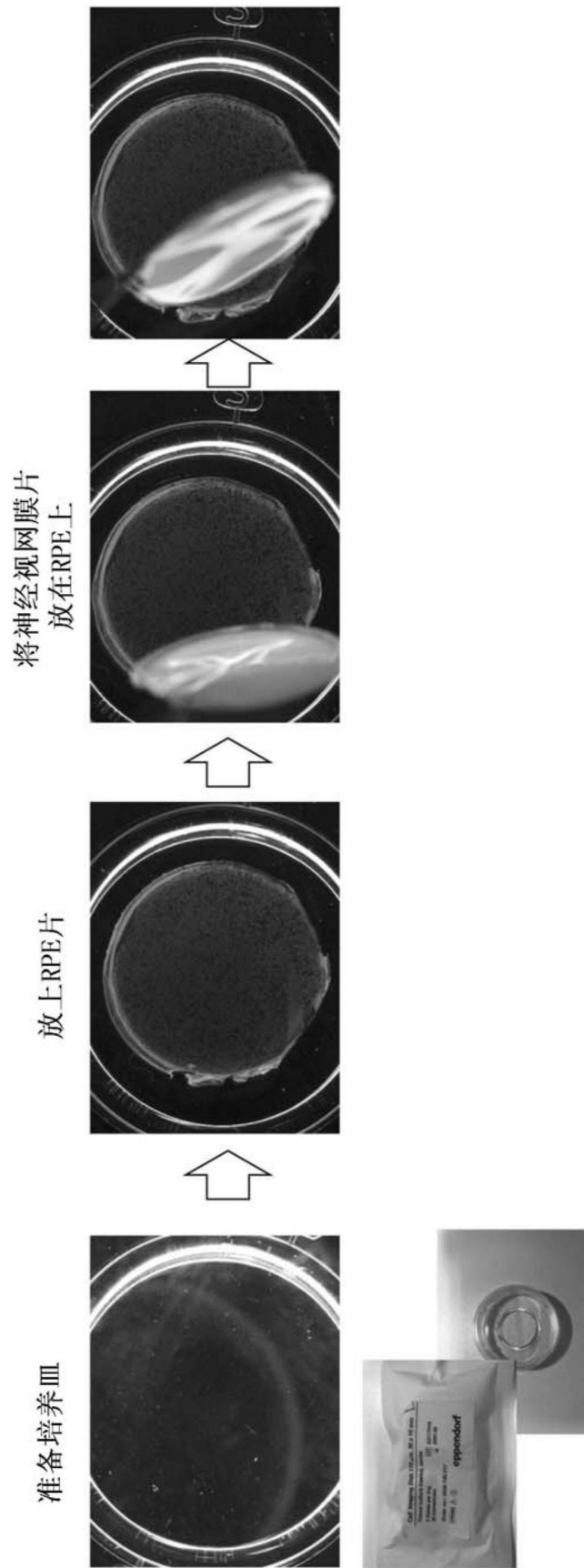


图105

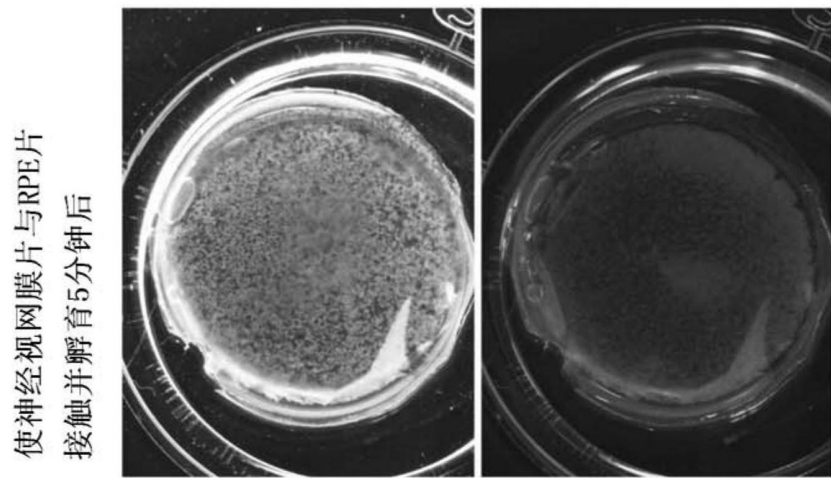
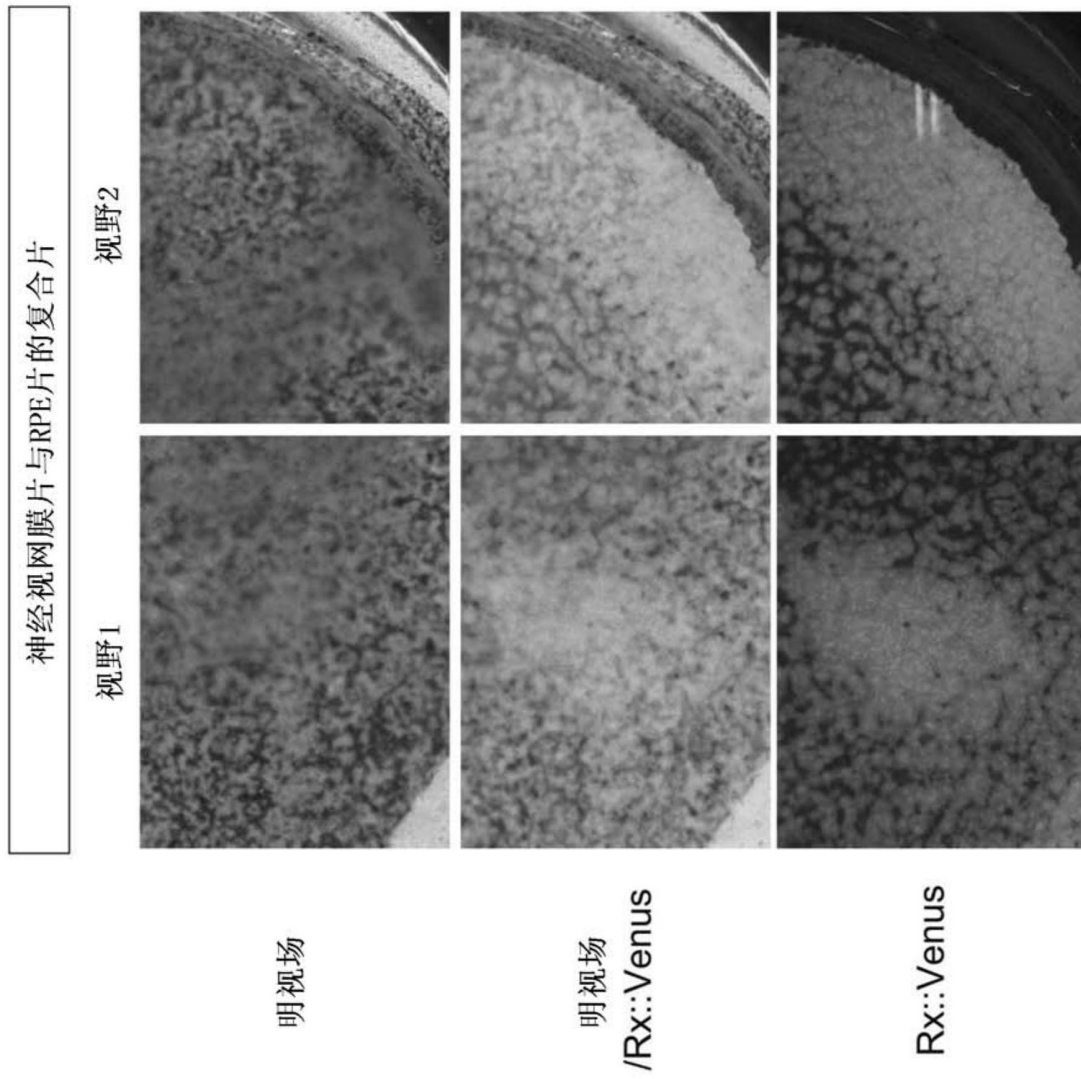


图106

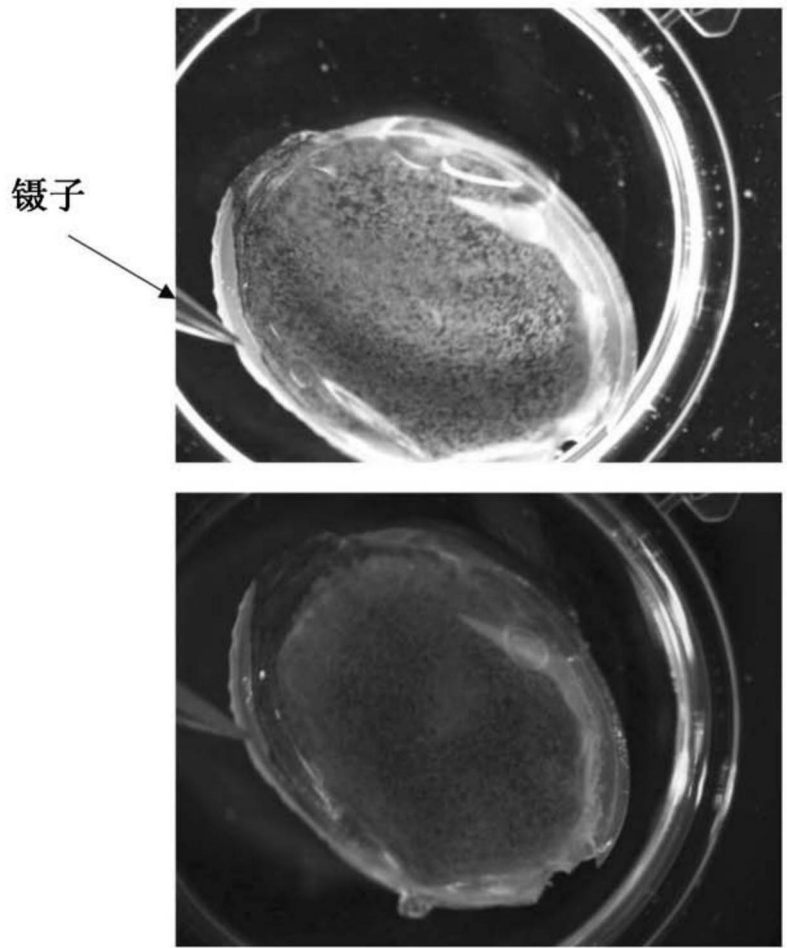


图107

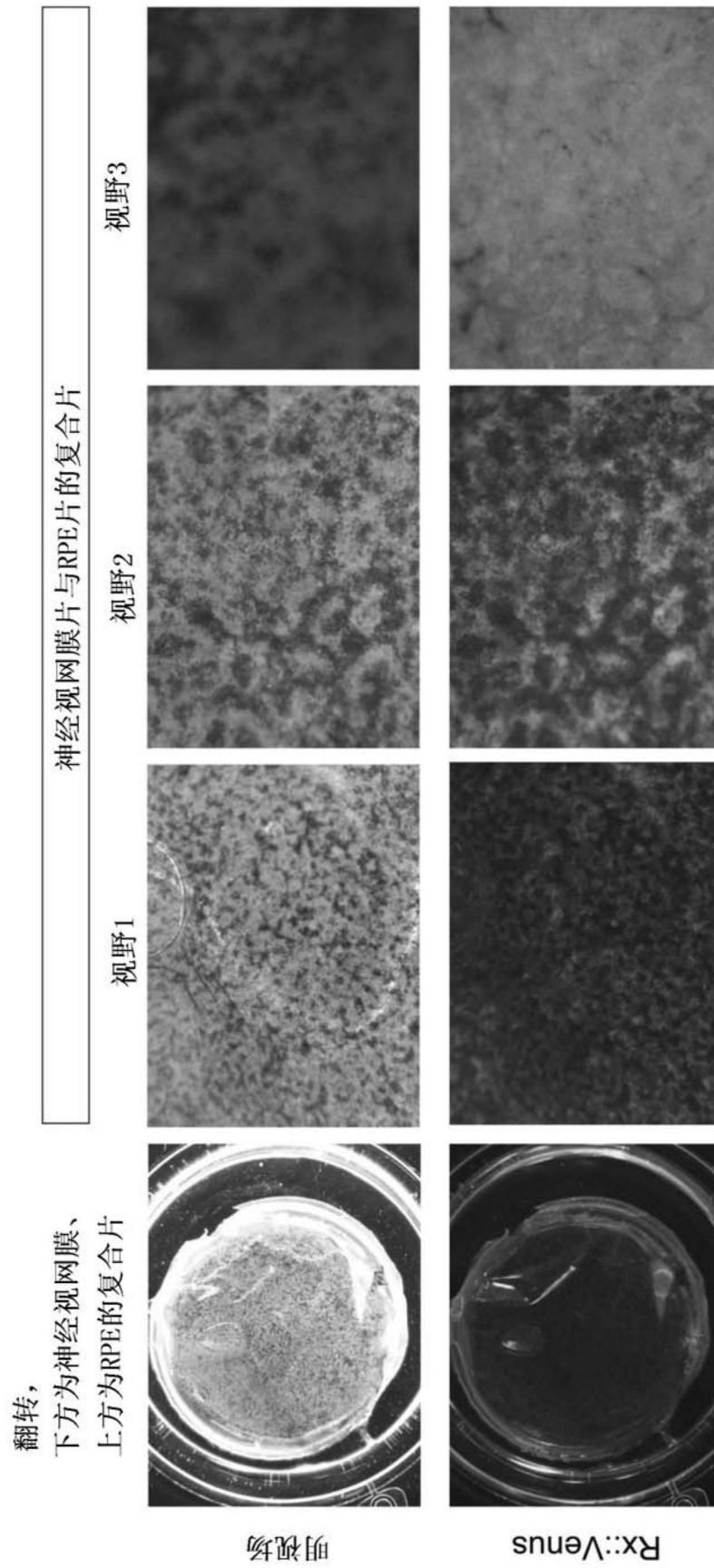


图108

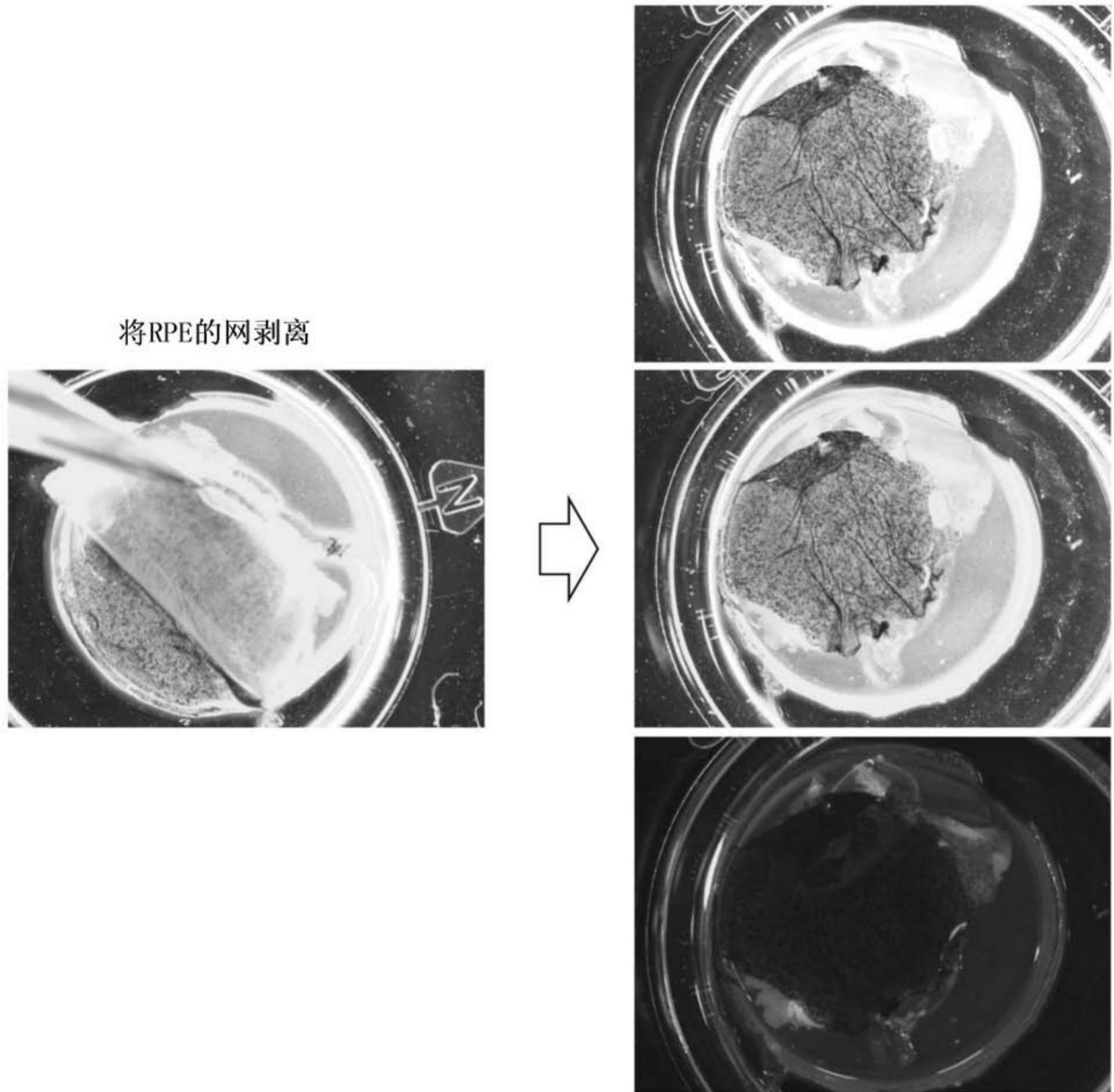


图109

仅通过CellShifer排出明胶的研究（用载玻片夹住）

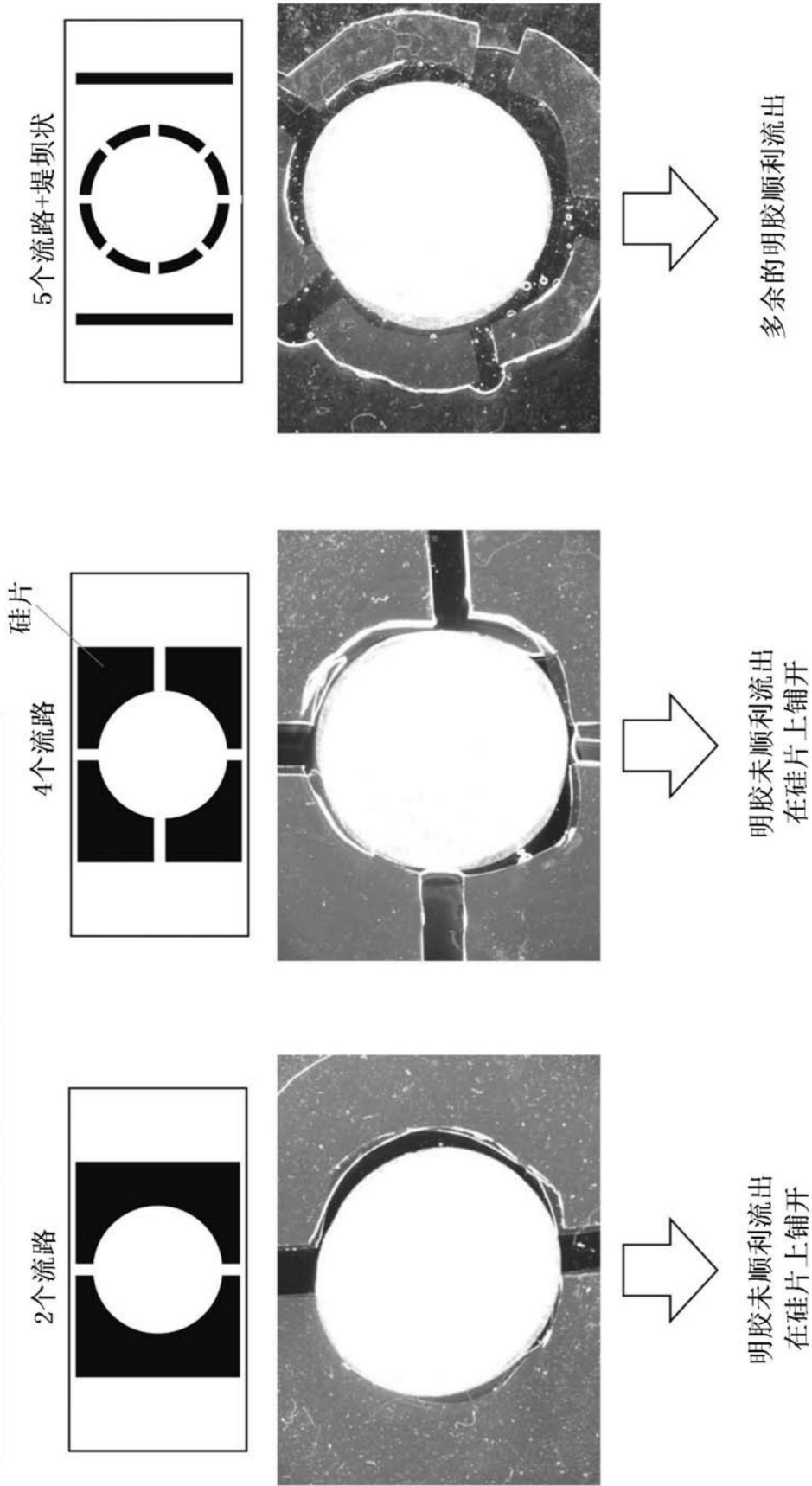


图110

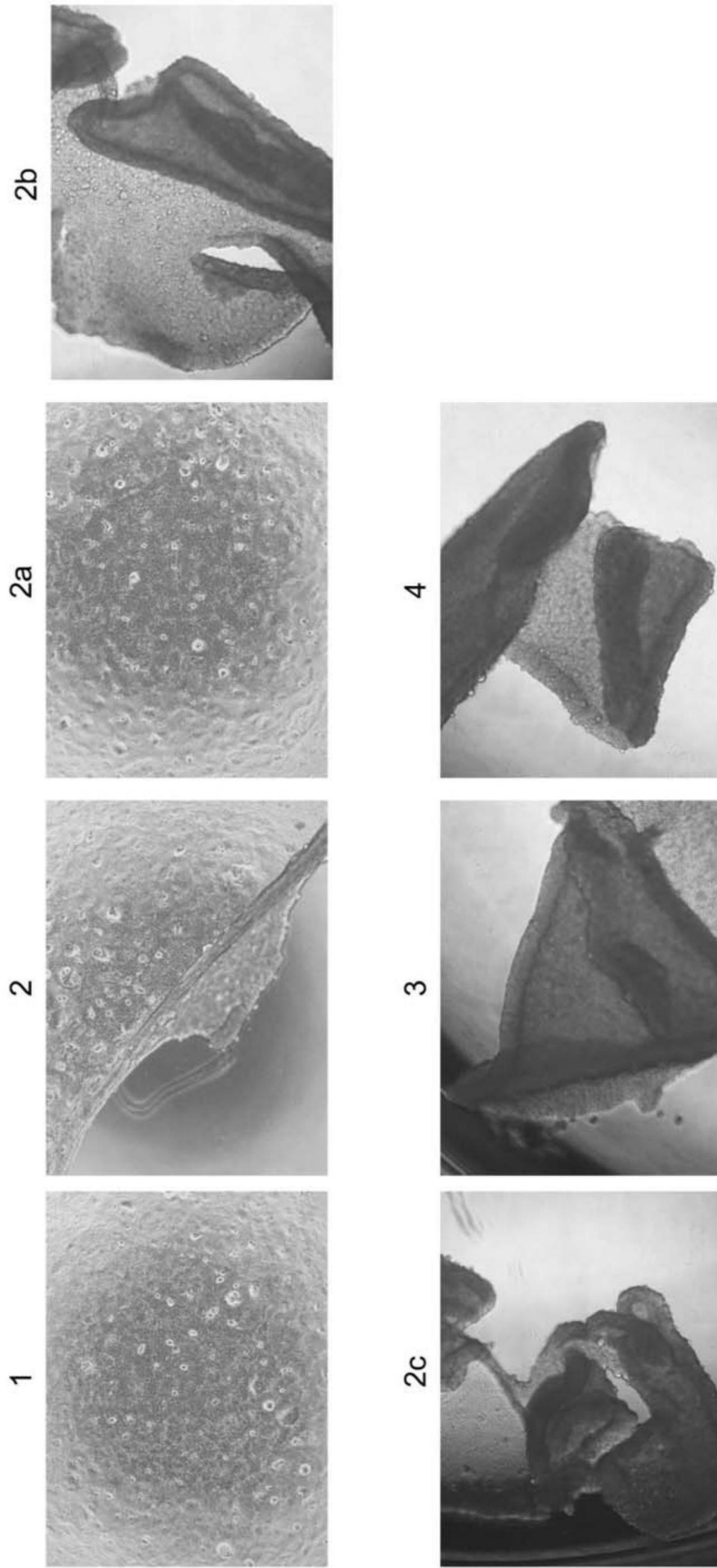


图111