(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
2021年3月4日(04.03.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/039965 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0793 (2010.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/032606

(22) 国際出願日： 2020年8月28日(28.08.2020)

(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 2019-157194 2019年8月29日(29.08.2019) JP

(71) 出願人:学校法人慶應義塾(**KEIO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目１５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 石川 充 (**ISHIKAWA Mitsuru**); 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo (JP). 岡野 栄之(**OKANO Hideyuki**); 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 棚井 澄雄，外 (**TANAI Sumio** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING PARVALBUMIN-POSITIVE NERVE CELLS, CELL, AND DIFFERENTIATION INDUCER

(54) 発明の名称： パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法、細胞、及び分化誘導剤

(57) **Abstract:** A method for producing parvalbumin-positive nerve cells, said method comprising: an expression induction step for inducing the expression of Ascl1 gene, Dlx2 gene and MEF2C gene in cells; and a differentiation step for, after inducing the expression, culturing the cells and differentiating the cells into parvalbumin-positive nerve cells. A cell into which Ascl1 gene, Dlx2 gene and MEF2C gene have been introduced in an expressible manner. A differentiation inducer for inducing the differentiation of cells into parvalbumin-positive nerve cells, said differentiation inducer comprising, as an active ingredient, Ascl1 gene, Dlx2 gene and MEF2C gene or products of these genes.

(57) 要約：細胞内で、Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤＩｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現を誘導する発現誘導工程と、前記発現誘導後の細胞を培養して、前記細胞からパルブアルブミン陽性神経細胞を分化させる分化工程と、を含む、パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法、Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤＩｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能なように導入された細胞、及び、Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤＩｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子、又はそれらの遺伝子産物を有効成分として含有する、細胞をパルブアルブミン陽性神経細胞に分化誘導させるための、分化誘導剤。

WO 2021/039965 A1

明　細　書

発明の名称 ：

パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法、細胞、及び分化誘導剤

技術分野

[0001] 本発明は、パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法、細胞、及び分化誘導剤に関する。

本願は、２０１９年８月２９日に、日本に出願された特願２０１９－１５７１９４号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] パルブアルブミン（Ｐａｒｖａｌｂｕｍｉｎ）陽性神経細胞は脳神経系の疾患に関与する重要な神経細胞のひとつであり、パルブアルブミン陽性神経細胞の存在量や機能低下は種々の精神神経疾患や神経発達障害を引き起こすと考えられている（非特許文献１、非特許文献２）。そのため長年その機能解明には注目がなされており、特に近年、ヒトｉＰＳ細胞などの多能性幹細胞からのパルブアルブミン陽性神経細胞の作出技術は強く望まれていた。

[0003] しかしながら、パルブアルブミン陽性神経細胞などを一部に含む抑制性神経細胞の特異的な分化誘導方法は報告されているものの、パルブアルブミン陽性神経細胞自体の誘導効率は極めて低いものであった（非特許文献３）。また、非特許文献４には、パルブアルブミン陽性神経細胞の出現率が、従来の誘導法の中では最も高効率である方法が報告されているが、この方法は、複数の分化誘導工程を介し、パルブアルブミン陽性神経細胞が産生されるのに８０日程度を要した後、産生されるパルブアルブミン陽性神経細胞の陽性率は２０～３０％程度である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Lewis DA et al., Trends Neurosci. 2012 Jan;35(1):57-67.

非特許文献2：Rodriguez RA et al., Front Mol Neurosci. 2018 Apr 24;11:

132.

非特許文献3：Yang N. et al., Nat Methods. 2017 Jun;14(6):621-628.

非特許文献4：Yuan F. et al., eLIFE. 2018 Sep 25;7. pii: e37382.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、分化誘導工程が少なく、短期間で、パルブアルブミン陽性神経細胞を高効率で製造する製造方法、前記パルブアルブミン陽性神経細胞に誘導可能な細胞、及び前記パルブアルブミン陽性神経細胞に分化誘導させるための分化誘導剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の態様を含む。

［１］ 細胞内で、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現を誘導する発現誘導工程と、前記発現誘導後の細胞を培養して、前記細胞からパルブアルブミン陽性神経細胞を分化させる分化工程と、を含む、パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法。

［２］ 前記発現誘導工程が、前記細胞内に、Ａｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む、［１］に記載のパルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法。

［３］ 前記発現誘導工程が、さらにＭＥＦ２Ｃ遺伝子を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む、［２］に記載のパルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法。

［４］ 前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、［１］～［３］のいずれか一項に記載の製造方法。

［５］ 前記発現誘導工程が、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種を、同時に発現誘導する工程を含む、［１］～［４］のいずれか一項に記載の製造方法。

［６］　前記発現誘導工程が、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種を、発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む、［５］に記載の製造方法。

［７］　前記マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、［５］または［６］に記載の製造方法。

［８］　前記細胞が線維芽細胞又は多能性幹細胞である、［１］～［７］のいずれか一項に記載の製造方法。

［９］　前記発現誘導工程を１～５日間行う、［１］～［８］のいずれか一項に記載の製造方法。

［１０］　前記分化工程を１０日間以上行う、［１］～［９］のいずれか一項に記載の製造方法。

［１１］　Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能なように導入された細胞。

［１２］　前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、［１１］に記載の細胞。

［１３］　さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種が、発現可能なように導入された［１１］又は［１２］に記載の細胞。

［１４］　前記マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、［１３］に記載の細胞。

［１５］　前記細胞が線維芽細胞又は多能性幹細胞である、［１１］～［１４］のいずれか一項に記載の細胞。

［１６］　Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤｌｘＺ遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子、又はそれらの遺伝子産物を有効成分として含有する、細胞をパルブアルブミン陽性神経細胞に分化誘導させるための、分化誘導剤。

［１７］　前記Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤｌｘＺ遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、［１６］に記載の分化誘導剤。

［１８］　さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、又はそれらの遺伝子産物を有効成分として含有する、［１６］又は［１７］に記載の分化誘導剤。

［１９］　前記マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、［１８］に記載の分化誘導剤。

［２０］　前記細胞が線維芽細胞又は多能性幹細胞である、［１６］～［１９］のいずれか一項に記載の分化誘導剤。

発明の効果

[0007]　本発明によれば、分化誘導工程が少なく、短期間で、パルブアルブミン陽性神経細胞を高効率で製造する製造方法、前記パルブアルブミン陽性神経細胞に誘導可能な細胞、及び前記パルブアルブミン陽性神経細胞に分化誘導させるための分化誘導剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1A]ヒト多能性幹細胞へのｐｉｇｇｙＢａｃベクター導入と薬剤選択によるクローニングのタイムコースを示す。

[図1B]ヒト多能性幹細胞へのレンチウイルスベクターの感染とドキシサイクリンによるＴｅｔ駆動性神経誘導のタイムコースを示す。図中、ＭＣは培地交換、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ　Ｐｌｕｓ　Ｂ２７　Ｐｌｕｓは神経細胞用培地、Ｄｏｘはドキシサイクリンをそれぞれ示す。

[図1C]遺伝子導入に用いているプラスミドベクターおよびレンチウイルスベ

クターを示した図である。図中、ＣＭＶ、ＰＧＫ、ＣＡＧ、ＥＦ１ａは、恒常発現遺伝子プロモーターを示す。Ｐｕｒｏ．Ｒは、ピューロマイシン耐性遺伝子、Ｈｙｇｒｏ．Ｒは、ハイグロマイシン耐性遺伝子、Ｎｅｏ．Ｒは、Ｇ４１８耐性遺伝子、Ｂｌａｓｔ．Ｒは、ブラストサイジン耐性遺伝子、Ｔｅｔは、ＴｅｔオペレーターＤＮＡ反復エレメント、ＨｙＰＢａｓｅは、トランスポゼース、ｒｔＴＡ３Ｇは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子、ＩＴＲは、逆向き反復配列をそれぞれ示す。

[図2]パルブアルブミン遺伝子（ＰＶＡＬＢ）レポーター細胞株の作製スキームを示した図である。

[図3]神経誘導後２０日（発現誘導５日、分化１５日）経過後の細胞の免疫染色像を示した図である。図中、ＰＶ－ＧＦＰはＡｎｔｉ－ＰＶ抗体での免疫染色像、ＧＦＰ／Ｐｈａｓｅは明視野像、Ｈｏｅｃｈｓｔは核染色像、Ａｎｔｉ－ＧＦＰは、Ａｎｔｉ－ＧＦＰ抗体での免疫染色像をそれぞれ示す。＋は遺伝子導入、－は遺伝子導入なしをそれぞれ示す。

[図4]発現誘導後２０日（発現誘導５日、分化１５日）経過後の細胞の免疫染色像を示した図である。左図は、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子の一過性発現を行わなかった場合、右図は、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子の一過性発現を行った場合の細胞の免疫染色像をそれぞれ示す。＋は遺伝子導入、－は遺伝子導入なしをそれぞれ示す。矢印はＡｎｔｉ－ＰＶ抗体およびＡｎｔｉ－ＧＦＰ抗体で染色される細胞の典型的な細胞を示している。

[図5]定量ＰＣＲ法によるパルブアルブミンｍＲＮＡ発現レベルの解析を示したグラフである。図中、＋は遺伝子導入、－は遺伝子導入なしをそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0009] ［パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法］

１実施形態において、本発明は、細胞内で、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現を誘導する発現誘導工程と、前記発現誘

導後の細胞を培養して、前記細胞からパルブアルブミン陽性神経細胞を分化させる分化工程と、を含む、パルブアルブミン陽性神経細胞（以下、ＰＶ＋神経細胞とも称する）の製造方法を提供する。

[0010] 実施例において後述するように、本実施形態の製造方法により、分化誘導工程が少なく、短期間で、ＰＶ＋神経細胞を高効率で製造する方法を提供することができる。従来のＰＶ＋神経細胞の分化誘導方法は、分化誘導工程が多く、ＰＶ＋神経細胞の含量は、最大でも２０～３０％程度である。しかも、ＰＶ＋神経細胞に分化誘導する期間が６０～８０日程度と長期間を要していた。これに対し、本実施形態の方法によれば、分化誘導工程が少なく、２０日間で８５％以上がＰＶ＋神経細胞である細胞集団を製造することができる。

[0011] 本実施形態の製造方法に用いられる細胞としては、ＰＶ＋神経細胞に誘導可能な細胞であれば特に制限はなく、例えば、線維芽細胞、間葉系幹細胞、多能性幹細胞等が挙げられるが、線維芽細胞及び多能性幹細胞が好ましい。

[0012] 本明細書において、多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）等が挙げられる。多能性幹細胞はヒト由来の細胞であってもよく、マウス、ラット、ブタ、ヤギ、ヒツジ、サル等の非ヒト動物由来の細胞であってもよい。

[0013] また、上記の多能性幹細胞は、健常人由来の人工多能性幹細胞であってもよく、神経疾患患者由来の人工多能性幹細胞であってもよい。神経疾患患者由来の人工多能性幹細胞からＰＶ＋神経細胞を製造した場合、得られたＰＶ＋神経細胞を神経疾患のモデルとして用いることができる。このようなＰＶ＋神経細胞は、神経疾患のメカニズムの解明等に有用である。

[0014] 本実施形態の製造方法において、Ａｓｃｌ１は、神経発生初期に働くｂＨＬＨファミリーに属する転写因子である。Ｄｌｘ２は、大脳基底核原基由来の細胞で発現し、大脳のＧＡＢＡ作動性神経細胞の産生において重要な転写因子である。ＭＥＦ２Ｃは、筋細胞及び神経細胞で特に高い発現を示す転写因子である。ヒト及びマウスのＡｓｃｌ１、Ｄｌｘ２及びＭＥＦ２Ｃの蛋白

質及びｍＲＮＡのＮＣＢＩアクセッション番号の例を下記表１及び表２に示す。

[0015] [表1]

蛋白質	ヒト	マウス
Ascl1	NP_004307.2	NP_032579.2
Dlx2	NP_004396.1	NP_034184.1
MEF2C	NP_001351262.1	NP_001334503.1

[0016] [表2]

mRNA	ヒト	マウス
Ascl1	NM_004316.4	NM_008553.5
Dlx2	NM_004405.4	NM_010054.2
MEF2C	NM_001364333.2	NM_001347574.1

[0017] 前記Ａｓｃｌ１、Ｄｌｘ２及びＭＥＦ２Ｃの各因子は、ＰＶ＋神経細胞に分化誘導させる活性を有する限り変異を有していてもよい。ＰＶ＋神経細胞に分化誘導させる前記各因子が変異を有する場合、当該因子は、表１又は表２に例示されるＮＣＢＩアクセッション番号により特定されるタンパク質又はｍＲＮＡに対して、８０％以上の配列同一性を有することが好ましく、９０％以上の配列同一性を有することがより好ましく、９５％以上の配列同一性を有することが更に好ましい。

[0018] ここで、アミノ酸配列の配列同一性は、対象のアミノ酸配列（対象アミノ酸配列）が、基準となるアミノ酸配列（基準アミノ酸配列）に対して一致している割合を示す値である。基準アミノ酸配列に対する、対象アミノ酸配列の配列同一性は、例えば次のようにして求めることができる。まず、基準アミノ酸配列及び対象アミノ酸配列をアラインメントする。ここで、各アミノ酸配列には、配列同一性が最大となるようにギャップを含めてもよい。続いて、基準アミノ酸配列及び対象アミノ酸配列において、一致したアミノ酸の数を算出し、下記式（１）にしたがって、配列同一性を求めることができる。

配列同一性（％）＝一致したアミノ酸の数／対象アミノ酸配列の総アミノ酸数×１００ …（１）

[0019] 同様に、基準塩基配列に対する、対象塩基配列の配列同一性は、例えば次のようにして求めることができる。まず、基準塩基配列及び対象塩基配列をアラインメントする。ここで、各塩基配列には、配列同一性が最大となるようにギャップを含めてもよい。続いて、基準塩基配列及び対象塩基配列において、一致した塩基の数を算出し、下記式（２）にしたがって、配列同一性を求めることができる。

配列同一性（％）＝一致した塩基の数／対象塩基配列の総塩基数×１００…（２）

[0020] 本実施形態の製造方法において、ＰＶ＋神経細胞に分化誘導させる因子はタンパク質であってもよく、当該タンパク質をコードする遺伝子（核酸）であってもよい。また、遺伝子（核酸）はｍＲＮＡであってもよいし、ＤＮＡであってもよい。上記の因子がＤＮＡである場合、当該ＤＮＡは、発現ベクターに含まれていてもよい。

[0021] 本実施形態の製造方法において、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子は、発現を誘導することができる限り、細胞内に内在するものであっても、外部から発現可能なように導入されたものであってもよい。前記遺伝子を外部から発現可能なように導入する場合は、前記発現誘導工程は、Ａｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む。前記遺伝子導入工程は、さらに、ＭＥＦ２Ｃ遺伝子を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含んでいてもよい。前記遺伝子導入工程においては、例えば、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子を含む発現ベクターを構築して、細胞内に導入することができる。

[0022] 本実施形態の製造方法において、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子は、外的刺激の応答に応じて発現調整可能な発現カセットにより発現制御することができる。そのような発現カセットは、外的刺激に応答して下流の遺伝子の発現を誘導できるプロモーターと、当該プロモーターによって発現が制御される、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥ

Ｆ２Ｃ遺伝子を少なくとも含む核酸コンストラクトである。

[0023] プロモーターとしては、外的刺激に応答して下流の遺伝子の発現を誘導できるプロモーターであれば特に制限はなく、例えば、外的刺激がテトラサイクリン系抗生物質（テトラサイクリン、またはドキシサイクリン等のテトラサイクリン誘導体）の存在である場合には、テトラサイクリン系抗生物質とテトラサイクリントランスアクチベーターとの複合体の結合によって、下流の遺伝子の発現を誘導できるプロモーターが挙げられる。一方、外的刺激がテトラサイクリン系抗生物質の非存在である場合には、テトラサイクリンリプレッサーの解離によって、下流の遺伝子の発現を誘導できるプロモーターが挙げられる。また、外的刺激がエクジステロイド（エクジソン、ムリステロンＡ、ポナステロンＡ等）の存在である場合には、エクジステロイドと、エクジソン受容体－レチノイド受容体複合体との結合によって、下流の遺伝子の発現を誘導できるプロモーターが挙げられる。さらに、外的刺激がＦＫＣｓＡの存在である場合には、ＦＫＣｓＡと、ＦＫＢＰ１２に融合したＧａｌ４ ＤＮＡ結合ドメイン－シクロフィリンに融合したＶＰ１６アクチベータードメイン複合体との結合によって、下流の遺伝子の発現を誘導できるプロモーターが挙げられる。

[0024] 発現カセットは、必要に応じて、エンハンサー、サイレンサー、選択マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子）、ＳＶ４０複製起点等を含んでいても良い。また、当業者であれば、利用する前記プロモーターの種類等を考慮して、エンハンサー、サイレンサー、選択マーカー遺伝子およびターミネーター等を、公知のものから適宜選択して組み合わせることにより、所望の発現レベルにてＡｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現を誘導することが可能な発現カセットを構築することができる。

[0025] このように、外的刺激は、薬物の存在または非存在下での培養が含まれる。例えば、テトラサイクリン発現誘導システム（例えば、タカラなど）用いて、ドキシサイクリン存在下で目的遺伝子の発現を制御する。例えば、Ａｓ

ｃｌ１遺伝子、ＤｌｘＺ遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－Ｏｎ）のプロモーター制御下で発現できるようにベクターを作製することができる。すなわち、本実施形態の製造方法において、Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤｌｘＺ遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）であってもよい。

次に、前記Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤｌｘＺ遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子発現ベクターを細胞にトランスフェクションして、トランスジェニック細胞を作製する。一方で、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）を発現するＴｅｔ－Ｏｎ調節プラスミドを作製し、当該調節プラスミドを前記細胞に導入する。培地中にドキシサイクリンを添加すると、ｒｔＴＡはテトラサイクリン応答因子と結合して、下流の遺伝子発現が誘導される。また、培地中にドキシサイクリンが存在しないと、下流の目的遺伝子の発現は誘導されない。

[0026] テトラサイクリン制御性発現システムは、市販のもの（例えば、Ｋｎｏｃｋｏｕｔ™ Ｔｅｔ ＲＮＡｉ Ｓｙｓｔｅｍ Ｐ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製））を用いてもよく、またはＤｉｃｋｉｎｓ ＲＡ． ｅｔ ａｌ．，（Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ， ３９（７）： ９１４－９２１ （２００７））に記載の方法で作製してもよい。

[0027] 本実施形態の製造方法において、Ａｓｃｌ１遺伝子、ＤｌｘＺ遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現誘導と同時に、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種を、発現誘導することが好ましく、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子の全てを同時に発現することがより好ましい。マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子は、内在性のものであっても、外部から発現可能なように導入したものであってもよい。前記遺伝子を外部から発現可能なように導入する場

合は、前記発現誘導工程は、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む。外部から発現可能なように導入する場合は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子と同様に、発現カセットを構築して、細胞に導入することができる。また、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－Ｏｎ）のプロモーター制御下で発現できるようにベクターを作製することができる。すなわち、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）であってもよい。

[0028] ヒトｍｉＲＮＡ－９／９*、ヒトｍｉＲＮＡ－１２４の核酸配列のＮＣＢＩアクセッション番号は、それぞれ、NR_029692.1、NR_029669.1である。また、マウスｍｉＲＮＡ－９／９*、マウスｍｉＲＮＡ－１２４の核酸配列のＮＣＢＩアクセッション番号は、それぞれ、NR_029818.1、NR_029814.1である。また、ヒトＢｃｌｘＬの蛋白質、ｍＲＮＡのＮＣＢＩアクセッション番号は、それぞれNP_001309169.1、NM_001322240.2である。マウスＢｃｌｘＬの蛋白質、ｍＲＮＡのＮＣＢＩアクセッション番号は、それぞれNP_001341982.1、NM_001355053.1である。

[0029] 本実施形態の製造方法において、前記発現カセットを細胞に導入する方法としては、特に制限はなく、公知の手法を適宜選択して用いることができる。例えば、前記発現カセットを適当な発現ベクターに挿入し、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクター等のウイルスベクターを用いたウイルス感染、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、ＤＥＡＥデキストラン法、マイクロインジェクション法等の公知の形質転換方法により行うことができる。

[0030] 発現ベクターとしては、細胞中でこれらの遺伝子を発現させることができ

る限り特に制限されず、プラスミドベクターであってもよく、ウイルスベクターであってもよく、トランスポゾンベクターであってもよい。ウイルスベクターは遺伝子の導入効率が高く使いやすい。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター等が挙げられる。トランスポゾンベクターやレンチウイルスベクターを用いた場合は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子、ＭＥＦ２Ｃ遺伝子、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子をゲノム上に複数コピー挿入することができる。これによって、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－Ｏｎ）の神経誘導用細胞としての状態を維持できる。さらには上述の外的刺激によって、遺伝子等のゲノム挿入がなされなかった細胞を排除し、ＰＶ＋神経細胞に分化誘導可能な細胞のみを維持することができる。また、トランスポゾンベクターは、必要に応じて細胞から完全に除去することができる。このようなトランスポゾンベクターとしては、例えばＰｉｇｇｙｂａｃトランスポゾンベクター等が挙げられる。

[0031] また、前記外的刺激に関しては、当業者であれば、利用する前記プロモーターの種類等を考慮して、後述の培地への添加量を適宜調製することができる。例えば、外的刺激がドキシサイクリンの存在である場合には、ドキシサイクリンの好適な添加濃度としては、０．１～１０μｇ／ｍｌ、より好ましくは１～２μｇ／ｍｌである。

[0032] 細胞内で、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現を誘導する発現誘導工程のために、前記外的刺激が添加される培養液としては、神経細胞用培地、例えば、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ　Ｐｌｕｓ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）等が挙げられる。培養液には、培養に通常添加される添加物が含まれていてもよい。前記添加物としては、γ－セレクターゼ阻害剤、ジブチリルｃＡＭＰ（ｄｂｃＡＭＰ）、Ｙ２７６３２等のＲＯＣＫ阻害剤等が挙げられる。γ－セレクターゼ阻害剤としては、ＤＡＰＴ（γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ　ｉｎｈｉｂ

ｉｔｏｒ ＩＸ）、Ｃｏｍｐｏｕｎｄ Ｅ、γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＸＩ、γ－ｓｅｃｒｅｔａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ＩＩＩ等が挙げられる。ただし、発現誘導工程及びそれに続く分化工程においては、血清を加える必要はなく、本実施形態の製造方法の一態様においては、ＰＶ＋神経細胞への分化誘導は、血清非存在下で行われる。

[0033] 本実施形態の製造方法において、前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子を発現誘導する前に、細胞を単一細胞に解離させて播種しなおしてもよい。ここで、単一細胞に解離させるとは、培養容器に接着している細胞を１個ずつばらばらに解離させることを意味する。単一細胞への解離は、通常、細胞の解離に用いられる、アキュターゼ、トリプシン、コラゲナーゼ、トリプルセレクト［ＴｒｙｐＬＥ（登録商標）Ｓｅｌｅｃｔ］等の酵素処理を行い、ピペッティングすること等により行うことができる。

[0034] Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子を含む細胞、又は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が発現可能なように導入された細胞は、発現誘導工程を１～８日間、好ましくは１～５日間行う。ドキシサイクリンなどの外的刺激の場合は、外的刺激を１～８日間、好ましくは１～５日間存在させる。前記細胞は、続いて発現誘導工程を終了させて培養する分化工程の結果、ＰＶ＋神経細胞に分化される。発現誘導工程終了後、前記細胞は１０日以上、好ましくは２０日以上培養する。前記分化工程に用いられる培地としては、神経細胞用培地、例えば、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ Ｐｌｕｓ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）等が挙げられる。前記分化工程においては、培養に通常添加される添加物が含まれていてもよい。前記添加物としては、ジブチリルｃＡＭＰ（ｄｂｃＡＭＰ）、ＢＤＮＦ、ＧＤＮＦ、アルコルビン酸等が挙げられる。

[0035] 前記発現誘導工程終了後の分化工程により、前記遺伝子を含む細胞は、ＰＶ＋神経細胞に分化される。ＰＶ＋神経細胞に分化されたことは、例えば、発現誘導工程の終了後から一定期間（例えば４０日間）中に、神経細胞中の

ＰＶの発現により確認することができる。また、神経細胞マーカーＴＵＢＢ３や、ＰＶ＋神経細胞で上昇すると考えられているＧＲＩＡ４、ＳＹＴ１、ＮＲＸＮ２ａ等の遺伝子の発現により確認することができる。例えば、細胞の集団が、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が導入され、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が導入され、ドキシサイクリンの外的刺激が与えられる場合、集団の少なくとも７０％、少なくとも８５％が、外的刺激終了後から５～２０日、好ましくは１０～４０日の期間のうちにＰＶ＋神経細胞へと分化したことを確認することができる。

[0036] ［発現誘導細胞］

１実施形態において、本発明は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能なように導入された細胞を提供する。本実施形態の細胞は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子に、さらにＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能なように導入されていることにより、ＰＶ＋神経細胞に分化することができる。本実施形態の細胞は、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、発現可能なように導入されていてもよい。Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子にさらにＭＥＦ２Ｃ遺伝子を導入することによって、分化効率の高い前駆細胞とし、さらに加えて、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、発現可能なように導入されることにより、短期間、高効率でＰＶ＋神経細胞を得ることができる。

[0037] 本実施形態の発現誘導細胞において、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）であってもよい。また、本実施形態の細胞が、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、発現可能なように導入されている場合、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）であってもよい。

[0038] 本実施形態のＰＶ＋神経細胞を分化誘導させるための細胞は、上述した製造方法の発現誘導工程において記載した方法により製造することができる。

本実施形態の細胞において、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子に、さらにＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能なように導入される細胞としては、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能であり、ＰＶ＋神経細胞に分化できる細胞であれば特に制限はなく、例えば、線維芽細胞、間葉系幹細胞、多能性幹細胞等が挙げられるが、線維芽細胞及び多能性幹細胞が好ましい。

[0039] ［分化誘導剤］

１実施形態において、本発明は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子、又はそれらの遺伝子産物を有効成分として含有する、細胞をＰＶ＋神経細胞に分化誘導させるための、分化誘導剤を提供する。本実施形態の分化誘導剤は、前記ＰＶ＋神経細胞への分化能を有さない未分化細胞に、ＰＶ＋神経細胞への分化能を付与することができる。本実施形態の分化誘導剤は、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ

－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子を、有効成分として含有していてもよい。Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子に加えて、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子に加えて、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子を、有効成分として含有することにより、さらに短期間、高効率でＰＶ＋神経細胞を得ることができる。したがって、本発明の分化誘導剤は、前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子に、さらにマイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる遺伝子群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子に、さらにマイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子を含む分化誘導剤である。

[0040] 本実施形態の分化誘導剤において、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）であってもよい。また、本実施形態の分化誘導剤が、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種、好ましくは、さらに、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子を有効成分として含有する場合、マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９＊）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子は、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）であってもよい。

[0041] 本実施形態の分化誘導剤において、ＰＶ＋神経細胞に分化誘導させる有効成分は、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子であって

も、それらの遺伝子産物であってもよい。前記遺伝子産物としては、前記遺伝子から産生される蛋白質自体のほか、前記蛋白質とその他の蛋白質又はペプチドなどとの融合遺伝子産物の形態であってもよい。例えば、緑色蛍光タンパク質(ＧＦＰ)との融合蛋白質やヒスチジンタグなどのペプチドとの融合遺伝子産物を用いることもできる。このような融合遺伝子産物の調製方法は公知であり、当業者は目的に応じて適宜の融合遺伝子産物を容易に設計して調製することが可能である。

[0042] 前記遺伝子は、発現ベクターに含まれていてもよい。すなわち、本実施形態の分化誘導剤は、ＰＶ＋神経細胞に分化誘導させる前記遺伝子を発現可能なように導入された発現ベクターであってもよい。前記発現ベクターは、上述した製造方法の発現誘導工程において挙げた発現ベクター等が用いられる。

[0043] 本実施形態の分化誘導剤を細胞に導入することにより、細胞をＰＶ＋神経細胞に分化誘導させることができる。本実施形態の分化誘導剤がタンパク質、ＲＮＡ等である場合、分化誘導剤を細胞に導入する方法としては、例えば、細胞への接触、マイクロインジェクション、ウイルス様粒子を用いる方法、リポフェクション法、これらの組み合わせ等が挙げられる。

[0044] また、本実施形態の分化誘導剤がベクター等である場合、分化誘導剤を細胞に導入する方法としては、例えば、細胞への接触、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、ＤＥＡＥ－デキストラン法、リン酸カルシウム法、これらの組み合わせ等が挙げられる。また、ベクターがウイルスベクターである場合には、細胞に感染させることにより細胞に導入することもできる。

[0045] 本実施形態の分化誘導剤の細胞への導入は、インビトロで行われてもよいし、インビボで行われてもよい。また、分化誘導剤は、１種類を単独で用いてもよいし、２種類以上を混合して用いてもよい。

[0046] 本実施形態の分化誘導剤が分化誘導させる細胞としては、ＰＶ＋神経細胞に誘導可能な細胞であれば特に制限はなく、例えば、線維芽細胞、間葉系幹

細胞、多能性幹細胞等が挙げられるが、線維芽細胞及び多能性幹細胞が好ましい。

[0047] また、本実施形態の分化誘導剤が分化誘導させる対象とする細胞の種としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ヒツジ等が挙げられる。

実施例

[0048] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0049] ［実験例１］

（ｉＰＳ細胞の維持培養）

ｉＰＳ細胞（１２１０Ｂ２株）を、細胞継代時のｉＰＳ細胞播種密度を、６ウェルプレートで１．５×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとし、細胞継代時の事前プレートコーティングは行わず、細胞播種直前に、６ウェルプレートに、１．５ｍＬの１０μｇ／ｍｌ ＲＯＣＫ阻害剤Ｙ２７６３２（フジフィルム和光純薬社製）及び１．５μｇ／ｍｌ ｉＭａｔｒｉｘ－５１１（ニッピ社製）を含む未分化細胞用培地Ｓｔｅｍ Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）を１．５ｍｌ／ｗｅｌｌで注ぎ、直接細胞播種を行う以外は、京都大学ｉＰＳ研究所が公開している公知の細胞培養法に準じて培養した。

[0050] ［実験例２］

（ｉＰＳ細胞へのＡｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子導入）

ｉＰＳ細胞へのＡｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子導入のスキームを、図１Ａに示した。具体的には以下のようにして、ｉＰＳ細胞へＡｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子導入行った。

[0051] （１）遺伝子導入操作後の細胞播種用のプレートの培地準備とコーティング準備

６ウェルプレートに、Ｓｔｅｍ Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）に２０μｇ／ｍｌ、Ｙ２７６３２（フジフィルム和光純薬社製）および２．５μｇ／ｍｌ ｉＭａｔｒｉｘ－５１１（ニッピ社製）を添加したものを、２ｍ

ｌ／ｗｅｌｌで６ウェル分（１プレート）入れて、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。

[0052] （２）ｉＰＳ細胞のシングルセル化

６ウェルプレートに約１．５×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように播種されたｉＰＳ細胞を、Ｓｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）で約１週間程度培養し、培地をアスピレーターで除去後、ＰＢＳ（－）を用いて１ｍｌ／ｗｅｌｌで細胞洗浄した。次に、ＰＢＳ（－）を除去後、０．５×ＴｒｙｐＬＥ（登録商標）Ｓｅｌｅｃｔ［ＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ（ＴｈｅｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）：ＰＢＳ（－）＝１：１で混合したものに全量の１／２０００量に相当する容量の０．５Ｍ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）を混合したもの］を０．５ｍｌ／ｗｅｌｌ加え、３７℃、５％CO_2で約５分間インキュベートし、細胞間接着が低下し、一つ一つの細胞の輪郭がある程度見えていることを確認後、ＰＢＳ（－）を用いて１ｍｌ／ｗｅｌｌで細胞を洗浄した。

[0053] 次に、１０μｇ／ｍｌ　Ｙ２７６３２（フジフィルム和光純薬社製）を含むＳｔｅｍ　Ｆｉｔ　（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）１ｍｌを用いて、迅速に細胞剥離し、１５ｍｌ又は５０ｍｌコニカルチューブに移し、十分に攪拌した後、１０μｌの細胞懸濁液とトリパンブルー染色液を混合させ、血球計算板に加え、生細胞数を算定し、懸濁液の生細胞密度を算出した。細胞懸濁液は４℃又は氷上に静置し、一部は維持培養するための継代用として１．５×10^4ｃｅｌｌｓで、６ウェルプレートに細胞播種した。

[0054] （３）Ａｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子が導入されたベクターのｉＰＳ細胞への導入

リポフェクション法による遺伝子導入試薬Ｇｅｎｅ　Ｊｕｉｃｅ（＃７０９６７、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）を、室温に戻し、ボルテックスミキサー等で良く攪拌した後、４．５μｌを１．５ｍＬチューブ内の１００μｌ　Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（＃３１９８５０８８、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に加え、よく攪拌し、５分間室温で静

置し、リポフェクション試薬カクテルを調製した。

[0055] 図１Ｃ上段に示す、トランスポゼース発現ベクター（ｐＣＭＶ－ＨｙＰＢａｓｅ－ＰＧＫ－Ｐｕｒｏ）、図１Ｃ中段に示す、ｒｔＴＡ発現用ＰｉｇｇｙＢａｃベクター（ｐＧ－ＰＢ－ＣＡＧ－ｒｔＴＡ３Ｇ－ＩＨ）、Ｔｅｔ誘導性ｈＡｓｃｌ１遺伝子発現用ＰｉｇｇｙＢａｃベクター（ＰＢ－Ｐ（ｔｅｔＯ）－ｈＡｓｃｌ１－ｐＡＰＧＫ－ＰｕｒｏＴＫ－ｐＡ）、Ｔｅｔ誘導性ｈＤｌｘ２遺伝子発現用ＰｉｇｇｙＢａｃベクター（ＰＢ－ｐ（ｔｅｔＯ）－ｈＤｌｘ２－ｐＡ－ｆｌｏｘＰＧＫｎｅｏ－ｐＡ）の各０．４μｇを上記で調製したリポフェクション試薬カクテルに加え、よく攪拌し、１５分間室温で静置し、ベクター・リポフェクションクション試薬を調製した。

[0056] １５分間の静置の間に、（２）でシングルセル化した細胞懸濁液３×10^5ｃｅｌｌｓ相当を１．５ｍｌチューブに移し、２００Ｇ×５分間で遠心分離し、１５分間が経過した後、遠心分離後の後の上澄みを除去し、上記で調製したベクター・リポフェクション試薬カクテルをペレットに加え、ピペッティングし、５分間室温で静置した。

得られた細胞を、（１）で事前にインキュベートしていた細胞培養用プレートに１５～２０μｌ／ｗｅｌｌで各ウェル内にまんべんなく播種し、３７℃、５％CO_2で約３時間インキュベートした。その後、２０μｇ／ｍｌ　Ｙ２７６３２（フジフィルム和光純薬社製）を含むＳｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）を３７℃で加温し、２ｍｌ／ｗｅｌｌで全ウェルについて全量培地交換した。

[0057] （４）抗生物質によるＰＶ＋神経細胞に誘導可能なｉＰＳ細胞の選抜

（３）の遺伝子導入１日後に、５０μｇ／ｍｌハイグロマイシンおよび１００μｇ／ｍｌ　Ｇ４１８を添加したＳｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）で全量培地交換（１．５ｍｌ／ｗｅｌｌ）し、２日間培養した。

２日間培養後、１００μｇ／ｍｌハイグロマイシン（Ｈｙｇｒｏｍｙｃｉｎ　Ｂ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ、＃０９２８７－８４、ナカライ社製）、１００μｇ／ｍｌ　Ｇ４１８（Ｇ　４１８　Ｄｉｓｕｌｆａｔｅ、＃０８９７３－

１４、ナカライ社製）、および５μｇ／ｍｌピューロマイシン（＃ａｎｔ－ｐｒ－１、ＩＮＶＩＶＯＧＥＮ社製、＃１４８６１－７１、ナカライ社製）を添加したＳｔｅｍ　Ｆｉｔ　（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）で全量培地交換（１．５ｍｌ／ｗｅｌｌ）し、２日間培養した。

２日間培養後、２００μｇ／ｍｌハイグロマイシン、１００μｇ／ｍｌＧ４１８、および１０μｇ／ｍｌピューロマイシンを添加したＳｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）で全量培地交換（１．５ｍｌ／ｗｅｌｌ）し、２日間培養した。

２日間培養後、Ｓｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）で全量培地交換（１．５ｍｌ／ｗｅｌｌ）し、抗生物質は加えず１日間培養し、生き残ったｉＰＳ細胞については、必要に応じ、継代又は凍結保存を行った。

[0058] ［実験例３］

（ｉＰＳ細胞へのＭＥＦ２Ｃ遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子の導入）

ｉＰＳ細胞へのＭＥＦ２Ｃ遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子導入のスキームを、図１Ｂに示した。具体的には以下のようにして、ｉＰＳ細胞へＭＥＦ２Ｃ遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子を導入した。

[0059] （１）ＭＥＦ２Ｃ遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子が導入されたレンチウイルスの精製

常法に従い、図１Ｃ下段に示す、ＭＥＦ２Ｃ遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子が導入されたレンチウイルスを精製した。具体的には以下のようにして、ＭＥＦ２Ｃ遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子が導入されたレンチウイルスを精製した。

[0060] ０．０１％Ｐｏｌｙ－Ｌ－Ｌｙｓｉｎｅ溶液（０．０１％、＃Ｐ４８３２、Ｓｉｇｍａ社製）をＰＢＳ（－）で１：１００に混合した溶液を用いてコーティングした細胞・組織培養用１００ｍｍディッシュをＰＢＳ（－）で洗

浄後に、１０％ＦＢＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミンを含むＤＭＥＭ培地（＃Ｄ５７９６、Ｓｉｇｍａ社製）でセミコンフルエントに培養したＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ディッシュ１枚分に対し、５００μｌ　ＨＢＳＳ、３μｇパッケージングベクター（ｐＣＡＧ－ＨＩＶｇｐ）、３μｇエンベロープ生成ベクター／Ｒｅｖ発現ベクター（ＶＳＶ－Ｇ、ＲＥＶ発現ベクター、ｐＣＭＶ－ＶＳＶ－Ｇ－ＲＳＶ－Ｒｅｖ）、６μｇのＳＩＮベクター（Ｔｅｔ感受性ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子発現ベクター、ＣＳＩＶ－１２４－９－ＢＣｌｘＬ－ＴＲＥ－ＥＦ－ＢｓｄＴ）、６μｇのＳＩＮベクター（Ｔｅｔ感受性ＭＥＦ２Ｃ遺伝子発現ベクター、ｐＬＶ－ＴＲＥ３Ｇ－ＨＡ－ｈＭＥＦ２Ｃ－ｍＰＧＫ－Ｚｅｏ）及びポリエチレンイミン（分子量：２５０００、＃２３９６６、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）［Ｍｉｌｌｉ－Ｑ（登録商標）水中１ｍｇ／ｍｌ］２４μｌをよく混合させ、１５分間室温静置したものをディッシュにまんべんなく滴下した。

[0061] ３７℃、５％CO_2で１２時間インキュベートした後に、１０μＭフォルスコリンを含むＤＭＥＭ（＃Ｄ５７９６、Ｓｉｇｍａ社製）に培地交換し、再度３７℃、５％CO_2でインキュベートした。４８時間後に細胞培養上清を取り出し、０．４５μｍシリンジフィルターを通し、浮遊細胞等を取り除いた後、超遠心器を用い、５０，０００×Ｇで２時間遠心分離後に得られる微量ペレットをＰＢＳ（－）で回収後、ウイルス力価を概算した。

[0062] （２）ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子導入用レンチウイルスベクター及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子導入用レンチウイルスベクターのｉＰＳ細胞への感染

６－ウェルプレートに、１０μｇ／ｍｌ　Ｙ２７６３２（フジフィルム和光純薬社製）、１．５μｇ／ｍｌ　ｉＭａｔｒｉｘ－５１１（ニッピ社製）を含むＳｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）を入れ、実験例２で調製したｉＰＳ細胞を１．５×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、播種し、１日間培養した。

次に、Ｙ２７６３２やｉＭａｔｒｉｘ－５１１は添加していないＳｔｅｍ

Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）を１．５ｍｌ／ｗｅｌｌで全量培地交換した後、（１）で調製したウイルス懸濁液を添加（各ＭＯＩ＝２．０）で感染させ、２日間培養した。

[0063] （３）抗生物質によるレンチウイルス感染済みｉＰＳ細胞の選抜

（２）のウイルス懸濁液の添加２日後に、培地をＳｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）に１．５ｍｌ／ｗｅｌｌで全量培地交換し、２０μｇ／ｍｌ　ブラストサイジン（Ｂｌａｓｔｃｉｄｉｎ）又は２００μｇ／ｍｌ　ゼオシン（Ｚｅｏｃｉｎ）を添加し、２日間培養した。

２日間培養後、Ｓｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）に１．５ｍｌ／ｗｅｌｌで全量培地交換し、上記２０μｇ／ｍｌ　ブラストサイジン（Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ　Ｓ，Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ、＃ＫＫ－４００、Ｆｕｎａｋｏｓｈｉ社製）又は２００μｇ／ｍｌゼオシン（Ｚｅｏｃｉｎ溶液、＃ａｎｔ－ｚｎ－１、ＩＮＶＩＶＯＧＥＮ社製、＃６１４８３－２６、ナカライ社製）を同様に添加し、１日間培養した。

その後、上記抗生物質を含まないＳｔｅｍ　Ｆｉｔ（ＡＫ０２Ｎ、味の素社製）に全量培地交換し、生き残ったｉＰＳ細胞について、必要に応じ、継代又は凍結保存を行った。

[0064] ［実験例４］

（遺伝子導入済みｉＰＳ細胞のＰＶ＋神経細胞への分化）

（１）細胞培養プレートのプレコーティング

Ｐｏｌｙ－Ｌ－Ｌｙｓｉｎｅ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（０．０１％、＃Ｐ４８３２、Ｓｉｇｍａ社製）をＰＢＳ（－）で１００倍希釈し、プレートに注ぎ６時間以上コーティングした。ＲＮＡ解析などの細胞回収用のプレートとして、６ウェルプレートを用い、１．５ｍｌ／ｗｅｌｌでコーティングした。免疫染色やイメージング用のプレートとして、ガラス底９６ウェルプレートを用い、１００μｌ／ｗｅｌｌでコーティングした。なお、コーティングの際は細胞培養用のCO_2インキュベーターなどに入れ、乾燥させないように一定の湿度を保っておいた。

[0065] 神経分化用のｉＰＳ細胞を播種する１時間前にＰｏｌｙ－Ｌ－Ｌｙｓｉｎｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎを吸引除去し、ＰＢＳ（－）で３回洗浄した。６ウェルプレートは各１ｍｌ／ｗｅｌｌ、９６ウェルプレートは各１００μｌ／ｗｅｌｌ程度で洗浄を行い、３回洗浄後は十分に残存液体を吸引除去した。

次に、５０ｍｌコニカルチューブなどを用いて、Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｄｕｃｅｄ Ｍａｔｒｉｇｅｌ（＃３５４２３０、Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）をＰＢＳ（－）で５０倍希釈したものを作成し、６ウェルプレートは各１．５ｍｌ／ｗｅｌｌ、９６ウェルプレートは各１００μｌ／ｗｅｌｌでコーティングした。

上記のマトリゲルコーティング中に、実験例２の（２）と同様の方法により神経分化用ｉＰＳ細胞をシングルセル化し、細胞懸濁液の細胞密度を算出した。

[0066] （２）ＰＶ＋神経細胞への分化

分化用培地として下記を混合させた培地を準備した。

・Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ Ｐｌｕｓ Ｍｅｄｉｕｍ（＃Ａ３５８２９０１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、基礎培地として下記を混合）

・Ｂ２７ Ｐｌｕｓ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（５０×、＃Ａ３５８２８０１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）（１：５０）

・Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）（１：１００）

・ｄｂｃＡＭＰ（Ｎ６，２’－Ｏ－Ｄｉｂｕｔｙｒｙｌａｄｅｎｏｓｉｎｅ－３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ Ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ Ｓｏｄｉｕｍ Ｓａｌｔ、＃１１５４０－６１、ナカライ社製）（１００μＭ）

・ＤＡＰＴ［Ｎ－［Ｎ－（３，５－Ｄｉｆｌｕｏｒｏｐｈｅｎａｃｅｔｙｌ－Ｌ－ａｌａｎｙｌ）］－（Ｓ）－ｐｈｅｎｙｌｇｌｙｃｉｎｅ ｔ－ｂｕｔｙｌ ｅｓｔｅｒ、＃Ｄ５９４２－５ＭＧ、Ｓｉｇｍａ社製）（１０μＭ）

・ドキシサイクリン（＃Ｄ４１１６、東京化成社製）（２．０μｇ／ｍｌ）
・Ｙ２７６３２（＃０３０－２４０２６、フジフィルム和光純薬社製）（２０μｇ／ｍｌ）

[0067] プレートに注ぐ直前にｉＭａｔｒｉｘ－５１１（ニッピ社製）１．０μｇ／ｍｌを上記分化用培地に添加し、６ウェルプレートは２．０ｍｌ／ｗｅｌｌ、９６ウェルプレートは１００μｌ／ｗｅｌｌで注いだ。

次に、実験例３で調製したｉＰＳ細胞懸濁液を６ウェルプレートは６．０×10^5ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ、９６ウェルプレートは３．０×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで均等に播種した。

[0068] （３）ＰＶ＋神経細胞の培養

（２）で分化させたｉＰＳ細胞を、培養開始後５日目で以下の培地に全量交換した。６ウェルプレートは２．０ｍｌ／ｗｅｌｌ、９６ウェルプレートは各１００μｌ／ｗｅｌｌで注いだ。

・Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ Ｐｌｕｓ Ｍｅｄｉｕｍ（＃Ａ３５８２９０１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、基礎培地として下記を混合）
・Ｂ２７ Ｐｌｕｓ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（５０×、＃Ａ３５８２８０１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）（１：５０）
・Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）（１：１００）
・ｄｂｃＡＭＰ（Ｎ６，２’－Ｏ－Ｄｉｂｕｔｙｒｙｌａｄｅｎｏｓｉｎｅ－３’，５’－ｃｙｃｌｉｃ Ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ Ｓｏｄｉｕｍ Ｓａｌｔ、＃１１５４０－６１、ナカライ社製）（１００μＭ）
・ＢＤＮＦ（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｈｕｍａｎ ＢＤＮＦ ｐｒｏｔｅｉｎ、＃Ｂ－２５０、ａｌｏｍｏｎｅ ｌａｂｓ社製）（１０ｎｇ／ｍｌ）
・ＧＤＮＦ（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｈｕｍａｎ ＧＤＮＦ ｐｒｏｔｅｉｎ、＃Ｇ－２４０、ａｌｌｏｍｏｎｅ ｌａｂｓ社製）（１０ ｎｇ／ｍｌ）

・Ｌ－Ａｓｃｏｒｂｉｃ　Ａｃｉｄ（＃０１６－０４８０５、フジフィルム和光純薬社製）（２００　μＭ）

[0069] 培養は、５日ごとに上記組成の培地を半量ずつ交換して行い、培養１０日目以降は細胞回収によるＲＮＡ精製、細胞固定による免疫染色などを行った。

[0070] ［実験例５］

（パルブアルブミン遺伝子（ＰＶＡＬＢ）レポーター細胞株の作製）

図２にパルブアルブミン遺伝子（ＰＶＡＬＢ）レポーター細胞株の作製のスキームを示す。具体的には以下のようにして、パルブアルブミン遺伝子（ＰＶＡＬＢ）レポーター細胞株を作製した。

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９により、ヒトＰａｒｖａｌｂｕｍｉｎ遺伝子（ＰＶＡＬＢ）の終止コドン部位に、ＥＧＦＰおよび分泌型ルシフェラーゼ（ＳＮＬｕｃ）、及びＰｉｇｇｙＢａｃ　ＩＴＲで挟まれた恒常発現性プロモーターで駆動されるピューロマイシン耐性遺伝子を挿入させた。遺伝子導入後、薬剤選択によって、ホモ型ＰＶＡＬＢノックイン細胞を取得し、その後、トランスポゼースによってＩＴＲ内部の配列を除去し、ＰＶＡＬＢ遺伝子下流に２Ａペプチド下で発現するＥＧＦＰ、ＳＮＬｕｃのレポーター細胞株を取得した。

[0071] ［実験例６］

（発現誘導後２０日（発現誘導５日、分化１５日）後の細胞の免疫染色）

Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子の一過性発現細胞について、ＭＥＦ２Ｃ遺伝子の一過性発現非誘導、および誘導を行った。発現誘導後２０日（発現誘導５日、分化１５日）後に細胞を固定し、Ａｎｔｉ－Ｔｕｂｂ３（神経細胞マーカー）抗体、Ａｎｔｉ－パルブアルブミン（ＰＶ）抗体、Ａｎｔｉ－ＧＦＰ抗体で免疫染色を行った。また細胞核染色としてＨｏｅｃｈｓｔ（Ｈｏ）も行った。その結果を図３及び図４に示す。

図３及び図４に示したように、ＭＥＦ２Ｃ誘導群においてＰＶ＋神経細胞

が多く確認された。また、図３及び図４に示したように、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子非誘導群においても、ＭＥＦ２Ｃ誘導群ではＰＶ＋神経細胞が分化誘導されることが確認された。

[0072] ［実験例７］

（定量ＰＣＲ法によるパルブアルブミンｍＲＮＡ発現レベルの解析）

Ａｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子による抑制性神経細胞誘導下で、ｍｉＲＮＡ－９／９*、ｍｉＲＮＡ－１２４及びＢｃｌｘＬ遺伝子を導入、ＭＥＦ２Ｃ遺伝子導入、の各組み合わせについて、発現誘導後１０日、２０日、４０日、および６０日で経時的に細胞回収し、パルブアルブミンｍＲＮＡの定量ＰＣＲを行った。その結果を図５に示す。

図５に示したように、発現誘導２０日後（Ｄａｙ２０）、４０日後（Ｄａｙ４０）、６０日後（Ｄａｙ６０）において、ｍｉＲＮＡ－９／９*，ｍｉＲＮＡ－１２４、ＢｃｌｘＬ遺伝子とＭＥＦ２Ｃ遺伝子との両方を共発現すると、単独の発現に比較して相乗的にパルブアルブミン遺伝子発現レベルが上昇していた。

産業上の利用可能性

[0073] 本発明によれば、分化誘導工程が少なく、短期間で、パルブアルブミン陽性神経細胞を高効率で製造する製造方法、前記ＰＶ＋神経細胞に誘導可能な細胞、及び前記ＰＶ＋神経細胞に分化誘導させるための分化誘導剤を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] 細胞内で、Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子の発現を誘導する発現誘導工程と、前記発現誘導後の細胞を培養して、前記細胞からパルブアルブミン陽性神経細胞を分化させる分化工程と、を含む、パルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法。

[請求項2] 前記発現誘導工程が、前記細胞内に、Ａｓｃｌ１遺伝子及びＤｌｘ２遺伝子を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む、請求項１に記載のパルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法。

[請求項3] 前記発現誘導工程が、さらにＭＥＦ２Ｃ遺伝子を発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む、請求項２に記載のパルブアルブミン陽性神経細胞の製造方法。

[請求項4] 前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、請求項１～３のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項5] 前記発現誘導工程が、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種を、同時に発現誘導する工程を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項6] 前記発現誘導工程が、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種を、発現可能なように導入する遺伝子導入工程を含む、請求項５に記載の製造方法。

[請求項7] 前記マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、請求項５又は６に記載の製造方法。

[請求項8] 前記細胞が線維芽細胞又は多能性幹細胞である、請求項１～７のい

ずれか一項に記載の製造方法。

[請求項9] 前記発現誘導工程を１～５日間行う、請求項１～８のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項10] 前記分化工程を１０日間以上行う、請求項１～９のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項11] Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、発現可能なように導入された細胞。

[請求項12] 前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、請求項１１に記載の細胞。

[請求項13] さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１種が、発現可能なように導入された請求項１１又は１２に記載の細胞。

[請求項14] 前記マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、請求項１３に記載の細胞。

[請求項15] 前記細胞が線維芽細胞又は多能性幹細胞である、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項16] Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子、又はそれらの遺伝子産物を有効成分として含有する、細胞をパルブアルブミン陽性神経細胞に分化誘導させるための、分化誘導剤。

[請求項17] 前記Ａｓｃｌ１遺伝子、Ｄｌｘ２遺伝子及びＭＥＦ２Ｃ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、請求項１６に記載の分化誘導剤。

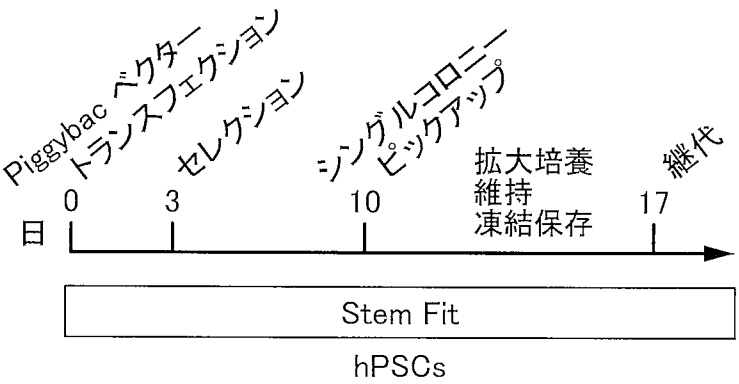
[請求項18] さらに、マイクロＲＮＡ－９／９*（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子

からなる群から選ばれる少なくとも１種、又はそれらの遺伝子産物を有効成分として含有する、請求項１６又は１７に記載の分化誘導剤。

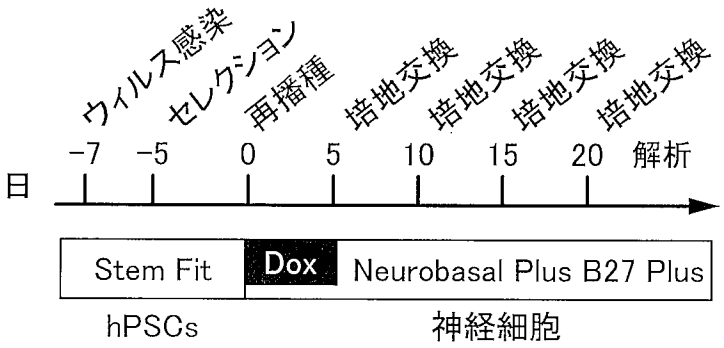
[請求項19] 前記マイクロＲＮＡ－９／９＊（ｍｉＲＮＡ－９／９*）、マイクロＲＮＡ－１２４（ｍｉＲＮＡ－１２４）及びＢｃｌｘＬ遺伝子が、テトラサイクリン制御性（Ｔｅｔ－ＯＮ）である、請求項１８に記載の分化誘導剤。

[請求項20] 前記細胞が線維芽細胞又は多能性幹細胞である、請求項１６～１９のいずれか一項に記載の分化誘導剤。

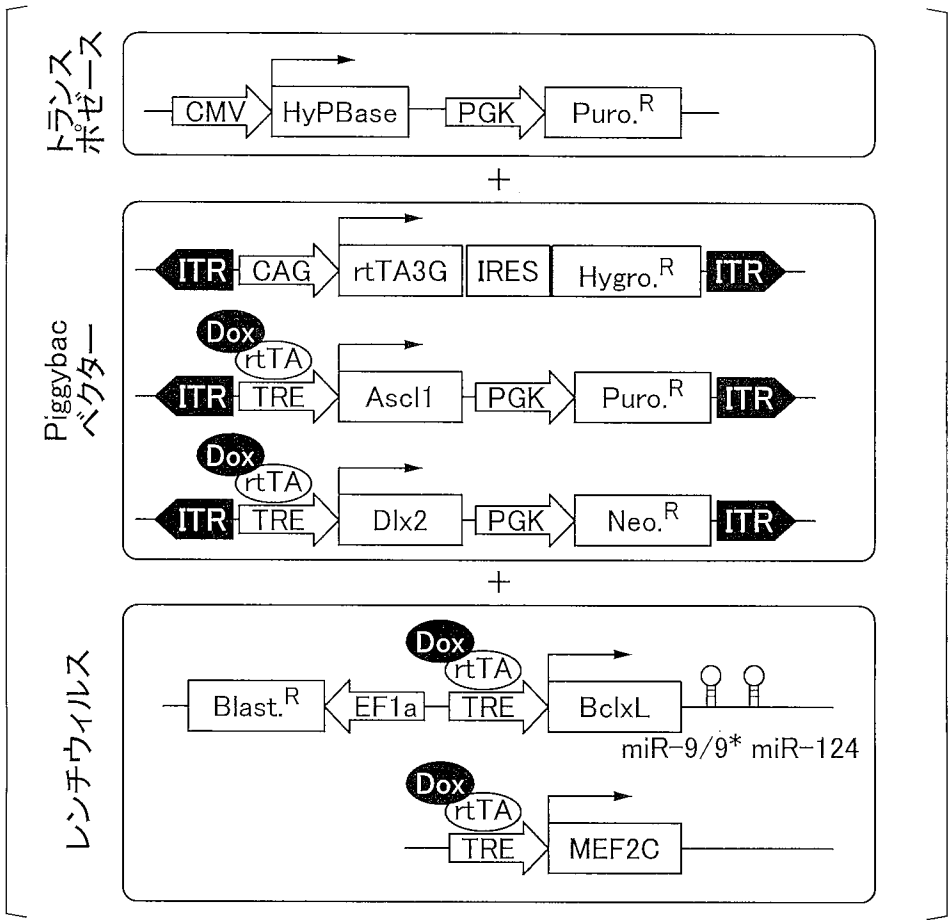
[図１Ａ]


Piggybac ベクター
トランスフェクション
セレクション
シングルコロニー
ピックアップ
拡大培養
維持
凍結保存
継代
日
0
3
10
17
Stem Fit
hPSCs

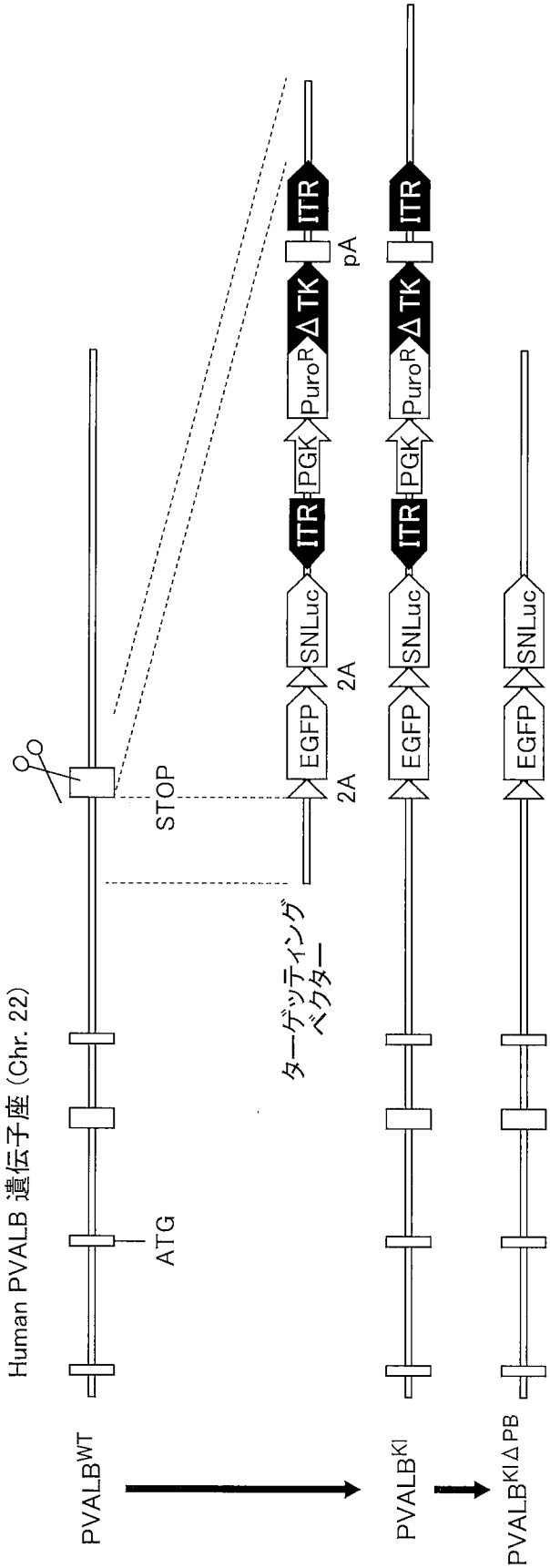
[図１Ｂ]


ウィルス感染
セレクション
再播種
培地交換
培地交換
培地交換
培地交換
日
−7
−5
0
5
10
15
20
解析
Stem Fit
Dox
Neurobasal Plus B27 Plus
hPSCs
神経細胞

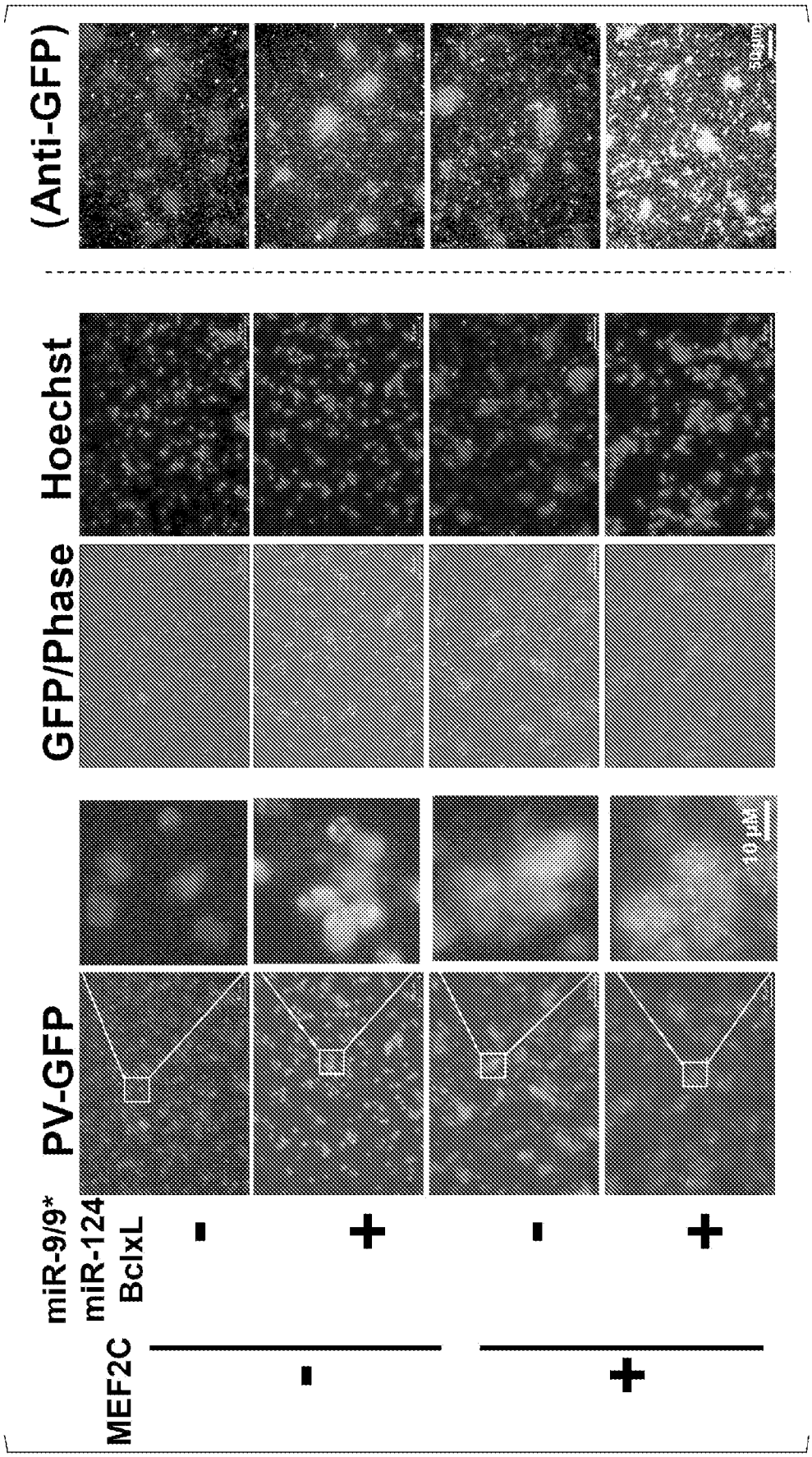
[図１Ｃ]


トランスポゼース
CMV
HyPBase
PGK
Puro.R
+
Piggybac ベクター
ITR
CAG
rtTA3G
IRES
Hygro.R
ITR
Dox
rtTA
TRE
Ascl1
PGK
Puro.R
Dox
rtTA
TRE
Dlx2
PGK
Neo.R
+
レンチウィルス
Dox
rtTA
Blast.R
EF1a
TRE
BclxL
miR-9/9* miR-124
Dox
rtTA
TRE
MEF2C

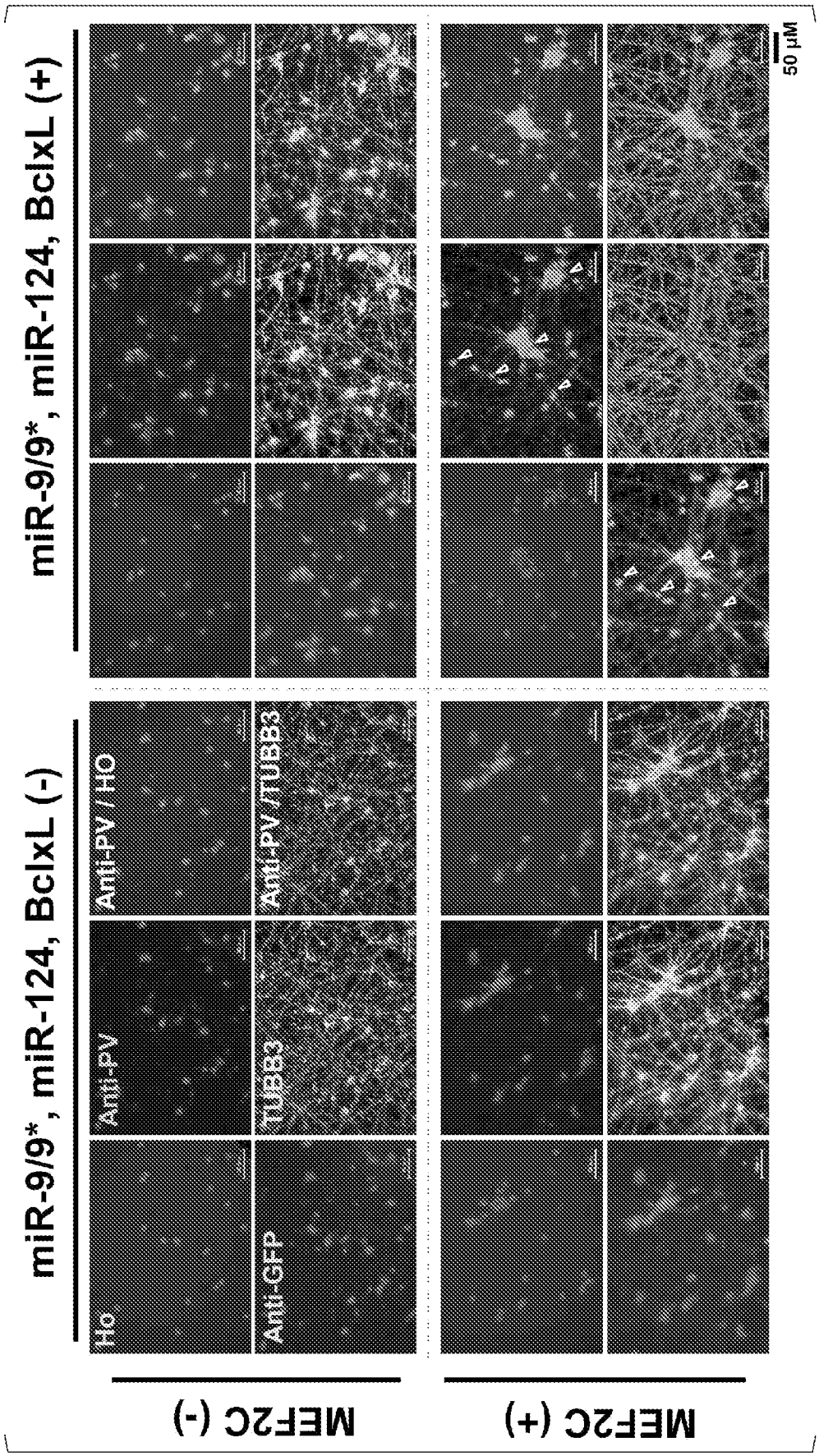
[図２]


Human PVALB 遺伝子座 (Chr. 22)
ATG
STOP
ターゲッティング
ベクター
ITR
PGK
PuroR
ΔTK
ITR
pA
EGFP
2A
SNLuc
PVALB^WT
PVALB^KI
PVALB^KIΔPB

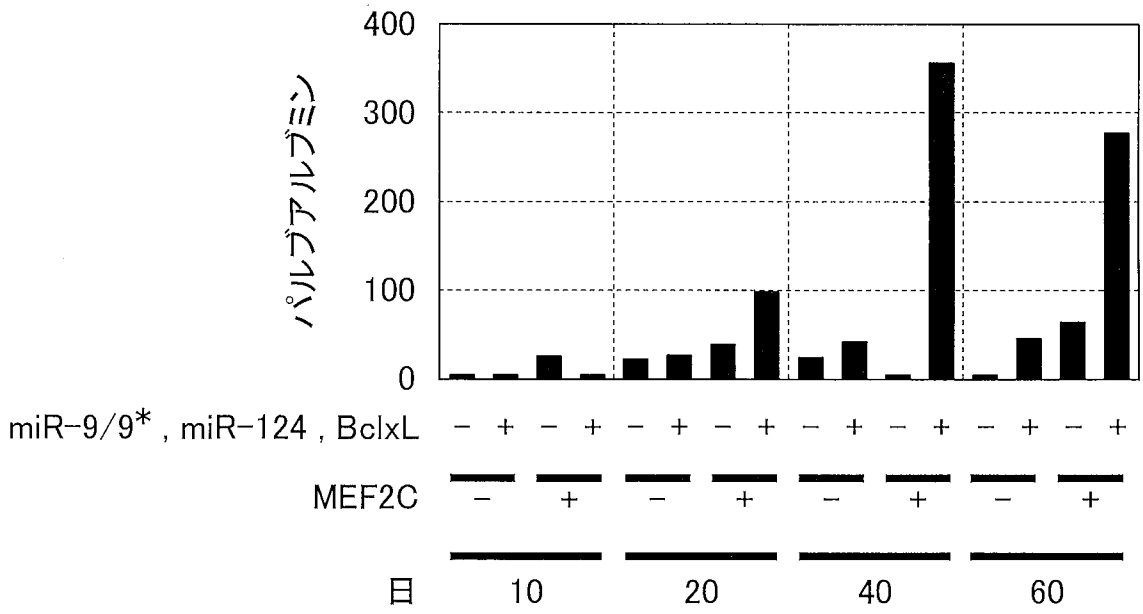
[図3]


(Anti-GFP)
Hoechst
GFP/Phase
PV-GFP
miR-9/9*
miR-124
BclxL
MEF2C
-
+
-
+
-
+
50μm

[図4]


MEF2C (-)
MEF2C (+)
miR-9/9*, miR-124, BclxL (-)
miR-9/9*, miR-124, BclxL (+)
Ho
Anti-GFP
Anti-PV
TUBB3
Anti-PV / Ho
Anti-PV /TUBB3
50 μM

[図５]


400
300
200
100
0
パルブアルブミン
miR-9/9*, miR-124, BclxL
MEF2C
日
10
20
40
60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/032606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 5/0793(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i
FI: C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/113 Z

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)
C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/113

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0022583 A1 (WERNIG, Marius) 24 January 2013 (2013-01-24) paragraphs [0152], [0154], [0157], [0166], [0184], [0189], [0202]	1-4, 8, 10-12, 15-17, 20
Y	paragraphs [0152], [0154], [0157], [0166], [0184], [0189], [0202], [0261]	1-20
Y	JP 2018-513686 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 31 May 2018 (2018-05-31) claim 62, paragraphs [0053], [0062], [0077], example 1	1-20
Y	KAMATH, S. P. et al., "Myocyte Enhancer Factor 2c Regulates Dendritic Complexity and Connectivity of Cerebellar Purkinje Cells", Mol. Neurobiol., 2019, vol. 56, pp. 4102-4119, Published online: 01 October 2018 fig. 2, page 4114, left column, lines 14-16	1-20

☐ 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
23 October 2020 (23.10.2020)	02 November 2020 (02.11.2020)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/032606

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2013/0022583 A1	24 Jan. 2013	WO 2011/091048 A1 US 2018/0072988 A1 claim 81, paragraphs [0073], [0082], [0097], example 1	
JP 2018-513686 A	31 May 2018		

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/032606

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/0793(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i
FI: C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/113 Z

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））

C12N5/0793; C12N5/10; C12N15/113

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	US 2013/0022583 A1 (WERNIG, Marius) 24.01.2013 (2013-01-24) 段落[0152], [0154], [0157], [0166], [0184], [0189], [0202]	1-4, 8, 10-12, 15-17, 20
Y	段落[0152], [0154], [0157], [0166], [0184], [0189], [0202], [0261]	1-20
Y	JP 2018-513686 A (シンガポール科学技術研究庁) 31.05.2018 (2018-05-31) 請求項62, 段落[0053], [0062], [0077], 実施例1	1-20
Y	KAMATH S.P. et al., Myocyte Enhancer Factor 2c Regulates Dendritic Complexity and Connectivity of Cerebellar Purkinje Cells, Mol. Neurobiol., 2019, Vol. 56, pp.4102-4119, Published online: 1 October 2018 図2, 第4114頁左欄第14-16行	1-20

☐ 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抵触するものではなく、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
23.10.2020	02.11.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
市島　洋介 4N 5804
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/032606

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2013/0022583 A1	24.01.2013	WO 2011/091048 A1	
JP 2018-513686 A	31.05.2018	US 2018/0072988 A1 請求項81，段落[0073]， [0082]，[0097]，実施例1	