

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7587584号
(P7587584)

(45)発行日 令和6年11月20日(2024.11.20)

(24)登録日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/079(2010.01)

C 1 2 N 5/079

A 6 1 K 35/30 (2015.01)

A 6 1 K 35/30

請求項の数 4 (全135頁)

(21)出願番号	特願2022-542468(P2022-542468)	(73)特許権者	520493429
(86)(22)出願日	令和2年1月13日(2020.1.13)		コアステムケモン インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2023-510823(P2023-510823 A)		大韓民国, 1 3 4 8 6 キョンギード, ソンナムーシ, ブンダンーグ, パンギョーロ, 2 5 5 ボンーギル, 2 4
(43)公表日	令和5年3月15日(2023.3.15)	(74)代理人	100107456
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/000581		弁理士 池田 成人
(87)国際公開番号	WO2021/145467	(74)代理人	100162352
(87)国際公開日	令和3年7月22日(2021.7.22)		弁理士 酒巻 順一郎
審査請求日	令和4年8月31日(2022.8.31)	(74)代理人	100123995
前置審査			弁理士 野田 雅一
		(74)代理人	100200540
			弁理士 安藤 祐子
		(74)代理人	100223424
			弁理士 和田 雄二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト多能性幹細胞から調製された3 Dオルガノイドをチョッピングして大量の細胞を獲得する分化方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

大量の最終分化細胞を得る方法であって、

1) ヒト多能性幹細胞を増殖及び培養して、3 Dオルガノイドを調製するステップと、

2) 2 Dプレート中でビトロネクチンを用いて前記3 Dオルガノイドを培養するステップと、

3) 培養された3 Dオルガノイドをパターン化及びチョッピングするステップと、

4) チョッピングされたオルガノイド中の幹細胞又は前駆細胞を培養及び増殖し、前記幹細胞又は前記前駆細胞の分化を誘導して大量の最終分化細胞を得るステップと、

を含み、

前記オルガノイドが中脳オルガノイドであり、

前記最終分化細胞が、中脳ドーパミンニューロン及び／又はアストロサイトである、方法。

【請求項2】

前記ヒト多能性幹細胞及び幹細胞がビトロネクチンを使用して培養される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記幹細胞が、外胚葉幹細胞である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記前駆細胞が、大脳アストロサイト前駆細胞又は中脳アストロサイト前駆細胞である

、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト多能性幹細胞から調製された 3D オルガノイドを分離及びチョッピングして、大量の最終分化細胞を確保する分化方法に関する。

【0002】

【背景技術】

パーキンソン病は、中脳の黒質におけるドーパミンニューロンの損失により引き起こされる神経変性疾患である。病変部位及び病変細胞が明確であるので、幹細胞移植に最も適した疾患であることが知られている。

10

【0003】

パーキンソン病の細胞療法では、幹細胞をヒト中脳型ドーパミンニューロン (mDA ニューロン) へ分化させる技術が必要であり、分化方法は、ヒト多能性幹細胞 (hPSC)、ヒト胚性幹細胞 (hESC) 又はヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) を mDA ニューロンに分化させるために長期間にわたって開発されてきた [3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders、Journal of Biomedical Science (2017) 24:59]。しかし、これらの分化方法を臨床用途に使用する際に、以下のような、いくつかの問題が存在している。

20

【0004】

第一は再現性の問題である。既存の二次元方法が非常に複雑であるので、他の研究室で十分に再現されていない。加えて、既存の二次元方法は、一部の多能性幹細胞株、例えば H9 にのみ適用され、開発された方法のすべてにおいて H9 が開発に使用され、中脳ドーパミンニューロンへの分化は、いくつかの他の多能性幹細胞株において十分に発生しなかった。

【0005】

第二は、中脳特異的因子の安定した発現の問題である。中脳特異的因子、例えば Nurr1、Foxa2 及び Lmx1a は、中脳ドーパミンニューロンの生存、機能及び維持にとって極めて重要であることが知られており、よって、これらは移植後にパーキンソン病を治療する能力と密接に関係している。この事実のため、hPSC-mDA ニューロンを分化させるための最近開発されたプロトコルは、すべて、中脳ドーパミンニューロンにおける中脳特異的因子の発現に焦点を合わせて開発された。しかし、これらの中脳特異的因子の発現は非常に不安定であり、中脳ドーパミンニューロンの長期間の培養又は移植後に容易に低減される。したがって、現在まで開発されている方法により分化された細胞の移植では、一部の中脳特異的因子 (主に、Foxa2) の発現のみが移植中脳ドーパミンニューロンにおいて示されている。

30

【0006】

第三は、アストロサイトが分化 mDA ニューロンの培養物中に存在しない問題である。アストロサイトは、現在まで開発されている方法により分化された mDA ニューロンの培養物に含まれない。アストロサイトは、ニューロン、例えば mDA ニューロンの生存及び機能の増強を担う細胞であり、実際の脳組織におけるニューロンの正常な生存及び機能の維持にとって必須である。加えて、アストロサイトは、mDA ニューロンにおける中脳特異的因子の発現を維持するために必要である。

40

【0007】

最後に、ニューロンの分化によって得ることができるニューロンの量の問題である。現在まで開発されているドーパミン作動性ニューロン分化方法は、中脳における増殖を可能にする神経幹細胞段階を伴わずに、直接的にニューロンへの分化を誘導するので、1 回の

50

分化によって得ることができる最終分化ニューロンの量に制限がある。

【0008】

〔発明の詳細な説明〕

〔技術的な課題〕

したがって、本発明者たちは、オルガノイドを使用する三次元培養が二次元細胞培養よりも、実際の脳環境に近い環境を実現し、健康な細胞培養物を可能にするという事実に焦点を合わせて研究努力を行った。標的細胞、すなわち、前駆細胞又は幹細胞を十分に含有することができる各オルガノイドをパターン化して、複数の細胞集団（濃縮された標的細胞）への所望の運命を持つ細胞集団を調製した。このオルガノイド組織をチョッピングし、前駆細胞又は幹細胞を培養した。他の技術は、二次元培養法により細胞をパターン化し、定量的に確保するか、又は三次元球形の中間段階のみを借用して細胞を得ることによって、分化方法の開発に適用されるが、本発明では、所望の状態の細胞は、完全な形態のオルガノイドを介して適切に培養することにより十分に濃縮される（標的細胞）。したがって、本発明により単離された各細胞は、他の既存の技術と比較して、オルガノイドと呼ばれる完全な三次元人工脳領域を経ることによって機能的に優れていたことが確認された。

10

【0009】

〔課題の解決〕

したがって、本発明の目的は、ヒト多能性幹細胞から調製された3Dオルガノイドをパターン化及びチョッピングし、幹細胞又は前駆細胞を培養し、その分化を誘導して、大量の最終分化細胞を得る方法を提供することである。

20

【0010】

加えて、本発明の別の目的は、上記の方法により得られた分化細胞を活性成分として含む細胞治療剤を提供することである。

【0011】

加えて、本発明の別の目的は、上記の方法により得られた分化細胞を使用する薬物スクリーニング方法を提供することである。

【0012】

〔発明の効果〕

本発明において、最終分化細胞は、調製された3Dオルガノイドをチョッピングすること、幹細胞又は前駆細胞をオルガノイドから分離すること、及び幹細胞又は前駆細胞を培養して増殖させることによって大量に分化させることができ、よって大量の細胞を一度に得ることができる。例えば、本発明の方法がmDAニューロン分化に適用される場合、分化は、細胞株依存性又はバッチ間の変動を伴わずに容易に誘導することができ、よって本発明の方法は、他の研究室において容易に再現することができる。加えて、本発明によって分化された中脳型神経幹細胞がパーキンソン病に移植された場合、mDAニューロンの生存、機能及び維持に極めて重要であることが知られている一連のNurr1、Foxa2、Lmx1a等は、移植mDAニューロンにおいて忠実に発現され、よって細胞移植の治療効果は顕著に改善されることが確認された。加えて、ニューロンの生存及び機能の増強を担う細胞であるアストロサイトも、mDAニューロンと共に存在し、よってアストロサイトは、mDAニューロンを保護し、mDAニューロンの機能を増強し、移植の際の細胞移植治療の増強に寄与していると思われる。

30

40

【0013】

したがって、そのように大量に得られた分化細胞（mDAニューロンに加えて、大脳アストロサイト前駆細胞、中脳アストロサイト前駆細胞、中脳ドーパミン作動性神経幹細胞、視床下部神経幹細胞等を含む）を、細胞治療剤として使用すること、又は細胞と共に処理することが可能である薬物のスクリーニングに使用することができる。

〔図面の簡単な説明〕

【0014】

〔図1A〕中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す〔A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共に

50

オルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコルが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+ mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコルは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+／PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側学生t検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

【図1B】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコルが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+ mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコルは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+／PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側学生t検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

【図1C】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（

OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコルが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+ mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコルは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+/PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側学生t検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

10

20

【図1D】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコルが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+ mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコルは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+/PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側学生t検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

30

40

【図1E】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから

50

増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコルが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+ mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコルは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+/PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側スチューデントt検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

10

【図1F】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコルが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+ mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコルは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+/PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側スチューデントt検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

20

30

40

【図1G】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた

50

中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコールが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコールは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。E+HD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側スチューデントt検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

【図1H】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコールが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%（>30%）TH+であり、TH+mDAニューロンの>70%（>20%）NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコールは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。E+HD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側スチューデントt検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）]。

【図1I】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA

10

20

30

40

50

2、LMX1A、NURR1及びEN1)、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー(AADC、SYPT及びDAT)の確認である。F:2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G:様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコールが安定して実現されたことの確認であった。H:2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。(それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%(>30%)TH+であり、TH+mDAニューロンの>70%(>20%)NURR1+である)。I~L:オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコールは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞(I)、切断カスパーゼ3+死細胞(J)、FACS-Annexin+/PI+細胞計算の使用(K)、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死(細胞老化)(L)。*P=0.0045(I)、0.02(J)、0.008~0.044(L)、0.003(K)、n=3回の独立した実験、片側スチューデントt検定。スケールバー 25 μm(J)、50 μm(B、E、I及びK)]。

【図1J】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A:神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC:オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー(OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5)、並びに神経幹細胞マーカー(SOX2、NESTIN及びKI67)の発現の確認である。D:オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL(集団が二倍になるレベル、棒)及び累積PDL(線)である。E~G:オルガノイドから12~15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー(TH)を伴った、中脳型マーカー(FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1)、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー(AADC、SYPT及びDAT)の確認である。F:2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G:様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコールが安定して実現されたことの確認であった。H:2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。(それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%(>30%)TH+であり、TH+mDAニューロンの>70%(>20%)NURR1+である)。I~L:オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコールは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞(I)、切断カスパーゼ3+死細胞(J)、FACS-Annexin+/PI+細胞計算の使用(K)、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死(細胞老化)(L)。*P=0.0045(I)、0.02(J)、0.008~0.044(L)、0.003(K)、n=3回の独立した実験、片側スチューデントt検定。スケールバー 25 μm(J)、50 μm(B、E、I及びK)]。

【図1K】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A:神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC:オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー(OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5)、並びに神経幹細胞マーカー(SOX2、NESTIN及びKI67)の発現の確認である。D:オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL(集団が二倍になるレベル、棒)及び累積PDL(線)である。E~G:オルガノイドから12~15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー(TH)を伴った、中脳型マーカー(FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1)、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー(AADC、SYPT及びDAT)の確認である。F:2D神経幹細胞から分化されたニュー

10

20

30

40

50

ロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコールが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%(>30%)TH+であり、TH+mDAニューロンの>70%(>20%)NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコールは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+／PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側学生t検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）】。

【図1L】中脳様オルガノイドを調製する、及び中脳様オルガノイドから中脳型神経幹細胞を抽出する方法を示す[A：神経幹細胞を得るための2D環境においてbFGFと共にオルガノイドから神経幹細胞を増殖させる方法を示すダイアグラムである。B及びC：オルガノイドから2週間増幅させた中脳型神経幹細胞の蛍光染色による、中脳型マーカー（OTX2、FOXA2、LMX1A、PAX2及びPAX5）、並びに神経幹細胞マーカー（SOX2、NESTIN及びKI67）の発現の確認である。D：オルガノイドから増幅させた中脳型神経幹細胞の増殖率の計算である。PDL（集団が二倍になるレベル、棒）及び累積PDL（線）である。E～G：オルガノイドから12～15日間増殖させた中脳型神経幹細胞の分化を誘導した後の、中脳型ドーパミンニューロンの正確な分化の確認である。ドーパミンニューロンマーカー（TH）を伴った、中脳型マーカー（FOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1）、並びに完全成熟ニューロン分化マーカー（ADC、SYPT及びDAT）の確認である。F：2D神経幹細胞から分化されたニューロンに対する発現%の確認である。G：様々なヒト胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞を使用した場合、プロトコールが安定して実現されたことの確認であった。H：2D分化方法に対する、オルガノイド由来神経幹細胞分化技術の安定した分化成功率の確認である。（それぞれの方法を実施する場合、成功の基準として、MAP2+ニューロンの>70%(>30%)TH+であり、TH+mDAニューロンの>70%(>20%)NURR1+である）。I～L：オルガノイド由来神経幹細胞分化プロトコールは、より安定して細胞死を阻害し、細胞を分化させることができる。EthD-1+死細胞（I）、切断カスパーゼ3+死細胞（J）、FACS-Annexin+／PI+細胞計算の使用（K）、及びβ-ガラクトシダーゼ染色細胞としてのプログラム細胞死（細胞老化）（L）。*P=0.0045（I）、0.02（J）、0.008～0.044（L）、0.003（K）、n=3回の独立した実験、片側学生t検定。スケールバー 25 μm（J）、50 μm（B、E、I及びK）】。

【図2A】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節（トランスクリプトーム特徴）の分析を示す[A及びB：調製された中脳様オルガノイド（MLO）、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織（出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット）、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体（成体生体黒質）、成体大脳皮質（皮質）及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A：スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG（分化発現遺伝子）の分析である。B：バルクRNAシーケンシングデータのPCA（主成分分析）である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C～G：単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。）C：t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D：3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングさ

10

20

30

40

50

れている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.)。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム(下記)で分析される。E:各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F:各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである($UMI > 1$ 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 、DAVID)。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される($\log_2$ 発現(UMI))。F~H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現(2D-NSC対、 $\log_2 FC > 1$ 、 $p_{adj} < 0.01$)を示す(DEG)GOを、バルク(H)及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット(I)を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した(J)。

10

【図2B】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節(トランスクリプトーム特徴)の分析を示す[A及びB:調製された中脳様オルガノイド(MLO)、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織(出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット)、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体(成体生体黒質)、成体大脳皮質(皮質)及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A:スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG(分化発現遺伝子)の分析である。B:バルクRNAシーケンシングデータのPCA(主成分分析)である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C~G:単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)の転写調節の分析である。(それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。)C:t-SNE(t分布型確率的近傍埋め込み法)マップがデータに基づいた色で表されている。D:3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.)。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム(下記)で分析される。E:各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F:各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである($UMI > 1$ 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 、DAVID)。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される($\log_2$ 発現(UMI))。F~H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現(2D-NSC対、 $\log_2 FC > 1$ 、 $p_{adj} < 0.01$)を示す(DEG)GOを、バルク(H)及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット(I)を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した(J)。

20

30

【図2C】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節(トランスクリプトーム特徴)の分析を示す[A及びB:調製された中脳様オルガノイド(MLO)、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織(出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット)、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体(成体生体黒質)、成体大脳皮質(皮質)及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A:スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG(分化発現遺伝子)の分析である。B:バルクRNAシーケンシングデータのPCA(主成分分析)である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C~G:単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)の転写調節の分析である。(それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析

40

50

した。) C: t-SNE (t 分布型確率的近傍埋め込み法) マップがデータに基づいた色で表されている。D: 3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.)。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム(下記)で分析される。E: 各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F: 各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである(UMI>1、log₂FC>0.5、P<0.05、DAVID)。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される(log₂発現(UMI))。F~H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現(2D-NSC対、log₂FC>1、padj<0.01)を示す(DEG)GOを、バルク(H)及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット(I)を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した(J)。

【図2D】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節(トランスクリプトーム特徴)の分析を示す[A及びB: 調製された中脳様オルガノイド(MLO)、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織(出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット)、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体(成体生体黒質)、成体大脳皮質(皮質)及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A: スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG(分化発現遺伝子)の分析である。B: バルクRNAシーケンシングデータのPCA(主成分分析)である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C~G: 単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)の転写調節の分析である。(それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。) C: t-SNE (t 分布型確率的近傍埋め込み法) マップがデータに基づいた色で表されている。D: 3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.)。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム(下記)で分析される。E: 各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F: 各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである(UMI>1、log₂FC>0.5、P<0.05、DAVID)。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される(log₂発現(UMI))。F~H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現(2D-NSC対、log₂FC>1、padj<0.01)を示す(DEG)GOを、バルク(H)及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット(I)を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した(J)。

【図2E】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節(トランスクリプトーム特徴)の分析を示す[A及びB: 調製された中脳様オルガノイド(MLO)、オルガノイド由来神経幹細胞(Og-NSC)及び2D由来神経幹細胞(2D-NSC)のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織(出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット)、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体(成体生体黒質)、成体大脳皮質(皮質)及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A: スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG(分化発現遺伝子)の分析である。B: バルクRNAシーケンシングデータのPCA(主成分分析)である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C~G: 単一細胞RNAシーケンシングによる

、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13, 793個及び12, 166個の細胞を分析した。）C: t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D: 3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.）。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム（下記）で分析される。E: 各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F: 各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである（ $UMI > 1$ 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 、DAVID）。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される（ $\log_2$ 発現（UMI））。F~H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現（2D-NSC対、 $\log_2 FC > 1$ 、 $p_{adj} < 0.01$ ）を示す（DEG）GOを、バルク（H）及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット（I）を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した（J）。

【図2F】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節（トランスクリプトーム特徴）の分析を示す[A及びB: 調製された中脳様オルガノイド（MLO）、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織（出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット）、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体（成体生体黒質）、成体大脳皮質（皮質）及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A: スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG（分化発現遺伝子）の分析である。B: バルクRNAシーケンシングデータのPCA（主成分分析）である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C~G: 単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13, 793個及び12, 166個の細胞を分析した。）C: t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D: 3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.）。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム（下記）で分析される。E: 各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F: 各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである（ $UMI > 1$ 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 、DAVID）。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される（ $\log_2$ 発現（UMI））。F~H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現（2D-NSC対、 $\log_2 FC > 1$ 、 $p_{adj} < 0.01$ ）を示す（DEG）GOを、バルク（H）及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット（I）を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した（J）。

【図2G】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節（トランスクリプトーム特徴）の分析を示す[A及びB: 調製された中脳様オルガノイド（MLO）、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織（出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット）、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体（成体生体黒質）、成体大脳皮質（皮質）及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A: スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG（分化発現遺伝子）の分析である。B: バルクRNAシーケ

10

20

30

40

50

ンシングデータのPCA（主成分分析）である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C～G：単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。）C：t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D：3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.）。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム（下記）で分析される。E：各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F：各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである（UMI>1、log₂FC>0.5、P<0.05、DAVID）。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される（log₂発現（UMI））。F～H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現（2D-NSC対、log₂FC>1、padj<0.01）を示す（DEG）GOを、バルク（H）及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット（I）を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した（J）。

【図2H】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節（トランスクリプトーム特徴）の分析を示す[A及びB：調製された中脳様オルガノイド（MLO）、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織（出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット）、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体（成体生体黒質）、成体大脳皮質（皮質）及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A：スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG（分化発現遺伝子）の分析である。B：バルクRNAシーケンシングデータのPCA（主成分分析）である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C～G：単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。）C：t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D：3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.）。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム（下記）で分析される。E：各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F：各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである（UMI>1、log₂FC>0.5、P<0.05、DAVID）。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される（log₂発現（UMI））。F～H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現（2D-NSC対、log₂FC>1、padj<0.01）を示す（DEG）GOを、バルク（H）及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット（I）を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した（J）。

【図2I】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節（トランスクリプトーム特徴）の分析を示す[A及びB：調製された中脳様オルガノイド（MLO）、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織（出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット）、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体（成体生体黒質）、成体大脳皮質（皮質）及び後脳の以前に報告された転写因子の調節にお

10

20

30

40

50

る差の分析である。A：スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG（分化発現遺伝子）の分析である。B：バルクRNAシーケンシングデータのPCA（主成分分析）である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C～G：単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。）C：t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D：3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.）。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム（下記）で分析される。E：各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F：各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである（ $UMI > 1$ 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 、DAVID）。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される（ $\log_2$ 発現（UMI））。F～H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現（2D-NSC対、 $\log_2 FC > 1$ 、 $p_{adj} < 0.01$ ）を示す（DEG）GOを、バルク（H）及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット（I）を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した（J）。

10

20

【図2J】オルガノイド由来神経幹細胞の転写調節（トランスクリプトーム特徴）の分析を示す[A及びB：調製された中脳様オルガノイド（MLO）、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）のRNAのバルクRNAシーケンシングによる転写因子、並びに発生の際の中脳組織（出生前中脳の公開トランスクリプトーム転写データセット）、ドーパミン作動性ニューロンを有する成体線条体（成体生体黒質）、成体大脳皮質（皮質）及び後脳の以前に報告された転写因子の調節における差の分析である。A：スピアマンの相関プロットである。2D神経幹細胞及びオルガノイド由来神経幹細胞のDEG（分化発現遺伝子）の分析である。B：バルクRNAシーケンシングデータのPCA（主成分分析）である。PCAスコアは、発現に最大の差を有する1,000個の遺伝子に集中している。C～G：単一細胞RNAシーケンシングによる、オルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）及び2D由来神経幹細胞（2D-NSC）の転写調節の分析である。（それぞれ13,793個及び12,166個の細胞を分析した。）C：t-SNE（t分布型確率的近傍埋め込み法）マップがデータに基づいた色で表されている。D：3つの別々のk平均法が、t-SNE投影によりクラスタリングされている。Loupe Cell Browser ver. 3.0.1、10X Genomics, Inc.）。Og-及び2D-神経幹細胞の分析は、それぞれVennダイアグラム（下記）で分析される。E：各クラスターにおける他の群と比較した40個の過剰発現遺伝子の階層クラスタリング分析である。F：各群における過剰発現遺伝子に基づいた上位ランクGOである（ $UMI > 1$ 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 、DAVID）。G、他の群と比較して特異的に調節された代表的な遺伝子発現である。データは、色の深みによって表される（ $\log_2$ 発現（UMI））。F～H、2D神経幹細胞の分析と比較してOg神経幹細胞においてより際立った発現（2D-NSC対、 $\log_2 FC > 1$ 、 $p_{adj} < 0.01$ ）を示す（DEG）GOを、バルク（H）及び単一細胞RNAシーケンシングデータセット（I）を使用して分析した。「細胞間接着」の発現は、バルク-及び単一細胞RNAシーケンシングデータの両方で増加し、よってヒートマップ分析を実施した（J）。

30

40

【図3A】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A

50

～F：オルガノイド神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：（2D-NSCに対して）Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成（ミトコンドリア新生（Mitotimer（ミトタイマー）））の分析である。 $*p=0.0000005$ （48時間）、 0.024 （24時間）、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS（Mitoxox（ミトソックス））であり、D、ミトコンドリア膜電位（JC-1）である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、 $310\sim314$ 個の細胞（C）、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による $283\sim311$ 個の細胞分析の結果（D）、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死（E）であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析（F）である。ROT、ロテノン；CC、cccp；HO、 H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ （E）、 $p=0.000032\sim0.11$ （F） $n=3$ 、スチューデントt検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、（2D-NSCに対する）Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida（ニューロルシダ）分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。 $23\sim58$ 個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ （Og）、3個の（2D）非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。（ $27\sim43$ 個のTH+線維／培養） $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC（赤）及び2D-NSC（黒）。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+}流入]$ Og = 0.60 ± 0.09 （ $n=10$ ）、 $[Ca^{2+}流入]$ 2D = 0.16 ± 0.02 （ $n=12$ ）。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+}流入の\tau]$ 3D = $0.85秒\pm0.11$ （ $n=10$ ）、 $[Ca^{2+}流入の\tau]$ 2D = $2.35秒\pm0.43$ （ $n=12$ ）。 $*p=0.0009$ （M）、 $p=0.005$ （O）、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ （Og）、5～6個の（2D）非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された（Q）。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ（R）、分化させた後、アストロサイト（GFAP）をドーパミン作動性ニューロン（TH）と一緒に分化させた（S）。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ （R）、 $p=0.0003$ （S）、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu m$ （I）、 $25\mu m$ （B、R）、 $50\mu m$ （C、D、S）、 $100\mu m$ （H）。

【図3B】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A～F：オルガノイド神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：（2D-NSCに対して）Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成（ミトコンドリア新生（Mitotimer（ミトタイマー）））の分析である。 $*p=0.0000005$ （48時間）、 0.024 （24時間）、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS（Mitoxox（ミトソックス））で

10

20

30

40

50

あり、D、ミトコンドリア膜電位（JC-1）である。 $*p=1.9 \times 10^{-46}$ 、非依存的培養物、310～314個の細胞（C）、 $p=3.5 \times 10^{-21}$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283～311個の細胞分析の結果（D）、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死（E）であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析（F）である。ROT、ロテノン；CC、cccp；HO、 H_2O_2 $*p=0.013 \sim 0.165$ （E）、 $p=0.000032 \sim 0.11$ （F） $n=3$ 、スチューデントt検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、（2D-NSCに対する）Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida（ニューロルシダ）分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23～58個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ （Og）、3個の（2D）非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。（27～43個のTH+線維／培養） $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC（赤）及び2D-NSC（黒）。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+} \text{流入}]$ Og = 0.60 ± 0.09 （ $n=10$ ）、 $[Ca^{2+} \text{流入}]$ 2D = 0.16 ± 0.02 （ $n=12$ ）。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau]$ 3D = $0.85 \text{ 秒} \pm 0.11$ （ $n=10$ ）、 $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau]$ 2D = $2.35 \text{ 秒} \pm 0.43$ （ $n=12$ ）。 $*p=0.0009$ （M）、 $p=0.005$ （O）、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n=4$ （Og）、5～6個の（2D）非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された（Q）。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ（R）、分化させた後、アストロサイト（GFAP）をドーパミン作動性ニューロン（TH）と一緒に分化させた（S）。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ （R）、 $p=0.0003$ （S）、 $n=3 \sim 4$ 個の非依存的培養物。スケールバー、10 μm （I）、25 μm （B、R）、50 μm （C、D、S）、100 μm （H）]。

【図3C】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A～F：オルガノイド神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：（2D-NSCに対して）Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成（ミトコンドリア新生（Mitotimer（ミトタイマー）））の分析である。 $*p=0.0000005$ （48時間）、0.024（24時間）、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS（Mitoxox（ミトソックス））であり、D、ミトコンドリア膜電位（JC-1）である。 $*p=1.9 \times 10^{-46}$ 、非依存的培養物、310～314個の細胞（C）、 $p=3.5 \times 10^{-21}$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283～311個の細胞分析の結果（D）、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死（E）であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析（F）である。ROT、ロテノン；CC、cccp；HO、 H_2O_2 $*p=0.013 \sim$

10

20

30

40

50

0.165 (E)、 $p=0.000032\sim0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデント t 検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する) Og-NSC 発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida (ニューロルシダ) 分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSC から誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23～58個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D) 非依存的培養物、 t 検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27～43個のTH+線維／培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC (赤) 及び2D-NSC (黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入}]$ Og = 0.60 ± 0.09 ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入}]$ 2D = 0.16 ± 0.02 ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau]$ 3D = $0.85 \text{ 秒} \pm 0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau]$ 2D = $2.35 \text{ 秒} \pm 0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデント t 検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCL脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5～6個の(2D) 非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、10 μm (I)、25 μm (B、R)、50 μm (C、D、S)、100 μm (H)]。

【図3D】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A～F：オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：(2D-NSCに対して) Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer (ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS(MitoSox (ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310～314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283～311個の細胞分析の結果(D)、スチューデント t 検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン；CC、cccp；HO、 H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ (E)、 $p=0.000032\sim0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデント t 検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する) Og-NSC 発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida (ニューロルシダ) 分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSC から誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23～58個の細胞／培

10

20

30

40

50

養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+} \text{流入}] \text{Og} = 0.60 \pm 0.09$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入}] \text{2D} = 0.16 \pm 0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] \text{3D} = 0.85 \text{秒} \pm 0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] \text{2D} = 2.35 \text{秒} \pm 0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3 \sim 4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、10 μm (I)、25 μm (B、R)、50 μm (C、D、S)、100 μm (H)]。

【図3E】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F：オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310~314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283~311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン；CC、ccc p；HO、H₂O₂ $*p=0.013 \sim 0.165$ (E)、 $p=0.000032 \sim 0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G~P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(

黒)。矢印 1 A Pポイント。M、1 A P 応答振幅の平均値である：[Ca²⁺流入] O g = 0.60 ± 0.09 (n = 10)、[Ca²⁺流入] 2 D = 0.16 ± 0.02 (n = 12)。N、刺激によるCa²⁺流入のトレースである。O、100 A P 応答の際のCa²⁺流入動態の平均値である：[Ca²⁺流入のτ] 3 D = 0.85 秒 ± 0.11 (n = 10)、[Ca²⁺流入のτ] 2 D = 2.35 秒 ± 0.43 (n = 12)。* p = 0.0009 (M)、p = 0.005 (O)、スチューデント t 検定。P、シナプス前 D A 分泌であり、D A レベルを、24 時間の調整培地を伴う培地において、13 ~ 15 日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。K C l 脱分極を30分間誘導した。* p = 0.0006 ~ 0.0009、n = 4 (O g)、5 ~ 6 個の(2 D) 非依存的培養物。Q、R、O g - N S C がアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一 R N A シーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。C D 4 4 + アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(G F A P)をドーパミン作動性ニューロン(T H)と一緒に分化させた(S)。これはO g - N S C 群において観察されたが、2 D - N S C 群では稀であった。* p = 0.004 (R)、p = 0.0003 (S)、n = 3 ~ 4 個の非依存性培養物。スケールバー、10 μm (I)、25 μm (B、R)、50 μm (C、D、S)、100 μm (H)]。

【図3 F】ミトコンドリア機能に関してO g - N S C 及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、O g - N S C は、過去に生成されたN S C と比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A ~ F : オルガノイド神経幹細胞(O g - N S C)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A : (2 D - N S C に対して) O g - N S C に過剰発現したミトコンドリア因子のS T R I N G 分析である。B : ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(M i t o T i m e r (ミトタイマー)))の分析である。* p = 0.0000005 (48時間)、0.024 (24時間)、n = 4 個の培養物。C : ミトコンドリアR O S (M i t o S o x (ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(J C - 1)である。* p = 1.9 e - 46、非依存的培養物、310 ~ 314 個の細胞(C)、p = 3.5 e - 21、3回又はそれ以上の独立した実験による283 ~ 311 個の細胞分析の結果(D)、スチューデント t 検定。E、F、4 日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。R O T、ロテノン; C C、c c c p; H O、H₂O₂ * p = 0.013 ~ 0.165 (E)、p = 0.000032 ~ 0.11 (F) n = 3、スチューデント t 検定。G ~ P : ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2 D - N S C に対する) O g - N S C 発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、N e u r o l u c i d a (ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、O g - N S C から誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12 日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23 ~ 58 個の細胞/培養からのT H + 線維の長さを測定した。* p = 0.013、n = 7 (O g)、3 個の(2 D) 非依存的培養物、t 検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27 ~ 43 個のT H + 線維/培養) * p = 0.03、各群毎にn = 5 個の培養物。L ~ O、ニューロン機能に基づいたCa²⁺流入の分析である。L、O g - N S C 及び2 D N S C からの1 A P 産生ニューロンを観察した。O g - N S C (赤)及び2 D - N S C (黒)。矢印 1 A Pポイント。M、1 A P 応答振幅の平均値である：[Ca²⁺流入] O g = 0.60 ± 0.09 (n = 10)、[Ca²⁺流入] 2 D = 0.16 ± 0.02 (n = 12)。N、刺激によるCa²⁺流入のトレースである。O、100 A P 応答の際のCa²⁺流入動態の平均値である：[Ca²⁺流入のτ] 3 D = 0.85 秒 ± 0.11 (n = 10)、[Ca²⁺流入のτ] 2 D = 2.35 秒 ± 0.43 (n = 12)。* p = 0.0009 (M)、p = 0.005 (O)、スチューデント t 検定。P、シナプス前 D A 分泌であ

10

20

30

40

50

り、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5～6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3 \sim 4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10 \mu\text{m}$ (I)、 $25 \mu\text{m}$ (B、R)、 $50 \mu\text{m}$ (C、D、S)、 $100 \mu\text{m}$ (H)]。

【図3G】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A～F：オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、 $310 \sim 314$ 個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による $283 \sim 311$ 個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン；CC、ccc p；HO、 H_2O_2 $*p=0.013 \sim 0.165$ (E)、 $p=0.000032 \sim 0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。 $23 \sim 58$ 個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27～43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[\text{Ca}^{2+}\text{流入}] \text{Og} = 0.60 \pm 0.09$ ($n=10$)、 $[\text{Ca}^{2+}\text{流入}] 2\text{D} = 0.16 \pm 0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[\text{Ca}^{2+}\text{流入の}\tau] 3\text{D} = 0.85 \text{秒} \pm 0.11$ ($n=10$)、 $[\text{Ca}^{2+}\text{流入の}\tau] 2\text{D} = 2.35 \text{秒} \pm 0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5～6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP

10

20

30

40

50

）をドーパミン作動性ニューロン（TH）と一緒に分化させた（S）。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ （R）、 $p=0.0003$ （S）、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu\text{m}$ （I）、 $25\mu\text{m}$ （B、R）、 $50\mu\text{m}$ （C、D、S）、 $100\mu\text{m}$ （H）]。

【図3H】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A～F：オルガノイド神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：（2D-NSCに対して）Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成（ミトコンドリア新生（Mitotimer（ミトタイマー）））の分析である。 $*p=0.0000005$ （48時間）、 0.024 （24時間）、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS（Mitoxox（ミトソックス））であり、D、ミトコンドリア膜電位（JC-1）である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、 $310\sim314$ 個の細胞（C）、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による $283\sim311$ 個の細胞分析の結果（D）、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死（E）であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析（F）である。ROT、ロテノン；CC、cccp； H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ （E）、 $p=0.000032\sim0.11$ （F） $n=3$ 、スチューデントt検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、（2D-NSCに対する）Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida（ニューロルシダ）分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。 $23\sim58$ 個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ （Og）、3個の（2D）非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。（ $27\sim43$ 個のTH+線維／培養） $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC（赤）及び2D-NSC（黒）。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[\text{Ca}^{2+}\text{流入}] \text{Og}=0.60\pm0.09$ （ $n=10$ ）、 $[\text{Ca}^{2+}\text{流入}] 2\text{D}=0.16\pm0.02$ （ $n=12$ ）。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、 100AP 応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[\text{Ca}^{2+}\text{流入の}\tau] 3\text{D}=0.85\text{秒}\pm0.11$ （ $n=10$ ）、 $[\text{Ca}^{2+}\text{流入の}\tau] 2\text{D}=2.35\text{秒}\pm0.43$ （ $n=12$ ）。 $*p=0.0009$ （M）、 $p=0.005$ （O）、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ （Og）、5～6個の（2D）非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された（Q）。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ（R）、分化させた後、アストロサイト（GFAP）をドーパミン作動性ニューロン（TH）と一緒に分化させた（S）。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ （R）、 $p=0.0003$ （S）、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu\text{m}$ （I）、 $25\mu\text{m}$ （B、R）、 $50\mu\text{m}$ （C、D、S）、 $100\mu\text{m}$ （H）]。

【図3I】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニュー

10

20

30

40

50

ロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C:ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、 $310\sim314$ 個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による $283\sim311$ 個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン;CC、cccp;HO、 H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ (E)、 $p=0.000032\sim0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G~P:ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。 $23\sim58$ 個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である: $[Ca^{2+} \text{流入}] Og = 0.60 \pm 0.09$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入}] 2D = 0.16 \pm 0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である: $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] 3D = 0.85 \text{秒} \pm 0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] 2D = 2.35 \text{秒} \pm 0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu m$ (I)、 $25\mu m$ (B、R)、 $50\mu m$ (C、D、S)、 $100\mu m$ (H)]。

【図3J】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー

10

20

30

40

50

))) の分析である。* $p = 0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n = 4$ 個の培養物。C: ミトコンドリア ROS (Mitoxox (ミトソックス)) であり、D、ミトコンドリア膜電位 (JC-1) である。* $p = 1.9 \times 10^{-46}$ 、非依存的培養物、 $310 \sim 314$ 個の細胞 (C)、 $p = 3.5 \times 10^{-21}$ 、3 回又はそれ以上の独立した実験による $283 \sim 311$ 個の細胞分析の結果 (D)、スチューデント t 検定。E、F、4 日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死 (E) であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析 (F) である。ROT、ロテノン; CC、ccccp; HO、 H_2O_2 * $p = 0.013 \sim 0.165$ (E)、 $p = 0.000032 \sim 0.11$ (F) $n = 3$ 、スチューデント t 検定。G~P: ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSC に対する) Og-NSC 発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida (ニューロルシダ) 分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSC から誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12 日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58 個の細胞/培養からの TH+線維の長さを測定した。* $p = 0.013$ 、 $n = 7$ (Og)、3 個の (2D) 非依存的培養物、t 検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43 個の TH+線維/培養) * $p = 0.03$ 、各群毎に $n = 5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC 及び 2D-NSC からの 1AP 産生ニューロンを観察した。Og-NSC (赤) 及び 2D-NSC (黒)。矢印 1AP ポイント。M、1AP 応答振幅の平均値である: $[Ca^{2+} \text{ 流入}]_{Og} = 0.60 \pm 0.09$ ($n = 10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入}]_{2D} = 0.16 \pm 0.02$ ($n = 12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100 AP 応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である: $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau]_{3D} = 0.85 \text{ 秒} \pm 0.11$ ($n = 10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau]_{2D} = 2.35 \text{ 秒} \pm 0.43$ ($n = 12$)。* $p = 0.0009$ (M)、 $p = 0.005$ (O)、スチューデント t 検定。P、シナプス前 DA 分泌であり、DA レベルを、24 時間の調整培地を伴う培地において、13~15 日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl 脱分極を 30 分間誘導した。* $p = 0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n = 4$ (Og)、5~6 個の (2D) 非依存的培養物。Q、R、Og-NSC がアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一 RNA シーケンシングのクラスター 1 に観察された (Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ (R)、分化させた後、アストロサイト (GFAP) をドーパミン作動性ニューロン (TH) と一緒に分化させた (S)。これは Og-NSC 群において観察されたが、2D-NSC 群では稀であった。* $p = 0.004$ (R)、 $p = 0.0003$ (S)、 $n = 3 \sim 4$ 個の非依存的培養物。スケールバー、 $10 \mu m$ (I)、 $25 \mu m$ (B、R)、 $50 \mu m$ (C、D、S)、 $100 \mu m$ (H)]。

【図 3 K】ミトコンドリア機能に関して Og-NSC 及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに 2 つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSC は、過去に生成された NSC と比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F: オルガノイド神経幹細胞 (Og-NSC) から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A: (2D-NSC に対して) Og-NSC に過剰発現したミトコンドリア因子の STRING 分析である。B: ミトコンドリア合成 (ミトコンドリア新生 (Mitotimer (ミトタイマー))) の分析である。* $p = 0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n = 4$ 個の培養物。C: ミトコンドリア ROS (Mitoxox (ミトソックス)) であり、D、ミトコンドリア膜電位 (JC-1) である。* $p = 1.9 \times 10^{-46}$ 、非依存的培養物、 $310 \sim 314$ 個の細胞 (C)、 $p = 3.5 \times 10^{-21}$ 、3 回又はそれ以上の独立した実験による $283 \sim 311$ 個の細胞分析の結果 (D)、スチューデント t 検定。E、F、4 日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生

10

20

30

40

50

存の分析である。細胞生存／死（E）であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析（F）である。ROT、ロテノン；CC、cccp；HO、H₂O₂ *p=0.013~0.165（E）、p=0.000032~0.11（F） n=3、スチューデントt検定。G~P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、（2D-NSCに対する）Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida（ニューロルシダ）分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。*p=0.013、n=7（Og）、3個の（2D）非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。（27~43個のTH+線維／培養）*p=0.03、各群毎にn=5個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいたCa²⁺流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC（赤）及び2D-NSC（黒）。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である：[Ca²⁺流入] Og=0.60±0.09（n=10）、[Ca²⁺流入] 2D=0.16±0.02（n=12）。N、刺激によるCa²⁺流入のトレースである。O、100AP応答の際のCa²⁺流入動態の平均値である：[Ca²⁺流入のτ] 3D=0.85秒±0.11（n=10）、[Ca²⁺流入のτ] 2D=2.35秒±0.43（n=12）。*p=0.0009（M）、p=0.005（O）、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。*p=0.0006~0.0009、n=4（Og）、5~6個の（2D）非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された（Q）。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ（R）、分化させた後、アストロサイト（GFAP）をドーパミン作動性ニューロン（TH）と一緒に分化させた（S）。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。*p=0.004（R）、p=0.0003（S）、n=3~4個の非依存的培養物。スケールバー、10μm（I）、25μm（B、R）、50μm（C、D、S）、100μm（H）]。

【図3L】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F：オルガノイド神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：（2D-NSCに対して）Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成（ミトコンドリア新生（Mitotimer（ミトタイマー）））の分析である。*p=0.0000005（48時間）、0.024（24時間）、n=4個の培養物。C：ミトコンドリアROS（Mitoxox（ミトソックス））であり、D、ミトコンドリア膜電位（JC-1）である。*p=1.9e-46、非依存的培養物、310~314個の細胞（C）、p=3.5e-21、3回又はそれ以上の独立した実験による283~311個の細胞分析の結果（D）、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死（E）であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析（F）である。ROT、ロテノン；CC、cccp；HO、H₂O₂ *p=0.013~0.165（E）、p=0.000032~0.11（F） n=3、スチューデントt検定。G~P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、（2D-NSCに対する）Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida（ニューロルシダ）分析プログラムにより代表的に分析された、

10

20

30

40

50

Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維／培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC (赤) 及び2D-NSC (黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入}]$ Og = 0.60 ± 0.09 ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入}]$ 2D = 0.16 ± 0.02 ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau]$ 3D = $0.85 \text{ 秒} \pm 0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau]$ 2D = $2.35 \text{ 秒} \pm 0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3 \sim 4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10 \mu m$ (I)、 $25 \mu m$ (B、R)、 $50 \mu m$ (C、D、S)、 $100 \mu m$ (H)]。

【図3M】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F：オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310~314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283~311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存／死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン；CC、ccc p；HO、 H_2O_2 $*p=0.013 \sim 0.165$ (E)、 $p=0.000032 \sim 0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G~P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞／培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維／培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L

10

20

30

40

50

～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC（赤）及び2D-NSC（黒）。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入}] \text{ Og} = 0.60 \pm 0.09$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入}] \text{ 2D} = 0.16 \pm 0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau] \text{ 3D} = 0.85 \text{ 秒} \pm 0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau] \text{ 2D} = 2.35 \text{ 秒} \pm 0.43$ ($n=12$)。* $p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCL脱分極を30分間誘導した。* $p=0.0006 \sim 0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5～6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。* $p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3 \sim 4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、10 μm (I)、25 μm (B、R)、50 μm (C、D、S)、100 μm (H)]。

【図3N】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A～F：オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A：(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B：ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。* $p=0.0000005$ (48時間)、0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C：ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。* $p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310～314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283～311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン；CC、ccc p；HO、 H_2O_2 * $p=0.013 \sim 0.165$ (E)、 $p=0.000032 \sim 0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G～P：ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシーダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23～58個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。* $p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27～43個のTH+線維/培養)* $p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC（赤）及び2D-NSC（黒）。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入}] \text{ Og} = 0.60 \pm 0.09$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{ 流入}] \text{ 2D} = 0.16 \pm 0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である： $[Ca^{2+} \text{ 流入の } \tau] \text{ 3D} = 0.85 \text{ 秒} \pm 0.11$ ($n=1$

10

20

30

40

50

0)、 $[Ca^{2+}$ 流入の $\tau]$ 2D=2.35秒 $\pm$ 0.43 (n=12)。*p=0.0009 (M)、p=0.005 (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCL脱分極を30分間誘導した。*p=0.0006~0.0009、n=4 (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。*p=0.004 (R)、p=0.0003 (S)、n=3~4個の非依存性培養物。スケールバー、10 μ m (I)、25 μ m (B、R)、50 μ m (C、D、S)、100 μ m (H)]。

【図30】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。*p=0.0000005 (48時間)、0.024 (24時間)、n=4個の培養物。C:ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。*p=1.9e-46、非依存的培養物、310~314個の細胞(C)、p=3.5e-21、3回又はそれ以上の独立した実験による283~311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン;CC、ccc p;HO、H₂O₂ *p=0.013~0.165 (E)、p=0.000032~0.11 (F) n=3、スチューデントt検定。G~P:ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。*p=0.013、n=7 (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養)*p=0.03、各群毎にn=5個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である: $[Ca^{2+}$ 流入]Og=0.60 $\pm$ 0.09 (n=10)、 $[Ca^{2+}$ 流入]2D=0.16 $\pm$ 0.02 (n=12)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である: $[Ca^{2+}$ 流入の $\tau]$ 3D=0.85秒 $\pm$ 0.11 (n=10)、 $[Ca^{2+}$ 流入の $\tau]$ 2D=2.35秒 $\pm$ 0.43 (n=12)。*p=0.0009 (M)、p=0.005 (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCL脱分極を30分間誘導した。*p=0.0006~0.0009、n=4 (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一

10

20

30

40

50

RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu\text{m}$ (I)、 $25\mu\text{m}$ (B、R)、 $50\mu\text{m}$ (C、D、S)、 $100\mu\text{m}$ (H)]。

【図3P】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C:ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、 $310\sim314$ 個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による $283\sim311$ 個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン;CC、ccc p;HO、 H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ (E)、 $p=0.000032\sim0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G~P:ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。 $23\sim58$ 個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である: $[\text{Ca}^{2+}\text{流入}] \text{Og}=0.60\pm0.09$ ($n=10$)、 $[\text{Ca}^{2+}\text{流入}] 2\text{D}=0.16\pm0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である: $[\text{Ca}^{2+}\text{流入の}\tau] 3\text{D}=0.85\text{秒}\pm0.11$ ($n=10$)、 $[\text{Ca}^{2+}\text{流入の}\tau] 2\text{D}=2.35\text{秒}\pm0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu\text{m}$ (I)、 $25\mu\text{m}$ (B、R)、 $50\mu\text{m}$ (C、D、S)、 $100\mu\text{m}$ (H)]。

【図3Q】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C:ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310~314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283~311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン;CC、cccp;HO、 H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ (E)、 $p=0.000032\sim0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G~P:ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である: $[Ca^{2+} \text{流入}] Og=0.60\pm0.09$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入}] 2D=0.16\pm0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である: $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] 3D=0.85 \text{秒}\pm0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] 2D=2.35 \text{秒}\pm0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu m$ (I)、 $25\mu m$ (B、R)、 $50\mu m$ (C、D、S)、 $100\mu m$ (H)]。

【図3R】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSC

10

20

30

40

50

SCに対して) Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C:ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310~314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立した実験による283~311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン;CC、cccp;HO、 H_2O_2 $*p=0.013\sim0.165$ (E)、 $p=0.000032\sim0.11$ (F) $n=3$ 、スチューデントt検定。G~P:ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する)Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、NeuroLucida(ニューロルシダ)分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23~58個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。 $*p=0.013$ 、 $n=7$ (Og)、3個の(2D)非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27~43個のTH+線維/培養) $*p=0.03$ 、各群毎に $n=5$ 個の培養物。L~O、ニューロン機能に基づいた Ca^{2+} 流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である: $[Ca^{2+} \text{流入}] Og=0.60\pm0.09$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入}] 2D=0.16\pm0.02$ ($n=12$)。N、刺激による Ca^{2+} 流入のトレースである。O、100AP応答の際の Ca^{2+} 流入動態の平均値である: $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] 3D=0.85 \text{秒}\pm0.11$ ($n=10$)、 $[Ca^{2+} \text{流入の}\tau] 2D=2.35 \text{秒}\pm0.43$ ($n=12$)。 $*p=0.0009$ (M)、 $p=0.005$ (O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13~15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。 $*p=0.0006\sim0.0009$ 、 $n=4$ (Og)、5~6個の(2D)非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。 $*p=0.004$ (R)、 $p=0.0003$ (S)、 $n=3\sim4$ 個の非依存性培養物。スケールバー、 $10\mu m$ (I)、 $25\mu m$ (B、R)、 $50\mu m$ (C、D、S)、 $100\mu m$ (H)]。

【図3S】ミトコンドリア機能に関してOg-NSC及びドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性を分析することによって得られた結果、並びに2つの群におけるニューロン成熟度の差を示す結果を示す。結論として、Og-NSCは、過去に生成されたNSCと比較して、より健康的及びより成熟した形態に分化され得ることを示している。[A~F:オルガノイド神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されるニューロンは、ミトコンドリア毒素実験下であってもミトコンドリアを健康的な状態で維持する。A:(2D-NSCに対して)Og-NSCに過剰発現したミトコンドリア因子のSTRING分析である。B:ミトコンドリア合成(ミトコンドリア新生(MitoTimer(ミトタイマー)))の分析である。 $*p=0.0000005$ (48時間)、 0.024 (24時間)、 $n=4$ 個の培養物。C:ミトコンドリアROS(MitoSox(ミトソックス))であり、D、ミトコンドリア膜電位(JC-1)である。 $*p=1.9e-46$ 、非依存的培養物、310~314個の細胞(C)、 $p=3.5e-21$ 、3回又はそれ以上の独立

10

20

30

40

50

した実験による283～311個の細胞分析の結果(D)、スチューデントt検定。E、F、4日間のミトコンドリア毒素処理下で分化させたドーパミン作動性ニューロンの生存の分析である。細胞生存/死(E)であり、ドーパミン作動性ニューロンの長さの分析(F)である。ROT、ロテノン; CC、ccc p; HO、H₂O₂ *p=0.013～0.165(E)、p=0.000032～0.11(F) n=3、スチューデントt検定。G～P: ドーパミン作動性ニューロンの成熟度及び機能性の分析である。G、(2D-NSCに対する) Og-NSC発現特異的遺伝子のヒートマップ分析である。H、Neuro lucida (ニューロルシダ) 分析プログラムにより代表的に分析された、Og-NSCから誘導された高成熟度ドーパミン作動性ニューロンである。J、12日間の分化由来のドーパミン作動性ニューロンの長さの分析である。23～58個の細胞/培養からのTH+線維の長さを測定した。*p=0.013、n=7(Og)、3個の(2D) 非依存的培養物、t検定。I、K、ドーパミン作動性ニューロンのシナプスの分析である。実際にシナプスを形成するニューロンの数を、シナプトフィジン染色で分析した。(27～43個のTH+線維/培養) *p=0.03、各群毎にn=5個の培養物。L～O、ニューロン機能に基づいたCa²⁺流入の分析である。L、Og-NSC及び2D-NSCからの1AP産生ニューロンを観察した。Og-NSC(赤)及び2D-NSC(黒)。矢印 1APポイント。M、1AP応答振幅の平均値である: [Ca²⁺流入] Og=0.60±0.09(n=10)、[Ca²⁺流入] 2D=0.16±0.02(n=12)。N、刺激によるCa²⁺流入のトレースである。O、100AP応答の際のCa²⁺流入動態の平均値である: [Ca²⁺流入のτ] 3D=0.85秒±0.11(n=10)、[Ca²⁺流入のτ] 2D=2.35秒±0.43(n=12)。*p=0.0009(M)、p=0.005(O)、スチューデントt検定。P、シナプス前DA分泌であり、DAレベルを、24時間の調整培地を伴う培地において、13～15日目の分化でのドーパミン分泌として測定した。KCl脱分極を30分間誘導した。*p=0.0006～0.0009、n=4(Og)、5～6個の(2D) 非依存的培養物。Q、R、Og-NSCがアストロサイトに分化する能力である。アストロサイト前駆細胞集団が、単一RNAシーケンシングのクラスター1に観察された(Q)。CD44+アストロサイト前駆細胞集団は神経幹細胞集団に含まれ(R)、分化させた後、アストロサイト(GFAP)をドーパミン作動性ニューロン(TH)と一緒に分化させた(S)。これはOg-NSC群において観察されたが、2D-NSC群では稀であった。*p=0.004(R)、p=0.0003(S)、n=3～4個の非依存性培養物。スケールバー、10μm(I)、25μm(B、R)、50μm(C、D、S)、100μm(H)]。

【図4A】パーキンソン病の生物学的特徴であるα-シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因であるα-シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる[オルガノイド由来中脳型神経幹細胞(Og-NSC)から誘導されたニューロンは、相対的に少ないα-シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、α-シヌクレイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A～D、α-シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。Og-NSC(対2D-NSC)。A、細胞間のα-シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンバシステムである。B: α-シヌクレイン強度(GFP)を768個の(Og)処理細胞及び740個の(2D)処理細胞で比較した。*p=0.000004。α-シヌクレインがOg-NSCに相対的に少なく浸透したことが観察された。C～F: パーキンソン病の病因であり得るα-シヌクレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得るp129-α-シヌクレインレベルは、特にOg-NSCにおいて相対的に低く観察された。(C)、ウイルス過剰発現の誘導後(左側)又は任意選択でPFF(予備形成α-シヌクレイン原線維)処理後(右側)の、α-シヌクレインオリゴマーのウェスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得るα-シヌクレインオリゴマーは、Og-NSC(D)、Bi-FC系(E、F)において少なく生じたことが観察さ

10

20

30

40

50

れた。B i - F C 緑色発現封入体は、O g - N S C において相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している (F)。* $p = 0.001$ (C) 及び 0.02 (F) で有意であり、 $n = 3$ 個の独立した実験である。G、O g - N S C (左半球) 及び 2 D - N S C (右半球) を P F F - a シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、P F F 及び α -シヌクレイン A A V ウイルスで 2 週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した 1 か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン (p 1 2 9 - α -シヌクレイン) が O g - N S C 移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50 \mu\text{m}$ (B、C、F)、 $100 \mu\text{m}$ (G)]。

【図 4 B】パーキンソン病の生物学的特徴である α -シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因である α -シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる [オルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (O g - N S C) から誘導されたニューロンは、相対的に少ない α -シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、 α -シヌクレイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A ~ D、 α -シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。O g - N S C (対 2 D - N S C)。A、細胞間の α -シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンバシステムである。B : α -シヌクレイン強度 (G F P) を 7 6 8 個の (O g) 処理細胞及び 7 4 0 個の (2 D) 処理細胞で比較した。* $p = 0.000004$ 。 α -シヌクレインが O g - N S C に相対的に少なく浸透したことが観察された。C ~ F : パーキンソン病の病因であり得る α -シヌクレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得る p 1 2 9 - α -シヌクレインレベルは、特に O g - N S C において相対的に低く観察された。(C)、ウイルス過剰発現の誘導後 (左側) 又は任意選択で P F F (予備形成 α -シヌクレイン原線維) 処理後 (右側) の、 α -シヌクレインオリゴマーのウエスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得る α -シヌクレインオリゴマーは、O g - N S C (D)、B i - F C 系 (E、F) において少なく生じたことが観察された。B i - F C 緑色発現封入体は、O g - N S C において相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している (F)。* $p = 0.001$ (C) 及び 0.02 (F) で有意であり、 $n = 3$ 個の独立した実験である。G、O g - N S C (左半球) 及び 2 D - N S C (右半球) を P F F - a シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、P F F 及び α -シヌクレイン A A V ウイルスで 2 週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した 1 か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン (p 1 2 9 - α -シヌクレイン) が O g - N S C 移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50 \mu\text{m}$ (B、C、F)、 $100 \mu\text{m}$ (G)]。

【図 4 C】パーキンソン病の生物学的特徴である α -シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因である α -シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる [オルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (O g - N S C) から誘導されたニューロンは、相対的に少ない α -シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、 α -シヌクレイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A ~ D、 α -シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。O g - N S C (対 2 D - N S C)。A、細胞間の α -シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンバシステムである。B : α -シヌクレイン強度 (G F P) を 7 6 8 個の (O g) 処理細胞及び 7 4 0 個の (2 D) 処理細胞で比較した。* $p = 0.000004$ 。 α -シヌクレインが O g - N S C に相対的に少なく浸透したことが観察された。C ~ F : パーキンソン病の病因であり得る α -シヌ

10

20

30

40

50

クレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得る p129- α -シヌクレインレベルは、特に Og-NSC において相対的に低く観察された。(C)、ウイルス過剰発現の誘導後(左側)又は任意選択で PFF (予備形成 α -シヌクレイン原線維) 処理後(右側)の、 α -シヌクレインオリゴマーのウエスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得る α -シヌクレインオリゴマーは、Og-NSC (D)、Bi-FC 系 (E、F) において少なく生じたことが観察された。Bi-FC 緑色発現封入体は、Og-NSC において相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している (F)。* $p = 0.001$ (C) 及び 0.02 (F) で有意であり、 $n = 3$ 個の独立した実験である。G、Og-NSC (左半球) 及び 2D-NSC (右半球) を PFF- α シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、PFF 及び α -シヌクレイン AAV ウイルスで 2 週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した 1 か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン (p129- α -シヌクレイン) が Og-NSC 移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50 \mu\text{m}$ (B、C、F)、 $100 \mu\text{m}$ (G)]。

【図 4 D】パーキンソン病の生物学的特徴である α -シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因である α -シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる [オルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (Og-NSC) から誘導されたニューロンは、相対的に少ない α -シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、 α -シヌクレイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A~D、 α -シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。Og-NSC (対 2D-NSC)。A、細胞間の α -シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンネルシステムである。B: α -シヌクレイン強度 (GFP) を 768 個の (Og) 処理細胞及び 740 個の (2D) 処理細胞で比較した。* $p = 0.000004$ 。 α -シヌクレインが Og-NSC に相対的に少なく浸透したことが観察された。C~F: パーキンソン病の病因であり得る α -シヌクレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得る p129- α -シヌクレインレベルは、特に Og-NSC において相対的に低く観察された。(C)、ウイルス過剰発現の誘導後(左側)又は任意選択で PFF (予備形成 α -シヌクレイン原線維) 処理後(右側)の、 α -シヌクレインオリゴマーのウエスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得る α -シヌクレインオリゴマーは、Og-NSC (D)、Bi-FC 系 (E、F) において少なく生じたことが観察された。Bi-FC 緑色発現封入体は、Og-NSC において相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している (F)。* $p = 0.001$ (C) 及び 0.02 (F) で有意であり、 $n = 3$ 個の独立した実験である。G、Og-NSC (左半球) 及び 2D-NSC (右半球) を PFF- α シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、PFF 及び α -シヌクレイン AAV ウイルスで 2 週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した 1 か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン (p129- α -シヌクレイン) が Og-NSC 移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50 \mu\text{m}$ (B、C、F)、 $100 \mu\text{m}$ (G)]。

【図 4 E】パーキンソン病の生物学的特徴である α -シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因である α -シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる [オルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (Og-NSC) から誘導されたニューロンは、相対的に少ない α -シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、 α -シヌク

10

20

30

40

50

レイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A～D、 α -シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。Og-NSC（対2D-NSC）。A、細胞間の α -シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンバシステムである。B： α -シヌクレイン強度（GFP）を768個の（Og）処理細胞及び740個の（2D）処理細胞で比較した。 $*p=0.000004$ 。 α -シヌクレインがOg-NSCに相対的に少なく浸透したことが観察された。C～F：パーキンソン病の病因であり得る α -シヌクレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得るp129- α -シヌクレインレベルは、特にOg-NSCにおいて相対的に低く観察された。（C）、ウイルス過剰発現の誘導後（左側）又は任意選択でPFF（予備形成 α -シヌクレイン原線維）処理後（右側）の、 α -シヌクレインオリゴマーのウエスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得る α -シヌクレインオリゴマーは、Og-NSC（D）、Bi-FC系（E、F）において少なく生じたことが観察された。Bi-FC緑色発現封入体は、Og-NSCにおいて相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している（F）。 $*p=0.001$ （C）及び 0.02 （F）で有意であり、 $n=3$ 個の独立した実験である。G、Og-NSC（左半球）及び2D-NSC（右半球）をPFF- α -シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、PFF及び α -シヌクレインAAVウイルスで2週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した1か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン（p129- α -シヌクレイン）がOg-NSC移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50\mu\text{m}$ （B、C、F）、 $100\mu\text{m}$ （G）]。

【図4F】パーキンソン病の生物学的特徴である α -シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因である α -シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる[オルガノイド由来中脳型神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されたニューロンは、相対的に少ない α -シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、 α -シヌクレイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A～D、 α -シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。Og-NSC（対2D-NSC）。A、細胞間の α -シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンバシステムである。B： α -シヌクレイン強度（GFP）を768個の（Og）処理細胞及び740個の（2D）処理細胞で比較した。 $*p=0.000004$ 。 α -シヌクレインがOg-NSCに相対的に少なく浸透したことが観察された。C～F：パーキンソン病の病因であり得る α -シヌクレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得るp129- α -シヌクレインレベルは、特にOg-NSCにおいて相対的に低く観察された。（C）、ウイルス過剰発現の誘導後（左側）又は任意選択でPFF（予備形成 α -シヌクレイン原線維）処理後（右側）の、 α -シヌクレインオリゴマーのウエスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得る α -シヌクレインオリゴマーは、Og-NSC（D）、Bi-FC系（E、F）において少なく生じたことが観察された。Bi-FC緑色発現封入体は、Og-NSCにおいて相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している（F）。 $*p=0.001$ （C）及び 0.02 （F）で有意であり、 $n=3$ 個の独立した実験である。G、Og-NSC（左半球）及び2D-NSC（右半球）をPFF- α -シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、PFF及び α -シヌクレインAAVウイルスで2週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した1か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン（p129- α -シヌクレイン）がOg-NSC移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50\mu\text{m}$ （B、C、F）、 $100\mu\text{m}$ （G）]。

【図4G】パーキンソン病の生物学的特徴である α -シヌクレイン病のモデルにおいて観察される場合、本発明の方法により誘導される神経幹細胞は、重度のパーキンソン病の病因である α -シヌクレインが十分に伝播されていない状態の細胞であることを示し、よってパーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合に有利であるといえることができる〔オルガノイド由来中脳型神経幹細胞（Og-NSC）から誘導されたニューロンは、相対的に少ない α -シヌクレイン伝播を有することが観察された。ニューロンは、 α -シヌクレイン疾患環境に対してより抵抗性があり得る。A～D、 α -シヌクレインがニューロンに少なく浸透する特徴の観察である。Og-NSC（対2D-NSC）。A、細胞間の α -シヌクレインの移動を観察することができるデュアルチャンネルシステムである。B： α -シヌクレイン強度（GFP）を768個の（Og）処理細胞及び740個の（2D）処理細胞で比較した。 $*p=0.000004$ 。 α -シヌクレインがOg-NSCに相対的に少なく浸透したことが観察された。C～F：パーキンソン病の病因であり得る α -シヌクレインオリゴマー化が、ウイルスを使用する過剰発現系により誘導された場合、病因であり得るp129- α -シヌクレインレベルは、特にOg-NSCにおいて相対的に低く観察された。（C）、ウイルス過剰発現の誘導後（左側）又は任意選択でPFF（予備形成 α -シヌクレイン原線維）処理後（右側）の、 α -シヌクレインオリゴマーのウェスタンブロット分析である。パーキンソン病の主な病因であり得る α -シヌクレインオリゴマーは、Og-NSC（D）、Bi-FC系（E、F）において少なく生じたことが観察された。Bi-FC緑色発現封入体は、Og-NSCにおいて相対的に少なく観察された。このことは、同じ量の α -シヌクレインでも凝集及び病理発生の低い確率を有することを示している（F）。 $*p=0.001$ （C）及び 0.02 （F）で有意であり、 $n=3$ 個の独立した実験である。G、Og-NSC（左半球）及び2D-NSC（右半球）をPFF- α -シヌクレインモデル動物にそれぞれ移植した後、組織学的分析を実施した。動物には、PFF及び α -シヌクレインAAVウイルスで2週間にわたってパーキンソン病モデルを誘導し、動物を、各細胞を移植した1か月後に殺処分した。悪性度が比較的少ない α -シヌクレイン（p129- α -シヌクレイン）がOg-NSC移植部位に観察され、健康なドーパミン作動性ニューロンが観察された。スケールバー、 $50\mu\text{m}$ （B、C、F）、 $100\mu\text{m}$ （G）〕。

【図5A】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面における*in vivo*予測研究を示す〔A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。 $\log_2$ （固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及び $\log_2$ Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを -70mV 保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットから $n=5$ （移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、 $n=8$ （移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。〕

【図5B】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面における*in vivo*予

10

20

30

40

50

測研究を示す〔A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。 $\log_2$ （固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及び $\log_2$ Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを -70mV 保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットから $n=5$ （移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、 $n=8$ （移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。

【図5C】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面におけるin vivo予測研究を示す〔A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。 $\log_2$ （固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及び $\log_2$ Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを -70mV 保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットから $n=5$ （移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、 $n=8$ （移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。

【図5D】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面におけるin vivo予測研究を示す〔A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。 $\log_2$ （固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及び $\log_2$ Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は

、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを-70mV保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットからn=5（移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FFP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、n=8（移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、200 μm 。

【図5E】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面におけるin vivo予測研究を示す[A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。log2（固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及びlog2 Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを-70mV保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットからn=5（移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FFP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、n=8（移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、200 μm 。

【図5F】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面におけるin vivo予測研究を示す[A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。log2（固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及びlog2 Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを-70mV保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットからn=5（移植片）

及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、 $n=8$ （移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。

【図5G】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面における*in vivo*予測研究を示す[A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。 $\log_2$ （固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及び $\log_2$ Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを -70mV 保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットから $n=5$ （移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、 $n=8$ （移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。

【図5H】Og-NSCの移植後に現れ得る結果の様々な局面における*in vivo*予測研究を示す[A：単一細胞RNAシーケンシングデータによるドーパミンニューロンの移植における成功にとっての重要な因子として報告されている因子の発現を分析した結果、Og-NSCが相対的に高い発現を示した。（対2D-NSC）。結果の値は、色密度で表されている。 $\log_2$ （固有分子識別子（UMI）値で表される）（左側）及び $\log_2$ Og/2D発現値の平均比（右側）として表されている。B：pSyn-GCaMP6発現ニューロンを背側線条体に移植することにより、二光子蛍光内視鏡（two-photon fluorescence endomicroscopy）によって観察された画像の結果である。（上側）。GCaMP6蛍光の異なる色のROI（目的領域）は、図の上側画像に丸で示されている（B、下側）。C～F：Og-NSC由来移植部位での活性電位発火及びシナプス伝達である。PDLL1-GFP-hESCから分化され、神経幹細胞に蛍光を発現しているOg-NSCを、ヘミパーキンソニアン（hemi parkinsonian）モデル動物の線条体に移植した。移植の1.5か月後の動物の脳片からの全細胞パッチクランプの記録である。内在的興奮性を、移植GFP+細胞（C）の脱分化電流注入により観察し、sEPSCを -70mV 保持電位で記録した（D）。Og-NSC由来移植部位からのsEPSCの平均振幅（E）及び周波数（F）を、非移植部位からの正常な細胞のもの（左側）と比較した。2匹のラットから $n=5$ （移植片）及び4（対照、病変なし）。G、H：6-OHDAパーキンソン病由誘導動物へのOg-NSCの5か月間の移植の後、 ^{18}F FP-CIT DAT結合をMRI及びPETスキャンで分析した。 $*p=0.021$ 、 $n=8$ （移植片）及び5（対照、病変あり）。T：移植部位、スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。

【図6A】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット（A～O）に移植し、フィリピンモンキー（P）にも移植した。A～C：パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A：移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。

開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1～6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1～4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、*p=7.8e-10-0.037、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、*p=5.58e-07-0.0006、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p=1.63e-08-0.000424、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。

D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E～O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E～G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I:中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13,697個のTH+細胞が分析された)。L～P:移植部位を、移植の6か月後(n=8匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50μm(E～Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200μm(Pの上側)、500μm(D～G)]。

【図6B】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A～O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A～C:パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A:移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1～6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1～4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、*p=7.8e-10-0.037、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、*p=5.58e-07-0.0006、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p=1.63e-08-0.000424、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。

D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E～O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E～G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I:中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13,697個のTH+細胞が分析された)。L～P:移植部位を、移植の6か月後(n=8匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移

植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μm (Pの上側)、500 μm (D~G)]。

【図6C】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A~O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A~C:パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A:移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、* $p=7.8e-10-0.037$ 、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、* $p=5.58e-07-0.0006$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、* $p=1.63e-08-0.000424$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I:中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13,697個のTH+細胞が分析された)。L~P:移植部位を、移植の6か月後(n=8匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μm (Pの上側)、500 μm (D~G)]。

【図6D】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A~O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A~C:パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A:移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、* $p=7.8e-10-0.037$ 、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、* $p=5.58e-07-0.0006$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、* $p=1.63e-08-0.000424$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O:組織形態学的分析を蛍

10

20

30

40

50

光染色によって実施した。E～G：移植部位でのTH+／FOXA2+、TH+／LMX1A+、TH+／NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I：中脳型因子による蛍光染色の結果、発現率が8匹の動物の移植部位で確認された（13, 697個のTH+細胞が分析された）。L～P：移植部位を、移植の6か月後（n=8匹のラット）の体積（L）、TH+ニューロンの数（M）、密度（N）、身体サイズ（O）により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー（カニクイザル）への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm（E～Gの下側、H、J、K、Pの下側）、200 μm（Pの上側）、500 μm（D～G）】。

【図6E】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す〔Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット（A～O）に移植し、フィリピンモンキー（P）にも移植した。A～C：パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A：移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1～6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1～4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率（%）で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。（偽（PBS注射）対照（n=7）の分析は、*p=7.8e-10-0.037、一元配置ANOVAであった。）段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、*p=5.58e-07-0.0006、一元配置ANOVA、事後チューキー分析（B）であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p=1.63e-08-0.000424、一元配置ANOVA、事後チューキー分析（C）（n=8）であった。D：Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース（NeuroLucida（ニューロルシダ））画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E～O：組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E～G：移植部位でのTH+／FOXA2+、TH+／LMX1A+、TH+／NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I：中脳型因子による蛍光染色の結果、発現率が8匹の動物の移植部位で確認された（13, 697個のTH+細胞が分析された）。L～P：移植部位を、移植の6か月後（n=8匹のラット）の体積（L）、TH+ニューロンの数（M）、密度（N）、身体サイズ（O）により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー（カニクイザル）への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm（E～Gの下側、H、J、K、Pの下側）、200 μm（Pの上側）、500 μm（D～G）】。

【図6F】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す〔Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット（A～O）に移植し、フィリピンモンキー（P）にも移植した。A～C：パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A：移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1～6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1～4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率（%）で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。（偽（PBS注射）対照（n=7）の分

10

20

30

40

50

析は、 $*p = 7.8 \times 10^{-0.037}$ 、一元配置ANOVAであった。) 段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、 $*p = 5.58 \times 10^{-0.0006}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、 $*p = 1.63 \times 10^{-0.000424}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C) ($n = 8$)であった。D: Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida (ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13, 697個のTH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の6か月後($n = 8$ 匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μm (Pの上側)、500 μm (D~G)]。

【図6G】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A~O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照($n = 7$))の分析は、 $*p = 7.8 \times 10^{-0.037}$ 、一元配置ANOVAであった。) 段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、 $*p = 5.58 \times 10^{-0.0006}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、 $*p = 1.63 \times 10^{-0.000424}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C) ($n = 8$)であった。D: Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida (ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13, 697個のTH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の6か月後($n = 8$ 匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μm (Pの上側)、500 μm (D~G)]。

【図6H】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果

を示す [Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット (A~O) に移植し、フィリピンモンキー (P) にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率 (%) で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽 (PBS注射) 対照 (n=7) の分析は、*p=7.8e-10-0.037、一元配置ANOVAであった。) 段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、*p=5.58e-07-0.0006、一元配置ANOVA、事後チューキー分析 (B) であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p=1.63e-08-0.000424、一元配置ANOVA、事後チューキー分析 (C) (n=8) であった。D: Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース (NeuroLucida (ニューロルシダ)) 画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された (13, 697個のTH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の6か月後 (n=8匹のラット) の体積 (L)、TH+ニューロンの数 (M)、密度 (N)、身体サイズ (O) により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー (カニクイザル) への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50µm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200µm (Pの上側)、500µm (D~G)]。

【図6I】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す [Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット (A~O) に移植し、フィリピンモンキー (P) にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率 (%) で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽 (PBS注射) 対照 (n=7) の分析は、*p=7.8e-10-0.037、一元配置ANOVAであった。) 段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、*p=5.58e-07-0.0006、一元配置ANOVA、事後チューキー分析 (B) であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p=1.63e-08-0.000424、一元配置ANOVA、事後チューキー分析 (C) (n=8) であった。D: Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース (NeuroLucida (ニューロルシダ)) 画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された (13, 697個のTH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の6か月後 (

n = 8 匹のラット) の体積 (L)、TH+ニューロンの数 (M)、密度 (N)、身体サイズ (O) により計算した。P、Og-NSC 移植成体フィリピンモンキー (カニクイザル) への移植の 1 か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示している STEM121 を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとして FOXA2 及び NURR1 を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~G の下側、H、J、K、P の下側)、200 μm (P の上側)、500 μm (D~G)]。

【図 6 J】実際のパーキンソン病モデル動物への Og-NSC の移植後に観察された結果を示す [Og-NSC を 6-OHDA 誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット (A~O) に移植し、フィリピンモンキー (P) にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の 6 か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14 匹のパーキンソン病モデル動物に Og-NSC を移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後 1~6 か月間にわたって毎月分析した。6 匹の動物が 1~4 か月間で行動回復スコアの > 60% を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率 (%) で表される。生理食塩水移植群の 7 匹の動物を対照群として使用した。(偽 (PBS 注射) 対照 (n = 7) の分析は、*p = 7.8e-10-0.037、一元配置 ANOVA であった。) 段階調整試験を、Og-NSC 移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後 6 か月間にわたって実施し、*p = 5.58e-07-0.0006、一元配置 ANOVA、事後チューキー分析 (B) であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p = 1.63e-08-0.000424、一元配置 ANOVA、事後チューキー分析 (C) (n = 8) であった。D: Og-NSC 移植動物モデルにおいて、移植の 6 か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース (NeuroLucida (ニューロルシダ)) 画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位での TH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現率が 8 匹の動物の移植部位で確認された (13, 697 個の TH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の 6 か月後 (n = 8 匹のラット) の体積 (L)、TH+ニューロンの数 (M)、密度 (N)、身体サイズ (O) により計算した。P、Og-NSC 移植成体フィリピンモンキー (カニクイザル) への移植の 1 か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示している STEM121 を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとして FOXA2 及び NURR1 を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~G の下側、H、J、K、P の下側)、200 μm (P の上側)、500 μm (D~G)]。

【図 6 K】実際のパーキンソン病モデル動物への Og-NSC の移植後に観察された結果を示す [Og-NSC を 6-OHDA 誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット (A~O) に移植し、フィリピンモンキー (P) にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の 6 か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14 匹のパーキンソン病モデル動物に Og-NSC を移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後 1~6 か月間にわたって毎月分析した。6 匹の動物が 1~4 か月間で行動回復スコアの > 60% を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率 (%) で表される。生理食塩水移植群の 7 匹の動物を対照群として使用した。(偽 (PBS 注射) 対照 (n = 7) の分析は、*p = 7.8e-10-0.037、一元配置 ANOVA であった。) 段階調整試験を、Og-NSC 移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後 6 か月間にわたって実施し、*p = 5.58e-07-0.0006、一元配置 ANOVA、事後チューキー分析 (B) であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p = 1.63e-08-0.000424、一元配置 ANOVA、事後チューキー分析 (C) (n = 8) であった。

D: O g - N S C 移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース (NeuroLucida (ニューロルシダ)) 画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位での TH+ / FOXA2+, TH+ / LMX1A+, TH+ / NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された (13, 697個のTH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の6か月後 (n=8匹のラット) の体積 (L)、TH+ニューロンの数 (M)、密度 (N)、身体サイズ (O) により計算した。P、O g - N S C 移植成体フィリピンモンキー (カニクイザル) への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 µm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 µm (Pの上側)、500 µm (D~G)]。

【図6L】実際のパーキンソン病モデル動物へのO g - N S Cの移植後に観察された結果を示す [O g - N S Cを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット (A~O) に移植し、フィリピンモンキー (P) にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にO g - N S Cを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率 (%) で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽 (PBS注射) 対照 (n=7) の分析は、*p=7.8e-10-0.037、一元配置ANOVAであった。) 段階調整試験を、O g - N S C 移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、*p=5.58e-07-0.0006、一元配置ANOVA、事後チューキー分析 (B) であった。加えて、シリンダー試験を実施し、*p=1.63e-08-0.000424、一元配置ANOVA、事後チューキー分析 (C) (n=8) であった。D: O g - N S C 移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース (NeuroLucida (ニューロルシダ)) 画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O: 組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G: 移植部位での TH+ / FOXA2+, TH+ / LMX1A+, TH+ / NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I: 中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された (13, 697個のTH+細胞が分析された)。L~P: 移植部位を、移植の6か月後 (n=8匹のラット) の体積 (L)、TH+ニューロンの数 (M)、密度 (N)、身体サイズ (O) により計算した。P、O g - N S C 移植成体フィリピンモンキー (カニクイザル) への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 µm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 µm (Pの上側)、500 µm (D~G)]。

【図6M】実際のパーキンソン病モデル動物へのO g - N S Cの移植後に観察された結果を示す [O g - N S Cを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット (A~O) に移植し、フィリピンモンキー (P) にも移植した。A~C: パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A: 移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にO g - N S Cを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が

10

20

30

40

50

1～4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、* $p=7.8 \times 10^{-0.037}$ 、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、* $p=5.58 \times 10^{-0.0006}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、* $p=1.63 \times 10^{-0.000424}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I:中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13,697個のTH+細胞が分析された)。L~P:移植部位を、移植の6か月後(n=8匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μ m(E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μ m(Pの上側)、500 μ m(D~G)]。

【図6N】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A~O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A~C:パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A:移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、* $p=7.8 \times 10^{-0.037}$ 、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、* $p=5.58 \times 10^{-0.0006}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、* $p=1.63 \times 10^{-0.000424}$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I:中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された(13,697個のTH+細胞が分析された)。L~P:移植部位を、移植の6か月後(n=8匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作

10

20

30

40

50

動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μm (Pの上側)、500 μm (D~G)]。

【図6O】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A~O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A~C:パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A:移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、* $p=7.8e-10-0.037$ 、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、* $p=5.58e-07-0.0006$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、* $p=1.63e-08-0.000424$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I:中脳型因子による蛍光染色の結果、発現率が8匹の動物の移植部位で確認された(13,697個のTH+細胞が分析された)。L~P:移植部位を、移植の6か月後(n=8匹のラット)の体積(L)、TH+ニューロンの数(M)、密度(N)、身体サイズ(O)により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー(カニクイザル)への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50 μm (E~Gの下側、H、J、K、Pの下側)、200 μm (Pの上側)、500 μm (D~G)]。

【図6P】実際のパーキンソン病モデル動物へのOg-NSCの移植後に観察された結果を示す[Og-NSCを6-OHDA誘導ヘミパーキンソニアンモデルラット(A~O)に移植し、フィリピンモンキー(P)にも移植した。A~C:パーキンソン病動物の移植後の行動分析である。A:移植の6か月後、アンフェタミン誘導回転スコアを観察した。開始時点では、14匹のパーキンソン病モデル動物にOg-NSCを移植し、アンフェタミン誘導行動回復スコアを、移植後1~6か月間にわたって毎月分析した。6匹の動物が1~4か月間で行動回復スコアの>60%を有した場合、動物を分析のために殺処分した。回復は、移植前の行動スコア分析データに基づいた百分率(%)で表される。生理食塩水移植群の7匹の動物を対照群として使用した。(偽(PBS注射)対照(n=7)の分析は、* $p=7.8e-10-0.037$ 、一元配置ANOVAであった。)段階調整試験を、Og-NSC移植動物モデルにおける別の行動実験として移植後6か月間にわたって実施し、* $p=5.58e-07-0.0006$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(B)であった。加えて、シリンダー試験を実施し、* $p=1.63e-08-0.000424$ 、一元配置ANOVA、事後チューキー分析(C)(n=8)であった。D:Og-NSC移植動物モデルにおいて、移植の6か月後に、ドーパミンニューロンの形態を、神経突起トレース(NeuroLucida(ニューロルシダ))画像で観察し、その結果、成熟形態に分化されたことが確認された。E~O:組織形態学的分析を蛍光染色によって実施した。E~G:移植部位でのTH+/FOXA2+、TH+/LMX1A+、TH+/NURR1+ドーパミン作動性ニューロンの確認である。下側の拡大画

像は、移植ドーパミン作動性ニューロンが真の中脳型ニューロンであることを確認している。I：中脳型因子による蛍光染色の結果、発現%が8匹の動物の移植部位で確認された（13, 697個のTH+細胞が分析された）。L~P：移植部位を、移植の6か月後（n=8匹のラット）の体積（L）、TH+ニューロンの数（M）、密度（N）、身体サイズ（O）により計算した。P、Og-NSC移植成体フィリピンモンキー（カニクイザル）への移植の1か月後、TH+ドーパミンニューロンのうち、ヒト細胞から誘導された移植細胞であることを示しているSTEM121を発現する移植ドーパミン作動性ニューロン、並びに中脳型マーカーとしてFOXA2及びNURR1を発現する移植ドーパミン作動性ニューロンを確認した。スケールバー、50µm（E~Gの下側、H、J、K、Pの下側）、200µm（Pの上側）、500µm（D~G）]。

10

【図7A】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B~D、in vitro（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200µm。E~O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日にin vitroで凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100µm（E~P）、200µm（B~D）]。

【図7B】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B~D、in vitro（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200µm。E~O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日にin vitroで凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100µm（E~P）、200µm（B~D）]。

20

【図7C】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B~D、in vitro（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200µm。E~O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日にin vitroで凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100µm（E~P）、200µm（B~D）]。

30

【図7D】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B~D、in vitro（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200µm。E~O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日にin vitroで凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100µm（E~P）、200µm（B~D）]。

【図7E】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B~D、in vitro（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200µm。E~O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日にin vitroで凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100µm（E~P）、200µm（B~D）]。

40

【図7F】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B~D、in vitro（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200µm。E~O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日にin vitroで凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳

50

室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7G】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7H】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7I】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7J】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7K】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7L】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m（B～D）]。

【図7M】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro*（DIV）の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200 μ m。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100 μ m（E～P）、200 μ m

(B～D)]。

【図7N】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro* (DIV)の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200μm。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100μm (E～P)、200μm (B～D)]。

【図7O】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro* (DIV)の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200μm。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100μm (E～P)、200μm (B～D)]。

【図7P】hPSCからの中脳様オルガノイドの生成及び特性を示す[A：中脳様オルガノイドを生成する実験手順の概略図である。B～D、*in vitro* (DIV)の数日間にわたるオルガノイドの位相差像である。スケールバー、200μm。E～O：オルガノイドで形成された神経構造の代表的な免疫蛍光画像である。オルガノイドを指定された日に*in vitro*で凍結切片にし、指定された抗体で染色した。V、脳室；VZ、脳室帯；IZ、中間帯；MZ、外套帯；スケールバー、100μm (E～P)、200μm (B～D)]。

【図8A】中脳神経幹細胞の維持が、中脳神経発生にとって重要であるFGF8の処理時間を本発明の方法により制御することによって、効率的に改善されることを示す[A：プロトコールA及びBのFGF8b処理スキームである。B：2つの異なるFGF8b処理スキームにより計算された、オルガノイド(Og)－NSCにおける腹側中脳(VM)特異的及び視床下部特異的マーカーの発現のためのRNAシーケンシングデータである。C：プロトコールA及びBにより誘導されたEN1+／TH+mDAニューロンの代表的な画像である。スケールバー(50μm)]。

【図8B】中脳神経幹細胞の維持が、中脳神経発生にとって重要であるFGF8の処理時間を本発明の方法により制御することによって、効率的に改善されることを示す[A：プロトコールA及びBのFGF8b処理スキームである。B：2つの異なるFGF8b処理スキームにより計算された、オルガノイド(Og)－NSCにおける腹側中脳(VM)特異的及び視床下部特異的マーカーの発現のためのRNAシーケンシングデータである。C：プロトコールA及びBにより誘導されたEN1+／TH+mDAニューロンの代表的な画像である。スケールバー(50μm)]。

【図8C】中脳神経幹細胞の維持が、中脳神経発生にとって重要であるFGF8の処理時間を本発明の方法により制御することによって、効率的に改善されることを示す[A：プロトコールA及びBのFGF8b処理スキームである。B：2つの異なるFGF8b処理スキームにより計算された、オルガノイド(Og)－NSCにおける腹側中脳(VM)特異的及び視床下部特異的マーカーの発現のためのRNAシーケンシングデータである。C：プロトコールA及びBにより誘導されたEN1+／TH+mDAニューロンの代表的な画像である。スケールバー(50μm)]。

【図9A】2D培養環境における腹側中脳(VM)神経幹／前駆細胞(NSC)又はhPSCからの2D－NSC生成を示す[A：2Dにおいて分化されたhPSCの細胞継代の際のアストロサイト調整培地(ACM)処理の要件である。NSCを調製するため、ACMの非存在(－)又は存在(＋)下でのVMパターン化化学処理により分化されたhPSC(上段前(before top)、上側パネル)を、単離及び平板培養した(継代後)。指定された中脳特異的因子を発現する細胞の位相差及び免疫蛍光染色の画像を表す。B：2D培養ベースhPSC－NSC／mDAニューロン分化プロトコールの概略図であ

10

20

30

40

50

る。C：2D-NSCにおけるVM特異的NSCマーカー発現NSC拡大の2週間後の免疫蛍光染色である。D：集団二倍レベル（PDL、棒）及び累積PDL（線）により表された2D-NSCの細胞拡大である。E～F：mDAニューロンは、分化の12～15日後にOg-NSCから生成された。DAニューロン中の中脳特異的マーカー発現（TH+細胞の%）を3つの独立した実験で定量化した（F）。スケールバー、50μm】。

【図9B】2D培養環境における腹側中脳（VM）神経幹／前駆細胞（NSC）又はhPSCからの2D-NSC生成を示す[A：2Dにおいて分化されたhPSCの細胞継代の際のアストロサイト調整培地（ACM）処理の要件である。NSCを調製するため、ACMの非存在（-）又は存在（+）下でのVMパターン化化学処理により分化されたhPSC（上段前（before top）、上側パネル）を、単離及び平板培養した（継代後）。指定された中脳特異的因子を発現する細胞の位相差及び免疫蛍光染色の画像を表す。B：2D培養ベースhPSC-NSC／mDAニューロン分化プロトコルの概略図である。C：2D-NSCにおけるVM特異的NSCマーカー発現NSC拡大の2週間後の免疫蛍光染色である。D：集団二倍レベル（PDL、棒）及び累積PDL（線）により表された2D-NSCの細胞拡大である。E～F：mDAニューロンは、分化の12～15日後にOg-NSCから生成された。DAニューロン中の中脳特異的マーカー発現（TH+細胞の%）を3つの独立した実験で定量化した（F）。スケールバー、50μm】。

【図9C】2D培養環境における腹側中脳（VM）神経幹／前駆細胞（NSC）又はhPSCからの2D-NSC生成を示す[A：2Dにおいて分化されたhPSCの細胞継代の際のアストロサイト調整培地（ACM）処理の要件である。NSCを調製するため、ACMの非存在（-）又は存在（+）下でのVMパターン化化学処理により分化されたhPSC（上段前（before top）、上側パネル）を、単離及び平板培養した（継代後）。指定された中脳特異的因子を発現する細胞の位相差及び免疫蛍光染色の画像を表す。B：2D培養ベースhPSC-NSC／mDAニューロン分化プロトコルの概略図である。C：2D-NSCにおけるVM特異的NSCマーカー発現NSC拡大の2週間後の免疫蛍光染色である。D：集団二倍レベル（PDL、棒）及び累積PDL（線）により表された2D-NSCの細胞拡大である。E～F：mDAニューロンは、分化の12～15日後にOg-NSCから生成された。DAニューロン中の中脳特異的マーカー発現（TH+細胞の%）を3つの独立した実験で定量化した（F）。スケールバー、50μm】。

【図9D】2D培養環境における腹側中脳（VM）神経幹／前駆細胞（NSC）又はhPSCからの2D-NSC生成を示す[A：2Dにおいて分化されたhPSCの細胞継代の際のアストロサイト調整培地（ACM）処理の要件である。NSCを調製するため、ACMの非存在（-）又は存在（+）下でのVMパターン化化学処理により分化されたhPSC（上段前（before top）、上側パネル）を、単離及び平板培養した（継代後）。指定された中脳特異的因子を発現する細胞の位相差及び免疫蛍光染色の画像を表す。B：2D培養ベースhPSC-NSC／mDAニューロン分化プロトコルの概略図である。C：2D-NSCにおけるVM特異的NSCマーカー発現NSC拡大の2週間後の免疫蛍光染色である。D：集団二倍レベル（PDL、棒）及び累積PDL（線）により表された2D-NSCの細胞拡大である。E～F：mDAニューロンは、分化の12～15日後にOg-NSCから生成された。DAニューロン中の中脳特異的マーカー発現（TH+細胞の%）を3つの独立した実験で定量化した（F）。スケールバー、50μm】。

【図9E】2D培養環境における腹側中脳（VM）神経幹／前駆細胞（NSC）又はhPSCからの2D-NSC生成を示す[A：2Dにおいて分化されたhPSCの細胞継代の際のアストロサイト調整培地（ACM）処理の要件である。NSCを調製するため、ACMの非存在（-）又は存在（+）下でのVMパターン化化学処理により分化されたhPSC（上段前（before top）、上側パネル）を、単離及び平板培養した（継代後）。指定された中脳特異的因子を発現する細胞の位相差及び免疫蛍光染色の画像を表す。B：2D培養ベースhPSC-NSC／mDAニューロン分化プロトコルの概略図である。C：2D-NSCにおけるVM特異的NSCマーカー発現NSC拡大の2週間後の免疫蛍光染色である。D：集団二倍レベル（PDL、棒）及び累積PDL（線）により表さ

10

20

30

40

50

れた2D-NSCの細胞拡大である。E~F:mDAニューロンは、分化の12~15日後にOg-NSCから生成された。DAニューロンの中脳特異的マーカー発現(TH+細胞の%)を3つの独立した実験で定量化した(F)。スケールバー、50μm]。

【図9F】2D培養環境における腹側中脳(VM)神経幹/前駆細胞(NSC)又はhPSCからの2D-NSC生成を示す[A:2Dにおいて分化されたhPSCの細胞継代の際のアストロサイト調整培地(ACM)処理の要件である。NSCを調製するため、ACMの非存在(-)又は存在(+)下でのVMパターン化化学処理により分化されたhPSC(上段前(before top)、上側パネル)を、単離及び平板培養した(継代後)。指定された中脳特異的因子を発現する細胞の位相差及び免疫蛍光染色の画像を表す。B:2D培養ベースhPSC-NSC/mDAニューロン分化プロトコルの概略図である。C:2D-NSCにおけるVM特異的NSCマーカー発現NSC拡大の2週間後の免疫蛍光染色である。D:集団二倍レベル(PDL、棒)及び累積PDL(線)により表された2D-NSCの細胞拡大である。E~F:mDAニューロンは、分化の12~15日後にOg-NSCから生成された。DAニューロンの中脳特異的マーカー発現(TH+細胞の%)を3つの独立した実験で定量化した(F)。スケールバー、50μm]。

【図10】オルガノイドベース培養物(上側)及び2Dベース培養物(下側)において中脳関連マーカーを発現する神経幹/前駆細胞(NSC)及びmDAニューロンの代表的画像を示す[スケールバー、50μm]。

【図11】開発されたプロトコルが、ヒト胚性幹細胞/人工多能性幹細胞及び様々な幹細胞株に汎用的に適用可能なプロトコルであることを示す結果を例示している[中脳特異的マーカーを発現する腹側中脳(VM)神経幹/前駆細胞(NSC)及びmDAニューロンが、試験されたすべてのhPSC株において生成された。3個のhESC株及び4個のhiPSC株が、図1Aに概説されたオルガノイドプロトコルを使用して誘導されて、VM型NSCへ分化した。NSCが2~3細胞継代に拡大され、NSCからmDAニューロンへの最終分化が誘導された。NSC段階(拡大)のFOXA2+、LMX1A+ NSC及び最終分化の7~12日後の中脳マーカーFOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1を発現するTH+ mDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写している。スケールバー、50μm]。

【図12A】オルガノイド(Og)神経幹/前駆細胞(NSC)がヒトmDAニューロンに拡大可能であること、及び量又はその細胞の生物学的特性の維持に関して、汎用細胞治療剤として使用するのに十分に供給できることを示す結果を例示している。[A:5細胞継代によるNSC拡大を使用して未分化hPSCの1個のディッシュからmDAニューロンの7,260個のバイアル(9,075個のディッシュ)を生成する、オルガノイドベースプロトコルの概略図である。B:複数NSC継代でのOg-NSCのmDA神経発生能力の維持である。上側の図は、NSC段階(拡大)でのFOXA2+、LMX1A+ NSC、及び最終分化の10~18日後の中脳マーカーFOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1を発現するTH+ mDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写している。NSC及びmDAニューロンにおける中脳マーカー発現を下側グラフに定量化した。独立した実験(n=3)。C:mDA神経発生電位を変えない、液体N₂中のOg-NSCの貯蔵である。液体N₂貯蔵を伴う(+)及び伴わない(-)H9 Og-NSCから分化させたmDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写する。スケールバー、50μm]。

【図12B】オルガノイド(Og)神経幹/前駆細胞(NSC)がヒトmDAニューロンに拡大可能であること、及び量又はその細胞の生物学的特性の維持に関して、汎用細胞治療剤として使用するのに十分に供給できることを示す結果を例示している。[A:5細胞継代によるNSC拡大を使用して未分化hPSCの1個のディッシュからmDAニューロンの7,260個のバイアル(9,075個のディッシュ)を生成する、オルガノイドベースプロトコルの概略図である。B:複数NSC継代でのOg-NSCのmDA神経発生能力の維持である。上側の図は、NSC段階(拡大)でのFOXA2+、LMX1A+ NSC、及び最終分化の10~18日後の中脳マーカーFOXA2、LMX1A、NUR

10

20

30

40

50

R1及びEN1を発現するTH+ mDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写している。NSC及びmDAニューロンにおける中脳マーカー発現を下側グラフに定量化した。独立した実験(n=3)。C:mDA神経発生電位を変えない、液体N₂中のOg-NSCの貯蔵である。液体N₂貯蔵を伴う(+)及び伴わない(-)H9 Og-NSCから分化させたmDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写する。スケールバー、50 μm]。

【図12C】オルガノイド(Og)神経幹/前駆細胞(NSC)がヒトmDAニューロンに拡大可能であること、及び量又はその細胞の生物学的特性の維持に関して、汎用細胞治療剤として使用するのに十分に供給できることを示す結果を例示している。[A:5細胞継代によるNSC拡大を使用して未分化hPSCの1個のディッシュからmDAニューロンの7,260個のバイアル(9,075個のディッシュ)を生成する、オルガノイドベースプロトコルの概略図である。B:複数NSC継代でのOg-NSCのmDA神経発生能力の維持である。上側の図は、NSC段階(拡大)でのFOXA2+、LMX1A+NSC、及び最終分化の10~18日後の中脳マーカーFOXA2、LMX1A、NURR1及びEN1を発現するTH+ mDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写している。NSC及びmDAニューロンにおける中脳マーカー発現を下側グラフに定量化した。独立した実験(n=3)。C:mDA神経発生電位を変えない、液体N₂中のOg-NSCの貯蔵である。液体N₂貯蔵を伴う(+)及び伴わない(-)H9 Og-NSCから分化させたmDAニューロンの代表的な免疫染色画像を描写する。スケールバー、50 μm]。

【図13A】Pd-iPSCから誘導されたmDAニューロンを使用したPD薬物の候補化合物のスクリーニングを示す[A:実験手順の概略図である。PD患者(PD-ips1)から誘導されたhiPSが、オルガノイドベースプロトコルを使用してmDAニューロンに分化された。Pd-iPSC-mDAニューロンの細胞生存は、MTT分析及びTH陽性DAニューロンの免疫蛍光強度ベース計数を使用して、化合物の存在下で評価した。Image Express Microconfocal(イメージエクスプレスマイクロコンフォーカル)(Molecular Devices, San Jose, CA)を使用するハイコンテンツスクリーニング(HCS)分析を、TH強度ベースmDAニューロン生存分析に使用した。B:MTT分析(上側)及びTH+強度測定(下側)により得られたスクリーニングデータの例である。黄色の線は対照群(ビヒクル)の平均値である。C:ビヒクル(上側)及び化合物#9を使用して10日目のPd-iPSC由来mDAニューロンの代表的なTH/MAP2画像である]。

【図13B】Pd-iPSCから誘導されたmDAニューロンを使用したPD薬物の候補化合物のスクリーニングを示す[A:実験手順の概略図である。PD患者(PD-ips1)から誘導されたhiPSが、オルガノイドベースプロトコルを使用してmDAニューロンに分化された。Pd-iPSC-mDAニューロンの細胞生存は、MTT分析及びTH陽性DAニューロンの免疫蛍光強度ベース計数を使用して、化合物の存在下で評価した。Image Express Microconfocal(イメージエクスプレスマイクロコンフォーカル)(Molecular Devices, San Jose, CA)を使用するハイコンテンツスクリーニング(HCS)分析を、TH強度ベースmDAニューロン生存分析に使用した。B:MTT分析(上側)及びTH+強度測定(下側)により得られたスクリーニングデータの例である。黄色の線は対照群(ビヒクル)の平均値である。C:ビヒクル(上側)及び化合物#9を使用して10日目のPd-iPSC由来mDAニューロンの代表的なTH/MAP2画像である]。

【図13C】Pd-iPSCから誘導されたmDAニューロンを使用したPD薬物の候補化合物のスクリーニングを示す[A:実験手順の概略図である。PD患者(PD-ips1)から誘導されたhiPSが、オルガノイドベースプロトコルを使用してmDAニューロンに分化された。Pd-iPSC-mDAニューロンの細胞生存は、MTT分析及びTH陽性DAニューロンの免疫蛍光強度ベース計数を使用して、化合物の存在下で評価した。Image Express Microconfocal(イメージエクスプレスマイクロコンフォーカル)(Molecular Devices, San Jose, CA)を使用するハイコンテンツスクリーニング(HCS)分析を、TH強度ベースmDAニューロン生存分析に使用した。B:MTT分析(上側)及びTH+強度測定(下側)により得られたスクリーニングデータの例である。黄色の線は対照群(ビヒクル)の平均値である。C:ビヒクル(上側)及び化合物#9を使用して10日目のPd-iPSC由来mDAニューロンの代表的なTH/MAP2画像である]。

10

20

30

40

50

イクロコンフォーカル) (Molecular Devices, San Jose, CA) を使用するハイコンテツスクリーニング (HCS) 分析を、TH強度ベースmDAニューロン生存分析に使用した。B: MTT分析 (上側) 及びTH+強度測定 (下側) により得られたスクリーニングデータの例である。黄色の線は対照群 (ビヒクル) の平均値である。C: ビヒクル (上側) 及び化合物 # 9 を使用して10日目のPD-iPSC由来mDAニューロンの代表的なTH/MAP2画像である]。

【図14】二次培養によるオルガノイド (Og) 神経幹/前駆細胞 (NSC) 分化による発生中脳 (VM) におけるmDAニューロンの発生及び細胞の特性を要約している。Og-NSCの最終分化を、bFGFの抜取り及び神経栄養因子BDNF、GDNF及びcAMPの存在によって誘導した。免疫細胞化学分析を、増殖細胞 (Ki67)、成熟ニューロン (MAP2)、DAニューロン (TH) 及び中脳 (FOXA2、LMX1A、NURR1) に特異的な抗体を使用して、指定された分化日に実施した。スケールバー、50 µm。

10

【図15A】オルガノイド (Og) 及び2D-NSCにおける神経幹/前駆細胞 (NSC) 特異的遺伝子 (A)、多能性細胞特異的遺伝子 (B) 及び細胞老化特異的遺伝子 (D) の単一細胞RNA発現パターンを示す [多分化能遺伝子SSEA4及びTRA1-60の低い発現レベルをFACS分析によって更に評価した (C)]。

【図15B】オルガノイド (Og) 及び2D-NSCにおける神経幹/前駆細胞 (NSC) 特異的遺伝子 (A)、多能性細胞特異的遺伝子 (B) 及び細胞老化特異的遺伝子 (D) の単一細胞RNA発現パターンを示す [多分化能遺伝子SSEA4及びTRA1-60の低い発現レベルをFACS分析によって更に評価した (C)]。

20

【図15C】オルガノイド (Og) 及び2D-NSCにおける神経幹/前駆細胞 (NSC) 特異的遺伝子 (A)、多能性細胞特異的遺伝子 (B) 及び細胞老化特異的遺伝子 (D) の単一細胞RNA発現パターンを示す [多分化能遺伝子SSEA4及びTRA1-60の低い発現レベルをFACS分析によって更に評価した (C)]。

【図15D】オルガノイド (Og) 及び2D-NSCにおける神経幹/前駆細胞 (NSC) 特異的遺伝子 (A)、多能性細胞特異的遺伝子 (B) 及び細胞老化特異的遺伝子 (D) の単一細胞RNA発現パターンを示す [多分化能遺伝子SSEA4及びTRA1-60の低い発現レベルをFACS分析によって更に評価した (C)]。

【図16】3D大脳皮質オルガノイドを使用して大脳皮質神経幹細胞を単離する、詳細なプロトコルを示す。

30

【図17】神経幹細胞が3D大脳皮質オルガノイドを使用して得られることを示す [左側グラフ: 分化プロトコルの適合性を、大脳マーカーであるpax6の発現によって確認した。右側: 上側の写真では、オルガノイドをチョッピングする前、正確な形態でのオルガノイドの形成を写真によって確認した。下側の写真では、チョッピングした後に、正常な神経幹細胞の形態で増殖していることを確認した]。

【図18】2D及び3D由来培養から中脳神経幹細胞への最終的に確立された方向付け分化プロトコルを示す [A: ヒト胚性幹細胞を使用する胚性幹細胞から中脳神経幹細胞への方向付け分化の段階的技術の確立、アストロサイト前駆細胞の確保、次いでアストロサイトへの最終分化である。B: 大脳皮質由来アストロサイトを確保するプロトコルである。(A) はパターン化方法が (B) と異なっている]。

40

【図19】2D及び3D由来培地から中脳神経幹細胞への方向付け分化プロトコルを使用するアストロサイトの調製を示す。本発明の方法により誘導された細胞は、従来の二次元培養方法と比較して、より健康的であり、改善されたマーカー維持を有することを示している。

【図20】in vitroで培養された大脳皮質型及び中脳型アストロサイトの特性を分析して得られた結果を示す。中脳由来アストロサイトは、2つのアストロサイトにおけるニューロンの実際の支持機能に関する遺伝子分析において優れていることを示す。

【図21】in vivo移植後の、大脳皮質型及び中脳型アストロサイトの特性を分析して得られた結果を示す。中脳由来アストロサイトは、2つのアストロサイトにおけるニ

50

ニューロンの実際の支持機能に関する遺伝子分析において優れていることを示している。

【図22】 *in vivo*でのアストロサイト前駆細胞の移植によるミクログリアから高品位M2型細胞への変化を示す。将来にアストロサイトを移植する場合、環境を改善することができるので大きな有用性を有することが予想され得る。

【図23】 異種成分不含有系を使用する人工多能性幹細胞の他のタイプの適応培養の結果を示す。細胞治療剤を実際に開発する場合、異種成分不含有系を様々な細胞株に適用することが重要なので、これは基本的な結果である。

【図24】 他のタイプの人工多能性幹細胞（CMC-iPSC#11）から中脳型アストロサイト群へのプロトコル適用の確認（左側）、及び正常なニューロンの分化の確認（右側）を示す。

【図25】 他のタイプの人工多能性幹細胞（CMC-iPSC#11）へのプロトコル適用を確認して得られた結果を示す。

【図26】 TGF- β 及びLIFを使用する効率的な分化誘導を介したプロトコル適用を確認して得られた結果を示す。

【図27】 生成された中脳アストロサイトの生理学的特性を分析して得られた結果を示す。

【図28】 中脳型アストロサイトのために調整された培地を使用して、ミクログリアにおける変化を観察することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果が *in vitro*で検証された。

【図29】 炎症を誘導した後、アストロサイト調整培地による死因子を阻害する可能性を確認することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果が *in vitro*で検証された。

【図30】 炎症を誘導した後、アストロサイト調整培地の抗炎症効果をRT-PCRの使用により確認することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果が *in vitro*で検証された。

【図31】 アストロサイトを線条体に移植した後、非翻訳部位及び炎症応答に関連するRNA発現を分析することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果が *in vivo*で検証された。

【図32】 アストロサイトを *in vivo*で移植した後の、M1マーカーであるiNOSの発現を示す。神経幹細胞移植部位と比較して、少ない炎症が発生したことが確認された。

【図33】 アストロサイトを *in vivo*で移植した後の、M1マーカーであるCD11bの発現を示す。神経幹細胞移植部位と比較して、少ない炎症が発生したことが確認された。

【図34】 アストロサイトを *in vivo*で移植した後の、M1マーカーであるCD16.32の発現を示す。神経幹細胞移植部位と比較して、少ない炎症が発生したことが確認された。

【図35】 アストロサイトを *in vivo*で移植した後のM2マーカーであるCD206の発現を示す。神経幹細胞移植部位と比較して、少ない炎症が発生したことが確認された。

【図36】 3Dオルガノイドを使用して視床下部神経幹細胞を単離する、詳細なプロトコルを示す。

【図37】 3D視床下部オルガノイドを確保し、これに適したマーカーの発現を確認することによって得られる結果を示す。特異的マーカーとしては、ネスチン、Rax及びSox2の発現が十分に生じている。

【図38】 増殖することができる視床下部神経幹細胞が得られることを確認して得られる結果を示す [A：視床下部神経幹細胞マーカーであるネスチン/Raxを97%発現する4継代まで増殖することができる神経幹細胞の確保である。B：視床下部神経幹細胞における視床下部関連遺伝子の発現の確認である]。

【図39】 視床下部神経幹細胞の分化を誘導した後、正常なニューロン及びアストロサイトの分化を確認することによって得られた結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 4 0】視床下部神経幹細胞の分化を誘導した後、レプチンに応答性の細胞への分化を確認することによって得られた結果を示す。この機能分析は、視床下部細胞の機能的特徴を十分に示しており、視床下部ニューロンのマーカーである N P Y 及び A G R P の発現は、分化後に増加している。したがって、所望の視床下部神経幹細胞へのパターン化は、機能的にも、マーカーの発現に関しても十分に実施されたことが確認された。

【図 4 1】3 D オルガノイドを使用して発生された視床下部神経幹細胞は、二次元 2 D 環境で発生したものより、多くのマーカー遺伝子群を *i n v i v o* で発現することを示す。

【図 4 2】3 D オルガノイドを使用して発生された視床下部神経幹細胞の *i n v i v o* 移植の可能性を確認することによって得られた結果を示す。

【0 0 1 5】

【発明を実施するための最良の形態】

本明細書以下に発明をより詳細に記載する。

【0 0 1 6】

本発明は、ヒト多能性幹細胞から調製された 3 D オルガノイドをパターン化及びチップングし、幹細胞又は前駆細胞を培養し、幹細胞又は前駆細胞の分化を誘導して、大量の最終分化細胞を得る方法に関する。

【0 0 1 7】

本明細書で使用されるとき、用語「多能性幹細胞 (P S C)」は、身体を構成する任意のタイプの細胞への分化を誘導することができる幹細胞を指し、多能性幹細胞には、胚性幹細胞 (E S C) 及び人工多能性幹細胞 (I p s c、脱分化型幹細胞) が含まれる。

【0 0 1 8】

本明細書で使用されるとき、用語「オルガノイド」は、幹細胞を使用して最小機能を有するように作製された「ミニ臓器もどき」を指し、三次元構造で作製されること及び研究室であっても実際の身体臓器に類似した環境を作り出すことができることを特徴とする。すなわち、「オルガノイド」は、3 D 立体構造を有する細胞を指し、動物等から採集又は取得されない人工培養方法によって調製された臓器、例えば神経及び腸に類似したモデルを指す。構成する細胞の起源は限定されない。オルガノイドは、細胞増殖の過程における周囲環境と相互作用することが可能である環境を有してもよい。2 D 培養と異なり、3 D 細胞培養は細胞が *e x v i v o* で全方向に増殖することを可能にする。したがって、本発明において、3 D オルガノイドは、実際に *i n v i v o* で相互作用する臓器をほぼ完全に模倣することにより、疾患等のための治療剤の開発を観察するための優れたモデルであり得る。

【0 0 1 9】

オルガノイドは、ヒト多能性幹細胞を培養することによって一般に調製され得る。具体的には、オルガノイドは、パーキンソン病から誘導された人工多能性幹細胞から神経外胚葉球体へ分化することができる、又はパーキンソン病から誘導された人工多能性幹細胞から完成型内胚葉及び後腸への段階的分化を介して、腸オルガノイドに分化することができる。

【0 0 2 0】

本明細書で使用されるとき、用語「分化」は、細胞の構造又は機能が、細胞の分化及び増殖、並びに全個体への成長の際に特定化される現象を指す。換言すると、対応する所定の役割を実践するため、臓器の細胞、組織等に適切な形態及び機能へ変化する過程を指す。例えば、分化は、多能性幹細胞が外胚葉 (大脳皮質、中脳、視床下部等)、中胚葉 (卵黄嚢等) 及び内胚葉細胞に形質転換される過程、並びに造血前駆幹細胞が赤血球、白血球、血小板等に形質転換される過程、すなわち、前駆細胞が得意的分化形質を発現する過程を含んでもよい。

【0 0 2 1】

直接ヒト多能性幹細胞からの分化を誘導して対応する細胞に分化させる既存の方法は、細胞株又は研究室 (実験環境) に応じて再現性に問題を有し、維持因子の安定した発現を達成することができない。例えば、中脳ドーパミンニューロンの場合では、実際の *i n*

10

20

30

40

50

v i v o 環境と異なり、アストロサイトと一緒に存在せず、1回の分化で得ることができる最終細胞の数に制限がある。本発明の一実施形態としては、二次元分化由来細胞集団と比較して、大脳アストロサイト前駆細胞、中脳アストロサイト前駆細胞、中脳ドーパミン作動性神経幹細胞又は視床下部神経幹細胞をそれぞれ十分に含有することができる（濃縮された標的細胞）オルガノイドをパターン化及び調製すること、すなわち、各標的細胞の最大量を含むオルガノイドを確保すること、並びにオルガノイド組織をチョッピングして、対応する幹細胞又は前駆細胞を培養することによって、幹細胞又は前駆細胞を、実際の脳から単離された細胞により類似させることができ、特性を十分に維持することができ、生存能が得られる細胞集団への分化を得ることが可能である。

【0022】

本明細書で使用されるとき、用語「パターン化」は、オルガノイドを調製する場合、この方法により、例えば、中脳型パターン化、大脳皮質型パターン又は視床下部型パターンにより詳細な脳組織から最終的に抽出される起源組織細胞の特性を有する運命の細胞集団が、複数の細胞集団（濃縮された標的細胞）として含有されるような、オルガノイドの調製を指す。加えて、パターン化マーカーには、中脳型パターン化では *Lmx1a*、*Foxa2*、*Nurr1* 及び *En1*、大脳皮質型パターン化では *Pax6* 及び *Foxg1*、視床下部型パターン化では *Rax* 及び *Nkx2.2* 等が含まれる。

【0023】

したがって、本発明において、最終分化細胞は、調製された3Dオルガノイドをチョッピングすること、増幅させることができる幹細胞をオルガノイドから分離すること、及び幹細胞を培養して増殖させることによって一度に大量に得ることができる。

【0024】

本発明の一実施形態によると、本発明は、ヒト多能性幹細胞から調製された3Dオルガノイドをチョッピングして、大量の幹細胞又は前駆細胞を得て、最終的に分化させる方法であって、

- 1) ヒト多能性幹細胞を増殖及び培養して、3Dオルガノイドを調製すること、
 - 2) 調製された3Dオルガノイドをパターン化及びチョッピングすること、並びに
 - 3) チョッピングされたオルガノイドから抽出された細胞中の幹細胞又は前駆細胞を培養及び増殖し、その分化を誘導して、大量の最終分化細胞を得ること、
- を含む方法を含む。

【0025】

幹細胞は、外胚葉幹細胞（皮膚及び神経細胞）、中胚葉幹細胞（筋肉及び骨細胞）、又は内胚葉幹細胞（消化器及び呼吸器細胞）であり得る。具体的には、中脳ドーパミン作動性神経幹細胞又は視床下部神経幹細胞であり得る。

【0026】

前駆細胞は、大脳アストロサイト前駆細胞又は中脳アストロサイト前駆細胞であり得るが、これらに限定されない。

【0027】

細胞は、ニューロン又はアストロサイトであり得るが、これらに限定されない。

【0028】

より好ましくは、ヒト多能性幹細胞及び幹細胞は、ビトロネクチンを使用して培養される。この点において、ビトロネクチンを $0.3 \sim 0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で使用することが適切である。現在まで、CellStemCell of Parmar group (A. Kirkeby et al., Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease. Cell Stem Cell 20, 135-148 (2017).)、Nature Protocol (S. Noltb rant, A. Heuer, M. Parmar, A. Kirkeby, Generation of high-purity human ventral midbrain d

10

20

30

40

50

opaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation. Nature protocols 12、1962-1979 (2017)) の報告によると、移植用にドーパミン作動性ニューロンを大量生産する最新研究を報告しており、ラミン521 (BioLamina (バイオラミナ) LN-521) をヒト胚性幹細胞の増殖及び培養に $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で使用すること、及びラミン511 (バイオラミナ LN-511) を中脳ニューロンへの分化後に $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で使用することが、非常に重要であると報告された。対照的に、本発明の実施例ではビトロネクチン (Gibco (ギブコ) A31804) の $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ を、ヒト胚性幹細胞の培養及び中脳神経幹細胞の培養の両方に使用した。培養に一般的に使用される 60mm ディッシュのコーティング単価に関して、ヒト胚性幹細胞を培養するラミン521 の価格は 7,282 ウォン/ディッシュであり、本発明のビトロネクチンの価格は 1,480 ウォン/ディッシュであり、中脳神経幹細胞を培養するラミン511 の価格は 23,832 ウォン/ディッシュであり、一方、本発明に連続的に使用されるビトロネクチンの価格は 1,480 ウォン/ディッシュである。コーティング価格のみが考慮されるのであれば、本発明の方法は、ヒト胚性幹細胞を培養する場合、5 倍の節約効果を有し、中脳神経幹細胞を培養する場合、16 倍の節約効果を有する。

【0029】

本明細書で使用されるとき、用語「大量」は、各パターン化細胞集団に応じて差があるが、最初に使用される多能性幹細胞の 1 個の培養ディッシュの開始時に導入される場合、凍結細胞の約 1,000 ~ 7,200 個のバイアルを得ることが可能であることを意味し、1 又は 2 個の培養ディッシュ細胞が 1 個のバイアルで一般的に凍結される場合、約 1,000 ~ 14,000 倍に増加する量を指す。特に、単純な定量的増殖のみならず、特性の維持も含まれる。

【0030】

本明細書で使用されるとき、用語「グリア」は、脳に存在する細胞の最大部分を示す細胞を指し、「アストロサイト」を指す。アストロサイトは、ミクログリアとも称され、ニューロンの保護、並びに栄養素及び炎症の供給に関与し、ミクログリアは、脳における炎症の原因となる細胞である。

【0031】

アストロサイトは、胚性又は成体幹細胞からの分化によって得ることができ、哺乳動物における中脳 (腹側中脳)、大脳皮質 (皮質) 又は外側基底核隆起 (線条体原基) からの単離によっても得ることができる。

【0032】

「神経幹/前駆細胞 (NSC/NPC)」は、発生又は成体脳組織の脳組織から単離及び培養され、培養された NPC を、研究及び薬物スクリーニング用のドーパミンニューロンの大量形成に使用することができる。

【0033】

「神経細胞」は、神経系の細胞であり、用語「ニューロン」又は「ニューロン細胞」は交換可能に使用され得る。

【0034】

「ドーパミン (DA) 神経細胞」は、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) を発現する神経細胞を指す。本発明において、「ドーパミン作動性神経細胞」、「ドーパミンニューロン」、「DA」等は交換可能に使用される。ドーパミン神経細胞は、中脳黒質に特異的に位置し、線条体、辺縁系及び新皮質を *in vivo* で刺激して、姿勢反射、移動及び報酬関連行動を制御する。

【0035】

本発明は、上記の方法によって得られる細胞を含む細胞治療剤も含む。

【0036】

「細胞治療剤」は、単離、培養及び特別な改変を介して対象から調製された細胞及び組

組織による治療、診断及び予防のために使用される薬物である（米国FDA規則）。一連の作用、例えば、生きている自己、同種若しくは異種細胞の *ex vivo* での増殖若しくは選別、又は細胞若しくは組織の機能を回復する他の方法による細胞の生物学的特性の変更を介した、治療、診断及び予防の目的に使用される薬物を指す。細胞治療剤は、細胞分化の程度によって体細胞治療剤及び幹細胞治療剤に大まかに分類される。

【0037】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」は、治療、観察又は実験される脊椎動物、好ましくは哺乳動物、例えば、ウシ、ブタ、ウメ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ヒト等であり得る。

【0038】

本明細書で使用されるとき、用語「治療」は、疾患に関連する臨床状況を阻害、軽減又は有利に変更する任意の作用を指す。加えて、治療は、治療を受けない場合の予想生存率と比較して増加した生存を意味することができる。治療は、治療的方法に加えて予防的方法も同時に含む。

【0039】

本発明の細胞治療剤は、神経変性疾患、炎症性変性疾患及び代謝疾患からなる群から選択される疾患に治療効果を呈する。

【0040】

神経変性疾患には、例えば、パーキンソン病、認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、記憶喪失、重症筋無力症、進行性核上性麻痺、多系統萎縮症、本態性振戦、大脳皮質基底核変性症、びまん性レビー小体病及びピック病からなる群から選択されるが、これらに限定されないものが含まれ得る。

【0041】

炎症性変性疾患には、認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、白質変性症、副腎白質ジストロフィー、多発性硬化症及びルー・ゲーリック病からなる群から選択されるが、これらに限定されないものが含まれ得る。

【0042】

代謝疾患には、糖尿病、肥満症及び代謝障害からなる群から選択されるが、これらに限定されないものが含まれ得る。

【0043】

本発明の方法により得られる細胞を細胞治療剤として適用することができ、薬学的に許容される担体を更に含むことによって処方することができる。本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容される担体」は、生物体を著しく刺激せず、投与された化合物の生物学的活性及び特性を阻害しない担体又は希釈剤を指す。本発明において、細胞治療剤に含まれ得る薬学的に許容される担体は、当該技術に既知である限り、制限されることなく使用することができ、例えば、緩衝剤、防腐剤、鎮痛剤、可溶化剤、等張剤、安定剤、塩基、賦形剤、滑沢剤等である。本発明の細胞治療剤は、一般的に使用される技術により様々な製剤の形態に調製され得る。本発明の細胞治療剤は、疾患部位への遊走を誘導し得る限り任意の経路で投与され得る。一部の場合、病変へ向かわせる手段を備えたビヒクルへの幹細胞の装填方法も、考慮され得る。したがって、本発明の細胞治療剤は、局所（口腔、舌下、真皮及び眼内の投与を含む）、非経口（皮下、皮内、筋肉内、滴下、静脈内、動脈内、関節内及び脳脊髄液内を含む）、又は経皮投与を含むいくつかの経路を介して投与することができ、好ましくは、疾患部位に直接投与される。一実施形態において、細胞は、薬剤を適切な希釈剤に懸濁させることによって個体に投与されてもよく、希釈剤は、標的組織に注射された場合、細胞を保護及び維持するため、並びに使用を促進するために使用される。希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝溶液、緩衝溶液、例えばHBS、脳脊髄液等が含まれ得る。加えて、医薬組成物は、活性物質が標的細胞に移動することを可能にする任意のデバイスによって投与されてもよい。投与及び調製の好ましい様式は、注射である。注射剤は、水溶液、例えば、生理食塩水、リンガー溶液、ハックス溶液又は滅菌水溶液、植物油、例えばオリーブ油、高級脂肪酸エステル、例えばエチルオレイン酸、非

10

20

30

40

50

水溶液、例えば、エタノール、ベンジルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール又はグリセリン等を使用して調製され得る。粘膜浸透には、バリアを通過するのに適した当該技術に既知の非浸透剤を使用することができ、医薬担体、例えば、劣化防止用の安定剤としてアスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、BHA、トロフェロール、EDTA等、及び乳化剤、pH調整用の緩衝剤、微生物の増殖を阻害する防腐剤、例えば、硝酸フェニル水銀、チメロサル、塩化ベンザルコニウム、フェノール、クレゾール及びベンジルアルコールを更に含むことができる。

【0044】

本発明は、上記の方法により得られた細胞又は前駆細胞を使用する薬物スクリーニング方法も提供する。

【0045】

本発明により得られる細胞の重要な特徴には、大量の細胞の生成を確実にする可能性、凍結保存の最中でも特性を維持すること、同じ細胞集団を長期間にわたって維持する可能性、及び生体から誘導された細胞により類似した分化が含まれる。この特性は、多数の薬物を同時にスクリーニングするのに特に適しており、このことは、同じ状態の細胞を大量に必要とし、長期間の反復分析に同じ細胞を確保することが鍵になる。これは、細胞をスクリーニングするのに非常に適しており、それは、主要マーカーが維持される同じ特徴を有する細胞集団をスクリーニング操作の最初から最後まで連続的に使用できるからである。

【0046】

薬物は、神経変性疾患、炎症性変性疾患及び代謝疾患からなる群から選択される疾患を治療する薬物であり、神経変性疾患、炎症性変性疾患及び代謝疾患からなる群から選択される疾患に治療効果を呈する。

【0047】

神経変性疾患には、例えば、パーキンソン病、認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、記憶喪失、重症筋無力症、進行性核上性麻痺、多系統萎縮症、本態性振戦、大脳皮質基底核変性症、びまん性レビー小体病及びピック病が含まれるが、これらに限定されない様々な神経系疾患が含まれ得る。

【0048】

炎症性変性疾患には、認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、白質変性症、副腎白質ジストロフィー、多発性硬化症及びルー・ゲーリック病からなる群から選択されるが、これらに限定されないものが含まれ得る。

【0049】

代謝疾患には、糖尿病、肥満症及び代謝障害からなる群から選択されるが、これらに限定されないものが含まれ得る。

【0050】

本発明に使用されるすべての技術用語は、特に定義されない限り、本発明が属する当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。加えて、好ましい方法及び例が本明細書に記載されているが、類似又は同等のものも本発明の範囲内に含まれる。本明細書に参照として記載されているすべての刊行物の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0051】

[発明を実施するための形態]

本明細書以下に本出願を、実施例を介して詳細に記載する。以下の実施例は、本出願を例示するためのものであり、本出願の範囲は以下の実施例によって制限されない。

【0052】

[実施例]

実施例1：中脳オルガノイドを使用したヒト人工多能性幹細胞からmDA（中脳ドーパミン）ニューロンへの分化

[実験方法]

ヒト胚幹細胞又はヒト人工多能性幹細胞の培養

10

20

30

40

50

hESC及びhiPSCを、Hanyang University (Seoul, Republic of Korea) の治験審査委員会 (IRB) により承認されたhESC研究指針に基づいて培養した。この実験に使用したhESC及びhiPSCを下記の表1に示す。

【0053】

【表1】

表1

hESC 株			
本明細書で使用する名称	本来の名称	核型	確立した施設
HSF6	UC06	雌(46, XX)	UCSF
H9	WA09	雌(46, XX)	Wi 細胞
HUES6	HUES6	雌(46, XX)	ハーバード大学 (HSCI iPS Core)

10

20

hiPSC 株					
本明細書で使用する名称	本来の名称	供給源 (ヒト)	再プログラミング因子	方法	確立した施設
Retro-1	Rv-hiPS 01-1	新生児線維芽細胞	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	レトロウイルス	ハーバード
Epi-ips	エピソード-ips1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター	漢陽大学 (自己保有物)
CMC-ips#11	CMC-hipsc-011	骨髄血液	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	センダイウイルス	カトリック大学 (韓国 NIH SCRM)
PD-ips1	PD 患者由来 ips-1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター	漢陽大学 (自己保有物)
PD-#22	Corr. PD-ips#22	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター及び編集済みゲノム	漢陽大学 (自己保有物)

30

40

【0054】

未分化hESC/iPSCの増殖及び維持のため、細胞を、37℃に設定されフィーダー層を有さないCO₂インキュベーターにより、mTESR-1培地 (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) を使用して、マトリゲル (Matrigel) (商標) 又はヒトロネクチン (Human, Gibco Fisher Scientific, Waltham, MA) (Gibco A31804, 0.5 µg/cm²) コーティング6cmディッシュ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で培養し、培地の交換を毎日実施した。未分化幹細胞は、培地を毎日交換することによって分化能を維持し、アクターゼ (Acutase) (Stemcell Technologies Inc.) を4

50

～5日毎に使用して二次培養した。

【0055】

3Dオルガノイド調製方法を使用する中脳型神経幹細胞の調製

簡潔には、中脳型3Dオルガノイドを最初に調製し、小片に切断し、中脳型神経幹細胞の状態では培養ディッシュに大量に増殖させた系を使用した。

【0056】

通常は未分化状態で培養されるhESC及びhiPSCを、二次培養の際にアクターゼ (Accutase) (商標) の使用によって分離し、未分化状態のヒト胚性幹細胞を、丸底底面を有する96ウェルプレートにアリコートし、底面に張り付くことなく、10,000個の細胞/ウェルでオルガノイドを一度に形成した。初日の培地組成では、オルガノイドの生成を、下記の表4の播種基礎培地における表2の0日目に対応する添加条件 (SB431542、10 μ M; ノギン (Noggin)、100 ng/ml; アスコルビン酸、200 μ M; ドキシサイクリン、1 μ g/ml; Y27632、20 μ M) で開始した。翌日には、神経誘導基礎培地 (表3) を培地として使用し、発生は、初日に添加された成分のうちでドキシサイクリン1 μ g/ml、Y27632 20 μ Mを除いて (表2を参照されたい)、プルモルファミン (purmorphamine) 2 μ M、ソニックヘッジホッグ100 ng/mlを成分に追加的に添加した。培養培地は、11日目までは神経誘導基礎培地であり、発生は、添加構成成分について表2を参照した濃度に従って添加剤を追加又は減算することによって誘導した。培地を日付に従って毎日交換した。オルガノイドの正確な形成は、2又は3日目の細胞集団の形成によって確認し、11日目に細胞の外側への出芽によって検査した。オルガノイド分化の11日目、96ウェルプレートに形成された8個のオルガノイドを一つずつ、それぞれの群に分け、対応する6ウェル低結合プレートにアリコートし、そこで培養した。発生を、表2の成分を含有する中脳パターン化基礎培地 (表3) において誘導し、その間、旋回振とう器 (80～100 rpm) で回転させた。18日目、1個のオルガノイドを30 G針で約4～10片に切断し、アクターゼ (商標) で10分間処理し、次いで1mlピペットで5回ピペットで移し、次いでアクターゼ (商標) を遠心分離により除去し、次いでオルガノイドの3個のウェルを、ポリ-Lオルニチン (PLO、15 μ g/cm²) /フィブロネクチン (FN、1 μ g/cm²) 又はビトロネクチン (VN、0.5 μ g/cm²) でコーティングされた1個の60mm培養ディッシュの中央で平板培養した。

【0057】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2

0日目	播種基礎培地 (下記にレシピ) + SB431542 (Tocris, #1614 10 μ M) + ノギン (Peprotech, #120-10, 100 ng/ml) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M) + ドキシサイクリン (Sigma, #D9891, 1 μ g/ml) + Y27632 (Sigma, #Y0503, 20 μ M)
1日目	神経誘導基礎培地 (下記にレシピ) + SB431542 (Tocris, #1614 10 μ M) + ノギン (Peprotech, #120-10, 100 ng/ml) + パルモルファミン (Purmorphamine) (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + ソニック・ヘッジホッグ (SonicHedgeHog) (Peprotech, #100-45, 100 ng/ml) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)
2～4日目	神経誘導基礎培地 (下記にレシピ) + SB431542 (Tocris, #1614 10 μ M) + ノギン (Peprotech, #120-10, 100 ng/ml) + パルモルファミン (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + ソニック・ヘッジホッグ (Peprotech, #100-45, 100 ng/ml) + CHIR99021 (Stemgent, #04-0004, 0.8 μ M) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)
5～6日目	神経誘導基礎培地 (下記にレシピ) + ノギン (Peprotech, #120-10, 100 ng/ml) + パルモルファミン (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + ソニック・ヘッジホッグ (Peprotech, #100-45, 100 ng/ml) + CHIR99021 (Stemgent, #04-0004, 0.8 μ M) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)
7～10日目	神経誘導基礎培地 (下記にレシピ) + ノギン (Peprotech, #120-10, 100 ng/ml) + パルモルファミン (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + ソニック・ヘッジホッグ (Peprotech, #100-45, 100 ng/ml) + Fgf8b (Peprotech, #AF-100-25, 100 ng/ml) + CHIR99021 (Stemgent, #04-0004, 0.8 μ M) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)
11～14日目	中脳パターン化基礎培地 (下記にレシピ) + ノギン (Peprotech, #120-10, 100 ng/ml) + パルモルファミン (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + ソニック・ヘッジホッグ (Peprotech, #100-45, 100 ng/ml) + Fgf8b (Peprotech, #AF-100-25, 100 ng/ml) + CHIR99021 (Stemgent, #04-0004, 1.5 μ M) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

15～16日目	中脳パターン化基礎培地（下記にレシピ）+ パルモルファミン (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + Fgf8b (Peprotech, #AF-100-25, 50 ng/ml) + CHIR99021 (Stemgent, #04-0004, 1.5 μ M) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)
17日目	中脳パターン化基礎培地（下記にレシピ）+ パルモルファミン (Calbiochem, #540223, 2 μ M) + Fgf8b (Peprotech, #AF-100-25, 50 ng/ml) + CHIR99021 (Stemgent, #04-0004, 1.5 μ M) + bFGF (R&D systems, #233-FB, 20 ng/ml) + アスコルビン酸 (Sigma, #A4544, 200 μ M)
18日目	チョッピング及び平板培養

【 0 0 5 8】

【表 3】

表3

播種基礎培地	神経誘導基礎培地	中脳パターン化基礎培地
Neurobasal/N2 2X (1:1) (Neurobasal, Gibco, #21103049) (N2 2X レシピは以下の通り(1L) D.W. 1L DMEM-F12 12g 重炭酸ナトリウム 1.69g D-グルコース 1.55g L-グルタミン 0.073g アポ-トランスフェリン 200mg ブトレシン 200 μ l セレン酸塩 120 μ l プロゲステロン 400 μ l) HEM-NEAA (Sigma, #M7145, 1:100) α -メルカプトエタノール (Sigma, #M6250, 0.1%) B27 w/o VitA (Gibco, #12587010, 1:50) GlutaMAX (Gibco, #35050061, 1:100) インスリン (Gibco, #12585014, 0.31 μ l/ml)	Neurobasal/H2 2X(1:1) (Neurobasal, Gibco, #21103049) (N2 2X レシピは以下の通り(1L) D.W. 1L DMEM-F12 12g 重炭酸ナトリウム 1.69g D-グルコース 1.55g L-グルタミン 0.073g アポ-トランスフェリン 200mg ブトレシン 200 μ l セレン酸塩 120 μ l プロゲステロン 400 μ l) B27 w/o VitA (Gibco, #12587010, 1:50) インスリン (Gibco, #12585014, 0.31 μ l/ml)	ヒト N2 (ヒト N2 レシピは以下の通り (1L) D.W. 1L DMEM-F12 12g 重炭酸ナトリウム 1.69g D-グルコース 1.55g L-グルタミン 0.073g アポ-トランスフェリン 200mg インスリン 312 μ l ブトレシン 100 μ l セレン酸塩 60 μ l プロゲステロン 200 μ l)

【 0 0 5 9】

中脳 3 D オルガノイド由来中脳型神経幹細胞の大量増殖

オルガノイド由来中脳型神経幹細胞を 30 G 針で物理的に切断した。二次培養のために

最初に平板培養した後、細胞が約80～90%充満した場合、 3×10^6 細胞を、アキュターゼ（商標）を使用して、PLO/FN又はPLO/VNでコーティングされた60mm培養ディッシュに二次培養のために1週間に1回培養した。中脳型神経幹細胞の培養培地では、マイトジェン（bFGF 20ng/ml、FGF-8 50ng/ml）、BDNF（20ng/ml）、GDNF（20ng/ml）、アスコルビン酸200μM、ドキシサイクリン1μg/mlを表4の中脳パターン化基礎培地に添加した培地を、増殖培地として使用した。しかし、二次培養の日にはY27632 20μMを、この培地に添加した。二次培養毎に、ウェル1個当たり 8×10^4 細胞をPLO/VN24ウェルコーティングプレートで平板培養し、2～3日間増殖させた。80～90%の細胞集密度が達成された場合、NSCの分化を、中脳型マーカーの蛍光染色によって又はマイトジェン（bFGF、FGF-8）の除去によって誘導した。分化培地では、BDNF（20ng/ml）、GDNF（20ng/ml）、アスコルビン酸200μM及びcAMP 500μMを上記の表4に示された中脳パターン化基礎培地に添加して、ニューロンの分化を12日間誘導し、次いでドーパミン作動性ニューロン及び中脳型マーカーが同時発現されているか検査した。

【0060】

3Dオルガノイド由来中脳型神経幹細胞の凍結貯蔵

オルガノイド由来中脳型神経幹細胞は一般に、少なくとも5継代まで特性を変化させないので、細胞を、最初の継代後の全継代で細胞の凍結貯蔵後に特性を変えることなく解凍及び使用することができる。細胞の凍結貯蔵は二次培養の際に行われ、細胞を、アキュターゼ（商標）を使用して剥離させ、細胞の数を計数し、 6×10^6 細胞を溶解し、増殖培地及びDMSOと10%の濃度で混合した凍結培地で1個の凍結バイアル中に凍結した。細胞を-70℃で最初の24時間にわたって凍結貯蔵し、次いで翌日には、使用するまで極低温窒素タンクに貯蔵した。必要であれば、1個のバイアルを37℃水浴で急速解凍し、細胞を、PLO/FN又はPLO/VNでコーティングされた60mm培養ディッシュで平板培養した。解凍するには、神経幹細胞増殖培地を使用し、解凍日には、Y27632 20μMを培地に添加した。

【0061】

免疫細胞化学

細胞を4%パラホルムアルデヒドでPBS（リン酸緩衝生理食塩水）中に固定し、遮断溶液（PBS中1%BSA/0.03%トリトン（Triton）X-100）で培養し、次いで以下の一次抗体と一緒に培養した。Tuj1抗ウサギ（1:2000、Babc o）、TH抗マウス（1:1000、Immunostar）、GFAP抗マウス（1:100、ICN Biochemicals）、微小管関連タンパク質2（MAP2、1:200、Sigma）以下の蛍光分子で標識された二次抗体標識を可視化に使用した。他の抗体を表4に列挙する。アレクサ（Alexa）488（1:200、Invitrogen）及びCy3（1:200、Jackson ImmunoResearch Laboratories）。染色試料を、DAPI封入剤を備えたベクターシールド（Vectashield）（Vector Laboratories）に搭載し、落射蛍光顕微鏡（epifluorescence microscope）（Leica）を使用して撮影した。

【0062】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表4

抗体	希釈処理	会社名	注
マウスモノクローナル抗体(Ab)			
Oct4	1:200	¹ Santa Cruz Biotechnology	Cy3 二次抗体のみを 使用
Pax6	1:100	² DSHB	
Cdh2 (N-カドヘリン)	1:500	Santa Cruz Biotechnology	
ニューロン特異的クラスIII ベータチューブリン (TuJ1)	1:500	³ Covance	
チロシンヒドロキシラーゼ (TH)	1:1000	⁴ Immunostar	4℃で2日間のインキ ュベーション
Ki67	1:100	⁵ Novocastra	
Pax5	1:50	⁶ BD Biosciences	
ヒト神経細胞接着分子 (hNCAM)	1:100	Santa Cruz Biotechnology	
HuC/D	1:100	⁷ Chemicon	
微小管関連タンパク質2 (MAP2)	1:200	⁸ Sigma	
ドーパミントランスポーター (DAT)	1:100	BD Biosciences	0.1%サポニンで遮断
ヒト核抗原 (HN)	1:1000	Chemicon	
ウサギポリクローナルAb			
ナノグ(Nanog)	1:200	Santa Cruz Biotechnology	
ネスチン#130	1:50	⁹ Dr Martha Marvin, Dr Ron McKay	
Sox2	1:100	Chemicon	
TuJ1	1:2000	Covance	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

Pax2	1:100	Covance	
TH	1:500	¹⁰ Pel-freez	
GFAP	1:400	¹¹ DAKO	
セロトニン	1:4000	Sigma	
γ-アミノ酪酸(GABA)	1:700	Sigma	
GAD67	1:500	Chemicon	
小胞モノアミントランスポーター2 (VMAT2)	1:500	Pel-freez	cy3二次抗体のみを使用
Nurr1	1:500	Chemicon	遮断する前に5分間の0.1% SDS処理
EN1	1:200	Chemicon	4℃で2日間のインキュベーション
カルビンディン1, 28 kDa (カルビンディンD28K)	1:250	Chemicon	
内向き整流性カリウムチャンネルサブファミリーJメンバー6 (GIRK2)	1:200	Sigma	
切断型カスパーゼ-3	1:500	¹² Cell signaling	

【0063】

パーキンソン病モデル動物における細胞移植及び組織学的手順

実験を、NIH（アメリカ国立衛生研究所）指針に従って実施した。3 μLの6-OHDA（6-ヒドロキシドーパミン、8 μg/μL、Sigma）単独を、右側黒質（AP-4.8 mm、ML-1.8 mm、V-8.2 mm）及びMFB（内側前脳束）（AP-4.4 mm、ML-1.2 mm、V-7.8 mm）に定位固定注射することによって、ヘミパーキンソニアンを成熟雌スプラグ・ドーリー（Sprague-Dawley）ラット（220～250 g）に誘導した。切歯バーを-3.5 mmに設定し、AP及びML座標を十字縫合前頂に対して提示した。この障害のために同じ側に300回転/時間を有するラットを、アンフェタミン誘導回転試験に選択した。移植には、ラットE12 VM-NPCを増殖させ、Ctx-VMアストロサイト、N+F-VMアストロサイト又はE14 Ctx-NPC（対照群）と2：1の比で混合した。3 μLの混合細胞（ 1.5×10^5 細胞/μL）を線条体の2つの部位（十字縫合及び硬膜に対して AP、ML及びVの座標：[1] 0.07、-0.30、-0.55；[2] -0.10、-0.40、-0.50；切歯バーをゼロの下方3.5 mmに設定した）のそれぞれに、100 μL/100 g（23.32 mg/mL）のロンプン（Rompun）と混合した100 μL/100 g（50 mg/mL）のゾレチル（Zoletil）により誘導された麻醉下で10分間かけて注射した。針（22ゲージ）を、それぞれの注射が完了した後、5分間放置した。ラットには、シクロスポリンA（10 mg/kg、i.p.）を移植の1日前から1か月間にわたって毎日投与し、移植後の残りの期間では免疫抑制剤薬を用いることなくラットを維持した。移植の6か月後、動物に麻醉をかけ、4%パラホルムアルデヒドを経皮的に灌流させた。脳を取り出し、PBS中30%スクロースに一晩浸け、ティッシュテック（Tissue-Tek）（登録商標）（Sakura Finetek、To

rance、CA、USA)に凍結し、次いで凍結ミクロトーム(Leica)で切片にした。浮遊脳切片(厚さ30μm)を上記に記載された免疫組織化学に付し、共焦点顕微鏡(Leica)で画像化した。移植脳の宿主環境を試験する実験では、動物を移植の1か月後に殺処分し、ラット脳片マトリックス(ZIVIC Instruments、Pittsburgh、PA)により1mmの厚さの切片にした。移植後の変化を観察するため、移植部位の組織を抽出した。移植片宿主界面(約2×2mm)／移植片の8～12領域を切り出し、qPCR分析を実施した。加えて、神経栄養性及び炎症促進性グリアマーカーに対する細胞免疫反応を、移植の7～10日後の凍結切断脳片の移植片宿主界面と共に計数した。

【0064】

行動試験

動物の行動を、アポモルフィン／アンフェタミン誘導回転試験をY. H. Rhee et alによる記事に記載されたように使用して評価した。(LIN28Aは、パーキンソン病モデルにおいて培養神経幹細胞の治療潜在力を増強する。Brain: a journal of neurology 139、2722-2739(2016))。アポモルフィン(Sigma)を0.5mg/kgの容量で皮下注射し、60分間回転させながら観察した。結果を回転最終数／60分の単位で表す。

【0065】

動物のPET／MRI画像化及び分析

PET／MRI融合画像化を、ナノスキャン(nanoScan)PET／MRIシステム(1T、Mediso、Hungary)を使用して実施した。マウスを暖かく保つために、0.2mLのFP-CITを尾静脈に6.5±1.0MBqで静脈内投与し、ラットを麻酔下(100%O₂ガス中1.5%イソフルラン)に維持した。MR脳画像化は、グラディエントエコー(GRE)3Dシーケンス(TR=25ms、T_{eff}=3.4、FOV=50mm、マトリックス=256×256)で重み付けしたT1画像を得て、高速スピネコー(FSE)3Dシーケンス(TR=2400ms、T_{eff}=110、FOV=50mm、マトリックス=256×256)で重み付けしたT2画像を、FP-CIT取込み時間の最中に取得した。20分の静止PET画像を、MRI範囲内の単一視野における1-3座標で取得した。体温を動物床(Multicell Mediso、Hungary)への熱風で維持し、感圧パッドを使用して、呼吸を誘導した。PET画像を、すべての修正及び高い正規化を伴い、8回の反復を有する検出器フルモードでテラトモ(Tera-Tomo)3Dにより再構築した。再構築画像の三次元VOI(関心体積)分析を、インタービューフュージョン(Interview Fusion)ソフトウェアパッケージ(Mediso、Hungary)を使用し、標準取込み値(SUV)分析を適用して実施した。VOIを冠状画像の2mm球体に固定し、線条体のVOIを誘導した。各VOI部位のSUV、以下の方程式を使用して計算した。SUV平均=(Bq/cc×体重の関心体積の腫瘍における腫瘍放射能)／注射された放射能

【0066】

ハイスループット全トランスクリプトームRNAシーケンシング

RNAでは、全RNAをトリゾール(Trizol)試薬(Invitrogen)を使用して単離し、次いでrRNAの除去を、リボゼロマグネチック(Ribo-Zero Magnetic)キット(Epicentre Inc.、Madison、WI、USA)を使用して実施した。ライブラリー構築を、SENSE mRNA-Seq Library Prep Kit(Lexogen Inc.、Vienna、Austria)を使用して実施した。ハイスループットシーケンシングを、HiSeq 2000(Illumina、San Diego、CA、USA)を使用して、ペアードエンド100シーケンシングとして実施した。RNA-Seqリード値を、トップハット(Tophat)ソフトウェアを使用してマッピングして、バムアラインメントファイル(bam alignment file)を得た。転写領域にマッピングされたリード計数を、BEDツールズ(BEDTools)(v2.25.0)及びR／バイオコンダクター(Bi

10

20

30

40

50

o conductor) (バージョン3.2.2; R Development Core Team, 2011) を使用して、アラインメントファイルから抽出した。アラインメントファイルを使用して、トランスクリプトームを組み立て、存在量を推定し、遺伝子、lincRNA又はアイソフォームの差次的発現を検出した。FPKM (100万個の断片当たりのエクソン1kb毎の断片) を使用して、遺伝子領域の発現レベルを決定した。網羅的正規化を、試料間の比較に使用した。遺伝子分類は、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) により提起された研究に基づいている。

【0067】

GO及びKEGG経路分析を、DAVIDバイオインフォマティクスリソース (Bioinformatics Resources) バージョン6.8を使用して実施した。リッチカテゴリ (rich category) のGO及びKEGG経路分析は、0.05までのp値を提示した。

【0068】

10×Genomics単一細胞RNAシーケンシング (scRNA-seq) 及びデータ分析

単一細胞転写因子調節分析 (scRNA-seq) は、クロミウム単一細胞遺伝子発現溶液 (Chromium Single cell Gene Expression Solution) 及びクロミウム単一細胞3' GEM、ライブラリー及びゲルビーズキット (Gel Bead Kit) v2 (10×Genomics) による実験の後、クロミウムコントローラー (Chromium Controller) (10×Genomics, San Francisco, CA) プログラムを使用して実施した。15,000個の単一細胞に分離された細胞を、マスター (Master) ミックス溶液を有する単一細胞Aチップ (Single cell A chip) に設置した。各単一細胞において、細胞内の転写因子は、オリゴdTコードUMIのエマルジョンにより逆転写及びRNAバーコード化された。バーコード化ライブラリーを、イルミナ (Illumina) HiSeq 4000プラットフォーム (Macrogen Inc., Seoul, Korea) でシーケンシングした。結果を、セルレンジャー (Cell Ranger) (v2.1.1, 10×Genomics) で分析した。2D-NSC分析では、細胞1個当たり57,343個のリード及び2,284個の遺伝子 (合計で24,055個の遺伝子のうち) の2D_セルレンジャー平均を有する12,166個の細胞を分析し、Og-NSC分析では (3D_セルレンジャー)、細胞1個当たり39,191個のリード及び2,353個の遺伝子 (合計で23,860個の遺伝子のうち) の平均を有する13,739個の細胞を分析した。細胞転写因子発現は、UMI計数で表した。細胞多様性分析を、t-SNE (t分布型確率的近傍埋め込み法) 分析 (ループセルブラウザー (Loupe Cell Browser) バージョン3.0.1, 10×Genomics, Inc. より実施した) のためにk平均法クラスタリングにより実施した。発現に有意な差を示す発現の増加を有する上位40個の遺伝子を、階層クラスタリング分析方法で分析し、各クラスターを、これに基づいて分けた。Og-NSCのGO及びKEGG経路分析では、580個の差示的上方調節遺伝子 (UMI>1、log2FC>0.5、P<0.05) を分析した。遺伝子分析は、主にDAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を使用して実施した。回路網分析を、サイトスケープ (Cytoscape) (バージョン3.7.1+JAVA v8、NIGMS提供) を使用して実施した。

【0069】

ミトコンドリア機能の分析

ミトコンドリアの再生動態を、若年 (緑色) 及び老年 (赤色) ミトタイマータンパク質の統合部分を使用して分析した (Ferree, A. W., Trudeau, K., Zik, E., Benador, I. Y., Twig, G., Gottlieb, R. A., 及びShirihai, O. S. (2013). MitoTimer probe rev

10

20

30

40

50

eals the impact of autophagy, fusion, and motility on subcellular distribution of young and old mitochondrial protein and on relative mitochondrial protein age. Autophagy 9, 1887–1896; Hernandez, G., Thornton, C., Stotland, A., Lui, D., Sin, J., Ramil, J., Magee, N., Andres, A., Quarato, G., Carreira, R. S., et al. (2013). MitoTimer: a novel tool for monitoring mitochondrial turnover. Autophagy 9, 1852–1861)。pミトタイマーベクター（アドジーン（Addgene）52659、Addgene, Watertown, MA）を、電気穿孔（NEPA21、Nepagene, Japan）によりNSC細胞に注入し、発現させ、次いで2日後に、赤色対緑色蛍光により生成されたミトコンドリアを調査した。ミトコンドリアROS及び膜電位をミトソックス（Thermo Scientific Inc., Waltham, MA）及びヌクレオカウンター（NucleoCounter）3000（NC3000、Chemometec, Allerød, Denmark）でそれぞれ測定した。ROS生成を、分析の前にH₂O₂（500 μM）で2時間処理した後に誘導のために分析した。ミトコンドリアの毒性耐性を研究するため、ミトコンドリアを、10 μMのロテノン、4 μMのCCCP又は250 μMのH₂O₂で1時間処理し、TH蛍光染色で分析した。

【0070】

DA放出の分析

DAニューロンのシナプス前活性を、分化VM-NPC培養物から放出されたDA神経伝達物質のレベルを測定することによって決定した。24時間培養した（12～13日目の分化）培地を採取し、DAレベルをELISAキット（BAE-5300、LDN）を使用して測定した。加えて、膜脱分極により誘導されたDA放出を、新たなN2培養培地において、56 mMのKClの存在下又は非存在下で30分間培養すること（12日目の培養物）によって評価した。誘導されたDA放出を、KClを伴うDAレベルからKClを伴わないDA放出を差し引くことによって計算した。

【0071】

細胞間α-シヌクレイン伝達の分析

アストロサイトから分泌された因子による細胞間α-シヌクレイン凝集移動の確認

分析実験を、神経芽細胞腫から誘導されたSH-SY5Y（Professor Sang Myun Park, Ajou University）細胞中にA53Tα-シヌクレインEGFPを過剰発現する細胞との同時培養を使用して実施した。

【0072】

RAを5日間使用して分化させるように誘導し、A53Tα-シヌクレインEGFPを発現するように誘導したSH-SY5Y細胞を、デュアルチャンバシステムにおいて10日間にわたって分化するように誘導した神経幹細胞と24時間同時培養し、A53Tα-シヌクレインEGFPの移動を、EGFP発現のレベルと比較した。α-シヌクレインの移動（伝達）を、抗体を使用するα-シヌクレインGFPの輝度を介して免疫染色（免疫細胞化学）により確認した。

【0073】

病的α-シヌクレイン凝集の検出

分化の際、培地（8 μg/mlの培地）をα-シヌクレイン凝集物であるPFF（予備形成原線維）で処理して、α-シヌクレイン凝集を誘導し、α-シヌクレイン凝集のレベルを、分化の20日後に分析した。或いは、過剰発現を、レンチウイルス発現α-シヌクレイン（pEF1α-α-シヌクレイン）を使用して誘導し、分析した。チオフラビンS（タンパク質凝集を測定する染色方法、Sigma Aldrich）を使用する免疫染色（免疫細胞化学）、並びにα-シヌクレイン抗体及びタンパク質電気泳動（ウェスタン

プロット)を使用して、存在を確認し、凝集を、タンパク質サイズの変化を介して観察した。

【0074】

B i - F C (二分子蛍光補完)

O g - N S C又は2 D - N S Cを誘導して、ビーナス (V e n u s) 1 - α -シヌクレイン (V 1 S、 α -シヌクレインのN末端)、 α -シヌクレインビーナス2 (S V 2、 α -シヌクレインのC末端)を発現するレンチウイルスを発現し、25日間分化されたドーパミン作動性ニューロン中の凝集 α -シヌクレインをG F Pで分析した。

【0075】

移植された移植片への i n v i v o α -シヌクレイン伝播

雌S D (スプラグドリー) ラット (225~250 g) では、A A V発現ヒト h α -シヌクレイン (A A V 2 - C M V - h α -シヌクレイン、 2×10^{13} ゲノムコピー) 及びP F F (10 μ g) を線状体に注射して、発現及び凝集を誘導した。前後方向 (A P)、-0; 中外側 (M L)、-3.0; 背腹側 (D V)、-5.0。2週間後、O g - N S C及び2 D - N S Cを線条体の両側にそれぞれ移植した。移植の1か月後、移植細胞への α -シヌクレインの移動を、免疫組織化学 (α -シヌクレイン及びp 1 2 9 - α -シヌクレイン) により分析した。

【0076】

移植片における G C a M P 6 発現ニューロンの二光子画像化

G C a M P 6 (アドジーン# 40753) を、シナプシンプロモーターの制御下で生成し (p S y n - G C a M P 6)、i n v i t r oでの培養を伝達するために使用した。2ml/6cmディッシュ又は200 μ l/ウェル (24ウェルプレート) 及び 10^6 伝達単位 (T U/ml、60~70 ng/ml) を、それぞれ伝達反応に使用した。A A V 2 - C M V - h α -シヌクレインの詰め込み及び産生を、韓国科学技術研究院 (K o r e a I n s t i t u t e o f S c i e n c e a n d T e c h n o l o g y) (S e o u l) で実施した。

【0077】

3継代のO g - N S Cを、移植の3日前にレンチウイルス (p S y n - G C a M P 6) で伝達した。その後、細胞を4匹の野生型S Dラットに移植し、ラットを移植の1か月後に分析した。二光子画像化を、680~1018 nmの可変波長、80 MHzの反復率及び140 fsのパルス幅を有するT i : サファイア・フェムト秒レーザー (カメレオンビジョン (C h a m e l e o n V i s i o n)、C o h e r e n t I n c.、U S A) を備えた市販の顕微鏡システム (S P - 5、L e i c a、G e r m a n y) を使用して実施した。

【0078】

i n v i v o脳画像化では、1.0 mmの直径及び9.20 mmの長さを有する単体グリーン (G R I N) レンズ (N E M - 100 - 25 - 10 - 860 - S - 1.0 p - S T、G R I N T E C H G m b H) を使用した。ガス麻酔下で、ラットを、外科的に露出させた脳を上向きにしてラットヘッドホルダーに搭載した。グリーンレンズをアルミニウムプレートに、プレートの孔を介して固定し、プレートを平行移動し、脳を上方から挿入した。10 $\times$ の乾燥対物レンズ (ライカ (L e i c a) H C P Lフルオタル (F L U O T A R) 10.0 $\times$ 0.30) を、グリーンレンズの一端に近づけて、顕微鏡システムの励起、レーザーと結合させた。励起、波長を、G C a M P 6の二光子励起のために900 nmに設定した。二光子画像化を、脳に励起レーザーをスキャンすることにより実施した。画像化の視野 (F O V) 及び画像化の速度は、それぞれ512 $\times$ 512画素で387.50 μ m $\times$ 387.50 μ m及び9.03フレーム/秒であった。脳の発光をグリーンレンズで集め、対物レンズで顕微鏡システムに結合させた。顕微鏡システムは、4つの検出チャンネル (C h 1 : 430~480 nm、C h 2 : 500~550 nm、C h 3 : 565~605 nm 及びC h 4 : 625~675 nm) を有し、G C a M P 6蛍光を第2のチャンネル (C h 2) で集めた。励起レーザー出力は58.08 mwであった。

10

20

30

40

50

【0079】

カルシウム画像化分析

培地をFluo3-AMで1時間処理し、それによってFluo3-AMを細胞に吸収させ、PBSで3回洗浄し、それによって培地に蛍光が残らなかった。共焦点顕微鏡で蛍光を観察しながら、蛍光の強度を1～3秒間隔で取り、ROIを、それぞれの時間枠写真で各細胞において測定し、蛍光の強度が変化したことを確認した。必要であれば、FACSによりゲート開閉した。

【0080】

実験結果

ヒト胚幹細胞からの中脳型オルガノイドの調製

二次元2D培養に基づいた従来の分化技術は、*in vivo*における実際の脳の三次元の複雑な回路網を表さない。三次元生成に基づいたプロトコルの開発のみが、実際の脳の組織特性を表すことができる。したがって、まずは、本研究チームは、存在する3D中脳型オルガノイドを最初に調製した。中脳型オルガノイドを成功裏に調製する開発の初期段階では、ZO-1及びN-カドヘリンを、幹細胞マーカーであるPLZF+及びSox2+と共に発現させた（図7E及び7F）。前側胚脳マーカー（OTX2）及び腹側VM低板マーカー（FOXA2及びLMX1A）を、一般的な神経幹細胞マーカーであるネスチン及びSox2と共に発現させた（図7G～7I）。発生が更に誘導される場合、ニューロンマーカーMAP2を、増殖マーカーKi67+及びSOX2+の他の層として発現させ、より具体的には生体の脳層のように、それぞれ、PCNA+（増殖性脳室帯VZ）、MASH1+（VZ、中間体IZ）及び外套帯（MZ））及びNURR1+細胞（IZ及びMZ）に特異的に発現する構造が確認された（図7L及び7M）。特徴的なことには、IZ及びMZにおいて、代表的な中脳特異的因子であるFOXA2+、LMX1A+及びNURR1+細胞を、ドーパミン作動性ニューロンマーカーTH（チロシンヒドロキシラーゼ）と共に発現させ、これらが真の中脳型ドーパミン作動性ニューロンであることを確認した（図7N、7O及び7P）。

【0081】

中脳型オルガノイドからの中脳型神経幹細胞（Og-NSC）の単離

パーキンソン病の細胞治療剤として使用される場合、オルガノイド由来中脳型神経幹細胞（Og-NSC）をより進化した形態の神経幹細胞として単離及び培養する技術を開発した。以前の研究として、神経幹細胞を発生10～35日目にオルガノイドから抽出する試みがなされたが、効率は高くなかった。オルガノイド中の神経幹細胞の率を増加させることにより適切な量の細胞を確保することが可能であると考えられ、細胞の量を増加させる努力によってプロトコルを改変した。

【0082】

（1）幹細胞集団の量は、分化が連続的に誘導される場合、自動的に低減されるので、10日から実施される最終発生分化プロトコルを停止し、増殖の方向を改善した。（2）17日目から、bFGFを添加することにより改変し、このことは神経幹細胞を特異的に増加させることができる。（3）中脳特異的神経幹細胞の増殖を、中脳特異的因子（SHH／プルモルファミン／CHIR999021）の処理期間を（1日目から18日目まで）延長すること、すなわち、中脳パターン化の過程を延長することによって誘導した。（4）従来の方法と異なり、bFGF8b処理期間は7日目から開始した（図8のA）。

【0083】

そのような詳細な時間区分を制御することによって、中脳の誘導の際に混入をもたらしやすい、視床下部（視床下（*subthalamic*））への発生を低減することができ、特異的マーカーの1つであるEN1の発現を有意に増加させることができる（図8）。これらの様々な改変を適用することによって、増殖及び培養を18日目の2D環境に実施して、中脳型オルガノイドの生成を誘導した。ヒトビトロネクチンコーティングプレートを、bFGF補充hN2培地で培養した。単離した後、細胞は、84～97%のオルガノイド由来神経幹細胞（Og-NSC）を含有した。神経幹細胞マーカーSOX2及びネス

10

20

30

40

50

チンが発現し、ドーパミン作動性ニューロン特性の初期確保にとって非常に重要である O T X 2 中脳型マーカーとして F O X A 2 及び L M X 1 A が発現したことが確認された (図 1 B 及び 1 C)。神経幹細胞の周囲の P A X 2 及び P A X 5 因子の発現を確認することによって、これらは真の中脳型細胞へと発生したことが確認された (図 1 B)。中脳型特異的マーカー、例えば、F O X A 2 + 及び L M X 1 A + (図 1 2) の発現を介して、オルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (O g - N S C) は、二次培養に際に特性を忠実に維持しながら増殖できることが観察された (図 1 D)。本発明者たちは、2 D h E S C 培養で V M 型 N S C を調製しようと試みた。V M 様アストロサイトにより条件付けた培地 (アストロサイト条件付培地、A C M) の処理は、細胞継代の際の細胞生存及び中脳マーカー発現にとって重要である (図 9 A)。A C M 処理及び改変により、上記に記載された N S C 集団を濃縮することによって、本発明者たちは、従来の 2 D 培養における h E S C の分化を拡大することができる、F O X A 2 + / L M X 1 A + V M - N S C を調製することもできた (図 9)。

【0084】

オルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (O g - N S C) は、最終分化過程を介して中脳型マーカーを完全に発現する完全なドーパミン作動性ニューロンに分化させることができる

最終分化過程を介して、中脳型 O g - N S C は、完全なドーパミン作動性ニューロンに効率的に分化させることができる (図 1 E 及び 1 F)。O g - N S C 由来ドーパミン作動性ニューロンは、ドーパミンニューロンマーカーである T H とともに、F O X A 2 (95%)、L M X 1 A (96%)、N U R R 1 (91%) 及び E N 1 (86%) 中脳型マーカーを同時に発現した。一方、従来の 2 D 培養環境では、約 44~61% の低い中脳型因子発現が示された (図 9 E、9 F 及び 10)。更に、このオルガノイド由来中脳型神経幹細胞単離プロトコルが、様々なヒト胚幹細胞及び人工多能性幹細胞に適用可能である (図 1 G 及び 11)。8 個のヒト多能性幹細胞 (3 個の h E S C 及び 5 個の h i P S C) により実施した 117 回の実験のうち 111 回の成功率は、著しく高い成功率であった。一方、2 D 方法は、適用することがはるかに難しく、そのため 63 回のうち 28 回の成功率が記録された (図 1 H)。

【0085】

最高の中脳特異的因子発現を示す H 9 h E S C 株を、本研究を通して主に使用した。これは、オルガノイドから開発したプロトコルが非常に安定しており、少量のみが、一般的な手順、例えば、細胞の単離、増殖及び分化の際に細胞死の過程を経ていると思われるからである。これは、手順の際に有意な率の細胞死を示した 2 D 方法と対比的である。実際の培養において、エチジウムヘテロ二量体染色死細胞 (図 1 I) 及び切断型カスパーゼ 3 + 死細胞 (図 1 J) の分析、並びに細胞単離後の F A C S 分析を介した アネキシン + / P I + 死細胞の分析は、相対的に少ない数の安定した結果を示した (図 1 K)。β - ガラクトシダーゼ + 細胞による表された老化細胞 (前アポトーシス段階) も、O g - N S C 培養物において有意に少なく示された (図 1 L)。全体として、新たに確保されたプロコルは、現存のプロトコルと比較して、より安定して中脳型ニューロンを確保することができる。

【0086】

O g - N S C 培養細胞を新たな薬物開発のプラットフォーム細胞として使用することができる

O g - N S C を中脳型にパターン化し、分化の後に完全なドーパミン作動性ニューロンに分化させることができ、5 継代を超えて特性を維持することができる (図 1 D、12 A 及び 12 B)。算術的には、O g - N S C の 7, 260 個のバイアル (9, 075 個の培養ディッシュ) を 1 個の培養ディッシュから確保することができる (図 12 A)。加えて、細胞を、その機能を損失することなく窒素タンクに貯蔵することができる (図 12 C)。結果として、細胞は、大手の製薬会社 (Chong Kun Dang Pharm.、Seoul、KOREA) により、パーキンソン病の新たな薬物候補のための開発に実際に使用されている (図 13)。製薬会社 (Chong Kun Dang Pharm.、

10

20

30

40

50

Seoul, KOREA) と共同して、Og-NSC 培養系の拡大性及び貯蔵性を、候補化学物質のバルクスクリーニングにかけて、hESC (H9) 及び PD-hiPSC (PD-iPS1) 細胞株からの mDA ニューロンを使用する PD 薬物を開発した (図 13)。
【0087】

未分化状態の Og-NSC は、適切な中脳型神経幹細胞マーカーを完璧に発現する (図 1B、1C、14A、14E 及び 14F)。分化する前、細胞は分化ニューロン/DA ニューロンマーカー (MAP2、TH) をなにも発現しない (図 14 の B 及び C)。最終分化を誘導した後、増殖マーカー Ki67+ の発現が低減され、形態変化、例えば神経突起発光がニューロンの特性として生じる (図 14 の A~C)。実際の中脳型神経幹細胞の発生段階では、特異的マーカーの NURR1 が、前駆細胞段階で発現し始め、分化後まで (分化の 2 日目から最終分化の段階まで) 発現し続ける (図 14 の D)。実際には、中脳の発育における生物リズムに従って、FOXA2 及び LMX1A は発現し続け、分化した後、LMX1A+ の発現は、わずかに減少する傾向を示した (図 14 の E 及び F)。中脳型細胞の重要なマーカーである NURR1、FOXA2 及び LMX1A は、最終分化ドーパミン作動性ニューロンに重複して十分に発現した (図 1E~1G)、これらの知見は、in vitro NSC 分化が VM における生理学的な mDA ニューロン発生を繰り返し、現存しないヒト mDA ニューロン開発を研究する in vitro モデルとして有用であり得ることを総合的に示している。

【0088】

バルク及び単一細胞 RNA シーケンシングを使用する Og-NSC の転写調節特性の分析

Og-NSC の分子生物学的転写調節を分析するため、RNA シーケンシング (RNA-seq) 分析を実施した。従来の分化方法により生成されたオルガノイド由来中脳型神経幹細胞 (Og-NSC) 及び神経幹細胞 (2D-NSC) を既存のヒト胎児及び成人脳組織の転写調節因子との差について比較及び分析した (Carithers, L. J.、Ardlie, K.、Barcus, M.、Branton, P. A.、Britton, A.、Buia, S. A.、Compton, C. C.、DeLuca, D. S.、Peter-Demchok, J.、Gelfand, E. T., et al. (2015). A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. Biopreserv Biobank 13, 311-319.; Jo, J.、Xiao, Y.、Sun, A. X.、Cukuroglu, E.、Tran, H. D.、Goke, J.、Tan, Z. Y.、Saw, T. Y.、Tan, C. P.、Lokman, H., et al. (2016). Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. Cell Stem Cell 19, 248-257.)。以前の報告 (Jo, J.、Xiao, Y.、Sun, A. X.、Cukuroglu, E.、Tran, H. D.、Goke, J.、Tan, Z. Y.、Saw, T. Y.、Tan, C. P.、Lokman, H., et al. (2016). Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. Cell Stem Cell 19, 248-257.) によると、PCA (主成分分析) 及びスピアマンの相関分析は、中脳型オルガノイドがヒト胎児脳に顕著に類似していることを示した (図 2A 及び 2B)。Og-NSC は、中脳型オルガノイドに類似しており、これらの特徴 (スピアマンの相関係数: 0.79~0.97) を維持している。加えて、Og-NSC は、実際の胎児中脳 (0.70~0.85) と類似しており、そのため実際の神経幹細胞から抽出された Og-NSC が単離及び二次培養の過程にあっても特徴を維持することが見られる。

【0089】

神経幹細胞コロニーにおける各個別の細胞の特性を確認するため、単一細胞RNA-seqを実施した(Og-NSC:合計で13,793個の細胞を分析し、2D-NSC:12,166個の細胞を分析した。平均して、細胞1個当たり 3.8×10^5 の正規化後リードがあり、各個別の細胞で2,227個の遺伝子が検出された)。平均して、細胞1個当たり 3.8×10^5 の正規化後リードがあり、各個別の細胞で2,227個の遺伝子が検出された。予想されたように、約99.7%のOg-NSC及び従来の2D-NSC細胞が、神経幹細胞マーカーのNESTIN、VIMENTIN、NCAM1、SOX2、NOTCH1及びMUSASHI1を発現した(図15A)。全能性細胞のマーカーであるPOU5F1、NANOG及びKLF4が、Og-NSC細胞のわずか0.09%、0.45%及び0.91%で発現し、このマーカーを発現する細胞においても、マーカーの発現レベルは些細なものであった(平均固有分子識別子(UMI)は <0.005 であった)(図15B)。大部分が神経幹細胞であったが、従来の2D-NSCは、全能性細胞の相対的にわずかに高い発現を示した(それぞれ0.19%、2.69%及び1.24%、平均UMIの <0.031)。Og-NSC及び2D-NSCの両方に3つのマーカーを同時に発現する細胞がないので、このことは、神経幹細胞のみが単離及び培養され得ることを示している。FACS分析を介して、TRA-1-60及びSSEA-4の発現がほぼないことが確認された(図15C)。以前には、老化細胞(前アポトーシス段階)の数もOg-NSC培養において有意に低減されたこと(図1L)、及びアポトーシス遺伝子を発現する細胞の数も非常に少ないこと(図15D)が分析された。特に、2D-NSC細胞と比較して非常に低い割合のOg-NSC細胞がp16/INK4aを発現し、このことは脳(Molofsky, A. V., Slutsky, S. G., Joseph, N. M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N. E. 及びMorrison, S. J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443, 448-452.; Nishino, J., Kim, I., Chada, K. 及びMorrison, S. J. (2008). Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135, 227-239.) 及び他の組織((Sousa-Victor, P., Gutarra, S., Garcia-Prat, L., Rodriguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jordi, M., Ballestar, E., Gonzalez, S., Serrano, A. L., et al. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506, 316-321.; Wang, J., Lu, X., Sakak, V., Klein, C. A. 及びRudolph, K. L. (2014). Senescence and apoptosis block hematopoietic activation of quiescent hematopoietic stem cells with short telomeres. *Blood* 124, 3237-3240.))における細胞老化(aging)/老化(senescence)及び幹細胞修復能の低減にとって重要な特徴である。

【0090】

t-SNE(t分布型確率的近傍埋め込み法)分析で分析したOg-NSC細胞集団を、3つのクラスターに分類することができる(図2C~2E)。各細胞クラスターの特性を確認するため、発現が増加した遺伝子群のGO(遺伝子オントロジー)分析を実施した(UMI >1 、 $\log_2 FC > 0.5$ 、 $P < 0.05$)(図2F)。クラスター3は、25%(Og-NSC)及び12%(2D-NSC)を占める(図2D)。遺伝子分析の結果、これはニューロンになることが既に運命付けられている細胞集団であり、有意な数の

10

20

30

40

50

分化因子を含有している。クラスター 1 に過剰発現した遺伝子群の場合、ドーパミンニューロンが生成される黒質 (SN) の発生にとって重要な多数の遺伝子群が発現している (ENO3、RSPO2、FGF9、LDHA、NR4A2、INA、LMX1A、OTX2、HSPA5、SYNGR3、RAD1、UCHL1、EN1、NDUFS3 及び SEC16A)。したがって、クラスター 1 は、中脳にパターン化される最も完全な細胞集団であると言える。特に、71% の O g - N S C 細胞及び 13% の現存 2 D - N S C 細胞がクラスター 1 に属する。この遺伝子分析の結果、O g - N S C 培養がはるかに多くの中脳型パターン化を有すること、並びに全能性細胞の混入なしに、及びアポトーシスを伴わずに細胞集団を安定的に確保することが可能であることも示した。

【0091】

GO 及び KEGG 分析を介して、バルク及び単一細胞 RNA-seq データ (O g - N S C 対 2 D - N S C) をより詳細に分析した (図 2 H 及び 2 I)。2 つの方法のシーケンスデータによると、O g - N S C (2 D - N S C と比較して) に相対的に頻繁に発現する遺伝子群は、細胞接着及び ECM の遺伝子群であり、このことは幹細胞の発生及び機能の維持の重要性を強調している。2 つの方法のシーケンスデータによって、両方の方法に高度に発現しているこの遺伝子群の発現を、目的変数なしの階層クラスタリングで研究した (図 2 J)。特別な機能も記載した (表 5)。

【0092】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表5

細胞間接着		
遺伝子 ID	別名	機能
HSP90AB1	熱ショックタンパク HSP 90-ベータ	シグナル伝達、タンパク質フォールディング及び分解に関与する
DBN1	発達的に調節された脳タンパク質	ニューロン成長の過程に役割を果たす細胞質アクチン結合タンパク質
SERBP1	セルピン 1 mRNA 結合タンパク質 1	mRNA の安定性の調節に役割を果たす
CCT8	TCP1 サブユニット 8 を含有するシャペロニン	新たに合成されたタンパク質の輸送及び会合に関与する
RDX	ラディキシン	アクチンを細胞膜に連結するのに重要な細胞骨格タンパク質
KIF5B	キネシンファミリーメンバー 5B	ミトコンドリア及びリソソームの正常な分布に必要な微小管依存性モーター
MACF1	微小管アクチン架橋因子 1	Wnt 受容体シグナル伝達経路の正のレギュレーターとしての作用
EIF4G2	真核細胞翻訳開始因子 4 ガンマ 2	有糸分裂の際にキャップ依存性から IRES 媒介翻訳へのスイッチの役割を果たす
HNRNPK	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 K	DNA 損傷に対する p53/TP53 応答において重要な役割を果たす
HSPA8	ヒートショック 70-kD タンパク質 8	タンパク質品質制御系において中心的役割を果たす
ZC3H15	ジンクフィンガー-CCCH タイプ含有 15	タンパク質分解から DRG1 を保護する
BZW1	塩基性ロイシンジッパー及び W2 ドメイン 1	ヒストン H4 遺伝子転写を増強する
RSL1D1	リボソーム L1 ドメイン含有 1	PTEN 翻訳の阻害を介して細胞老化を調節する
HSP90AB1	ヒートショックタンパク質 HSP 90-ベータ	シグナル伝達、タンパク質フォールディング及び分解に関与する
DBN1	発達的に調節された脳タンパク質	ニューロン成長の過程に役割を果たす細胞質アクチン結合タンパク質

【表 5 - 2】

ニューロン成熟度		
遺伝子 ID	別名	機能
CADPS	カルシウム依存性分泌アクチベーター1	小胞のエキソサイトーシスに關与するカルシウム結合タンパク質
P2RX7	P2X プリン受容体 7	リガンド開口型イオンチャンネルとして作用する ATP の受容体
CADPS2	カルシウム依存性分泌アクチベーター2	ニューロン及び神経内分泌細胞におけるシナプス小胞及び有芯小胞のエキソサイトーシスを調節す
SYT10	シナプトタグミン 10	神経伝達物質放出及びホルモン分泌の調節におけるカルシウムセンサー
UNC13C	Unc-13 相同体 C	エキソサイトーシスの際の小胞成熟に役割を果たす
RIMS1	シナプス膜エキソサイトーシスタンパク質 1 の調節	シナプス小胞エキソサイトーシスを調節するシナプス小胞タンパク質
PCLO	タンパク質ピッコロ	シナプス小胞の再利用を調節する。Bassoon, RIMS1.2 に類似した役割。
KCNMB3	カルシウム活性化カリウムチャンネルサブユニットベータ 3	KCNMA1 のカルシウム感受性及び開門動態をモデュレートする
SCN1A	ナトリウムチャンネル電位開口型 I アルファサブユニット	興奮性膜の電位依存性ナトリウムイオン透過性を媒介する
KCND2	カリウム電位開口チャンネルサブファミリー D メンバー2	興奮性膜の膜貫通カリウム輸送
ANK3	アンキリン-3	細胞の運動性、活性化及び増殖に主要な役割を果たす
SCN2A	ナトリウムチャンネル電位開口型 II アルファサブユニット	ニューロン及び筋肉における活動電位の生成及び伝播の原因
SCN9A	ナトリウムチャンネル電位開口型 9 アルファサブユニット	興奮性膜の電位依存性ナトリウムイオン透過性を媒介する
GPER1	G タンパク質共役型エストロゲン受容体 1	cAMP 産生、カルシウム動員及びチロシキナーゼ Src を刺激する

(続く)

【表 5 - 3】

MYO5A	ミオシン-Va	細胞質小胞輸送に関与するアクチンベースモータータンパク質のクラス
GRIK1	グルタミン酸受容体イオンチャンネル型キナーゼ 1	興奮性神経伝達を媒介し、正常なシナプス機能にとって重要である。
AKAP9	キナーゼアンカータンパク質 9	ゴルジ体の完全性の維持のために必要
GABBR2	ガンマ-アミノ酪酸 (GABA)B 受容体 2	神経伝達物質の放出及びイオンチャンネルの活性を調節する
PMCHL1	プロメラニン濃縮ホルモン様 1	胎児新生及び成人脳に見出される偽遺伝子
KCNQ5	カリウム電位開口チャンネルサブファミリー-KQTメンバー5	KCNQ3 と会合してカリウムチャンネルを形成する
PCDHB16	プロトカドヘリンベータ 16	特異的細胞間神経接続の確立及び機能に重要な役割を果たす
DLG2	ディスク・ラージホモログ(Disks large homolog)2	興奮性シナプスのシナプス後タンパク質足場の一部である
PCDHB9	プロトカドヘリンベータ 9	特異的細胞間神経接続の確立及び機能に重要な役割を果たす
PTPRD	受容体型チロシンタンパク質ホスファターゼデルタ	神経突起成長を促進し、ニューロン軸索誘導を調節する
CEP89	中心体タンパク質 89	ミトコンドリア代謝に役割を果たす
PCDHB3	プロトカドヘリンベータ 3	特異的細胞間神経接続の確立及び機能に重要な役割を果たす
GRIN2A	グルタミン酸[NMDA]受容体サブユニットイプシロン-1	イオンチャンネル型グルタミン酸受容体
PDYN	プロダイノルフィン	カッパ型オピオイド受容体のリガンドのプレプロタンパク質
HOMER1	ホーマータンパク質相同体 1	シナプス可塑性に役割を果たす
GRM5	代謝型グルタミン酸受容体 5	神経回路網活性及びシナプス可塑性の調節に関与する
ATXN3	アタキシン-3	タンパク質ホメオスタシスの維持に関与する脱ユビキチン化酵素

(続く)

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

GRIA2	イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 AMPA タイプサブユニット 2	リガンド活性化カチオンチャンネルとして機能する
LRP6	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 6	Wnt タンパク質によりシグナルを伝達するための LRP5 を伴う共受容体
RIT2	GTP 結合タンパク質 Rit2	POU4F1 に結合し、POU4F1 の活性をモジュレートする
HTR2A	5-ヒドロキシトリプタミン受容体 2A	5-HT _{2A} 受容体
OPRD1	δ-オピオイド受容体	カルシウムイオン流を低減して、神経伝達物質の放出を阻害する
DCC	結腸直腸癌では欠失している	ネトリン 1 リガンドの供給源に向けてニューロン成長円錐の軸索誘導を媒介する
KIF5B	Kinesin ファミリーメンバー 5B	ミトコンドリア及びリソソームの正常な分布に必要な微小管依存性モーター
LMX1A	LIM ホメオボックス転写因子 1 アルファ	胚形成の際にドーパミン産生ニューロンの発生に役割を果たす
PTPRO	受容体型チロシンタンパク質ホスファターゼ O	細胞増殖の阻害及びアポトーシスの促進に役割を果たす
SHH	ソニックヘッジホッグ	神経管腹側のパターン化における主要な誘導シグナルである
EPHA5	EPH 受容体 A5	発生の際に軸索誘導分子として機能する
WNT3	Wnt ファミリーメンバー 3	正規 Wnt シグナル伝達経路において機能する
ISPD	イソプレノイド合成ドメイン含有	D リビトール 5-リン酸から CDP リビトールヌクレオチド糖を形成することを触媒する
SOS1	SOS Ras/Rac グアニンヌクレオチド交換因子 1	RAS タンパク質、膜タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子
SPTBN1	スペクトリンベータ非赤血球 1	アクチン架橋及び分子足場タンパク質
OPHN1	オリゴフェレニン (Oligopherenin)1	Rho-GTP アーゼ活性化タンパク質
CNTN4	コンタクチン 4	軸索関連細胞接着分子
UNC5D	Unc-5 ネットリン受容体 D	細胞間接着及び細胞誘導に役割を果たす

(続く)

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

SPTA1	スペクトリンアルファ赤血球 1	細胞膜をアクチン細胞骨格に連結する
CHL1	細胞接着分子 L1 様	神経系発生及びシナプス可塑性に役割を果たす
FEZ2	線維束化及び伸長タンパク質ゼータ 2	軸索伸長及び線維束化に関与する
MYH10	ミオシン重鎖 10	細胞質分裂、細胞形状に役割を果たす
SPTB	スペクトリンベータ、赤血球	細胞膜組織化及び安定性に役割を果たす

10

【0093】

加えて、Og-NSC細胞集団に特異的に高度に発現している遺伝子群は、中脳パターン化に関して「SN発生」又は「細胞死の負の調節」である（図2I）。単一細胞RNA-seq分析の分析において、特に、ミトコンドリアの生物学的機能の関連する遺伝子群は、Og-NSC群において大まかに調節されることが見出された（ミトコンドリア機能、ER及びタンパク質フォールディング、並びにオートファジー）。ミトコンドリアが、細胞老化及び死に密接に関連する神経変性疾患の文脈で典型的に罹患している臓器に密接に関連するので、このことは重要性を強調することができる。このデータを介したKEGG分析においても、神経変性疾患の代表である「パーキンソン病」、「ハンチントン病」及び「アルツハイマー病」においてトップチェンジ（top change）としてランク付けされるので、相関関係を推論することができる（図2I）。

20

【0094】

ミトコンドリアの機能は、ヒト胚幹細胞及び人工多能性幹細胞の分化において非常に重要である。特に、神経幹細胞ミトコンドリアは、神経変性疾患の進行及び病理発生に非常に重要であることが知られている。ミトコンドリア遺伝子は、従来の方法により誘導された細胞と比較して、2つの異なるバルク及び単一RNA-seq分析において、ミトコンドリア生成及び動態に関連するものを含むすべてがOg-NSCで調節された（図3A）。遺伝子分析に類似して、ミトタイマーで分析することができ、Og-NSC細胞集団は、従来の2D-NSCよりはるかに健康的で機能的に優れていることが見出された（図3B）Og-NSCの健康及び機能的優位性は、ミトコンドリアROS分析によっても見られる（ミトソックス、図3C）。加えて、Og-NSC群は高いミトコンドリア膜電位も有するので、すべての局面で優れていることを示した（JC-1、図3D）。改善されたミトコンドリア代謝及び抗酸化能に加えて、Og-NSCから分化させたmDAニューロンは、2D-NSCから誘導されたものより多くの抵抗性を、様々なミトコンドリア毒素により誘導されたアポトーシス（図3E）及び神経突起変性（図3F）に対して示した。

30

【0095】

Og-NSCから分化誘導されたドーパミン作動性ニューロンmDAニューロンがアストロサイトと共存して、改善されたニューロン機能及び成熟をもたらす

40

遺伝子の転写調節は、細胞集団の形状が変化する前に、早期変化を実際に示している。例えば、実際の遺伝子分析において（分化発現された遺伝子（DEG）において）、神経幹細胞に見られる変化は、胚神経幹細胞段階で見られるものである。バルクRNA-seq分析において、ニューロン成熟に関連する遺伝子は、Og-NSC（対2D-NSC）細胞に高度に発現された（図2H及び3G）。遺伝子発現プロファイルでは、2Dの対応物と比較すると、Og-NSCから分化誘導された中脳型ドーパミンニューロンは、ニューロン分化後により成熟した形態を示し（図3H及び3J）、シナプス形成に関するより成熟した形態（図3I及び3K）、活動電位誘導Ca²⁺動態（図3L～3O）脱分極由来ドーパミン分泌で評価したシナプス前ドーパミンニューロン機能（図3P）を示した。

50

【0096】

すべての現在するhPSC-mDA分化プロトコルでは、mDAニューロンが、アストロサイト分化を伴わずに生成される。同様に、培養された2D-NSCにおいてアストロサイト分化は見出されなかった(図3R及び3S)。興味深いことに、O-NSCクラスター1の部分集団(中脳型SN生成細胞集団、より高いSN発生遺伝子発現を有するクラスター)において17%の細胞は、グリア発生に関して遺伝子(EIF2B5、MT3、PLP1、CDK6、SCL1A3、HES1、HES5及びSOX8)の高い発現の特徴を共通して示した(図3Q)。Og-NSC培養物がVM(SN)型グリア前駆体集団を含有することを示した。一貫して、Og-NSC培養物の一部の細胞はCD44を発現し(図3S)、このことは、末梢分化の際にアストロサイトに分化される神経発生前駆細胞に特異的に見出される(図3R)。これらの細胞は、アストロサイト前駆細胞のマーカーであるCD44を発現し(図3R)、よって、将来の最終分化の際にアストロサイトに分化されることが予想できる(図3S)。中脳発生の実際のパターンと同様に、mDAニューロンは、GFAP+アストロサイトとともに生成されることが見られる(図3S)。

【0097】

したがって、mDAニューロンは、in vivoでの中脳のように、分化培養物にGFAP+アストロサイトとともに生成された(図3S)。アストロサイトの一般的な神経栄養作用に加えて、VM型アストロサイトは、他の脳領域のアストロサイトより優れた特異的ドーパミン栄養(dopaminotrophic)機能を誘発することが知られている。

【0098】

以前の報告に基づいてアストロサイトのサイトカイン分泌能を考慮すると、アストロサイトは、ドーパミン作動性ニューロンが生成される場合、肯定的な効果を有することが予想できる。この情報に基づいて、図1E~1L及び3E~3Pに示されているように、隣接アストロサイトは、mDAニューロンの成熟、生存、シナプス前機能及び中脳特異的因子発現に対する神経栄養的支持を誘発することができる。

【0099】

Og-NSCから分化されたドーパミン作動性ニューロンは、 α -シヌクレインオリゴ化及び病的伝播をする傾向が少ない。

元の患者の脳に存在する α -シヌクレイン病が移植細胞に伝播するのを予防するため、及びパーキンソン病の長期間にわたる細胞治療の成功のために、細胞治療剤として使用される(移植される)細胞に α -シヌクレイン伝播耐性を確保することが重要である。毒性 α -シヌクレインの病的伝播は、 α -シヌクレインの細胞間移動に関連し、 α -シヌクレイン凝集は、移植細胞への移動にも関連する。 α -シヌクレインの細胞間移動能を測定するため、Og-NSC及び2D-NSCをデュアルチャンバシステム(Choi, Y. R., Cha, S. H., Kang, S. J., Kim, J. B., Jou, I.及びPark, S. M. (2018b). Prion-like Propagation of α -Synuclein Is Regulated by the Fc γ RIIb-SHP-1/2 Signaling Pathway in Neurons. Cell reports 22, 136-148)を使用してそれぞれ分析した。GFP標識 α -シヌクレイン(SH-SY5Y神経細胞に過剰発現したタンパク質)をチャンバに設置し、培養したOg-NSC(2D-NSC)由来ニューロンをチャンバの下に設置し、取込み及び拡大をタンパク質輸送後に観察した(図4A)。結果として、GFP標識 α -シヌクレインの蛍光強度は、Og-NSC由来ニューロンにおいて有意に低いことが観察された(図4B)。

【0100】

α -シヌクレイン移動に加えて、別の重要な問題である移植細胞への α -シヌクレインの病的伝播を、毒性 α -シヌクレイン凝集物により分析した。凝集の程度を、細胞内の α -シヌクレインの量が増加している環境において又は α -シヌクレインが外部から導入される条件において、比較及び分析した(外因性 α -シヌクレイン原線維種子)。

【0101】

Og-NSC及び2D-NSC細胞集団にレンチウイルス過剰発現 α -シヌクレインを感染させ、酸化ストレスを、ドーパミン作動性ニューロンの分化後に誘導し、毒性 α -シヌクレイン凝集及び伝播を分析した。毒性 α -シヌクレインであり得るセリン129リン酸化 α -シヌクレイン(p129- α -シヌクレイン)又はGFP+ α -シヌクレイン移動は、Og-NSCにおいて少ないことが観察された(図4C)。したがって、毒性 α -シヌクレイン凝集も、分化Og-NSC細胞集団において少ないことが観察された(図4D、左側)。加えて、 α -シヌクレイン原線維(PFF)の注入により α -シヌクレインが外部から導入される(外因性 α -シヌクレイン原線維種子)条件を調製することによる毒性 α -シヌクレイン凝集を観察した結果、毒性 α -シヌクレイン凝集は、従来の2D-NSCにおいてより高いこと(図4D、右側)及び様々な条件下での毒性 α -シヌクレイン凝集は、Og-NSC細胞集団において少なかったことも観察されたことが見出された。次に、毒性 α -シヌクレイン凝集をBiFC(二分子蛍光補完)システムにより観察した。このシステムは、アミノ(N)末端(VIS)又はカルボキシ(C)末端(SV2)ビーナス断片がそれぞれ発現及び凝集する場合に強力な蛍光を示すことによって、 α -シヌクレインを観察するシステムである(図4E及び4F)。酸化ストレス及びミトコンドリア破壊は、タンパク質ミスフォールディング及び α -シヌクレインの凝集を誘導することが知られている。 α -シヌクレイン病に対するOg-NSC由来ドーパミン作動性ニューロンの相対的な抵抗性は、低い酸化及びミトコンドリアストレスに寄与することができる(図3B~3F)。加えて、アストロサイトを分化Og-NSC細胞集団に含めることは、毒性 α -シヌクレイン凝集をアストロサイトの元の機能に還元することもでき、よって α -シヌクレイン病の低減に寄与することが見られる。全体として、Og-NSC由来ニューロンは、毒性の α -シヌクレインの伝播を相対的に阻害しており、これは細胞の内側及び外側の α -シヌクレインの研究によって確認された。

【0102】

最後に、Og-NSC又は2D-NSCを脳組織に*in vivo*で移植し、実際の脳環境における α -シヌクレインの伝播及び凝集を観察した。ヒト特異的 α -シヌクレイン過剰発現AAVウイルス及びPFFをラットの線条体に注射して、 α -シヌクレイン疾患により引き起こされるパーキンソン病を誘導した。2週間後、Og-NSC及び2D-NSCを動物線条体モデルに移植し、*in vivo*脳環境内の差を観察した。1か月後の移植組織の分析の結果、重篤な α -シヌクレイン病環境下では、従来の2D-NSC由来移植部位には、生存しているドーパミン作動性ニューロンはほぼなく(図4G、下側パネル)、 α -シヌクレイン+及びp129- α -シヌクレイン+が同時発現したレビー小体が観察され、神経突起は、ほとんど分化しなかった。したがって、従来の細胞集団は細胞治療剤として適していないことが示された。一方、新たに開発されたOg-NSC細胞集団由来移植部位の場合、ニューロンの形状は、はるかに健康的であり、重篤な神経突起変性はなかった(図4G、上側パネル)。更に、毒性 α -シヌクレイン+(p129- α -シヌクレイン+)凝集は、ニューロンの様々な部位において少ないことが観察された。パーキンソン病の患者の場合、細胞治療剤の移植の後であっても、患者由来 α -シヌクレインの、移植細胞への伝播(宿主対移植片 α -シヌクレイン伝播)は、患者の生存(移植後11~16年)における重大な問題である。動物モデルの場合、 α -シヌクレイン伝播凝集は、約1か月のはるかに早い期間で観察される。患者の脳環境を完全に反映していないが、*in vitro*及び*in vivo*アッセイの結果は、Og-NSC由来細胞が毒性 α -シヌクレイン伝播及び凝集に対してより抵抗性があることを示している。

【0103】

Og-NSC移植は、パーキンソン病動物モデルに健康なドーパミン作動性ニューロンを提供する

最後に、細胞治療剤としてのOg-NSC由来細胞集団の可能性を、パーキンソン病が6-OHDA(6-ヒドロキシドーパミン)で誘導された動物モデル系に移植した後に観察した。最近、ヒト胚幹細胞由来細胞の移植後の成功を予想することができる遺伝子が研

究されている。予想されたように、単一細胞RNA-seq分析の結果、この遺伝子群は、新たに開発されたOg-NSC細胞集団に（従来の2D細胞集団と比較して）相対的に高く発現したことが見出された（図5A）。移植ドーパミン作動性ニューロンのシナプス可塑性は、細胞生存及び将来の移植の成功にとって非常に重要である。ニューロンとしての機能を分析するため、GFP蛍光標識GCaMP6（カルシウム指示タンパク質、Ca⁺⁺結合により緑色蛍光を発する）を、Og-NSC細胞集団に発現させ、次いで脳線条体に移植した。ニューロンの機能を、ニューロンへの特別な刺激を伴わずに、移植の1か月後に二光子内視鏡で観察した（図5B、上側）。移植Og-NSC細胞では、ニューロンを介した自発性シグナル伝達が観察された。Ca²⁺過渡応答（ $\Delta F/F$ ）は、2~5 Hzのニューロンの活動電位周波数を示し（図5B、下側）、これは脳組織のSNpc（黒質緻密部）に元々生じるドーパミン作動性ニューロンに類似している。移植Og-NSC細胞のシナプス可塑性を更に確認するため、Og-NSC細胞を、デルタ様正規ノッチリガンド1に結合したGFP（DLL1、pDLL1-GFP-hESC）を有する遺伝子を発現するヒト胚幹細胞集団から調製した。これらは分化ニューロンのみに蛍光的に発現するので、蛍光を発現する細胞のみを、パーキンソン病モデル動物への細胞移植後に分析した。1月半の後、パッチクランプ分析では、活動電位（図5C）及び自発性興奮性シナプス後電流（sEPPC）（図5D）を移植GFP発現ニューロンにおいて観察した。移植ニューロンのシナプス可塑性は、反対側の、病変を有さない正常な細胞と有意に異ならず（図5E及び5F）、このことは、Og-NSCの移植後であっても、ニューロンは機能的に完全な形態を有することを示している。移植ドーパミン作動性ニューロンが完全に成熟しているか及び完全なシナプス機能、例えばドーパミン分泌を有しているかを見出すために、ドーパミントランスポーターにより取り込まれるドーパミンを [¹⁸F]FP-CIT PETスキャンで観察した。結果として、パーキンソン病動物の線条体は、低いドーパミン取込み（インタクト半球の2%）を示したが、Og-NSC細胞集団の移植の5か月後に正常なレベルの40%まで相対的に回復した（図5G及び5H）。

【0104】

Og-NSC細胞集団をパーキンソン病動物モデルに移植し、行動研究を実施した。結果として、アンフェタミン誘導回転構想分析は、移管した回復効果を示した。移植の約6か月目に、14匹の動物のうち11匹の行動回復（回転スコア）は移植前の>50%であった。移植の6か月後に観察された8匹の動物の場合では、すべての動物が>79%の結果を示した（図6A）。移植動物では、回復効果が段階試験（図6B）及びシリンダー試験（図6C）においても示された。

【0105】

動物モデルへのOg-NSCの移植の6か月後、結果を分析した。健康なドーパミン作動性ニューロン組織を移植部位で確認した（移植片体積：4.50±1.56mm³、TH+細胞：9031±3773細胞、6回の独立した移植実験でn=8、図6D~6O）。一貫した特異的増殖は移植部位に観察されなかった。これは、in vitroでのOg-NSC由来ドーパミン作動性ニューロンへの分化と同じである（図2H及び3G~3I）。特に、移植ドーパミン作動性ニューロンは、元の脳組織朝雨の細胞とシナプスを成熟的に形成し、正常な神経突起を延ばす（図6D）。中脳特異的因子はドーパミン作動性ニューロンの生存及び成熟に非常に重要であるが、これらの発現は移植後に十分に維持されないことが知られている。このため、大部分の現存する論文は、移植後の組織中にすべての中脳型因子の発現を示しているわけではなく、最大FOX A2/TH+発現細胞の画像のみを示した。しかし、本発明のプロトコールにより開発されたOg-NSCから誘導された移植細胞集団は、すべての重要な中脳特異的因子を発現する。移植の6か月後でも、96.7%（3, 106/3, 196、FOX A2）、93.8%（3, 338/3, 549、LMX1A）、95.0%（3, 496/3, 678、NURR1）、91.5%（2, 989/3, 274、EN1）の主な中脳特異的因子が、ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるTH+と同時発現する（8匹の動物、図6E~6I）。特に、A9黒質ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるGIRK2が発現し（図6J）、A

9 黒質ドーパミン作動性ニューロンの主な特徴として、移植ドーパミン作動性ニューロンは、多方向への神経突起を延ばす成熟形態を有し（図6E～6G及び6H、下側図面及び図6P）、元の脳組織細胞と成熟神経突起も延長した（図6D）。ヒトGFAP（hGFAP）発現アストロサイトは、移植ドーパミン作動性ニューロンの周りにクラスターし（図6K）、このことは、移植Og-NSC由来アストロサイトが、ドーパミン作動性ニューロンが神経突起の延長によりシナプスを形成するのを助けること、及び細胞の成熟を助けることを示している。これは、同様の効果を示した以前のアストロサイト同時移植と同じである。霊長類における効果を確認するため、Og-NSC由来細胞集団を2匹の生体フィリピンモンキーの線条体に移植し、1か月後、重要な中脳型マーカーであるFOX A2及びNURR1を同時発現する成熟ドーパミン作動性ニューロンが確認された（図6P）。

10

【0106】

考察

培養したオルガノイドを組織発生及びヒト疾患モデル化研究に適用することができ、再生医療におけるドナー移植の供給源ともなり得る。しかし、深部脳領域への脳オルガノイドの移植は、宿主脳組織の損傷を伴うことなく実現可能ではなく、脳オルガノイドの移植は、脳障害の治療に適用可能ではない。更に、移植脳オルガノイドの治療結果は、移植オルガノイド中の自己組織化構造が宿主脳と非常に精密に相互作用する、新たな神経回路網を確立できるべきである。対症的に、他の組織（肝臓、腸、腎臓、膵臓等）からの移植オルガノイドは、移植後に単離機能単位（肝芽、膵島、腎ネフロン等）として治療機能を誘発することができる。したがって、オルガノイド移植は、他のCNS外障害を治療する潜在力を有し得るが、脳障害を治療するための脳オルガノイドの直接的移植は、非現実的である。

20

【0107】

すべての組織発生は、逐次生成過程、組織特異的幹／前駆細胞の増殖及び組織特異的細胞への分化を介して達成される。培養された組織特異的幹／前駆細胞は、再生医療のためのドナー細胞、並びに開発研究及び薬物スクリーニングのためのバイオアッセイプラットフォームを提供することができる。しかし、hPSCからの適切なVMパターン化によるNSC培養の誘導は、以前の研究では達成されなかった。本発明者たちは、VM特異的NSC培養を調製する困難さが、培養中のVM領域特性の不安定さが原因であることを理解していた。VM特異的マーカー発現の維持が細胞密度に対して非常に感受性があるので、NSC調製に必要な細胞単離及び交換過程の際に容易に失われる（図9A）。

30

【0108】

したがって、hPSC-mDAニューロンプロトコールは、非常に高い細胞密度、又は特異的プレートコーティング材料、例えばラミン511又は111（Biolamina、LN-511、LN-111）を伴って開発された。様々な細胞解離条件（アクターゼ、コラゲナーゼ、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺遊離HBSS）、細胞生存サイトカイン（TGFβ、ドキシサイクリン、cAMP、アスコルビン酸、Y27632）、オープンエピジェネティック条件（open epigenetic condition）（5-アザシチジン、VPA、TSA）、β-エストラジオール又はDAPT（ノッチ阻害剤）を誘導する化学物質を使用する様々な努力は、問題の解決に失敗した。

40

【0109】

最近の研究（Song, J. J., Oh, S. M., Kwon, O. C., Wulansari, N., Lee, H. S., Chang, M. Y., Lee, E., Sun, W., Lee, S. E., Chang, S., et al. (2018). Cografting astrocytes improves cell therapeutic outcomes in a Parkinson's disease model. The Journal of clinical investigation 128, 463-482.）において、本発明者たちは、培養アストロサイトから分泌された因子、特にVM組織から誘導された因子は、強力な栄養効果を発揮して、一次NSC及びmDAニューロン培養物における細

50

胞生存及び中脳特異的因子発現を促進することを観察した。

【0110】

したがって、本研究に使用される2D-NSC培養プロトコルを、培養アストロサイト(ACM)から調製した条件付培地に処理を介して開発することができる(図9)。しかし、2D-NSC培養の誘導は、依然として前述の安定性及び再現性の問題を有した。対症的に、安定したVMマーカー発現を有するNSCは、げっ歯類胚VM組織から容易に単離及び培養され、刺激を受けて、hPSC由来中脳様オルガノイドからヒトVM特異的NSCを単離し、胚脳の生理学的構造に類似した環境において構築構造物及び領域特性を有した。

【0111】

オルガノイドベース製剤は、忠実な中脳特異的マーカー発現を伴ったNSC培養物におけるVMパターン化の安定性、並びに非常に低いレベルのアポトーシス、老化、酸化及びミトコンドリアストレスを伴った一般的な培養安定性に関して大きな成功を有した。別の注目すべき観察は、Og-NSCが、mDANニューロンと混合したアストロサイトに分化されるVM特異的遺伝子発現プロファイルを有するアストロサイト前駆細胞集団を、Og-NSCが含有することであった。対症的に、mDANニューロン分化は、hPSC-mDAN分化のための現存するすべての方法において、アストロサイト分化を伴わずに誘導され、したがって、分化mDANニューロン培養物にアストログリアは存在しなかった。したがって、アストログリア支持の非存在下で、神経の成熟及び機能は、in vivo対応物における分化mDANニューロンと同一であると予想できなかった。事実、不十分な成熟及び機能は、in vitro疾患モデル化及び療法においてhPSCから分化されたmDANニューロンの有用性における重大な欠点であると提唱されている。対症的に、混合型アストロサイトによる栄養支持下では、Og-NSC由来mDANニューロンは、in vivo及び移植後のin vivoで改善されたシナプス成熟、機能性、毒性侵襲に対する抵抗性、及び長期中脳特異的因子発現の改善された設定を呈した。これらのOg-NSCのすべての特性は、移植後の再現的な優れた長期治療有効性に最終的に寄与する。加えて、本発明者たちは、オルガノイド誘導NSCが、治療用のドナー細胞の調製に必要な拡大可能な細胞供給源、並びに薬物スクリーニング、発生研究及び疾患モデル化用のバイオアッセイプラットフォームであることを示した。

【0112】

本発明に基づいて、オルガノイドベース方法は、CNSのみならず非CNS障害のために強い治療潜在力を有する組織特異的幹/前駆細胞を調製する、一般的な次世代戦略となり得る。

【0113】

換言すると、オルガノイドの細胞が二次元培養と比較して健康的であり、優れた結果が細胞治療によって得られることは、疑いの余地がない。オルガノイドを「塊」の形態で直接移植することは、脳組織の特徴から望ましくないため、本発明は、神経系の細胞治療剤の最も適切なモデルであると言えることができる。

【0114】

実施例2：大脳皮質オルガノイドを使用したヒト多能性幹細胞の大脳皮質神経幹細胞への分化

[実験手順]

ヒト多能性幹細胞(hESC/hIPSC)の培養

hESC及びhIPSCを、Hanyang University (Seoul, Republic of Korea)の治験審査委員会(IRB)により承認されたhESC研究指針に基づいて培養した。

【0115】

この実験に使用したhESC及びhIPSCを下記の表6に示す。

【0116】

【表 6】

表6

hESC 株					
本明細書で 使用される 名称		本来の名称		核型	確立した施設
HSF6		UC06		雌(46, XX)	UCSF
H9		WA09		雌(46, XX)	Wi 細胞
HUES6		HUES6		雌(46, XX)	ハーバード大学 (HSCI iPS Core)
hiPSC 株					
本明細書で 使用される 名称	本来の名称	供給源 (ヒト)	再プログラミング因子	方法	確立した施設
Retro-1	Rv-hiPS 01-1	新生児線維芽細胞	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	レトロウイルス	ハーバード
Epi-ips	エピソード-ips1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター	漢陽大学 (自己保有物)
CMC-ips#11	CMC-hiPSC-011	骨髄血液	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	センダイウイルス	カトリック大学 (韓国 NIH SCRM)
PD-ips1	PD 患者由来 ips-1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター	漢陽大学 (自己保有物)
PD-#22	Corr. PD-ips#22	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター及び編集済ゲノム	漢陽大学 (自己保有物)

【0117】

未分化 hESC/iPSC の増殖及び維持のため、細胞を、37℃に設定されフィーダー層を有さない CO₂ インキュベーターにより、mTESR-1 培地 (Stemcell Technologies Inc.、Vancouver、BC、Canada) を使用して、マトリゲル (Matrigel) (商標) 又はヒトロネクチン (Human、Gibco Fisher Scientific、Waltham、MA) (Gibco A31804、0.5 µg/cm²) コーティング 6 cm ディッシュ (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) で培養し、培地の交換を毎日実施した。未分化幹細胞は、培地を毎日交換することによって分化能を維持し、アクターゼ (Acutase) (Stemcell Technologies Inc.) を 4～5 日毎に使用して二次培養した。

【0118】

三次元大脳皮質オルガノイドの調製

ヒト胚/人工多能性幹細胞を、アクターゼを使用してディッシュから剥離させ、ニューロン分化誘導培地に入れ、低結合 96 ウェル丸底プレート (Corning、Corning、NY) に、ウェル 1 個当たり 10,000 個の細胞を 150 µL で注入した (分化の 0 日目)。ニューロン分化誘導培地の組成を下記の表に示す。最初の播種では、KSR-hES 培地 (DMEM 40 mL、KSR 10 mL、2-メルカプト 20 µL、MEM-NEAA 500 µL、グルタマックス (GlutaMAX) 500 µL) 及び bFGF (4 ng/mL)、ロック (ROCK) 阻害剤 Y27632 (20 µM)、ドキシサイクリン 1 µg/mL を添加した。細胞を 1 日目に Y27632 のみにより 24 時間処理した。2 日目には、レチノイン酸を有さない B27、インスリン (15.6 µL/50 mL)、SB431542 (10 µM)、LDN (10 µM) 及び A-83 (10 µM) を添加してフルスケールで神経系分化を誘導した。2 日目と 3 日目の間に、基礎培地の 1/2

のみをN2：ニューロベーサル（Neurobasal）（1：1、Gibco）として使用し、次いで基礎培地全体を、18日目に2D状態でチョッピングした後にプレートに塗布するまで、N2：ニューロベーサル（1：1、Gibco）として使用した。培地組成が変わる毎に、培地全体を交換した。8日目から、bFGF（20ng／ml）及びEGF（20ng／ml）を添加した。

【0119】

オルガノイドを、18日目まで下記の表に示された培地によって培養することによって形成した。

【0120】

【表7】

				50x	15.6μl/50 ml	2000x	2000x	2000x	2000x	100x-250x	100x	100x	1000x	200ng/ml	500x	1000x	1000x	1000x	1000x
D0-2	KSR-hES									+X									
D2-3	KSR-hES 1/2	NB, N2(2X) 1/4 ずつ		+B27(w/o RA)	+インスリン	+LDN	+SB	+A83	+AA										
D3-7		NB, N2(2X) 1/2 ずつ		+B27(w/o RA)	+インスリン	+LDN	+SB	+A83	+AA										
D8-11	1/2 マトリゲル(Matrigel)	NB, N2(2X) 1/2 ずつ		+B27(w/o RA)	+インスリン				+AA	+bFGF (500x)									
D11-	マトリゲル埋め込み X	hN2 (+インスリン, P/S)							+AA	+bFGF (500x)									
	マトリゲル埋め込み O	NB, N2(2X) 1/2 ずつ		+B27(w/o RA)					+AA										
D18	埋め込み X→チョッピング																		

表7

10

20

30

40

50

【0121】

大脳皮質オルガノイドからの大脳皮質神経幹細胞及びアストロサイト前駆細胞の単離、並びにニューロン及びアストロサイトへの分化

18日目、オルガノイドをアキュターゼにより37℃で7分間消化し、次いで30ゲージ針でチョッピングして小片にし、ビトロネクチンコーティング6cmプレートに塗布した(Corning、24個のオルガノイド/プレートからの細胞)。この時点で、細胞は神経幹細胞(NSC)段階であり、増殖すること及び5~7日毎に二次培養することができた。NSC培養に使用した培地はN2拡大培地であり、組成は以下の通りであった(200µMのアスコルビン酸、20ng/mlのEGF、20ng/mlのbFGF及び1µg/mlのドキシサイクリンを含む1XN2補充)。培地を毎日交換し、二次元培養及び各二次培養への最初の変換の1日目にY27632により5µMの濃度で処理した。ニューロンへの最終分化を、N2分化培地(10ng/mlのBDNF、10ng/mlのGDNF、200µMのアスコルビン酸)で誘導した。

10

【0122】

大脳皮質オルガノイドからの大脳皮質アストロサイト前駆細胞の単離及び培養

調製された大脳皮質型Og-NSCの継代が実際の脳発生段階に従って更に増加すると、9継代後にアストロサイト前駆細胞を主に含有するOg-アストロサイト前駆細胞を、培地組成等に変化を伴わずに培養することが可能である。9継代から11継代を健康な状態で使用することができる。大脳皮質型Og-NSCでは、増殖培地はN2拡大培地であり、組成は、200µMのアスコルビン酸、20ng/mlのEGF、20ng/mlのbFGF及び1µg/mlのドキシサイクリンを含む1XN2補充であった。培地を毎日交換し、二次元培養及び各二次培養への最初の変換の1日目にY27632により5µMの濃度で処理した。中脳のオルガノイド誘導アストロサイト前駆細胞(実施例3を参照されたい)と同様に、より古い継代の増殖段階の細胞を移植研究に使用する。分析には、上記の最終分化培地の高い継代を有する細胞集団は、アストロサイトの特徴を持つ。

20

【0123】

大脳皮質ニューロン及びアストロサイトへの分化の確認

大脳皮質型ニューロンを調製し、これによって、大脳皮質型パターン化を優先的に実行し、いくつかの二次培養を介してアストロサイト前駆細胞を確保した。ヒト胚幹細胞から神経系への分化を誘導した後、その確認をパターン化の確認によって優先的に実施し、大脳皮質型マーカー、例えばPAX6及びFOXG1の発現を確認した。加えて、アストロサイト前駆細胞をいくつかの二次培養で発生させ、アストロサイト型因子、例えば、GFAP、AQP4、ALDH1L1及びGLASTの発現を確認した。マーカーを、過程を介して、例えば、RNA抽出後のリアルタイムPCR又は免疫染色方法を同時に使用する発現確認を介して確認することができる。

30

【0124】

[結果]

3Dオルガノイドの調製

結果の要点は、正常なオルガノイド形態で大脳皮質細胞集団への分化が優先的に実施されること、パターン化が実施されること、及びアストロサイト前駆細胞への分化が将来的に完了することを確認することである。図17に示されているように、正常な形態のオルガノイドの形成が完了したこと、並びにパターン化マーカーのPAX6及びFOXG1の発現が、オルガノイドがチョッピングされた後であっても維持されたことが確認された。

40

【0125】

調製された大脳皮質3Dオルガノイドからの大脳皮質神経幹細胞及びアストロサイト前駆細胞の確保

記述されたプロトコールのように、SB431542(10µM)、LDN(10µM)及びA-83(10µM)を添加して、フルスケールで神経系分化を誘導し(図16の下側図、図18の大脳皮質誘導スキーム)、正常な形態のオルガノイドが形成されたことが確認され、図17に示されている。確認のため、大脳皮質領域パターン化因子PAX6

50

及びFOXG1の発現を、RNAリアルタイムPCRで確認した(図17及び25)。上記に記述された方法のように、アストロサイト前駆細胞への発生を誘導し、いくつかの二次培養を介して確保することができた。GFAP、AQP4、ALDH1L1、GLAST等の十分な発現を、免疫染色方法を使用して確認することができ、同時に、パターン化因子の発現をこの細胞集団で確認することができた(図25)。

【0126】

大脳皮質ニューロン及びアストロサイトへの分化の確認

神経系パターン化因子のSB431542(10 μ M)、LDN(10 μ M)及びA-83(10 μ M)を添加して、フルスケールで神経系分化を誘導し、大脳皮質型脳オルガノイドへのパターン化を実施した。しかし、神経幹細胞からニューロンの分裂及び複数継代を介してアストロサイト前駆細胞へ分化した後の過程は、初期パターン化のみが異なっていることを除いて、中脳様オルガノイドを介した分化過程と異なっていない。中脳アストロサイト前駆細胞の分化と比較した場合、GFAP、AQP4、ALDH1L1、GLAST等の十分な発現を、免疫染色方法を使用して確認することができ、同時に、パターン化因子の発現を各細胞集団で確認することができた(図25)。活性化アストロサイトへ分化を機能及び電気生理学的機能に関して完了できることが見られる。

【0127】

この実施例では、大脳皮質特異的神経幹細胞を産生することができる3Dオルガノイドを使用する方法が確立された。3Dオルガノイドを利用することによって、神経幹細胞を、実際のin vivo大脳と同じ構造を有する組織から抽出し、それによって健康的な実際の細胞を確保することが可能であると予想することができる。

【0128】

実施例3：中脳様オルガノイドを使用したヒト人工多能性幹細胞から中脳アストロサイトへの分化の確認

[実験手順]

ヒト多能性幹細胞(hESC/h iPSC)の培養

hESC及びh iPSCを、Hanyang University (Seoul, Republic of Korea)の治験審査委員会(IRB)により承認されたhESC研究指針に基づいて培養した。

【0129】

この実験に使用したhESC及びh iPSCを下記の表8に示す。

【0130】

10

20

30

40

50

【表 8】

表8

hESC 株					
本明細書で使用される 名称		本来の名称		核型	確立した施設
HSF6		UC06		雌(46, XX)	UCSF
H9		WA09		雌(46, XX)	Wi 細胞
HUES6		HUES6		雌(46, XX)	ハーバード大学 (HSCI iPS Core)
hiPSC 株					
本明細書で 使用される 名称	本来の名称	供給源 (ヒト)	再プログラミング因子	方法	確立した施設
Retro-1	Rv-hiPS 01-1	新生児線維 芽細胞	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	レトロウィ ルス	ハーバード
Epi-ips	エピソード- ips1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソード ベクター	漢陽大学 (自己保有物)
CMC- ips#11	CMC-hipsc- 011	骨髄血液	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	センダイウ イルス	カトリック 大学 (韓国 NIH SCRM)
PD-ips1	PD 患者由来 ips-1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソード ベクター	漢陽大学 (自己保有物)
PD-#22	Corr. PD- ips#22	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソード ベクター及 び編集済ゲ ノム	漢陽大学 (自 己保有物)

【0131】

未分化 hESC/iPSC の増殖及び維持のため、細胞を、37℃に設定されフィーダー層を有さない CO₂ インキュベーターにより、mTESR-1 培地 (Stemcell Technologies Inc.、Vancouver、BC、Canada) を使用して、マトリゲル (Matrigel) (商標) 又はヒトロネクチン (Human、Gibco Fisher Scientific、Waltham、MA) (Gibco A31804、0.5 µg/cm²) コーティング 6 cm ディッシュ (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) で培養し、培地の交換を毎日実施した。未分化幹細胞は、培地を毎日交換することによって分化能を維持し、アクターゼ (Acutase) (Stemcell Technologies Inc.) を 4～5 日毎に使用して二次培養した。

【0132】

三次元中脳様オルガノイドの調製

中脳型オルガノイドが調製されるまで、実施例 1 の同じ方法で調製した。中脳型オルガノイドを成功裏に調製する開発の初期段階では、ZOX1 及び N-カドヘリンを、神経幹細胞マーカーである PLZF+ 及び Sox2+ と共に発現させた (図 7E 及び 7F)。前側胚脳マーカー (OTX2) 及び腹側 VM 低板マーカー (FOXA2 及び LMX1A) を、一般的な神経幹細胞マーカーであるネスチン及び Sox2 と共に発現させた (図 7G～7I)。発生が更に誘導される場合、ニューロンマーカー MAP2 を、増殖マーカー Ki67+ 及び SOX2+ の外の層として発現させ、より具体的には生体の脳層のように、それぞれ、PCNA+ (増殖性脳室帯 VZ)、MASH1+ (VZ、中間体 (IZ) 及び外套帯 (MZ)) 及び NURR1+ 細胞 (IZ 及び MZ) に特異的に発現する構造が確認された (図 7L 及び 7M)。特徴的なことには、中脳特異的因子である FOXA2+ 細胞、LMX1A+ 細胞及び NURR1+ 細胞もオルガノイドに発現し、オルガノイドは、真の

中脳型オルガノイドとして直接調製されたことが確認された。

【0133】

中脳様オルガノイドからの中脳神経幹細胞の単離、及びニューロンへの分化

hESC/hiPSCを、アクターゼを使用してディッシュから剥離させ、ニューロン分化誘導培地に入れ、低結合96ウエル丸底プレート(Corning、Corning、NY)に、ウエル1個当たり10,000個の細胞を150μLで注入した(分化の0日目)。ニューロン分化誘導培地の組成は以下の通りであった(N2:ビタミンAを有さないB27を含有するニューロベーサル(1:1、Gibco)(2%、Invitrogen Fisher Scientific、Waltham、MA)、グルタマックス(1%、Invitrogen Fisher Scientific)、最小必須培地-非必須アミノ酸(1%、MEM-NEAA、Invitrogen Fisher Scientific)、β-メルカプトエタノール(0.1%、Invitrogen Fisher Scientific)、SB431542(10μM、Tocris、Bristol、UK)、ノギン(200ng/ml、Peprotech、Rocky Hill、NJ)、アスコルビン酸(200μM、Sigma-Aldrich)、インスリン(25mg/L)、ロック阻害剤Y27632(20μM、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)。細胞を1日目にY27632のみにより24時間処理した。オルガノイドの腹側中脳型神経幹細胞の拡大では、ソニックヘッジホッグ(100ng/ml、SHH、Peprotech)及びプルモルファミン(2μM、カルビオケム(Calbiochem)、MilliporeSigma、Burlington、MA)をニューロン分化誘導培地に分化1の1日目から添加した。2日目には、CHIR99021(0.8μM、ステムгент(Stemgent)、Cambridge、MA)を添加した。培地組成が変わる毎に、培地全体を交換した。SB431542を5日目に除去し、FGF8b(100ng/ml、Peprotech)を7日目から添加した。11日目には、基礎培地をN2に完全に交換し、B27、グルタマックス、MEM-NEAA及びβ-メルカプトエタノールは添加しなかった。11日目から添加したCHIR99021の濃度を約2倍(1.5μM)に増加させた。この時点から、オルガノイドを96ウエルプレートから6ウエルプレート(低結合、Corning)に移し、旋回振とう器により80rpmの速度で培養した。ノギン及びソニックヘッジホッグを15日目から除去しbFGF(20ng/ml)を17日目から添加した。18日目、オルガノイドをアクターゼにより37℃で7分間消化し、次いで30ゲージ針でチョッピングして小片にし、ビトロネクチンコーティング6cmプレートに塗布した(Corning、24個のオルガノイド/プレートからの細胞)。この時点で、細胞は神経幹細胞(NSC)段階であり、増殖すること及び5~7日毎に二次培養することができた。NSC培養に使用した培地はN2発現培地であり、組成は以下の通りであった(10ng/mlのBDNF、10ng/mlのGDNF、200μMのアスコルビン酸、100ng/mlのFGF8b、20ng/mlのbFGF及び1μg/mlのドキシサイクリンを含有するN2)。培地を毎日交換し、二次元培養及び各二次培養への最初の変換の1日目にY27632により5μMの濃度で処理した。ニューロンへの最終分化を、N2分化培地で誘導し、組成は以下の通りであった(10ng/mlのBDNF、10ng/mlのGDNF、200μMのアスコルビン酸及び500μMのdb-cAMP)。

【0134】

中脳様オルガノイドからの中脳アストロサイト前駆細胞の単離、及びアストロサイトへの分化

調製された中脳型Og-NSCの継代が実際の脳発生段階に従って更に増加すると、9継代後にアストロサイト前駆細胞を主に含有するOg-アストロサイト前駆細胞を、培地組成等に変化を伴わずに培養することが可能である。9継代から11継代を健康な状態で使用することができる。Og-NSCでは、増殖培地はN2増殖培地であり、組成は、10ng/mlのBDNF、10ng/mlのGDNF、200μMのアスコルビン酸、100ng/mlのFGF8b、20ng/mlのbFGF及び1μg/mlのドキシサイ

クリンを含有するN2補充であった。培地を毎日交換し、二次元培養及び各二次培養への最初の変換の1日目にY27632により5 μ Mの濃度で処理した。増殖段階のアストロサイト前駆細胞を移植に使用し、研究のために分化をN2分化培地で誘導し、組成は以下の通りであった(10 ng/mlのBDNF、10 ng/mlのGDNF、200 μ Mのアスコルビン酸及び500 μ Mのdb-cAMP)。

【0135】

〔結果〕

3D中脳様オルガノイドの調製の確認

図7に示されている中脳型オルガノイドが調製され、継代が実際の脳発生段階に従って更に増加される場合、中脳型ニューロンのみならずアストロサイト前駆細胞に分化させることが可能な中脳型オルガノイドを調製することが可能である。したがって、中脳型オルガノイドの調製及び特性に関する結果は、中脳様オルガノイドを介したニューロンの分化の際に示されたものと同じである。

【0136】

調製された中脳3Dオルガノイドからの中脳アストロサイト前駆細胞の確保の確認

(1) 中脳神経幹細胞の直接分化及びアストロサイト前駆細胞の確保

hESC/iPSCから神経幹細胞及び中脳神経幹細胞への分化を誘導するため、中脳神経幹細胞を、神経外胚葉インデューサー及び中脳型神経幹細胞インデューサーを胚幹細胞段階で約20日間使用することによって確保した。確保された神経幹細胞は、増殖及び保存が容易であり、多数の神経幹細胞を二次培養によって得ることができる。正確な分化の確認は、神経幹細胞マーカー、例えばネスチン及びSox2、並びに中脳神経幹細胞マーカー、例えばFoxa2及びLmx1aの発現率を介して実施することができる。本発明のプロトコルが適用される場合、中脳神経幹細胞への分化は、以下のように95%以上の高い効率で誘導することができる。アストロサイト前駆細胞を得るため、追加の二次培養を数回実施する。初期二次培養の際に、最終分化細胞は、アストロサイトよりニューロンに高い分化率を有するが、アストロサイト前駆細胞の割合は、二次培養が増加すると増加する。従来のプロトコルは、5回の二次培養後の分化によりアストロサイトを確認することができるが、アストロサイト前駆細胞のより効率的な確立のために、9継代から11継代の神経幹細胞集団を、アストロサイト前駆細胞集団として使用する。この時点で、アストロサイト前駆細胞マーカーCD44は、90%以上発現し、分化が誘導される場合、分化されたアストロサイトマーカー群(GFAP、AQP4、GLAST及びS100b)は、図19に示されているように90%以上発現した。

【0137】

(2) 中脳型アストロサイト前駆細胞のより高い品質効果の観察

in vitro特性の分析の結果、中脳型アストロサイトは、より有用なサイトカインの分泌及びニューロン機能の維持に関連する因子を過剰発現することが観察された(図20)。in vivoの結果から、より有用な因子の分泌が中脳型アストロサイトにおける発現を促進することも観察された(図21)。加えて、このアストロサイトの効果はミクログリアに影響を与え、より良好なタイプのミクログリアへの変化に関与し、抗炎症効果との相乗効果を予想することができる(図22)。

【0138】

中脳アストロサイトの分化の確認

hiPSCを使用するプロトコル適用の確認

実験を実施して、確保されたプロトコルがH9 hESCのみならず、他のタイプの胚幹細胞にも適用されるかを確認した。このため、iPSCを疾病管理庁(Korea Centers for Disease Control and Prevention)から確保した(CMC-hiPSC-003及び011)。培養段階では、本発明者たちは、動物由来成分、例えば、ヒト胚幹細胞の培養に以前に使用されたマウスフィーダー又はマトリゲルを使用しない異種成分不含有系を使用した適応培養に成功し(図23)、複数の細胞保存を確保した。

【0139】

確保されたh i P S Cを本発明のプロトコールに適用した結果、神経幹細胞に十分に分化されたことが確認され、更に、アストロサイトマーカー、例えばG F A Pが、H 9 h E S Cのように、二次培養過程で増加したことが確認された（図24）。

【0140】

中脳アストロサイトへの正常な分化が確認された（図25）。すなわち、これを通して、本発明のプロトコールはH 9 h E S Cのみならず、他のタイプの胚幹細胞にも適用できることが確認された。使用したi P S C株のうち、#11は分化が容易であり、将来的に実践的に使用される場合、利用可能な人工多能性幹細胞を確保する非常に重要なステップとなる。

【0141】

T G F - β 及びL I Fを使用する効率的な分化誘導

T G F - β 及びL I Fを使用する効率的な分化誘導を介して、大量のアストロサイトを確保する技術が確保された。増殖段階でT G F - β を用い、分化段階でL I Fを用いて処理することによって、多量のアストロサイトが分化される（G F A Pマーカーの発現により）ことが観察され、これらのアストロサイトが、多量の神経調節因子が発現する高品質細胞となることが観察された（図26）。アストロサイト前駆細胞の量を確認するため、細胞を、増殖段階の分裂細胞のみにマーク付けすることができるE d Uで30分間だけ処理し、完全に分化させ、次いでアストロサイトの前駆細胞の増加又は減少を、アストロサイトと同時に発現した量を確認することによって確認した。結果として、アストロサイト前駆細胞の量が1.5倍増加したことを確認した。

【0142】

最終プロトコールにより確保されたアストロサイトの元の材料の有用性を確認するため、条件付培地の特性を優先的に分析する

－細胞特性の分析：確保されたアストロサイトの特性の分析をするため、生理学的特性を分析し、中脳型アストロサイトの生理学的活性を測定した。これによって、分化誘導材料の確保及び移植に適した未成熟アストロサイトであることが確認された〔図27〕。完全成熟アストロサイトが不十分な環境に容易に同化できることを考慮すると、これらの未成熟型細胞は、移植により適している。

【0143】

－機能の分析：移植した後、アストロサイトの機能を確認するために実行し、移植後にi n v i v oでの高品質細胞として機能を発揮できるかをi n v i t r o及びi n v i v oで観察した。I N v i t r oの結果が周囲環境の改善に適しているかを見出すため、条件付培地を使用する実験を実行した。

【0144】

結果を図28、29及び30に示す。図28は、中脳型アストロサイトのために調整された培地を使用して、ミクログリアにおける変化を観察することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果がi n v i t r oで検証された。ミクログリアを含有する細胞培養では、炎症がL P S処理で誘導された場合、中脳アストロサイト用の条件付培地による処理は、不十分なミクログリアマーカーであるi N O S、C d 1 1 b及びC D 1 6 . 3 2の発現を低減し、ミクログリアへの良好な形質転換を示すマーカーであるA r g及びC D 2 0 6の発現を増加させた。

【0145】

図29は、炎症を誘導した後、アストロサイト調整培地による死因子を阻害する可能性を確認することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果がi n v i t r oで検証された。加えて、ミクログリアを含有する細胞培養では、炎症がL P S処理で誘導された場合、中脳アストロサイト用の条件付培地による処理は、アポトーシスマーカーであるb - g a l及びp 1 6の発現を低減した。

【0146】

図30は、炎症を誘導した後、アストロサイト調整培地の抗炎症効果をR T - P C Rの

10

20

30

40

50

使用により確認することによって得られた結果を示す。これによって、アストロサイトによる抗炎症効果が *in vitro* で検証された。加えて、ミクログリアを含有する細胞培養では、炎症が LPS 処理で誘導された場合、中脳アストロサイト用の条件付培地による処理は、インフラマソーム (*inflammosome*) 形成関連因子の発現を低減し、神経発生因子の発現を増加させることが確認された。

【0147】

最終プロトコールにより確保されたアストロサイトの *in vivo* 有用性を確認する移植後の特性の分析

最初に、本発明者たちは、*in vivo* で脳に移植した後の周囲環境へのアストロサイトの肯定的な効果を研究した。線条体部位へのアストロサイトの移植後、抗炎症性因子、炎症性因子及びサイトカイン分泌等の結果を確認した。炎症性因子、例えば、TNF- α 、IL1 β 、iNOS 及び CD11 β の発現は、アストロサイト移植部位で低減され、炎症性因子、例えば、IL1 β 、iNOS 及び CD11 β の発現は、周囲部位で低減され、BDNF、GDNF 及び Arg1 サイトカインの発現は、移植部位及び周囲部位でわずかに増加した (図31)。

【0148】

in vivo でアストロサイトを移植した後に環境を改善する効果を、ミクログリアにおける変化を介して *in vivo* で観察した。

確保されたアストロサイトをラット脳線条体に移植し、次いで神経幹細胞を、対照群として反対側に移植した。対応する環境経過を観察することによって、ミクログリアが M1 及び M2 に変換したかを確認した。

【0149】

炎症を LPS で低減し、アストロサイトを移植した。結果として、不十分なタイプの M1 マーカーである iNOS、CD11、CD16 等の発現はアストロサイト移植部位で阻害され (図32~34)、M2 マーカーである CD206 の発現は増加したことが観察された。したがって、アストロサイトへの肯定的な効果が確認された (図35)。

【0150】

実施例4：視床下部オルガノイドを使用したヒト人工多能性幹細胞から視床下部ニューロン及びアストロサイトの分化の確認

〔実験手順〕

ヒト多能性幹細胞 (hESC/h iPSC) の培養

hESC 及び h i P S C を、Hanyang University (Seoul, Republic of Korea) の治験審査委員会 (IRB) により承認された hESC 研究指針に基づいて培養した。

【0151】

この実験に使用した hESC 及び h i P S C を下記の表9に示す。

【0152】

10

20

30

40

50

【表 9】

表9

hESC 株					
本明細書で 使用される 名称		本来の名称		核型	確立した施設
HSF6		UC06		雌(46, XX)	UCSF
H9		WA09		雌(46, XX)	Wi 細胞
HUES6		HUES6		雌(46, XX)	ハーバード大学 (HSCI iPS Core)
hiPSC 株					
本明細書で 使用される 名称	本来の名称	供給源 (ヒト)	再プログラミング因子	方法	確立した施設
Retro-1	Rv-hiPS 01-1	新生児線維芽細胞	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	レトロウイルス	ハーバード
Epi-ips	エピソード-ips1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター	漢陽大学 (自己保有物)
CMC-ips#11	CMC-hiPSC-011	骨髄血液	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	センダイウイルス	カトリック大学 (韓国 NIH SCRM)
PD-ips1	PD 患者由来 ips-1	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター	漢陽大学 (自己保有物)
PD-#22	Corr. PD-ips#22	皮膚	OCT4, SOX2, KLF4, shp53	エピソードベクター及び編集済ゲノム	漢陽大学 (自己保有物)

【0153】

未分化 hESC/iPSC の増殖及び維持のため、細胞を、37℃に設定されフィーダー層を有さない CO₂ インキュベーターにより、mTESR-1 培地 (Stemcell Technologies Inc.、Vancouver、BC、Canada) を使用して、マトリゲル (Matrigel) (商標) 又はヒトロネクチン (Human、Gibco Fisher Scientific、Waltham、MA) (Gibco A31804、0.5 µg/cm²) コーティング 6 cm ディッシュ (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) で培養し、培地の交換を毎日実施した。未分化幹細胞は、培地を毎日交換することによって分化能を維持し、アクターゼ (Acutase) (Stemcell Technologies Inc.) を 4～5 日毎に使用して二次培養した。

【0154】

三次元視床下部オルガノイドの調製

オルガノイドを図 36 と同じプロトコルで調製した。

【0155】

基本的に、神経系のオルガノイドが胚/人工多能性幹細胞から調製されたので、ヒト胚/人工多能性幹細胞を、アクターゼを使用してディッシュから剥離させ、ニューロン分化誘導培地に入れ、低結合 96 ウェル丸底プレート (Corning、Corning、NY) に、ウェル 1 個当たり 10,000 個の細胞を 150 µL で注入した (分化の 0 日目)。オルガノイドを神経系に調製するため、10 µM の SB-431542 及び 100 ng/mL のノギンで処理し、神経系に誘導し、腹側インデューサーの SHH 及びプルモルファミンで処理することによりパターン化した。培地の特定の組成を下記の表 10 及び 11 に示す。

【0156】

視床下部オルガノイドからの視床下部神経幹細胞の単離、及びニューロンへの分化の確認
日程に従った分化誘導培地の組成を下記の表 10 に示す。

【 0 1 5 7 】

【表 10】

表10

日目	培地組成
96 ウエル(播種: 1×10^3 細胞/ウエル)	
D0	Neurobasal: $2 \times N2$ (1:1)
	1×R27(-RA)
	1×MEM NEAA
	1×Glutamax
	β-メルカプトエタノール, 55μM
	ペニシリン/ストレプトマイシン
	アスコルビン酸, 200μM
	ドキシサイクリン, 1μg/mL
	Y-27632, 10μM
	SB -431542, 10μM
	Noggin, 100ng/mL
D1-6	Neurobasal: $2 \times N2$ (1:1)
	1×R27 (-RA)
	1×MEM NEAA
	1×Glutamax
	β-メルカプトエタノール, 55μM
	ペニシリン/ストレプトマイシン
	アスコルビン酸, 200μM
	SB-431542, 10μM
	SHH, 100ng/mL
	パルモルファミン, 2μM
D7-12	Neurobasal: $2 \times N2$ (1:1)
	1×R27 (-RA)
	1 ×MEM NEAA
	1×Glutamax
	β-メルカプトエタノール, 55μM
	ペニシリン/ストレプトマイシン
	アスコルビン酸, 200μM
	Noggin, 100ng/mL
	SHH, 100ng/mL
	パルモルファミン, 2μM
6 ウエル培養プレートに移行	
D13-20	N2 培地
	ペニシリン/ストレプトマイシン
	アスコルビン酸, 200μM
	FGF2, 20ng/mL
チョッピング	
D18-21	N2 培地
	ペニシリン/ストレプトマイシン
	アスコルビン酸, 200μM
	ドキシサイクリン, 1μg/mL
	FGF2, 20ng/mg

【 0 1 5 8 】

最初の播種では、N2：ニューロベーサル（1：1、Gibco）、B27（RAなし）、2-メルカプト 55 μM、MEM-NEAA、グルタマックス、アスコルビン酸 200 μM、SB 431542（10 μM）、ノギン 100 ng/mL、ロック阻害剤 Y 27632（20 μM）、ドキシサイクリン 1 μg/mLを添加した。細胞を1日目に Y 27632 及びドキシサイクリンのみにより24時間処理した。1日目と6日目の間に

10

20

30

40

50

、基礎培地を使用しながら 100 mg/ml の SHH 及び $2 \mu\text{M}$ のプルモルファミンを添加した。7 日目と 12 日目の間に、従来の基礎培地を使用しながら、SB431542 のみを有さない培地を使用した。13 日目に 6 ウエルプレート（低結合）に移し、旋回振とう器で攪拌した。13～20 日目に、 $200 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸及び 20 ng/ml の FGF2 のみを N2 培地に添加し、細胞を培養し、基礎培地全体を、21 日目（可能であれば、18 日目の後）に 2D 状態でチョッピングされた後にプレートに塗布されるまで、N2 として使用し、ドキシサイクリンを、平板培養の初日のみに添加した。培地組成が変わる毎に、培地全体を交換し、13 日目に使用した培地を増殖培地として使用した。 $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度のドキシサイクリン及び $5 \mu\text{M}$ の濃度の Y27632 で各二次培養を 1 日処理した。ニューロンへの最終分化を、N2 分化培地（ 10 ng/ml の BDNF、 10 ng/ml の GDNF 及び $200 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸）で誘導した。基礎培地を下記の表 11 に示す。

【0159】

【表 11】

表 11

2×N2 培地	N2 培地
12g DMEM/F12 (-ヘペス(HEPES)緩衝液、-重炭酸ナトリウム)	12g DMEM/F12 (-ヘペス緩衝液、-重炭酸ナトリウム)
1.69g 重炭酸ナトリウム	1.69g 重炭酸ナトリウム
1.55g D(+) グルコース	1.55g D(+) グルコース
0.073g L-グルタミン	0.073g L-グルタミン
200mg アポ-トランスフェリン	100mg アポ-トランスフェリン
プロゲステロン, 40nM	プロゲステロン, 20nM
ブトレシン, 200μM	ブトレシン, 100μM
セレン酸塩, 60nM	セレン酸塩, 30nM
インスリン, 200nM	インスリン, 200nM
1L の水	1L の水

【0160】

視床下部オルガノイドからの視床下部アストロサイト前駆細胞の単離、及びアストロサイトへの分化の確認

調製され視床下部型 O g - N S C の継代が実際の脳発生段階に従って更に増加すると、9 継代後にアストロサイト前駆細胞を主に含有する O g - アストロサイト前駆細胞を、培地組成に変化等を伴わずに培養することが可能である。9 継代から 11 継代を健康な状態で使用することができる。視床下部型 O g - N S C では、増殖培地は N2 増殖培地であり、組成は、 $200 \mu\text{M}$ のアスコルビン酸、 20 ng/ml の bFGF 及び $1 \mu\text{g/ml}$ のドキシサイクリンを含有する 1×N2 補充であった。培地を毎日交換し、二次元培養及び各二次培養への最初の変換の 1 日目に Y27632 により $5 \mu\text{M}$ の濃度で処理した。中脳のオルガノイド誘導アストロサイト前駆細胞と同様に、より古い継代の増殖段階の細胞を移植研究に使用する。

【0161】

〔結果〕

3D 視床下部オルガノイドの調製の確認

図 37 に示されているように、調製された視床下部オルガノイドは、正常な形状を有し、神経幹細胞のマーカーであるネスチン及び Sox2 を視床下部マーカーである RAX と一緒に発現する初期形態を有する。

【0162】

調製された視床下部 3D オルガノイドからの視床下部神経幹細胞及びアストロサイト前駆細胞の確保の確認

視床下部オルガノイドからチョッピング及び抽出された神経幹細胞が正確にパターン化

された神経幹細胞になったことが確認され、視床下部マーカーの96.8%が図38の結果に示されているように発現した。定量的に、4継代までの神経幹細胞をニューロン分化に使用することができ、最初の10,000個の細胞から約1,000倍の数の神経幹細胞を確保することが可能である(図38)。神経幹細胞は、RAX及びNKX2.2をパターン化マーカーとして発現する。

【0163】

視床下部ニューロン及びアストロサイトへの分化の確認

図39の結果に示されているように、調製された視床下部幹細胞を、分化の際にMAP2発現ニューロン及びGFAP発現アストロサイトに分化させることができる。ニューロンは、視床下部特異的のマーカーであるNPY及びα-MSHを発現する細胞に分化される。

10

【0164】

分化後に機能的に完全な細胞の形成を確認するため、レプチン反応性(図40)を特異的に観察する場合、p-s-t-a-t-3機構への感受性を測定し、遺伝子応答を観察すると、食欲不振関連POMC、CARTPT、PCSK1、2、LEPR及びMC4Rの発現が増加し、食欲増進関連遺伝子のNPY、AGRP及びNPY1Rの発現が増加していた。よって、このことは細胞が完全に機能し得ることを示唆している。特に、NKX2.1、RAX、ISL、SF1及びNGN3の発現を介して、三次元オルガノイド由来細胞は、二次元培養と比較してより良好にパターン化されることが見られる(図41)。

【0165】

視床下部神経幹細胞をレプチン感受性幹細胞として確保することは、生体中の機能に類似した機能を実際に発揮できることを示し、将来的に代謝疾患、例えば肥満症及び糖尿病のための治療剤の研究及び開発に主に使用される可能性を有することが示唆される(図40)。

20

【0166】

3Dオルガノイドを使用した視床下部神経幹細胞の*in vivo*移植の可能性の確認

3Dオルガノイドを使用して発生された視床下部神経幹細胞の*in vivo*移植の可能性を確認した。1×10⁵個の視床下部神経幹細胞を第三脳室に移植した後、生着可能性を7日後に確認した。hNCAM/Raxを発現する視床下部神経幹細胞が安定して生着したことが確認され、同時に、hGFAP/POMCを発現する視床下部神経幹細胞の形態を取ったことが確認された(図42)。

30

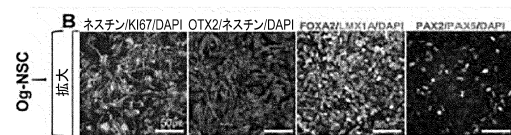
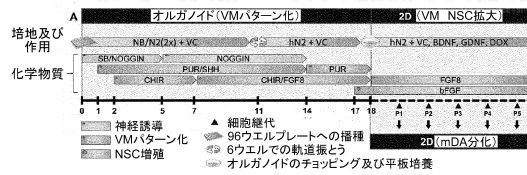
40

50

【図面】

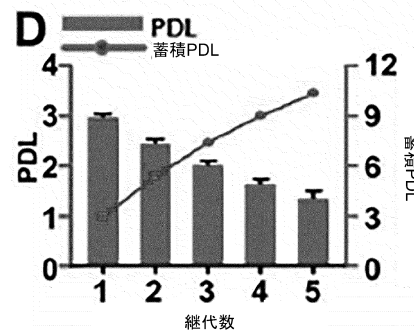
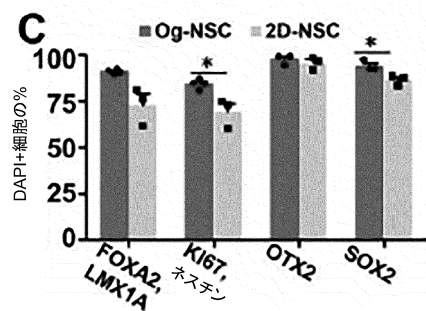
【図 1 A】

【図 1 B】



【図 1 C】

【図 1 D】



10

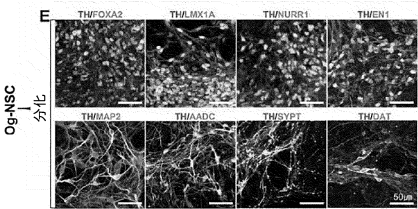
20

30

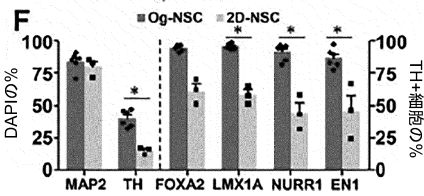
40

50

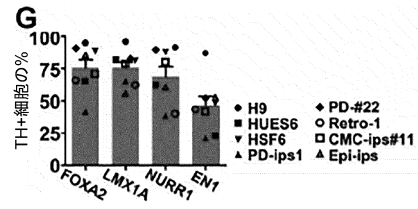
【図 1 E】



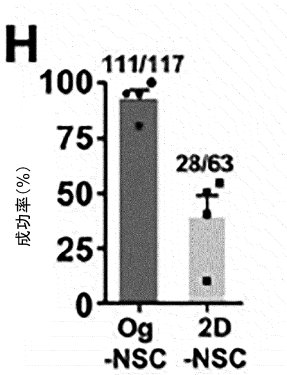
【図 1 F】



【図 1 G】



【図 1 H】



10

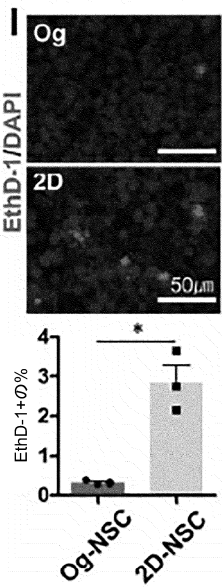
20

30

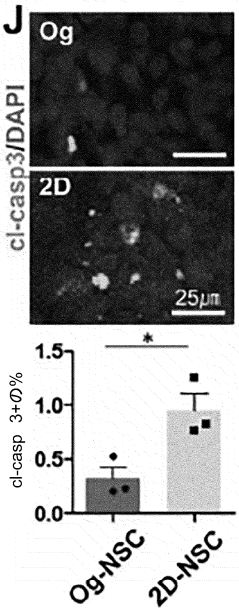
40

50

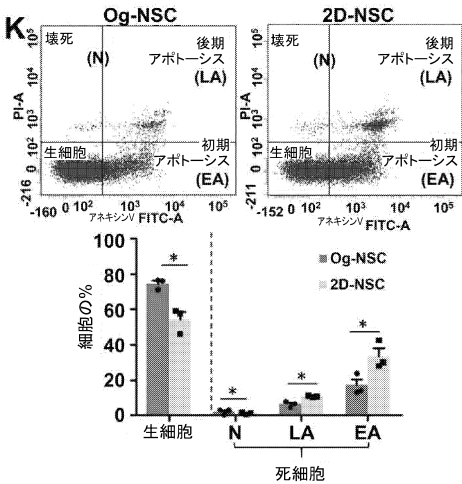
【図 1 I】



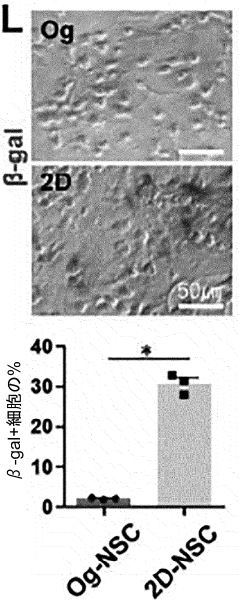
【図 1 J】



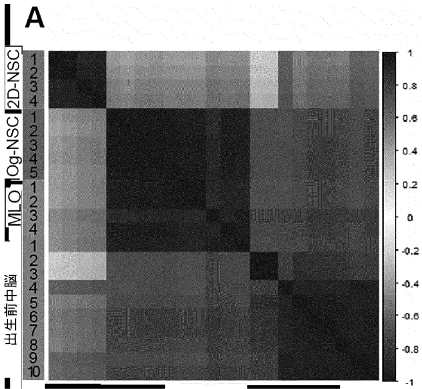
【図 1 K】



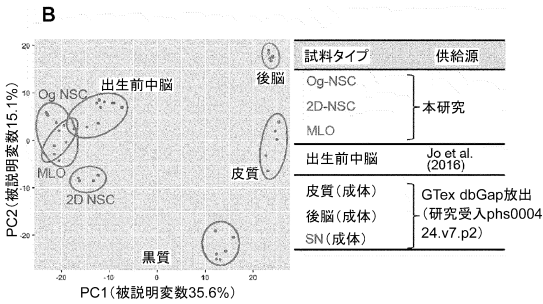
【図 1 L】



【図 2 A】



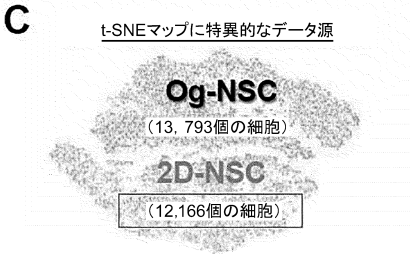
【図 2 B】



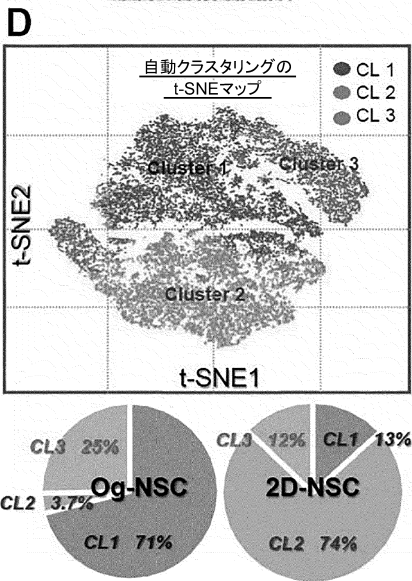
10

20

【図 2 C】



【図 2 D】

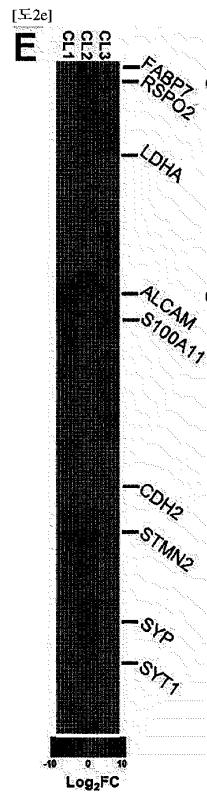


30

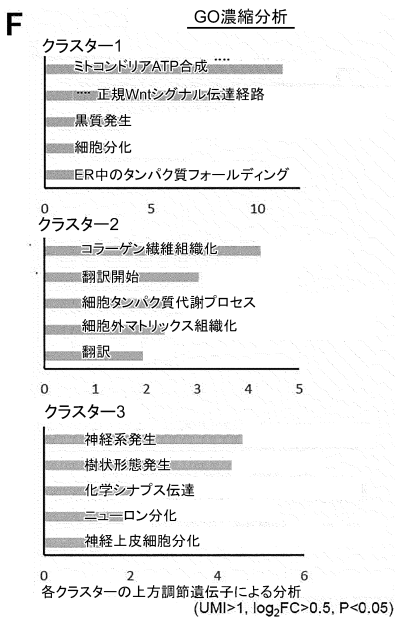
40

50

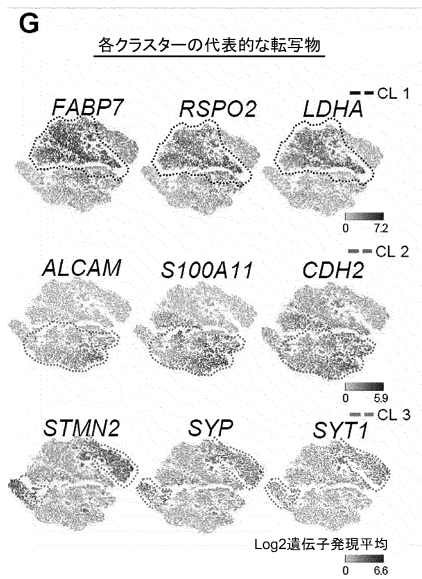
【図 2 E】



【図 2 F】



【図 2 G】



【図 2 H】



10

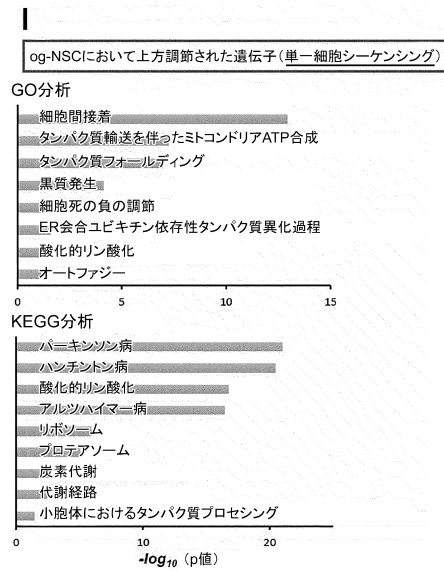
20

30

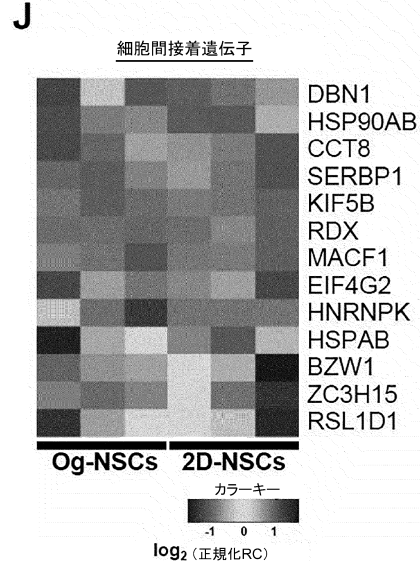
40

50

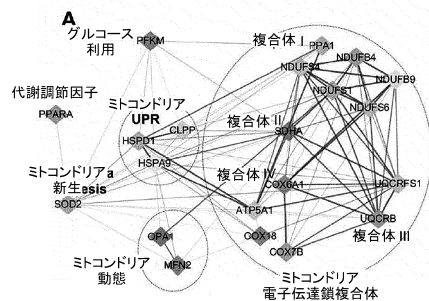
【図 2 I】



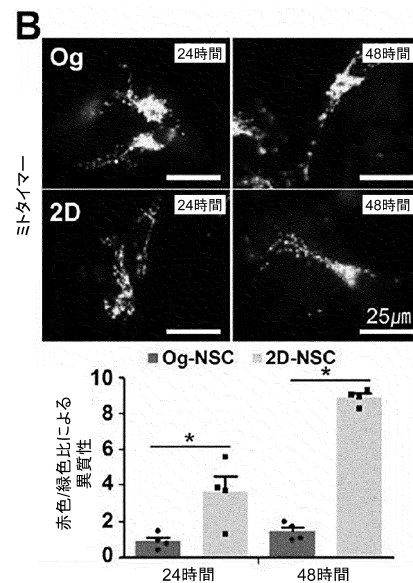
【図 2 J】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

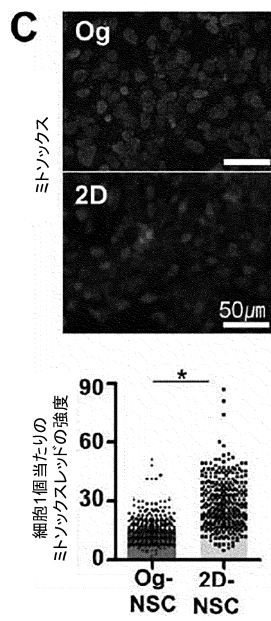
20

30

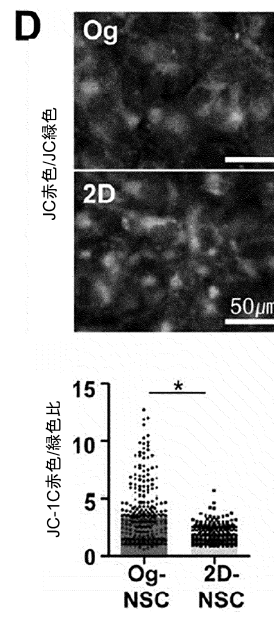
40

50

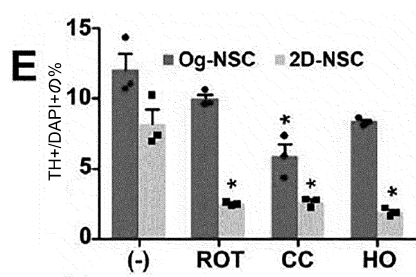
【図 3 C】



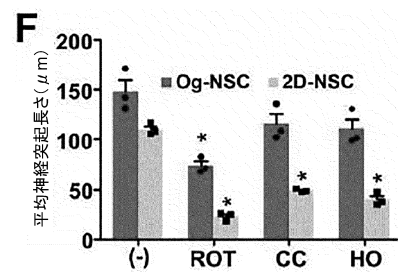
【図 3 D】



【図 3 E】



【図 3 F】



10

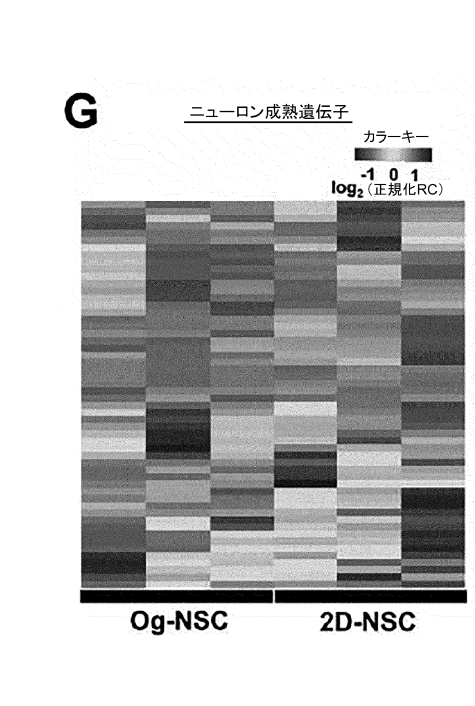
20

30

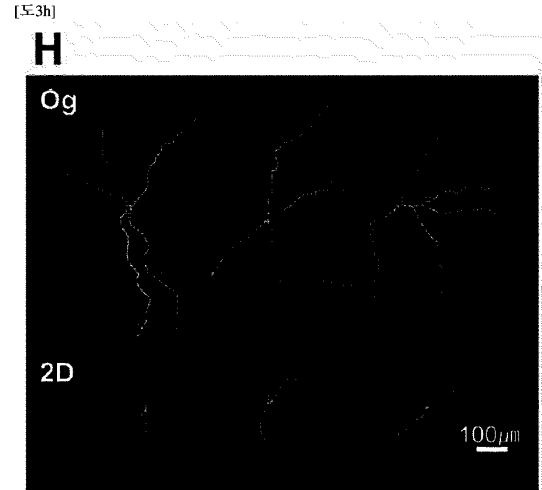
40

50

【図 3 G】



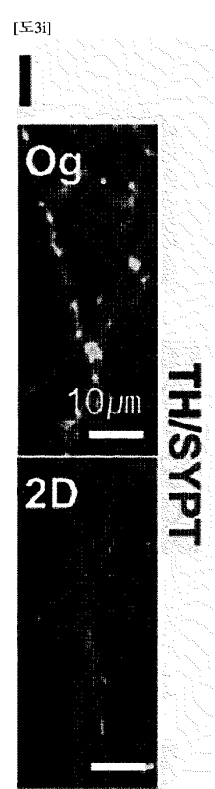
【図 3 H】



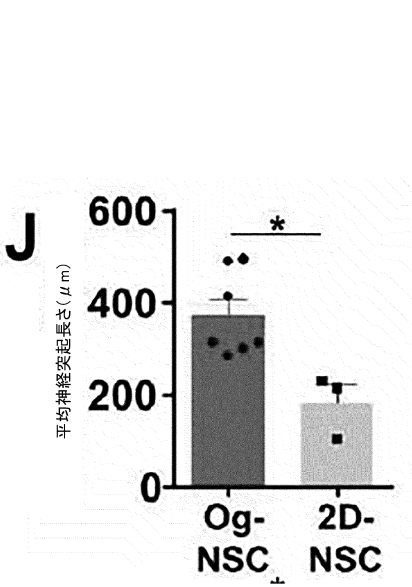
10

20

【図 3 I】



【図 3 J】

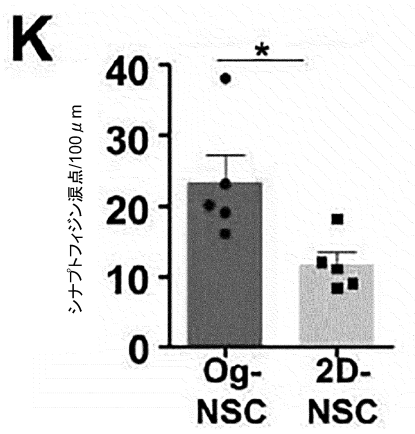


30

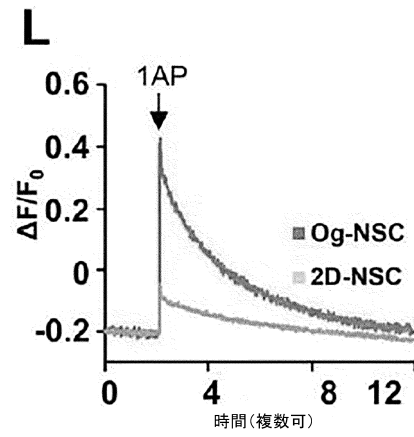
40

50

【図 3 K】

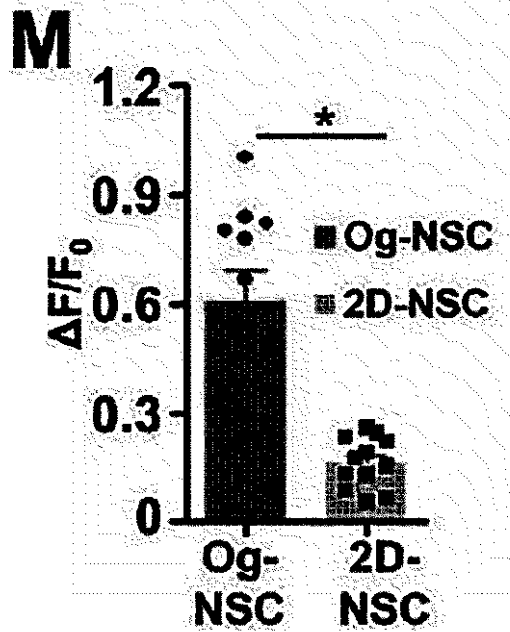


【図 3 L】

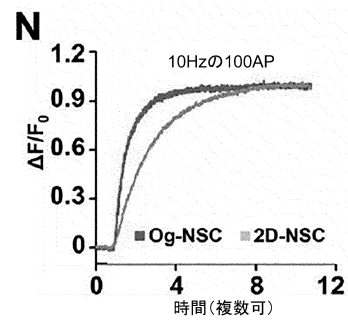


【図 3 M】

[$\pm 3m$]



【図 3 N】



10

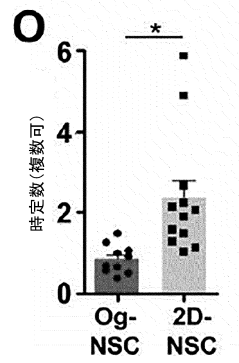
20

30

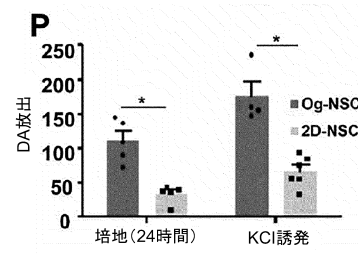
40

50

【図 3 O】



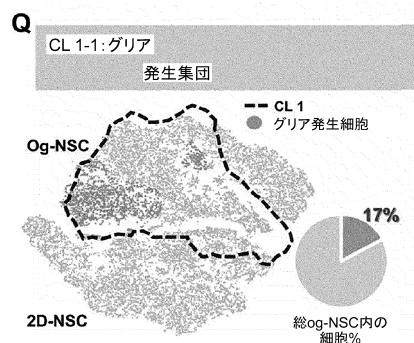
【図 3 P】



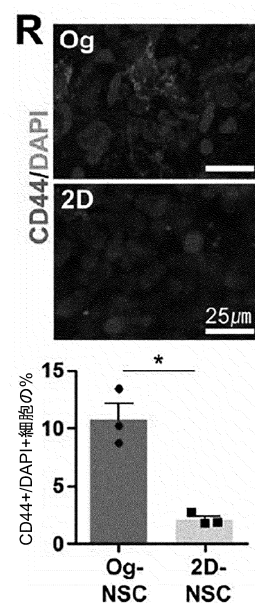
10

20

【図 3 Q】



【図 3 R】

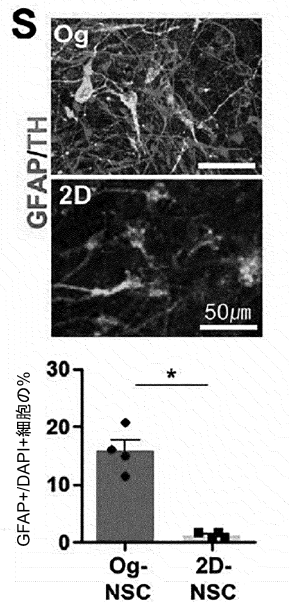


30

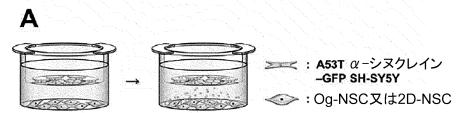
40

50

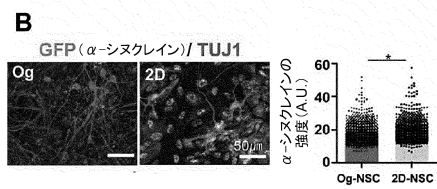
【図 3 S】



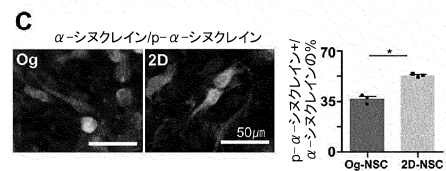
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

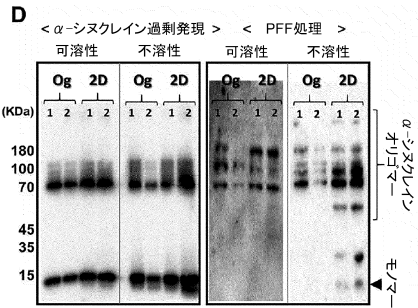
20

30

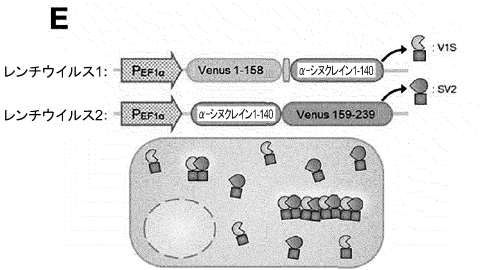
40

50

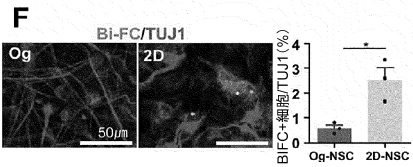
【図 4 D】



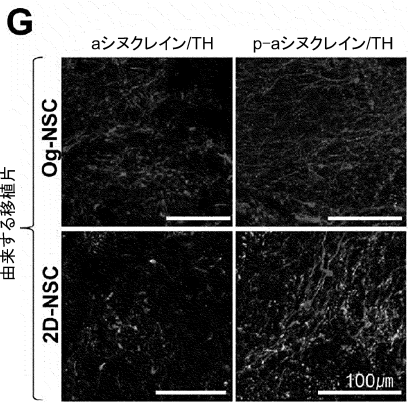
【図 4 E】



【図 4 F】



【図 4 G】



10

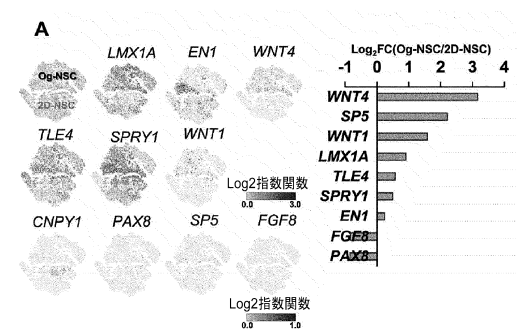
20

30

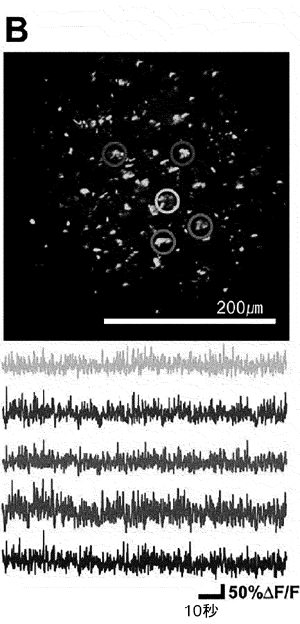
40

50

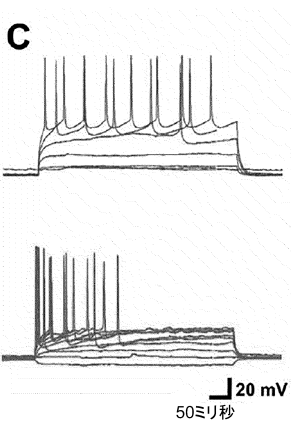
【図 5 A】



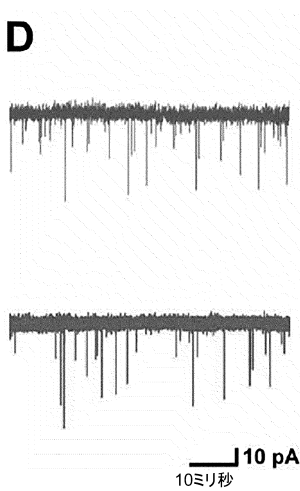
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 5 D】



10

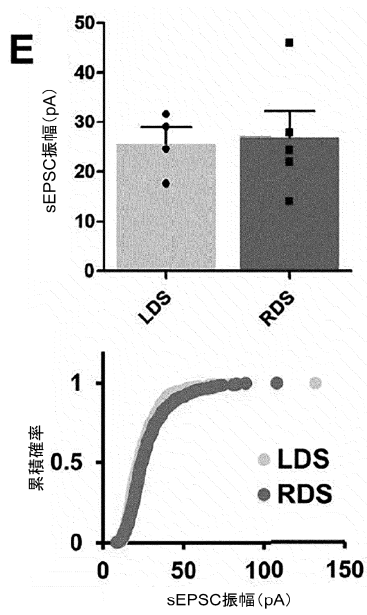
20

30

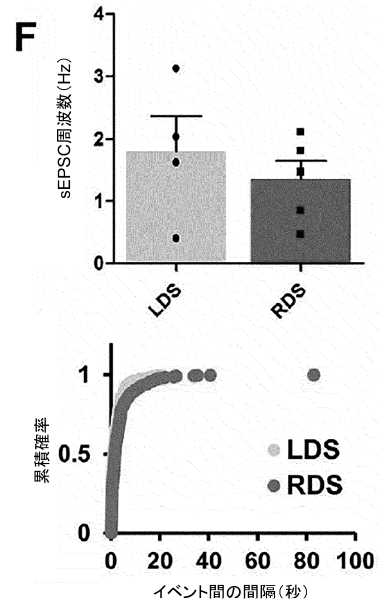
40

50

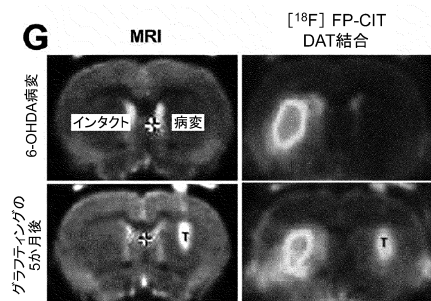
【図 5 E】



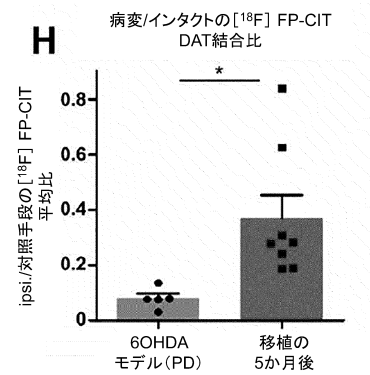
【図 5 F】



【図 5 G】



【図 5 H】



10

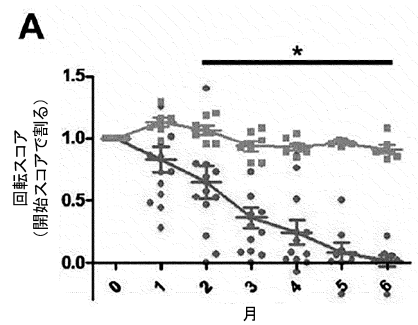
20

30

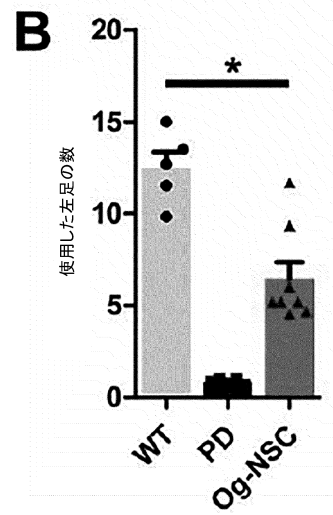
40

50

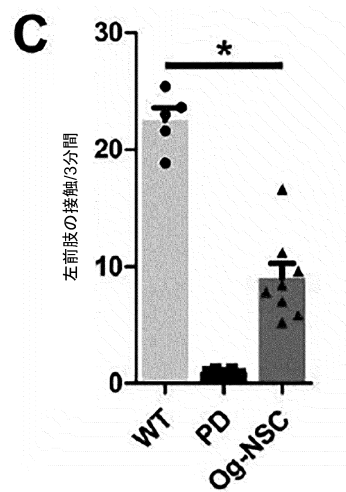
【図 6 A】



【図 6 B】

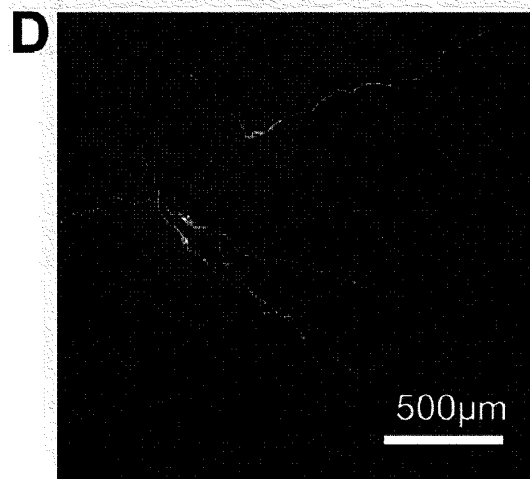


【図 6 C】



【図 6 D】

[5d]



10

20

30

40

50

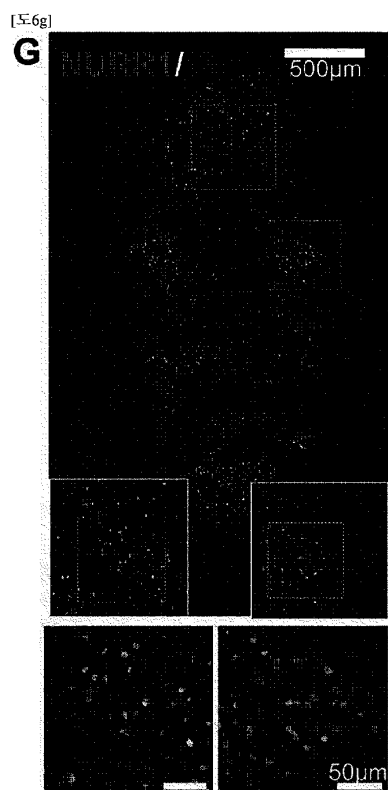
【図 6 E】



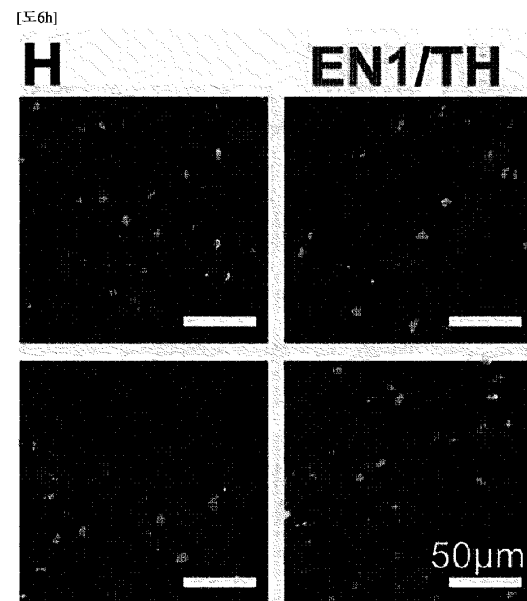
【図 6 F】



【図 6 G】



【図 6 H】



10

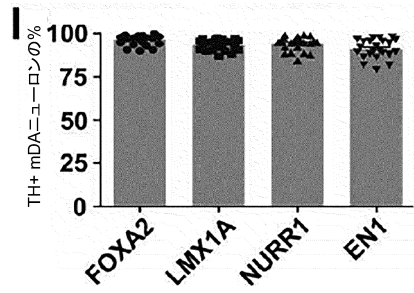
20

30

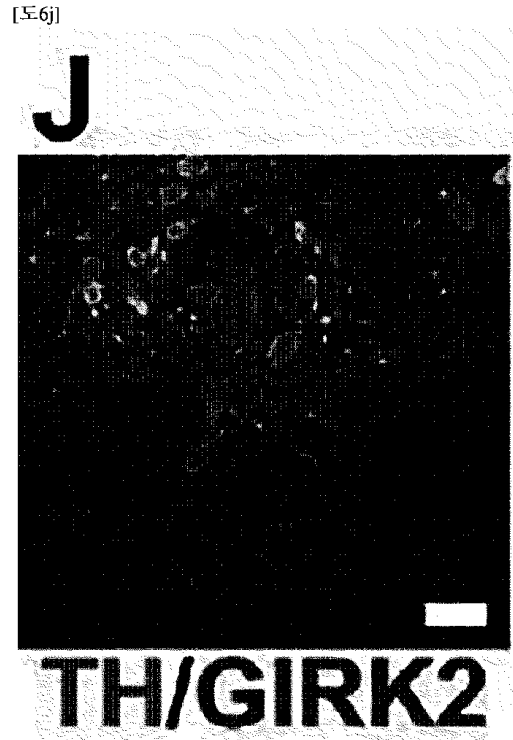
40

50

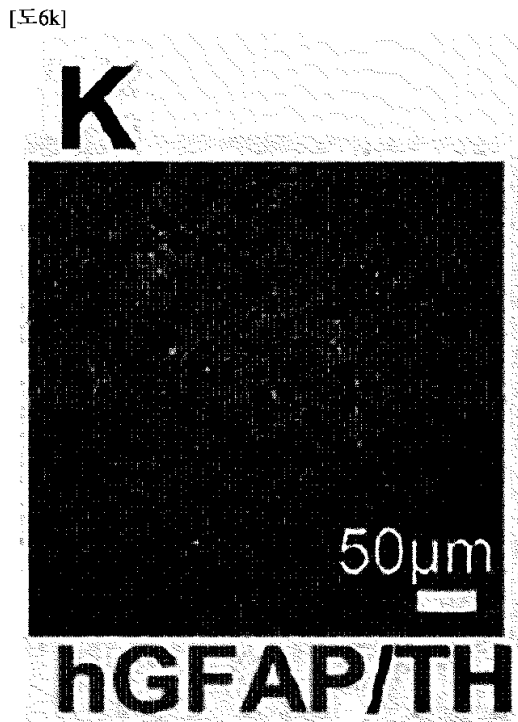
【図 6 I】



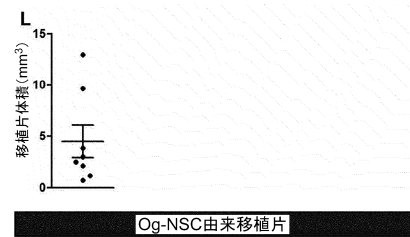
【図 6 J】



【図 6 K】



【図 6 L】



10

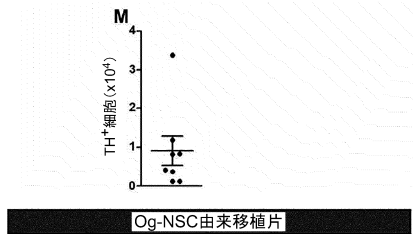
20

30

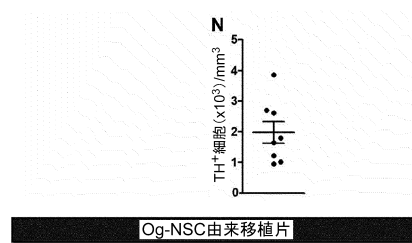
40

50

【図 6 M】



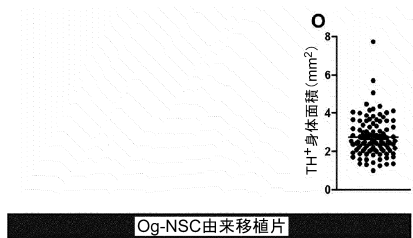
【図 6 N】



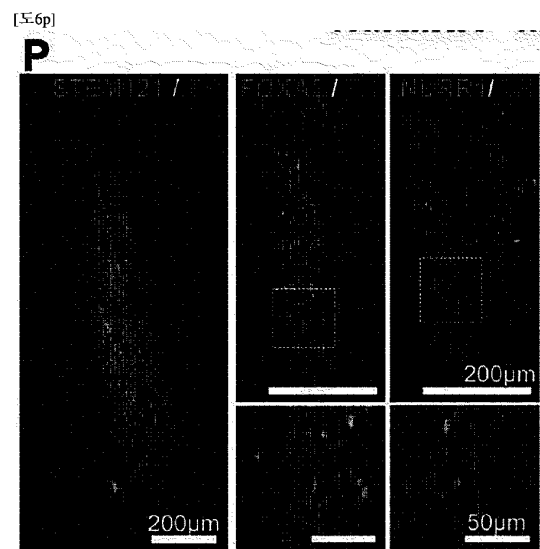
10

20

【図 6 O】



【図 6 P】

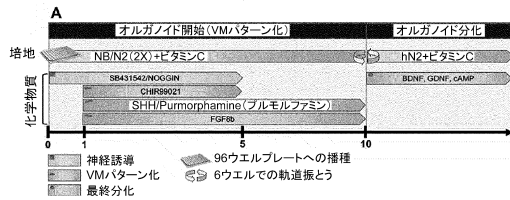


30

40

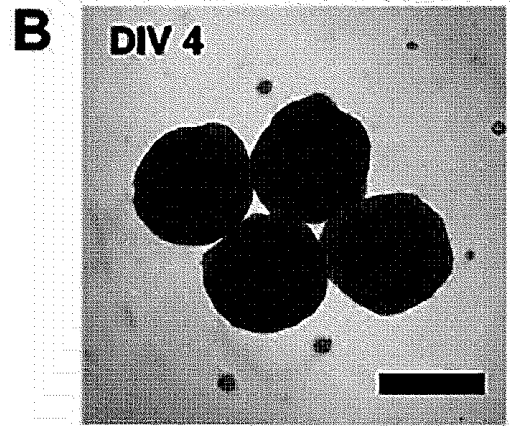
50

【図 7 A】



【図 7 B】

[図7b]

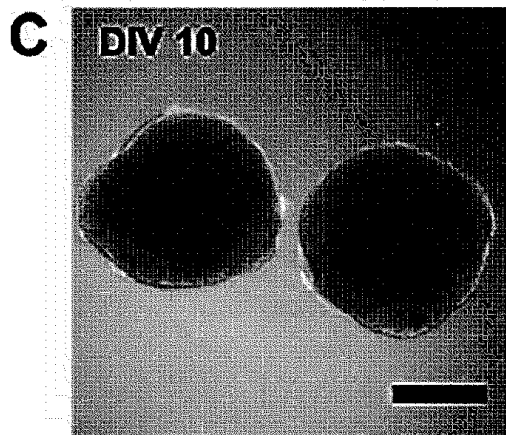


10

20

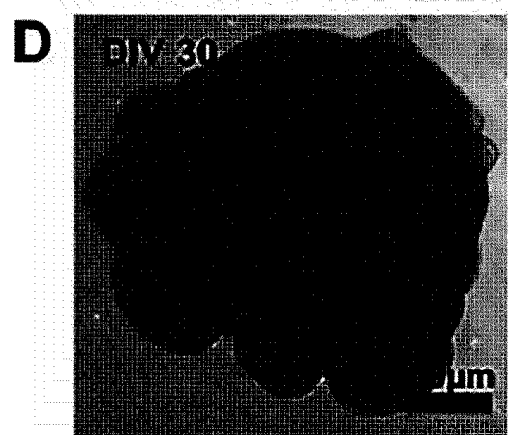
【図 7 C】

[図7c]



【図 7 D】

[図7d]



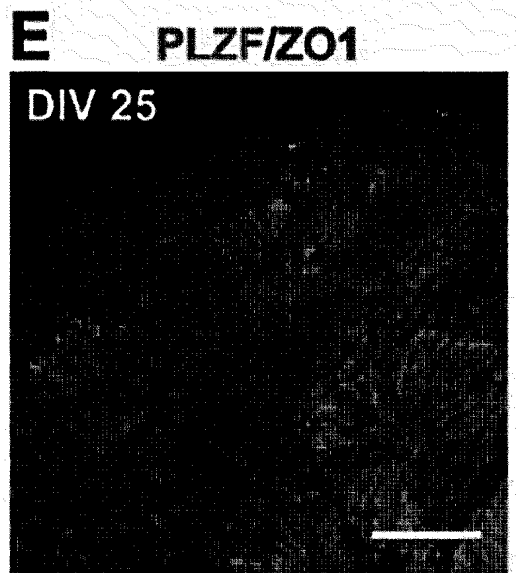
30

40

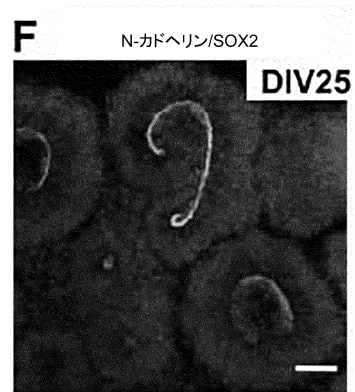
50

【図 7 E】

[図7e]



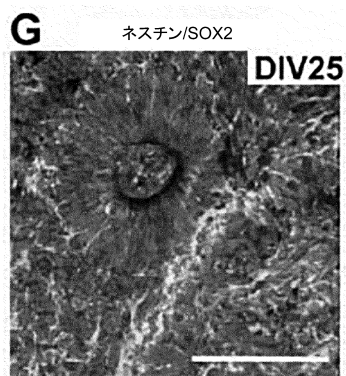
【図 7 F】



10

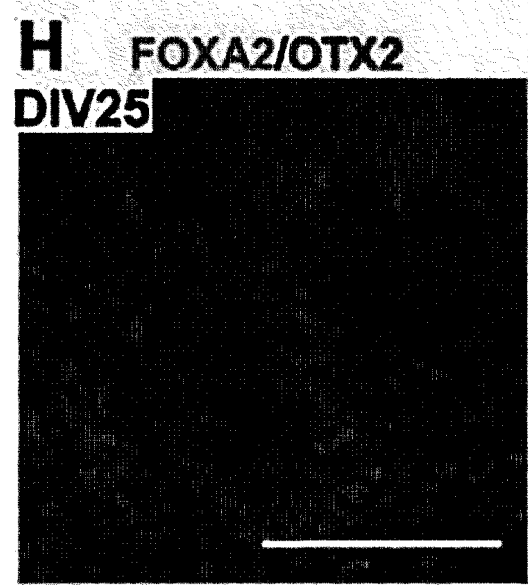
20

【図 7 G】



【図 7 H】

[図7h]



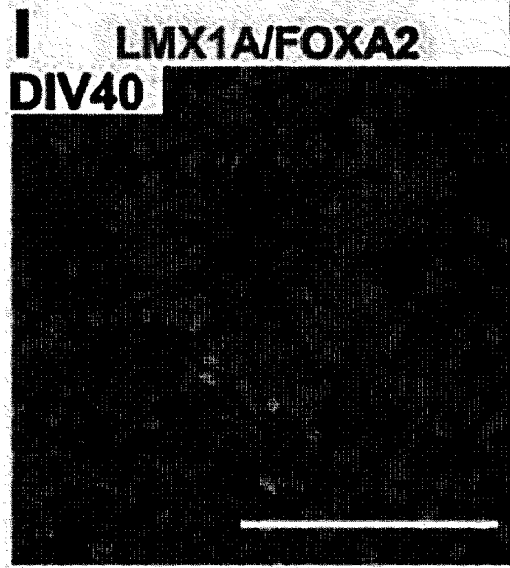
30

40

50

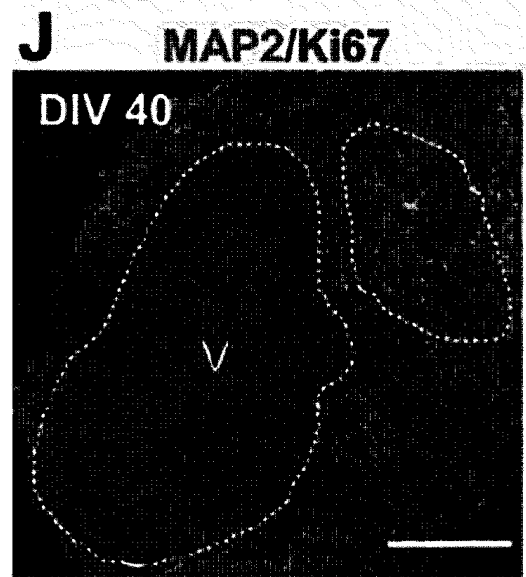
【図 7 I】

[図7i]



【図 7 J】

[図7j]

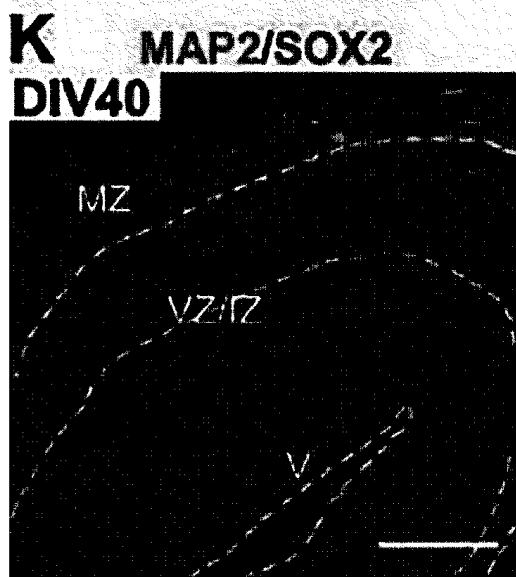


10

20

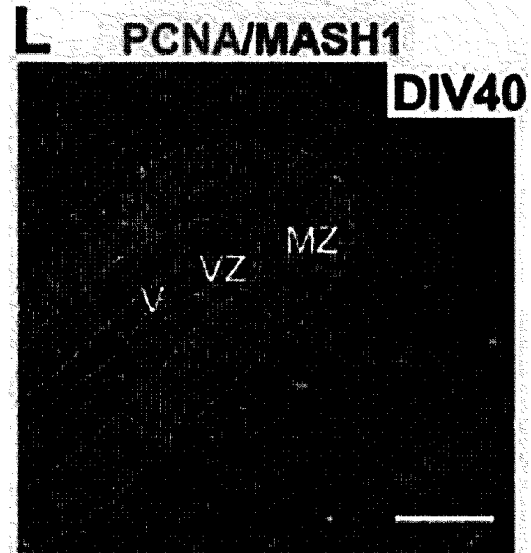
【図 7 K】

[図7k]



【図 7 L】

[図7l]



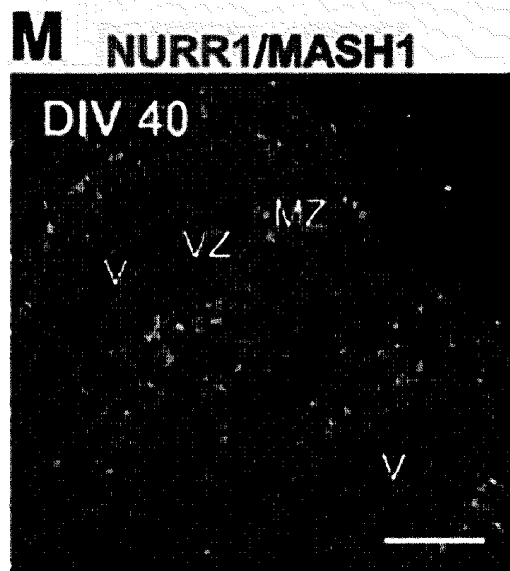
30

40

50

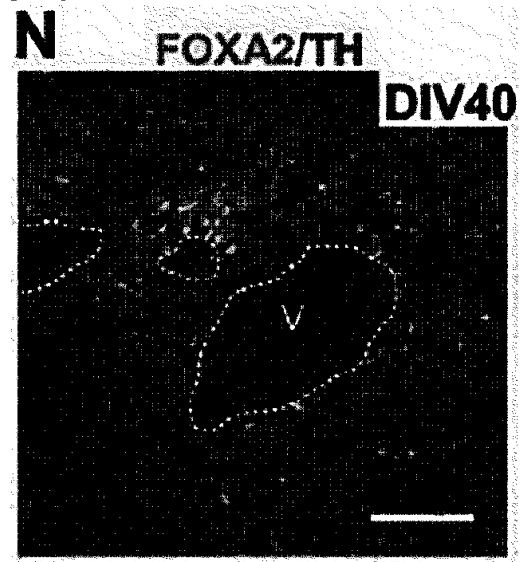
【図 7 M】

[図7m]



【図 7 N】

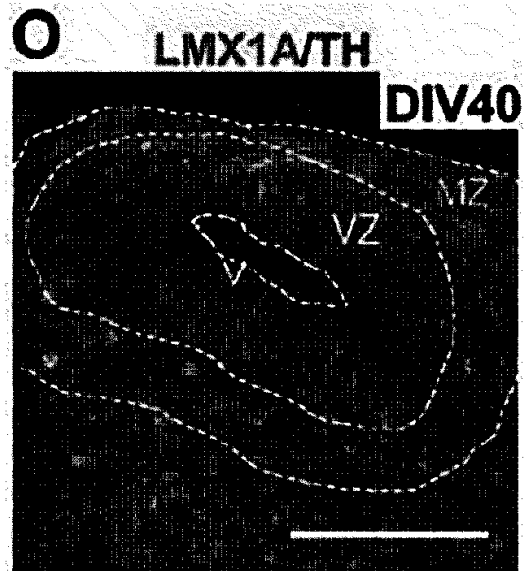
[図7n]



10

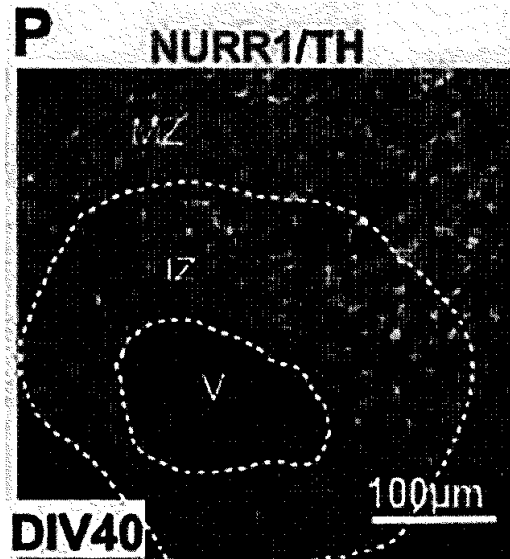
【図 7 O】

[図7o]



【図 7 P】

[図7p]



20

30

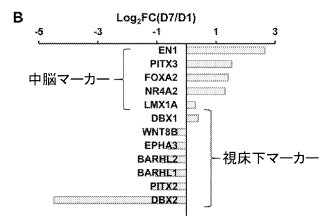
40

50

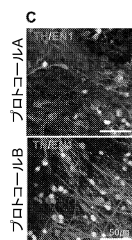
【図 8 A】



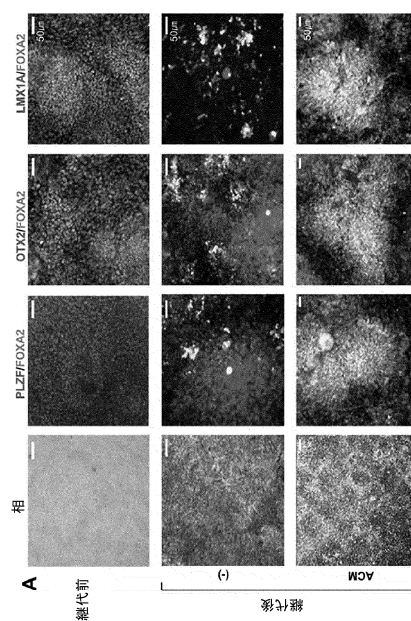
【図 8 B】



【図 8 C】



【図 9 A】



10

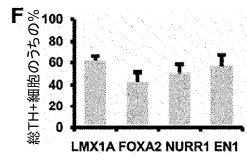
20

30

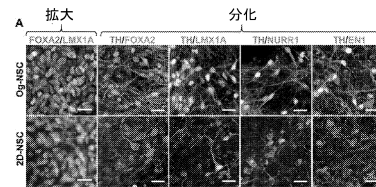
40

50

【図 9 F】



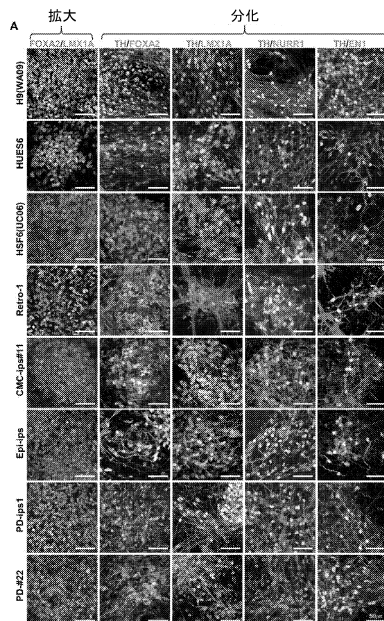
【図 1 0】



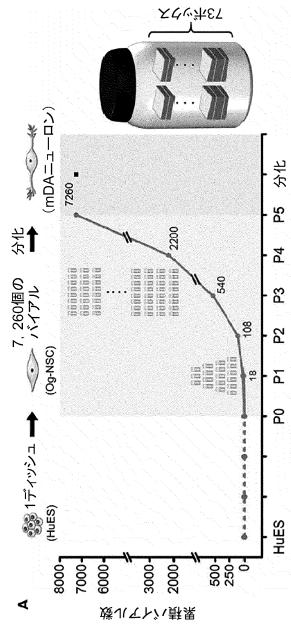
10

20

【図 1 1】



【図 1 2 A】

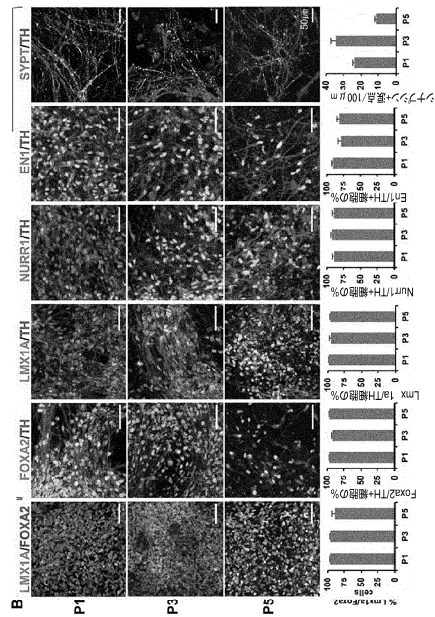


30

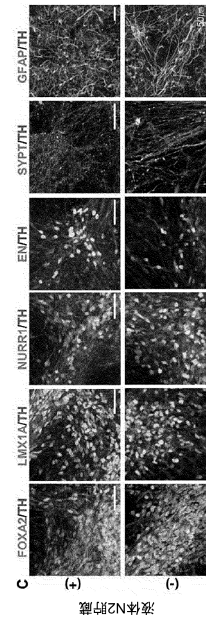
40

50

【図 1 2 B】



【図 1 2 C】

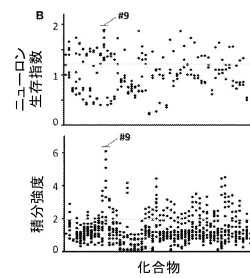
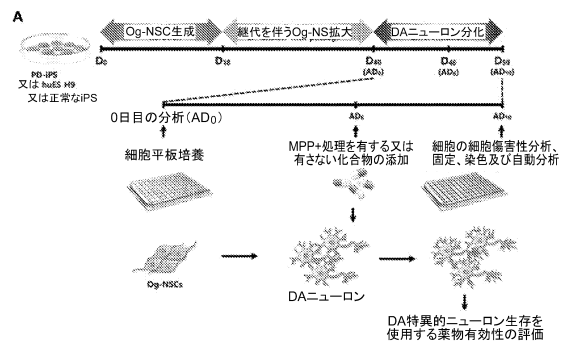


10

20

【図 1 3 A】

【図 1 3 B】

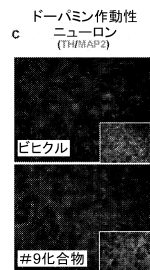


30

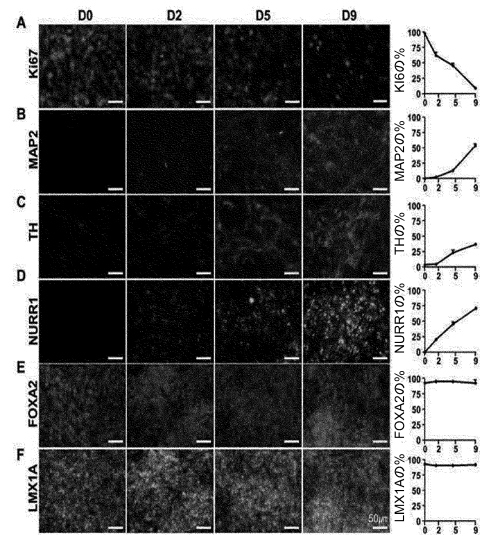
40

50

【図 13 C】



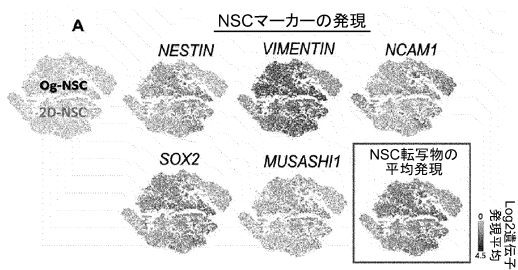
【図 14】



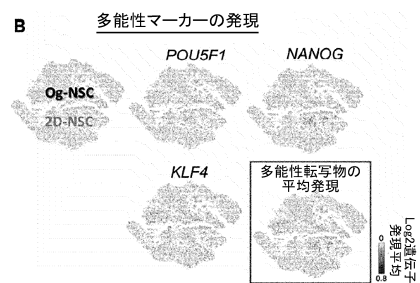
10

20

【図 15 A】



【図 15 B】

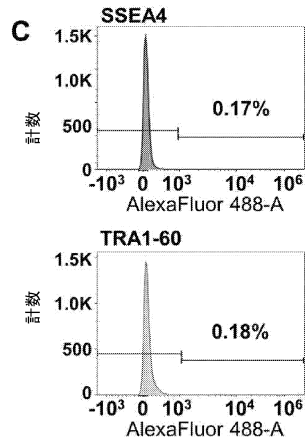


30

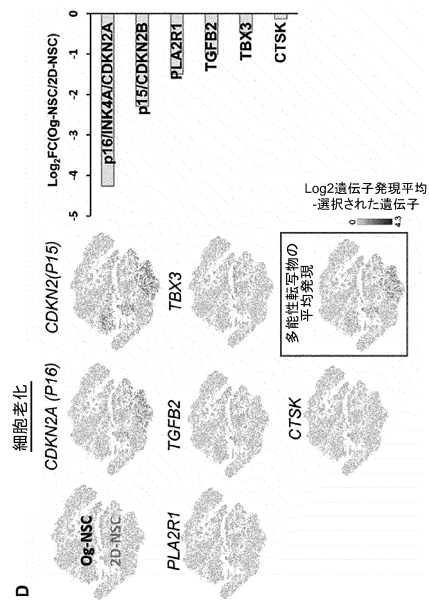
40

50

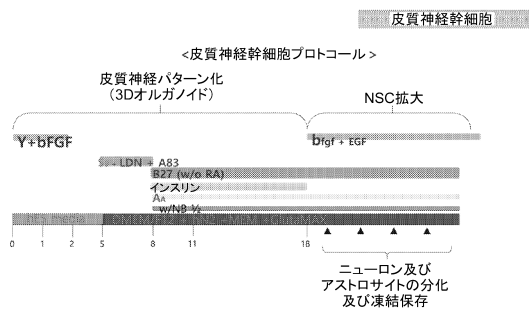
【図 15 C】



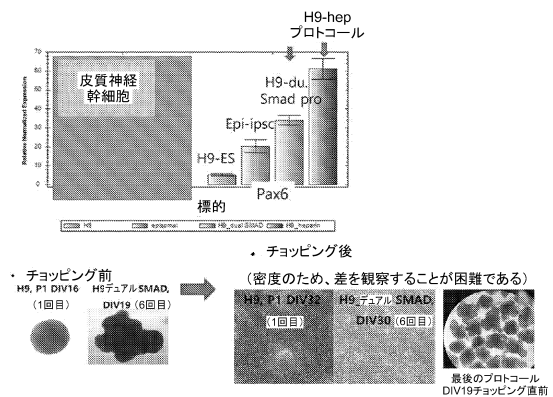
【図 15 D】



【図 16】



【図 17】



10

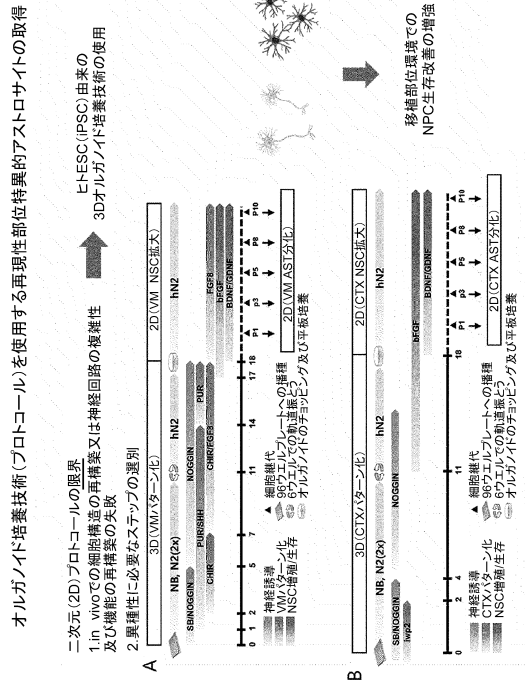
20

30

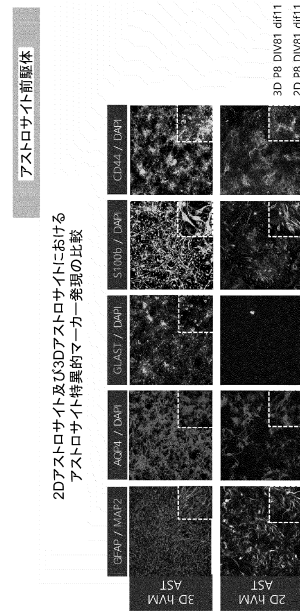
40

50

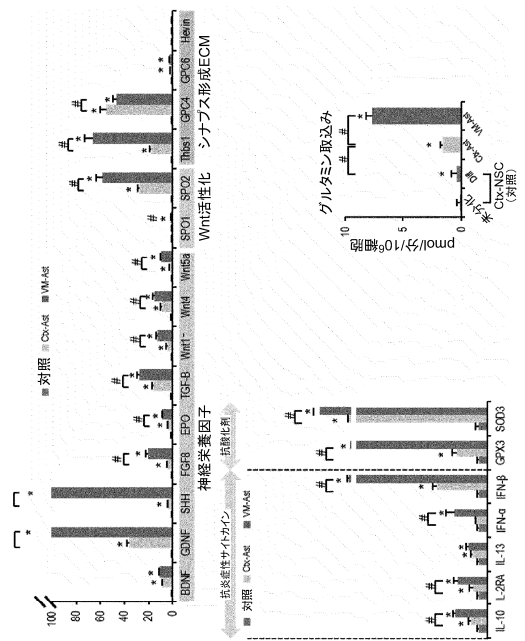
【図 18】



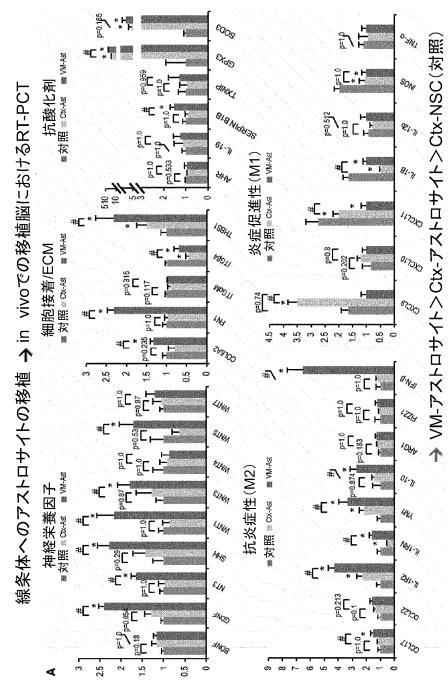
【図 19】



【図 20】

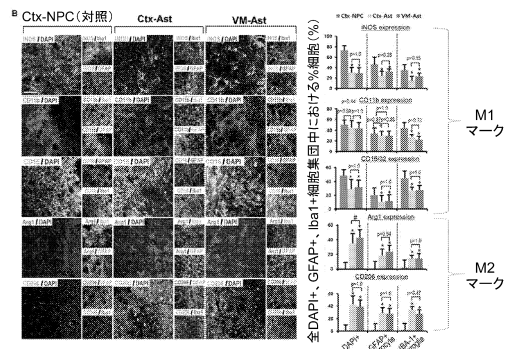


【図 2 1】



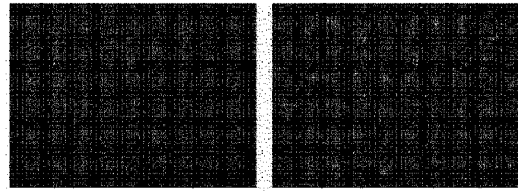
【図 2 2】

線条体へのアストロサイトの移植 → M1及びM2マーカーに対する免疫組織化学
(cont-NSC対Ctx-Ast対VM-Ast)



【図 2 3】

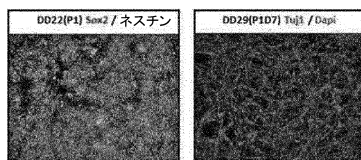
[図 23]



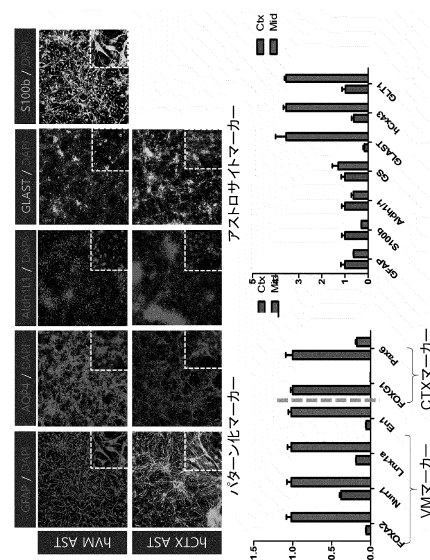
10

20

【図 2 4】



【図 2 5】

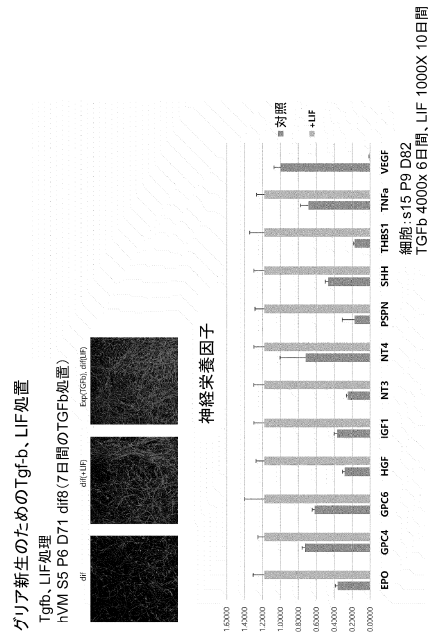


30

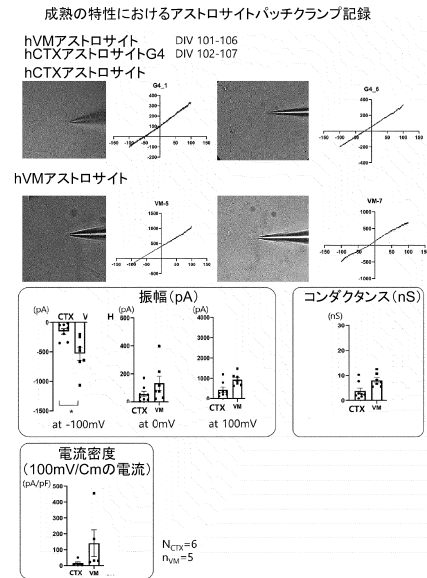
40

50

【図 26】



【図 27】

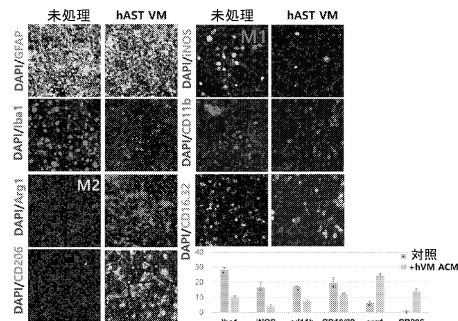


10

20

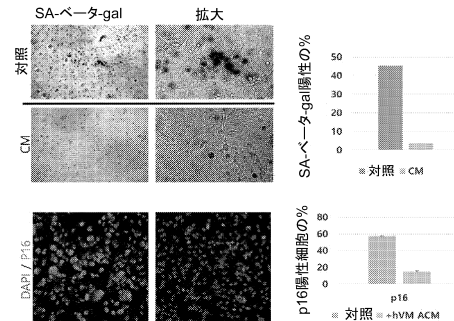
【図 28】

LPSで誘導されたヒトアストロサイトCM処理ラット混合グリアの
M1/M2マイクログリアマーカー染色



【図 29】

LPSで誘導されたヒトアストロサイトCM処理ラット
混合グリアの老化マーカー

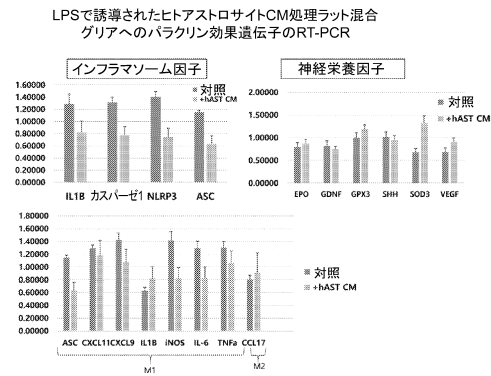


30

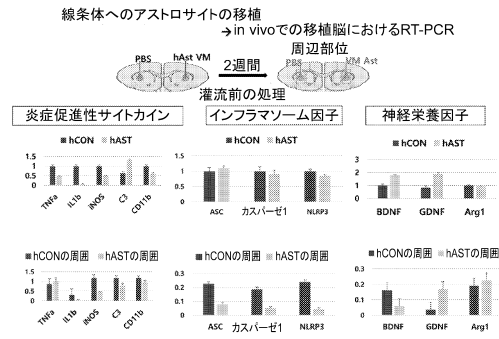
40

50

【図 3 0】

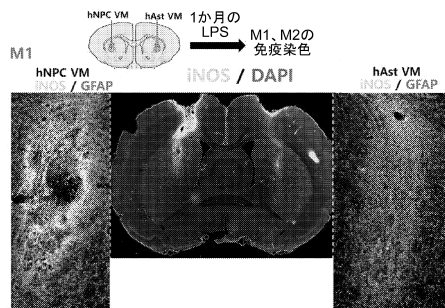


【図 3 1】

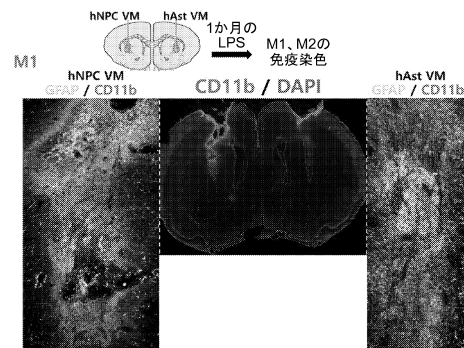


【図 3 2】

・M1/M2マーカーをin vivoで異なって発現するヒトVM
アストロサイト及び神経幹細胞の移植片



【図 3 3】



10

20

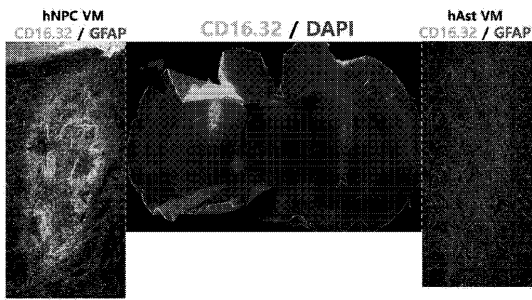
30

40

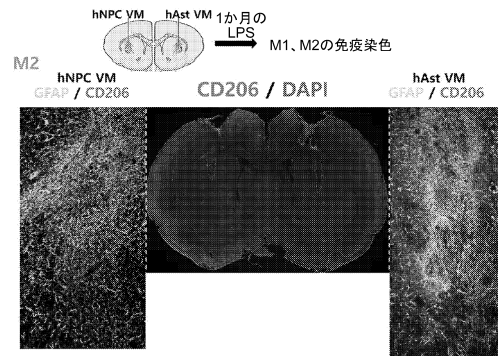
50

【図 3 4】

[34]



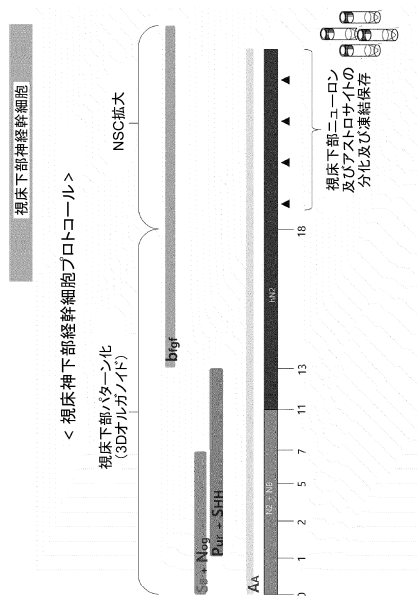
【図 3 5】



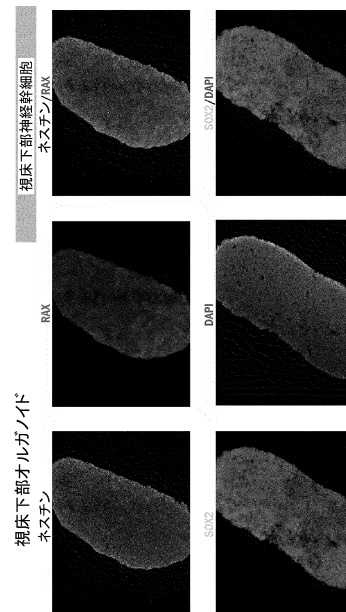
10

20

【図 3 6】



【図 3 7】

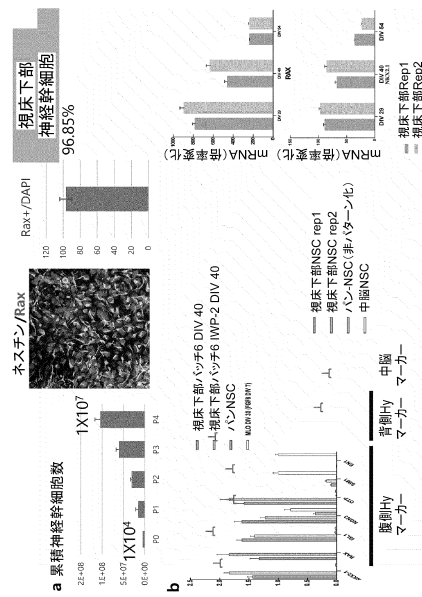


30

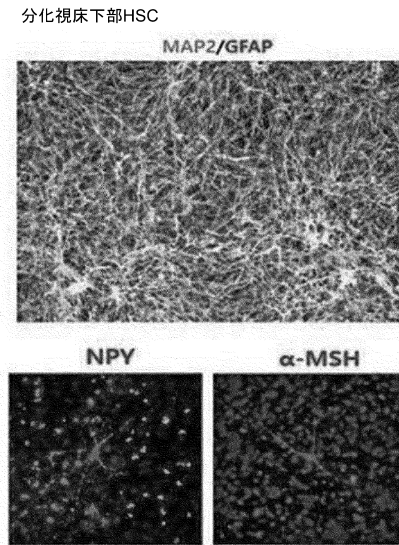
40

50

【図 3 8】



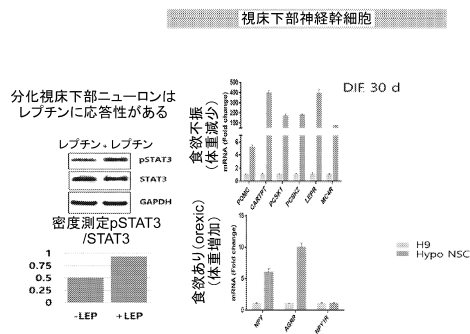
【図 3 9】



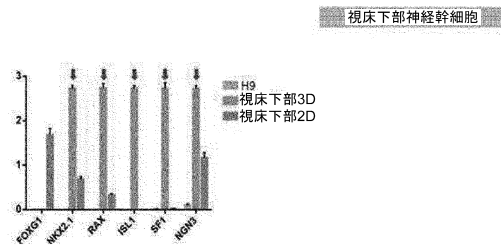
10

20

【図 4 0】



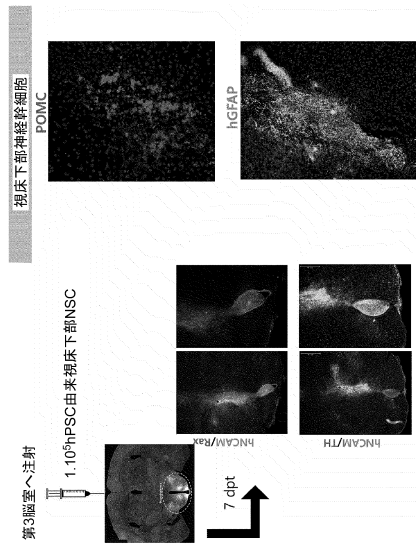
【図 4 1】



40

50

【図 4 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 リー, サン フン
大韓民国, 04763 ソウル, ソンドン-グ, ワンシムニ-ロ, 222, ハンヤン ユニバーシティ
- (72)発明者 チャン, ミ ユン
大韓民国, 04763 ソウル, ソンドン-グ, ワンシムニ-ロ, 222, ハンヤン ユニバーシティ
- (72)発明者 キム, スン ウォン
大韓民国, 03009 ソウル, チョンロ-グ, ピョンチャン 12-ギル, 8-22, 4-209 (クムカンジュテク, ピョンチャン-ドン)
- (72)発明者 ウー, ヘ ジ
大韓民国, 07206 ソウル, ヨンドウンボ-グ, ソンユロ, 53-ギル, 28-1, 401-ホ (ヤンピョン-ドン 4-ガ)
- (72)発明者 スリスティオ, ヤヌアル アラン
大韓民国, 04792 ソウル, ソンドン-グ グァンナルロ 4ダ-ギル, 9, 202ホ (ダオンハウス, ソンス-ドン2-ガ)
- 審査官 藤井 美穂
- (56)参考文献 国際公開第2019/032680 (WO, A1)
国際公開第2015/020234 (WO, A1)
特表2016-535248 (JP, A)
SCIENTIFIC REPORTS, 2017年03月27日, 7:45091, p.1-14
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 5/00