(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年7月6日(06.07.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/127824 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/079 (2010.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
A61K 35/28 (2015.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/047993

(22) 国際出願日： 2022年12月26日(26.12.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

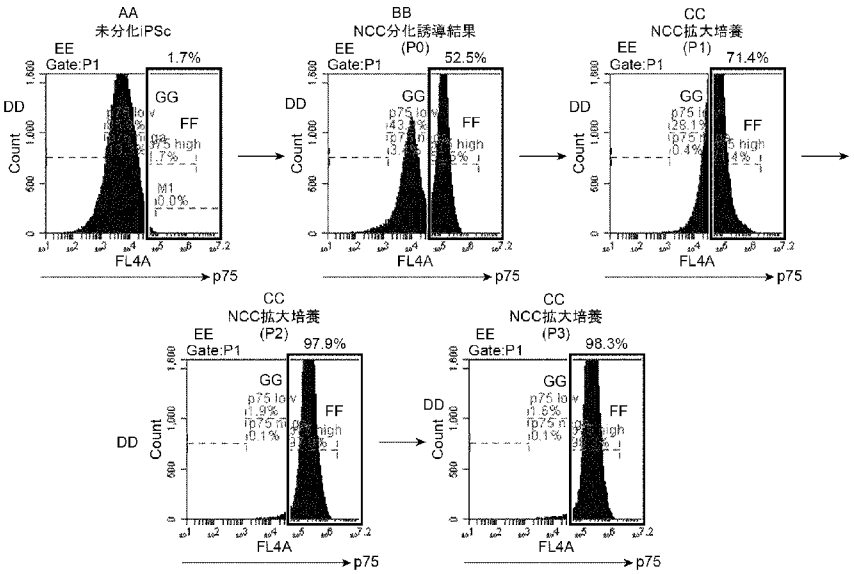
(30) 優先権データ：
特願 2021-212693 2021年12月27日(27.12.2021) JP

(71) 出願人: 住友ファーマ株式会社 (**SUMITOMO PHARMA CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町二丁目6番8号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 田原 昌浩 (**TAHARA Masahiro**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5－2神戸キメックセンタービル5階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 藤木 彩加 (**FUJIKI Ayaka**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5－2神戸キメックセンタービル5階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 吉田 賢司 (**YOSHIDA Kenji**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5－2神戸キメックセンタービル5階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 北川 麻衣子 (**KITAGAWA Maiko**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南

(54) **Title:** NEURAL CREST CELL CULTURING METHOD AND PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称： 神経堤細胞の培養方法及び製造方法



AA Undifferentiated iPSc
BB NCC differentiation induction result
CC NCC expansion culture
DD Count
EE Gate
FF high
GG low

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide: a culturing method and a production method for a cell population containing neural crest cells, said methods being capable of stably mass producing neural crest cells from pluripotent stem cells at a quality that allows said cells to be employed in treatment employing cells; and a production method for mesenchymal stem cells, etc., employing said neural crest cells. A selective culturing method according to the present invention for neural crest cells in a cell population containing neural crest cells and/or neural crest progenitor

WO 2023/127824 A1

[続葉有]

町１丁目５－２神戸キメックセンタービル５階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人：長谷川 芳樹，外(**HASEGAWA Yoshiki** et al.)；〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル） ９階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

cells includes a culturing step for performing adherent culturing of a cell population containing neural crest cells and/or neural crest progenitor cells in the presence of one or more extracellular matrixes selected from the group consisting of extracellular matrixes containing a laminin in which the α chain is an α1 chain and the β chain is a β1 chain, a laminin in which the α chain is an α2 chain and the β chain is a β1 chain, a laminin in which the α chain is an α2 chain and the β chain is a β2 chain, a laminin in which the α chain is an α5 chain and the β chain is a β1 chain, and integrin binding sites for these laminins.

(57) 要約：本発明は、多能性幹細胞から神経堤細胞を、細胞を用いた治療に用いることが可能な品質で安定的に大量生産できる、神経堤細胞を含む細胞集団の培養方法及び製造方法、並びに当該神経堤細胞を用いる間葉系幹細胞等の製造方法を提供することを目的とする。本発明の神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞の選択的培養方法は、α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの存在下で、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する培養工程を備える。

明　細　書

発明の名称 ： 神経堤細胞の培養方法及び製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、神経堤細胞の培養方法及び製造方法に関する。

背景技術

[0002] 神経堤細胞は、神経堤に由来する細胞であり、末梢神経系の神経細胞、シュワン細胞、メラノサイト、内分泌細胞、平滑筋、頭部骨格、角膜、虹彩などの多様な細胞種へ分化する。そのため、脊椎動物が進化した過程で獲得した「第四の胚葉」とも呼ばれる。

[0003] 近年、ｉＰＳ細胞などの多能性幹細胞を神経堤細胞へ分化誘導し、さらに神経堤細胞を間葉系幹細胞へ分化誘導する方法が提案されている（特許文献１～４、非特許文献１～２）。また、目的の神経堤細胞を純化するため、当該方法の工程の中で、ｉＰＳ細胞から神経堤細胞への分化誘導後に、ＦＡＣＳ等によるソーティングにより神経堤細胞マーカー陽性細胞を選別する操作を行うことが提案されている（例えば、非特許文献１）。しかしながら、臨床応用に際して、製造工程におけるコンタミネーションを排除することができ、より安全性の高い、神経堤細胞の製造方法の確立が求められている。

[0004] 一方、細胞外マトリクスであるフィブロネクチン及びラミニンの受容体であるインテグリンは、神経堤細胞と細胞外マトリクスとの相互作用に必須であると報告されている（非特許文献３）。また、特許文献５は、ラミニン２１１又はラミニン２１１のＥ８フラグメントの存在下で神経堤細胞への分化を制御する方法を示している。また、非特許文献４は、ｉＰＳ細胞から目の細胞に誘導する際、ラミニン２１１でコーティングした培養容器を用いると神経堤細胞に誘導されることを報告している。さらに、特許文献６は、ラミニン２１１を細胞の足場として用いて拡大培養する工程を含む神経堤細胞の純化方法を開示している。

[0005] 間葉系幹細胞の培養に関しては、例えば特許文献７に開示の間葉系幹細胞

用培地が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：ＷＯ２０１１／１４９７６２

特許文献2：ＷＯ２０１６／１１４２８５

特許文献3：ＷＯ２０１８／１９９１４２

特許文献4：ＷＯ２０１９／１０７４８５

特許文献5：ＷＯ２０１８／１４３３１２

特許文献6：ＷＯ２０２０／２３０８３２

特許文献7：ＷＯ２０１６／０２７８５０

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Makoto Fukuta et al., “Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media”, PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e112291

非特許文献2：Alan W. Leung et al., “WNT/β-catenin signaling mediates human neural crest induction via a pre-neural border intermediate”, Development, 143:398-410, 2016

非特許文献3：Laura S. Gammill et al., “Division of labor during trunk neural crest development”, Dev Biol. 2010 Aug 15; 344(2): 555-565

非特許文献4：Shun Shibata et al., “Selective Laminin-Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Distinct Ocular Lineages”, Cell Reports, 2018, 25(6):1668-1679

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 細胞を用いた治療に際しては、目的細胞を適切に選別し増殖させること、及び、培養工程において細菌等のコンタミネーションが発生する危険性を排

除することが重要な課題である。

[0009] 本発明は、多能性幹細胞から神経堤細胞を、細胞を用いた治療に用いることが可能な品質で安定的に大量生産できる、神経堤細胞を含む細胞集団の培養方法及び製造方法、並びに当該神経堤細胞を用いる間葉系幹細胞等の製造方法を提供することを目的とする。

[0010] また、神経堤細胞は、様々な細胞に分化することができるため、神経堤細胞が目的の細胞へ分化することができる特徴を備えるよう、神経堤細胞を選別し、所望の細胞状態の神経堤細胞を得ることも本発明の目的である。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、多能性幹細胞から分化誘導した神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を、特定のラミニン又はその断片を足場として培養することで、神経堤細胞を高純度で含有する細胞集団を得られることを見出し、臨床応用上望ましい品質を有する神経堤細胞を安定的に効率よく製造する方法を完成させた。

[0012] すなわち、本発明は以下の各発明に関する。

［１］

α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの存在下で、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する培養工程を備える、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞の選択的培養方法。

［２］

上記ラミニンのγ鎖がγ１鎖である、［１］に記載の培養方法。

［３］

上記ラミニンが、ラミニン２２１である、［１］又は［２］に記載の培養

方法。

［４］

上記ラミニンのインテグリン結合部位が、ラミニンのＥ８フラグメントである、［１］～［３］のいずれかに記載の培養方法。

［５］

上記培養工程にて培養後の細胞集団が、ＥＤＮ３、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ及びＴＷＩＳＴ１から選択される少なくとも１つの遺伝子を発現する、［１］～［４］のいずれかに記載の培養方法。

［６］

上記培養工程において、上記細胞集団が接着する培養面の少なくとも一部が上記細胞外マトリクスでコーティングされており、上記細胞集団が培地中にて接着培養される、［１］～［５］のいずれかに記載の培養方法。

［７］

上記培地は、神経堤細胞の維持に適する培地である、［６］に記載の培養方法。

［８］

培養前の細胞集団に比べて、培養後の細胞集団における全細胞数及び全細胞数に対する神経堤細胞の割合の両方が増加する、［１］～［７］のいずれかに記載の培養方法。

［９］

（１）多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得る工程と、

（２）工程（１）で得られた細胞集団を［１］～［８］のいずれかに記載の培養方法で接着培養する工程と

を備える、神経堤細胞を含む細胞集団の製造方法。

［１０］

工程（１）で得られ得られた細胞集団を、神経堤細胞マーカーにより選別することなく、工程（２）に供する、［９］に記載の製造方法。

［１１］

工程（１）が、多能性幹細胞を含む細胞集団を、少なくとも１つのＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤及び少なくとも１つのＷｎｔシグナル伝達活性化剤を含む培地で培養することを含む、［９］又は［１０］に記載の製造方法。

［１２］

上記ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤が、ＴＧＦβ阻害剤である、［１１］に記載の製造方法。

［１３］

上記Ｗｎｔシグナル伝達活性化剤が、ＧＳＫ３β阻害剤である、［１１］又は［１２］に記載の製造方法。

［１４］

工程（１）が、７日間～１８日間行われる、［９］～［１３］のいずれかに記載の製造方法。

［１５］

工程（１）における培地が、血清代替物又は血清を含まない合成培地である、［９］～［１４］のいずれかに記載の製造方法。

［１６］

（３）［９］～［１５］のいずれかに記載の製造方法で神経堤細胞を含む細胞集団を製造する工程と、

（４）工程（３）で得られた細胞集団をｂＦＧＦの存在下で培養し、間葉系幹細胞へ分化誘導する工程と

を備える、間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法。

［１７］

［１６］に記載の製造方法で製造された、間葉系幹細胞を含む細胞集団。

［１８］

［１７］に記載の間葉系幹細胞を含む細胞集団を有効成分として含有する、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、喘息、重症心不全、心筋梗塞、脳梗塞、外傷性脳損傷、脳腫瘍、脊髄損傷、重症下

肢虚血、糖尿病性下肢潰瘍、肝硬変、急性肝不全、慢性肝不全、クローン病、敗血症、ウイルス感染症、表皮水疱症、糖尿病、糖尿病性臓器障害、アトピー性皮膚炎、過敏症、重度複合免疫不全症候群、多発性骨髄腫、川崎病、強皮症、脱毛症、自己免疫性肝炎、ループス腎炎、再生不良性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、乾癬、変形性股関節症、変形性膝関節症（ＯＡ）、椎間板変性、皮膚軟部組織感染症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎、緑膿菌感染症、後天性免疫不全症候群、狂犬病、インフルエンザ、骨壊死、骨減少症、歯槽骨喪失、骨損傷、骨形成不全症、脊椎癒着、筋萎縮、腱損傷、膝部損傷、筋損傷、筋骨格損傷、骨粗鬆症、運動障害疾患、多発性硬化症、脳性麻痺、認知症、視神経炎、手根管症候群、線条体黒質変性症、オリーブ橋小脳萎縮症、トゥレット症候群、顔面萎縮症、脳室周囲白質軟化症、脊髄小脳変性症、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、不安障害、適応障害、アルコール依存症、先天性自律神経失調症、脳炎、癲癇、二分脊椎、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、筋ジストロフィー、アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、ファブリー病、ハンチントン病、ムコ多糖症Ｉ型、シャルコー・マリー・トゥース病、神経因性疼痛、末梢神経障害、三叉神経痛、糖尿病性神経障害、坐骨神経痛、脊柱管狭窄症、低酸素性虚血性脳症、脳出血、乳がん、転移性膵臓がん、膵管腺がん、消化器がん、頭頸部がん、口腔がん、中皮腫、転移性非小細胞肺がん、黒色腫、皮膚がん、膠芽腫、固形がん、腺がん、神経膠腫、髄芽腫、ブドウ膜黒色腫、気管支拡張症、慢性気管支炎、呼吸窮迫症候群、特発性肺線維症、肺奇形、肺気腫、塵肺症、呼吸不全、急性肺損傷、肺損傷、子癇前症、うっ血性心不全、狭心症、心筋炎、先天性心疾患、拡張型心筋症、多臓器不全、冠動脈疾患、虚血、静脈瘤潰瘍、閉塞性血栓血管炎、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、肺狭窄、動静脈瘻、末梢血管疾患、血管新生障害、アテローム性動脈硬化、角膜損傷、角膜炎、角膜変性症、角膜潰瘍、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜色素変性症、萎縮型加齢黄斑変性、眼球乾燥症、角膜浮腫、滲出型加齢黄斑変性、瘻孔、創傷治癒、肥満、ピット・ホプキ

ンス症候群、褥瘡、下肢潰瘍、皮膚潰瘍、インスリン依存性糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、難聴、肛門周囲瘻、直腸瘻、痔瘻、直腸膣瘻、アルコール性肝障害、膵炎、胆道閉鎖症、消化管出血、原発性硬化性胆管炎、直腸炎、食道損傷、肝損傷、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、早期卵巣機能不全、卵巣がん、精子減少症、精巣疾患、勃起不全、陰茎硬結、子宮損傷、腎不全、糖尿病性腎症、腎損傷、腎線維症、間質性膀胱炎、ＩｇＡ腎症、腹圧性尿失禁、切迫性尿失禁、Ｃ３糸球体症、サラセミア、白血病、全身性炎症反応症候群、放射線宿酔、皮膚の火傷、再灌流障害、シンドロームＸ、代謝疾患、口腔粘膜炎、歯周病、歯肉病、及び自閉スペクトラム症から選択される疾患の治療薬、又は、再生医療における移植に伴う拒絶反応の抑制、移植（臓器移植、造血幹細胞移植、骨髄移植、角膜移植、膵島移植）の補助、老化の改善、及びワクチンへの利用から選択される応用的な利用のための医薬組成物。

［１９］

多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導する際に、上記多能性幹細胞の分化進行状態を判定するための方法であって、

（Ｉ）所望の時点で培養中の細胞集団の一部を採取する工程と、

（ＩＩ）採取した細胞集団の所定の遺伝子の発現量を測定する工程と、

（ＩＩＩ）測定した上記遺伝子の発現量を、閾値と比較する工程と、

（ＩＶ）測定した上記遺伝子の発現量が上記閾値以上であるとき、上記所望の時点における培養細胞集団が神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化しうると判定する工程と、

を含む、方法。

［２０］

上記所定の遺伝子は、１つ以上の分化誘導後に発現が亢進する遺伝子、及び／又は、１つ以上の拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子を含む、［１９］に記載の方法。

［２１］

上記１つ以上の分化誘導後に発現が亢進する遺伝子が、ＳＯＸ１０、ＲＨＯＢ、ＦＯＸＤ３、及びＮＯＴＣＨ１からなる群より選択される１つ以上を含み、上記１つ以上の拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子が、ＳＯＸ９、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＴＷＩＳＴ１、及びＥＤＮ３からなる群より選択される１つ以上を含む、［２０］に記載の方法。

［２２］

上記所望の時点は、多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得る工程内の任意の時点である、又は

前記所望の時点は、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団から神経堤細胞を選択的に培養する工程内の任意の時点である、［１９］～［２１］のいずれかに記載の方法。

［２３］

神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞の選択的培養における、α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの使用。

発明の効果

[0013] 本発明の神経堤細胞の培養方法及び神経堤細胞を含む細胞集団の製造方法によれば、フローサイトメトリーなどによって分化誘導後の神経堤細胞を含む細胞集団から神経堤細胞を選別しなくても、高純度の神経堤細胞を含む細胞集団を提供することができる。さらに、得られた該細胞集団を間葉系幹細胞へ分化誘導することで、高純度の間葉系幹細胞を含む細胞集団を提供することができる。

[0014] 本発明の多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化

進行状態の判定方法によれば、とりわけ所定の遺伝子の発現量によって、所望の時点における培養細胞集団の、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化進行状態を判定することができる。また、本発明によれば、神経堤細胞を選別し、所望の細胞状態の神経堤細胞を得ることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]実施例１における、ｉＰＳ細胞から神経堤細胞への分化誘導時点、及び分化誘導した神経堤細胞の拡大培養時点での神経堤細胞マーカーｐ７５の発現をフローサイトメトリーにより経時的に観察した結果を示した図である。

[図2]実施例１における、神経堤細胞から間葉系幹細胞へと分化誘導した時点の、間葉系幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリーにより観察した結果を示した図である。

[図3]実施例１及び実施例２における、分化誘導後にラミニン２１１又はラミニン２２１上で拡大培養した神経堤細胞を光学顕微鏡で観察した画像の図である。

[図4]実施例３における、分化誘導した神経堤細胞の各種細胞外マトリクスに対する細胞接着状態を光学顕微鏡で観察した画像の図である。

[図5]実施例３における、分化誘導した神経堤細胞（Ｐ０）、並びに、各種細胞外マトリクスを用いて拡大培養したＰ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の細胞集団におけるｐ７５陽性細胞率をフローサイトメトリーによって測定した結果を示す図である。

[図6]実施例３における、分化誘導した神経堤細胞（Ｐ０）、並びに、各種細胞外マトリクスを用いて拡大培養したＰ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の細胞集団のＮＧＦＲ（Ａ）、ＴＦＡＰ２Ａ（Ｂ）、及びＴＷＩＳＴ１（Ｃ）の、播種前（Ｄａｙ０）のｉＰＳ細胞を基準とする相対発現量を、リアルタイムＰＣＲによって測定した結果を示す図である。

[図7]実施例３における、分化誘導した神経堤細胞（Ｐ０）、並びに、各種細胞外マトリクスを用いて拡大培養したＰ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の細胞集団のＳＯＸ１０（Ａ）及びＳＯＸ９（Ｂ）の、播種前（Ｄａｙ０）の

ｉＰＳ細胞を基準とする相対発現量をリアルタイムＰＣＲによって測定した結果を示す図である。

[図8]実施例４における、各種細胞外マトリクスを用いて拡大培養した各継代時の細胞集団を対象としてマイクロアレイ解析を実施し、得られた全遺伝子の発現量に基づきクラスター分析を行った結果を示すデンドログラムである。

[図9]実施例６における、分化誘導した神経堤細胞（ＰＯ）、並びに、２種類の細胞外マトリクスを用いて拡大培養した各継代時の細胞集団を対象としてマイクロアレイ解析を実施し、得られた全遺伝子の発現量に基づきクラスター分析を行った結果を示すデンドログラムである。

発明を実施するための形態

[0016] 〔神経堤細胞を含む細胞集団の製造方法〕

一実施形態の神経堤細胞を含む細胞集団の製造方法は、少なくとも下記の工程（１）及び工程（２）を備える。

（１）多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得る工程

（２）工程（１）で得られた神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を、所定の細胞外マトリクスの存在下で接着培養する工程

[0017] 工程（１）は、多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化誘導工程であり、工程（２）は、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞の割合を高める（純化）ための神経堤細胞の選択的培養工程である。

[0018] ＜工程（１） 多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化誘導＞

［多能性幹細胞］

本明細書において「幹細胞」とは、分化能及び分化能を維持した増殖能（特に自己複製能）を有する未分化細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ）、

複能性幹細胞（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）、単能性幹細胞（ｕｎｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）等の亜集団が含まれる。

[0019] 多能性幹細胞は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、組織内幹細胞、体細胞などから誘導することができる。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ＥＳ細胞：Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）、ＥＧ細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｇｅｒｍ　ｃｅｌｌ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞：ｉｎｄｕｃｅｄ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）などを挙げることができる。

[0020] ＥＳ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ＥＳ細胞が樹立されており、再生医療にも利用されつつある。ＥＳ細胞は、内部細胞塊をフィーダー細胞上で培養することによって製造可能である。フィーダー細胞に代えて、マウスの場合はＬＩＦ（白血病抑制因子）、ヒトの場合はｂＦＧＦ（線維芽細胞増殖因子）を含む培地中で培養することによって製造することもできる。ＥＳ細胞の製造方法は、例えば、ＷＯ９６／２２３６２、ＷＯ０２／１０１０５７、ＵＳ５，８４３，７８０、ＵＳ６，２００，８０６、ＵＳ６，２８０，７１８などに記載されている。ＥＳ細胞は、所定の機関から入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒトＥＳ細胞であるＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２及びＫｈＥＳ－３は、京都大学再生医科学研究所から入手可能である。マウスＥＳ細胞であるＥＢ５細胞株及びＤ３細胞株は、それぞれ国立研究開発法人理化学研究所及びＡＴＣＣから入手可能である。なお、ＥＳ細胞は受精１４日以内の胚から樹立したＥＳ細胞である。

[0021] ＥＳ細胞の一つである核移植胚性幹細胞（ｎｔＥＳ細胞）は、核を取り除いた卵子に体細胞の核を移植して作ったクローン胚から樹立することができる。

[0022] ＥＧ細胞は、始原生殖細胞をｍＳＣＦ、ＬＩＦ及びｂＦＧＦを含む培地中で培養することによって製造することができる（Ｃｅｌｌ，７０：８４１－８４７，１９９２）。

[0023] 本明細書における「人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞；induced pluripotent stem cell）」とは、体細胞を、公知の方法などによって初期化（ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ）することで、多能性を誘導した細胞である。具体的には、線維芽細胞、又は末梢血単核球などの分化した体細胞を、Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｍｙｃ（ｃ－Ｍｙｃ、Ｎ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃ）、Ｇｌｉｓ１、Ｎａｎｏｇ、Ｓａｌｌ４、Ｌｉｎ２８、Ｅｓｒｒｂなどを含む初期化遺伝子群から選ばれる複数の遺伝子の組合せのいずれかの発現によって初期化して、多分化能を誘導した細胞が挙げられる。好ましい初期化因子の組み合わせとしては、（１）Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、及びＭｙｃ（例えばｃ－Ｍｙｃ又はＬ－Ｍｙｃ）、（２）Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｌｉｎ２８及びＬ－Ｍｙｃ（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ，２０１３；３１：４５８－４６６）を挙げることが出来る。

[0024] ｉＰＳ細胞は、２００６年、山中らによってマウス細胞で樹立された（Ｃｅｌｌ，２００６，１２６（４），ｐｐ．６６３－６７６）。ｉＰＳ細胞は、２００７年にヒト線維芽細胞でも樹立され、ＥＳ細胞と同様に多能性と自己複製能を有する（Ｃｅｌｌ，２００７，１３１（５），ｐｐ．８６１－８７２；Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００７，３１８（５８５８），ｐｐ．１９１７－１９２０；Ｎａｔ． Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２００８，２６（１），ｐｐ．１０１－１０６）。

[0025] ｉＰＳ細胞は、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加などによって体細胞からｉＰＳ細胞を誘導する方法によっても製造することができる（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１３，３４１，ｐｐ．６５１－６５４）。

[0026] また、株化されたｉＰＳ細胞を入手することも可能であり、例えば、京都大学で樹立された２０１Ｂ７細胞、２０１Ｂ７－Ｆｆ細胞、２５３Ｇ１細胞、２５３Ｇ４細胞、１２０１Ｃ１細胞、１２０５Ｄ１細胞、１２１０Ｂ２細胞、１２３１Ａ３細胞などのヒトｉＰＳ細胞株が、京都大学から入手可能である。株化された臨床用のｉＰＳ細胞として、例えば、京都大学で樹立され

たＦｆ－Ｉ０１、Ｆｆ－Ｉ１４、ＱＨＪＩ０１及びＱＨＪＩ１４が京都大学から入手可能である。また、ｉＰＳ細胞は例えば体細胞を用いて製造することが可能である。

[0027] ｉＰＳ細胞を製造する際に用いられる体細胞としては、特に限定は無いが、組織由来の線維芽細胞、血球系細胞（例えば、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、Ｔ細胞）、肝細胞、膵臓細胞、腸上皮細胞、平滑筋細胞、歯髄細胞などが挙げられる。ｉＰＳ細胞を製造する際に用いられる体細胞の由来としては、ヒト血管から採取した末梢血や臍帯血、皮膚組織、歯等が挙げられる。

[0028] ｉＰＳ細胞を製造する際に、数種類の遺伝子の発現によって初期化する場合、遺伝子を発現させるための手段は特に限定されない。上記手段としては、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はアデノ随伴ウイルスベクター）を用いた感染法、プラスミドベクター（例えば、プラスミドベクター、又はエピソーマルベクター）を用いた遺伝子導入法（例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、レトロネクチン法、又はエレクトロポレーション法）、ＲＮＡベクターを用いた遺伝子導入法（例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、又はエレクトロポレーション法）、タンパク質の直接注入法（例えば、針を用いた方法、リポフェクション法、又はエレクトロポレーション法）などが挙げられる。また、市販のｉＰＳ細胞作製キット（例えば、センダイウイルスベクターを用いたｉＰＳ細胞作製キットＣｙｔｏＴｕｎｅ（商標）－ｉＰＳ）を用いてもよい。

[0029] ｉＰＳ細胞は、フィーダー細胞存在下又はフィーダー細胞非存在下（フィーダーフリー）で製造できる。フィーダー細胞存在下でｉＰＳ細胞を製造する際には、公知の方法で、未分化維持因子存在下でｉＰＳ細胞を製造できる。フィーダーフリーでｉＰＳ細胞を製造する際に用いられる培地としては、特に限定は無いが、公知のＥＳ細胞及び／又はｉＰＳ細胞の維持培地、又はフィーダーフリーでｉＰＳ細胞を樹立するための培地を用いることができる。フィーダーフリーでｉＰＳ細胞を樹立するための培地としては、例えばＥ

ｓｓｅｎｔｉａｌ　８培地（Ｅ８培地）、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　６培地、ＴｅＳＲ培地、ｍＴｅＳＲ培地、ｍＴｅＳＲ－Ｅ８培地、Ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　８培地、ＳｔｅｍＦｉｔ培地などのフィーダーフリー培養用培地を挙げることができ、いずれも市販されている培地を入手可能である。ｉＰＳ細胞を製造する際、例えば、フィーダーフリーで体細胞に、センダイウイルスベクターを用いて、Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、及びＭｙｃ（例えばｃ－Ｍｙｃ又はＬ－Ｍｙｃ）の４因子を遺伝子導入することで、ｉＰＳ細胞を製造することができる。

[0030] 本発明における多能性幹細胞は、好ましくは哺乳動物の多能性幹細胞であり、より好ましくはげっ歯類（例、マウス又はラット）又は霊長類（例、ヒト又はサル）の多能性幹細胞であり、さらに好ましくは霊長類の多能性幹細胞、特に好ましくはヒトｉＰＳ細胞またはヒトＥＳ細胞である。

[0031] ［多能性幹細胞の未分化維持培地］

本明細書おいて多能性幹細胞の培養に用いられる培地、すなわち多能性幹細胞の多能性を維持可能な培地は、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。多能性幹細胞の培養のための基礎培地としては、例えば、ＢＭＥ培地、ＢＧＪｂ培地、ＣＭＲＬ　１０６６培地、Ｇｌａｓｇｏｗ’ｓ　Ｍｉｎｉｍａｌ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＧＭＥＭ）培地、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ　Ｚｉｎｃ　Ｏｐｔｉｏｎ培地、ＩＭＤＭ培地、Ｍｅｄｉｕｍ　１９９培地、Ｅａｇｌｅ　ＭＥＭ培地、αＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ培地、Ｆ－１２培地、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地、ＩＭＤＭ／Ｆ１２培地、ハム培地、ＲＰＭＩ　１６４０培地、Ｆｉｓｃｈｅｒ’ｓ培地、Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地及びこれらの混合培地を挙げることができる。

[0032] 本明細書において、多能性幹細胞の多能性を維持可能な培地は、多能性幹細胞の未分化状態を維持すべく、未分化維持因子を含む培地（未分化維持培地）であることが望ましい。当該培地は、市販品を利用することができ、例えば、基礎培地に未分化維持因子、血清代替物及び適宜栄養源などを添加す

ることにより、調製することができる。具体的には、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地にｂＦＧＦ、ＫＳＲ、非必須アミノ酸（ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ；ＮＥＡＡ）、Ｌ－グルタミン及び２－メルカプトエタノールを添加することにより、調製することができる。また、上述したＥｓｓｅｎｔｉａｌ　８培地（Ｅ８培地）、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　６培地、ＴｅＳＲ培地、ｍＴｅＳＲ培地、ｍＴｅＳＲ－Ｅ８培地、Ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　８培地、ＳｔｅｍＦｉｔ培地などのフィーダーフリー培地を用いることもできる。

[0033] 安全性を確保し、ロット間差を少なくするなどの好適な品質を確保する観点から、多能性幹細胞の培養に用いる培地は、好ましくはゼノフリー培地、さらに好ましくは動物由来成分を含まず化学的に既知組成である培地が好ましい。従って、多能性幹細胞の培養に用いられる培地は、フィーダーフリー培地、無血清培地であることが望ましい。

[0034] ［神経堤細胞への分化誘導方法］

神経堤（Neural Crest）は、脊椎動物の初期発生において表皮外胚葉と神経板の間に一過性に形成される構造であり、様々な細胞種に分化するため「第四の胚葉」とも呼ばれている。神経堤細胞（Neural Crest Cell; NCC）は神経堤から脱上皮化し、上皮から間葉への転換を行った後に、発生中の胚内で広範囲に遊走する細胞群である。胚内で特異的な領域に分布することにより、領域に特徴的な様々な細胞種、例えば、末梢神経、軟骨、平滑筋等に分化する。神経堤細胞は一過性に発生する細胞集団であるため、発生中の胚から回収するのは困難であったが、近年、マウスやヒトの多能性幹細胞から神経堤への分化誘導法の開発が報告されたことにより、入手することが可能となった。神経堤前駆細胞とは、神経堤細胞に分化することが運命づけられた細胞群の総称である。

[0035] 本明細書における「神経堤細胞」及び「神経堤前駆細胞」は、発生中に胚から得られる神経堤細胞及び神経堤前駆細胞、分化誘導法により得られた神経堤細胞及び神経堤前駆細胞を指し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞

に発現するマーカーにより同定することができる。神経堤細胞マーカーとしては、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ（ｐ７５と同義）、ＴＷＩＳＴ（ＴＷＩＳＴ１又はＴＷＩＳＴ２）、ＥＤＮ３などが挙げられ、神経堤前駆細胞マーカーとしては、ＦＯＸＤ３、ＰＡＸ３、ＺＩＣ１などが挙げられる。

[0036] 本明細書において、「神経堤細胞を含む細胞集団」には、神経堤前駆細胞が含まれていてもよい。また、「神経堤細胞を含む細胞集団」は神経堤幹細胞を含有する可能性がある。

[0037] 神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞は、多能性幹細胞から分化誘導によって得ることができる。分化誘導の方法は特に限定されないが、例えば、特許文献１～４、非特許文献１～２に記載の方法を用いることができる。また、分化誘導の効率を考慮すれば、多能性幹細胞を含む細胞集団を、少なくとも１つのＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤及び少なくとも１つのＷｎｔシグナル伝達活性化剤を含む培地で培養するのが好ましい。

[0038] ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤としては、例えば、ＳＭＡＤシグナルの上流において、ＳＭＡＤのリン酸化を阻害することでＳＭＡＤシグナル伝達を阻害し得るＴＧＦβスーパーファミリーの阻害剤であり、具体的には、ＴＧＦβ阻害剤及びＢＭＰ阻害剤が挙げられる。ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤は、１以上のＴＧＦβ阻害剤と、１以上のＢＭＰ阻害剤とを適宜組合せて使用してもよい。ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤として、少なくとも１つのＴＧＦβ阻害剤を含むことが好ましい。

[0039] 本明細書において、ＴＧＦβ阻害剤は、ＴＧＦβにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。ＴＧＦβ阻害剤として、例えばＴＧＦβに直接作用する物質（例えば、タンパク質、抗体、アプタマー等）、ＴＧＦβをコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ等）、ＴＧＦβ受容体とＴＧＦβの結合を阻害する物質、ＴＧＦβ受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質（例えば、ＴＧＦβ受容体の阻害剤等）を挙げることができる。Ｔ

ＧＦβ阻害剤として、受容体であるＡＬＫファミリーへの結合を阻害する物質、又はＡＬＫファミリーによるＳＭＡＤのリン酸化を阻害する物質が挙げられる。

[0040] 本明細書において、具体的なＴＧＦβ阻害剤としては、例えばＳＢ４３１５４２、ＳＢ２０２１９０（Ｒ．Ｋ．Ｌｉｎｄｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ． Ｃａｎｃｅｒ ２：２０（２００３））、ＳＢ５０５１２４（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）、ＮＰＣ３０３４５、ＳＤ０９３、ＳＤ９０８、ＳＤ２０８（Ｓｃｉｏｓ）、ＬＹ２１０９７６１、ＬＹ３６４９４７、ＬＹ５８０２７６（Ｌｉｌｌｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、Ａ－８３－０１（ＷＯ２００９１４６４０８）、Ｇａｌｕｎｉｓｅｒｔｉｂ（ＬＹ２１５７２９９）、ＬＹ３２００８８２、ＳＢ５２５３３４、ＧＷ７８８３８８、ＲｅｐＳｏｘ、Ｌｅｆｔｙ－１（ＮＣＢＩ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．として、マウス：ＮＭ＿０１００９４、ヒト：ＮＭ＿０２０９９７が例示される）、Ｌｅｆｔｙ－２（ＮＣＢＩ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．として、マウス：ＮＭ＿１７７０９９、ヒト：ＮＭ＿００３２４０及びＮＭ＿００１１７２４２５が例示される）、及びこれらの誘導体等が挙げられ、少なくとも１つのＴＧＦβ阻害剤を使用することができる。ＴＧＦβ阻害剤として、好ましくは、ＴＧＦβ受容体（ＡＬＫ５）及びアクチビン受容体（ＡＬＫ４／７）の阻害剤として知られている、ＳＢ４３１５４２及びＡ８３－０１からなる群から選択される１以上であることが好ましい。

[0041] 培地中におけるＴＧＦβ阻害剤の濃度は、ＴＧＦβにより媒介されるシグナル伝達を抑制可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、ＳＢ４３１５４２の濃度は、ＡＬＫ５を阻害可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、１００ｎＭ～１００μＭ、好ましくは５００ｎＭ～３０μＭ、更に好ましくは１μＭ～２０μＭである。他のＴＧＦβ阻害剤の場合、前述の濃度のＳＢ４３１５４２に相当するＡＬＫ阻害活性若しくはＴＧＦβ阻害活性を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0042] ＢＭＰ阻害剤は、ＢＭＰ（ｂｏｎｅ ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｔｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ）とＢＭＰ受容体（Ｉ型又はＩＩ型）との結合を介するＢＭＰシグナル伝達（ＢＭＰ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）の阻害に関与する阻害剤である限り特に限定されず、核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。ＢＭＰ阻害剤としては、ＢＭＰに直接作用する物質（例えば、タンパク質、抗体、アプタマー等）、ＢＭＰをコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ等）、ＢＭＰ受容体へのＢＭＰの結合を阻害することによって上記のＢＭＰシグナル伝達を阻害する生物活性を有する物質、ＢＭＰ受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質（例えば、ＢＭＰ受容体の阻害剤等）や、ＢＭＰＩ型受容体キナーゼ阻害剤等が含まれる。

[0043] ＢＭＰ受容体へのＢＭＰの結合を阻害することによって上記のＢＭＰシグナル伝達を阻害する生物活性を有するものの具体例には、Ｄｏｒｓｏｍｏｒｐｈｉｎ、Ｎｏｇｇｉｎ及びこれらの誘導体が挙げられる。また、ＢＭＰＩ型受容体キナーゼ阻害剤の具体例には、ＬＤＮ－１９３１８９（すなわち、４－（６－（４－（ピペラジン－１－イル）フェニル）ピラゾロ［１，５－ａ］ピリミジン－３－イル）キノリン）及びその誘導体（例えば、ＬＤＮ－２１２８５４）が挙げられる。その他ＢＭＰ阻害剤として、Ｋ０２２８８、Ｃｈｏｒｄｉｎ及びＦｏｌｌｉｓｔａｔｉｎが挙げられる。

[0044] ＢＭＰ阻害剤としては、好ましくはＮｏｇｇｉｎ、ＬＤＮ－１９３１８９、Ｄｏｒｓｏｍｏｒｐｈｉｎ及びＫ０２２８８（ＰＬｏＳ Ｏｎｅ． ２０１３； ８（４）： ｅ６２７２１．）からなる群から選択される１又は複数である。

[0045] 培地中におけるＢＭＰ阻害剤の濃度は、例えばＢＭＰにより媒介されるシグナル伝達を抑制可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、ＬＤＮ－１９３１８９の濃度は、ＢＭＰ Ｉ型受容体キナーゼを阻害可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、０．１ｎＭ～１０μＭ、又は０．５ｎＭ～１０μＭ、好ましくは１０ｎＭ～５μＭ、更に好ましくは５０ｎＭ

～３μＭ、更により好ましくは５０ｎＭ～１μＭである。他のＢＭＰ阻害剤の場合、前述の濃度のＬＤＮ－１９３１８９に相当するＢＭＰ　Ｉ型受容体キナーゼ阻害活性若しくはＢＭＰ阻害活性を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0046] Ｗｎｔシグナル伝達活性化剤は、Ｗｎｔにより媒介されるシグナル伝達を活性化し得るものである限り特に限定されない。Ｗｎｔシグナル伝達活性化剤としては、例えばＷｎｔタンパク質（Ｗｎｔ３ａ等）、Ｗｎｔアゴニスト、Ｄｋｋ（Ｗｎｔシグナル伝達阻害タンパク質の阻害剤）、ＧＳＫ３β（Ｇｌｙｃｏｇｅｎ　Ｓｙｎｔｈａｓｅ　Ｋｉｎａｓｅ　３β）阻害剤、Ｒ－Ｓｐｏｎｄｉｎ等が挙げられる。

[0047] 本明細書において、ＧＳＫ３β阻害剤は、Ｇｌｙｃｏｇｅｎ　Ｓｙｎｔｈａｓｅ　Ｋｉｎａｓｅ（ＧＳＫ）３βタンパク質のキナーゼ活性を阻害する物質として定義され、その具体例として、ＢＩＯ（別称：ＧＳＫ－３βインヒビターＩＸ；６－ブロモインジルビン－３’－オキシム）等のインジルビン（ｉｎｄｉｒｕｂｉｎ）誘導体、ＳＢ２１６７６３等のマレイミド誘導体、ＧＳＫ－３βインヒビターＶＩＩ等のα－ブロモメチルケトン化合物、ＣＨＩＲ９９０２１、Ｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ、Ｌ８０３－ｍｔｓ等の細胞膜透過性リン酸化ペプチド、及びそれらの誘導体が挙げられる。

[0048] 本明細書において、Ｗｎｔシグナル伝達活性化剤は、ＧＳＫ３β阻害剤であることが好ましく、また、ＧＳＫ３β阻害剤である、ＣＨＩＲ９９０２１、ＢＩＯ、Ｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ、ＳＢ２１６７６３及びＬ８０３－ｍｔｓからなる群から選択される１以上であることが好ましい。

[0049] 培地中におけるＷｎｔシグナル伝達活性化剤の濃度は、例えばＷｎｔタンパク質（Ｗｎｔ３ａ等）により媒介されるシグナル伝達を亢進可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、ＣＨＩＲ９９０２１の濃度は、ＧＳＫ３βを阻害可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、１００ｎＭ～１００μＭ、好ましくは５００ｎＭ～３０μＭ、更に好ましくは１μＭ～１０μＭである。他のＷｎｔシグナル伝達活性化剤の場合、前述の濃度の

ＣＨＩＲ９９０２１に相当するＧＳＫ３β阻害活性若しくはＷｎｔタンパク質（Ｗｎｔ３ａ等）により媒介されるシグナル伝達の亢進を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0050] 工程（１）において、多能性幹細胞はフィーダー細胞非存在下で培養される。フィーダー細胞非存在下とは、フィーダーフリーと言い換えられることができ、培地中にフィーダー細胞が存在しない状態のことを示す。フィーダー細胞非存在下の培養条件としては、例えば、線維芽細胞、ＳＮＬ細胞、ＳＴＯ細胞等のフィーダー細胞を添加していない培養条件が挙げられる。

[0051] 本明細書において「神経堤細胞分化誘導培地」とは、多能性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導因子を含み、当該培地で多能性幹細胞を培養することによって神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へと分化誘導することができる培地である。神経堤細胞分化誘導培地としては、神経堤細胞の分化誘導に適し、かつ、多能性幹細胞のフィーダーフリー培養に適した、フィーダーフリー培地であってもよい。神経堤細胞分化誘導培地は、例えば基礎培地に必要に応じて血清代替物及び栄養源等の添加因子、さらに、分化誘導因子を添加することにより好適に調製することができる。

[0052] 本発明の工程（１）は、多能性幹細胞を神経堤細胞分化誘導培地中で培養することにより、神経堤細胞へ分化誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得ることができる。すなわち、工程（１）全体で神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を得ることができれば、１つの工程から構成されることに限定されず、工程（１）は複数の細分化した小工程から構成されてもよい。例えば、工程（１）は、２～５の小工程、好ましくは２～３の小工程から構成されていてもよい。より具体的には（ｉ）各小工程で使用する神経堤細胞分化誘導培地は同じ組成であって、培養温度、酸素分圧等の培養条件が異なっている複数の小工程から構成されてもよく、（ｉｉ）１又は複数の分化誘導因子の種類、及び／又は濃度が異なる複数の小工程から構成されてもよく、（ｉｉｉ）上記（ｉ）及び（ｉｉ）を組み合わせる構成でもよい。

[0053] 言い換えると、多能性幹細胞を、神経堤細胞へ分化誘導するために必要な分化誘導因子で処理するタイミングは、適宜設定すればよく、複数の分化誘導因子を使用する場合、同時であっても、別々であってもよい。また、当該分化誘導因子の濃度は、適宜設定すればよく、一定であっても、段階的に増加もしくは減少させてもよい。

[0054] 工程（１）において用いられる基礎培地としては、細胞の培養が可能な限り特に限定はなく、細胞増殖用基礎培地として市販されている基礎培地を適宜使用することができる。細胞増殖用基礎培地として、例えば、ＢＭＥ培地、ＢＧＪｂ培地、ＣＭＲＬ　１０６６培地、Ｇｌａｓｇｏｗ　ＭＥＭ　（ＧＭＥＭ）培地、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ＭＥＭ　Ｚｉｎｃ　Ｏｐｔｉｏｎ培地、ＩＭＤＭ培地、Ｍｅｄｉｕｍ　１９９培地、Ｅａｇｌｅ　ＭＥＭ培地、αＭＥＭ培地、ＤＭＥＭ培地、Ｆ－１２培地、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地、ＩＭＤＭ／Ｆ１２培地、ハム培地、ＲＰＭＩ　１６４０培地、Ｆｉｓｃｈｅｒ’ｓ培地、ＣＤＭ培地又はこれらの混合培地等、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。ここでＣＤＭ培地とは、化学物質として同定された成分のみからなる培地を意味する。

[0055] これらの基礎培地には、糖質やアミノ酸等の炭素源やビタミン、無機塩類、血清もしくは血清代替え物等細胞の生存・増殖に必要な成分が適宜含まれる。また、血清代替物又は血清を含まない合成培地であることが好ましい。

[0056] 工程（１）において用いられる基礎培地として、例えば、ＣＤＭ培地が好ましく用いられる。具体的なＣＤＭ培地として、ＩＭＤＭ／Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２　１：１（ＧＩＢＣＯ、米国）及び１×　Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｄｅｆｉｎｅｄ　Ｌｉｐｉｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ　（ＧＩＢＣＯ）を含む培地が挙げられる。

[0057] 神経堤細胞分化誘導培地として、例えば、多能性幹細胞を未分化のままに維持培養するための培地（未分化維持培地）から、未分化維持のために必要な因子（未分化維持因子）の一部又は全てを除いた培地、又は、後述のとおり一部若しくは全ての未分化維持因子の濃度を有効濃度以下に低下させた培

地を使用することもできる。このような培地は、例えば、当該培地と同等の成分を含むように配合することによって調製することができる。または、例えば、ＤＭＥＭ等の基礎培地に血清代替物やホルモン等の栄養因子を添加した培地を使用することもできる。或いは、未分化維持培地は複数の液体を適宜混合して使用できるようキットとして販売されている場合があり、その場合、未分化維持因子を含む液体を入れないで配合することで、神経堤細胞分化誘導培地を調製することも可能である。例えばＳｔｅｍ　Ｆｉｔ　ＡＫ０３Ｎ（味の素ヘルシーサプライ社製）の場合、Ａ液、Ｂ液及びＣ液に分かれているので、ＦＧＦ２（ｂＦＧＦともいう）を含むＣ液を除いてＡ液及びＢ液のみで神経堤細胞分化誘導培地を調製して使用することができる。

[0058] 一態様として、神経堤細胞分化誘導培地には、ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤及びＷｎｔシグナル伝達活性化剤等の分化誘導因子が含まれるが、それらの作用を阻害又は拮抗する成分が、工程（１）に影響を与えない程度、例えば作用しない程度の濃度で含まれるか、又は含まれないことが好ましい。

[0059] 工程（１）に用いられる神経堤細胞分化誘導培地として、神経堤細胞から神経細胞（ｎｅｕｒａｌ　ｃｅｌｌ）への誘導が抑制されている培地が挙げられる。工程（１）に用いられる神経堤細胞分化誘導培地として、ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤及び／又はＷｎｔシグナル伝達活性化剤を含む基礎培地（例えばＣＤＭ培地）が挙げられる。

[0060] 工程（１）に用いられる神経堤細胞分化誘導培地の具体例としては、ＣＤＭ培地（ＩＭＤＭ／Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２　１：１（ＧＩＢＣＯ、米国）、１×　Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｄｅｆｉｎｅｄ　Ｌｉｐｉｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ　（ＧＩＢＣＯ）に、Ｏｐｔｉｆｅｒｒｉｎ（ＩｎＶｉｔｒｉａ、米国）（０．１～１０００μｇ／ｍｌであってよく、又は１～１００μｇ／ｍｌであってよく、好ましくは１０～３０μｇ／ｍｌ）、インスリン（Ｓｉｇｍａ、米国）　（０．１～１０００μｇ／ｍｌであってよく、又は１～１００μｇ／ｍｌであってよく、好ましくは２～２０μｇ／ｍｌ）、モノチオグリセロール（０．０１～１０ｍＭであってよく、又は０．１～１ｍＭで

あってよく、好ましくは０．３～０．６ｍＭ）（Ｗａｋｏ、日本））に、ＫＳＲ（ＧＩＢＣＯ）（１～６０体積％であってよく、好ましくは１０～３０体積％）、ＳＢ４３１５４２（Ｗａｋｏ）（０．１～１０００μＭであってよく、又は１～５００μＭであってよく、好ましくは２～２０μＭ）、及び、ＣＨＩＲ９９０２１（Ｗａｋｏ）（０．０１～１００μＭであってよく、又は０．０１～５０μＭであってよく、好ましくは０．１～３μＭ）を添加した培地が挙げられる。なお、本発明の製造方法において、ＣＤＭ培地は、神経堤細胞から神経細胞への誘導が抑制される培地であるため、神経堤細胞の維持に適する培地である。

[0061] 工程（１）において、培養容器の培養面、すなわち、細胞集団が接着する面が神経堤細胞の分化誘導に適した細胞外マトリクスによってコーティングされていることが好ましい。このような細胞外マトリクスは、分化誘導された神経堤細胞が接着しやすいものであればよく、特に限定されないが、例えば、ラミニン、フィブロネクチンが挙げられる。そのうち、ラミニン５１１、フィブロネクチンが好ましく用いられる。コーティング量としては、例えばラミニン５１１の場合、培養面の面積に対して、０．００１～３０μｇ／ｃｍ^{2}であってよく、０．０１～１０μｇ／ｃｍ^2、又は０．１～１μｇ／ｃｍ^{2}であることが好ましい。

[0062] 培養容器として、通常市販で入手できる培養容器、例えば、平底の、６ウェルプレート（底面積が９．５ｃｍ^{2}程度、内径３５ｍｍ程度）、１２ウェルプレート（底面積が３．８ｃｍ^{2}程度、内径２３ｍｍ程度）２４ウェルプレート（底面積が１．８８ｃｍ^{2}程度、内径１６ｍｍ程度）、４８ウェルプレート（底面積が１．０ｃｍ^{2}程度、内径１１ｍｍ程度）、９６ウェルプレート（底面積が０．３５ｃｍ^{2}程度、内径６～８ｍｍ程度）、３８４ウェルプレート（底面積が０．１ｃｍ^{2}程度、内径３～４ｍｍ程度）が挙げられる。好ましくは、平底の６ウェルプレートである。

[0063] ６ウェルプレートを用いて培養する場合、均一な細胞密度を有する細胞懸濁液を、培養容器の各孔に等量ずつ分注する。細胞密度は０．１×１０^{5}細胞

／ウェル～５．０×１０^{5}細胞／ウェルであってよく、好ましくは０．２×１０^{5}細胞／ウェル～２．０ｘ１０^{5}細胞／ウェルである。

[0064] 工程（１）における培養は、凡そ６日間～２０日間、好ましくは凡そ７日間～１８日間、更に好ましくは１０日間～１８日間行ってもよい。培養期間は、所望の細胞分化度によって決めてもよい。分化誘導した細胞がどのくらい分化したかを示す細胞分化度は、分化マーカーの測定によって決定することもでき、例えば、ＦＡＣＳによるｐ７５発現量の上昇、或いは、ＰＣＲによるＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＥＤＮ３及びＴＷＩＳＴ１のうち少なくとも１つの発現量の上昇によって行うことができる。発現量の上昇とは、特定の時点から一定時間経過後に誤差範囲内以上の発現量の上昇を示した場合を示す。

[0065] 工程（１）における培養の培養条件は特に限定されないが、例えば、３５℃～３７℃、好ましくは３７℃の温度、９０％～９５％、好ましくは９５％の湿度、３％～５％、好ましくは５％のCO_2濃度の条件であればよく、さらに低酸素培養条件であることが好ましい。「低酸素培養条件」とは、大気中の酸素濃度（約２１％）より低い酸素濃度において、細胞を培養する条件のことを意味する。ここで、酸素濃度とは、培養装置中、細胞を含む培地が接する空気中の酸素の濃度を意味する。酸素濃度は、２０％以下であれば特に限定されないが、好ましくは３％～１０％の範囲であり、より好ましくは４％～６％の範囲であり、最も好ましくは５％である。

[0066] なお、分化させる前に、すなわち、工程（１）の前に、多能性幹細胞を未分化維持培地で維持培養してもよい。未分化維持培地は、未分化状態を維持するために必要な因子（未分化維持因子）を含み、多能性を維持できる培地である。未分化維持因子としては、線維芽細胞増殖因子、形質転換増殖因子ベータ（ＴＧＦβファミリー）因子、アクチビンＡ等が挙げられる。本明細書における「線維芽細胞増殖因子（Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒｓ、ＦＧＦ）」とは、線維芽細胞増殖因子受容体に作用してＦＧＦシグナルを活性化する因子を意味する。ＦＧＦとして、例えば、ＦＧＦ

２（ｂＦＧＦともいう）、ＦＧＦ４及びＦＧＦ８が挙げられる。なお、未分化維持培地は、上述のとおりである。

[0067] 一態様として、工程（１）によって、得られる神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団は、神経堤細胞マーカー及び神経堤前駆細胞マーカーの少なくとも１以上がｉＰＳ細胞よりも高く発現している。

[0068] 一態様として、工程（１）によって得られる神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団は、全細胞数における、神経堤細胞マーカー及び神経堤前駆細胞マーカーの少なくとも１以上が陽性の細胞の割合が、凡そ１％以上であり、好ましくは１０％以上、更に好ましくは３０％以上、より好ましくは４０％以上である。

[0069] 一態様として、工程（１）によって得られる神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団は、神経堤細胞を含む細胞集団である。この場合において、全細胞数におけるｐ７５陽性細胞（すなわち、神経堤細胞）の割合が、凡そ１％以上であり、好ましくは１０％以上、更に好ましくは３０％以上、より好ましくは４０％以上である。

[0070] ＜工程（２） 神経堤細胞の選択的培養＞

一実施形態の神経堤細胞の選択的培養方法、すなわち、上記工程（２）は、α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの存在下で、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する培養工程を備える。本明細書では、この工程（２）を拡大培養と呼ぶことがある。

[0071] 工程（２）の培養対象は、工程（１）で得られた神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団であり、この際には、工程（１）で得られた細胞集団に対して神経堤細胞マーカーにより選別することなく、そのまま工程（２）に供することができる。工程（２）は選択的に神経堤細胞を培養し、

増殖させることが可能であるからである。後述の実施例に示すとおり、上記所定の細胞外マトリクスの存在下で、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養することにより、一定の傾向の細胞状態の神経堤細胞を得ることもできる。

[0072] ここで、本明細書において「一定の傾向の細胞状態」とは、遺伝子発現状態が一定の傾向であることを意味する。遺伝子発現状態が一定の傾向であることは、独立した複数の、同じ培養方法により得た神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団サンプル間に対して、マイクロアレイ、ＲＮＡシーケンス等を実施し、遺伝子プロファイリングの類似性をクラスター解析すること等によって分析できる。

[0073] 本明細書におけるラミニン（Ｌａｍｉｎｉｎ）とは、細胞外マトリクスの基底膜を構成するタンパク質であり、α鎖、β鎖、γ鎖をそれぞれ１本ずつ持つヘテロ三量体構造を有する。α鎖にはα１鎖、α２鎖、α３鎖、α４鎖及びα５鎖の５種類があり、β鎖にはβ１鎖、β２鎖及びβ３鎖の３種類があり、γ鎖にはγ１鎖、γ２鎖及びγ３鎖の３種類がある。これらの組合せで各種ラミニンを形成する。例えば、ラミニン５１１は、α５鎖、β１鎖及びγ１鎖から構成される。ラミニンは細胞接着分子であり、細胞表面のレセプターと結合する。ラミニンのレセプターとして、インテグリンがある。ラミニンには、インテグリンに結合する部位が存在し、この結合部位が存在するラミニンの断片はＥ８フラグメントとして知られている。

[0074] 工程（２）における細胞外マトリクスは、α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン（すなわち、ラミニン１１１、ラミニン１１２）、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン（すなわち、ラミニン２１１、ラミニン２１２）、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン（すなわち、ラミニン２２１、ラミニン２２２）、及び、α鎖がα５鎖且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン（すなわち、ラミニン５１１、ラミニン５１２）からなる群から選択される１以上のラミニンであってよく、また、これらのラミニンのγ鎖がγ１鎖であることが好ましく、例えば、ラミニン２

２１、ラミニン２１１、ラミニン１１１、ラミニン５１１であってよく、特にラミニン２２１であることが好ましい。

[0075] 工程（２）における細胞外マトリクスはまた上記のラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスであってよく、ラミニンのインテグリン結合部位は、インテグリン結合部位を含むＥ８フラグメントであることが好ましく、特にラミニン２２１のＥ８フラグメントであることが好ましい。ラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスは、インテグリン結合部位を含むラミニン断片（例えば、Ｅ８フラグメント）であってもよく、また、インテグリン結合能に影響し得ない又はインテグリン結合能を増強し得る他のアミノ酸残基又はペプチドが、ラミニンのインテグリン結合部位（例えば、Ｅ８フラグメント）に結合して得られたペプチド又はタンパク質であってよい。

[0076] 工程（２）において、上記所定の細胞外マトリクスを用いることで、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞を選択的に生着させ増殖させることができ、さらに、神経堤細胞に分化誘導されやすい神経堤前駆細胞を選択的に生着させ増殖・分化誘導を促進することができる。この結果、細胞集団の全細胞数に対する神経堤細胞の割合が高くなり、神経堤細胞を濃縮し純化することができる。

[0077] 工程（２）の接着培養は、上記所定の細胞外マトリクスの存在下で、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する。所定の細胞外マトリクスの存在下とは、所定の細胞外マトリクスで細胞集団が接着する培養面をコーティングしている状態で存在していてもよく、また、所定の細胞外マトリクスを培地に添加している状態で存在していてもよく、さらにその両方の状態で存在していてもよい。これらのうち、好ましくは、所定の細胞外マトリクスで細胞集団が培養面をコーティングしている状態で存在することである。コーティングの場合は、培養面の少なくとも一部（例えば、培養面の５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、９５％以上）が上記細胞外マトリクスでコーティングされていればよく、コ

ーティング量としては、例えばラミニン２２１、ラミニン２１１、ラミニン１１１、ラミニン５１１及びこれらのＥ８フラグメントの場合、培養面の面積に対して、０．００１～３０μｇ／ｃｍ²であってよく、０．０１～１０μｇ／ｃｍ²、又は０．１～２μｇ／ｃｍ²であることが好ましい。培地に添加する場合は、コーティング量としては、例えばラミニン２２１、ラミニン２１１、ラミニン１１１、ラミニン５１１及びこれらのＥ８フラグメントの場合、培養面の面積に対して、０．１～１０００ｎｇ／ｃｍ²であってよく、１～１００ｎｇ／ｃｍ²、又は２～２０ｎｇ／ｃｍ²あることが好ましい。

[0078] 工程（２）に使用される培地は、神経堤細胞を分化させないように、神経堤細胞の維持に適した培地であれば、特に限定されないが、神経堤細胞の維持及び増殖に適した培地であることが好ましい。「神経堤細胞の維持に適する培地」としては、上記の工程（１）における基礎培地に、神経堤細胞を細胞死させたりさらに分化させたりすることなく維持するために必要な成分を添加した培地であればよい。また、細胞への刺激を低減するために、工程（２）の基礎培地は工程（１）で使用した基礎培地と同じものを使用することが好ましい。例えば、工程（１）における基礎培地に血清代替物及び適宜栄養源などを添加してもよく、このような成分として、アルブミン、ＢＳＡ、ＨＳＡ、ＦＢＳ、ＫＳＲ、ＴＧＦβ阻害剤（ＳＢ４３１５４２など）、成長因子（ＥＧＦ、ｂＦＧＦなど）などが挙げられる。一態様として、ＣＤＭ培地に、アルブミン、ＢＳＡ、ＨＳＡ、ＦＢＳ及びＫＳＲから選択される１以上の成分、ＴＧＦβ阻害剤、及び成長因子（ＥＧＦ、ｂＦＧＦなど）を添加した培地が挙げられる。

[0079] 工程（２）の培養条件及び培養容器は工程（１）に準じる。工程（２）の培養日数、すなわち、拡大培養の日数は、特に限定されないが、凡そ１２日間～２８日間、好ましくは凡そ１４日間～２２日間、より好ましくは凡そ１６日間～２０日間行ってもよい。拡大培養の間に、例えば、３日～５日／１回の間隔で継代してもよく、３日～７日／１回、または２日～１２日／１回の間隔で継代してもよい。

[0080] 培養前の細胞集団に比べて、工程（２）の拡大培養後の細胞集団における全細胞数及び全細胞数に対する神経堤細胞の割合の両方が増加する。全細胞数は、例えば４～３０倍増加し、全細胞数に対する神経堤細胞の割合は、例えば、１．２～５倍増加する。

[0081] ＜神経堤細胞を含む細胞集団＞

一実施形態の神経堤細胞を含む細胞集団は、上記神経堤細胞の製造方法によって得られる細胞集団である。神経堤細胞を含む細胞集団は、全細胞数に対するｐ７５陽性細胞（すなわち、神経堤細胞）の割合が７０％以上（例えば、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上）であり、全細胞数に対する神経堤前駆細胞の割合が３０％以下（例えば、２０％以下、１５％以下、１０％以下又は５％以下）である。

[0082] また、工程（２）にて培養後の細胞集団が、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＥＤＮ３及びＴＷＩＳＴ１から選択される少なくとも１つの遺伝子を発現する。これらの遺伝子は、神経堤細胞マーカーであり、これらの遺伝子の発現はＰＣＲ等当業者にとって一般的な手法で測定することができる。

[0083] 上記では、神経堤細胞は多能性幹細胞から誘導する方法を用いたが、神経堤細胞を得る方法はこれに限られず、例えば、生体内から分離したものを、神経堤細胞の選択的培養方法に用いてもよい。

[0084] 本発明の一実施形態として、α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの存在下で、生体由来の神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する培養工程を備える、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団の培養方法も提供される。当該培養方法における培養工程は、上述の工程（２）と同様である。

[0085] 上記生体由来の神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団は、

例えば発生中の胚から回収されたものである。発生中の胚から回収された神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団は、神経堤細胞マーカー（ＳＯＸ１０、ｐ７５）を用いて神経堤細胞を含む細胞集団をソーティングすることにより回収することができる。上記発生中の胚は、ヒトの胚である場合、発生１５日以内の胚である。

[0086] 〔間葉系幹細胞の製造方法〕

一実施形態の間葉系幹細胞の製造方法は、下記の工程（３）及び工程（４）を備える。

（３）上記神経堤細胞の製造方法で神経堤細胞を含む細胞集団を製造する工程

（４）工程（３）で得られた細胞集団をｂＦＧＦの存在下で培養し、間葉系幹細胞へ分化誘導する工程

[0087] 工程（３）は、上述の工程（１）及び工程（２）を備える。工程（４）は、間葉系幹細胞の分化誘導工程である。

[0088] 本明細書における間葉系幹細胞（Ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ；ＭＳＣ）とは、成体内に存在する幹細胞の一つで、中胚葉由来の組織である骨や軟骨、血管、心筋細胞に分化できる能力をもつ細胞。間葉系細胞マーカーとしては、ＣＤ７３、ＣＤ１０５、ＣＤ４４などの陽性マーカー、及びＣＤ４５などの陰性マーカーが挙げられる。

[0089] 工程（４）の培地は、上記工程（１）の説明において挙げられた基礎培地に、ｂＦＧＦを添加して調製すればよく、基礎培地としては、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０、αＭＥＭが好ましく、特にαＭＥＭが好ましく使用できる。ｂＦＧＦの添加量としては、０．０１～１０００ｎｇ／ｍｌであればよく、０．１～１００ｎｇ／ｍｌ、又は１～３０ｎｇ／ｍｌであることが好ましい。培地に任意に添加する成分としては、ＦＢＳ、ＢＳＡなどが挙げられる。

[0090] 工程（４）の培養条件及び培養容器は、工程（１）及び（２）に準じる。また、細胞の生着を促進するために、培養面を細胞外マトリクスでコーティ

ングしてもよい。このような細胞外マトリクスとしては、ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ（Recombinant Human Fibronectin Fragment）、フィブロネクチン等が挙げられ、特にフィブロネクチンが好ましく使用される。コーティング量としては、培養面の面積に対して、０．０１～１０００μｇ／ｃｍ^{2}であってよく、０．１～１００μｇ／ｃｍ^2、又は１～３０μｇ／ｃｍ^{2}であることが好ましい。

[0091] 工程（４）の培養は、凡そ４日間～２０日間、好ましくは凡そ８日間～１６日間行ってもよい。培養期間は、所望の細胞分化度によって決めてもよい。細胞分化度は、分化マーカーの発現量の測定によって決定することができる。例えば、ＦＡＣＳによるＣＤ７３、ＣＤ１０５、ＣＤ４４発現量の上昇、又はＣＤ４５発現量の減少、或いは、ＰＣＲによるＣＤ７３、ＣＤ１０５、ＣＤ４４のいずれか１つの所定の発現量の上昇又はＣＤ４５発現量の減少によって行うことができる。

[0092] 一実施形態に係る間葉系幹細胞の製造方法は、下記の工程（３’）及び工程（４’）を備える。

（３’）神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を胚から回収する工程

（４’）工程（３’）で得られた細胞集団をｂＦＧＦの存在下で培養し、間葉系幹細胞へ分化誘導する工程

[0093] 上記工程（３’）及び工程（４’）を備える間葉系幹細胞の製造方法は、上記工程（３）及び工程（４）を備える間葉系幹細胞の製造方法と同様の態様を適用できる。

[0094] ＜間葉系幹細胞を含む細胞集団＞

一実施形態の間葉系幹細胞を含む細胞集団は、上記間葉系幹細胞の製造方法によって得られる細胞集団である。間葉系幹細胞を含む細胞集団は、全細胞数に対するＣＤ４５陰性かつＣＤ７３、ＣＤ１０５、ＣＤ４４陽性細胞の割合が９０％以上である。

[0095] 〔治療薬及び医薬組成物〕

一実施形態の治療薬又は医薬組成物は、上記間葉系幹細胞の細胞集団又は、上記間葉系幹細胞の製造方法によって得られる細胞集団を有効成分として含有する、治療薬及び医薬組成物である。具体的には、例えば、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、喘息、重症心不全、心筋梗塞、脳梗塞、外傷性脳損傷、脳腫瘍、脊髄損傷、重症下肢虚血、糖尿病性下肢潰瘍、肝硬変、急性肝不全、慢性肝不全、クローン病、敗血症、ウイルス感染症、表皮水疱症、糖尿病、糖尿病性臓器障害、アトピー性皮膚炎、過敏症、重度複合免疫不全症候群、多発性骨髄腫、川崎病、強皮症、脱毛症、自己免疫性肝炎、ループス腎炎、再生不良性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、乾癬、変形性股関節症、変形性膝関節症（ＯＡ）、椎間板変性、皮膚軟部組織感染症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎、緑膿菌感染症、後天性免疫不全症候群、狂犬病、インフルエンザ、骨壊死、骨減少症、歯槽骨喪失、骨損傷、骨形成不全症、脊椎癒着、筋萎縮、腱損傷、膝部損傷、筋損傷、筋骨格損傷、骨粗鬆症、運動障害疾患、多発性硬化症、脳性麻痺、認知症、視神経炎、手根管症候群、線条体黒質変性症、オリーブ橋小脳萎縮症、トゥレット症候群、顔面萎縮症、脳室周囲白質軟化症、脊髄小脳変性症、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、不安障害、適応障害、アルコール依存症、先天性自律神経失調症、脳炎、癲癇、二分脊椎、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、筋ジストロフィー、アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、ファブリー病、ハンチントン病、ムコ多糖症Ｉ型、シャルコー・マリー・トゥース病、神経因性疼痛、末梢神経障害、三叉神経痛、糖尿病性神経障害、坐骨神経痛、脊柱管狭窄症、低酸素性虚血性脳症、脳出血、乳がん、転移性膵臓がん、膵管腺がん、消化器がん、頭頸部がん、口腔がん、中皮腫、転移性非小細胞肺がん、黒色腫、皮膚がん、膠芽腫、固形がん、腺がん、神経膠腫、髄芽腫、ブドウ膜黒色腫、気管支拡張症、慢性気管支炎、呼吸窮迫症候群、特発性肺線維症、肺奇形、肺気腫、塵肺症、呼吸不全、急性肺損傷、肺損傷、子癇前症、うっ血性心不全、狭心症、心筋炎、先天性心疾患、拡張型心筋症、多臓器

不全、冠動脈疾患、虚血、静脈瘤潰瘍、閉塞性血栓血管炎、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、肺狭窄、動静脈瘻、末梢血管疾患、血管新生障害、アテローム性動脈硬化、角膜損傷、角膜炎、角膜変性症、角膜潰瘍、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜色素変性症、萎縮型加齢黄斑変性、眼球乾燥症、角膜浮腫、滲出型加齢黄斑変性、瘻孔、創傷治癒、肥満、ピット・ホプキンス症候群、褥瘡、下肢潰瘍、皮膚潰瘍、インスリン依存性糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、難聴、肛門周囲瘻、直腸瘻、痔瘻、直腸膣瘻、アルコール性肝障害、膵炎、胆道閉鎖症、消化管出血、原発性硬化性胆管炎、直腸炎、食道損傷、肝損傷、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、早期卵巣機能不全、卵巣がん、精子減少症、精巣疾患、勃起不全、陰茎硬結、子宮損傷、腎不全、糖尿病性腎症、腎損傷、腎線維症、間質性膀胱炎、ＩｇＡ腎症、腹圧性尿失禁、切迫性尿失禁、Ｃ３糸球体症、サラセミア、白血病、全身性炎症反応症候群、放射線宿酔、皮膚の火傷、再灌流障害、シンドロームＸ、代謝疾患、口腔粘膜炎、歯周病、歯肉病、及び自閉スペクトラム症から選択される疾患の治療薬、又は、再生医療における移植に伴う拒絶反応の抑制、移植（臓器移植、造血幹細胞移植、骨髄移植、角膜移植、膵島移植）の補助、老化の改善、及びワクチンへの利用から選択される応用的な利用等のための医薬組成物である。

[0096] 治療薬又は医薬組成物における、当該有効成分の有効量は、投与目的、投与方法、及び投与対象の状況（性別、年齢、体重、病状等）によって異なるが、例えば、細胞集団の有効量としては、間葉系幹細胞の細胞数を基準に１．０×１０^{8}細胞以上を用いることが好ましい。

[0097] 一実施形態の治療薬又は医薬組成物は、上記有効成分の有効量のほか、薬学的に許容される担体を含んでもよい。薬学的に許容される担体としては、生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）を用いることができる。治療薬又は医薬組成物は、必要に応じて移植医療において、移植する組織又は細胞を含む医薬に、通常使用される保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を含んでもよい。

[0098] 細胞集団を、適切な生理的な水性溶媒で懸濁することによって、細胞懸濁

液として製造することができる。必要であれば、凍結保存剤を添加して上記細胞集団を凍結保存し、使用時に解凍し、緩衝液で洗浄し、移植医療に用いてもよい。

[0099] 有効成分の細胞集団は、株化された多能性幹細胞から製造される場合、マーカー等により特定され品質管理されることにより、安定した品質の細胞集団を大量に製造し、移植に用いることができる。また、細胞集団を保存することができるため、患者の移植の時期にあわせて細胞集団を準備することができる。

[0100] 〔多能性幹細胞の分化進行状態の判定方法〕

一実施形態の多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導する際に、上記多能性幹細胞の分化進行状態を判定するための方法は、下記の工程（Ｉ）～（ＩＶ）を含む。

（Ｉ）所望の時点で培養中の細胞集団の一部を採取する工程

（ＩＩ）採取した細胞集団の所定の遺伝子の発現量を測定する工程

（ＩＩＩ）測定した上記遺伝子の発現量を、閾値と比較する工程

（ＩＶ）測定した上記遺伝子の発現量が上記閾値以上であるとき、上記所望の時点における培養細胞集団が神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化しうると判定する工程

[0101] ＜工程（Ｉ） 細胞集団の一部の採取工程＞

工程（Ｉ）において、「所望の時点」とは、多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導するための培養における任意の時点を意味する。ここで、多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導するための培養は、上記の神経堤細胞を含む細胞集団の製造方法における工程（１）及び（２）を含み得る。工程（Ｉ）における所望の時点としては、例えば、多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得る工程内（工程（１）の工程内）の任意の時点であってもよく、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団から神経堤細胞を選択的に培養する工程内

（工程（２）の工程内）の任意の時点であってもよい。

[0102] 工程（Ｉ）における培養中の細胞集団は、多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導するための培養における培養中の細胞集団であればよく、例えば工程（１）の培養中の細胞集団であってもよく、工程（２）の培養中の細胞集団であってもよい。細胞集団から一部を採取することは、通常の方法、遠心分離等によって行うことができ、また、採取される細胞数も特に限定されず、後述の遺伝子の発現量を測定できる細胞数であればよい。

[0103] ＜工程（ＩＩ） 所定の遺伝子の発現量の測定工程＞

所定の遺伝子とは、多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化が確認できる遺伝子であればよく、多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化誘導後の細胞集団において発現量が増加する遺伝子であってよく、多能性幹細胞では殆ど発現せず、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞で特異的に発現する遺伝子であることが好ましい。多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化誘導（工程）後の細胞集団において発現量が増加する遺伝子とは、分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子であってもよく、又は拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子であってもよい。ここで「分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子」は、分化誘導（工程）の終了時に、多能性幹細胞と比較して発現が亢進する遺伝子を意味し、分化誘導の進行に伴い発現が徐々に亢進する遺伝子を含む。また、「分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子は」拡大培養期間に更に発現が亢進する遺伝子を含む。上記所定の遺伝子は、例えば、１つ以上の分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子、及び／又は、１つ以上の拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子を含んでよい。所定の遺伝子は、未分化マーカー遺伝子と組み合わせたものであってもよい。本願明細書における遺伝子の発現量とは、遺伝子の発現産物の量を意味する。遺伝子の発現産物は、例えば、遺伝子のｍＲＮＡであってもよく、遺伝子がコードするタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

[0104] 遺伝子の発現量を測定する方法は特に限定されないが、当業者にとって公知の方法により実施することができる。そのような方法としては、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）、リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット、ＲＮＡシーケンス、マイクロアレイ、ウエスタンブロッティング、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ等が挙げられる。

[0105] 上記１つ以上の分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子は、例えば、ＳＯＸ１０、ＲＨＯＢ、ＦＯＸＤ３、及びＮＯＴＣＨ１であってもよい。上記１つ以上の拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子は、例えばＳＯＸ９、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＴＷＩＳＴ１、及びＥＤＮ３からなる群より選択される１つ以上を含んでもよくＴＷＩＳＴ１、及び／又はＮＧＦＲであることが好ましい。尚、分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子には、前記ＳＯＸ９、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＴＷＩＳＴ１、及びＥＤＮ３が含まれる。これらの遺伝子は、本発明者らの実験（実施例４～６）にて、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞に特異的に発現する遺伝子（神経堤細胞関連遺伝子）であることが示唆されている。上記未分化マーカー遺伝子としては、例えばＮＡＮＯＧ、Ｏｃｔ３／４が挙げられる。

[0106] ＜工程（ＩＩＩ） 測定した上記遺伝子の発現量を閾値と比較する工程＞

工程（ＩＩＩ）では、上記工程（ＩＩ）で測定した遺伝子の発現量を、予め設定した閾値と比較する。工程（ＩＩＩ）における閾値は、例えば、分化誘導前の多能性細胞における上記所定の遺伝子の発現量に基づいて設定してもよく、又は所望の分化進行状態に達していない培養細胞集団における上記所定の遺伝子の発現量に基づいて設定してもよい。ここで、閾値は遺伝子の発現産物（ｍＲＮＡかポリペプチド）によって異なり得る。

[0107] ＜工程（ＩＶ） 上記細胞集団が神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞集団へ分化しうるかどうかの判定工程＞

上記所定の遺伝子は、多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞への分化誘導後の細胞集団において発現量が増加する遺伝子（分化誘導（工程）後に発現が亢進する遺伝子、及び／又は、拡大培養期間に発現が亢

進する遺伝子）であり、上記閾値は所望の分化進行状態に達していない培養細胞集団の指標であるため、当該遺伝子の発現量が上記閾値よりも高い場合には、所望の時点における培養細胞集団が神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化しうると判定することができる。

[0108] 一実施形態に係る多能性幹細胞の分化進行状態の判定方法は、多能性幹細胞集団から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞集団へ分化させることのできる物質のスクリーニング方法と捉えることもできる。

[0109] 上記方法によって、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化しうると判定された細胞集団を回収し、さらに該細胞集団における神経堤細胞を選択的に培養してもよい。さらに得られた神経堤細胞を含む細胞集団を、上記間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法にしたがって培養することで、間葉系幹細胞を含む細胞集団を製造してもよい。

[0110] 〔神経堤細胞の細胞外マトリクスの使用〕

本発明の一態様として、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞の選択的培養における、α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの使用を提供する。

[0111] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

実施例

[0112] 〔実施例１　神経堤細胞への分化誘導及びｉＭａｔｒｉｘ－２２１を用いた拡大培養〕

＜ｉＰＳ細胞の培養＞

ｉＰＳ細胞として、成人末梢血単核球から、ＣｙｔｏＴｕｎｅ（商標）－２．０（ＩＤファーマ）を用いて樹立したｉＰＳ細胞（ＳＭＣＢ００４）を

使用した。ラミニン５１１のＥ８フラグメントであるｉＭａｔｒｉｘ－５１１（株式会社ニッピ、日本）を０．５μｇ／ｃｍ^{2}になるように６ウェルプレートに添加し、１時間、３７℃のインキュベーターで静置し、培地を少量添加後に上清を吸引除去し、その後ＰＢＳにて洗浄し、ｉＭａｔｒｉｘ－５１１でコーディングしたプレートを得た。次いで、ＳｔｅｍＦｉｔ（登録商標）ＡＫ０３Ｎ（味の素株式会社、日本）培地で懸濁したｉＰＳ細胞を８０００細胞／ウェル播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで５日間培養した。なお、本実施例では、ｉＰＳ細胞を播種した日をＤａｙ０とし、その後の実験日は、この日から数えた日数で表記する。例えば、ｉＰＳ細胞を培養した５日後をＤａｙ５と表記する。

[0113] ＜ｉＰＳ細胞から神経堤細胞への分化誘導＞

ｉＰＳ細胞播種５日後（Ｄａｙ５）、ＣＤＭ培地（ＩＭＤＭ／Ｈａｍ’ｓＦ－１２　１：１（ＧＩＢＣＯ、米国）、１×　Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｄｅｆｉｎｅｄ　Ｌｉｐｉｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ　（ＧＩＢＣＯ）、１５μｇ／ｍｌ　Ｏｐｔｉｆｅｒｒｉｎ　（ＩｎＶｉｔｒｉａ、米国）、７μｇ／ｍＬインスリン（Ｓｉｇｍａ、米国）、４５０μＭモノチオグリセロール（Ｗａｋｏ、日本））に、２０％のＫＳＲ（ＧＩＢＣＯ）、１０μＭＳＢ４３１５４２（Ｗａｋｏ）及び１μＭ　ＣＨＩＲ９９０２１（Ｗａｋｏ）を添加した神経堤細胞誘導培地に置換し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで９日間培養し、神経堤細胞への分化誘導を行った。本実施例において、この分化誘導時点をパッセージ０（Ｐ０）と呼ぶ。

[0114] ＜神経堤細胞の拡大（選択）培養＞

ラミニン２２１のＥ８フラグメントであるｉＭａｔｒｉｘ－２２１（株式会社ニッピ）を０．５μｇ／ｃｍ^{2}になるように６ウェルプレートに添加し、１時間、３７℃のインキュベーターで静置し、培地を少量添加後に上清を吸引除去し、その後ＰＢＳにて洗浄し、ｉＭａｔｒｉｘ－２２１コーティングプレートを得た。

[0115] 次いで、Ｄａｙ１４に、神経堤細胞の分化誘導にて９日間培養した細胞を

トリプシン／ＥＤＴＡ溶液を用いて剥離回収し、シングルセル化して、神経堤細胞拡大培養用培地（ＣＤＭ培地に、５ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ（Ｐｒｏｌｉａｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、米国）、１０μＭ　ＳＢ４３１５４２、１０ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ（Ｗａｋｏ）及び２０ｎｇ／ｍＬ　ＥＧＦ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、米国）を添加した培地）で懸濁した細胞を上記ｉＭａｔｒｉｘ－２２１コーティングプレートに５００００細胞／ウェル播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで１０日間培養した。本実施例において、この拡大培養、すなわち、１回継代後の拡大培養をパッセージ１（Ｐ１）と呼ぶ。

[0116]　播種後１０日目（Ｄａｙ２４）に、初回の継代を実施した。細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ溶液を用いて剥離回収し、神経堤細胞拡大培養用培地で懸濁した細胞をｉＭａｔｒｉｘ－２２１でコーティングしたプレートに５００００細胞／ウェル播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで培養した。本実施例において、この拡大培養、すなわち、２回継代後の拡大培養をパッセージ２（Ｐ２）と呼ぶ。その後、３～７日毎に継代し（Ｐ３、Ｐ４など）、さらに数度継代操作を実施した。

[0117]＜フローサイトメトリーによる分化誘導及び拡大培養の結果の確認＞

上記の播種前（Ｄａｙ０）のｉＰＳ細胞（未分化ｉＰＳ細胞）、並びに、神経堤細胞（ＮＣＣ）への分化誘導にて９日間培養した細胞（Ｐ０：Ｄａｙ１４）、拡大培養Ｐ１（Ｄａｙ２４）、Ｐ２（Ｄａｙ３２）、及びＰ３（Ｄａｙ３５）後の細胞を剥離回収し、シングルセル化してから、神経堤細胞マーカーｐ７５を抗原とする抗体であるＣＤ２７１ＦＡＣＳ用抗体（ＢＤ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で染色し、ＦＡＣＳ（ＢＤ　Ａｃｃｕｒｉ（ＢＤ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、米国））にて確認した。

[0118]　結果を図１に示す。図１から、神経堤細胞へ分化誘導後（Ｐ０）の細胞集団におけるｐ７５陽性細胞の割合（ｐ７５陽性細胞率）が５２．５％であったが、１回継代後の拡大培養（Ｐ１）後のｐ７５陽性細胞率が７１．４％となり、２回継代後の拡大培養（Ｐ２）後のｐ７５陽性細胞率が９７．９％と

なり、さらに、３回継代後の拡大培養（Ｐ３）後のｐ７５陽性細胞率が９８．３％となった。このことから、上記拡大培養によって、ｐ７５陽性細胞（すなわち、神経堤細胞）が選択培養され、濃縮されたことが分かった。神経堤細胞へ分化誘導後（Ｐ０）の細胞集団に対して、ｐ７５陽性細胞をソーティングすることなく、本発明の拡大培養方法のみで９８％以上のｐ７５陽性細胞率を得ることができることを確認できた。また、別のｉＰＳ細胞（２０１Ｂ７株）を継代することにより９８％以上のｐ７５陽性細胞率を得ることができた。

[0119] ＜間葉系幹細胞への分化誘導＞

フィブロネクチン（Ｓｉｇｍａ）を１０μｇ／ｃｍ^{2}になるようにプレートに添加し、１時間、３７℃インキュベーターで静置し、フィブロネクチンでコーティングしたプレートを得た。

[0120] 次いで、Ｄａｙ３２（Ｐ２）に、上記の拡大培養された神経堤細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ溶液を用いて剥離回収し、シングルセル化して、神経堤細胞拡大培養用培地で懸濁した細胞をフィブロネクチンコーティングプレートに播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで培養した。翌日、間葉系幹細胞用培地（α－ＭＥＭ（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ、日本）に１０％ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）及び１０ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ　（Ｗａｋｏ）を添加した培地）に置換し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで培養し、間葉系幹細胞への分化誘導を行った。

[0121] 間葉系幹細胞への分化誘導開始３日後（Ｄａｙ３４）、細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ溶液を用いて剥離回収し、シングルセル化して、間葉系幹細胞用培地で、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで培養し、その後、コンフルエントになったら継代した。

[0122] さらに、間葉系幹細胞への分化誘導後、９日間継代培養した後（Ｄａｙ４０）の細胞集団については、剥離回収し、シングルセル化してから、間葉系幹細胞のマーカーであるＣＤ７３、ＣＤ１０５、ＣＤ４４及びＣＤ４５のＦＡＣＳ用抗体（ＢＤ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で染色し、上記と同様にＦＡ

ＣＳにて確認した。結果を図２に示す。図２から、間葉系幹細胞への分化が成功したことを確認できた。なお、同様の方法で別のｉＰＳ細胞株から分化誘導して得られた間葉系幹細胞から、少なくとも骨芽細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞へ分化することが確認できた。

[0123] 〔実施例２　ラミニン２１１を用いた拡大培養〕

実施例１と同様な方法によって、ｉＰＳ細胞から神経堤細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の細胞集団を以下の方法によって拡大培養した。

[0124] Ｌａｍｉｎｉｎ－２１１（ＢｉｏＬａｍｉｎａ）を０．４５μｇ／ｃｍ^{2}になるように６ウェルプレートに添加し、１時間、３７℃のインキュベーターで静置し、培地を少量添加後に上清を吸引除去し、その後ＰＢＳにて洗浄し、Ｌａｍｉｎｉｎ－２１１コーティングプレートを得た。

[0125] 次いで、Ｄａｙ１４に、神経堤細胞の分化誘導にて９日間培養した細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ溶液を用いて剥離回収し、シングルセル化して、神経堤細胞拡大培養用培地で播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで１０日間培養した。

[0126] ＜実施例１と実施例２との結果の比較＞

実施例１及び実施例２の１０日間拡大培養後（Ｐ１）の細胞を、光学顕微鏡で観察し、その結果を図３に示す。図３の（Ａ）及び（Ｂ）は実施例２の１０日間拡大培養後の細胞の画像であり、（Ｃ）及び（Ｄ）は実施例１の１０日間拡大培養後の細胞の画像である。図３から、実施例２の細胞が密集していたのに対して、実施例１の細胞は全体的に広がって増えていた。実施例１の拡大培養方法が、より神経堤細胞の増殖に適していることが示唆された。また、細胞の密集形態が異なることから、ラミニン２２１とラミニン２１１とは細胞生着に関して異なる役割を持っている可能性も示唆された。

[0127] 〔実施例３　各種細胞外マトリクスを用いた拡大培養〕

実施例１と同様な方法によって、ｉＰＳ細胞から神経堤細胞への分化誘導を行った。

[0128] フィブロネクチン（Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ；Ｓｉｇｍａ）を１０μｇ／

ｃｍ^{2}になるようにプレートに添加し、１時間、３７℃インキュベーターで静置し、フィブロネクチンでコーティングしたプレートを得た。また、実施例１の記載に準じて、Ｌａｍｉｎｉｎ－１１１（ＢｉｏＬａｍｉｎａ）、Ｌａｍｉｎｉｎ－２１１（ＢｉｏＬａｍｉｎａ）、及びＬａｍｉｎｉｎ－５２１（ＢｉｏＬａｍｉｎａ）をそれぞれ０．５μｇ／ｃｍ^{2}になるように６ウェルプレートに添加し、１時間、３７℃のインキュベーターで静置し、培地を少量添加後に上清を吸引除去し、その後ＰＢＳにて洗浄し、Ｌａｍｉｎｉｎ－１１１コーティングプレート、Ｌａｍｉｎｉｎ－２１１コーティングプレート、及びＬａｍｉｎｉｎ－５２１コーティングプレートをそれぞれ得た。さらに、Ｅ８フラグメントであるｉＭａｔｒｉｘ－５１１（株式会社ニッピ）、及びｉＭａｔｒｉｘ－２２１（株式会社ニッピ）を０．５μｇ／ｃｍ^{2}になるように６ウェルプレートに添加し、１時間、３７℃のインキュベーターで静置し、培地を少量添加後に上清を吸引除去し、その後ＰＢＳにて洗浄し、ｉＭａｔｒｉｘ－５１１コーディングプレート及びｉＭａｔｒｉｘ－２２１コーティングプレートをそれぞれ得た。

[0129] 次いで、Ｄａｙ１４（Ｐ０）に、神経堤細胞の分化誘導にて９日間培養した細胞をトリプシン／ＥＤＴＡ溶液を用いて剥離回収し、シングルセル化して、神経堤細胞拡大培養用培地で上記各種コーティングプレートに５００００細胞／ウェル播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベーターで拡大培養を行った。播種翌日、各種細胞外マトリクスに対する細胞の接着状態を光学顕微鏡で観察し、その結果を図４に示す。図４から、同じ細胞集団にもかかわらず、異なる細胞外マトリクスに対する接着状態が異なっていたことが分かった。

[0130] その後、Ｄａｙ２３、Ｄａｙ２６、Ｄａｙ２９、Ｄａｙ３２及びＤａｙ３５に上記と同様に継代し、それぞれ、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の拡大培養を行った。実施例１と同様の方法で、Ｐ０、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の細胞を剥離回収し、シングルセル化してから、フローサイトメトリーにて神経堤細胞マーカーｐ７５の発現を確認した。全細胞数に対す

るｐ７５を発現する細胞（ｐ７５陽性細胞）の割合（ｐ７５陽性細胞率）の結果を図５に示す。ただし、Ｌａｍｉｎｉｎ－５２１コーティング実験にはＰ４までの結果しかなかった。図５から、各種細胞外マトリクスのうち、Ｌａｍｉｎｉｎ－１１１、ｉＭａｔｒｉｘ－２１１、ｉＭａｔｒｉｘ－５１１、及びｉＭａｔｒｉｘ－２２１のコーディング上で拡大培養した細胞集団において、ｐ７５陽性細胞率が拡大培養の継続によって上昇したことが認められる。また、これらの細胞外マトリクスを用いた拡大培養によって、９０％以上のｐ７５陽性細胞率を得たことを確認できた。すなわち、これらの細胞外マトリクスを用いた拡大培養で得られた細胞集団は、ｐ７５陽性細胞（すなわち、神経堤細胞）をソーティングすることなく、そのまま間葉系幹細胞への分化誘導などに用いることができる。

[0131] また、播種前（Ｄａｙ０）のｉＰＳ細胞、分化誘導した神経堤細胞（Ｐ０）、並びに、各種細胞外マトリクスを用いて拡大培養したＰ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の細胞集団におけるＮＧＦＲ、ＴＦＡＰ２Ａ、ＴＷＩＳＴ１、ＳＯＸ１０及びＳＯＸ９の遺伝子発現をリアルタイムＰＣＲ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）により確認した。使用したプライマー配列は以下のとおりであった。また、内部標準としてβアクチンを用いた。

[表1]

	フォーワードプライマー	リバースプライマー
NGFR	CCGTTGGATTACACGGTCCA（配列番号1）	GACAGGGATGAGGTTGTCGG（配列番号2）
TFAP2A	AGGGCCTCGGTGAGATAGTT（配列番号3）	AAGAGTTCACCGACCTGCTG（配列番号4）
TWIST1	TTTTAAAAGTGCGCCCCACG（配列番号5）	TCTCGGTCTGGAGGATGGAG（配列番号6）
SOX10	GAGCTGGACCGCACACCTTGGG（配列番号7）	AACGCCCACCTCCTCGGACCTC（配列番号8）
SOX9	GAGCAGACGCACATCTC（配列番号9）	CCTGGGATTGCCCCGA（配列番号10）

[0132] リアルタイムＰＣＲにて測定した各種遺伝子発現量をβアクチンの発現量

にて補正し、さらに、Ｄａｙ０のｉＰＳ細胞の発現量を「１」とした各種遺伝子の相対発現量を図６及び図７に示す。各グラフにおいて、左からＤａｙ０、Ｐ０、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ５の順に示されている。ただし、Ｌａｍｉｎｉｎ５２１コーティング実験には、Ｐ４までの結果しかなかった。フローサイトメトリー解析によって９０％以上のｐ７５陽性細胞率を得ることができたＬａｍｉｎｉｎ－１１１、ｉＭａｔｒｉｘ－２１１、ｉＭａｔｒｉｘ－５１１、及びｉＭａｔｒｉｘ２２１上で培養した細胞集団にて、Ｐ０時点と比較し、神経堤細胞マーカーであるＮＧＦＲ、ＴＦＡＰ２Ａ、ＴＷＩＳＴ１の発現が拡大培養の継続によりＰ１以降増加していることが確認できた（図６）。

[0133] 図６及び図７に示すように、上記培養工程（特に複数回継代を含む拡大培養）によって得られた、神経堤細胞を含む細胞集団は、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、及びＴＷＩＳＴ１の遺伝子のうち少なくとも１つが分化誘導した神経堤細胞（Ｐ０）よりも多く発現していた。このことから、上記細胞外マトリクスを用いた拡大培養によって得られた細胞は神経堤細胞であることが遺伝子発現プロファイル面からも確認できた。

[0134] また、接着培養に重要であるＳＯＸ９遺伝子の発現量が上記細胞外マトリクスで拡大培養した細胞集団では増加していることが確認できた。また、ＳＯＸ９遺伝子の発現状態から、接着培養による拡大培養法として、適していることが示唆された（図７）。実施例３において、選択的に培養された神経堤細胞を含む細胞集団は、ＳＯＸ１０遺伝子の発現量が減少し、ＳＯＸ９が高発現している細胞集団であることから、本実施例で用いた培養条件では、ＳＯＸ１０遺伝子の発現を下げ、ＳＯＸ９遺伝子の発現を上げるプロファイルを示す傾向を有する。すなわち、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する培養工程にて培養後の細胞集団は、ＳＯＸ１０遺伝子の発現を下げ、ＳＯＸ９遺伝子の発現を上げる特徴を有する。具体的には、拡大培養開始時点の細胞集団と比較して、ＳＯＸ１０遺伝子の発現量が減少し、ＳＯＸ９遺伝子の発現量が増加している細胞集団は、本発明の一

態様である。

[0135] 〔実施例４　各種細胞外マトリクスを用いた拡大培養時の遺伝子発現量に基づくクラスター分析〕

実施例３で各種細胞外マトリクスを用いて拡大培養して作製したＰ１～Ｐ５の細胞の遺伝子発現量を、マイクロアレイ解析によって取得した。マイクロアレイ解析は、ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｕ１３３　Ｐｌｕｓ　２．０　Ａｒｒａｙ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いることによって実施した。次に、マイクロアレイ解析により得られた全遺伝子発現量より、各継代毎（Ｐ１～Ｐ５）のシグナル強度の比較に基づき、Ｒを用いてウォード法により上記各細胞のクラスター分析を実施した。ウォード法は階層型クラスタリングの手法の１つであり、データからクラスターの階層構造を抽出する手法となる。ウォード法は分散が最小になるようにデータを結合し、クラスタリングする。ウォード法でクラスター解析した結果を図８に示す。

[0136] 図８に示すように、クラスター分析の結果は、図５に示すフローサイトメトリーでのｐ７５の発現状態の違いと同様に、細胞外マトリクスの違いで細胞が遺伝子発現状態により明確に分類された。以上の結果より、ｐ７５の発現状態の違うｉＭａｔｒｉｘ－２２１、ｉＭａｔｒｉｘ－５１１、Ｌａｍｉｎｉｎ－２１１、Ｌａｍｉｎｉｎ－１１１の細胞外マトリクス群とＬａｍｉｎｉｎ－５２１、Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎの細胞外マトリクス群とでは、神経堤細胞関連遺伝子及び未分化マーカー遺伝子発現状態が異なることが明らかとなった。また、細胞外マトリクスの違いで細胞が遺伝子発現状態により明確に分類されたことから、同じ種類の細胞外マトリクス群で一定の傾向の遺伝子発現状態の神経堤細胞（一定の傾向の細胞状態の神経堤細胞）が得られることが示唆された。一定の傾向の遺伝子発現状態とは、培養により得られた細胞が遺伝子発現においてある傾向（測定可能な遺伝子発現のパターン）を示すことである。

[0137] 〔実施例５　各種細胞外マトリクスを用いた拡大培養時の各遺伝子の発現の

比較〕

表２～３に、実施例４で得られた遺伝子発現量より未分化遺伝子マーカー及び神経堤細胞関連遺伝子データを抽出した。抽出した未分化マーカー遺伝子及び神経堤細胞関連遺伝子の各遺伝子の相対発現量について、ｉＰＳ細胞とＰ０又はＰ５でのシグナル強度を比較した結果を示す。

[表2]

遺伝子名	iPS 細胞	P0	P1	P2	P3	P4	P5
NANOG	100%	≦1%	≦1%	≦1%	≦1%	≦1%	≦1%
Oct3/4	100%	≦1%	≦1%	≦1%	≦1%	≦1%	≦1%

[表3]

遺伝子名	iPS 細胞	P0	Laminin-111 P5	Laminin-211 P5	iMatrix-221 P5	iMatrix-511 P5
SOX10	1	27.0	0.2	0.2	0.4	0.3
RHOB	1	32.0	3.6	3.5	3.8	4.1
FOXD3	1	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0
NOTCH1	1	1.2	0.7	1.1	1.2	0.9
SOX9	1	3.1	5.7	6.9	8.2	4.5
TFAP2A	1	85.0	144.0	140.0	153.0	148.0
NGFR	1	16.0	57.0	57.0	38.0	55.0
TWIST1	1	90.0	434.0	401.0	438.0	381.0
EDN3	1	4.2	141.0	131.0	161.0	108.0

[0138] 表２に示すように、未分化マーカー遺伝子（ＮＡＮＯＧ、Ｏｃｔ３／４）はｉＰＳ細胞では高発現していたが、Ｐ１以降発現はほぼなくなり、神経堤細胞への誘導において未分化のｉＰＳ細胞の残留が最小限であったことがわ

かる。また、表３に示すように、神経堤細胞関連遺伝子は神経堤細胞誘導後（Ｐ０まで）に発現が亢進する遺伝子群（ＳＯＸ１０、ＲＨＯＢ、ＦＯＸＤ３、ＮＯＴＣＨ１）と誘導後期（Ｐ１～Ｐ５）に発現が亢進する遺伝子群（ＳＯＸ９、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＴＷＩＳＴ１、ＥＤＮ３）があり、細胞外マトリクスが異なっていても同様な挙動を示した。

[0139] 〔実施例６　β鎖のみが異なる細胞外マトリクスを用いて神経堤細胞への分化誘導を行った場合における遺伝子発現状態の比較〕

実施例４のクラスター分析の結果より、Ｐ０から細胞外マトリクスを変更し培養したことで、特に神経堤細胞関連遺伝子及び未分化マーカー遺伝子の発現状態が変化していたことが明らかとなった。さらに詳細を調べる目的で、β鎖のみが異なる細胞外マトリクスを用いて、マイクロアレイ解析によって得られた全遺伝子発現に基づくＰ０～Ｐ５の細胞のクラスター分析を行った。クラスター分析はβ鎖のみが異なる細胞外マトリクスとしてＬａｍｉｎ－２１１、ｉＭａｔｉｒｘ－２２１を用いたこと以外は実施例４と同様にして実施した。その結果を図９に示す。

[0140] 図９に示すように、β鎖のみが異なるＬａｉｍｉｎ－２１１とｉＭａｔｒｉｘ－２２１上でｉＰＳ細胞を神経堤細胞に分化誘導した結果、神経堤細胞ではあるが遺伝子的発現状態は違い、神経堤細胞の細胞状態が異なっていることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0141] 本発明の神経堤細胞の製造方法によれば、多能性幹細胞から神経堤細胞を安定的に大量生産することができ、その結果、多能性幹細胞から間葉系幹細胞を安定的に大量生産することができる。

請求の範囲

[請求項1] α鎖がα１鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン、及び、α鎖がα５鎖であり且つβ鎖がβ１鎖であるラミニン、並びに、これらのラミニンのインテグリン結合部位を含む細胞外マトリクスからなる群より選択される１以上の細胞外マトリクスの存在下で、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を接着培養する培養工程を備える、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団における神経堤細胞の選択的培養方法。

[請求項2] 前記ラミニンのγ鎖がγ１鎖である、請求項１に記載の培養方法。

[請求項3] 前記ラミニンが、ラミニン２２１である、請求項１又は２に記載の培養方法。

[請求項4] 前記ラミニンのインテグリン結合部位が、ラミニンのＥ８フラグメントである、請求項１～３のいずれか一項に記載の培養方法。

[請求項5] 前記培養工程にて培養後の細胞集団が、ＥＤＮ３、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ及びＴＷＩＳＴ１から選択される少なくとも１つの遺伝子を発現する、請求項１～４のいずれか一項に記載の培養方法。

[請求項6] 前記培養工程において、前記細胞集団が接着する培養面の少なくとも一部が前記細胞外マトリクスでコーティングされており、前記細胞集団が培地中にて接着培養される、請求項１～５のいずれか一項に記載の培養方法。

[請求項7] 前記培地は、神経堤細胞の維持に適する培地である、請求項６に記載の培養方法。

[請求項8] 培養前の細胞集団に比べて、培養後の細胞集団における全細胞数及び全細胞数に対する神経堤細胞の割合の両方が増加する、請求項１～７のいずれか一項に記載の培養方法。

[請求項9] （１）多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化

誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得る工程と、

（２）工程（１）で得られた細胞集団を請求項１～８のいずれか一項に記載の培養方法で接着培養する工程と

を備える、神経堤細胞を含む細胞集団の製造方法。

[請求項10] 工程（１）で得られ得られた細胞集団を、神経堤細胞マーカーにより選別することなく、工程（２）に供する、請求項９に記載の製造方法。

[請求項11] 工程（１）が、多能性幹細胞を含む細胞集団を、少なくとも１つのＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤及び少なくとも１つのＷｎｔシグナル伝達活性化剤を含む培地で培養することを含む、請求項９又は１０に記載の製造方法。

[請求項12] 前記ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤が、ＴＧＦβ阻害剤である、請求項１１に記載の製造方法。

[請求項13] 前記Ｗｎｔシグナル伝達活性化剤が、ＧＳＫ３β阻害剤である、請求項１１又は１２に記載の製造方法。

[請求項14] 工程（１）が、７日間～１８日間行われる、請求項９～１３のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項15] 工程（１）における培地が、血清代替物又は血清を含まない合成培地である、請求項９～１４のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項16] （３）請求項９～１５のいずれか一項に記載の製造方法で神経堤細胞を含む細胞集団を製造する工程と、

（４）工程（３）で得られた細胞集団をｂＦＧＦの存在下で培養し、間葉系幹細胞へ分化誘導する工程と

を備える、間葉系幹細胞を含む細胞集団の製造方法。

[請求項17] 請求項１６に記載の製造方法で製造された、間葉系幹細胞を含む細胞集団。

[請求項18] 請求項１７に記載の間葉系幹細胞を含む細胞集団を有効成分として

含有する、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、喘息、重症心不全、心筋梗塞、脳梗塞、外傷性脳損傷、脳腫瘍、脊髄損傷、重症下肢虚血、糖尿病性下肢潰瘍、肝硬変、急性肝不全、慢性肝不全、クローン病、敗血症、ウイルス感染症、表皮水疱症、糖尿病、糖尿病性臓器障害、アトピー性皮膚炎、過敏症、重度複合免疫不全症候群、多発性骨髄腫、川崎病、強皮症、脱毛症、自己免疫性肝炎、ループス腎炎、再生不良性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、乾癬、変形性股関節症、変形性膝関節症（ＯＡ）、椎間板変性、皮膚軟部組織感染症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎、緑膿菌感染症、後天性免疫不全症候群、狂犬病、インフルエンザ、骨壊死、骨減少症、歯槽骨喪失、骨損傷、骨形成不全症、脊椎癒着、筋萎縮、腱損傷、膝部損傷、筋損傷、筋骨格損傷、骨粗鬆症、運動障害疾患、多発性硬化症、脳性麻痺、認知症、視神経炎、手根管症候群、線条体黒質変性症、オリーブ橋小脳萎縮症、トゥレット症候群、顔面萎縮症、脳室周囲白質軟化症、脊髄小脳変性症、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、不安障害、適応障害、アルコール依存症、先天性自律神経失調症、脳炎、癲癇、二分脊椎、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、原発性側索硬化症、筋ジストロフィー、アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、ファブリー病、ハンチントン病、ムコ多糖症Ｉ型、シャルコー・マリー・トゥース病、神経因性疼痛、末梢神経障害、三叉神経痛、糖尿病性神経障害、坐骨神経痛、脊柱管狭窄症、低酸素性虚血性脳症、脳出血、乳がん、転移性膵臓がん、膵管腺がん、消化器がん、頭頸部がん、口腔がん、中皮腫、転移性非小細胞肺がん、黒色腫、皮膚がん、膠芽腫、固形がん、腺がん、神経膠腫、髄芽腫、ブドウ膜黒色腫、気管支拡張症、慢性気管支炎、呼吸窮迫症候群、特発性肺線維症、肺奇形、肺気腫、塵肺症、呼吸不全、急性肺損傷、肺損傷、子癇前症、うっ血性心不全、狭心症、心筋炎、先天性心疾患、拡張型心筋症、多臓器不全、冠動脈疾患

、虚血、静脈瘤潰瘍、閉塞性血栓血管炎、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、肺狭窄、動静脈瘻、末梢血管疾患、血管新生障害、アテローム性動脈硬化、角膜損傷、角膜炎、角膜変性症、角膜潰瘍、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜色素変性症、萎縮型加齢黄斑変性、眼球乾燥症、角膜浮腫、滲出型加齢黄斑変性、瘻孔、創傷治癒、肥満、ピット・ホプキンス症候群、褥瘡、下肢潰瘍、皮膚潰瘍、インスリン依存性糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、難聴、肛門周囲瘻、直腸瘻、痔瘻、直腸膣瘻、アルコール性肝障害、膵炎、胆道閉鎖症、消化管出血、原発性硬化性胆管炎、直腸炎、食道損傷、肝損傷、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、早期卵巣機能不全、卵巣がん、精子減少症、精巣疾患、勃起不全、陰茎硬結、子宮損傷、腎不全、糖尿病性腎症、腎損傷、腎線維症、間質性膀胱炎、ＩｇＡ腎症、腹圧性尿失禁、切迫性尿失禁、Ｃ３糸球体症、サラセミア、白血病、全身性炎症反応症候群、放射線宿酔、皮膚の火傷、再灌流障害、シンドロームＸ、代謝疾患、口腔粘膜炎、歯周病、歯肉病、及び自閉スペクトラム症から選択される疾患の治療薬、又は、再生医療における移植に伴う拒絶反応の抑制、移植（臓器移植、造血幹細胞移植、骨髄移植、角膜移植、膵島移植）の補助、老化の改善、及びワクチンへの利用から選択される応用的な利用のための医薬組成物。

[請求項19] 多能性幹細胞から神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導する際に、前記多能性幹細胞の分化進行状態を判定するための方法であって、

（Ｉ）所望の時点で培養中の細胞集団の一部を採取する工程と、

（ＩＩ）採取した細胞集団の所定の遺伝子の発現量を測定する工程と、

（ＩＩＩ）測定した前記遺伝子の発現量を、閾値と比較する工程と、

（ＩＶ）測定した前記遺伝子の発現量が前記閾値以上であるとき、

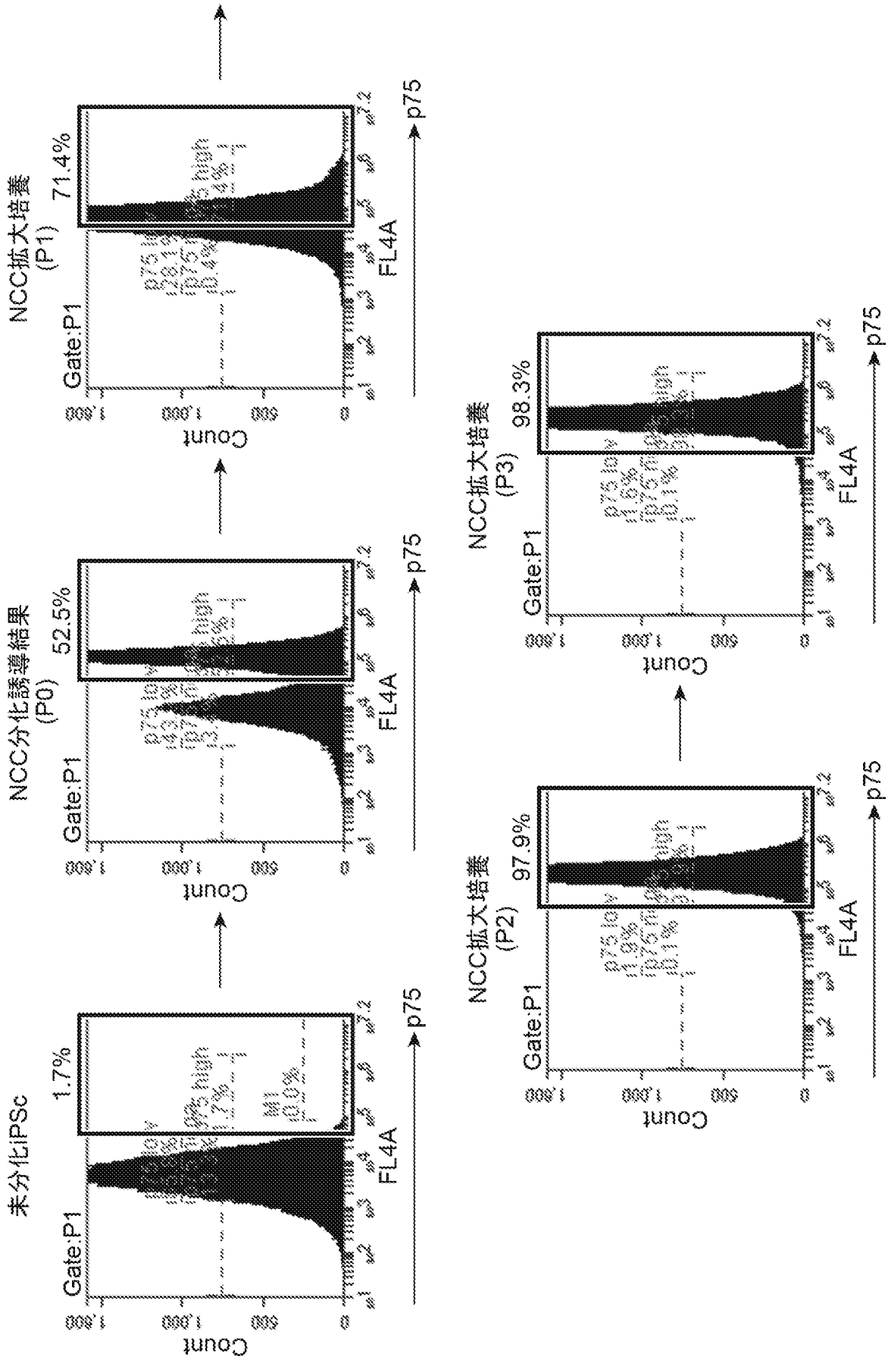
上記所望の時点における培養細胞集団が神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化しうると判定する工程と、
を含む、方法。

[請求項20] 前記所定の遺伝子は、１つ以上の分化誘導後に発現が亢進する遺伝子、及び／又は、１つ以上の拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子を含む、請求項１９に記載の方法。

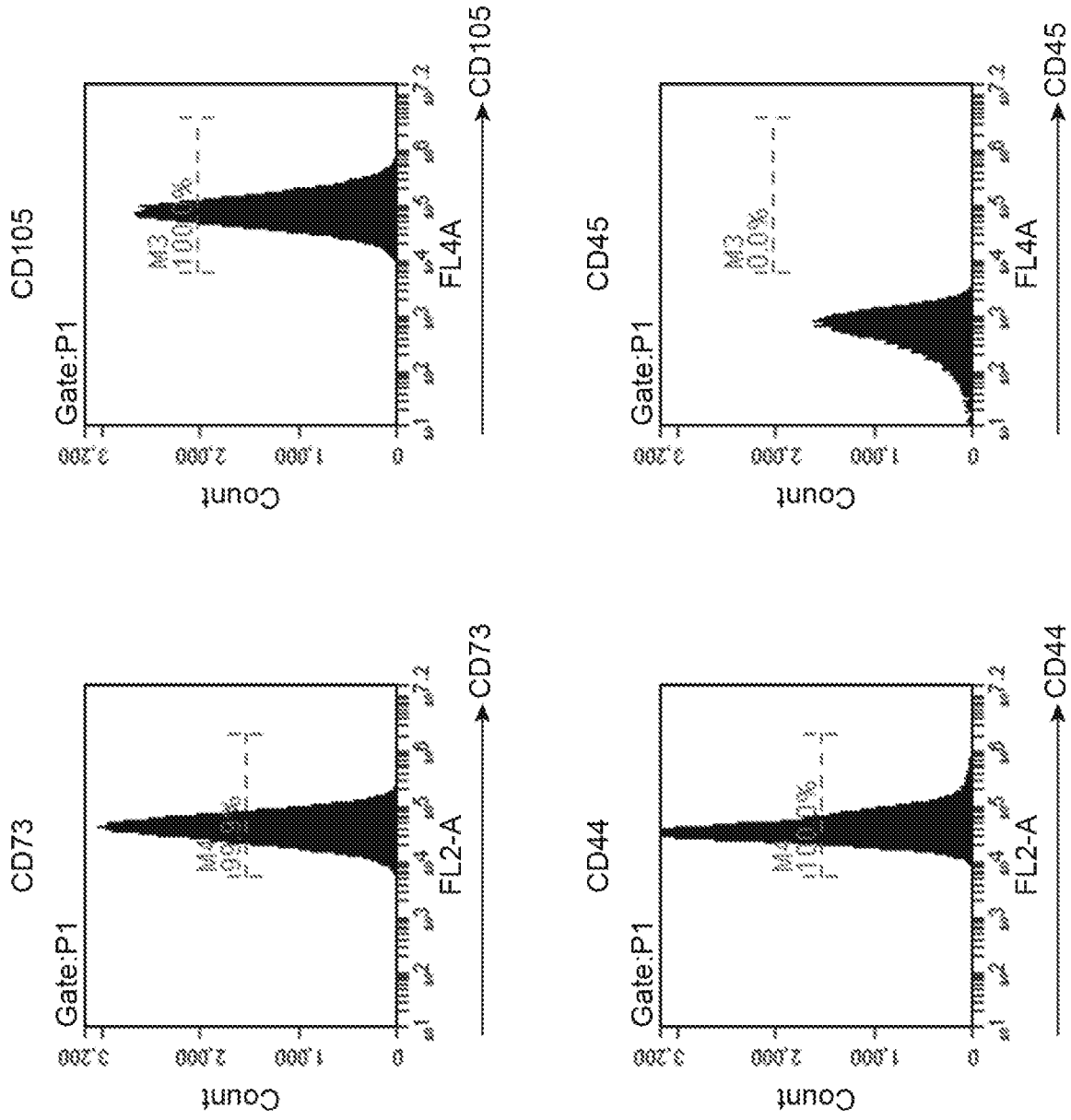
[請求項21] 前記１つ以上の分化誘導後に発現が亢進する遺伝子が、ＳＯＸ１０、ＲＨＯＢ、ＦＯＸＤ３、及びＮＯＴＣＨ１からなる群より選択される１つ以上を含み、前記１つ以上の拡大培養期間に発現が亢進する遺伝子が、ＳＯＸ９、ＴＦＡＰ２Ａ、ＮＧＦＲ、ＴＷＩＳＴ１、及びＥＤＮ３からなる群より選択される１つ以上を含む、請求項２０に記載の方法。

[請求項22] 前記所望の時点は、多能性幹細胞を神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞へ分化誘導し、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団を得る工程内の任意の時点である、又は
前記所望の時点は、神経堤細胞及び／又は神経堤前駆細胞を含む細胞集団から神経堤細胞を選択的に培養する工程内の任意の時点である、請求項１９～２１のいずれか一項に記載の方法。

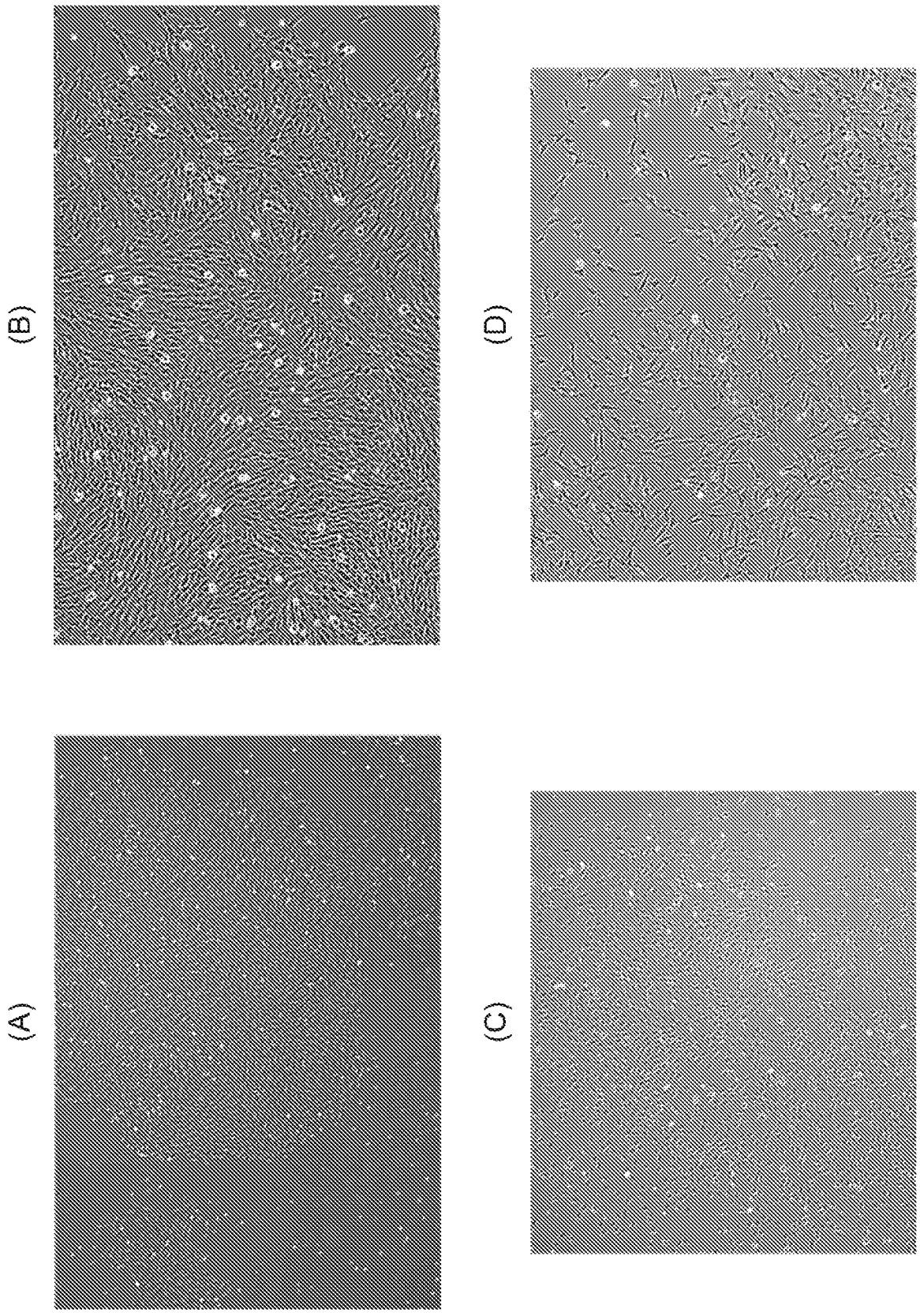
[図1]


未分化iPSc
Gate:P1
Count
FL4A
p75
1.7%
M1
(0.0%)
NCC分化誘導結果
(P0)
52.5%
NCC拡大培養
(P1)
71.4%
NCC拡大培養
(P2)
97.9%
NCC拡大培養
(P3)
98.3%

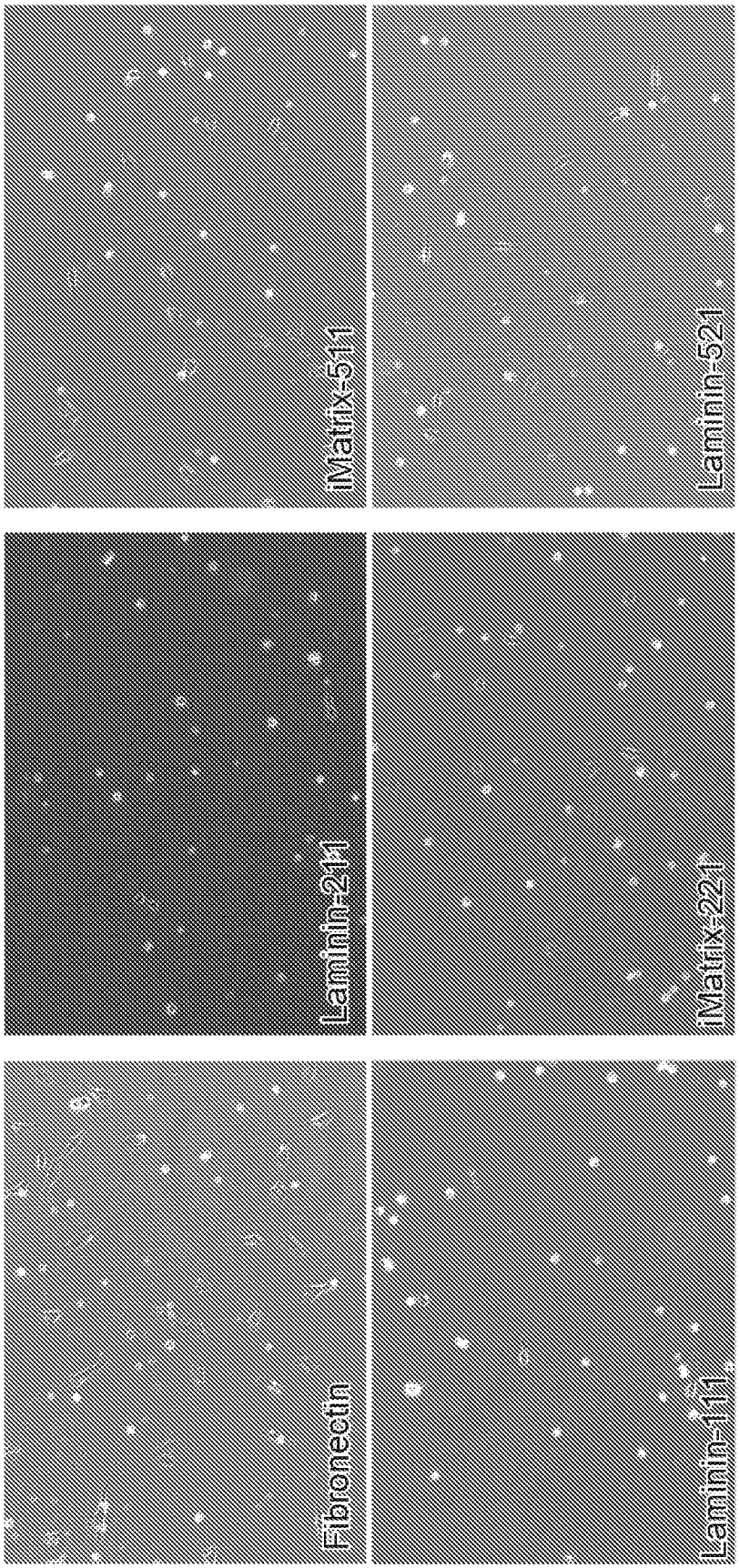
[図2]


CD105
Gate:P1
M3
100.0%
Count
FL4A
CD105
CD45
Gate:P1
M3
0.0%
Count
FL4A
CD45
CD73
Gate:P1
Count
FL2-A
CD73
CD44
Gate:P1
Count
FL2-A
CD44

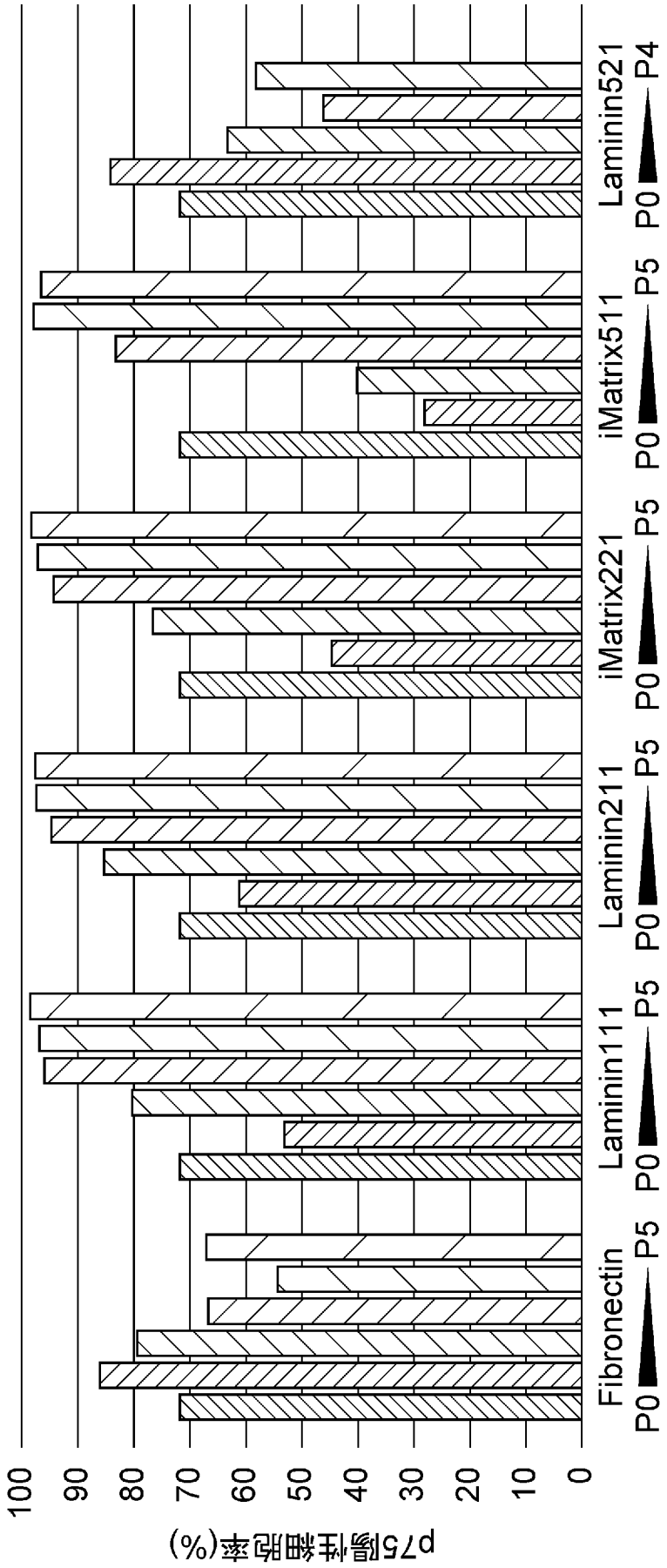
[図3]



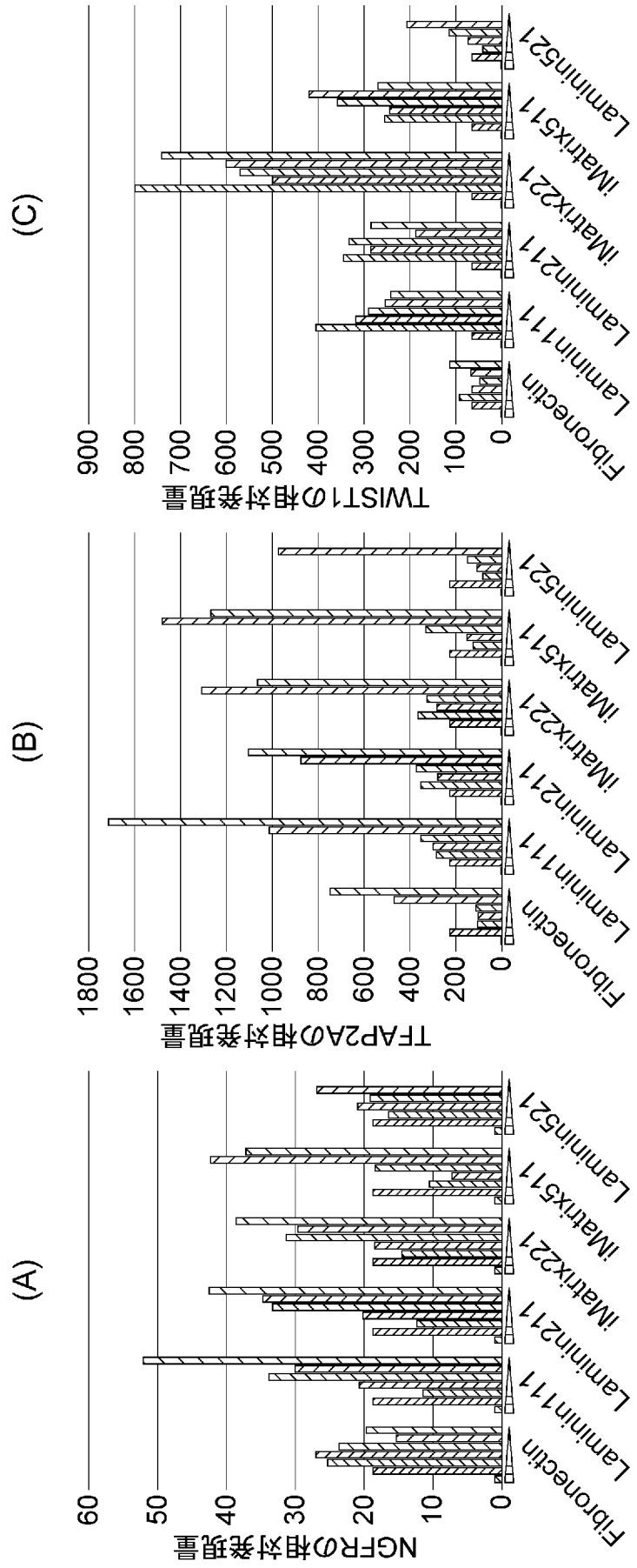
[図4]


iMatrix-511
Laminin-521
Laminin-211
iMatrix-221
Fibronectin
Laminin-111

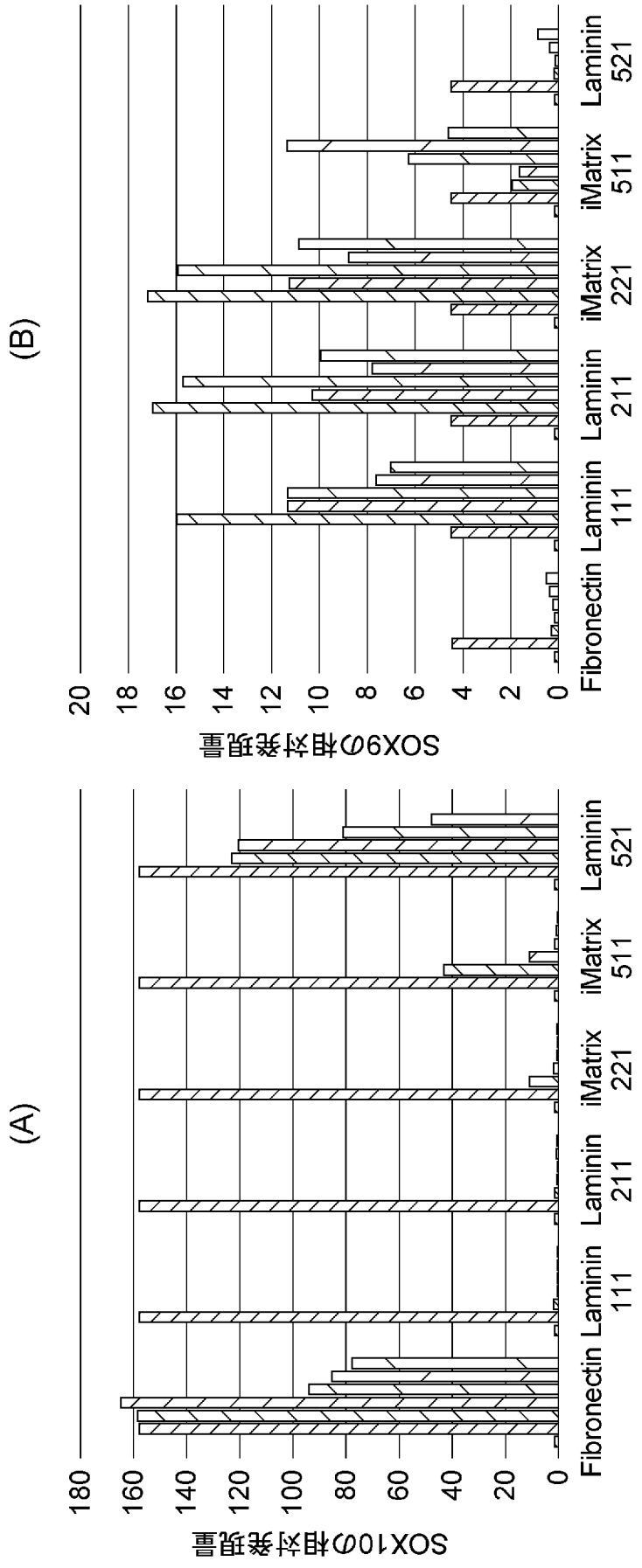
[図5]


p75陽性細胞率(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Fibronectin
P0
P5
Laminin111
P0
P5
Laminin211
P0
P5
iMatrix221
P0
P5
iMatrix511
P0
P5
Laminin521
P0
P4

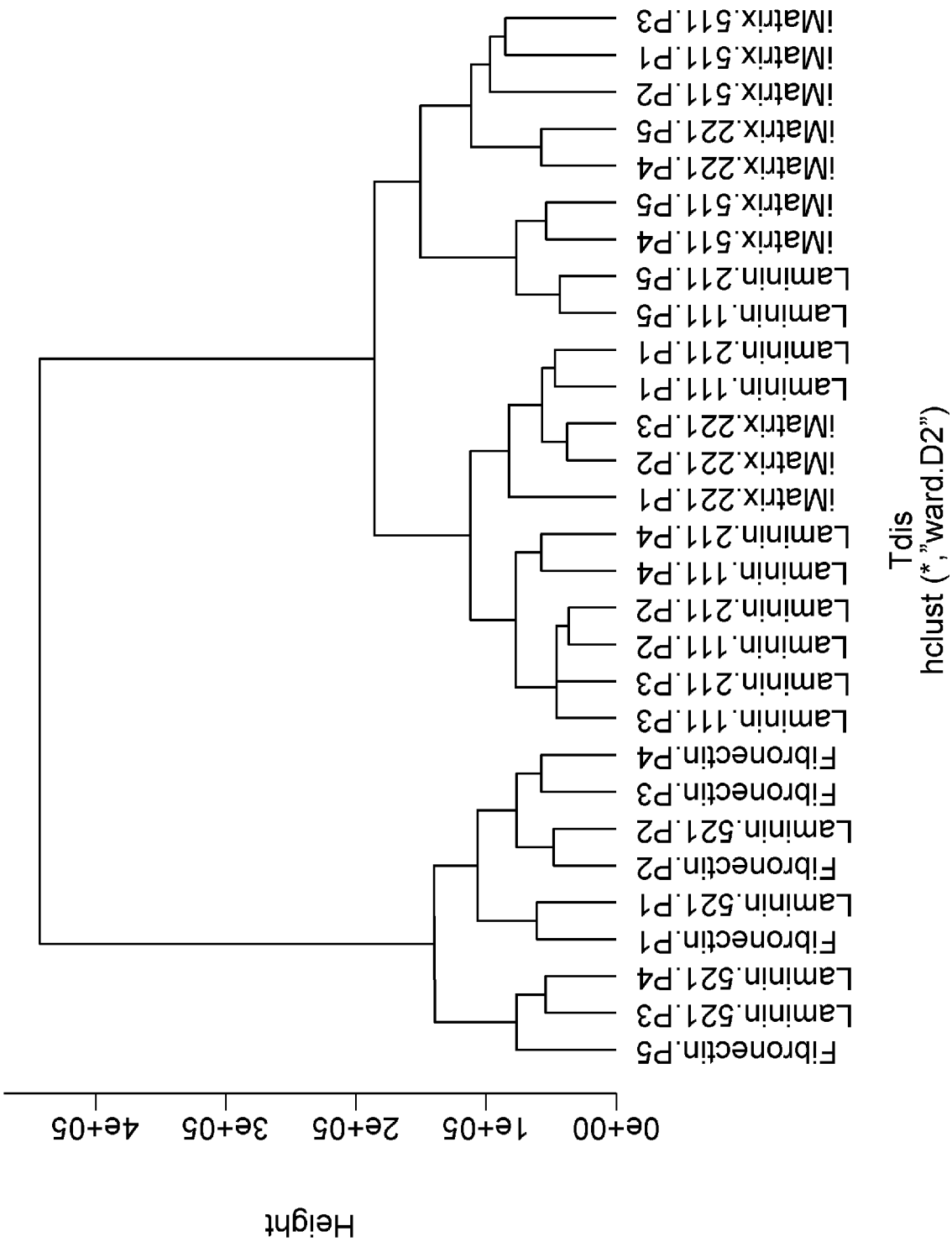
[図6]


(A)
NGFRの相対発現量
0
10
20
30
40
50
60
Fibronectin
Laminin111
Laminin211
iMatrix221
iMatrix511
Laminin521
(B)
TFAP2Aの相対発現量
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Fibronectin
Laminin111
Laminin211
iMatrix221
iMatrix511
Laminin521
(C)
TWIST1の相対発現量
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Fibronectin
Laminin111
Laminin211
iMatrix221
iMatrix511
Laminin521

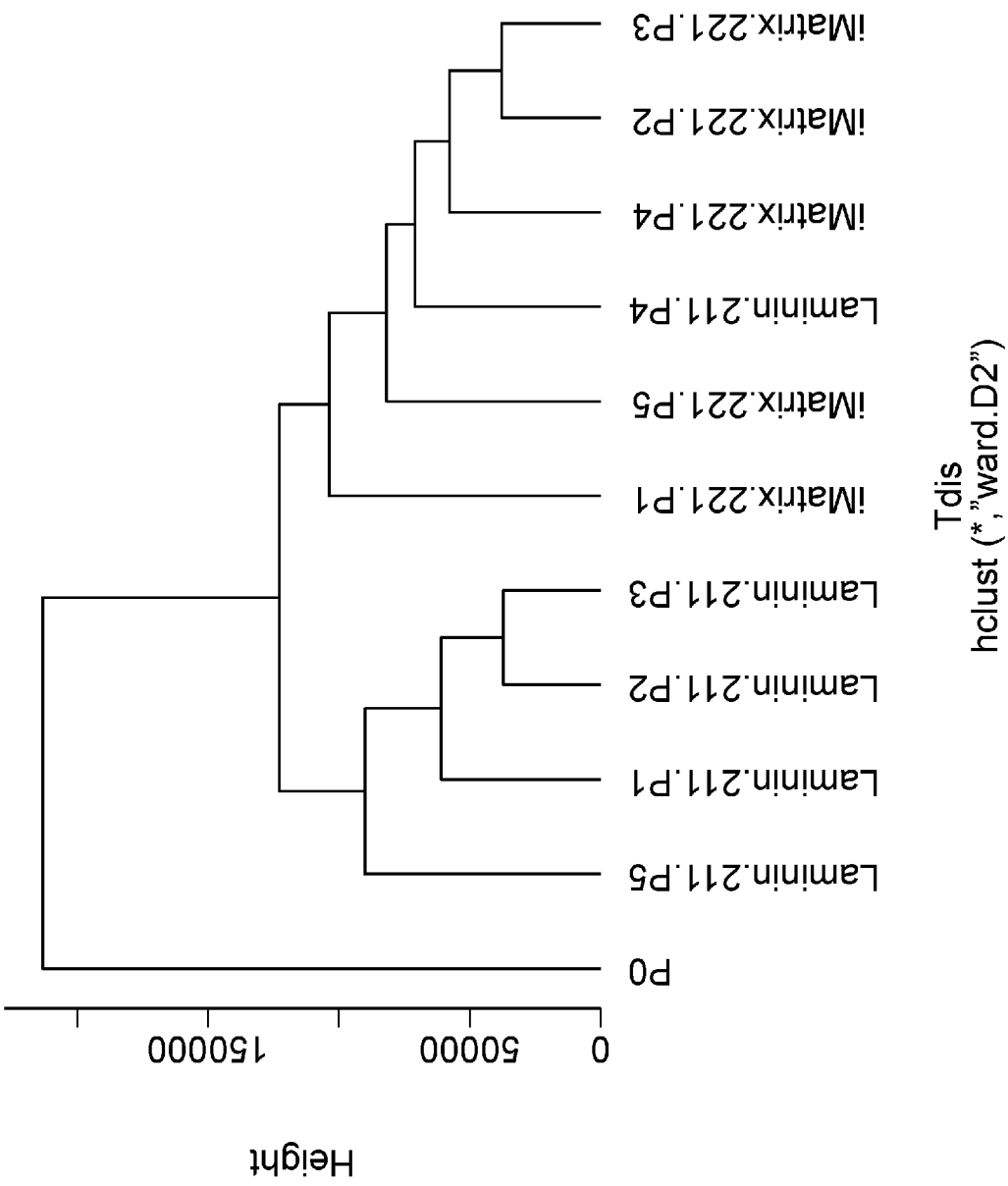
[図7]


(A)
SOX10の相対発現量
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Fibronectin
Laminin 111
Laminin 211
iMatrix 221
iMatrix 511
Laminin 521
(B)
SOX9の相対発現量
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Fibronectin
Laminin 111
Laminin 211
iMatrix 221
iMatrix 511
Laminin 521

[図8]


Height
0e+00
1e+05
2e+05
3e+05
4e+05
Tdis
hclust (*,"ward.D2")
Fibronectin.P5
Laminin.521.P3
Laminin.521.P4
Fibronectin.P1
Laminin.521.P1
Fibronectin.P2
Laminin.521.P2
Fibronectin.P3
Fibronectin.P4
Laminin.111.P3
Laminin.211.P3
Laminin.111.P2
Laminin.211.P2
Laminin.111.P4
Laminin.211.P4
iMatrix.221.P1
iMatrix.221.P2
iMatrix.221.P3
Laminin.111.P1
Laminin.211.P1
Laminin.111.P5
Laminin.211.P5
iMatrix.511.P4
iMatrix.511.P5
iMatrix.221.P4
iMatrix.221.P5
iMatrix.511.P2
iMatrix.511.P1
iMatrix.511.P3

[図9]


Tdis
hclust (*,"ward.D2")
iMatrix.221.P3
iMatrix.221.P2
iMatrix.221.P4
Laminin.211.P4
iMatrix.221.P5
iMatrix.221.P1
Laminin.211.P3
Laminin.211.P2
Laminin.211.P1
Laminin.211.P5
P0
0
50000
150000
Height

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/047993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/079(2010.01)i; ***A61K 35/28***(2015.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C07K 14/78***(2006.01)i; ***C12N 5/0775***(2010.01)i; ***C12Q 1/6851***(2018.01)i; *C12N 5/10*(2006.01)n; *C12N 15/12*(2006.01)n
FI: C12N5/079 ZNA; A61K35/28; A61P43/00 101; C07K14/78; C12N5/0775; C12Q1/6851 Z; C12N5/10; C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/079; A61K35/28; A61P43/00; C07K14/78; C12N5/0775; C12Q1/6851; C12N5/10; C12N15/12

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/230832 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 19 November 2020 (2020-11-19) claims, paragraph [0039], examples 1 2, table 3	1-2, 4-15, 19-22
Y		16-18
A		3
X	JP 2021-23293 A (KAO CORP.) 22 February 2021 (2021-02-22) claims, examples	1-2, 4-15
Y		16-18
A		3

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 March 2023	**14 March 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHIJIMATSU, R. et al. Characterization of mesenchymal stem cell-like cells derived from human iPSCs via neural crest development and their application for osteochondral repair. Stem Cells International (2017), vol. 2017, Article ID 1960965, pp. 1-18, ISSN:1687-966X abstract, p. 2, right column, 3rd and 4th paragraphs, p. 15, left column, 2nd paragraph, fig. 1	17-18
Y		16-18
A		3
X	FUKUTA, M. et al. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. PLoS ONE (2014), vol. 9, no. 12, e112291, pp. 1-25, ISSN: 1932-6203 abstract, p. 7, 4th paragraph, p. 8, last paragraph to p. 14, 1st paragraph, p. 20, 3rd paragraph to p. 21, 1st paragraph, fig. 1-3	17-22
A		3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/047993

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"Annex C/ST.25 text file format" should be read as "ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/047993

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

(i) Number of inventions included in claims
2
(ii) Claim numbers classified as each invention
Invention 1: Claims 1-18
Invention 2: Claims 19-22

(iii) Reason for determination that unity of invention is not satisfied
The claims are classified into the following two inventions.

Invention 1: Claims 1-18
In claim 1, the special technical feature of a "laminin in which an α-chain is an α2-chain and a β-chain is a β2-chain" is found. Consequently, the part of claim 1 involving the "laminin in which an α-chain is an α2-chain and a β-chain is a β2-chain" is classified as invention 1.
The invention in the other options in claim 1, and claims 2-18, are related to claim 1 as inventions, and hence are classified as invention 1.

Invention 2: Claims 19-22
Claim 19 cannot be said to involve one or more of the same or corresponding special technical features as the inventions classified as invention 1. Further, claim 19 is not substantially identical or similarly closely related to any of the parts classified as invention 1. Consequently, claim 19 cannot be classified as invention 1.
Thus, claim 19 is classified as invention 2. Claims 20-22 are related to claim 19 as inventions, and hence are classified as invention 2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☑ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/047993

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/230832 A1	19 November 2020	US 2022/0073873 A1 claims, paragraph [0067], examples 1, 2, table 3 EP 3970795 A1	
JP 2021-23293 A	22 February 2021	US 2022/0340868 A1 claims, examples EP 4012022 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/047993

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/079(2010.01)i; A61K 35/28(2015.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 14/78(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12N 5/10(2006.01)n; C12N 15/12(2006.01)n
FI: C12N5/079 ZNA; A61K35/28; A61P43/00 101; C07K14/78; C12N5/0775; C12Q1/6851 Z; C12N5/10; C12N15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N5/079; A61K35/28; A61P43/00; C07K14/78; C12N5/0775; C12Q1/6851; C12N5/10; C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2020/230832 A1 (味の素株式会社) 19.11.2020 (2020-11-19) 請求の範囲、［００３９］、実施例１－２、表３	1-2,4-15,19-22
Y		16-18
A		3
X	JP 2021-23293 A (花王株式会社) 22.02.2021 (2021-02-22) 特許請求の範囲、実施例	1-2,4-15
Y		16-18
A		3
X	CHIJIMATSU R., et al., Characterization of mesenchymal stem cell-like cells derived from human iPSCs via neural crest development and their application for osteochondral repair, Stem Cells International (2017) Vol.2017, Article ID 1960965, pp.1-18, ISSN:1687-966X 要約、第２頁右欄第３－４段落、第１５頁左欄第２段落、図１	17-18
Y		16-18
A		3

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
02.03.2023	14.03.2023

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

権限のある職員（特許庁審査官）
藤澤　雅樹 4B 5802

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	FUKUTA M., et al., Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media, PLoS ONE (2014) Vol.9, No.12, e112291, pp.1-25, ISSN: 1932-6203 要約、第７頁第４段落、第８頁最終段落－第１４頁第１段落、第２０頁第３段落－第２１頁第１段落、図１－３	17-22
A		3

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/047993

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/047993

第Ⅲ欄　　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

（i）請求の範囲に含まれる発明の数
２
（ii）各発明に区分した請求項の番号
発明１：請求項１－１８
発明２：請求項１９－２２

（iii）発明の単一性を満たさないと判断した理由
請求の範囲は、以下の２つの発明に区分される。

（発明１）請求項１－１８
請求項１に、「α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン」という特別な技術的特徴が発見された。したがって、請求項１の「α鎖がα２鎖であり且つβ鎖がβ２鎖であるラミニン」に係る部分を発明１に区分する。
請求項１の他の選択肢に係る発明及び請求項２－１８は、請求項１に対して発明の連関を有しているので、発明１に区分する。

（発明２）請求項１９－２２
請求項１９は、発明１に区分された上記発明と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項１９は、発明１に区分されたいずれの部分に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項１９は発明１に区分できない。
よって、請求項１９を、発明２に区分する。請求項２０－２２は、請求項１９に対して発明の連関を有しているので、発明２に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/047993

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/230832 A1	19.11.2020	US 2022/0073873 A1 請求の範囲、［００６７］、実施例１－２、表３ EP 3970795 A1	
JP 2021-23293 A	22.02.2021	US 2022/0340868 A1 特許請求の範囲、実施例 EP 4012022 A1	