

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年1月22日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/007700 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06, A61P 25/00, A61K 35/30 三田市 あかしあ台五丁目 2 9 番地 A-1 0 2 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007906
- (22) 国際出願日: 2003年6月23日 (23.06.2003)
- (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2002-182386 2002年6月24日 (24.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 田辺製薬株式会社 (TANABE SEIYAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8505 大阪府 大阪市 中央区道修町三丁目 2 番 1 0 号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者 (日本, 米国についてのみ): 中山 孝 (NAKAYAMA, Takashi) [JP/JP]; 〒249-0002 神奈川県 逗子市 山の根 3-1 5-2 9 Kanagawa (JP). 井上 順雄 (INOUE, Nobuo) [JP/JP]; 〒237-0066 神奈川県 横須賀市 湘南鷹取 4-1-3 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 近藤 靖 (KONDO, Yasushi) [JP/JP]; 〒612-8027 京都府 京都市 伏見区 桃山町本多上野 1 1 番地の 1 6 Kyoto (JP). 鈴木 豊 (SUZUKI, Yutaka) [JP/JP]; 〒669-1323 兵庫県
- (74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMMビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING NERVE CELLS

(54) 発明の名称: 神経系細胞の製造方法

(57) Abstract: It is intended to supply a large amount of nerve cells having been substantially isolated to thereby provide means applicable to nerve regeneration therapy for neurodegenerative diseases, nerve injury and so on. A process for producing nerve cells having been substantially isolated which comprises suspended-culturing embryonic stem cells in an acclimation medium for astrocytes or in the presence of components substantially equivalent to the acclimation medium; nerve cells thus obtained; a cell medicinal composition comprising the nerve cells as the active ingredient; and a method of treating a neurodegenerative disease or nerve injury by inserting the nerve cells into a neurodegenerative site or a nerve injury site.

(57) 要約: 実質的に単離された神経系細胞を大量に供給し、神経変性疾患、神経損傷等に対する神経再生医療等への応用手段を提供すること。アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養する、実質的に単離された神経系細胞の製造方法及びそれにより得られた神経系細胞、該神経幹細胞を有効成分とする細胞医薬組成物、並びに該神経系細胞を神経変性部位又は神経損傷部位に導入する、神経変性疾患又は神経損傷の治療方法。

WO 2004/007700 A1

明細書

神経系細胞の製造方法

技術分野

本発明は、実質的に単離された神経系細胞を得ることが可能な、神経系細胞の製造方法、実質的に単離された神経幹細胞、実質的に単離された神経細胞、実質的に単離されたグリア細胞、細胞医薬組成物及び神経変性疾患又は神経損傷の治療方法に関する。

背景技術

現在、胚性幹細胞から神経系細胞を作製するためには、主に4つの方法：

①胚性幹細胞凝集体の浮遊培養物をレチノイン酸で処理し、それにより、種々の神経系細胞へ分化誘導する方法 [バイン(Bain, G.)ら, Dev. Biol., 168:642-657 (1995)] ；

②胚様体 [E B (embrioid body) という] を作製し、該E Bを無血清の培養液で培養して、ネスチン陽性細胞として神経幹細胞を得、該神経幹細胞を塩基性繊維芽細胞成長因子 (b F G F) 存在下に培養して神経系細胞への分化誘導に用いる方法 [オカベ(Okabe, S.)ら, Mech. Dev., 59:89-102 (1996)] ；

③株化したストローマ細胞上で胚性幹細胞 (E S細胞) を培養することによりコロニーを形成させ、神経系細胞へ分化誘導する方法 (S D I A法) [カワサキ(Kawasaki, H.)ら, Neuron, 28:31-40 (2000)] ；並びに

④白血病阻害因子 (L I F) の存在下、E S細胞を浮遊培養し、E S細胞中に約0. 2%存在する神経幹細胞からneural sphereを作製し、ついで神経系細胞へ分化誘導する方法 [トロペッペ(Tropepe V.)ら, Neuron 30:65-78 (2001)]

が行なわれている。しかしながら、これらの方法によれば、レチノイン酸によ

る分化細胞の催奇性、神経幹細胞を作製に要する時間、分化の割合、収量の効率等の観点から、再生医療に用いるための細胞を十分量確保することが困難であるのが現状である。

神経幹細胞は、神経細胞やグリア細胞に分化できる多分化能をもち、また自己複製能をもつ細胞であり、神経系の移植再生医学にとって重要な役割をはたす細胞である。神経幹細胞を未分化な状態で維持し増殖させる方法として、Neurosphere法が確立されている [レイノルズ(Reynolds, B. A.)ら, J. Neurosci., 12:4565-4574, (1992)、レイノルズ(Reynolds, B. A.)ら, Science 255:1707-1710 (1992)]。前記Neurosphere法によれば、脳から分離した神経幹細胞を含む細胞群を、N2添加物 [N2 supplement ; インスリン、トランスフェリン、セレン及びプロゲステロン] と 20 ng/ml 上皮増殖因子 (EGFという) 及び/又は 20 ng/ml bFGFとを含むDMEM:F-12無血清培地中で培養すると、前記培地条件下で生存することができる神経幹細胞のみが増殖する。増殖した神経幹細胞は、マーカーである中間径フィラメントのネスチンに陽性であり、細胞凝集体 (neurosphere) を形成し、浮遊状態で培養することができるようになる。前記neurosphereは、成長促進因子を除いて接着性の基質プレート上で培養すると、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト等に分化する (多分化能) ことが見出されている。さらに、neurosphereを単一の細胞にまで分離し、成長促進因子を含む無血清培地で該細胞を培養すると、再び、neurosphereを形成すること (自己複製能) が示されている。しかしながら、neurosphereは、全ての細胞からではなく一部の細胞からしか形成されないという欠点がある。

また、Neurosphere法とは異なる方法として、接着性の基質でコートしたプレート上で神経幹細胞を培養し増殖分化させる単層培養法も確立されている。前記単層培養法としては、密度勾配遠心分離により神経幹細胞を濃縮して単層培養を行なう方法 [パルマー(Palmer, T. D.)ら, J. Neurosci., 19:8487-8497 (1999)]、低密度で単層培養して神経幹細胞をクローン化し増

殖を行なう方法 [レイ (Ray, J.) ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3602-3606 (1993)、ゲージ (Gage, F. H.) ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11879-11883 (1995)] が行なわれる。前記単層培養法は、それぞれの細胞を同定できるため、神経幹細胞からどのような細胞に分化していくかの細胞系譜の解析に適している。しかしながら、神経幹細胞を未分化な状態に保つことが難しく、該神経幹細胞の増殖が遅いため、大量の神経幹細胞を必要とする目的には適していないのが現状である。

したがって、Neurosphere法及び単層培養法のいずれの方法においても、どの細胞が未分化なまま神経幹細胞として増殖するか正確に判断することが困難である。

発明の開示

本発明は、実質的に単離された神経系細胞を得ること、該神経系細胞を大量に得ること及び胚性幹細胞の供給源に限定されることなく神経系細胞を提供することの少なくとも1つを達成しうる、神経系細胞の製造方法を提供することを目的とする。また、本発明は、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病等）、脊髄損傷、脳梗塞等に対する神経再生医療等における細胞又は組織の供給源として有用な、実質的に単離された神経幹細胞を提供することを目的とする。さらに、本発明は、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病等）、脊髄損傷、脳梗塞等に対する神経細胞移植治療等の再生医療に有用な神経細胞を提供することを目的とする。また、本発明は、神経細胞及び神経幹細胞と同時に移植して、神経細胞の分化成長を支持し、さらに血液脳関門を形成して栄養物質の補給を行なうのに有用なグリア細胞を提供することを目的とする。さらに、本発明は、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病等）、脊髄損傷、脳梗塞等に対する神経細胞移植治療等の再生医療に有用であり、細胞治療の際、安定した治療効果、高い治療効果等を得ることができる、細胞医薬組成物を提供することを目的とする。また、本発明は、神経変性又は神経損傷

に起因する状態を、安定な状態で治療することが可能な、神経変性疾患又は神経損傷の治療方法を提供することを目的とする。

すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養することを特徴とする、実質的に単離された神経系細胞の製造方法、

〔2〕 胚性幹細胞が、哺乳動物由来の胚性幹細胞である、前記〔1〕記載の神経系細胞の製造方法、

〔3〕 哺乳動物が、マウス、カニクイザル、ヒト、及びラットからなる群より選ばれたものである、前記〔2〕記載の神経系細胞の製造方法、

〔4〕 (A) アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養して、幹細胞球状凝集体 (SCS) を形成させる工程を含む、前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の神経系細胞の製造方法、

〔5〕 工程 (A) の後に、

(B) 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) 及び/又は上皮成長因子 (EGF) の存在下、かつ細胞接着分子の存在下、該工程 (A) で得られた幹細胞球状凝集体 (SCS) を培養する工程、
を行ない、それにより、SCSから遊走した細胞として神経幹細胞を得る、前記〔4〕記載の神経系細胞の製造方法、

〔6〕 工程 (B) における培養が、工程 (A) で得られた幹細胞球状凝集体 (SCS) と、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて行なわれる、前記〔5〕記載の神経系細胞の製造方法、

〔7〕 (A') アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、かつ塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) 及び/又は上皮成長因子 (EGF) の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養する工程、
を行ない、それにより、幹細胞球状凝集体 (SCS) 内に神経幹細胞を得る、

前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の神経系細胞の製造方法、

〔8〕 工程（A）の後に、

（B'）塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）及び／又は上皮成長因子（EGF）の非存在下、かつアストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、工程（A）で得られた幹細胞球状凝集体（SCS）と、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養する工程、

を行ない、それにより、神経細胞を得る、前記〔4〕に記載の神経系細胞の製造方法、

〔9〕 工程（A）の後に、

（B）塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）及び／又は上皮成長因子（EGF）の存在下、かつ細胞接着分子の存在下、該工程（A）で得られた幹細胞球状凝集体（SCS）を培養する工程、及び

（C）bFGF及び／又はEGFの非存在下、該工程（B）で得られたSCSと、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養する工程、を行ない、それにより、SCSから遊走した細胞としてグリア細胞を得る、前記〔4〕に記載の神経系細胞の製造方法、

〔10〕 塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）及び／又は上皮成長因子（EGF）の非存在下、かつアストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、前記〔1〕～〔7〕いずれか1項に記載の製造方法により得られた神経幹細胞を、細胞接着分子を保持した接着性培養基質と接着させて培養する、神経細胞の製造方法、

〔11〕 前記〔1〕～〔7〕いずれか1項に記載の製造方法により胚性幹細胞から分化誘導されてなる、実質的に単離された神経幹細胞、

〔12〕 凍結保存されてなる、前記〔10〕に記載の神経幹細胞、

〔13〕 前記〔8〕又は〔10〕に記載の製造方法により得られる、実質的に単離された神経細胞、

〔14〕 クラスIII β チューブリン、ニューロフィラメント、チロシン水酸化酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素及びコリンアセチルトランスフェラーゼから

なる群より選ばれた少なくとも1種を発現してなる、前記〔13〕記載の実質的に単離された神経細胞、

〔15〕 前記〔9〕記載の製造方法により得られる、実質的に単離されたグリア細胞、

〔16〕 前記〔1〕～〔7〕いずれか1項に記載の製造方法により胚性幹細胞から分化誘導されてなる、実質的に単離された神経幹細胞を有効成分として含有してなる、細胞医薬組成物、

〔17〕 前記〔8〕又は〔10〕記載の製造方法により得られる、実質的に単離された神経細胞を有効成分として含有してなる、細胞医薬組成物、

〔18〕 前記〔9〕記載の製造方法により得られる、実質的に単離されたグリア細胞を有効成分として含有してなる、細胞医薬組成物、並びに

〔19〕 (1) 前記〔1〕～〔7〕いずれか1項に記載の製造方法により胚性幹細胞から分化誘導されてなる、実質的に単離された神経幹細胞、

(2) 前記〔8〕又は〔10〕記載の製造方法により得られる、実質的に単離された神経細胞、及び

(3) 前記〔9〕記載の製造方法により得られる、実質的に単離されたグリア細胞

からなる群より選ばれた少なくとも1つの細胞を、神経変性部位又は神経損傷部位に導入することを特徴とする、神経変性疾患又は神経損傷の治療方法、に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で浮遊培養させたマウス胚性幹細胞（HK細胞株）コロニー（SCS）について、神経幹細胞のマーカであるネスチンの発現の分布及び細胞分裂の指標であるBrdUの取り込みを調べた結果を示す写真である。なお、観察には、ツァイス（Zeiss）社製の共焦点レーザ走査蛍光顕微鏡を用いた。図中、パネルAは、S

C Sの位相差観察像を示し、パネルBは、抗ネスチン抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、抗BrdU抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルDは、パネルB及びパネルCの二重露光像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第2図は、浮遊培養を7日間継続したSCSについて、幼弱ニューロンのマーカーであるクラス III β チューブリンの発現を調べた結果を示す写真である。なお、観察には、Nikon社製の正立蛍光顕微鏡を用いた。図中、パネルAは、SCSの位相差観察像を示し、パネルBは、抗クラス III β チューブリン抗体による免疫蛍光染色像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第3図は、浮遊培養4日後、接着性基質でコートした培養ディッシュの培養面側（すなわち、培地が入ってる側）の表面で4日間接着培養したSCSにおける分化誘導を調べた結果を示す写真である。パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗ネスチン抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、抗ニューロフィラメント（NF）抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルDは、パネルBとパネルCとの二重露光像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第4図は、接着培養したSCSにおけるBrdUの取り込み及びニューロフィラメントの発現の分布を調べた結果を示す写真である。なお、観察には、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた。図中、パネルAは、抗NF抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルBは、抗BrdU抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第5図は、接着したSCSにおける神経伝達物質合成酵素の発現を調べた結果を示す写真である。なお、観察には、正立蛍光顕微鏡を用いた。図中、パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗NF抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、抗チロシン水酸化酵素（TH）抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルDは、パネルBとパネルCとの二重露光像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第6図は、接着したSCSにおける神経伝達物質合成酵素の発現を調べた結果を示す写真である。なお、観察には、正立蛍光顕微鏡を用いた。パネルAは、抗グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルBは、抗NF抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第7図は、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）の発現を調べた結果を示す写真である。なお、観察には、正立蛍光顕微鏡を用いた。パネルAは、抗ChAT抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルBは、抗NF抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、20 μ mを示す。

第8図は、SCSを接着培養し、かつ培養液として、bFGFを含むNeurobasal™ B-27を用いた場合のSCSを調べた結果を示す写真である。パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗ネスチン抗体による免疫蛍光染色像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第9図は、1個のSCSから遊走してきた神経幹細胞のコロニーを示す写真である。スケールバーは、50 μ mを示す。

第10図は、bFGFを含むNeurobasal™ B-27中、神経幹細胞を遊走させるSCSにおけるBrdUの取り込み及びネスチンの発現の分布を調べた結果を示す写真である。パネルAは、抗BrdUによる免疫蛍光染色像を示し、パネルBは、抗ネスチン抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、50 μ mを示す。

第11図は、マウス胚性幹細胞HK細胞株からSCS作製時に浮遊培養液中に初めからbFGFを加えたときの、神経幹細胞のマーカーのネスチン及び細胞分裂の指標となるBrdUの分布を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、抗ネスチン抗体の免疫蛍光染色像を示す。また、図中、パネルBは、抗BrdU抗体の免疫蛍光染色像を示す。パネルCは、パネルA及びパネルBの二重露

光像を示す。スケールバーは、50 μm を示す。

第12図は、SCSから遊走した神経幹細胞の神経細胞への分化を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、bFGFを含むNeurobasal™ B-27を、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物に交換した直後のSCS及び神経幹細胞の位相差像を示し、パネルBは、交換1日後の位相差像を示す。スケールバーは、50 μm を示す。

第13図は、遊走した神経幹細胞由来の神経細胞における神経伝達物質合成酵素の発現を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗NF抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、抗TH抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルDは、パネルBとパネルCとの二重露光像を示す。スケールバーは、20 μm を示す。

第14図は、遊走した神経幹細胞由来の神経細胞におけるTH及びGADの発現の分布を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗TH抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、抗GAD抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルDは、パネルBとパネルCとの二重露光像を示す。スケールバーは、20 μm を示す。

第15図は、遊走した神経幹細胞由来の神経細胞における神経伝達物質のセロトニンの存在を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗セロトニン抗体による免疫蛍光染色像を示す。スケールバーは、20 μm を示す。

第16図は、遊走した神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、SCSを中心にした位相差像を示し、パネルBは、パネルAと同じ部位における抗GFAP抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAと同じ部位における抗NF抗体による対照の染色像を示し、パネルDは、SCSから離れた部位の位相差像を示し、パネルEは、パネルDと同じ部位における抗GFAP抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネ

ルFは、コロニー周辺部における抗GFAP抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルGは、同じく、コロニー周辺部における抗GFAP抗体による免疫蛍光染色像（高倍率）を示し、パネルHは、コロニー周辺部での抗GFAP抗体による免疫蛍光染色像（高倍率）を示す。パネルA～Fのスケールバーは、50 μ mを示し、パネルGとHのスケールバーは、20 μ mを示す。

第17図は、分散させた遊走神経幹細胞の神経細胞への分化を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、抗ネスチン抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルBは、抗TH抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、20 μ mを示す。

第18図は、凍結保存された神経幹細胞の神経細胞への分化を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、位相差像を示し、パネルBは、抗TH抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、抗ChAT抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルDは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、20 μ mを示す。

第19図は、市販されている胚性幹細胞樹立株（129SV細胞株）について、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中での浮遊培養を行なった結果を示す写真である。スケールバーは、50 μ mを示す。

第20図は、カニクイザルより樹立した胚性幹細胞株のCMK-6細胞株におけるSCSを作製したときのネスチンの分布を示す写真である。図中、パネルAは、抗ネスチン抗体による、浮遊SCSの免疫蛍光染色像である。図中、パネルBは、抗ネスチン抗体による、SCSを接着させ遊走してきた細胞の免疫蛍光染色像である。スケールバーは、50 μ mを示す。

第21図は、カニクイザル由来のCMK-6細胞株について、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中での浮遊培養を行なった結果を示す写真である。スケールバーは、20 μ mを示す。

第22図は、カニクイザル胚性幹細胞のCMK-6細胞株から得られたSCS

から遊走してくる神経細胞における神経伝達物質の合成酵素の発現を調べた結果を示す写真である。図中、パネルAは、抗TH抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルBは、抗NF抗体による免疫蛍光染色像を示し、パネルCは、パネルAとパネルBとの二重露光像を示す。スケールバーは、 $20\mu\text{m}$ を示す。

第23図は、胚性幹細胞から神経細胞への分化誘導に伴う遺伝子発現を調べた結果を示す図である。図中、レーン1は、未分化な胚性幹細胞クローン、レーン2は、浮遊培養4日間によって形成されたSCS、レーン3は、接着培養5日間で得られた細胞塊の結果を示す。

第24図は、胚性幹細胞から神経細胞への分化誘導に伴う遺伝子発現の経時的変化を示す図である。Oct-4、ネスチン（図中、Nestin）及びTHそれぞれの量を、GAPDHの量で割り、Oct-4/GAPDH、ネスチン/GAPDH、TH/GAPDHとして相対的な発現量を求め、さらに、相対的な発現量の最高値を1として、グラフに示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の実質的に単離された神経系細胞の製造方法は、アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養することを1つの大きな特徴とする。本発明は、アストロサイト細胞培養上清、すなわち、アストロサイト馴化培地を用い、未分化な胚性幹細胞を浮遊培養することにより、該胚性幹細胞から神経幹細胞へ短時間で分化誘導することができ、かつ、大量に神経幹細胞を調製することができること、及びさらに分化誘導した神経幹細胞を用いて神経細胞、特に、ドーパミン作動性ニューロン；グリア細胞、特に、アストロサイトへの分化誘導を行なうことができるという本発明者らの驚くべき知見に基づく。

本発明の神経系細胞の製造方法によれば、胚性幹細胞の培養に際して、アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分を用いるため、未分化の

胚性幹細胞から、短期間で効率よく、実質的に単離された神経系細胞を得ることができるという優れた効果を発揮する。本発明の神経系細胞の製造方法によれば、胚性幹細胞の浮遊培養後2～4日という、例えば、SDIA法等に比べ、驚くべく短期間に神経幹細胞を得ることができる。また、本発明の神経系細胞の製造方法によれば、胚性幹細胞を浮遊培養するため、驚くべく効率で、驚くべく短期間に神経系細胞を得ることができるという優れた効果を発揮する。具体的には、本発明の神経系細胞の製造方法によれば、該胚性幹細胞から、神経系細胞以外の外胚葉性細胞、中胚葉性細胞及び内胚葉性細胞を誘導することなく効率よく、実質的に単離された神経系細胞を提供することができるという優れた効果を発揮する。さらに、本発明の製造方法によれば、胚性幹細胞から、神経幹細胞を経て、神経細胞又はグリア細胞のいずれか1種を選択的に分化させることができるという優れた効果を奏する。

なお、本明細書において、「神経系細胞」の語は、神経幹細胞、神経細胞（ニューロン）、グリア細胞（例えば、アストロサイト等）等を包含するものとする。

前記神経幹細胞は、脳、脊髄等を構成するニューロン、グリア細胞等への多分化能を有し、自己複製能を有する中枢神経系多能性未分化細胞をいう。前記神経幹細胞は、ネスチン（Nestin）、RC2、ムサシ1（Musashi1）等のマーカーの発現を指標として、例えば、対応する遺伝子の発現を慣用の核酸の検出方法により調べること又はタンパク質の発現を免疫細胞組織化学的手法により調べることにより同定されうる。

前記神経細胞、すなわち、ニューロンは、情報伝達物質の受容体の発現に特徴があり、例えば、ニューロフィラメント、チロシン水酸化酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素、コリンアセチルトランスフェラーゼ等の発現を特徴とする。また、ニューロンの形態的特徴としては、細胞体、樹状突起、軸索、軸索成長円錐等が挙げられる。

本発明の神経系細胞の製造方法により得られる神経細胞としては、ニューロン

等が挙げられ、前記ニューロンとしては、より具体的には、ドーパミン作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン等が挙げられる。前記ドーパミン作動性ニューロンは、例えば、パーキンソン病等への応用が期待される。また、GABA作動性ニューロンは、抑制性ニューロンであり、過剰興奮の抑制等への応用が期待される。また、前記コリン作動性ニューロンは、アルツハイマー病等への応用が期待される。

前記グリア細胞は、ニューロンとニューロンとの隙間を埋め、該ニューロンの代謝の仲介をするとともに、支持組織として働く細胞である。前記グリア細胞としては、中枢神経系では、アストロサイト、オリゴデンドロサイト及びミクログリアサイトが挙げられ、末梢神経系では、外套細胞、シュワン細胞及び終末神経膠細胞が挙げられる。本発明の神経系細胞の製造方法によれば、前記グリア細胞のなかでも、特に、アストロサイトが得られうる。前記アストロサイトは、グリア繊維性酸性タンパク質（GFAP）の発現を特徴とする。また、前記アストロサイトの形態的特徴としては、特有の分岐した数多くの突起を有することが挙げられる。

本発明の神経系細胞の製造方法としては、具体的には、

(A) アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養して、幹細胞球状凝集体（Stem Cell Sphere；SCSという）を形成させる工程を含む方法が挙げられる。

本発明に用いられるアストロサイト馴化培地は、アストロサイトの培養物の上清であり、例えば、N2添加物〔インスリン、トランスフェリン、セレン、プロゲステロン；例えば、ボテンシュタイン(Bottenstein)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:514 (1979)等を参照のこと〕を含む、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）とF-12培地との混合培地〔（体積比=1：1～1：3）；以下、前記混合培地を「DMEM：F-12」という〕を基本培地として用いてアストロサイトを、例えば、1日培養し、得られた培養物から、例えば、

遠心分離等でアストロサイトを除去することにより得られうる。なお、アストロサイトの培養のための基本培地としては、前記DMEM:F-12の他に、例えば、DMEM、F-12、MEM、Neurobasal™〔ギブコ ビーアールエル(GIBCO BRL) 社製〕等が挙げられる。これらの培地は、例えば、フレッシュニー(Frshney, R. Ian)、カルチャー・オブ・アニマルセルズ・ア・マニュアル・オブ・ベーシック・テクニク、第2版(Culture of animal cell A manual of basic technique, 2nd ed.)、Alan R. Liss, Inc., 66-84 (1987)等の記載に基づき調製されうる。また、アストロサイト馴化培地の調製に際して用いられうるアストロサイトには、特に限定されるものではない。また、前記アストロサイトは、既報の方法〔バンカー(Banker, G.)ら編、カルチャリング ナーブ セルズ (Culturing Nerve Cells), (1991), ザ エムアイティ ー プレス(The MIT Press)(ケンブリッジ, イギリス) 発行] に従い、例えば、任意の動物(例えば、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ブタ、サル、ウサギ等)の脳、例えば、マウス胎仔脳、ラット胎仔脳等から、脳膜を取り除いた後、慣用の細胞単離操作で行なわれる酵素処理(例えば、トリプシン処理、ディスパーゼ処理等)に供して細胞を解離・分散させ、グリア繊維性産生タンパク質を発現する細胞を選別し、動物由来の血清、例えば、ウシ胎仔血清等を含む動物細胞培養用栄養培地〔例えば、DMEM、F-12、改変イーグル培地(MEM)等〕で増殖させることにより採取されうる。

前記「馴化培地と実質的に同等な成分」とは、馴化培地と同じ作用を発揮しうる成分をいい、アストロサイトの培養物から、用いられた基本培地の成分とアストロサイトとを除去して得られた成分、例えば、代謝産物等をいう。

本発明の神経系細胞の製造方法に用いられる胚性幹細胞は、その供給源となる個体の種類に特に限定されるものでなく、例えば、哺乳動物、具体的には、例えば、マウス、サル(例えば、カニクイザル等)、ヒト、ラット等に由来する胚性幹細胞等が挙げられる。具体的には、例えば、マウス由来のHK細胞株、マウス

由来の129SV細胞株、カニクイザル由来のCMK-6細胞株等が挙げられる。本発明においては、市販の胚性幹細胞であってもよい。特に、得られた神経系細胞を細胞移植治療等に用いる場合、生体適合性の観点から、細胞移植治療等の適用対象の個体と同種の個体由来の胚性幹細胞であることが望ましい。

胚性幹細胞の培養に用いられる培地としては、前記アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分と、前記アストロサイト基本培地、例えば、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM、Neurobasal™等のいずれかの培地との混合物等が挙げられ、混合比は、体積比として、1:1～1:3であることが望ましい。

胚性幹細胞の浮遊培養は、用いられる胚性幹細胞の種類により異なるが、例えば、前記胚性幹細胞の浮遊培養に用いられる培養容器の大きさが、35mmディッシュであることが望ましく、培地中の胚性幹細胞の濃度は、2mlの培養液中で20個以下のSCSとなる濃度であることが望ましく、さらに、培養気相の条件は、HK細胞株の場合、37℃前後、例えば、37℃±0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8～5.2%、湿度100%であることが望ましい。具体的には、マウス由来のHK細胞株又はマウス由来の129SV細胞株の場合、前記アストロサイト馴化培地と前記アストロサイト基本培地との混合物（体積比=1:1）2mlが入った35mmディッシュ中、37℃、空气中5%CO₂及び100%加湿雰囲気下で、約10～20個を培養することにより行なわれうる。なお、ここで用いられるマウス由来胚性幹細胞の大きさは、操作の容易性、胚性幹細胞の状態の安定維持、及びSCSを効率よく得る観点から、フィーダー細胞層上での大きさとして、直径約400～500μmであることが望ましい。また、カニクイザル由来のCMK-6細胞株の場合、前記アストロサイト馴化培地と前記アストロサイト基本培地との混合物（体積比=1:1）2mlが入った35mmディッシュ中、37℃、空气中5%CO₂及び100%加湿雰囲気下で、約10～20細胞を培養することにより行なわれうる。なお、こ

ここで用いられるカニクイザル由来胚性幹細胞の大きさは、操作の容易性、胚性幹細胞の状態の安定維持、及びSCSを効率よく得る観点から、直径400～500 μ mであることが望ましい。

また、前記胚性幹細胞として、適切な培地上、さらに必要によりフィーダー細胞上、細胞接着状態で増殖させて、未分化な胚性幹細胞のコロニーの塊として得られたものを用いることができる。

SCSは、用いられる胚性幹細胞の種類により異なるが、マウス由来胚性幹細胞の場合、前記浮遊培養の条件下、例えば、2～7日、好ましくは、4～5日に形成され、サル、特にカニクイザル由来胚性幹細胞の場合、前記浮遊培養の条件下、例えば、4～15日、好ましくは、10～12日に形成される。なお、SCSの形成は、実体顕微鏡下もしくは位相差倒立顕微鏡下で芯構造の形成により確認できる。

なお、本発明の神経系細胞の製造方法により、神経幹細胞を製造する場合、より効率よく神経幹細胞を得る観点から、好ましくは、

工程（A）の後に、

（B）bFGF及び／又はEGFの存在下、かつ細胞接着分子の存在下、該工程（A）で得られたSCSを培養する工程、

を行なうこと〔「神経幹細胞の製造方法1」ともいう〕、あるいは

前記工程（A）の代わりに、

（A'）アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、かつbFGF及び／又はEGFの存在下、胚性幹細胞を浮遊培養する工程、を行なうこと〔「神経幹細胞の製造方法2」ともいう〕

ができる。

前記神経幹細胞の製造方法1において、前記工程（B）を行なうことにより、SCSから遊走した細胞として神経幹細胞が得られる。また、前記神経幹細胞の製造方法2において、前記工程（A'）を行なうことにより、SCS内に大量の神経幹細胞が得られる。

前記「神経幹細胞の製造方法1」において、SCSの培養に用いられる培地としては、bFGF及び／又はEGFを含み、かつ前記アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分と、例えば、Neurobasal™ B-27、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM等との混合物が挙げられる。培地中におけるbFGFの濃度は、細胞の分化の抑制能と神経幹細胞の細胞分裂能とを十分に発揮させる観点から、例えば、10～50 ng/ml、好ましくは、10～20 ng/mlであることが望ましい。また、培地中におけるEGFの濃度は、細胞の分化の抑制能を十分に発揮させる観点から、例えば、10～50 ng/ml、好ましくは、10～20 ng/mlであることが望ましい。さらに、bFGFとEGFとを組み合わせる場合、例えば、bFGFを10～20 ng/mlの濃度、EGFを10～20 ng/mlの濃度となるように混合して用いてもよい。

本発明においては、前記bFGF及びEGFの代わりに、該bFGF及びEGFと同様に分化の抑制作用を呈する物質を用いてもよい。

工程(B)に用いられる培地において、前記アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分と、前記Neurobasal™ B-27、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM等との混合比は、体積比として、1:1～1:3であることが望ましい。

前記細胞接着分子としては、ポリリジン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、マトリゲル™ [ビーディー・バイオサイエンス(BD Bioscience)社製]等が挙げられる。

前記工程(B)における培養は、工程(A)で得られたSCSと、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養してもよく、適切な支持体に該細胞接着分子を保持させた担体を浮遊若しくは立体配置させた培養容器内でSCSを培養してもよい。

前記接着性培養基質としては、慣用の細胞培養用ディッシュの培養側の表面を前記細胞接着分子でコートしたもの等が挙げられる。例えば、ポリリジンを細胞接着分子として用いる場合、最終濃度約0.1 mg/mlのポリリジンを

含む純水に、培養容器（細胞培養用ディッシュ）の培養側の表面が十分に浸るようにし、室温で1～2時間インキュベートし、ついで溶液を培養容器から除去することにより接着性培養基質を得ることができる。また、フィブロネクチンを細胞接着分子として用いる場合、最終濃度2～20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のフィブロネクチンを含むリン酸緩衝化生理的食塩水を用い、37℃で30～90分インキュベートすればよく、ラミニンを細胞接着分子として用いる場合、最終濃度10～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のラミニンを含むリン酸緩衝化生理的食塩水を用い、37℃で2時間以上インキュベートすればよく、ビトロネクチンを細胞接着分子として用いる場合、1～10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビトロネクチンを含むリン酸緩衝化生理的食塩水を用い、37℃で2時間以上インキュベートすればよい。マトリゲルを接着分子として用いる場合、培地で10～20倍希釈して37℃で1時間以上インキュベートすればよい。

ここで、SCSと接着性培養基質との接着は、例えば、適切な培地を入れた接着性培養基質にSCSを添加することにより行なわれうる。

また、前記支持体は、培養容器内に浮遊させる場合、培地よりも比重が小さい物質からなる支持体であってもよく、培養容器内に立体配置させる場合、慣用の細胞培養用ディッシュと同じ材質からなる支持体であってもよい。

前記工程（B）における培養条件は、用いられるSCSの供給源となる胚性幹細胞の種類により適宜設定することができる。例えば、培養容器の大きさは、35mmディッシュ又は60mmディッシュであることが望ましい。胚性幹細胞のコロニーの数、すなわち、SCSの数は、マウス由来胚性幹細胞の場合、例えば、2mlの培地が入った35mmディッシュ中、1～20個、好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～2個であることが望ましく、サル由来胚性幹細胞の場合、例えば、2mlの培地が入った35mmディッシュ中、1～20個、好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～2個であることが望ましい。さらに、培養気相の条件は、マウスの場合、37℃前後、例えば、37℃ \pm 0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8～5.2%、湿度100%であることが望ましく、サルの場合、37℃前後、例えば、37℃ \pm 0.

2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8~5.2%、湿度100%であることが望ましい。

また、前記工程(B)における培養時間は、用いられる胚性幹細胞の種類により適宜設定することができ、マウス由来胚性幹細胞の場合、5~10日であることが望ましく、サルの場合、5~20日であることが望ましい。

なお、前記工程(B)においては、浮遊培養中、適切な時期(例えば、1日間隔、2日間隔等)、適切な濃度となるように、bFGF及び/又はEGFを添加してもよい。

前記「神経幹細胞の製造方法1」によれば、用いられる胚性幹細胞の種類により異なるが、マウス由来胚性幹細胞の場合、SCSは、前記浮遊培養の条件下、浮遊培養開始後、例えば、2~7日で形成され、神経幹細胞は、2~5日、好ましくは、2~4日という驚くべく短期間に得られ、サル、特にカニクイザル由来胚性幹細胞の場合、SCSは、前記浮遊培養の条件下、浮遊培養開始後、例えば、4~15日で形成され、神経幹細胞は、4~7日、好ましくは、4~5日という驚くべく短期間に得られるという優れた効果を発揮する。

前記「神経幹細胞の製造方法2」の工程(A')において、胚性幹細胞を培養するための培地としては、bFGF及び/又はEGFを含み、かつ前記アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分と、例えば、Neurobasal™ B-27、DMEM:F-12、DMEM、F-12、MEM等との混合物が挙げられる。培地中におけるbFGFの濃度は、細胞の分化の抑制能と神経幹細胞の細胞分裂能とを十分に発揮させる観点から、例えば、10~50ng/ml、好ましくは、10~20ng/mlであることが望ましい。また、培地中におけるEGFの濃度は、細胞の分化の抑制能と神経幹細胞の細胞分裂能を十分に発揮させる観点から、例えば、10~50ng/ml、好ましくは、10~20ng/mlであることが望ましい。さらに、bFGFとEGFとを組み合わせる場合、例えば、bFGFを10~20ng/mlの濃度、EGFを10~20ng/mlの濃度となるように混合して用いてもよい。

前記「神経幹細胞の製造方法2」において、胚性幹細胞の浮遊培養は、用いられる胚性幹細胞の種類により異なるが、例えば、前記胚性幹細胞の浮遊培養に用いられる培養容器の大きさは、前記工程(A)の場合と同様に、35mmディッシュであることが望ましく、培地中の胚性幹細胞の濃度は、2mlの培養液中で20個以下であることが望ましく、さらに、培養気相の条件は、HK株の場合、37℃前後、例えば、37℃±0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8~5.2%、湿度100%であることが望ましい。具体的には、マウス由来のHK細胞株又はマウス由来の129SV細胞株の場合、前記培地2mlが入った35mmディッシュ中、37℃、空气中5%CO₂及び100%加湿雰囲気下で、約10~20個を培養することにより行なわれうる。また、カニクイザル由来のCMK-6細胞株の場合、前記培地2mlが入った35mmディッシュ中、37℃、空气中5%CO₂及び100%加湿雰囲気下で、約10~20細胞を培養することにより行なわれうる。

また、前記工程(A')における培養時間は、用いられる胚性幹細胞の種類により適宜設定することができ、マウス由来胚性幹細胞の場合、4~5日であることが望ましく、サルの場合、7~10日であることが望ましい。

なお、前記工程(A')においては、浮遊培養中、適切な時期(例えば、1日間隔、2日間隔等)、適切な濃度となるように、bFGF及び/又はEGFを添加してもよい。

前記「神経幹細胞の製造方法2」によれば、用いられる胚性幹細胞の種類により異なるが、マウス由来胚性幹細胞の場合、SCSは、前記浮遊培養の条件下、例えば、2~7日で形成され、神経幹細胞は、2~5日、好ましくは、2~4日という驚くべく短期間に得られ、サル、特にカニクイザル由来胚性幹細胞の場合、SCSは、前記浮遊培養の条件下、例えば、4~15日で形成され、神経幹細胞は、4~7日、好ましくは、4~5日という驚くべく短期間に得られるという優れた効果を発揮する。

得られた細胞が、神経幹細胞であることは、ネスチン、RC2、ムサシ1等のマーカーの発現を指標として、例えば、対応する遺伝子の発現を慣用の核酸

の検出方法により調べることも又はタンパク質の発現を免疫学的手法により調べることにより確認されうる。さらに、得られた細胞が、神経幹細胞であることは、レチノイン酸等の存在下、得られた細胞を、各種細胞又は組織への分化を妨げない培地における培養により分化して生じた分化細胞又は分化組織の形態又は該分化細胞若しくは分化組織に特異的なマーカーの発現により確認してもよい。さらに、得られた細胞を、前脳、中脳、網膜、嗅球等の中枢神経系内に移植し、ニューロン等の形成等を指標として確認することもできる。前記分化細胞又は分化組織の形態及び分化細胞若しくは分化組織に特異的なマーカーとしては、前記神経細胞及びグリア細胞の形態的特徴及び特異的なマーカーが挙げられる。なお、前記神経幹細胞は、前記指標に加え、ブロモデオキシウリジン (B r d U) の取り込みに対し、弱陽性～強陽性を示す。

ここで、核酸の検出方法としては、検出対象の遺伝子をコードする核酸若しくはその特異的断片からなるプローブ又は該核酸若しくはその特異的断片に特異的に結合するプローブを用いるハイブリダイゼーションに基づく検出方法、該核酸若しくはその特異的断片を増幅するためのプライマーを用いるPCRに基づく検出方法等が挙げられる。前記ハイブリダイゼーションに基づく検出方法としては、例えば、サザンハイブリダイゼーション、DNAアレイハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション等が挙げられる。PCRに基づく検出方法としては、例えば、RT-PCR等が挙げられる。ここで、プローブ又はプライマーとして用いる核酸は、検出対象の遺伝子の塩基配列に特異的な部分の配列を有することが望ましい。前記「検出対象の遺伝子の塩基配列に特異的な部分」は、例えば、検出対象でない公知配列との配列同一性が、20%以下、好ましくは、15%以下、より好ましくは、10%以下、さらに好ましくは、5%以下、特に好ましくは、0%である部分の配列を選択することに得られうる。前記配列同一性は、2つの核酸間における比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定されうる。また、配列同一性の数値(パーセンテージ)は、両方の配列に存在する同一の残基を決定して、適合部位の数を決定し、ついで、比

較対象の配列領域内の残基の総数で、前記適合部位の数を割、得られた数値に 100 をかけることにより、算出される。なお、最適なアラインメント及びホモロジーの算出のために、例えば、スミス(Smith)らの局所ホモロジーアルゴリズム[Add. APL. Math., 2, 482 (1981)]、ニードルマン(Needleman)らのホモロジーアラインメントアルゴリズム[J. Mol. Biol., 48, 443(1970)]、Smith-Watermanアルゴリズム、Good-Kanehisa アルゴリズム、BLAST アルゴリズム、FASTA アルゴリズム等が用いられうる。例えば、BLASTアルゴリズムによりアライメントするための条件としては、期待値 10、ワードサイズ 3、ギャップコスト (Existence : 11、Extension : 1) 等が挙げられる。

また、免疫学的手法として、検出対象のタンパク質若しくはその特異的断片に対する抗体若しくは抗体断片を用い、免疫学的手法、例えば、慣用の ELISA、免疫染色等を行なうことができる。抗体は、慣用の方法〔例えば、1992年、ジョン・ワイリー&サンズ社 (John Wiley & Sons, Inc) 発行、ジョン・E・コリガン (John E. Coligan) 編集、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー (Current Protocols in Immunology) 等〕に記載の方法に従い、検出対象のマーカータンパク質を用いて、適切な動物、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ヤギ等を免疫することにより得られる。

本発明には、かかる製造方法により胚性幹細胞から分化誘導された、実質的に単離された神経幹細胞も含まれる。

また、本発明の神経幹細胞は、凍結保存したものであっても、神経細胞、グリア細胞等への分化能を呈するという優れた性質を発現する。

本発明の神経幹細胞は、神経細胞、グリア細胞等に分化させることができるため、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、プリオン病 (例えば、クロイツフェルトーヤコブ病、ウシ海綿状脳症等)、ポリグルタミン病 (球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳失調症等)、筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患；脳虚血、脱髄疾患、頭部外傷、脊髄損傷、脳梗塞等における神経再生医療への応用が期待される。

本発明の神経系細胞の製造方法により神経細胞を製造する場合、より効率よく神経細胞を得る観点から、好ましくは、前記工程（A）の後に、（B'）bFGF及び／又はEGFの非存在下、かつアストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、工程（A）で得られたSCSと、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養する工程、を行なうことができる〔「神経細胞の製造方法I」ともいう〕。かかる工程（B'）を行なうことにより、神経細胞が得られうる。また、神経細胞を製造する場合の別法として、前記のようにして得られた神経幹細胞を、bFGF及び／又はEGFの非存在下、かつアストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、細胞接着分子を保持した接着性培養基質と接着させて培養する方法〔「神経細胞の製造方法II」ともいう〕が挙げられる。

前記工程（B'）又は前記別法で用いられる培地としては、前記アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分と、DMEM：F-12、DMEM、F-12、MEM、Neurobasal™等のいずれかの培地との混合物等が挙げられ、混合比は、体積比として、1：1～1：3であることが望ましい。培養条件は、用いられるSCSの供給源となる胚性幹細胞の種類により適宜設定することができる。例えば、培養容器の大きさは、35mmディッシュ又は60mmディッシュであることが望ましい。SCSの数は、マウス由来胚性幹細胞の場合、例えば、35mmディッシュで2mlの培地が入った培養液中、1～20個、好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～2個であることが望ましく、サル由来胚性幹細胞の場合、例えば、35mmディッシュで2mlの培養液中、1～20個、好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～2個であることが望ましい。さらに、培養気相の条件は、マウスの場合、37℃前後、例えば、37℃±0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8～5.2%、湿度100%であることが望ましく、サルの場合、37℃前後、例えば、37℃±0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8～5.2%、湿度100%であることが望ましい。

また、前記工程（B'）における培養時間は、用いられる胚性幹細胞の種類

により適宜設定することができ、マウス由来胚性幹細胞の場合、1～7日であることが望ましく、サルの場合、1～14日であることが望ましく、神経細胞の製造方法IIにおける培養時間は、マウス由来胚性幹細胞の場合、1～7日であることが望ましく、サルの場合、1～14日であることが望ましい。

前記神経細胞の製造方法I及び前記神経細胞の製造方法IIによれば、神経細胞は、1～7日、好ましくは、2～5日という驚くべく短期間に得られるという優れた効果を発揮する。

得られた細胞が、神経細胞であることは、ニューロフィラメント、チロシン水酸化酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素、コリナセチルトランスフェラーゼ等の発現を指標として、対応する遺伝子の発現を慣用の核酸の検出方法により調べること又はタンパク質の発現を免疫学的手法、例えば、慣用のELISA、免疫染色等により調べることにより確認されうる。また、ニューロンの形態的特徴、例えば、細胞体、樹状突起、軸索、軸索成長円錐等を指標として確認することもできる。

本発明には、かかる製造方法により得られた実質的に単離された神経細胞も含まれる。

本発明の神経細胞は、クラスIII β チューブリン、ニューロフィラメント、チロシン水酸化酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素及びコリンアセチルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた少なくとも1種を発現するものであり、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、プリオン病（例えば、クロイツフェルトーヤコブ病、ウシ海綿状脳症等）、ポリグルタミン病（球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳失調症等）、筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患；脳虚血、脱髄疾患、頭部外傷、脊髄損傷、脳梗塞等における神経再生医療への応用が期待される。

本発明の神経系細胞の製造方法によりグリア細胞を製造する場合、より効率よくグリア細胞を得る観点から、好ましくは、工程（B）の後、（C）b FGF及び／又はEGFの非存在下、該工程（B）で得られたSCSと、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養する工程、を行なうことが

できる。かかる工程（C）を行なうことにより、SCSから遊走した細胞としてグリア細胞、特に、アストロサイトが得られうる。

工程（C）で用いられる培地としては、Neurobasal™ B-27〔ギブコ・ビーアールエル(GIBCO BRL)社製〕1～2%添加物、DMEM：F-12 N₂添加物等が挙げられる。培養条件は、用いられるSCSの供給源となる胚性幹細胞の種類により適宜設定することができる。例えば、培養容器の大きさは、35mmディッシュ又は60mmディッシュであることが望ましい。SCSの数は、マウス由来胚性幹細胞の場合、例えば、35mmディッシュで2ml培養液中、1～20個、好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～2個であることが望ましく、サル由来胚性幹細胞の場合、例えば、35mmディッシュで2mlの培養液中、1～20個、好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～2個であることが望ましい。さらに、培養気相の条件は、マウスの場合、37℃前後、例えば、37℃±0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8～5.2%、湿度100%であることが望ましく、サルの場合、37℃前後、例えば、37℃±0.2℃、CO₂濃度5%前後、例えば、4.8～5.2%、湿度100%であることが望ましい。

また、前記工程（C）における培養時間は、用いられる胚性幹細胞の種類により適宜設定することができ、マウス由来胚性幹細胞の場合、2～7日であることが望ましく、サルの場合、5～15日であることが望ましい。

前記グリア細胞の製造方法によれば、グリア細胞は、2～7日、好ましくは、5～7日という驚くべく短期間に得られるという優れた効果を発揮する。

得られた細胞が、グリア細胞、特に、アストロサイトであることは、グリア繊維性酸性タンパク質（GFAP）等の発現を指標として、対応する遺伝子の発現を慣用の核酸の検出方法により調べること又はタンパク質の発現を免疫学的手法、例えば、慣用のELISA、免疫染色等により調べることにより確認されうる。また、アストロサイトの形態的特徴、例えば、特有の星状の分岐した数多くの突起等を指標として確認することもできる。

本発明には、かかる製造方法により得られた、実質的に単離されたグリア細

胞も含まれる。

本発明のグリア細胞は、ほぼ純粋なアストログリア細胞であるため、神経細胞、神経幹細胞と同時に移植して、神経細胞の分化成長を支持し、さらに血液脳関門を形成して栄養物質の補給を行なう等への応用が期待される。

本発明の神経系細胞の製造方法により得られた神経系細胞の純度は、例えば、それぞれの細胞特異的マーカーに対する抗体又は抗体断片を用いたフローサイトメトリーにより、全体の細胞数における細胞特異的マーカー発現細胞の割合により求められうる。本発明の神経系細胞の製造方法によれば、実質的に単離された神経系細胞が得られる。

なお、本発明の神経系細胞は、細胞医薬組成物としても提供されうる。かかる細胞医薬組成物も本発明に含まれる。

本発明の細胞医薬組成物は、具体的には、本発明の神経幹細胞、神経細胞及びグリア細胞からなる群より選ばれた細胞を有効成分として含有する。

本発明の細胞医薬組成物は、薬理上許容されうる助剤を適宜含有していてもよい。

なお、細胞医薬組成物の適用対象となる個体の適用部位に対し、神経伝達物質、神経栄養因子等を供給することを目的とする場合、例えば、神経幹細胞に、神経伝達物質をコードする核酸、神経栄養因子をコードする核酸等を導入した細胞、又は、必要により、適切な分化条件下に分化誘導して得られた細胞を、半透膜等のカプセルに封入して得られた細胞医薬組成物を用いてもよい。カプセルに有効成分が封入された細胞医薬組成物に用いられる細胞は、適用対象の個体にとって、同種である細胞であってもよく、異種である細胞であってもよい。

また、本発明の神経幹細胞、神経細胞又はグリア細胞によれば、個体の神経変性部位又は神経損傷部位に導入することにより、神経変性又は神経損傷に起因する状態、例えば、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病等）、脊髄損傷、脳梗塞等の神経損傷等に対する神経細胞移植治療等を行なうことができる。したがって、神経変性疾患又は神経損傷の治療方法も本発明に含ま

れる。

本発明の神経変性疾患又は神経損傷の治療方法は、

- (1) 本発明の神経幹細胞、
- (2) 本発明の神経細胞、及び
- (3) 本発明のグリア細胞

からなる群より選ばれた少なくとも1つの細胞を、神経変性部位又は神経損傷部位に導入することを1つの大きな特徴とする。

本発明の治療方法によれば、本発明の神経幹細胞、神経細胞及びグリア細胞からなる群より選ばれた少なくとも1つの細胞が用いられているため、細胞治療の際、安定した治療効果、高い治療効果等を得ることができ、神経変性又は神経損傷に起因する状態を、安定な状態で治療することができるという優れた効果を発揮する。

本発明の治療方法は、本発明の神経幹細胞、神経細胞及びグリア細胞それぞれの応用として、上記に列挙した疾患に適用することができる。

神経変性部位又は神経損傷部位への細胞の導入は、注射等により行なわれうる。

本発明の治療方法では、例えば、

- － 脳梗塞、脊髄損傷の場合、損傷部位に、本発明の神経幹細胞を導入すること、
- － パーキンソン病の場合、本発明の神経細胞であるドーパミン作動性ニューロンを、線条体、中脳黒質等に導入すること、
- － ハンチントン病の場合、本発明の神経細胞であるGABA作動性ニューロンを、尾状核等に導入すること

等が行なわれうる。

また、本発明の神経幹細胞、神経細胞及びグリア細胞は、神経変性疾患又は神経損傷を治療するための医薬の製造に使用することもできる。

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、かかる実施例により限定されるものではない。また、以下の実施例において、神経幹細胞及び神経細胞分化誘導培地として、アストロサイト馴化培地を用いた。なお、アストロサイトの培養のための基本培地（アストロサイト基本培地）として、N2添加物（インスリン、トランスフェリン、セレン、プロゲステロン）を含むDMEM:F-12を用いた。アストロサイトの調製は、マウス胎仔脳及びラット胎仔脳を用い、既報の方法〔バンカー(Banker, G.)ら編, カルチャリング ナーブ セルズ (Culturing Nerve Cells), (1991), ザ エムアイティ プレス(The MIT Press)(ケンブリッジ, イギリス) 発行] に従って行なった。

実施例1 神経幹細胞の作製

胚性幹細胞として、C57BL/6マウスの胚盤胞（膣栓確認後3.5日目）から、慣用の方法によって樹立されたHK細胞株（継代数10未満）を用いた。前記HK細胞は、継代数が少なく、自発的な分化がおこりにくいものである。

また、妊娠14日目の同系マウスから調製した繊維芽細胞を、10% (w/v) ウシ胎仔血清 (FCS) を含むDMEM培地でコンフルエントになるまで培養した。ついで、得られた細胞培養物に、マイトマイシンC ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して3時間インキュベートし、不活化細胞を得た。不活化細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄して、ついで、トリプシンで処理した。得られた細胞を、ゼラチンコートされたプレートに播種し、フィーダー細胞層を得た。なお、前記プレートとして、60mmプレート (1.5×10^6 細胞/プレート) 及び4ウェルプレート (3×10^5 細胞/ウェル) のそれぞれを用いた。

前記HK細胞株を、60mmプレートのフィーダー細胞層上に、プレートあたり100~200個となるように播種した。培養液として、最終濃度で、15% (v/v) ノックアウト セラム リプレースメント (Knockout Serum Replacement) [ケーエスアール ギブコ ビーアールエル(KSR, GIBCO BR

L)社製]と、 10^3 U/ml 白血病阻害因子 (Leukemia Inhibitory factor) [LIF、ESGRO、ケミコン・インターナショナル・インコーポレーテッド (Chemicon International Inc.)、米国カルフォルニア州]と、2 mM L-グルタミン、 $100 \mu\text{M}$ 非必須アミノ酸と、 $100 \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノールと、 50 U/ml ペニシリンと、 $50 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンとを含むDMEMを用いた。培地は、1~2日おきに交換した。

7~10日後、胚性幹細胞コロニーの直径が約 $400\sim500 \mu\text{m}$ にまで増殖しているプレートを、DMEM (血清及びその他の成分を含まない)で2~3回洗浄した。胚性幹細胞のコロニーを、先端を細く加工したガラスキャピラリーによって、フィーダー細胞層から機械的に剥離させ、拾い上げた。得られた胚性幹細胞のコロニーを、培養用ディッシュ中、血清不含DMEMで2~3回洗浄した。その後、培養側表面が無処理の浮遊培養用 35 mmバクテリアディッシュに、胚性幹細胞のコロニーを移し、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物 (体積比=1:1)中、 CO_2 インキュベーター内で浮遊培養を行なった。 CO_2 インキュベーター内での培養条件は、 37°C 、空気中 5% CO_2 及び 100% 加湿雰囲気であった。培養に際し、 35 mmディッシュ中 2 mlの培養液で約 $10\sim20$ 個の胚性幹細胞のコロニーを培養した。なお、分化誘導中は、培養液の交換を行なわなかった。

浮遊培養4日目、培養物に、プロモデオキシウリジン (BrdU)を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように添加した。なお、BrdUの取り込みは、細胞分裂の指標となる。培養物を、前記と同様の培養条件で8時間インキュベートした。ついで、得られた細胞を、BrdUを含まない培地で1時間培養して、洗浄した。その後、得られた細胞を、 4% (w/v) パラホルムアルデヒド、 0.4 M ショ糖、 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.4で30分間固定し、 0.1% (v/v) Triton™ X-100処理と 10% (w/v) BSA-PBSによるブロッキングとに供した。

ブロッキング後の細胞 (Stem Cell Sphere; 以下、SCSと略す)と、マウス由来抗ネスチン抗体とを 4°C で一晩インキュベートした。

得られた混合物と蛍光標識ウサギ抗マウス I g G 抗体とを、室温で 2 時間インキュベートし、さらに、ビオチン標識マウス抗 B r d U 抗体と 4℃で一晩インキュベートした。ついで、得られた混合物と、蛍光標識ストレプトアビジンとを室温で 2 時間インキュベートした。その後、得られた細胞について、ツァイス(Zeiss) 社製の共焦点レーザー走査顕微鏡(商品名: L S M 5 1 0)で観察した。第 1 図に免疫蛍光染色像を示す。

第 1 図に示すように、S C S 表層の細胞群において、神経幹細胞のマーカーであるネスチンに対する強いシグナルが観察され(ネスチン強陽性)が、B r d U に対する弱いシグナルが観察された(B r d U 弱陽性)。したがって、前記 S C S 表層の細胞群は、神経幹細胞であることが示唆された。

また、S C S の芯にあたる部分の細胞群において、B r d U に対する強いシグナルが観察された(B r d U 強陽性)。したがって、前記 S C S の芯にあたる部分の細胞群においては、細胞分裂が盛んに行なわれていることが示された。さらに、S C S の芯にある細胞群では、ネスチンに対するシグナルが観察されなかった。かかる結果と、後述の R T - P C R の結果とから、前記 S C S の芯にあたる部分の細胞群は、未分化の胚性幹細胞であると考えられる。

また、S C S 表層と芯との間にある細胞において、ネスチン及び B r d U のどちらに対してもシグナルは観察されなかった(ネスチン陰性及び B r d U 陰性)。したがって、前記 S C S 表層と芯との間にある細胞は、胚性幹細胞から神経幹細胞へ分化誘導される移行段階の状態である細胞であることが示唆された。

第 1 図に示すように、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物を用いた浮遊培養により形成される S C S は、惑星構造に類似した層構造を有することがわかる。すなわち、S C S は、地殻層に対応するネスチン陽性の神経幹細胞層と、マントル層にあたるネスチン及び B r d U のいずれに対しても陰性の前神経幹細胞層と、核にあたる B r d U 陽性の胚性幹細胞層とから構成される三層構造を有することがわかる。これらの構造は、液滴法等により、1 乃至数個の胚性幹細胞を凝集体として形成させた E B の構造とは全く

異なっている。なお、前記EBの作製においては、血清の存在下で胚性幹細胞を凝集体形成させており、血清中の不明確な種々の分化誘導因子により、内胚葉と外胚葉と中胚葉とがそれぞれ分化誘導される。

それに対して、本実施例において、胚性幹細胞の浮遊培養に用いたアストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物は、血清不含であるため、アストロサイトから放出される因子（群）によって、短期間で効率よく神経幹細胞のみがSCS表層に分化誘導されることが明らかである。コロニーから分散した単一の胚性幹細胞をアストロサイト馴化培地で浮遊培養しても凝集体を形成することができなかった。したがって、細胞接着状態で増殖した未分化な胚性幹細胞のコロニーを塊として用いて浮遊培養を行なうことが、神経幹細胞の分化誘導に必要であることが示唆される。

また、SCSの形成に際して用いる胚性幹細胞のコロニーの大きさを検討した。その結果、マウスの場合、フィーダー細胞層上で単一の胚性幹細胞を培養しはじめて、7～9日後、直径で約400～500 μ mの大きさのコロニーが生じた場合、前記と同様の浮遊培養により、ほとんどの胚性幹細胞がSCSを形成することがわかった。かかるコロニーの大きさは、浮遊培養後に球形になったときに、直径が約200～300 μ mに相当する。

実施例2 神経細胞への分化

神経幹細胞が表層に分化誘導されたSCS〔前記実施例1で得られたSCS（浮遊培養4日間）〕を、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物（体積比＝1：1）中、CO₂インキュベーター内、37℃、空気中5% CO₂及び100% 加湿雰囲気中で浮遊培養を行なった。

なお、SCSにおける分化状態の経時変化を調べるため、1～4日培養で、浮遊培養したSCSを前記と同様に固定した。

神経細胞への分化の指標としては、幼弱ニューロンのマーカーであるクラスIII β チューブリンを認識する抗体TUJ1を用いた。免疫蛍光組織化学の観察は、ニコン(Nikon)社製の正立蛍光顕微鏡（商品名：Eclipse E800）によ

り行なった。

その結果、浮遊培養開始後直ぐにT U J 1に弱く反応する細胞がS C Sの内部で観察された。

さらに、前記S C Sを、6～7日間浮遊培養した結果を第2図に示す。

第2図に示すように、T U J 1に対して強陽性で神経突起をS C S内で長く伸展させる細胞が観察された。即ち、S C S中で分化した神経細胞から、抗クラスIII β チューブリン抗体によって染色された神経突起がS C S中を網状に伸展していることがわかる。この結果により、アストロサイト馴化培地中の因子(群)によって、神経幹細胞がS C Sの状態から幼弱ニューロンにまで分化誘導できることが示される。

実施例3 神経細胞分化法の改良

S C Sをアストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物で浮遊培養することにより、神経幹細胞を作製し幼弱ニューロンに分化誘導させることができた。

ついで、S C S表層に形成された神経幹細胞からの神経細胞への分化を効率よく進めるための培養至適条件を検討した。

ポリリジンでコートした培養ディッシュの培養側の表面を、0.1 mg/m² ラミニン又は10～20倍希釈したマトリゲルTM〔ビーディーバイオサイエンス(BD Bioscience)社製〕でさらに処理して接着性培養基質を作製した。4日間浮遊培養したS C Sをガラスキャピラリーで吸い上げて、予めアストロサイト馴化培地を添加しておいた接着性の培養ディッシュに移し、CO₂ インキュベーター内で37℃、5% CO₂ 及び100%加湿雰囲気中で数時間培養した。その結果、S C Sは培養基質に接着した。

さらに、位相差倒立顕微鏡〔ニコン(Nikon)社製〕を用い、S C S及びその周辺の形態の観察を行なった。その結果、接着培養して1日目から神経突起を伸展させるS C Sが認められた。

また、さらに4～7日間、接着培養を続けることにより、多数の神経細胞の

分化誘導が生じた。細胞へのBrdUの取り込みを前記実施例1と同様に調べた。また、SCS及びその周辺について、神経幹細胞マーカであるネスチン、分化した神経細胞マーカであるニューロフィラメント、ドーパミン作動性ニューロンのマーカであるチロシン水酸化酵素（以下、THと略す）、GABA作動性ニューロンのマーカであるグルタミン酸脱炭酸酵素（以下、GADと略す）及びコリン作動性ニューロンのマーカであるコリンアセチルトランスフェラーゼのそれぞれの発現を、各マーカに対する抗体を用い、前記実施例1におけるネスチンの検出と同様に、免疫組織化学的手法により調べた。結果を第3図～第7図に示す。

第3図及び第4図に示すように、接着したSCSは、BrdUを取り込んで分裂を盛んに行なうネスチン陽性の神経幹細胞として全体が分化した。さらに、SCS周辺では、NFに対する抗体で強く染色される、遊走した神経細胞と細胞体から伸展した神経突起とが数多く観察され、ネスチン陽性の神経幹細胞はその内部に存在していることがわかる。また、第4図に示すように、接着培養面をNF陽性の神経突起が多数伸びていることがわかる。また、第4図に示すように、第3図でネスチン陽性の神経幹細胞が存在するSCSの部位がBrdUに陽性で、細胞分裂が盛んであることがわかる。

さらに、第5図に示すように、SCS全体がドーパミン作動性ニューロンのマーカであるTHに対する抗体によって強く染色されており、伸展している神経突起も多数がTH陽性であることがわかる。また、第6図に示すように、THと同様に、SCS全体が、GABA作動性ニューロンのマーカであるGADに対する抗体によって強く染色されており、伸展している神経突起も多数がGAD陽性であることがわかる。さらに、第7図に示すように、SCSがコリン作動性ニューロンのマーカであるChATに対する抗体によって強く染色されていることがわかる。即ち、第5図、第6図及び第7図に示すように、TH、GAD及びChATのそれぞれの発現の誘導が起きていることがわかる。

アストロサイト馴化培地中の分化誘導因子（群）により、浮遊培養によって形成されたSCS表層の神経幹細胞が、細胞接着分子の働きと協調して非常に

効率良く神経細胞へと分化できることがわかった。また、前記アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物を用いた浮遊培養と接着培養との逐次培養法においては、グリア細胞への分化は認められず、アストロサイトが分泌する誘導因子（群）が、神経幹細胞から神経細胞への分化決定に強い作用をもつ可能性が示唆された。アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で浮遊培養されたSCSが接着性培養基質に接着できる割合は、90%以上であり、接着したSCSが神経分化の指標となる神経突起を伸展させる割合は、ほぼ100%であった。したがって、実験的な操作ミス等を考慮しても、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物を用いた浮遊培養によって増殖するSCSは、ほぼ全てが神経幹細胞へと条件付けが行なわれ、さらに接着培養による細胞接着分子の働きにより神経への分化が決定付けられたと考えられる。また、接着培養におけるアストロサイト馴化培地は、神経細胞への分化促進作用は示すが、他の神経細胞培養用培地、例えば、DMEM:F-12/N-2 supplement、Neurobasal™ B-27〔ギブコ ビーアールエル(GIBCO BRL) 社製〕等によっても神経細胞への分化が認められる。このことは、SCSが浮遊培養によって神経幹細胞へと分化すると、デフォルトとして神経細胞へと分化し、細胞接着分子との相互作用によりその性質発現が促進されるものと考えられる。

なお、胚性幹細胞のコロニーの塊をそのまま接着させてアストロサイト馴化培地で培養しても分化誘導は起こらなかったため、胚性幹細胞のコロニーを浮遊培養させることが必須条件であると考えられる。

実施例4 神経幹細胞の増殖

浮遊培養したSCSの表層に神経幹細胞層が形成されるが、そのまま浮遊培養又はアストロサイト馴化培地等で接着培養すると神経細胞へと分化していく。そこで、前記SCSから神経細胞への分化を抑制し、神経幹細胞を増殖させるために、浮遊培養後のSCSを、bFGFの存在下、37℃、CO₂濃度5%、100%の加湿雰囲気下に培養した。

前記 b F G F は、神経幹細胞を未分化な状態に維持し、かつ細胞増殖を促進する因子であり、S C S 表層に形成された神経幹細胞でも有効であろうと考えられた。S C S を実施例 3 と同様に接着性培養基質に接着させた。また、培養液として、最終濃度 20 ng/ml b F G F を含む Neurobasal™

B-27 を用いた。1~2 日おきに、培養物に、b F G F を 20 ng/ml になるように新たに添加した。正立蛍光顕微鏡〔ニコン(Nikon) 社製〕を用い、S C S 及びその周辺の形態の観察を行なった。

その結果、接着培養直後は、神経細胞の分化が見られ神経突起の伸展が観察された。1~2 日目から接着した S C S から、神経細胞とは形態的に異なる細胞が出現し遊走していた。

さらに、細胞への B r d U の取り込みを前記実施例 1 と同様に調べた。また、S C S 及びその周辺について、神経幹細胞マーカーであるネスチンの発現を、マウス由来抗ネスチン抗体を用い、前記実施例 1 におけるネスチンの検出と同様に、免疫組織化学的手法により調べた。結果を第 8 図に示す。

第 8 図の免疫蛍光組織化学の結果で示すように、遊走してくる細胞は、ネスチン陽性であり、神経幹細胞であることがわかる。すなわち、培養液をアストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物から、b F G F を含む Neurobasal™ B-27 に換えることにより、神経細胞への分化が抑制され、ネスチン陽性の神経幹細胞が増殖し S C S から多数遊走してくることがわかる。

また、1 個の S C S から広がった神経幹細胞のコロニーを観察した結果を第 9 図に示す。その結果、第 9 図に示すように、驚くべく均一に多数の神経幹細胞が得られることがわかる。遊走してくる神経幹細胞は、密に細胞同士が接着しており、培養基質に接着した S C S を中心にして半径約 600 μ m の円心状に遊走し、大量の神経幹細胞が 1 個の S C S から得られることがわかる。Neurosphere 法や他の単層培養法では、このように均一で多数の神経幹細胞を調製することは困難であり、本実施例における方法が優れていることがわかる。

また、本実施例のように、SCSを用いて、神経幹細胞を調製する方法は、SCSが遊走する神経幹細胞コロニーの種として何回も使用できるという優れた特徴を有する。即ち、SCSを接着させて神経幹細胞を遊走させた後、中心にあるSCSをガラスキャピラリーで拾い上げ、新たな接着性培養基質上に移すことにより、再びそのSCSから神経幹細胞を遊走させることができる。

bFGFを含むNeurobasal™ B-27中、神経幹細胞を遊走させるSCSにおけるBrdUの取り込み及びネスチンの発現の分布を調べた。その結果を第10図に示す。第10図に示すように、接着して神経幹細胞を遊走させるSCSは、BrdU陽性であり、抗BrdU抗体による染色は、SCSの芯の部分で強いが、第1図と比較すると、BrdUの取り込みが全体に広がっていることがわかる。また、第10図に示すように、抗ネスチン抗体により芯以外が染色されているため、SCS内部で神経幹細胞に分化した割合が増加したことがわかる。神経幹細胞のSCS内での増殖により培養基質への遊走が生じたと考えられる。SCSは、それ自体が神経幹細胞として盛んに細胞分裂を繰り返しているために何回も種として使用することが可能となる。

本実施例により、SCSをbFGF存在下で接着培養することにより、多数の神経幹細胞を調製することができることが示される。

実施例 5

マウス胚性幹細胞HK細胞のコロニーをアストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で浮遊培養してSCSを形成させる際、該HK細胞の浮遊培養開始時から、終濃度20 ng/ml bFGFを含む培地〔アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物（体積比＝1：1）〕中、CO₂ インキュベーター内で浮遊培養を行なった。CO₂ インキュベーター内での培養条件は、37℃、空气中5% CO₂ 及び100%加湿雰囲気であった。培養に際し、35 mmディッシュ中2 mlの培養液で約10～20個の胚性幹細胞のコロニーを培養した。1～2日おきに、終濃度20 ng/mlとなるようにbFGFを、浮遊培養中の培養物に添加した。

浮遊培養4日目、培養物に、ブロモデオキシウリジン (BrdU) を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように添加した。なお、BrdUの取り込みは、細胞分裂の指標となる。培養物を、前記と同様の培養条件で8時間インキュベートした。ついで、得られた細胞を、BrdUを含まない培地で1時間培養して、洗浄した。その後、得られた細胞を、4% (w/v) パラホルムアルデヒド、0.4M ショ糖、50mM リン酸緩衝液 pH 7.4 で30分間固定し、0.1% (v/v) Triton™ X-100 処理と10% (w/v) BSA-PBSによるブロッキングとに供した。

ブロッキング後の細胞 (Stem Cell Sphere; 以下、SCS と略す) と、マウス由来抗ネスチン抗体とを 4°C で一晩インキュベートした。得られた混合物と蛍光標識ウサギ抗マウス IgG 抗体とを、室温で2時間インキュベートし、さらに、ビオチン標識マウス抗BrdU抗体と 4°C で一晩インキュベートした。ついで、得られた混合物と、蛍光標識ストレプトアビジンとを室温で2時間インキュベートした。その後、得られた細胞について、ツァイス (Zeiss) 社製の共焦点レーザー走査顕微鏡 (商品名: LSM 510) で観察した。神経幹細胞のマーカであるネスチンと細胞分裂の指標となるBrdUの分布を調べた免疫蛍光染色像を第11図に示す。

第11図に示すように、SCS表層から芯を除く大部分がネスチンに陽性な細胞となり増殖していた。また、これらの細胞は、BrdUにも陽性であった。アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物への神経幹細胞の増殖因子であるbFGFの添加により、驚くべく効率よく神経幹細胞を作製できることが示された。

実施例6 増殖した神経幹細胞の神経細胞への分化

実施例4で得られた神経幹細胞が、SCS表層に形成される神経幹細胞と同様に神経細胞に分化するかどうかを調べた。具体的には、bFGFを含む Neurobasal™ B-27 でSCSを培養し、遊走神経幹細胞を得、分化が抑制されている前記神経幹細胞について、アストロサイト馴化培地とアスト

ロサイト基本培地との混合物に培地を37℃前後、5%前後CO₂濃度100%加湿雰囲気下、交換することにより、神経細胞に分化誘導できるかどうかを調べた。結果を第12図に示す。

第12図に示すように、細胞同士が密着していた神経幹細胞が、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物に培地を交換することにより、1日後には、お互いが密に接着しながら遊走していた神経幹細胞が離散して広がり、神経細胞へと形態が分化することがわかる。また、SCS表層に形成された神経幹細胞と同じく、遊走した神経幹細胞もアストロサイト馴化培地により神経細胞に分化することがわかる。かかる結果により、大量に調製した神経幹細胞から、そのまま大量の神経細胞の作製を行ないということが示唆される。

また、細胞へのBrdUの取り込みを前記実施例1と同様に調べた。また、SCS及びその周辺について、神経幹細胞マーカーであるネスチン、分化した神経細胞マーカーであるニューロフィラメント、ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるチロシン水酸化酵素（以下、THと略す）、GABA作動性ニューロンのマーカーであるグルタミン酸脱炭酸酵素（以下、GADと略す）及びコリン作動性ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼのそれぞれの発現を、各マーカーに対する抗体を用い、前記実施例1におけるネスチンの検出と同様に、免疫組織化学的手法により調べた。結果を第13図、第14図、第15図に示す。

第13図に示すように、NF陽性の神経細胞の大部分でドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるTHが発現することがわかる。すなわち、SCS内部にとどまっている神経幹細胞からTH陽性の神経細胞が分化するだけでなく、遊走した神経幹細胞からもTH陽性の神経細胞が分化することがわかる。また、第13図に示すように、遊走した神経幹細胞由来の神経細胞において、THとGADとの共発現を示す神経細胞が認められ、未成熟の神経細胞が存在することが示唆された。さらに、第15図に示すように、細胞内に神経伝達物質のセロトニンを含む神経細胞が確認できた。これらの結果より、増殖させた神経幹

細胞を使うことによって、

- ①従来の既報の方法ではできなかった均一な神経細胞を大量に調製することができ、
 - ②分裂の盛んな胚性幹細胞を出発材料としているので、High Throughput Screening に必要な神経細胞を提供することができ、
 - ③脳から調製する初代培養神経細胞を用いた場合には困難であった、遺伝子を操作した神経細胞をも大量に調製することができる
- という優れた効果が得られることがわかる。

実施例 7 増殖した神経幹細胞のアストロサイトへの分化。

神経幹細胞は、多分化能を持つ細胞であるため、培養条件を変えることにより神経細胞以外の細胞種に分化できるか検討した。

実施例 4 と同様に SCS を培養して、接着させた SCS から神経幹細胞が遊走し、広がったコロニーを形成した時点で、bFGF を含む Neurobasal™ B-27 を、bFGF 不含 Neurobasal™ B-27 に交換し、37℃前後、5%前後 CO₂ 濃度、100%加湿雰囲気下、培養を続けた。

その結果、神経細胞に分化する時と同じく、数日後にコロニーの周辺部において細胞同士が密着していた状態の細胞が、個々に分離してきた。さらに、分離した細胞が、アストロサイトに特有の分岐した数多くの突起を持つ細胞へと分化してきた。この段階で、免疫蛍光組織化学により、アストロサイトのマーカーであるグリア繊維性酸性タンパク質 [Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)] の発現を調べた。

その結果、第 16 図に示すように、神経幹細胞を供給し続けた種であった SCS 及び遊走した神経幹細胞全てが GFAP 陽性のアストロサイトに分化しており、NF には陰性であることがわかる。また、第 16 図に示すように、コロニー周辺部では、アストロサイト特有の短い分岐した突起が抗 GFAP 抗体により染色された。即ち、実施例 6 と併せて、培養条件を変えることにより、神経幹細胞を、神経細胞又はアストロサイトのどちらかに分化決定できることが

わかる。

すなわち、従来、神経幹細胞を一つの細胞種に限定して分化させることは困難であったが、本実施例の方法によれば、実質的に均一な神経幹細胞を大量に調製できるため、神経幹細胞を一つの細胞種に限定して分化させることができる。したがって、再生医療、移植医療等において最大の問題となる、移植細胞の癌化、癌化等に対して、本実施例のように、SCSを用いた方法の有効性が期待できる。

実施例 8 分散された神経幹細胞の神経細胞への分化

実施例 4 で得られた神経幹細胞を含む 60 mm ディッシュから培地を除き、ダルベッコの PBS (Ca、Mg 不含) で洗浄した。ついで、前記 60 mm ディッシュに、2 ml の PBS を添加し、37℃で 5 分間インキュベートした。培養基質との接着が弱くなった神経幹細胞をピペティングにより剥がし、700×g で 5 分間の遠心分離によって、該神経幹細胞を回収した。ついで、前記神経幹細胞に、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物 2 ml を添加して懸濁し、細胞接着分子でコートした 35 mm ディッシュに播種した。その結果、第 17 図に示すように、実施例 4 で得られた神経幹細胞は、一度、接着性培養基質から剥がして単層培養しても、数日のうちに神経細胞へと分化することがわかる。

実施例 9 凍結保存した神経幹細胞からの神経細胞への分化

実施例 8 と同様の方法で神経幹細胞を回収した。得られた神経幹細胞を、10% (v/v) DMSO / 90% (v/v) FCS に懸濁し、ディープフリーザー中、-80℃で凍結保存した。

凍結保存した神経幹細胞を、37℃のインキュベーター中で融解し、得られた産物に DMEM 5 ml を添加し、700×g、5 分間の遠心分離を行なうことにより、神経幹細胞を洗浄し、FCS を除去した。ついで、得られた神経幹細胞に、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物 2 ml

を添加し、神経幹細胞を懸濁し、細胞接着分子でコートした3.5mmディッシュに播種した。第18図に、凍結保存された神経幹細胞の神経細胞への分化を調べた結果を示す。

第18図で示すように、凍結保存した神経幹細胞を用いて単層培養しても、数日のうちに神経細胞へと分化することがわかる。即ち、大量に調製できる神経幹細胞を凍結し、必要時に融解して使用することができることがわかる。

実施例10 胚性幹細胞129SV細胞株の神経細胞への分化

前記実施例1～3におけるC57BL/6マウスの胚盤胞から作製され樹立された胚性幹細胞であるHK細胞株の代わりに、市販の129SVマウスの胚性幹細胞（継代数15、大日本製薬株式会社供給）[コントゲン(Kontgen F.)ら, *Int. Immunol.*, 5:957-964, (1993); マリセン(Malissen M.)ら, *EMBO J.*, 12:4347-4355., (1993)]を用いて、前記実施例1～3と同様の培養条件で分化誘導を検討した。第19図に、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中での浮遊培養を行ない、接着性培養基質で接着培養を行なった結果を示す。

第19図に示すように、浮遊培養後、接着性培養基質で接着培養を行なうと、129SV細胞株から得られたSCSから、多数の神経突起が伸展することがわかる。また、接着培養時の培地を、最終濃度20ng/ml bFGFを含むNeurobasal™ B-27に交換することにより、神経幹細胞の遊走が引き起こされ、HK細胞株と同じ現象が観察される。即ち、系統の異なるマウス由来の胚性幹細胞でも、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で胚性幹細胞を浮遊培養してSCSを形成させ、ついで、接着培養を行なう方法が適用できることが明らかとなった。

なお、浮遊培養以外の条件の場合、神経系細胞だけでなく他の細胞が確認される場合があり、神経系細胞への選択的な分化誘導は、困難である。

実施例11 カニクイザル胚性幹細胞(CMK-6)の神経細胞への分化

カニクイザルより樹立した胚性幹細胞株CMK-6細胞株 [スエモリ (Suemori, H.) ら, Dev. Dyn., 222:273-279, (2001)] が、マウス胚性幹細胞と同様に、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物による浮遊培養と接着性培養基質での接着培養とによって、神経細胞へと分化誘導されるか否かを検討した。

マウス初代繊維芽細胞を、フィーダー細胞層として、CMK-6細胞株を、最終濃度13.3% (w/v) FCSと 10^3 U/ml LIFとを含むDMEM:F-12 (1:1) で培養した。培養条件は、37℃、5% CO₂ であった。

CMK-6細胞株のコロニーが、400~500 μmの大きさになった段階で、マウスの場合と同様に、ガラスキャピラリーによってフィーダー細胞層から機械的に引き剥がした。ついで、得られたCMK-6細胞株のコロニーを37℃前後、5%前後のCO₂ 濃度、100%加湿雰囲気下で35mmのバクテリアディッシュ中、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物2ml中で10~20個のコロニーを浮遊培養した。

なお、マウス胚性幹細胞が盛り上がった状態でコロニーを形成するのに対して、CMK-6細胞株のコロニーは扁平であるため、引き剥がした直後は、紙がよじれたような状態で浮遊した。しかしながら、数時間後には、CMK-6細胞株は、胚性幹細胞同士の細胞間接着によって球状の形態を形成した。

また、マウス胚性幹細胞に比べて、CMK-6細胞株は、増殖が遅いため、浮遊培養でもCMK-6細胞株に由来するSCSの大きさが増大するのに時間を要した。

カニクイザル胚性幹細胞 (CMK-6細胞株) のSCS形成時における神経幹細胞への分化の状態を調べるため、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で10~12日浮遊培養後、固定し、マウスの場合と同様に、霊長類に対するウサギ由来抗ネスチン抗体で分布を調べた。さらに、浮遊培養後のSCSを接着培地に接着させ、7~10日後に遊走してきた細胞について、ネスチンに対する反応性も調べた。その結果を第20図に示す。

第20図に示すように、浮遊SCSは、全体が抗ネスチン抗体で染色される。また、接着SCSから遊走してきた細胞も抗ネスチン抗体で染色され、マウスの場合と同じく効率よく神経幹細胞がアストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物と浮遊培養によって作製できることが示された。

接着培養1日目におけるSCS及びその周辺を位相差顕微鏡により観察した結果を第21図に示す。

第21図に示すように、マウス胚性幹細胞由来のSCSと同様に、接着培養後1日目で、カニクイザル胚性幹細胞由来のSCSから神経細胞が遊走し、神経突起を伸展させているのがわかる。また、マウス胚性幹細胞の接着SCSでも観察されたように、SCS内で神経細胞に分化し、神経突起をSCSから盛んに伸展させていることがわかる。

また、カニクイザル胚性幹細胞CMK-6細胞株から得られたSCSから遊走してくる神経細胞における神経伝達物質の合成酵素の発現について、前記実施例1におけるネスチンの検出と同様に、免疫組織化学的手法により調べた。結果を第22図に示す。

第22図に示すように、NF陽性の神経細胞のほとんどがTH陽性であり、ドーパミン作動性ニューロンが分化誘導されたことがわかる。すなわち、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物による、浮遊培養及び接着性培養基質を使った接着培養によって、カニクイザル胚性幹細胞CMK-6細胞株も容易に神経細胞へと分化することがわかる。

このことから、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で浮遊培養し、接着培養して神経細胞へと分化させる方法が、マウスとは種が異なる霊長類のカニクイザル胚性幹細胞にも普遍的に適用できることがわかる。また、かかる方法は、種を超えて有効であり、普遍性があるものであると考えられる。さらに、カニクイザルが霊長類であることを考慮すると、この方法はヒト胚性幹細胞においても適用できる可能性がある。

なお、浮遊培養以外の条件の場合、神経系細胞だけでなく他の細胞が確認される場合があり、神経系細胞への選択的な分化誘導は、困難である。

実施例 1 2 遺伝子発現の解析

マウス由来のHK株

未分化の胚性幹細胞から神経細胞への分化誘導に伴う遺伝子発現を調べた。

未分化の胚性幹細胞を、37℃、空气中5% CO₂、100%加湿雰囲気下、4日間浮遊培養してSCSを形成させ、ついで、37℃、空气中5% CO₂、100%加湿雰囲気下、5日間接着培養して、神経細胞への分化を誘導した。

未分化の胚性幹細胞、浮遊培養によって形成したSCS及び接着培養で得られた細胞塊のそれぞれ20個から、慣用の方法でmRNAを調製した。得られたmRNAを鋳型として、プライマーとしてランダムヘキサマーを用いて、37℃60分間逆転写反応を行ない、cDNAを合成した。

なお、プライマーとして、Oct-4 (ES細胞特有の転写制御因子)、Pax-6 (神経前駆細胞に特有の転写制御因子)、ネスチン、NF-M、Nurr1 (ドーパミンニューロンのマーカー)、TH、GATA4 (内胚葉のマーカー)、Brachury (中胚葉のマーカー)、サイトケラチン17 (外胚葉表皮細胞のマーカー)、β-アクチン及びGAPDHのそれぞれを増幅するためのプライマーを用いた。

ついで、未分化の胚性幹細胞と、浮遊培養によって形成したSCSと、接着培養で得られた細胞塊との間で、GAPDHに対応する断片のPCR産物の量が、等しくなる量のcDNAを鋳型とし、前記プライマーを用いてOct-4 (24サイクル)、Pax-6 (30サイクル)、ネスチン (26サイクル)、NF-M (30サイクル)、Nurr1 (26サイクル)、TH (30サイクル)、GATA4 (30サイクル)、Brachury (30サイクル) 及びβ-アクチン (22サイクル) のそれぞれについて、PCRを行なった。PCRのサーマルプロファイルは、95℃15秒と58℃30秒と72℃45秒とを1サイクルとした。得られた各産物を電気泳動に供し分析した。結果を第23図に示す。

第23図に示すように、胚性幹細胞（レーン1）において検出されるOct-4は、浮遊SCS（レーン2）で減少し、接着SCSで神経に分化する状態（レーン3）では、シグナルは非常に弱くしか認められないことがわかる。また、神経幹細胞で発現しているネスチンは、浮遊SCSで急速に発現が高まり、接着SCSの段階でも発現が続くことがわかる。かかるネスチンの発現プロファイルは、神経幹細胞がどんどん分裂し神経細胞に分化することとよく一致している。さらに、神経細胞にしか発現しないNF、ドーパミンニューロンの合成酵素であるTH及びその転写因子のNurr1が、それぞれ浮遊SCSから接着SCSへと分化していくに従って遺伝子発現が強くなることがわかる。また、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で胚性幹細胞を浮遊培養してSCSを形成させ、ついで、接着培養を行なう方法により得られた分化神経細胞においては、内胚葉と中胚葉及び外胚葉のマーカ遺伝子の発現はほとんど変化していないため、前記方法は、EBを形成して分化させる方法とは異なっていることが明らかである。

ついで、時間経過による定量的な変化を調べた。未分化な胚性幹細胞クローンを、アストロサイト馴化培地とアストロサイト基本培地との混合物中で、4日間浮遊培養をして、SCSを形成させ、該SCSを5日間接着培養して、神経細胞への分化を誘導した。未分化な胚性幹細胞クローン（浮遊培養0日目）、浮遊培養2日目と4日目のSCS及び接着培養後2日目と5日目の細胞塊のそれぞれ4個又は5個から、慣用の方法でmRNAを調製した。得られたmRNAを鋳型として、逆転写反応を行ない、cDNAを合成した。

ついで、GAPDH、Oct-4、ネスチン及びTHのmRNA量を解析するために、前記と同様のサイクル数のPCRを行なって、産物量を定量し、それにより試料中のGAPDH、Oct-4、ネスチン及びTHそれぞれのmRNAの量を半定量的に求めた。その後、Oct-4、ネスチン及びTHそれぞれの量を、GAPDHの量で割り、Oct-4/GAPDH、ネスチン/GAPDH、TH/GAPDHとして相対的な発現量を求め、さらに、相対的な発現量の最高値を1として、グラフに示した。結果を第24図に示す。

その結果、第24図に示すように、神経幹細胞で発現しているネスチンは、浮遊SCSで急速に発現が高まり、接着SCSの段階でも発現が続くことがわかる。かかるネスチンの発現プロファイルは、神経幹細胞がどんどん分裂し神経細胞に分化することとよく一致している。さらに、ドーパミンニューロンの合成酵素であるTHが、浮遊SCSから接着SCSへと分化していくに従って遺伝子発現が強くなることがわかる。

産業上の利用可能性

本発明の実質的に単離された神経系細胞の製造方法によれば、胚性幹細胞の供給源に限定されることなく、大量に、かつ該胚性幹細胞から、神経系細胞以外の外胚葉性細胞、中胚葉性細胞及び内胚葉性細胞を誘導することなく効率よく、実質的に単離された神経系細胞を提供することができ、移植に適した神経系細胞を大量、かつ安定に供給することができる。したがって、神経再生医療等への応用が期待される。また、本発明の神経系細胞は、胚性幹細胞から、神経幹細胞を経て、神経細胞又はグリア細胞のいずれか1種に選択的に分化誘導されたものであるため、神経変性疾患、脊髄損傷、脳梗塞等に対する神経再生医療等における細胞又は組織の供給源として用いることができる。さらに、本発明の神経細胞によれば、神経変性疾患、脊髄損傷、脳梗塞等に対する神経細胞移植治療等の再生医療において、神経伝達物質の放出、神経間連絡の再構築等を可能にする。さらに、本発明のグリア細胞によれば、神経細胞、神経幹細胞と同時に移植して神経細胞の分化成長を支持し、さらに血液脳関門を形成して栄養物質の補給を行うことができる。

請求の範囲

1. アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養することを特徴とする、実質的に単離された神経系細胞の製造方法。
2. 胚性幹細胞が、哺乳動物由来の胚性幹細胞である、請求項1記載の神経系細胞の製造方法。
3. 哺乳動物が、マウス、カニクイザル、ヒト、及びラットからなる群より選ばれたものである、請求項2記載の神経系細胞の製造方法。
4. (A) アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養して、幹細胞球状凝集体 (SCS) を形成させる工程を含む、請求項1～3いずれか1項に記載の神経系細胞の製造方法。
5. 工程(A)の後に、
(B) 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) 及び/又は上皮成長因子 (EGF) の存在下、かつ細胞接着分子の存在下、該工程(A)で得られた幹細胞球状凝集体 (SCS) を培養する工程、
を行ない、それにより、SCSから遊走した細胞として神経幹細胞を得る、請求項4記載の神経系細胞の製造方法。
6. 工程(B)における培養が、工程(A)で得られた幹細胞球状凝集体 (SCS) と、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて行なわれる、請求項5記載の神経系細胞の製造方法。
7. (A') アストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分

の存在下、かつ塩基性繊維芽細胞成長因子（b F G F）及び／又は上皮成長因子（E G F）の存在下、胚性幹細胞を浮遊培養する工程、
を行ない、それにより、幹細胞球状凝集体（S C S）内に神経幹細胞を得る、
請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載の神経系細胞の製造方法。

8. 工程（A）の後に、

（B'）塩基性繊維芽細胞成長因子（b F G F）及び／又は上皮成長因子（E G F）の非存在下、かつアストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、工程（A）で得られた幹細胞球状凝集体（S C S）と、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養する工程、
を行ない、それにより、神経細胞を得る、請求項 4 記載の神経系細胞の製造方法。

9. 工程（A）の後に、

（B）塩基性繊維芽細胞成長因子（b F G F）及び／又は上皮成長因子（E G F）の存在下、かつ細胞接着分子の存在下、該工程（A）で得られた幹細胞球状凝集体（S C S）を培養する工程、及び
（C）b F G F 及び／又は E G F の非存在下、該工程（B）で得られた S C S と、細胞接着分子を保持した接着性培養基質とを接着させて培養する工程、
を行ない、それにより、S C S から遊走した細胞としてグリア細胞を得る、請求項 4 記載の神経系細胞の製造方法。

10. 塩基性繊維芽細胞成長因子（b F G F）及び／又は上皮成長因子（E G F）の非存在下、かつアストロサイト馴化培地又は該馴化培地と実質的に同等な成分の存在下、請求項 1 ～ 7 いずれか 1 項に記載の製造方法により得られた神経幹細胞を、細胞接着分子を保持した接着性培養基質と接着させて培養する、神経細胞の製造方法。

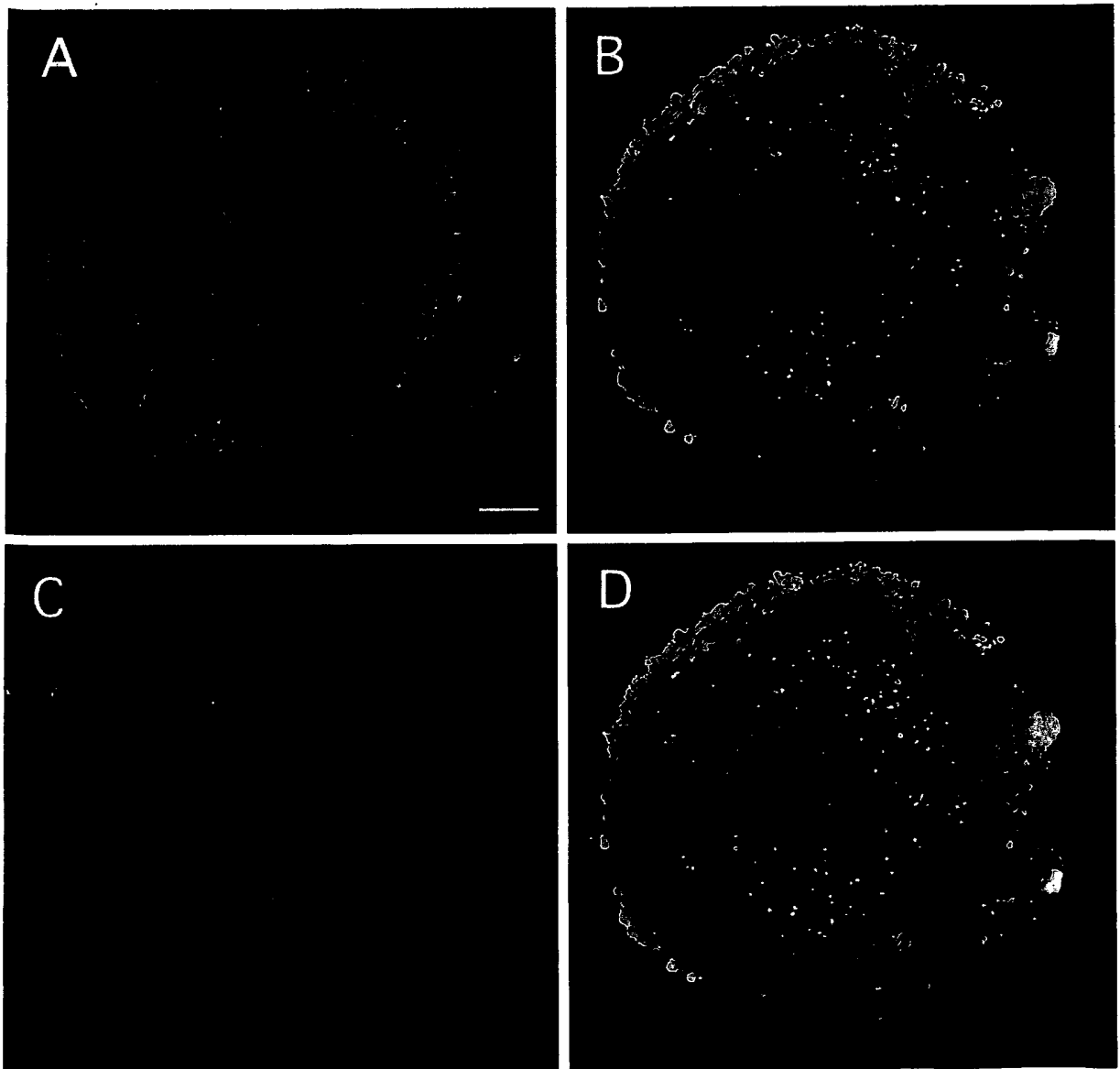
- 1 1. 請求項 1～7 いずれか 1 項に記載の製造方法により胚性幹細胞から分化誘導されてなる、実質的に単離された神経幹細胞。
- 1 2. 凍結保存されてなる、請求項 1 0 記載の神経幹細胞。
- 1 3. 請求項 8 又は 1 0 記載の製造方法により得られる、実質的に単離された神経細胞。
- 1 4. クラス III β チューブリン、ニューロフィラメント、チロシン水酸化酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素及びコリンアセチルトランスフェラーゼからなる群より選ばれた少なくとも 1 種を発現してなる、請求項 1 3 記載の実質的に単離された神経細胞。
- 1 5. 請求項 9 記載の製造方法により得られる、実質的に単離されたグリア細胞。
- 1 6. 請求項 1～7 いずれか 1 項に記載の製造方法により胚性幹細胞から分化誘導されてなる、実質的に単離された神経幹細胞を有効成分として含有してなる、細胞医薬組成物。
- 1 7. 請求項 8 又は 1 0 記載の製造方法により得られる、実質的に単離された神経細胞を有効成分として含有してなる、細胞医薬組成物。
- 1 8. 請求項 9 記載の製造方法により得られる、実質的に単離されたグリア細胞を有効成分として含有してなる、細胞医薬組成物。
- 1 9. (1) 請求項 1～7 いずれか 1 項に記載の製造方法により胚性幹細胞か

ら分化誘導されてなる、実質的に単離された神経幹細胞、

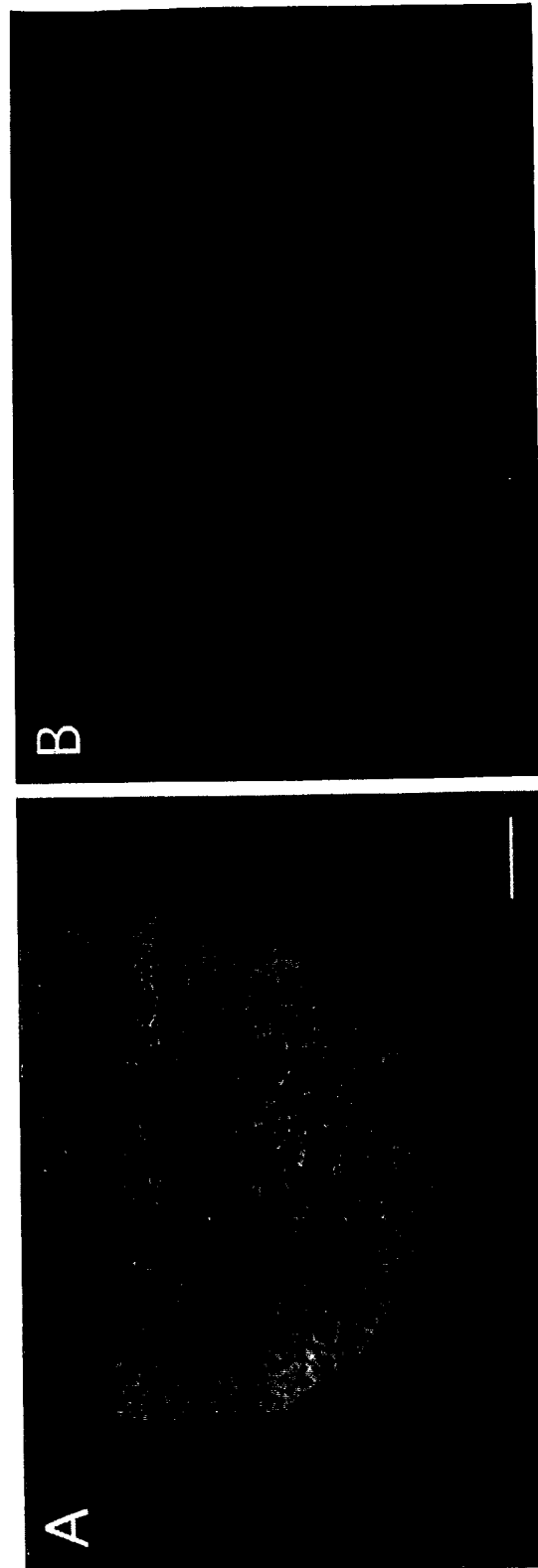
(2) 請求項 8 又は 10 記載の製造方法により得られる、実質的に単離された神経細胞、及び

(3) 請求項 9 記載の製造方法により得られる、実質的に単離されたグリア細胞からなる群より選ばれた少なくとも 1 つの細胞を、神経変性部位又は神経損傷部位に適用することを特徴とする、神経変性疾患又は神経損傷の治療方法。

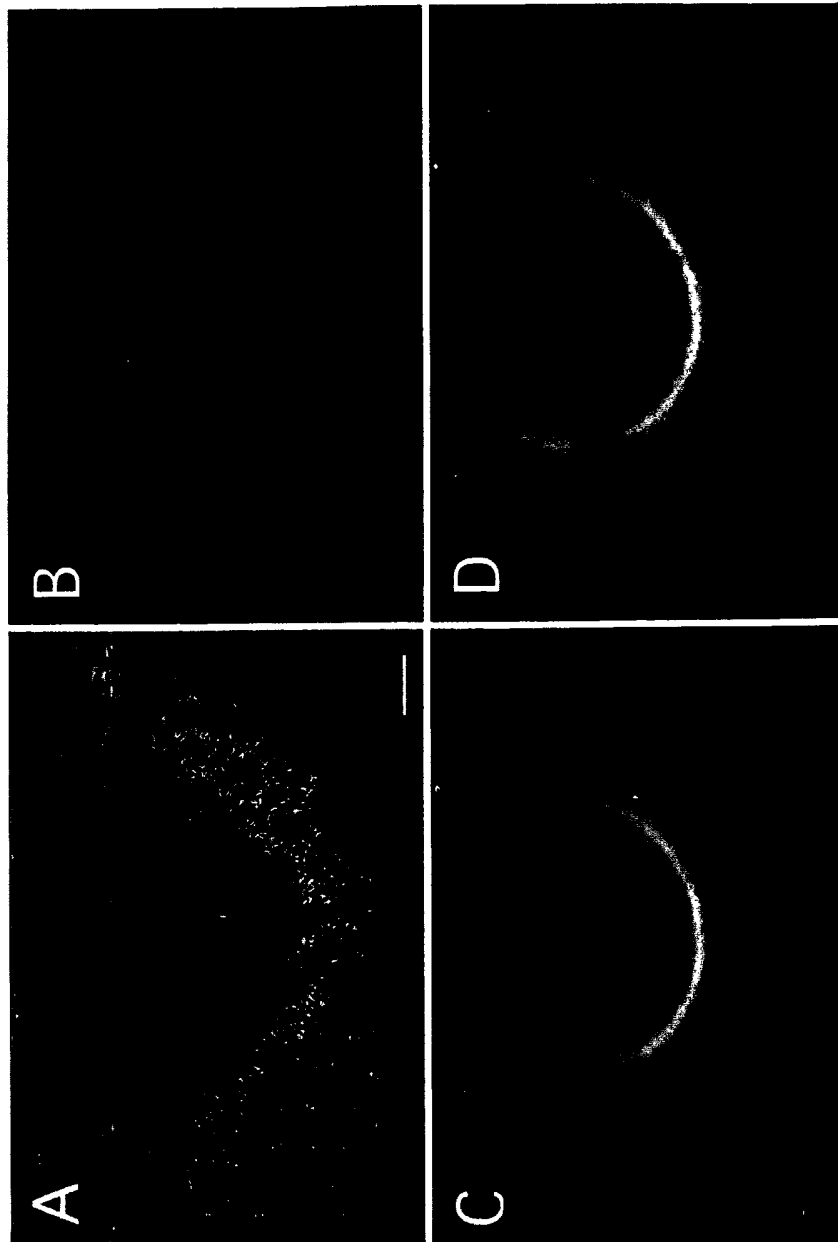
第 1 図



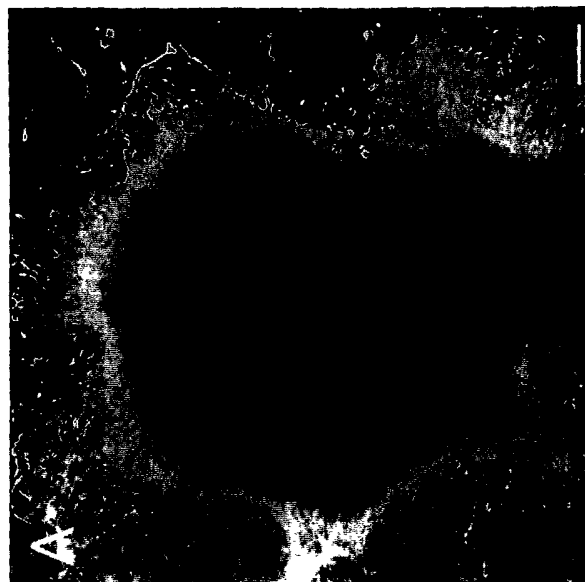
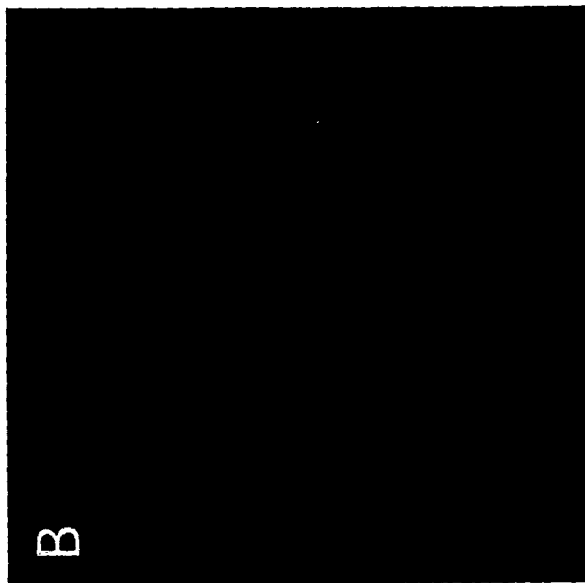
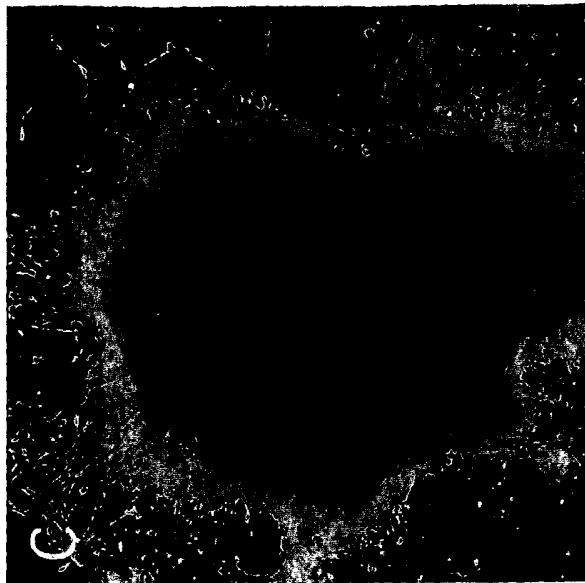
第 2 図



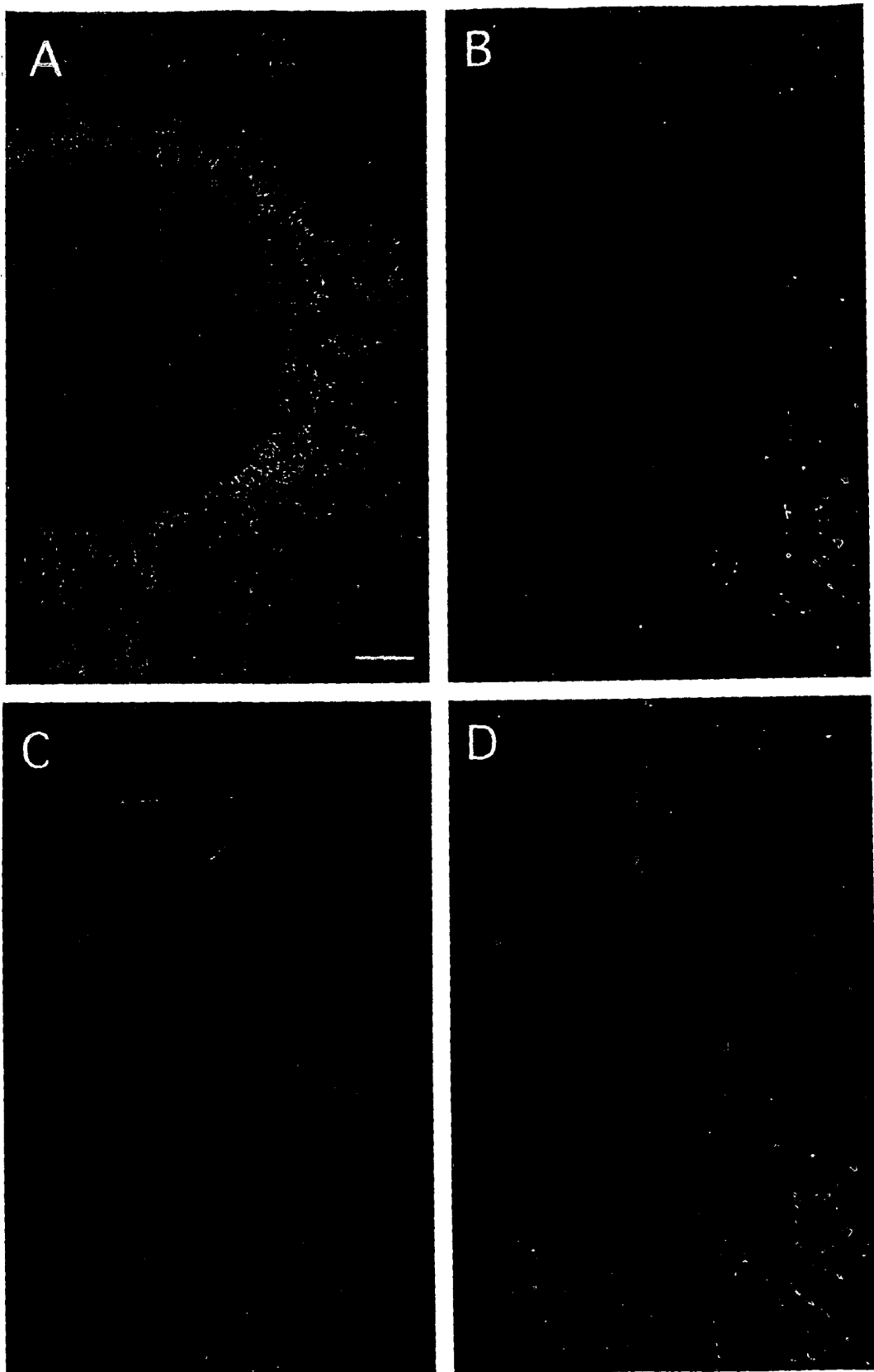
第 3 図



第4図



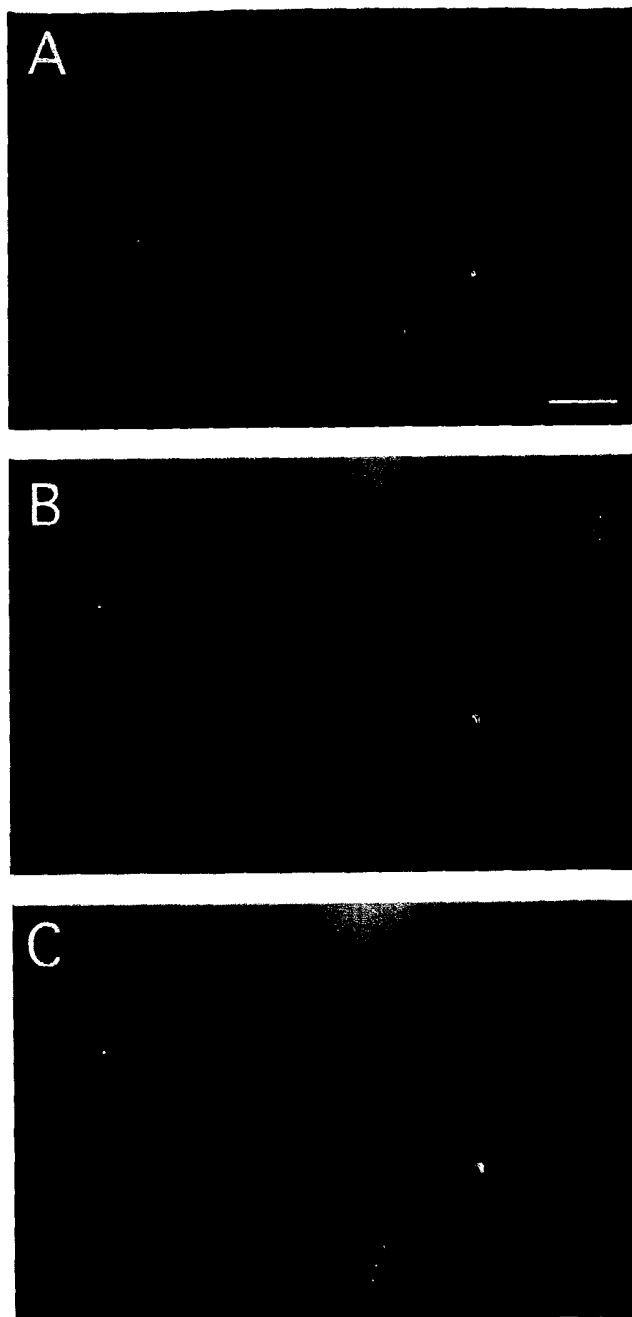
第 5 図



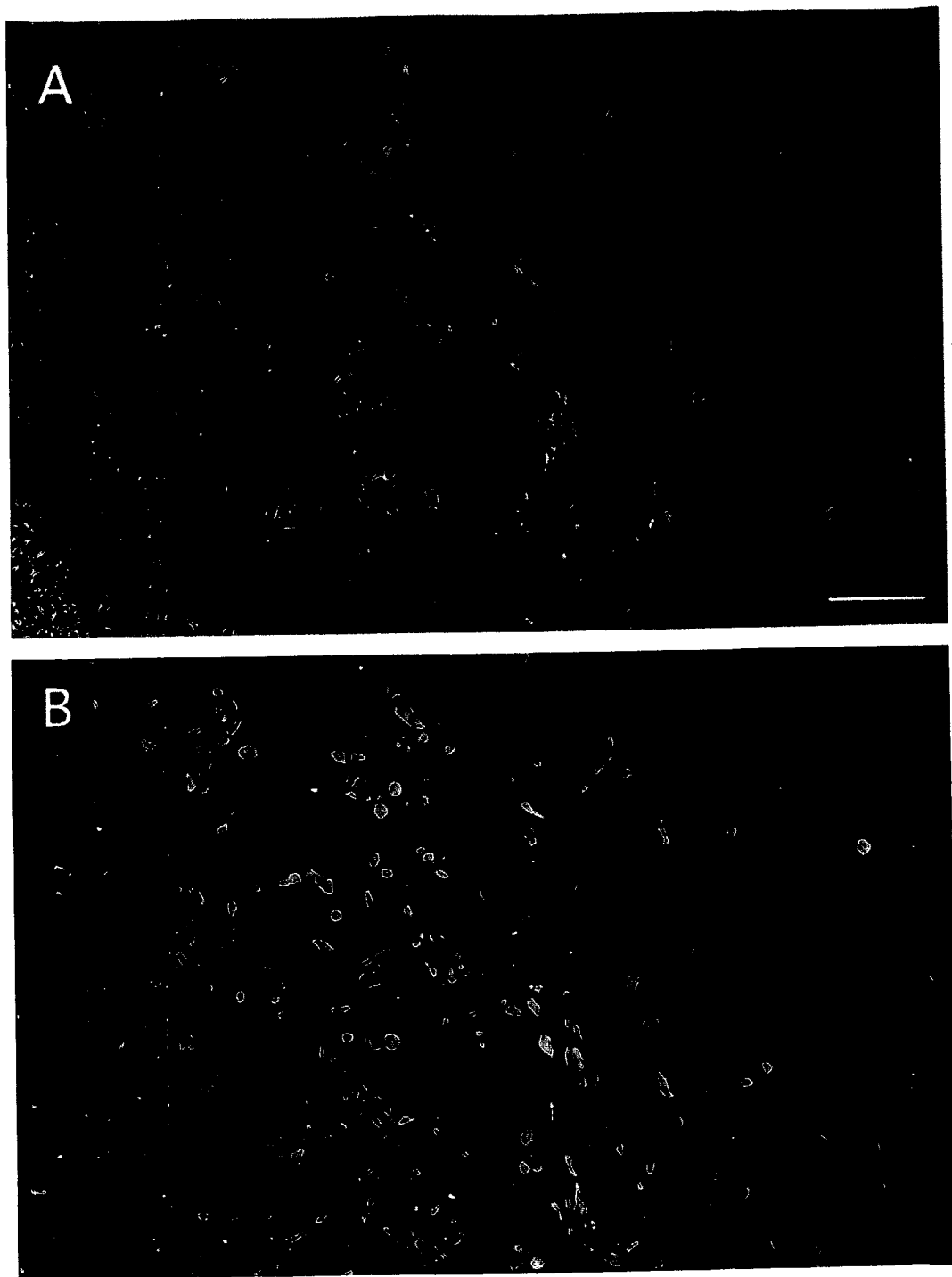
第 6 図



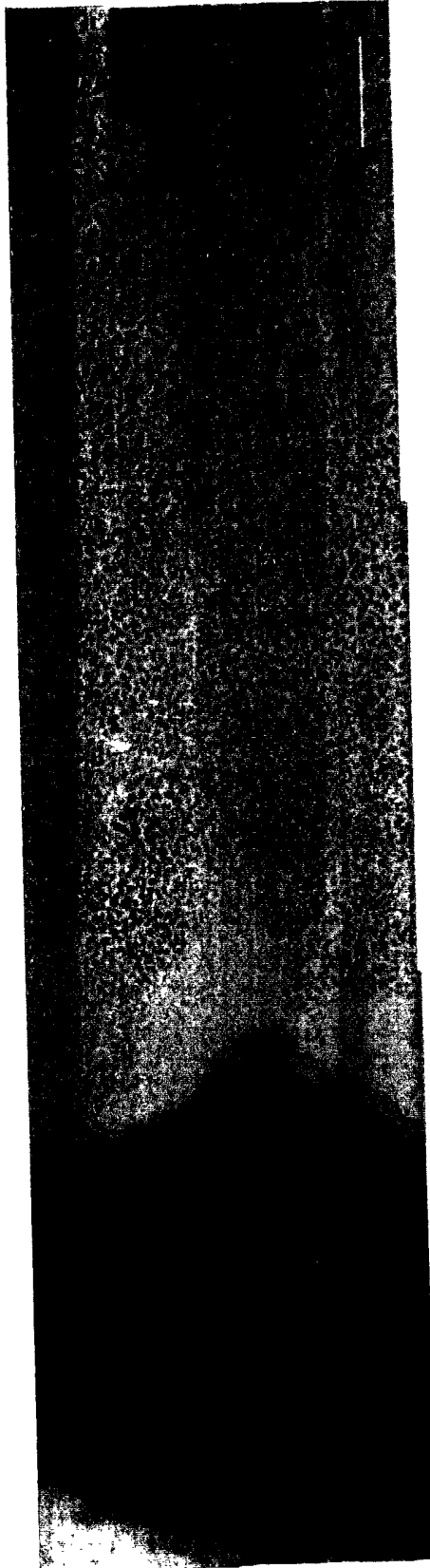
第7図



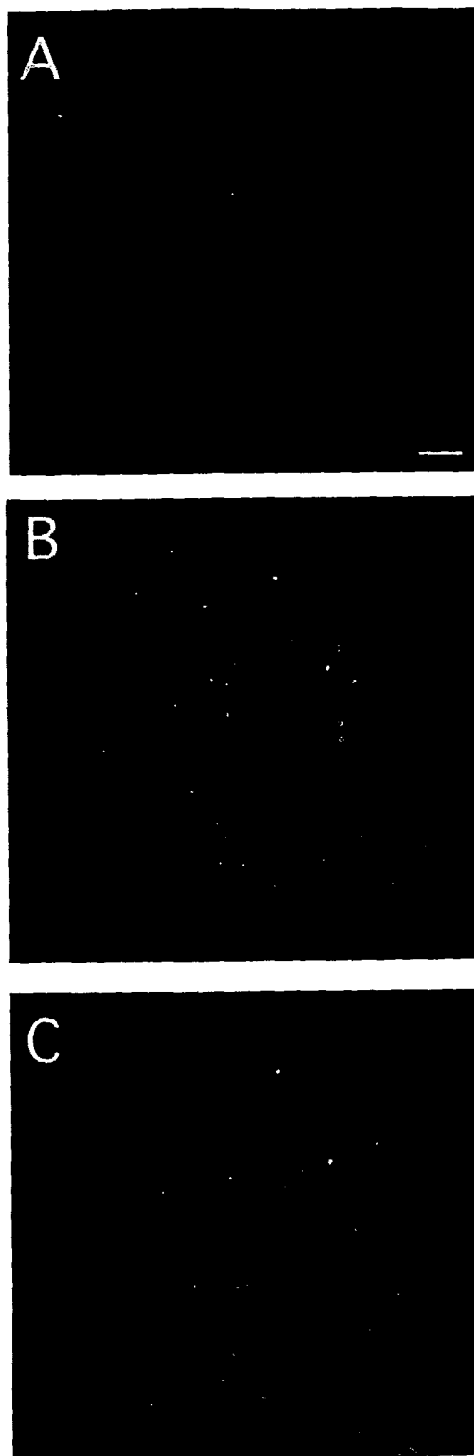
第 8 図



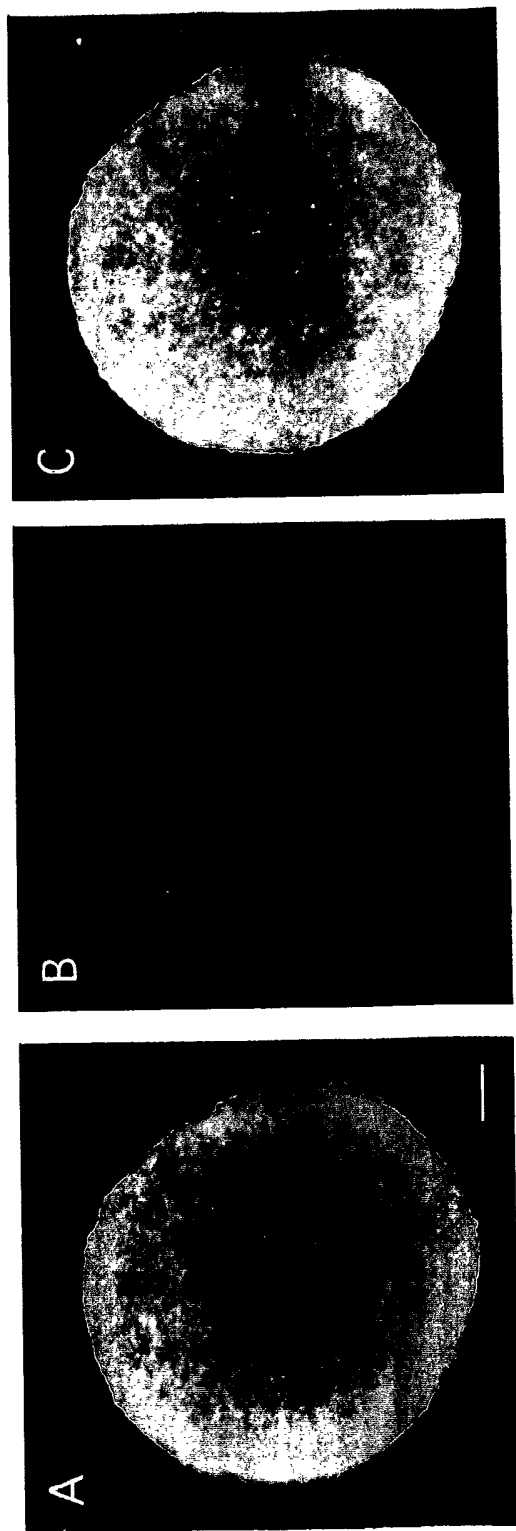
第 9 図



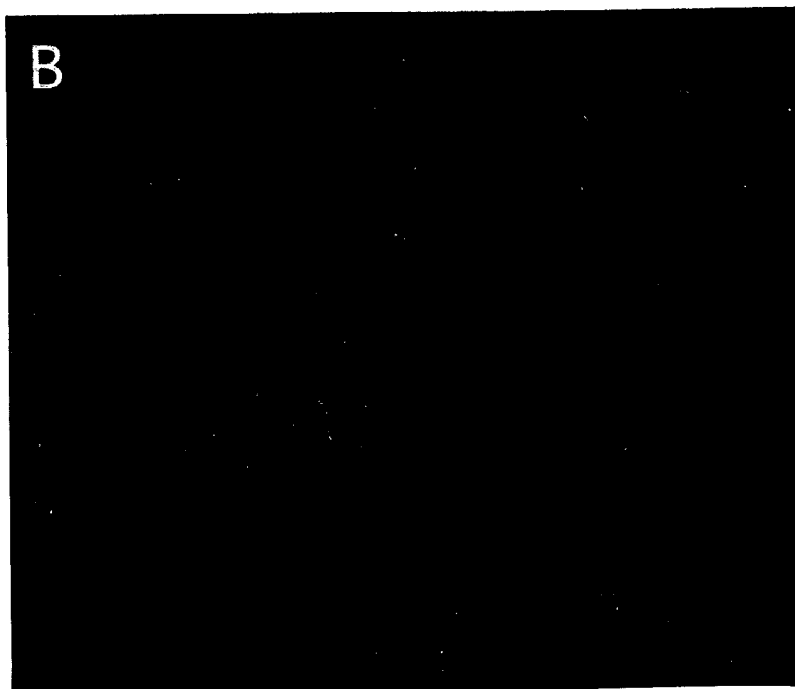
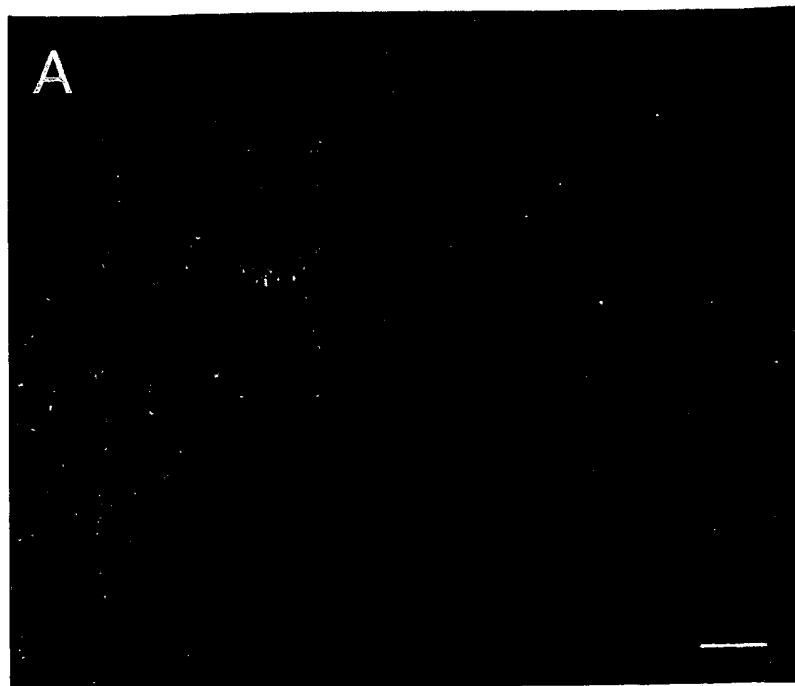
第 1 0 図



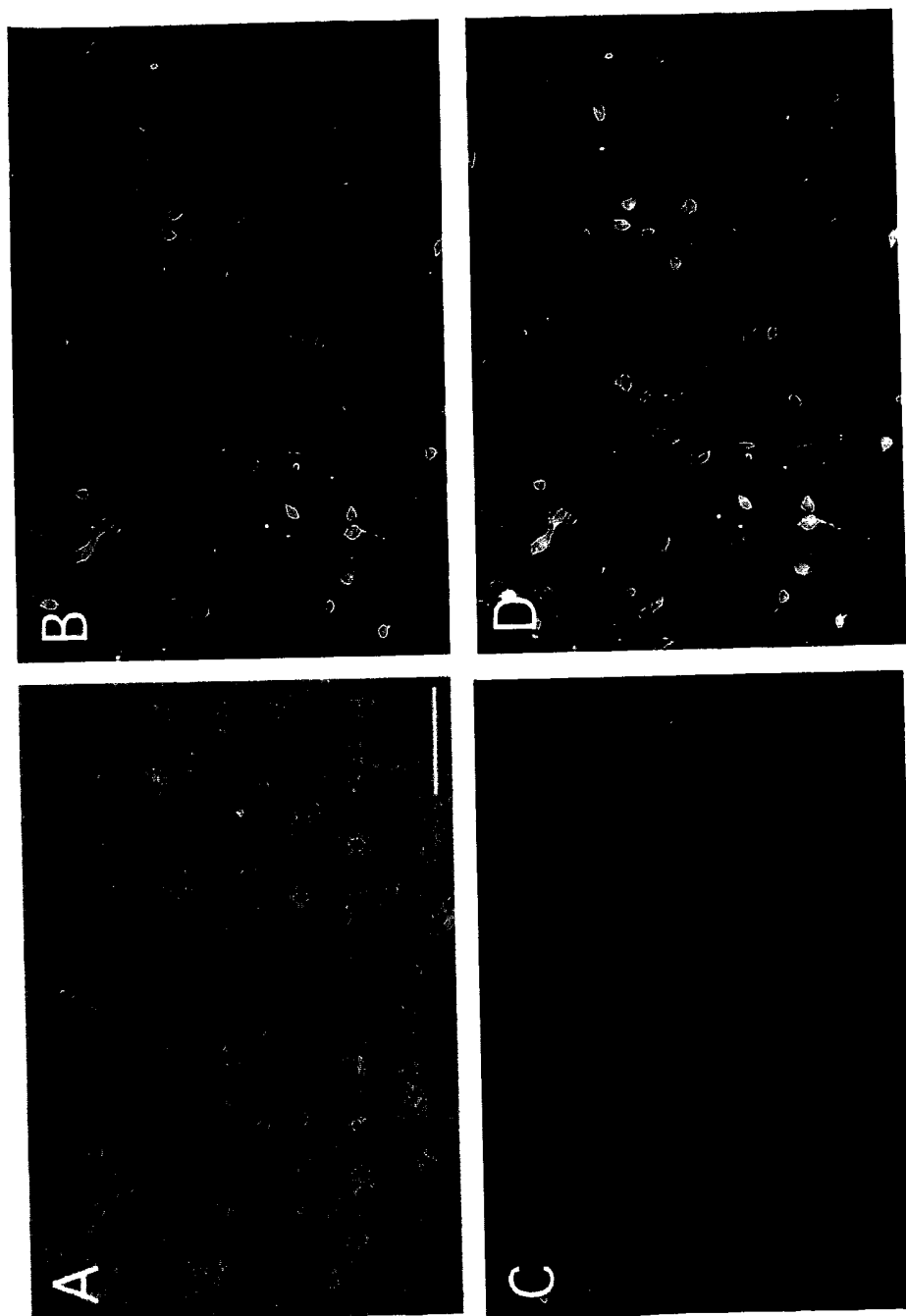
第 1 1 図



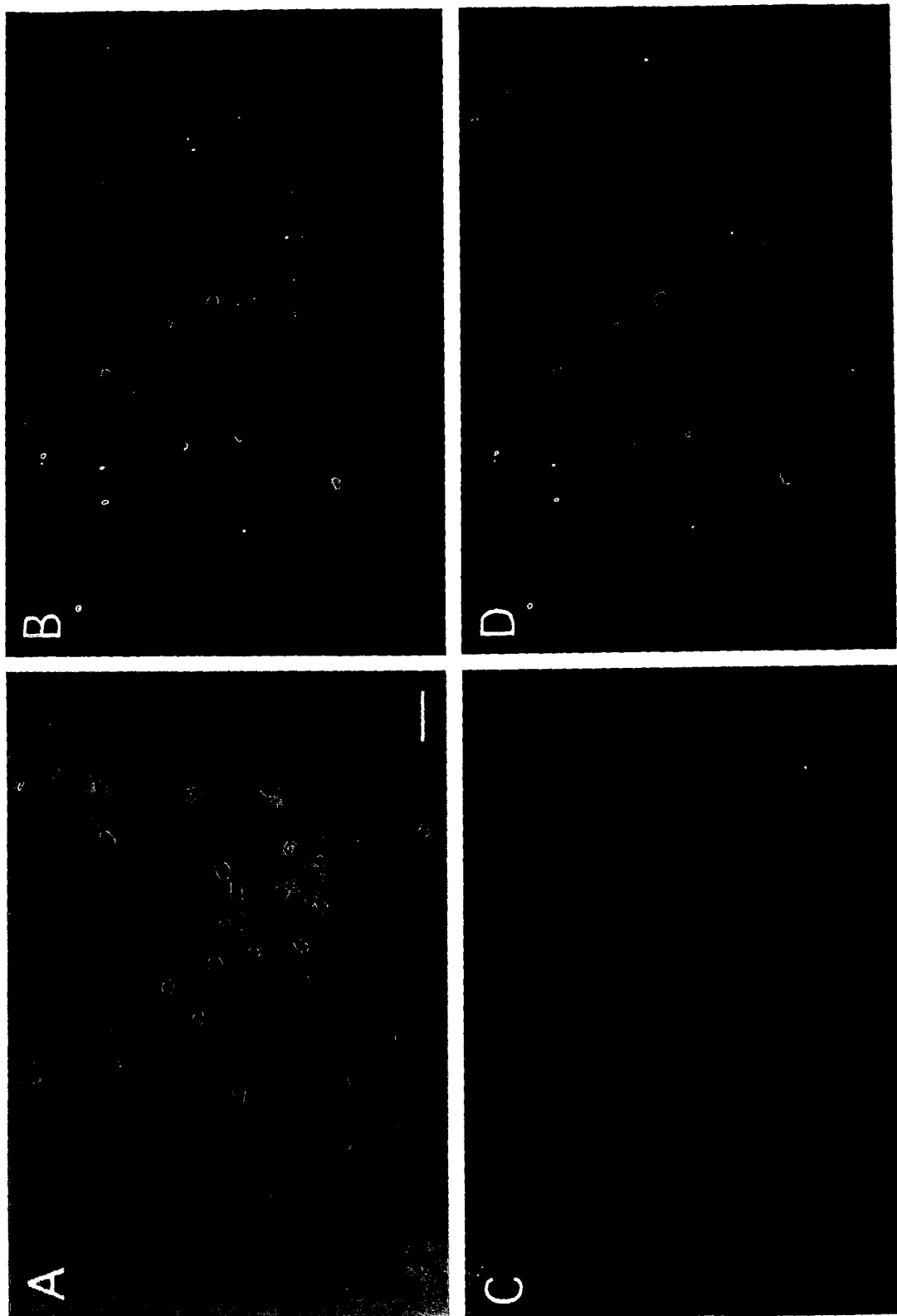
第 1 2 図



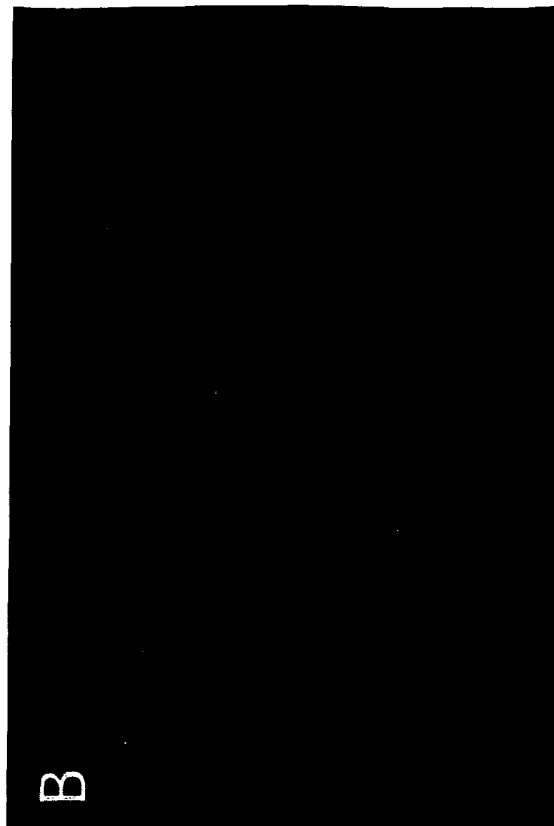
第 1 3 図



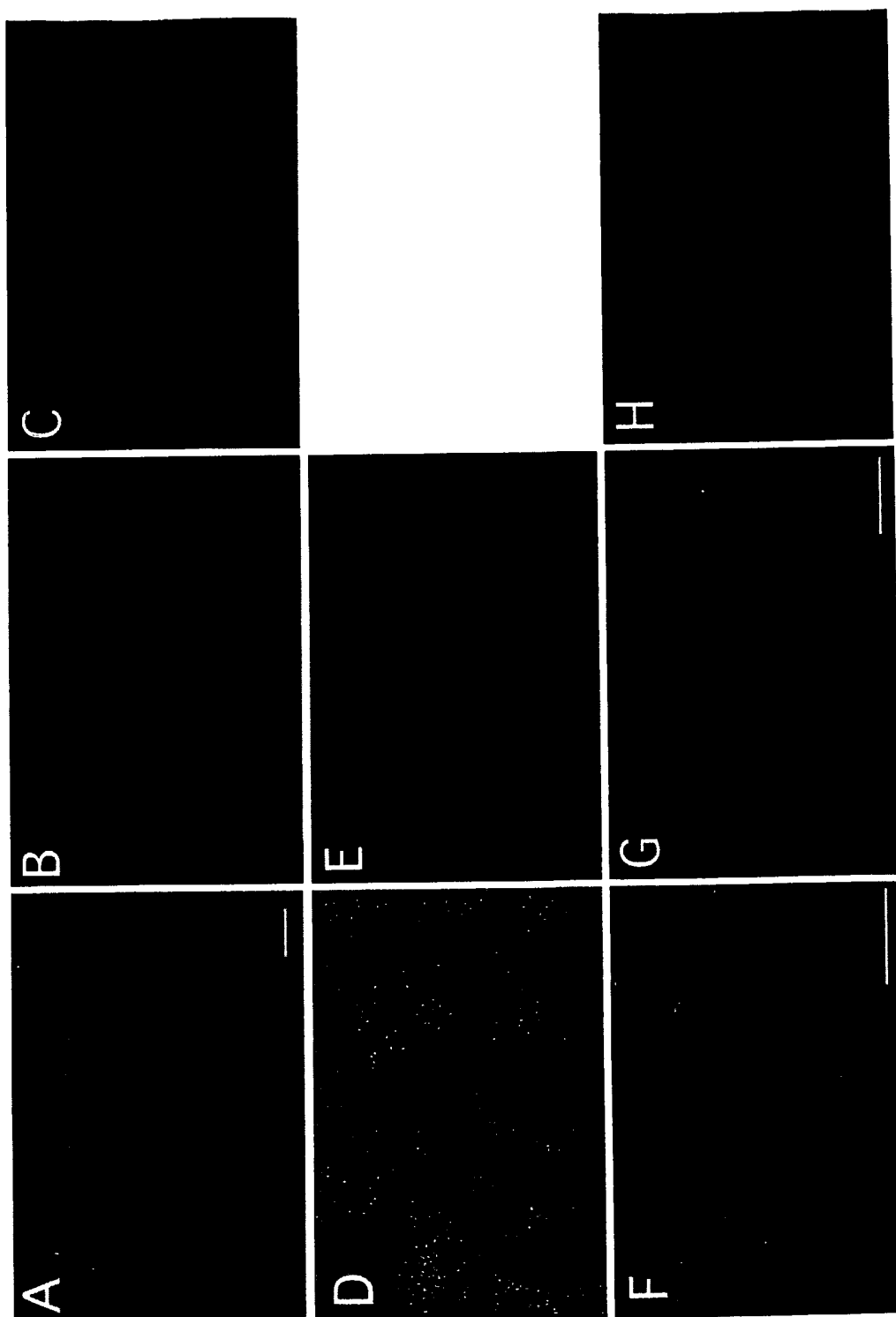
第 1 4 図



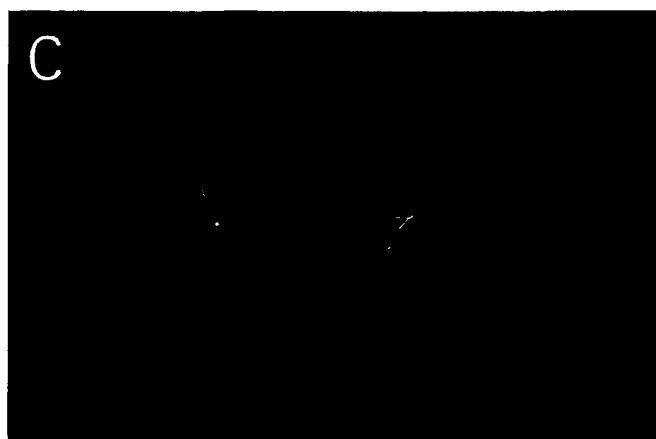
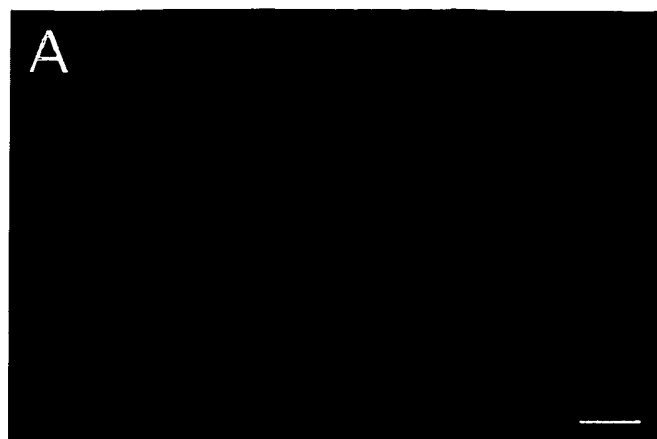
第 1 5 図



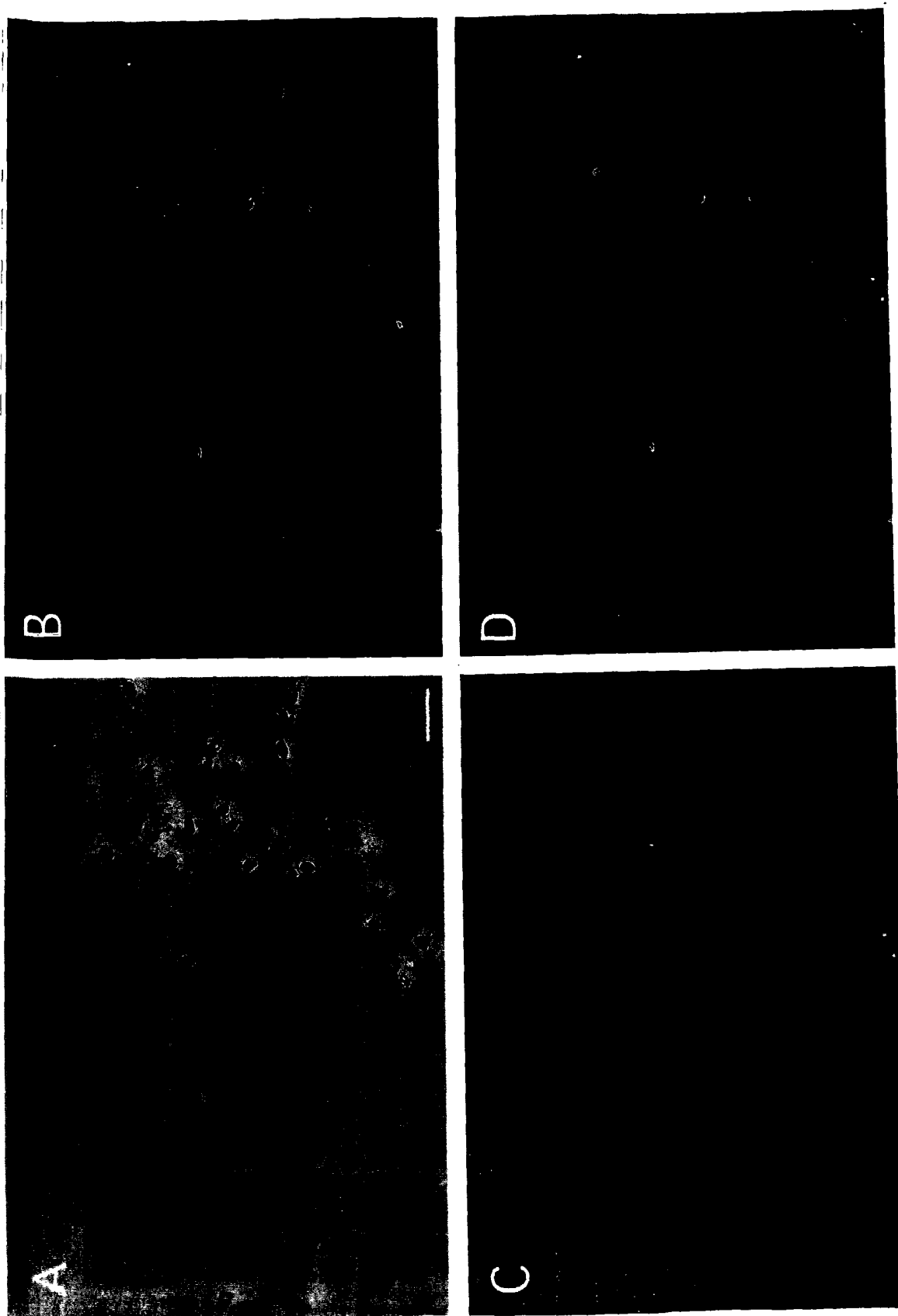
第 1 6 図



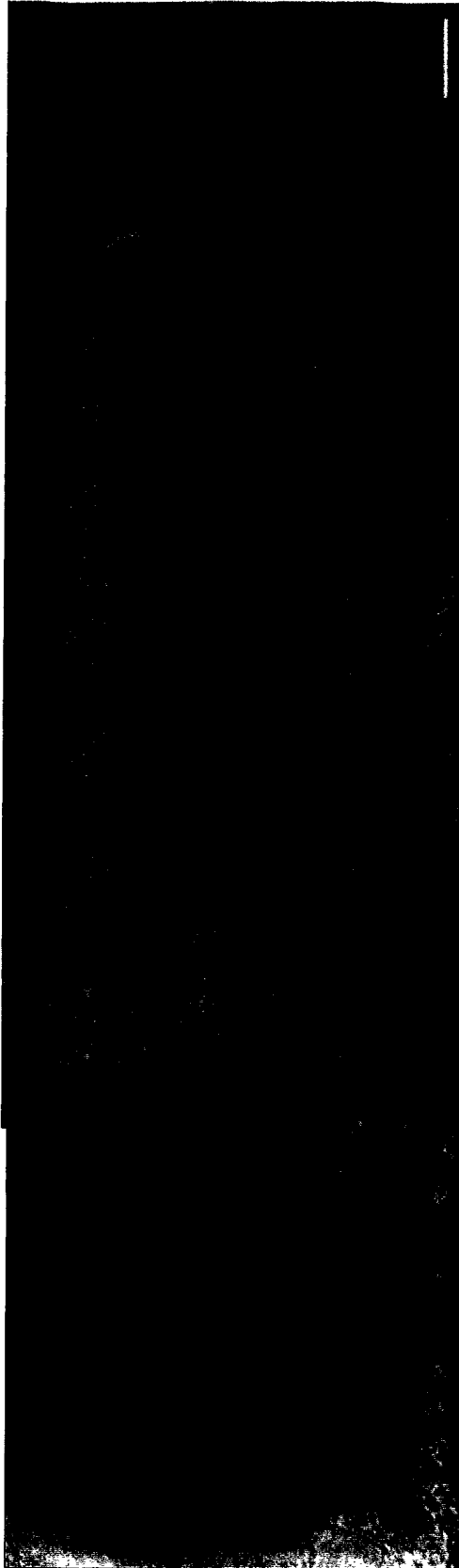
第 17 図



第 18 図



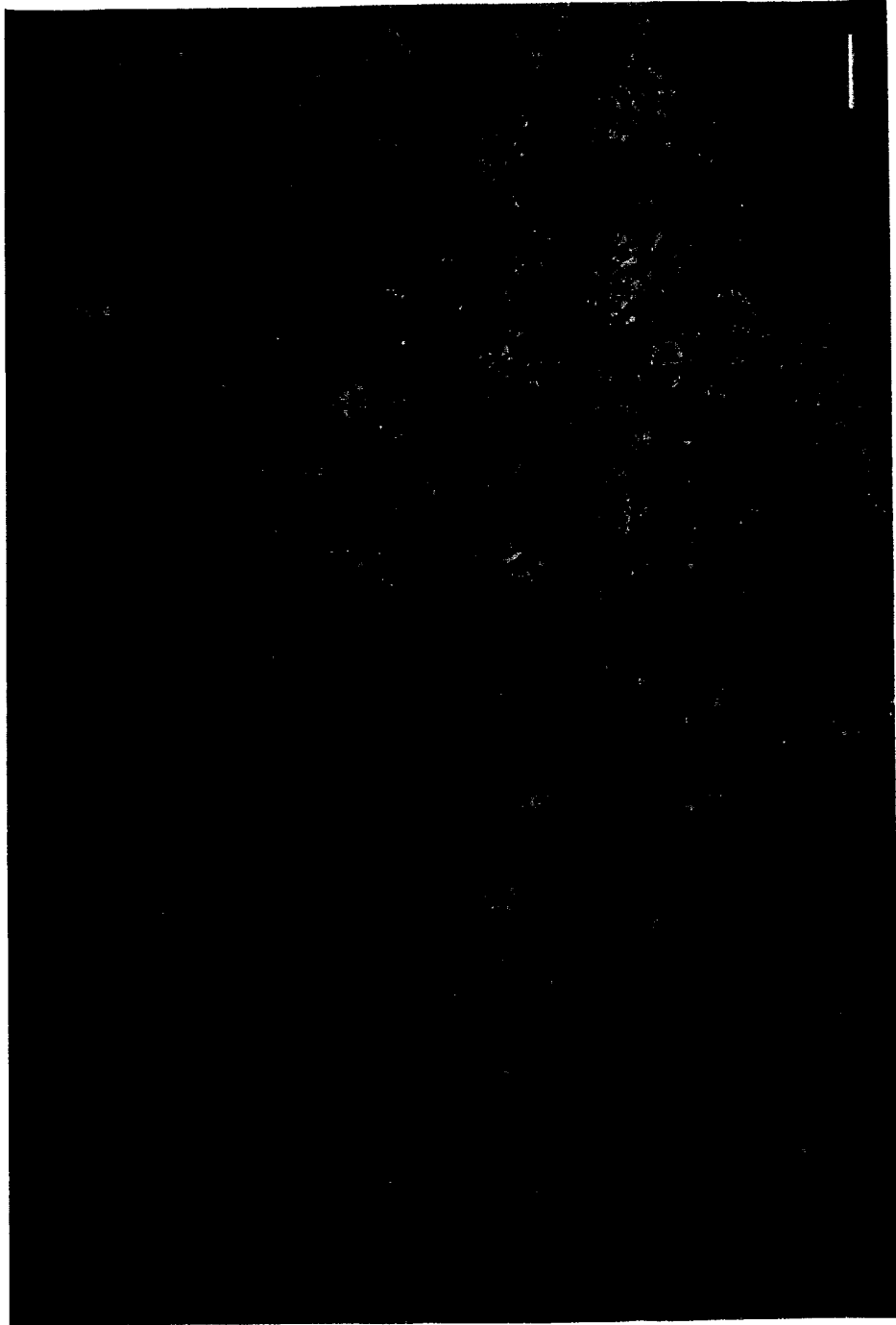
第 1 9 図



第 2 0 図



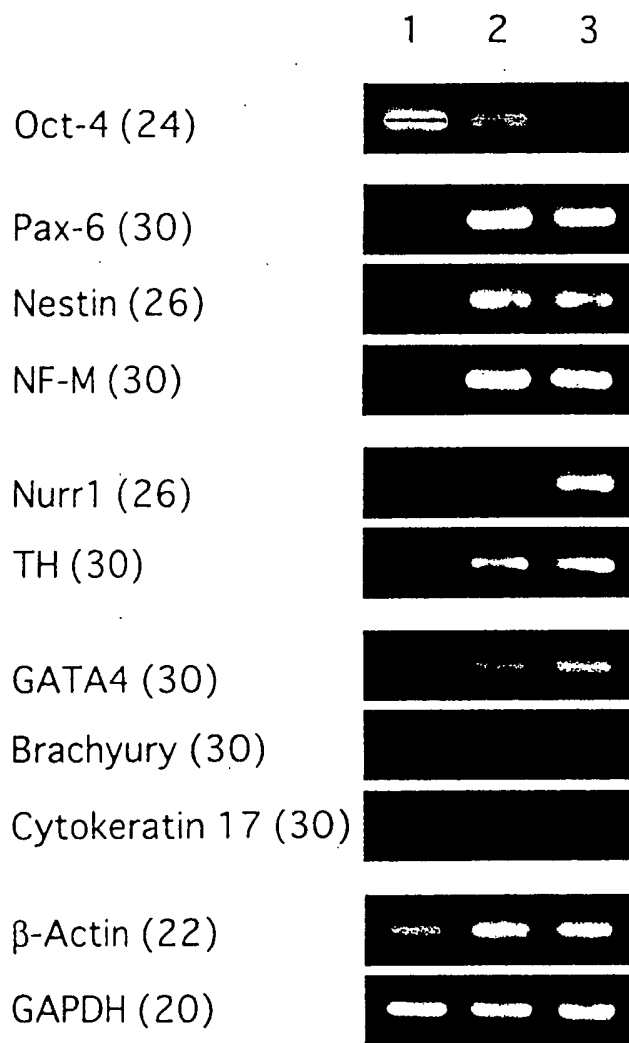
第 2 1 図



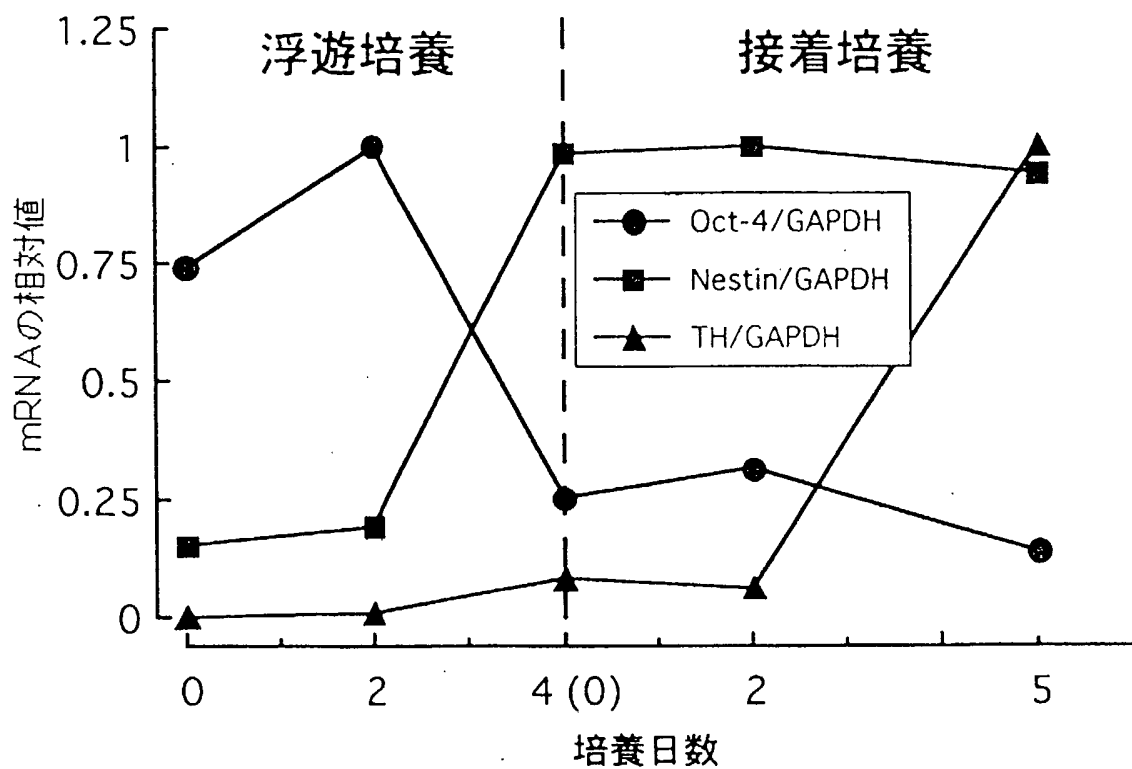
第 2 2 図



第 2 3 図



第 2 4 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP03/07906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N5/06, A61P25/00, A61K35/30		
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) Int.Cl ⁷ C12N5/06, A61P25/00, A61K35/30		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTplus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	KAWASAKI, H. et al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 29 January, 2002 (29.01.02), Vol.99, No.3, pages 1580 to 1585	10-18/1-9
X/Y	ZHANG, SC. et al., In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells., Nat.Biotechnol., (2001), Vol.19, No.12, pages 1129 to 1133	10-18/1-9
X/Y	REUBINOFF, BE. et al., Neural progenitors from human embryonic stem cells., Nat.Biotechnol., (2001), Vol.19, No.12, pages 1134 to 1140	10-18/1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 24 July, 2003 (24.07.03)	Date of mailing of the international search report 12 August, 2003 (12.08.03)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07906

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	KAWASAKI, H. et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity., Neuron (2000), Vol.28, No.1, pages 31 to 40	10-18/1-9
Y	YOSHIDA, M. et al., Neurotrophic effects of conditioned media of astrocytes isolated from different brain regions on hippocampal and cortical neurons., Experientia (1995), Vol.51, No.2, pages 133 to 136	1-9
Y	ROUSSELET, A. et al., In vitro regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors., Dev.Biol., (1990), Vol.137, No.1, pages 33 to 45	1-9
Y	PATAKY, DM. et al., Fibroblast growth factor treatment produces differential effects on survival and neurite outgrowth from identified bulbospinal neurons in vitro., Exp.Neurol., (2000), Vol.163, No.2, pages 357 to 372	1-9
Y	KILPATRICK TJ. et al., The differentiation and survival of murine neurons in vitro is promoted by soluble factors produced by an astrocytic cell line., J.Neurosci.Res., (1993), Vol.35, No.2, pages 147 to 161	1-9
Y	Neurons and astrocytes influence the development of purified 0-2A progenitor cells., Glia., (1991), Vol.4, No.6, pages 559 to 571	1-9
A	WAGNER, J. et al., Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurrl-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes., Nat. Biotechnol., (1999), Vol.17, No.7, pages 653 to 659	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07906

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in the above claim pertain to therapeutic or diagnostic method for the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and (continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07906

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl. C12N 5/06, A61P 25/00, A61K 35/30

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. C12N 5/06, A61P 25/00, A61K 35/30

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

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)
 MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTplus(JOIS)

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 請求の範囲の番号
X/Y	KAWASAKI, H. et al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Proc Natl Acad Sci U S A. (2002.01.29)Vol. 99, No. 3, p. 1580-1585	10-18/1-9
X/Y	ZHANG, SC. et al., In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. (2001)Vol. 19, No. 12, p. 1129-1133	10-18/1-9

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 24.07.03	国際調査報告の発送日 12.08.03
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) 長井 啓子 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 請求の範囲の番号
X/Y	REUBINOFF, BE. et al., Neural progenitors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. (2001)Vol. 19, No. 12, p. 1134-1140	10-18/1-9
X/Y	KAWASAKI, H. et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Neuron(2000) Vol. 28, No. 1, p. 31-40	10-18/1-9
Y	YOSHIDA, M. et al., Neurotrophic effects of conditioned media of astrocytes isolated from different brain regions on hippocampal and cortical neurons. Experientia(1995)Vol. 51, No. 2, p. 133-136	1-9
Y	ROUSSELET, A. et al., In vitro regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors. Dev Biol. (1990)Vol. 137, No. 1, p. 33-45	1-9
Y	PATAKY, DM. et al., Fibroblast growth factor treatment produces differential effects on survival and neurite outgrowth from identified bulbospinal neurons in vitro. Exp Neurol. (2000)Vol. 163, No. 2, p. 357-372	1-9
Y	KILPATRICK TJ. et al., The differentiation and survival of murine neurons in vitro is promoted by soluble factors produced by an astrocytic cell line. J Neurosci Res. (1993)Vol. 35, No. 2, p. 147-161	1-9
Y	Neurons and astrocytes influence the development of purified O-2A progenitor cells. Glia. (1991)Vol. 4, No. 6, p. 559-571	1-9
A	WAGNER, J. et al., Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. Nat Biotechnol. (1999)Vol. 17, No. 7, p. 653-659	1-18

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の発明は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。