

明 細 書

発明の名称：シート状網膜組織の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、シート状網膜組織の製造方法及びシート状網膜組織に関する。

背景技術

[0002] 近年、マウス生体の正常な網膜において、適切な分化段階の視細胞前駆細胞を移植すると、機能的に生着することが報告され（非特許文献1）、網膜色素変性等の視細胞の変性疾患に対する移植治療の可能性が示された。

[0003] 自己組織化培養による多能性幹細胞から立体網膜組織への分化誘導方法が多数報告されており、層構造を有する立体網膜組織を製造し移植することが可能になりつつある。例えば、多能性幹細胞から多層の網膜組織を得る方法（非特許文献2及び特許文献1）、均一な多能性幹細胞の凝集体を、Wntシグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地中で形成させ、得られた凝集体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って、多層の網膜組織を得る方法（非特許文献3及び特許文献2）、及び、多能性幹細胞の凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養することによって網膜組織を得る方法（非特許文献4及び特許文献3）等が報告されている。しかし、これらの網膜組織は、スフェア（s p h e r e）状の細胞凝集体として製造されており、シート状の（平坦化した）網膜組織を製造する方法は知られていない。

[0004] 一方、ニワトリにおいて、Wnt2bが網膜の上皮構造形成に効果を示すことが報告されているが（非特許文献5）、ニワトリ以外の生物における同様の効果は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 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

特許文献3：国際公開第2015／025967号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Maclaren RE et al., “Retinal Repair by Transplantation of Photoreceptor Precursors”, Nature, 444, 203-207, (2006)

非特許文献2：Eiraku M. et al., “Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture”, Nature, 472, 51-56, (2011)

非特許文献3：Nakano T. et al., “Self-formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina From Human ESCs” Cell Stem Cell, 10(6), 771-785, (2012)

非特許文献4：Kawahara A. et al., “Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue” Nature Communications, 6, 6286, (2015)

非特許文献5：Nakagawa, S. et al., “Identification of the laminar-inducing factor Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of the neural retina in vitro.” Developmental Biology, 260, 414-425, (2003)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] そこで、本発明は上記事情に鑑みて、網膜系細胞から網膜組織の神経上皮構造を再形成させる方法及び当該方法を応用したシート状網膜組織の製造方法、並びにシート状網膜組織を提供することを目的とする。また、副次的に、出発細胞としてより好ましい網膜前駆細胞の精製方法、及び、上記により製造した広いシート状網膜組織の剥離方法の提供も目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、分散した網膜系細胞を出発細胞として、神経上皮構造を再形成させ、シート状網膜組織を製造することを着想した。しかし、網膜系細胞を分散化することで細胞のApical-Basallの極性が崩れてしま

い、神経上皮構造が再形成されないという課題があることが判明した。

[0009] この課題に対し、本発明者らは、鋭意研究を行った結果、分散化した網膜系細胞にWntシグナル伝達経路作用物質を添加することで、上記課題が解決することがわかった。また、より良好な神経上皮構造を再形成させるために、本発明者らは、鋭意研究を行った。その結果、(1) ROCK阻害剤、SHHシグナル伝達経路作用物質及び／又は線維芽細胞増殖因子をさらに添加すること、(2) 特にシート状での良好な神経上皮構造の再形成のためには細胞接着の足場となる細胞外マトリクスをコーティングした培養プレート上で培養すること、並びに(3) 出発細胞として網膜前駆細胞の純度を向上させることにより、網膜色素上皮細胞(RPE)などの不純細胞が除去されることをさらに見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下の各発明に関する。

[1]

上皮構造を有する網膜組織の製造方法であって、

分散された網膜系細胞集団を、Wntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養又は接着培養することを含み、

上記網膜系細胞集団が、網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含む、製造方法。

[2]

上記Wntシグナル伝達経路作用物質が、CHIR99021、BIO、Wnt2b及びWnt3aからなる群から選択される1以上の物質である、

[1]に記載の製造方法。

[3]

上記培地が、ROCK阻害剤、SHHシグナル伝達経路作用物質及びFGFシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上の物質をさらに含む、[1]又は[2]に記載の製造方法。

[4]

上記ROCK阻害剤が、Y-27632、Fasudil(HA1077

）及びH-1152からなる群から選択される1以上の物質である、[3]に記載の製造方法。

[5]

上記SHHシグナル伝達経路作用物質が、SAG、PMA及びSHHからなる群から選択される1以上の物質である、[3]又は[4]に記載の製造方法。

[6]

上記FGFシグナル伝達経路作用物質が、FGF2、FGF4及びFGF8からなる群から選択される1以上の線維芽細胞増殖因子である、[3]～[5]のいずれかに記載の製造方法。

[7]

上記Wntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で接着培養することを含み、上記上皮構造を有する網膜組織が、シート状網膜組織である、[1]～[6]のいずれかに記載の製造方法。

[8]

上記接着培養が、細胞外マトリクス及び／又は温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器を用いて行われる、[7]に記載の製造方法。

[9]

上記培養容器の培養面が、上記温度感受性ポリマーでコーティングされ、上記温度感受性ポリマーの上面が、上記細胞外マトリクスでコーティングされる、[8]に記載の製造方法。

[10]

上記細胞外マトリクスが、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル及びビトロネクチンからなる群から選択される1以上の物質である、[8]又は[9]に記載の製造方法。

[11]

上記温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器を、該温度感受性ポリマーの性質が変化する温度にさらすことにより、上記シート状網膜

組織を該培養容器からはがす工程をさらに含む、〔８〕～〔１０〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１２〕

網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される１種以上の細胞を含む細胞凝集体を分散させて、上記分散された網膜系細胞集団を得る工程を含む、〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１３〕

多能性幹細胞を分化させて、上記網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される１種以上の細胞を含む細胞凝集体を得る工程を含む、〔１２〕に記載の製造方法。

〔１４〕

上記分散された網膜系細胞集団を浮遊培養又は接着培養する前に、上記分散された網膜系細胞集団中に含まれる網膜前駆細胞の割合を高める工程をさらに含む、〔１〕～〔１３〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１５〕

網膜色素上皮細胞の混入又は分化が抑制される、〔１４〕に記載の方法。

〔１６〕

上記網膜前駆細胞の割合を高める工程が、上記分散された網膜系細胞集団を、ＣＤ９、ＣＤ３９、ＣＤ９０及びＣＸＣＲ４からなる群から選択される１以上の抗原に結合する物質と接触させ、当該抗原を発現する細胞集団を得る工程を含む、〔１４〕又は〔１５〕に記載の製造方法。

〔１７〕

上記網膜前駆細胞の割合を高める工程が、上記分散された網膜系細胞集団を、さらにＳＳＥＡ１、ＣＤ６６ｂ、ＣＤ６９及びＣＤ８４からなる群から選択される１以上の抗原に結合する物質と接触させ、当該抗原の発現量が基準値以下である細胞集団を得る工程を含む、〔１６〕に記載の製造方法。

〔１８〕

上記網膜前駆細胞の割合を高める工程が、以下の工程を含む、〔１４〕～

[1 7] のいずれかに記載の製造方法：

- (1) 多能性幹細胞を S h h シグナル伝達経路作用物質、A T P 及び A 2 A 受容体作用物質からなる群から選択される 1 以上の存在下で培養し、細胞凝集体を製造する工程、
- (2) 細胞凝集体を網膜前駆細胞へ分化誘導させる工程、
- (3) 細胞凝集体を分散させ、C D 3 9 に結合する物質と接触させる工程。

[1 9]

上記網膜前駆細胞及び／又は上記視細胞前駆細胞が、上記網膜系細胞集団に含まれる全細胞数の 5 0 % 以上を占める、[1] ～ [1 8] のいずれかに記載の製造方法。

[2 0]

上記網膜前駆細胞及び／又は上記視細胞前駆細胞が、上記網膜系細胞集団に含まれる全細胞数の 8 0 % 以上を占める、[1] ～ [1 8] のいずれかに記載の製造方法。

[2 1]

上記浮遊培養又は接着培養の開始時から、上記分散された網膜系細胞集団を、上記 W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養する、[1] ～ [2 0] のいずれかに記載の製造方法。

[2 2]

上記上皮構造において、細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっている、[1] ～ [2 1] のいずれかに記載の製造方法。

[2 3]

浮遊培養又は接着培養によって得られた上皮構造を有する網膜組織を、移植に必要な大きさに切り出す工程をさらに含む、[1] ～ [2 2] のいずれかに記載の製造方法。

[2 4]

前記上皮構造が、多層構造である、[1] ～ [2 3] のいずれか一項に記載の製造方法。

[2 5]

多層構造を有する網膜系細胞層からなるシート状網膜組織であって、

(1) 当該多層構造を有する網膜系細胞層が基底面及び頂端面の極性を有し、

(2) 上記多層構造を有する網膜系細胞層が、網膜前駆細胞、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される 1 種以上の細胞を含み、

(3) 上記網膜系細胞層の各層において、細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっており、かつ、

(4) 直径が 8 m m 以上である、シート状網膜組織。

[2 6]

上記多層構造を有する網膜系細胞層が、上記網膜系細胞層に接合しているシート状網膜色素上皮細胞をさらに含み、上記網膜系細胞層と上記シート状網膜色素上皮細胞とはそれぞれの表面の接線方向が凡そ平行しており、上記網膜系細胞層の頂端面と上記シート状網膜色素上皮細胞の頂端面とが向き合っており、かつ、上記網膜系細胞層と上記シート状網膜色素上皮細胞とは両者の間に存在する接着因子により接合している、[2 5] に記載のシート状網膜組織。

[2 7]

上記接着因子が細胞外マトリクス又はハイドロゲルである、[2 6] に記載のシート状網膜組織。

[2 8]

上記接着因子が、ゼラチン、フィブリン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、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及びエンタクチンから選択される 1 以上の物質である、[2 7] に記載のシート状網膜組織。

[2 9]

上記接着因子が、ゼラチン又はフィブリンである、[2 7] に記載のシート状網膜組織。

[30]

[25]～[29]のいずれかに記載のシート状網膜組織を含む、医薬組成物。

[31]

[25]～[29]のいずれかに記載のシート状網膜組織を、移植を必要とする対象に移植することを含む、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の、治療方法。

[32]

網膜前駆細胞を含む細胞集団を、CD9、CD24、CD29、CD39、CD47、CD49b、CD49c、CD49f、CD57、CD73、CD82、CD90、CD164、CD200、CD340及びCXCR4からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させる工程を含む、細胞集団における網膜前駆細胞の割合を向上させる方法。

[33]

上記網膜前駆細胞を含む細胞集団を、CD9、CD39、CD90及びCXCR4からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させる工程を含む、[32]に記載方法。

[34]

上記網膜前駆細胞を含む細胞集団を、SSEA1、CD66b、CD69及びCD84からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させる工程をさらに含む、[32]又は[33]に記載の方法。

[35]

CD9、CD39、CD90及びCXCR4からなる群から選択される少なくとも1つの因子が陽性であり、かつ、R×陽性である網膜前駆細胞を、細胞集団の全細胞数に対して90%以上含む、細胞集団。

[36]

上記網膜前駆細胞が、SSEA1、CD66b、CD69及びCD84からなる群から選択される1以上の抗原が陰性である、[35]に記載の細胞

集団。

[37]

網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療に使用するための、[25]～[29]のいずれかに記載のシート状網膜組織。

[38]

網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療薬の製造における、[25]～[29]のいずれかに記載のシート状網膜組織の使用。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、網膜系細胞から網膜組織の層構造を再形成させる方法及び当該方法を応用したシート状網膜組織の製造方法、並びにシート状網膜組織を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例1において、K h E S - 1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後1日目の凝集体の再形成状態を示す明視野顕微鏡写真である。

[図2]実施例1において、1231A3由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後1日目の凝集体の再形成状態を示す明視野顕微鏡写真である。

[図3]実施例2において、K h E S - 1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後1日目に再形成された凝集体の形態を示す明視野顕微鏡写真である。

[図4]実施例2において、K h E S - 1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後7日目に再形成された凝集体の形態を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図5]実施例2において、K h E S - 1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後14日目に再形成された凝集体の形態を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図6]実施例2において、K h E S - 1由来の単一細胞が再形成された凝集体の面積をImage Jにて計測した結果を示すグラフである。(A)は播種後1日目、7日目及び14日目の凝集体の面積を示し、(B)は播種後1日目の凝集体の面積に対する、7日目及び14日目の凝集体の面積の比(面

積比)を示す。

[図7]実施例2において、1231A3由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後1日目に形成された凝集体の形態を示す明視野顕微鏡写真である。

[図8]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後1日目に形成された凝集体の形態を示す明視野顕微鏡写真である。

[図9]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後14日目に形成された凝集体の形態を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図10]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目に形成された凝集体の形態を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図11]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後15日目の凝集体の免疫染色(DAPI、Rx::Venus、Chx10)された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図12]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後15日目の凝集体の免疫染色(β -catenin)された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図13]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後15日目の凝集体の免疫染色(CollagenIV、Zor1)された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図14]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目の凝集体の免疫染色(DAPI、Chx10、Ki67、Pax6)された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図15]実施例3において、KHES-1由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目の凝集体の切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いてRx::Venusの蛍光を観察した結果を示す写真である。

[図16]実施例3において、K h E S - 1 由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目の凝集体の免疫染色（C o l l a g e n I V、Z o - 1）された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図17]実施例3において、K h E S - 1 由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目の凝集体の免疫染色（D A P I、R x :: V e n u s、C o l l a g e n I V、Z o - 1）された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図18]実施例3において、K h E S - 1 由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目目の凝集体の免疫染色（D A P I、C h x 1 0、K i 6 7、P a x 6）された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図19]実施例3において、K h E S - 1 由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目の凝集体の免疫染色（C R X、R x R g、N R L、R e c o v e r i n）された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図20]実施例3において、K h E S - 1 由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後28日目の凝集体の免疫染色（D A P I、I s l e t - 1、B r n 3、C a l r e t i n i n）された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図21]実施例4において、分化日数が18日目、25日目、40日目、61日目、及び75日目のK h E S - 1 由来の凝集体を単一細胞に分散し、播種後3日目、15日目、21日目に再形成された凝集体の状態を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図22]実施例5において、分化日数が40日目のK h E S - 1 由来の凝集体（B M P 4 + / B M P 4 -）を単一細胞に分散し、播種後3日目、15日目、21日目に再形成された凝集体の状態を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡（R x :: V e n u s）写真である。

[図23]実施例6において、各種凍結保存液にて凍結保存された分散された網膜系細胞を播種して1日後及び7日後に形成された凝集体の形態を観察した蛍光顕微鏡写真である。

[図24]実施例6において、各種凍結保存液にて凍結保存された分散された網膜系細胞を起眠した後の生細胞率（A）、及び起眠した網膜系細胞を用いて再形成された凝集体の面積（B）を示すグラフである。

[図25]実施例7において、浮遊培養で形成された網膜組織において発現している基底膜を免疫染色した切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

[図26]実施例7において、マウスの胎児神経網膜組織において発現しているLamininのアイソフォームを調べた結果を示す免疫組織染色像である。

[図27]実施例8において、条件1～3において、網膜系細胞の単一細胞懸濁液から、接着培養でのシート状網膜組織の再形成を確認した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図28]実施例8において、条件1～3において、網膜系細胞の単一細胞懸濁液から、接着培養でのシート状網膜組織の再形成を確認した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図29]実施例9において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成に対する各種因子の効果を確認した結果を示す明視野顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真である。

[図30]実施例9において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成における各種因子の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図31]実施例10において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の濃度及び添加期間を検討した結果を示す明視野顕微鏡写真、蛍光顕微鏡写真及び共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図32]実施例10において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけ

るCHIR99021の濃度及び添加期間を検討した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図33]実施例11において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるTranswell上への播種時の足場を検討した結果を示す明視野顕微鏡写真、明視野及び蛍光顕微鏡写真、並びに、蛍光顕微鏡写真である。

[図34]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す明視野顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真である。

[図35]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図36]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図37]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図38]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図39]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図40]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図41]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光

顕微鏡写真である。

[図42]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図43]実施例12において、接着培養でのシート状網膜組織の再形成におけるCHIR99021の効果を確認した結果を示す共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図44]実施例13において、各種因子による網膜細胞の維持効果を検討した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図45]実施例14において、網膜前駆細胞の維持培養に有効な条件の検討結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図46]実施例15において、コラーゲン上にて再シート化した結果を示す実体顕微鏡写真である。

[図47]実施例16において、再シート化した網膜細胞シートから作製した移植用グラフトを示す蛍光顕微鏡写真である。

[図48]実施例16において、移植後網膜の眼底を観察した結果を示す蛍光実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図49]実施例17において、単一細胞に分散された細胞集団からR×: Venus陽性の画分をSortingするためのFACS解析の結果を示すグラフである。(A)はドットプロットであり、(B)はヒストグラムプロットである。

[図50]実施例17において、Sorting有／Sorting無の細胞集団を観察した実体顕微鏡及び蛍光実体顕微鏡写真である。

[図51]実施例17において、Sorting有／Sorting無の細胞集団を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図52]実施例17において、Sorting有／Sorting無の細胞集団を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図53]実施例17において、Sortingした細胞集団を観察した明視野

顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図54]実施例18において、各種タンパク質を添加した場合のR x : : V e n u s 陽性の細胞集団を観察した蛍光顕微鏡写真である。

[図55]実施例18において、各種低分子化合物を添加した場合のR x : : V e n u s 陽性の細胞集団を観察した蛍光顕微鏡写真である。

[図56]実施例18において、異なる濃度のF G F 2、F G F 4及びF G F 8を添加した場合のR x : : V e n u s 陽性の細胞集団を観察した蛍光顕微鏡写真である。

[図57]実施例19において、S o r t i n g 及びF G F 8の添加による凝集体再形成及び網膜分化効果を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図58]実施例19において、S o r t i n g 及びF G F 8の添加による凝集体再形成及び網膜分化効果を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真並びにF A C S 解析結果を示すグラフである。

[図59]実施例19において、F G F 8の添加による凝集体再形成及び網膜分化効果を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真並びにF A C S 解析結果を示すグラフである。

[図60]実施例20において、F G F 8の添加による再シート化時の影響を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図61]実施例20において、F G F 8の添加による再シート化時の影響を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図62]実施例20において、F G F 8の添加による再シート化及び網膜分化効果を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真及びF A C S 解析結果を示すグラフである。

[図63]実施例21において、再シート化した網膜シートの継時変化を示す実体顕微鏡、蛍光実体顕微鏡写真である。

[図64]実施例22において、表面抗原スクリーニングにおいて着目したマーカーを示す図である。

[図65]実施例22において、各種表面抗原を用いた細胞S o r t i n g の結

果を示すグラフである。

[図66]実施例22において、各種表面抗原を用いた細胞Sortingの結果を示すグラフである。

[図67]実施例22において、各種表面抗原を用いた細胞Sortingの結果を示すグラフである。

[図68]実施例22において、各種表面抗原を用いた細胞Sortingの結果を示すグラフである。

[図69]実施例22において、各種表面抗原を用いた細胞Sortingの結果を示すグラフである。

[図70]実施例23において、Brain Organoidへの分化状態を観察した明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図71]実施例23において、Brain Organoidへの分化状態を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図72]実施例23において、でBrain OrganoidでのCD39及びCD73、CXCR4の発現についてのFACS解析結果を示すグラフである。

[図73]実施例24において、異なる濃度のSAGによる分化誘導の結果を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図74]実施例24において、異なる濃度のSAGによる分化誘導後のCD39及びCXCR4の発現についてのFACS解析結果並びにデジタル化したグラフである。

[図75]実施例24において、異なる濃度のSAGにより分化誘導した組織の免疫染色像を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図76]実施例24において、異なる濃度のSAGにより分化誘導した組織の免疫染色像を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図77]実施例24において、異なる濃度のSAGによる後のCD39及びBV421の発現についてのFACS解析結果並びに異なる濃度のSAGにより分化誘導した組織の免疫染色像を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡

写真である。

[図78]実施例24において、異なる濃度のSAGにより分化誘導した組織の免疫染色像を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図79]実施例24において、異なる濃度のSAGにより分化誘導した組織の免疫染色像を観察した共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡写真である。

[図80]実施例25において、CD39の発現を増強し得る物質の検討結果を示すFACS解析結果を示すグラフである。

[図81]実施例25において、CD39の発現を増強し得る物質の検討結果を示すFACS解析結果を数値化したグラフである。(A)はCD39陽性かつRX::venus陽性の結果であり、(B)CXCR4陰性かつRX::venus陽性の結果である。

[図82]実施例26において、FGF8-及びFGF8+で作製したIslet-1 KO hESC-網膜シート(dd74)を観察、移植用グラフトを切り出す工程を示す明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図83]実施例27において、Brain Organoidと対比して、NRの各種表面抗原のスクリーニングの結果を示すFACSドットプロットである。

[図84]実施例27において、NRの各種表面抗原のスクリーニングの結果を示すFACSドットプロットである。

[図85]実施例28において、hESC-網膜におけるCD9の発現の経時変化の結果を示すFACSドットプロットである。

[図86]実施例29において、hESC-網膜におけるCD9及びSSEA-1の発現を解析した結果を示すFACSドットプロットである。

[図87]実施例30において、hESC-網膜におけるCD9、CD90、CXCR4及びSSEA-1を用いた純化検討の結果を示すFACSドットプロットである。

[図88]実施例30において、hESC-網膜におけるCD9、CD90、CXCR4及びSSEA-1を用いた純化検討の結果を示すFACSドットプロットである。

ロットである。

[図89]実施例30において、hESC-網膜におけるCD9、CD90、CXCR4及びSSEA-1を用いた純化検討の結果を示すグラフである。

[図90]実施例30において、hESC-網膜におけるCD9、CD90、CXCR4及びSSEA-1を用いた純化検討の結果を示す写真である。

[図91]実施例30において、hESC-網膜におけるCD9、CD90、CXCR4及びSSEA-1を用いた純化検討の結果を示す写真である。

[図92]実施例31において、hESC-網膜におけるCD9及びSSEA-1の発現の経時変化の結果を示すFACS図である。

[図93]実施例32において、ゼラチンを用いたRPEシート及び網膜シートの複合化検討を行った過程を示す模式図である。

[図94]実施例32において、ゼラチンを用いた複合化に用いたトランズウェル上で培養したRPEシート及び再シート化した神経網膜を観察した実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図95]実施例32において、RPEシート及び再シート化した神経網膜をトランズウェルから剥離させ、ゼラチンを添加する過程を示す実体顕微鏡写真である。

[図96]実施例32において、RPEシート及び再シート化した神経網膜にゼラチンを添加する過程を示す実体顕微鏡写真である。

[図97]実施例32において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させる過程を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図98]実施例32において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させた後ピンセットを用いて持ち上げていることを示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図99]実施例32において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させた後、ハサミを用いて切り出していることを示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図100]実施例32において、複合化RPEシート及び再シート化した神経網

膜を切り出した断面を観察した実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図101]実施例32において、切り出した複合化RPEシート及び再シート化した神経網膜の吸引・吐出を観察した実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図102]実施例33において、Fibrinを用いた複合化に用いたトランズウェル上で培養したRPEシート及び再シート化した神経網膜を観察した実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図103]実施例33において、RPEシート及び再シート化した神経網膜をトランズウェルから剥離させる複合化検討の過程を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図104]実施例33において、回収したRPEシート及び再シート化に対してFibrinogen及びThrombinを添加する複合化検討の過程を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図105]実施例33において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させる過程を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図106]実施例33において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させる過程を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図107]実施例33において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させた後ピンセットを用いて持ち上げていることを示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図108]実施例33において、RPEシート及び再シート化した神経網膜を複合化させた状態を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図109]実施例33において、RPEシートをトランズウェルのメッシュから剥離させる複合化検討の過程を示す実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡写真である。

[図110]実施例34において、セルシフターを用いた不要なハイドロゲルの排出検討結果を示す模式図及び写真である。

[図111]実施例35において、温度感受性培養皿上で平面化シートを作製し、剥離する過程を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0013] 〔定義〕

「幹細胞」とは、分化能及び増殖能（特に自己複製能）を有する未分化な細胞を意味する。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。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、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）及び／又は胚体外組織に属する細胞系譜すべてに分化しうる能力（分化多能性（*pluripotency*））を有する幹細胞をいう。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。

[0014] 「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、体細胞等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*）等を挙げることが出来る。間葉系幹細胞（*mesenchymal stem cell*；MSC）から得られるMuse細胞（*Multi-lineage differentiating stress enduring cell*）や、生殖細胞（例えば精巢）から作製されたGS細胞も多能性幹細胞に包含される。

[0015] 1998年に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。胚性幹細胞は、内部細胞凝集体をフィーダー細胞上又はbFGFを含む培地中で培養することにより製造することが出来る。胚性幹細胞の製造方法は、例えば、WO96/22362、WO02/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718等に

記載されている。胚性幹細胞は、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。ヒト胚性幹細胞であるC r x : : V e n u s 株及びR x : : V e n u s 株（いずれもK h E S - 1 由来）は国立研究開発法人理化学研究所より入手可能である。

[0016] 「人工多能性幹細胞」とは、体細胞を、公知の方法等により初期化（r e p r o g r a m m i n g）することにより、多能性を誘導した細胞である。

[0017] 人工多能性幹細胞は、2006年、山中らによりマウス細胞で樹立された（C e l l , 2006, 126(4), pp. 663-676）。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多能性と自己複製能を有する（C e l l , 2007, 131(5), pp.861-872; Science , 2007, 318(5858), pp.1917-1920; Nat. Biotechnol., 2008, 26(1), pp.101-106）。

[0018] 人工多能性幹細胞は、具体的には、線維芽細胞や末梢血単核球等分化した体細胞をO c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、M y c（c-M y c、N-M y c、L-M y c）、G l i s 1、N a n o g、S a l l 4、l i n 2 8、E s r r b等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り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）O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、及びM y c（c-M y c又はL-M y c）、（2）O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、L i n 2 8及びL-M y c（S t e m C e l l s、2013; 31: 458-466）を挙げることが出来る。

[0019] 人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加等により体細胞より人工多能性幹細胞を誘導することもできる（S c i e n c e , 2013, 341, pp. 651-654）。

[0020] また、株化された人工多能性幹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、253G

1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞、1231A3細胞等のヒト人工多能性細胞株が、京都大学及びiPSアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたFf-IO1細胞、Ff-IL14細胞及びQHJIO1sO4細胞が、京都大学より入手可能である。

[0021] 本明細書において、多能性幹細胞は、好ましくは胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞であり、より好ましくは人工多能性幹細胞である。

[0022] 本明細書において、多能性幹細胞は、ヒトの多能性幹細胞であり、好ましくはヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）又はヒト胚性幹細胞（ES細胞）である。

[0023] ヒトiPS細胞等の多能性幹細胞は、当業者に周知の方法で維持培養及び拡大培養に付することができる。

[0024] 「神経組織」とは、発生期又は成体期の脳、中脳、小脳、脊髄、網膜、末梢神経、前脳、後脳、終脳、間脳等の、神経系細胞によって構成される組織を意味する。神経組織は、層構造をもつ上皮構造（神経上皮）を形成することがあり、細胞凝集体中の神経上皮は光学顕微鏡を用いた明視野観察により存在量を評価することができる。

[0025] 「神経系細胞（Neural cell）」とは、外胚葉由来組織のうち表皮系細胞以外の細胞を表す。すなわち、神経系前駆細胞、ニューロン（神経細胞）、グリア、神経幹細胞、ニューロン前駆細胞及びグリア前駆細胞等の細胞を含む。神経系細胞には、下述する網膜組織を構成する細胞（網膜細胞）、網膜前駆細胞、網膜層特異的神経細胞、神経網膜細胞、網膜色素上皮細胞も包含される。神経系細胞は、Nestin、TuJ1、PSA-NCAM、N-cadherin等をマーカーとして同定することができる。

[0026] 「神経細胞（Neuron・Neuronal cell）」は、神経回路を形成し情報伝達に貢献する機能的な細胞であり、TuJ1、Dcx、HuC／D等の幼若神経細胞マーカー、及び／又は、Map2、NeuN等の成熟神経細胞マーカーの発現を指標に同定することができる。

- [0027] 「神経系前駆細胞 (Neural Precursor cell)」は、神経幹細胞、ニューロン前駆細胞及びグリア前駆細胞を含む前駆細胞の集合体であり、増殖能とニューロン及びグリア産生能をもつ。神経系前駆細胞はNestin、GLAST、Sox2、Sox1、Musashi、Pax6等をマーカーとして同定することができる。あるいは、神経系細胞のマーカー陽性かつ増殖マーカー (Ki67、pH3、MCM) 陽性の細胞を、神経系前駆細胞として同定することもできる。
- [0028] 「網膜組織 (Retinal tissue)」とは、生体網膜において各網膜層を構成する網膜系細胞が、一種類又は複数種類、一定の秩序に従い存在する組織を意味し、「神経網膜 (Neural Retina)」は、網膜組織であって、後述する網膜層のうち網膜色素上皮層を含まない内側の神経網膜層を含む組織を意味する。
- [0029] 「網膜系細胞 (Retinal cell)」とは、生体網膜において各網膜層を構成する細胞又はその前駆細胞を意味する。網膜系細胞には、視細胞 (桿体視細胞、錐体視細胞)、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞 (神経節細胞)、双極細胞 (桿体双極細胞、錐体双極細胞)、ミューラーグリア細胞、網膜色素上皮 (RPE) 細胞、毛様体、これらの前駆細胞 (例: 視細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞、網膜色素上皮前駆細胞等)、神経網膜前駆細胞、網膜前駆細胞等の細胞が含まれるがこれらに限定されない。網膜系細胞のうち、神経網膜層を構成する細胞 (神経網膜細胞又は神経網膜系細胞 (Neural retina-related cell) ともいう) として、具体的には、視細胞 (桿体視細胞、錐体視細胞)、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞 (神経節細胞)、双極細胞 (桿体双極細胞、錐体双極細胞)、ミューラーグリア細胞、及びこれらの前駆細胞 (例: 視細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞等) 等の細胞が挙げられる。すなわち、神経網膜系細胞には網膜色素上皮細胞及び毛様体細胞が含まれない。
- [0030] 「成熟した網膜系細胞」とは、ヒト成人の網膜組織に含まれ得る細胞を意

味し、具体的には、視細胞（桿体視細胞、錐体視細胞）、水平細胞、アマクリン細胞、介在神経細胞、網膜神経節細胞（神経節細胞）、双極細胞（桿体双極細胞、錐体双極細胞）、ミュラーグリア細胞、網膜色素上皮（RPE）細胞、毛様体細胞等の分化した細胞を意味する。「未成熟な網膜系細胞」とは、成熟した網膜系細胞への分化が決定づけられている前駆細胞（例：視細胞前駆細胞、双極細胞前駆細胞、網膜前駆細胞等）を意味する。

[0031] 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、網膜神経節細胞前駆細胞、ミュラーグリア前駆細胞、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、網膜神経節細胞、ミュラーグリア細胞、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。

[0032] 「網膜前駆細胞」とは、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、網膜神経節細胞前駆細胞、ミュラーグリア細胞、網膜色素上皮前駆細胞等のいずれの未成熟な網膜系細胞にも分化しうる前駆細胞であって、最終的に、視細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞、網膜色素上皮細胞等のいずれの成熟した網膜系細胞にも分化しうる前駆細胞をいう。「神経網膜前駆細胞」とは、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、網膜神経節細胞前駆細胞、ミュラーグリア細胞等のいずれの未成熟な神経網膜系細胞にも分化しうる前駆細胞であって、最終的に、視細胞、桿体視細胞、錐体視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞等のいずれの成熟した神経網膜系細胞にも分化しうる前駆細胞をいう。神経網膜前駆細胞は、網膜色素上皮細胞への分化能は有しない。

[0033] 「視細胞（photoreceptor cell）」とは、生体においては網膜の視細胞層に存在し、光刺激を吸収し電気信号へと変換する役割を持つ。視細胞には、明所で機能する錐体（cone）と暗所で機能する桿体（又は桿体、rod）の2種類がある（それぞれ、錐体視細胞、桿体視細胞

という)。また、錐体視細胞としては、S-opsinを発現し青色光を受容するS錐体視細胞、L-opsinを発現し赤色光を受容するL錐体視細胞、及びM-opsinを発現し緑色光を受容するM錐体視細胞を挙げることができる。視細胞は視細胞前駆細胞から分化し、成熟する。細胞が視細胞若しくは視細胞前駆細胞であるか否かは、当業者であれば、例えば後述する細胞マーカー（視細胞前駆細胞で発現するCrx及びBlimp1、視細胞で発現するリカバリン（Recoverin）、成熟視細胞で発現するロドプシン、S-Opsin及びM/L-Opsin等）の発現、外節構造の形成等により容易に確認できる。一態様において、視細胞前駆細胞はCrx陽性細胞であり、視細胞はロドプシン、S-Opsin及びM/L-Opsin陽性細胞である。一態様において、桿体視細胞はNRL及びRhodopsin陽性細胞である。一態様において、S錐体視細胞はS-opsin陽性細胞、L錐体視細胞はL-opsin陽性細胞、及びM錐体視細胞はM-opsin陽性細胞である。

[0034] 神経網膜系細胞の存在は、神経網膜系細胞関連遺伝子（以下、「神経網膜系細胞マーカー」、又は「神経網膜マーカー」という場合がある。）の発現の有無によって確認することができる。神経網膜系細胞マーカーの発現の有無、又は細胞集団若しくは組織における神経網膜系細胞マーカー陽性細胞の割合は、当業者であれば容易に確認することができる。例えば、抗体を用いた手法、核酸プライマーを用いた手法、シーケンス反応を用いた手法が挙げられる。抗体を用いた手法としては、神経網膜系細胞マーカーのタンパク質の発現を、例えば、市販の抗体を用いたフローサイトメトリー（FACS）、免疫染色等の手法によって、特定の神経網膜系細胞マーカー陽性細胞の数を全細胞数で除することにより確認することができる。核酸プライマーを用いた手法としては、神経網膜系細胞マーカーのRNAの発現を、例えば、PCR法、半定量PCR法、定量PCR法（例：リアルタイムPCR法）で確認することができる。シーケンス反応を用いた手法としては、神経網膜系細胞マーカーのRNAの発現を、例えば、核酸シーケンサ（例：次世代シーケ

ンサ)を用いて確認することができる。

[0035] 神経網膜系細胞マーカーとしては、網膜前駆細胞で発現するR_x (R_axとも言う)及びPAX6、神経網膜前駆細胞で発現するR_x、PAX6及びChx10 (Vs_x2とも言う)、視細胞前駆細胞で発現するCr_x及びBlimp1等が挙げられる。また、双極細胞で強発現するChx10、双極細胞で発現するPKC α 、Go α 、VSX1及びL7、網膜神経節細胞で発現するTuJ1及びBrn3、アマクリン細胞で発現するCalretinin及びHPC-1、水平細胞で発現するCalbindin、視細胞及び視細胞前駆細胞で発現するRecoverin、桿体細胞で発現するRhodopsin、桿体視細胞及び桿体視細胞前駆細胞で発現するNr1、錐体視細胞で発現するS-opsin及びLM-opsin、錐体細胞、錐体視細胞前駆細胞及び神経節細胞で発現するRXR- γ 、錐体視細胞のうち、分化初期に出現する錐体視細胞又はその前駆細胞で発現するTR β 2、OTX2及びOC2、水平細胞、アマクリン細胞及び神経節細胞で共通して発現するPax6等が挙げられる。本願実施例において同定された網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞の表面抗原を、網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞のマーカーとして用いることもできる。詳細は後述する。

[0036] 「陽性細胞」とは、特定のマーカーを細胞表面上又は細胞内に発現している細胞を意味する。例えば、「Chx10陽性細胞」とは、Chx10タンパク質を発現している細胞を意味する。

[0037] 「網膜色素上皮細胞」とは、生体網膜において神経網膜の外側に存在する上皮細胞を意味する。細胞が網膜色素上皮細胞であるか否かは、当業者であれば、例えば細胞マーカー(MITF、Pax6、PMEL17、TYRP1、TRPM1、ALDH1A3、GPNMB、RPE65、CRALBP、MERTK、BEST1、TTR等)の発現や、メラニン顆粒の存在(黒褐色)、細胞間のタイトジャンクション、多角形・敷石状の特徴的な細胞形態等により容易に確認できる。細胞が網膜色素上皮細胞の機能を有するか否かは、VEGF及びPEDF等のサイトカインの分泌能や視細胞外節の貪食

能等により容易に確認できる。一態様において、網膜色素上皮細胞はRPE65陽性細胞、MITF陽性細胞、又は、RPE65陽性かつMITF陽性細胞である。

[0038] 「網膜色素上皮細胞シート」とは、網膜色素上皮細胞が少なくとも二次元の方向に生物学的結合により互いに接着し、単一又は複数の細胞から構成される単層又は重層のシート状の構造体を意味する。

[0039] 「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、神経線維層及び内境界膜を挙げることができる。

[0040] 「神経網膜層」とは、神経網膜を構成する各層を意味し、具体的には、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、神経線維層及び内境界膜を挙げることができる。「視細胞層」とは、神経網膜の最も外側に形成され、視細胞（桿体視細胞、錐体視細胞）、視細胞前駆細胞及び網膜前駆細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を多く含む網膜層を意味する。視細胞層以外の各層を内層という。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の発現の有無又は発現の程度等によって確認できる。

[0041] 視細胞又は視細胞前駆細胞の出現割合が少ない段階の網膜組織の場合、増殖する神経網膜前駆細胞を含む層を「ニューロブラスティックレイヤー (neuroblastic layer)」といい、inner neuroblastic layerとouter neuroblastic layerが存在する。当業者であれば周知の方法、例えば明視野顕微鏡の下では、色の濃淡 (outer neuroblastic layerが薄く、inner neuroblastic layerが濃い) により判断することができる。

[0042] 「毛様体」は、発生過程及び成体の「毛様体」、「毛様体周縁部」、「Ciliary body」を含む。「毛様体」のマーカーとしては、Zic1、MAL、HNF1beta、FoxQ1、CLDN2、CLDN1、GPR177、AQP1及びAQP4があげられる。「毛様体周縁部 (ciliary marginal zone; CMZ)」としては、例えば、生体網

膜において神経網膜と網膜色素上皮との境界領域に存在する組織であり、且つ、網膜の組織幹細胞（網膜幹細胞）を含む領域を挙げることができる。毛様体周縁部は、毛様体縁（ciliary margin）又は網膜縁（retinal margin）とも呼ばれ、毛様体周縁部、毛様体縁及び網膜縁は同等の組織である。毛様体周縁部は、網膜組織への網膜前駆細胞、分化細胞の供給、網膜組織構造の維持等に重要な役割を果たしていることが知られている。毛様体周縁部のマーカー遺伝子としては、例えば、Rdh10 遺伝子（陽性）、Otx1 遺伝子（陽性）及びZic1（陽性）を挙げることができる。「毛様体周縁部様構造体」とは、毛様体周縁部と類似した構造体のことである。

[0043] 「大脳組織」とは、胎児期又は成体の大脳を構成する細胞（例、大脳神経系前駆細胞（cortical neural precursor cell）、背側大脳神経系前駆細胞、腹側大脳神経系前駆細胞、大脳層構造特異的神経細胞（ニューロン）、第一層ニューロン、第二層ニューロン、第三層ニューロン、第四層ニューロン、第五層ニューロン、第六層ニューロン、グリア細胞（アストロサイト及びオリゴデンドロサイト）、これらの前駆細胞など）が、一種類又は少なくとも複数種類、層状で立体的に配列した組織を意味する。胎児期の大脳は、前脳又は終脳とも呼ばれる。それぞれの細胞の存在は、公知の方法、例えば細胞マーカーの発現有無若しくはその程度等により確認できる。

[0044] 「大脳層」とは、成体大脳又は胎児期大脳を構成する各層を意味し、具体的には、分子層、外顆粒層、外錐体細胞層、内顆粒層、神経細胞層（内錐体細胞層）、多型細胞層、第一層、第二層、第三層、第四層、第五層、第六層、皮質帯、中間帯、脳室下帯、及び、脳室帯（ventricular zone）を挙げることができる。

[0045] 「大脳神経系前駆細胞」としては、ニューロン前駆細胞、第一層ニューロン前駆細胞、第二層ニューロン前駆細胞、第三層ニューロン前駆細胞、第四層ニューロン前駆細胞、第五層ニューロン前駆細胞、第六層ニューロン前駆細胞、アストロサイト前駆細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞等を挙げる

ことができる。それぞれの細胞は、第一層ニューロン、第二層ニューロン、第三層ニューロン、第四層ニューロン、第五層ニューロン、第六層ニューロン、アストロサイト、及び、オリゴデンドロサイトへの分化が決定付けられている前駆細胞である。

[0046] 「大脳神経系前駆細胞」は、第一層ニューロン、第二層ニューロン、第三層ニューロン、第四層ニューロン、第五層ニューロン、第六層ニューロン、アストロサイト、及び、オリゴデンドロサイトのうちの少なくとも複数の分化系譜への分化能（多分化能）をもつ複能性幹細胞（複能性神経幹細胞、multi-potent neural stem cell）を含む。

[0047] 「大脳層特異的神経細胞」とは、大脳層を構成する細胞であって大脳層に特異的な神経細胞を意味する。大脳層特異的神経細胞としては、第一層ニューロン、第二層ニューロン、第三層ニューロン、第四層ニューロン、第五層ニューロン、第六層ニューロン、大脳興奮性ニューロン、大脳抑制性ニューロン等を挙げることができる。

[0048] 大脳細胞マーカーとしては、大脳細胞で発現するFoxG1（別名Bf1）、大脳神経系前駆細胞で発現するSox2及びNestin、背側大脳神経系前駆細胞で発現するPax6及びEmx2、腹側大脳神経系前駆細胞で発現するDlx1、Dlx2及びNkx2.1、ニューロン前駆細胞で発現するTbr2、Nes、Svet1、第六層ニューロンで発現するTbr1、第五層ニューロンで発現するCtip2、第四層ニューロンで発現するROREβ、第三層ニューロン又は第二層ニューロンで発現するCux1又はBrn2、第一層ニューロンで発現するReelinなどが挙げられる。

[0049] 「細胞凝集体」（Cell Aggregate）とは、複数の細胞同士が接着して立体構造を形成しているものであれば特に限定はなく、例えば、培地等の媒体中に分散していた細胞が集合して形成する塊、又は細胞分裂を経て形成される細胞の塊等をいう。細胞凝集体には、特定の組織を形成している場合も含まれる。

[0050] 「スフェア（sphere）状細胞凝集体」は、球状に近い立体的な形を

有する細胞凝集体を意味する。球状に近い立体的な形とは、三次元構造を有する形であって、二次元面に投影したときに、例えば、円形又は楕円形を示す球状形、及び球状形が複数融合して形成される形状（例えば二次元に投影した場合に2～4個の円形若しくは楕円形が重なりあって形成する形を示す）が挙げられる。一態様において、凝集体のコア部は、小胞性層状構造を有し、明視野顕微鏡の下では、中央部が暗く外縁部分が明るく観察されるという特徴を有する。

- [0051] 「上皮組織」とは、体表面、管腔（消化管など）、体腔（心膜腔など）などの表面を細胞が隙間なく覆うことで形成される組織である。上皮組織を形成している細胞を上皮細胞という。上皮細胞は、細胞が頂端（a p i c a l）－基底（b a s a l）方向の極性を持つ。上皮細胞は、接着結合（a d h e r e n c e j u n c t i o n）及び／又は密着結合（t i g h t j u n c t i o n）により上皮細胞同士で強固な結合をつくり、細胞の層を形成できる。この細胞層が、1ないし十数層重なってできた組織が上皮組織である。上皮組織を形成し得る組織には、胎児期及び／又は成体の網膜組織、脳脊髄組織、眼球組織、神経組織等も含まれる。本明細書における神経網膜も上皮組織である。「上皮構造」とは、上皮組織が特徴的に有する構造（例：基底面及び頂端面の極性を有する）を意味する。
- [0052] 「連続上皮組織」とは、連続上皮構造を有する組織である。連続上皮構造とは、上皮組織が連続している状態のことである。上皮組織が連続しているとは、例えば、上皮組織に対する接線方向に 10^1 細胞～ 10^7 細胞、好ましくは接線方向に 30 細胞～ 10^7 細胞、さらに好ましくは 10^2 細胞～ 10^7 細胞、並んでいる状態のことである。
- [0053] 例えば、網膜組織において形成される連続上皮構造は、網膜組織が上皮組織に特有の頂端面を持ち、頂端面が神経網膜層を形成する各層のうち、少なくとも視細胞層（外顆粒層）等と概ね平行に、かつ連続的に網膜組織の表面に形成される。例えば、多能性幹細胞より作製した網膜組織を含む細胞凝集体の場合、凝集体の表面に頂端面が形成され、表面に対して接線方向に 10^1

細胞以上、好ましくは30細胞以上、より好ましくは100細胞以上、さらに好ましくは400細胞以上の視細胞又は視細胞前駆細胞が規則正しく連続して配列する。

[0054] 一態様において、上皮組織は極性化して「頂端面 (apical surface)」と「基底面」及び「基底膜」ができる。「基底膜」とは、上皮細胞が産生した基底 (basal) 側の層 (基底膜) のことをいい、ラミニン及びⅠⅤ型コラーゲンを多く含み、50～100nmの厚さを有する。「基底面」は「基底膜」側に形成される表面 (表層面) のことをいう。「頂端面」は、「基底膜」と反対側に形成される表面 (表層面) のことをいう。一態様において、「頂端面」は視細胞又は視細胞前駆細胞が認められる程度に発生段階が進行した網膜組織においては、外境界膜が形成され、視細胞、視細胞前駆細胞が存在する視細胞層 (外顆粒層) に接する面のことをいう。また、このような頂端面は、頂端面のマーカー (例: atypical-PKC (以下、「aPKC」と略す)、Tight Junctionマーカー (Zoo-1)、ERMタンパク質であるEzrin、E-cadherin、N-cadherin) に対する抗体を用いて、当業者に周知の免疫染色法等で同定することができる。

[0055] 「細胞凝集体の製造方法」

本発明の一態様は、分散された網膜系細胞集団から、上皮構造 (又は多層構造) を有する網膜組織を含む細胞凝集体 (本明細書において、「網膜組織を含む細胞凝集体」を単に「網膜組織」という場合がある) を製造するための製造方法である。該方法は、分散された網膜系細胞集団を、Wntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養又は接着培養することを含む。ここで、分散された網膜系細胞集団は、網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含む。網膜組織は上記に定義されているとおりである。一態様として、網膜組織は神経網膜組織を含み、また、神経網膜組織と網膜色素上皮組織の両方を含んでもよい。

[0056] 網膜系細胞は、上記に定義されているとおりであり、一態様において、網

膜系細胞は網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される１種以上の細胞を含み、他に視細胞（桿体視細胞、錐体視細胞）、水平細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞（神経節細胞）、双極細胞（桿体双極細胞、錐体双極細胞）、ミューグリア細胞等の細胞を含んでもよい。網膜系細胞は神経網膜系細胞であることが好ましい。使用される網膜系細胞集団は、生体組織由来のものであっても多能性幹細胞由来のものであってもよく、多能性幹細胞を分化誘導して得られたものであることが好ましい。

[0057] 生体組織由来の網膜系細胞は、当業者であれば、周知技術により生体由来の網膜組織から調製することができる。例えば、眼摘後、RPEと剥離させて、回収する方法や、直接神経網膜を摘出する方法がある。

[0058] 本発明の一態様は、分散された神経系細胞集団から、上皮構造（又は多層構造）を有する神経組織（例：大脳（終脳）組織）を含む細胞凝集体の製造方法である。該方法は、分散された神経系細胞集団を、Wntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で接着培養又は浮遊培養することを含む。神経系細胞は神経系前駆細胞（例：大脳神経系前駆細胞）を含んでいることが好ましい。使用される神経系細胞集団は、生体組織由来のものであっても多能性幹細胞由来のものであってもよく、多能性幹細胞を分化誘導して得られたものであることが好ましい。

[0059] （出発細胞としての網膜系細胞集団の分化誘導方法）

本発明の製造方法の出発細胞としての多能性幹細胞由来の網膜系細胞は、多能性幹細胞を分化誘導することによって得ることができる。一態様として、分化誘導因子を用いて多能性幹細胞を分化誘導して網膜系細胞の凝集体を得ることができる。分化誘導因子として、基底膜標品、BMPシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、IGFシグナル伝達経路作用物質などが挙げられる。一態様として、自己組織化による網膜系細胞の凝集体の製造方法が挙げられる。自己組織化とは、細胞の集団が自律的に複雑な構造を生み出す機序をいう。例えば、SFEBC（Serum-free Floating culture of Embryoid Bodi

es-like aggregates) 法 (WO2005/12390) やSFEbq法 (WO2009/148170) により、自己組織化を行うことができる。

[0060] 具体的な分化誘導方法として、WO2011/055855、WO2013/077425、WO2015/025967、WO2016/063985、WO2016/063986、WO2017/183732、PLOS One, 2010 Jan 20; 5 (1) : e8763.、Stem Cells, 2011 Aug; 29 (8) : 1206-18.、Proc Natl Acad Sci USA, 2014 Jun 10; 111 (23) : 8518-23、又はNat Commun, 2014 Jun 10; 5 : 4047に開示されている方法が挙げられるが、特に限定されない。

[0061] 具体的な一態様として、下記工程 (A)、(B) 及び (C) を含む方法によって網膜系細胞の凝集体を調製することができる。

(A) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、未分化維持因子を含む培地で培養する工程、

(B) 工程 (A) で得られた細胞を浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

(C) 工程 (B) で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに浮遊培養する工程。

[0062] なお、工程 (A) は、さらにTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでもよい。

[0063] また、工程 (B) は、後述するように、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、及び／又はWntシグナル伝達阻害物質を含んでもよい。

[0064] 本方法は、例えばWO2015/025967、WO2016/063985、WO2017/183732にも開示されており、より詳細にはWO

2015/025967、WO2016/063985、WO2017/183732を参照することが可能である。

[0065] 網膜系細胞の凝集体の調製に使用する培地は、特段の記載がない限り、細胞増殖用基礎培地（基礎培地とも呼ぶ）を使用することができる。細胞増殖用基礎培地は細胞の培養が可能な限り特に限定はなく、適宜細胞増殖用培地として市販されている基礎培地を用いることができる。具体的には、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、MEM培地、Eagle MEM培地、 α MEM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、Leibovitz's L-15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。また、補助培地であるN2培地を添加した培地を用いてもよい。

[0066] TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質とは、TGF β ファミリーシグナル伝達経路、すなわちSmadファミリーによって伝達される、シグナル伝達経路を阻害する物質を表し、具体的にはTGF β シグナル伝達経路阻害物質（例：SB431542、LY-364947、SB505124、A-83-01等）、Nodal/Activinシグナル伝達経路阻害物質（例：SB431542、A-83-01等）及びBMPシグナル伝達経路阻害物質（例：LDN193189、Dorsomorphin等）を挙げることができる。これらの物質は市販されており入手可能である。

[0067] ソニック・ヘッジホッグ（以下、「Shh」又は「SHH」と記すことがある。）シグナル伝達経路作用物質とは、Shhによって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、SHH、SHHの部分ペプチド、PMA (Purmorphamine)、SAG (Smoothened Agonist) 等が挙げられ

る。

[0068] TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の濃度は、網膜系細胞への分化を誘導可能な濃度であればよい。例えば、SB431542は、通常0.1~200 μ M、好ましくは2~50 μ Mの濃度で使用される。A-83-01は、通常0.05~50 μ M、好ましくは0.5~5 μ Mの濃度で使用される。LDN193189は、通常1~2000nM、好ましくは10~300nMの濃度で使用される。SAGは、通常、1~2000nM、好ましくは10~700nMの濃度で使用される。PMAは、通常0.002~20 μ M、好ましくは0.02~2 μ Mの濃度で使用される。

[0069] 未分化維持因子は、多能性幹細胞の分化を抑制する作用を有する物質であれば特に限定はない。当業者に汎用されている未分化維持因子としては、FGFシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質、insulin等を挙げることができる。FGFシグナル伝達経路作用物質として具体的には、線維芽細胞増殖因子（例えば、bFGF、FGF4やFGF8）が挙げられる。また、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質としては、TGF β シグナル伝達経路作用物質、Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質が挙げられる。TGF β シグナル伝達経路作用物質としては、例えばTGF β 1、TGF β 2が挙げられる。Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質としては、例えばNodal、ActivinA、ActivinBが挙げられる。ヒト多能性幹細胞（ヒトES細胞、ヒトiPS細胞）を培養する場合、工程（A）における培地は、好ましくは未分化維持因子として、bFGFを含む。

[0070] 工程（A）において用いられる培地中の未分化維持因子濃度は、培養する多能性幹細胞の未分化状態を維持可能な濃度であり、当業者であれば、適宜設定することができる。例えば、具体的には、フィーダー細胞非存在下で未分化維持因子としてbFGFを用いる場合、その濃度は、通常4~500ng/mL程度、好ましくは10~200ng/mL程度、より好ましくは3

0～150 ng/mL程度である。

[0071] 未分化維持因子を含み、多能性幹細胞を培養するために使用可能なフィーダーフリー培地として、多くの合成培地が開発・市販されており、例えばEssential 8培地(Life Technologies社製)が挙げられる。Essential 8培地は、DMEM/F12培地に、添加剤として、L-ascorbic acid-2-phosphate magnesium (64 mg/L)、sodium selenium (14 μg/L)、insulin (19.4 mg/L)、NaHCO₃ (543 mg/L)、transferrin (10.7 mg/L)、bFGF (100 ng/mL)、及び、TGFβファミリーシグナル伝達経路作用物質(TGFβ1 (2 ng/mL) 又はNodal (100 ng/mL))を含む(Nature Methods、8、424-429 (2011))。その他市販のフィーダーフリー培地としては、S-medium (DSファーマバイオメディカル社製)、StemPro (Life Technologies社製)、hESF9 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008 Sep 9; 105 (36): 13409-14)、mTeSR1 (STEMCELL Technologies社製)、mTeSR2 (STEMCELL Technologies社製)、TeSR-E8 (STEMCELL Technologies社製)、又はStemFit (味の素社製)が挙げられる。上記工程(A)ではこれらを用いることにより、簡便に本発明を実施することが出来る。これら培地を使用することで、フィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養をおこなうことが可能である。工程(A)で使用する培地は、一例として、BMPシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路作用物質及びWntシグナル伝達経路阻害物質のいずれも添加されていない無血清培地である。

[0072] 工程(A)におけるフィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養においては、フィーダー細胞に代わる足場を多能性幹細胞に提供するため、適切なマトリクスを足場として用いてもよい。足場として用いることのできるマト

リクスとしては、ラミニン (Nat Biotechnol 28, 611-615, (2010))、ラミニン断片 (Nat Commun 3, 1236, (2012))、基底膜標品 (Nat Biotechnol 19, 971-974, (2001))、ゼラチン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、ビトロネクチン (Vitronectin) 等が挙げられる。

[0073] 工程 (A) における多能性幹細胞の培養時間は、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質 (例：100 nM～700 nM) の存在下で培養する場合、工程 (B) において形成される細胞凝集体の質を向上させる効果が達成可能な範囲で特に限定されないが、通常0.5～144時間である。一態様において、好ましくは2～96時間、より好ましくは6～48時間、さらに好ましくは12～48時間、よりさらに好ましくは18～28時間 (例、24時間) である。

[0074] 工程 (B) において用いられる培地は血清含有培地又は無血清培地であり得る。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、無血清培地が好適に用いられる。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が挙げられる。無血清培地へのKSRの添加量としては、通常約1%から約30%であり、好ましくは約2%から約20%である。

[0075] 凝集体の形成に際しては、まず、工程 (A) で得られた細胞の分散操作により、分散された細胞を調製する。分散操作により得られた「分散された細胞」とは、例えば7割 (好ましくは8割以上) 以上が単一細胞であり2～50細胞の塊が3割以下 (好ましくは2割以下) 存在する状態が挙げられる。分散された細胞とは、細胞同士の接着 (例えば面接着) がほとんどなくなった状態が挙げられる。

[0076] 分散された細胞の懸濁液を培養器中に播き、分散させた細胞を、培養器に対して、非接着性の条件下で培養することにより、複数の細胞を集合させて

凝集体を形成する。一態様として、96ウェルプレートのようなマルチウェルプレート（U底、V底）の各ウェルに一定数の分散された幹細胞を入れて、これを静置培養すると、細胞が迅速に凝集することにより、各ウェルにおいて1個の凝集体が形成される（SFE Bq法）。96ウェルプレートを用いて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、約 4×10^3 から約 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。

[0077] 一態様において、工程（B）において用いられる培地は、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む。

すなわち、具体的で一態様として、下記工程（A）、（B）及び（C）を含む方法によって網膜系細胞の凝集体を調製することができる：

（A）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、かつ任意でTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでもよい、未分化維持因子を含む培地で培養する工程、

（B）工程（A）で得られた細胞を、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

（C）工程（B）で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに浮遊培養する工程。

工程（B）におけるソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質としては、上述したものを上述の濃度（例：10 nM～300 nM）で用いることができる。ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質は、好ましくは、浮遊培養開始時から培地に含まれる。培地には、ROCK阻害剤（例、Y-27632）を添加してもよい。培養時間は例えば、12時間～6日間である。工程（B）において用いられる培地は、一例において、BMPシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路作用物質、TGF β フ

ァミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGFβファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。

[0078] 工程（B）において、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養することにより、後述する網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞（R×陽性細胞）の細胞表面マーカーであるCD39の発現が増加する。一態様として、工程（B）の浮遊培養開始時（Day 0）から高濃度（100 nM～1000 nM、例：300 nM）のSAGを添加することにより、CD39の発現が増加する。当該方法を用いることにより、CD39を用いた網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞の純化工程を行う場合に、より多くのCD39陽性細胞を純化することができ、製造効率が向上する。なお、SAGを300 nM添加して得られたCD39陽性細胞を含む組織は、Chx10陽性かつLhx2陽性、NKX2.1陰性であることから、網膜組織である。特に腹側（CoupTF1陽性）の網膜組織が誘導される。なお、工程（B）においてSAGを添加せずに得られた網膜組織は、背側（ALDH1A1陽性）の網膜組織が誘導される。

[0079] 工程（B）において、ATP、ATPアナログ（AMP-PNPなど）及びA2A受容体アゴニスト（アデノシン、CGS 21680（3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoic acid）など）からなる群から選択される1以上を含む培地で培養することによっても、誘導される組織中のCD39陽性細胞の割合が増加する。

[0080] BMPシグナル伝達経路作用物質とは、BMPによって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若しくはBMP7等のBMPタンパク質、GDF7等のGDFタンパク質、抗BMP受容体抗体、又は、BMP部分ペプチド等が挙げられる。BMP2タンパク質、BMP4タンパク質及びBMP7タンパク質は例えばR&D Systems社から、GDF7タンパク

質は例えば和光純薬から入手可能である。

[0081] 工程（C）において用いられる培地は、例えば、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（好ましくは、無血清培地）が挙げられる。無血清培地、血清培地は上述の通り準備することができる。工程（C）において用いられる培地は、一例において、Wntシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。また、工程（C）において用いられる培地は、一例において、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を添加されていない培地である。また、工程（C）において用いられる培地は、Wntシグナル伝達経路作用物質が添加されていてもよい培地である。

[0082] BMPシグナル伝達経路作用物質の濃度は、網膜系細胞への分化を誘導可能な濃度であればよい。例えばヒトBMP4タンパク質の場合は、約0.01 nM～約1 μ M、好ましくは約0.1 nM～約100 nM、より好ましくは約1 nM～約10 nM、さらに好ましくは約1.5 nM（55 ng/mL）の濃度となるように培地に添加する。

[0083] BMPシグナル伝達経路作用物質は、工程（A）の浮遊培養開始から約24時間後以降に添加されていればよく、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～15日目までの間、より好ましくは1日目～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。

[0084] 具体的な態様として、例えば、工程（B）の浮遊培養開始後1～9日目、好ましくは1～3日目に、培地の一部又は全部をBMP4を含む培地に交換し、BMP4の終濃度を約1～10 nMに調製し、BMP4の存在下で例えば1～12日、好ましくは2～9日、さらに好ましくは2～5日間培養することができる。ここにおいて、BMP4の濃度を、同一濃度を維持すべく、1回若しくは2回程度培地の一部又は全部をBMP4を含む培地に交換する

ことができる。又はBMP4の濃度を段階的に減じることでもある。例えば、工程（B）の浮遊培養開始後2～10日目までBMPシグナル伝達経路作用物質（BMP4）の濃度を維持した後、工程（B）の浮遊培養開始後6～20日目まで段階的にBMPシグナル伝達経路作用物質（BMP4）の濃度を減じてよい。

[0085] 上記工程（A）～工程（C）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℃～約40℃、好ましくは約37℃である。またCO₂濃度は、例えば約1%～約10%、好ましくは約5%である。

[0086] 上記工程（C）における培養期間を変動させることによって、細胞凝集体に含まれる網膜系細胞として、様々な分化段階の網膜系細胞を製造することができる。すなわち、未成熟な網膜系細胞（例：網膜前駆細胞、視細胞前駆細胞）と成熟した網膜系細胞（例：視細胞）とを様々な割合で含む、細胞凝集体中の網膜系細胞を製造することができる。工程（C）の培養期間を延ばすことによって、成熟した網膜系細胞の割合を増やすことができる。

[0087] 上記工程（B）及び／又は工程（C）は、WO2017/183732に開示された方法を使用することもできる。すなわち、工程（B）及び／又は工程（C）において、Wntシグナル伝達経路阻害物質をさらに含む培地で浮遊培養し、細胞凝集体を形成することができる。

[0088] 工程（B）及び／又は工程（C）に用いる、Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、Wnt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、タンパク質、核酸、低分子化合物等のいずれであってもよい。Wntにより媒介されるシグナルは、Frizzled（Fz）及びLRP5/6（low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6）のヘテロ二量体として存在するWnt受容体を介して伝達される。Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Wnt又はWnt受容体に直接作用する物質（抗Wnt中和抗体、抗Wnt受容体中和抗体等）、Wnt又はWnt受容

体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）、*Wnt*受容体と*Wnt*の結合を阻害する物質（可溶型*Wnt*受容体、ドミナントネガティブ*Wnt*受容体等、*Wnt*アンタゴニスト、*Dkk1*、*Cerberus*タンパク質等）、*Wnt*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〔*CK1-7*（*N*-(2-アミノエチル)-5-クロロイソキノリン-8-スルホンアミド）、*D4476*（4-[4-(2,3-ジヒドロ-1,4-ベンゾジオキシ-6-イル)-5-(2-ピリジニル)-1*H*-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド）、*IWR-1-endo*（*IWR1e*）（4-[（3*aR*, 4*S*, 7*R*, 7*aS*）-1,3,3*a*,4,7,7*a*-ヘキサヒドロ-1,3-ジオキサ-4,7-メタノ-2*H*-イソインドール-2-イル]-*N*-8-キノリニル-ベンズアミド）、並びに、*IWP-2*（*N*-(6-メチル-2-ベンゾチアゾリル)-2-[(3,4,6,7-テトラヒドロ-4-オキサ-3-フェニルチエノ[3,2-*d*]ピリミジン-2-イル)チオ]アセタミド）等の低分子化合物等〕等が挙げられるが、これらに限定されない。*Wnt*シグナル伝達経路阻害物質として、これらを一種又は二種以上含んでもよい。*CK1-7*、*D4476*、*IWR-1-endo*（*IWR1e*）、*IWP-2*等は公知の*Wnt*シグナル伝達経路阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。*Wnt*シグナル伝達経路阻害物質として好ましくは*IWR1e*が用いられる。

[0089] 工程（B）における*Wnt*シグナル伝達経路阻害物質の濃度は、良好な細胞凝集体の形成を誘導可能な濃度であればよい。例えば*IWR-1-endo*の場合は、約0.1 μM から約100 μM 、好ましくは約0.3 μM から約30 μM 、より好ましくは約1 μM から約10 μM 、さらに好ましくは約3 μM の濃度となるように培地に添加する。*IWR-1-endo*以外の*Wnt*シグナル伝達経路阻害物質を用いる場合には、上記*IWR-1-endo*の濃度と同等の*Wnt*シグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

- [0090] 工程（Ｂ）において、W n tシグナル伝達経路阻害物質を培地に添加するタイミングは、早い方が好ましい。W n tシグナル伝達経路阻害物質は、工程（Ｂ）における浮遊培養開始から、通常６日以内、好ましくは３日以内、より好ましくは１日以内、より好ましくは１２時間以内、さらに好ましくは工程（Ｂ）における浮遊培養開始時に、培地に添加される。具体的には、例えば、W n tシグナル伝達経路阻害物質を添加した基礎培地の添加や、該基礎培地への一部若しくは全部の培地交換を行うことができる。工程（Ａ）で得られた細胞を、工程（Ｂ）においてW n tシグナル伝達経路阻害物質に作用させる期間は特に限定されないが、好ましくは、工程（Ｂ）における浮遊培養開始時に培地へ添加した後、工程（Ｂ）終了時（BMPシグナル伝達経路作用物質添加直前）まで作用させる。さらに好ましくは、後述する通り、工程（Ｂ）終了後（すなわち工程（Ｃ）の期間中）も、継続してW n tシグナル伝達経路阻害物質に曝露させる。一態様としては、後述する通り、工程（Ｂ）終了後（すなわち工程（Ｃ）の期間中）も、継続してW n tシグナル伝達経路阻害物質に作用させ、網膜組織が形成されるまで作用させてもよい。
- [0091] 工程（Ｃ）において、W n tシグナル伝達経路阻害物質としては、前述のW n tシグナル伝達経路阻害物質のいずれかを用いることができるが、好ましくは、工程（Ｂ）で用いたW n tシグナル伝達経路阻害物質と同一の種類のもを工程（Ｃ）において使用する。
- [0092] 工程（Ｃ）におけるW n tシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、網膜前駆細胞及び網膜組織を誘導可能な濃度であればよい。例えばIWR-1-endoの場合は、約0.1 μ Mから約100 μ M、好ましくは約0.3 μ Mから約30 μ M、より好ましくは約1 μ Mから約10 μ M、さらに好ましくは約3 μ Mの濃度となるように培地に添加する。IWR-1-endo以外のW n tシグナル伝達経路阻害物質を用いる場合には、上記IWR-1-endoの濃度と同等のW n tシグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。工程（Ｃ）の培地中のW n tシグナル伝達経路阻害物質

の濃度は、工程（Ｂ）の培地中のW n t シグナル伝達経路阻害物質の濃度を 1 0 0としたとき、好ましくは5 0～1 5 0、より好ましくは8 0～1 2 0、さらに好ましくは9 0～1 1 0であり、工程（Ｂ）の培地中のW n t シグナル伝達経路阻害物質の濃度と同等であることが、より好ましい。

[0093] W n t シグナル伝達経路阻害物質の培地への添加時期は、網膜系細胞若しくは網膜組織を含む凝集体形成を達成できる範囲で特に限定されないが、早ければ早い方が好ましい。好ましくは、工程（Ｃ）開始時にW n t シグナル伝達経路阻害物質が培地に添加される。より好ましくは、工程（Ｂ）においてW n t シグナル伝達経路阻害物質が添加された後、工程（Ｃ）においても継続して（即ち、工程（Ｂ）の開始時から）培地中に含まれる。さらに好ましくは、工程（Ｂ）の浮遊培養開始時にW n t シグナル伝達経路阻害物質が添加された後、工程（Ｃ）においても継続して培地中に含まれる。例えば、工程（Ｂ）で得られた培養物（W n t シグナル伝達経路阻害物質を含む培地中の凝集体の懸濁液）にB M P シグナル伝達作用物質（例、B M P 4）を添加すればよい。

[0094] W n t シグナル伝達経路阻害物質に作用させる期間は、特に限定されないが、好ましくは、工程（Ｂ）における浮遊培養開始時にW n t シグナル伝達経路阻害物質が添加される場合において、工程（Ｂ）における浮遊培養開始時を起算点として、2日間から3 0日間、より好ましくは6日間から2 0日間、8日間から1 8日間、1 0日間から1 8日間、又は1 0日間から1 7日間（例えば、1 0日間）である。別の態様において、W n t シグナル伝達経路阻害物質に作用させる期間は、工程（Ｂ）における浮遊培養開始時にW n t シグナル伝達経路阻害物質が添加される場合において、工程（Ｂ）における浮遊培養開始時を起算点として、好ましくは3日間から1 5日間（例えば、5日間、6日間、7日間）であり、より好ましくは6日間から1 0日間（例えば、6日間）である。

[0095] 上述した方法で得た細胞凝集体をW n t シグナル伝達経路作用物質、及び／又は、F G Fシグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地又は血清培地中

で2日間から4日間程度の期間培養（工程（D））後、Wntシグナル伝達経路作用物質及びFGFシグナル伝達経路阻害物質を含まない無血清培地又は血清培地中で30日間～200日間程度（30日間～150日間、50日間～120日間、60日間～90日間）培養する（工程（E））ことによって、毛様体周縁部様構造体を含む神経網膜を製造することもできる。

[0096] 一態様として、工程（A）～（C）で得られた細胞凝集体であって、工程（B）の浮遊培養開始後6～30日目、10～20日目（10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、15日目、16日目、17日目、18日目、19日目又は20日目）の細胞凝集体から、上記工程（D）及び工程（E）により、毛様体周縁部様構造体を含む神経網膜を製造できる。

[0097] Wntシグナル伝達経路作用物質としては、Wntによって媒介されるシグナル伝達を増強し得るものである限り特に限定されない。具体的なWntシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、GSK3 β 阻害剤（例えば、6-Bromoindirubin-3'-oxime（BIO）、CHIR99021、Kenpaulone）を挙げることができる。例えばCHIR99021の場合には、約0.1 μ M～約100 μ M、好ましくは約1 μ M～約30 μ Mの範囲を挙げることができる。

[0098] FGFシグナル伝達経路阻害物質としては、FGFによって媒介されるシグナル伝達を阻害できるものである限り特に限定されない。FGFシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、SU-5402、AZD4547、BGJ398等が挙げられる。例えばSU-5402の場合、約0.1 μ M～約100 μ M、好ましくは約1 μ M～約30 μ M、より好ましくは約5 μ Mの濃度で添加する。

[0099] 工程（D）において用いられる培地は、一例において、BMPシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、SHHシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。

- [0100] 上記工程（E）の一部又は全部の工程は、WO 2019/017492に開示された連続上皮組織維持用培地を用いて培養することができる。すなわち、連続上皮組織維持用培地を用いて培養することにより、神経網膜の連続上皮構造を維持することができる。一例として、Neurobasal培地（例：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、21103049）にB27サプリメント（例：サーモフィッシャーサイエンティフィック、12587010）を配合した培地を連続上皮組織維持用培地として挙げるることができる。
- [0101] 上記工程（E）における培養は、網膜系細胞（特に視細胞）の分化及び／又は成熟化と、連続上皮構造の維持を両立させるために、段階的に連続上皮組織維持用培地に交換することが好ましい。例えば、最初の10日間～30日間を細胞増殖用基礎培地（例：DMEM/F12培地に10%牛胎仔血清、1%N2 supplement、及び100μMタウリンが添加された培地）、次の10日間～40日間を細胞増殖用基礎培地と連続上皮組織維持用培地の混合培地（DMEM/F12培地に10%牛胎仔血清、1%N2 supplement、及び100μMタウリンが添加された培地と、Neurobasal培地に、10%牛胎仔血清、2%B27 supplement、2mM glutamine、及び100μMタウリンが添加された培地を1：3の比率で混合した培地）、次の20日間～140日間を連続上皮組織維持用培地（例：Neurobasal培地に、10%牛胎仔血清、2%B27 supplement、2mM glutamine、及び100μMタウリンが添加された培地）、を用いて培養することができる。
- [0102] 上記工程（E）の一部又は全部の工程において、細胞増殖用基礎培地、連続上皮組織維持用培地又はこれらの混合培地のいずれの培地を用いている場合であっても、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質をさらに含んでよい。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養することにより、神経網膜に含まれる双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞又は水平細胞等の割合が低く、かつ視細胞前駆細胞の割合を増大させた網膜系細胞の

凝集体の製造が可能となる。

- [0103] 本明細書において、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質とは、甲状腺ホルモンにより媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質であり、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路を増強し得るものであれば特に限定はない。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、トリヨードサイロニン（以下、T3と略することがある）、サイロキシシン（以下、T4と略することがある）、甲状腺ホルモン受容体（好ましくはTR β 受容体）アゴニスト等が挙げられる。
- [0104] また、当業者に周知の甲状腺ホルモン受容体アゴニストとして、国際公開第97/21993号パンフレット、国際公開第2004/066929号パンフレット、国際公開第2004/093799号、国際公開第2000/039077号パンフレット、国際公開第2001/098256号パンフレット、国際公開第2003/018515号パンフレット、国際公開第2003/084915号パンフレット、国際公開第2002/094319号パンフレット、国際公開第2003/064369号パンフレット、特開2002-053564号公報、特開2002-370978号公報、特開2000-256190号公報、国際公開第2007/132475号パンフレット、国際公開第2007/009913号パンフレット、国際公開第2003/094845号パンフレット、国際公開第2002/051805号パンフレット又は国際公開第2010/122980号パンフレットに記載のジフェニルメタン誘導体、ジアリールエーテル誘導体、ピリダジン誘導体、ピリジン誘導体若しくはインドール誘導体等の化合物を挙げることができる。
- [0105] 甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質としてT3を用いる場合には、例えば、0.1～1000 nMの範囲となるように培地に添加することができる。好ましくは、1～500 nM；より好ましくは10～100 nM；さらに好ましくは30～90 nM；さらにより好ましくは60 nM前後の濃度のT3に相当する甲状腺ホルモンシグナル伝達亢進活性を有する濃度が挙げ

られる。甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質としてT4を用いる場合には、例えば、1 nM～500 μ Mの範囲となるように培地に添加することができる。好ましくは、50 nM～50 μ M；より好ましくは500 nM～5 μ Mの範囲である。その他の甲状腺ホルモン受容体アゴニストを用いる場合、上述の濃度のT3又はT4が示すアゴニスト活性と同程度の活性を示す濃度であればよい。

[0106] 工程(E)において用いられる培地は、適宜、L-グルタミン、タウリン、血清などを含んでいてもよい。工程(E)において用いられる培地は、一例において、BMPシグナル伝達経路作用物質、FGFシグナル伝達経路阻害物質、Wntシグナル伝達経路作用物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、SHHシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上（好ましくは全部）を添加されていない培地である。

[0107] 具体的な一態様として、下記工程(A)～(E)を含む方法によって網膜系細胞の凝集体を調製することができる：

(A) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、未分化維持因子を含み、かつ任意でTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでもよい培地で培養する工程、

(B) 工程(A)で得られた細胞を、Wntシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含んでいてもよい培地中で浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

(C) 工程(B)で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに浮遊培養する工程、

(D) 工程(C)で得られた細胞凝集体を、Wntシグナル伝達経路作用物質、及び／又は、FGFシグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地又は血清培地中で2日間から4日間程度の期間培養する工程、及び、

(E) 工程(D)で得られた細胞凝集体を、Wntシグナル伝達経路作用物

質及びF G Fシグナル伝達経路阻害物質を含まず、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含んでいてもよい無血清培地又は血清培地中で30日間～200日間程度培養する工程。

[0108] 具体的な一態様として、下記工程(A')～(E')を含む方法によって網膜系細胞の凝集体を調製することができる：

(A') 多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、未分化維持因子を含み、かつTGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地で12時間～48時間培養する工程、

(B') 工程(A')で得られた細胞を、Wntシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地中で、12時間～72日間(24時間～48時間)浮遊培養することによって細胞凝集体を形成させる工程、

(C') 工程(B')で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地中でさらに8日間～15日間(10日間～13日間)浮遊培養する工程、

(D') 工程(C')で得られた細胞凝集体を、Wntシグナル伝達経路作用物質、及び／又は、F G Fシグナル伝達経路阻害物質を含む無血清培地又は血清培地中で2日間から4日間培養する工程、及び、

(E') 工程(D')で得られた細胞凝集体を、Wntシグナル伝達経路作用物質及びF G Fシグナル伝達経路阻害物質を含まず、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質を含んでいてもよい無血清培地又は血清培地中で10日間～200日間程度培養する工程。

[0109] ここで工程(E')は10日間～30日間細胞増殖用基礎培地で培養し、次いで10日間～40日間細胞増殖用基礎培地と甲状腺ホルモンシグナル伝達作用物質を含む連続上皮組織維持用培地の混合培地で培養し、さらに20日間～140日間甲状腺ホルモンシグナル伝達作用物質を含む連続上皮組織維持用培地で培養する工程を含んでいてもよい。

[0110] 一態様において、工程（E'）は、甲状腺ホルモンシグナル伝達経路作用物質の存在下に20日間～60日間（30日間～50日間）培養することを含む。

[0111] 一態様において、工程（B'）～工程（E'）までの培養期間は、70日間～100日間（80日間～90日間）である。

[0112] 出発細胞としての網膜系細胞を含む網膜組織の回収時期は、当該網膜組織中に網膜前駆細胞、神経網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含む時期であれば特に限定されない。当該網膜組織中に網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞を多く含む時期が好ましい。上述した方法において、例えば、浮遊培養開始後10日～100日後（好ましくは、9日～45日後）の網膜組織から、後述する通り出発細胞としての分散された網膜系細胞集団を調製すればよい。

[0113] （出発細胞としての神経系細胞集団の分化誘導方法）

本発明の製造方法の出発細胞としての多能性幹細胞由来の神経系細胞は、多能性幹細胞を分化誘導させることにより誘導することができる。多能性幹細胞の凝集体を浮遊培養により、神経系細胞又は神経組織に誘導する方法としては、多くの方法が報告されている。例えばW02005/123902、W02009/148170、W02008/035110、W02011/055855、W02016/063985、Cell Stem Cell, 3, 519-32 (2008)、Nature, 472, 51-56 (2011)、Cell Stem Cell, 10(6), 771-775 (2012)、Nature Biotechnology, 27(3), 275-80 (2009)、Proc Natl Acad Sci USA, 110(50), 20284-9 (2013)等に記載された方法が知られているが、これらに限定されない。このような種々の神経系細胞又は神経組織の誘導方法を、工程（B）で得られた凝集体に適用し、工程（B）で得られた凝集体を、適切な神経分化誘導条件下で培養することにより、神経系細胞もしくは神経組織を含む凝集体を製造することが出来る。

[0114] 本発明の製造方法の出発細胞としての神経細胞（例：大脳細胞（大脳組織））の製造方法の一例を下記に示す。

[0115] 下記工程（A' '）～（C' '）を含む、大脳組織の製造方法である：

(A'') 多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1) TGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2) 未分化維持因子を含む培地で培養する工程、

(B'') 工程(A'') で得られた細胞を浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる工程、及び

(C'') 工程(B'') で得られた凝集体を、分化誘導剤(例：BMPシグナル伝達経路作用物質)の非存在下、又は分化誘導剤(例：TGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はWntシグナル伝達経路阻害物質)の存在下に浮遊培養し、神経組織(大脳組織)を含む凝集体を得る工程。

[0116] 工程(A'') 及び(B'') は、上述した網膜組織の製造方法の工程(A) 及び(B)と同様に実施することができる。

[0117] 工程(C'') においては、分化誘導剤、例えばBMPシグナル伝達経路作用物質などの特定のシグナル伝達を活性化し、又は、阻害する物質を添加しない培地中で培養してもよい。工程(A'') 及び(B'') により当該細胞凝集体は神経に分化する運命にあるため、基礎培地中で培養することにより自発的に神経(例：大脳)に分化する。

[0118] 工程(C'') においては、分化誘導剤として、TGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質又はWntシグナル伝達経路阻害物質を単独で培地に添加してもよいが、両者を組み合わせる方が好ましい。工程(B'') からこれら分化誘導因子を加えてもよい。

[0119] 工程(B'') 及び(C'') に用いる、TGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質としては、TGFβシグナル伝達経路阻害物質、Nodal／Activinシグナル伝達経路阻害物質及びBMPシグナル伝達経路阻害物質を挙げることができる。これらの因子は上述した因子と同じである。TGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質は、好ましくは、SB431542、A-83-01又はLDN193189である。

[0120] 工程 (B'') 及び (C'') に用いる、Wnt シグナル伝達経路阻害物質としては、Wnt 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、蛋白質、核酸、低分子化合物等のいずれであってもよい。Wnt により媒介されるシグナルは、Frizzled (Fz) 及び LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) のヘテロ二量体として存在する Wnt 受容体を介して伝達される。Wnt シグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Wnt 又は Wnt 受容体に直接作用する物質 (抗 Wnt 抗体、抗 Wnt 受容体抗体等)、Wnt 又は Wnt 受容体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)、Wnt 受容体と Wnt の結合を阻害する物質 (可溶型 Wnt 受容体、ドミナントネガティブ Wnt 受容体等、Wnt アンタゴニスト、Dkk1、Cerberus 蛋白等)、Wnt 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 [CK1-7 (N-(2-アミノエチル)-5-クロロイソキノリン-8-スルホンアミド)、D4476 (4-[4-(2,3-ジヒドロ-1,4-ベンゾジオキシン-6-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド)、IWR-1-endo (IWR1e) (4-[(3aR, 4S, 7R, 7aS)-1,3,3a,4,7,7a-ヘキサヒドロ-1,3-ジオキソ-4,7-メタノ-2H-イソインドール-2-イル]-N-8-キノリニル-ベンズアミド)、並びに、IWP-2 (N-(6-メチル-2-ベンゾチアゾリル)-2-[(3,4,6,7-テトラヒドロ-4-オキソ-3-フェニルチエノ [3,2-d] ピリミジン-2-イル) チオ] アセタミド) 等の低分子化合物等] 等が挙げられるが、これらに限定されない。CK1-7、D4476、IWR-1-endo (IWR1e)、IWP-2 等は公知の Wnt シグナル伝達経路阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Wnt シグナル伝達経路阻害物質として好ましくは IWR1e が挙げられる。

[0121] Wnt シグナル伝達経路阻害物質の濃度は、多能性幹細胞の凝集体を形成

する細胞の脳細胞への分化を誘導可能な濃度であればよい。例えば $WR-1-end$ の場合は、約 $0.1 \mu M$ から約 $100 \mu M$ 、好ましくは約 $0.3 \mu M$ から約 $30 \mu M$ 、より好ましくは約 $1 \mu M$ から約 $10 \mu M$ 、更に好ましくは約 $3 \mu M$ の濃度となるように培地に添加する。 $WR-1-end$ 以外の Wnt シグナル伝達経路阻害物質を用いる場合には、上記 $WR-1$ の濃度と同等の Wnt シグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0122] かかる培養により、工程 (B') で得られた凝集体を形成する細胞から脳神経系前駆細胞への分化が誘導され、脳神経系前駆細胞を含む凝集体を得ることが出来る。脳神経系前駆細胞を含む凝集体が得られたことは、例えば、脳神経系前駆細胞のマーカーである $FoxG1$ 、 $Lhx2$ 、 $PAX6$ 、 $Emx2$ 等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。工程 (C') の実施態様の一つとして、工程 (B') で形成された凝集体を、 $FoxG1$ 遺伝子を発現する細胞が出現し始めるまでの間、無血清培地又は血清培地中で浮遊培養する工程、を挙げることができる。一態様において、凝集体に含まれる細胞の20%以上（好ましくは、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上）が、 $FoxG1$ を発現する状態となるまで、工程 (C') の培養が実施される。

[0123] 出発細胞としての神経系細胞を含む神経組織の回収時期は、当該神経組織（脳組織）中に神経系前駆細胞又は脳神経系前駆細胞を含む時期であれば特に限定されないが、当該組織中にこれらの細胞を多く含む時期が好ましい。上述した方法において、例えば、浮遊培養開始後10日～100日後（好ましくは、15日～40日後）の神経組織（脳組織）から、後述する通り出発細胞としての分散された神経系細胞集団を調製すればよい。

[0124] （分散された網膜系又は神経系細胞集団）

「分散」とは、細胞や組織を酵素処理や物理処理等の分散処理により、小さな細胞片又は細胞の集合体 (Cell clump)（2細胞以上100細胞以下、好ましくは50細胞以下、30細胞以下、20細胞以下、10細胞以下、5

細胞以下；例えば2～5個の細胞の集合体）又は単一細胞まで分離させることをいう。分散された細胞集団とは、細胞片若しくは細胞の集合体又は単一細胞を一定数集めたもののことをいう。「分散された網膜系細胞集団」とは、分散された状態の細胞集団を意味し、生体組織又は細胞凝集体等の細胞の集合体を分散することによって得ることができる。分散された網膜系細胞集団は、好ましくは、上記の網膜系細胞の凝集体を分散することによって得ることが好ましい。

- [0125] 一態様において、分散方法は、細胞を生きたままに分散できる方法であればよく、例えば機械的分散処理、細胞分散液処理、細胞保護剤添加処理が挙げられる。これらの処理を組み合わせてもよい。好ましくは、細胞分散液処理を行い、次いで機械的分散処理をするとよい。
- [0126] 機械的分散処理の方法としては、ピペッティング処理又はスクレーパーでの掻き取り操作が挙げられる。
- [0127] 細胞分散液処理に用いられる細胞分散液としては、例えば、トリプシン、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、プロナーゼ、DNase、パパイン等の酵素類や、エチレンジアミン四酢酸等のキレート剤のいずれかを含む溶液を挙げることができる。市販の細胞分散液、例えば、TrypLE Select (Life Technologies社製) や TrypLE Express (Life Technologies社製)、神経細胞分散液 (Fujifilm) を用いることもできる。
- [0128] 細胞を分散する際に、細胞保護剤で処理することにより、細胞の細胞死を抑制してもよい。細胞保護剤処理に用いられる細胞保護剤としては、FGFシグナル伝達経路作用物質、ヘパリン、IGFシグナル伝達経路作用物質、血清、又は血清代替物を挙げることができる。また、分散により誘導される細胞死（特に、ヒト多能性幹細胞の細胞死）を抑制するために、分散の際に、Rho-associated coiled-coil Containing Protein Kinase（「ROCK」又は「Rhoキナーゼ」）の阻害物質（ROCK阻害剤）又はMyosinの阻害物質を添加

してもよい。ROCK阻害剤としては、Y-27632、Fasudil (HA1077)、H-1152等を挙げることができる。Myosinの阻害物質としてはBlebbistatinを挙げることができる。好ましい細胞保護剤としては、ROCK阻害剤が挙げられる。

[0129] 分散された網膜系細胞集団（又は神経系細胞集団）は、単一細胞（single cell）を含み、例えば細胞集団の全細胞数に対して70%以上、好ましくは80%以上が単一細胞であり、また、2～50細胞の塊が細胞集団の全細胞数に対して30%以下、好ましくは20%以下存在する状態が挙げられる。分散された網膜系細胞集団（又は神経系細胞集団）において、細胞同士の接着（例えば面接着）がほとんどなくなっている。また、分散された網膜系細胞集団（又は神経系細胞集団）は、できるだけ単一細胞からなることより好ましく、このような分散された網膜系細胞集団（又は神経系細胞集団）は、分散処理後、単一細胞になっていない細胞の塊を除去することによって得ることができる。細胞の塊の除去方法は特に限定されないが、例えばメンブレンフィルター（セルストレーナー）による塊の除去等が挙げられる。一態様において、分散された細胞とは、細胞-細胞間結合（例えば、接着結合）がほとんどなくなった状態が挙げられる。

[0130] 網膜組織から出発細胞としての網膜系細胞集団を準備する場合、網膜色素上皮細胞などの不要な細胞が網膜組織に含まれる場合がある。例えば、生体から網膜組織を採取した場合や、上述した多能性幹細胞からの網膜組織の製造方法における工程（D）及び工程（E）を実施した場合などが挙げられる。この場合、網膜色素上皮細胞など不要な細胞が存在する領域を切り離した上で、網膜系細胞集団を分散させればよい。網膜色素上皮細胞の場合は、形態や色素により判別可能であり、当業者であれば容易に切除可能である。

[0131] 後述するWntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中での培養を開始する前に、後述の通り網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞の純度を高めるための工程（純化工程）を実施してもよく、さらに分散された網膜系細胞集団（又は神経系細胞集団）の維持・拡大培養を実施してもよい。培地は、網膜系

細胞（又は神経系細胞）が生存及び増殖可能な培地（DME M培地など）であれば特に限定されない。凍結融解した網膜系細胞集団を本発明の製造方法の出発細胞として用いることもできるため、分散された網膜系細胞集団を凍結保存しておくことも可能である。凍結保存液は特に問わず、市販の凍結保存液を用いることができる。

[0132] 〔網膜前駆細胞の純化〕

上述した分散された網膜系細胞集団を、W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地中での培養を開始する前に、分散された網膜系細胞集団に対し、網膜前駆細胞の割合（純度）、好ましくは神経網膜前駆細胞の割合（純度）を高める工程（純化工程）を実施してもよい。純化工程では、網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞で発現する特定のマーカーを用いたセルソーティング等の操作を実施してもよい。セルソーティングは、F A C SやM A C Sなどの周知技術を用いて実施することができる。網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞の純化工程を実施することにより、本明細書に記載の製造方法においてR P E細胞や目的外細胞の混入を減少させることが可能である。分散された網膜系細胞集団中に含まれる網膜前駆細胞の割合を高める工程によって、網膜色素上皮前駆細胞及び／又は網膜色素上皮細胞の生成が抑制される。網膜色素上皮前駆細胞及び／又は網膜色素上皮細胞の生成が抑制されたか否かは、分散された網膜系細胞集団を後述する培養方法により培養した後に、上述した網膜色素上皮細胞のマーカーや形態、性質等に基づき網膜色素上皮細胞が生成したか否かで判断すればよい。網膜色素上皮前駆細胞及び／又は網膜色素上皮細胞の生成が抑制されとは、上記培養後の全細胞数に対する網膜色素上皮細胞の割合が、網膜前駆細胞の割合を高める工程を実施しなかった場合と比較して、抑制されていればよい。段落0175に記載されている程度の網膜色素上皮細胞の割合であれば、網膜色素上皮前駆細胞及び／又は網膜色素上皮細胞の生成が抑制されたと判断できる。

[0133] 網膜前駆細胞の細胞のマーカー（ポジティブマーカー）として、R xやC h x 1 0などがよく知られている。しかしながら、これら遺伝子は細胞内で

発現しているため、例えば遺伝子組換え技術により当該遺伝子と蛍光タンパク質と連結した細胞、又は当該遺伝子を蛍光タンパク質で置き換えた細胞を用いるなどの工夫が必要である（例：Rx::Venus細胞）。そこで、網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞のポジティブマーカーの探索を行い、CD9（Genbank ID: NM_001769. 4、NM_001330312. 2）、CD24（Genbank ID: NM_001291737. 1、NM_001291738. 1、NM_001291739. 1、NM_001359084. 1、NM_013230. 3）、CD29（Genbank ID: NM_002211. 4、NM_033668. 2、NM_133376. 2）、CD39（Genbank ID: NM_001098175. 2、NM_001164178. 1、NM_001164179. 2、NM_001164181. 1、NM_001164182. 2、NM_001164183. 2、NM_001312654. 1、NM_001320916. 1、NM_001776. 6）、CD47（Genbank ID: NM_001777. 3、NM_198793. 2）、CD49b（Genbank ID: NM_002203. 4）、CD49c（Genbank ID: NM_002204. 4）、CD49f（Genbank ID: NM_000210. 4、NM_001079818. 3、NM_001316306. 2、NM_001365529. 2、NM_001365530. 2）、CD57（Genbank ID: NM_001367973. 1、NM_018644. 3、NM_054025. 3）、CD73（Genbank ID: NM_001204813. 1、NM_002526. 4）、CD82（Genbank ID: NM_001024844. 2、NM_002231. 4）、CD90（Genbank ID: NM_001311160. 2、NM_001311162. 2、NM_001372050. 1、NM_006288. 5）、CD164（Genbank ID: NM_001142401. 2、NM_001142402. 2、NM_001142403. 3、NM_001142

404. 2、NM_001346500. 2、NM_006016. 6)、CD200 (Genbank ID: NM_001004196. 3、NM_001318826. 1、NM_001318828. 1、NM_001318830. 1、NM_001365851. 2、NM_001365852. 1、NM_001365853. 1、NM_001365854. 1、NM_001365855. 1、NM_005944. 7)、CD340 (Genbank ID: NM_001005862. 2、NM_001289936. 1、NM_001289937. 1、NM_001289938. 1、NM_004448. 3) 及びCXCR4 (Genbank ID: NM_001008540. 2、NM_001348056. 2、NM_001348059. 2、NM_001348060. 2、NM_003467. 3) が、これらの細胞の細胞表面で発現していることを見出した。好ましい細胞表面マーカーとして、例えば、CD9、CD39、CD90及びCXCR4が挙げられる。一態様として、前記網膜前駆細胞を含む細胞集団を、CD9、CD39、CD90及びCXCR4からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質(例: 抗体、ペプチドなど)と接触させ陽性画分を分取する工程を含む、細胞集団における網膜前駆細胞の割合を向上させる方法を、上述したWntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中での培養を開始する前に実施してもよい。当該方法により、本明細書に記載の製造方法においてRPE細胞の混入を減少させることが可能である。

[0134] さらに、これらの細胞のネガティブマーカー、すなわちこれらの細胞での発現が認められないマーカーとして、SSEA1 (Genbank ID: NM_002033. 3)、CD66b (Genbank ID: NM_001816. 4)、CD69 (Genbank ID: NM_001781. 2) 及びCD84 (Genbank ID: NM_001184879. 2、NM_001184881. 2、NM_001184882. 1、NM_001330742. 2、NM_003874. 4) 等を見出した。上述したポジティブマーカーと組み合わせることにより、網膜前駆細胞及び／又

は神経網膜前駆細胞の純度をより高めることが可能である。一態様として、前記網膜前駆細胞を含む細胞集団を、CD 9、CD 3 9、CD 9 0及びCXCR 4 からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質（例：抗体）、好ましくはさらに、SSEA 1、CD 6 6 b、CD 6 9及びCD 8 4 からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質（例：抗体）と接触させ、前者のマーカーの陽性画分及び後者のマーカーの陰性画分を分取する工程を含む、細胞集団における網膜前駆細胞の割合を向上させる方法を、Wntシグナル伝達経路作用物質を含む培地中での培養を開始する前に実施してもよい。上記分散された網膜系細胞集団を、SSEA 1、CD 6 6 b、CD 6 9及びCD 8 4 からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質（例：抗体）と接触させ、これらのマーカーの陰性画分を分取する工程においては、当該抗原の発現量が基準値以下である細胞集団を得る工程である。ここで、基準値は、当業者が任意に設定することができる。例えば、蛍光標識したアイソタイプコントロール抗体を細胞集団に処理した場合の蛍光強度と同等の強さの蛍光標識した上記抗原に対する抗体を細胞集団に処理した細胞集団を得ることで、陰性の画分を分取することができる。

[0135] なお、上述したポジティブマーカー及びネガティブマーカーに結合する物質（例：抗体）を用いた、細胞集団における網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞の割合を向上させる方法は、本明細書に記載の製造方法の一工程としての方法に限定されない。細胞表面マーカーを用いた網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞の割合を向上させる方法は、例えば他の網膜組織の製造方法の一工程としても用いることができる。

[0136] 一態様において、分散された網膜系細胞集団において、網膜前駆細胞及び／又は神経網膜前駆細胞は、例えば全細胞数の30%以上を占めていてよく、全細胞数の50%以上を占めていることが好ましく、全細胞数の80%以上を占めていることがより好ましく、全細胞数の90%以上を占めることがさらに好ましい。さらに、例えば、分散された網膜系細胞集団において、CD 9、CD 3 9、CD 9 0及びCXCR 4 からなる群から選択される少なく

とも1つのマーカーが陽性であり、かつ、R x 及び／又はC h x 1 0陽性である細胞（網膜前駆細胞又は神経網膜前駆細胞）を、細胞集団の全細胞数に対して50%以上含み、好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、95%以上含む。さらに、上記細胞集団は、S S E A 1、C D 6 6 b、C D 6 9 及びC D 8 4 からなる群から選択される1以上、好ましくは2以上、3以上又は全部の抗原が陰性であることが好ましい。ここでいう陰性とは、上述した基準値以下であればよい。

[0137] 一実施形態において、網膜前駆細胞の割合を高める工程（純化工程）が、以下の工程を含む：

（1）多能性幹細胞をS h hシグナル伝達経路作用物質、A T P 及びA 2 A 受容体作用物質からなる群から選択される1以上の存在下で培養し、細胞凝集体を製造する工程、

（2）細胞凝集体を網膜前駆細胞へ分化誘導させる工程、

（3）細胞凝集体を分散させ、C D 3 9 に結合する物質（例：抗体）と接触させる工程。

工程（1）及び（2）の詳細は、「出発細胞としての網膜系細胞集団の分化誘導方法」に記載の通りである。

[0138] （分散された網膜系細胞集団又は神経系細胞集団の培養による層構造の再形成）

本発明に係る網膜組織の製造方法は、分散された網膜系細胞集団を、W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地中で接着培養又は浮遊培養することを含む。いずれの培養方法によっても、分散された網膜系細胞集団から上皮構造（多層構造）を再形成させることが可能である。上皮構造（又は多層構造）を有するシート状網膜組織を製造するためには、接着培養が好ましい。本発明に係る製造方法は、分散された神経系細胞集団を出発細胞としても同様に実施ことができる。以下、分散された網膜系細胞集団を出発細胞として用いた場合について記載するが、特別の記載がない限り、分散された神経系細胞集団を出発細胞とした場合でも同様である。

- [0139] 分散された網膜系細胞集団の培養に用いられる培地は、網膜系細胞が生存及び増殖可能な培地であれば特に限定されない。一態様において、分散された網膜系細胞集団の培養に用いられる培地としては、連続上皮組織維持用培地が挙げられる。一例として、Neurobasal培地（例：サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、21103049）にB27サプリメント（例：サーモフィッシャーサイエンティフィック、12587010）を配合した培地を連続上皮組織維持用培地として挙げることができる。
- [0140] 培地中に含まれるWntシグナル伝達経路作用物質としては、Wntによって媒介されるシグナル伝達を増強し得るものである限り特に限定されない。具体的なWntシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、GSK3 β 阻害剤（例えば、6-Bromoindirubin-3'-oxime（BIO）、CHIR99021、Kenpaulone、Wntタンパク質であるWnt2b、Wnt3a等、及びその部分ペプチド等を挙げることができ、1つの物質であってもよく、2つ以上の物質であってもよい。Wntシグナル伝達経路作用物質としては、好ましくはCHIR99021、BIO、Wnt2b及びWnt3aからなる群から選択される1以上の物質、2以上の物質、又は3以上の物質である。Wntシグナル伝達経路作用物質は、分散された網膜系細胞集団を再凝集化させる過程において、凝集体を大きくするとともに、頂端面／基底膜の極性を有する上皮構造（又は多層構造）を再形成させることができる。Wntシグナル伝達経路作用物質により、ロゼット様構造形成も抑制できる。
- [0141] Wntシグナル伝達経路作用物質の濃度は、所望の細胞凝集体の形成（例えば、上皮構造（又は多層構造）の再形成）を誘導可能な濃度であればよい。Wntシグナル伝達経路作用物質の濃度は、例えばCHIR99021を用いる場合には、0.01 μ M～100 μ Mであってよく、好ましくは0.1 μ M～10 μ M、より好ましくは1 μ M～10 μ Mである。その他のWntシグナル伝達経路作用物質を用いる場合には、上述した濃度のCHIR99021と同程度のWntシグナル活性化作用を示す濃度であればよい。W

n t シグナル活性化作用は、当業者であれば、例えば β -C a t e n i n の発現の確認等の方法により測定可能である。

[0142] W n t シグナル伝達経路作用物質を添加するタイミングは特に限定されないが、再シート化のための浮遊培養又は接着培養開始後できるだけ早い時期に添加する方が好ましい。一態様として、培養開始時からW n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養することが好ましい。W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地での培養日数は、頂端面／基底膜の極性を有する上皮構造（又は多層構造）を再形成させる効果が認められる範囲で特に限定されないが、例えば、1日間～14日間である。

[0143] 一態様において、培地は、R O C K 阻害剤、S H H（ソニック・ヘッジホッグ）シグナル伝達経路作用物質及び線維芽細胞増殖因子（F G F）シグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上の物質をさらに含んでよい。例えば、R O C K 阻害剤の添加によって、分散された網膜前駆細胞集団の再凝集化を促進する効果が認められ、S H Hシグナル伝達経路作用物質の添加によって、細胞凝集体の増殖を促進し、細胞凝集体を大きくする効果が認められ、F G Fシグナル伝達経路作用物質（例：F G F 2、F G F 8）添加によって、細胞のダメージを軽減し、またR P E細胞への分化誘導が抑制される効果が認められる。

[0144] R O C K 阻害剤とは、R h o キナーゼ（R O C K）の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632（例えば、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983(2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284(2000)参照）、F a s u d i l / H A 1 0 7 7（例えば、Uenata et al., Nature 389:990-994(1997)参照）、H-1152（例えば、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93:225-232(2002)参照）、W f - 5 3 6（例えば、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4):319-324(2003)参照）及びそれらの誘導体、ならびにR O C K に対するアンチセンス核酸、R N A 干渉誘導性核酸（例えば、s i R N A）、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクターが挙げられる。また、R O C K 阻害

剤としては他の低分子化合物も知られているので、本発明においてはこのような化合物又はそれらの誘導体も使用できる（例えば、米国特許出願公開第20050209261号、同第20050192304号、同第20040014755号、同第20040002508号、同第20040002507号、同第20030125344号、同第20030087919号、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照）。ROCK阻害剤は、1種又は2種以上のROCK阻害剤を使用することができる。ROCK阻害剤は、好ましくはY-27632、Fasudil（HA1077）、H-1152からなる群から選択される1以上の物質を含んでいる。

[0145] ROCK阻害剤の濃度は、当業者であれば実験条件に応じて適宜設定可能である。一態様として、分散された網膜前駆細胞集団の再凝集化を促進することが可能な濃度であればよい。例えばY-27632を用いる場合、0.1 μ M～1 mMであってよく、好ましくは1 μ M～100 μ M、より好ましくは5 μ M～20 μ Mである。Y-27632以外のROCK阻害剤を用いる場合には、上述した濃度のY-27632と同程度のROCK阻害作用を示す濃度であればよい。ROCK阻害作用は、当業者であれば、例えばMLC2のリン酸化の発現解析等の方法により測定可能である。

[0146] SHH（ソニック・ヘッジホッグ）シグナル伝達経路作用物質とは、SHH（Shhと記載することもある）によって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質（例えば、ShhやIhh）、SHH受容体、Shh受容体アゴニスト、PMA（Purmorphamine；9-シクロヘキシル-N-[4-(4-モルホリニル)フェニル]-2-(1-ナグタレニルオキシ)-9H-プリン-6-アミン）、又はSAG（Smoothened Agonist；N-メチル-N'-(3-ピリジニルベンジル)-N'-(3-クロロベンゾ[b]チオフェン-2-カル

ボニル) - 1, 4 - ジアミノシクロヘキサン) 等が挙げられる。Shhシグナル伝達経路作用物質として、これらを一種又は二種以上含んでもよい。Shhシグナル伝達経路作用物質は、好ましくはShh (Genbankアクセッション番号: NM_000193、NP_000184)、SAG又はPMAからなる群から選択される1以上の物質である。

[0147] SHHシグナル伝達経路作用物質の濃度は、当業者であれば実験条件に応じて適宜設定可能である。一態様として、細胞凝集体を大きくする効果が認められる範囲の濃度であればよい。例えば、SAGは、通常1~2000nM、好ましくは10~700nMの濃度で使用する。PMAは、通常0.002~20μM、好ましくは0.02~2μMの濃度で使用する。SHHは、通常4~500ng/mL、好ましくは10~200ng/mLで使用する。その他のSHHシグナル伝達経路作用物質を用いる場合には、上述した濃度のSAGと同程度のSHHシグナル活性化作用を示す濃度であればよい。SHHシグナル活性化作用は、当業者であれば、例えば下流のシグナル(SMOやGLI)の発現解析等の方法により測定可能である。

[0148] FGFシグナル伝達経路作用物質とは、FGFによって媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質である限り特に限定されない。FGFシグナル伝達経路作用物質として具体的には、線維芽細胞増殖因子(例えば、bFGF、FGF4、FGF8及びFGF9)が挙げられる。FGFシグナル伝達経路作用物質は、好ましくはFGF2、FGF4及びFGF8からなる群から選択される1以上の線維芽細胞増殖因子である。

[0149] FGFシグナル伝達経路作用物質の濃度は、当業者であれば実験条件に応じて適宜設定可能である。一態様として、RPE細胞への分化誘導が抑制される効果が認められる範囲の濃度であればよい。例えば、FGF2、4又は8を用いる場合、4~500ng/mL程度、好ましくは10~200ng/mL程度、より好ましくは25~100ng/mL程度である。その他のFGFシグナル伝達経路作用物質を用いる場合には、上述した濃度のFGF8等と同程度のFGFシグナル活性化作用を示す濃度であればよい。FGF

シグナル活性化作用は、当業者であれば、例えば下流のシグナル（Akt、MEK）の発現解析等の方法により測定可能である。

[0150] ROCK阻害剤、SHH（ソニック・ヘッジホッグ）シグナル伝達経路作用物質及び／又はFGFシグナル伝達経路作用物質を添加するタイミングは特に限定されないが、培養開始時からROCK阻害剤、SHH（ソニック・ヘッジホッグ）シグナル伝達経路作用物質及び／又はFGFシグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養することが好ましい。これらの物質は同時に培地に添加されることが好ましく、さらに、Wntシグナル伝達経路作用物質と同時に培地に添加されることが好ましい。一態様として、1日～14日間、これらの物質を含む培地において分散された網膜系細胞を培養すればよい。

[0151] 浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態で培養することであり、特に限定はされないが、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）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）、非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）又はリン脂質類似構造物（例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする水溶性ポリマー（Lipidure））によるコーティング処理した培養容器）を使用し行うことができる。

[0152] 浮遊培養は、例えば、分散された網膜系細胞を出発細胞として、SFEB（Serum-free Floating culture of Embryoid Bodies-like aggregates）法（WO2005/12390）やSFEBq法（WO2009/148170）を用いることにより行うことができる。

[0153] 接着培養とは、細胞を培養容器へ接着の状態で培養することであり、特に限定されないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理されている培養容器等を使用し行うことができる。接着培養は、細胞外マトリクス

及び／又は温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器等を用いて行われることが好ましい。一実施形態の網膜組織の製造方法として、温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器を、該温度感受性ポリマーの性質が変化する温度にさらすことにより、シート状網膜組織を該培養容器からはがす工程を含む。

[0154] 細胞外マトリクスでコーティングされた培養容器上で接着培養することにより、後述するシート状網膜組織を製造することができる。

[0155] 細胞外マトリクス存在下で培養することにより、細胞が基底膜側を認識することができるため、頂端面が形成されやすく、また、細胞が層方向に対して凡そ垂直方向に向き、より良好な層構造を有する網膜組織が得られる。温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器等を用いることにより、温度変化のみによって、形成された上皮構造（又は多層構造）を有する網膜組織を容易に培養容器等から剥がすことができ、酵素処理が不要であり、そのため酵素処理により細胞間の結合が弱くなることなく、丈夫なシート状の網膜組織を回収することができる。そのため、細胞外マトリクス及び／又は温度感受性ポリマー、特に細胞外マトリクス及び温度感受性ポリマーの両方によりコーティングされた培養容器等を用いることが好ましく、例えば、培養容器の培養面が、上記温度感受性ポリマーでコーティングされ、そのポリマーの上面が、上記細胞外マトリクスでコーティングされることが挙げられる。ここで、培養面とは、培養容器において、細胞が接着する面を指し、ポリマーの上面とは、ポリマーコーティングの培養面に接する面と反対の面を指す。

[0156] 細胞外マトリクスとは、細胞の外側の空間を構成する生体高分子を意味し、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等の細胞接着性タンパク質、コラーゲン、エラスチン等の線維性タンパク質、これらのタンパク質のフラグメント、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等のグルコサミノグリカン又はプロテオグリカン、マトリゲル等が挙げられる。細胞外マトリクスは、好ましくは、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル、ビト

ロネクチン及びこれらのタンパク質のフラグメントからなる群から選択される1以上の物質である。ラミニンフラグメントとして、例えば、iMatrix-511、iMatrix-411、iMatrix-221などの市販品が挙げられる。

[0157] マトリゲルは、Engelbreth Holm Swarn (EHS) マウス肉腫由来の基底膜調製物である。マトリゲルは、例えばUS Patent No. 4829000に開示された方法により調製することができ、市販のものを購入することもできる。マトリゲルの主成分はラミニン、I V型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン及びエンタクチンである。

[0158] 温度感受性ポリマーとは、温度の変化によりポリマーの性質が変化するポリマーである。すなわち、水中で下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution temperature, LCST) を有し、ある温度を境にそれより高い温度ではその分子内、或いは分子間の疎水結合が強まりポリマー鎖が凝集し、逆に、低い温度ではポリマー鎖が水分子を結合し水和する相転移挙動を示す。具体的には、例えば、培養温度 (約37℃) においては器材表面の疎水性の状態を保ち、培養温度よりも低い温度、例えば20～30℃程度においては器材表面が親水性に変化し、培養細胞がはがれやすくなる温度感受性ポリマーが挙げられる。従って、細胞剥離において酵素処理を必要とせず、酵素処理による細胞への細胞と細胞の間にあるタンパク質を壊さず一枚の大きなシートとしても回収することが可能である。このような温度感受性ポリマーとしては、例えばポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAM) (LCSTが32℃) 好ましく用いられる。通常細胞培養は約37℃の条件下で行われ、低温による細胞へのダメージも考慮すると、LCSTが約20℃～35℃の範囲の温度感受性ポリマーが好ましい。市販品として、温度感受性ポリマーが表面に固定された細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材 (セルシード社: UpCell (登録商標)) なども入手可能である。

[0159] 培養条件について、培養温度は、特に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO

₂濃度は、好ましくは約2～5%である。

[0160] シート状網膜組織における層構造の形成及び、特に頂端面/基底面（A p i c a l / B a s a l の極性）の形成には、W n t シグナル伝達経路作用物質が必要である。

[0161] W n t シグナル伝達経路作用物質の濃度は、層構造及び頂端面を有するシート状網膜組織を誘導可能な濃度であればよい。W n t シグナル伝達経路作用物質の濃度は、例えばC H I R 9 9 0 2 1 を用いる場合には、0. 0 1 μ M ~ 1 0 0 μ M であってよく、好ましくは0. 1 μ M ~ 1 0 μ M、より好ましくは1 μ M ~ 1 0 μ M である。その他のW n t シグナル伝達経路作用物質を用いる場合には、上述した濃度のC H I R 9 9 0 2 1 と同程度のW n t シグナル活性化作用を示す濃度であればよい。層構造が形成されているか否かは、当業者であれば、例えば顕微鏡での観察や、O C T 等の装置による厚みを計測することにより容易に判断することができる。頂端面が形成されているかどうかは、例えば抗Z o - 1 抗体や抗E z r i n 抗体、抗a t y p i c a l - P K C 抗体を用いて染色することにより確認することができる。

[0162] W n t シグナル伝達経路作用物質を添加するタイミングは特に限定されないが、接着培養開始後できるだけ早い時期に添加する方が好ましい。一態様として、培養開始時からW n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養することが好ましい。W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地での培養日数は、頂端面／基底膜の極性を有する多層構造（又は多層構造）を再形成させる効果が認められる範囲で特に限定されないが、例えば、1 日間～1 5 日間、好ましくは1 日間～9 日間である。

[0163] W n t シグナル伝達経路作用物質等を除いた培地で培養を継続してもよい。培養を継続することにより、層構造は厚くなり、網膜系細胞の分化は進む。培養期間は、特に限定されず、播種した分散された網膜系細胞集団が増殖し、少なくとも上皮構造（又は多層構造）が形成されるまでの期間であればよく、目的とする分化段階のシート状網膜組織が製造されるまで培養すればよい。上皮構造（又は多層構造）の形成の観点から培養は、少なくとも7 日

間行われることが望ましい。培養期間は例えば、7日間から60日間以下であってよく、40日間以下、30日間以下、20日間以下、16日間以下（例えば16日間）であってもよい。

[0164] 上皮構造（又は多層構造）が形成された後においても、細胞を増殖させ、分化又は成熟させるために、さらに培養を継続してもよい。更なる培養に用いる培地は、Wntシグナル伝達経路作用物質、ROCK阻害剤、SHH（ソニック・ヘッジホッグ）シグナル伝達経路作用物質及び／又はインテグリン伝達経路作用物質を含んでいても含まなくてもよい。

[0165] 「多層構造」とは、基底膜側と頂端側の極性を有する（すなわち上皮構造を有する）組織において、細胞が同一方向に並んでいる細胞層が2以上重ね合わせてできた構造であり、異なる層同士がそれぞれの表面の接線方向が凡そ平行している構造である。当該多層構造は、基底面及び頂端面の極性を有する方が好ましく、基底膜及び一態様において、多層構造を有する網膜組織が、シート状網膜組織であってよく、多層構造を有する網膜組織を含む細胞凝集体は、シート状細胞凝集体であってよい。また、一態様において、細胞層が神経網膜前駆細胞層、神経節細胞層、又は視細胞層であってよい。

[0166] 本発明の一態様では、多層構造において、細胞の向きが凡そ層方向に対して垂直方向になっていてよい。ここで、「細胞の向き」とは、核の形、細胞体の向きが、基底膜側と頂端側に伸びている方向性を示す。また、層方向に対して凡そ垂直方向とは、多層構造における層において一つ一つの細胞が接して並んでいる方向（すなわち、層の表面の接線方向）に直交する方向のことをいい、層に対して垂直方向又は縦方向のことをいう。

[0167] 本発明の一態様では、浮遊培養又は接着培養によって得られた上皮構造（又は多層構造）を有する網膜組織（特にシート状網膜組織）を、移植に必要な大きさに切り出す工程をさらに含んでもよい。例えば、ピンセット、ナイフ、ハサミ等を用いて切り出すことができる。

[0168] 一方、上述の方法でシート状網膜組織を製造した場合、一定の割合でRPE細胞が製造され混入するという課題を見出した。これらRPE細胞は目視

により確認することができ、除去することもできるが、品質や製造効率の観点で当初からR P E細胞は含まれない方が好ましい。そこで、当該課題を解決するために鋭意検討を行った結果、以下に開示する方法を用いることにより、R P E細胞の混入を大幅に減少させることが可能になった。

[0169] [シート状網膜組織]

本発明の一態様は、上皮構造を有するシート状網膜（神経網膜）組織である。該シート状網膜組織の一態様は、多層構造を有する網膜系細胞層からなり、当該多層構造が基底面及び頂端面の極性を有し、上記多層構造を有する網膜系細胞層が網膜前駆細胞、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含み、上記網膜系細胞層において、細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっている。ここで、「シート状」とは、少なくとも二次元の方向に生物学的結合を有する単一又は複数の細胞から構成される単層又は重層の構造体をいう。

[0170] 用いる培養器材に応じて、任意の大きさのシート状網膜組織を製造することができる点が、本発明の一つの利点である。すなわち、これまでに製造できなかった大きさのシート状網膜組織を製造することが可能であり、広い範囲に疾患が及ぶ場合に、1つのシートの移植により治療が可能となる。

[0171] 一態様において、本発明に係るシート状網膜組織の長径（直径ともいう）は、例えば2 mm以上、4 mm以上、5 mm以上、7.5 mm以上、10 mm以上である。一態様において、本発明に係るシート状網膜組織の短径は、例えば2 mm以上、3 mm以上、4 mm以上、5 mm以上である。原理上、長径及び短径に上限はないが、培養に用いるディッシュ等の大きさが限度になる。一態様として、長径は、10 cm以下、5 cm以下、4 cm以下、3 cm以下、2 cm以下、1 cm以下であってよい。一態様において、本発明に係るシート状網膜組織の高さは、例えば50 μ m～1500 μ mであってよく、好ましくは200 μ m～700 μ mである。

[0172] シート状網膜組織の長径、短径及び高さを測定する方法は、特に限定されず、例えば、顕微鏡下で撮像した画像から測定すればよい。例えば、シート

状網膜組織について、頂端面を対物レンズ側に向けた状態で撮像した正面画像と、切断面が対物レンズから見て垂直になるよう傾けた状態で撮像した横断面画像とを、実体顕微鏡で撮像し、撮像した画像から測定できる。ここで、長径とは、正面画像において、該シート断面上の2つの端点を結ぶ線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。短径とは、正面画像において、該シート断面上の2つの端点を結ぶ線分で長径と直交する線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。高さとは、該シート断面に直交する線分で、該シート断面との交点と網膜シートの頂点を端点とする線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。

[0173] 基底面及び頂端面は上述の定義に記載した通りである。「多層構造が基底面及び頂端面の極性を有し」とは、多層構造の一方に基底面が存在し、他方に頂端面が存在することを意味する。基底面上には、基底膜が存在しているもよい。

[0174] 「細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向」とは、網膜系細胞層の各層に存在する細胞の長径が、層方向に対し凡そ垂直方向を向いていることを意味する。凡そ垂直方向とは、層方向と細胞の長径がなす鋭角が、凡そ 75° （又は 80° ）以上 90° 以下である。本明細書において、各層に存在する細胞の約50%以上、好ましくは60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上が、層方向に対して凡そ垂直方向に向いていれば、「細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっている」と判断する。

[0175] シート状網膜組織はRPE細胞を含まない方が好ましい。一態様において、シート状網膜組織における総細胞数に対するRPE細胞数の割合は、10%以下、好ましくは9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下である。シート状網膜組織における総細胞数に対するRPE細胞数の割合は、例えば上述したRPE細胞のマーカーを発現する細胞の割合を、フローサイトメトリー（FACS）等を用いて測定することが可能である。一態様において、シート状網膜組織の総面

積における R P E 細胞の面積の占める割合は、10%以下、好ましくは9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下である。R P E 細胞は黒色を呈するため、シート状網膜組織の総面積における R P E 細胞の面積の占める割合は、顕微鏡下において黒色を示す面積の割合から算出することが可能である。また、R P E 細胞のマーカーを発現する細胞を、P C R 等によって検出することも可能である。なお、シート状網膜（神経網膜）組織における R P E 細胞の割合を減少させる方法は上述した通りである。

[0176] 一実施形態の多層構造を有する網膜系細胞層からなるシート状網膜組織は、

- 、
- （1）当該多層構造を有する網膜系細胞層が基底面及び頂端面の極性を有し、
- 、
- （2）上記多層構造を有する網膜系細胞層が、網膜前駆細胞、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含み、
- （3）上記網膜系細胞層の各層において、細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっており、かつ、
- （4）直径が8mm以上である。

[0177] （シート状網膜系細胞層（神経網膜）－網膜色素上皮細胞の複合体（複合シート））

本発明の一態様として、上記多層構造を有する網膜系細胞層が、上記網膜系細胞層に接合しているシート状網膜色素上皮細胞をさらに含んでもよく、上記網膜系細胞層と上記シート状網膜色素上皮細胞とはそれぞれの表面の接線方向が凡そ平行しており、上記網膜系細胞層の頂端面と上記シート状網膜色素上皮細胞の頂端面とが向き合っており、かつ、上記網膜系細胞層と上記シート状網膜色素上皮細胞とは両者の間に存在する接着因子により接合している複合体（複合シート）が挙げられる。シート状神経網膜は、神経網膜シート又はN Rシートともいい、シート状網膜色素上皮細胞は、網膜色素上皮細胞シート又はR P E 細胞シート（R P Eシート）ともいう。すなわち、本

発明の一態様は、神経網膜及びRPE細胞の複合体（複合シート）も提供する。本発明の別態様として、シート状網膜系細胞層（シート状神経網膜）の頂端面側に、分散された網膜色素上皮細胞が接着因子により接合した、複合体（複合シート）も挙げられる。

[0178] 本明細書の複合体において、神経網膜シートと網膜色素上皮細胞シートとは、それぞれ接線方向が凡そ平行している。「接線方向が凡そ平行している」とは、神経網膜と網膜色素上皮細胞シートの向かい合った面の接線方向が平行していることを意味する。また、本発明に係る複合体において、神経網膜の頂端面と網膜色素上皮細胞の頂端面とが向き合っている。すなわち、神経網膜の頂端面と網膜色素上皮細胞の頂端面とが近接した状態で存在する。

[0179] 神経網膜及びRPE細胞の複合体（複合シート）は、後述する通り、接着因子の存在下で、シート状網膜系細胞層（シート状神経網膜）とRPE細胞シート若しくは分散されたRPE細胞とを接合させることで準備することができる。シート状網膜系細胞層（シート状神経網膜）は、上述の上皮構造（又は多層構造）を有する網膜組織を含む細胞凝集体の製造方法によって製造することができる。RPE細胞シートは、後述の網膜色素上皮細胞シートの製造方法によって製造することができる。

[0180] （網膜色素上皮細胞シートの製造方法）

網膜色素上皮（RPE）細胞は、多能性幹細胞由来であり、具体的に多能性幹細胞を分化誘導することによって得ることができる。網膜色素上皮細胞を製造する方法は、WO2005/070011、WO2006/080952、WO2011/063005、WO2012/173207号、WO2015/053375号、WO2015/053376号、WO2015/068505号、WO2017/043605、Stem Cell Reports, 2(2), 205-218 (2014)及びCell Stem Cell, 10(6), 771-785 (2012)に開示されている方法が挙げられるが、特に限定されない。また、上述したWO2016/063985に記載の方法を改良することで網膜色素上皮（RPE

）細胞シートを調製することも可能である。網膜色素上皮細胞は、細胞シート又はスフェア状細胞凝集体として製造されてもよい。スフェア状細胞凝集体として製造された場合、例えば、ピンセット、ナイフ、ハサミ等を用いて細胞凝集体を切り開くことでRPE細胞シートを調製可能である。

[0181] WO2016/063985に記載の方法の改良法としては、上述した方法のうち、多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1) 分化誘導一日前にTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質で処理し、2) 分化誘導開始時にソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を処理しない条件で培養する。その後、上述した工程（B）及び（C）を行う。さらに、上記工程（D）の開始時期を早める方が好ましい。具体的には、工程（B）の浮遊培養開始9日前後（例：7日、8日、9日、10日、11日後）に工程（D）を開始する。その後、上述した工程（E）を実施すればよい。本方法により、スフェア状のRPE細胞の細胞凝集体が得られる。当該細胞凝集体を分散させて細胞懸濁液にしてもよいし、ピンセット、ナイフ、ハサミ等を用いて細胞凝集体を切り開くことでRPE細胞シートを調製することもできる。分散させた細胞懸濁液を接着培養で培養することにより、RPE細胞シートを調製することもできる。また、RPE細胞シート又はRPE細胞の凝集体の分散により、分散されたRPE細胞を得ることもできる。

[0182] 網膜色素上皮細胞シートは、神経網膜の細胞凝集体と接触させる前に、多角形又は敷石状の細胞形態を有するまでさらに培養してもよい。この場合の培地は、特に限定されないが、網膜色素上皮細胞の維持培地（以下、RPE維持培地と記載することもある。）に交換し、さらに培養することもできる。それにより、さらにはっきりとメラニン色素沈着細胞群や基底膜に接着する多角扁平状の形態を有する細胞群を観察することができる。RPE維持培地による培養は、網膜色素上皮細胞の性質が維持されたまま増殖するコロニーが形成される限り限定されないが、例えば3日に1回以上の頻度で全量培地交換を行いながら5日以上（例：5～20日間程度）培養を行う。当業者

であれば、当該形態を確認しながら、培養期間を容易に設定することができる。網膜色素上皮細胞の維持培地は、例えば I O V S, M a r c h 2 0 0 4, V o l. 4 5, N o. 3、M a s a t o s h i H a r u t a ら, I O V S, N o v e m b e r 2 0 1 1, V o l. 5 2, N o. 1 2、O k a m o t o ら, C e l l S c i e n c e 1 2 2 (1 7)、F u m i t a k a O s a k a d a ら, F e b r u a r y 2 0 0 8, V o l. 4 9, N o. 2、G a m m らに記載のものを使用することができる。

[0183] 網膜色素上皮細胞シートの長径はシート状網膜組織（神経網膜シート）の長径と同じであってもよい。一態様において、網膜色素上皮細胞シートの長径は、例えば 3 mm～5 0 mm、5 mm～3 0 mm、1 0 mm～2 0 mm などの範囲であってよい。

[0184] 網膜色素上皮細胞シートの短径はシート状網膜組織（神経網膜シート）の短径と同じであってもよい。一態様において、網膜色素上皮細胞シートの短径は、例えば 2 mm～4 0 mm、5 mm～3 0 mm、1 0 mm～2 0 mm などの範囲であってよい。

[0185] 網膜色素上皮細胞シートのメラニン色素沈着の程度は特に限定されない。網膜色素上皮細胞シート中に含まれる網膜色素上皮細胞におけるメラニン色素沈着の程度は、細胞間で同程度である方が好ましい。一態様として、網膜色素上皮細胞シートの平均メラニン含有量は、2 0 p g / 細胞未満、1 5 p g / 細胞未満、1 0 p g / 細胞未満、8 p g / 細胞未満、7 p g / 細胞未満、6 p g / 細胞未満、5 p g / 細胞未満、4 p g / 細胞未満、3 p g / 細胞未満、2 p g / 細胞未満、1 p g / 細胞未満であってよい。また、網膜色素上皮細胞シートの平均メラニン含有量は、0. 1 p g / 細胞以上、0. 5 p g / 細胞以上、1 p g / 細胞以上、2 p g / 細胞以上、5 p g / 細胞以上であってもよい。

[0186] 網膜色素上皮細胞シート中のメラニン含有量は、例えば、網膜色素上皮細胞シートを分散させた後、N a O H などを用いて抽出した細胞抽出物を用いて、分光光度計等を用いて測定することができる。平均メラニン含有量は、

メラニン含有量を網膜色素上皮細胞シートに含まれる総細胞数で除することにより求めることができる。

[0187] 上述の複合体は、神経網膜シートと分散されたRPE細胞又はRPE細胞シートを接合させることによって製造することができる。神経網膜シートとRPE細胞シートを接合させた複合シートの方が好ましい。上述の神経網膜シート及びRPE細胞シートは、ピンセット、ナイフ、ハサミ等を用いることにより、培養器材より容易に取り出すことができる。取り出した両シートを新たな容器（培養器材など）に移してもよいが、一方を培養器材中に残したまま、別の一方を当該培養器材中に移してもよい。同じ大きさの培養器材で製造することにより、接合させるシート状組織の大きさを揃えることができる。また、接触させる神経網膜シート及び網膜色素上皮細胞について、上述の製造方法における異なる培養日数の神経網膜シート及び網膜色素上皮細胞を用いる場合、製造を開始する日をずらせばよい。

[0188] 上述の神経網膜シート及び網膜色素上皮細胞は、接着因子の存在下で接触させることが好ましい。接着因子とは、細胞同士を接着させる作用を有している物質を意味し、特に限定はないが、例えば、上述した細胞外マトリクスや人工的なハイドロゲル等が挙げられる。接着因子は、単離された単一の物質である必要はなく、例えばマトリゲル、視細胞間マトリクス、血清等の生体や細胞からの調製物も含まれる。マトリゲルは、Engelbreth Holm Swarn (EHS) マウス肉腫由来の基底膜調製物である。マトリゲルは、例えばUS patent No. 4829000に開示された方法により調製することができ、市販のものを購入することもできる。マトリゲルの主成分はラミニン、ⅠⅤ型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン及びエンタクチンである。視細胞間マトリクスは、生体網膜における視細胞等の網膜系細胞の間に存在する細胞外マトリクスの総称であり、例えばヒアルロン酸が含まれる。視細胞間マトリクスは、当業者であれば、例えば網膜を蒸留水中に置き、膨張させて分離するという方法により、生体網膜から採取することが可能であり、市販のものを購入することもできる。接着

因子としては、細胞外マトリクス又はハイドロゲルであることが好ましい。さらに、細胞外マトリクスとして、ヒアルロン酸、フィブリン、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、エンタクチンからなる群から選択される１又は複数の細胞外マトリクスであることが好ましい。ハイドロゲルとして、ゼラチン、フィブリン、コラーゲン、ペクチン、ヒアルロン酸、アルギン酸からなる群から選択される１又は複数のハイドロゲルであることが好ましい。細胞外マトリクス及びハイドロゲルのどちらにも分類される物質が存在するが、本明細書においては、ゲル状の接着因子として用いる場合には、ハイドロゲルとして扱う。市販の細胞外マトリクスとしては、Corning（登録商標）マトリゲル基底膜マトリックス、iMat r i x 5 1 1 等が挙げられる。接着因子としては、ゼラチン、フィブリン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、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及びエンタクチンから選択される１以上の物質であってよく、特に、ゼラチン又はフィブリンであることが好ましい。

[0189] フィブリンゲルとは、フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液とを反応させることで得られるゲル状フィブリンである。市販のボルヒール（登録商標）組織接着用を使用することもできる。フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を接触又は混合させることで、両者を反応させることができる。

[0190] 「ゼラチン」とは、水に不溶性のコラーゲンを、例えば酸あるいはアルカリで前処理し、熱加水分解するなどにより可溶化したものである。市販のゼラチンを入手することも可能であり、例えば、ゼラチンLS-H（新田ゼラチン（株）、豚皮アルカリ処理ゼラチン、非加熱処理ゼラチン、高ゼリー強度）、ゼラチンLS-W（新田ゼラチン（株）、豚皮アルカリ処理ゼラチン、加熱処理ゼラチン、低ゼリー強度）が挙げられる。アルカリ処理（石灰処理）ゼラチン（Bタイプゼラチン）が好ましく、加熱処理ゼラチンが好ましい。

[0191] ハイドロゲルは、加熱又は冷却によって、溶液がゲルからゾル、ゾルからゲルに相変化する。ハイドロゲルは、冷却して流動性を失うことでゲル（ゼ

リー）化し、加熱して流動性を獲得することによりゾル（水溶液）化する。ここで、「融解点」とは、一定圧力のもとで、ゾル化する温度を意味し、「凝固点」とは、一定圧力のもとで、ゲル化する温度を意味する。ハイドロゲルは、生体で分解される方が好ましい。一態様として、融解点が体温付近の温度（ $25^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ ）のハイドロゲル（例：ゼラチン）が好ましい。本明細書におけるハイドロゲルは、融解点が $20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ （例： $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、 $35^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ ）であってもよい。一般に、ゲルの融点は、ネットワークの強さの尺度であり、ハイドロゲルの濃度及び分子量の上昇に伴い、ハイドロゲル（例：ゼラチン）の融解点は上昇する。また、例えば、糖類により固形分を増加させると融解点及び凝固点は上昇する傾向にある。このように、一定の範囲で融解点及び凝固点を変動させることが可能である。ハイドロゲルの融解点の測定方法は、特に限定されず、例えば、JIS K 6503に定められた方法によって測定できる。

[0192] ハイドロゲルの強度は、移植のための操作においてハイドロゲルが崩れない程度であればよい。ハイドロゲルの強度の指標として「ゼリー強度」がある。ハイドロゲルの「ゼリー強度」とは、ゲルを形成した物体の機械的強度を意味する。通常一定形状のゲルを変形させるのに要する力又はゲルを破断させるのに要する力（単位： g 、 $\text{dyne (s)}/\text{cm}^2$ 又は g/cm^2 ）で表現され、主としてゲルの硬さの尺度である。なお、1ダイン（ dyne (s) ）は、質量1グラム（ g ）の物体に働くとき、その方向に1センチメートル毎秒毎秒（ cm/s^2 ）の加速度を与える力と定義される。例えば、ゼラチンのゼリー強度は、JIS K 6503に定められた方法において測定することができる。本明細書において、例えば、ハイドロゲル（例：ゼラチン）ゲルのゼリー強度は、 50 g 以上、 100 g 以上、 200 g 以上、 500 g 以上、 1000 g 以上、 1200 g 以上、 1300 g 以上、 1400 g 以上又は 1500 g 以上であってよい。また、ハイドロゲル（ゼラチン）のゼリー強度は、 3000 g 以下、 2500 g 以下又は 2000 g 以下であってよい。

- [0193] 接着因子（細胞外マトリクス）の濃度は、神経網膜シート若しくは網膜色素上皮細胞シートの大きさや網膜色素上皮細胞の細胞数により異なるが、当業者であればRPE細胞の接着の状態を確認することにより容易に設定可能である。例えば、Matrigelであれば、既製品（Corning社）を200～10000倍希釈した濃度、iMatrix511であれば、0.1～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加するのが好ましい。
- [0194] 細胞外マトリクスを用いた上記複合体の製造方法の一態様として、接着因子（細胞外マトリクス）を含む媒体中で、神経網膜シートと網膜色素上皮細胞又は網膜色素上皮細胞シートとを接着させるための培養を行えばよい。使用する媒体としては、特に限定されないが、例えば、網膜色素上皮細胞又は神経網膜の培養に用いられる培地（例：DMEM/F12培地、Neurobasal培地、これらの混合培地、RPE維持培地等）が挙げられる。また、細胞外マトリクスと共に、EGF等の成長因子等の他の成分の存在下で接着のための培養を行ってもよい。上述した神経網膜シートと網膜色素上皮細胞又は網膜色素上皮細胞シートとを接着させるための培養期間中、継続して接着因子を含む上記媒体中で培養してもよいし、接着因子を含む上記媒体中で一定期間（例：1日～10日間）培養後、接着因子を含まない媒体に交換して培養を継続してもよい。
- [0195] 神経網膜シートと網膜色素上皮細胞又は網膜色素上皮細胞シートを接着させるための培養を行う前に、神経網膜シート又は網膜色素上皮細胞若しくは網膜色素上皮細胞シートを接着因子でコーティングしてもよい。具体的には、接着因子を含む上記媒体中で、神経網膜シート又は網膜色素上皮細胞若しくは網膜色素上皮細胞シートを培養すればよい。当業者であれば培養時間は適宜設定可能であるが、10分～5時間（例えば、10分～60分）程度培養すればよい。培養後、PBS等の媒体により洗浄してもよい。
- [0196] 接着因子、ハイドロゲルもしくはマトリクスゲルは好ましくはフィブリンゲルである。フィブリンゲルとは、フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液とを反応させることで得られるゲル状フィブリンである。本明細書において

、反応によってゲルを形成する性質の物質をマトリクス前駆体といい、例えば、反応することによってフィブリンゲルを形成するトロンビン及びフィブリノーゲンはマトリクス前駆体の一例である。フィブリノーゲン溶液は、フィブリノーゲン粉末などを、アプロチニンを含むフィブリノーゲンを溶解できる溶解液に溶解させることで作製でき、その濃度は特に限定されないが、例えば40～480 mg/mL、好ましくは、80 mg/mL～320 mg/mL（例：160 mg/mL）である。また、正常人血漿1 mL中に含まれる血液凝固第Ⅴ因子活性を1単位とした時、37.5単位/mL～225単位/mL（例：75単位/mL）であってよい。トロンビン溶液は、トロンビン粉末などを、塩化カルシウム水和物を含むトロンビン溶解液に溶解させることで作製でき、その濃度は特に限定されないが、例えば125単位/mL～750単位/mL（例：75単位/mL）である。フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を接触又は混合させることで、両者を反応させることができ、その際、フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を活性比で、1：1～1：9、好ましくは1：3～1：4の範囲で使用されることが好ましい。

[0197] ハイドロゲルを用いた上記複合体の製造方法の一態様として、フィブリンゲルを用いた複合体の製造方法を下記に示す。具体的には、フィブリノーゲン及びトロンビンを反応させることによって生成するフィブリンゲルにより、神経網膜シートと網膜色素上皮細胞又は網膜色素上皮細胞シートを接着させる。

[0198] 一態様において、上記の2つの組織のうち、フィブリノーゲン溶液を接触させた1の組織（神経網膜又は網膜色素上皮細胞）、及び、トロンビン溶液に接触させた他の1の組織（網膜色素上皮細胞又は神経網膜）を、互いに接触させることでフィブリノーゲン及びトロンビンを反応させて、ゲル化させてもよい。ここで溶液との接触とは、少なくとも組織の接着面（フィブリンゲルによって他の組織と接着する際、他の組織に向いている面）をフィブリノーゲン溶液又はトロンビン溶液に、溶液によって組織の接着面に付着する

程度に触れさせることをいう。

[0199] より具体的には、例えば、神経網膜シートと網膜色素上皮細胞シートとを接着させる場合、神経網膜シートをフィブリノーゲン溶液に浸し、網膜色素上皮細胞シートをトロンビン溶液に浸していればよい（溶液は逆でもよい）。フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液を、容量比で、3 : 1 ~ 1 : 3 の範囲で使用されることが好ましい。接着させる前に、組織に付着した余分のフィブリノーゲン又はトロンビンを取り除いてもよい。この操作によってフィブリンゲルの厚さを調整することができる。

[0200] フィブリノーゲン溶液を接触させた神経網膜シートと、トロンビン溶液に接触させた網膜色素上皮細胞シートとを接着させるために、両者を接触させればよい。ここで組織を接触させるとは、フィブリノーゲン溶液が付着した面と、トロンビン溶液が付着した面とを接触させる、すなわち、重ね合わせることをいう。また、網膜色素上皮細胞シート及び神経網膜が、それぞれの表面の接線方向が凡そ平行となり、かつ、神経網膜の頂端面と網膜色素上皮細胞シートの頂端面とが向き合うように、両者を接着させることが好ましい。

[0201] 一態様において、上記の組織をフィブリノーゲン溶液に接触させ、続いてトロンビン溶液をフィブリノーゲン溶液に添加することでフィブリノーゲン及びトロンビンを反応させてもよい。この場合、上記の組織がフィブリンゲルに包埋される。

[0202] 一態様において、本発明の製造方法は、複合体から、移植に必要な大きさの複合体を切り出す工程をさらに含んでもよい。フィブリンゲルによって2以上の組織が強固に接着されているため、複合体から移植片を切り出す際に、複合体から組織が剥がれることなく、容易に所望のサイズに切り出すことができる。切り出す際は、ピンセット、ナイフ、ハサミ等を用いることが可能である。

[0203] [医薬組成物、治療方法、治療薬及び使用]

本発明の一態様として、シート状網膜組織を含む医薬組成物が挙げられる

。医薬組成物は好ましくは、本発明のシート状網膜組織の他にさらに医薬として許容される担体を含む。医薬組成物は、神経網膜系細胞若しくは神経網膜の障害又は神経網膜の損傷に基づく疾患の治療に使用し得る。神経網膜系細胞若しくは神経網膜の障害に基づく疾患としては、例えば、網膜変性疾患、黄斑変性症、加齢黄斑変性、網膜色素変性、緑内障、角膜疾患、網膜剥離、中心性漿液性網脈絡膜症、錐体ジストロフィー、錐体桿体ジストロフィー等の眼科疾患が挙げられる。神経網膜の損傷状態としては、例えば、視細胞が変性死している状態等が挙げられる。

[0204] 医薬として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。必要に応じて、医薬組成物には、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、等張化剤等を配合させてもよい。

[0205] 本発明の一態様として、本発明で得られるシート状網膜組織を含む、神経網膜の障害に基づく疾患の治療薬を提供する。また、本発明の一態様として、本発明で得られるシート状網膜組織を、移植を必要とする対象（例えば、眼科疾患が起きている眼の網膜下）に移植することを含む、神経網膜系細胞若しくは神経網膜の障害又は神経網膜の損傷に基づく疾患を治療する方法が挙げられる。神経網膜の障害に基づく疾患の治療薬として、又は、当該神経網膜の損傷状態において、該当する損傷部位を補充するために、本発明のシート状網膜組織を用いることができる。移植を必要とする、神経網膜系細胞若しくは神経網膜の障害に基づく疾患を有する患者、又は神経網膜の損傷状態の患者に、本発明のシート状網膜組織を移植し、当該神経網膜系細胞又は、障害を受けた神経網膜を補充することによって、神経網膜系細胞若しくは神経網膜の障害に基づく疾患、又は神経網膜の損傷状態を治療することができる。移植方法としては、例えば、眼球の切開などにより損傷部位の網膜下にシート状網膜組織を移植する方法が挙げられる。移植する方法としては、例えば細い管を用いて注入する方法やピンセットで挟んで移植する方法が挙げられ、細い管としては注射針等が挙げられる。

[0206] 本発明の一態様として、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療に使用するための、本発明で得られるシート状網膜組織を提供する。また、本発明の一態様として、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の治療薬の製造における、本発明で得られるシート状網膜組織の使用を提供する。

実施例

[0207] 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。

[0208] <実施例 1 凝集体再形成因子の探索>

Rx : : Venus レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト ES 細胞 (Khes-1 株 (非特許文献 3))、及びヒト iPS 細胞 (1231A3 株、京都大学より入手) を、「Scientific Reports, 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として Laminin 511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0209] 具体的なヒト ES 及びヒト iPS 細胞 (ヒト ES/iPS 細胞) の維持培養操作は、以下のように行った。まず、サブコンフレント (培養面積の 6 割が細胞に覆われる程度) になったヒト ES/iPS 細胞を、PBS にて洗浄後、TrypLE Select (商品名、Life Technologies 社製) を用いて単一細胞へ分散した。なお、ここで、単一細胞への分散とは、単一細胞となるように分散することであり、単一細胞に分散された細胞集団は、単一細胞のほか、2~50 個の細胞の塊を含み得る。その後、単一細胞へ分散されたヒト ES 細胞を、Laminin 511-E8 にてコートしたプラスチック培養ディッシュに播種し、Y-27632 (ROCK 阻害剤、10 μ M) 存在下、StemFit 培地にてフィーダーフリー条件下で培養した。上記プラスチック培養ディッシュとして、6 ウェルプレート (イワキ社製、細胞培養用、培養面積 9.4 cm²) を用いた場合、上記単一

細胞へ分散されたヒトES/iPS細胞の播種細胞数は1ウェルあたり $0.4 \sim 1.2 \times 10^4$ 細胞とした。播種した1日後に、Y-27632を含まないStemFit培地に交換した。以降、1～2日に1回Y-27632を含まないStemFit培地にて培地交換した。その後、サブコンフレントに達する1日前までフィーダーフリー条件下で培養した。当該サブコンフレント1日前のヒトES細胞を、SB431542 (TGF β シグナル伝達経路阻害物質、 $5 \mu\text{M}$) 及びSAG (Shhシグナル伝達経路作用物質、 300 nM) の存在下 (Precondition処理) で、1日間フィーダーフリー条件下で培養した。

[0210] ヒトES/iPS細胞を、PBSにて洗浄後、TrypLE Selectを用いて細胞分散液処理し、さらにピペティング操作によって単一細胞に分散した後、単一細胞に分散されたヒトES細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート (商品名: PrimeSurface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製) の1ウェルあたり 1.2×10^4 細胞になるように $100 \mu\text{L}$ の無血清培地に浮遊させ、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で浮遊培養した。その際の無血清培地 (gfCDM+KSR) には、F-12培地とIMDM培地との1:1混合液に $10\% \text{ KSR}$ 、 $450 \mu\text{M}$ 1-モノチオグリセロール、 $1 \times \text{Chemically defined lipid concentrate}$ を添加した無血清培地を用いた。

[0211] 浮遊培養開始時 (分化誘導開始時、0日目) に、上記無血清培地にY-27632 (ROCK阻害剤、終濃度 $10 \mu\text{M}$ 又は $20 \mu\text{M}$) 及びSAG (Shhシグナル伝達経路作用物質、 300 nM 又は 30 nM 、又は 0 nM) を添加した。浮遊培養開始後3日目に、Y-27632及びSAGを含まず、外来性のヒト組み換えBMP4 (商品名: Recombinant Human BMP-4、R&D Systems社製) を終濃度 1.5 nM で含む培地を $50 \mu\text{L}$ 用いた。浮遊培養開始後6日目以降、3日に1回Y-27632及びSAG及びヒト組み換えBMP4を含まない培地で半量交換した。

- [0212] K h E S - 1 由来の細胞凝集体については、さらに当該浮遊培養開始後 1 4 日目から 1 8 日目の凝集体を、9 0 m m の低接着培養皿（浮遊培養用シャーレ 9 0 Φ（深型）、住友ベークライト社製）に移し、W n t シグナル伝達経路作用物質（C H I R 9 9 0 2 1、3 μ M）及び F G F シグナル伝達経路阻害物質（S U 5 4 0 2、5 μ M）を含む無血清培地（D M E M / F 1 2 培地に 1 % N 2 S u p p l e m e n t が添加された培地）で 3 7 ° C、5 % C O ₂ で、3 ~ 4 日間培養した。その後、9 0 m m の低接着培養皿（浮遊培養用シャーレ 9 0 Φ（深型）、住友ベークライト社製）にて、W n t シグナル伝達経路作用物質及び F G F シグナル伝達経路阻害物質を含まない血清培地（N u c T O 培地）で長期培養した。
- [0213] 浮遊培養開始後 1 6 日目（1 2 3 1 A 3 由来）又は 2 7 日目（K h E S - 1 由来）の凝集体を P B S にて洗浄し、神経細胞分散液（W a k o 社製）を添加した。3 7 ° C で 2 0 ~ 3 0 分間インキュベート後、ピペッティングにより単一細胞へ分散した。これらの細胞を非細胞接着性の 9 6 ウェル培養プレート（商品名：P r i m e S u r f a c e 9 6 ウェル V 底プレート、住友ベークライト社製）の 1 ウェルあたり 2×10^5 細胞（K h E S - 1 由来）又は 5×10^5 細胞（1 2 3 1 A 3 由来）になるように 1 0 0 μ L の無血清培地に浮遊させ、3 7 ° C、5 % C O ₂ で浮遊培養した。細胞添加と同時に、（1）添加無し（c o n t r o l）、（2）1 0 μ M 又は 2 0 μ M（1 2 3 1 A 3 由来） Y - 2 7 6 3 2（W a k o 社）、（3）3 0 0 n M S A G（E n z o 社）、（4）1 0 μ g / m L b F G F（W a k o 社）、（5）1 μ M L D N 1 9 3 1 8 9（S t e m g e n t 社）、（6）3 μ M C H I R 9 9 0 2 1（W a k o 社）、（7）1 0 μ M S B 4 3 1 5 4 2（W a k o 社）、（8）3 μ M I W R - 1（W a k o 社）をそれぞれ添加した。
- [0214] （1）～（8）のいずれの条件においても 2 週間程度培養すると凝集体が再形成されることが確認されたが（実施例 3 の結果を参照）、Y - 2 7 6 3 2 を添加した場合、凝集体の再形成のための浮遊培養後 1 ~ 2 日目（D a y 1 ~ D a y 2）から凝集体が再形成されていることが確認された（図 1 : K h

ES-1、図2:1231A3)。一方で、Y-27632以外の化合物では、早期の凝集体の再形成促進効果は認められなかった（図1及び図2）。よって、単一細胞に分散された網膜前駆細胞において、Y-27632を添加することで、早期から凝集体の再形成を促進することがわかった。

[0215] <実施例2 層構造形成促進因子及び凝集体増殖促進因子の探索>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KhES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports, 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0216] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後20日目（1231A3）及び27日目（KhES-1）の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。これらの細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート（商品名：PrimeSurface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製）の1ウェルあたり $2\sim 5\times 10^5$ 細胞になるように $10\mu\text{M}$ Y-27632（Wako社）を含む $100\mu\text{L}$ の無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。細胞添加と同時に、（1）添加無し（ $10\mu\text{M}$ Y-27632のみ）、（2）30nM SAG（Enzo社）、（3）300nM SAG（Enzo社）、（4）10ng/mL bFGF（Wako社）、（5） $1\mu\text{M}$ LDN193189（Stemgent社）、（6） $3\mu\text{M}$ CHIR99021（Wako社）、（7） $10\mu\text{M}$ SB431542（Wako社）、（8） $3\mu\text{M}$ IWR-1（KhES-1由来）又は10ng/mL EGF（1231A3由来）を添加した。

[0217] 凝集体再形成のための浮遊培養後1日目、7日目、及び14日目に凝集体の再形成状態を明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡（Keyence社製BZ-X

810)にて観察した。K h E S - 1由来細胞の結果を図3～5に示す。また、凝集体の面積をImage Jにて計測した。K h E S - 1由来細胞の結果を図6に示す(12個計測した平均値)。また、浮遊培養後1日目の凝集体の再形成状態を観察した1231A3由来細胞の結果を図7に示す。図3～7により、Y-27632に加えてSAG(300nM)又はCHIR99021(3μM)を添加した群は、Y-27632のみ添加した群より大きな凝集体が再形成されていることが確認された。よって、SAGとCHIR99021は凝集体の増殖、再形成を促進する効果が確認された。

[0218] <実施例3 層構造形成促進因子及び凝集体増殖促進因子の探索>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(K h E S - 1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports, 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名:AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0219] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後26日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(Wako社製)を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。これらの細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート(商品名:PrimeSurface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製)の1ウェルあたり3.0×10⁴細胞になるように100μLの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。細胞添加と同時に(1)添加無し(control)、(2)10μM Y-27632(Wako社)、(3)300nM SAG(Enzo社)、(4)10μM Y-27632(Wako社)及び300nM SAG(Enzo社)、(5)3μM CHIR99021(Wako社)、(6)10μM Y-27632(Wako社)及び3μM CHIR99021(Wako社)、(7)300nM SAG(Enzo社)及び3μM CHIR99021(Wako社)、(8)10μM

Y-27632 (Wako社)、300nM SAG (Enzo社) 及び3 μ M CHIR99021 (Wako社) を添加した。

[0220] 凝集体再形成のための浮遊培養後1日目、14日目及び28日目 (Day 1、Day 14、Day 28)、すなわち、分化誘導のための浮遊培養開始後27日目、40日目及び54日目 (dd27、dd40、dd54) に凝集体の再形成状態を観察した結果を図8、図9、図10に示す。図8、図9、図10により、CHIR99021を添加した際、凝集体が再形成されていることが確認された。またCHIR99021に加えてSAGを添加すると凝集体がより大きいことが確認された。

[0221] 凝集体の再形成のための浮遊培養後15日目 (分化41日目相当) 及び28日目 (分化54日目相当) 凝集体を、4%PFAで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、DAPI及び抗Chx10抗体 (商品名: Anti CHX10 Antibody、EX alpha社)、抗 β -Catenin抗体 (R&D Systems社)、抗Collagen IV抗体 (Abcam社)、抗Zo-1抗体 (Invitrogen社)、抗Ki67抗体 (BD社)、抗Pax6抗体 (BioLegend社)、抗R $\times$ R- γ (R $\times$ Rg) 抗体 (Spring Bioscience社)、抗CRX抗体 (Abnova社)、抗NRL抗体 (R&D Systems社)、抗Recoverin抗体 (Proteintech社製)、抗Isllet-1抗体 (DSHB社)、抗GS抗体 (Sigma社)、抗Brn3抗体 (Santa Cruz社)、抗Calretinin抗体 (R&D Systems社) を用いて免疫染色を行った。

[0222] これらの免疫染色された切片を、明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡観察 (Keyence社製BZ-X810)、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (Leica社製SP-8) を用いて観察し、その結果を図11～20に示す。図11、図14、図15、図18により、CHIR99021を添加した場合、凝集体の最も外側にR $\times$::Venus陽性、Chx10陽性の神経網膜前駆細胞が含まれる層構造が形成されていることを確認した。また、図12、

図16、図17により、CHIR99021を添加した場合、凝集体の最も外側にZoo-1陽性の頂端面が、内部にコラーゲン陽性の基底面が形成されており、ApicalとBasalの極性を有する上皮組織が形成されていることを確認した。一方で特に図17のように、CHIR99021を添加していない群では、細胞の極性がない、もしくはロゼット様の構造を示していることが観察された。さらに、図19、図20により、R $\times$ R- γ (R $\times$ R γ) 陽性及びCRX陽性の錐体前駆細胞、Recoverin陽性及びCRX陽性の視細胞前駆細胞が分化していることが確認され、Islet-1陽性及びBrn3陽性の網膜神経節細胞、Calretinin陽性アマクリン細胞の分化も確認された。

[0223] これらの結果から、一度分散した網膜系細胞の単一細胞懸濁液において、CHIR99021を添加することで、Apical basalの極性を有する上皮組織としての網膜組織を再組織化・網膜分化できることが分かった。

[0224] <実施例4 凝集体再形成させる分化時期について>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports, 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0225] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後18日目、25日目、40日目、61日目、及び75日目(dd18、dd25、dd40、dd61、dd75)の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(WAKO社製)を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。これらの細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート(商品名: PrimeSurface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製)の1ウェルあたり2~5 $\times 10^5$ 細胞になるように10 μ M Y-27

632 (Wako社)、300 nM SAG (Enzo社) 及び3 μ M CHIR99021 (Wako社) を含む100 μ Lの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。

[0226] 凝集体の再形成のための培養3日目、15日目、21日目 (Day 3、Day 15、Day 21) に凝集体の再形成状態を明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察した結果を図21に示す。図21により、dd18、dd25、dd40、dd61、dd75のどの分化日数の細胞凝集体においても、凝集体が再形成され、層構造が形成されていることが確認された。また、Rx : Venus陽性の網膜組織の特性が維持されていることが観察された (図21)。

[0227] これらの結果から、どの分化段階の網膜組織においてもY-27632並びにSAG及びCHIR99021を添加することで凝集体を再形成できることがわかった。

[0228] <実施例5 脳オルガノイドの再凝集体形成について>

Rx : Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞 (KhES-1株、(非特許文献3)) を、「Scientific Reports, 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0229] 浮遊培養開始後3日目に、Y-27632及びSAGを含まず、外来性のヒト組み換えBMP4 (商品名: Recombinant Human BMP-4、R&D Systems社製) を終濃度1.5 nMで含む培地を50 μ L用いた。また、脳オルガノイドを作製するために、BMP4を添加しない群をおいた。浮遊培養開始後6日目以降、3日に1回Y-27632及びSAG及びヒト組み換えBMP4を含まない培地で半量交換した。

[0230] このように作製された浮遊培養開始後40日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液 (WAKO社製) を添加した。37℃でインキュベート

後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散した細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート（商品名：Prime Surface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製）の1ウェルあたり 5×10^5 細胞になるように、10mM Y-27632（Wako社）、300nM SAG（Enzo社）及び3 μ M CHIR99021（Wako社）を含む100 μ Lの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。

[0231] 凝集体の再形成のための培養3日目、15日目、21日目に凝集体の再形成状態を明視野顕微鏡及び蛍光顕微鏡した結果を図22に示す。図22により、Rx::Venus陰性の終脳オルガノイドにおいても、網膜オルガノイドと同様に凝集体が再形成され、層構造が形成されていることが確認された。

[0232] これらの結果から、網膜オルガノイドだけでなく終脳オルガノイド等の神経上皮組織においても凝集体を再形成できることがわかった。

[0233] <実施例6 凍結保存検討>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KhES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0234] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後31日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。

[0235] 分散後、非凍結群においては、非細胞接着性の96ウェル培養プレート（商品名：Prime Surface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製）の1ウェルあたり 2.0×10^5 細胞になるように10 μ M Y-27632（Wako社）、300nM SAG（Enzo社）及び3 μ M CHIR99021（Wako社）を含む100 μ Lの無血清培地に浮

遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。

- [0236] 分散後、凍結群として、陰性対照のPBS (Gibco社)と、以下の凍結保存液、Cell Banker 1 (TaKaRa社)、Stem Cell Banker (TaKaRa社)、CultureSure (登録商標)凍結保存溶液 (CultureSure (登録商標) Freezing Medium; 富士フイルム和光純薬株式会社)、STEMdiff (商標) Neural Progenitor Freezing Medium (Stemcell社)、StemSure (登録商標)凍結保存溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社)、BamBanker (日本ジェネティクス株式会社)を用いて、上記単一細胞を 1.0×10^6 cells/mLとなるように懸濁し、バイセルを用いて-80℃にて凍結保存した。
- [0237] 凍結保存1日後、起眠し、生細胞率を確認した。起眠直後の生細胞率は、PBS群では激減したが、いずれの凍結保存液でも生細胞率は高く、STEMdiff以外の凍結保存液 (Cell Banker 1、Stem Cell Banker、CultureSure、StemSure、BamBanker) では、非凍結と遜色なく90%以上を示した (図24 (A))。
- [0238] これらの細胞を、非細胞接着性の96ウェル培養プレート (商品名: PrimeSurface 96ウェルV底プレート、住友ベークライト社製) の1ウェルあたり 2×10^5 細胞になるように $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako社)、 300 nM SAG (Enzo社) 及び $3 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Wako社)を含む $100 \mu\text{L}$ のNucT0培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で浮遊培養した。
- [0239] 播種1日後、いずれの凍結保存液 (Cell Banker 1、Stem Cell Banker、CultureSure、STEMdiff、StemSure、BamBanker) においても、非凍結と比較して遜色なく凝集体が再形成されていることが確認された (図23、図24 (B))。特に、Cell Banker 1では、他の凍結保存液で見られる

凝集体の周辺部に存在する小さなR x : : V e n u s 陽性の細胞凝集体が確認されず、非凍結に近い観察像が得られた（図23）。

[0240] 凝集体の再形成のための培養7日後、いずれの凍結保存液においても、非凍結と比較して遜色なく凝集体が再形成されていることがわかった。

[0241] これらの結果から、一度分散して得られた網膜系細胞の単一細胞懸濁液を、凍結保存させても、起眠後、Y-27632、SAG、及びCHIR99021を添加して培養することで、凝集体を再形成させることができることがわかった。

[0242] <実施例7 網膜凝集体の発現している足場タンパク質について>

実施例1～6の検討で、網膜系細胞を分散し、多能性幹細胞を網膜分化させて網膜系細胞を含む細胞凝集体を得て、細胞凝集体を分散して単一細胞懸濁液を得て、当該単一細胞懸濁液を、播種時にY-27632（Wako社）、SAG（Enzo社）及びCHIR99021（Wako社）を添加して浮遊培養することで、層構造を持ち、極性を有する網膜組織を再組織化できることがわかった。次に、広いシート状網膜組織を作製するための検討として、接着培養を行うことを構想した。そして、接着培養するための、細胞外マトリクスを検討することとした。

[0243] R x : : V e n u s レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KhES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports, 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0244] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後25～35日後の凝集体を4%PFAで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、DAPI及び抗Laminin抗体（商品名：Anti Laminin Antibody、Abcam社）、抗Fibronectin抗体（R&D systems社）、抗Collagen IV抗体（Abcam社）を用い

て免疫染色を行った。これらの免疫染色された切片を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、凝集体は少なくとも基底膜の構成成分であるLamininやFibronectin、Collagen IVを発現していることを確認した（図25）。すなわち、この自己組織化培養系では、ヒト網膜組織が自ら基底膜を形成し、LamininやFibronectin、Collagen IVを発現することがわかった。

[0245] 公知の基底膜に特化したマウス胎児の組織染色に関するデータベース（MOUSE BASEMENT MEMBRANE BODYMAP; <http://dbarchive.biosciencedbc.jp/archive/matrixome/bm/home.html>）の情報から、マウスの胎児神経網膜組織において発現しているLamininのアイソフォームを調査した。その結果、LamininのアイソフォームとしてLaminin α が1、4、5、Laminin β が1、2、Laminin γ が1ということが明らかとなった（図26）。

[0246] この結果から、神経網膜組織に適した細胞外マトリクスとして、Laminin α 、Laminin β 、Laminin γ の組み合わせで、Lamininの511、521、411、421、111、121（特に511、521、411）が有用である可能性が示唆された。

[0247] すなわち、接着培養でシート状網膜シートを再形成させるための、細胞外マトリクスとして、Laminin511、Laminin521、Laminin411、Fibronectin、Collagen IV等が有用である可能性が示唆された。

[0248] <実施例8 Transwell上への播種 細胞外マトリクス検討>

実施例1～6の検討で、網膜系細胞の単一細胞懸濁液から、浮遊培養で、層構造を持つ網膜組織を含む凝集体を再形成させる手法を検討した。実施例7にて、接着培養に用いる細胞外マトリクスの候補を検討した。これらを組み合わせ、網膜系細胞の単一細胞懸濁液から、接着培養での、シート状網膜組織の再形成法（再シート化）を検討した。

[0249] Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトE

S細胞（KHES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0250] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後16日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。

[0251] 再シート化を促進させる細胞外マトリクスとして、Matrigel（Corning社）とLaminin511-E8（商品名iMatrix511、ニッピ社製）を用いた。上記分散した網膜系細胞の単一細胞を、以下の3条件で24ウェルTranswell（Corning社）に、1ウェル当たり $0.5 \sim 4 \times 10^5$ 細胞となるように、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632（Wako社）、 300 nM SAG（Enzo社）及び $3 \mu\text{M}$ CHIR99021（Wako社）を含む $300 \mu\text{L}$ の無血清培地に浮遊させて播種した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地（gfCDM）培地で3～4日に1回、培地交換を行った。

条件1：Matrigelで予めコーティングした24ウェルTranswellに播種（Matrigel（Precoat））

条件2：Laminin511-E8で予めコーティングした24ウェルTranswellに播種（iMatrix511（Precoat））

条件3：予めコートをしなかった24ウェルTranswellに、Laminin511-E8を添加した培養液を用いて細胞を播種（Mix法）。

[0252] 凝集体の再形成のための培養14日以降、いずれの条件においてもシート状の細胞凝集体（細胞シート）が形成された。シート状の細胞凝集体を4% PFAで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、DAPI及び抗Chx10抗体（ExAlpha社）、抗Zor-1抗体（商品名：Anti Zor-1 Antibody、Invitrogen社）、抗Co

Collagen IV抗体 (Abcam社) を用いて免疫染色を行った。これらの免疫染色された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、Matrigel (Pre coat)、iMatrix511 (Pre coat)、Mix法の全てにおいて、Chx10陽性の神経網膜前駆細胞が存在することが確認された (図27)。さらに、Matrigel (Pre coat) 及びiMatrix511 (Pre coat) の条件では、Apical面 (上皮組織のtight junctionはApical面に形成される) のマーカーであるZO-1が、シート状の細胞凝集体の上側 (ウェルに接していない側) に、Basal面のマーカーであるCollagen IVが、シート状の細胞凝集体の下側 (ウェルに接している側) にて確認された (図28)。ApicalとBasalの極性を有するRx::Venus陽性の網膜前駆細胞のシートが再形成されていることが確認された。一方で、細胞外マトリクスを同時に投与するMix法では極性が形成されていないことが確認された。

[0253] これらの結果から、単一細胞に分散された網膜系細胞 (NR) において、Laminin511-E8もしくはMatrigelを足場として事前にコートすることでApical-basalの極性を有するシート状網膜組織を再度作製 (再シート化) できることが分かった。

[0254] <実施例9 Transwell上への播種・再シート化 CHIR99021の効果確認>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞 (KhES-1株、(非特許文献3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0255] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後15~30日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液 (Wako社製) を添加した。37℃でイ

ンキュベート後、ピペッティングにより単一細胞へ分散した。分散後、Laminin 511-E8でコーティングした12ウェルTranswellに、1ウェルあたり 8×10^5 細胞となるように(1) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako社)、(2) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako社) 及び 300 nM SAG (Enzo社)、(3) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako社) 及び $5 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Wako社)、(4) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako社)、 300 nM SAG (Enzo社) 及び $3 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Wako社) を含む $300 \mu\text{L}$ の無血清培地に浮遊させ、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で接着培養した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地(NucT0)培地で3～4日に1回、培地交換を行った。

[0256] 凝集体の再形成のための培養14日に得られた細胞シートを観察したところ、全ての条件において、細胞が生着していることが観察された(図29)。そこで、これらの細胞シートを $4\% \text{PFA}$ で固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、DAPI及び抗Zoo-1抗体(商品名: Anti Zoo-1 Antibody、Invitrogen社製)、抗Collagen IV抗体(Abcam社)を用いて免疫染色を行った。これらの免疫染色された切片を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果CHIR99021を添加した場合、ApicalとBasalの極性を有するRx::Venus陽性の網膜前駆細胞のシートが再度形成されていることが確認された。一方で、CHIR99021を添加しなかった場合、Apical面が構成されず、極性が形成されていないことが確認された(図30)。

[0257] これらの結果から、単一細胞に分散された網膜系細胞(NR)において、CHIR99021を添加することでApical-basalの極性を有する網膜シートを再度作製できることが分かった。

[0258] <実施例10 Transwell上への播種・再シート化 CHIR99021の濃度・添加期間の検討>

Rx : : Venus レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト ES 細胞 (Khes-1 株、(非特許文献 3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地 (商品名 : AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として Laminin 511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0259] 実施例 1 のように作製された浮遊培養開始後 33 日 (dd33) の凝集体を PBS にて洗浄し、神経細胞分散液 (Wako 社製) を添加した。37℃ でインキュベート後、ピペッティングにより単一細胞へ分散した。分散後、Laminin 511-E8 でコーティングした 24 ウェル Transwell に 1 ウェルあたり $2 \sim 4 \times 10^5$ 細胞となるように播種し、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako 社) 及び 300 nM SAG (Enzo 社) に加え、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 又は $9 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Wako 社) を含む $300 \mu\text{L}$ の無血清培地を添加し、3 日間 (0~3 日目) 又は 6 日間 (0~6 日目) 又は 9 日間 (0~9 日目)、37℃、5% CO_2 で接着培養した。播種 3 日以降に 3~4 日に 1 回、培地交換を行った。

[0260] 凝集体の再形成のための培養 14 日後 (Day 14、dd47) に得られた細胞シートを、観察したところ、CHIR99021 を $9 \mu\text{M}$ で 6 日間、9 日間添加群以外は生着していることが観察された (図 31)。そこで、これらの細胞シートを 4% PFA で固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、DAPI を用いて免疫染色を行った。CHIR99021 を $1 \mu\text{M}$ から $9 \mu\text{M}$ で 3 日間から 9 日間添加することで、Rx : : Venus 陽性の網膜前駆細胞のシートが厚く再形成されていることが確認された (図 32)。

[0261] これらの結果から、単一細胞に分散された網膜系細胞 (NR) において、CHIR99021 を少なくとも $1 \sim 9 \mu\text{M}$ で 3~9 日間添加することで網膜シートを再度作製できることが分かった。

[0262] <実施例 11 Transwell 上への播種時の足場の検討>

Rx : : Venus レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト ES 細胞 (Khes-1 株、(非特許文献 3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として Laminin 511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0263] 実施例 1 のように作製された浮遊培養開始後 24 日の凝集体を PBS にて洗浄し、神経細胞分散液 (Wako 社製) を添加した。37℃ でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、(1) コーティングなし (Non Coat)、並びに、(2) 2 μ L の iMatrix 511 (商品名、ニッピ社製)、(3) 2 μ L の iMatrix 411 (商品名、ニッピ社製)、(4) 2 μ L の iMatrix 211 (商品名、ニッピ社製)、(5) 2 μ L の Vitronectin (VTN-N) Recombinant Human Protein (Thermo 社)、(6) 2 μ L の Cell Start (Thermo 社)、(7) 5 μ L の Laminin 111、5 μ L の Laminin 121、5 μ L の Laminin 211、5 μ L の Laminin 221、5 μ L の Laminin 411、5 μ L の Laminin 421、5 μ L の Laminin 511、5 μ L の Laminin 521 (BioLamina 社)、(8) 5 μ L の Laminin 332、(9) 2 μ L の Matrigel (Corning) でコーティングした 24 ウェル Transwell に 1 ウェルあたり 2.0×10^5 細胞となるように播種し、10 μ M Y-27632 (Wako 社) 及び 300 nM SAG (Enzo 社) に加え、3 μ M CHIR99021 (Wako 社)、100 μ g/mL FGF8 (Wako 社) を含む 200 μ L の無血清培地を添加し、3 日間、37℃、5% CO₂ で接着培養した。播種 3 日以降に 3 ~ 4 日に 1 回、培地交換を行った。

[0264] 播種 22 日後に得られた細胞シートを、観察したところ、Cell Start 以外の足場で良好な神経網膜シートが得られた (図 33)。

[0265] これらの結果から、単一細胞に分散された凝集体（NR）において、i M a t r i x 5 1 1 や M a t r i g e l だけでなく、様々な足場タンパク質においても網膜シートを再度作製できることが分かった。

[0266] <実施例12 Transwell上への播種・再シート化・網膜分化の確認>

C r x : : V e n u s レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト E S 細胞（K h E S - 1 株、（非特許文献3））を、「S c i e n t i f i c R e p o r t s 4 , 3 5 9 4 （2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては S t e m F i t 培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場として L a m i n i n 5 1 1 - E 8 （商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0267] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後15日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、L a m i n i n 5 1 1 - E 8 でコーティングした24ウェルTranswellに、1ウェルあたり 2.0×10^5 細胞となるように、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632、 300 nM SAG及び $3 \mu\text{M}$ CHIR99021を含む $200 \mu\text{L}$ の無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で3日間培養した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地（N u c T O）培地で3～4日に1回、培地交換を行った。

[0268] 播種44日後（Day44、dd59）に得られた細胞シートを、観察したところ、C r x : : V e n u s 陽性の視細胞が分化してきていることが観察された（図34）。

[0269] さらに、浮遊培養開始後29日目の凝集体を用いて、同様に再シート化した。再組織化培養28日目（Day67）の細胞シートを4%PFAで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、DAPI及び抗Ki67抗体（R&D Systems社）、抗Chx10抗体（商品名：A n t i C H X 1 0 A n t i b o d y、EX alpha社）、抗Pax6抗

体 (BD Pharmingen 社)、抗 Brn3 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 RxR- γ (RxRg) 抗体 (Spring Bioscience 社)、抗 Crx 抗体 (abnova 社) を用いて免疫染色を行った。Control として平面化 (再シート化) させていない dd70 の 3D Retina (細胞凝集体) も染色を行った (図 35~37)。

また、Day 57 の細胞シートを 4% PFA で固定した後、切片は作製せず、全体免疫染色を行った。DAPI 及び抗 Chx10 抗体 (商品名: Anti CHX10 Antibody、EX alpha 社)、抗 Sox2 抗体 (BD Pharmingen 社)、抗 Ki67 抗体 (BD 社)、抗 Pax6 抗体 (BioLegend 社)、抗 Brn3 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 TUJ1 抗体 (Millipore 社)、抗 Islet-1 抗体 (R&D Systems 社)、抗 Crx 抗体 (abnova 社)、抗 Recoverin 抗体 (Proteintech 社)、抗 Zo-1 抗体 (Invitrogen 社)、抗 Collagen IV 抗体 (Abcam 社) を用いて免疫染色を行った。

[0270] その結果、Chx10 陽性、Pax6 陽性及び Ki67 陽性の網膜前駆細胞、Brn3 陽性の網膜神経節細胞、RxRg 陽性、Crx::Venus 陽性及び Crx 陽性の錐体細胞前駆細胞が、Control の 3D Retina と遜色なく分化していることが確認された。また、透過光で Transwell との位置関係を観察したところ、Transwell 上に網膜シートが形成されており、Basal 側に局在する Pax6 強陽性、Chx10 陰性の網膜神経節細胞が Transwell 側に局在していることが確認された (図 38)。さらに、切片を作製せずに全体を共焦点顕微鏡で観察したところ、Apical と Basal の極性を有し、極性に従って各種網膜細胞が分化していることが確認された (図 39、図 40、図 41)。

[0271] さらに長期間培養し、dd112 の細胞シートについて、切片は作製せず、シート状態で免疫染色を行った。抗 Ribeye 抗体 (CtBP2、BD 社) と抗 Recoverin 抗体 (Proteintech 社)、抗 Pax

×6抗体 (BioLegend社) 及び抗Chx10抗体 (商品名: Anti CHX10 Antibody、SantaCruz社) を用いて染色したところ、Crx::VenusとRecoverinが同一の細胞で発現が観察され、Ribeyeが発現していることが確認された (図42)。よって、再シート化した網膜から分化した視細胞は、シナプスタンパク質を発現する程度にまで成熟することが確認された。また、Crx::Venus、がApical側に、Chx10、Pax6が内側に局在された状態で、シートが形成されていることが確認された (図43)。

[0272] これらの結果から、Transwell上で再組織化した網膜シートにおいて網膜細胞の分化が確認され、極性が維持されていることが観察された。

[0273] <実施例13 Rx::Venus株で網膜系細胞の維持培養>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞 (KHES-1株、(非特許文献3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0274] 実施例1のように作製された浮遊培養開始後31日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液 (Wako社製) を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、10μLのLaminin511-E8でコーティングした12ウェルTranswellに、1ウェルあたり 2.0×10^5 細胞となるように10μM Y-27632、300nM SAG及び3μM CHIR99021を含む500μLの血清を含まないDMEM/F12にN2を添加した培地に (1) Control、(2) 20ng/mL FGF2、(3) 20ng/mL EGF、(4) 100nM SAG、(5) 1ユニットLIF、(6) 10ng/mL IGF-1、(7) 100ng/mL PDGF-AA、(8) 100ng/mL PDGF-AB、(9) 10μg/mL GDNF、(

10) $20\mu\text{g}/\text{mL}$ BDNF、(11) $2\mu\text{M}$ Pyrintegrin、(12) $1\mu\text{M}$ BMP4を添加して、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で3日間培養した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地(DMEM/F12にN2を添加)培地で3~4日に1回、培地交換を行った。

[0275] 34日後、細胞シートを $4\%\text{PFA}$ で固定し、DAPIを用いて核を染色した。Rx::Venus陽性細胞の面積に着目して観察し、網膜系の細胞の維持の状態について検討を行った。蛍光顕微鏡(Keyence社製BX-X810)を用いて、観察したところ、 $20\text{ng}/\text{mL}$ EGF及びFGF2を添加し続けた際、Rx::Venus陽性細胞が広く維持されていることが確認された(図44)。

[0276] よって、EGFやFGFを網膜の再組織化の際に添加すると、Rx::Venus陽性細胞の維持に効果があることがわかった。

[0277] <実施例14 平面化培養時の網膜前駆細胞の維持培養>

Crx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0278] 実施例1で作製された浮遊培養開始後27日目の凝集体(NR)をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(Wako社製)を添加した。 37°C でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、 $10\mu\text{L}$ のLaminin511-E8でコーティングした12ウェルのTranswellに $8.0\times 10^5\text{cell}/\text{well}$ となるように $10\mu\text{M}$ Y-27632、 300nM SAG及び $3\mu\text{M}$ CHIR99021を含む $500\mu\text{L}$ の以下の培地に懸濁して、細胞を播種した。網膜前駆細胞を維持する培地を検討するため、(1) NeuroCult NS-A (STEMCE

LL Technologies社)、(2) STEMdiff Neural Progenitor (STEMCELL Technologies社)、(3) StemPro NSC SFM (Thermo Fisher社)、(4) RHB-A (TaKaRa社)の培地に20ng/mL FGF2と20ng/mL EGFを添加して1か月間培養した。ControlとしてNucT0培地をおいた。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない培地で3～4日に1回、培地交換を行った。

[0279] 凝集体の再形成のための培養16日後、視細胞前駆細胞マーカーCrx : : Venusを指標に分化をしていない条件(蛍光顕微鏡で観察した場合、Crx : : Venusが光っていない条件)を調べたところ、NeuroCult NS-A及びRHB-A培地がある程度分化を遅らせる効果があることが認められた(図45)。

[0280] よって、NeuroCult NS-A及びRHB-A培地とEGFやFGFを再シート化の際に添加すると、網膜前駆細胞の維持、及び分化を遅らせる効果があることがわかった。

[0281] <実施例15 コラーゲングル上で培養>

Rx : : Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0282] beMatrix低エンドトキシン化コラーゲン液(新田ゼラチン社)を用いてコラーゲングルを作製した。具体的な操作としては、コラーゲンATと5×DME、再構成用緩衝液を7:2:1の割合で混合し、Transwellのメッシュの上にコーティングし、37℃、5%CO₂インキュベーターにて30分インキュベートした。インキュベート後、インサートの内外に

培地を添加した。

[0283] 実施例1で作製された浮遊培養開始後26日目の凝集体(NR)をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(Wako社製)を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、12ウェルのTranswellのコラーゲングル上に $8.0 \times 10^5 \text{ cell/well}$ となるように細胞を播種した。最初の3日間は、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632、 300 nM SAG及び $3 \mu\text{M}$ CHIR99021の存在下で培養した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地(NucT0培地)培地で3~4日に1回、培地交換を行った。

[0284] 凝集体の再形成のための培養33日後、実体顕微鏡にて、Rx::Venusを指標に再シート化の具合を観察したところ、Transwellのコラーゲングル上で前面にRx::Venus陽性細胞が存在していることが認められた(図46)。

[0285] よって、コラーゲングル上においても、Y-27632及びSAG及びCHIR99021を添加することで再シート化ができることがわかった。

[0286] <実施例16 移植検討>

Crx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0287] 実施例15のようにして作製されたコラーゲングル上で26日目の凝集体(NR)をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(Wako社製)を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、12ウェルのTranswellのコラーゲングル上に $8.0 \times 10^5 \text{ cell/well}$ となるように細胞を播種した。最初の3日間は、 10

μM Y-27632、300 nM SAG及び3 μM CHIR99021の存在下で培養した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地（NucT0培地）培地で3～4日に1回、培地交換を行った。

[0288] 凝集体の再形成のための培養37日及び44日の分化63日目及び70日目の網膜細胞シートに関してCollagenase（Roche社）を用いて30分間37℃で処理し、剥離させた。剥離させた網膜シートをピンセットとハサミを用いて細長く切り出し、長さ1.8 cm程度の移植用のグラフトを用意した（図47）。

[0289] 用意したグラフトについて、ガラスパスツールピペットを用いて、免疫不全網膜不全ラット（SD Foxn）の網膜下に移植した。

[0290] 移植後1年のラットの眼を取り出し、4%PFAで固定した。蛍光実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡（Keyence BZ-X810）を用いて、観察したところCx::Venus陽性のグラフトが生着していることが確認された（図48）。

[0291] よって、再シート化した網膜シートは移植後に生着することができることがわかった。

[0292] <実施例17 ソーティング検討>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KhES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0293] 実施例1で作製された浮遊培養開始後14～25日目の凝集体をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペッティングにより単一細胞へ分散し、Cell Sorter ARIA II（BD社）を用いて、FSCとSSCで目的の細胞集団を

ゲーティングした後、 $Rx::Venus$ 陽性の画分を分取した（図49）

。

[0294] 分取した細胞を、1ウェルあたり $1.6 \sim 8.0 \times 10^5$ 細胞となるように、Laminin511-E8でコーティングしておいた12ウェルTranswell（Corning社）に播種した。コントロールとしてSortingしていないシートも作製した。最初の3日間は、 $10 \mu M$ Y-27632、 $300 nM$ SAG及び $3 \mu M$ CHIR99021の存在下で培養した。播種3日以降にY-27632、SAG及びCHIR99021を含まない無血清培地（NucT0培地）培地で3～4日に1回、培地交換を行った。播種後、26日目に蛍光実体顕微鏡を用いて観察した（図50）。

[0295] また、分化82日目のSortingにより $Rx::Venus$ で純化した細胞シートを4%PFAで固定した後、切片は作製せず、シートのまま免疫染色を行った。DAPI及び抗Recoverin抗体（Proteintech社）を用いて免疫染色を行った。ControlとしてSortingしていない網膜シートも染色を行った（図51、図52、図53）。その後、凍結切片を作製しDAPI及び抗Ki67抗体（BD社）、抗Chx10抗体（商品名：Anti CHX10 Antibody、Santa Cruz社）、抗CRX抗体（TaKaRa社）を用いて免疫染色を行った。（図53）。

[0296] その結果、 $Rx::Venus$ 陽性画分をソーティングせずに播種すると、一部においてRPE細胞の塊が観察された。もっとも、目視で確認できるため、RPE細胞を除去することは可能である。一方、 $Rx::Venus$ 陽性画分をSortingした場合、 $Rx::Venus$ 陽性の網膜シートが作製できていることが観察された。さらに、RPE細胞が大部分除去できていることが確認された（図49、図50）。しかしながら、Sortingしても、RPE細胞が混入する場合があります、これはSortingでRPE細胞を完全に除去できなかったためか、又は、Sorting後に分化されたかは不明である。しかし、混入したRPE細胞は神経網膜組織と混ざ

り合っていないことが確認できた（図52）。目視で確認できるため、RPE細胞を除去することは可能である。

[0297] また、Sortingを行った網膜シートにおいて、ControlであるSorting無の網膜シートと遜色なく、Recoverin陽性の視細胞が分化していることが確認された（図51、図53）。Z Stack解析及び、切片の免疫組織学的な解析から、網膜組織の層構造が再形成されていること、Chx10陽性及びKi67陽性の網膜前駆細胞、Crx陽性の視細胞前駆細胞の存在が確認された（図53）。

[0298] よって、FSC及びSSCで目的の細胞集団をゲーティングした後、Rx::Venusを指標にSortingすることにより、大部分のRPE細胞を除去することができ、かつ、再シート化をした際問題なく網膜細胞が分化することが観察された。

[0299] <実施例18 再シート化時のRetinaの性質を維持する因子探索>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KHES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0300] 実施例1で作製された浮遊培養開始後25日目の凝集体（NR）をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、Cell Sorter ARIA II（BD社）を用いてRx::Venusを指標にSortingを実施した。Sorting後の細胞をEasy iMatrixを用いてLaminin511-E8コートした96Wellガラスボトムプレート（グライナー社）に1ウェルあたり 5×10^4 細胞を100 μ LのNucT0にY-27632、CHIR99021、SAGを添加して播種した。播種と同時に表1に示すタンパク質、又は表2に示す低分子化合物を添

加した。

[表1]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS/0.1% BSA			Endorepellin (ng/ml)			IGF-1 (ng/ml)			SCF (ng/ml)		
				100	50	25	40	20	10	100	50	25
B	Activin A (ng/ml)			FGF2 (ng/ml)			LIF (Unit)			TGF-b1 (ng/ml)		
	100	50	25	40	20	10	x500	x1000	x2000	100	50	25
C	BDNF (ng/ml)			FGF4 (ng/ml)			NGF (ng/ml)			TGF-b2 (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	40	20	10	100	50	25
D	BMP2 (ng/ml)			FGF8 (ng/ml)			PDGF-AB (ng/ml)			Thbs1 (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
E	BMP4 (ng/ml)			GDF7 (ng/ml)			PDGF-BB (ng/ml)			Thbs 2 (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
F	BMP7 (ng/ml)			GDF11 (ng/ml)			PEDF (ng/ml)			SAG (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
G	CXCL12 (ng/ml)			GDF15 (ng/ml)			PODN (ng/ml)			VEGF (ng/ml)		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25	100	50	25
H	EGF (ng/ml)			GDNF (ng/ml)			R-Spondin (ng/ml)			Wnt2b (ng/ml)		
	100	50	25	40	20	10	100	50	25	100	50	25

[表2]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO			S1P (μ M)			XMU MP 1 (XMU) (μ M)			Ascorbic acid (Asco) (μ M)		
				20	10	5	10	5	2.5	400	200	100
B	Y-27632 (Y) (μ M)			FTY 720 (FTY) (μ M)			Adenosine (Ade) (μ M)			Go 6983 (Go) (μ M)		
	40	20	10	20	10	5	200	100	50	4	2	1
C	SB-431542 (SB) (μ M)			VPC-23019 (VPC) (μ M)			ATP (μ M)			PMA (μ M)		
	20	10	5	20	10	5	200	100	50	0.5	0.25	0.125
D	LDN-193189 (LDN) (μ M)			AMD-3100 (AMD) (μ M)			ZM-241385 (ZM) (μ M)			PD-0325901 (PD) (μ M)		
	2	1	0.5	10	5	2.5	10	5	2.5	2	1	0.5
E	Cyclopamine KAAD (Cyc) (nM)			LPA (μ M)			CP-724714 (CP) (μ M)			TSA (μ M)		
	40	20	10	20	10	5	5	2.5	1.25	0.2	0.1	0.05
F	GI-254023X (GI) (μ M)			DHA (μ M)			Marimastat (Mari) (μ M)			OAC2 (μ M)		
	2	1	.5	20	10	5	5	2.5	1.25	20	10	5
G	IWR1 endo (IWR) (μ M)			SF-1670 (SF) (μ M)			AGN-193109 (AGN) (μ M)			Chetomin (CTM) (nM)		
	6	3	1.5	20	10	5	0.2	0.1	0.05	80	40	20
H	Pyrintegrin (Pyr) (μ M)			Rapamycin (Rapa) (μ M)			Retinoic acid (RA) (μ M)			ML-792 (ML) (μ M)		
	4	2	1	1	0.5	0.25	1	0.5	0.25	5	2.5	1.25

[0301] 播種3日後にも同様に表1及び2に記載の低分子化合物又はタンパク質の濃度を維持するように培地交換を行った。その後7日目に表1及び2に記載の低分子化合物又はタンパク質を含まないNucT0培地で培地交換を実施した。播種10日後、4%PFAで固定し、蛍光顕微鏡 (Keyence社製BZ-X810) でRx::Venusを指標に、Sorting後の細胞の評価を行った。その結果、タンパク質のうち、FGF2、FGF4、FGF8を添加したシートでは、ControlであるPBSと比較して、R

x::Venusの発現強度が高いことが観察された(図54)。また、低分子化合物のうち、IWR1endoを添加したシートでは、Rx::Venusの発現強度が高いことが観察された(図55)。さらに、濃度依存性が確認され、FGF8を100 μ g/mL添加した際、最もRx::Venusの発現強度が高いことが観察された(図56)。

[0302] よって、細胞播種直後にFGFシグナルを活性化させることで、Rx::Venus陽性の細胞集団を維持できることがわかった。

[0303] <実施例19 FGF8の添加による凝集体再形成、網膜分化確認>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名:AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0304] 実施例1で作製された浮遊培養開始後24日目の凝集体(NR)をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(Wako社製)を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、Cell sorter ARIAIII(BD社)を用いてRx::Venusを指標にSortingを実施した。Sorting後の細胞を低接着Vplateに1ウェルあたり2.0~5.0 $\times 10^4$ 細胞播種した。Controlとして、FGF8を添加していない群(FGF8-)、Sortingしていない群(Sorting無)も置いた。

[0305] 3~4日に1回培地交換を実施した。なお、培地交換時にFGF8も添加した。再播種後10日目に顕微鏡で観察したところ、Sorting無、FGF8-の群では、Rx::Venus陰性の細胞塊、又はRPE細胞が観察された(図57)。一方、FGF8を添加した群(FGF8+)では、これらの細胞塊が減少していることが観察された。Sorting有、FGF8-の群では、RPE細胞が部分的に観察された。Sortingによって

RPE細胞は除去されていることから、Rx::Venus陽性細胞の一部の集団がRPE細胞に分化したことが示唆された。一方で、Sorting有、FGF8+の群では、Rx::Venus陽性の凝集体が形成され、RPE細胞、Rx::Venus陰性の塊は観察されなかった。

[0306] これらの結果から、FGF8を添加することによって、RPE細胞、又はRx::Venus陰性細胞の分化を減少させることができると分かった。

[0307] さらに凝集体の再形成のための培養54日目（再播種後30日目）の凝集体を、PBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を用いて、単一細胞に分散した後、Fixation buffer（BD社）を用いてホルムアルデヒド固定を行った。その後、Perm/Wash buffer（BD社）で洗浄した後、抗CHX10-Alexa Fluor 647 Conjugate抗体（Santa Cruz社）、抗Sox2-BV421抗体（Biolegend社）、抗Ki67-Alexa Fluor 647 Conjugate抗体（BD社）、抗CRX-Alexa Fluor 647 Conjugate抗体（Santa Cruz社）で染色を行った。Perm/Wash buffer（BD社）で抗体を洗浄後、FACS Canto II（BD Bioscience社）を用いて測定し、FlowJoを用いて解析を行った。なお、コントロールとして、再組織化をしていない、同分化日数の神経網膜組織も置いた。

[0308] その結果、Sorting無でかつ、FGF8を添加していない群では、Rx::Venusネガティブの細胞集団が多数観察され、Rx::Venus陽性率が低い傾向にあった。一方で、Sorting無においても、FGF8を添加した群ではRx::Venus陽性率が高い傾向にあることが示された（図58）。

[0309] また、Sortingを行うとFGF8を添加しない群においてもRx::Venus陽性率が高い傾向であった（図58）。一方で、Sortingを行いかつ、FGF8を添加した群では、Chx10陽性及びSox2陽性の神経網膜前駆細胞の割合が高く、Crx陽性の視細胞前駆細胞の割合が

低い傾向であった（図59）。

[0310] これらの結果から、Sortingだけでなく、FGF8を添加することによって、RPEやRx::Venus陰性細胞の分化を減少させ、均一で良好な凝集体を得ることができると分かった。

[0311] <実施例20 再シート化時のFGF8の効果の確認>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KHES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0312] 実施例1で作製された浮遊培養開始後24日目の凝集体（NR）をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、Cell sorter ARIA II（BD社）を用いてRx::Venusを指標にSortingを実施した。Sorting後の細胞をY-27632、CHIR99021及びSAG、FGF8を含むNucT0培地に24ウェルトランズウェル（Corning社）に1ウェルあたり 2.0×10^5 細胞を懸濁し、播種した。Controlとして、FGF8を添加していない群（FGF8-）も置いた。

[0313] 3～4日に1回培地交換を実施した。なお、培地交換時にFGF8も添加した。分化63日、再播種後40日を経過したシートを、蛍光実体顕微鏡で観察をした（図60、図61）。また、FACS解析のため、分化64日、再播種後41日の凝集体を、PBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を用いて、単一細胞に分散した後、Fixation buffer（BD社）を用いてホルムアルデヒド固定を行った。その後、Fixation buffer（BD社）BD社）を用いて固定し、Perm/Wash buffer（BD社）で洗浄した後、抗CHX10-Alexa F

luo 647 Conjugate抗体 (Santacruz社)、抗Sox2-BV421 Conjugate抗体 (Biolegend社)、抗Ki67抗体 (BD社)、抗CRX-Alexa Fluor 647 Conjugate抗体 (Santacruz社)で染色を行った。Perm/Wash buffer (BD社)で抗体を洗浄後、FACSCantoII (BD Bioscience社)を用いて測定し、FlowJoを用いて解析を行った。なお、コントロールとして、再組織化をしていない、同分化日数の神経網膜組織も置いた (図62)。

[0314] その結果、Sortingをした後、FGF8を添加していないシートでは、Rx::Venusネガティブの細胞集団が多数観察され、Rx::Venus陽性細胞がウェルの周辺部に偏って、塊上に存在している傾向にあった。一方で、Sorting後にFGF8を添加したシートではRx::Venus陽性細胞がウェル全体に均一に存在しており、良好なシートが作製されていることが観察された (図60、図61)。また、FGF8を添加していないシートでは黒いRPE (図61、矢印) が観察された一方、FGF8を添加したシートではほとんど観察されなかった。

[0315] また、FACS解析において、FGF8を添加していないシートでは、Rx::Venus陽性率が60%と減少していたが、FGF8を添加した群では95%以上と、神経網膜組織と遜色ない陽性率を維持できていることがわかった (図62)。さらに、Chx10陽性及びSox2陽性の神経網膜前駆細胞やCrx陽性の視細胞前駆細胞の割合も神経網膜組織と比較しても同等であった。Rx::Venus陽性でかつ、Ki67陽性の増殖性のある網膜系細胞の割合は神経網膜組織と比較して多い傾向であった (図62)。

[0316] これらの結果から、再シート化を行う際、Sorting後にFGF8を添加することによって、RPEやRx::Venus陰性細胞の分化を減少させ、均一で良好なシートを得ることができると分かった。

[0317] <実施例21 Transwell上への播種・再シート化後の経時変化確

認>

Rx : : Venus レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト ES 細胞 (K h E S - 1 株、(非特許文献 3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地 (商品名 : AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として Laminin 511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0318] 実施例 1 のように作製された浮遊培養開始後 27 日目の凝集体を PBS にて洗浄し、神経細胞分散液 (Wako 社製) を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散した。分散後、Laminin 511-E8 でコーティングした 24 ウェル Transwell に、1 ウェルあたり 2.0×10^5 細胞となるように、10 μ M Y-27632、300 nM SAG 及び 3 μ M CHIR99021、100 ng/mL FGF8 を含む 200 μ L の無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂で 3 日間培養した。播種 3 日以降に Y-27632、SAG 及び CHIR99021、FGF8 を含まない無血清培地 (NucT0) 培地で 3~4 日に 1 回、培地交換を行った。

[0319] 凝集体の再形成のための培養 3 日、6 日、9 日、12 日、22 日、40 日後 (dd30、dd33、dd36、dd39、dd49、dd67) に得られた細胞シートを、4%PFA で固定後、蛍光実体顕微鏡及び蛍光顕微鏡を用いて Rx : : Venus を指標にシート化を観察したところ、Rx : : Venus 陽性の網膜細胞が増殖し、厚みの持ったシートが形成されてきていることが観察された (図 63)。特に 22 日から 40 日後には全面が Rx : : Venus 陽性細胞に覆われた厚い細胞シートが確認された

[0320] これらの結果から、22 日から 40 日後に移植やアッセイ等に用いられる再組織化網膜シートが得られることが観察された。

[0321] <実施例 22 RPC 表面抗原スクリーニング~hES 細胞と NR の比較>

Rx : : Venus レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト ES 細胞 (K h E S - 1 株、(非特許文献 3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地 (商品名 : AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として Laminin 511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0322] 上記細胞を用いて、実施例 1 に記載のように分化誘導のための浮遊培養を開始した。なお、分化誘導開始時に SAG 300 nM を添加した。浮遊培養開始後 19 及び 26 日目の凝集体 (NR) を PBS にて洗浄し、神経細胞分散液 (Wako 社製) を添加した。37℃ でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、表面抗原スクリーニングキット MACS (登録商標) Marker Screen, human (Miltenyi 社) を用いて、表面抗原スクリーニングを実施した (Alexa 647 で蛍光色素 Conjugate 抗体群)。Control としてヒト ES 細胞 (hESC) を染色した。なお、スクリーニングに使用したマーカーは全部で 371 個であった (図 64 ~ 69)。

[0323] FACS 解析は MACS Quant10 (Miltenyi 社) を用いて測定し、FlowJo を用いて解析を行った。図 65 に示す FSC 及び SSC で示される集団でゲーティングを行い解析した。まず、hESC で発現され、分化すると発現が消失される E-Cadherin や SSEA-4、SSEA-5 で染色及び解析が正確に行われていることを確認した (図 66)。その後の解析結果を図 64 に纏める。なお、「hESC : 高い」はヒト ES 細胞での発現レベルが高い又は発現があることを意味し、「hESC : 低い」はヒト ES 細胞での発現レベルが低い又は発現がないことを意味し、「NR : 高い」は神経網膜細胞での発現レベルが高いことを意味し、「NR : 低い」は神経網膜細胞での発現レベルが低い又は発現がないことを意味する。

[0324] hESC では発現が無く (又は発現がある)、浮遊培養開始後 19 日目又

は26日目でRx::Venus陽性の集団が発現している（又は発現していない）表面抗原を探索したところ、CD39、CD73、CXCR4、さらにはCD29、CD49b、CD49c、CD49f、CD57、CD82、CD90、CD200が、Rx::Venus陽性細胞とその他の細胞（Rx::Venus陰性細胞、hESC）とを区別できるマーカーである可能性が示唆された（図67）。

[0325] さらにMouse IgG1-APC-Conjugate抗体（Miltenyi社）、抗CD39-APC-Conjugate抗体（Miltenyi社）、抗CD73-APC-Conjugate抗体（Miltenyi社）、抗CD184（CXCR4）-APC-Conjugate抗体（Miltenyi社）を用いて、浮遊培養開始後dd18、dd25、dd53、dd81（図68中、d18、d25、d53、d81）におけるCD39、CD73、CD184（CXCR4）の発現を、FACS解析した（図68）。

[0326] その結果、CD39及びCD73は、dd25で最も発現している細胞の割合が高く、CD184に関しては、dd18及びdd25で発現が低い細胞の割合が高いことがわかった。

[0327] よって、神経網膜前駆細胞を純化するために表面抗原CD39、CD73、CD184を用いる場合は、浮遊培養開始後18日目以降、25日目付近が良いことがわかった（図68）。

[0328] <実施例23 でのCD39及びCD73、CXCR4の発現解析>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KhES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0329] 浮遊培養開始時（分化誘導開始時）にSAG 300nMを添加し、浮遊

培養開始後の3日目にBMP4を添加せず、Brain Organoidを作製した。Controlとして、BMP4を添加する群をおいた。このようにして作製された浮遊培養開始後26日目のBrain Organoidに関して、蛍光顕微鏡観察を行った(図70)。その結果、BMP4を添加した群ではRx::Venus陽性の網膜組織が分化していることが観察された一方、BMP4を添加していない群ではRx::Venus陰性の神経上皮細胞が分化していることが観察された。さらに、これらの凝集体を4%PFAで固定し、切片を作製し、DAPI及び抗FoxG1抗体(Takara社)で染色し、蛍光顕微鏡(Keyence社製BZ-X810)で観察を行った。その結果、BMP4を添加した群ではFoxG1は陰性である一方、BMP4を添加していない群ではFoxG1陽性が確認され、Brain Organoidが分化されていることを確認された(図71)。

[0330] このようにして作製された浮遊培養開始後25日目のBrain OrganoidをPBSにて洗浄し、神経細胞分散液(Wako社製)を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、抗CD39-APC Conjugate抗体(Miltenyi社)、抗CD73-APC Conjugate抗体(Miltenyi社)、及び抗CXCR4-APC Conjugate抗体(Miltenyi社)を用いて染色し、FACS測定はFACSCantoII(BD Bioscience社)を用いて発現細胞集団の割合を測定し、FlowJoを用いて解析を行った。

[0331] その結果、CD39及びCD73はBrain Organoidで発現しておらず、一方でCXCR4はBrain Organoidの大部分の細胞で発現していることが観察された(図72)。

[0332] よって、CD39陽性、CD73陽性、及びCXCR4陰性の細胞集団を指標にすることでBrain Organoidと区別して、Rx::Venus陽性細胞の集団を分取できることが確認された

[0333] <実施例 24 CD39 発現解析>

Rx : : Venus レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト ES 細胞 (Khes-1 株、(非特許文献 3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として Laminin 511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0334] 分化誘導開始時に SAG を (1) 0 nM、(2) 30 nM、(3) 300 nM を添加して作製された浮遊培養開始後 26 日目の凝集体 (NR) の形態を顕微鏡で観察した。その結果、浮遊培養開始時 (dd0) に SAG 300 nM 添加した場合に比べ、SAG 0 nM 及び SAG 30 nM を添加した場合には、凝集体がより大きく、また、層構造もよりはっきりわかることが確認された (図 73)。

[0335] さらに、上記凝集体に関して、神経細胞分散液を用いて単一細胞に分散し、抗 CD39-APC Conjugate 抗体 (Miltenyi 社) 及び抗 CXCR4-APC Conjugate 抗体 (Miltenyi 社) を用いて、CD39 及び CXCR4 の発現について FACS 解析を行った。FACSCantoII (BD Bioscience 社) を用いて発現細胞集団の割合を測定し、FlowJo を用いて解析を行った。また、これら凝集体を 4% PFA 固定し、切片を作製後、抗 ALDH1A1 抗体 (R&D Systems 社)、抗 CoupTF1 抗体 (PPMX 社)、抗 LHX2 抗体 (Millipore 社製)、抗 Chx10 抗体 (ExAlpha 社製)、抗 Pax2 抗体 (Covance 社製)、抗 NKX2.1 抗体 (Leica 社製) を用いて染色を行った。

[0336] その結果、浮遊培養開始時 (dd0) に SAG 300 nM 添加した凝集体では CD39 の発現があり、CXCR4 の発現が低いことが観察された (図 74)。また、dd0 における SAG の添加により、背側マーカーである ALDH1A1 の発現の低下、及び、腹側マーカーである CoupTF1 の

発現の上昇が認められた（図75、図76）。また、SAGの刺激を加えない方が、細胞凝集体におけるR $\times$ の発現度が均一であることが判明した（図77）。しかしながら、LHX2及び、Chx10、Pax2に関して300nM添加した凝集体でR $\times$ の発現が低い領域においても発現が確認され、NKX2.1は陰性であったことから、神経網膜組織であることは確認されている（図78、図79）。

[0337] よって、分化誘導開始時にSAGを300nM添加することで、CD39陽性かつCXCR4陰性の神経網膜前駆細胞の集団を得ることができることがわかった。

[0338] <実施例25 CD39発現増強検討>

R $\times$: Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KhES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0339] 分化誘導開始時（dd0）にSAG 300nMを添加し作製された凝集体（NR）に対して、浮遊培養開始後17日目に10個の神経網膜組織を低接着浮遊培養用シャーレ60mmDish（住友ベークライト社製）に移し、4mLのNucT0培地中に1mM、0.2mM Adenosine（A2A受容体Agonist、Sigma社製）、1mM、0.2mM、0.04mM AMP-PNP（Tocris社製）、5mM、1mM、0.2mM、0.04mM ATP disodium salt（Tocris社製）、及び1 μ M、0.2 μ M、0.04 μ M CGS 21680（Adenosine A2A Receptor Agonist、Tocris社製）を添加して浮遊培養開始後25日目まで培養し、CD39及びCXCR4の発現変化をMouse IgG1-APC Conjugate抗体（Miltenyi社）、抗CD39-BV421 Conjugate

te抗体 (BD Bioscience社) 及び抗CXCR4-APC Conjugate抗体 (Miltenyi社) を用いて染色し、FACS Cantof II (BD Bioscience社) を用いて測定し、FlowJoを用いて解析を行った。なお、ControlとしてDMSO添加群を置いた。

[0340] その結果、ATP及びA2A受容体AgonistがCD39の発現を増強させ、CXCR4の発現を減少させる効果があることがわかった (図80、図81)。

[0341] よって、CD39の発現をATP及びA2A受容体Agonistを添加することで増強できることがわかった。

[0342] <実施例26 CD39でSortingし、FGF8添加により作製したIslet-1 KO hESC-網膜シートの移植>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変し、かつIslet-1遺伝子をKOしたヒトES細胞 (KhES-1株、(非特許文献3)) を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」及びWO2018/097253に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地 (商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0343] 浮遊培養開始 (分化誘導開始時、dd0) にSAG300nMで分化させた凝集体に対して、浮遊培養開始25日目の凝集体 (NR) を単一細胞に分散し、抗CD39-APC Conjugate抗体 (Miltenyi社) を用いて37℃で15分間染色した後、Cell sorter ARIA II (BD社) を用いてCD39-APCを指標にSortingを実施した。Sorting後の細胞をCollagen gelコートした12ウェルTranswellに1ウェルあたり 8.0×10^5 細胞播種した。播種時にY-27632 (Wako社) 及びSAG (Enzo社)、CHIR99021 (Wako社)、50ng/mL FGF8 (Wako社) を添加

した。また、Controlとして、FGF8を添加していない群（FGF8-）もおいた。

[0344] 3～4日に一回培地交換を実施した。なお、培地交換時にFGF8も添加した。浮遊培養開始後73日目に顕微鏡で観察したところ、FGF8を添加していない群では、Cx::Venus細胞集団がまばらに観察されるのに対して、FGF8を添加した群においては、均一に存在していることが観察された（図82）。

[0345] このようにして作製されたシートを浮遊培養開始後88日目にCollagenaseを用いてシートを回収後、マイクロシザーズを用いて移植用グラフトを長く切り出し（図82）、免疫不全網膜不全ラット（SD Foxn）の網膜下への移植を実施した。

[0346] よって、CD39でSortingした細胞から製造した網膜シートは移植可能であることが確認された。

[0347] <実施例27 RPC表面抗原スクリーニング～Brain OrganoidとNRの比較～>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KHES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0348] 浮遊培養開始時（分化誘導開始時、dd0）にSAG 30nMを添加し作製された浮遊培養開始後24～26日目の凝集体（NR）に関して、神経細胞分散液（Wako社）を用いて単一細胞に分散し、表面抗原スクリーニングキットMACS（登録商標）Marker Screen, human（Miltenyi社）を用いて染色し、表面抗原スクリーニングを実施した（Alexa 647で蛍光色素Conjugate抗体群）。Controlとして分化誘導開始後3日目にBMP4を添加せずに作製したBr

Brain Organoidを染色した。

[0349] FACS解析はMACS Quant10 (Miltenyi社)を用いて測定し、FlowJoを用いて解析を行った。Brain Organoidでは発現が無く(又は発現がある)、浮遊培養開始後24~26日目でRx::Venus陽性の集団が発現している(又は発現していない)表面抗原を探索したところ、CD9、CD15、CD49c、CD66b、CD69、CD82、CD164、EpCAM、ErbB2 (CD340)においてBrain Organoidと区別できる可能性が示された(図83)。

[0350] また、Rx::Venus陽性細胞と陰性細胞を区別するマーカーとして、CD9、CD24、CD49c、CD90、CXCR4、EpCAMが有用である可能性が示された(図84)。

[0351] <実施例28 CD9の発現経時変化確認>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KHES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名:AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0352] hESC及び、浮遊培養開始時(分化誘導開始時、dd0)にSAG 30nMを添加して作製されたdd4、dd11、dd18、dd25、dd32、dd46の凝集体(NR)を神経細胞分散液(Wako社)で単一細胞に分散し、APCがConjugateされた抗CD9抗体(BioLegend社)で染色し、抗体を洗浄した後、FACS解析を行った。FACS解析はMACS Quant10 (Miltenyi社)を用いて測定し、FlowJoを用いて解析を行った。

[0353] その結果、CD9はhESCでは発現しているものの、分化開始Day4では一度発現が落ち、Day11(図85中d11)頃から発現し始め、d

d 1 8 (図 8 5 中 d 1 8) から d d 2 5 (図 8 5 中 d 2 5)、d d 3 2 (図 8 5 中 d 3 2) 頃で陽性細胞率が高まることが分かった。純化する時期として、d d 1 1 以降であることがよく、より好ましくは d d 1 8 から d d 3 2 以降で純化するとよいことが確認された (図 8 5)。

[0354] <実施例 2 9 S S E A 1 を指標とした目的外細胞の除去検討>

R x : : V e n u s レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト E S 細胞 (K h E S - 1 株、(非特許文献 3)) を、「S c i e n t i f i c R e p o r t s 4, 3 5 9 4 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては S t e m F i t 培地 (商品名: A K O 3 N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として L a m i n i n 5 1 1 - E 8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0355] 浮遊培養開始時 (分化誘導開始時、d d 0) に S A G 3 0 n M を添加して作製された 2 5 日目の凝集体 (N R) を神経細胞分散液 (W a k o 社) で単一細胞に分散し、A P C が C o n j u g a t e された抗 C D 9 抗体 (B i o L e g e n d 社) に加えて、B V 4 2 1 を C o n j u g a t e した抗 S S E A 1 抗体 (B i o L e g e n d 社) で染色し、F A C S C a n t o I I (B D B i o s c i e n c e 社) を用いて測定し、F l o w J o を用いて解析を行った。

[0356] その結果、凝集体全体では R x 陽性細胞は約 8 7 % であるが、C D 9 陽性細胞をゲーティングしたところ、R x 陽性細胞は 9 4 % まで向上することがわかった。さらに C D 9 陽性でかつ S S E A 1 陰性の細胞をゲーティングしたところ、R x 陽性細胞は約 9 6 % まで向上することがわかった (図 8 6)。

[0357] よって、C D 9 に加えて、S S E A 1 を組み合わせることで、より網膜系の細胞を純化できることがわかった

[0358] <実施例 3 0 C D 9、C D 9 0、C X C R 4、S S E A 1 の組み合わせ検討>

R x : : V e n u s レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト E

S細胞（KHES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0359] 浮遊培養開始時（分化誘導開始時、dd0）にSAG 30nMを添加して作製された25日目の凝集体（NR）200個を神経細胞分散液（Wako社）で単一細胞に分散し、7等分に細胞を分け、次の7条件で表面抗原を4℃で1時間染色した。（1）非染色（Rx::Venusを指標に純化）、（2）抗CD9-APC-Conjugate抗体（BioLegend社）、（3）抗CD90-APC-Conjugate抗体（BD社）、（4）抗CD184（CXCR4）-APC-Conjugate抗体（Miltenyi社）、（5）抗CD9-APC-Conjugate抗体（BioLegend社）及び抗SSEA1-BV421-Conjugate抗体（BioLegend社）、（6）抗CD9-APC-Conjugate抗体（BioLegend社）及び抗CD90-BV421-Conjugate抗体（BioLegend社）、並びに、（7）抗CD90-APC-Conjugate抗体（BD社）及び抗SSEA1-BV421-Conjugate抗体（BioLegend社）を用いて染色した。染色後、ARIA II（BD社）を用いて、図87に示す枠を指標にSortingを実施した。Sortingにより回収した細胞を、MACS Quant10（Miltenyi社）を用いてFACS解析を行い、目的の細胞画分で純化できていることを確認した（図87）。純化後の細胞の集団におけるRx::Venus陽性細胞の割合を測定したところ、Sorting前と比較し、（1）Rx::Venus陽性画分でSortingしたサンプルで最も純度は高かったが、CD9陽性かつSSEA-1陰性の画分で純化したサンプルではRx::Venusで純化したものと遜色なく、Rx::Venus陽性率が高かった（図88、図89）。

[0360] これらのSorting後の細胞をLaminin511-E8コートした24ウェルTranswellに1ウェルあたり 2.0×10^5 細胞播種した。播種時に $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako社)、 300 nM SAG (Enzo社)、 $3 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Wako社)、及び 100 ng/mL FGF8 (Wako社)を添加した。播種後、3～4日に一回培地交換を実施した。

[0361] 再シート化培養開始後1日目及び12日目に蛍光顕微鏡で明視野及び蛍光観察をしたところ、播種後1日目ではいずれの純化後の細胞でもTranswellのメッシュ上に細胞が生着していることが観察された(図90)。さらに12日後の観察では、 $\text{Rx}::\text{Venus}$ 陽性で純化したサンプルでは黒いRPEがいくつか観察されたのに対し、CD9陽性、及びCD9陽性/SSEA1陰性(CD9/SSEA1)の集団、CD9陽性/CD90陽性(CD9/CD90)の集団のCD9で純化しているシートにおいて、黒いRPEは観察されなかった(図91)。

[0362] よって、CD9及びCD9とSSEA1陰性又はCD90陽性の画分でSortingした網膜シートは $\text{Rx}::\text{Venus}$ 陽性でSortingするよりもRPE画分を除去でき、より良好であることが確認された。

[0363] <実施例31 CD9及びSSEA1の発現の経時変化確認>

$\text{Rx}::\text{Venus}$ レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8(商品名、ニッピ社製)を用いた。

[0364] hESC及び、浮遊培養開始時(分化誘導開始時、dd0)にSAG 300 nM を添加して作製されたdd4、dd11、dd18、dd25、dd32、dd46の凝集体(NR)を神経細胞分散液(Wako社)で単一細胞に分散し、抗CD9-APC-Conjugate抗体(BioLegend社)

nd社)及び抗SSEA1-BV421-Conjugate抗体(BioLegend社)で染色しFACS解析を行った。FACSCantoII(BD Bioscience社)を用いて測定し、FlowJoを用いて解析を行った。

[0365] その結果、hESCにおいて、CD9は陽性でかつSSEA1は陰性であるが、分化開始後4日目になると、CD9は陰性でかつSSEA1は陽性となる(図92)。さらに分化11日目からCD9陽性でかつSSEA1陰性の集団が現れ始め、Day18、Day25と目的の集団の割合が増殖することがわかった。Day32やDay46においても発現し続けていることも測定された。

[0366] よって、純化する時期として、dd11(図92中d11)以降であることがよく、dd18(図92中d18)から、dd32(図92中d32)以降で純化するとよいことが確認された(図92)。

[0367] このようにしてCD9及びSSEA1を指標にSortingして10 μ M Y-27632、3 μ M CHIR99021、300nM SAG及び100ng/mL FGF8を添加して、作製された12ウェルトランズウェル上の網膜シートを浮遊培養開始後48及び62日目にメスやハサミを用いてシートを回収後、マイクロシザーズを用いて移植用グラフトを長く切り出し、免疫不全網膜不全ラット(SD Foxn)の網膜下への移植を実施した(図無)。

[0368] よって、CD9及びSSEA1でSortingした細胞を用いて製造した網膜シートは移植可能であることが確認された。

[0369] <実施例32 ゼラチンを用いたRPE-網膜組織複合化検討>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞(KhES-1株、(非特許文献3))を、「Scientific Reports 4, 3594 (2014)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地(商品名: AK03N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足

場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

- [0370] 実施例1で作製された浮遊培養開始後18～30日目の凝集体（NR）をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、12ウェルTranswellに1ウェルあたり4.0～8.0×10⁵細胞播種した。播種時、NucTO培地にY-27632及びSAG、CHIR99021を添加した。その後、Y-27632及びSAG、CHIR99021を含まないNucTO培地で3～4日に一回培地交換を実施し、1カ月以上培養を行った。
- [0371] 実施例1で作製された浮遊培養開始後80日以降のRPEも同時に分化された凝集体をLaminin511-E8でコートしたディッシュにDME M（SIGMA社）及びF12 Ham（SIGMA社）培地にB27（Gibco社）、L Glutamin, 10ng/mL FGF2、SB431542を添加した培地に播種し、培養した。RPEが接着後、増殖し広がってきたら、RPEのみを1mLのチップを用いて削り取り、別のLaminin511-E8でコートしたディッシュに播種し、純化を行った。その後、拡大培養した後、Laminin511-E8でコートした12ウェルTranswellに1.0×10⁶細胞のRPEを播種し、3～4日に1回培地交換を実施し、1カ月以上培養を行った。
- [0372] 上記のようにして培養されたRPEシートとシート状網膜組織の接合作業をBeMatrix LS-Wゼラチン（新田ゼラチン社）を用いて行った。具体的な操作としては、ピンセットやハサミを用いてTranswellからそれぞれのシートを回収し、10%（w/v）のゼラチンでシート状網膜組織、RPEシートをなじませた後、20%ゼラチンでなじませ、最終的に30%のゼラチンを添加し、シート状網膜組織とRPEシートを接着させる。接着後4℃に急冷し、20分間インキュベートすることで固め、回収することでシート状網膜組織とRPEシートを接着させた複合シートを作製した（図93～図98）。

[0373] このようにして作製された網膜組織－RPE複合シートをピンセットとハサミを用いて、切り出しを行った。まず、複合シートを半割した後、切り出した面に沿うように細長く切り出した（図99）。その結果、両シートがゼラチンを介して接着した状態で切り出すことができた。この切り出した複合シートの断面を観察したところ、片方に黒い色素を持ったRPEが、反対側にRx::Venus陽性のシート状網膜組織が確認され、その間にゼラチンが詰まっていることが観察された（図100）。この切り出した複合シートが移植の作業である、吸引、吐出の動作によって、剥がれたりしないか、先端を切り落とした1mLのチップを用いて、吸引・吐出の作業を行った。その結果、複合シートは分離することなく、何度も吸引・吐出することができた（図101）。

[0374] よって、シート状網膜組織とRPEシート、及びゼラチンを用いることによって、移植可能な、網膜組織－RPE複合シートを作製することができたことがわかった。

[0375] <実施例33 フィブリンを用いたRPE－網膜組織複合化検討>

Rx::Venusレポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒトES細胞（KHES-1株、（非特許文献3））を、「Scientific Reports 4, 3594（2014）」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地（商品名：AK03N、味の素社製）、フィーダー細胞に代わる足場としてLaminin511-E8（商品名、ニッピ社製）を用いた。

[0376] 実施例1で作製された浮遊培養開始後18～30日目の凝集体（NR）をPBSにて洗浄し、神経細胞分散液（Wako社製）を添加した。37℃でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、12ウェルTranswellに1ウェルあたり4.0～8.0×10⁵細胞播種した。播種時、NucT0培地にY-27632及びSAG、CHIR99021を添加した。その後、Y-27632及びSAG、CHIR99021を含まないNucT0培地で3～4日に一回培地交換を実施し、1カ月以上培養を

行った（図102）。

[0377] 実施例1で作製された浮遊培養開始後80日以降のRPEも同時に分化された凝集体をiMatrix511でコートしたディッシュにDMEM（SIGMA社）及びF12 Ham（SIGMA社）培地にB27（Gibco社）、L Glutamin, 10ng/mL FGF2、SB431542を添加した培地に播種し、培養した。RPEが接着後、増殖し広がってきたら、RPEのみをチップを用いて削り取り、別のiMatrix511でコートしたディッシュに播種し、純化を行った。その後、拡大培養した後、iMatrix511でコートした12ウェルTranswell 1、 0×10^6 細胞のRPEを播種し、3～4日に一回培地交換を実施し、1カ月以上培養を行った（図102）。

[0378] 上記のようにして培養されたシート状網膜組織とRPEシートの接着作業をボルヒール組織接着用（帝人ファーマ社）を用いて行った。具体的な操作としては、ピンセットやハサミを用いてTranswellからそれぞれのシートを回収し、シート状網膜組織にFibrinogenを100 μ L、RPEシートにThrombinを100 μ L添加し、なじませた後、除去した（図103～104）。再度、シート状網膜組織にFibrinogenを100 μ L、RPEシートにThrombinを100 μ L添加した（図104）。RPEシートを培養皿の上にApical側が上側に、メッシュ側を培養皿側に置き、シート状網膜組織をApical面がRPE側にむくように上から乗せた（図105）。接着後室温で5分間インキュベートすることで固め、回収することで接着させたシートを作製した（図106～107）。このようにして作製された網膜組織－RPE複合シートをピンセットを用いて裏返し、下側にシート状網膜組織、上側に網膜色素上皮シートが向くように置き、観察した（図108）。また、接着させていたトランズウェルのメッシュをはいた（図109）。

[0379] よって、シート状網膜組織とRPEシート、及びフィブリンを用いることによって、網膜組織－RPE複合シートを作製することができることがわか

った。

[0380] <実施例 3 4 セルシフターを用いた 2 つのシート間の不要なゼラチンの除去の検討>

実施例 3 2 で検討した複合化したシートでは、二つのシートの間には多くのゼラチンが含まれて厚くなることがわかった。そこで、複合化工程時に、二つのシートの間には不要なゼラチンを押し出して除去できるように、ゼラチンが逃げる通り道を作った複合化デバイスの検討を行った。

[0381] スライドガラス上に、シリコンシートを用いて、通り道が 2 つ、4 つ、5 つでかつ堤防状にしたものを作成し、ゼラチンを間に添加した 2 枚のセルシフター (Cell Seed 社) を用いて、上から押し出して、ゼラチンが流れ出るか観察した。

[0382] その結果、流路を 5 つにし、堤防状にシリコンシートをのせたデバイスで最も余分なゼラチンが流れ出ることがわかった (図 1 1 0)。

[0383] <実施例 3 5 温度感受性培養皿上で平面化シートを作製し、剥離・移植検討>

R x : : V e n u s レポーター遺伝子を持つように遺伝子改変したヒト E S 細胞 (K h E S - 1 株、(非特許文献 3)) を、「Scientific Reports 4, 3 5 9 4 (2 0 1 4)」に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件下で培養した。フィーダーフリー培地としては S t e m F i t 培地 (商品名: A K 0 3 N、味の素社製)、フィーダー細胞に代わる足場として L a m i n i n 5 1 1 - E 8 (商品名、ニッピ社製) を用いた。

[0384] 実施例 1 で作製された D a y 1 8 ~ 3 0 日の凝集体 (N R) を P B S にて洗浄し、神経細胞分散液 (W a k o 社製) を添加した。3 7 ° C でインキュベート後、ピペティングにより単一細胞へ分散し、L a m i n i n 5 1 1 - E 8 コーティングした 2 4 ウェルの 7 段階の剥離度の異なる温度感受性培養皿 (C e l l s e e d 社) に $8.0 \times 10^5 \text{ cells/well}$ で細胞を播種した。3 ~ 4 日に一回培地交換を実施し、播種後 3 0 日以降でシートが厚みをもって形成された後、室温に下げて、2 時間インキュベートし、観察

した。その結果、7段階の剥離度の温度感受性培養皿のうち、2b、2c、3、4と複数のウェルにおいて、網膜シートが室温にすることで剥離できることが観察された（図111）。

[0385] よって、温度感受性培養皿で培養することで、網膜シートを回収できることがわかった。

[0386] このようにしてRx::Venusを指標にSortingして10 μ M Y-27632、3 μ M CHIR99021、300nM SAG及び100ng/mL FGF8を添加して、作製された温度感受性培養皿上の網膜シートを浮遊培養開始後62日目に4℃で1時間インキュベートして回収後、マイクロシザーズを用いて移植用グラフトを長く切り出し、免疫不全網膜不全ラット（SD Foxn）の網膜下への移植を実施した（図無）。

[0387] よって、温度感受性培養皿上で培養した網膜シートは移植可能であることが確認された。

請求の範囲

- [請求項1] 上皮構造を有する網膜組織の製造方法であって、
分散された網膜系細胞集団を、W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地中で浮遊培養又は接着培養することを含み、
前記網膜系細胞集団が、網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含む、製造方法。
- [請求項2] 前記W n t シグナル伝達経路作用物質が、C H I R 9 9 0 2 1、B l O、W n t 2 b 及びW n t 3 a からなる群から選択される1以上の物質である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記培地が、R O C K 阻害剤、S H H シグナル伝達経路作用物質及びF G F シグナル伝達経路作用物質からなる群から選択される1以上の物質をさらに含む、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記R O C K 阻害剤が、Y - 2 7 6 3 2、F a s u d i l (H A 1 0 7 7) 及びH - 1 1 5 2 からなる群から選択される1以上の物質である、請求項3に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記S H H シグナル伝達経路作用物質が、S A G、P M A 及びS H H からなる群から選択される1以上の物質である、請求項3又は4に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記F G F シグナル伝達経路作用物質が、F G F 2、F G F 4 及びF G F 8 からなる群から選択される1以上の線維芽細胞増殖因子である、請求項3～5のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記W n t シグナル伝達経路作用物質を含む培地中で接着培養することを含み、前記上皮構造を有する網膜組織が、シート状網膜組織である、請求項1～6のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記接着培養が、細胞外マトリクス及び／又は温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器を用いて行われる、請求項7に記載の製造方法。
- [請求項9] 前記培養容器の培養面が、前記温度感受性ポリマーでコーティング

され、前記温度感受性ポリマーの上面が、前記細胞外マトリクスでコーティングされる、請求項 8 に記載の製造方法。

[請求項10] 前記細胞外マトリクスが、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル及びビトロネクチンからなる群から選択される 1 以上の物質である、請求項 8 又は 9 に記載の製造方法。

[請求項11] 前記温度感受性ポリマーによりコーティングされた培養容器を、該温度感受性ポリマーの性質が変化する温度にさらすことにより、前記シート状網膜組織を該培養容器からはがす工程をさらに含む、請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項12] 網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される 1 種以上の細胞を含む細胞凝集体を分散させて、前記分散された網膜系細胞集団を得る工程を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項13] 多能性幹細胞を分化させて、前記網膜前駆細胞及び視細胞前駆細胞からなる群から選択される 1 種以上の細胞を含む細胞凝集体を得る工程を含む、請求項 12 に記載の製造方法。

[請求項14] 前記分散された網膜系細胞集団を浮遊培養又は接着培養する前に、前記分散された網膜系細胞集団中に含まれる網膜前駆細胞の割合を高める工程をさらに含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項15] 網膜色素上皮細胞の混入又は分化が抑制される、請求項 14 に記載の方法。

[請求項16] 前記網膜前駆細胞の割合を高める工程が、前記分散された網膜系細胞集団を、CD9、CD39、CD90及びCXCR4からなる群から選択される 1 以上の抗原に結合する物質と接触させ、当該抗原を発現する細胞集団を得る工程を含む、請求項 14 又は 15 に記載の製造方法。

[請求項17] 前記網膜前駆細胞の割合を高める工程が、前記分散された網膜系細

胞集団を、さらにSSEA1、CD66b、CD69及びCD84からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させ、当該抗原の発現量が基準値以下である細胞集団を得る工程を含む、請求項16に記載の製造方法。

[請求項18] 前記網膜前駆細胞の割合を高める工程が、以下の工程を含む、請求項14～17のいずれか一項に記載の製造方法：

(1) 多能性幹細胞をShhシグナル伝達経路作用物質、ATP及びA2A受容体作用物質からなる群から選択される1以上の存在下で培養し、細胞凝集体を製造する工程、

(2) 細胞凝集体を網膜前駆細胞へ分化誘導させる工程、

(3) 細胞凝集体を分散させ、CD39に結合する物質と接触させる工程。

[請求項19] 前記網膜前駆細胞及び／又は前記視細胞前駆細胞が、前記網膜系細胞集団に含まれる全細胞数の50%以上を占める、請求項1～18のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項20] 前記網膜前駆細胞及び／又は前記視細胞前駆細胞が、前記網膜系細胞集団に含まれる全細胞数の80%以上を占める、請求項1～18のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項21] 前記浮遊培養又は接着培養の開始時から、前記分散された網膜系細胞集団を、前記Wntシグナル伝達経路作用物質を含む培地で培養する、請求項1～20のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項22] 前記上皮構造において、細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっている、請求項1～21のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項23] 浮遊培養又は接着培養によって得られた上皮構造を有する網膜組織を、移植に必要な大きさに切り出す工程をさらに含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項24] 前記上皮構造が、多層構造である、請求項1～23のいずれか一項に記載の製造方法。

- [請求項25] 多層構造を有する網膜系細胞層からなるシート状網膜組織であって、
- (1) 当該多層構造を有する網膜系細胞層が基底面及び頂端面の極性を有し、
 - (2) 前記多層構造を有する網膜系細胞層が、網膜前駆細胞、視細胞前駆細胞及び視細胞からなる群から選択される1種以上の細胞を含み、
 - (3) 前記網膜系細胞層の各層において、細胞の向きが層方向に対して凡そ垂直方向になっており、かつ、
 - (4) 直径が8 mm以上である、シート状網膜組織。
- [請求項26] 前記多層構造を有する網膜系細胞層が、前記網膜系細胞層に接合しているシート状網膜色素上皮細胞をさらに含み、前記網膜系細胞層と前記シート状網膜色素上皮細胞とはそれぞれの表面の接線方向が凡そ平行しており、前記網膜系細胞層の頂端面と前記シート状網膜色素上皮細胞の頂端面とが向き合っており、かつ、前記網膜系細胞層と前記シート状網膜色素上皮細胞とは両者の間に存在する接着因子により接合している、請求項25に記載のシート状網膜組織。
- [請求項27] 前記接着因子が細胞外マトリクス又はハイドロゲルである、請求項26に記載のシート状網膜組織。
- [請求項28] 前記接着因子が、ゼラチン、フィブリン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、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及びエンタクチンから選択される1以上の物質である、請求項27に記載のシート状網膜組織。
- [請求項29] 前記接着因子が、ゼラチン又はフィブリンである、請求項27に記載のシート状網膜組織。
- [請求項30] 請求項25～29のいずれか一項に記載のシート状網膜組織を含む、医薬組成物。
- [請求項31] 請求項25～29のいずれか一項に記載のシート状網膜組織を、移

植を必要とする対象に移植することを含む、網膜系細胞若しくは網膜組織の障害又は網膜組織の損傷に基づく疾患の、治療方法。

[請求項32] 網膜前駆細胞を含む細胞集団を、CD9、CD24、CD29、CD39、CD47、CD49b、CD49c、CD49f、CD57、CD73、CD82、CD90、CD164、CD200、CD340及びCXCR4からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させる工程を含む、細胞集団における網膜前駆細胞の割合を向上させる方法。

[請求項33] 前記網膜前駆細胞を含む細胞集団を、CD9、CD39、CD90及びCXCR4からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させる工程を含む、請求項32に記載の方法。

[請求項34] 前記網膜前駆細胞を含む細胞集団を、SSEA1、CD66b、CD69及びCD84からなる群から選択される1以上の抗原に結合する物質と接触させる工程をさらに含む、請求項32又は33に記載の方法。

[請求項35] CD9、CD39、CD90及びCXCR4からなる群から選択される少なくとも1つの因子が陽性であり、かつ、R $\times$ 陽性である網膜前駆細胞を、細胞集団の全細胞数に対して90%以上含む、細胞集団。

[請求項36] 前記網膜前駆細胞が、SSEA1、CD66b、CD69及びCD84からなる群から選択される1以上の抗原が陰性である、請求項35に記載の細胞集団。