

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6419073号
(P6419073)

(45) 発行日 平成30年11月7日 (2018. 11. 7)

(24) 登録日 平成30年10月19日 (2018. 10. 19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/0793 (2010. 01)

C 1 2 N 5/0793

C 1 2 N 5/0797 (2010. 01)

C 1 2 N 5/0797

請求項の数 10 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2015-530994 (P2015-530994)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月6日 (2014. 8. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/071352
 (87) 国際公開番号 W02015/020234
 (87) 国際公開日 平成27年2月12日 (2015. 2. 12)
 審査請求日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-163062 (P2013-163062)
 (32) 優先日 平成25年8月6日 (2013. 8. 6)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000002934
 武田薬品工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100117743
 弁理士 村田 美由紀
 (74) 代理人 100163658
 弁理士 小池 順造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドパミン神経細胞の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

底板細胞を、以下の工程 (1) に付すことを特徴とする、ドパミン神経細胞の製造方法
 :

(1) (i) c A M P アナログおよび (i i) M E K 阻害剤を含む培地で培養する工程。

【請求項 2】

培地が、さらにアスコルビン酸またはその塩を含む培地である、請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】

培地が、さらにアクチビン受容体様キナーゼ - 4 , 7 の活性化剤を含む培地である、請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

【請求項 4】

c A M P アナログがジブチリル c A M P である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 5】

M E K 阻害剤が

(i) N - [(2 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニル) アミノ] ベンズアミド、

(i i) 2 - (2 - クロロ - 4 - ヨードフェニルアミノ) - N - シクロプロピルメトキシ - 3 , 4 - ジフルオロベンズアミド、または

10

20

(i i i) 2 - [(1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 3 H - インドール - 3 - イリデン)
メチル] - 4 - メチル - 1 H - ピロール - 3 - プロパン酸
である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 6】

アクチビン受容体様キナーゼ - 4 , 7 の活性化剤がアクチビンである、請求項 3 ~ 5 の
いずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 7】

c A M P アナログがジブチリル c A M P であり、
M E K 阻害剤が

(i) N - [(2 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 -
[(2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニル) アミノ] ベンズアミド、

10

(i i) 2 - (2 - クロロ - 4 - ヨードフェニルアミノ) - N - シクロプロピルメトキシ
- 3 , 4 - ジフルオロベンズアミド、または

(i i i) 2 - [(1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 3 H - インドール - 3 - イリデン)
メチル] - 4 - メチル - 1 H - ピロール - 3 - プロパン酸

であり、

アクチビン受容体様キナーゼ - 4 , 7 の活性化剤がアクチビンである、請求項 3 記載の製
造方法。

【請求項 8】

(i) c A M P アナログおよび (i i) M E K 阻害剤を含む、底板細胞からドパミン神
経細胞を製造するための試薬。

20

【請求項 9】

(i) c A M P アナログおよび (i i) M E K 阻害剤を含む、底板細胞からドパミン神
経細胞を製造するためのキット。

【請求項 10】

底板細胞からドパミン神経細胞を製造するための (i) c A M P アナログおよび (i i)
M E K 阻害剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、ドパミン神経細胞の製造方法に関する。さらに本発明は、該方法により得ら
れたドパミン神経細胞を含む医薬、ならびに該方法に使用するための試薬およびキットも
提供する。

【背景技術】

【0002】

ドパミン (d o p a m i n e ; 3 , 4 - ジヒドロキシフェニルエチルアミン) は、多様
な作用を持つ生体内分子であり、主に中枢神経系における神経伝達物質として機能する。
生体内では、ドパミンはアミノ酸チロシンを起点としてチロシン水酸化酵素およびドーパ
脱炭酸酵素の二つの酵素の働きにより細胞内で生合成される。

【0003】

40

ドパミン神経細胞は、神経伝達物質としてドパミンを合成し、放出する神経細胞であり
、脳内では主に中脳に存在し、一部は視床下部に存在する。中脳に存在するドパミン神経
細胞は、運動や情動の制御において重要な役割を果たしており、中脳ドパミン神経細胞が
変性・脱落すると、例えばパーキンソン病などの重篤な神経変性疾患が引き起こされ得る
。このような神経変性疾患を治療するために最も期待されている治療的アプローチの一つ
が、ドパミン神経細胞を対象に移植する細胞移植療法である。

【0004】

現在、ドパミン神経細胞を得る方法として、胚性幹細胞 (本明細書中、E S 細胞と称す
ることがある) や人工多能性幹細胞 (本明細書中、i P S 細胞と称することがある) など
の幹細胞を神経外胚葉に分化させた後、さらにドパミン神経細胞へと分化誘導する方法が

50

知られている。

最近、底板細胞 (floor plate cells) から中脳のドパミン神経細胞が産生されることが報告された。また、中脳ドパミン神経細胞を得るために2種類のSMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) シグナリング阻害剤を用いて幹細胞を底板細胞に分化させる方法 (特許文献1、非特許文献1) や、ヒト幹細胞から底板細胞を誘導し、さらに神経栄養因子とともに底板細胞を培養することにより中脳ドパミン神経細胞を誘導する方法 (特許文献2、非特許文献2～4)、ヒトES細胞にGSK3 beta阻害剤およびアクチビン / Nodal阻害剤を作用させることにより効率的に底板細胞を誘導する方法 (非特許文献5) が相次いで報告されている。

10

【0005】

しかし、これらの方法によって得られるドパミン神経細胞の産生効率は依然として低く、また、当該細胞は酸化ストレスや薬剤刺激への応答性をインビトロで再現できないなど機能的にも十分でない。従って、高品質のドパミン神経細胞を効率的に得る方法の開発が依然として求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2012/0094381号明細書

【特許文献2】国際公開第2013/067362号パンフレット

20

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Fasano et al., Cell Stem Cell 6 (2010) 336 - 347

【非特許文献2】Kriks et al., Nature 480 (2011) 547 - 553

【非特許文献3】Kirkeby et al., Cell Reports 1 (2012) 703 - 714

【非特許文献4】Xi et al., Stem Cells 30 (2012) 1655 - 1663

30

【非特許文献5】Denham et al., Stem Cells 30 (2012) 2400 - 2411

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、高品質なドパミン神経細胞をより効率的に製造する方法を提供することである。さらに本発明は、該方法により得られたドパミン神経細胞を含む医薬、ならびに該方法に使用するための試薬およびキットの提供も目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

40

本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討した結果、神経前駆細胞を (i) cAMPアナログおよび (ii) MEK阻害剤を含む培地で培養することにより、高密度に、再現性良くドパミン神経細胞を製造できることを見出した。さらに、得られたドパミン神経細胞が、生体内のドパミン神経細胞と同様の表現形質および機能を有するなど、高品質なドパミン神経細胞であることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0010】

即ち、本発明は、以下を提供する。

[1] 底板細胞を、以下の工程 (1) に付すことを特徴とする、ドパミン神経細胞の製造方法：

(1) (i) cAMPアナログおよび (ii) MEK阻害剤を含む培地で培養する工程；

50

[2] 培地が、さらにアスコルビン酸またはその塩を含む培地である、上記 [1] 記載の製造方法；

[3] 培地が、さらにアクチビン受容体様キナーゼ - 4 , 7 の活性化剤を含む培地である、[2] 記載の製造方法；

[4] c A M P アナログがジブチリル c A M P である、[1] 記載の製造方法。

[5] M E K 阻害剤が

(i) N - [(2 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニル) アミノ] ベンズアミド (P D 0 3 2 5 9 0 1) 、

(i i) 2 - (2 - クロロ - 4 - ヨードフェニルアミノ) - N - シクロプロピルメトキシ - 3 , 4 - ジフルオロベンズアミド (P D 1 8 4 3 5 2) 、または

(i i i) 2 - [(1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 3 H - インドール - 3 - イリデン) メチル] - 4 - メチル - 1 H - ピロール - 3 - プロパン酸 (S U 5 4 0 2)

である、[1] 記載の製造方法；

[6] アクチビン受容体様キナーゼ - 4 , 7 の活性化剤がアクチビンである、[3] 記載の製造方法；

[7] c A M P アナログがジブチリル c A M P であり、M E K 阻害剤が

(i) N - [(2 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニル) アミノ] ベンズアミド (P D 0 3 2 5 9 0 1) 、

(i i) 2 - (2 - クロロ - 4 - ヨードフェニルアミノ) - N - シクロプロピルメトキシ - 3 , 4 - ジフルオロベンズアミド (P D 1 8 4 3 5 2) 、または

(i i i) 2 - [(1 , 2 - ジヒドロ - 2 - オキソ - 3 H - インドール - 3 - イリデン) メチル] - 4 - メチル - 1 H - ピロール - 3 - プロパン酸 (S U 5 4 0 2)

であり、

アクチビン受容体様キナーゼ - 4 , 7 の活性化剤がアクチビンである、[3] 記載の製造方法；

[8] [1] 記載の製造方法で得られたドパミン神経細胞を含む、医薬；

[9] (i) c A M P アナログおよび (i i) M E K 阻害剤を含む、底板細胞からドパミン神経細胞を製造するための試薬；

[1 0] (i) c A M P アナログおよび (i i) M E K 阻害剤を含む、底板細胞からドパミン神経細胞を製造するためのキット；

[1 1] 底板細胞からドパミン神経細胞を製造するための (i) c A M P アナログおよび (i i) M E K 阻害剤の使用。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、神経前駆細胞から高品質のドパミン神経細胞をより効率的に製造することができる。本発明により製造されたドパミン神経細胞は、従来の方法により製造されたドパミン神経細胞では観察されなかった酸化ストレスや薬剤刺激への応答性が観察されるなど、生体内のドパミン神経細胞と同様の表現形質及び機能を有する。従って、本発明により製造されたドパミン神経細胞は、ドパミンの産生（放出）の低下に起因する疾患、例えばパーキンソン病などの神経変性疾患を治療するための細胞移植療法において、高い生着率を達成でき、極めて有用であるだけでなく、当該疾患の予防および／または治療に有用な化合物のスクリーニング、化合物の毒性評価、創薬ターゲットの検証、疾患メカニズムの解析など様々な用途に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

図 1 は分化誘導因子を様々な組み合わせで添加した N e u r o / B 2 7 を用いて底板細胞を誘導し、培養 1 3 日目に底板細胞マーカーの発現変動を定量 R T - P C R で調べた結

10

20

30

40

50

果を示す。〔 - 〕は各分化誘導因子を添加しない場合、〔 A 1 1 〕は L D N 1 9 3 1 8 9 (L D N)、S B 4 3 1 5 4 2 (S B)、S o n i c H e d g e h o g (S H H)、プルモルファミン (P u r) および C H I R 9 9 0 2 1 (C H I R) の 5 種類すべてを使用した条件を示す。〔 - 因子名 〕はそれぞれの因子を除いた条件を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用いた。Y 軸の値は各遺伝子のコピー数を G A P D H のコピー数で補正した値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 2 は底板細胞を誘導し、培養 1 3 日目に抗 F O X A 2 抗体および抗 L M X 1 A 抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した結果を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株を用いた。赤色は F O X A 2 陽性細胞の核、緑色は L M X 1 A 陽性細胞の核、青色 (D A P I 染色) は細胞核を示す。

10

図 3 は底板細胞を誘導後 1 3 日目から、アスコルビン酸 (A A)、ジブチリル c A M P (d b c A M P) および P D 0 3 2 5 9 0 1 (P D) を様々な組み合わせで添加して培養を行い、4 5 日目に N U R R 1 の発現変動を定量 R T - P C R で調べた結果を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用いた。Y 軸の値は各遺伝子のコピー数を G A P D H のコピー数で補正した値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 4 は図 3 と同様に分化誘導を行い、培養 4 5 日目に抗 T H 抗体および抗 N U R R 1 抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した結果を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用いた。緑色は T H 陽性細胞の細胞体を、赤色は N U R R 1 陽性細胞の核を示す。

図 5 は底板細胞を誘導後 1 3 日目から、アスコルビン酸 (A A)、ジブチリル c A M P (d b c A M P) および P D 0 3 2 5 9 0 1 (P D) を添加して培養を行い、4 5 日目 (2 5 3 G 1 株) または 5 2 日目 (2 0 1 B 7 株) に抗 T H 抗体、抗 N U R R 1 抗体および抗 F O X A 2 抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した結果を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用いた。緑色は T H 陽性細胞の細胞体を、赤色は N U R R 1 陽性細胞の核を、マゼンタ色は F O X A 2 陽性細胞の核を、青色 (D A P I 染色) は細胞核を示す。

20

図 6 は図 5 の 2 5 3 G 1 株を用いて得られた結果について高倍率で観察した図を示す。緑色は T H 陽性細胞の細胞体を、赤色は N U R R 1 陽性細胞の核を、青色 (D A P I 染色) は細胞核を示す。

図 7 は図 5 と同様に分化誘導を行い、培養 5 0 日目に高 K C l 刺激によるドパミンの放出能を評価した結果を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用い、独立した 2 つの実験結果を示す。C t r l は H B S S で、K C l は 5 5 m M K C l を含む H B S S で刺激した条件を示す。また、Y 軸の値はコントロール群のドパミン放出量を 1 としたときの相対値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

30

図 8 は底板細胞を誘導後 1 3 日目から、アスコルビン酸 (A A) およびジブチリル c A M P (d b c A M P) に加え、各種 M E K 阻害剤 (F G F R 阻害剤を含む) を添加して培養を行い、4 5 日目に N U R R 1 の発現変動を定量 R T - P C R で調べた結果を示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用いた。Y 軸の値は各遺伝子のコピー数を G A P D H のコピー数で補正した値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 9 はヒト i P S 細胞からの底板細胞およびドパミン神経細胞への分化誘導法の模式図を示す。

図 1 0 は図 9 の方法に従って分化誘導を行った際の、各種分化マーカーの経時的な発現変動を定量 R T - P C R で調べた結果を示す。〔 A 1 1 〕は図 9 に従って行い、〔 - 〕は C H I R 9 9 0 2 1、L D N 1 9 3 1 8 9、S B 4 3 1 5 4 2、S H H およびプルモルファミンを除いて、〔 - S H H 〕は S H H のみを除いて、〔 - P u r 〕はプルモルファミンのみを除いて分化誘導を行ったことを示す。細胞株は 2 5 3 G 1 株と 2 0 1 B 7 株を用いた。Y 軸の値は各遺伝子のコピー数を G A P D H のコピー数で補正した値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

40

図 1 1 は図 9 で示した工程 3 において、アスコルビン酸 (A A)、ジブチリル c A M P (d b c A M P)、P D 0 3 2 5 9 0 1 (P D) およびアクチビン A (A c t) を様々な組み合わせで添加して分化誘導を行い、培養 2 6 日目にドパミン神経細胞マーカーの発現変動を定量 R T - P C R で調べた結果を示す。〔 - 〕は各分化誘導因子を添加しない場合

50

を示す。細胞株は253G1株と201B7株を用いた。Y軸の値は各遺伝子のコピー数をGAPDHのコピー数で補正した値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図12は図11と同様に分化誘導を行い、培養26日目に抗TH抗体および抗NURR1抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した結果を示す。細胞株は253G1株と201B7株を用いた。緑色はTH陽性細胞の細胞体を、赤色はNURR1陽性細胞の核を示す。

図13は図9で示した工程3において、アスコルビン酸(AA)、ジブチリルcAMP(dbcAMP)、PD0325901(PD)およびアクチビンA(AC T)を添加して分化誘導を行い、培養26日目に細胞を凍結保存した。この細胞を解凍し、AA、dbcAMP、PDおよびAC Tを様々な組み合わせで添加して2週間培養した後、ドパミン神経マーカーの発現変動を定量RT-PCRで調べた結果を示す。〔-〕は各分化誘導因子を添加しない場合を示す。細胞株は253G1株と201B7株を用いた。Y軸の値は各遺伝子のコピー数をGAPDHのコピー数で補正した値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

10

図14は図13と同様に凍結保存した細胞を解凍し、AA、dbcAMP、PDおよびAC Tを添加して2週間培養した後、抗TH抗体および抗NURR1抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した結果を示す。緑色はTH陽性細胞の細胞体を、赤色はNURR1陽性細胞の核を示す。青色(DAPI染色)は細胞核を示す。

図15は図9で示した工程3において、アスコルビン酸、dbcAMP、PD0325901(Control群;左側4枚のパネル)またはアスコルビン酸、dbcAMP、PD0325901およびアクチビンA(ActivinA群;右側4枚のパネル)を添加して分化誘導を行い、培養26日目に細胞を回収してマウス線条体に移植した。移植4週後、組織染色を実施した結果を示す。緑色はTH陽性細胞の細胞体を、赤色はhNuc陽性細胞の核を示す。青色(DAPI染色)は細胞核を示す。

20

図16は図15と同様に移植を行い、移植8週後に組織染色を実施した結果を示す。緑色はTH陽性細胞の細胞体を、赤色はhNuc陽性細胞の核を示す。青色(DAPI染色)は細胞核を示す。

図17は図15と同様に移植を行い、移植12週後に組織染色を実施した結果を示す。緑色はTH陽性細胞の細胞体を、赤色はhNuc陽性細胞の核を示す。青色(DAPI染色)は細胞核を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【0013】

以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味を有する。

【0014】

本明細書において、「ドパミン神経細胞」とは、ドパミン(dopamine;3,4-ジヒドロキシフェニルエチルアミン)を産生する能力を有する神経細胞を意味する。ドパミン神経細胞は常にドパミンを産生している必要はなく、ドパミン産生能力を有していればよい。また、産生されるドパミン量は特に限定されない。

生体内に存在するドパミン神経細胞のなかでも特に黒質緻密部や腹側被蓋野などの中脳に存在するドパミン神経細胞は、インビトロでは、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、FOX A2(forkhead box A2)、NURR1(Nuclear Receptor-related 1)遺伝子/タンパク質などの特定の細胞マーカーの発現により特徴付けることができる。また、上記中脳に存在するドパミン神経細胞は、インビトロでは、TH、FOX A2、LMX1A(LIM homeobox transcription factor 1 alpha)、NURR1遺伝子/タンパク質などの特定の細胞マーカーの発現でも特徴付けることができる。

40

底板細胞を本発明の製造方法に供して得られる「ドパミン神経細胞」は、中脳に存在するドパミン神経細胞(すなわち、中脳ドパミン神経細胞)である。

【0015】

本明細書において、「神経前駆細胞」とは、分化後にドパミン神経細胞を生成すること

50

のできる細胞をいい、具体的には、例えば、底板細胞、中間体フィラメントタンパク質 Nestinなどの発現マーカーにより特徴付けられる神経外胚葉の細胞などが挙げられるが、最も好ましくは底板細胞である。

【0016】

本明細書において、「底板細胞」(floor plate cell)とは、脊髄から間脳にかけて、神経管の腹側正中に位置する形態的に特殊化したオーガナイザー細胞を意味する。底板細胞のなかでも特に腹側中脳に位置する底板細胞は、インビトロでは、FOX A2やLMX1A遺伝子/タンパク質などの特定の細胞マーカーの発現により特徴付けることができる。

【0017】

本明細書において、「幹細胞」とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ生体を構成する複数系列の細胞に分化しうる細胞をいう。具体的にはES細胞、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞(EG細胞: Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95: 13726-31)、精巣由来の多能性幹細胞(GS細胞: Nature, 2008, 456: 344-9)、体細胞由来人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS細胞)、ヒト多能性体性幹細胞(神経幹細胞)が挙げられ、好ましくは、iPS細胞およびES細胞、さらに好ましくはiPS細胞である。

【0018】

ES細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来するES細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。ES細胞の好ましい例としては、ヒトに由来するES細胞が挙げられる。

ES細胞の具体例として、着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物などのES細胞、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立したES細胞、およびこれらのES細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変したES細胞が挙げられる。

各ES細胞は当該分野で通常実施されている方法や、公知文献に従って調製することができる。

マウスのES細胞は、1981年にエバンスら(Evans et al., 1981, Nature 292: 154-6)や、マーチンら(Martin GR et al., 1981, Proc Natl Acad Sci 78: 7634-8)によって樹立されており、例えば大日本住友製薬株式会社(大阪、日本)などから購入可能である。

ヒトのES細胞は、1998年にトムソンら(Thomson et al., Science, 1998, 282: 1145-7)によって樹立されており、WiCell研究施設(WiCell Research Institute、ウェブサイト: <http://www.wicell.org/>、マジソン、ウイスコンシン州、米国)、米国国立衛生研究所(National Institute of Health)、京都大学などから入手可能であり、例えばCellartis社(ウェブサイト: <http://www.cellartis.com/>、スウェーデン)などから購入可能である。

【0019】

iPS細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来するiPS細胞を使用できる。該哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。iPS細胞の好ましい例としては、ヒトに由来するiPS細胞が挙げられる。

iPS細胞の具体例として、皮膚細胞などの体細胞に複数の遺伝子を導入して得られる、ES細胞同様の多分化能を獲得した細胞が挙げられ、例えばOct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、c-Myc遺伝子およびSox2遺伝子を導入することによって得られるiPS細胞、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子およびSox2遺伝子を導入することに

10

20

30

40

50

よって得られるiPS細胞(Nat Biotechnol 2008; 26: 101-106)が挙げられる。他にも、導入遺伝子をさらに減らした方法(Nature. 2008 Jul 31; 454(7204): 646-50)、低分子化合物を利用した方法(Cell Stem Cell. 2009 Jan 9; 4(1): 16-9、Cell Stem Cell. 2009 Nov 6; 5(5): 491-503)、遺伝子の代わりに転写因子タンパク質を利用した方法(Cell Stem Cell. 2009 May 8; 4(5): 381-4)などが挙げられる。

作製されたiPS細胞は、その作出方法によらずいずれも本発明に用いられうる。

ヒトiPS細胞株としては、具体的には、253G1株(36歳女性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4を発現させて作製されたiPS細胞株)、201B7株(36歳女性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4/c-MYCを発現させて作製されたiPS細胞株)、1503-iPS(297A1)(73歳女性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4/c-MYCを発現させて作製されたiPS細胞株)、1392-iPS(297F1)(56歳男性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4/c-MYCを発現させて作製されたiPS細胞株)、NHDF-iPS(297L1)(新生児男性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4/c-MYCを発現させて作製されたiPS細胞株)などが挙げられる。

【0020】

1. ドパミン神経細胞の製造方法

本発明は、神経前駆細胞を、以下の工程(1)に付すことを特徴とする、ドパミン神経細胞の製造方法(以下、本発明の製造方法と称することもある)：(1)(i)cAMP(cyclic adenosine monophosphate)アナログおよび(ii)MEK阻害剤を含む培地で培養する工程、を提供する。

【0021】

本発明の製造方法で使用される神経前駆細胞を得る方法としては、特に限定されず、対象となる動物胚から直接採取することもできるが、大量に神経前駆細胞を得るという観点からは、幹細胞を出発材料として製造することが好ましい。

【0022】

幹細胞から神経前駆細胞を製造する方法としては、特に限定されず、低分子BMP阻害剤の存在下で多能性幹細胞を培養する方法や、ストローマ細胞との共培養による分化誘導法(SDIA法)など自体公知の方法を利用することができる。

【0023】

本発明の製造方法で使用される神経前駆細胞は、分化後にドパミン神経細胞を生成することができる限りいずれの細胞であってもよいが、底板細胞を出発細胞として使用することが最も好ましい。従って、以下に、幹細胞を底板細胞に分化させる方法を具体的に記載する。

【0024】

1-1. 幹細胞を底板細胞に分化させる方法

本分化方法は、底板細胞分化誘導因子を含む培地で幹細胞を培養する工程を含む。

【0025】

本分化方法(分化誘導方法)において幹細胞は、通常培養器上で培養される。ここで用いられる培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられる。好ましくは、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレートなどである。培養器は、幹細胞を維持・培養するのに適するようなコーティングが施されていることが好ましい。具体的にはフィーダー細胞や、細胞外基質成分でコーティングされた培養器を用いることが好ましい。フィーダー細胞としては、特に限定されないが、例えば、線維芽細胞(マウス胎仔線維芽細胞

胞 (MEF)、マウス線維芽細胞 (STO) などが挙げられる。フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線 (ガンマ線など) 照射や抗癌剤 (マイトマイシン C など) 処理などで不活化されていることが好ましい。細胞外基質成分としては、ゼラチン、コラーゲン、エラスチンなどの繊維性タンパク質、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグルコサミノグリカンやプロテオグリカン、フィブロネクチン、ピトロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性タンパク質、あるいはマトリゲルなどの基底膜成分などが挙げられる。

【0026】

本分化方法で使用される底板細胞分化誘導因子は、底板細胞への分化を誘導する物質であれば特に限定されず、底板細胞分化誘導因子として公知のいかなる物質をも使用することができる。ここで、物質には、低分子化合物、ペプチド、タンパク質などが含まれる。底板細胞分化誘導因子の例としては、BMP 阻害剤、例えば、Noggin、LDN-193189 (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) キノリン塩酸塩)、dorsomorphin (6 - [4 - (2 - ピペリジン - 1 - イルエトキシ) フェニル] - 3 - ピリジン - 4 - イルピラゾロ [1, 5 - a] ピリミジン) など; TGFβ ファミリー阻害剤、例えば、SB431542 (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)、A-83-01 (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 - フェニルチオカルバモイル - 4 - キノリン - 4 - イルピラゾール) など; GSK3β 阻害剤、例えば、CHIR99021 (6 - [[2 - [4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (5 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) - 2 - ピリジニル] アミノ] エチル] アミノ] - 3 - ピリジニルカルボニトリル)、BIO (6 - プロモインジルピン - 3' - オキシム) など; Smoothened agonist、例えば、プルモルファミン (N - (4 - モルフォリノフェニル) - 2 - (1 - ナフチルオキシ) - 9 - シクロヘキシル - 9 H - プリン - 6 - アミン)、SAG (N - メチル - N' - (3 - ピリジニルベンジル) - N' - (3 - クロロベンゾ [b] チオフェン - 2 - カルボニル) - 1, 4 - ジアミノシクロヘキサン) など; 成長因子、例えば、Sonic hedgehog (SHH)、線維芽細胞増殖因子 - 8 (FGF8) などが挙げられる。これらは Axon Medchem BV 社、和光純薬工業社、Enzo Life Sciences, Inc. 社、Merck Bioscience 社、Tocris bioscience 社、Stemgent 社、Sigma 社、R&D 社、Peprtech 社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一の商品名であれば、同一の物質を指し、構造ならびに物性は製造元によらず同等である。また、市販品として入手できない場合であっても、当業者であれば既知文献に従って調製することもできる。

【0027】

本発明者らは、本分化方法において、LDN193189、SB431542、プルモルファミンおよび CHIR99021 (任意選択で SHH を含んでもよい) を含む培地で 3 ~ 5 日間一次培養した後、LDN193189 および CHIR99021 を含む培地で 5 ~ 8 日間二次培養することにより、より効率的に幹細胞を底板細胞へと分化誘導することができることを見出した。

従って、上記底板細胞分化誘導因子として LDN193189、SB431542、プルモルファミンおよび CHIR99021 を組み合わせることで、SHH などのタンパク成分を培地に添加しなくとも、効率的に幹細胞を底板細胞へと分化誘導することができ、従来よりも安価に底板細胞、ひいてはドパミン神経細胞を製造することが可能となる。

【0028】

本分化方法における培地中の底板細胞分化誘導因子の濃度は、用いる因子の種類によって適宜設定されるが、例えば、底板細胞分化誘導因子として LDN193189、プルモルファミン、CHIR99021 を使用する場合は、それぞれ、通常 0.05 ~ 10 μM、好ましくは 0.1 ~ 5 μM である。底板細胞分化誘導因子として SB431542 を使用する場合は、通常 1 ~ 20 μM、好ましくは 5 ~ 15 μM である。底板細胞

胞分化誘導因子としてSHHを使用する場合の濃度は、通常10～500 ng/ml、好ましくは100～300 ng/mlである。

【0029】

本分化方法で用いる培地は、上記基板細胞分化誘導因子を含有している限り特に限定されず、通常、幹細胞を培養するのに用いられる培地（以下では、基礎培地と称することもある）に基板細胞分化誘導因子を添加してなるものである。

上記基礎培地は、Neurobasal培地、Neurobasal-A培地、Neural Progenitor Basal培地、NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、αMEM培地、DMEM培地、DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。これらの基礎培地は、Invitrogen社、SIGMA社、和光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一商品名の培地であれば培地の組成は製造元によらず同等である。基板細胞への分化誘導がより効率的に行えるという点で、DMEM/F12培地、Neurobasal培地、およびこれらの混合培地が基礎培地として好適に用いられる。

10

本分化方法で用いられる培地は、血清含有培地であっても無血清培地であってもよい。ここで、無血清培地とは、無調整または未精製の血清を含まない基礎培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、成長因子）が混入している培地は無血清培地に該当するものとする。本分化方法で用いられる培地が血清含有培地である場合、該血清としてはウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum）などの哺乳動物の血清が使用できる。該血清の培地中の濃度は通常0.01～20重量%、好ましくは0.1～10重量%である。

20

【0030】

本分化方法で用いられる培地はまた、血清代替物を含んでいてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレン）、B-27サプリメント、N2サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、またはこれらの均等物が挙げられる。これらの培地中の濃度は、前記した血清の培地中の濃度と同様である。

30

本分化方法では、血清代替物としてN2サプリメントやB-27サプリメント（Brewer G. J. et al., J. Neurosci. Res. (1993) 35, 567）が好適に培地中に添加され得る。

その場合、培地中のN2サプリメントの濃度は、0.1～10重量%が好ましく、より好ましくは0.5～2重量%であり、B-27サプリメントの濃度は、0.1～10重量%が好ましく、より好ましくは1～5重量%である。

ノックアウトシーラムリプレースメントはInvitrogen社から購入可能である。その他の血清代替物については、Invitrogen社、SIGMA社、和光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一商品名の試薬あるいは添加物であれば組成は製造元によらず同等である。

40

【0031】

本分化方法で用いられる培地はまた、脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、抗生物質（例えばペニシリンやストレプトマイシン）または抗菌剤（例えばアンホテリシンB）などを含有してもよい。これらの培地中の濃度は、前記した血清の培地中の濃度と同様である。

培養温度、CO₂濃度などの他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約30～40℃、好ましくは約37℃である。また、CO₂

50

濃度は、例えば約 1 ~ 10 %、好ましくは約 5 %である。

【0032】

本分化方法において、幹細胞が底板細胞に分化したことの確認は、底板細胞特異的に発現するタンパク質や遺伝子（本明細書において、上記タンパク質や遺伝子を底板細胞マーカーと称することがある）の発現変動を評価することによって行うことができる。上記底板細胞マーカーの発現変動の評価は、例えば、抗原抗体反応を利用したタンパク質の発現評価方法、定量 RT - PCR を利用した遺伝子発現評価方法などによって行なうことができる。中脳に分化する上記底板細胞マーカーの例としては、FOX A 2 や LMX 1 A 遺伝子 / タンパク質が挙げられる。

【0033】

1 - 2 . 神経前駆細胞からドパミン神経細胞を製造する方法（本発明の製造方法）

上記分化方法により得られた底板細胞などの神経前駆細胞は、(i) cAMP アナログおよび (i i) MEK 阻害剤を含む培地で培養する工程により、ドパミン神経細胞へとさらに分化させることができる。神経前駆細胞として底板細胞を使用する場合、本発明の製造方法によれば、底板細胞からドパミン神経細胞への分化誘導時に通常使用される脳由来神経栄養因子 (BDNF) やグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) などの神経栄養因子の培地への添加は必須ではない。

【0034】

本発明の製造方法で使用される cAMP アナログは、細胞との接触時に細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが可能な、cAMP に類似した構造を有する化合物であれば特に限定されない。

上記 cAMP アナログの例としては、8 - ブロモ cAMP、ジブチリル cAMP、N 6 - ベンゾイル cAMP、8 - チオメチル cAMP などが挙げられる。これらは、Sigma 社、Merck Bioscience 社、和光純薬工業社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一の商品名であれば、同一の物質を指し、構造ならびに物性は製造元によらず同等である。また、市販品として入手できない場合であっても、当業者であれば既知文献に従って調製することもできる。

本発明の製造方法において使用される cAMP アナログとしては、ジブチリル cAMP が好ましい。

cAMP アナログの培地中の濃度は、用いる cAMP アナログの種類によって適宜設定されるが、cAMP アナログとしてジブチリル cAMP を用いる場合の濃度は、通常 0 . 01 ~ 5 mM、好ましくは 0 . 1 ~ 1 mM である。

【0035】

本発明の製造方法で使用される MEK 阻害剤は、MAP キナーゼキナーゼ (Mitogen activated protein kinase / ERK Kinase ; MEK) 阻害活性を有する物質を指し、MEK の働きを阻害する限り、MEK シグナル伝達経路の上流因子に対する阻害剤（例えば、FGF レセプター阻害剤）も本発明の MEK 阻害剤に含まれる。

上記 MEK 阻害剤の例としては、PD0325901 (N - [(2R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - イオドフェニル) アミノ] - ベンズアミド)、PD184352 (2 - (2 - クロロ - 4 - イオドフェニルアミノ) - N - シクロプロピルメトキシ - 3 , 4 - ジフルオロベンズアミド)、SU5402 (3 - [4 - メチル - 2 - (2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロ - インドール - 3 - イリデンメチル) - 1H - ピロール - 3 - イル] - プロパン酸)、PD173074 (N - [2 - [[4 - (ジエチルアミノ) ブチル] アミノ - 6 - (3 , 5 - ジメトキシフェニル) ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - イル] - N' - (1 , 1 - ジメチル) 尿素) などが挙げられる。これらは、Axon Medchem BV 社、和光純薬工業社、Enzo Life Sciences , Inc . 社、Merck Bioscience 社、Tocris bioscience 社、Stemgent 社、Sigma 社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一の商品名であれば、同一の物質を指し、構造な

10

20

30

40

50

らびに物性は製造元によらず同等である。また、市販品として入手できない場合であっても、当業者であれば既知文献に従って調製することもできる。

また、MEKのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNAなどもMEK阻害剤として使用することができる。これらはいずれも商業的に入手可能であるが既報に従って合成することができる。

本発明の製造方法において使用されるMEK阻害剤としては、PD0325901、PD184352またはSU5402が好ましい。

MEK阻害剤の培地中の濃度は、用いるMEK阻害剤の種類によって適宜設定されるが、MEK阻害剤としてPD0325901またはPD184352を使用する場合の濃度は、通常0.1~10 μ M、好ましくは1~5 μ Mである。MEK阻害剤としてSU5402を使用する場合の濃度は、通常0.1~20 μ M、好ましくは5~15 μ Mである。

【0036】

本発明の製造方法において、cAMPアナログとMEK阻害剤とは、培地中に同時に添加されてもよく、また、神経前駆細胞からドパミン神経細胞への分化を誘導し得る限り、別個に時間差を設けて培地中に添加されてもよい。cAMPアナログとMEK阻害剤とは、培地中に同時に添加されることが簡便であり、また好ましい。

【0037】

本発明の製造方法で用いる培地は、上記1-1.の分化方法で例示した基礎培地（所望により前記で例示した各種添加物、血清または血清代替物を含有していてもよい）にcAMPアナログおよびMEK阻害剤を添加することにより作製される。

本発明の製造方法で用いられる培地は、前記の底板細胞の製造方法にて用いた基礎培地と同種の基礎培地を用いて作製されたものであっても、異種の基礎培地を用いて作製されたものであってもよいが、同種の基礎培地を用いて作製されたものであることが好ましい。

【0038】

本発明の製造方法で用いる培地に、上記のcAMPアナログおよびMEK阻害剤に加えて、アスコルビン酸またはその塩を加えることにより、さらに効率的に高品質のドパミン神経細胞を製造することができる。

本発明の製造方法で使用され得るアスコルビン酸塩の例としては、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カリウム、アスコルビン酸カルシウムなどが挙げられるが、これらに限定されない。

アスコルビン酸またはその塩が培地に添加される場合の濃度は、通常0.01~10mM、好ましくは0.05~1mMである。

アスコルビン酸またはその塩は、cAMPアナログおよびMEK阻害剤と同時に培地に添加されてもよく、また、神経前駆細胞からドパミン神経細胞への分化を誘導し得る限り、別個に時間差を設けて培地中に添加されてもよい。アスコルビン酸またはその塩は、cAMPアナログおよびMEK阻害剤と同時に培地中に添加されることが簡便であり、また好ましい。

【0039】

本発明の製造方法においては、上記のcAMPアナログおよびMEK阻害剤に加えて、アクチビン受容体様キナーゼ-4,7の活性化剤を培地に添加して神経前駆細胞を培養することにより、さらに効率的に高品質のドパミン神経細胞を製造することができるばかりでなく、ドパミン神経細胞への分化誘導期間も短縮することができる。アクチビン受容体様キナーゼ-4,7の活性化剤としては、アクチビン受容体様キナーゼ-4及び/又はアクチビン受容体様キナーゼ-7を活性化する限り特に限定されないが、例えば、nodal、GDF-1、Vg1、アクチビンなどが挙げられる。好ましくはアクチビン（特に、アクチビンA）である。

【0040】

アクチビンはTGF β （トランスフォーミング増殖因子 β ）ファミリーに属する大きさ24kDのペプチド性細胞増殖、分化因子であり、2個の β サブユニットがSS結合を介

10

20

30

40

50

して2量体を構成している(Ling, N., et al., (1986) Nature 321, 779-782; Vale, W., et al., (1986) Nature 321, 776-779)。アクチピンには、アクチピンA、B、C、DおよびABが知られているが、本発明の製造方法においてはアクチピンA、B、C、D、ABのいずれのアクチピンも使用することができる。本発明の製造方法でアクチピンを使用する場合には、アクチピンとしては特にアクチピンAが好適に用いられる。また、該アクチピンとしてはヒト、マウスなどいずれの哺乳動物由来のアクチピンをも使用することができる。本発明の製造方法にてアクチピンを使用する場合には、用いる神経前駆細胞と同一の動物種由来のアクチピンを用いることが好ましく、例えばヒト由来の神経前駆細胞を出発原料とする場合、ヒト由来のアクチピンを用いることが好ましい。これらのアクチピンは商業的に入手可能である。

10

本発明の製造方法における培地中のアクチピンの濃度は、用いるアクチピンの種類によって適宜設定されるが、アクチピンとしてアクチピンAを使用する場合の濃度は、通常0.1~200 ng/ml、好ましくは5~150 ng/ml、特に好ましくは10~100 ng/mlである。

アクチピンは、cAMPアナログおよびMEK阻害剤と同時に培地に添加されてもよく、また、神経前駆細胞からドパミン神経細胞への分化を誘導し得る限り、別個に時間差を設けて培地中に添加されてもよい。アクチピンは、cAMPアナログおよびMEK阻害剤と同時に培地中に添加されることが簡便であり、また好ましい。

【0041】

20

本発明の製造方法は、神経前駆細胞の培養に適した培養温度(通常30~40℃、好ましくは37℃程度)で、1~10%(好ましくは5%)の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーター内にて培養することによって実施される。

【0042】

本発明の製造方法において、神経前駆細胞がドパミン神経細胞に分化したことの確認は、ドパミン神経細胞特異的に発現するタンパク質や遺伝子(本明細書において、上記タンパク質や遺伝子をドパミン神経細胞マーカーと称することがある)の発現変動を評価することによって行うことができる。上記ドパミン神経細胞マーカーの発現変動の評価は、例えば、抗原抗体反応を利用したタンパク質の発現評価方法、定量RT-PCRを利用した遺伝子発現評価方法などによって行なうことができる。中脳に存在する上記ドパミン神経細胞マーカーの例としては、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、FOX A2、LMX1A、NURR1遺伝子/タンパク質が挙げられる。

30

また、本発明の製造方法により得られたドパミン神経細胞が、インビボにおけるドパミン神経細胞と同質の機能を有することの確認は、ドパミンの放出、酸化ストレスや薬剤刺激への応答性を評価することによって行うことができる。

【0043】

本発明の製造方法を用いれば、上記1-1.の分化方法により得られた底板細胞以外の底板細胞または神経前駆細胞を出発材料として、高品質のドパミン神経細胞を効率良く製造することもできる。

【0044】

40

本発明の製造方法では、神経前駆細胞をドパミン神経細胞へと効率的に分化誘導することにより、高品質のドパミン神経細胞を大量に製造することができる。このドパミン神経細胞は、生体内のドパミン神経細胞と同様の表現形質及び機能を有することから、ドパミンの産生(放出)の低下に起因する疾患、例えばパーキンソン病などの神経変性疾患を治療するための細胞移植療法において医薬として利用すれば、高い生着率を達成できる。また、当該疾患の治療薬を開発するためのツールとしても有用である。

【0045】

本発明の製造方法の過程で得られる細胞及び本発明のドパミン神経細胞は、凍結保存及び解凍することができる。細胞の凍結及び解凍方法は、当該分野において公知であり、細胞の分化能、生存能、ドパミン産生能等に影響しない限り、特に限定されない。例えば、

50

本発明のドパミン神経細胞は、PBSで洗浄後、細胞分散液（例、Accutase（登録商標）Innovative Cell Technologies）により細胞を培養皿から剥離させた後、細胞分散液を除き、凍結保存液（例、セルバンカー2（株式会社LSIメディエンス））に懸濁して、-80℃で保存することができる。また、解凍方法としては、例えば、37℃の恒温槽中で解凍し、凍結保存液を遠心洗浄後、培地に懸濁させて用いる方法等が挙げられる。本発明の製造方法の過程で得られる細胞を凍結及び融解した場合、融解後の細胞からも、Nurr1陽性ドパミン神経を誘導することが可能である。

【0046】

2. ドパミン神経細胞を含む医薬

本発明は、上記した本発明の製造方法により製造されたドパミン神経細胞を含む医薬（本明細書中、本発明の医薬と略記する場合がある）を提供する。

ここでドパミン神経細胞は、上記した本発明の製造方法により得られた細胞であれば特に限定されない。

該医薬において、ドパミン神経細胞はそのまま、もしくはフィルター濾過などにより濃縮したペレットなどの細胞塊などとして用いられる。さらに、該医薬は、DMSO（ジメチルスルホキシド）などの保護剤を加え、凍結保存することもできる。該医薬は、医薬として、より安全に利用するために、加熱処理、放射線処理など、ドパミン神経細胞としての機能を残しつつ、病原体のタンパク質が変性する程度の条件下での処理に付してもよい。また、ドパミン神経細胞が必要量以上に増殖することを防止するために、上記処理と組み合わせて、マイトマイシンC前処理などによる増殖の抑制や、哺乳類が自然には持っていない代謝酵素の遺伝子を当該細胞に導入して、その後、必要に応じて未活性型の薬を投与し、哺乳類が自然には持っていない代謝酵素の遺伝子を導入した細胞の中だけでその薬を毒物に変化させて細胞を死滅させる方法（自殺遺伝子療法）などの処理に付してもよい。

【0047】

本発明の医薬は、安全で低毒性であり、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ブタ、サル）に投与することができる。

本発明の医薬のヒトへの投与形態（移植方法）としては、例えば、Nature Neuroscience, 2, 1137 (1999) もしくは N Engl J Med, 344: 710-9 (2001) に記載されるような手法が挙げられる。好ましくは、本発明の医薬は、脳のドパミン欠乏領域へと投与（移植）される。

本発明の医薬において、患者本人の細胞あるいは組織適合型が許容範囲のドナーの細胞を用いて作製されたドパミン神経細胞を用いることが好ましいが、年齢や体質などの理由から十分な細胞が得られない場合には、ポリエチレングリコールやシリコンのようなカプセル、多孔性の容器などに包埋して拒絶反応を回避した状態で移植することも可能である。また、本発明の医薬の投与量（移植量）および投与回数（移植回数）は、投与される患者の年齢、体重、症状などによって適宜決定することができる。

【0048】

本発明のドパミン神経細胞を含む医薬は、それ自体の投与（移植）により、患者体内に効率的に生着でき、その結果、患者体内での効率的なドパミンの産生（放出）が可能となる。従って、本発明の医薬は、ドパミンの産生（放出）低下に起因する疾患、例えば、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、アルツハイマー病、てんかんおよび統合失調症などの神経変性疾患の治療に有用である。

【0049】

3. その他の用途

本発明のドパミン神経細胞は、生体内のドパミン神経細胞と同様の表現形質及び機能を有するため、医薬化合物、好ましくは神経変性疾患治療用化合物のスクリーニングに有用である。例えば、試験化合物を単独でまたは他の薬剤と組み合わせて、本発明のドパミン神経細胞に加え、当該細胞の形態または機能的な変化を測定することにより、当該試験化

10

20

30

40

50

合物が医薬として有用であるか否かを評価することができる。機能的な変化の例としては、当該細胞から産生または放出されるドーパミン量を計測することにより行うことができる。ここで、ドーパミン神経細胞は、治療対象となる疾患と同様の表現型を呈する細胞が好ましく、特に好ましくは、疾患由来の体細胞から作製された幹細胞を分化誘導することにより製造されたドーパミン神経細胞である。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられる。ここで試験化合物は塩を形成していてもよい。該塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アルミニウム塩）などとの塩が用いられ、このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、または有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩、アルミニウム塩が用いられ得る。

【0050】

上記スクリーニングを用いて得られる医薬は、生理学的に許容し得る添加剤を用いて、公知の方法に従って製剤化することができる。

このようにして得られる製剤の剤形としては、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などの経口剤；注射剤などの非経口剤が挙げられる。これら製剤における有効成分（上記スクリーニング方法により選択された化合物）の含量は例えば、0.1～90重量％である。

前記添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムなどの結合剤；結晶性セルロースなどの賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などの膨化剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、アカモノ油、チェリーなどの香味剤；油脂、注射用水、植物油（例えば、ゴマ油、ヤシ油、大豆油）、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）などの液状担体；溶解補助剤（例えば、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）；非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50）；溶解補助剤（例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール）；無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン）；安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール）；保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール）；酸化防止剤が挙げられる。

前記注射用水としては、例えば、生理食塩水；ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなどを含む等張液があげられる。

上記スクリーニングによって得られる医薬（好ましくは、神経変性疾患治療薬）は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

該医薬の投与量および投与回数は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより適宜設定される。

【0051】

本発明のドーパミン神経細胞は、化合物の毒性評価に用いることもできる。例えば、試験化合物を単独でまたは他の薬剤と組み合わせて、本発明のドーパミン神経細胞に加え、当該細胞の形態または機能的な変化を測定することにより、当該試験化合物が毒性を有するかどうかを評価することができる。機能的な変化の例としては、当該細胞から産生または放出されるドーパミンの量を計測することにより行うことができる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿が挙げられる。ここで試験化合物は、上記スクリーニングに記載したような塩を形成していてもよい。

【0052】

本発明の製造方法により得られたドパミン神経細胞は、さらに、創薬ターゲットの検証や疾患メカニズムの解析などにも使用することができる。

【0053】

別の実施態様において、本発明は、(i) cAMPアナログおよび(ii) MEK阻害剤を含む、神経前駆細胞からドパミン神経細胞を製造するための試薬およびキットも提供する。

上記試薬およびキットは、さらに(1) アスコルビン酸またはその塩および/または(2) アクチビン受容体様キナーゼ-4, 7の活性化剤を含んでいてもよい。

上記cAMPアナログ、MEK阻害剤およびアクチビン受容体様キナーゼ-4, 7の活性化剤としては、本発明の製造方法に使用可能であるものが挙げられる。

10

【0054】

本明細書中で挙げられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0055】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0056】

[参考例1]

20

未分化ヒトiPS細胞の維持培養

ヒトiPS細胞としては253G1株(Nature Biotechnology 2008; 26: 101-106)または201B7株(Cell 2007; 131: 861-872)を使用した。

未分化状態のiPS細胞(253G1株または201B7株)の維持培養は、(i)フィーダー細胞を使用する方法、または(ii)使用しない方法の2通りで行った。

【0057】

(i) フィーダー細胞を使用する方法

フィーダー細胞としてマイトマイシンC(和光純薬)処理により増殖不活性化したマウス線維芽細胞(MEFs、北山ラベス社)をゼラチンコートしたプレート上に播種したものを使用した。本方法では、培地として4 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor)(PeproTech社)と0.5 × Penicillin-streptomycin(和光純薬)を添加した霊長類ES細胞用培地(リプロセル社)を用い、37、5%CO₂下で培養を行った。培地交換は毎日行い、6~7日ごとに継代を行った。上記継代は、霊長類ES細胞用細胞剥離液(リプロセル社製)を用いて細胞塊の状態でのiPS細胞をプレートから剥離させた後、剥離させたiPS細胞を新しいフィーダー細胞上に播種することにより行った。

30

【0058】

(ii) フィーダー細胞を使用しない方法

フィーダー細胞を使用しない方法では、ビトロネクチン(Life Technologies)をコートしたプレートを用いた。本方法では、培地として0.5 × Penicillin-streptomycin(和光純薬)を添加したEssential 8(Life Technologies)を用い、37、5%CO₂下で培養を行った。培地交換は毎日行い、6~7日ごとに継代を行った。上記継代は、0.5 mM EDTAを添加したPBSを用いて細胞塊の状態でのiPS細胞をプレートから剥離させた後、剥離させたiPS細胞を、ビトロネクチンをコートした新しいプレート上に播種することにより行った。

40

【0059】

[参考例2]

ヒトiPS細胞の前培養

50

底板細胞への分化誘導の前培養として、上記参考例 1 に記載の (i) または (i i) の方法で維持培養した未分化ヒト i P S 細胞を 9 6 穴プレートに播種した。

【 0 0 6 0 】

(i) フィーダー細胞上で維持した i P S 細胞を使用する場合

まず細胞塊の状態では維持していた i P S 細胞を霊長類 E S 細胞用細胞剥離液で 1 0 秒間処理し、軽くピペティングして M E F s をある程度除去した。続いて、 P B S で洗浄し、 A c c u t a s e (I n n o v a t i v e C e l l T e c h n o l o g i e s) を用いて 3 7 °C で 5 分間処理し、単一細胞になるまで解離させた。続いて、培地に分散させた i P S 細胞を 9 6 穴プレートに 1 穴あたり $1.5 \sim 2 \times 10^4$ 個の密度で播種し、 3 7 °C、5 % C O ₂ 下で 1 日間培養 (前培養) した。播種時の培養液としては、1 0 μ M の Y 2 7 6 3 2 ((R) - (+) - t r a n s - 4 - (1 - アミノエチル) - N - (4 - ピリジル) シクロヘキサンカルボキサミド) (和光純薬) を添加した霊長類 E S 細胞用培地を用いた。

10

【 0 0 6 1 】

(i i) フィーダー細胞を使用しない方法で維持した i P S 細胞を使用する場合

まず細胞塊の状態では維持していた i P S 細胞を 0 . 5 m M E D T A を添加した P B S を用いて 3 7 °C で 1 0 分間処理し、単一細胞になるまで解離させた。続いて、培地に分散させた i P S 細胞を 9 6 穴プレートに 1 穴あたり $1.5 \sim 2 \times 10^4$ 個の密度で播種し、 3 7 °C、5 % C O ₂ 下で 1 日間培養 (前培養) した。播種時の培養液としては、1 0 μ M の Y 2 7 6 3 2 (和光純薬) を添加した E s s e n t i a l 8 を使用した。上記 9 6 穴プレートとしては、M a t r i g e l (B D 社) を D M E M / F 1 2 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) で 1 / 3 0 ~ 1 / 4 0 希釈したものを添加して、3 7 °C で一晚コーティングしたものをを用いた。

20

【 0 0 6 2 】

[参考例 3]

ヒト i P S 細胞から底板細胞への分化誘導

ヒト i P S 細胞から底板細胞への分化誘導は次の方法で行った。

上記参考例 2 に記載した前培養後の培地を、底板細胞への分化誘導因子 (L D N 1 9 3 1 8 9 (0 . 5 μ M、A x o n M e d C h e m 社)、S B 4 3 1 5 4 2 (1 0 μ M、和光純薬)、プルモルファミン (0 . 5 μ M、M e r c k 社)、S H H (2 0 0 n g / m l、R & D s y s t e m s 社) および C H I R 9 9 0 2 1 (1 μ M、A x o n M e d C h e m 社)) を含む分化誘導培地に交換し (培養 0 日目)、3 7 °C、5 % C O ₂ 下で 5 日間培養した。その後、培地を、0 . 5 μ M L D N 1 9 3 1 8 9 および 1 μ M C H I R 9 9 0 2 1 を含む分化誘導培地に交換し、3 7 °C、5 % C O ₂ 下で 5 ~ 8 日間培養した (計 1 0 ~ 1 3 日間)。ここで、上記分化誘導培地としては、(a) 2 % B 2 7 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) と 2 m M G l u t a M a x I (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を含む N e u r o b a s a l (L i f e T e c h n o l o g i e s、以下、N e u r o / B 2 7 と記載)、または (b) 1 % N 2 (和光純薬) と 2 % B 2 7 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を含む D M E M / F 1 2 (以下、N 2 B 2 7 と記載) を用いた。なお、これらの培養期間中、培地交換は 3 ~ 4 日毎に行った。

30

40

【 0 0 6 3 】

各底板細胞への分化誘導因子 (L D N 1 9 3 1 8 9、S B 4 3 1 5 4 2、プルモルファミン、S H H および C H I R 9 9 0 2 1) の有無による底板細胞マーカーの発現変動を調べるため、培養 1 3 日目の細胞を回収し、R N e a s y (Q i a g e n 社) を用いて全 R N A 画分を精製した。P r i m e S c r i p t R T r e a g e n t k i t (タカラバイオ社) を用いて c D N A を合成した後、定量 R T - P C R を実施して、底板細胞マーカーである F O X A 2 および L M X 1 A の遺伝子発現量を測定した。結果を図 1 に示す。L D N 1 9 3 1 8 9、S B 4 3 1 5 4 2、S H H、プルモルファミンおよび C H I R 9 9 0 2 1 の 5 種類すべてを添加した場合 (図 1 中、A 1 1) で F O X A 2 と L M X 1 A が共に高い発現を示したことから、上記 5 種類すべてを添加した場合に効率的に底板細胞を誘

50

導できることが判った。また、上記5種類からSHHを除いた場合(図中、-SHH)でも、FOXA2とLMX1Aの発現はある程度上昇したことから、SHHを使用しない、すなわち分化誘導因子として化合物のみを添加する場合でも底板細胞を誘導できると考えられた。また、上記5種類に加え、ヒトES/iPS細胞から分化させた神経外胚葉を中脳領域の方向へ誘導する因子として広く用いられているFGF8を添加しても、FOXA2とLMX1Aの発現はほとんど変化しなかったことから(図1中、All+FGF8)、本系ではFGF8は必須ではないと考えられた。

【0064】

次に、培養13日目のFOXA2およびLMX1Aタンパク質の発現を調べるため、抗FOXA2抗体および抗LMX1A抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した。LDN193189、SB431542、SHH、プルモルファミンおよびCHIR99021の5種類すべてを使用して13日目まで培養した後、4%パラホルムアルデヒド(和光純薬)を添加して室温で30分間インキュベートし、細胞の固定を行った。1次抗体として抗FOXA2抗体(sc-6544、Santa Cruz社)および抗LMX1A抗体(AB10533、Millipore社)と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせたAlexa488標識2次抗体(Invitrogen社)およびAlexa568標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。分化誘導培地として前記(a)または(b)のいずれを使用した場合にも、大部分の細胞がFOXA2およびLMX1Aタンパク質を共に発現している様子が観察された。

【0065】

以上の結果から、LDN193189、SB431542、SHH、プルモルファミンおよびCHIR99021を添加した分化誘導培地で5日間、その後LDN193189およびCHIR99021を添加した分化誘導培地で5~8日間培養することにより、効率的に底板細胞を誘導できることが明らかとなった。

【0066】

[実施例1]

底板細胞からドパミン神経への分化誘導

参考例1ないし3に記載した方法と同様の方法で底板細胞を誘導し、培養13日目に培地を(A)0.1mM アスコルビン酸(SIGMA社)、0.5mM ジブチリルcAMP(SIGMA社、以下、dbcAMPと記載)および3μM PD0325901の3因子を添加したNeuro/B27、または(B)0.1mM アスコルビン酸および0.5mM dbcAMPの2因子を添加したNeuro/B27に交換し、37℃、5%CO₂下で30日以上培養した。なお、上記培養期間中、3~4日毎に培地交換を行った。

【0067】

[試験例1]

ドパミン神経細胞分化誘導後の中脳ドパミン神経細胞マーカー遺伝子およびマーカータンパク質の発現解析

培養45日目に細胞を回収し、中脳ドパミン神経細胞の分化、成熟化および機能維持に極めて重要な転写因子として知られるNURR1の発現変動を調べた。その結果を図3に示す。アスコルビン酸およびdbcAMPの2因子を添加して分化誘導することでNURR1の発現は上昇したが、この2因子に加えPD0325901を添加することによって発現がさらに大きく上昇した。

次に、中脳ドパミン神経細胞マーカーであるTH、NURR1およびFOXA2タンパク質の発現を、抗TH抗体、抗NURR1抗体および抗FOXA2抗体を用いた免疫蛍光染色で調べた。参考例1ないし3に記載した方法と同様の方法で底板細胞を誘導し、培養13日目から(A)アスコルビン酸、dbcAMPおよびPD0325901の3因子を添加したNeuro/B27、または(B)アスコルビン酸およびdbcAMPの2因子を添加したNeuro/B27に交換して分化誘導を進め、培養45~52日目に4%PFAを添加して室温で30分間の固定を行った。1次抗体として抗TH抗体(AB152

、Millipore社)、抗NURR1抗体(PP-N1404-00、Perseus Proteomics社)および抗FOXA2抗体(sc-6544、Santa Cruz社)と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせたAlexa488標識2次抗体、Alexa568標識2次抗体およびAlexa647標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図4、図5および図6に示す。いずれの条件においてもTHタンパク質を発現する細胞が同じように観察されたが、PD0325901を添加(実施例1、(A))することによってNURR1タンパク質の染色が明らかに強陽性となり(図4)、また、TH、NURR1およびFOXA2タンパク質を同時に発現する細胞が多数観察された(図5)。図6は、高倍率で観察したときの染色像を示す。以上の結果は、253G1および201B7株でほぼ同様に得られた。

10

これらのことから、底板細胞を前記(A)のNeuro/B27を用いて分化誘導することにより、cAMPアナログおよびMEK阻害剤を加えない場合に比して、数十倍も効率的に中脳ドパミン神経細胞を誘導できることが判明した。

【0068】

[試験例2]

dbcAMPおよびPD0325901を添加した培地で誘導したドパミン神経細胞の機能評価

参考例1ないし3に記載した方法と同様の方法で底板細胞を誘導し、培養13日目から(A)アスコルビン酸、dbcAMPおよびPD0325901の3因子を添加したNeuro/B27、または(B)アスコルビン酸およびdbcAMPの2因子を添加したNeuro/B27に交換して分化誘導を進め、培養50日目に高KCl刺激によるドパミンの放出能を評価した。

20

上記評価は次のように行った。分化誘導した細胞の培地をNeuro/B27に交換し、一晚培養した。翌日HBSS(Life Technologies、カルシウムおよびマグネシウム含有)中で37℃、5%CO₂下で1時間インキュベートを行い、HBSS(コントロール)または55mM KClを添加したHBSSに交換して、37℃、5%CO₂下で15~30分インキュベートした。インキュベート後、上清を回収してフィルターろ過(UFC30HVN、Millipore社)した後、0.01N HClおよび100μM EDTAを添加し、得られた試料は分析まで-80℃で保存した。分析には微量生体試料分析システムおよびHTEC500(エイコム社)、電気化学検出器EPC-500(エイコム社)を使用し、エイコム社のマニュアル(エイコム情報 No. 25)に従って、試料中に含まれるドパミン量の測定を行った。結果を図7に示す。前記(A)のNeuro/B27を用いて分化誘導することにより、高KCl刺激によるドパミン放出量の増加を明確に検出できるようになった。前記(B)のNeuro/B27を用いて分化誘導した場合には、ロットによってドパミン放出が認められない場合があったが、前記(A)のNeuro/B27を用いて分化誘導した場合には、高KCl刺激によるドパミン放出量の増加は、異なるロットでも再現よく検出できた。このことから、PD0325901によって分化系が安定化したことが示唆された。また、253G1および201B7株で若干の応答の違いが認められたが、PD0325901を添加した場合には、高KCl刺激によるドパミン放出量の増加が安定して検出され、異なる細胞株間において高KCl刺激によるドパミン放出量の増加が確認された。

30

40

【0069】

[実施例2]

各種MEK阻害剤(FGFR阻害剤を含む)の検討

前記(A)のNeuro/B27におけるPD0325901に代えて、PD184352(Axon MedChem社)、SU5402(FGFRレセプター(FGFR)阻害剤、和光純薬)またはPD173074(FGFR阻害剤、Axon MedChem社)のいずれかを含む培地により中脳ドパミン神経細胞を誘導できるか否かについて検討を行った。

【0070】

50

参考例 1 ないし 3 に記載した方法と同様の方法で底板細胞を誘導し、培養 13 日目から (1) アスコルビン酸、dbcAMP および PD0325901 の 3 因子、(2) アスコルビン酸および dbcAMP の 2 因子、(3) アスコルビン酸、dbcAMP および $3\mu\text{M}$ PD184352、(4) アスコルビン酸、dbcAMP および $10\mu\text{M}$ SU5402、または (5) アスコルビン酸、dbcAMP および $0.1\mu\text{M}$ PD173074 を添加した Neuro/B27 に交換し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で 30 日以上培養した。なお、上記培養期間中、3~4 日毎に培地交換を行った。培養 45 日目に細胞を回収し、NURR1 の発現変動を調べた結果を図 8 に示す。253G1 株では、PD0325901、PD184352 または SU5402 の添加で NURR1 の発現が上昇し、201B7 株では 4 種類すべてで NURR1 の発現が上昇した。一方、MEK パスウェイを活性化することが知られている PLX4032 は効果が認められなかった。

10

以上の結果から、NURR1 の発現上昇は MEK (または上流の FGFR) 阻害作用に起因していることが示唆された。

【0071】

[試験例 3]

分化誘導過程における各分化マーカーの発現変動

上記参考例、実施例および試験例の結果を元に、図 9 に示した 3 つの工程からなるドパミン神経分化系を設定し、未分化 iPS 細胞からの分化誘導過程における各種分化マーカーの発現を調べた。

【0072】

20

工程 1 では、 $0.5\mu\text{M}$ LDN193189、 $10\mu\text{M}$ SB431542、 $0.5\mu\text{M}$ プルモルファミン、 200ng/ml SHH および $1\mu\text{M}$ CHIR99021 を添加した Neuro/B27 で 5 日間培養した。工程 2 では $0.5\mu\text{M}$ LDN193189 および $1\mu\text{M}$ CHIR99021 を添加した Neuro/B27 で 8 日間培養した (計 13 日間)。工程 3 では、 0.1mM アスコルビン酸、 0.5mM dbcAMP および $3\mu\text{M}$ PD0325901 を添加した Neuro/B27 で 32 日間培養した (計 45 日間)。培養後、各種分化マーカーの経時的な発現変動を、参考例 3 と同様の方法を用いて測定した。発現解析の結果を図 10 に示す。

【0073】

対照として、分化誘導因子を添加しない条件 (図中、-)、SHH のみを除いた条件 (図中、-SHH) または プルモルファミンのみを除いた条件 (図中、-Pur) で培養し、工程 2 以降はすべて図 9 に示した条件で分化誘導した群の検討も行った。

30

【0074】

すべて添加した条件 (図中、A11) では、底板細胞マーカーである FOXA2 の発現は分化誘導 7 日目まで上昇し、分化誘導の終了までその発現量が維持されていた。中脳に分化する底板細胞マーカーである LMX1A の発現は、分化誘導に伴い経時的に上昇し続けた。ドパミン神経細胞マーカーである TH および NURR1 の発現は培養 20 日目から急激に増加した。一方、SHH のみを除いた条件 (図中、-SHH) においても、すべて添加した条件 (図中、A11) と同様の発現パターンを示したことから、SHH は必須ではないことが示唆された。しかしながら、プルモルファミンのみを除いた条件 (図中、-Pur) では FOXA2 の発現が低い状態であったことから、底板細胞の誘導にはプルモルファミンの添加が必須であると考えられた。

40

【0075】

[実施例 3]

底板細胞からドパミン神経細胞への分化誘導の効率化

PD0325901 に加え、工程 3 においてドパミン神経細胞への分化を促進させる因子を探索した。その結果、アクチピン A を工程 3 において添加した場合に、ドパミン神経細胞への分化効率が上昇することが見出された。

【0076】

参考例 1 ないし 3 に記載した方法と同様の方法で底板細胞を誘導し、培養 12 日目に 0

50

． 1 mM アスコルビン酸、 0.5 mM dbcAMP、 3 μ M PD0325901、 20 ng/ml アクチビンA (R&D社) のうちの一種類以上を添加したNeuro/B27、もしくはコントロールとしてアスコルビン酸、 dbcAMP、 PD0325901、およびアクチビンAを添加していないNeuro/B27に交換してさらに14日間培養した(計26日間)。培養後の細胞を回収し、THおよびNURR1の発現変動を参考例3と同様の方法で調べた結果を図11に示す。アクチビンAのみを添加した場合、THおよびNURR1の発現はほとんど上昇しなかった。しかしながら、アスコルビン酸およびdbcAMPとともにアクチビンAを添加した場合はTHおよびNURR1の発現が顕著に増加し、アスコルビン酸、 dbcAMPおよびアクチビンAとともにPD0325901を添加した場合はさらに大きく上昇した。一方で、アスコルビン酸、 dbcAMPおよびPD0325901を添加した場合は、培養26日目の時点ではアスコルビン酸、 dbcAMPおよびアクチビンAを添加した場合よりも低いレベルであった。

10

【0077】

次に、ドパミン神経細胞マーカーであるTHおよびNURR1タンパク質の発現を、抗TH抗体および抗NURR1抗体を用いた免疫蛍光染色で調べた。底板細胞を誘導し、培養12日目に0.1 mM アスコルビン酸、 0.5 mM dbcAMP、 3 μ M PD0325901、 20 ng/ml アクチビンAのうちの一種類以上を添加したNeuro/B27、もしくはコントロールとして分化誘導因子を添加していないNeuro/B27に交換してさらに14日間培養した(計26日間)。培養後4% PFAを添加して室温で30分間の固定を行った。1次抗体として抗TH抗体および抗NURR1抗体と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせたAlexa488標識2次抗体およびAlexa568標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図12に示す。アスコルビン酸、 dbcAMP、 アクチビンAおよびPD0325901を同時に添加することで、THおよびNURR1タンパク質の発現する細胞が顕著に増加している様子が観察された。これらの結果は、THおよびNURR1遺伝子の発現変動の結果とよく一致するものであった。

20

【0078】

以上の結果から、底板細胞の誘導後アスコルビン酸、 dbcAMP、 PD0325901およびアクチビンAを添加することで、従来よりも短い分化誘導期間(計26日間)で、効率よく中脳ドパミン神経細胞を誘導できることが明らかとなった。

30

【0079】

[試験例4]

分化誘導26日目における凍結保存

参考例1ないし3に記載した方法と同様の方法で中脳底板細胞を誘導し、培養12日目に0.1 mM アスコルビン酸、 0.5 mM dbcAMP、 3 μ M PD0325901、 20 ng/ml アクチビンA (R&D社) を添加したNeuro/B27に交換し、さらに14日間培養した(計26日間)。培養後、細胞をPBSで洗浄し、Accutase (Innovative Cell Technologies) を用いて37℃、20-30分間処理して分散させた。遠心洗浄後、約 2×10^6 cells/ml/tubeの濃度で細胞をセルパンカー2(十慈フィールド)に懸濁し、-80℃で凍結保存した。

40

凍結保存した細胞を37℃の恒温槽に浸して解凍し、遠心洗浄を行った後、96穴プレートに1穴あたり 2×10^4 個の密度で播種し、37℃、5% CO₂下で2週間培養した。上記96穴プレートとしては、MatrigelをDMEM/F12 (Life Technologies社)で1/30-1/40希釈したもの、またはLaminin (Trevigen社)をDMEM/F12で10 μ g/mlの濃度に希釈したものを添加して、37℃で一晩コーティングしたものをを用いた。培養液としては、0.1 mM Ascorbic acid、 0.5 mM dbcAMP、 3 μ M PD0325901、 20 ng/ml アクチビンA (R&D社) のうちの一種類以上を添加したNeuro/B27、もしくはコントロールとしてアスコルビン酸、 dbcAMP、 PD0

50

3 2 5 9 0 1、およびアクチビンAを添加していないNeuro/B27を用いた。

解凍後2週間培養した細胞を回収し、ドパミン神経マーカーであるTH、NURR1、FOX A2およびLMX1Aの発現変動を参考例3と同様の方法で調べた結果を図13に示す。アスコルビン酸、dbcAMP、アクチビンAおよびPD0325901を同時に添加することで、各分化マーカーは最も高い発現を示した。これらの因子を添加しない場合(図中、-)では、分化マーカーの発現レベルは低かったことから、解凍後は分化因子が必須であることがわかった。またこのときY27632(10 μM)の有無について検討を行ったが、マーカーの発現レベルにほとんど差は認められなかった。

次に、THおよびNURR1タンパク質の発現を、抗TH抗体および抗NURR1抗体を用いた免疫蛍光染色で調べた。解凍後2週間培養した細胞に4%PFAを添加して室温で30分間固定した後、1次抗体として抗TH抗体および抗NURR1抗体と反応させ、さらに1次抗体の免疫動物に合わせたAlexa488標識2次抗体およびAlexa568標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図14に示す。

【0080】

以上の結果から、分化誘導26日目の細胞が凍結保存可能であること、さらに解凍後、アスコルビン酸、dbcAMP、アクチビンAおよびPD0325901を添加して培養することにより、THおよびNURR1タンパク質を発現する中脳ドパミン神経を効率よく誘導できることが明らかとなった。

【0081】

[試験例5]

移植実験

参考例1ないし3に記載した方法と同様の方法で中脳底板細胞を誘導し、培養12日目に0.1 mM アスコルビン酸、0.5 mM dbcAMP、3 μM PD0325901または0.1 mMアスコルビン酸、0.5 mM dbcAMP、3 μM PD0325901、20 ng/ml アクチビンAを添加したNeuro/B27に交換して、さらに14日間培養した(計26日間)。培養後、細胞をPBSで洗浄しTrypLE Express (Life Technologies)で37、10分間処理して分散させ、Neuro/B27培地で細胞濃度を 1×10^5 cells/μlに調整し、移植まで氷上で保持した。

マウス線条体への移植実験は以下のように行った。12匹8週齢の雄性NOD SCIDマウス(日本チャールズリバー)をControl群とアクチビンA群(各群6匹)に分けた。Control群への移植はアスコルビン酸、dbcAMP、PD0325901を添加して培養した細胞を用い、アクチビンA群への移植はアスコルビン酸、dbcAMP、PD0325901、アクチビンAを添加して培養した細胞を用いた。マウスはペントバルビタール(50 mg/kg、ip)麻酔下で頭部術野の毛を剃り、イソジンを塗布した。数分後に0.1%オスバン水溶液を浸したメンバンにてイソジンを拭取って皮膚を消毒し、脳定位固定装置(デビット・コフ、米国David Kopf社)に固定した。頭皮を正中から切開して、骨膜を剥離し、マウスのBregmaおよびLambdaを暴露した。線条体の座標(AP: +0.5 mm; ML: +1.8 mm)は「The mouse brain in stereotaxic coordinates」を参照し、電動ドリル(φ0.5 mm)を用いて頭蓋骨に穴を開け、ハミルトンシリンジを頭蓋骨表面から深さDV: -3.5 mmに挿入し、細胞(1×10^5 cells/μl、2 μl)を10分間かけて移植した。移植後、頭部の切り口を縫合し回復させた。移植して4週、8週および12週後に各群から2匹ずつサンプリングを行った。マウスをイソフルラン吸引麻酔後断頭放血し、頭部を4%パラホルムアルデヒドで24時間固定し、頭蓋骨を剥いた後30%のサッカロース液にて24時間脱水を行った。その後、脳を凍結包埋し、クリオスタット(Leica CM3050S)を用いて凍結切片(40 μm)を作製した。ドパミン神経の組織染色は抗TH抗体と抗ヒト特異的Nuclei抗体(MAB1281、Millipore社)(hNuc)を用いて行った。

移植4週後、Control群のマウス線条体からTH/hNuc両陽性細胞がわずか

に（５％以下）観察された程度であったが（図１５左）、アクチビンＡ群ではＴＨ／ｈＮｕｃ両陽性細胞が多数観察された（４０％以上、図１５右）。移植８週後、Ｃｏｎｔｒｏｌ群の脳切片ではＴＨ／ｈＮｕｃ両陽性細胞は４週後に比べ増えたが、アクチビンＡ群ではＴＨ／ｈＮｕｃ両陽性細胞は４週に比べさらに増加し、５０％以上であった（図１６）。移植１２週後、Ｃｏｎｔｒｏｌ群の脳切片ではＴＨ／ｈＮｕｃ両陽性細胞は８週後よりさらに増加したが、１０％未満であった。アクチビンＡ群ではＴＨ／ｈＮｕｃ両陽性細胞は８週に比べ、顕著な増加は認められなかった（図１７）。

【００８２】

以上の結果から、中脳底板細胞に誘導した後、アスコルビン酸、dbcAMP、PD0325901およびアクチビンＡを添加した培地で培養した細胞は、マウス線条体でドパミン神経に効率よく分化し、３ヶ月以上定着し続けることが明らかとなった。

【００８３】

本出願は、日本で出願された特願２０１３－１６３０６２（出願日：２０１３年８月６日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

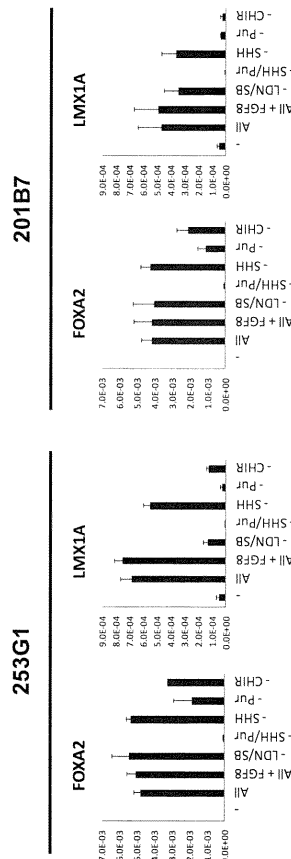
【産業上の利用可能性】

【００８４】

本発明によれば、神経前駆細胞から高品質のドパミン神経細胞をより効率的に製造することができる。本発明により製造されたドパミン神経細胞は、従来の方法により製造されたドパミン神経細胞では観察されなかった酸化ストレスや薬剤刺激への応答性が観察されるなど、生体内のドパミン神経細胞と同様の表現形質及び機能を有する。従って、本発明により製造されたドパミン神経細胞は、ドパミンの産生（放出）の低下に起因する疾患、例えばパーキンソン病などの神経変性疾患を治療するための細胞移植療法において、高い生着率を達成でき、極めて有用であるだけでなく、当該疾患の予防および／または治療に有用な化合物のスクリーニング、化合物の毒性評価、創薬ターゲットの検証、疾患メカニズムの解析など様々な用途に使用することができる。

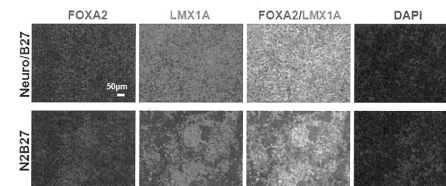
【図１】

図１



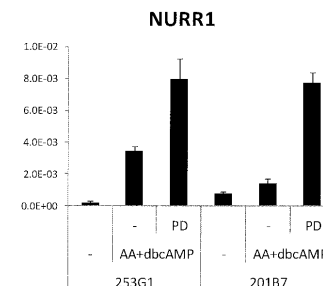
【図２】

図２



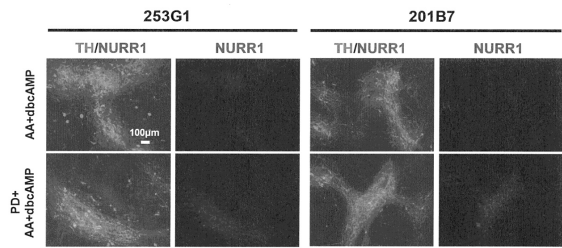
【図３】

図３



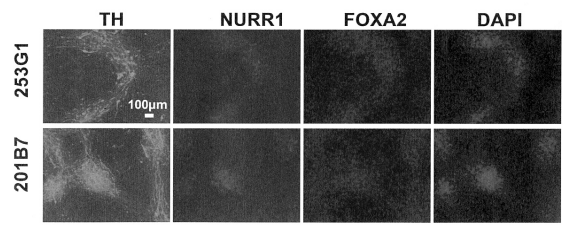
【 図 4 】

図 4



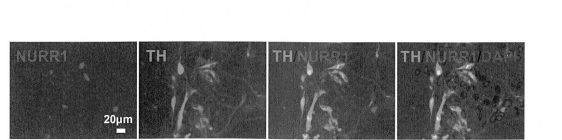
【 図 5 】

図 5



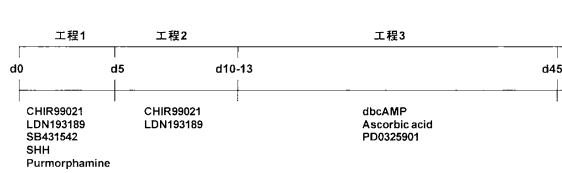
【 図 6 】

図 6



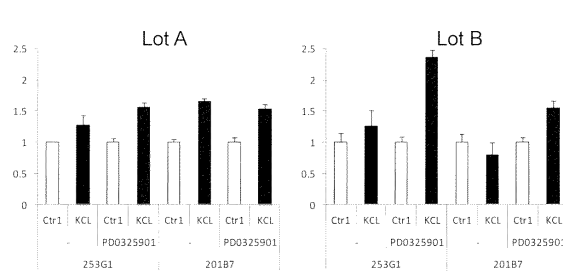
【 図 9 】

図 9



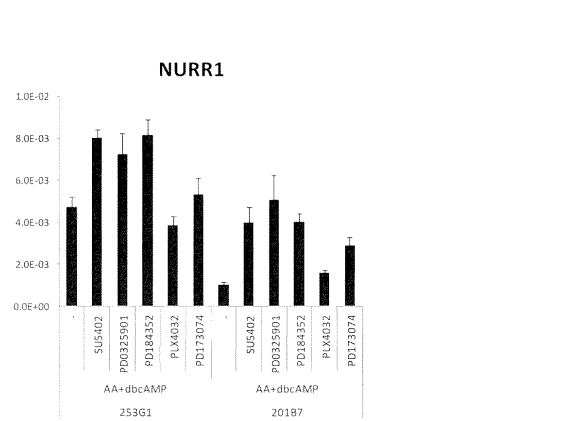
【 図 7 】

図 7



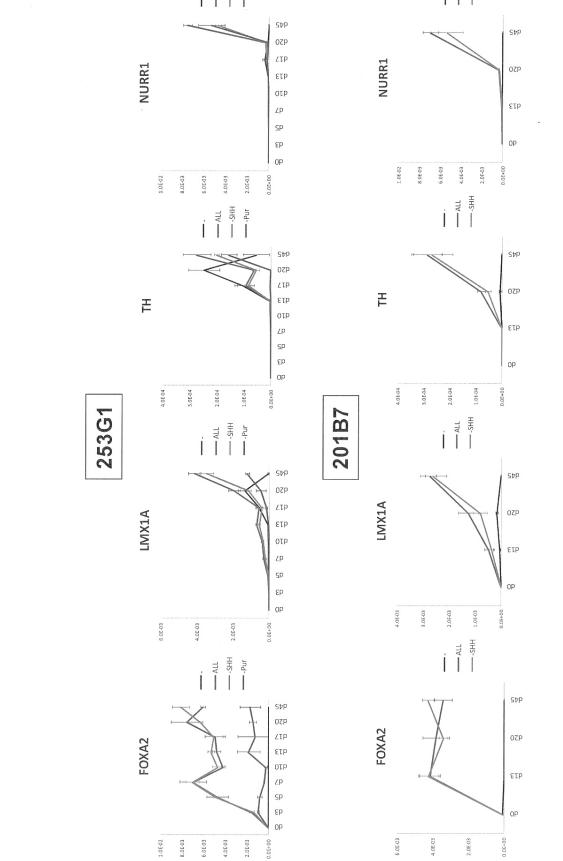
【 図 8 】

図 8



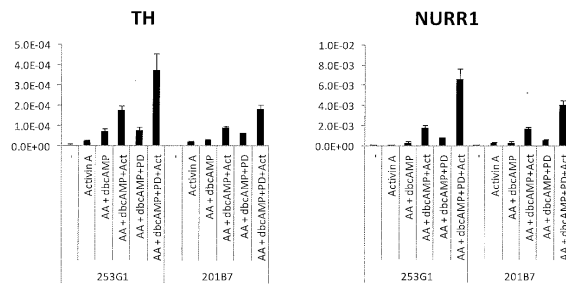
【 図 10 】

図 10



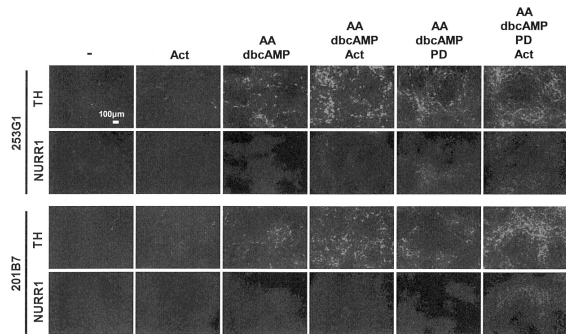
【図 1 1】

図 11



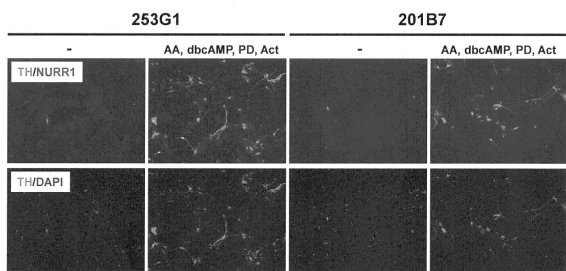
【図 1 2】

図 12



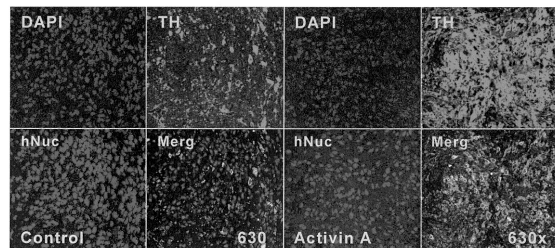
【図 1 4】

図 14



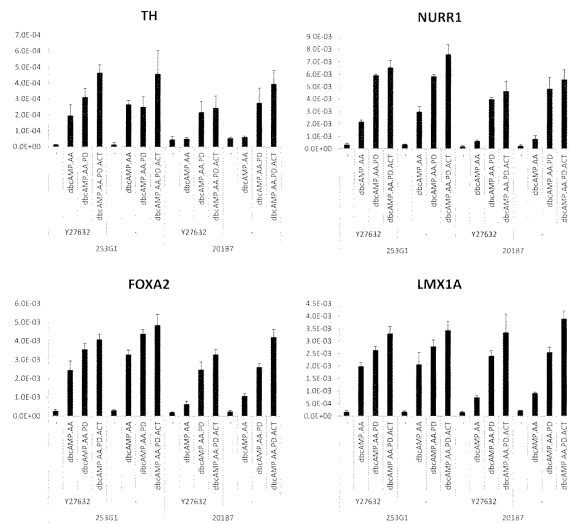
【図 1 5】

図 15



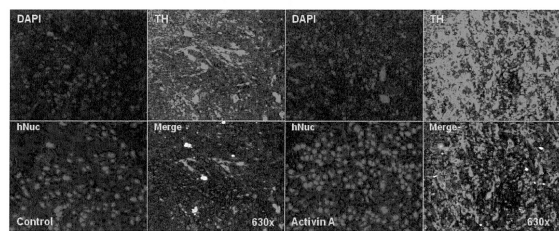
【図 1 3】

図 13



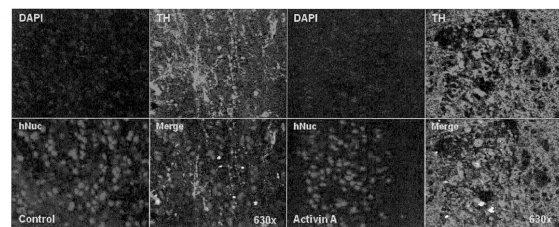
【図 1 6】

図 16



【図 1 7】

図 17



フロントページの続き

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 庄司 昌伸

神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2004/081172(WO, A2)

J. Cell. Biochem., 2010年 2月 1日, Vol.109, No.2, p.292-301

Nature, 2011年11月 6日, Vol.480, No.7378, p.547-551

Development, 2011年10月, Vol.138, No.20, p.4363-4374

Stem Cells, 2012年11月, Vol.30, No.11, p.2400-2411

J. Neurochem., 2007年11月, Vol.103, No.3, p.962-971

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2010年 4月 9日, Vol.394, No.3, p.639-645

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)