

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6580989号
(P6580989)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	5/0797 (2010.01)	C 1 2 N 5/0797
C 1 2 N	5/0793 (2010.01)	C 1 2 N 5/0793

請求項の数 11 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-532926 (P2015-532926)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月22日 (2014.8.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/072065
 (87) 国際公開番号 W02015/025967
 (87) 国際公開日 平成27年2月26日 (2015.2.26)
 審査請求日 平成29年5月12日 (2017.5.12)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-173285 (P2013-173285)
 (32) 優先日 平成25年8月23日 (2013.8.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000002093
 住友化学株式会社
 東京都中央区新川二丁目27番1号
 (73) 特許権者 503359821
 国立研究開発法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 網膜組織及び網膜関連細胞の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 霊長類多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、及び

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、Rax遺伝子を発現する細胞が出現し始めるまでの間、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程

を含む、網膜前駆細胞の製造方法。

【請求項2】

(1) 霊長類多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、Rax遺伝子を発現する細胞が出現し始めるまでの間、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程、及び

(3) 工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程

を含む網膜組織の製造方法。

【請求項 3】

(1) 霊長類多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、Rax遺伝子を発現する細胞が出現し始めるまでの間、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程、及び

(3) 工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない、無血清培地又は血清培地中で、目的とする網膜層特異的神経細胞が出現するまで浮遊培養し、目的とする網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程

を含む網膜層特異的神経細胞の製造方法。

【請求項 4】

工程(1)における多能性幹細胞の凝集体が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 細胞で形成されるものである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記霊長類多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である請求項1から4のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 6】

前記工程(1)及び工程(2)が、血清代替物存在下で行われる請求項1から5のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 7】

浮遊培養が、基底膜標品非存在下で行われる請求項1から6のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 8】

前記BMPシグナル伝達経路作用物質が、BMP2、BMP4、BMP7及びGDF7からなる群から選ばれる1以上の蛋白質である請求項1から7のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 9】

前記BMPシグナル伝達経路作用物質が、BMP4である請求項1から8のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 10】

前記BMPシグナル伝達経路作用物質が、工程(1)の浮遊培養開始から1日目から15日目までの間に培地に添加される請求項1から9のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 11】

(1) 霊長類多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、及び

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、Rax遺伝子を発現する細胞が出現し始めるまでの間、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程

を含む、網膜前駆細胞の製造方法により網膜前駆細胞を含む凝集体を得るか；

(3) 工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程

を含む網膜組織の製造方法により網膜組織を含む凝集体を得るか；あるいは

(3) 工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物

10

20

30

40

50

質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない、無血清培地又は血清培地中で、目的とする網膜層特異的神経細胞が出現するまで浮遊培養し、目的とする網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程を含む網膜層特異的神経細胞の製造方法により網膜層特異的神経細胞を含む凝集体を得て；

得られた、網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を含む凝集体に被検物質を接触させ、該物質が該細胞又は該組織に及ぼす影響を検定することを含む、該物質の毒性・薬効評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、網膜組織、並びに網膜前駆細胞及び網膜層特異的神経細胞等の網膜関連細胞の製造方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

多能性幹細胞から立体的な網膜組織を製造する方法として、均一な多能性幹細胞の凝集体を無血清培地中で形成させ、これを基底膜標品の存在下において浮遊培養した後、器官培養液中で浮遊培養することにより、多層の網膜組織を得る方法（非特許文献1及び特許文献1）、均一な多能性幹細胞の凝集体をWntシグナル経路阻害物質を含む無血清培地中で形成させ、これを基底膜標品の存在下において浮遊培養した後、血清培地中で浮遊培養することにより、多層の網膜組織を得る方法（非特許文献2及び特許文献2）が示されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2011/055855号

【特許文献2】国際公開第2013/077425号

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Nature, 472, 51-56 (2011)

30

【非特許文献2】Cell Stem Cell, 10(6), 771-785 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

多能性幹細胞から網膜組織を製造する方法の更なる開発が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、網膜組織、並びに網膜前駆細胞及び網膜層特異的神経細胞等の網膜関連細胞を多能性幹細胞から製造する方法等を提供する。

即ち、本発明は：

40

[1] (1) 多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、及び

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程

を含む、網膜前駆細胞の製造方法（以下、本発明製造方法1と記すこともある。）；

[2] (1) 多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養

50

し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程、及び

(3) 工程(2) で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程

を含む網膜組織の製造方法(以下、本発明製造方法2と記すこともある。);

[3] (1) 多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 工程(1) で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程、及び

(3) 工程(2) で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない無血清培地又は血清培地中で、目的とする網膜層特異的神経細胞が出現するまで浮遊培養し、目的とする網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程

を含む網膜層特異的神経細胞の製造方法(以下、本発明製造方法3と記すこともある。);

;

[4] 前記多能性幹細胞が霊長類多能性幹細胞である前記[1]から[3]のいずれかに記載の製造方法;

[5] 前記多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である前記[1]から[4]のいずれかに記載の製造方法;

[6] 前記工程(1)及び工程(2)が、血清代替物存在下で行われる前記[1]から[5]のいずれかに記載の製造方法;

[7] 浮遊培養が、基底膜標品非存在下で行われる前記[1]から[6]のいずれかに記載の製造方法;

[8] 前記BMPシグナル伝達経路作用物質が、BMP2、BMP4、BMP7及びGDF7からなる群から選ばれる1以上の蛋白質である前記[1]から[7]のいずれかに記載の製造方法;

[9] 前記BMPシグナル伝達経路作用物質が、工程(1)の浮遊培養開始から1日目から15日目までの間に培地に添加される前記[1]から[8]のいずれかに記載の製造方法;

[10] 前記[1]から[9]のいずれかに記載の方法により製造される網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を含有してなる、毒性・薬効評価用試薬;

[11] 前記[1]から[9]のいずれかに記載の方法により製造される網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞に被検物質を接触させ、該物質が該細胞又は該組織に及ぼす影響を検定することを含む、該物質の毒性・薬効評価方法;

[12] 前記[1]から[9]のいずれかに記載の方法により製造される網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を含有してなる、網膜組織の障害に基づく疾患の治療剤;

[13] 前記[1]から[9]のいずれかに記載の方法により製造される、有効量の網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を、移植を必要とする対象に移植することを含む、網膜組織の障害に基づく疾患の治療方法;及び

[14] 網膜組織の障害に基づく疾患の治療における使用のための前記[1]から[9]のいずれかに記載の方法により製造される網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞;

等を提供する。

【発明の効果】

【0007】

本発明の製造方法によれば、網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を高

10

20

30

40

50

効率に製造することが可能となる。本発明の製造方法においては、基底膜標品を培地中に添加することなく、すなわち基底膜標品非存在下に凝集体を浮遊培養して、網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を得ることが可能であるので、得られた細胞または組織への異種由来成分の混入のリスクが低減される。本発明の製造方法によれば、化学物質等の毒性または薬効評価や移植治療などを目的として、網膜組織、又は網膜前駆細胞もしくは網膜層特異的神経細胞等の網膜関連細胞を効率よく提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、BMPシグナル伝達経路作用物質を培地に添加せずに浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始18日目の明視野像(A)と蛍光像(B)、浮遊培養開始3日目にBMP2を100ng/mlとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始18日目の明視野像(C)と蛍光像(D)、浮遊培養開始3日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始18日目の明視野像(E)と蛍光像(F)、浮遊培養開始3日目にBMP7を100ng/mlとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始18日目の明視野像(G)と蛍光像(H)、及び、浮遊培養開始3日目にGDF7を100ng/mlとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始18日目の明視野像(I)と蛍光像(J)を示す図である。

【図2】図2は、BMPシグナル伝達経路作用物質を培地に添加せずに浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始26日目の明視野像(A)、蛍光像(B)及びFACSヒストグラム(C)、浮遊培養開始(0日目)と同時にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始26日目の明視野像(D)、蛍光像(E)及びFACSヒストグラム(F)、浮遊培養開始1日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始26日目の明視野像(G)、蛍光像(H)及びFACSヒストグラム(I)、浮遊培養開始2日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始26日目の明視野像(J)、蛍光像(K)及びFACSヒストグラム(L)、並びに、浮遊培養開始3日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始26日目の明視野像(M)、蛍光像(N)及びFACSヒストグラム(O)である。

【図3】図3は、BMP4シグナル伝達経路作用物質を培地に添加せずに浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始24日目の明視野像(A)と蛍光像(B)、浮遊培養開始6日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始24日目の明視野像(C)と蛍光像(D)、浮遊培養開始9日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始24日目の明視野像(E)と蛍光像(F)、浮遊培養開始12日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始24日目の明視野像(G)と蛍光像(H)、及び、浮遊培養開始15日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の浮遊培養開始24日目の明視野像(I)と蛍光像(J)を示す図である。

【図4】図4は、浮遊培養開始3日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して浮遊培養開始26日目まで浮遊培養したRAX::GFPノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の凍結切片の、GFP蛍光像(A)、抗Chx10抗体を用いた蛍光免疫染色像(B)及びHoechst染色像(C)を示す図である。

【図5】図5は、浮遊培養開始3日目にBMP4を1.5nMとなるよう培地に添加して

10

20

30

40

50

浮遊培養開始 117 日目まで浮遊培養した RAX::GFP ノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の凍結切片の、抗 Recoverin 抗体を用いた免疫染色像 (A)、抗 Nr1 抗体を用いた免疫染色像 (B)、抗 R X R - g a m m a 抗体を用いた免疫染色像 (C)、抗 Chx10 抗体を用いた免疫染色像 (D)、抗 Calretinin 抗体を用いた免疫染色像 (E)、及び、抗 Calbindin 抗体を用いた免疫染色像 (F) を示す図である。

【図 6】図 6 は、浮遊培養開始 6 日目に BMP4 を 1.5 nM となるよう培地に添加して浮遊培養開始 50 日目まで浮遊培養した RAX::GFP ノックインヒト胚性幹細胞由来凝集体の凍結切片の、抗 Chx10 抗体を用いた免疫染色像 (A)、抗 Pax6 抗体を用いた免疫染色像 (B)、抗 Crx 抗体を用いた免疫染色像 (C)、及び、抗 Brn3b 抗体を用いた免疫染色像 (D) を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。

【0010】

本発明における「ベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターを意味する。このようなベクターとしては、例えば、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体又は植物個体等の宿主細胞において自律複製が可能であるベクター、宿主細胞の染色体中への組込みが可能であるベクター、及びポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているベクター等を挙げることができる。

20

このようなベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」と記すこともある。クローニングベクターとしては、通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含むベクターを挙げることができ、例えば、「Molecular Cloning (3rd edition)」 by Sambrook, J and Russell, D.W., Appendix 3 (Volume 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor USA, 2001) に記載されたベクターを挙げることができる。

【0011】

本発明における「ベクター」は、「発現ベクター」及び「レポーターベクター」も含む。「発現ベクター」には、構造遺伝子及びその発現を調節するプロモーターに加えて、種々の調節エレメントが宿主細胞の中で作動し得る状態で連結されていてもよい。「レポーターベクター」には、レポーター遺伝子及びその発現を調節するプロモーターに加えて、種々の調節エレメントが宿主細胞の中で作動し得る状態で連結されていてもよい。「調節エレメント」としては、例えば、ターミネーター、又は、エンハンサーを挙げることができる。「発現ベクター」及び「レポーターベクター」には、さらに薬剤耐性遺伝子のような選択マーカー遺伝子が含まれ得る。

30

【0012】

「クローニングベクター」としては、例えば、(a) ゲノムライブラリーの作製のためにはファージベクターであるラムダFIXベクター、(b) cDNAライブラリーの作製のためにはファージベクターであるラムダZAPベクター、(c) ゲノムDNAをクローニングするためには、pBluescript II SK+/-、pGEM、又はpCR2.1ベクター等のプラスミドベクターを挙げることができる。「発現ベクター」としては、例えば、pSV2/neoベクター、pcDNAベクター、pUC18ベクター、pUC19ベクター、pRc/RSVベクター、pLenti6/V5-Destベクター、pAd/CMV/V5-DESTベクター、pDON-AI-2/neoベクター、又はpMEI-5/neoベクター等のプラスミドベクターを挙げることができる。「レポーターベクター」としては、例えば、pGL2ベクター、pGL3ベクター、pGL4.10ベクター、pGL4.11ベクター、pGL4.12ベクター、pGL4.70ベクター、pGL4.71ベクター、pGL4.72ベクター、pSLGベクター、pSLOベクター、pSLRベクター、pEGFPベクター、pAcGFPベクター、又はpDsRedベクターを挙げることができる。このようなベクターは、前述のMolecular Cloning誌を参考にして適宜利用すればよい。

40

【0013】

50

核酸分子を細胞内に導入する技術としては、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクション等を挙げることができる。このような導入技術としては、例えば、Ausubel F. A.ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, NY; Sambrook J.ら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook J.ら(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 又は別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997; 等に記載される方法を挙げることができる。遺伝子が細胞内に導入されたことを確認する技術としては、例えば、ノーザンブロット分析又はウェスタンブロット分析を挙げることができる。

10

【0014】

本発明における「浮遊培養」とは、細胞または細胞塊を培養器材等に接着させない条件で培養することをいう。

浮遊培養を行う際に用いられる培養器は、「浮遊培養する」ことが可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このような培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、又はローラーボトルが挙げられる。これらの培養器は、浮遊培養を可能とするために、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理(例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理)されていないものなどを使用できる。

20

【0015】

本発明において細胞の培養に用いられる培地は、動物細胞の培養に通常用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、MEM培地、DMEM培地、F-12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、又はこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地を挙げることができる。

30

【0016】

本発明における「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。本発明では、精製された血液由来成分や動物組織由来成分(例えば、増殖因子)が混入している培地も、無調整又は未精製の血清を含まない限り無血清培地に含まれる。

【0017】

無血清培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'-チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものを挙げることができる。かかる血清代替物は、例えば、WO98/30679に記載の方法により調製することができる。血清代替物としては市販品を利用してもよい。かかる市販の血清代替物としては、例えば、Knockout™ Serum Replacement (Invitrogen社製: 以下、KSRと記すこともある。)、Chemically defined lipid concentrate (Gibco社製)、Glutamax™ (Gibco社製)が挙げられる。

40

【0018】

浮遊培養で用いる無血清培地は、脂肪酸又は脂質、アミノ酸(例えば、非必須アミノ酸)、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を含有してもよい。

【0019】

調製の煩雑さを回避するために、かかる無血清培地として、市販のKSRを適量(例え

50

ば、約1%から約20%)添加した無血清培地(例えば、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR及び450 μ M1-モノチオグリセロールを添加した培地)を使用してもよい。

【0020】

本発明における「血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含む培地を意味する。当該培地は、脂肪酸又は脂質、アミノ酸(例えば、非必須アミノ酸)、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、1-モノチオグリセロール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を含含有してもよい。

【0021】

本発明における「基底膜標品」とは、その上に基底膜形成能を有する所望の細胞を播種して培養した場合に、上皮細胞様の細胞形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜構成成分を含むものをいう。ここで、「基底膜構成成分」とは、動物の組織において、上皮細胞層と間質細胞層などとの間に存在する薄い膜状をした細胞外マトリックス分子をいう。基底膜標品は、例えば基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶液やアルカリ溶液などを用いて支持体から除去することで作製することができる。基底膜標品としては、基底膜調製物として市販されている商品(例えば、MatrigelTM(ベクトン・ディッキンソン社製:以下、マトリゲルと記すこともある))や、基底膜成分として公知の細胞外マトリックス分子(例えば、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、

10

20

エンタクチンなど)を含むものが挙げられる。MatrigelTMは、Engelbreth Holm Swarm(EHS)マウス肉腫から抽出された基底膜調製物である。MatrigelTMの主成分はIV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン及びエンタクチンであり、これらに加えてTGF- β 、線維芽細胞増殖因子(FGF)、組織プラスミノゲン活性化因子及びEHS腫瘍が天然に産生する増殖因子が含まれる。MatrigelTMの「growth factor reduced製品」は、通常のMatrigelTMよりも増殖因子の濃度が低く、その標準的な濃度はEGFが<0.5ng/ml、NGFが<0.2ng/ml、PDGFが<5pg/ml、IGF-1が5ng/ml、TGF- β が1.7ng/mlである。

【0022】

本発明において、「物質Xを含む培地」とは、外因性(exogenous)の物質Xが添加された培地または外因性の物質Xを含む培地を意味し、「物質Xを含まない培地」とは、外因性の物質Xが添加されていない培地または外因性の物質Xを含まない培地を意味する。ここで、「外因性の物質X」とは、その培地で培養される細胞または組織にとって外来の物質Xを意味し、その細胞または組織が産生する内在性(endogenous)の物質Xはこれに含まれない。

30

例えば、「BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地」とは、外因性のBMPシグナル伝達経路作用物質が添加された培地または外因性のBMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地である。「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まない培地」とは、外因性のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が添加されていない培地または

40

【0023】

本発明における「霊長類」とは、霊長目に属するほ乳類動物をいい、霊長類としては、キツネザルやロリス、ツバイなどの原猿亜目と、サル、類人猿、ヒトなどの真猿亜目が挙げられる。

【0024】

本発明における「幹細胞」とは、細胞分裂を経ても同じ分化能を維持する細胞のことであり、組織が傷害を受けたときにその組織の再生に寄与することができる。幹細胞としては、胚性幹細胞(以下、ES細胞と記すこともある。)もしくは組織幹細胞(組織性幹細胞、組織特異的幹細胞又は体性幹細胞とも呼ばれる)、又は人工多能性幹細胞(iPS細胞

50

: induced pluripotent stem cell) が挙げられる。上記の幹細胞由来の組織細胞は、組織再生が可能なることから分かるように、生体に近い正常な細胞に分化できることが知られている。

幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞である K h E S - 1、K h E S - 2 及び K h E S - 3 は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。いずれもマウス胚性幹細胞である、E B 5 細胞は独立行政法人理化学研究所より、D 3 株は A T C C より、入手可能である。

幹細胞は、自体公知の方法により維持培養できる。例えば、ヒト幹細胞は、K n o c k o u t ^{T M} S e r u m R e p l a c e m e n t (Invitrogen社) を添加した培地で培養することにより維持できる。マウス幹細胞は、ウシ胎児血清 (F C S) 及び L e u k e m i a I n h i b i t o r y F a c t o r (L I F) を添加し無フィーダー下に培養することにより維持できる。

10

【 0 0 2 5 】

本発明における「多能性幹細胞」とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、胎盤を除く生体を構成するすべての細胞 (三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) 由来の組織) に分化しうる能力 (多能性 (p l u r i p o t e n c y)) を有する幹細胞をいう。胚性幹細胞 (E S 細胞) も「多能性幹細胞」に含まれる。「多能性幹細胞」は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞又は組織内幹細胞から得られる。体細胞に数種類の遺伝子を導入することにより、胚性幹細胞に似た多能性を人工的に持たせた細胞 (人工多能性幹細胞とも呼ばれる) も「多能性幹細胞」に含まれる。多能性幹細胞は、自体公知の方法で作製することが可能である。作製方法としては、例えば人工多能性幹細胞であれば、C e l l , 2 0 0 7 , 1 3 1 (5) p p . 8 6 1 - 8 7 2 や、C e l l , 2 0 0 6 , 1 2 6 (4) p p . 6 6 3 - 6 7 6 に記載される方法が挙げられる。

20

【 0 0 2 6 】

本発明における「胚性幹細胞 (E S 細胞) 」とは、自己複製能を有し、多分化能 (特に多能性「pluripotency」) を有する幹細胞であり、初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。

【 0 0 2 7 】

本発明における「人工多能性幹細胞」とは、線維芽細胞等の分化した細胞をOct3/4、Sox2、Klf4、Myc等の数種類の遺伝子の発現により直接初期化するなどして多分化能を誘導した細胞である。2006年、山中らによりマウス細胞で人工多能性幹細胞が樹立された (C e l l , 2 0 0 6 , 1 2 6 (4) p p . 6 6 3 - 6 7 6) 。人工多能性幹細胞は、2007年にヒト線維芽細胞でも樹立され、胚性幹細胞と同様に分化多能性を有する (C e l l , 2 0 0 7 , 1 3 1 (5) p p . 8 6 1 - 8 7 2 ; S c i e n c e , 2 0 0 7 , 3 1 8 (5 8 5 8) p p . 1 9 1 7 - 1 9 2 0 ; N a t . B i o t e c h n o l . , 2 0 0 8 , 2 6 (1) p p . 1 0 1 - 1 0 6) 。

30

【 0 0 2 8 】

遺伝子改変された多能性幹細胞は、例えば、相同組換え技術を用いることにより作製できる。改変される染色体上の遺伝子としては、例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子、神経系細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などがあげられる。染色体上の標的遺伝子の改変は、M a n i p u l a t i n g t h e M o u s e E m b r y o , A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s (1 9 9 4) ; G e n e T a r g e t i n g , A P r a c t i c a l A p p r o a c h , I R L P r e s s a t O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s (1 9 9 3) ; バイオマニュアルシリーズ 8 , ジーンターゲティング, E S 細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1 9 9 5) ; 等に記載の方法を用いて行うことができる。

40

【 0 0 2 9 】

具体的には、例えば、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など) のゲノム遺伝子を単離し、単離されたゲノム遺伝子

50

を用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。作製されたターゲットベクターを幹細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子が改変された幹細胞を作製することができる。

【0030】

標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 - 1997) 等に記載された公知の方法があげられる。ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 製) や Universal GenomeWalker Kits (CLONTECH 製) などを用いることにより、標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離することもできる。

10

【0031】

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターの作製、及び相同組換え体の効率的な選別は、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995); 等に記載の方法にしたがって行うことができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型又はインサクション型のいずれでも用いることができる。選別方法としては、ポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、又はポリA選択などの方法を用いることができる。

20

選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法やPCR法等があげられる。

【0032】

本発明における「凝集体」とは、培地中に分散していた細胞が集合して形成した塊をいう。本発明における「凝集体」には、浮遊培養開始時に分散していた細胞が形成した凝集体と浮遊培養開始時に既に形成されていた凝集体とが含まれる。

「凝集体を形成させる」とは、細胞を集合させて細胞の凝集体を形成させ浮遊培養する際に、「一定数の分散した細胞を迅速に凝集」させることで質的に均一な細胞の凝集体を形成させることをいう。

30

本発明においては、多能性幹細胞を迅速に集合させて多能性幹細胞の凝集体を形成させることが好ましい。このように多能性幹細胞の凝集体を形成させると、形成された凝集体から分化誘導される細胞において上皮様構造を再現性よく形成させることができる。

凝集体を形成させる実験的な操作としては、例えば、ウェルの小さなプレート (96穴プレート) やマイクロポアなどを用いて小さいスペースに細胞を閉じ込める方法、小さな遠心チューブを用いて短時間遠心することで細胞を凝集させる方法が挙げられる。

多能性幹細胞の凝集体が形成されたことや、凝集体を形成する各細胞において上皮様構造が形成されたことは、凝集体のサイズおよび細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態およびその均一性、分化および未分化マーカーの発現およびその均一性、分化マーカーの発現制御およびその同期性、分化効率の凝集体間の再現性などにに基づき判断することが可能である。

40

【0033】

本発明における「組織」とは、形態や性質が異なる複数種類の細胞が一定のパターンで立体的に配置した構造を有する細胞集団の構造体をさす。

【0034】

本発明における「網膜組織」とは、生体網膜において各網膜層を構成する視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜節細胞、これらの前駆細胞、または網膜前駆細胞などの細胞が、少なくとも複数種類、層状で立体的に配列した網膜組織を意味する。それぞれの細胞がいずれの網膜層を構成する細胞であるかは、公知の方法、例えば細胞マーカー

50

一の発現有無若しくはその程度等により確認できる。

【0035】

本発明における「網膜層」とは、網膜を構成する各層を意味し、具体的には、網膜色素上皮層、視細胞層、外境界膜、外顆粒層、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、神経線維層および内境界膜を挙げることができる。

【0036】

本発明における「網膜層特異的神経細胞」とは、網膜層を構成する細胞であって網膜層に特異的な神経細胞を意味する。網膜層特異的神経細胞としては、双極細胞、節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、視細胞、色素上皮細胞、杆体細胞及び錐体細胞を挙げることができる。

10

【0037】

本発明における「網膜前駆細胞」とは、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜節細胞、網膜色素上皮細胞のいずれの成熟な網膜細胞にも分化しうる前駆細胞をいう。

視細胞前駆細胞、水平細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞、アマクリン細胞前駆細胞、網膜節細胞前駆細胞、網膜色素上皮前駆細胞とは、それぞれ、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜節細胞、網膜色素上皮細胞への分化が決定付けられている前駆細胞をいう。

【0038】

網膜細胞マーカーとしては、網膜前駆細胞で発現するRax及びPAX6、視床下部ニューロンの前駆細胞では発現するが網膜前駆細胞では発現しないNkx2.1、視床下部神経上皮で発現し網膜では発現しないSox1、視細胞の前駆細胞で発現するCrxなどが挙げられる。網膜層特異的神経細胞のマーカーとしては、双極細胞で発現するChx10及びL7、節細胞で発現するTuj1及びBrn3、アマクリン細胞で発現するCalretinin、水平細胞で発現するCalbindin、視細胞で発現するRhodopsin及びRecoverin、色素上皮細胞で発現するRPE65及びMitf、杆体細胞で発現するNrl、錐体細胞で発現するRxr-gammaなどが挙げられる。

20

【0039】

本発明製造方法1は、下記工程(1)及び(2)を含む網膜前駆細胞の製造方法である：

30

(1)多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、及び

(2)工程(1)で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程。

【0040】

多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる工程(1)について説明する。

【0041】

工程(1)において用いられる無血清培地は、上述したようなものである限り特に限定されない。例えば、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路阻害物質がいずれも添加されていない無血清培地を使用することができる。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地(例えば、IMDMとF-12の1:1の混合液に10%KSR、450µM1-モノチオグリセロール及び1xChemically Defined Lipid Concentrateが添加された培地)を使用することが好ましい。無血清培地へのKSRの添加量としては、例えばヒトES細胞の場合は、通常約1%から約20%であり、好ましくは約2%から約20%である。

40

工程(1)における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30から約40、好ましくは約37である。CO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。

50

【 0 0 4 2 】

工程(1)における多能性幹細胞の濃度は、多能性幹細胞の凝集体をより均一に、効率的に形成させるように適宜設定することができる。例えば96穴マイクロウェルプレートを用いてヒトES細胞を浮遊培養する場合、1ウェルあたり約 1×10^3 から約 1×10^5 細胞、好ましくは約 3×10^3 から約 5×10^4 細胞、より好ましくは約 5×10^3 から約 3×10^4 細胞、最も好ましくは約 1.2×10^4 細胞となるように調製した液をウェルに添加し、プレートを静置して凝集体を形成させる。

【 0 0 4 3 】

凝集体を形成させるために必要な浮遊培養の時間は、細胞を均一に凝集させるように、用いる多能性幹細胞によって適宜決定可能であるが、均一な凝集体を形成するためにはできる限り短時間であることが望ましい。例えば、ヒトES細胞の場合には、好ましくは約24時間以内、より好ましくは約12時間以内に凝集体を形成させる。この凝集体形成までの時間は、細胞を凝集させる用具や、遠心条件などを調整することにより適宜調節することが可能である。

10

多能性幹細胞の凝集体が形成されたことは、凝集体のサイズおよび細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態およびその均一性、分化および未分化マーカーの発現およびその均一性、分化マーカーの発現制御およびその同期性、分化効率の凝集体間の再現性などに基き判断することが可能である。

【 0 0 4 4 】

工程(1)で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る工程(2)について説明する。

20

【 0 0 4 5 】

工程(2)において用いられる培地は、例えば、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が添加されておらずBMPシグナル伝達経路作用物質が添加された無血清培地又は血清培地であり、基底膜標品を添加する必要は無い。

かかる培地に用いられる無血清培地又は血清培地は、上述したようなものである限り特に限定されない。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地(例えば、IMDMとF-12の1:1の混合液に10%KSR、 $450 \mu\text{M}$ 1-モノチオグリセロール及び $1 \times$ Chemically Defined Lipid Concentrateが添加された培地)を使用することが好ましい。無血清培地へのKSRの添加量としては、例えばヒトES細胞の場合は、通常約1%から約20%であり、好ましくは約2%から約20%である。

30

工程(2)で用いられる無血清培地は、工程(1)で用いた無血清培地がソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まない限り、当該培地をそのまま用いることもできるし、新たな無血清培地に置き換えることもできる。工程(1)で用いた、BMPシグナル伝達経路作用物質を含まない無血清培地をそのまま工程(2)に用いる場合、BMPシグナル伝達経路作用物質を培地中に添加すればよい。

【 0 0 4 6 】

ソニック・ヘッジホッグ(以下、Shhと記すことがある。)シグナル伝達経路作用物質とは、Shhにより媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質である。Shhシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、Hedgehogファミリーに属する蛋白(例えば、Shh)、Shh受容体、Shh受容体アゴニスト、Purmorphamine、又はSAGなどが挙げられる。

40

「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まない」培地には、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を実質的に含まない培地、例えば、網膜前駆細胞及び網膜組織への選択的分化に不利な影響を与える程度の濃度のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含有しない培地、も含まれる。

「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が添加されていない」培地には、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が実質的に添加されていない培地、例えば、網膜前駆細胞及び網膜組織への選択的分化に不利な影響を与える程度の濃度のソニ

50

ック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が添加されていない培地、も含まれる。

【0047】

BMPシグナル伝達経路作用物質とは、BMPにより媒介されるシグナル伝達経路を増強し得る物質である。BMPシグナル伝達経路作用物質としては、例えばBMP2、BMP4もしくはBMP7等のBMP蛋白、GDF7等のGDF蛋白、抗BMP受容体抗体、又は、BMP部分ペプチドなどが挙げられる。BMP2蛋白、BMP4蛋白及びBMP7蛋白は例えばR&D Systemsから、GDF7蛋白は例えば和光純薬から入手可能である。

BMPシグナル伝達経路作用物質の濃度は、多能性幹細胞の凝集体を形成する細胞の網膜細胞への分化を誘導可能な濃度であればよい。例えばBMP4の場合は、約0.01nMから約1μM、好ましくは約0.1nMから約100nM、より好ましくは約1.5nMの濃度となるように培地に添加する。

【0048】

BMPシグナル伝達経路作用物質は、工程(1)の浮遊培養開始から約24時間後以降に添加されていけばよく、浮遊培養開始後数日以内(例えば、15日以内)に培地に添加してもよい。好ましくは、BMPシグナル伝達経路作用物質は、浮遊培養開始後1日目から15日目までの間、より好ましくは1日目から9日目までの間、最も好ましくは3日目に培地に添加する。

BMPシグナル伝達経路作用物質が培地に添加され、多能性幹細胞の凝集体を形成する細胞の網膜細胞への分化誘導が開始された後は、BMPシグナル伝達経路作用物質を培地に添加する必要は無く、BMPシグナル伝達経路作用物質を含まない無血清培地又は血清培地を用いて培地交換を行ってよい。これにより、培地に掛かる経費を抑えることができる。網膜細胞への分化誘導が開始された細胞は、例えば、当該細胞におけるRax遺伝子の発現を検出することにより確認することができる。GFP等の蛍光レポータータンパク質遺伝子がRax遺伝子座へノックインされた多能性幹細胞を用いて工程(1)により形成された凝集体を、網膜細胞への分化誘導に必要な濃度のBMPシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、発現した蛍光レポータータンパク質から発せられる蛍光を検出することにより、網膜細胞への分化誘導が開始された時期を確認することもできる。工程(2)の実施態様の一つとして、工程(1)で形成された凝集体を、Rax遺伝子を発現する細胞が出現し始めるまでの間、網膜細胞への分化誘導に必要な濃度のBMPシグナル伝達経路作用物質を含みソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まない無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る工程、を挙げることができる。

【0049】

工程(2)における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30から約40、好ましくは約37である。またCO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。

【0050】

網膜前駆細胞を含む凝集体が得られたことは、例えば、網膜前駆細胞のマーカーであるRax又はPAX6を発現する細胞が凝集体に含まれていることを検出することにより確認することができる。

得られた網膜前駆細胞を含む凝集体は、そのまま毒性・薬効評価用試薬として用いてもよい。網膜前駆細胞を含む凝集体を分散処理(例えば、トリプシン/EDTA処理)し、得られた細胞をFACSを用いて選別することにより、高純度な網膜前駆細胞を得ることも可能である。

【0051】

本発明製造方法2は、下記工程(1)、(2)及び(3)を含む網膜組織の製造方法である：

(1)多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、

10

20

30

40

50

(2) 工程(1)で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程、及び

(3) 工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程。

【0052】

本発明製造方法2の工程(1)及び工程(2)は、本発明製造方法1の工程(1)及び工程(2)と同様に実施することができる。

【0053】

工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る工程(3)について説明する。

【0054】

工程(3)において用いられる培地は、例えば、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれもが添加されていない無血清培地又は血清培地である。

「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない」培地には、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも実質的に含まない培地、例えば、網膜組織への選択的分化に不利な影響を与える程度の濃度のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質を含有しない培地、も含まれる。

「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれもが添加されていない」培地には、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれもが実質的に添加されていない培地、例えば、網膜組織への選択的分化に不利な影響を与える程度の濃度のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質が添加されていない培地、も含まれる。

かかる培地に用いられる無血清培地又は血清培地は、上述したようなものである限り特に限定されない。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地(例えば、IMDMとF-12の1:1の混合液に10%KSR、450 μ M1-モノチオグリセロール及び1xChemically Defined Lipid Concentrateを添加した培地)を使用することが好ましい。無血清培地へのKSRの添加量としては、例えばヒトES細胞の場合は、通常約1%から約20%であり、好ましくは約2%から約20%である。

【0055】

Wntシグナル経路作用物質とは、Wntにより媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質である。Wntシグナル経路作用物質としては、例えば、Wntファミリーに属するタンパク質(例えば、Wnt1、Wnt3a、Wnt7a)、Wnt受容体、Wnt受容体アゴニスト、GSK3阻害剤(例えば、6-Bromoindirubin-3'-oxime(BIO)、CHIR99021、Kenpau1one)等を挙げることができる。

【0056】

工程(3)における培養温度、CO₂濃度、O₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30から約40、好ましくは約37である。CO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。O₂濃度は、約18%以上、例えば約20%から約70%、好ましくは約20%から約60%、より好ましくは約20%か

10

20

30

40

50

ら約50%である。

工程(3)の培養時間は特に限定されないが、通常48時間以上であり、好ましくは7日間以上である。

【0057】

このようにして浮遊培養された凝集体において、網膜組織は凝集体の表面を覆うように存在する。浮遊培養終了後、凝集体をパラホルムアルデヒド溶液等の固定液を用いて固定し、凍結切片を作製した後、層構造を有する網膜組織が形成されていることを免疫染色法などにより確認すればよい。網膜組織は、各層を構成する網膜前駆細胞(視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜節細胞)がそれぞれ異なるため、これらの細胞に発現している上述のマーカーに対する抗体を用いて、免疫染色法により、層構造が形成されていることを確認することができる。

10

凝集体の表面に存在する網膜組織をピンセット等を用いて、凝集体から物理的に切り出すことも可能である。この場合、各凝集体の表面には、網膜組織以外の神経組織が形成される場合もあるため、凝集体から切り出した神経組織の一部を切り取り、これを用いて後述の免疫染色法等により確認することにより、その組織が網膜組織であることを確認することが出来る。

網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体では、例えば、上述の凝集体凍結切片の免疫染色像において、RAX陽性の組織が観察され、その外側にRAX陰性の組織が観察されない。

【0058】

20

本発明製造方法2により、ヒト多能性幹細胞から高効率で網膜組織を得ることができる。本発明製造方法2により得られる網膜組織には、網膜層のそれぞれに特異的なニューロンが含まれることから、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞または、これらの前駆細胞など網膜組織を構成する細胞を入手することも可能である。得られた網膜組織から入手した細胞がいずれの細胞であるかは、自体公知の方法、例えば細胞マーカーの発現により確認できる。

得られた網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体は、そのまま毒性・薬効評価用試薬として用いてもよい。網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を分散処理(例えば、トリプシン/EDTA処理)し、得られた細胞をFACSを用いて選別することにより、高純度な網膜組織構成細胞を得ることも可能である。

30

【0059】

本発明製造方法3は、下記工程(1)、(2)及び(3)を含む網膜層特異的神経細胞の製造方法である：

(1)多能性幹細胞を無血清培地中で浮遊培養することにより多能性幹細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2)工程(1)で形成された凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含まずBMPシグナル伝達経路作用物質を含む無血清培地又は血清培地中で浮遊培養し、網膜前駆細胞を含む凝集体を得る第二工程、及び

(3)工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない無血清培地又は血清培地中で、目的とする網膜層特異的神経細胞が出現するまで浮遊培養し、目的とする網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る第三工程。

40

【0060】

本発明製造方法3の工程(1)及び工程(2)は、本発明製造方法1の工程(1)及び工程(2)と同様に実施することができる。

【0061】

工程(2)で得られた凝集体を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない無血清培地又は血清培地中、目的とする網膜層特異的神経細胞が出現するまで浮遊培養し、目的

50

とする網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を得る工程(3)について説明する。

【0062】

工程(3)において用いられる培地は、例えば、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれもが添加されていない無血清培地又は血清培地である。

「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも含まない」培地には、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれをも実質的に含まない培地、例えば、網膜組織及び網膜層特異的神経細胞への選択的分化に不利な影響を与える程度の濃度のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質を含有しない培地、も含まれる。

10

「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれもが添加されていない」培地には、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質のいずれもが実質的に添加されていない培地、例えば、網膜組織及び網膜層特異的神経細胞への選択的分化に不利な影響を与える程度の濃度のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、BMPシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル経路作用物質が添加されていない培地、も含まれる。

20

かかる培地に用いられる無血清培地又は血清培地は、上述したようなものである限り特に限定されない。例えば、DMEM-F12培地に10%ウシ胎児血清、N2サプリメント、100 μ Mタウリン、500nMレチノイン酸を添加した血清培地、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地(例えば、IMDMとF-12の1:1の混合液に10%KSR、450 μ M1-モノチオグリセロール及び1xChemically Defined Lipid Concentrateを添加した培地)等を挙げることができる。

【0063】

工程(3)における培養温度、CO₂濃度、O₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30から約40、好ましくは約37である。CO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。O₂濃度は、約18%以上、例えば約20%から約70%、好ましくは約20%から約60%、より好ましくは約20%から約50%である。

30

工程(3)の培養時間は、目的とする網膜層特異的神経細胞によって異なり、例えば約7日間から約200日間である。

【0064】

このようにして浮遊培養された凝集体において、網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織は凝集体の表面を覆うように存在する。網膜組織の確認は、浮遊培養終了後、凝集体をパラホルムアルデヒド溶液等の固定液を用いて固定し、凍結切片を作製した後、層構造を有する網膜組織が形成されていることを免疫染色法などにより確認すればよい。網膜組織は、各層を構成する網膜前駆細胞(視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜節細胞)がそれぞれ異なるため、これらの細胞に発現している上述のマーカに対する抗体を用いて、免疫染色法により、層構造が形成されていることを確認することができる。

40

網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体では、例えば、上述の凝集体凍結切片の免疫染色像において、RAX陽性の組織が観察され、その外側にRAX陰性の組織が観察されない。

【0065】

本発明製造方法3により得られる網膜組織には、網膜層のそれぞれに特異的なニューロンが含まれることから、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞などの網膜層特異的神経細胞を入手することが可能である。得られた網膜組織から入手した細

50

胞がいずれの細胞であるかは、自体公知の方法、例えば細胞マーカーの発現により確認できる。

得られた網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体は、そのまま毒性・薬効評価用試薬として用いてもよい。網膜層特異的神経細胞を含有する網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体を分散処理（例えば、トリプシン/EDTA処理）し、得られた細胞をFACSを用いて選別することにより、高純度な網膜層特異的神経細胞を得ることも可能である。

【0066】

得られた網膜層特異的神経細胞は、そのまま、あるいは分散処理（例えば、トリプシン/EDTA処理）した後、接着条件下でさらに培養することもできる。接着培養する場合、細胞接着性の培養器、例えば細胞外マトリクス等（例えば、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン）によりコーティング処理された培養器を使用することが好ましい。接着培養における培養温度、CO₂濃度、O₂濃度等の培養条件は、適宜決定できる。この際、既知の分化誘導物質や神経栄養因子の存在下で培養してもよい。このような分化誘導物質、神経栄養因子としては、例えば、NGF（*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 552 (1994)）、レチノイン酸（*Dev. Biol.*, 168, 342 (1995); *J. Neurosci.*, 16, 1056 (1996)）、BMP阻害因子（*Nature*, 376, 333-336 (1995)）、IGF（*Genes & Development*, 15, 3023-8 (2003)）、BDNF、NT3、または、NT4などが挙げられる。

【0067】

製造された網膜組織や網膜層特異的神経細胞は、細胞マーカーの発現の有無等を指標として、必要に応じてそれらを組み合わせることにより確認することができる。細胞の形態を観察することによって、得られた網膜層特異的神経細胞を特定することもできる。このようなマーカー発現パターンや細胞の形態に基づき、所望の特定の細胞を単離することもできる。

【0068】

本発明製造方法1ないし3により製造された網膜前駆細胞、網膜組織又は網膜層特異的神経細胞は、網膜組織又は網膜関連細胞の障害に基づく疾患の治療薬のスクリーニング、その他の原因による細胞損傷状態における治療薬に対する細胞治療用移植用材料や疾患研究材料、創薬材料として利用可能である。また化学物質等の毒性・薬効評価においても、光毒性等の毒性研究、毒性試験等に活用可能である。

網膜組織又は網膜関連細胞の障害に基づく疾患としては、例えば、有機水銀中毒、クロロキン網膜症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症、緑内障、糖尿病性網膜症、新生児網膜症、などが挙げられる。

【0069】

本発明製造方法1ないし3により製造された網膜前駆細胞、網膜組織又は網膜層特異的神経細胞は、細胞損傷状態において、当該細胞や、障害を受けた組織自体を補充する（例えば、移植手術に用いる）ためなどに用いる移植用網膜として用いることができる。

【実施例】

【0070】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0071】

実施例1：網膜前駆細胞を含む凝集体の製造例

RAX::GFPノックインヒトES細胞（KhES-1由来；*Cell Stem Cell*, 2012, 10(6) 771-785）を「Ueno, M. et al. *PNAS* 2006, 103(25), 9554-9559」 「Watanabe, K. et al. *Nat Biotech* 2007, 25, 681-686」に記載の方法に準じて培養した。培地にはDMEM/F12 培地（Sigma）に20%KSR（Knockout™ Serum Replacement；Invitrogen）、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタ

10

20

30

40

50

ミン、1x 非必須アミノ酸、5ng/ml bFGFを添加した培地を用いた。培養された前記ES細胞を、TrypLE Express (Invitrogen)を用いて単一分散した後、単一分散されたES細胞を非細胞接着性の96穴培養プレート(スミロン スフェロイドプレート, 住友ベークライト社)の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37、5%CO₂で浮遊培養した。その際の無血清培地には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrate、20 μ M Y27632を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始3日目に終濃度1.5 nMのヒト組み換えBMP4 (R&D)、終濃度100 ng/mlのBMP2 (R&D)、終濃度100 ng/mlのBMP7 (R&D)、終濃度100 ng/mlのGDF7 (R&D)のうちの何れかを添加して浮遊培養した。前記BMPシグナル伝達経路作用物質をいずれも添加していない条件でも同様に培養した。ウェル内の培養液の半量を、BMPシグナル伝達経路作用物質をいずれも添加していない上記培地に3日おきに交換した。浮遊培養開始18日目に蛍光顕微鏡観察を実施した。BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない条件で培養した場合には網膜前駆細胞が誘導されたことを示すGFP発現細胞がほとんど認められなかった(図1A, B)。それと比べて、BMP2 (図1C, D)、BMP4 (図1E, F)、BMP7 (図1G, H)、GDF7 (図1I, J)のいずれかを添加して培養した条件ではGFP発現細胞が明らかに増加した。

10

【0072】

実施例2: 網膜組織の製造例1

20

RAX::GFPノックインヒトES細胞(KhES-1由来; Cell Stem Cell, 2012, 10(6) 771-785)を「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」に記載の方法に準じて培養した。培地にはDMEM/F12培地(Sigma)に20%KSR(Knockout™ Serum Replacement; Invitrogen)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミン、1x 非必須アミノ酸、5ng/ml bFGFを添加した培地を用いた。培養された前記ES細胞を、TrypLE Express (Invitrogen)を用いて単一分散した後、単一分散されたES細胞を非細胞接着性の96穴培養プレート(スミロン スフェロイドプレート, 住友ベークライト社)の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37、5%CO₂で浮遊培養した。その際の無血清培地には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrate、20 μ M Y27632を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始と同時に、浮遊培養開始1日目、浮遊培養開始2日目、浮遊培養開始3日目のいずれかの時点で終濃度1.5 nMのヒト組み換えBMP4 (R&D)を添加して浮遊培養した。BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない条件でも同様に培養した。ウェル内の培養液の半量を、BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない上記培地に3日おきに交換した。浮遊培養開始18日目に96wellプレートから浮遊培養用ディッシュへと凝集体を移し、引き続きF-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrateを添加した無血清培地中で浮遊培養を行った。浮遊培養開始26日目に蛍光顕微鏡による観察およびFACSによるGFP陽性細胞の割合の測定を行った。

30

40

BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない条件(図2A, B, C)および浮遊培養開始と同時にBMP4を添加した条件(図2D, E, F)では網膜前駆細胞が誘導されたことを示すGFP発現細胞は認められなかった。それと比べて、浮遊培養開始1日目(図2G, H, I)、浮遊培養開始2日目(図2J, K, L)、浮遊培養開始3日目(図2M, N, O)のいずれかの時点でBMP4を添加した条件では、GFP発現細胞が明らかに増加した。いずれの条件においても、形成されたRAX::GFP陽性の組織の外側にRAX::GFP陰性の組織は観察されなかった。FACSによる測定の結果では、浮遊培養開始3日目にBMP4を添加した条件では85%以上の細胞がGFP陽性であった(図2O)。以上の結

50

果から、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体の製造には、BMPシグナル伝達経路作用物質を浮遊培養開始1日目以降、好ましくは3日目に添加することが有効であることが示された。

【0073】

実施例3：網膜組織の製造例2

RAX::GFPノックインヒトES細胞(KhES-1由来; Cell Stem Cell, 2012, 10(6) 771-785)を「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」に記載の方法に準じて培養した。培地にはDMEM/F12培地(Sigma)に20%KSR(Knockout™ Serum Replacement; Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、1x 非必須アミノ酸、5ng/ml bFGFを添加した培地を用いた。培養された前記ES細胞を、TrypLE Express(Invitrogen)を用いて単一分散した後、単一分散されたES細胞を非細胞接着性の96穴培養プレート(スミロン スフェロイドプレート, 住友ベークライト社)の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。その際の無血清培地には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrate、20 μ M Y27632を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始6日目、浮遊培養開始9日目、浮遊培養開始12日目、浮遊培養開始15日目のいずれかの時点で終濃度1.5nMのヒト組み換えBMP4(R&D)を添加して浮遊培養した。BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない条件でも同様に培養した。ウェル内の培養液の半量を、BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない上記培地に3日おきに交換した。浮遊培養開始18日目に、96wellプレートから浮遊培養用ディッシュへと凝集体を移し、引き続きF-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrateを添加した無血清培地で浮遊培養を行った。浮遊培養開始24日目に、蛍光顕微鏡観察を実施した。

その結果、BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない条件では網膜前駆細胞が誘導されたことを示すGFP発現細胞は認められなかった(図3A, B)。それと比べて、浮遊培養開始6日目(図3C, D)、浮遊培養開始9日目(図3E, F)、浮遊培養開始12日目(図3G, H)のいずれかの時点でBMP4を添加した条件では明らかにGFP発現細胞が増加した。浮遊培養開始15日目にBMP4を添加した条件でもGFP発現細胞が誘導されたものの、効率は低かった(図3I, J)。いずれの条件においても、形成されたRAX::GFP陽性の組織の外側にRAX::GFP陰性の組織は観察されなかった。以上の結果から、網膜組織を含み頭部非神経外胚葉を実質的に含まない凝集体の製造には、BMPシグナル伝達経路作用物質を浮遊培養開始15日目以前に添加することが有効であることが示された。

【0074】

実施例4：網膜組織の製造例3

実施例1で得られたGFP発現細胞を含む凝集体を、浮遊培養開始18日目に96wellプレートから浮遊培養用ディッシュへと凝集体を移し、引き続きF-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrateを添加した培地で浮遊培養を実施した。浮遊培養開始26日目に凝集体を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結切片を作製した後、免疫染色法により組織構造の確認を行った。

浮遊培養開始26日目において、全層がRAX::GFP陽性であり、外層が網膜幹細胞のマーカーであるChx10陽性であった(図4A, B, C)。RAX::GFP陽性の上皮の外側には非神経外胚葉等のいかなる組織も存在しなかった。本発明製造方法により、ヒトES細胞から高効率に網膜組織が製造可能であることが示された。

【0075】

10

20

30

40

50

実施例 5：網膜層特異的神経細胞の製造例

RAX::GFPノックインヒトES細胞 (KhES-1由来; Cell Stem Cell, 2012, 10(6) 771-785) を「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」 「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」に記載の方法に準じて培養した。培地にはDMEM/F12 培地 (Sigma) に20%KSR (Knockout™ Serum Replacement; Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、1x 非必須アミノ酸、5ng/ml bFGFを添加した培地を用いた。培養された前記ES細胞を、TrypLE Express (Invitrogen) を用いて単一分散した後、単一分散されたES細胞を非細胞接着性の96穴培養プレート (スミロン スフェロイドプレート, 住友ベークライト社) の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37、5%CO₂で浮遊培養した。その際の無血清培地には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrate、20 μ M Y27632を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始3日目に終濃度1.5nMのヒト組み換えBMP4 (R&D) を添加した。ウェル内の培養液の半量を、BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない上記培地に3日おきに交換した。浮遊培養開始18日目に96wellプレートから浮遊培養用ディッシュへと凝集体を移し、DMEM-F12培地に10%ウシ胎児血清、N2サプリメント、100 μ M タウリン、500nM レチノイン酸を添加した培地を用いて浮遊培養を続けた。浮遊培養開始18日目以降の培養は40%O₂下で実施した。浮遊培養開始117日目に凝集体を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結切片を作製した後、免疫染色法により組織構造の確認を行った。浮遊培養開始117日目において、全層がRAX::GFP陽性であり、視細胞マーカーであるRecoverinが陽性の細胞が存在した (図5A)。くわえて、網膜組織外層に、桿体視細胞マーカーであるNr1が陽性の細胞 (図5B) と、錐体視細胞マーカーであるRXR-gammaが陽性の細胞 (図5C) が存在し、桿体、錐体視細胞への分化が生じていることが示された。さらに、網膜前駆細胞及び双極細胞のマーカーであるChx10が陽性の細胞 (図5D)、アマクリン細胞マーカーであるCalretininが陽性の細胞 (図5E)、水平細胞マーカーであるCalbindinが陽性の細胞 (図5F) が存在していた。この結果から、本発明製造方法により、各種の分化した網膜層特異的神経細胞から構成される網膜組織を、ヒトES細胞から高効率に製造可能であることが示された。

【0076】

実施例 6：網膜層特異的神経細胞の製造例

RAX::GFPノックインヒトES細胞 (KhES-1由来; Cell Stem Cell, 2012, 10(6) 771-785) を、「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」 「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」に記載の方法に準じて培養した。培地にはDMEM/F12 培地 (Sigma) に20%KSR (Knockout™ Serum Replacement; Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、1x 非必須アミノ酸、8ng/ml bFGFを添加した培地を用いた。培養された前記ES細胞を、TrypLE Express (Invitrogen) を用いて単一分散した後、単一分散されたES細胞を非細胞接着性の96穴培養プレート (スミロン スフェロイドプレート, 住友ベークライト社) の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37、5%CO₂で浮遊培養した。その際の無血清培地には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrate、20 μ M Y27632を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始3日目に、前記無血清培地を50 μ l加えた (合計150 μ l)。浮遊培養開始6日目に終濃度1.5nMのヒト組み換えBMP4 (R&D) を添加した。ウェル内の培養液の半量を、BMPシグナル伝達経路作用物質を添加していない上記培地に3日おきに交換した。浮遊培養開始18日目に96wellプレートから浮遊培養用ディッシュへと凝集体

を移し、DMEM-F12培地に10%ウシ胎児血清、N2サプリメント、100 μ Mタウリン、500nMレチノイン酸を添加した培地を用いて浮遊培養を継続した。浮遊培養開始18日目以降の培養は40%O₂下で実施した。浮遊培養開始50日目に凝集体を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結切片を作製した後、免疫染色法により組織構造の確認を行った。浮遊培養開始50日目において、全層がRAX::GFP陽性であり、網膜前駆細胞及び双極細胞のマーカーであるChx10が陽性の細胞(図6A)、神経節細胞及び神経細胞のマーカーであるPax6陽性の細胞(図6B)が存在し、多層の網膜神経組織が形成されていることが示された。くわえて、視細胞マーカーであるCrxが陽性の細胞(図6C)、及び、神経節細胞のマーカーであるBrn3b陽性の細胞(図6D)が存在した。この結果から、本発明製造方法により、各種の分化した網膜層特異的神経細胞から構成される網膜組織を、ヒトES細胞から高効率に製造可能であることが示された。

10

【0077】

実施例7：人工多能性幹細胞(iPS細胞)からの網膜前駆細胞を含む凝集体、網膜組織、及び網膜層特異的神経細胞の製造例

ヒトiPS細胞株201B7(独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター又はiPSアカデミアジャパン株式会社から入手可能)を「Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559」「Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686」に記載の方法に準じて培養する。培地にはDMEM/F12培地(Sigma)に20%KSR(KnockoutTM Serum Replacement; Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、1x 非必須アミノ酸、5ng/ml bFGFを添加した培地を用いる。培養された前記iPS細胞を、TrypLE Express(Invitrogen)を用いて単一分散した後、非細胞接着性の96穴培養プレート(スミロンスフェロイドプレート, 住友ベークライト社)の1ウェルあたり1.2 \times 10⁴細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で浮遊培養する。その際の無血清培地には、F-12培地とIMDM培地の1:1混合液に10%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1x Chemically defined lipid concentrate、20 μ M Y27632を添加した無血清培地を用いる。浮遊培養開始1日目から15日目の何れかの時点で、終濃度1.5nMのヒト組み換えBMP4(R&D)、終濃度100ng/mlのBMP2(R&D)、終濃度100ng/mlのBMP7(R&D)、終濃度100ng/mlのGDF7(R&D)のうち

の何れかを添加して浮遊培養を行う。ウェル内の培養液の半量を、BMPシグナル伝達経路作用物質をいずれも添加していない上記培地に3日おきに交換する。浮遊培養開始18日目に凝集体を一部回収し、4%パラホルムアルデヒドで固定処理を実施し凍結切片を作製した後、免疫染色法により網膜前駆細胞マーカー(Rax、Chx10)の発現を確認する。残りの凝集体を96wellプレートから浮遊培養用ディッシュへと移し、DMEM-F12培地に10%ウシ胎児血清、N2サプリメント、100 μ Mタウリン、500nMレチノイン酸を添加した培地を用いて浮遊培養を継続する。浮遊培養開始18日目以降の培養は40%O₂下で実施する。浮遊培養開始117日目に凝集体を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結切片を作製した後、免疫染色法により組織構造と網膜層特異的神経細胞のマーカー(Nrl、RXR-gamma、Recoverin、Chx10、Calretinin、Calbindin)の発現の確認を行う。

20

30

40

このようにして、網膜前駆細胞、更には、各種の分化した網膜層特異的神経細胞から構成される網膜組織を、ヒトiPS細胞から製造可能である。

【0078】

本出願は、2013年8月23日付で日本国に出願された特願2013-173285を基礎としており、ここで言及することによりその内容は全て本明細書に包含される。

【産業上の利用可能性】

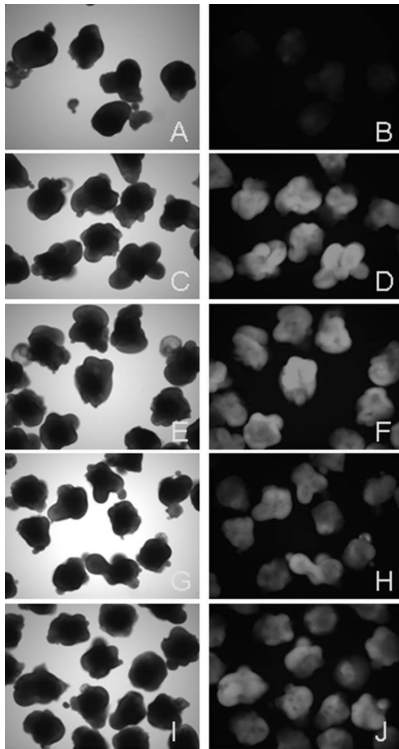
【0079】

本発明の製造方法によれば、網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を高効率に製造することが可能となる。本発明の製造方法においては、基底膜標品を培地中に

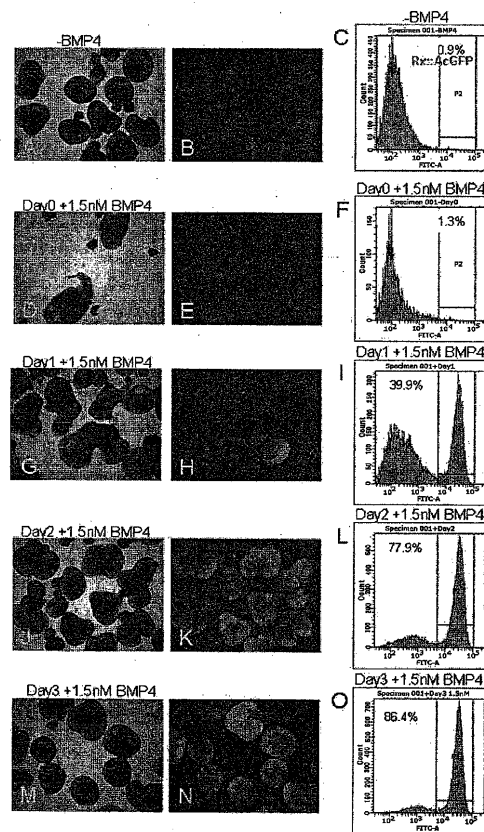
50

添加することなく凝集体を浮遊培養して、網膜前駆細胞、網膜組織または網膜層特異的神経細胞を得ることが可能であるので、得られた細胞または組織への異種由来成分の混入のリスクが低減される。本発明の製造方法は、化学物質等の毒性・薬効評価や細胞治療などを目的として、網膜組織を構成する細胞群（視細胞、視神経など）を効率よく製造することや、組織構造を有する網膜組織を用いた毒性・薬効評価や網膜組織移植治療用移植材料への応用を目的として、試験や治療に使用するための「組織材料」となる網膜組織を効率よく製造するという観点から非常に有用である。

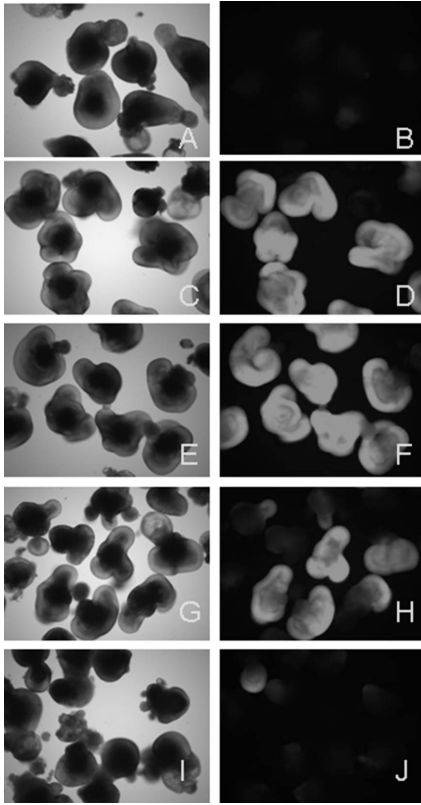
【図1】



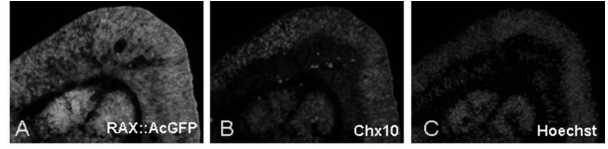
【図2】



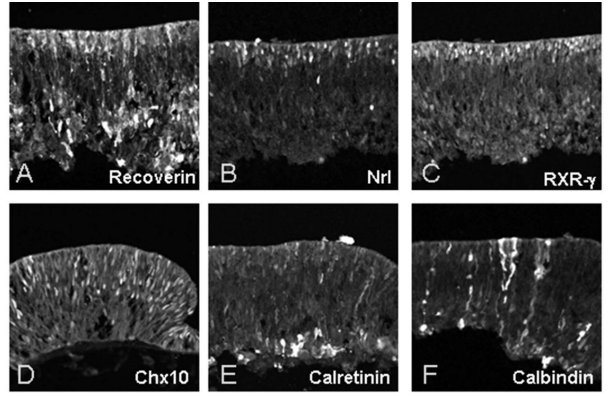
【 図 3 】



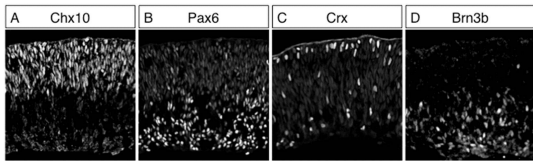
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 L	27/00 (2006.01)	A 6 1 L	27/00
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 K	35/30 (2015.01)	A 6 1 K	35/30
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z

(74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(72)発明者 中野 徳重
大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内

(72)発明者 笹井 芳樹
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 大曾根 親文
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 国際公開第2013/065763(WO, A1)
特表2013-509859(JP, A)
特表2008-509576(JP, A)
特表2008-507288(JP, A)
特表2014-501518(JP, A)
国際公開第2006/053629(WO, A1)
国際公開第2011/055855(WO, A1)
Cell Stem Cell, 2012年, Vol.10, Iss.10, p.771-785
池田華子 他, 幹細胞の基礎的研究 第2章 幹細胞の運命を変えるしくみ 2.ES細胞を用いた試験管内での神経分化誘導 終, 実験医学, 2006年, Vol.24, No.2, p.188-194
OSAKADA F. et al., Control of neural differentiation from pluripotent stem cells, Inflamm Regen, 2008年, Vol.28, No.3, p.166-173
LAMBA D.A. et al., Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells, PNAS, 2006年, Vol.103, No.34, p.12769-12774
LANG R.A. et al., Pathways regulating lens induction in the mouse, Int. J. Dev. Biol., 2004年, Vol.48, p.783-791
FURUTA Y. et al., BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo, Genes Dev., 1998年, Vol.12, No.23, p.3764-3775
TROUSSE F. et al., Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye, J Neurosci., 2001年, Vol.21, No.4, p.1292-1301
住友化学, ヒトES細胞から立体網膜の形成に世界で初めて成功 - 網膜難病の治療や原因解明の研究を飛躍的に加速 -, 2012年 6月, pp.1-14, URL, <https://www.sumitomo-chem.co.jp/newsreleases/docs/20120614.pdf>
WATANABE K. et al., Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells, Nature Neuroscience, 2005年, Vol.8, No.3, p.288-296

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 5/28

A61K 35/30

A61L 27/00

C12Q 1/00 - 3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)