(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 12 月 9 日(09.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/140698 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0735 (2010.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 27/06* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/059576

(22) 国際出願日: 2010 年 5 月 31 日(31.05.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-134182 2009 年 6 月 3 日(03.06.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東北大学 **(TOHOKU UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号 Miyagi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西田幸二 **(NISHIDA, Kohji)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 大家義則 **(OIE, Yoshinori)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 林竜平 **(HAYASHI, Ryuhei)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 萩原邦恵 **(HAGIWARA, Kunie)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 大野聖二, 外 **(OHNO, Seiji** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階　大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2010/140698 A1

(54) **Title**: METHOD FOR INDUCTION OF DIFFERENTIATION OF NEURAL CREST CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称 : 多能性幹細胞からの神経堤細胞群の分化誘導方法

(57) **Abstract**: A method for inducing the differentiation of neural crest cells from pluripotent stem cells; a clinical application of neural crest cells of which the differentiation has been induced by the method to the treatment of neurocristopathy, which is a disease induced by the congenital abnormality, or diseases induced by acquired disorders of cells derived from neural crest cells, or the like; studies on the development of medicines using cells derived from neural crest cells; and basic studies on embryology or the like using neural crest cells.

(57) 要約: 本発明は、多能性幹細胞から神経堤細胞群を分化誘導する方法、及び前記方法によって分化誘導された神経堤細胞群の先天的な異常による神経堤症もしくは神経堤に由来する細胞の後天的な障害によって引き起こされた疾患への治療等への臨床応用に関する。さらに神経堤に由来する細胞を用いた創薬研究、及び神経堤細胞を用いた発生などの基礎研究にも関連する。

明　細　書

発明の名称：多能性幹細胞からの神経堤細胞群の分化誘導方法

技術分野

[０００１]

本発明は、多能性幹細胞から神経堤細胞群を分化誘導する方法、及び前記方法によって分化誘導された神経堤細胞群の先天的な異常による神経堤症もしくは神経堤に由来する細胞の後天的な障害によって引き起こされた疾患への治療等への臨床応用に関する。さらに神経堤に由来する細胞を用いた創薬研究、及び神経堤細胞用いた発生などの基礎研究にも関連する。

背景技術

[０００２]

ヒトの胚は、発生の段階で３つの胚葉、すなわち内胚葉、中胚葉、外胚葉を形成する。このうち内胚葉は、胃や小腸の粘膜上皮、肝臓、膵臓等になり、中胚葉は筋肉、骨、血管や血液、皮下組織、心臓、腎臓等になり、外胚葉は神経、目、表皮等を形成する。

[０００３]

神経堤細胞は脊椎動物に特徴的な細胞群であり、発生初期において神経板から神経管が形成される際に神経外胚葉と表皮外胚葉の間から発生する。この細胞群はそのあと全身へ遊走を始め、色素細胞、末梢神経、内分泌細胞、頭部の結合組織などへ分化する。このような点から、神経堤細胞は外胚葉系の細胞に分類されるが、これとは別に、第４の胚葉と言われることもある。

[０００４]

神経堤細胞は末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞や角膜実質細胞など多くの種類の細胞へと分化する細胞であり、その異常は神経芽細胞腫やHirschsprung病、Waadenburg症候群、Recklinghausen病、Peters奇形、Reger奇形などに関与することが知られている。

[０００５]

近年、未分化な細胞（幹細胞）を分化誘導することで、損傷した組織器官の補填を図る再生医療（細胞医療）の研究が進められている。特に胚性幹細胞（ES細胞）は、胎盤以外のすべての細胞に分化可能であるため、各細胞系譜への分化誘導やそ

の分化決定因子の同定が注目されているが、樹立する際の受精卵の破壊という倫理的問題からその研究や利用には制約が多く、また移植を受ける患者由来のES細胞の樹立ができないため、拒絶反応の問題もあることから、未だ臨床応用には至っていない。

[0006]

これに対し、最近、体細胞や未分化な幹細胞に特定の因子を導入することでES細胞と同様の分化多能性を有する人工多能性幹細胞が樹立された。その代表的なものは、Yamanakaらによって樹立されたiPS細胞である（特許文献1、非特許文献1及び2）。人工多能性幹細胞を利用した再生医療は、受精卵を破壊しないため倫理的問題が少ないばかりか、患者由来の細胞から樹立することができることから、自家細胞をソースとすることで拒絶反応の問題も回避することができる。

[0007]

神経堤に由来する細胞、組織の異常に起因する疾患の治療にも、上記したES細胞や人工多能性幹細胞を利用した再生医療の応用が可能である。

[0008]

ES細胞から神経堤細胞を誘導する方法としては、SasaiやMizusekiらによって報告されたSDIA (Stromal cell-derived inducing activity) 法が知られている。SDIA法はマウス由来の間質細胞(PA6細胞)をフィーダー細胞として利用することで、ES細胞から神経堤細胞を分化誘導する方法である（特許文献2及び3、非特許文献3～5）。このほか、ES細胞から神経堤細胞を誘導する方法としては、ST2細胞を用いる方法（非特許文献6）や、MS-5細胞を用いる方法（非特許文献7）も知られている。しかしながら、上記の方法はいずれも異種由来のフィーダー細胞を用いるため、異種由来感染症の危険性や異種由来フィーダー細胞との共培養によってヒト細胞がヒトに抗原性を持つ蛋白を発現する危険性など（非特許文献8）、臨床応用にあたっては安全性の点で配慮すべき問題がある。

[0009]

一方、フィーダー細胞や血清を用いることなく、ES細胞から神経細胞を分化誘導する方法として、Watanabeらによって報告されたSFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates) 法が知られている（特許文献4、非特許文献9）。Watanabeらは、フィーダー細胞の非存在下で、特別な無血清培養液と浮

遊凝集塊培養を組み合わせることで、マウスES細胞から効率よく終脳（発生期の前脳の一部）の神経細胞を誘導できたことを報告している。SFEB法は、動物由来フィーダー細胞や動物由来血清を用いないことから、ES細胞や人工多能性幹細胞を利用した再生医療を実現するうえで有用な方法と考えられる。

[００１０]

しかしながら、神経堤細胞については、ES細胞や人工多能性幹細胞から動物由来フィーダー細胞や動物血清を用いずに安全に分化誘導する臨床応用可能な方法は、現在のところ報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[００１１]

特許文献１：ＷＯ２００７／０６９６６６

特許文献２：ＷＯ２００１／０８８１００

特許文献３：ＷＯ２００３／０４２３８４

特許文献４：ＷＯ２００５／１２３９０２

非特許文献

[００１２]

非特許文献１：Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676

非特許文献２：Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.

非特許文献３：Kawasaki, H., Sasai, Y. et al. (2000) Neuron 28, 31-40.

非特許文献４：Kawasaki, H., Sasai, Y. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 1580-1585

非特許文献５：Mizuseki, K., Sasai, Y. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 5828-5833

非特許文献６：Motohashi T et al. Stem Cells. 2007;25:402-10.

非特許文献７：Lee G et al. Nat Biotechnol. 2007;25:1468-75.

非特許文献８：Martin MJ et al. (2005) Nature Medicine. 11: 228-232

非特許文献９：Watanabe K et al. Nature Neuroscience 2005; 8: 288-96

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[００１３]

本発明の課題は、ES 細胞や人工多能性幹細胞を細胞源として、安全に神経堤細胞を分化誘導する方法を開発し、神経堤に由来する細胞の異常に起因する疾患等に対する再生医療の新たな手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[００１４]

発明者らは、多能性幹細胞からフィーダー細胞や動物血清を用いることなく神経堤細胞を分化誘導する方法について鋭意検討し、特定の成分を含む無血清培地で浮遊培養を行うことにより、神経堤細胞マーカーである p75 陽性、Sox-10 陽性の細胞群が得られることを見出した。

[００１５]

この方法により、患者自身の細胞から作製した多能性幹細胞を用いて神経堤細胞を創出することができれば、拒絶反応や異種由来感染症の心配なく、神経堤の誘導、形成、遊走の欠陥に起因する各種疾患や神経堤に由来する細胞・組織の異常に起因する疾患の再生医療に利用することができる。すなわち得られた神経堤細胞群を、さらに神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞や角膜実質細胞等に分化誘導することにより、さまざまな疾患の再生医療にも用いることができる。

[００１６]

すなわち本発明は、多能性幹細胞を、無血清培地においてフィーダー細胞の非存在下で浮遊培養することにより、神経堤細胞群に分化誘導することを特徴とする、神経堤細胞群の分化誘導方法に関する。

[００１７]

本発明の方法で分化誘導される神経堤細胞群は、神経堤細胞のマーカーの発現、すなわち p75 陽性及び Sox10 陽性によって特徴づけられる。なお、神経堤細胞群が p75 陽性及び Sox10 陽性とは、実質的に神経堤細胞群の多くの細胞において、これらのマーカーの発現が検出されるということを意味する。

本発明の方法は、上記のとおり多能性幹細胞を浮遊培養した後、さらに接着培養

することが好ましい。

[００１８]

本発明の方法で用いられる培地には、血清代替物、非必須アミノ酸、ピルビン酸、及び2－メルカプトエタノールから選ばれるいずれか１又は２以上が含まれる。特に、KSR等の血清代替物の存在下で行われることが望ましい。

[００１９]

本発明の方法で用いられる培地には、さらにWnt、FGF（fibroblast growth factor）、及びBMP4等の増殖因子を含むことが好ましく、特にBMP4を含有することが好ましい。

[００２０]

１つの実施形態において、多能性幹細胞はiPS細胞等の人工多能性幹細胞である。別な実施形態において、多能性幹細胞はES細胞である。

[００２１]

本発明は、本発明の方法で得られた神経堤細胞群を含む培養物も提供する。

[００２２]

また本発明は、本発明の方法で得られた神経堤細胞群を含む、神経堤に由来する細胞、組織の異常に起因する疾患を治療するための細胞製剤も提供する。

[００２３]

前記神経堤に由来する細胞、組織の異常に起因する疾患としては、水疱性角膜症を含む角膜内皮機能不全、角膜ジストロフィー、発達緑内障、Rieger奇形、先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィー、輪部デルモイド、強膜化角膜、円錐角膜やペルーシド角膜変性などの角膜形状異常、角膜瘢痕、角膜浸潤、角膜沈着、角膜浮腫、角膜潰瘍、化学物質や熱によるものを含む眼外傷、角膜炎、角膜変性、角膜感染症などの眼疾患やHirschsprung病、Waadenburg症候群、限局性白皮症、Recklinghausen病を挙げることができる。

[００２４]

本発明は、上記した方法で得られた神経堤細胞群を、さらに末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞、角膜実質細胞、線維柱帯細胞、虹彩実質細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、脂肪細胞、内分泌細胞、クロム親和性細胞からな

る群より選ばれるいずれかの細胞群に分化誘導させる方法、及び前記方法で分化誘導された細胞群を含む培養物ならびに細胞製剤も提供する。

発明の効果

[００２５]

本発明によれば、異種フィーダー細胞や血清を用いることなく、多能性幹細胞から神経堤細胞群を分化誘導することができる。そのため、誘導された神経堤細胞群は外来の未知の病原体によって汚染される可能性がなく、臨床応用に安全に利用しうる。

[００２６]

本発明の方法で得られる神経堤細胞群は多分化能を有しており、神経堤由来のさまざまな細胞群にさらに分化誘導しうる。そのため、神経堤の誘導、形成、遊走の欠陥に起因する神経堤症等様々な疾患の再生医療に対する有用な細胞源となる。

図面の簡単な説明

[００２７]

[図１]図１は、分化誘導培養後の各時点における細胞を示す。(a)Day1、(b)Day2、(c)Day4、(d)Day7、(e)Day9

[図２]図２は、マウス iPS 細胞からの分化誘導細胞の免疫染色による p75,Sox-10,AP-2 の発現をみた結果を示す。(a)p75、(b)Sox10、(c)AP-2、(d)(e)青：Hoechst（核染色）緑：p75 赤：Sox10 による多重染色。

[図３－１]図３は、マウス iPS 細胞からの分化誘導細胞のフローサイトメトリーによる p75 陽性細胞率の解析結果を示す。A:増殖因子を添加していない　B:BMP4(0.5nM)を day0-5 で添加

[図３－２]図３は、マウス iPS 細胞からの分化誘導細胞のフローサイトメトリーによる p75 陽性細胞率の解析結果を示す。C:BMP4(5nM)を day0-5 で添加　D:BMP4(5nM),Wnt3a(5ng/ml)を day0-5 で添加　E:BMP4(0.5nM),Wnt3a(5ng/ml),bFGF(10ng/ml)を day0-5 で添加

[図４]図４は、ヒト iPS 細胞からの分化誘導細胞の免疫染色による p75,Sox-10 の発現をみた結果を示す。（ａ）青：Hoechst（核染色）　緑：p75　赤：Sox10 による多重染色

[図５]図５は、ヒト iPS 細胞からの分化誘導細胞のフローサイトメトリーによる p75 陽性細胞率の解析結果を示す。

[図６]図６は、マウス iPS 細胞からの分化誘導細胞のスフェア形成能と遊走能を示す。（ａ）マウス iPS 分化誘導細胞のスフェア形成、（ｂ）（ｃ）ニワトリ胚移植後のマウス iPS 分化誘導細胞、（ｄ）DiI 陽性細胞（移植した神経堤細胞）及び HNK-1 染色による chick の神経堤細胞の局在

[００２８]

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願２００９－１３４１８２号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための形態

[００２９]

本発明は、多能性幹細胞を、無血清培地においてフィーダー細胞の非存在下で浮遊培養することにより、神経堤細胞に分化誘導することを特徴とする、神経堤細胞群の分化誘導方法、及び前記方法によって得られた神経堤細胞の神経堤症治療等への臨床応用に関する。

[００３０]

１．定義

以下、本発明にかかる用語のいくつかについて説明する。

（１）多能性幹細胞

本発明にかかる「多能性幹細胞」とは、胎盤以外のすべての細胞に分化可能な分化多能性を有する細胞すべてを含み、ES 細胞や ES 細胞株のほか、iPS 細胞等の人工多能性幹細胞の両方を含む。

[００３１]

（２）人工多能性幹細胞（iPS 細胞等）

本発明にかかる「人工多能性幹細胞」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子を導入することにより、ES 細胞と同様の分化多能性を有するように再プログラミング（初期化）された細胞を言う。

[００３２]

「人工多能性幹細胞」は、Yamanaka らにより、マウス繊維芽細胞に Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の 4 因子を導入することにより、初めて樹立され「iPS 細胞（indu

ced Pluripotent Stem Cell)」と命名された(Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676)。その後、同様の4因子をヒト繊維芽細胞に導入することにより、ヒトiPSも樹立され(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.)、さらにc-Mycを含まない方法等(Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106)、腫瘍形成誘導が低いより安全性の高いiPS細胞を樹立する方法の確立にも成功している。

[００３３]

Wisconsin大学のThomsonらは、OCT3/4, SOX2, NANOG, LIN28の4遺伝子をヒト繊維芽細胞に導入して作製した人工多能性幹細胞の樹立に成功している(Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.)。また、Harvard大学のDaleyらは、皮膚細胞にOCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC, hTERT, SV40 large Tの6遺伝子を導入して作製した人工多能性幹細胞の樹立について報告している(Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146)。

[００３４]

Sakuradaらは、体細胞ではなく、出生後の組織に存在する未分化幹細胞を細胞源として、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc等を導入することで、より効率よく誘導される人工多能性幹細胞を報告している(特開２００８－３０７００７)。

[００３５]

このほか、OCT3/4, KLF4, 低分子化合物をマウス神経前駆細胞等に導入して作製された人工多能性幹細胞(Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574,)、SOX2, C-MYCを内因性に発現しているマウス神経幹細胞にOCT3/4, KLF4を導入して作製された人工多能性幹細胞(Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650)、C-MYCを用いることなく、Dnmt阻害剤やHDAC阻害剤を利用して作製された人工多能性幹細胞(Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)が報告されている。

[００３６]

上記を含めて、人工多能性幹細胞に関する公知の特許としては、特開２００８－３０７００７号、特開２００８－２８３９７２号、ＵＳ２００８－２３３６６１０、ＵＳ２００９－０４７２６３、ＷＯ２００７－０６９６６６、ＷＯ２００８－１１８２２０、ＷＯ２００８－１２４１３３、ＷＯ２００８－１５１０５８、２００９

－００６９３０WO２００９－００６９９７、WO２００９－００７８５２等を挙げることができる。

［００３７］

本発明で用いられる「人工多能性幹細胞」は、冒頭に記載した定義を満たし、本発明の目的を損なわない限りにおいて、公知の人工多能性幹細胞及びこれと等価な人工多能性幹細胞細胞のすべてを含み、細胞源、導入因子、導入方法等は特に限定されない。

［００３８］

好ましくは、細胞源はヒト由来であり、より好ましくは、当該細胞から分化誘導された神経堤に由来する細胞を必要とする患者自身に由来する。

［００３９］

（３）神経堤細胞

本発明に係る「神経堤細胞」とは、脊椎動物に特徴的な細胞群であり、発生初期において神経板から神経管が形成される際に神経外胚葉と表皮外胚葉の間から発生する。神経堤細胞群は、色素細胞、末梢神経、内分泌細胞、頭部の結合組織など、さまざまな組織･器官へと分化する。神経堤細胞は外胚葉系の細胞に分類されるが、このように重要な役割を担うことから、これとは別に第４の胚葉と言われることもある。

［００４０］

神経堤細胞は末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞、角膜実質細胞、虹彩実質細胞、線維柱帯細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、脂肪細胞、内分泌細胞、クロム親和性細胞など多くの種類の細胞へと分化する。

［００４１］

本発明にかかる「神経堤細胞」は、その特異的マーカーである p75、Sox-10 の発現によって特徴づけられる。各マーカーの詳細については、後述する。

［００４２］

（４）フィーダー細胞

本発明の方法は「フィーダー細胞」を用いることなく多能性幹細胞を培養することを特徴とする。「フィーダー細胞（あるいは「フィーダー」と略記されることもある）」とは、目的とする細胞の培養条件を補助、調製するために用いられる、培

養細胞とは異なる種類の細胞を意味する。フィーダー細胞は、実験の目的や細胞の種類によって異なるが、通常それ自体増殖することがないようX線照射やマイトマイシンC（MMC）等で前処理が施される。

［００４３］

本発明の分化誘導方法自体は「フィーダー細胞」を用いることはないが、細胞源となるES細胞（株）や人工多能性幹細胞の維持においては、「フィーダー細胞」を利用してもよい。例えば、ES細胞やiPS細胞を維持する場合は，MEF（マウス胎児線維芽細胞）やSNLやSNLPが用いられる。

［００４４］

（５）無血清培地

本発明で用いられる「無血清培地」とは、動物血清を含まない培地を言う。無血清培地は、動物血清に由来する病原体による感染の恐れがなく、得られた細胞や培養物は安全に、臨床応用に適用することができる。なお、「無血清培地」は、感染の恐れがない人工血清代替物を含んでいてもよい。そのような人工血清代替物としては、例えば、KSR（knockout serum replacement：invitrogen社（GIBCO）製）、脂質リッチアルブミン等のアルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2－メルカプトエタノールや3’チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物を挙げられる。

［００４５］

（６）神経堤細胞マーカー：p75、AP-2、Sox-10

本発明では、分化誘導された細胞を同定するために、神経堤細胞に特異的なマーカーを利用する。具体的には、本発明にかかる神経堤細胞は、p75陽性やSox-10陽性によって特徴づけられる。さらに、AP-2陽性の細胞もみられた。

［００４６］

p75：

p75はLow affinity neurotrophin recepterとして知られており、遊走している神経堤細胞のマーカーである。また表面マーカーであることから、このマーカーを指標にして細胞を純化することができる。実際にラットの坐骨神経からp75陽性細胞群をfluorescence activated cell sorting(FACS)によって純化し、その細胞が多分化能をもつことが証明されている(Morrison SJ et al. Prospective identifi

cation, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipote nt mammalian neural crest stem cells. Cell 1999; 96: 737-49.)。

[００４７]

AP-2：

AP-2は転写因子であるが、そのなかでもAP-2aは、頭部神経堤のマーカーとして知られている。ノックアウトマウスの解析からも神経堤の形成に不可欠なものとして知られている。

[００４８]

Sox-10：

Sox-10はsoxファミリー遺伝子のグループEサブファミリーに属する転写因子として知られており、神経堤細胞のマーカーとして知られている。

[００４９]

２．分化誘導方法

本発明においては、ES細胞やiPS細胞等の人工多能性幹細胞を、フィーダー細胞を用いることなく無血清培地で浮遊培養することにより神経堤細胞群へと分化誘導する。

[００５０]

なお、分化誘導前において、ES細胞や人工多能性幹細胞を、MEFやSNL等のフィーダー細胞上で、適当な培地（市販のES細胞用培地や、iPS細胞用培地等）を用いて維持しておいてもよい。

[００５１]

２．１　培地の調製

本発明の方法では、動物血清を含まない無血清培地を用いる。

基本培地としては、DMEM培地、BME培地、α MEM培地、Dulbecco MEM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、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer’s培地、McCoy’s培地、ウイリアムスE培地、及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いずれも用いることができる。この基本培地に、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源や分化誘導に必要な各成分を添加して

作成される。

[００５２]

例えば、栄養源としては、グリセロール、グルコース、果糖、ショ糖、乳糖、ハチミツ、デンプン、デキストリン等の炭素源、また、脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール類等の炭化水素類、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源、食塩、カリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等の無機塩類、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、モリブデン酸ナトリウム、タングステン酸ナトリウム及び硫酸マンガン、各種ビタミン類、アミノ酸類等を含むことができる。

[００５３]

分化誘導に好適な成分としては、増殖因子等の各種サイトカイン、2－メルカプトエタノール、KSR 等の人工血清代替物、非必須アミノ酸、ピルビン酸等が挙げられる。2－メルカプトエタノールは、例えば約 0. 0.05-1.0mM、好ましくは約 0.1～0.5mM、より好ましくは約 0.１mM の終濃度で添加する。なお、非必須アミノ酸とは、必須アミノ酸（その動物の体内で合成できず、栄養分として摂取しなければならないアミノ酸）以外のアミノ酸を意味し、ヒトの場合、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、プロリン、オルニチン、チロシン、セリン、アラニンの１１種が非必須アミノ酸に該当する。本発明において、「非必須アミノ酸」は、上記１１種のすべてを含む必要はなく、これらの一部であってもよい。

[００５４]

これらの成分を配合して得られる培地のｐＨは 6.0～8.5、好ましくは 6.4～8.0、より好ましくは 7.0～7.4 の範囲である。

[００５５]

なお、前述したとおり、無血清培地は、感染の恐れがない人工血清代替物を含んでいてもよい。そのような人工血清代替物としては、例えば、脂質リッチアルブミン等のアルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2－メルカプトエタノールや 3’チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物を挙げられる。例えば、市販品であれば、knockout Serum Replacement (K

SR）、Chemically-defined Lipid concentrated（Gibco）、Glutmax（Gibco）等が挙げられる。

［００５６］

培地には、BMP4（Bone Morphogenetic Protein 4）を添加すると、より良好な神経堤細胞群への分化誘導が達成できる。BMP4は骨形成因子の一つで、transforming growth factor-β（TGF-β）スーパーファミリーに属し、分化、増殖及び様々な細胞機能を調節することが知られているが、神経管の背側化を行うKey Factorであることが知られている。培地へのBMPの添加量は特に制限されないが、0.005nM～50nM、とくに0.1nM～10nM程度が好ましい。

［００５７］

培地には、さらに上記した以外の分化誘導物質を併用できる。そのような分化誘導物質としては、例えば、FGF、Wnt等を挙げることができる。Wntは、0.1～20ng/ml程度、好ましくは1-10ng/ml程度添加することができる。bFGFは、0.1～50ng/ml程度、好ましくは1～20ng/ml程度添加することができる。

［００５８］

２．２　培養方法

多能性幹細胞から神経堤細胞の分化誘導には、通常フィーダー細胞を用いるのが常法であるが、本発明においては、フィーダー細胞を用いることなく上記無血清培地で浮遊培養を行う。

［００５９］

浮遊培養は、約36.0～38.0℃、好ましくは約36.5℃～37.5℃で、20％O_2、5％CO_2といった通常の条件下で行われる。

［００６０］

浮遊培養で用いられる培養容器は、細胞非接着性であることが好ましい。よって、親水性ポリマーでコーティング処理がされたものが好ましい。

［００６１］

なお、培養開始後～5日程度までは、浮遊状態で細胞を培養し、浮遊凝集体を形成させるが、その後、接着培養にて培養を行うことが好ましい。

［００６２］

例えば、浮遊培養においてはGMEMを基礎培地として使用し、非必須アミノ酸、ピ

ルビン酸、2－メルカプトエタノール等を使用する。接着培養にはpoly-D-lysine、ラミニン、ファイブロネクチン等をコーティングしたディッシュを用い、培地は浮遊培養と同様のものを用いる。

[００６３]

条件にもよるが、通常接着培養に切り替えてから７日～9日以降において、p75陽性、AP-2陽性、Sox10陽性の神経堤細胞が出現してくる。

[００６４]

培養開始時の多能性幹細胞の濃度は特に限定されず、適宜設定できる。例えば、約1.0×10^{3}～約1.0×10^{6}cells/ml、好ましくは約1.0×10^{4}～約1.0×10^{5}cells/mlの開始濃度で播種する。

[００６５]

３．神経堤細胞群からの分化誘導

本発明の方法によって分化誘導された神経堤細胞群は、他のさまざまな神経堤由来の細胞群にさらに分化誘導することができる。

[００６６]

神経堤細胞群から分化誘導可能な細胞群としては、例えば、末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞、角膜実質細胞、虹彩実質細胞、線維柱帯細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、脂肪細胞、内分泌細胞、クロム親和性細胞、が挙げられる。

[００６７]

例えば、TGF-bを添加することにより、選択的にsmooth muscle cellに分化誘導することができる。またdexamethasone,アスコルビン酸、血清などを含んだ培地（Lonza社のヒト間葉系幹細胞骨芽細胞分化培地キットなど）などを使用することにより選択的に骨芽細胞に分化誘導することができる。さらにITS(insulin,transferring,selenium)、アスコルビン酸、デキサメサゾンなどを含む培地（Lonza社のヒト間葉系幹細胞軟骨細胞分化培地キットなど）などを使用することによって選択的に軟骨細胞へ分化誘導することができる。また、インスリン、IBMX、デキサメサゾン、血清などを含む培地(Lonza社のヒト間葉系幹細胞脂肪細胞分化培地キットなど)などを使用することで選択的に脂肪細胞へ分化誘導することができる。

[００６８]

４．細胞の単離（純化）

本発明の方法によって分化誘導された神経堤細胞群は、表面マーカーであるp75を利用して、簡便に単離（純化）することができる。またPDGFRaやSca-1といった表面マーカーを用いても単離することができる。

［００６９］

例えば、p75に特異的な抗体で標識された免疫磁気ビーズ、p75抗体を固相化したカラム、蛍光標識されたp75抗体を用いたセルソーター（FACS）による分離を用いて単離することができる。抗体は、市販のものを利用してもよいし、常法にしたがって作製してもよい。

［００７０］

５．再生医療への利用

５．１　培養物

本発明の方法によって得られた神経堤細胞群、及び/又は前記細胞群から分化誘導された細胞群を含む培養物は、それ自体、研究、再生医療あるいは後述する細胞製剤の原料として利用することができる。

［００７１］

５．２　細胞製剤

本発明の方法によって、分化誘導され、単離された神経堤細胞群、及び/又は前記細胞群から分化誘導された細胞群は、神経堤細胞に起因する疾患を治療するための細胞製剤として利用できる。

［００７２］

本発明の細胞製剤の投与方法は特に限定されず、適用部位に応じて、外科的手段による局所移植、静脈内投与、腰椎穿刺投与、局所注入投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、脳内投与、脳室内投与、眼への投与（静脈投与、角膜上投与、角膜内投与、前房内投与、硝子体内投与など）などが考えられる。

［００７３］

本発明の細胞製剤は、細胞の維持・増殖、患部への投与を補助する足場材料や成分、他の医薬的に許容しうる担体を含んでいてもよい。

［００７４］

細胞の維持・増殖に必要な成分としては、炭素源、窒素源、ビタミン、ミネラル、

塩類、各種サイトカイン等の培地成分、あるいはマトリゲル™等の細胞外マトリックス調製品、が挙げられる。

[００７５]

患部への投与を補助する足場材料や成分としては、生分解性ポリマー；例えば、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、セルロース、及びこれらの誘導体、ならびにその２種以上からなる複合体、注射用水溶液；例えば生理食塩水、培地、ＰＢＳなどの生理緩衝液、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液（例えばＤ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム）等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えば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８０、ＨＣＯ－５０等と併用してもよいが挙げられる。

[００７６]

その他、必要に応じて、医薬的に許容される有機溶剤、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤等を含んでいてもよい。

[００７７]

実際の添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、これらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、ゼラチン等を加えたものを使用することができる。

[００７８]

５．３　細胞シート

細胞の投与方法として、これら以外に細胞シートとして投与する方があげられる。

すなわち、発明の方法で得られた神経堤細胞群やこれから分化誘導された細胞群を単層であるいは重層化して細胞シートを作製することができる。

特に岡野らによって開発された温度応答性培養皿を用いれば、低温処理のみで細胞をシート状に回収することができる。この方法ではカドヘリンなどの細胞間接着蛋白やインテグリンなどの基底膜との接着蛋白を保存したまま細胞の回収が可能であり、酵素を用いた細胞回収法より優れている（Yamada N et al. Chem Rapid Commun 1990; 11: 571. Yamato M et al. Tissue Eng 2001; 7: 473）。またこの方法を用いて角膜上皮や心筋の再生治療が既に臨床応用されている(Nishida K et al. N Eng J Med 2004; 351: 1187-96.）。

[００７９]

これらの方法を用いた本発明の細胞製剤や細胞シート移植の対象となりうる疾患としては、水疱性角膜症を含む角膜内皮機能不全、角膜ジストロフィー、発達緑内障、Rieger 奇形、先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィー、輪部デルモイド、強膜化角膜、円錐角膜やペルーシド角膜変性などの角膜形状異常、角膜瘢痕、角膜浸潤、角膜沈着、角膜浮腫、角膜潰瘍、化学物質や熱によるものを含む眼外傷、角膜炎、角膜変性、角膜感染症などの眼疾患や神経芽細胞腫、Hirschsprung 病、Waadenburg 症候群、限局性白皮症 Recklinghausen 病が挙げられる。

実施例

[００８０]

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[００８１]

実施例１：マウス iPS 細胞からの神経堤細胞の分化誘導

１．マウス iPS 細胞の培養：

マウス iPS 細胞は、京都大学　山中伸弥教授より供与を受けた(Okita K. et al., (2007) Nature, 448:313-317）。同じく山中教授より供与を受けた SNLP（ピューロマイシン耐性の SNL 細胞）を常法に従って調製し、下記に示す SNLP フィーダー用培地を用いて維持した。

[００８２]

ゲラチンコートした培養皿にマイトマイシン(MMC)処理した SNLP 細胞を播種し、

これをフィーダー細胞とした。この上にマウス iPS 細胞を播種し、iPS 細胞培養用培地中 37℃5%CO_2, 20%O_2で維持した。

[００８３]

SNLP フィーダー培地

DMEM(Nacalai Tesque)

7%FBS(Sigma)

L-Glutamine(Invitorgen)

Penicillin-Streptomycin(Invitrogen)

[００８４]

iPS 細胞培養用培地

DMEM(Nacalai Tesque)

15%FBS(Biological Industries)

L-Glutamine(Invitorgen)

Penicillin-Streptomycin(Invitrogen)

Puromycin(Sigma)

nonessential amino acids(Invitrogen)

2-mercaptoethanol(Invitrogen)

[００８５]

２．分化誘導系の準備

（１）無血清培地の調製

Watanabe ら (Watanabe K et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells Nature Neuroscience 2005; 8: 288-96) の記載に従い、下記に示す無血清培地を調製した。

[００８６]

培地組成

GMEM(Invitrogen)

5%Knockout serum replacement(Invitrogen)

Nonessential amino acids(Invitrogen)

Pyruvate(Invitrogen)

2-mercaptoethanol(Invitrogen)

[００８７]

（２）iPS 細胞の分化誘導培養

SNLP フィーダー上の iPS 細胞を 0.25%トリプシン/EDTA 処理することにより、iPS 細胞を回収し、さらにピペッティングを行うことにより iPS 細胞の細胞懸濁液（single cell suspension）を作製した。

[００８８]

得られた細胞を無血清培地で cell suspension にしてゲラチンコートしたディッシュに 1 時間程度静置し、上清を回収することでフィーダー細胞を除去して、iPS 細胞を回収した。この iPS 細胞を上述の無血清培地を用いて 37℃5%CO_2で、５日間浮遊培養した。その後、同様の培地を用いて接着での培養を 37℃で、8 日間行った。

[００８９]

（３）BMP4 の影響

培地に BMP4 0.5nM から 5nM を day0-5 もしくは day3-5 の間添加する以外は、上記と同様にして iPS 細胞の分化誘導を行い、神経堤細胞誘導効率に対する影響を検討した。

[００９０]

（４）FGF の影響

培地に day0-5 の間、BMP4(0.5nM)及び Wnt3a(5ng/ml)及び bFGF(10ng/ml)を添加する以外は、上記と同様に iPS 細胞の分化誘導を行い、神経堤細胞誘導効率に対する影響を検討した。

[００９１]

（５）Wnt の影響

培地に day0-5 の間、BMP4(0.5nM)及び Wnt3a(5ng/ml)を添加して、上記と同様に iPS 細胞の分化誘導を行い、神経堤細胞誘導効率に対する影響を検討した。

[００９２]

３．分化誘導細胞の検証

分化誘導後の細胞について、免疫染色法により神経堤細胞マーカーである p75、AP-2、Sox-10 の発現をみた。また、フローサイトメトリーにより p75 陽性細胞率を解析した。免疫染色法及びフローサイトメトリー解析の詳細は下記に示す。

[００９３]

＜免疫染色法＞

Low affinity NGF receptor (p75)

PFA(paraformaldehyde)で細胞を固定した後、5%NSTを入れ60分室温に置きブロッキングした。その後、1次抗体(p75: Advanced Targeting Systems)で1晩反応（4℃）させた後、TBSで洗浄し、2次抗体に2時間反応（室温）させた。細胞核はHoechst33342で染色した。

[００９４]

(AP-2)

PFAで細胞を固定した後、5%NSTでブロッキングをおこない(60分)、一次抗体(AP-2 (5E4): Developmental studies hybridoma bank)で一晩反応(4℃)させた後、TBSで洗浄し、2次抗体に2時間反応させた。（室温）細胞核はHoechst33342で染色を行った。

[００９５]

(Sox10)

PFAで細胞を固定した後、5%NSTでブロッキングをおこない(60分)、一次抗体(Sox-10:Santacruz)で一晩反応(4℃)させた後、TBSで洗浄し、2次抗体に2時間反応させた。（室温）細胞核はHoechst33342で染色を行った。

[００９６]

＜フローサイトメトリー解析＞

細胞をコラゲナーゼ及びTrypsin/EDTAで回収し、1 次抗体(p75: Advanced Targeting Systems)を1000 倍希釈で添加し、30分4℃に静置した。遠心分離によりペレットを洗浄し、さらに2 次抗体(anti-rabbit alexa647)を100 倍希釈で添加し、30分4℃で静置した。遠心分離によりペレットを洗浄した後、PBS1-2ml に縣濁した。縣濁液をフローサイトメーターに供与し、p75陽性細胞率を調べた。

[００９７]

４．結果

無血清培地での浮遊培養後Day１、Day2、Day4の細胞を図１(a)-(c)に示す。細胞は浮遊細胞塊は徐々に大きくなっていった。（図１）。接着培養に切り替えてからの、Day7、Day9の細胞を図１(d)(e)に示す。浮遊培養した細胞塊から細胞が遊走しているのが確認された。

Day7 以降において、神経堤細胞マーカーである p75、AP-2、Sox10 を発現する細胞が認められた（図２）。

［００９８］

P75 陽性細胞のフローサイトメトリー解析の結果、分化誘導効率は、BMP4,Wnt3a, bFGF といったファクターを添加しない場合は 0.9％であるのに対して day0-5 の間、0.5nM の BMP4 を添加すると 3.1%へ増加し、day0-5 の間、5nM の BMP4 を添加すると 4.0%へと増加した。さらに day0-5 の間、0.5nM の BMP4 及び 5ng/mlWnt3a を添加すると 2.0%、0.5nM の BMP4 及び 5ng/ml の Wnt3a 及び 10ng/ml の bFGF を添加すると 1.7%であった。（図３）。

［００９９］

５．考察

以上の結果から、SFEB 法を利用した無血清培地でのフィーダー細胞を使わない培養により、マウス iPS 細胞から神経堤細胞を分化誘導できることが確認された。神経堤細胞への分化誘導効率は、BMP4 の添加により、有意に向上することが確認された。

［０１００］

実施例２：ヒト iPS 細胞からの神経堤細胞の分化誘導

１．ヒト iPS 細胞の培養：

ヒト iPS 細胞は、京都大学　山中伸弥教授より供与を受けた(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872)。MEF 細胞（KBL9284600 北山ラベス）は、下記に示す MEF フィーダー用培地を用いて維持した。

［０１０１］

ゲラチンコートした培養皿にマイトマイシン（MMC）処理した MEF 細胞を播種し、これをフィーダー細胞とした。この上にヒト iPS 細胞を播種し、iPS 細胞培養用培地中 37℃5%CO_2, 20%O_2で維持した。

［０１０２］

MEF フィーダー培地

DMEM(Invitrogen)

10%FBS(Sigma)

［０１０３］

iPS 細胞培養用培地

霊長類 ES 細胞用培地(リプロセル)

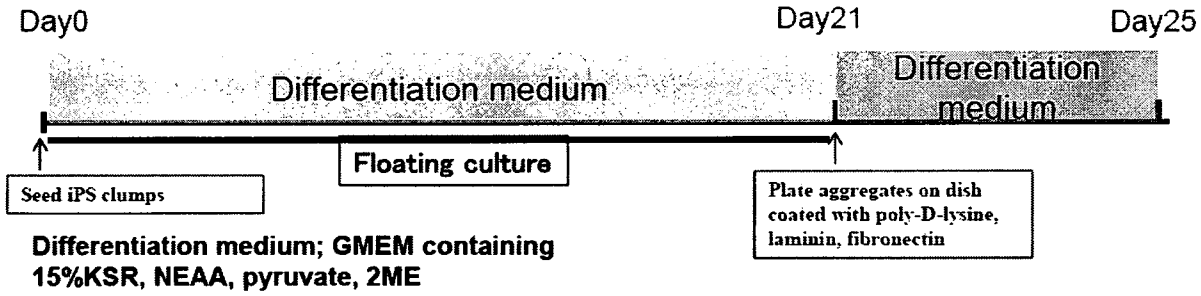
Basic FGF(Wako)(4ng/ml)

[0104]

2．分化誘導系（SFEB 法）の準備

マウス iPS 細胞での誘導条件をもとに、ヒト iPS 細胞から SFEB 法による神経堤細胞への分化誘導を行った。すなわち、0.25%トリプシン、0.1mg/ml コラゲナーゼ IV、1mMCaCl2、20%KSR を含んだ PBS を用いてヒト iPS 細胞のコロニーを回収し、ピペッティングによって 5 から 10 個の細胞塊とした。ゲラチンコートディッシュを用いてフィーダー細胞を除去した。このようにして用意したヒト iPS 細胞塊を非接着性の培養皿上で２１日間浮遊培養を行った後、４日間接着培養を行った。浮遊培養は、下記分化誘導培地（分化誘導培地 1 あるいは 2 のいずれか）に BMP4,Wnt,FGF を加えて調製した培地を用いて行った。接着培養は poly-D-lysine, laminin, fibronectin をコーティングした培養皿を用いて、浮遊培養と同様の培地を用いて行った。概要を下記に示す。

[化1]



[0105]

分化用培地 1

DMEM/F-12(Invitrogen)

KSR(Invitrogen)

Nonessential amino acid(Invitrogen)

L-glutamine(Invitrogen)

2-mercaptoethanol(Invitrogen)

[0106]

分化用培地 2

GMEM(Invitrogen)

KSR(Invitrogen)

Nonessential amino acids(Invitrogen)

Pyruvate(Invitrogen)

2-mercaptoethanol(Invitrogen)

[0107]

3．分化誘導細胞の検証

分化誘導後の細胞について、実施例１と同様にして、免疫染色法により神経堤細胞マーカーである p75 と Sox-10 の発現をみた。また、フローサイトメトリーにより p75 陽性細胞率を解析した。

[0108]

4．結果

免疫染色の結果、ヒト iPS 細胞から SFEB 法により誘導された細胞について、p75/sox10 陽性細胞は day25 で約 30%認められ、day25 以降は、減少する傾向がみられた（図４）。

フローサイトメトリーの結果、ヒト iPS 細胞から SFEB 法により誘導された細胞のうち 39.6%が神経堤細胞マーカーである p75 陽性であることが確認された（図５）。

[0109]

5．考察

以上の結果から、SFEB 法を利用した無血清培地でのフィーダー細胞を使わない培養により、ヒト iPS 細胞から神経堤細胞を分化誘導できることが確認された。

[0110]

実施例３：マウス iPS 誘導神経堤細胞の機能解析（ニワトリ胚への導入）

SFEB 法による分化誘導後、FCAS により分離した p75 陽性誘導神経堤細胞はスフェア形成能を有していた（図６ａ）。この細胞の遊走能を確認するためニワトリ胚(HH13)へ移植実験を行った。

[0111]

FACS によってソーティングした細胞を非接着性培養皿で下記培地を用いて浮遊培養を行い、neural crest sphere を作成した。作成した sphere を neural crest

のmedialもしくはlateral pathway(Hamburger and Hamiltonのステージ分類による9及び12－13）へ移植して細胞のmigration及び分化能について検討した。

[０１１２]

Neural crest sphere用培地

DMEM/F-12(1:1)(Invitrogen)

20ng/ml EGF(Sigma-Aldrich)

10ng/ml bFGF(Invitrogen)

LIF(leukemia inhibitory factor)

B27 supplement(Invitrogen)

[０１１３]

背側移植２４時間後に組織を固定し、DiI陽性細胞（移植した神経堤細胞）及びHNK-1染色によるニワトリ神経堤細胞の局在を確認した（図６ｄ）。その結果、移植したiPS由来神経堤細胞は、神経堤細胞に特徴的な遊走能を有していることが示唆された。

[０１１４]

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[０１１５]

本発明の方法は、異種フィーダー細胞や血清を用いることなく、多能性幹細胞から神経堤細胞群を分化誘導することができる。そのため、誘導された神経堤細胞群が外来の未知の病原体によって汚染される可能性がなく、臨床応用実現化のために理想的な方法である。

本発明の方法で得られる神経堤細胞群は多分化能を有しており、神経堤由来のさまざまな細胞にさらに分化誘導しうる。そのため、神経堤の誘導、形成、遊走の欠陥に起因する神経堤症等様々な疾患の再生医療に利用しうる。

請求の範囲

[請求項１]

多能性幹細胞を、無血清培地においてフィーダー細胞の非存在下で浮遊培養することにより、神経堤細胞群に分化誘導することを特徴とする、神経堤細胞群の分化誘導方法。

[請求項２]

神経堤細胞群が、p75 陽性及び Sox10 陽性である、請求項１に記載の方法。

[請求項３]

多能性幹細胞を浮遊培養した後、接着培養することを特徴とする、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項４]

培地が、血清代替物、非必須アミノ酸、ピルビン酸、及び 2－メルカプトエタノールから選ばれるいずれか１又は２以上を含有することを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項５]

培地が、血清代替物を含有することを特徴とする、請求項４に記載の方法。

[請求項６]

培地が、さらに Wnt、FGF（fibroblast growth factor）、及び BMP4 から選ばれる１又は２以上を含有することを特徴とする、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項７]

培地が、BMP4 を含有することを特徴とする、請求項６に記載の方法。

[請求項８]

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項９]

多能性幹細胞が ES 細胞である、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

[請求項１０]

請求項１～９のいずれか１項に記載の方法で得られた神経堤細胞群を含む培養物。

[請求項１１]

請求項１～９のいずれか１項に記載の方法で得られた神経堤細胞群を含む、神経堤に由来する細胞、組織の異常に起因する疾患を治療するための細胞製剤。

[請求項１２]

神経堤に由来する細胞、組織の異常に起因する疾患が、水疱性角膜症を含む角膜内皮機能不全、角膜ジストロフィー、発達緑内障、Rieger 奇形、先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィー、輪部デルモイド、強膜化角膜、円錐角膜及びペルーシド角膜変性を含む角膜形状異常、角膜瘢痕、角膜浸潤、角膜沈着、角膜浮腫、角膜潰瘍、化学物質及び熱によるものを含む眼外傷、角膜炎、角膜変性、角膜感染症、Hirschsprung 病、Waadenburg 症候群、ならびに限局性白皮症 Recklinghausen 病からなる群より選ばれるいずれかの疾患をである、請求項１１に記載の細胞製剤。

[請求項１３]

請求項１～９のいずれか１項に記載の方法で得られた神経堤細胞群を、さらに末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞、角膜実質細胞、線維柱帯細胞、虹彩実質細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、脂肪細胞、内分泌細胞、及びクロム親和性細胞からなる群より選ばれるいずれかの細胞群に分化誘導させる方法。

[請求項１４]

請求項１３に記載の方法で分化誘導された細胞群を含む培養物。

[請求項１５]

請求項１３に記載の方法で分化誘導された細胞群を含む細胞製剤。

図 1

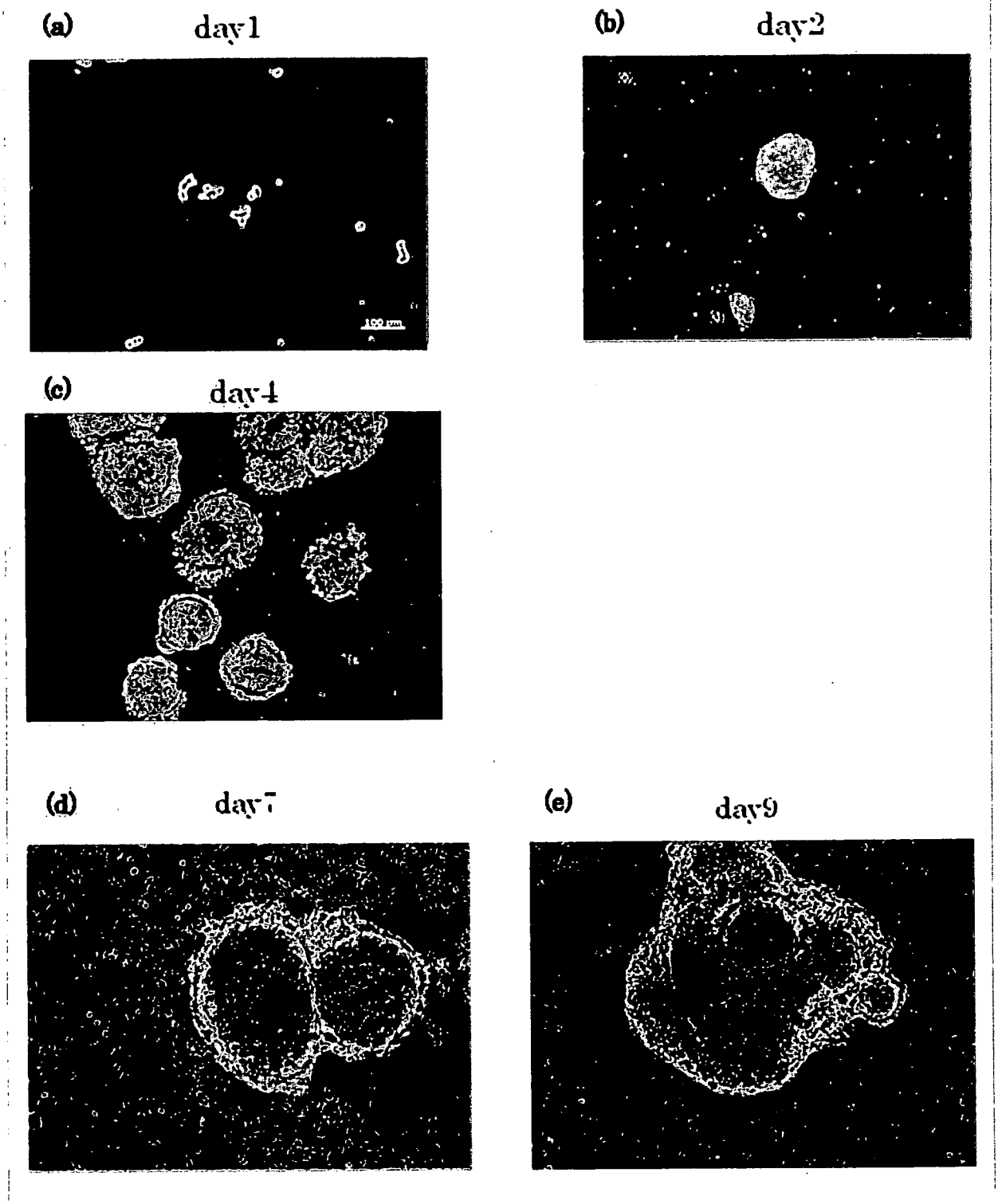


図 2

(a) p75 (b)sox10 (c)AP-2



(d) Hoechst , p75, Sox10

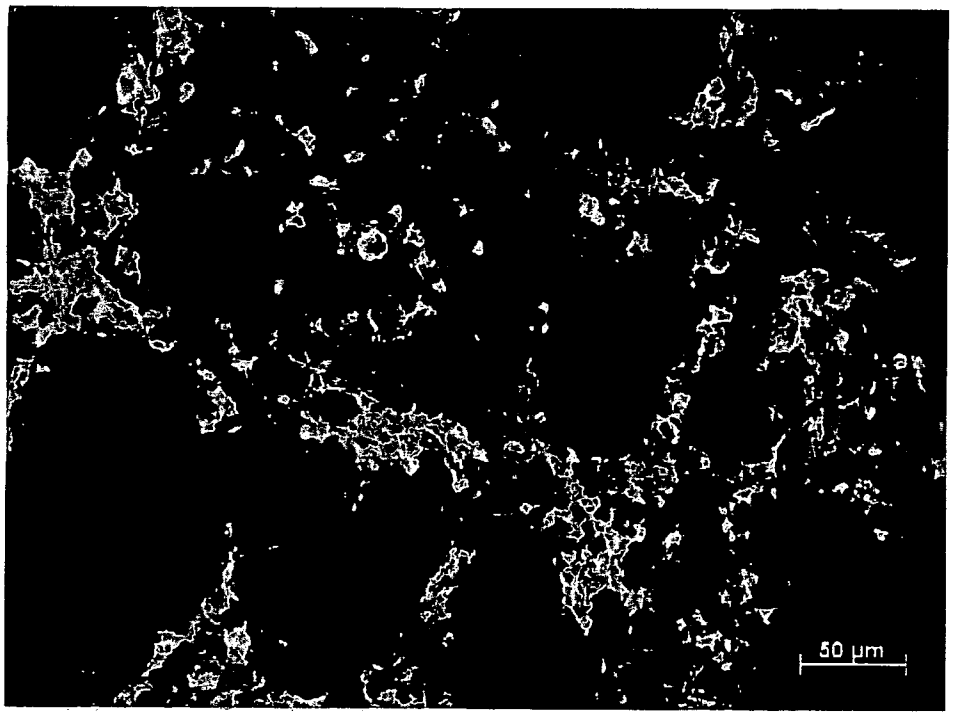


図３－１

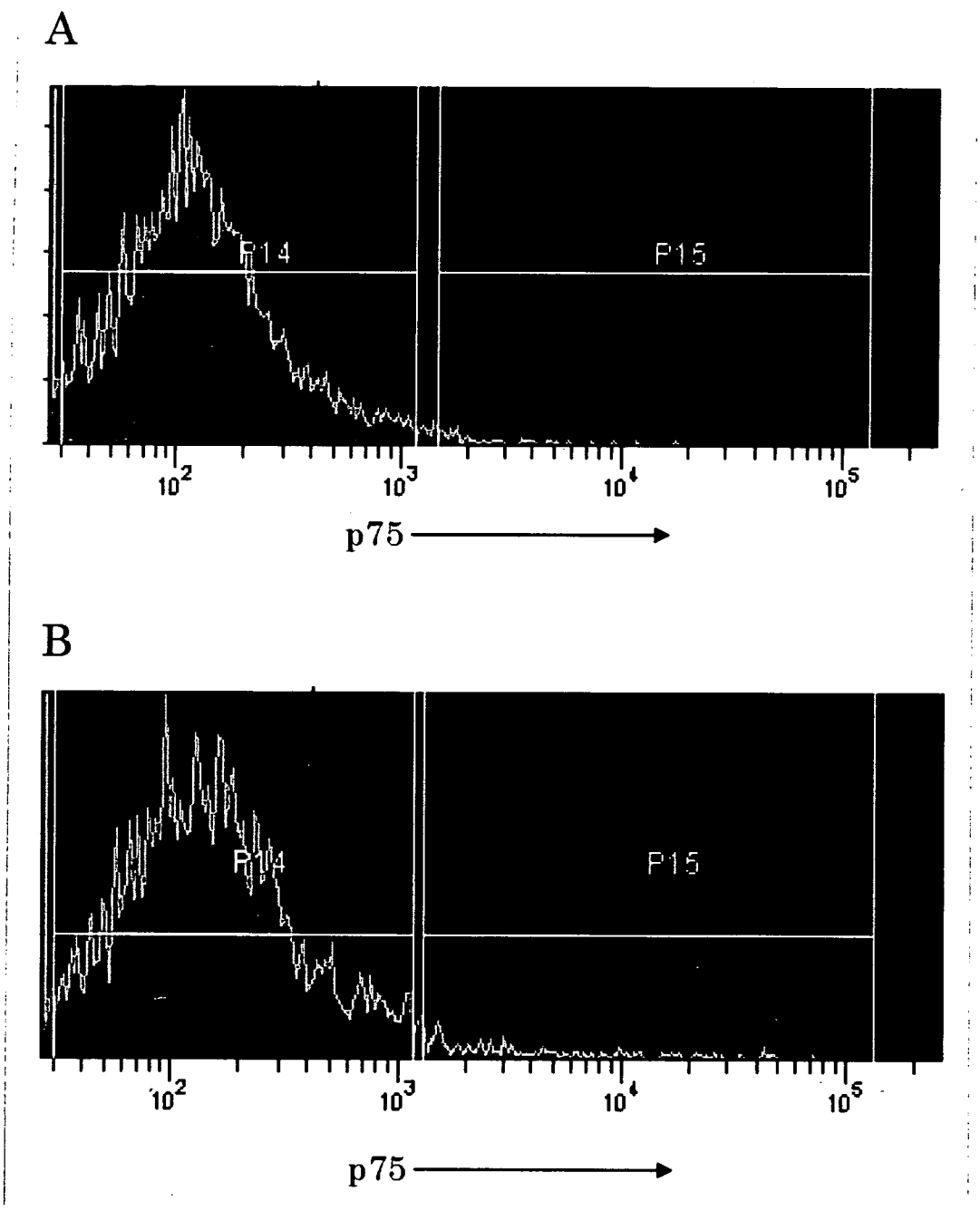
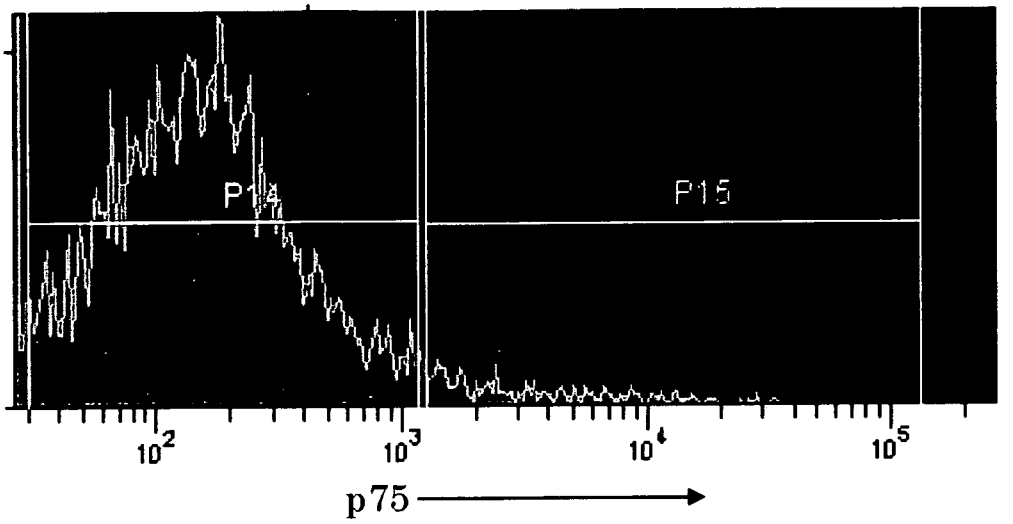
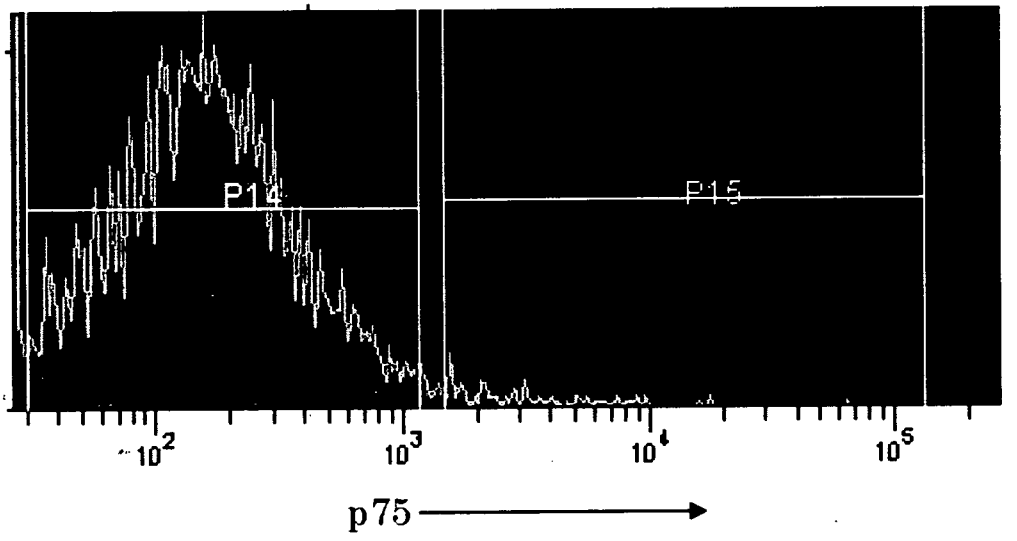


図３－２

C.


P14
P15
10^2
10^3
10^4
10^5
p75

D.


P14
P15
10^2
10^3
10^4
10^5
p75

E.

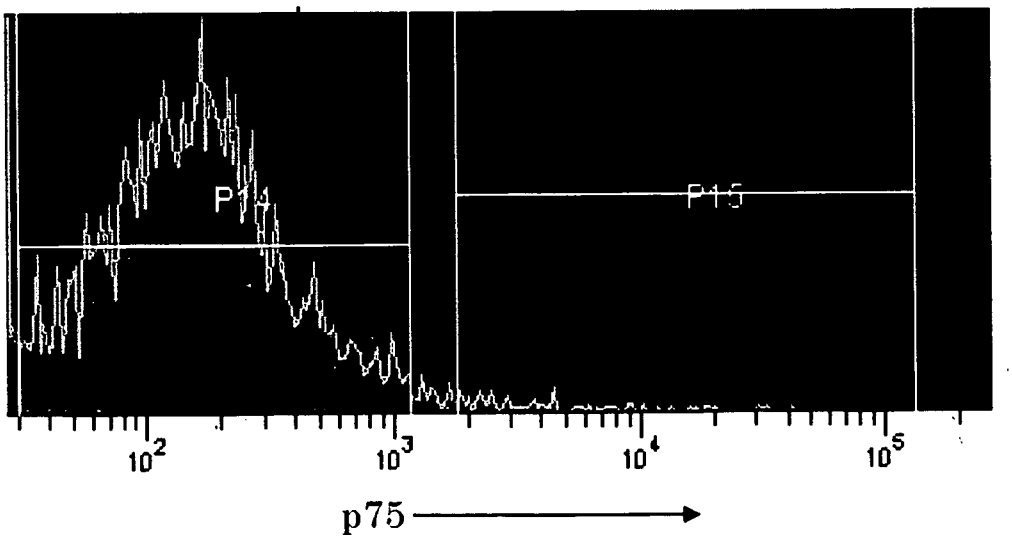
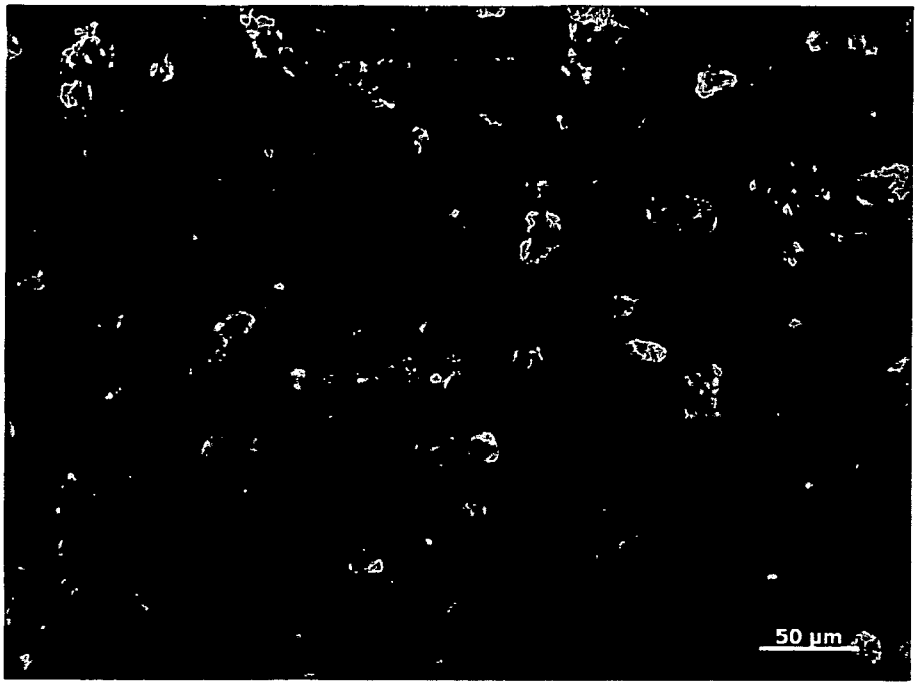

P14
P15
10^2
10^3
10^4
10^5
p75

図４

a



b

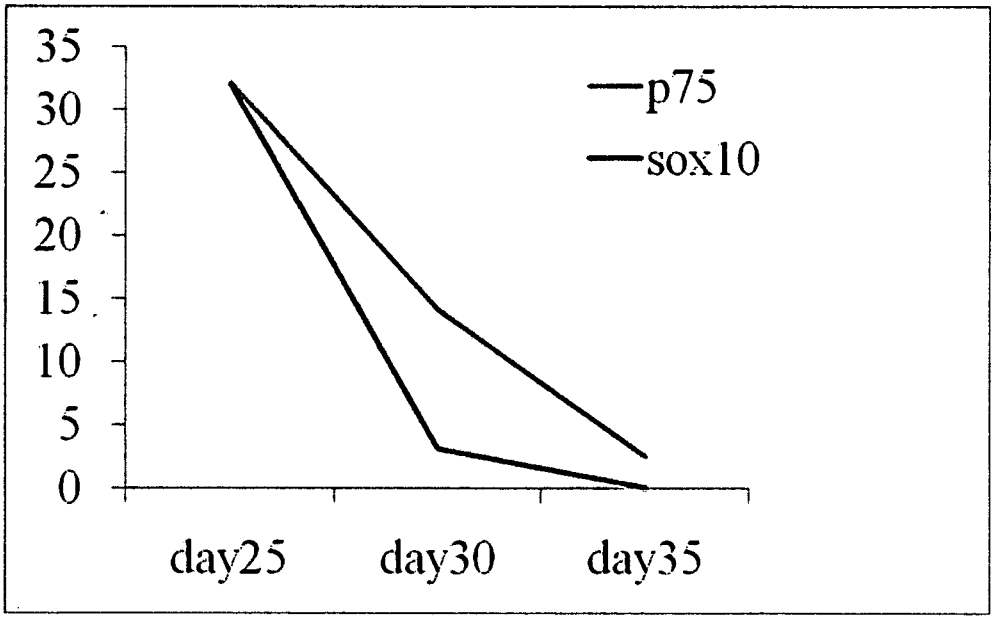


図5

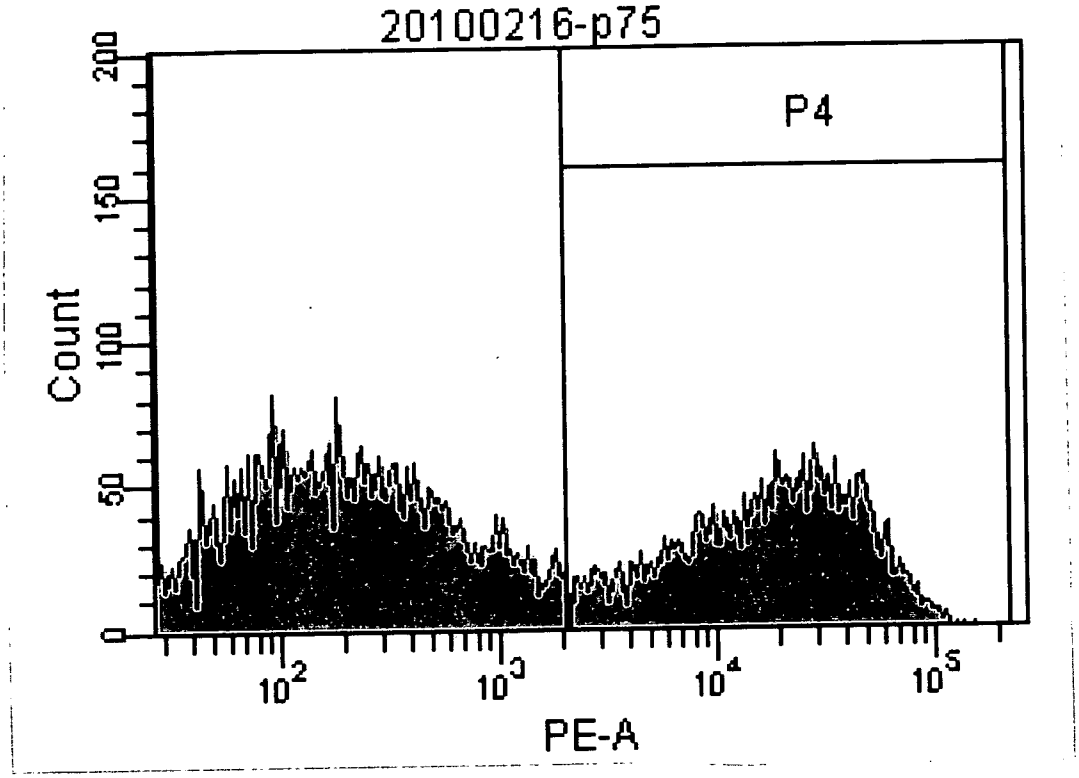
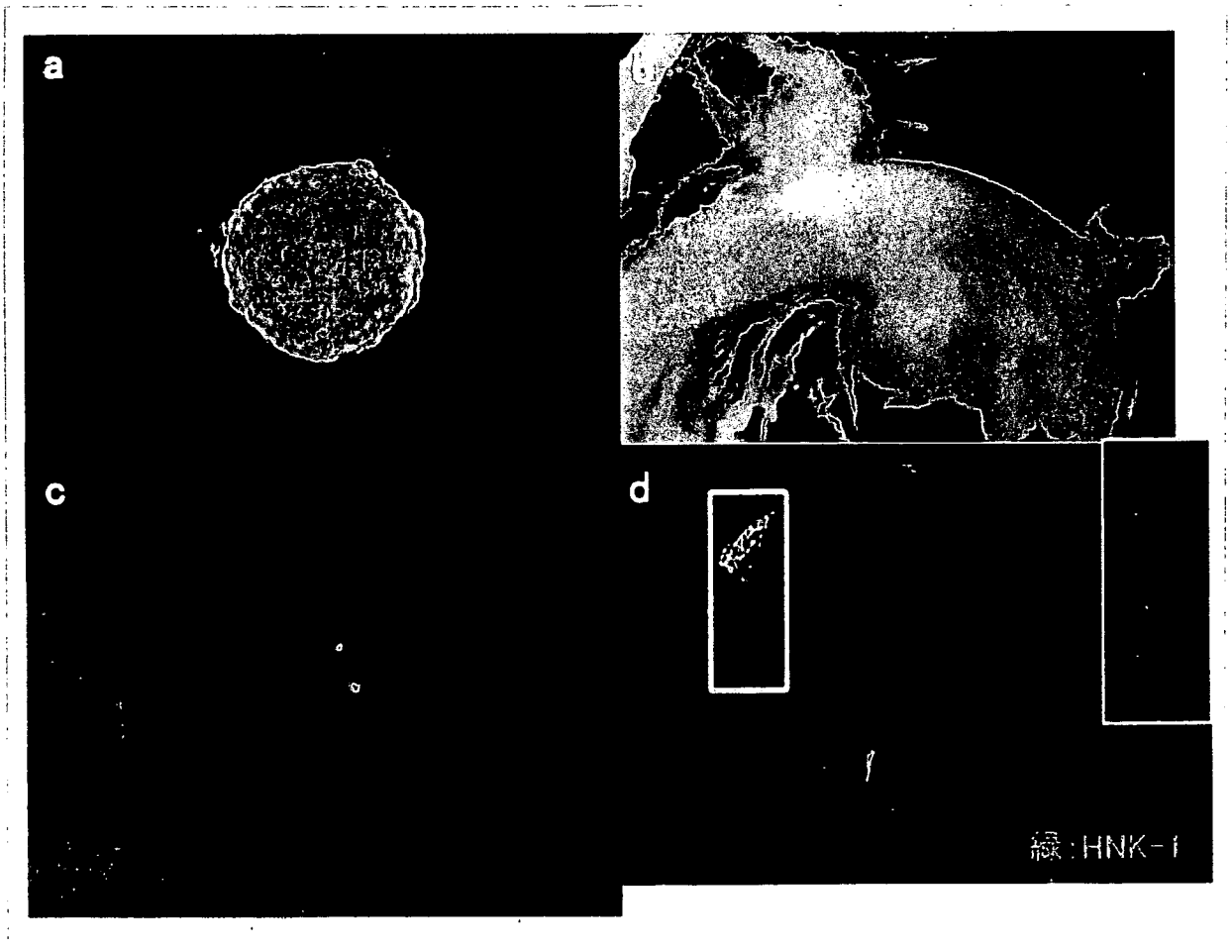

20100216-p75
P4
Count
200
150
100
50
0
10^2
10^3
10^4
10^5
PE-A

図6


a
c
d
緑：HNK-1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/059576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/0735(2010.01)i, *A61K35/30*(2006.01)i, *A61P17/00*(2006.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P25/28*(2006.01)i, *A61P27/02*(2006.01)i, *A61P27/06*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/0735, A61K35/30, A61P17/00, A61P25/00, A61P25/28, A61P27/02, A61P27/06, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2005/123902 A1 (Riken, Japan), 29 December 2005 (29.12.2005), claims; page 8, lines 25 to 29; page 8, lines 45 to 47 & US 2008/0044901 A1 & EP 1783205 A1	1-7,9,10 1-15
Y	Kiichi WATANABE, et al., Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells., Nature Neuroscience (2005), Vol.8, No.3, p.288-296	10 1-15
X Y	Stuart M Chambers, et al., Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling., Nature Biotechnology(2009 Mar.), Vol.27, No.3, p.275-280	10 1-15

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 August, 2010 (05.08.10)	17 August, 2010 (17.08.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/059576

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yuko AIHARA et al., "Mukessei Tanso Baiyokei ni yoru Mouse ES Saibo kara no Shinkeitei Saibo no Koritsuteki Yudoho no Kakuritsu", The Jourunal of Experimental & Applied Cell Culture Research (2008), vol.27, no.1, page 53	10 1-15
X Y	Yuko AIHARA et al., "Mukessei Tanso Baiyokei ni yoru Mouse ES Saibo kara no Shinkeitei Saibo no Koritsuteki Yudo", Yokohama Igaku (Heisei 21 Nen 5 Gatsu 30 Nichi), vol.60, no.1/2, pages 156 to 157	10 1-15
X Y	Yuko AIHARA et al., "Mouse ES Saibo kara Yudo sareta Shinkeitei Saibo no Tokusei Kaiseki", The Jourunal of Experimental & Applied Cell Culture Research (31 March 2009 (31.03.2009)), vol.28, no.1, page 58	10,13,14 1-15
Y	JP 2003-512439 A (Biogen Inc.), 02 April 2003 (02.04.2003), claims & US 2003/0027744 A1 & EP 1223981 A & WO 2001/030386 A1	11,12,15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５９５７６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0735(2010.01)i, A61K35/30(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P27/06(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0735, A61K35/30, A61P17/00, A61P25/00, A61P25/28, A61P27/02, A61P27/06, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１０年

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	WO 2005/123902 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2005.12.29, 請求項、第８頁第２５～２９行、第８頁第４５～４７頁 & US 2008/0044901 A1 & EP 1783205 A1	1-7,9,10 1-15
Y	Kiichi WATANABE,et al., Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells., Nature Neuroscience(2005),Vol.8,No.3,p.288-296	10 1-15

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０５．０８．２０１０	１７．０８．２０１０

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

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９８３９
高　美葉子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	Stuart M Chambers, et al., Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling., Nature Biotechnology (2009 Mar.), Vol. 27, No. 3, p. 275-280	10 1-15
X Y	相原祐子, et al., 無血清単層培養系によるマウスＥＳ細胞からの神経堤細胞の効率的誘導法の確立, 組織培養研究(2008), Vol. 27, No. 1, p. 53	10 1-15
X Y	相原祐子, et al., 無血清単層培養系によるマウスＥＳ細胞からの神経堤細胞の効率的誘導, 横浜医学(平成21年5月30日), Vol. 60, No. 1/2, p. 156-157	10 1-15
X Y	相原祐子, et al., マウスＥＳ細胞から誘導された神経堤細胞の特性解析, 組織培養研究(2009.03.31), Vol. 28, No. 1, p. 58	10, 13, 14 1-15
Y	JP 2003-512439 A (バイオジェン　インコーポレイテッド) 2003.04.02, 請求項 & US 2003/0027744 A1 & EP 1223981 A & WO 2001/030386 A1	11, 12, 15