

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-146060

(P2020-146060A)

(43) 公開日 令和2年9月17日(2020.9.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/079 (2010.01)	C 1 2 N 5/079	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/30 (2015.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-102332 (P2020-102332)	(71) 出願人	500213834
(22) 出願日	令和2年6月12日 (2020.6.12)		メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
(62) 分割の表示	特願2017-562028 (P2017-562028) の分割		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 7 5
原出願日	平成28年6月1日 (2016.6.1)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	62/169, 379		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成27年6月1日 (2015.6.1)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	62/169, 444	(72) 発明者	ローレンツ ステューダー
(32) 優先日	平成27年6月1日 (2015.6.1)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, イー. 6 8 ティーエイチ ストリート 4 1 5
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中脳ドーパミン (mDA) ニューロンの *in vitro* 分化の方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 中脳ドーパミン (mDA) ニューロンの *in vitro* 分化の方法の提供。

【解決手段】 ヒト幹細胞の中脳ドーパミンニューロンまたはその前駆体への分化を誘導する *in vitro* 方法、このような方法によって生成される細胞、神経変性障害を処置するためのこのような細胞の使用、ならびに、複数の多能性細胞を、(a) TGFβ/アクチビン-Nodal シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤、(b) ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達の少なくとも1種の活性化剤、および(c) ウィングレス (Wnt) シグナル伝達の少なくとも1種の活性化剤と接触させるステップを含む、多能性細胞を分化させるための *in vitro* 方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2015年6月1日出願された米国仮出願第62/169,379号および2015年6月1日出願された米国仮出願第62/169,444号に対する優先権を主張する（それぞれに対する優先権が主張され、それぞれの内容は、それらの全体が参考として本明細書に援用される）。 10

【0002】

1. 緒言

本開示の主題は、ヒト幹細胞から誘導される、中脳ドーパミン（DA）ニューロン、およびその前駆体、ならびに神経障害の細胞ベースの処置のためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 発明の背景 20

以前、胚性幹細胞および体性幹細胞が、神経変性疾患に対する治療薬およびモデル系として使用されていた。胚性幹細胞および体性幹細胞の誘導された分化に関する研究開発および技術開発は、中枢神経系（CNS）疾患、例えばハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、および多発性硬化症の分野で行われている。しかしながら、これらの研究の結果は、*in vivo*でニューロン機能を回復させる可能性をほとんど示さず、患者において望ましくない腫瘍の成長をもたらすことが多かった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、パーキンソン病などの神経変性障害を処置する際に使用されるニューロン前駆細胞を分化させるための組成物および方法に対する必要性が存在する。 30

【課題を解決するための手段】

【0005】

3. 発明の概要

本開示の主題は、少なくとも部分的に、*in vitro*での分化によるヒト幹細胞から誘導される中脳ドーパミン（DA）ニューロン（mDA）、およびその前駆体に関する。

【0006】

本開示の主題は、ソニックヘッジホッグ（SHH）シグナル伝達の活性化、およびウィングレス（Wnt）シグナル伝達の活性化を伴う、SMADシグナル伝達の二重阻害（例えば、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達およびBMPシグナル伝達の阻害による）であって、Wnt活性化化合物の濃度を、細胞のSMAD阻害剤、SHH活性化剤、およびWnt活性化剤への最初の接触の約4日後に増加させる二重阻害によって、中脳ドーパミン（DA）ニューロン、およびその前駆体をヒト幹細胞から分化させることができるという発見に関する。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、例えば、未成熟前駆細胞のマーカー、例えばPAX6の発現を低下させること、および生着（*engraftment*）後に機能的チロシンヒドロキシラーゼを発現するmDA細胞に分化する細胞を生成することによって、幹細胞をWnt活性化化合物の増加を含まない中脳DA細胞に分化させる方法に勝る利益をもたらす。 40

【0007】

ある特定の実施形態では、細胞を、D Aニューロン系列活性化剤および阻害剤、例えば脳由来神経栄養因子 (B D N F)、グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F)、サイクリックアデノシン一リン酸 (c A M P)、形質転換成長因子ベータ (T G F β 、例えば、T G F β 3)、アスコルビン酸 (A A)、およびD A P T (これは、N-[(3, 5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-アラニル-2-フェニル]グリシン-1, 1-ジメチルエチルエステル; L Y-374973、N-[N-(3, 5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-アラニル]-S-フェニルグリシン-1-tert-ブチルエステル; またはN-[N-(3, 5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-アラニル]-S-フェニルグリシン-1-tert-ブチルエステルとしても公知である)とさらに接触させる。

【0008】

ある特定の実施形態では、本開示の主題は、ヒト幹細胞の中脳D A前駆体への分化を誘導するためのin vitro方法であって、ヒト幹細胞の集団または複数のヒト幹細胞を、T G F β /アクチビン-N o d a lシグナル伝達の1種または複数の阻害剤 (すなわち、第1のS M A D阻害剤)、B M Pシグナル伝達の1種または複数の阻害剤 (すなわち、第2のS M A D阻害剤)、ウィングレス (W n t)シグナル伝達の1種または複数の活性化剤、およびソニックヘッジホッグ (S H H)シグナル伝達の1種または複数の活性化剤と接触させるステップを含むin vitro方法を提供する。ある特定の実施形態では、阻害剤と活性化剤は、同時に細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、W n tシグナル伝達の活性化剤の濃度は、細胞をW n t活性化剤と最初に接触させてから少なくとも約2、3、4、5または6日後に増加させる。ある特定の実施形態では、少なくとも約4、5、6、7、8、9、または10日またはそれを超える間、細胞を、濃度を増加させたW n t活性化剤と接触させる。

【0009】

ある特定の実施形態では、細胞を、中脳D Aニューロン、またはその前駆体、例えばこれらに限定されないが、e n g r a i l e d-1 (E N-1)、o r t h o d e n t i c l eホメオボックス2 (O T X 2)、チロシンヒドロキシラーゼ (T H)、核受容体関連1タンパク質 (N U R R 1)、フォークヘッドボックスタンパク質A 2 (F O X A 2)、およびL I Mホメオボックス転写因子1アルファ (L M X 1 A)の1種または複数のマーカーの発現の検出可能なレベルを上昇させるのに有効な量で、前述の薬剤と接触させる。

【0010】

ある特定の実施形態では、細胞を、ニューロン特異的クラスI I I型ベーターチューブリン (T u j 1)、トレフォイルファクターファミリー3 (T T F 3)、ペアード様ホメオドメイン (p a i r e d-l i k e h o m e o d o m a i n) 3 (P I T X 3)、a c h a e t e-s c u t e複合体 (A S C L)、早期B細胞因子1 (e a r l y B-c e l l f a c t o r 1) (E B F-1)、早期B細胞因子3 (e a r l y B-c e l l f a c t o r 3) (E B F-3)、トランスサイレチン (T T R)、シナプシン、ドーパミントランスポーター (D A T)、およびGタンパク質共役内向き整流性カリウムチャネル (K i r 3. 2/G I R K 2)、C D 1 4 2、D C S M 1、C D 6 3および/またはC D 9 9の1種または複数の発現の検出可能なレベルを上昇させるのに有効な量で、前述の薬剤と接触させる。

【0011】

本開示は、本明細書に記載されている方法に従って調製された、中脳D A細胞、またはその前駆体の1種または複数のマーカーを発現するin vitro分化細胞の集団も提供する。ある特定の実施形態では、分化細胞集団は、ヒト幹細胞の集団から誘導される。本開示の主題は、このような分化細胞集団を含む組成物を、さらに提供する。

【0012】

ある特定の実施形態では、細胞は、ペアードボックスタンパク質 (p a i r e d b o x p r o t e i n) (P A X 6)および/またはK i 6 7の発現の検出可能なレベルを低下させるのに有効な量で、前述の薬剤と共に培養される。ある特定の実施形態では、細胞は、検出可能なレベルのP A X 6および/またはK i 6 7を発現しない。

【0013】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って調製された細胞を、例えばフローサイトメトリーを使用して、CD142発現、および／またはコリン作用性受容体（CHRN B3）発現に基づいて選別、選択、および単離することができる。

【0014】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って調製された細胞を、ポリシアリルトランスフェラーゼ、例えば *Neisseria meningitidis* のポリシアリルトランスフェラーゼ（PST_{Nm}）などの細菌のポリシアリルトランスフェラーゼとさらに接触させることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、組換えポリシアリルトランスフェラーゼを発現する組換え細胞である。

10

【0015】

さらに、本開示の主題は、幹細胞の分化を誘導するためのキットを提供する。

【0016】

ある特定の実施形態では、キットは、（a）形質転換成長因子ベータ（TGFβ）／アクチビンーNodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤（すなわち、第1のSMA D阻害剤）、（b）骨形成タンパク質（BMP）シグナル伝達の1種または複数の阻害剤（すなわち、第2のSMA D阻害剤）、（c）ウィングレス（Wnt）シグナル伝達の1種または複数の活性化剤、（d）ソニックヘッジホッグ（SHH）シグナル伝達の1種または複数の活性化剤、および（e）幹細胞の、中脳DAニューロン、またはその前駆体の1種または複数のマーカーを発現する分化細胞の集団への分化を誘導するための指示を含む。

20

【0017】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されている方法に従って調製された幹細胞由来の前駆体を含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、幹細胞由来の細胞は、成熟した分化細胞、例えば中脳DA細胞である。

【0018】

ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビンーNodalシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤は、SB431542、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群より選択される小分子である。ある特定の実施形態では、BMPシグナル伝達の前記1種または複数の阻害剤は、LDN193189、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群より選択される小分子である。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の前記1種または複数の活性化剤は、Wntシグナル伝達の活性化のためにグリコーゲン合成酵素キナーゼ3β（GSK3β）を低下させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の前記1種または複数の活性化剤は、CHIR99021、WNT3A、それらの誘導体、およびそれらの混合物からなる群より選択される小分子である。ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の活性化剤は、組換えSHH、精製SHH、C25II、および小分子パルモルファミン（purmorphamine）などのSmoothened（SMO）受容体アゴニスト、それらの誘導体、ならびにそれらの混合物からなる群より選択される。

30

【0019】

ある特定の実施形態では、前記ヒト幹細胞は、ヒト胚性幹細胞、ヒト人工多能性幹細胞、ヒト単為生殖幹細胞、始生殖細胞様多能性幹細胞（primordial germ cell-like pluripotent stem cell）、胚盤葉上層幹細胞、およびFクラス多能性幹細胞からなる群より選択される。ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）は、さらに分化した細胞、例えば、胚性遺伝子（これらに限定されないが、OCT4、SOX2、cMy c、およびKLF4導入遺伝子など）の体細胞への導入（例えば、参照により本明細書に組み込まれるTakahashiおよびYamanaka、Cell 126巻、663～676頁（2006年））によって形成される分化体細胞から調製される細胞である。

40

【0020】

50

ある特定の実施形態では、方法は、分化細胞の前記集団を、前記分化細胞の中脳 D A ニューロンの集団への成熟に好ましい条件に供するステップを含む。

【0021】

本開示の主題は、被験体の神経変性障害、例えばパーキンソン病を処置する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、有効量の本明細書に記載されている分化細胞集団を、神経変性障害を患っている被験体に投与するステップを含む。

【0022】

本開示の主題は、神経変性障害を処置するための本明細書に記載されている分化細胞集団をさらに提供する。

【0023】

本開示の主題は、神経変性障害を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載されている分化細胞集団の使用をさらに提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

多能性細胞を分化させるための *in vitro* 方法であって、複数の多能性細胞を、
(a) TGF β /アクチビン-Nodal シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤、
(b) ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達の少なくとも1種の活性化剤、および

(c) ウィングレス (Wnt) シグナル伝達の少なくとも1種の活性化剤
と接触させるステップを含み、

前記複数の多能性細胞に接触させる、Wnt シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤の濃度を、Wnt シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤を前記複数の多能性細胞に最初に接触させてから約2日から約6日の間の後に増加させ、その結果、複数の前記細胞が分化して、フォークヘッドボックスタンパク質 A2 (FOXA2) および LIM ホメオボックス転写因子1アルファ (LMX1A) を発現する、*in vitro* 方法。

(項目2)

前記細胞を、骨形成タンパク質 (BMP) および Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) シグナル伝達の少なくとも1種の阻害剤と接触させる、項目1に記載の方法。

(項目3)

TGF β /アクチビン-Nodal シグナル伝達の前記少なくとも1種の阻害剤、BMP/SMAD シグナル伝達の前記少なくとも1種の阻害剤、ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤を、約4日間から約10日間の間、前記複数の多能性細胞に接触させる、項目2に記載の方法。

(項目4)

TGF β /アクチビン-Nodal シグナル伝達の前記少なくとも1種の阻害剤、BMP/SMAD シグナル伝達の前記少なくとも1種の阻害剤、ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤を、最長約7日間まで、または少なくとも約7日間にわたり、前記複数の多能性細胞に接触させる、項目2に記載の方法。

(項目5)

ウィングレス (Wnt) シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤を、約8日間から約15日間の間、前記複数の多能性細胞に接触させる、項目2に記載の方法。

(項目6)

ウィングレス (Wnt) シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤を、約12日間にわたり、最長約12日間まで、または少なくとも約12日間にわたり、前記複数の多能性細胞に接触させる、項目2に記載の方法。

(項目7)

Wnt シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤の濃度を、Wnt シグナル伝達の前記少なくとも1種の活性化剤を前記複数の多能性細胞に最初に接触させてから約4日後に増加させる、前記項目のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 8)

W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の濃度における増加が、前記複数の細胞に接触させた、W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の最初の濃度の約 4 0 0 % ~ 1 4 5 0 % である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の濃度における増加が、前記複数の細胞に接触させた、W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の最初の濃度の約 7 0 0 % ~ 1 0 5 0 % である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 1 0)

W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の濃度における増加が、約 3 から 1 0 μ M の間の濃度までの増加である、前記項目のいずれかに記載の方法。

10

(項目 1 1)

W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の濃度における増加が、約 3 μ M の濃度までの増加である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 1 2)

W n t シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤の濃度における増加が、約 7 . 5 μ M の濃度までの増加である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 1 3)

前記複数の細胞が、チロシンヒドロキシラーゼ (T H)、e n g r a i l e d - 1 (E N - 1)、および核受容体関連 1 タンパク質 (N U R R 1) の 1 種または複数を発現する、前記項目のいずれかに記載の方法。

20

(項目 1 4)

前記複数の細胞が、検出可能なレベルのペアードボックスタンパク質 (P A X 6) および／または K i 6 7 を発現しない、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5)

分化細胞の集団を、前記細胞のドーパミンニューロンへの成熟に好ましい条件に供するステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 1 6)

前記細胞のドーパミンニューロンへの成熟に好ましい前記条件が、前記細胞を、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F)、サイクリックアデノシン一リン酸 (c A M P)、形質転換成長因子ベータ 3 (T G F β 3)、アスコルビン酸 (A A)、および／または D A P T と接触させることを含む、項目 1 5 に記載の方法。

30

(項目 1 7)

前記多能性細胞が、ヒト、非ヒト霊長類またはげっ歯類の非胚性幹細胞、ヒト、非ヒト霊長類またはげっ歯類の胚性幹細胞、ヒト、非ヒト霊長類またはげっ歯類の人工多能性幹細胞、ヒト、非ヒト霊長類またはげっ歯類の組換え多能性細胞からなる群より選択される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 1 8)

T G F β / アクチビン - N o d a l シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の阻害剤が、4 - [4 - (1 , 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) - 5 - (2 - ピリジニル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] ベンズアミド (S B 4 3 1 5 4 2) を含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

40

(項目 1 9)

B M P および S M A D シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の阻害剤が、4 - (6 - (4 - (ピペラジン - 1 - イル) フェニル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジン - 3 - イル) キノリン (L D N 1 9 3 1 8 9) を含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 2 0)

ソニックヘッジホッグ (S H H) シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤が、パルモルファミン、組換え S H H、精製 S H H、および／または S m o o t h e n e d アゴ

50

ニストを含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 2 1)

ウィングレス (Wnt) シグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤が、CHIR99021、Wnt3A、および／またはWnt1を含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 2 2)

前記多能性細胞が、TGFβ／アクチビン-Nodalシグナル伝達の前記少なくとも 1 種の阻害剤、SHHシグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤、およびWntシグナル伝達の前記少なくとも 1 種の活性化剤との接触の開始後、22～27日以内に、中脳ドーパミンニューロンに分化する、前記項目のいずれかに記載の方法。

10

(項目 2 3)

前記複数の細胞が、検出可能なレベルのCD142を発現し、前記方法が、CD142を発現する中脳ドーパミンニューロンの集団を選択するステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 2 4)

前記項目のいずれかに記載の方法に従って分化させた中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体。

(項目 2 5)

前記細胞を、ポリシアリルトランスフェラーゼと接触させる、項目 2 4 に記載の中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体。

20

(項目 2 6)

項目 2 4 に記載の中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体を含むキット。

(項目 2 7)

被験体における神経変性障害を処置する方法であって、項目 2 4 に記載の中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む方法。

(項目 2 8)

前記神経変性障害が、パーキンソン病であり、前記中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体が、パーキンソン病の 1 つまたは複数の症状を減少させるのに有効な量で投与される、項目 2 7 に記載の方法。

30

(項目 2 9)

検出可能なマーカーを発現する組換え細胞である、項目 2 4 に記載の中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体。

(項目 3 0)

生体適合性スキャホールドに含まれる、項目 2 4 に記載の中脳ドーパミンニューロン、またはその前駆体。

【0024】

前述の内容は、以下に続く詳細な説明がより理解されやすいように、本出願の特徴および技術的な利点をやや大まかに概説した。本出願の特許請求の範囲の主題を形成する本出願のさらなる特徴および利点は、以下に説明される。開示されている概念および具体的な実施形態は、本出願と同じ目的を実行するために他の構造を修正または設計するための基礎として容易に利用できることを当業者は理解すべきである。このような均等な構築物が、添付の特許請求の範囲に示された本出願の精神および範囲を逸脱しないことも当業者は認識すべきである。本出願の特性と考えられる新規特徴は、その構成および操作方法の両方について、さらなる目的および利点と共に、以下の記載からより理解されるものである。

40

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】図 1 は、Wnt bump により生成された中脳 DA ニューロンおよび他の脳領域のニューロンを用いずに、KSR 培地 (Non-GMP) 中または E8 / NB / N2 培

50

地 (GMP V1) 中で、K r i k s ら、N a t u r e . 2 0 1 1 年 1 1 月 6 日 ; 4 8 0 巻 (7 3 7 8 号) : 5 4 7 ~ 5 1 頁に記載されている方法に従って、h E S C を 1 0 日間分化させたことを示す。D 4 ~ D 1 0 に 7 . 5 μ M (または 5 ~ 1 0 μ M) の W n t b u m p を利用する実施例 1 の方法に従って、E 8 / N B / N 2 培地中で h E S C を培養することは、中脳 D A 細胞を生成するために特異的であった。

【 0 0 2 6 】

【図 2】図 2 は、W n t b u m p を用いずに、K S R 培地 (N o n - G M P) 中または E 8 / N B / N 2 培地 (G M P V 1) 中で、K r i k s ら、N a t u r e . 2 0 1 1 年 1 1 月 6 日 ; 4 8 0 巻 (7 3 7 8 号) : 5 4 7 ~ 5 1 頁に記載されている方法に従って、2 2 から 2 7 日の間分化させた h E S C における P A X 6 、 T H 、 N U R R 1 、 F O X A 2 、および L M X 1 A の発現を示す。細胞を回収し、指定された遺伝子に対して q R T - P C R で解析した (n = 条件ごとに 3 から 1 4 の間) 。データは、正規化した c T 値として表し、数値が低い程、高い遺伝子発現を示す。

10

【 0 0 2 7 】

【図 3】図 3 は、W n t b u m p を用いずに、K S R 培地 (N o n - G M P) 中または E 8 / N B / N 2 培地 (G M P V 1) 中で、K r i k s ら、N a t u r e . 2 0 1 1 年 1 1 月 6 日 ; 4 8 0 巻 (7 3 7 8 号) : 5 4 7 ~ 5 1 頁に記載されている方法に従って、および 3 μ M (G M P V 2 A) または 7 . 5 μ M (G M P V 2 B) の W n t b u m p を用いて、E 8 / N B / N 2 培地中で h E S C を培養することを含む、実施例 1 に記載されている方法に従って、2 2 から 2 7 日の間分化させた h E S C における P A X 6 、 T H 、 N U R R 1 、 F O X A 2 、 L M X 1 A 、および E n - 1 の発現を示す。細胞を回収し、指定された遺伝子に対して q R T - P C R で解析した (n = 条件ごとに 3 から 1 4 の間) 。データは、正規化した c T 値として表し、数値が低い程、高い遺伝子発現を示す。G M P V 2 A および G M P V 2 B に従って培養した細胞は、高レベルの E n - 1 を発現した。

20

【 0 0 2 8 】

【図 4 - 1】図 4 は、分化した中脳 D A 細胞を特定するために使用することができる中脳 D A マーカーを示す。

【図 4 - 2】図 4 は、分化した中脳 D A 細胞を特定するために使用することができる中脳 D A マーカーを示す。

30

【図 4 - 3】図 4 は、分化した中脳 D A 細胞を特定するために使用することができる中脳 D A マーカーを示す。

【図 4 - 4】図 4 は、分化した中脳 D A 細胞を特定するために使用することができる中脳 D A マーカーを示す。

【 0 0 2 9 】

【図 5】図 5 は、E 8 / マトリゲル条件下で維持され、次いで、0 . 7 μ M の W n t を用い、W n t b u m p を用いない N B / N 2 培地中で、K r i k s ら、N a t u r e . 2 0 1 1 年 1 1 月 6 日 ; 4 8 0 巻 (7 3 7 8 号) : 5 4 7 ~ 5 1 頁に記載されている方法に従って、2 5 日間分化させた h E S C が、i n v i v o での増殖領域を呈することを示す。分化に続いて、細胞は、損傷していない、免疫無防備状態のマウスに移植され、4 週間後に移植片を回収した。切片を、ヒト N C A M 、 F O X A 2 および T H に対して I C C で解析した。多数の F O X A 2 を発現する T H + 細胞が観察された一方、移植片コア内に h N C A M + 細胞のクラスターも検出された。これらのパッチは P A X 6 も発現し、神経前駆細胞状態を示した。

40

【 0 0 3 0 】

【図 6 A】図 6 A ~ B は、(A) E 8 / マトリゲル条件下で維持され、次いで、実施例 1 で記載されている G M P V 2 A (0 . 7 μ M の W n t バックグラウンドの存在下で 3 μ M の W n t b u m p) および G M P V 2 B (0 . 7 μ M の W n t バックグラウンドの存在下で 7 . 5 μ M の W n t b u m p) 培養方法に従って N B / N 2 培地で 2 5 日間分化させた h E S C が、高レベルの E N - 1 および T H を発現する中脳 D A 細胞の分化を

50

誘導することを示す。中脳DAニューロンを固定し、*in vitro*でTHおよびEN-1（上のパネル）ならびにNURR1およびLMX1A（下のパネル）に対して染色した。（B）GMP V2Bプロトコルに従って分化させた中脳DA細胞を、損傷していない、免疫無防備状態のマウスの線条体に移植し、これは、移植の3週間後に、線維伸長の増大とhNCAMおよびTHの発現を示した。

【図6B】図6A～Bは、（A）E8／マトリゲル条件下で維持され、次いで、実施例1で記載されているGMP V2A（0.7 μ MのWntバックグラウンドの存在下で3 μ MのWnt bump）およびGMP V2B（0.7 μ MのWntバックグラウンドの存在下で7.5 μ MのWnt bump）培養方法に従ってNB／N2培地で25日間分化させたhESCが、高レベルのEN-1およびTHを発現する中脳DA細胞の分化を誘導することを示す。中脳DAニューロンを固定し、*in vitro*でTHおよびEN-1（上のパネル）ならびにNURR1およびLMX1A（下のパネル）に対して染色した。（B）GMP V2Bプロトコルに従って分化させた中脳DA細胞を、損傷していない、免疫無防備状態のマウスの線条体に移植し、これは、移植の3週間後に、線維伸長の増大とhNCAMおよびTHの発現を示した。

【0031】

【図7】図7は、E8／マトリゲル条件下で維持され、次いで、実施例1で記載されているGMP V2B（0.7 μ MのWntバックグラウンドの存在下で7.5 μ MのWnt bump）培養方法に従ってNB／N2培地で25日間分化させたhESCが、PAX6発現細胞を排除する一方、FOXA2発現細胞を維持したことを示す。細胞を回収し、FOXA2およびPAX6の存在についてフローサイトメトリーで解析した。

【0032】

【図8】図8は、凍結保存した中脳DAニューロンが、「新鮮な」細胞と比較した場合に、*in vivo*で同様に挙動することを示す。マウスに移植した「新鮮な」細胞の3週間後の移植片と「凍結した」細胞の4週間後の移植片におけるHncamおよびTHの発現を比較した。両移植片は、右の挿入パネルで強調したように、線維伸長の早期徴候を示した。

【0033】

【図9A】図9A～Bは、（A）MACSフローサイトメトリーを使用するCD142を発現する中脳DA細胞の細胞選別を示す。選別前（「前」）、24日目のフロースルー（陰性画分）および陽性画分について、CD142により選別されたmDAニューロンを示す。フィコエリトリンをCD142にコンジュゲートし、抗PEビーズを単離のために使用して、結果を可視化した。（B）6つの実験にわたるコンシステンシーを示す。

【図9B】図9A～Bは、（A）MACSフローサイトメトリーを使用するCD142を発現する中脳DA細胞の細胞選別を示す。選別前（「前」）、24日目のフロースルー（陰性画分）および陽性画分について、CD142により選別されたmDAニューロンを示す。フィコエリトリンをCD142にコンジュゲートし、抗PEビーズを単離のために使用して、結果を可視化した。（B）6つの実験にわたるコンシステンシーを示す。

【0034】

【図10A】図10A～Bは、損傷していないマウスおよびパーキンソン症候群のサルにおいて、mDAニューロンが生存することを示す。（A）CD142により選別したmDA細胞は、*in vivo*で生存する。Kirkらによって記載されている方法に従って、KSRで調製されたmDAニューロンを、CD142についてFACSで選別し、マウスに移植した。移植片を、移植の30日後に回収し、THおよびhNCAMの発現について解析した。（B）KSRプロトコルに由来する（Kirkら）mDAニューロンは、非ヒト霊長類（NHP）で1年生存する。25日目のmDAニューロンをパーキンソン症候群のサルに移植し、移植片を移植の12カ月後に採取した。切片を、ヒト細胞質（SC121）およびTHを検出する抗体で染色した。上半分は、通常および反転した画像を示し、一方下半分は、より高い倍率を示す。データにより、MACSにより選別された細胞が、マウスに移植されたCD142により選別されたmDA細胞に対して匹敵する生存を

10

20

30

40

50

示したことが示された。

【図10B】図10A～Bは、損傷していないマウスおよびパーキンソン症候群のサルにおいて、mDAニューロンが生存することを示す。(A) CD142により選別したmDA細胞は、*in vivo*で生存する。Kirkらによって記載されている方法に従って、KSRで調製されたmDAニューロンを、CD142についてFACSで選別し、マウスに移植した。移植片を、移植の30日後に回収し、THおよびhNCAMの発現について解析した。(B) KSRプロトコルに由来する(Kirkら)mDAニューロンは、非ヒト霊長類(NHP)で1年生存する。25日目のmDAニューロンをパーキンソン症候群のサルに移植し、移植片を移植の12カ月後に採取した。切片を、ヒト細胞質(SC121)およびTHを検出する抗体で染色した。上半分は、通常および反転した画像を示し、一方下半分は、より高い倍率を示す。データにより、MACSにより選別された細胞が、マウスに移植されたCD142により選別されたmDA細胞に対して匹敵する生存を示したことが示された。

10

【0035】

【図11-1】図11A～Dは、*in vitro*におけるmDAニューロンのポリシアリルトランスフェラーゼ処理(*Neisseria meningitidis*のポリシアリルトランスフェラーゼ(PST_{Nm}))の効果を示す。(A) ポリシアリル化(PSA)レベルに対する凍結保存の効果を示す。mDA細胞は、PST_{Nm}で処理されるか、または改変されないままである。細胞の半分を固定し、一方、他の半分は凍結保存した。凍結した細胞を1週間後に解凍し、やはり固定した。細胞を、PSAについて免疫染色し、フローサイトメトリーによって解析した。黒線は、新鮮な染色されていない細胞を示す。PST_{Nm}に誘導されたPSAの染色は、凍結された細胞および凍結されていない細胞において同一であった。青線は、新鮮なまま解析された未処理の細胞を表し、赤および緑の線は、新鮮なまま解析された(赤)か、または凍結保存後に解析された(緑)かのいずれかのPST_{Nm}で処理された細胞に由来する。(B) CD142細胞により選別した細胞に対するPST_{Nm}処理の効果を示す。未処理(左)か、またはPST_{Nm}で処理された(右)かのいずれかの、CD142により選別された細胞を1日培養した後に染色したTAU-1の代表的な画像。(C) PST_{Nm}で処理されたCD142により選別された細胞の軸索長が増大したことを示したことを示す。細胞を1日目または4日目に解析し、画像をNIH's ImageJソフトウェアを使用して定量化した。(D) PSAレベルが、*in vivo*で持続することを示す。PST_{Nm}で処理されたmDAニューロンをマウスの線条体に移植し、PSAレベルを移植の2週間後に可視化した。2つの視野(FOV 1およびFOV 2)は、条件ごとに示される。右のグラフに結果をまとめる。

20

30

【図11-2】図11A～Dは、*in vitro*におけるmDAニューロンのポリシアリルトランスフェラーゼ処理(*Neisseria meningitidis*のポリシアリルトランスフェラーゼ(PST_{Nm}))の効果を示す。(A) ポリシアリル化(PSA)レベルに対する凍結保存の効果を示す。mDA細胞は、PST_{Nm}で処理されるか、または改変されないままである。細胞の半分を固定し、一方、他の半分は凍結保存した。凍結した細胞を1週間後に解凍し、やはり固定した。細胞を、PSAについて免疫染色し、フローサイトメトリーによって解析した。黒線は、新鮮な染色されていない細胞を示す。PST_{Nm}に誘導されたPSAの染色は、凍結された細胞および凍結されていない細胞において同一であった。青線は、新鮮なまま解析された未処理の細胞を表し、赤および緑の線は、新鮮なまま解析された(赤)か、または凍結保存後に解析された(緑)かのいずれかのPST_{Nm}で処理された細胞に由来する。(B) CD142細胞により選別した細胞に対するPST_{Nm}処理の効果を示す。未処理(左)か、またはPST_{Nm}で処理された(右)かのいずれかの、CD142により選別された細胞を1日培養した後に染色したTAU-1の代表的な画像。(C) PST_{Nm}で処理されたCD142により選別された細胞の軸索長が増大したことを示したことを示す。細胞を1日目または4日目に解析し、画像をNIH's ImageJソフトウェアを使用して定量化した。(D) PSAレベルが、*in vivo*で持続することを示す。PST_{Nm}で処理されたmDAニューロン

40

50

をマウスの線条体に移植し、P S Aレベルを移植の2週間後に可視化した。2つの視野（F O V 1およびF O V 2）は、条件ごとに示される。右のグラフに結果をまとめる。

【図11-3】図11A~Dは、in v i t r oにおけるm D Aニューロンのポリシアリルトランスフェラーゼ処理（Ne i s s e r i a m e n i n g i t i d i sのポリシアリルトランスフェラーゼ（P S T_{Nm}））の効果を示す。（A）ポリシアリル化（P S A）レベルに対する凍結保存の効果を示す。m D A細胞は、P S T_{Nm}で処理されるか、または改変されないままである。細胞の半分を固定し、一方、他の半分は凍結保存した。凍結した細胞を1週間後に解凍し、やはり固定した。細胞を、P S Aについて免疫染色し、フローサイトメトリーによって解析した。黒線は、新鮮な染色されていない細胞を示す。P S T_{Nm}に誘導されたP S Aの染色は、凍結された細胞および凍結されていない細胞において同一であった。青線は、新鮮なまま解析された未処理の細胞を表し、赤および緑の線は、新鮮なまま解析された（赤）か、または凍結保存後に解析された（緑）かのいずれかのP S T_{Nm}で処理された細胞に由来する。（B）C D 1 4 2細胞により選別した細胞に対するP S T_{Nm}処理の効果を示す。未処理（左）か、またはP S T_{Nm}で処理された（右）かのいずれかの、C D 1 4 2により選別された細胞を1日培養した後に染色したT A U - 1の代表的な画像。（C）P S T_{Nm}で処理されたC D 1 4 2により選別された細胞の軸索長が増大したことを示したことを示す。細胞を1日目または4日目に解析し、画像をN I H ' s I m a g e Jソフトウェアを使用して定量化した。（D）P S Aレベルが、in v i v oで持続することを示す。P S T_{Nm}で処理されたm D Aニューロンをマウスの線条体に移植し、P S Aレベルを移植の2週間後に可視化した。2つの視野（F O V 1およびF O V 2）は、条件ごとに示される。右のグラフに結果をまとめる。

10

20

【0036】

【図12】図12は、偽移植ラットと比較した、実施例2に記載されているように分化させ、16日目に凍結保存したm D A前駆体で移植した損傷ラットの回転行動を示す。ラットは、移植前、ならびに移植の1、2、3、4および5カ月後に試験した。回転行動は、アンフェタミン投与により誘導した。移植片を受けた損傷ラットは、移植の4カ月後に、偽移植ラットと比較して、回転行動における統計的に有意な低下を示した。

【0037】

【図13】図13は、実施例2に記載されているように分化させ、16日目に凍結保存したm D A前駆体で移植した損傷ラットにおけるh N C A M、T H、およびG I R K 2のi n v i v oでの発現を示す。移植後の移植片を、移植後5カ月調査した。T H染色は、典型的なm D A形態を示した。T H陽性ニューロンは、G I R K 2陽性でもあった。

30

【0038】

【図14】図14は、実施例2に従って分化させ、16日目に凍結保存したm D A前駆体は、解凍および非ヒト霊長類への移植後6週間生存した。移植後の移植片は、移植コアから堅固な線維伸長を示し、また典型的なm D A形態も示した。

【発明を実施するための形態】

【0039】

5. 発明の詳細な説明

本開示の主題は、ヒト幹細胞の中脳ドーパミン（m D A）細胞またはその前駆体の1種または複数のマーカーを発現する細胞への分化を誘導するための方法、このようなマーカーを発現する細胞の組成物、および神経変性障害を処置するための方法に関する。

40

【0040】

限定としてではなく、開示の明確性を目的として、詳細な説明は以下の小項目に分割される：

5. 1. 定義；
5. 2. 幹細胞を分化させる方法；
5. 3. 神経変性障害を処置する方法；および
5. 4. キット。

【0041】

50

5. 1 定義

この明細書において使用される用語は、一般に、この発明の文脈の中で、および各用語が使用される具体的な文脈で、当技術分野における通常の意味を有する。ある特定の用語については、本発明の組成物および方法ならびに本発明の組成物の作製方法および使用方法を説明する際に、専門家にさらなるガイダンスを与えるために、以下で、または本明細書の他の場所で論じられる。

【0042】

用語「約 (about)」または「およそ (approximately)」は、部分的に特定の値が測定または決定される方法、すなわち測定システムの限界に応じて、当業者によって決定されるその値に対する許容される誤差範囲を意味する。例えば、「約」は、当技術分野の実施によって、3または3超の標準偏差内を意味する場合がある。あるいは、「約」は、所与の値の20%まで、例えば10%まで、5%まで、または1%までの範囲を意味する場合がある。あるいは、特に生物系または生物学的プロセスについて、この用語は、例えば値の5倍以内または2倍以内といった1桁内を意味する。

【0043】

本明細書で使用する場合、「シグナルトランスダクションタンパク質」に関する用語「シグナル伝達」は、活性化されるかまたはそうでなければ、膜受容体タンパク質へのリガンド結合もしくはいくつかの他の刺激によって影響を受けるタンパク質を指す。シグナルトランスダクションタンパク質の例として、これらに限定されないが、SMAD、ベーターカテニンを含むウィングレス (Wnt) 複合体タンパク質、NOTCH、形質転換成長因子ベータ (TGF β)、アクチビン、Nodal、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β (GSK3 β) タンパク質、骨形成タンパク質 (BMP) および線維芽細胞成長因子 (FGF) が挙げられる。多くの細胞表面受容体または内部受容体タンパク質に関して、リガンド-受容体相互作用は、細胞の応答に直接的には結び付かない。リガンドによって活性化された受容体は、細胞の挙動に対するリガンドの最終的な生理学的効果が生じる前に、細胞の内部で他のタンパク質とまず相互作用しうる。いくつかの相互作用する細胞タンパク質の鎖の挙動はしばしば、受容体活性化または阻害後に変更される。受容体活性化によって誘導される細胞変化一式が、シグナルトランスダクション機構またはシグナル伝達経路と称される。

【0044】

本明細書で使用される場合、用語「シグナル」は、細胞構造および機能における変化を制御する内部および外部因子を指す。これらは、本質的に化学的であっても物理的であってもよい。

【0045】

本明細書で使用される場合、用語「リガンド」は、受容体に結合する分子およびタンパク質、例えば形質転換成長因子ベータ (TGF β)、アクチビン、Nodal、骨形成タンパク質 (BMP)などを指す。

【0046】

「阻害剤」は、本明細書で使用される場合、分子または経路のシグナル伝達機能を妨げる (例えば、低減させる、減少させる、抑制する、排除する、または遮断する) 化合物または分子 (例えば、小分子、ペプチド、ペプチド模倣体、天然化合物、siRNA、アンチセンス核酸、アプタマー、または抗体) を指す。阻害剤は、一例として、SMADシグナル伝達に直接接触すること、SMADmRNAに接触すること、SMADのコンフォメーションを変化させること、SMADタンパク質レベルを低下させること、またはSMADのシグナル伝達パートナー (例えば、本明細書に記載されているものを含む) との相互作用を妨げること、およびSMAD標的遺伝子 (例えば、本明細書に記載されているもの) の発現に影響を及ぼすことによって、特定のタンパク質 (シグナル伝達分子、特定のシグナル伝達分子に関連する任意の分子、特定の関連分子、例えばグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β (GSK3 β)) (例えば、これらに限定されないが、本明細書に記載されているシグナル伝達分子を含む) の任意の活性を変化させる任意の化合物または分子であり

うる。阻害剤は、シグナル伝達分子を上流で妨害することによって、生物活性、例えばSMA D生物活性を間接的に調節する分子も含む（例えば、細胞外ドメイン内でのシグナル伝達分子と効果の例として以下が挙げられる：骨形成タンパク質を捕捉するノギンは、ALK受容体1、2、3、および6の活性化を阻害し、したがって下流でSMA D活性化を防止する。さらに、Chordin、Cerberus、Follistatinは、同様に、SMA Dシグナル伝達の細胞外活性化剤を捕捉する。Bambi、膜貫通タンパク質も、細胞外TGF β シグナル伝達分子を捕捉する偽受容体として作用する）。上流または下流でタンパク質を遮断する抗体は、タンパク質のシグナル伝達の細胞外活性化剤などを中和するために使用することが企図される。阻害剤は、特定のシグナル伝達分子の上流で分子に結合して影響を及ぼし、順次、特定の分子の阻害を引き起こすことによって誘導される阻害に加えて、競合阻害（別の公知の結合化合物の結合を排除するかまたは低減させるように活性部位に結合する）およびアロステリック阻害（タンパク質のコンフォメーションを変化させるようにタンパク質に結合して、そのタンパク質の活性部位への化合物の結合を妨げる）に関して記載されている。阻害剤は、シグナル伝達の標的と実際に接触することによって、シグナル伝達の標的またはシグナル伝達の標的経路を阻害する「直接阻害剤」でありうる。

10

【0047】

「活性化剤」は、本明細書で使用される場合、分子または経路のシグナル伝達機能、例えばWntシグナル伝達、SHHシグナル伝達などの活性化を増大させる、誘導する、刺激する、活性化する、促進する、または増強する化合物を指す。

20

【0048】

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

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「細胞の集団」または「細胞集団」は、少なくとも2個の細胞の群を指す。非限定例では、細胞集団は、少なくとも約10、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1000個の細胞を含むことができる。集団は、1つの細胞型を含む純粋な集団、例えば中脳DA前駆体の集団、または未分化幹細胞の集団であってもよい。あるいは、集団は、2種以上の細胞型を含んでもよい（例えば、混合細胞集団）。

30

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「幹細胞」は、培養下で無期限に分裂して、特化した細胞を生じる能力を有する細胞を指す。

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「胚性幹細胞」および「ESC」は、培養下で長期間分化せずに分裂することができる移植前の段階の胚から誘導され、3つの一次胚葉の細胞および組織に発生することが知られている原始（未分化）細胞を指す。ヒト胚性幹細胞は、ヒトの胚に由来する胚性幹細胞を指す。本明細書で使用される場合、用語「ヒト胚性幹細胞」または「hESC」は、培養下で長期間分化せずに分裂することができ、3つの一次胚葉の細胞および組織に発生することが知られている、初期段階のヒト胚から胚盤胞期までおよび胚盤胞期を含む胚から誘導される1種の多能性幹細胞を指す。

40

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「胚性幹細胞株」は、数日、数カ月から数年までの間、分化せずに増殖可能であるin vitro条件下で培養された胚性幹細胞の集団を指す。

【0053】

本明細書で使用される場合、用語「全能性」は、体の全ての細胞型、および胎盤などの胚体外組織を構成するすべての細胞型を生じる能力を指す。

【0054】

50

本明細書で使用される場合、用語「多分化能」は、体の2種以上の細胞型に発生する能力を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「多能性」は、内胚葉、中胚葉、および外胚葉を含む生物の発生における3つの胚葉に発生する能力を指す。

【0056】

本明細書で使用される場合、用語「人工多能性幹細胞」または「iPSC」は、ある特定の胚性遺伝子（例えば、これらに限定されないが、OCT4、SOX2、およびKLF4導入遺伝子）（例えば、参照により本明細書に組み込まれるTakahashiおよびYamanaka Cell 126巻、663～676頁（2006年）を参照のこと）を体細胞に導入することによって形成された1種の多能性幹細胞を指す。

10

【0057】

本明細書で使用される場合、用語「体細胞」は、配偶子（卵子または精子）以外の体内の任意の細胞を指し、「成体」細胞と称されることもある。

【0058】

本明細書で使用される場合、用語「体性（成体）幹細胞」は、自己再生（実験室における）と分化の両方に対する能力が制限された多くの器官および分化した組織において見られる比較的稀な未分化細胞を指す。

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「ニューロン」は神経系の主な機能単位である神経細胞を指す。ニューロンは、細胞体とその突起、すなわち軸索と1つまたは複数の樹状突起からなる。ニューロンは、シナプスにおいて神経伝達物質を放出することによって、情報を他のニューロンまたは細胞に伝達する。

20

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「増殖」は、細胞数の増加を指す。

【0061】

本明細書で使用される場合、用語「未分化」は、特化した細胞型に未だ発生していない細胞を指す。

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「分化」は、特化していない胚性細胞が、ニューロン、心臓、肝臓、または筋肉細胞などの特化した細胞の特徴を獲得する工程を指す。分化は、通常、細胞表面に埋め込まれたタンパク質に参与するシグナル伝達経路を通して、細胞の遺伝子と細胞の外側の物理的および化学的条件との相互作用によって制御されている。

30

【0063】

本明細書で使用される場合、用語「誘導された分化」は、神経、神経堤、頭蓋プラコード、および非神経外胚葉の前駆体などの特定の（例えば、所望の）細胞型への分化を誘導する幹細胞培養条件の操作を指す。

【0064】

本明細書で使用される場合、幹細胞に関する用語「誘導された分化」は、多能性状態からより成熟したまたは特化した細胞運命への幹細胞の遷移を促進する小分子、成長因子タンパク質、および他の成長条件の使用を指す。

40

【0065】

本明細書で使用される場合、細胞に関する用語「分化を誘導する」は、デフォルト細胞型（遺伝子型および／または表現型）を非デフォルト細胞型（遺伝子型および／または表現型）に変化させることを指す。したがって、「幹細胞における分化を誘導すること」は、幹細胞とは異なる特徴、例えば遺伝子型（例えば、マイクロアレイなどの遺伝子解析によって決定される遺伝子発現における変化）および／または表現型（例えば、中脳DA細胞、またはその前駆体、例えばEN-1、OTX2、TH、NURR1、FOXA2、およびLLMX1Aのタンパク質マーカーの発現における変化）を有する子孫細胞へ分裂するように幹細胞（例えば、ヒト幹細胞）を誘導することを指す。

50

【0066】

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

【0067】

本明細書で使用される場合、用語「培養培地」は、培養容器、例えばペトリ皿、マルチウェルプレートなどにおいて細胞を覆い、細胞を養い、支持する栄養物を含有する液体を指す。培養培地は、細胞において所望の変化をもたらすために添加される成長因子も含む。

【0068】

本明細書で使用される場合、用語、細胞（複数可）を化合物（例えば、1種または複数の阻害剤、活性化剤、および／または誘導剤）と「接触させること」は、細胞（複数可）を化合物にアクセス可能にする位置に化合物を提供することを指す。接触させることは、任意の適切な方法を使用して達成される。例えば、接触させることは、濃縮形態の化合物を、細胞培養の状況下で、所望の濃度を達成するために、細胞または細胞の集団に添加することによって達成されうる。接触させることは、化合物を配合培養培地の構成成分として含むことによって達成される。

10

【0069】

本明細書で使用される場合、用語「*in vitro*」は、人工環境および人工環境内で起こるプロセスまたは反応を指す。例示される *in vitro* 環境は、これらに限定されないが、試験管および細胞培養である。

20

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「*in vivo*」は、自然環境（例えば、動物または細胞）および自然環境内で起こるプロセスまたは反応、例えば胚発生、細胞分化、神経管形成などを指す。

【0071】

本明細書で使用される場合、遺伝子またはタンパク質に関連する用語「発現すること」は、マイクロアレイアッセイ、抗体染色アッセイなどのアッセイを使用して観察することができる *mRNA* またはタンパク質を作製することを指す。

【0072】

本明細書で使用される場合、用語「マーカー」または「細胞マーカー」は、特定の細胞または細胞型を特定する遺伝子またはタンパク質を指す。細胞に対するマーカーは、1種のマーカーに限定されず、マーカーは、指定されたマーカー群が、別の細胞または細胞型からある細胞または細胞型を特定することができるようなマーカーの「パターン」を指す場合がある。

30

【0073】

本明細書で使用される場合、本明細書で開示されている任意の細胞に言及した場合の用語「から誘導される」または「から確立される」または「から分化させる」は、任意の操作、例えば、限定せずに、単細胞単離、*in vitro* での培養、例えばタンパク質、化学物質、放射線、ウイルス感染、DNA配列を用いる、例えばモルフォゲンなどを用いるトランスフェクション、培養された親細胞に含有される任意の細胞の選択（例えば、連続培養による）を使用する処置および／または変異誘発を使用して、細胞株、組織（例えば、解離させた胚）、または体液における最終的な親細胞から得られた（例えば、単離された、精製されたなど）細胞を指す。誘導された細胞は、成長因子に対する応答、サイトカイン、サイトカイン処置の選択された進行、接着性、接着性の欠如、選別手順などにより、混合集団から選択されうる。

40

【0074】

本明細書における「個体」または「被験体」は、脊椎動物、例えばヒトまたは非ヒト動物、例えば哺乳動物である。哺乳動物として、これらに限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、家畜、競技動物、げっ歯類およびペットが挙げられる。非ヒト動物被験体の非限定例として、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットなどのげっ歯類、ウサギ、イ

50

ヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、ならびに類人猿およびサルなどの非ヒト霊長類が挙げられる。

【0075】

本明細書で使用される場合、用語「疾患」は、細胞、組織、または器官の通常の機能に損傷を与えるかまたはそれらを妨げる任意の状態または障害を指す。

【0076】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」または「処置」は、処置される個体または細胞の疾患経過を変更することを試みる臨床的介入を指し、予防としてかまたは臨床病理の経過中にのいずれかで実施されうる。処置の治療効果として、限定されず、疾患の発生または再発を予防すること、症状の緩和、疾患の任意の直接的なまたは間接的な病理学的帰結の減弱、転移を予防すること、疾患の進行速度を低下させること、疾患状態の好転 (amelioration) または軽減、および寛解または改善された予後が挙げられる。疾患または障害の進行を予防することによって、処置によって、罹患したもしくは診断された被験体または障害を有することが疑われる被験体における障害に起因する悪化が予防されうるが、処置によって、障害のリスクを有する被験体または障害を有することが疑われる被験体における障害または障害の症状の発症も予防することができる。

【0077】

5. 2 幹細胞を分化させる方法

本開示の主題は、少なくとも一部は、ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル伝達の活性化、およびウィングレス (Wnt) シグナル伝達の活性化を伴う、SMADシグナル伝達の二重阻害 (例えば、TGF β /アクチビン-Nodalシグナル伝達およびBMPシグナル伝達の阻害による) であって、Wnt活性化化合物の濃度を、細胞のSMAD阻害剤、SHH活性化剤、およびWnt活性化剤への最初の接触の約4日後に増加させる二重阻害によって、中脳ドーパミン (mDA) ニューロン、およびその前駆体をヒト幹細胞から分化させることができるという発見に基づく。ある特定の非限定的実施形態では、Wnt活性化化合物の濃度における前記増加は、前記増加の前のWnt活性化化合物の濃度の約400%~1000%であってよい。ある特定の非限定的実施形態では、Wnt活性化剤の前記より高い濃度は、少なくとも約7または8日間維持されうる。ある特定の非限定的実施形態では、Wnt活性化における増加は、第2のまたはそれを超えるWnt活性化剤を添加することによって達成される。細胞は、中脳DA系列特異的活性化剤および阻害剤、例えばBDNF、GDNF、cAMP、TGF β 、AA、およびDAPTとさらに接触させることができる。ある特定の非限定的実施形態では、増加したWnt活性化剤の濃度の有効量は、Wnt活性化剤と接触させた細胞の集団におけるPAX6発現の検出可能なレベルを低減させる濃度である。ある特定の非限定的実施形態では、PAX6発現は、細胞の集団において検出不可能である。

【0078】

本開示の主題は、幹細胞 (例えば、ヒト幹細胞) の分化を誘導するためのin vitro方法を提供する。ヒト幹細胞の非限定例として、ヒト胚性幹細胞 (hESC)、ヒト多能性幹細胞 (hPSC)、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC)、ヒト単為生殖幹細胞、始生殖細胞様多能性幹細胞、胚盤葉上層幹細胞、Fクラス多能性幹細胞、体性幹細胞、がん幹細胞、または系列特異的分化の可能な任意の他の細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、ヒト幹細胞は、ヒト胚性幹細胞 (hESC) である。ある特定の実施形態では、ヒト幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) である。

【0079】

本出願によって記載されている方法に従って使用することができる幹細胞の非限定例として、ヒト、非ヒト霊長類またはげっ歯類の非胚性幹細胞、胚性幹細胞、人工非胚性多能性細胞および操作された多能性細胞も挙げられる。

【0080】

ある特定の非限定的実施形態では、幹細胞またはその子孫細胞は、導入された異種核酸を含有し、前記核酸は、所望の核酸またはタンパク質産物をコードしてもよく、情報とし

10

20

30

40

50

ての価値を有してもよい（例えば、参照によりその全体が組み込まれる米国特許第6,312,911号を参照のこと）。所望のタンパク質産物の非限定例として、*in vivo* 画像化研究により検出可能なマーカー、例えばこれらに限定されないが、受容体またはヒトのナトリウムヨウ素共輸送体などの他の細胞膜タンパク質が挙げられる。

【0081】

マーカーの非限定例として、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal）、シアン蛍光タンパク質（ECFP、Cerulean、Cypet、mTurquoise2）、および黄色蛍光タンパク質誘導体（YFP、Citrine、Venus、YPet、EYFP））、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（cat）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo）、酵素（例えば、オキシダーゼおよびペルオキシダーゼ）、ならびに抗原分子がさらに挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「レポーター遺伝子」または「レポーター構築物」は、着色したタンパク質、GFPなどの蛍光タンパク質またはベータガラクトシダーゼ（LacZ遺伝子）などの酵素などの容易に検出可能なまたは容易にアッセイ可能なタンパク質をコードする核酸を含む遺伝子構築物を指す。ある特定の実施形態では、レポーターは、mDAマーカー遺伝子の組換えプロモーター、例えばTHおよび／またはEn-1によって駆動されうる。

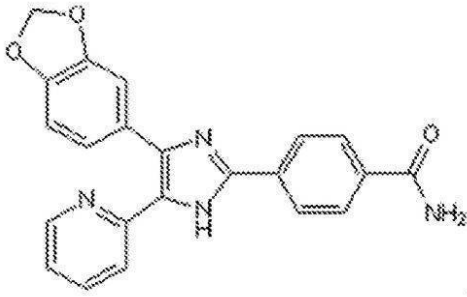
【0082】

ある特定の非限定的実施形態では、幹細胞、またはその前駆細胞は、細胞の代謝プロセス、例えば、グルコース代謝および／またはコリン代謝を上昇または低下させる導入された異種核酸を含有し、ここで、細胞は、変更された代謝活性により、ポジトロン断層撮影（PET）を使用して、*in vivo* で画像化されうる。

【0083】

ある特定の実施形態では、本開示の分化方法は、ヒト幹細胞の集団を、Small Mothers Against Decapentaplegic（SMAD）シグナル伝達の阻害をもたらす形質転換成長因子ベータ（TGF β ）／アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、TGF β ／アクチビン-Nodalシグナル伝達の阻害剤は、TGF β 、骨形成タンパク質（BMP）、Nodal、およびアクチビンを含むリガンドを中和するか、またはそれらのシグナル経路を受容体および下流のエフェクターを遮断することによって遮断する。TGF β ／アクチビン-Nodalシグナル伝達の阻害剤の非限定例は、すべての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO／2010／096496、WO／2011／149762、WO／2013／067362、WO／2014／176606、WO／2015／077648、Chambersら、Nat Biotechnol. 2009年3月；27巻（3号）：275～80頁、Kriksら、Nature. 2011年11月6日；480巻（7378号）：547～51頁、およびChambersら、Nat Biotechnol. 2012年7月1日；30巻（7号）：715～20頁（2012年）に開示されている。ある特定の実施形態では、TGF β ／アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤は、SB431542、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群より選択される小分子である。「SB431542」は、番号がCAS301836-41-9、分子式がC₂₂H₁₈N₄O₃、名称が4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミドである分子を指す。例えば、以下の構造を参照のこと：

【化 1】



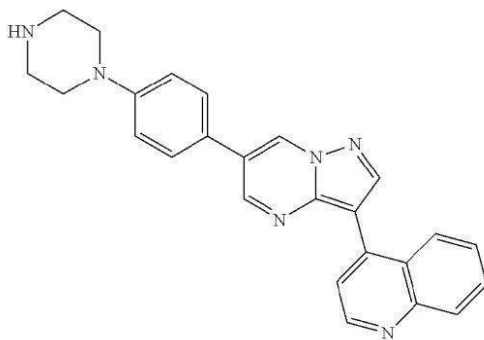
10

【0084】

本開示の分化方法は、ヒト幹細胞を、SMADシグナル伝達の阻害をもたらすBMPシグナル伝達の1種または複数の阻害剤と接触させることをさらに含む。SMADシグナル伝達の阻害剤の非限定例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2011/149762、Chambersら、Nat Biotechnol. 2009年3月；27巻（3号）：275～80頁、Kriksら、Nature. 2011年11月6日；480巻（7378号）：547～51頁、およびChambersら、Nat Biotechnol. 2012年7月1日；30巻（7号）：715～20頁に開示されている。ある特定の実施形態では、BMP/SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤は、LDN193189、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群より選択される小分子である。「LDN193189」は、小分子DM-3189、IUPAC名4-（6-（4-（ピペラジン-1-イル）フェニル）ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル）キノリン、を指し、化学式C₂₅H₂₂N₆を有し、以下の式を有する。

20

【化 2】



30

【0085】

LDN193189は、SMADシグナル伝達阻害剤として機能することができる。LDN193189は、ALK2、ALK3、およびALK6、タンパク質チロシンキナーゼ（PTK）の非常に強力な小分子阻害剤でもあり、I型TGFβ受容体のALK1およびALK3ファミリーメンバーのシグナル伝達を阻害し、骨形成タンパク質（BMP）BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、およびアクチビンサイトカインシグナル、なら

40

【0086】

本開示の分化方法は、ヒト幹細胞を、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と接触させることをさらに含む。本明細書で使用される場合、リガンドに関する用語「WNT」または「ウィングレス」はWNT受容体、例えばFrizzledおよびLRP5/6（LRP5/6）/RYK受容体ファミリーにおける受容体など、WNT受容体と相互作用

50

することができる分泌タンパク質（すなわち、ヒトにおける *Int 1*（インテグレーション1））の群を指す。本明細書で使用される場合、シグナル伝達経路に関する用語「WNT」または「ウィングレス」は、 β -カテニンで媒介されるかまたは β -カテニンを有さない *Frizzled* および *LRP Derailled* / RYK 受容体など、Wnt ファミリーリガンドおよび Wnt ファミリー受容体から構成されるシグナル経路を指す。本明細書に記載されている目的として、好ましい WNT シグナル伝達経路は、 β -カテニン、例えば WNT / β -カテニンによる媒介を含む。

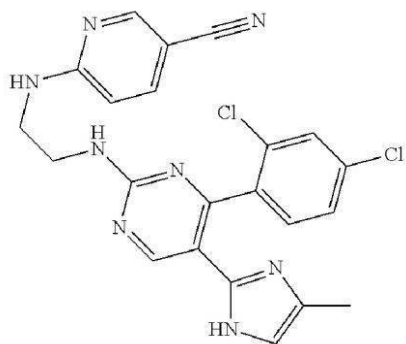
【0087】

ある特定の実施形態では、Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化剤は、Wnt シグナル伝達の活性化に対する GSK3 β を低下させる。したがって、Wnt シグナル伝達の活性化剤は、GSK3 β 阻害剤であってよい。GSK3 β 阻害剤は、WNT シグナル伝達経路を活性化することができ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる Cadigan ら、*J Cell Sci.* 2006年；119巻：395～402頁；Kikuchi ら、*Cell Signaling.* 2007年；19巻：659～671頁を参照されたい。本明細書で使用される場合、用語「グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β 阻害剤」は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β 酵素を阻害する化合物を指し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる Double ら、*J Cell Sci.* 2003年；116巻：1175～1186頁を参照されたい。

【0088】

Wnt シグナル伝達の活性化剤または GSK3 β 阻害剤の非限定例は、参照によりその全体が組み込まれる WO2011/149762、WO13/067362、Chambers ら、*Nat Biotechnol.* 2012年7月1日；30巻（7号）：715～20頁、Kriks ら、*Nature.* 2011年11月6日；480巻（7378号）：547～51頁、および Calder ら、*J Neurosci.* 2015年8月19日；35巻（33号）：11462～81頁に開示されている。ある特定の実施形態では、Wnt シグナル伝達の1種または複数の活性化剤は、CHIR99021、その誘導体、およびそれらの混合物からなる群より選択される小分子である。「CHIR99021」（「アミノピリミジン」または「3-〔3-（2-カルボキシエチル）-4-メチルピロール-2-メチリデニル〕-2-インドリノン」としても公知）は、IUPAC 名 6-（2-（4-（2,4-ジクロロフェニル）-5-（4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル）ピリミジン-2-イルアミノ）エチルアミノ）ニコチノニトリルを指し、以下の式を有する。

【化3】



【0089】

CHIR99021 は、選択性が高く、関連するおよび関連しないキナーゼのパネルに対してほぼ1000倍の選択性を示し、ヒト GSK3 β に対して IC50 = 6.7 nM およびげっ歯類 GSK3 β ホモログに対してナノモル濃度の IC50 値を有する。

【0090】

ある特定の非限定的実施形態では、本明細書に記載されている細胞の集団を、約0.001から2 μ Mの間、または約0.01から1.5 μ Mの間、または約0.1から1 μ M

10

20

30

40

50

の間、または約0.5から0.8 μM の間、または約0.7 μM の濃度のCHIR99021の初期濃度で接触させ、CHIR99021の濃度は、本明細書に記載されているように、例えば、細胞のCHIR99021への最初の接触の約4日後に、約2から15 μM の間、または約3から14 μM の間、または約4から13 μM の間、または約5から12 μM の間、または約6から11 μM の間、または約7から10 μM の間、または約8から9 μM の間、または約3から10 μM の間、または約5から10 μM の間、または約3 μM 、または約7.5 μM まで増加させる。

【0091】

本開示の分化方法は、ヒト幹細胞を、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と接触させることをさらに含む。本明細書で使用する場合、用語「ソニックヘッジホッグ」、「SHH」、または「Shh」は、ヘッジホッグと称され、別のものはデザートヘッジホッグ(DHH)であり、一方、3つ目はインディアンヘッジホッグ(IHH)である、哺乳動物のシグナル伝達経路ファミリーにおける少なくとも3つのタンパク質のうちの1つであるタンパク質を指す。Shhは、膜貫通分子であるPatched(PTC)およびSmoothened(SMO)と相互作用することによって少なくとも2種の膜貫通タンパク質と相互作用する。Shhは、典型的には、PTCに結合し、次いで、シグナルトランスデューサーとしてSMOの活性化を可能にする。SHHの非存在下では、PTCは典型的にはSMOを阻害し、順次、ある特定の遺伝子の転写が起らないように転写抑制因子を活性化する。Shhが存在し、PTCに結合する場合、PTCは、SMOの機能を妨げることはできない。SMOが阻害されないと、ある特定のタンパク質が核に侵入し、ある特定の遺伝子の活性化を可能にする転写因子として作用することができる(Gilbert、2000年 Developmental Biology (Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc., Publishers)を参照のこと)。ある特定の実施形態では、ソニックヘッジホッグ(SHH)シグナル伝達の活性化剤は、PTCまたはSmoothenedアゴニストなどに結合する分子または化合物を含む、SHHシグナル伝達経路を活性化する任意の分子または化合物を指す。Wntシグナル伝達の活性化剤またはGSK3 β 阻害剤の非限定例は、WO10/096496、WO13/067362、Chambersら、Nat Biotechnol. 2009年3月; 27巻(3号): 275~80頁、およびKriksら、Nature. 2011年11月6日; 480巻(7378号): 547~51頁に開示されている。このような化合物の例は、組換えSHH、精製SHH、タンパク質ソニックヘッジホッグ(SHH) C25II(すなわち、SHHを活性化するためにSHH受容体に結合することができる全長マウスソニックヘッジホッグタンパク質の組換えN-T末端断片、例えばRand Systemsのカatalog番号: 464-5H-025/CF)および小分子Smoothenedアゴニスト、例えばパルモルファミンなどである。

【0092】

ある特定の実施形態では、上述の阻害剤および活性化剤は、幹細胞を含む細胞培養培地に添加される。適切な細胞培養培地として、これらに限定されないが、Knockout(登録商標) Serum Replacement(「KSR」)培地、Neurobasal(登録商標)培地(NB)、N2培地、B-27培地、およびEssential 8(登録商標)/Essential 6(登録商標)(「E8/E6」)培地、ならびにこれらの組合せが挙げられる。KSR培地、NB培地、N2培地、B-27培地、およびE8/E6培地は市販されている。KSR培地は、培養下で未分化hESC細胞を成長させ維持するために最適化された規定の血清不含配合物である。

【0093】

ある特定の実施形態では、細胞培養培地は、KSR培地である。KSR培地の構成成分は、WO2011/149762に開示されている。ある特定の実施形態では、KSR培地は、Knockout DMEM、Knockout Serum Replacement、L-グルタミン、Pen/Strep、MEM、および13-メルカプトエタノールを含む。

10

20

30

40

50

ールを含む。ある特定の実施形態では、1リットルのKSR培地は、820mLのKnockout DMEM、150mLのKnockout Serum Replacement、10mLの200mM L-グルタミン、10mLのPen/Strep、10mLの10mM MEM、および55μMの13-メルカプトエタノールを含む。

【0094】

ある特定の実施形態では、幹細胞を、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、BMP/SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、およびSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、およびSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤は、幹細胞を含む細胞培養培地に添加される。

【0095】

ある特定の実施形態では、細胞培養培地は、E8/E6培地である。E8/E6培地は、ヒト多能性幹細胞の成長および増殖を支持するフィーダーフリーおよび異種成分不含(xenofree)培地である。E8/E6培地は、体細胞再プログラミングを支持することが判明した。さらにE8/E6培地は、PSCの培養に対するカスタム培地の配合物のベースとして使用することができる。E8/E6培地の一例は、参照によりその全体が組み込まれるChenら、Nat Methods 2011年5月; 8巻(5号): 424~9頁に記載されている。E8/E6培地の一例は、参照によりその全体が組み込まれるWO15/077648に開示されている。ある特定の実施形態では、E8/E6細胞培養培地は、DMEM/F12、アスコルビン酸、セレン(selenium)、インスリン、NaHCO₃、トランスフェリン、FGF2およびTGFβを含む。E8/E6培地は、E8/E6培地が、活性BMPまたはWnt成分を含まない点でKSR培地と異なる。したがって、ある特定の実施形態では、E8/E6培地が、本開示の幹細胞の集団を培養して固有受容器の集団に分化させるために使用される場合、SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤(例えば、BMPを阻害するもの)は、E8/E6培地に添加される必要がない。ある特定の実施形態では、幹細胞を、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、およびSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、およびSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤は、幹細胞を含む細胞培養培地に添加される。ある特定の実施形態では、BMPが、培地にさらに添加される場合がある。

【0096】

ある特定の実施形態では、本開示の主題は、ヒト幹細胞の中脳DAニューロン、またはその前駆体への分化を誘導するためのin vitro方法を提供する。ある特定の実施形態では、幹細胞を、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、BMP/SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、およびSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と、例えば、これらの阻害剤を、同日に、幹細胞を含む細胞培養培地に添加することによって、同時に接触させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤の濃度は、細胞をWnt活性化剤と最初に接触させてから少なくとも約2、3、4、5または6日後に増加させる。

【0097】

ある特定の実施形態では、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、少なくとも約4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数の間、例えば約4から10日の間、または約5から9日の間、または約6から8日の間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ/アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約4、5、6、7、8、9、もしくは10

またはそれを超える日数までの間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビン－Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約7日間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビン－Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤は、0日目～10日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、毎日または隔日で添加される（例えば、0日目、2日目、4日目、6日目、8日目、および10日目に添加される）。ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビン－Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤は、0、1、3、4、および6日目に添加される。

【0098】

ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビン－Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約1から20μMの間、または約2から19μMの間、または約3から18μMの間、または約4から17μMの間、または約5から16μMの間、または約6から15μMの間、または約7から14μMの間、または約8から13μMの間、または約9から12μMの間、または約10から11μMの間、およびその間の値の濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビン－Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約7、8、9、10、11、12、または13μMの濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、TGFβ／アクチビン－Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約10.8μMの濃度で細胞に接触させる。

【0099】

ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、少なくとも約4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数の間、例えば約4から10日の間、または約5から9日の間、または約6から8日の間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数までの間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約7日間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤は、0日目～10日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、毎日または隔日で添加される（例えば、0日目、2日目、4日目、6日目、8日目、および10日目に添加される）。ある特定の実施形態では、1種または複数の阻害剤は、0、1、3、4、および6日目に添加される。

【0100】

ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約50から500nMの間、または約75から475nMの間、または約100から450nMの間、または約125から425nMの間、または約150から400nMの間、または約175から375nMの間、または約200から350nMの間、または約225から325nMの間、または約250から300nMの間、およびその間の値の濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約150、200、250、300、または350nMの濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を、約250nMの濃度で細胞に接触させる。

【0101】

ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、少なくとも約4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数の間、例えば約4から10日の間、または約5から9日の間、または約6から8日の間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数までの間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約7日間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤は、0日目～10日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、毎日または隔日で添加される（例えば、0日目、2日目、4日目、6日目、8日目、および10日目に添加

される)。ある特定の実施形態では、1種または複数の阻害剤は、0、1、3、4、および6日目に添加される。

【0102】

ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約50から1000 ng/mLの間、または約100から950 ng/mLの間、または約150から900 ng/mLの間、または約200から850 ng/mLの間、または約250から800 ng/mLの間、または約300から750 ng/mLの間、または約350から700 ng/mLの間、または約400から650 ng/mLの間、または約450から600 ng/mLの間、または約500から550 ng/mLの間、およびその間の値の濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約400、450、500、550、または600 ng/mLの濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態ではSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約500 ng/mLの濃度で細胞に接触させる。

10

【0103】

ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、少なくとも約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20またはそれを超える日数の間、例えば約4から20日の間、または約4から19日の間、または約4から18日の間、または約4から17日の間、または約4から16日の間、または約4から15日の間、または約4から14日の間、または約4から13日の間、または約4から12日の間、または約4から11日の間、または約4から10日の間、または約4から9日の間、または約4から8日の間、または約4から7日の間、または約4から6日の間、または約5から19日の間、または約6から17日の間、または約7から16日の間、または約8から15日の間、または約9から14日の間、または約10から13日の間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20またはそれを超える日数までの間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約12日間、細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤は、0日目～12日目まで、幹細胞を含む細胞培養培地に、毎日または隔日で添加される（例えば、0日目、2日目、4日目、6日目、8日目、10日目、および12日目に添加される）。ある特定の実施形態では、1種または複数の阻害剤は、0、1、3、4、6、7、9、10、および11日目に添加される。

20

30

【0104】

ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約0.05から15 μMの間、または約0.1から14 μMの間、または約0.5から13 μMの間、または約1から12 μMの間、または約1.5から11 μMの間、または約2から10 μMの間、または約2.5から9.5 μMの間、または約3から9 μMの間、または約3.5から8.5 μMの間、または約4から8 μMの間、または約4.5から7.5 μMの間、または約5から7 μMの間、または約5.5から6.5 μMの間、およびその間の値の濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、または1 μMの濃度で細胞に接触させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤を、約0.7 μMの濃度で細胞に接触させる。

40

【0105】

ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、細胞をWnt活性化剤と最初に接触させてから少なくとも約2、3、4、5または6日後、例えば約2から10日の間、または約3から9日の間、または約4から8日の間、または約5から7日の間に増加させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、細胞をWnt活性化剤と最初に接触させてから約2、3、4、5または6日後までに増加さ

50

せる。ある特定の実施形態では、細胞を、増加した濃度のWnt活性化剤と、少なくとも約4、5、6、7、8、9、もしくは10日またはそれを超える間、例えば、約4から20日の間、または約5から19日の間、または約6から18日の間、または約7から17日の間、または約8から16日の間、または約9から15日の間、または約8から14日の間、または約9から13日の間、または約10から12日の間、接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、増加した濃度のWnt活性化剤と、約4、5、6、7、8、9、もしくは10日またはそれを超えるまでの間、接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、増加した濃度のWnt活性化剤と、約5、6、7、8、9、10、または11日の間、接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、増加した濃度のWnt活性化剤と、約8日間接触させる。

10

【0106】

ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、約2から15 μ Mの間、または約3から14 μ Mの間、または約4から13 μ Mの間、または約5から12 μ Mの間、または約6から11 μ Mの間、または約7から10 μ Mの間、または約8から9 μ Mの間の濃度まで増加される。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、約3から10 μ Mの間、または約5から10 μ Mの間の濃度まで増加される。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、約3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5または10 μ Mの濃度まで増加される。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、約3 μ Mの濃度まで増加される。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、約7.5 μ Mの濃度まで増加される。

20

【0107】

ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、細胞に接触させた初期濃度から、約50から2000%の間、または約100から1950%の間、または約150から1900%の間、または約200から1850%の間、または約250から1800%の間、または約300から1750%の間、または約350から1700%の間、または約400から1650%の間、または約450から1600%の間、または約500から1550%の間、または約550から1500%の間、または約600から1450%の間、または約650から1400%の間、または約700から1350%の間、または約750から1300%の間、または約800から1250%の間、または約850から1200%の間、または約900から1150%の間、または約950から1100%の間、または約1000から1050%、およびその間の値、増加させる。ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、細胞に接触させた初期濃度から、約400から1450%の間、または約700から1050%の間、およびその間の値、増加される。

30

【0108】

ある特定の実施形態では、Wntシグナル伝達の活性化剤の濃度は、細胞に接触させた初期濃度から、約400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%、1050%、もしくは1100%またはそれを超えて増加される。

40

【0109】

特定の非限定的実施形態では、細胞を、TGF β /アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤（すなわち、第1のSMAD阻害剤）、例えば約10.8 μ Mの濃度のSB431542、BMPシグナル伝達の1種または複数の阻害剤（すなわち、第2のSMAD阻害剤）、例えば約250 nMの濃度のLDN193189、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、例えば0.7 μ Mの濃度のCHIR99021、および約500 ng/mLの濃度のSHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と接触させ、ここで、細胞は、約7日間（すなわち、培養の0日目から6日目まで）阻害剤と接触させ、CHIR99021の濃度は、細胞培養の4日目に、3 μ Mまたは7.5 μ Mまで増加させる。

50

【0110】

ある特定の実施形態では、細胞を、Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤と約11日間（すなわち、培養の0日目～11日目）接触させ、細胞を、細胞培養の4日目から11日目に7.5 μ MのCHIR99021と接触させるか、または細胞を、培養の4日目から9日目に7.5 μ MのCHIR99021と接触させ、次いで細胞培養の10日目から11日目に3 μ MのCHIR99021と接触させる。

【0111】

ある特定の実施形態では、細胞を、engrailed-1 (EN-1)、orthodenticleホメオボックス2 (OTX2)、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、核受容体関連1タンパク質 (NURR1)、フォークヘッドボックスタンパク質A2 (FOX A2)、およびLIMホメオボックス転写因子1アルファ (LMX1A) の1種または複数の発現の検出可能なレベルを上昇させるのに有効な濃度および時間で、本明細書に記載されている活性化剤および阻害剤と接触させる。

【0112】

ある特定の実施形態では、細胞を、ニューロン特異的クラスIII型ベーターチューブリン (Tuj1)、トレフォイルファクターファミリー3 (TTF3)、ペアード様ホメオドメイン3 (PITX3)、achaete-scute 複合体 (ASCL)、早期B細胞因子1 (EBF-1)、早期B細胞因子3 (EBF-3)、トランスサイレチン (TTR)、シナプシン、ドーパミントランスポーター (DAT)、およびGタンパク質共役内向き整流性カリウムチャネル (Kir3.2/GIRK2)、CD142、DCSM1、CD63および/またはCD99の1種または複数の発現の検出可能なレベルを上昇させるのに有効な濃度および時間で、本明細書に記載されている活性化剤および阻害剤と接触させる。

【0113】

ある特定の実施形態では、細胞を、DAニューロンのマーカーの1種または複数、例えばCD142の発現の検出可能なレベルを上昇させるのに有効な濃度および時間で、本明細書に記載されている活性化剤および阻害剤と接触させ、ここで、細胞はA9型ニューロン細胞である。

【0114】

ある特定の実施形態では、細胞を、ペアードボックスタンパク質 (PAX6) およびKi67の発現を低下させるのに有効な濃度および時間で、本明細書に記載されている活性化剤および阻害剤と接触させる。

【0115】

ある特定の実施形態では、細胞を、DAニューロン系列特異的活性化剤および阻害剤、例えば、L-グルタミン、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、サイクリックアデノシンリン酸 (cAMP)、形質転換成長因子ベータ (TGF β 、例えばTGF β 3)、アスコルビン酸 (AA)、およびDAPT (N-[(3, 5-ジフルオロフェニル) アセチル] -L-アラニル-2-フェニル) グリシン-1, 1-ジメチレニルエステル; LY-374973、N-[N-(3, 5-ジフルオロフェニル) アセチル] -L-アラニル] -S-フェニルグリシン-1-ブチルエステル; または N-[N-(3, 5-ジフルオロフェニル) アセチル] -L-アラニル] -S-フェニルグリシン-1-ブチルエステルとしても公知である) とさらに接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、上述のDAニューロン系列特異的活性化剤および阻害剤と、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数の間、例えば約2から20日の間、約3から19日の間、約4から18日の間、約5から17日の間、約6から16日の間、約7から15日の間、約8から15日の間、約9から14日の間、または約10から13日の間接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、上述のDAニューロン系列特異的活性化剤および阻害剤と、約2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10またはそれを超える日数までの間接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、上述のDAニューロン系列特異的活性化剤および阻害剤と、約4、5、6、7、または

8日間接触させる。

【0116】

ある特定の実施形態では、細胞を、L-グルタミンと、約0.5から5mMの間、または約1から4mMの間、または約1.5から3mMの間の濃度で接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、L-グルタミンと、約2mMの濃度で接触させる。

【0117】

ある特定の実施形態では、細胞を、BDNFと、約5から50ng/mLの間、または約10から40ng/mLの間、または約15から30ng/mLの間、または約18から25ng/mLの間の濃度で接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、BDNFと、約20ng/mLの濃度で接触させる。

10

【0118】

ある特定の実施形態では、細胞を、AAと、約50から500nMの間、または約100から400nMの間、または約150から300nMの間、または約180から250nMの間の濃度で接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、AAと、約200nMの濃度で接触させる。

【0119】

ある特定の実施形態では、細胞を、GDNFと、約5から50ng/mLの間、または約10から40ng/mLの間、または約15から30ng/mLの間、または約18から25ng/mLの間の濃度で接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、GDNFと約20ng/mLの濃度で接触させる。

20

【0120】

ある特定の実施形態では、細胞を、cAMPと、約200から800nMの間、または約250から750nMの間、または約300から700nMの間、または約350から650nMの間、または約400から600nMの間、または約450から550nMの濃度で接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、cAMPと、約500nMの濃度で接触させる。

【0121】

ある特定の実施形態では、細胞を、TGFβ3と、約0.01から5ng/mLの間、または約0.05から4ng/mLの間、または約0.1から3ng/mLの間、または約0.5から2ng/mL濃度で接触させる。ある特定の実施形態では、細胞を、TGFβ3と、約1ng/mLの濃度で接触させる。

30

【0122】

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

【0123】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って調製された細胞を、例えばフローサイトメトリーを使用して、CD142発現、またはコリン作用性受容体（CHRN B3）発現に基づいて選別、選択および単離することができる。

【0124】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って調製された細胞を、ポリシアリルトランスフェラーゼ、例えば細菌のポリシアリルトランスフェラーゼ、例えば*Neisseria meningitidis*のポリシアリルトランスフェラーゼ（PST_{Nm}）とさらに接触させる。ある特定の実施形態では、細胞は、組換えポリシアリルトランスフェラーゼを発現する組換え細胞である。

40

【0125】

5.3 神経変性障害を処置する方法

中脳DAニューロン、またはその前駆体（「幹細胞由来中脳DA前駆体」または「mDA」前駆体とも称される）の1種または複数のマーカーを発現する*in vitro*分化細胞を、神経変性障害を処置するために使用することができる。本開示の主題は、神経変

50

性障害を処置する方法であって、有効量の本開示の幹細胞由来前駆体を、神経変性障害を患っている被験体に投与するステップを含む方法を提供する。

【0126】

神経変性障害の非限定例として、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、および多発性硬化症が挙げられる。

【0127】

ある特定の実施形態では、神経変性障害はパーキンソン病である。パーキンソン病の主要な運動徴候として、例えばこれらに限定されないが、手、腕、足、顎および顔の震え、運動緩徐もしくは動きの緩慢さ、四肢体幹の硬直もしくはこわばり、および不安定な姿勢（*postural instability*）または平衡および共調が損なわれることが挙げられる。

10

【0128】

ある特定の実施形態では、神経変性疾患は、パーキンソン症候群疾患（*parkinsonism disease*）であり、これは、運動を制御する脳の部分である基底核におけるドーパミンの不足に関連する疾患を指す。症状として、震え、運動緩徐（動きの極端な緩慢さ）、屈曲姿勢、不安定な姿勢、および硬直が挙げられる。パーキンソン症候群疾患の非限定例として、皮質基底核変性症、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、および進行性核上性麻痺が挙げられる。

【0129】

本開示の幹細胞由来前駆体は、神経変性障害を処置または予防するために、被験体に、全身的または直接的に投与または提供することができる。ある特定の実施形態では、本開示の幹細胞由来前駆体は、目的の器官（例えば、中枢神経系（*CNS*）または末梢神経系（*PNS*））に直接注射される。ある特定の実施形態では、本開示の幹細胞由来前駆体は、線条体に直接注射される。

20

【0130】

本開示の幹細胞由来前駆体は、任意の生理学的に許容されるビヒクルにおいて投与することができる。本開示の幹細胞由来前駆体および薬学的に許容されるビヒクルを含む医薬組成物も提供される。本開示の幹細胞由来前駆体および前記細胞を含む医薬組成物は、局注、同所（*OT*）注射、全身注射、静脈内注射、または非経口投与によって投与することができる。ある特定の実施形態では、本開示の幹細胞由来前駆体は、神経変性障害を患っている患者に、同所（*OT*）注射により投与することができる。

30

【0131】

本開示の幹細胞由来前駆体および前記細胞を含む医薬組成物は、選択された *pH* に緩衝されうる滅菌液体調製物、例えば等張水溶液、懸濁物、エマルション、分散物、または粘性組成物として、都合よく提供することができる。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物より調製しやすい。さらに、液体組成物は、特に注射によって、投与するのに多少都合がよい。一方、粘性組成物は、特定の組織とのより長い接触期間をもたらすのに適当な粘度範囲内で製剤化することができる。液体または粘性組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）およびその適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でありうる担体を含むことができる。滅菌注射溶液は、本開示の主題の組成物、例えば本開示の幹細胞由来前駆体を含む組成物を、所望の様々な量の他の成分を含む必要量の適当な溶媒に組み込むことによって調製することができる。このような組成物は、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの適切な担体、希釈剤、または賦形剤との混合物において存在してもよい。組成物は、凍結乾燥されてもよい。組成物は、所望の投与経路および調製物に応じて、例えば、湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、*pH* 緩衝剤、ゲル化もしくは粘度増強添加剤、保存剤、矯味矯臭剤、着色剤などの補助物質を含有することができる。参照により本明細書に組み込まれる「*REMYNGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE*」、第 17 版、1985 年などの標準教科書が、過度な実験を行うことなく適切な調製物を調製

40

50

するために参考にされうる。

【0132】

抗菌性保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む、組成物の安定性および無菌状態を増強する種々の添加剤を添加することができる。微生物の活動の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって確保される。注射用医薬形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらしすることができる。しかしながら、本開示の主題によれば、使用される任意のビヒクル、希釈剤、または添加剤は、本開示の幹細胞由来前駆体と適合性であるべきである。

【0133】

必要であれば、組成物の粘度は、薬学的に許容される増粘剤を使用して、選択されたレベルに維持することができる。容易かつ経済的に入手可能であり、容易に作用するため、メチルセルロースを使用することができる。他の適切な増粘剤として、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが挙げられる。増粘剤の濃度は、選択される薬剤に応じて変わりうる。重要な点は、選択された粘度を達成する量を使用することである。適切な担体および他の添加剤の選択は、投与の正確な経路および特定の剤形、例えば、液体剤形の性質（例えば、組成物が、液体、懸濁物、ゲルまたは別の液体形態、例えば時限放出形態（time release form）または液体充填形態に製剤化されることになるか否か）に依存して変わる。

【0134】

当業者は、組成物の構成成分は、化学的に不活性であるように選択されるべきであり、本開示の幹細胞由来前駆体の生存度または有効性に影響を与えないことを認識している。このことは、化学および製薬分野の当業者（those skilled in chemical and pharmaceutical principles）にとって課題を提示せず、すなわち、この開示および本明細書で引用された文書から、標準教科書を参照することにより、または簡単な実験（過度の実験を含まない）により、課題を容易に回避することができる。

【0135】

ある特定の非限定的実施形態では、本明細書に記載されている細胞および前駆体は、生体適合性スキャホールドまたはマトリクス、例えば、細胞を被験体に植込むかまたは移植する際に、組織再生を促進する生体適合性三次元スキャホールドをさらに含む組成物中に含まれる。ある特定の非限定的実施形態では、生体適合性スキャホールドは、細胞外マトリクス材料、合成ポリマー、サイトカイン、コラーゲン、ポリペプチドまたはタンパク質、多糖類（フィブロネクチン、ラミニン、ケラチン、フィブリン、フィブリノーゲン、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、アガロースまたはゼラチン、および／またはヒドロゲルを含む）を含む。（例えば、そのそれぞれの内容が、全体が参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2015/0159135号、同第2011/0296542号、同第2009/0123433号、および同第2008/0268019号を参照のこと。）ある特定の実施形態では、組成物は、中脳DA細胞に植込まれた／移植した細胞の成熟を促進するための成長因子をさらに含む。

【0136】

本開示の幹細胞由来前駆体の治療用途に関する1つの検討事項は、最適な効果を達成するために必要な細胞の量である。最適の効果として、これらに限定されないが、神経変性障害を患っている被験体のCNSおよび／もしくはPNS領域の再増殖、ならびに／または被験体のCNSおよび／もしくはPNSの機能の改良が挙げられる。

【0137】

「有効量」（または「治療有効量」）は、処置の際に有益な結果または所望の臨床結果に影響を及ぼすのに十分な量である。有効量は、1または複数の用量で被験体に投与することができる。処置について、有効量は、神経変性障害または下垂体障害の進行を和らげる、好転させる、安定化させる、反転させるもしくは遅延させる、または代わりに神経変

10

20

30

40

50

性障害の病理学的帰結を低減するのに十分な量である。有効量は、一般的に、ケースバイケースを基本に医師によって決定され、当業者の技術の範囲内である。いくつかの因子が、典型的には、有効量を達成するために適当な投薬量を決定する際に考慮に入れられる。これらの因子として、被験体の年齢、性別および体重、処置される状態、状態の重症度ならびに投与される細胞の形態および有効濃度が挙げられる。

【0138】

ある特定の実施形態では、本開示の幹細胞由来前駆体の有効量は、神経変性障害を患っている被験体のCNSおよび／またはPNS領域の再増殖に十分な量である。ある特定の実施形態では、本開示の幹細胞由来前駆体の有効量は、神経変性障害を患っている被験体のCNSおよび／またはPNSの機能を改良するのに十分な量であり、例えば改良された機能は、通常のヒトのCNSおよび／またはPNSの機能の約1%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約99%または約100%でありうる。

10

【0139】

投与される細胞の量は、処置される被験体に対して変化する。ある特定の実施形態では、約 1×10^4 ～約 1×10^{10} 、約 1×10^4 ～約 1×10^5 、約 1×10^5 ～約 1×10^9 、約 1×10^5 ～約 1×10^6 、約 1×10^5 ～約 1×10^7 、約 1×10^6 ～約 1×10^7 、約 1×10^6 ～約 1×10^8 、約 1×10^7 ～約 1×10^8 、約 1×10^8 ～約 1×10^9 、約 1×10^8 ～約 1×10^{10} 、または約 1×10^9 ～約 1×10^{10} の本開示の幹細胞由来前駆体が、被験体に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^5 ～約 1×10^7 の本開示の幹細胞由来前駆体が、神経変性障害を患っている被験体に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^6 ～約 1×10^7 の本開示の幹細胞由来前駆体が、神経変性障害を患っている被験体に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^6 ～約 4×10^6 の本開示の幹細胞由来前駆体が、神経変性障害を患っている被験体に投与される。検討される有効用量の正確な決定は、特定の被験体のサイズ、年齢、性別、体重、および状態を含む各被験体に対する個々の因子に基づいてよい。投薬量は、この開示および当技術分野の知識から、当業者によって容易に確認されうる。

20

【0140】

ある特定の実施形態では、神経変性障害を処置するために、神経変性障害を患っている被験体に投与される細胞は、本開示の幹細胞由来中脳DA前駆体から分化／成熟されたニューロンの集団である。

30

【0141】

5. 4 キット

本開示の主題は、幹細胞の分化を誘導するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、(a) 形質転換成長因子ベータ(TGF β)／アクチビン-Nodalシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、(b) BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤、(c) Wntシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、(d) SHHシグナル伝達の1種または複数の活性化剤、および(e) 幹細胞の、中脳DAニューロン、またはその前駆体の1種または複数のマーカーを発現する分化細胞の集団への分化を誘導するための指示を含む。

40

【0142】

ある特定の実施形態では、キットは、BMP／SMADシグナル伝達の1種または複数の阻害剤を含まない。

【0143】

ある特定の実施形態では、キットは、BMPシグナル伝達の1種または複数の活性化剤をさらに含む。

【0144】

ある特定の実施形態では、指示は、幹細胞を、特異的な順序で、阻害剤、活性化剤および分子と接触させることを含む。阻害剤、活性化剤および分子を接触させる順序は、幹細胞を培養するために使用される細胞培養培地によって決定することができる。

50

【0145】

ある特定の実施形態では、指示は、幹細胞を、本開示の方法によって記載されているように、阻害剤、活性化剤および分子と接触させることを含む（上掲の項目5.2を参照のこと）。

【0146】

ある特定の実施形態では、本開示は、有効量の本開示の幹細胞由来前駆体の集団または前記前駆体を単位剤形で含む組成物を含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、幹細胞由来の細胞は、成熟分化細胞、例えば中脳DAニューロンである。ある特定の実施形態では、キットは、治療用組成物を含有する滅菌容器を含み、このような容器は、箱、アンプル、瓶、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、ブリスターパック、または当技術分野で公知の他の適切な容器形態であってよい。このような容器は、プラスチック、ガラス、積層した紙、金属箔、または医薬を保持するために適切な他の材料から作製されうる。

10

【0147】

ある特定の実施形態では、キットは、本開示の幹細胞由来前駆体またはそれを含む組成物の集団を、神経変性障害を患っている被験体に投与するための指示を含む。指示は、神経変性障害を処置または予防するための細胞または組成物の使用についての情報を含むことができる。ある特定の実施形態では、指示は、以下のもののうちの少なくとも1つを含む：治療剤についての記載、投薬スケジュールおよび神経変性障害もしくはその症状を処置もしくは予防するための投与、注意事項、警告、適応症、禁忌（*counter-indication*）、過量投薬情報、有害反応、動物薬理学、臨床試験、および／または参照文献。指示は、容器（存在する場合）に直接、または容器に貼られたラベルとして、または容器の中もしくは容器と一緒に供給される別のシート、パンフレット、カード、もしくはフォルダーとして印刷されうる。

20

【実施例】

【0148】

6. 実施例

本開示の主題は、限定としてではなく、本開示の主題の例として提供される以下の実施例を参照してより理解される。

【0149】

6.1 実施例1：幹細胞由来中脳ドーパミン（DA）前駆細胞を調製する方法

30

【0150】

概要

ヒト胚性幹細胞（hESC）は、潜在的に、身体の任意の細胞型を生じることができる。長期的な目的は、*in vitro*で完全なヒトの系統樹を再現するためのストラテジーの開発である。本実施例は、hESCを中脳ドーパミンニューロン前駆体細胞に分化させるストラテジーについて記載し、ここで細胞は、SB431542（TGFβ／アクチビン-Nodalシグナル伝達阻害剤）、LDN193189（BMP／SMADシグナル伝達阻害剤）、ソニックヘッジホッグ（SHH）、およびCHIR99021（ウィングレス（Wnt）シグナル伝達を増大させるGSK3β阻害剤）を補充したneurobasal（NB）／N2培地（任意選択でE6培地を含むことができる）中で分化され、CHIR99021の濃度は、細胞を、成長因子と一緒に4または5日間最初に培養した後に増加させる（「bump」）。細胞を、濃度を増加させたCHIR99021と一緒に、7または8日間培養した。次いで、細胞を、DAニューロン成長因子である脳由来神経栄養因子（BDNF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、サイクリックアデノシン一リン酸（cAMP）、形質転換成長因子ベータ3（TGFβ3）、アスコルビン酸（AA）、およびDAPTと一緒に培養して、中脳DA前駆体を生成した。

40

【0151】

方法

hESCを、分化の前に、E8／マトリゲル培地中で維持した。細胞を、以下の培養ス

50

トラテジーに従って、成長因子を補充したNB／N2培地中で分化させた（細胞は、4日目の3 μ Mのbumpかまたは5日目の7.5 μ Mのbumpのいずれかを用いて培養した）。

【0152】

3 μ M bumpのプロトコル（GMP V2A）

－ 0日目（D0）：hESCを、E8／マトリゲル培地から以下の分化因子を補充したneurobasal（NB）／N2培地を含む分化培地に移した（D0培地は、細胞の生存を増強するために、10 μ MのY-27632 ROCK（Rho関連コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ）阻害剤も含んでいた）。細胞は、1 mL当たり約2百万個の細胞の濃度であった：

- ・ 250 nMのLDN193189
- ・ 10 μ MのSB431542
- ・ 500 ng/mLのSHH
- ・ 0.7 μ MのCHIR99021

【0153】

－ D1：分化培地を、Y-27632を含まない新鮮な分化培地と交換した。

【0154】

－ D2：培地の交換なし。

【0155】

－ D3：D1に記載されたように交換した培地。

【0156】

－ D4：分化培地を、3 μ MのCHIR99021を含む（Y-27632を含まない）新鮮な分化培地と交換した。

【0157】

－ D5：培地の交換なし。

【0158】

－ D6：D4に記載されたように交換した培地。

【0159】

－ D7：分化培地を、3 μ MのCHIR99021を補充したNB／N2を含む（LDN193189、SB431542、SHHまたはY-27632は含まない）新鮮な培地と交換した。

【0160】

－ D8：培地の交換なし。

【0161】

－ D9：D7に記載されたように交換した培地。

【0162】

－ D10：培地を、3 μ MのCHIR99021、BDNF、GDNF、cAMP、TGF β 3、およびAAを含む新鮮なNB／B27培地と交換した。

【0163】

－ D11：D10に記載されたように交換した培地。

【0164】

－ D12：培地は、DAPTをさらに含み、CHIR99021を含まないことを除いて、D10に記載されたように交換した培地。

【0165】

－ D13～D19：D12に記載されたように交換した培地。（培養期間は、D27またはそれを超えるまでであり、D17またはD18に少なくとも1回の継代を含みうる。）

【0166】

－ D20：細胞から培地を吸引し、細胞を洗浄してNB培地に懸濁させ、次いで平板培養した。

10

20

30

40

50

【0167】

－ 次いで、細胞を、早期中脳DAマーカーの組合せ：1) OTX2/EN/LMX1Aならびに2) PAX6/FOXA2/EN/およびNKX2.2もしくはNKX6.1、または後期中脳DAマーカーの組合せ：1) TH/EN/FOXA2および2) LMX1A/OTX2/NURR1の発現について試験した。

【0168】

－ 細胞を、凍結保存またはマウスへの移植に供した。

【0169】

－ マウスへの移植のために、細胞を150,000個/マイクロリットルの濃度でHBSS+HEPESに懸濁させ、ここで、5～6百万個の細胞を免疫不全マウスに移植した。

10

【0170】

7. 5 μ M bumpのプロトコル (GMP V2B)

－ 0日目(D0)：hESCを、E8/マトリゲル培地から以下の分化因子を補充したneurobasal (NB)/N2培地を含む分化培地に移した(D0培地は、細胞の生存を増強するために、10 μ MのY-27632 ROCK (Rho関連コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ) 阻害剤も含んでいた)。細胞は、1 mL当たり約2百万個の細胞の濃度であった：

- ・ 250 nMのLDN193189
- ・ 10 μ MのSB431542
- ・ 500 ng/mLのSHH
- ・ 0.7 μ MのCHIR99021

20

【0171】

－ D1：分化培地を、Y-27632を含まない新鮮な分化培地と交換した。

【0172】

－ D2：培地の交換なし。

【0173】

－ D3：D1に記載されたように交換した培地。

【0174】

－ D4：培地の交換なし。

30

【0175】

－ D5：分化培地を、7.5 μ MのCHIR99021を含む(Y-27632を含まない)新鮮な分化培地と交換した。

【0176】

－ D6：培地の交換なし。

【0177】

－ D7：分化培地を、7.5 μ MのCHIR99021を補充したNB/N2を含む(LDN193189、SB431542、SHHまたはY-27632は含まない)新鮮な培地と交換した。

【0178】

－ D8：培地の交換なし。

40

【0179】

－ D9：D7に記載されたように交換した培地。

【0180】

－ D10：培地を、3 μ MのCHIR99021、BDNF、GDNF、cAMP、TGF β 3、およびAAを含む新鮮なNB/B27培地と交換した。

【0181】

－ D11：D10に記載されたように交換した培地。

【0182】

－ D12：培地を、DAPTをさらに含み、CHIR99021を含まないことを除

50

いて、D 1 0 に記載されたように交換した培地。

【0 1 8 3】

— D 1 3 ～D 1 9 : D 1 2 に記載されたように交換した培地。(培養期間は、D 2 7 またはそれを超えるまでであり、D 1 7 またはD 1 8 に少なくとも1回の継代を含みうる。)

【0 1 8 4】

— D 2 0 : 細胞から培地を吸引し、細胞を洗浄してNB培地に懸濁させ、次いで平板培養した。

【0 1 8 5】

— 細胞を、早期中脳DAマーカーの組合せ: 1) OTX 2 / EN / LMX 1 Aならびに2) PAX 6 / FOXA 2 / EN/およびNKX 2. 2もしくはNKX 6. 1、または後期中脳DAマーカーの組合せ: 1) TH / EN / FOXA 2および2) LMX 1 A / OTX 2 / NURR 1の発現について試験した。

【0 1 8 6】

— 細胞を、凍結保存またはマウスへの移植に供した。

【0 1 8 7】

— マウスへの移植のために、細胞を150,000個/マイクロリットルの濃度でHBSS+HEPESに懸濁させ、ここで、5～6百万個の細胞を免疫不全マウスに移植した。

【0 1 8 8】

結果

K r i k s ら、Nature. 2011年11月6日; 480巻(7378号): 547～51頁には、SMAD二重阻害、SHH活性化、およびWnt活性化を含むKSR培地において細胞を培養することによって、中脳DA細胞へのhESCの分化についてのプロトコルが記載されている(以下に記載されているように「bump」を含まない)。しかしながら、KSR培地は規定されておらず、この分化プロトコルを使用して生成された細胞は、移植後にin vivoで不十分な役割しか果たさない。本実施例に従って分化させた細胞は、NB/N2培地においてSMAD二重阻害(SB431542およびLDN193189による)、SHH活性化およびWnt活性化を含む培養プロトコルを利用し、この培養プロトコルでは、Wntの濃度は、培養のD4またはD5において、0.7 μMのベースライン濃度から5～10 μMの間まで増加させる(すなわち、Wnt「bump」)。

【0 1 8 9】

図1に示すように、KSR培地(Non-GMP)において、またはE8/NB/N2培地(GMP V1)において、K r i k s らに記載されている方法に従ってhESCを分化させることにより、中脳DAニューロンが生成されたが、他の脳領域のニューロンも生成された。D4～D10において7.5 μM(または5～10 μM)のWnt bumpを利用する本実施例の方法によるE8/NB/N2培地で細胞を培養した場合、中脳DA細胞が特異的に生成された。

【0 1 9 0】

図2に示すように、KSR培地(Non-GMP)において、またはE8/NB/N2培地(GMP V1)において、K r i k s らに記載されている方法に従ってhESCを分化させることにより、同様のレベルのPAX6、TH、NURR1、FOXA2、およびLMX1Aを発現する細胞が、両者共に生成された。しかしながら、いずれかの培地を使用して生成された細胞は、げっ歯類に移植された場合に、不十分な生存しか示さなかった。

【0 1 9 1】

E8/NB/N2培地および3 μM(GMP V2A)または7.5 μM(GMP V2B)のWnt bumpを使用して、hESCを分化させた場合、細胞はまた、KSR(Non-GMP)またはE8/NB/N2(GMP V1)を使用するK r i k s らの

10

20

30

40

50

プロトコルと同様のレベルのPAX6、TH、NURR1、FOXA2、およびLMX1Aを発現した。しかしながら、GMP V2AまたはGMP V2Bプロトコルに従って分化させた細胞は、より高レベルの中脳DAマーカーEN-1を発現した(図3)。図4は、分化細胞を特定するために使用することができる他の中脳DAマーカーについて記載する。

【0192】

E8/NB/N2培地におけるKriksらのプロトコルを使用して分化させたhESCは、25日間の分化および損傷していない、免疫無防備状態のマウスへの移植後に、in vivoでHncam、FOXA2、およびTHを発現するDA細胞について良好な生存をもたらすことがあった。移植の4週間後に移植片を調査した。しかしながら、細胞は、PAX6についても陽性であり、神経前駆状態を示す、Hncam発現の密なパッチを示した(図5)。GMP V2A(3 μMのbump)またはGMP V2B(7.5 μMのbump)に従って培養したhESCは、in vitroで、レベルが増加したNURR1、LMX1A、EN-1、およびTHを発現するDA細胞を生成し(図6A)、PAX6を発現しなかった(図7)。さらに、損傷していない、免疫無防備状態のマウスの線条体に移植された、GMP V2B(7.5 μMのbump)プロトコルを使用して分化させた中脳DA細胞は、移植の3週間後に、線維伸長の増大とhNCAMおよびTHの発現を示し、Hncamパッチを有さなかった(図6B)。さらに、移植前に、細胞を凍結保存した場合、細胞は、前もって凍結保存しなかったマウスに移植した細胞の線維伸長と同様の線維伸長を示した(図8)。

【0193】

図9A~Bに示すように、GMP V2AまたはGMP V2Bプロトコルに従って調製した細胞は、CD142発現に基づいて成功裏に選別することができる。さらに、KS R培地においてKriksらに記載されている方法に従って培養し、CD142発現に基づいて選別された中脳DA細胞を、マウスおよび非ヒト霊長類に移植した。図10A~Bに示すように、これらの細胞は、マウス(移植後30日)および非ヒト霊長類(移植後1年)に移植した場合、短い期間生存し、多くのTH発現ニューロンを含有する。

【0194】

さらに、分化中脳DA細胞をポリシアリルトランスフェラーゼ処理(Neisseria meningitidisのポリシアリルトランスフェラーゼ(PST_{Nm}))することによりレベルの上昇したポリシアリル化は、凍結解凍サイクルの後、およびin vivoでのマウスへの移植後に安定であった。さらに、CD142細胞の選別は、ポリシアリルトランスフェラーゼ処理によって影響を受けなかった(図11A、BおよびD)。さらに、未処理の細胞は、マウスへの移植後に、in vivoで注目すべき伸長を有さない約10%のニューロンを有するが、ポリシアリルトランスフェラーゼ処理した細胞はいずれも、マウスの線条体におけるmDA細胞の移植の2週間後に100 μm未満の長さの軸索を有していなかった(図11C)。

【0195】

6. 2 実施例2：幹細胞由来中脳ドーパミン(DA)前駆細胞の調製方法

【0196】

概要

本実施例は、実施例1に記載されているGMP V2A分化プロトコルの改変バージョンを提供する。

【0197】

hESCを、分化前に、E8/マトリゲル培地で維持した。以下の培養ストラテジーによる成長因子を補充したNB/N2/B27培地において、細胞を分化させ、ここで細胞は、4日目に7.5 μMのbumpを用いて培養した。

【0198】

7.5 μM bumpのプロトコル(GMP V2Bの改変)

— 0日目(D0)：hESCを、E8/マトリゲル培地から以下の分化因子を補充し

10

20

30

40

50

た *neurobasal* (NB) / N2 / B27 培地を含む分化培地に移した (D0 培地は、細胞の生存を増強するために、 $10\ \mu\text{M}$ の Y-27632 ROCK (Rho 関連コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ) 阻害剤も含んでいた)。細胞は、1 L 当たり約 7 億 5 千万個の細胞の濃度であった：

- ・ $2\ \text{mM}$ の L-グルタミン
- ・ $250\ \text{nM}$ の LDN193189
- ・ $10.8\ \mu\text{M}$ の SB431542
- ・ $500\ \text{ng/mL}$ の SHH
- ・ $0.7\ \mu\text{M}$ の CHIR99021

【0199】

10

— D1：分化培地を、Y-27632 を含まない新鮮な分化培地と交換した。

【0200】

— D2：培地の交換なし。

【0201】

— D3：D1 に記載されたように交換した培地。

【0202】

— D4：分化培地を、 $7.5\ \mu\text{M}$ の CHIR99021 を含む (Y-27632 を含まない) 新鮮な分化培地と交換した。

【0203】

— D5：培地の交換なし。

20

【0204】

— D6：D4 に記載されたように交換した培地。

【0205】

— D7：分化培地を、 $2\ \text{mM}$ の L-グルタミンおよび $7.5\ \mu\text{M}$ の CHIR99021 を補充した NB / N2 / B27 を含む (LDN193189、SB431542、SHH または Y-27632 は含まない) 新鮮な培地と交換した。

【0206】

— D8：培地の交換なし。

【0207】

— D9：D7 に記載されたように交換した培地。

30

【0208】

— D10：培地を、 $2\ \text{mM}$ の L-グルタミン、 $3\ \mu\text{M}$ の CHIR99021、 $20\ \text{ng/mL}$ の BDNF、 $20\ \text{ng/mL}$ の GDNF、 $500\ \text{nM}$ の cAMP、 $1\ \text{ng/mL}$ の TGF β 3、および $200\ \text{nM}$ の AA を含む新鮮な NB / B27 培地と交換した。

【0209】

— D11：細胞の継代および 1 L 当たり 1.5 億個の細胞の濃度を達成するために、D10 に記載されたように交換した培地。

【0210】

— D12：培地が、 $10\ \mu\text{M}$ の DAPT をさらに含み、CHIR99021 を含まないことを除いて、D10 に記載されたように交換した培地。

40

【0211】

— D13 ~ D15：成熟培地。D12 に記載されたように交換した培地。

【0212】

— D16：細胞を回収し、NB 中で凍結保存した。

【0213】

方法

5.0 試薬および材料

5.1 Texwipe Sterile TechniSat Presaturated Wipers (Fisher、Cat 番号 19-003-239) または等価物

5.2 遠心チューブ (Fisher、Cat 番号 05-538-51 15 mL 用；

50

Fisher、Cat 番号 05-538-49 50 mL 用) または等価物

5.3 組織培養プレート (Fisher、Cat 番号 08-772-24 15 cm) または等価物

5.4 組織培養フラスコ (Fisher、Cat 番号 13-680-65 75 cm²; Fisher、Cat 番号 12-565-221 225 cm²) または等価物

5.5 滅菌ポリスチレン血清学ピペット (Fisher、Cat 番号 13-675-47 2 mL 用; Fisher、Cat 番号 13-678-11D 5 mL 用; Fisher、Cat 番号 13-678-11E 10 mL 用; Fisher、Cat 番号 13-678-11 25 mL 用; Fisher、Cat 番号 13-678-11F; Fisher、Cat 番号 13-675-73 100 mL 用) または等価物

5.6 滅菌吸引ピペット (Fisher、Cat 番号 13-678-20D) または等価物

5.7 zCellometer 計数スライド (Nexcelom、Cat 番号 CHT4-PD-100-003) または等価物

5.8 滅菌ピペットチップ (Fisher、Cat 番号 21-403-00 20 µL 用; Fisher、Cat 番号 21-403-01 200 µL 用; Fisher、Cat 番号 21-403-02 1000 µL 用) または等価物

5.9 凍結保存バイアル (Fisher、Cat 番号 12-565-164N) または等価物

5.10 CryoColor Code Cap Inserts (Fisher、Cat 番号 12-565-242 白色用; Fisher、Cat 番号 12-565-180 種々の色用) または等価物

5.11 セルストレーナー (Fisher、Cat 番号 08-771-1 40 µM 用) または等価物

5.12 AOP1 (Nexcelom、Cat 番号 CS2-0106-5 mL)

5.13 DMEM/F-12 (Life Technologies、Cat 番号 11320)

5.14 Accutase (登録商標) Cell Detachment Solution (Innovative Cell Technology、Cat 番号 AT104)

5.15 Geltrex (商標) LDEV-free reduced growth factor (Life Technologies、Cat 番号 A14132-01)

5.16 CTS (商標) (Cell Therapy Systems) 塩化カルシウムを含まず、塩化マグネシウムを含まない DPBS (Life Technologies、Cat 番号 A1285601)

5.17 B27 (ビタミンAを含まない) (Life Technologies、Cat 番号 12587-010)

5.18 N2 Supplement B (Stem Cell Technologies、Cat 番号 07156)

5.19 Neurobasal Medium (Life Technologies、Cat 番号 21103049)

5.20 50 mg/mL のゲンタマイシン [任意選択] (Life Technologies、Cat 番号 15750078) 5.21 500 µM の LDN 193189 (SSCRF-RP-011)

5.22 10.8 mM の SB431542 (SSCRF-RP-013)

5.23 100 µg/mL の Shh (SSCRF-RP-014)

5.24 15 mM の CHIR99021 (SSCRF-RP-004)

5.25 10 µg/mL の BDNF (SSCRF-RP-003)

5.26 10 mM の Y-27632 (SSCRF-RP-016)

10

20

30

40

50

5. 27 100mMのアスコルビン酸 (SSCRF-RP-002)
5. 28 10 μ g/mLのGDNF (SSCRF-RP-007)
5. 29 100mMのdbcAMP (SSCRF-RP-006)
5. 30 2 μ g/mLのTGF- β 3 (SSCRF-RP-015)
5. 31 10mMのDAPT (SSCRF-RP-005)
5. 32 4mMのHCl (SSCRF-RP-008)
5. 33 15mg/mLのポリ-L-オルニチン (SSCRF-RP-012)
5. 34 1mg/mLのヒトフィブロネクチン (SSCRF-RP-001)
5. 35 1mg/mLのCultrexマウスラミニンI (SSCRF-RP-010)
5. 36 Essential 8 (商標) 培地 (SSCRF-FR-002)
5. 37 200mMのL-グルタミン (SSCRF-RP-009)
- 【0214】
6. 0 機器
- 【0215】
6. 1 Gilsonの調整可能ピペッター (Pipetman-p1000、p200、p20、p10、p2) または等価物
6. 2 Integra Pipetteboy Pro Pipetaid Device または等価物
6. 3 Cellometer (登録商標) Vision System
6. 4 CO₂ インキュベーター (Nuair IR Autoflow CO₂ water-jacked incubator) または等価物
6. 5 Sorvall Legend XTR遠心分離器 (Thermo Scientific、Cat 番号75004520) または等価物
6. 6 CryoMed Controlled-Rate Freezer (Thermo Scientific、Cat 番号7450) または等価物
6. 7 倒立顕微鏡 (Olympus CK2) または等価物
6. 8 Biological Safety Cabinet (Baker SterileGARD Class II) または等価物
- 【0216】
7. 0 手順
- 【0217】
7. 1 分化開始前の日: Geltrex 解凍
7. 1. 1 6 $\times$ 5 mLの凍結Geltrex (商標) バイアルを、4 $^{\circ}$ Cで終夜または氷晶がなくなるまで解凍する。
- 【0218】
7. 2 0日目: hESCの供給およびGeltrexコーティング
7. 2. 1 すべてのWA09 hESC培養物に新鮮なE8培地を補給する。
7. 2. 2 48 $\times$ T75フラスコに、バッチ記録番号を番号を増番させて標識した。各タスクを後で順次実施する。
7. 2. 3 Geltrex (商標): DMEM/F12の1:30の混合物を作製する。
7. 2. 3. 1 870mLの冷却DMEM/F12を1Lの瓶に添加する。
7. 2. 3. 2 30mLのGeltrex (商標) を注意深く添加する。各Geltrex (商標) バイアルを、瓶からのDMEM/F12で1回洗浄し、生成物のほとんどを回収する。
7. 2. 3. 3 キャップをきつく締め、Geltrexと培地を逆さまにして混合することを一度行う。沈降を防止するために、使用の間に時折注意深く回転させる。
7. 2. 4 Geltrex (商標) コーティングをスタートした時間を記録する。
7. 2. 5 各T75容器を15mLのGeltrex (商標) で順次コーティング

する。

7. 2. 6 Geltrex（商標）インキュベーションが始まった時間を記録する。

7. 2. 7 フード中、室温で、2～3時間インキュベートする。

7. 2. 8 吸引をスタートする時間を記録する。

7. 2. 9 インキュベーションに続き、Geltrex（商標）を吸引し、15 mLのプレーンNeurobasalを添加する。細胞を平板培養する準備ができるまで、容器を室温に置く。

7. 2. 10 Geltrex（商標）を容器から除去した時間を記録する。

【0219】

10

7. 3 0日目：細胞の準備および誘導

【0220】

注記：7. 3は、生成の組ごとに2人の独立したオペレーターにより同時に実施することができる。2つの組は、同時に処理し、処理時間を低減させることができる。生成物は、均質性を確保するために播種前にプールされなければならない。

【0221】

注記：収量が必要量より多い場合、48個のフラスコのみを播種することができる。収量が48個未満のフラスコである場合、試行は中止される。

【0222】

7. 3. 1 開始前の、OCT4+QC（SSCRF-SOP-107）およびcDNA生成（SSCRF-SOP-109）のために使用するための、かつ収量を評価するためのAccutase（登録商標）の単一の容器。

20

7. 3. 1. 1 密度、コロニーのサイズおよび表面を覆うコロニーの分布に基づき、代表的なプレートを見つける。

7. 3. 1. 2 細胞から培地を吸引し、Accutase（登録商標）を添加する。

7. 3. 1. 2. 1 T225フラスコ当たり15 mL

7. 3. 1. 2. 2 15 cmの皿当たり10 mL

7. 3. 1. 3 細胞を37℃で20～30分間インキュベートする。

7. 3. 1. 4 10 mLのピペットを使用して、細胞を移動させて粉碎し、均質な懸濁物にする。

30

7. 3. 1. 5 50 mLのコニカルにピペットで移し、10 mLのE8培地を添加する（合計20 mL）。

7. 3. 1. 6 200×gで5分間室温で遠心分離する。

7. 3. 1. 7 培地を吸引し、5 mLのE8培地を添加する。

7. 3. 1. 8 細胞の計数を実施する（7. 3. 20を参照のこと）

7. 3. 1. 9 3×10^6 個の細胞のアリコートにSSCRF-SOP-109と標識した凍結保存チューブに入れる（QCのためのcDNA生成）。

7. 3. 1. 10 3×10^6 個の細胞のアリコートにSSCRF-SOP-107と標識した凍結保存チューブに入れる（OCT4測定）。

40

7. 3. 1. 11 QCチューブを別のオペレーターに提出し、QC実験室に持ち込む。

【0223】

7. 3. 2 2 mMのL-glut、250 nMのLDN193189、10.8 μMのSB431542、500 ng/mLのShh、0.7 μMのCHIRおよび10 μMのY-27632を含有する2.5 LのNB/N2/B27を調製する。

【0224】

7. 3. 3 インプットWA09番号（バッチ番号）および関連するデータをバッチ記録に記録する。

【0225】

50

7. 3. 4 12個の容器のバッチにおいて、順次、一つずつ作業する。

注記：これは、オペレーターごとに行う。

【0226】

7. 3. 5 吸引を開始する時間を記録する。

【0227】

7. 3. 6 WA09 hESCの12個の容器をインキュベーターから取り除き、細胞から培地を吸引し、Accutase（登録商標）を添加する。

7. 3. 6. 1 T225フラスコ当たり15mL

7. 3. 6. 2 15cmの皿当たり10mL

【0228】

7. 3. 7 細胞を37℃で20～30分間インキュベートする。

【0229】

7. 3. 8 バッチ記録に関して、Accutase（登録商標）インキュベーションのスタート時間を記録する。

【0230】

7. 3. 9 12 [T225] または6 [15cm] × 50mLのコニカルチューブの組み立てを開始する。

【0231】

7. 3. 10 バッチ記録に関して、Accutase（登録商標）インキュベーション終了時間を記録する。

【0232】

7. 3. 11 10mLのピペットを使用して、各容器の表面をAccutase（登録商標）で約5～10回洗浄して、細胞を移して、塊が見えなくなるまで粉碎する。

【0233】

7. 3. 12 Accutase（登録商標）中に解離した細胞を50mLのコニカルに移す。

【0234】

7. 3. 13 乾燥した容器の表面を新鮮なE8培地で洗浄し（Accutase（登録商標）と等しい体積を使用する）、残っている細胞を回収し、細胞-Accutase（登録商標）を有するコニカルに添加する。

注記：例えば、15mLのAccutase（登録商標）を有していたT225フラスコをコニカルに移す。次いで乾燥したフラスコを15mLのE8培地で洗浄し、回収した細胞-E8を、15mLのAccutase（登録商標）-細胞を含有するコニカルに添加する（合計30mL）。10mLのAccutase（登録商標）を含有する15cmの皿をコニカルに移し、次いで、10mLの新鮮なE8で洗浄する（合計20mL）。2つの15cmの皿を1つのコニカルにプールすることができる（合計40mL）。

注記：可能であれば、生きた試料を、記録保管の目的で凍結保存すべきでもある。生きた試料は、FreeSR-SおよびQC実験室における凍結保存プロトコル「USER1」を使用して、単一の細胞として凍結することができる。

【0235】

7. 3. 14 細胞を、5分間200×gで室温で遠心分離する。

【0236】

7. 3. 15 培地を吸引し、各ペレットを、新鮮なプレーンNeurobasalを含む10mLに穏やかに再懸濁させる。

【0237】

7. 3. 16 3つのチューブを新鮮な50mLのコニカルにプールする（バッチごとに合計2×50mLのコニカルを与える）。

【0238】

7. 3. 17 細胞を、5分間200×gで室温で遠心分離する。

【0239】

10

20

30

40

50

7. 3. 18 培地を吸引し、2 mMのL-glut、250 nMのLDN193189、10.8 μMのSB431542、500 ng/mLのShh、0.7 μMのCHIRおよび10 μMのY-27632を含有する合計5 mLのNB/N2/B27を使用して、穏やかに再懸濁させる。すべての容器が処理されるまで4℃に置く。

【0240】

7. 3. 19 すべての容器を処理したら、すべての細胞をプールし、200 mLに合わせる。

【0241】

7. 3. 20 プールした細胞を計数する：

7. 3. 20. 1 プレーンNeurobasalにおける細胞の既知の希釈液を作製する（成長因子を含まない）。 10

7. 3. 20. 2 20 uLの希釈細胞を20 uLのAOP Iと混合する。

7. 3. 20. 3 20 uLの細胞/AOP I混合物をCellometer（登録商標）スライドにロードする。

7. 3. 20. 4 スライドをスロットに挿入する。

7. 3. 20. 5 プログラムファイル「hES Cells AOP I」を選択する。

7. 3. 20. 6 以下のフォーマット「DA01 Lot#MMDDYY d0」を使用してファイル名を与える。

7. 3. 20. 7 希釈値を入力する。 20

7. 3. 20. 8 F1チャンネルを使用して、機械の右側のつまみを使用して細胞に焦点を当てる。

7. 3. 20. 9 焦点があったら、「Count」を押す。

【0242】

7. 3. 21 1 mL当たりの、目に見えるおよび目に見えない細胞の総数、細胞の総数、および生存率%を記録する。

【0243】

7. 3. 22 3×10^6 個の細胞のアリコートをMICR-CULT-SOP-1634と標識した凍結保存チューブに入れる（無菌）。 3×10^6 個の細胞のアリコートをPTOP-7020と標識した凍結保存チューブに入れる（マイコプラズマ）。提出前にそれぞれを1 mLに合わせ、処理のために別のオペレーターに送る。 30

【0244】

7. 3. 23 細胞濃度を1 L当たり7億5千万個の細胞に調整する（合計2 L必要）。

7. 3. 23. 1 7億5千万個の細胞を達成するために必要な体積を計算する。

7. 3. 23. 2 計算した体積を2 mMのL-glut、250 nMのLDN193189、10.8 μMのSB431542、500 ng/mLのShh、0.7 μMのCHIRおよび10 μMのY-27632を含有するNB/N2/B27の各1 L瓶から取り除く。

7. 3. 23. 3 7億5千万個の細胞を含有する計算した体積を各1 L瓶に添加する。 40

【0245】

7. 3. 24 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

【0246】

7. 3. 25 プレーンNeurobasal培地を、Geltrex（商標）でコーティングされたフラスコから吸引する。

【0247】

7. 3. 26 40 mLの細胞懸濁物を各T75に注意深く添加する。

注記：ピペティングの前に細胞を注意深く懸濁させることを確認する。

【0248】

7. 3. 27 フラスコを穏やかに揺すり、表面を細胞で均一にコーティングする。

注記：細胞分布は顕微鏡で検証することができる。

【0249】

7. 3. 28 フード中で攪乱することなく10～15分間静置する。

【0250】

7. 3. 29 フラスコを注意深くインキュベーターに移動させる。

【0251】

7. 3. 30 37℃で5%のCO₂と一緒に終夜インキュベートする。

【0252】

7. 4 1日目：供給（0.7 μMのCHIR）

10

7. 4. 1 制御点：BRで示されたフラスコの集密度をチェックする。培養は100%コンフルエントであるべきである。指定されたフラスコのコンフルエンスに留意すること。

7. 4. 2 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 4. 3 既存の培地を吸引し、2mMのL-glut、250nMのLDN193189および10.8 μMのSB431542、500ng/mLのSHHおよび0.7 μMのCHIR99021を含有するNB/N2/B27培地40mLを穏やかに添加する。

【0253】

7. 5 2日目：培地交換なし

20

【0254】

7. 6 3日目：供給（0.7 μMのCHIR）

7. 6. 1 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 6. 2 既存の培地を吸引し、2mMのL-glut、250nMのLDN193189および10.8 μMのSB431542、500ng/mLのSHHおよび0.7 μMのCHIR99021を含有するNB/N2/B27培地40mLを穏やかに添加する。

【0255】

7. 7 4日目：供給（7.5 μMのCHIR BUMP）

30

7. 7. 1 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 7. 2 既存の培地を吸引し、2mMのL-glut、250nMのLDN193189および10.8 μMのSB431542、500ng/mLのSHHおよび7.5 μMのCHIRを含有するNB/N2/B27培地40mLを穏やかに添加する。

【0256】

7. 8 5日目：培地交換なし

【0257】

7. 9 6日目：供給（7.5 μMのCHIR）

7. 9. 1 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 9. 2 既存の培地を吸引し、2mMのL-glut、250nMのLDN193189および10.8 μMのSB431542、500ng/mLのSHHおよび7.5 μMのCHIR99021を含有するNB/N2/B27培地40mLを穏やかに添加する。

40

【0258】

7. 10 7日目：LDN、SBおよびSHHの除去

7. 10. 1 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 10. 2 既存の培地を吸引し、2mMのL-glutおよび7.5 μMのCHIR99021を含有するNB/N2/B27培地40mLを穏やかに添加する。

【0259】

7. 11 8日目：培地交換なし

【0260】

50

7. 1 2 9日目：供給（7. 5 μ MのCHIR）およびPOコーティング

7. 1 2. 1 7. 5 μ MのCHIRを供給する：

7. 1 2. 1. 1 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 1 2. 1. 2 既存の培地を吸引し、2 mMのL-glutおよび7. 5 μ MのCHIR 99021を含有するNB/N2/B27培地40 mLを穏やかに添加する。

7. 1 2. 2 POコーティング

7. 1 2. 2. 1 各T75フラスコに、バッチ記録番号を番号を増番させて標識した。各タスクを順次実施する。

7. 1 2. 2. 2 48 $\times$ T75を、フラスコごとに、DPBS中の15 μ g/mLのポリ-L-オルニチン15 mLでコーティングする。

10

注記：必要量は720 mLであるが、過剰に800 mLを作製する。

7. 1 2. 2. 3 37℃で5%のCO₂と一緒に終夜インキュベートする。

【0261】

7. 1 3 10日目：供給（3 μ MのCHIR、DAPTなし）およびF/Lコーティング

7. 1 3. 1 3 μ MのCHIRをプレートに供給する。

7. 1 3. 1. 1 順次、各T75フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 1 3. 1. 2 既存の培地を吸引し、2 mMのL-glut、20 ng/mLのBDNF、200 nMのAA、20 ng/mLのGDNF、500 nMのcAMP、1 ng/mLのTGF β 3および3 μ MのCHIR 99021を含有するNB/B27培地40 mLを穏やかに添加する。

20

7. 1 3. 2 F/Lコーティング

7. 1 3. 2. 1 フラスコを4つのバッチで処理することができる。

7. 1 3. 2. 2 吸引し、次いで、15 mLのDPBSを添加する。

7. 1 3. 2. 3 穏やかに揺すって洗浄し、次いで、合計で3 $\times$ DPBS洗浄のために、もう2回繰り返す。

7. 1 3. 2. 4 吸引し、次いで、DPBS中2 μ g/mLのフィブロネクチン/ラミニン15 mLを添加する。

注記：必要量は720 mLであるが、過剰に800 mLを作製する。

7. 1 3. 2. 5 37℃で5%のCO₂と一緒に終夜インキュベートする。

30

【0262】

7. 1 4 11日目：継代

注記：7. 1 4は、生成の組ごとに2人の独立したオペレーターにより同時に実施することができる。2つの組は、同時にフラスコを処理し、処理時間を低減させることができる。生成物は、均質性を確保するために播種前にプールされなければならない。

注記：収量が必要量より多い場合、48個のフラスコのみを継代することができる。収量が合計1 $\times$ 10⁹個の細胞未満である場合、バッチは中止される場合がある。

【0263】

7. 1 4. 1 2 mMのL-glut、20 ng/mLのBDNF、200 nMのAA、20 ng/mLのGDNF、500 nMのcAMP、1 ng/mLのTGF β 3および3 μ MのCHIR 99021を含有するNB/B27培地2. 5 Lを調製する。

40

【0264】

7. 1 4. 2 12個の容器のバッチにおいて、順次、一つずつ作業する。

【0265】

7. 1 4. 3 フードからフラスコを注意深く取り除き、順次配列させ、吸引が開始する時を記録する。

【0266】

7. 1 4. 4 既存の培地を吸引し、T75ごとに、5 mLのAccutase（登録商標）を添加する。

【0267】

50

7. 14. 5 最後の Accutase（登録商標）の添加後に、インキュベーションのスタート時間を記録する。

【0268】

7. 14. 6 37℃で30～40分間インキュベートする。

【0269】

7. 14. 7 可能な限り十分に乾燥させるため、フィブロネクチン／ラミニンコーティングを吸引し、乾燥するまでフード下でフラスコを開けたままにする。

【0270】

7. 14. 8 順次、50 mLのコニカルを標識し、継代されているT75フラスコに一致させる。

10

【0271】

7. 14. 9 フード内で、滅菌技術を注意深く使用して、フラスコごとに、標識した50 mLのコニカルのうちの1つに40 μmのブルーセルストレーナーを据え付ける。

【0272】

7. 14. 10 インキュベーション時間が経過したら、インキュベーション停止時間を記録する。

【0273】

7. 14. 11 プレーンをインキュベーターから取り除く。

【0274】

7. 14. 12 10 mLのピペットを使用して、細胞を勢いよく約5～10回ピペッティングして、クラスターを破壊する。

20

【0275】

7. 14. 13 粉碎した細胞を、40 μmフィルターを通して注意深くピペットで取る。

【0276】

7. 14. 14 15 mLのプレーンNeurobasal培地を乾燥したフラスコに添加し、静置された細胞を回収する。

【0277】

7. 14. 15 回収した細胞を含有するNeurobasalを40 μmフィルターに添加する。

30

注記：このステップでは2つの容器を処理して、同じチューブ内に含めることができる。

【0278】

7. 14. 16 フィルターを注意深く取り除き、処分する。チューブに蓋をする。

【0279】

7. 14. 17 各T75フラスコについて処理を繰り返す。

【0280】

7. 14. 18 細胞を、5分間200×gで室温で遠心分離する。

【0281】

7. 14. 19 培地を吸引し、各ペレットを10 mLのプレーンNeurobasalに再懸濁させる。

40

【0282】

7. 14. 20 4つ以下のチューブからのペレットを合わせて、50 mLのコニカルチューブに入れる。

【0283】

7. 14. 21 細胞を、5分間200×gで室温で遠心分離する。

【0284】

7. 14. 22 培地を吸引し、2 mMのL-glut、20 ng/mLのBDNF、200 nMのAA、20 ng/mLのGDNF、500 nMのcAMP、1 ng/mLのTGFβ3および3 μMのCHIR99021を含有するNB/B27培地10 mLに

50

、各ペレットを再懸濁させる。

注記：さらに容器を処理する必要がある場合は、細胞を4℃で保存することができる。

【0285】

7.14.23 すべての容器を処理したら、すべての細胞をプールし、2 mMのL-glut、20 ng/mLのBDNF、200 nMのAA、20 ng/mLのGDNF、500 nMのcAMP、1 ng/mLのTGFβ3および3 μMのCHIR99021を含有するNB/B27培地を使用して、200 mLの最終体積に合わせる。

7.14.23.1 プレーンNeurobasal培地における細胞の既知の希釈液を作製する。 10

7.14.23.2 20 uLの希釈細胞を20 uLのAOP1と混合する。

7.14.23.3 20 uLの細胞/AOP1混合物をCellometer（登録商標）スライドにロードする。

7.14.23.4 スライドをCellometer（登録商標）に挿入する。

7.14.23.5 プログラムファイル「mDA Neurons AOP1」を選択する。

7.14.23.6 以下のフォーマット「DA01 Lot#MMDDYY d11」を使用してファイル名を与える。

7.14.23.7 希釈値を入力する。

7.14.23.8 F1チャンネルを使用して、機械の右側のつまみを使用して細胞に焦点を当てる。 20

7.14.23.9 焦点があったら、「Count」を押す。

【0286】

7.14.24 1 mL当たりの、目に見えるおよび目に見えない細胞の総数、細胞の総数、および生存率%を記録する。

【0287】

7.14.25 3×10^6 個の細胞のアリコートでSSCRF-SOP-109と標識した凍結保存チューブに入れる（QCのためのcDNA生成）。

【0288】

7.14.26 3×10^6 個の細胞のアリコートでPT-OP-7020と標識した凍結保存チューブに入れる（マイコプラズマ）。提出前に1 mLに合わせる。 30

【0289】

7.14.27 3×10^6 個の細胞のアリコートでMICR-CULT-SOP-1634と標識した凍結保存チューブに入れる（無菌）。提出前に1 mLに合わせる。

注記：可能であれば、試料を、記録保管のために生きた試料を凍結保存するために提出すべきでもある。生きた試料は、Stem-Cellbanker（登録商標）およびQC実験室における凍結保存プロトコル「USER1」を使用して、単一の細胞として凍結することができる。

【0290】

7.14.28 別のオペレーターに、すべてのQCチューブを、関連するSOPに従って処理するために送る。 40

【0291】

7.14.29 細胞濃度を1 L当たり15億個の細胞に調整する（合計2 L必要）。

7.14.29.1 15億個の細胞を達成するために必要な体積を計算する。

7.14.29.2 計算した体積を2 mMのL-glut、20 ng/mLのBDNF、200 nMのAA、20 ng/mLのGDNF、500 nMのcAMP、1 ng/mLのTGFβ3および3 μMのCHIR99021を含有するNB/B27培地の各1 L瓶から取り除く。

7.14.29.3 15億個の細胞を含有する計算した体積を各1 L瓶に添加す 50

る。

注記：細胞収量が 3×10^9 個未満であるが 1×10^9 個超である場合、細胞を 1 mL 当たり 1.5×10^6 個の細胞の最終濃度にするために必要な mL 数を計算し、可能な限り多くのフラスコに播種する。

【0292】

7. 14. 30 40 mL の細胞懸濁物を各 T75 に添加する（合計 60×10^6 個の細胞）。

注記：ピペッティングの前に細胞を注意深く懸濁させることを確認する。

【0293】

7. 14. 31 プレートを注意深く揺すり、均一な細胞懸濁物を確保する。

10

【0294】

7. 14. 32 プレートを室温で 10 分間インキュベートさせる。

【0295】

7. 14. 33 フラスコを注意深くインキュベーターに移動させる。

注記：均一なコーティングを確保するために、顕微鏡でフラスコを抜き打ち検査すること。

【0296】

7. 14. 34 プレートを、 37°C で 5 % の CO_2 で終夜インキュベートする。

【0297】

7. 15 供給 12 日目（CHIR 除去、DAPT 添加〔成熟培地〕）

20

7. 15. 1 制御点：フラスコのコンフルエンスを抜き打ち検査し、BR に記録する。培養物は 100 % コンフルエントであるべきである。指定されたフラスコのコンフルエンスに留意すること。

注記：継代の間に最大数のフラスコが達成されない場合には、成熟培地を次の日に使用してもよい。

7. 15. 2 順次、各 T75 フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 15. 3 既存の培地を吸引し、各 T75 フラスコに対し、2 mM の L-glut、 20 ng/mL の BDNF、 200 nM の AA、 20 ng/mL の GDNF、 500 nM の cAMP、 1 ng/mL の TGF β 3 および $10 \mu\text{M}$ の DAPT を含有する NB/B27 培地を穏やかに添加する。

30

【0298】

7. 16 13 日目（成熟培地）

7. 16. 1 順次、各 T75 フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 16. 2 既存の培地を吸引し、各 T75 フラスコに対し、2 mM の L-glut、 20 ng/mL の BDNF、 200 nM の AA、 20 ng/mL の GDNF、 500 nM の cAMP、 1 ng/mL の TGF β 3 および $10 \mu\text{M}$ の DAPT を含有する NB/B27 培地を穏やかに添加する。

【0299】

7. 17 14 日目（成熟培地）

7. 17. 1 順次、各 T75 フラスコを一度に一つずつ操作する。

40

7. 17. 2 既存の培地を吸引し、各 T75 フラスコに対し、2 mM の L-glut、 20 ng/mL の BDNF、 200 nM の AA、 20 ng/mL の GDNF、 500 nM の cAMP、 1 ng/mL の TGF β 3 および $10 \mu\text{M}$ の DAPT を含有する NB/B27 培地を穏やかに添加する。

【0300】

7. 18 15 日目（成熟培地）

7. 18. 1 順次、各 T75 フラスコを一度に一つずつ操作する。

7. 18. 2 既存の培地を吸引し、各 T75 フラスコに対し、2 mM の L-glut、 20 ng/mL の BDNF、 200 nM の AA、 20 ng/mL の GDNF、 500 nM の cAMP、 1 ng/mL の TGF β 3 および $10 \mu\text{M}$ の DAPT を含有する NB/B27 培地を穏やかに添加する。

50

B 2 7 培地を穏やかに添加する。

【0301】

7. 1 9 1 6 日目：細胞回収および凍結保存

注記：7. 1 4 は、生成の組ごとに2人の独立したオペレーターにより同時に実施することができる。2つの組は、同時にフラスコを処理し、処理時間を低減させることができる。生成物は、均質性を確保するために播種前にプールされなければならない。

【0302】

7. 1 9. 1 順次、すべての凍結保存チューブを標識し4℃で冷やす。

【0303】

7. 1 9. 2 順次、ロット番号とチューブの範囲で箱を標識する。

10

【0304】

7. 1 9. 3 吸引を開始する前の時間に留意すること。

【0305】

7. 1 9. 4 1 2 のバッチにおいて順次作業し、既存の培地をフラスコから吸引し、T 7 5 ごとに、A c c u t a s e（登録商標）5 m L を添加する。

【0306】

7. 1 9. 5 インキュベーションのスタート時間を記録する。

【0307】

7. 1 9. 6 3 7℃で30～40分間インキュベートする。

【0308】

20

7. 1 9. 7 フード内で、50 m L のコニカルに40 μ m のブルーセルストレーナーを据え付ける（2つのT 7 5 フラスコごとに1つのコニカル）。

【0309】

7. 1 9. 8 インキュベーション後に、フラスコをインキュベーターから取り除き、バッチ記録に時間を記録する。

【0310】

7. 1 9. 9 10 m L のピペットを使用して、クラスターがもはや見えなくなるまで約5～10回ピペッティングする。

【0311】

7. 1 9. 10 細胞懸濁物を40 μ M フィルターを通して注意深く移す。

30

【0312】

7. 1 9. 11 15 m L のN e u r o b a s a l 培地を乾燥したフラスコに添加し、細胞を回収する。

【0313】

7. 1 9. 12 回収した細胞を含むN e u r o b a s a l を同じ40 μ M フィルターを通して移す。

【0314】

7. 1 9. 13 各フラスコについて順次繰り返す。

【0315】

7. 1 9. 14 細胞を、5分間200×gで室温で遠心分離する。

40

【0316】

7. 1 9. 15 培地を吸引し、各ペレットを5 m L のN e u r o b a s a l 培地に再懸濁させる。

注記：すべての容器が処理されるまで、コニカルを4℃で保存する。

【0317】

7. 1 9. 16 すべての容器が処理されたら、全ての細胞をプールし、合計200 m L の体積に合わせる。

【0318】

7. 1 9. 17 細胞の計数を実施する：

7. 1 9. 17. 1 プレーンN e u r o b a s a l における細胞の既知の希釈液

50

を作製する。

7. 19. 17. 2 20 uLの希釈細胞を20 uLのAOP Iと混合する。

7. 19. 17. 3 20 uLの細胞/AOP I混合物をCellometer (登録商標) スライドにロードする。

7. 19. 17. 4 スライドをCellometer (登録商標) に挿入する。

7. 19. 17. 5 プログラムファイル「mDA Neurons AOP I」を選択する。

7. 19. 17. 6 以下のフォーマット「DA01 Lot #MMDDYY d16 cryo」を使用してファイル名を与える。

7. 19. 17. 7 希釈値を入力する。

7. 19. 17. 8 F1チャンネルを使用して、機械の右側のつまみを使用して細胞に焦点を当てる。

7. 19. 17. 9 焦点があったら、「Count」を押す。

【0319】

7. 19. 18 1 mL当たりの、目に見えるおよび目に見えない細胞の総数、細胞の総数、および生存率%を記録する。

【0320】

7. 19. 19 3×10^6 個の細胞のアリコートをSSCRF-SOP-109と標識した凍結保存チューブに入れる (QCのためのcDNA生成)。

【0321】

7. 19. 20 3×10^6 個の細胞のアリコートでPT-OP-7020と標識した凍結保存チューブに入れる (マイコプラズマ)。プレーンNeurobasalを用いて1 mLに体積を合わせる。

【0322】

7. 19. 21 3×10^6 個の細胞のアリコートでMICR-CULT-SOP-1634と標識した凍結保存チューブに入れる (無菌)。プレーンNeurobasalを用いて1 mLに体積を合わせる。

【0323】

7. 19. 22 別のオペレーターに、チューブを、関連するSOPに従って処理するために送る。

【0324】

7. 19. 23 残っている細胞をSOP-SSCRF-105に従って凍結保存する (16日目の最終生成物の凍結保存)。

【0325】

7. 19. 24 終了したら、冷凍庫から細胞を速やかに取り出し、予め標識した箱に入れ、輸送業者に荷積みする。

【0326】

7. 19. 25 箱を液体窒素に移す。

【0327】

7. 19. 26 バッチ記録に情報を記録する。

【0328】

16日目に凍結保存した細胞を解凍し、損傷ラットに移植した (NIHヌード、Taconic Biosciences, Inc.) (すなわち、パーキンソン症候群ラットモデル)。移植前、ならびに移植の1、2、3、4および5カ月後に、移植ラットと偽移植ラットにおけるアンフェタミン誘導回転行動について調査した。hNCAM、およびmDAマーカーTH (チロシンヒドロキシラーゼ) およびGIRK2 (Gタンパク質活性化内向き整流性カリウムチャンネル2) のin vivoでの発現を、移植の5カ月後に調査した。

【0329】

16日目に凍結保存した細胞を解凍し、非ヒト霊長類に移植した。移植した移植片から

10

20

30

40

50

の線維伸長と細胞形態を移植の6週間後に調査した。

【0330】

結果

図12に示すように、mDA前駆体の損傷ラットへの移植の4カ月後に、移植片を受けたラットは、偽処置ラットと比較して少ない、1分当たりの回転数を示した。移植の5カ月後には、移植した移植片の免疫細胞化学により、移植片が、mDA形態の典型的なTH染色を示し、TH陽性ニューロンは、GIRK2発現についても陽性であることが示された(図13)。

【0331】

非ヒト霊長類に移植されたmDA前駆体移植片の形態を、移植の6週間後に調査した。移植片は、移植片コアからの堅固な線維伸長を示し、典型的なmDA形態も示した(図14)。

10

【0332】

本開示の主題およびその利点について詳細に記載したが、添付の特許請求の範囲によって定義された発明の精神および範囲を逸脱せずに、種々の変化、置換および変更を本明細書において行うことができることを理解されたい。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載されている過程、機械、製造物、組成物、手段、方法およびステップの特定の実施形態に限定されることを意図するものではない。当業者が本開示の主題の開示から容易に理解するように、本明細書に記載されている対応する実施形態と実質的に同じ機能を実施し、または実質的に同じ結果を達成する既存のまたは後に開発される過程、機械、製造物、組成物、手段、方法またはステップを、本開示の主題に従って利用できる。したがって、添付の特許請求の範囲は、このような過程、機械、製造物、組成物、手段、方法、またはステップをその範囲内に含むことを意図する。

20

【0333】

その開示が、参照によりすべての目的のために全体として本明細書に組み込まれる特許、特許出願、刊行物、製品の記載およびプロトコルがこの出願を通して引用されている。

【図 4 - 2】

-FGF8 DATE UNK C01 D35	021714 SK EB D25	021814 SK EB D23	102313 MT ??? D25	JWS D50
28.03	20.00	28.60	33.36	20.60
22.43	23.86	23.76	22.94	20.95
28.07	28.32	27.78	27.01	24.92
24.23	26.12	24.88	23.89	22.74
25.06	22.81	28.29	26.02	25.99
25.03	23.31	24.70	25.89	24.21
27.61	25.50	26.42	28.06	29.19
28.24	33.06	29.51	27.55	36.00
40.24	36.00	36.00	38.47	36.00
32.27	34.58	35.05	33.86	30.81
32.41	29.00	27.57	28.48	31.37
21.28	22.09	23.77	24.18	20.64
30.47	31.94	30.69	31.13	27.66
28.91	29.27	30.91	29.66	27.02
27.44	27.09	23.79	23.86	28.07
25.93	25.01	25.51	24.94	28.75
24.92	23.21	24.71	24.02	26.91
28.57	21.96	23.43	24.88	25.76
22.57	22.79	21.22	20.43	25.86
28.22	28.63	31.93	31.40	28.90
23.46	22.53	22.37	23.65	22.85
21.29	20.97	20.25	20.89	20.89
22.43	22.83	22.28	22.51	22.15
24.27	24.38	20.99	21.23	27.01

FIG. 4 (続き)

【図 4 - 3】

遺伝子番号	012014 BD TESR D0	012014 BD フーダー D0	012014 BD EB D0	112213 MT EB D13	031914 BD EB D13	-FGF8 DATE UNK C01 D26	+FGF8 DATE UNK D38	+FGF8 DATE UNK D33
PITX3	34.14	32.16	35.25	28.92	31.87	30.95	28.95	29.47
NR4A2	28.87	28.73	29.94	25.13	27.42	20.57	22.87	22.10
CHRNA3	34.16	38.08	35.29	30.96	36.00	23.77	25.00	24.74
DDC	32.27	34.10	34.66	23.18	25.51	21.53	20.65	20.33
CCX	28.81	28.83	30.74	20.43	24.79	24.19	24.74	25.35
DRD2	29.10	29.96	30.36	24.30	29.04	24.17	26.20	25.82
DRH	29.85	30.16	30.41	25.37	26.96	28.26	29.87	29.36
ISL1	32.46	30.74	34.80	29.29	30.06	28.73	30.00	26.99
EN1	33.14	28.14	38.75	37.21	34.00	20.90	27.44	27.02
FOXG1	27.72	28.81	28.81	36.00	36.00	33.87	36.00	36.00
HXB2	29.77	28.75	36.36	30.16	28.89	35.92	31.08	32.35
DLX2	30.78	29.73	33.08	27.21	30.29	29.70	30.57	30.28
GATA3	32.61	31.39	33.53	28.54	30.35	32.29	36.00	29.60
PHOX2A	31.40	29.33	30.38	22.54	26.84	34.61	31.09	29.80
PHOX2B	33.29	35.96	34.38	29.30	32.30	33.27	31.18	28.36
PAN6	25.72	26.62	27.75	26.37	28.24	29.41	36.00	31.77
GAP	35.55	31.94	33.65	36.00	33.70	33.50	34.52	34.82
MAP2	24.51	26.64	24.67	20.56	21.66	19.47	19.20	19.95
SHH	33.70	33.70	38.81	22.68	22.70	25.04	25.54	26.39
ACTB	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50
GAPDH	16.94	16.92	17.05	14.68	17.94	17.32	17.92	17.38
HQC	33.98	35.40	37.56	31.37	36.00	35.43	36.00	32.85
RTG	21.04	21.06	22.16	21.14	21.10	22.27	18.57	22.11
PPC	20.64	19.18	21.43	17.27	20.77	18.35	17.85	17.96

FIG. 4 (続き)

【図 4 - 4】

-FGF8 DATE UNK C01 D35	021714 SK EB D25	021814 SK EB D23	102313 MT ??? D25	JWS D50
30.75	29.64	27.11	26.55	29.81
21.25	21.48	23.42	22.05	20.54
24.16	25.72	31.35	27.39	24.77
22.04	22.13	21.93	23.17	21.50
22.50	28.44	25.28	26.18	22.58
24.85	24.10	23.85	22.84	22.76
30.55	28.17	29.88	28.31	27.78
32.75	28.43	30.41	28.85	29.71
31.75	33.24	33.38	32.85	29.06
33.54	33.48	35.66	32.35	32.69
34.23	29.96	28.11	28.91	30.66
31.47	30.04	31.09	28.79	29.73
33.41	33.16	36.26	32.84	33.35
35.60	30.72	30.19	29.92	32.14
35.20	29.44	32.77	33.09	32.04
31.75	28.50	30.08	28.05	27.86
33.91	34.87	37.79	34.05	33.15
19.09	23.28	22.41	21.18	20.05
24.07	21.99	22.80	24.56	25.93
15.50	15.50	15.50	15.50	15.50
17.35	17.02	17.69	17.83	16.71
34.80	36.63	36.00	38.18	36.00
21.40	22.86	25.56	22.13	21.05
19.96	19.82	19.90	22.98	17.90

FIG. 4 (続き)

【図 5】

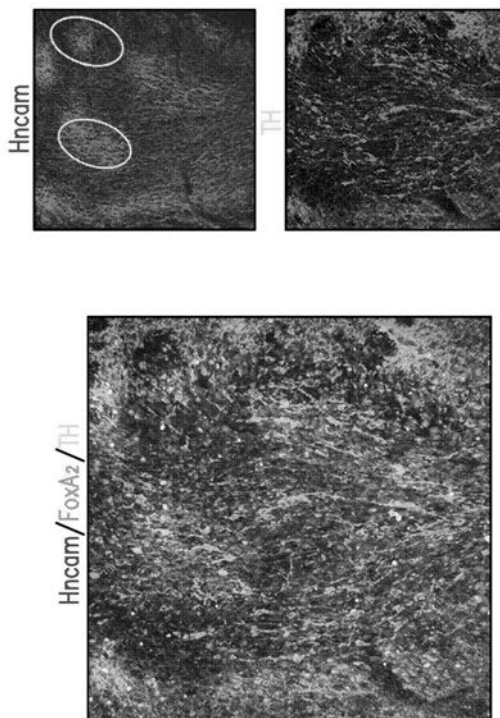
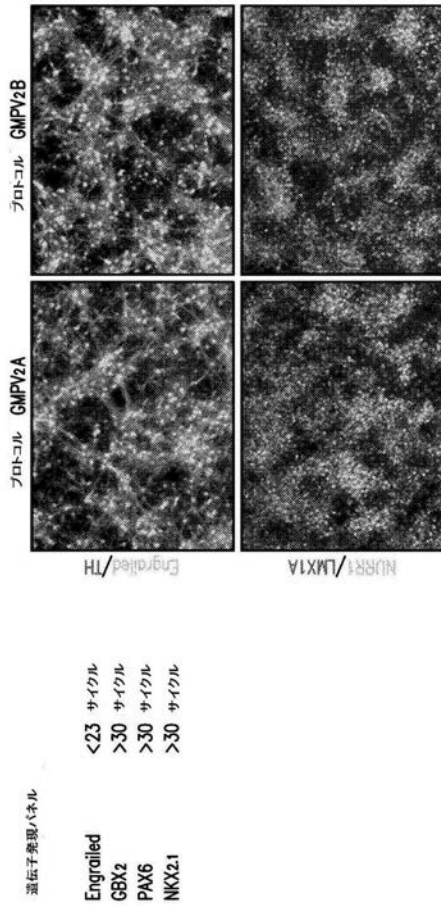


FIG. 5

【図 6 A】



【図 6 B】

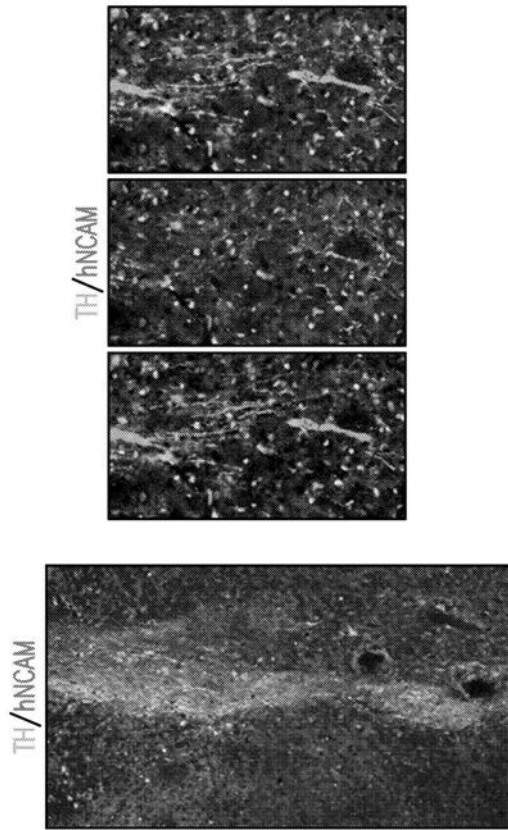
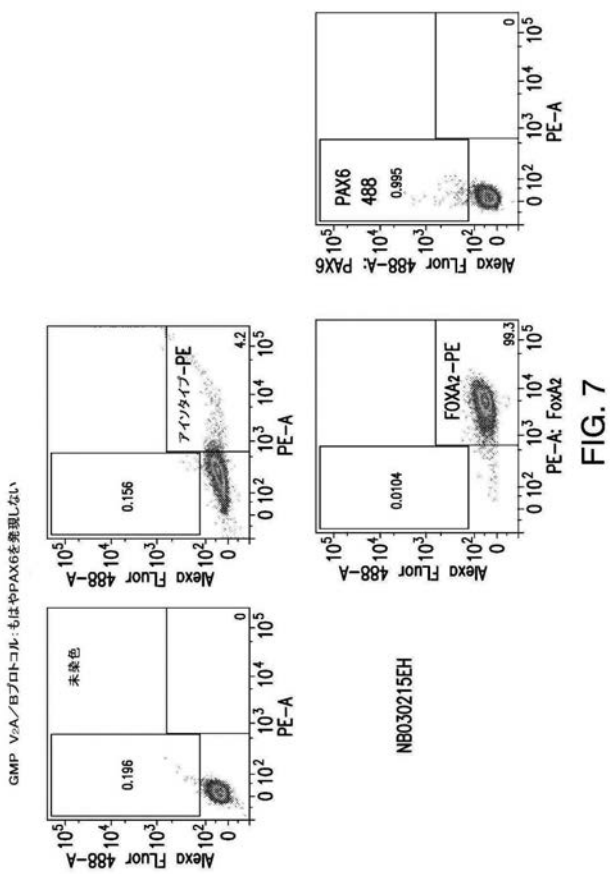


FIG. 6B

【 図 7 】



【 図 8 】

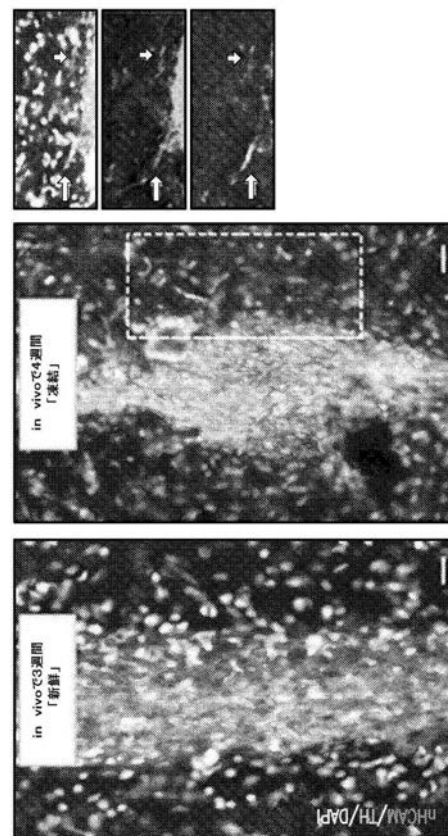


FIG. 8

【図 9 A】

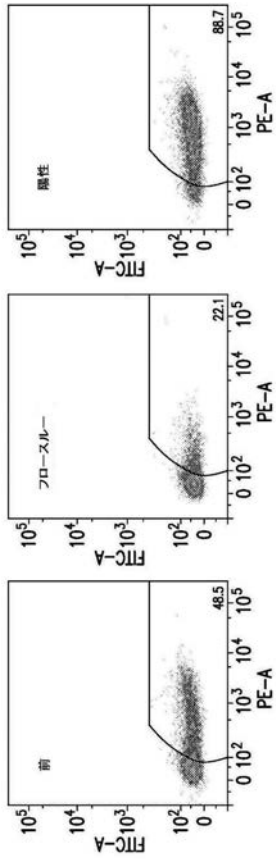


FIG. 9A

【図 9 B】

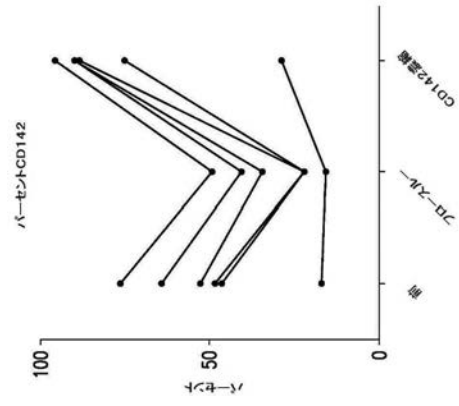


FIG. 9B

【図 10 A】

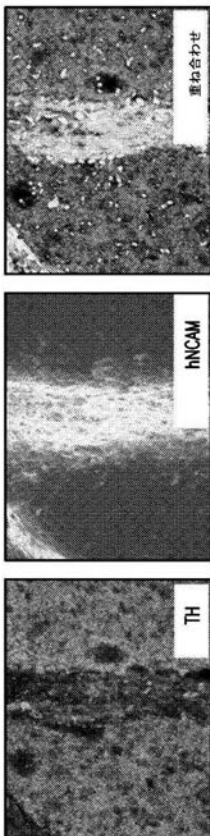


FIG. 10A

【図 10 B】

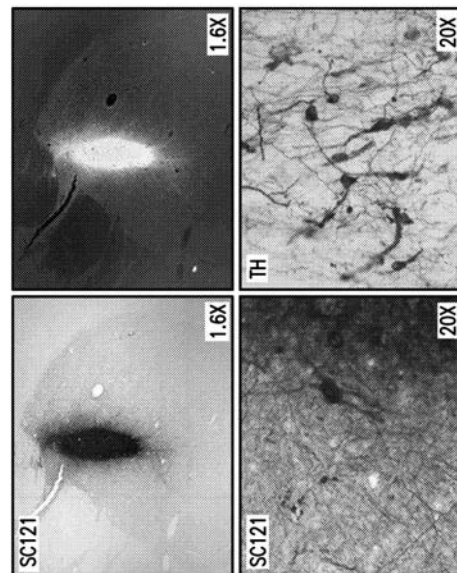


FIG. 10B

【図 1 1 - 1】

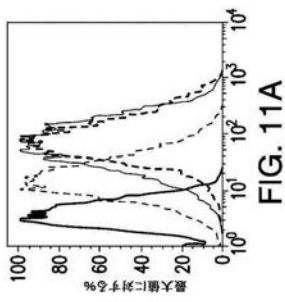


FIG. 11A

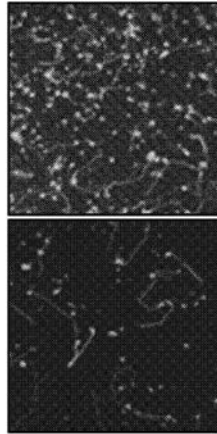


FIG. 11B

【図 1 1 - 2】

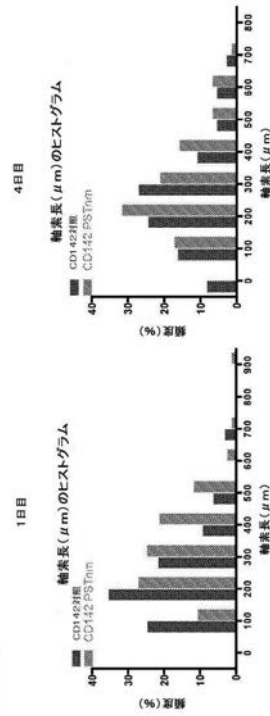


FIG. 11C

【図 1 1 - 3】

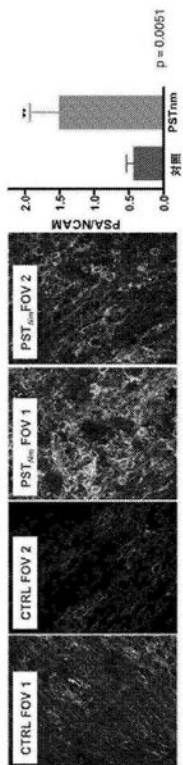


FIG. 11D

【図 1 2】

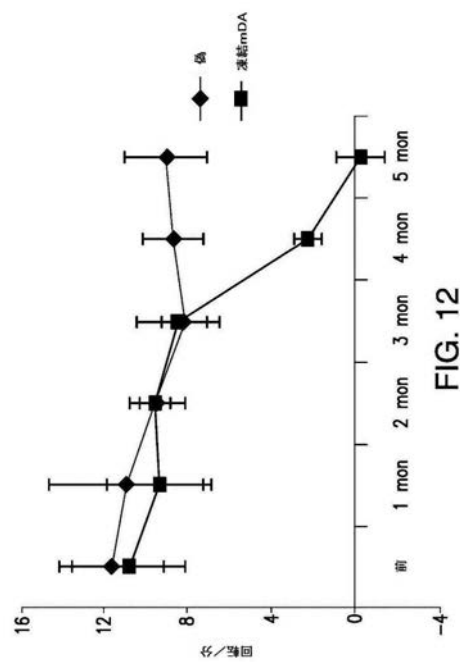


FIG. 12

【図 13】

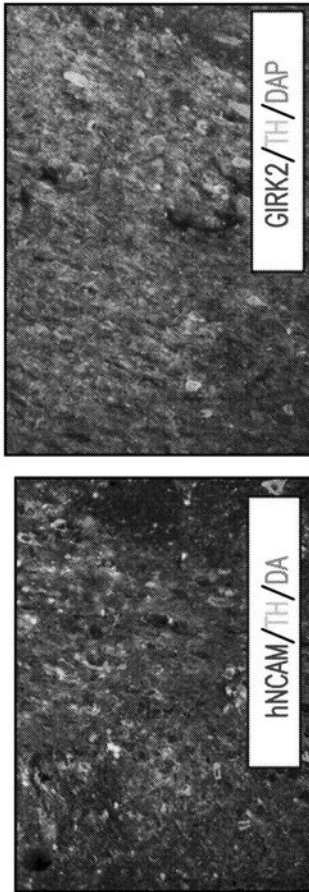


FIG. 13

【図 14】

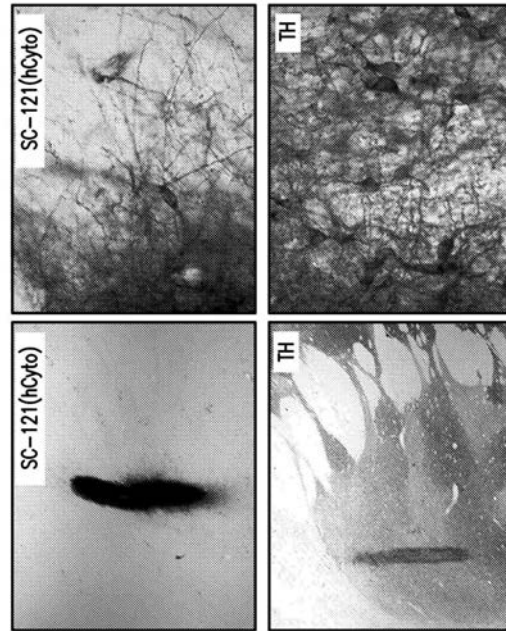


FIG. 14

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

(72)発明者 ステファン イリオン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2 3, ニューヨーク, ウェスト 7 0 ティーエイチ
ストリート 2 4

(72)発明者 マーク トミシマ
アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 9 2 8, チャタム, ウッドランド ロード 5 4

(72)発明者 ソニア カークス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 2, サンフランシスコ, マーケット ストリート
1 3 9 0, アpartment 1 6 2 5

F ターム(参考) 4B065 AA01Y AA93X AB01 AC14 AC20 BA01 BB40 CA24 CA44
4C087 AA01 AA02 AA03 BB45 BB57 BB64 BB65 CA04 MA21 MA65
MA66 NA14 ZA02 ZA16 ZC02

【外国語明細書】
2020146060000001.pdf