

明 細 書

発明の名称： グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞由来のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、及びその製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 脊髄損傷を含む脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく疾患は、自然に治癒するケースは稀であり、ミエリンを形成するグリア細胞の脱落にとどまらず軸索変性及び細胞体変性を引き起こし深刻化するケースがほとんどである。特に脊髄損傷は、一部の患者においてリハビリテーションの効果が見られるものの、失われた神経軸索やグリア細胞を再生する根本的治療法は無く、アンメットメディカルニーズの高い疾患である。神経再生及び再髄鞘化による治療戦略として、移植による細胞補充が有望視されている。

[0003] 神経前駆細胞を移植する治療を実現すべく多くの研究成果が報告されており、近年多能性幹細胞から神経前駆細胞を分化誘導する方法が知られている（例えば非特許文献1及び2）。また、神経系細胞の培養方法として、無血清培地中で胚様体を形成させ浮遊培養を行う方法も知られている（例えば非特許文献3）。

[0004] 脊髄損傷においてはミエリンの脱落が顕著であることから、その治療にはグリア細胞の中でもオリゴデンドロサイトを多く含有する細胞を移植することが重要であると考えられてきたが（非特許文献4、6及び7）、どの細胞種がどの程度含まれていれば治療効果を示すかについては、これまで明らかにされていない。

[0005] また、細胞移植の実用化に向けては、移植後の細胞の腫瘍化を防ぐため未分化の多能性幹細胞が残存していないことが必須であり、また、感染性因子の混入を避けるため異種細胞由来成分が含まれないことが望ましい。しかしながら、これまで報告されているオリゴデンドロサイト前駆細胞を含む細胞

凝集体（非特許文献4、5及び特許文献1）は、マウス細胞等のフィーダー細胞存在下で製造されているため、フィーダー細胞又はフィーダー細胞由来の異種細胞由来成分が含まれる可能性がある。そのため、より臨床応用に適した、異種細胞由来成分が含まれ得ない製造方法の確立が必要である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表2017-524340号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Fukusumi H et al., Stem Cells International, Volume 2016, Article ID 7235757 (2016)

非特許文献2：Sugai K et al., Molecular Brain, 9:85 (2016)

非特許文献3：Eiraku M et al., Cell Stem Cell 3, 519-532 (2008)

非特許文献4：Douvaras P et al., Nature Protocols 10, 1143-1154 (2015)

非特許文献5：Numasawa-Kuroiwa Y et al., Stem Cell Reports, 2: 648-661 (2014)

非特許文献6：Kawabata S et al., Stem Cell Reports, 6: 1-8 (2016)

非特許文献7：Yasuda A et al., Stem Cells 29, 1983-1994. (2011)

非特許文献8：Nori et al., Stem Cell Reports, 4: 360-73. (2015)

非特許文献9：Choi SS et al., PLoS ONE 9(4) (2014): e92325

非特許文献10：Kunlin Jin et al., J Clin Invest. 2002;110(3):311-319

非特許文献11：Thorsten R Doeppner et al., J Cereb Blood Flow Metab 2011; 31: 1251-1262

非特許文献12：Shigeki Ohta et al., Journal of Cell Science 2012 125: 3210-3220

非特許文献13：Vincent Pons et al., Front. Cell. Neurosci. 2018 12:499

非特許文献14：Jeff A Stogsdill et al., Current Opinion in Neurobiology 2017, 42:1-8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、再生医療に有用な、異種細胞由来成分を含まない、グリア前駆細胞の含有率の高い細胞凝集体を提供すること、及び、異種細胞由来成分が混入する可能性のない、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、病巣におけるミエリンー神経細胞ーアストロサイトの相互作用の低下に着目し、移植に用いる細胞には、オリゴデンドロサイト前駆細胞、神経前駆細胞、及びアストロサイト前駆細胞の全てが含まれることが重要であると考え、iPS細胞からそのような細胞凝集体を分化誘導でき、かつ、より臨床応用に適した分化誘導方法を検討した。
- [0010] 本発明者らは、まず従来の分化誘導方法である非特許文献5に記載の方法について検討した。非特許文献5に記載の方法では、フィーダー細胞であるマウス細胞上でiPS細胞を維持培養している。すなわち、異種細胞由来成分を含有する培地を用いてiPS細胞を分化誘導しているため、得られたオリゴデンドロサイト前駆細胞を含む細胞凝集体は異種細胞由来成分を含有する可能性がある。一方、臨床応用には、異種細胞由来成分を可能な限り排除することが望まれていた。そこで、本発明者らは、フィーダー細胞非依存の、すなわち、フィーダーフリーiPS細胞から、異種細胞由来成分不含の培地を使用してオリゴデンドロサイト前駆細胞を含む細胞凝集体の分化誘導方法を開発すべく鋭意検討を行った。
- [0011] 本発明者らは、異種細胞由来成分を含まない未分化維持培地で、フィーダー細胞非存在下で培養されたフィーダーフリーiPS細胞を用い、非特許文献5に記載の方法を参照して分化誘導を試みた。その結果、iPS細胞の細胞株によっては、胚様体（Embryoid Body；以下「EB」と略す場合がある）を形成できない場合があり、また、最終的にオリゴデンドロサイトへの分化能を有さない細胞凝集体へと誘導される確率が高いことが判

明し、この分化誘導方法は不安定であることが示唆された。

[0012] そこで、EBを形成する方法を検討した結果、培養方法を無血清凝集浮遊培養法 (Serum-Free Embryonic Body quick; 以下「SFE Bq法」と略す場合がある) に変更するとともに、分化誘導の過程で、特定の培地と分化誘導剤との組合せを採用することにより、安定的にEBを形成できるとともに、オリゴデンドロサイトへの分化能を有する、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体 (ニューロスフェア) を得ることができた。当該細胞凝集体は、障害モデル動物に移植された場合に治療効果を示すことも分かった。すなわち、本発明者らは、異種細胞由来成分を含まない、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体が大量に製造可能な製造方法確立することに初めて成功した。

[0013] すなわち、本発明は以下に関する。

[1]

グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法であって、以下の工程：

(1) 1以上のSMA Dシグナル伝達阻害剤及び1以上のW n tシグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地中で、フィーダー細胞非存在下、多能性幹細胞を5日間～10日間浮遊培養することにより、細胞凝集体を形成させる工程、

(2) (1)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含む胚様体形成培地中で、浮遊培養する工程、

(3) (2)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及び1以上のS H Hシグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地又は神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程、並びに

(4) (3)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含まず、1以上のS H Hシグナル伝達活性化剤を含む神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程

を含み、更に以下の工程：

(5) (4)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及びS H Hシグナル伝

達活性化剤を共に含まない神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程を含んでいてもよい、製造方法。

[2]

(1)の工程において、多能性幹細胞を、複数の均一な形状の孔を有する培養容器を用いて培養する、[1]に記載の製造方法。

[3]

(1)の工程において、(1)の工程開始時に比べて、以下の条件：

- 1) SOX1、PAX6、HES4及びHES5のうち少なくとも1つのRNAの発現量が100倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、
- 2) OCT3/4のRNAの発現量が200分の1以下に低下した細胞凝集体が得られること、並びに
- 3) NANOGのRNAの発現量が400分の1以下に低下した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(1)の工程を持続してから、(2)の工程が開始される、[1]又は[2]に記載の製造方法。

[4]

(2)の工程において、(2)の工程開始時に比べて、以下の条件：

- 1) ASCL1、DCX、HEY1、ZBTB20、 β III tubulin、ELAVL3及びSLIT1のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに
- 2) HOXB3、HOXA4、HOXB4、HOXB6及びHOXB8のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(2)の工程を持続してから、(3)の工程が開始される、[1]～[3]のいずれかに記載の製造方法。

[5]

(2)の工程が4日間～11日間行われる、[1]～[4]のいずれかに記載の製造方法。

[6]

(1) 及び (2) の工程において、酸素濃度が3%～10%である、[1]～[5] のいずれかに記載の製造方法。

[7]

(3) の工程において、(3) の工程開始時に比べて、以下の条件：

1) HEY2、NKX6.2 及び NKX2.2 のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに

2) OLIG1 及び／又は OLIG2 のRNAの発現量が10倍以上上昇した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(3) の工程を持続してから、(4) の工程が開始される、[1]～[6] のいずれかに記載の製造方法。

[8]

(3) の工程が4日間～11日間行われる、[1]～[7] のいずれかに記載の製造方法。

[9]

(4) の工程において、(4) の工程開始時に比べて、以下の条件：

1) NFIA、NFI B、SLC1A3、S100B 及び FABP7 のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が10倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに

2) PAX6 のRNAの発現量が5倍以下に低下した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(4) の工程を持続してから、(5) の工程が開始される、[1]～[8] のいずれかに記載の製造方法。

[10]

(4) の工程が4日間以上行われる、[1]～[9] のいずれかに記載の製造方法。

[11]

(4) の工程において、当該工程開始時に(3) の工程で得られた細胞凝

集体を分散させてから、分散された細胞を浮遊培養することにより再度細胞凝集体を形成させる、[1]～[10]のいずれかに記載の製造方法。

[12]

上記方法が(5)の工程を含み、(5)の工程において、当該工程開始時に(4)の工程で得られた細胞凝集体を分散させてから、分散された細胞を5日間～100日間浮遊培養することにより再度細胞凝集体を形成させる、[1]～[11]のいずれかに記載の製造方法。

[13]

上記方法が(5)の工程を含み、(5)の工程において、O4抗原、NG2、OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPから選択される1以上のマーカーが発現するまで、(5)の工程を持続する、[1]～[12]のいずれかに記載の製造方法。

[14]

上記方法が(5)の工程を含み、(5)の工程において、細胞凝集体を培養する培地中において、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、GRO- α 、LIF、IFN- γ 及びTRAILからなる群から選択される1以上のタンパク質が検出されるまで(5)の工程を持続する、[1]～[12]のいずれかに記載の製造方法。

[15]

SMADシグナル伝達阻害剤が、TGF β 阻害剤及びBMP阻害剤の2種類である、[1]～[14]のいずれかに記載の製造方法。

[16]

TGF β 阻害剤が、SB431542、A83-01、SB202190、SB505124、NPC30345、SD093、SD908、SD208、LY2109761、LY364947、LY580276、Galunisertib (LY2157299)、LY3200882、SB525334、GW788388、RepSox、及びLefty-1からな

る群から選択される1以上である、[15]に記載の製造方法。

[17]

BMP阻害剤が、Noggin、LDN-193189、LDN-212854、Dorsomorphin、K02288、Chordin及びFollistatinからなる群から選択される1以上である、[15]又は[16]に記載の製造方法。

[18]

Wntシグナル伝達活性化剤が、GSK3 β 阻害剤、Wnt3a、Wntアゴニスト、Dkk及びR-Spondinからなる群から選択される1以上である、[1]～[17]のいずれかに記載の製造方法。

[19]

Wntシグナル伝達活性化剤が、CHIR99021、BIO、Kenpaullone、SB216763及びL803-mtsからなる群から選択される1以上である、[1]～[18]のいずれかに記載の製造方法。

[20]

SHHシグナル伝達活性化剤が、Purmorphamine、SAG、SHHタンパク質及びSHH断片からなる群から選択される1以上である、[1]～[19]のいずれかに記載の製造方法。

[21]

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[1]～[20]のいずれかに記載の製造方法。

[22]

多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、[1]～[20]のいずれかに記載の製造方法。

[23]

グリア前駆細胞を含む細胞凝集体が、以下の特徴：

(a) オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含むこと、

(b) 脊髄領域マーカーを発現していること、及び

(c) フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の成分を含まないことを有する、[1]～[22]のいずれかに記載の製造方法。

[24]

オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の製造方法であって、[1]～[23]のいずれかに記載の製造方法により製造された、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を、成熟化培地を用いて5日間～60日間培養する工程を含む、製造方法。

[25]

オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団が、

(i) O4抗原、GalC、MBP、APC、GST π 、CNP、PLP、OLIG2、SOX10、PDGFR α 及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、

(ii) β III tubulin、MAP2及びELAVL3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、並びに

(iii) SLC1A3、S100B、AQP4、GFAP及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む、[24]に記載の製造方法。

[26]

成熟化培地が、T3、NT-3及びLIFのうち少なくとも1つを含む培地である、[24]又は[25]に記載の製造方法。

[27]

成熟化培地が、さらにCNTFを含む、[26]に記載の製造方法。

[28]

[1]～[23]のいずれかに記載の製造方法により得られた、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体。

[29]

以下の特徴：

(a) オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含むこと、

(b) 脊髄領域マーカーを発現する細胞を含むこと、

(c) フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の成分を含まないこと、及び

(d) オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有すること

を有する、グリア細胞前駆細胞を含む細胞凝集体。

[30]

脊髄領域マーカーがHOXB3、HOXB4、HOXB6及びHOXD8からなる群より選択される1以上のマーカーである、[29]に記載の細胞凝集体。

[31]

さらに、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.1及びNKX6.2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む、[29]又は[30]に記載の細胞凝集体。

[32]

以下の特徴：

(I) NF1A、NF1B、SOX9、HEY1、HEY2、ZBTB20、SLC1A3、S100B、MLC1、SLIT1、TIMP3、SPARCL1、GFAP及びAQP4からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

(II) OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRIK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPからなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

(III) DCX、 β III tubulin、MAP2、ELAVL3、NTRK2、GRIA2、PTPRO及びEPHA3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

(IV) SOX1、SOX2、NESTIN、MEIS1、MEIS2、DLL3及びASCL1からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

並びに、

(V) (i) O4抗原、GalC、MBP、APC、GST π 、CNP、PLP、OLIG2、SOX10、PDGFR α 及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、

(ii) β III tubulin、MAP2及びELAVL3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、及び

(iii) SLC1A3、S100B、AQP4、GFAP及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有すること

を有する、[29]～[31]のいずれかに記載の細胞凝集体。

[33]

さらに、(VI) C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む、[29]～[32]のいずれかに記載の細胞凝集体。

[34]

さらに、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、GRO- α 、LIF、IFN- γ 及びTRAILからなる群より選択される1以上のマーカーを発現又は分泌する細胞を含む、[29]～[33]のいずれかに記載の細胞凝集体。

[35]

[24]～[27]のいずれかに記載の製造方法により得られた、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団。

[36]

[28]～[34]のいずれかに記載の細胞凝集体、又は[35]に記載の細胞集団を有効成分として含有する、医薬組成物。

[3 7]

[2 8] ～ [3 4] のいずれかに記載の細胞凝集体、又は [3 5] に記載の細胞集団の有効量を、移植を必要とする対象に移植することを含む、脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患の治療方法。

[3 8]

脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患が急性期、亜急性期又は慢性期の脊髄損傷である、[3 7] に記載の治療方法。

[3 9]

脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患の治療における使用のための、[2 8] ～ [3 4] のいずれかに記載の細胞凝集体、又は [3 5] に記載の細胞集団。

[4 0]

脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患が急性期、亜急性期又は慢性期の脊髄損傷である、[3 9] に記載の細胞凝集体、又は細胞集団。

[4 1]

被験物質の毒性又は薬効を評価するための方法であって、[2 8] ～ [3 4] のいずれかに記載の細胞凝集体、又は [3 5] に記載の細胞集団に上記被験物質を接触させ、上記被験物質が上記細胞凝集体又は上記細胞集団に及ぼす影響を検出又は定量することを含む、評価方法。

[4 2]

C 1 O R F 6 1 及び S E R P I N E 2 からなる群より選択される 1 以上のマーカーが発現しているか否かを指標として、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体が移植に適していることを判別する方法。

[4 3]

C 1 O R F 6 1 及び S E R P I N E 2 からなる群より選択される 1 以上の

遺伝子、当該遺伝子によりコードされるタンパク質、及びこれらの断片を検出することを含む、グリア前駆細胞若しくはグリアへの分化指向性が高い神経幹細胞の同定方法。

発明の効果

[0014] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法によれば、フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の異種細胞由来成分を含まない、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を製造することができる。このグリア前駆細胞を含む細胞凝集体をさらに培養すると、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団を製造することができる。本発明の製造方法によって得られた細胞凝集体又は細胞集団は、細胞治療用移植用材料として有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1A] 1における、分化35日目と49日目のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の明視野像を示す画像である。

[図1B]実施例1における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の終末分化14日後の蛍光免疫染色の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図2]グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法のプロトコールの一例を示す図である。

[図3A]実施例2における分化誘導過程の遺伝子発現解析結果を示す図である。

[図3B]実施例2における分化誘導過程の遺伝子発現解析結果を示す図である。

[図3C]実施例2における分化誘導過程の遺伝子発現解析結果を示す図である。

[図3D]実施例2における分化誘導過程の遺伝子発現解析結果を示す図である。

[図4A]実施例3における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の蛍光免疫染色の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図4B]実施例3における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を構成する全細胞数当たりのOLIG2陽性細胞及びNFIA陽性細胞の割合の解析結果を示す図である。

[図5]実施例4における、Gliogenic NPC及びNeurogenic NPCにおける各クラスターに属す細胞数の割合を示す図である。

[図6A]実施例4における、Gliogenic NPC及びNeurogenic NPCにおける1細胞あたりの各遺伝子の発現量の分布を示す図である。

[図6B]実施例4における、Gliogenic NPC及びNeurogenic NPCにおける1細胞あたりの各遺伝子の発現量の分布を示す図である。

[図7A]実施例5における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の終末分化31日後の蛍光免疫染色の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図7B]実施例5における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の終末分化後31日後におけるO4陽性細胞、GFAP陽性細胞及びTuj1陽性細胞の割合を示す図である。

[図8]実施例6における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の終末分化前後における各遺伝子発現量の相対値を示す図である。

[図9]実施例8における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を亜急性期脊髄損傷モデルマウスに移植した後のBMSスコアリングによる後肢運動機能評価結果を示す図である。

[図10]実施例9における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を亜急性期脊髄損傷モデルマウスに移植した後のロータロッドテストによる協調運動評価の結果を示す図である。

[図11A]実施例10における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を亜急性期脊髄損傷モデルマウスに移植した後の歩幅による歩様パターン評価の結果を示す図である。

[図11B]実施例10における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を亜急性期脊

髄損傷モデルマウスに移植した後の進行方向に対して肢をつく角度による歩様パターン評価の結果を示す図である。

[図12]実施例11における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を亜急性期脊髄損傷モデルマウスに移植した後のキネマティクス解析による関節の動きを評価した結果を示す図である。(A)は、後肢が地面から離れてから接地するまでの軌跡の代表例を示す。(B)は歩行周期1周期における股関節、膝関節、足関節、足趾の関節角度変化を示す。

[図13]実施例12における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を亜急性期脊髄損傷モデルマウスに移植した後の組織切片観察の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。(A)はSTEM121抗体を用いて蛍光免疫染色した矢状切片の結果であり、(B)はHE染色した矢状切片の結果であり、(C)は抗HNA抗体を用いて蛍光免疫染色した(1)損傷中心部から頭側4mm、(2)損傷中心部、(3)損傷中心部から尾側4mmの横断切片のそれぞれの結果である。

[図14A]実施例12における、ヒト特異的マーカーと各種マーカーとで蛍光免疫共染色した矢状切片の蛍光顕微鏡画像である。

[図14B]実施例12における、矢状切片におけるHNA陽性移植細胞中の各種陽性細胞率を示す図である。

[図15]実施例12における、Tuj1抗体、抗HNA抗体と抗マウス特異的Bassoon(Bsn)及び抗ヒトSynaptophysin(hSyn)抗体を用いて蛍光免疫染色した矢状切片の蛍光顕微鏡画像である。

[図16A]実施例12における、損傷中心部から頭側(Rostral)0.48mm、損傷中心部(Epicenter)及び損傷中心部から尾側(Caudal)0.48mmのそれぞれのLFB染色画像ある。

[図16B]実施例12における、LFB染色した横断切片における損傷中心部から頭尾側0.96mmまでの髄鞘組織のLFB陽性領域を定量した結果を示す図である。

[図17]実施例12における、STEM121抗体と抗MBP抗体を用いて蛍

光免疫染色した横断切片の蛍光顕微鏡画像である。

[図18]実施例12における、免疫電子顕微鏡法によりSTEM121抗体反応部位を検出した横断切片の電子顕微鏡画像である。金コロイド粒子を標識した二次抗体により検出した、STEM121抗体反応部位（黒い点）を矢印で示す。（A）及び（B）はそれぞれ異なる視野を撮像した画像である。

[図19]実施例14における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を慢性期脊髄損傷モデルラットに移植した後のBBBスコアリングによる後肢運動機能評価結果を示す図である。

[図20]実施例15における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を慢性期脊髄損傷モデルラットに移植後12週での歩様パターン評価の結果を示す図である。（A）は歩幅を、（B）は進行方向に対して肢をつく角度を示す。

[図21]実施例16における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を慢性期脊髄損傷モデルラットに移植した後の組織切片観察の結果を示す。（A）はHE染色した矢状切片の結果であり、（B）は抗HNA抗体を用いて蛍光免疫染色した矢状切片の結果である。

[図22]実施例16における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を慢性期脊髄損傷モデルラットに移植した後の組織切片観察の結果を示す。（A）は抗HNA抗体と抗OCT3/4抗体を用いて、（B）は抗HNA抗体と抗Hu抗体を用いて、（C）は抗HNA抗体と抗GFAP抗体を用いて、（D）は抗HNA抗体と抗APC抗体を用いて、それぞれ蛍光免疫染色した矢状切片の結果である。

[図23]実施例17における、細胞播種後1日目、8日目と14日目のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の明視野像を示す画像である。

[図24]実施例17における、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の終末分化28日後のO4抗体、抗GFAP抗体、TuJ1抗体を用いて蛍光免疫染色した蛍光顕微鏡画像である。（A）は培養8日後から終末分化を開始した細胞凝集体であり、（B）は培養14日後から終末分化を開始した細胞凝集体である。

発明を実施するための形態

[0016] 〔定義〕

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

[0017] 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。

[0018] 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*も多能性幹細胞に含まれる。

[0019] 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、胚盤胞期の内部細胞塊をフィーダー細胞上又はFGF2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、US6,280,71

8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(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。

[0020] 本明細書において「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(reprogramming)することにより、多能性を誘導した細胞である。

[0021] 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(Cell, 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(Cell, 2007, 131(5), pp. 861-872; Science, 2007, 318(5858), pp. 1917-1920; Nat. Biotechnol., 2008, 26(1), pp. 101-106)。

[0022] 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OCT3/4、SOX2、KLF4、MYC(c-MYC、N-MYC、L-MYC)、GLIS1、NANOG、SALL4、LIN28、ESRRB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)OCT3/4、SOX2、KLF4、及びMYC(c-MYC又はL-MYC)、(2)OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28及びL-MYC(Stem Cells, 2013; 31: 458-466)を挙げることが出来る。

[0023] 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(Science, 2013, 341, pp. 651-654)。

[0024] また、株化された人工多能性幹細胞を入手する事も可能であり、例えば、

京都大学で樹立された201B7細胞、201B7-Ff細胞、253G1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞、1231A3細胞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QHJ101s04細胞が、京都大学より入手可能である。

[0025] 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。

[0026] 本明細書において多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であり、好ましくはげっ歯類（例、マウス、ラット）又は霊長類（例、ヒト、サル）の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞、更に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。

[0027] 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ことができる。

[0028] 本明細書において「グリア（Glia）」は、「グリア細胞（Glial cell）」、「神経膠細胞」とも呼ばれ、神経系を構成する神経細胞ではない細胞の総称であり、ヒトの脳では細胞数で神経細胞の10倍以上存在しているの見積もられている。グリア細胞としては、アストロサイト（Astrocyte）、オリゴデンドロサイト（Oligodendrocyte）等が挙げられ、これらは神経組織において、神経細胞の周囲に存在しており、様々な機能を担っている。

[0029] 本明細書において「マーカー」は、細胞に存在する物質であって、その存在や存在量に基づいて、当該細胞の種類若しくは性質等を同定若しくは判別することができる物質を意味する。マーカーとして、具体的には、mRNA、当該mRNAによりコードされるタンパク質及び糖鎖、並びにこれらの断片が挙げられる。

[0030] 本明細書において「分化マーカー」は、特定の分化段階にある細胞の分化の程度（レベル）を検出するためのマーカーを意味する。

- [0031] 本明細書において「グリア前駆細胞」は、グリア細胞へ分化する能力を有する細胞を意味し、例えば、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が挙げられる。
- [0032] 本明細書において「オリゴデンドロサイト」は、中枢神経系に存在するグリア細胞の一種であり、ニューロン（神経細胞）の軸索の周りに巻き付くように存在し、ミエリン（髄鞘）を形成することによって、神経細胞間のシグナル伝導速度を速める働きを担っている。オリゴデンドロサイトは、オリゴデンドロサイトに特異的に発現するマーカーによって同定することができ、当該マーカーとしては、例えばPLP、GalC、APC、MBP、MAG、MOG、GST- π 、SOX10、O4（オー4）抗原、NG2（CSPG4）及びCNP等が知られており、例えば遺伝子増幅法、*in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織学的手法、フローサイトメトリー解析等を用いて分析することによって、上記mRNA、糖鎖若しくはタンパク質のうち少なくとも1種類を発現する細胞をオリゴデンドロサイトとして判別することが可能である。尚、上記マーカーのうち、アストロサイトでも発現が認められるNG2を指標とする場合には、別のマーカーと併せて同定することが望ましい。
- [0033] 本明細書において「オリゴデンドロサイト前駆細胞」は、オリゴデンドロサイトに分化する能力を有する細胞を意味する。オリゴデンドロサイト前駆細胞の存在は、オリゴデンドロサイト前駆細胞において、有意に発現が認められるマーカーによって特定することができる。オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーとしては、例えばPDGFR α 及びOLIG2等が知られており、例えば遺伝子増幅法、*in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織染色法等を用いて分析することによって、上記mRNA若しくはタンパク質のうち少なくとも1種類のマーカーを発現する細胞をオリゴデンドロサイト前駆細胞として判別することが可能である。なお、ミエリンを形成していない未成熟なオリゴデンドロサイトも、オリゴデンドロサイト前駆細胞に含まれる。

[0034] 本明細書において「アストロサイト」は、中枢神経系に存在するグリア細胞の一種であり、ニューロンを構造的に支える機能や、神経伝達物質やエネルギー及び細胞外イオン濃度を調節することにより、神経伝達の活性化に寄与していると考えられている。また、上記オリゴデンドロサイトに対して、ミエリン形成を促進する物質を供給すると考えられており、神経組織において、ニューロン及びオリゴデンドロサイトとともに重要な機能を担う細胞である。アストロサイトに特異的に発現するマーカーによって同定することができ、当該マーカーとしては、例えばGFAP、S100B、AQP4、NG2及びSLC1A3（GLAST若しくはEAAT1ともいう）等が知られており、例えば免疫組織学的手法を用いて分析することによって、上記mRNA、糖鎖若しくはタンパク質のうち少なくとも1種類を発現する細胞をアストロサイトとして判別することが可能である。尚、上記マーカーのうち、オリゴデンドロサイトでも発現が認められNG2を指標とする場合には、別のマーカーと併せて同定することが望ましい。

[0035] 本明細書において「アストロサイト前駆細胞」は、アストロサイトに分化する能力を有する細胞を意味する。アストロサイト前駆細胞の存在は、アストロサイト前駆細胞において、有意に発現が認められるマーカーによって特定することができる。アストロサイト前駆細胞のマーカーとしては、例えばNF1A、NF1B、SOX9、HEY1、HEY2、FABP7及びZBTB20等が挙げられる。

[0036] 多能性幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化の過程において、まず多能性幹細胞が神経幹細胞（Neural stem cell）に分化し、さらに、オリゴデンドロサイト前駆細胞、そしてオリゴデンドロサイトの順へと分化する。神経幹細胞は多分化能（Multipotency）を有し、神経前駆細胞、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のいずれにも分化可能であるが、オリゴデンドロサイト前駆細胞に分化されると、オリゴデンドロサイトへ分化することが運命づけられる。また、神経前駆細胞へ分化されると、神経細胞へ分化することが運命づけられ、アスト

ロサイト前駆細胞へ分化されると、アストロサイトへ分化することが運命づけられる。

[0037] ここでアストロサイトへ分化することが運命付けられたことは、以下の1以上のマーカー：NFIA、NFI B、SOX9、HEY1、HEY2、ZBTB20、SLC1A3及びS100Bのうちの少なくとも一つを発現しているか否か、好ましくはSOX9、HEY1、HEY2、ZBTB20、SLC1A3及びS100Bのうちの少なくとも一つを発現しているか否かで確認することができる。ここでS100BはS100βともいう。

[0038] 本明細書において神経細胞とは、細胞体、樹状突起及び軸索から構成される神経単位のことを言い、ニューロンとも呼ばれる。神経細胞は、有意に発現するマーカーによって同定することができ、当該マーカーとしては、例えばβIII tubulin、MAP2及びELAVL3等が挙げられる。

[0039] 神経細胞は、他の神経細胞又は刺激受容細胞からの刺激を別の神経細胞、筋又は腺細胞に刺激を伝える機能を有する細胞を意味する。神経細胞は、神経細胞が産生する神経伝達物質の違いにより、セロトニン神経、運動神経等のように分類されるが、本明細書においては神経伝達物質の種類については特に限定しない。

[0040] 本明細書において「神経前駆細胞」は、神経細胞への分化能を有し、神経細胞へ分化することが運命づけられた細胞のことをいい、神経細胞接着分子（NCAM）、ポリシアリル化NCAM、神経マーカー（DCX、βIII tubulin等）等によって同定されうる。

[0041] 本明細書において「神経幹細胞」は、神経前駆細胞への分化能、及びアストロサイト前駆細胞又はオリゴデンドロサイト前駆細胞を含むグリア前駆細胞への分化能を共に有する細胞のことをいい、中間体フィラメントタンパク質（ネスチン、ビメンチン等）、転写因子SOX1、PAX6等の原始的神経外胚葉及び神経幹細胞のマーカー等によって同定されうる。

[0042] 本明細書において、「脊髄領域マーカー」とは、発生段階において、脊髄への分化に伴って発現するマーカーを意味し、具体的には、HOXB3、H

O X B 4、H O X B 6 及び H O X D 8 等の遺伝子又は当該遺伝子がコードするタンパク質等が挙げられる。

[0043] 本明細書において、「腹側領域マーカー」とは、発生段階において、腹側への分化に伴って発現するマーカーを意味し、具体的には、NK X 2. 1、NK X 2. 2、NK X 6. 1 及び NK X 6. 2 等の遺伝子又は当該遺伝子がコードするタンパク質等が挙げられる。

[0044] 本明細書において「細胞凝集体」(C e l l A g g r e g a t e)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されず、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。胚様体もまた、細胞凝集体に含まれる。本明細書において「細胞集団」は、細胞凝集体(スフェア状細胞集団)であってもよく、層状の細胞集団であってもよい。

[0045] 本明細書において「培地」は、動物細胞の培養に通常用いられる培地であればよく、動物細胞が生命を維持することができれば特に限定されないが、好ましくは目的細胞に増殖可能な環境を提供するものである。培地は自ら調製してもよく市販培地を購入して用いてもよい。本明細書において「胚様体形成培地」、「神経・グリア増殖用培地」及び「成熟化培地」は、上記培地を基礎培地としているものであり、それぞれの目的に合った因子等を添加することによって調製することができる。

[0046] 本発明で使用する培地は、移植に適した細胞凝集体を製造するために使用するという観点から、無血清培地であることが好ましい。本発明における「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。本明細書において、精製された血液由来成分、又は、動物組織由来成分(例えば、増殖因子)が混入している培地であっても、無調整又は未精製の血清を含まない限り、無血清培地に含まれる。無血清培地は、適宜、脂肪酸又は脂質、アミノ酸(例えば、非必須アミノ酸)、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機

塩類等を含有してもよい。

- [0047] 本発明で使用される培地には、血清代替物が含まれていてもよい。血清代替物として、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'チオールグリセロール、或いはこれらの均等物等を適宜含有するものを挙げることができる。かかる血清代替物は、例えば、WO 98/30679に記載の方法により調製することができる。血清代替物としては市販品を利用してもよい。かかる市販の血清代替物としては、例えば、Knockout Serum Replacement（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製；以下、KSRと記す場合がある。）、「StemSure（登録商標）Serum Replacement（SSR）」Chemically-defined Lipid concentrated（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、B27サプリメント（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、N2サプリメント（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、ITSサプリメント（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）が挙げられ、好ましくはB27サプリメントが挙げられる。
- [0048] 本発明で使用される培地は、好ましくはゼノフリー培地である。ここで「ゼノフリー」とは、培養対象の細胞の生物種とは異なる生物種由来の成分（異種由来成分、Xenogenic factorともいう）が排除された条件を意味する。無血清培地の一部は、ゼノフリー培地であり得る。
- [0049] 本明細書において、フィーダー細胞とは、多能性幹細胞等の幹細胞を培養するときに共存させる当該幹細胞以外の細胞をいう。フィーダー細胞としては、例えば、マウス線維芽細胞（MEF等）、ヒト線維芽細胞、SNL細胞、STO細胞等が挙げられる。フィーダー細胞は、増殖抑制処理されたフィーダー細胞であってもよい。ここで、増殖抑制処理としては、増殖抑制剤（例えば、マイトマイシンC）処理又はガンマ線照射若しくはUV照射等による処理が挙げられる。
- [0050] 本明細書においてフィーダー細胞由来の成分とは、当該幹細胞には含まれ

ず、フィーダー細胞に含まれる若しくはフィーダー細胞が分泌する成分を意味する。

[0051] 本明細書において、「異種細胞」は、培養対象の細胞とは異なる生物種由来の細胞を意味し、「異種動物細胞」と同義で用いられる。「異種細胞由来成分」は当該異種細胞由来の成分であって、培養対象の細胞には含まれない成分を意味する。

[0052] フィーダー細胞由来の異種細胞由来成分とは、フィーダー細胞が培養対象の細胞とは異なる生物種由来である場合において、当該フィーダー細胞由来の成分であって、培養対象の細胞には含まれない成分を意味する。

具体的な成分としては、少なくとも、塩基配列若しくはアミノ酸配列等が異なるたんぱく質成分、糖及び脂質等が挙げられる。

[0053] 本発明において「浮遊培養」とは、細胞を培地中に浮遊させた状態で生存させることを意味する。本明細書中では、細胞は、単一細胞又は複数の細胞が集まった塊（細胞凝集体又は細胞集団）の状態で浮遊培養される。浮遊培養された細胞は、増殖及び／又は分化する。

[0054] [グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法]

本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法の一態様としては、
（１）１以上のSMA Dシグナル伝達阻害剤及び１以上のW n tシグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地中で、フィーダー細胞非存在下、多能性幹細胞を５日間～１０日間浮遊培養することにより、細胞凝集体を形成させる工程、

（２）（１）で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含む胚様体形成培地中で、浮遊培養する工程、

（３）（２）で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及び１以上のS H Hシグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地又は神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程、並びに

（４）（３）で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含まず、１以上のS H Hシグナル伝達活性化剤を含む神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養す

る工程

を含み、更に以下の工程：

(5) (4) で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及びSHHシグナル伝達活性化剤を共に含まない神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程を含んでいてもよい、
製造方法が挙げられる。

[0055] < (1) の工程 >

(1) の工程において、多能性幹細胞を培養し、胚様体を形成させる。「胚様体 (Embryoid Body ; EB)」とは、多能性幹細胞を浮遊培養することによって形成される三次元の細胞凝集体を意味する。多能性幹細胞を効率よく目的細胞に分化させるためには、分化の途中で形成される胚様体が、目的細胞が含まれる胚葉 (外胚葉、中胚葉又は内胚葉) への分化能を有する細胞を多く含有することが好ましい。例えば、多能性幹細胞を神経細胞やグリア細胞に分化させたい場合、分化途中で形成される胚様体には、外胚葉への分化能を有する細胞が多く含まれることが好ましい。すなわち、本明細書において、胚様体は、好ましくは外胚葉への分化能を有する胚様体である。もっとも、胚様体形成の過程においても多能性幹細胞の分化は開始されており、胚様体は、外胚葉に分類される細胞を含んでいてもよい。

[0056] (1) の工程において、多能性幹細胞は、有効濃度の1以上のSMADシグナル伝達阻害剤及び1以上のWntシグナル伝達活性化剤等の分化誘導因子を含む胚様体形成培地を用いて培養される。(1) の工程において使用される培地は、胚様体形成培地に有効濃度の上記所定の分化誘導因子を混合することによって調製することができる。

[0057] 本明細書において、SMADシグナル伝達阻害剤は、SMAD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、1以上のSMADシグナル阻害剤を適宜組合せて使用してもよい。SMADシグナル伝達阻害剤としては、例えば、SMADシグナルの上流において、SMADのリン酸化を阻害することでSMADシグナル伝達を阻害し得るTGFβス

ーパーファミリーの阻害剤、具体的には、TGF β 阻害剤及びBMP阻害剤が挙げられる。SMADシグナル伝達阻害剤は、TGF β 阻害剤及びBMP阻害剤の2種類を用いることが好ましく、例えば、1以上のTGF β 阻害剤、好ましくは1つのTGF β 阻害剤と、1以上のBMP阻害剤、好ましくは1つのBMP阻害剤とを適宜組合せて使用してもよい。

[0058] 本明細書において、TGF β 阻害剤は、TGF β により媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。TGF β 阻害剤として、例えばTGF β に直接作用する物質（例えば、タンパク質、抗体、アプタマー等）、TGF β 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）、TGF β 受容体とTGF β の結合を阻害する物質、TGF β 受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質（例えば、TGF β 受容体の阻害剤等）を挙げることができる。TGF β 阻害剤として、受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質、又はALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質が挙げられる。

[0059] 本明細書において、具体的なTGF β 阻害剤としては、例えばSB431542、SB202190 (R. K. Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20 (2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01 (WO2009146408)、Galunisertib (LY2157299)、LY3200882、SB525334、GW788388、RepSox、Lefty-1 (NCBI Accession No. として、マウス:NM_010094、ヒト:NM_020997が例示される)、Lefty-2 (NCBI Accession No. として、マウス:NM_177099、ヒト:NM_003

240及びNM__001172425が例示される)、及びこれらの誘導体等が挙げられ、少なくとも1つのTGF β 阻害剤を使用することができる。TGF β 阻害剤として、好ましくは、TGF β 受容体(ALK5)及びアクチビン受容体(ALK4/7)の阻害剤として知られている、SB431542及びA83-01からなる群から選択される1以上であることが好ましい。

[0060] 培地中におけるTGF β 阻害剤の濃度は、TGF β により媒介されるシグナル伝達を抑制可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、SB431542の濃度は、ALK5を阻害可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、100nM~100 μ M、好ましくは500nM~30 μ M、更に好ましくは1 μ M~20 μ Mである。他のTGF β 阻害剤の場合、前述の濃度のSB431542に相当するALK阻害活性若しくはTGF β 阻害活性を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0061] 本明細書において、BMP阻害剤は、BMP(Bone Morphogenetic Protein)とBMP受容体(I型又はII型)との結合を介するBMPシグナル伝達(BMP signaling)の阻害に関与する阻害剤である限り特に限定されず、核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。BMP阻害剤としては、BMPに直接作用する物質(例えば、タンパク質、抗体、アプタマー等)、BMPをコードする遺伝子の発現を抑制する物質(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等)、BMP受容体へのBMPの結合を阻害することによって上記のBMPシグナル伝達を阻害する生物活性を有する物質、BMP受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質(例えば、BMP受容体の阻害剤等)や、BMP I型受容体キナーゼ阻害剤等が含まれる。

[0062] BMP受容体へのBMPの結合を阻害することによって上記のBMPシグナル伝達を阻害する生物活性を有するものの具体例には、Dorsomorphin、Noggin及びこれらの誘導体が挙げられる。また、BMP I型受容体キナーゼ阻害剤の具体例には、LDN-193189(すなわち

、4-（6-（4-（ピペラジン-1-イル）フェニル）ピラゾロ[1, 5-a]ピリミジン-3-イル）キノリン）及びその誘導体（例えば、LDN-212854）が挙げられる。その他BMP阻害剤として、K02288、Chordin及びFollistatinが挙げられる。

[0063] BMP阻害剤としては、好ましくはNoggin、LDN-193189、Dorsomorphin及びK02288（PLOS One, 2013; 8(4): e62721.）からなる群から選択される1以上である。

[0064] 培地中におけるBMP阻害剤の濃度は、例えばBMPにより媒介されるシグナル伝達を抑制可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、LDN-193189の濃度は、BMP I型受容体キナーゼを阻害可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、1 nM~10 μ M、好ましくは10 nM~5 μ M、更に好ましくは50 nM~3 μ M、更により好ましくは50 nM~1 μ Mである。他のBMP阻害剤の場合、前述の濃度のLDN-193189に相当するBMP I型受容体キナーゼ阻害活性若しくはBMP阻害活性を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0065] 本明細書において、Wntシグナル活性化剤は、Wntにより媒介されるシグナル伝達を活性化し得るものである限り特に限定されない。Wntシグナル活性化剤としては、例えばWntタンパク質（Wnt3a等）、Wntアゴニスト、Dkk（Wntシグナル伝達阻害タンパク質の阻害剤）、GSK3 β （Glycogen Synthase Kinase 3 β ）阻害剤、R-Spondin等が挙げられる。

[0066] 本明細書において、GSK3 β 阻害剤は、Glycogen Synthase Kinase（GSK）3 β タンパク質のキナーゼ活性を阻害する物質として定義され、その具体例として、BIO（別称：GSK-3 β インヒビターIX；6-ブロモインジルビン-3'-オキシム）等のインジルビン（indirubin）誘導体、SB216763等のマレイイミド誘導体、GSK-3 β インヒビターVII等の α -ブロモメチルケトン化合物、

CHIR99021、L803-mts等の細胞膜透過性リン酸化ペプチド、及びそれらの誘導体が挙げられる。

[0067] 本明細書において、Wntシグナル活性化剤は、GSK3 β 阻害剤であることが好ましく、また、GSK3 β 阻害剤である、CHIR99021、BIO、Kenpaulone、SB216763及びL803-mtsからなる群から選択される1以上であることが好ましい。

[0068] 培地中におけるWntシグナル活性化剤の濃度は、例えばWnt3aにより媒介されるシグナル伝達を亢進可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、CHIR99021の濃度は、GSK3 β を阻害可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、100nM~100 μ M、好ましくは500nM~30 μ M、更に好ましくは1 μ M~10 μ Mである。他のWntシグナル活性化剤の場合、前述の濃度のCHIR99021に相当するGSK3 β 阻害活性若しくはWnt3aにより媒介されるシグナル伝達の亢進を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0069] (1)の工程において、多能性幹細胞はフィーダー細胞非存在下で培養される。フィーダー細胞非存在下とは、フィーダーフリーともいい、培地中にフィーダー細胞が存在しない状態をいう。フィーダー細胞非存在下の培養条件としては、例えば、線維芽細胞、SNL細胞、STO細胞等のフィーダー細胞を添加していない培養条件が挙げられる。

[0070] 本明細書において「胚様体形成培地」とは、多能性幹細胞を浮遊培養することにより胚様体を作製する際に使用可能な培地であれば特に限定されない。胚様体形成培地としては、胚様体の形成に適し、かつ、多能性幹細胞のフィーダーフリー培養に適した、フィーダーフリー培地であってよい。胚様体形成培地は、例えば基礎培地に必要に応じて血清代替物及び栄養源等の添加因子を添加することにより調製することができる。

[0071] 基礎培地としては、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 1

99培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、F-12培地、DMEM/F-12培地、IMDM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、又はこれらの混合培地等、動物細胞の培養に用いることのできる培地を挙げることができる。これらの基礎培地には、糖質やアミノ酸等の炭素源やビタミン、無機塩類等が含まれる。

[0072] 胚様体形成培地としては、例えば、多能性幹細胞を未分化のままに維持培養するための培地（未分化維持培地）から、未分化維持のために必要な因子（未分化維持因子）の一部又は全てを除いた培地、又は、後述のとおり一部若しくは全ての未分化維持因子の濃度を有効濃度以下に低下させた培地を使用することができる。このような培地は、例えば、当該培地と同等の成分を含むように配合することによって調製することができる。または、例えば、DMEM等の基礎培地に血清代替物やホルモン等の栄養因子を添加した培地を使用することもできる。或いは、未分化維持培地は複数の液体を適宜混合して使用できるようキットとして販売されている場合があり、その場合、未分化維持因子を含む液体を入れないで配合することで、胚様体形成培地を調製することも可能である。例えばStem Fit AK03N（味の素ヘルシーサプライ社製）の場合、A液、B液及びC液に分かれているので、FGF2を含むC液を除いてA液及びB液のみで胚様体形成培地を調製して使用することができる。

[0073] 胚様体形成培地として未分化維持培地に基づく培地を用いる場合は、（1）の工程開始時に培地の基本組成を大幅に変えることなく、所望の添加因子を所望の濃度まで適宜変化させればよいという利点がある。これにより、細胞にとって培養環境が大きく変わらないという利点がある。

[0074] 胚様体形成培地には、SMADシグナル伝達阻害剤及びWntシグナル伝達活性化剤等の分化誘導因子の作用を阻害又は拮抗する成分が、（1）の工程に影響を与えない程度、例えば作用しない程度の濃度で含まれるか、又は含まれないことが好ましい。

[0075] (1) の工程に用いられる培地の具体例としては、未分化維持培地である、StemFit AK03N培地（味の素ヘルシーサプライ社製）から、キット中でC液と呼ばれるFGF2を抜いた培地（AK03N-C）を胚様体形成培地とし、50 nM～3 μ M、好ましくは100 nMのLDN-193189（SMADシグナル伝達阻害剤）、1 μ M～20 μ M、好ましくは3 μ MのSB431542（SMADシグナル伝達阻害剤）及び1 μ M～10 μ M、好ましくは3 μ MのCHIR99021（Wntシグナル伝達活性化剤）（全てステムジェン社製）を添加した培地が挙げられる。

[0076] (1) の工程において、多能性幹細胞は、胚様体形成培地中で5日間～10日間浮遊培養される。一実施形態において、浮遊培養は、細胞が細胞凝集体（又は胚様体）を形成した状態で浮遊培養される。浮遊培養としては、いわゆるSFEbq法（非特許文献3）として知られている浮遊培養法が好ましい。SFEbq法、複数の均一な形状の孔を有する培養容器を用いて、多能性幹細胞を浮遊培養することにより細胞凝集体を形成させる方法である。SFEbq法においては、細胞は、(1) の工程開始時に分散された単一の細胞として培養容器（孔）内で浮遊培養され、やがて一つの孔の中で浮遊していた細胞同士が接着することにより、3次元構造を取り、各孔に一つずつ細胞凝集体を形成する。

[0077] SFEbq法において使用される複数の均一な形状の孔を有する培養容器としては、一つの培養容器には、複数の、例えば6、12、24、96又は384の、独立した、細胞を培養するための空間（孔）を有し、これらの孔は同じ形状及び大きさを有することが好ましい。培養容器の各孔は柱状であってよく、底面の形状は特に限定されないが、真円、正方形、長方形、多角形、楕円等であってよく、真円であること（すなわち、孔が円柱状であること）が好ましい。また、孔の底面が平底であってもよく、丸底（U底）又はV底又はM底であってもよく、好ましくはU底又はV底又はM底、より好ましくはV底又はM底、最も好ましくはV底である。底の形状が尖っていることにより、孔内に懸濁（浮遊）した細胞が集まりやすく、一定時間内に球状

を形成しやすいからである。また、孔の底面に細胞非接着性素材又は細胞低接着性素材が用いられているものであることが好ましい。

- [0078] 培養容器における孔は、底面積が平底換算で $0.1 \sim 2.0 \text{ cm}^2$ 、好ましくは $0.5 \sim 1.2 \text{ cm}^2$ 、より好ましくは 0.35 cm^2 程度であってよく、内径が $0.3 \sim 16.5 \text{ mm}$ 、好ましくは $3 \sim 11 \text{ mm}$ 、より好ましくは $6 \sim 8 \text{ mm}$ 程度であってよく、高さが $0.1 \sim 20 \text{ mm}$ 、好ましくは $0.3 \sim 17 \text{ mm}$ 、より好ましくは $8 \sim 12 \text{ mm}$ であってよい。
- [0079] 培養容器として、通常市販で入手できる培養容器、例えば、6ウェルプレート（底面積が平底換算で 9.5 cm^2 程度、内径 35 mm 程度）、12ウェルプレート（底面積が平底換算で 3.8 cm^2 程度、内径 23 mm 程度）24ウェルプレート（底面積が平底換算で 1.88 cm^2 程度、内径 16 mm 程度）、48ウェルプレート（底面積が平底換算で 1.0 cm^2 程度、内径 11 mm 程度）、96ウェルプレート（底面積が平底換算で 0.35 cm^2 程度、内径 $6 \sim 8 \text{ mm}$ 程度）、384ウェルプレート（底面積が平底換算で 0.1 cm^2 程度、内径 $3 \sim 4 \text{ mm}$ 程度）が挙げられる。好ましくは、96ウェルプレートであり、より好ましくはV底の96ウェルプレートである。
- [0080] 96ウェルプレートとしては、Prime Surfaceプレート96V、96M、96U、96スリットウェルプレート（住友ベークライト社製）、Ultra-Low Attachment Surface 96ウェル丸型ボトム（コーニング社製）を使用することができる。また、培養容器は、均一な大きさの細胞凝集体を独立して形成可能な形状を有していれば、96ウェルプレートのように各孔が明確に独立している必要はなく、例えばディッシュの底面に凹凸、又は、くぼみがあるものを使用することもできる。このような培養容器としてマルチディンプルが挙げられ、 $60 \text{ mm} \sim 150 \text{ mm}$ のものが利用されているが、これに限定されない。
- [0081] 96ウェルプレートの全ての孔に細胞懸濁液を分注した場合には、原理的には96個の均一な細胞凝集体を得ることが可能となり、プレートの数を増やす、或いはマルチディンプルのようなウェル当たりの孔の数を増やすこと

によって、一度に大量の細胞凝集体を得ることが可能となる。市販のマルチディンプルとしては、例えばE l p l a s i a（クラレ社製）やA g g r e W e l l（STEMCELL Technologies社製）、E Z S P H E R E（旭テクノグラス社製）を使用することができるが、これらに限定されない。

[0082] S F E B q法において、まず均一な細胞密度を有する細胞懸濁液を、培養容器の各孔に等量ずつ分注する。96ウェルプレートの場合、細胞密度は3000細胞／ウェル～20000細胞／ウェルであってよく、好ましくは5000細胞／ウェル～10000細胞／ウェルであってよく、より好ましくは約9000細胞／ウェルである。そして、培養開始から短時間で、例えば24時間以内に、好ましくは12時間以内、より好ましくは8時間以内に、各孔の中央部分に1つずつほぼ同じ大きさを有する細胞凝集体が形成される。また、分注する細胞懸濁液の量や細胞密度を調節することにより、細胞凝集体の径及び細胞数を制御することが可能である。さらに、S F E B q法を用いることによって、得られた複数の細胞凝集体は球状となり、再現性高く細胞凝集体を形成させることができる。

[0083] （1）の工程における浮遊培養は、凡そ5日間～10日間、好ましくは凡そ7日間～10日間、より好ましくは凡そ7日間行ってもよい。培養期間は、所望の細胞分化度によって決めてもよい。細胞分化度は、分化マーカーの測定によって決定することができ、（1）の工程においては、例えば、S O X 1、P A X 6、H E S 4及びH E S 5の発現量の上昇、O C T 3／4の発現量の低下、及びN A N O Gの発現量の低下によって培養期間を決めることができる。具体的には、（1）の工程開始時に比べ、以下の条件：

- 1) S O X 1、P A X 6、H E S 4及びH E S 5のうち少なくとも1つの発現量がRNAレベルで100倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、
- 2) O C T 3／4の発現量がRNAレベルで200分の1以下に低下した細胞凝集体が得られること、並びに
- 3) N A N O Gの発現量がRNAレベルで400分の1以下に低下した細胞

凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまでの期間、(1)の工程を持続してから、(2)の工程を開始してもよい。

[0084] 本明細書において、「RNAレベルでX倍多く発現する」こと、「発現量がRNAレベルでX倍上昇した」こと、又は「RNAの発現量がX倍上昇した」こととは、工程中の2時点において浮遊細胞或いは細胞凝集体を構成する細胞を一つ又は複数取得し、細胞中のRNA発現量を絶対的又は相対的に定量できる手法を用いて、比較解析した結果、一方の時点より他方の時点のRNA発現量がX倍多い(X倍上昇した)ことを意味する。また、「RNAレベルでX倍少なく発現する」こと、「発現量がRNAレベルでX倍低下した」こと、又は「RNAの発現量がX倍低下した」ことは、一方の時点より他方の時点のRNA発現量がX倍少ない(X倍低下した)ことを意味する。用いる手法はRNAの定量が可能な限り特に限定されないが、RNAシーケンス、リアルタイムPCRアッセイ、マイクロアレイ、ノザンブロット、及び*in situ*ハイブリダイゼーション、等を用いた測定法が使用可能であり、好ましくは、RNAシーケンス、リアルタイムPCRアッセイ、マイクロアレイを用いて比較計測される。

[0085] (1)の工程における浮遊培養の培養条件は特に限定されないが、例えば、35℃～37℃、好ましくは37℃の温度、90%～95%、好ましくは95%の湿度、3%～5%、好ましくは5%のCO₂濃度の条件であればよく、さらに低酸素培養条件であることが好ましい。「低酸素培養条件」とは、大気中の酸素濃度(約21%)より低い酸素濃度において、細胞を培養する条件のことを意味する。ここで、酸素濃度とは、培養装置中、細胞を含む培地が接する空気中の酸素の濃度を意味する。酸素濃度は、20%以下であれば特に限定されないが、好ましくは3%～10%の範囲であり、より好ましくは4%～6%の範囲であり、最も好ましくは5%である。

[0086] なお、分化させる前に、すなわち、(1)の工程の前に、多能性幹細胞を未分化維持培地で維持培養してもよい。未分化維持培地は、未分化状態を維

持するために必要な因子（未分化維持因子）を含み、多能性を維持できる培地である。未分化維持因子としては、線維芽細胞増殖因子、形質転換増殖因子ベータ（ $TGF\beta$ ファミリー）因子、アクチビンA等が挙げられる。

[0087] 本明細書における「線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factors、FGF）」とは、線維芽細胞増殖因子受容体に作用してFGFシグナルを活性化する因子を意味する。FGFとして、例えば、FGF2（bFGFともいう）、FGF4及びFGF8が挙げられる。

[0088] 本明細書における未分化維持培地は、フィーダーフリー条件で多能性幹細胞を維持培養可能な培地、すなわちフィーダーフリー培地である。使用可能なフィーダーフリー培地としては、様々な培地が開発、市販されており、例えばEssential 8（サーモフィッシュサイエンティフィック社製）が挙げられる。Essential 8培地は、DMEM/F-12培地に、添加剤としてL-アスコルビン酸-2-リン酸マグネシウム（64 mg/l）、セレン化ナトリウム（14 μ g/l）、インスリン（19.4 mg/l）、 $NaHCO_3$ （543 mg/l）、トランスフェリン（10.7 mg/l）、FGF2（100 ng/ml）、及び、 $TGF\beta$ （ $TGF\beta 1$ （2 ng/ml）又はNodal（100 ng/ml））を含む（Nature Methods、8、p424-429（2011））。

[0089] 市販の未分化維持培地として、他に、S-medium（DSファーマバイオメディカル社製）、StemPro（サーモフィッシュサイエンティフィック社製）、hESF9（Proc Natl Acad Sci U S A、2008 Sep 9；105（36）：13409-14）、mTeSR1（STEMCELL Technologies社製）、mTeSR2（STEMCELL Technologies社製）、TeSR-E8（STEMCELL Technologies社製）、Cellartis DEF-CS 500 Xeno-Free Culture Medium（タカラバイオ社製）又はStemFit（味の素ヘルシーサプライ社製）が挙げられる。

[0090] 上述の未分化維持培地の成分から、未分化維持因子の濃度を低下させて、未分化維持因子を除去した組成の培地を調製し、(1)の工程の胚様体形成培地として使用することができる。従って、(1)の工程で用いられる胚様体形成培地は、好ましくは、フィーダーフリー培地であり、かつ未分化維持因子の濃度を低下させた、又は未分化維持因子を除去した未分化維持培地である。具体的には、FGF2等のFGFを含まないフィーダーフリー培養用の未分化維持培地が挙げられる。また、後述の神経・グリア増殖用培地又はこれと類似の組成の培地と、未分化維持培地とを、1:1等の比率で混合した培地を、胚様体形成培地として用いることもできる。

[0091] <(2)の工程>

(2)の工程において、(1)の工程で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含む胚様体形成培地中で、浮遊培養する。胚様体形成培地及び浮遊培養は、上述のとおりである。(2)の工程で用いられる培地は、胚様体形成培地にレチノイン酸を混合することによって調製することができる。

[0092] (2)の工程で用いられる培地は、(1)の工程で用いられる培地とは、レチノイン酸を含むこと、1以上のSMADシグナル伝達阻害剤及び1以上のWntシグナル伝達活性化剤を含まないことの2点を除き、同一組成を有する培地であってもよい。「レチノイン酸」としては、レチノイド類(例えば、レチノイン酸)を挙げることができる。(2)の工程で用いられる培地の具体例として、StemFit AK03N培地(味の素ヘルシーサプライ社製)から、キット中でC液と呼ばれるFGF2を抜いた培地(AK03N-C)を胚様体形成培地とし、1 μ M レチノイン酸(シグマアルドリッチ社製)を添加した培地が挙げられる。

[0093] 培地中におけるレチノイド類の濃度は、レチノイン酸により媒介されるシグナル伝達を亢進可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、レチノイン酸の濃度は、活性、すなわち領域特異性の後方化作用を示す限り限定はないが、例えば、10 nM~100 μ M、好ましくは100 nM~10 μ M、更に好ましくは500 nM~5 μ Mである。他のレチノイド類の場合

、前述の濃度のレチノイン酸に相当する活性を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0094] (1)の工程の終了時に、(1)の工程で用いられる培地を培養容器から取り除き、(2)の工程で用いられる培地に培地交換することによって、(2)の工程を開始することができる。(2)の工程で、(1)と同じ培養容器を使用する場合には、細胞凝集体を保護する観点から、半量程度の培地を交換することが好ましいが、この作業を複数回繰り返すことによって、半量以上の培地を交換することができる。また、この時、必要に応じて、(2)の工程で用いられる培地以外の培地又はリン酸緩衝液等を用いて細胞凝集体を洗浄したのち、(2)の工程で用いられる培地での培養を開始することもできる。或いは、(1)の工程の終了時に、(1)で得られたすべての細胞凝集体を回収し、必要に応じて、細胞凝集体を洗浄したのち、(2)の工程で用いられる培地に懸濁することによって、(2)の工程を開始することもできる。(2)の工程において使用する培養容器は浮遊培養用の培養器材であれば特に限定されず、当業者に汎用されているディッシュやプレートを用いることができる。例えばPrime Surfaceプレート96V及びUltra-Low Attachment Culture Flasks(コーニング社製)等が挙げられる。

[0095] (2)の工程における浮遊培養は、凡そ3日間～21日間、好ましくは凡そ4日間～11日間、より好ましくは凡そ7日間行ってもよい。培養期間は、所望の細胞分化度によって決めてもよい。細胞分化度は、分化マーカーの測定によって決定することができ、例えば細胞を採取して発現する分化マーカーのmRNA量若しくはタンパク質量を測定することができる。または、培養上清を採取し、細胞から培地中に分泌される分化マーカーのタンパク質量を測定してもよい。(2)の工程においては、例えば、ASCL1、DCX、SLIT1、HEY1、ZBTB20、 β III tubulin、ELAVL3、HOXB3、HOXA4、HOXB4、HOXB6及びHOXB8からなる群より選択される1以上のマーカーのRNA若しくはタンパク

質の発現量によって培養期間を決めることができる。具体的には、(2)の工程開始時に比べ、

1) ASCL1、DCX、HEY1、ZBTB20、 β III tubulin、ELAVL3及びSLIT1のうち、少なくとも1つの発現量がRNAレベルで5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに

2) HOXB3、HOXA4、HOXB4、HOXB6及びHOXB8のうち、少なくとも1つの発現量がRNAレベルで5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまでの期間、(2)の工程を持続してから、(3)の工程を開始してもよい。

[0096] (2)の工程における浮遊培養の培養条件は(1)の工程と同様であってよく、さらに低酸素培養条件であることが好ましい。低酸素培養条件の酸素濃度としては、20%以下であれば特に限定されないが、好ましくは3%~10%の範囲であり、より好ましくは4%~6%の範囲であり、最も好ましくは5%である。

[0097] <(3)の工程>

(3)の工程において、(2)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及び1以上のSHHシグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地又は神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する。胚様体形成培地は、上述のとおりである。(3)の工程で用いられる培地は、胚様体形成培地又は神経・グリア増殖用培地にレチノイン酸及び1以上のSHHシグナル伝達活性化剤を混合することによって調製することができる。胚様体形成培地を用いる場合、(2)の工程で用いられる培地に、さらに1以上のSHHシグナル伝達活性化剤を混合することによって調製することもできる。

[0098] 本明細書において「神経・グリア増殖用培地」とは、グリア前駆細胞、グリア細胞、神経前駆細胞及び神経細胞(Neuron; ニューロン)の増殖培養に適した培地を意味し、これらの細胞の生存を維持し、かつ分化・増殖させることができる培地であれば特に限定はない。神経・グリア増殖用培地

は、上記の基礎培地に適宜、グリア前駆細胞、グリア細胞、神経前駆細胞及び神経細胞の生存に適した栄養因子等を添加して作製することもできるが、特に神経系細胞の維持培養又は分化誘導に適した培地として市販されているものを適宜組み合わせるか又は組成を一部変更して使用することもできる。例えば、市販されているNeurobasal、又は市販のDMEM/F-12等の基礎培地等を選択した上で、これに適宜上記栄養因子等を添加して使用してもよい。

[0099] 前述の「生存に適した栄養因子」は、神経系細胞を培養する際に添加される因子として当業者に周知のものを適宜組合せて用いることができるが、具体的には、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、プロゲステロン、トランスフェリン、ブトレシン、成長因子、ビタミン、cAMP活性化剤、ホルモン、神経栄養因子等が挙げられ、これらから1以上の因子を選択して使用することができる。

[0100] 本明細書における神経・グリア増殖用培地には、特にグリア前駆細胞、グリア細胞、神経前駆細胞及び神経細胞の全てを適切に分化・増殖させるべく1種類以上の成長因子が含まれていることが好ましく、血小板由来成長因子(PDGF)が含まれていることが好ましい。血小板由来成長因子としては、PDGF-AAを用いることができる。本明細書における神経・グリア増殖用培地には、その他の成長因子として、FGF(例えばFGF2)、EGF、IGF-1又はHGF等も挙げられる。好ましい一態様として、神経・グリア増殖用培地には、PDGF-AA、EGF、IGF-1及びFGF(好ましくはFGF2)が含まれる。

[0101] 神経栄養因子としては、ヒトNT-3(組み換え体タンパク質ヒトニューロトロフィン3)、BDNF、NGF、GDNF又はCNTF等が挙げられる。ビタミンとしては、ビオチン又はアスコルビン酸等が挙げられる。cAMP活性化剤としては、cAMP、dibutyryl-cAMP又はフォルスコリン等が挙げられる。ホルモンとしては、プロゲステロン(progesterone)又はT3等が挙げられる。好ましい一態様として、神経

・ グリア増殖用培地には前述の成長因子に加えて、T3等の甲状腺ホルモン、NT-3等の神経栄養因子が含まれる。

[0102] 上述の栄養因子を適宜配合した混合物として、N1サプリメント（以下、N1と記す場合がある）、N2サプリメント（以下、N2と記す場合がある）、B27サプリメント（ビタミンAを除去したものも含む；以下、B27と記す場合がある）等が市販されていることから、これを便宜的に用いて基礎培地に添加することができる。例えばN2には、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレン酸ナトリウム及びプトレシン（putrescine）が含まれている。N2を使用する場合、更に、ヒトNT-3、及び／又はB27（ビタミンAを除くことが好ましい）が含まれていることが好ましい。

[0103] 神経・グリア増殖用培地として、例えば、DMEM/F-12培地に、N2、B27（ビタミンAを除いたものを用いてもよい）、Glutamax（登録商標）、FGF2、EGF、T3、NT-3、PDGF-AA及びIGF-1を添加した培地が挙げられる。また、DMEM/F-12培地に、グルコース、L-グルタミン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、亜セレン酸ナトリウム、プトレシン、B27、MEM NEAA、FGF2、EGF、T3、NT-3、PDGF-AA、及びIGF-1を添加した培地が挙げられる。また、DMEM/F-12培地に、Glutamax、 β -メルカプトエタノール、B27、N2、MEM NEAA、FGF2、EGF、T3、NT-3、PDGF-AA、及びIGF-1を添加した培地を挙げられる。さらに、DMEM/F-12培地に、N1、B27、T3、ビオチン、ジブチリルcAMP、PDGF-AA、IGF-1、及びNT-3を添加した培地が挙げられる。

[0104] 神経・グリア増殖用培地には、上述の神経系細胞の生存に適した栄養因子が1以上含まれているという観点から、当該成分の生物活性を阻害若しくは抑制する物質を含まないか、有効濃度に満たない濃度で含むことが好ましい。

[0105] 神経・グリア増殖用培地の具体例として、DMEM/F-12培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に、1%N2（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、ビタミンAの濃度が5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、好ましくはビタミンAを含まないB27（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、10 ng/ml～100 ng/ml、好ましくは60 ng/mlのT3（シグマアルドリッチ社製）、5 ng/ml～100 ng/ml、好ましくは10 ng/mlのPDGF-AA（ペプロテック社製）、10 ng/ml～100 ng/ml、好ましくは20 ng/mlのFGF2、5 ng/ml～100 ng/ml、好ましくは10 ng/mlのEGF（ペプロテック社製）、10 ng/mlのインスリン様成長因子1（R&D システムズ社製）、及び、5 ng/ml～100 ng/ml、好ましくは10 ng/mlのNT-3（Neurotrophin-3）（R&D システムズ社製）を添加した培地が挙げられる。

[0106] 本明細書において、SHHシグナル伝達活性化剤とは、SHH（Sonic Hedgehog；ソニック・ヘッジホッグ）が受容体であるPatched（Ptch1）に結合して引き起こされるSmoothened（Smo）の脱抑制及びさらに続くGli2の活性化を引き起こす物質として定義される。SHHシグナル伝達活性化剤として例えば、Hedgehogファミリーに属するタンパク質、具体的にはSHH若しくはIHH（Indian Hedgehog；インディアン・ヘッジホッグ）、又はSonic Hedgehog N-Terminus（Shh-N）、リコンビナントHuman Sonic Hedgehog（C2411）N-Terminus（SHH-C2411）、及びリコンビナントMouse Sonic Hedgehog（C2511）N-Terminus（SHH-C2511）等のSHH若しくはIHHの部分ペプチド、SHH受容体、SHH受容体アゴニスト、Hh-Ag1.5（Li、X. ら、Nature Biotechnology、23、215～221（2005））、Smoothened Agonist（SAG）、[N-Methyl-N'-（

3-pyridinylbenzyl)-N'-(3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1,4-diaminocyclohexane; 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)、20a-hydroxycholesterol、Purmorphamine (PMA; 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) 並びにこれらの誘導体等が例示される (Stanton BZら、Mol Biosyst. 6:44-54、2010)。

[0107] (3) の工程における SHH シグナル伝達活性化剤として、Purmorphamine、SAG、SHH タンパク質及び SHH 断片 (例えば SHH C2511 又は SHH C2411) からなる群から選択される 1 以上であってよく、好ましくは、SHH タンパク質、SHH 断片、Purmorphamine、SAG からなる群から選択される 1 以上である。

[0108] 培地中における SHH シグナル伝達活性化剤の濃度は、SHH により媒介されるシグナル伝達を亢進可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えば、Purmorphamine の濃度は、領域特異性の腹側化作用を示す限り限定はないが、例えば、10 nM~10 μ M、好ましくは 100 nM~10 μ M、更に好ましくは 500 nM~5 μ M である。他の SHH シグナル伝達活性化剤の場合、前述の濃度の Purmorphamine に相当する、Smoothened (Smo) の脱抑制作用及びさらに続く Gli2 の活性化作用を引き起こす、又は領域特異性の腹側化作用を示す濃度を、適宜設定することができる。

[0109] (3) の工程において使用される培地として具体的には、胚様体形成培地又は神経・グリア増殖用培地に、1 μ M レチノイン酸 (シグマアルドリッチ社製) 及び 1 μ M Purmorphamine (ミリポア社製) を添加した培地を挙げられる。

[0110] (2)の工程の終了時に、(2)で得られたすべての細胞凝集体を回収し、必要に応じて、(3)の工程で用いられる培地、その他の培地(例えばDMEM/F-12が挙げられるがそれに限定されない)又はリン酸緩衝液等で回収した細胞凝集体を洗浄したのち、(3)の工程で用いられる培地に懸濁することによって、(3)の工程を開始することができる。或いは、細胞凝集体を保護する観点から、急激な培養環境の変化を避けて半量程度の培地を交換することもでき、この作業を複数回繰り返すことによって、半量以上の培地を交換することもできる。(3)の工程において使用する培養容器は浮遊培養用の培養器材であれば特に限定されず、当業者に汎用されているフラスコ、プレートに適宜用いることができる。例えばPrime Surfaceプレート96V、96スリットウェルプレート及びUltra-Low Attachment Culture Flasks(コーニング社製)等が挙げられる。

[0111] (3)の工程における浮遊培養は、凡そ4日間~11日間、好ましくは凡そ4日間~7日間、より好ましくは凡そ7日間行ってもよい。培養期間は、所望の細胞分化度によって決めてもよい。培養期間中、適宜数日に1回(例えば3日若しくは4日に1回)全量若しくは一部培地交換を行ってもよい。

[0112] 細胞分化度は、分化マーカーの測定によって決定することができ、例えば細胞を採取して発現する分化マーカーのmRNA量若しくはタンパク質量を測定することができる。または、培養上清を採取し、細胞から培地中に分泌される分化マーカーのタンパク質量を測定してもよい。(3)の工程においては、例えば、HEY2、NKX6.2、NKX2.2、OLIG1及びOLIG2からなる群より選択される1以上のマーカーのRNA若しくはタンパク質の発現量によって培養期間を決めることができる。具体的には、(3)の工程開始時に比べ、

- 1) HEY2、NKX6.2及びNKX2.2のうち、少なくとも1つの発現量がRNAレベルで5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに
- 2) OLIG1及び/又はOLIG2の発現量がRNAレベルで10倍以上

上昇した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまでの期間、(3)の工程を持続してから、(4)の工程を開始してもよい。当該RNAの発現量の評価方法は、(1)の工程で述べたとおりである。

[0113] (3)の工程における浮遊培養の培養条件は特に限定されないが、例えば、35℃～37℃、好ましくは37℃の温度、90%～95%、好ましくは95%の湿度、3%～5%、好ましくは5%のCO₂濃度、10%～20%、好ましくは20%のO₂濃度の条件であればよい。

[0114] <(4)の工程>

(4)の工程において、(3)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含まず、1以上のSHHシグナル伝達活性化剤を含む神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する。神経・グリア増殖用培地及びSHHシグナル伝達活性化剤は上述のとおりである。

[0115] (4)の工程において、(3)の工程の終了時に、(3)の工程で得られた細胞凝集体を(4)の工程の培地に培地交換して細胞凝集体のまま浮遊培養してもよいが、(4)の工程に使用する培地中で生存、増殖できない細胞を目的外細胞として取り除き、目的とするオリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞の含有率を向上させるため(3)の工程で得られた細胞凝集体を分散させてから、分散された細胞を浮遊培養することにより再度細胞凝集体を形成させてもよい。

[0116] 「細胞凝集体を分散させる」とは、細胞凝集体を形成する細胞を一細胞単位(単一細胞)に解離させるか或いは、複数の細胞同士が接合したままの状態を維持しながら、もとの細胞凝集体の形状を崩壊させることを意味する。分散させる方法として、物理的な刺激手法、化合物を用いた手法が挙げられるが、いずれか又は両方の手法を組み合わせる用いることにより、細胞凝集体を崩壊させることができる。すなわち、元の細胞凝集体は約1000個～10万個、好ましくは約3000個～5万個であり、より好ましくは約1000個～5万個、更により好ましくは約3000個～3万個の細胞を含んで

いるが、細胞凝集体を分散させた後は、複数の細胞同士が接合して小さな細胞の塊を形成している状態であっても、当該塊に含まれる細胞数は100個以下程度であるが、好ましくは、解離前の細胞凝集体に対して、90%以上の細胞が単一の状態になるまで分散させることが更に好ましい。

[0117] 具体的には、トリプシン様酵素（例えばトリプシン、TrypLE（登録商標））、Accutase（登録商標）、Accumax（登録商標）、又は金属キレート剤（EDTA、EGTA等）を用いて、細胞同士の接着を解離させ、さらにピペットマンを用いて物理的刺激を与えることにより、効果的に細胞凝集体を分散させることができる。更に細胞を単一細胞にまで分散させるための方法として、セルストレーナーに通す、という手技を利用することができる。本発明の実施のために、分散させた細胞凝集体を集合させ、再度細胞凝集体を形成させるためには、浮遊培養条件下で細胞を一定期間培養することにより達成されるが、より均一な大きさの細胞凝集体を得るために前述のSFEBC法を用いることができる。

[0118] （4）の工程における浮遊培養は、凡そ4日間以上、好ましくは凡そ10日間以上、より好ましくは凡そ14日間以上、特により好ましくは凡そ14日間～21日間行ってもよい。培養期間は、所望の細胞分化度によって決めてもよい。

[0119] 細胞分化度は、分化マーカーの測定によって決定することができ、例えば細胞を採取して発現する分化マーカーのmRNA量若しくはタンパク質量を測定することができる。または、培養上清を採取し、細胞から培地中に分泌される分化マーカーのタンパク質量を測定してもよい。（4）の工程においては、例えば、NFIA、NFI B、SLC1A3、S100B、FABP7及びPAX6からなる群より選択される1以上のマーカーのRNA若しくはタンパク質の発現量によって培養期間を決めることができる。具体的には、（4）の工程開始時に比べて

1) NFIA、NFI B、SLC1A3、S100B及びFABP7のうち、少なくとも1つの発現量がRNAレベルで10倍以上上昇した細胞凝集体

が得られること、並びに

2) PAX6の発現量がRNAレベルで5倍以下に低下した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまでの期間、(4)の工程を持続してから、(5)の工程を開始してもよい。当該RNAの発現量の評価方法は、(1)の工程で述べたとおりである。

[0120] 例えばPrime Surfaceプレート96V、96スリットウェルプレート及びUltra-Low Attachment Culture Flasks (コーニング社製)等が挙げられる。

[0121] (4)の工程において使用する培養容器は細胞培養用の浮遊培養用の培養器材であれば特に限定されず、当業者に汎用されているフラスコ、プレート及びディッシュを適宜用いることができる。例えばNunc (商標) Easy Flask (商標) Cell Culture Flasks (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、Ultra-Low Attachment Culture Flasks (コーニング社製)、SFBq法において使用される複数の均一な形状の孔を有する培養容器等が挙げられる。

[0122] (4)の工程における浮遊培養の培養条件は特に限定されないが、例えば、35℃～37℃、好ましくは37℃の温度、90%～95%、好ましくは95%の湿度、2%～5%、好ましくは5%のCO₂濃度、10%～20%、好ましくは20%のO₂濃度の条件であればよい。

[0123] 培養期間中に、凡そ2～7日に1回培地交換、又は凡そ2日～5日に1回培地交換、又は凡そ3～4日に1回培地交換を行ってもよく、当該培地交換は、培地の全量を交換してもよいし、細胞の環境が大きく変わることを避けるために、例えば1/3若しくは1/2程度の培地を交換してもよい。培地交換以外のタイミングで、培地に含まれる成長因子若しくは神経栄養因子等の成分を適宜補ってもよい。例えば、(4)の工程においては、PDGF-AAの濃度(例えば10 ng/ml)が維持されるように、例えば2～3日

に1回PDGF-AAを添加することが好ましい。

[0124] (4)の工程で用いられる神経・グリア増殖用培地は、(3)の工程で神経・グリア増殖用培地を用いる場合、(4)の工程でも同じ組成の培地を神経・グリア増殖用培地として用いてもよいし、適宜成分を変更してもよい。

[0125] (4)の工程で用いられる神経・グリア増殖用培地は、5 ng/ml～100 ng/ml、更に好ましくは約10 ng/mlのPDGF-AAを含んでいることが好ましい。

[0126] <(5)の工程>

(5)の工程において、(4)で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及びSHHシグナル伝達活性化剤を共に含まない神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する。神経・グリア増殖用培地は上述のとおりである。

[0127] (5)の工程において、(4)の工程の終了時に、(4)の工程で得られた細胞凝集体を(5)の工程の培地に培地交換して細胞凝集体のまま浮遊培養してもよいが、(5)の工程に使用する培地中で生存、増殖できない細胞を目的外細胞として取り除き、目的とするオリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞の含有率を向上させるため(4)の工程で得られた細胞凝集体を分散させてから、分散された細胞を浮遊培養することにより再度細胞凝集体を形成させてもよい。具体的な方法は、工程(4)と同様である。

[0128] (5)の工程における浮遊培養は、分化が進み過ぎず、かつ細胞凝集体が大きくなり過ぎない条件で適宜培地交換及び継代を行いながら培養する限り、その期間に特に限定はなく培養を続けることができる。(5)の工程の培養は、凡そ5日間～100日間、好ましくは凡そ5日間～20日間又は7日間～50日間、より好ましくは凡そ7日間～35日間、更に好ましくは7日間～28日間、最も好ましくは14日間～28日間行ってもよい。(5)の工程において、培養期間中、細胞数や培地量に合わせて、適宜数日に1回、例えば、7日以内に1回、凡そ2～7日に1回、又は凡そ2日～5日に1回、又は凡そ3～4日に1回培地交換を行ってもよく、当該培地交換は、培地

の全量を交換してもよいし、細胞の環境が大きく変わることを避けるために、例えば1／3若しくは1／2程度の培地を交換してもよい。継代回数は制限されず、例えば0回～5回継代してもよい。例えば、(5)の工程を開始して、14日間培養し、その時点で工程を終了することもできるが、さらに、1回継代を行い、その後、8日間又は14日間培養を継続してから、工程を終了することもできる。

[0129] 細胞分化度は、分化マーカーの測定によって決定することができ、例えば細胞を採取して発現又は存在する分化マーカーの量を測定することができる。分化マーカーとしては、少なくとも、mRNA若しくはタンパク質、糖、脂質等が挙げられる。または、培養上清を採取し、細胞から培地中に分泌される分化マーカーの量を測定してもよい。

[0130] (5)の工程においては、例えば、O4抗原、NG2、OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRK3、LHFPL3、KLF9、A2B5 (Epitope A2B5) 抗原、CNP及びPLPからなる群より選択される1以上のマーカーの発現量又は存在量によって培養期間を決めることができる。

[0131] (5)の工程で用いられる神経・グリア増殖用培地としては、レチノイン酸及びSHHシグナル伝達活性化剤を共に含まない限り、(4)の工程と同じ組成の培地を用いてもよいし、適宜成分を変更してもよい。

[0132] (5)の工程において使用する培養容器は細胞培養用の器材であれば特に限定されず、当業者に汎用されているフラスコ、プレートを適宜用いることができる。例えばNunc (商標) EasyFlask (商標) Cell Culture Flasks (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、Ultra-Low Attachment Culture Flasks (コーニング社製)、96穴ウェルプレート、96穴スリットウェルプレート等が挙げられる。(5)の工程における浮遊培養の培養条件は特に限定されないが、例えば、37℃の温度、95%の湿度、5%のCO₂濃度、20%のO₂濃度の条件であればよい。培養期間中に、凡そ7日に1回

培地交換、凡そ3～4日に1回PDGF-AA（例えば10ng/ml）を添加することが好ましい。

[0133] （5）の工程後に得られるグリア前駆細胞を含む細胞凝集体（本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体）は、以下の特徴を有する：

（a）オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含むこと、

（b）脊髄領域マーカーを発現していること、及び

（c）フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の成分を含まないこと。

[0134] （5）の工程において、上記（a）の特徴を有する細胞が得られていることを確認する目的で、細胞凝集体が、O4抗原、NG2、OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPから選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは5以上のマーカーを発現していることを確認するまで（5）の工程を持続することができる。

[0135] さらに、（5）の工程において、上記（b）の特徴を有する細胞が得られていることを確認する目的で、細胞凝集体が、HOXB3、HOXB4、HOXB6及びHOXD8からなる群より選択される1以上好ましくは2以上のマーカーを発現していることを確認するまで（5）の工程を持続することができる。

[0136] さらに、（5）の工程において、細胞凝集体を培養する培地中において、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、GRO- α 、LIF、IFN- γ 及びTRAILからなる群から選択される1以上のタンパク質が検出されるまで（5）の工程を持続することができる。

[0137] 上記グリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、直径が約100 μ m～800 μ m、例えば、約100 μ m～300 μ m、約200 μ m～400 μ m、又は、約400 μ m～600 μ mの球状である。該グリア前駆細胞を含む細胞凝

集体は、分化に適した培養を継続することにより、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞凝集体へと分化可能である。また、該グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を生体へ移植した場合には、生体内でオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団へと分化可能である。

[0138] [グリア前駆細胞を含む細胞凝集体]

本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の一態様としては、以下の特徴を有する：

- (a) オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含むこと、
- (b) 脊髄領域マーカーを発現していること、
- (c) フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の成分を含まないこと、及び
- (d) オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有すること。

[0139] (a) 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、細胞凝集体を構成する細胞として、オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含む。

[0140] グリア前駆細胞は、オリゴデンドロサイト前駆細胞及びアストロサイト前駆細胞を共に含む概念である。

[0141] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞は、O4抗原、NG2、OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRIK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPから選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは5以上のマーカーを発現していることを特徴とする。当該オリゴデンドロサイト前駆細胞は、好ましくは、少なくともA2B5抗原、O4抗原、OLIG2及びFAM181Bを発現している。

[0142] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体におけるアストロサイト前駆細胞

胞は、NFIA、NFIB、SOX9、HEY1、HEY2、FABP7、ZBTB20、SLC1A3、S100B、MLC1、SLIT1、TIMP3、SPARCL1、GFAP及びAQP4から選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは5以上のマーカーを発現していることを特徴とする。当該アストロサイト前駆細胞は、好ましくは、少なくともNFIA、NFIB、SLC1A3及びSPARCL1を発現している。

[0143] 上記アストロサイト前駆細胞において発現するマーカーのうち、NFIA、NFIB、SOX9、HEY1、HEY2、FABP7及びZBTB20は、グリア前駆細胞に分類され、かつ完全なアストロ前駆細胞に分化していないもののアストロサイトへの分化誘導が運命付けられている、成熟度の浅いアストロサイト前駆細胞に発現するマーカーである。すなわち、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、当該成熟度の浅いアストロサイト前駆細胞を含むことを特徴とする。

[0144] 従って、より好ましくは、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体においては、

1) NFIA、NFIB、SOX9、HEY1、HEY2、FABP7及びZBTB20から選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは5以上のマーカーを発現していることを特徴とする成熟度の浅いアストロサイト前駆細胞、並びに

2) SLC1A3、S100B、MLC1、SLIT1、TIMP3、SPARCL1、GFAP及びAQP4から選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは5以上のマーカーを発現していることを特徴とするアストロサイト前駆細胞が共に含まれる。

[0145] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は神経前駆細胞とともに、更に比較的未熟な（分化度の低い）神経幹細胞を含む。当該神経幹細胞は、SOX1、SOX2、NESTIN、MEIS1、MEIS2、DLL3及びASCL1から選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは4以上のマーカーを発現していることを特徴とする。当該神経幹細胞は、好ましく

は、少なくともSOX1、ASCL1、NESTINを発現している。

[0146] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体における神経前駆細胞は、DCX、 β III tubulin、MAP2、ELAVL3、NTRK2、GRIA2、PTPRO及びEPHA3からなる群より選択される1以上、好ましくは2以上、更に好ましくは5以上のマーカーを発現していることを特徴とする。当該神経前駆細胞は、好ましくは、少なくともDCX、 β III tubulin及びELAVL3を発現している。

[0147] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、細胞凝集体を構成する全細胞に対して、オリゴデンドロサイト前駆細胞を5%以上含み、好ましくは10%~60%、より好ましくは20%~50%、更に好ましくは20%~40%含むことが好ましい。また、アストロサイト前駆細胞を10%以上含み、好ましくは10%~80%、より好ましくは10%~50%、更に好ましくは20%~30%含むことが好ましい。さらに、神経前駆細胞を10%以上含み、好ましくは20%~60%、より好ましくは30%~50%含むことが好ましい。ここでオリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞は合計が100%を超えることは無く、当該細胞凝集体に含まれる全細胞数の80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上を占める。

[0148] ここでグリア前駆細胞を含む細胞凝集体におけるそれぞれの細胞種の割合は特に限定されないが、一態様として、アストロサイト前駆細胞又は神経前駆細胞の含有量が、オリゴデンドロサイト前駆細胞の含有量よりも大きい細胞凝集体が挙げられる。

[0149] 細胞凝集体を構成する全細胞に対する各細胞の含有割合は、それぞれの細胞マーカーの発現によって特定することができる。例えば、FACS、免疫染色、又はシングルセルRNA配列解析等、当業者に周知の手法により、一定範囲内に存在する全細胞に対する目的細胞の割合を、マーカーのmRNA、タンパク質、又はそれらの断片を測定（検出若しくは定量）して算出した数値を用いて判断することが可能である。全細胞数は、例えば、核染色によ

り計数することが可能であり、同じ範囲内に存在する目的細胞数は目的細胞特異的に発現するマーカーを発現する細胞数で計数することが可能となる。

[0150] (b) 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、脊髄領域マーカーを発現しており、例えば、HOXB3、HOXB4、HOXB6及びHOXD8から選択される1以上、好ましくは2以上の脊髄領域マーカーをmRNAレベルで発現することを特徴とする。

[0151] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、腹側領域マーカーを発現しており、例えば、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.1及びNKX6.2から選択される1以上、好ましくは2以上の腹側領域マーカーをmRNAレベルで発現することを特徴とする。

[0152] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、HOXB3、HOXB4、HOXB6及びHOXD8から選択される1以上、好ましくは2以上の脊髄領域マーカーをmRNAレベルで発現し、かつNKX2.1、NKX2.2、NKX6.1及びNKX6.2から選択される1以上、好ましくは2以上の腹側領域マーカーを発現している細胞を含むことを特徴とする。

[0153] (c) 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の成分を含まないこと、フィーダー細胞が異種動物由来の場合は異種細胞由来成分を含まないことを特徴とする。このような細胞凝集体は、多能性幹細胞をフィーダー細胞非存在下で培養することによって得ることができる。ここで、異種細胞由来成分は、培養対象の細胞の生物種とは異なる生物種由来の成分を意味し、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体においては、iPS細胞若しくはiPS細胞から分化誘導された細胞以外の細胞、又はこれらの細胞特異的な成分が含まれない。尚、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体には、フィーダー細胞由来の成分、例えば異種のフィーダー細胞由来の成分のみならず、他の異種細胞由来の成分や異種由来成分(Xenogenic Factor)も含まない態様も含まれる。このような細胞凝集体は、上記フィーダー細胞非存在下条件に加えて、ゼノフリー培地を用いることによって得ることができる。

- [0154] (d) 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有する。本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体が当該能力を有することは、後述の成熟化培地中で後述の培養方法で5日間～60日間、より具体的には10日間培養したのち、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団へ分化したかどうかを確認することができる。すなわち、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団への分化は、後述するマーカーの発現を検出することにより、同定することができる。
- [0155] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(I) NFIA、NFIIB、SOX9、HEY1、HEY2、FABP7、ZBTB20、SLC1A3、S100B、MLC1、SLIT1、TIMP3、SPARCL1、GFAP及びAQP4から選択される1以上、好ましくは2以上、さらに好ましくは5以上のマーカーを、好ましくはmRNAレベルで発現する細胞を含むことを特徴とする。
- [0156] 好ましくは、実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、NFIAB、SOX9、HEY1、HEY2及びZBTB20から選択される1以上、好ましくは2以上、さらに好ましくは5以上のマーカーをmRNAレベルで発現することを特徴とし、かつSLC1A3、S100B、MLC1、SLIT1、TIMP3、SPARCL1、GFAP及びAQP4から選択される1以上、好ましくは2以上、さらに好ましくは5以上のマーカーをmRNAレベルで発現する細胞を含むことを特徴とする。
- [0157] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(II) OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPから選択される1以上、好ましくは2以上、さらに好ましくは5以上のマーカーを、好ましくはmRNAレベルで発現する細胞を含むことを特徴とする。

- [0158] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(III) DCX、 β III tubulin、MAP2、ELAVL3、NTRK2、GRIA2、PTPRO及びEPHA3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むことを特徴とする。
- [0159] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(IV) SOX1、SOX2、NESTIN、MEIS1、MEIS2、DLL3及びASCL1からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むことを特徴とする。
- [0160] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(V)
- (i) O4抗原、GalC、MBP、APC、GST π 、CNP、PLP、OLIG2、SOX10、PDGFR α 及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞；
 - (ii) β III tubulin、MAP2及びELAVL3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、並びに
 - (iii) SLC1A3、S100B、AQP4、GFAP及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞
- を含む細胞集団へ分化する能力を有する。
- [0161] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、上記培養を経て、少なくとも5%以上、好ましくは約5%~20%のO4陽性細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有することを特徴とする。
- [0162] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、上記培養を経て、少なくとも10%以上、好ましくは約10%~50%のAPC陽性細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有することを特徴とする。
- [0163] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、上記培養を経て、少なくとも10%以上、好ましくは約10%~40%のGFAP陽性細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有することを特徴とする。
- [0164] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、上記培養を経て、少なくとも15%以上、好ましくは約15%~50%の β III tubuli

n 陽性細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有することを特徴とする。

[0165] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、上記培養を経て、少なくとも10%以上、好ましくは約10%~30%のHu陽性細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有することを特徴とする。

[0166] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(VI) C1ORF61及びSERPINE2から選択される1以上のマーカーをmRNAレベルで発現することを特徴とする。

[0167] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(VII) さらに、以下の(A)~(C)の少なくとも1つの特徴を有する：

(A) 細胞凝集体を構成する全細胞に対して60%以上、好ましくは70%以上、更に好ましくは70%~90%、更により好ましくは75%~85%の細胞が、NFIAを発現すること、

(B) 細胞凝集体を構成する全細胞に対して10%以上の、好ましくは20%以上、更に好ましくは20%~50%、更により好ましくは20%~40%の細胞が、OLIG2を発現すること、並びに、

(C) 細胞凝集体を構成する全細胞に対して20%以上の、好ましくは30%以上、更に好ましくは30%~60%、更により好ましくは30%~50%の細胞がHEY2、C1ORF61、FAM181B、NFIA、NFI B、ITM2B、LHFPL3及びMLC1から選択される1以上のマーカーを発現すること。

[0168] ここで各マーカー陽性細胞の比率は、免疫染色により染色された細胞数の計測や、シングルセルレベルでの遺伝子発現解析により算出することができる。

[0169] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(VIII) 多能性幹細胞を包含しない。多能性幹細胞を包含しないことは、OCT3/4及びNANOGのいずれもmRNAレベル若しくはタンパク質レベルで発現しないこと、又は発現量が低下していることを指標として確認することができる。具体的には、例えばOCT3/4の発現量がIPS細胞と比較して200分

の1以下に低下していること、及び／又はNANOGの発現量がiPS細胞と比較して400分の1以下に低下していることを指標とすることができる。

[0170] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(IX)PAX6を発現しない程度まで分化していることを特徴とする。ここでPAX6がmRNAレベル若しくはタンパク質レベルで発現しないこと、又は発現量が低下していることを指標として確認することができる。具体的には、例えばPAX6の発現量が工程(3)を開始するタイミング(例えば本願実施例における分化14日目)に比べて工程(4)又は(5)を実施し移植用の細胞凝集体を回収するタイミング(例えば本願実施例における分化49日目)で10分の1以下に低下していることを指標とすることができる。

[0171] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、(X)直径が約100 μ m～800 μ mの球状の細胞凝集体であってよく、例えば、約100 μ m～300 μ m、約200 μ m～400 μ m、又は、約400 μ m～600 μ mであってよい。細胞凝集体当たりの細胞数は、約1000～100000個であってよく、好ましくは約3000～50000個であり、より好ましくは約3000～30000個である。

[0172] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、上記(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)(IX)及び(X)の少なくとも2、少なくとも4、少なくとも6、少なくとも8又は全ての特徴を有する。

[0173] 一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、GRO- α 、LIF、IFN- γ 及びTRAILからなる群より選択される1以上のマーカーを発現又は分泌する細胞、又は当該細胞凝集体の培養上清中に上記マーカーが検出される細胞を含む。一実施形態のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、及びGRO- α からなる群より選択される1以上のマーカーを発

現又は分泌する細胞、又は当該細胞凝集体の培養上清中に上記マーカーが検出される細胞を含むことが好ましく、SPARCL1、MIF、MCP-1、SCF、M-CSF及びHGFからなる群より選択される1以上のマーカーを発現又は分泌する細胞、又は当該細胞凝集体の培養上清中に上記マーカーが検出される細胞を含むことがより好ましい。

[0174] 一実施態様において、SPARCL1は、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.1ng以上、好ましくは1ng以上、より好ましくは10ng以上検出される。一実施態様において、SPARCL1は、細胞1000個あたり0.1ng~1000ng、好ましくは1ng~1000ng、より好ましくは10ng~60ng検出される。

[0175] 一実施態様において、MIFは、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.1pg以上、好ましくは0.2pg以上、より好ましくは0.5pg以上検出される。一実施態様において、細胞1000個あたり0.1pg~100pg、好ましくは0.1pg~10pg、より好ましくは0.5pg~5pg検出される。

[0176] 一実施態様において、MCP-1は、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.1pg以上、好ましくは0.2pg以上、より好ましくは0.5pg以上検出される。一実施態様において、細胞1000個あたり0.1pg~100pg、好ましくは0.1pg~10pg、より好ましくは0.5pg~8pg検出される。

[0177] 一実施態様において、SCFは、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.001pg以上、好ましくは0.01pg以上、より好ましくは0.02pg以上検出される。一実施態様において、細胞1000個あたり0.001pg~10pg、好ましくは0.01pg~1pg、より好まし

くは0.02 pg~0.2 pg 検出される。

[0178] 一実施態様において、M-CSFは、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.001 pg以上、好ましくは0.005 pg以上、より好ましくは0.01 pg以上検出される。一実施態様において、細胞1000個あたり0.0001 pg~10 pg、好ましくは0.001 pg~1 pg、より好ましくは0.005 pg~0.1 pg 検出される。

[0179] 一実施態様において、HGFは、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.0001 pg以上、好ましくは0.001 pg以上、より好ましくは0.01 pg以上検出される。一実施態様において、細胞1000個あたり0.0001 pg~10 pg、好ましくは0.001 pg~1 pg、より好ましくは0.005 pg~0.5 pg 検出される。

[0180] 一実施態様において、LIFは、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清に検出される場合は、例えば、48時間培養した場合、細胞1000個あたり0.0001 pg以上、好ましくは0.001 pg以上、より好ましくは0.01 pg以上検出される。一実施態様において、細胞1000個あたり0.0001 pg~10 pg、好ましくは0.001 pg~1 pg、より好ましくは0.005 pg~0.5 pg 検出される。

[0181] [オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の製造方法]

本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の製造方法の一態様としては、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を、成熟化培地を用いて5日間~60日間培養することによって行われる。

[0182] 「成熟化培地」とは、グリア細胞及び神経細胞が成熟化するための培地であり、グリア細胞及び神経細胞の成熟化に必要な因子を含有する培地である。基礎となる培地（基礎培地）となるものは、神経系細胞が生存可能な培地であれば特に限定はなく、上述の神経・グリア増殖用培地と共通であってよ

い。基礎培地として、例えば、DMEM/F-12等の基礎培地にN2及び／又はB27等の神経系細胞培養用のサプリメントを添加した培地が挙げられる。但し、神経・グリア増殖用培地に含まれる、主に細胞の増殖に寄与する増殖因子類：FGF（例えばFGF2）、EGF及びPDGF（例えばPDGF-AA）は含まれないことが望ましい。

[0183] 一方、成熟化培地は、グリア細胞への分化に寄与する、神経栄養因子、甲状腺ホルモン及び／又はサイトカインを含む。神経栄養因子としては、NT-3が挙げられる。甲状腺ホルモンとしては、T3が挙げられる。当該サイトカインとしてはLIFが挙げられる。

[0184] 成熟化培地として、例えば、T3、NT-3及びLIFのうち少なくとも1つ、好ましくは2つ、更に好ましくは全てを含む培地が使用できる。また、アストロサイトへの分化のために用いられる成熟化培地として、さらにCNTFを含む培地が使用できる。培地にこれらの因子を添加して使用してもよく、これらの因子が配合された培地を使用してもよい。成熟化培地中におけるT3の濃度は、5 ng/ml以上であればよく、好ましくは30 ng/ml～100 ng/ml、より好ましくは60 ng/ml～100 ng/mlである。また、成熟化培地中におけるNT-3の濃度は、10 ng/ml以上であればよく、好ましくは10 ng/ml～100 ng/ml、より好ましくは10 ng/ml～50 ng/mlである。また、成熟化培地中におけるLIFの濃度は、10 ng/ml以上であればよく、好ましくは10 ng/ml～100 ng/ml、より好ましくは10 ng/ml～50 ng/mlである。さらに、成熟化培地中におけるCNTFの濃度は、5 ng/ml以上であればよく、好ましくは10 ng/ml～50 ng/ml、より好ましくは25 ng/ml～50 ng/mlである。

[0185] オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の製造方法によって得られた、「オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団」（本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団）とは、細胞集団を構成する細胞にオリゴデン

ドロサイト、アストロサイト及び神経細胞の3種類の細胞を検出可能なレベルで含んでいる細胞集団であれば、それぞれの細胞種の含有割合は特に限定されない。上記細胞集団は、立体構造（スフェア状）を有する細胞凝集体であっても、二次の層状構造を有する細胞集団であってもよい。層状の細胞集団は、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を、マトリゲル等の細胞接着因子の存在下で接着培養することにより製造することができる。

[0186] 各々の細胞を検出するためには、例えば、免疫組織学的手法及び（RT-qPCR及びRNAシーケンス等の）遺伝子解析を用いることができる。遺伝子解析を用いる場合、本明細書実施例2に記載の方法に準じて、細胞凝集体に含まれるmRNA及びその発現レベルを同定することができる。

[0187] 得られた本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団は、出発細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含んでもよい。当該細胞集団は、好ましくは、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を全細胞数の50%以上、更に好ましくは70%以上含む。当該細胞集団は、オリゴデンドロサイトを2%以上含み、好ましくは5%~50%、より好ましくは10%~40%含む。また、アストロサイトを10%以上含み、好ましくは10%~70%、より好ましくは10%~50%含む。さらに、神経細胞を10%以上含み、好ましくは20%~60%、より好ましくは30%~50%含む。ここでオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞は合計が100%を超えることは無く、当該細胞凝集体に含まれる全細胞数の50%以上、好ましくは70%以上を占める。

[0188] 本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団は、

(i) O4抗原、GalC、MBP、APC、GST π 、CNP、PLP、OLIG2、SOX10、PDGFR α 及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカー、好ましくは3以上のマーカー、更に好ましくは5以上のマーカー、更により好ましくは全てのマーカーを発現する細胞、

(i i) β t u b u l i n、MAP 2 及び E L A V L 3 からなる群より選択される 1 以上のマーカー、好ましくは 2 以上のマーカー、更に好ましくは全てのマーカーを発現する細胞、並びに

(i i i) S L C 1 A 3、S 1 0 0 B、A Q P 4、G F A P 及び N G 2 からなる群より選択される 1 以上のマーカー、好ましくは 2 以上のマーカー、更に好ましくは 3 以上のマーカー、更に好ましくは全てのマーカーを発現する細胞を含む。

[0189] グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養は、浮遊培養であってもよい。培養条件は特に限定されないが、例えば、35℃～37℃、好ましくは37℃の温度、90%～95%、好ましくは95%の湿度、3%～5%、好ましくは5%のCO₂濃度、10%～20%、好ましくは20%のO₂濃度の条件であればよい。培養容器は細胞培養用器材であれば特に限定されず、当業者に汎用されているフラスコやディッシュを用いることができる。例えばNunc (商標) EasyFlask (商標) Cell Culture Flasks (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、Ultra-Low Attachment Culture Flasks (コーニング社製) 等が挙げられる。

[0190] [医薬組成物]

本発明の一態様として、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、又は本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団、或いは当該細胞凝集体又は細胞集団由来の細胞を含む移植用細胞集団を有効成分とする、医薬組成物が挙げられる。本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法によって製造される。本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団は、本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の製造方法によって製造される。

[0191] 当該有効成分の有効量は、投与目的、投与方法、及び投与対象の状況（性別、年齢、体重、病状等）によって異なるが、例えば、細胞数として、1×

10^4 個～ 1×10^8 個、 1×10^5 個～ 3×10^5 個、 1×10^6 個～ 3×10^6 個、又は 1×10^7 ～ 3×10^7 個とすることができる。

[0192] 一実施形態の医薬組成物は、上記有効成分の有効量のほか、薬学的に許容される担体を含んでもよい。薬学的に許容される担体としては、生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）を用いることができる。医薬組成物は、必要に応じて移植医療において、移植する組織又は細胞を含む医薬に、通常使用される保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を含んでもよい。

[0193] 移植用細胞凝集体又は移植用細胞集団を、適切な生理的な水性溶媒で懸濁することによって、細胞懸濁液として製造することができる。必要であれば、凍結保存剤を添加して上記移植用細胞集団を凍結保存し、使用時に解凍し、緩衝液で洗浄し、移植医療に用いてもよい。

[0194] 本発明の移植用細胞集団は、細胞凝集体を懸濁させた懸濁液であってもよいし、当該細胞凝集体を、細胞凝集体から細胞を分散せたりした懸濁液、シート剤であってもよい。

[0195] また、本発明の製造方法で得られた移植用細胞集団は、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法における（４）の工程を実施した後に、スキャフォールド上で培養を行うことによって、立体状に成型し、三次元組織である細胞組織構造体とすることもできる。

[0196] 下記に記載するように、本発明の細胞を含む医薬組成物は、無血清で取得することから、血清由来成分など治療上に問題となる成分を含むことなく、脊髄損傷モデル動物（例えばマウス）への投与において、損傷部位における損傷神経系の修復そして運動機能の回復という顕著な効果をもたらすものである。したがって、本発明の医薬組成物は、これまで有効な治療手段のなかった脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患、更に急性期、亜急性期又は慢性期脊髄損傷等の、急性期、亜急性期又は慢性期のグリア細胞の障害に基づく又は伴う疾患の治療薬として有用である。

[0197] しかも本明細書に記載するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体からなる移植用細胞集団は、株化された多能性幹細胞から製造され、マーカー等により特定され品質管理されることにより、安定した品質の移植用細胞集団を大量に製造し、移植に用いることができる。また、移植用細胞集団を保存することができるため、患者の移植の時期にあわせて移植用細胞集団を準備することができる。

[0198] 「脱髄疾患」は、神経細胞の軸索の周囲に髄鞘を形成するミエリンの炎症や退縮を含む障害であれば特に限定されない。脱髄疾患としては、例えば、脊髄損傷や多発性硬化症、副腎白質ジストロフィー、白質消失疾患、ペリツェウス・メルツバッハー病（広義には先天性大脳白質形成不全症）及び白質ジストロフィーが挙げられる。上記脊髄損傷として、急性期骨髄損傷、亜急性期脊髄損傷又は慢性期の脊髄損傷が挙げられる。

[0199] 「グリア細胞の障害を伴う疾患」（「グリア細胞に基づく疾患」ともいう）とは、グリア細胞すなわちアストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞及びミクログリアからなる群から選択される一又は複数の細胞種の障害を伴う疾患であれば特に限定されない。グリア細胞の障害を伴う疾患としては、具体的には、脊髄損傷、脳梗塞、統合失調症などの精神神経疾患、脱髄疾患、神経変性疾患が挙げられる。より具体的には、視神経脊髄炎（*neuromyelitis optica*）や筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アレキサンダー病、先天性大脳白質形成不全症、ハンチントン病、アルツハイマー病及び統合失調症、進行性多巣性白質脳症（*PML*）、脳脊髄炎（*EPL*）、橋中心髄鞘崩壊症（*CPM*）、ウォラー変性、副腎白質ジストロフィー、黄斑円孔、脊髄小脳変性症、多系統萎縮症等の他の多数の神経障害及び神経変性状態等が挙げられる。これらの疾患のうち発症から一定期間が経過したものを、慢性期の脱髄疾患又は慢性期のグリア細胞の障害を伴う疾患と呼ぶ。例えば、脊髄損傷については、損傷後3か月から6か月経過すると損傷部には非常に固い瘢痕組織が形成され病態が固定化するケースが多く認められており、この病態を慢性期の脊髄損傷と呼ぶ。

[0200] グリア細胞の障害を伴う疾患において、グリア細胞を含む膜組織の損傷状態としては、例えば、オリゴデンドロサイト若しくはアストロサイト等のグリア細胞が変性死している状態等が挙げられる。

[0201] [治療方法・治療薬]

本発明の一態様として、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、又は本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団、或いは当該細胞凝集体又は当該細胞集団由来の細胞を含む移植用細胞集団の有効量を、移植を必要とする対象に移植することを含む、脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく又は伴う疾患の治療方法が挙げられる。ここで、脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく又は伴う疾患が、慢性期の脱髄疾患及び慢性期のグリア細胞の障害に基づく又は伴う疾患であってもよい。なお、障害又は疾患の発症から一定期間が経過したもの、例えば慢性期脊髄損傷の場合損傷後3か月から6か月以上経過したものが慢性期と判定される。

[0202] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、脱髄疾患、及びグリア細胞の障害を伴う疾患の移植医療に有用である。そこで、本発明は、本発明の細胞凝集体、又は当該細胞凝集体から得られる細胞を含む移植用細胞集団を含む、脱髄疾患及びグリア細胞の障害を伴う疾患の治療薬を提供する。

[0203] また、本発明は当該治療薬を、細胞凝集体若しくはその懸濁液、分散された細胞の懸濁液や、フィブリン、ハイドロジェル等の生分解性バイオマテリアルとの懸濁液、及びそれらをスキャフォールドとして培養した細胞組織構造体の形態で患者に投与（移植）することを含む治療方法も提供する。脱髄疾患及びグリア細胞の障害を伴う疾患の治療薬として、又は、当該グリア細胞を含む組織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、本発明の細胞凝集体（細胞集団）又は当該細胞凝集体（細胞集団）から得られる細胞を含む移植用細胞集団を用いることができる。

[0204] 移植を必要とする、脱髄疾患及びグリア細胞の障害を伴う疾患、又はグリア細胞を含む組織の損傷状態の患者に、本発明の細胞凝集体又は当該細胞凝集体から得られる細胞を含む移植用細胞集団を移植し、又は、障害を受けた

グリア細胞を含む組織自体を補充することによって、脱髄疾患及びグリア細胞の障害を伴う疾患、又はグリア細胞を含む組織の損傷状態を治療することができる。

[0205] 移植医療においては、組織適合性抗原の違いによる拒絶反応がしばしば問題となるが、移植のレシピエントの体細胞から樹立した多能性幹細胞（例、人工多能性幹細胞）を用いることで当該問題を克服できる。すなわち、本発明の好ましい一態様において、多能性幹細胞として、レシピエントの体細胞から樹立した多能性幹細胞（例、人工多能性幹細胞）を用いることによって、当該レシピエントについて免疫学的自己の細胞凝集体（細胞集団）を製造し、当該細胞凝集体（細胞集団）又は当該細胞凝集体（細胞集団）から得られる細胞を含む移植用細胞集団が当該レシピエントに移植される。

[0206] また、レシピエントと免疫が適合する（例えば、HLA型又はMHC型が適合する）他者の体細胞から樹立した多能性幹細胞（例、人工多能性幹細胞）から、アロ（他家）の細胞凝集体（細胞集団）を製造し、当該細胞凝集体（細胞集団）又は当該細胞凝集体（細胞集団）から得られる細胞を含む移植用細胞集団を当該レシピエントに移植してもよい。

[0207] また、組織適合性抗原（例えば、HLA Class I、HLA Class IIを構成する抗原タンパク質）又は当該抗原の発現に必要な因子の発現が抑制されたiPS細胞を用いて本発明の細胞凝集体（細胞集団）を製造することによって、他家の細胞移植であっても拒絶反応を回避することができる。

[0208] 本発明の治療方法において患者若しくはレシピエントに投与若しくは移植される治療薬として、前述の医薬組成物を使用することができる。

[0209] 本発明の一態様として、脱髄疾患並びに、グリア細胞の障害に基づく疾患及びグリア細胞の障害を伴う疾患の治療における使用のための、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、又は本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の使用が挙げられる。

[0210] 〔毒性・薬効評価方法〕

本発明の一態様として、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、又は本発明のオリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団に被験物質を接触させ、被検物質が該細胞凝集体又は該細胞集団に及ぼす影響を検出又は定量することを含む、被験物質の毒性又は薬効を評価するための方法が挙げられる。

[0211] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、並びに、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団は、疾患のモデル細胞として、脱髄疾患並びに、グリア細胞の障害に基づく疾患及びグリア細胞の障害を伴う疾患（併せてグリア疾患ともいう）の治療薬、又はその予防薬のスクリーニング、薬効評価に利用することができる。

[0212] また、本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、並びに、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団は、健常のモデル細胞として、化学物質等の安全性試験、ストレス試験、毒性試験、副作用試験、感染又は混入試験に利用することができる。また、本発明の細胞凝集体又は細胞集団は、オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞等のグリア前駆細胞、神経前駆細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト等を含むため、これらの細胞を含む神経組織（中枢神経系、脊髄、神経筋接合部）の機能試験、具体的には、セロトニン作動性神経や運動神経等の機能評価や、グリア及び神経前駆細胞の増殖能や分化能評価に利用することも可能である。

[0213] その評価方法としては、アポトーシス評価等の刺激・毒性試験のほか、化学物質が、グリア前駆細胞からグリア細胞への正常分化に及ぼす影響を評価する試験（各種遺伝子マーカーのRT-PCR、サイトカインのELISA等による発現タンパク質解析、貪食能試験）等が挙げられる。例えば、オリゴデンドロサイトへの分化能を促進する化合物の探索や、脱髄疾患やグリア疾患等の患者由来iPS細胞から分化させた細胞について、疾患特異的な表現型をレスキューさせるような化合物、タンパク質等の探索等に使用できる。

- [0214] また、これらの試験の為の細胞材料としては、例えば、本発明の細胞凝集体の細胞を分散し、播種接着したプレート、細胞懸濁液、そのシート又は成形体を提供することができる。
- [0215] 本発明のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体、並びに、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団、或いはこれらから分散される細胞は、ヒト及び動物試験の外挿試験として用いることができる。
- [0216] 「グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を評価・判別するための新規マーカー」
本発明の一態様として、C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカーが発現しているか否かを指標として、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体が移植に適していることを判別する方法が挙げられる。
- [0217] 本発明の判別方法は、C1ORF61又はSERPINE2の発現の有無は、これらのマーカーのタンパク質、mRNA、又はこれらの断片を検出することにより実施することができる。すなわち、一態様として、本発明の判別方法は、以下の工程を含む：
- (1) 細胞凝集体サンプルに発現する、C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカー由来のタンパク質又はその断片を検出する工程；
 - (2) 上記マーカー由来のタンパク質又はその断片の発現量が、基準値よりも大きい場合に、当該細胞凝集体サンプルが、移植に適するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体であると決定する工程。
- [0218] また、一態様として、本発明の判別方法は、以下の工程を含む：
- (1) 細胞凝集体サンプルに発現する、C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカー由来のmRNA又はその断片を検出する工程；
 - (2) 上記マーカー由来のmRNA又はその断片の発現量が、基準値よりも大きい場合に、当該細胞凝集体サンプルが、移植に適するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体であると決定する工程。

[0219] 本発明の一態様として、C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上の遺伝子、当該遺伝子によりコードされるタンパク質、及びこれらの断片を検出することを含む、グリア前駆細胞若しくはグリアへの分化指向性が高い神経幹細胞の同定方法が挙げられる。ここで「グリアへの分化指向性が高い」とは、成熟化培地にて終末分化を誘導すると、グリアに分化する割合が高い（例えば30%以上）神経幹細胞の性質を表す。

[0220] 本発明の同定方法は、C1ORF61又はSERPINE2の発現の有無は、これらのマーカーのタンパク質、mRNA、又はこれらの断片を検出することにより実施することができる。すなわち、一態様として、本発明の同定方法は、以下の工程を含む：

（1）細胞集団サンプルに発現する、C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカー由来のタンパク質又はその断片を検出する工程；

（2）上記マーカー由来のタンパク質又断片の発現量が、基準値よりも大きい場合に、当該細胞集団サンプルが、グリアへの分化指向性が高いグリア前駆細胞若しくは神経幹細胞であると同定する工程。

[0221] また、一態様として、本発明の同定方法は、以下の工程を含む：

（1）細胞集団サンプルに発現する、C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカー由来のmRNA又はその断片を検出する工程；

（2）上記マーカー由来のmRNA又はその断片の発現量が、基準値よりも大きい場合に、当該細胞集団サンプルが、グリアへの分化指向性が高いグリア前駆細胞若しくは神経幹細胞であると決定する工程。

[0222] 下記の表1は、本明細書に記載の遺伝子及びそのGenBankアクセッション番号を示す。

[表1]

遺伝子名	GenBankアクセッション番号
ACTL6B	NM_016188, NR_134539
AKR1C1	NM_001353, XM_017015791
APC	NM_000038, NM_001127510, NM_001127511, NM_001354895, NM_001354896
AQP4	NM_001650, NM_004028, NM_001317384, NM_001317387, NM_001364286
ASCL1	NM_004316
ASPHD1	NM_181718, XM_017023107, XM_024450222, XM_024450223
ATCAY	NM_033064
BDNF	NM_001143805, NM_001143806, NM_001143807, NM_001143808, NM_001143809
C1ORF61	NM_006365
CCL2 (MCP-1)	NM_002982
CELF4	NM_020180, NM_001025087, NM_001025088, NM_001025089, NM_001330603
CNTF	NM_000614
CNP	NM_033133, NM_001330216, XM_011524340
CSF1 (M-CSF)	NM_000757, NM_172210, NM_172211, NM_172212
CSPG4 (NG2)	NM_001897
CXCL1 (GRO- α)	NM_001511, NR_046035
DCX	NM_001195553, NM_000555, NM_178151, NM_178152, NM_178153
DKK	NM_012242
DLL3	NM_203486, NM_016941
DYNC1I1	NM_001135556, NM_004411, NM_001135557, NM_001278421, NM_001278422
EGF	NM_001963, NM_001178130, NM_001178131, NM_001357021, XM_005262796
ELAVL3	NM_001420, NM_032281, XM_011527778, XM_024451410, XM_024451411
EPHA3	NM_005233, NM_182644, XM_005264715, XM_005264716
ESRRB	NM_001379180, NM_004452
FABP7	NM_001446, NM_001319039, NM_001319041, NM_001319042
FAM181B	NM_175885
FGF2	NM_001361665, NM_002006
FKBP5	NM_004117, NM_001145775, NM_001145776, NM_001145777
GAPDH	NM_002046, NM_001256799, NM_001289745, NM_001289746, NM_001357943
GDNF	NM_000514, NM_001190468, NM_001190469, NM_001278098, NM_199231
GFAP	NM_002055, NM_001131019, NM_001242376, NM_001363846, XM_024450690
GLIS1	NM_001367484, NM_147193, XM_017000409, XM_017000410, XM_017000411
GRIA2	NM_001083619, NM_000826, NM_001083620, NM_001379000, NM_001379001
GRIK3	NM_000831
GSK3B	NM_001146156, NM_002093, NM_001354596, XM_006713610, XR_002959518
GSTP1 (GST π)	NM_000852
HES4	NM_021170, NM_001142467, XM_005244771
HES5	NM_001010926, XM_005244751
HEY1	NM_012258, NM_001040708, NM_001282851
HEY2	NM_012259, XM_017010627, XM_017010628, XM_017010629

遺伝子名	GenBankアクセッション番号
HGF	NM_000601, NM_001010931, NM_001010932, NM_001010933, NM_001010934
HOXA4	NM_002141
HOXB3	NM_001384749, NM_002146, NM_001330322, NM_001330323, NM_001384747
HOXB4	NM_024015
HOXB6	NM_018952, NM_001369397, XM_011524727
HOXB8	NM_024016, XM_005257286, XM_017024564
HOXD8	NM_019558, NM_001199746, NM_001199747
HS3ST3B1	NM_006041, NR_130138, XM_017025479
IFI44	NM_006417, NR_135640, NR_135641, XM_005270380, XM_011540516
IFI44L	NM_006820, NM_001375646, NM_001375647, NM_001375648, NM_001375649
IFNG (IFN- γ)	NM_000619
IGF1	NM_000618, NM_001111283, NM_001111284, NM_001111285
IL8	NM_000584, NM_001354840
IMPA2	NM_014214, XM_011525659, XM_011525661
ITM2B	NM_021999
KCND3	NM_004980, NM_172198, NM_001378969, NM_001378970
KIF3C	NM_002254, XM_005264299
KLF4	NM_004235, NM_001314052
KLF9	NM_001206
LAMA1	NM_005559
LHFPL3	NM_199000, NM_001386065, XM_005250327
LIF	NM_002309, NM_001257135, XM_024452239, XM_024452240
LIN28	NM_024674
LINC00152	NR_024204, NR_024205, NR_024206, NR_146460, NR_146461
LMTK3	NM_001080434, XM_011526411, XM_011526412
MAG	NM_002361, NM_080600, NM_001199216
MAP2	NM_001039538, NM_001363910, NM_001363911, NM_001363913, NM_001375474
MBP	NM_001025101, NM_002385, NM_001025081, NM_001025090, NM_001025092
MEIS1	NM_002398
MEIS2	NM_170675, NM_002399, NM_170674, NM_170676, NM_170677
MGC12916	NR_026880
MIF	NM_002415
MLC1	NM_015166, NM_139202, NM_001376472, NM_001376473, NM_001376474
MMRN1	NM_007351, NM_001371403, XM_005262856
MOG	NM_206809, NM_002433, NM_206810, NM_206811, NM_206812
MYC	NM_002467, NM_001354870
NANOG	NM_024865, NM_001297698
NCAM	NM_000615, NM_001076682, NM_001242607, NM_001242608, NM_001386289
NESTIN	NM_006617
NFIA	NM_001134673, NM_005595, NM_001145511, NM_001145512, XM_011541512

遺伝子名	GenBankアクセッション番号
NFIB	NM_001190737, NM_005596, NM_001190738, NM_001282787, NM_001369458
NGF	NM_002506
NKX2.1	NM_001079668, NM_003317
NKX2.2	NM_002509, XM_006723566
NKX6.1	NM_006168
NKX6.2	NM_177400, XM_017016789
NTF3 (NT-3)	NM_001102654, NM_002527
NTRK2	NM_006180, NM_001007097, NM_001018064, NM_001018065, NM_001018066
OLIG1	NM_138983
OLIG2	NM_005806, XM_005260908
PAX6	NM_001368894, NM_000280, NM_001604, NM_001127612, NM_001258462
PDGFA (PDGF-AA)	NM_002607, NM_033023
PDGFRA	NM_006206, NM_001347827, NM_001347828, NM_001347829, NM_001347830
PLP	NM_001128834, NM_199478, NM_000533, NM_001305004
POU5F1	NM_002701, NM_203289, NM_001173531, NM_001285986, NM_001285987
PTPRO	NM_030667, NM_002848, NM_030668, NM_030669, NM_030670
RSPO1 (R-spondin)	NM_001038633, NM_001242908, NM_001242909, NM_001242910
S100B	NM_006272, XM_017028424
SALL4	NM_020436, NM_001318031, XM_005260467, XM_011528921, XM_011528922
SCF	NM_000899, NM_003994
SERPINE2	NM_001136528, NM_006216, NM_001136530, NR_073116, XM_005246641
SFRP2	NM_001010897, NM_001346980, NR_144535, XM_024449348, XM_024449349
SHH	NM_000193, NM_001310462, NR_132318, NR_132319, XM_011516479
SLIT1	NM_003061
SLC1A3	NM_004172, NM_001166695, NM_001166696, NM_001289939, NM_001289940
SLC8A2	NM_015063, XM_005259172, XM_017027159
SOX1	NM_005986
SOX2	NM_003106
SOX6	NM_001367873, NM_017508, NM_033326, NM_001145811, NM_001145819
SOX9	NM_000346
SOX10	NM_006941
SPARCL1	NM_004684, NM_001128310, NM_001291976, NM_001291977
SPON1	NM_006108
STXBP1	NM_001032221, NM_003165, NM_001374306, NM_001374307, NM_001374308
TIMP3	NM_000362
TIMP4	NM_003256
TUBB3	NM_006086, NM_001197181
TRAIL	NM_001190942, NM_001190943, NM_003810
WNT3A	NM_033131, XM_011544319
ZBTB20	NM_001348800, NM_015642, NM_001164342, NM_001164343, NM_001164344

実施例

[0223] 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。

[0224] <実施例 1 細胞凝集体の製造>

i P S細胞株として、京都大学 i P S細胞研究所にて樹立された臨床グレード末梢血由来フィーダーフリー i P S細胞株である Q H J I O 1 s O 4 株を用いた。分化前に、ラミニン 5 1 1 E 8 断片 (i M a t r i x - 5 1 1 E 8 ; ニッピ社製) (0 . 5 m g / m l) が添加された S t e m F i t (登録商標) A K O 3 N 培地 (味の素社製) 中で維持培養された。

[0225] i P S細胞を神経前駆細胞に分化誘導するため、胚様体形成に無血清凝集浮遊培養法 (S F E B q 法) を使用した。具体的に、維持培養された Q H J I O 1 s O 4 株を、 0 . 5 × T r y p L E S e l e c t (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) / 0 . 2 5 m M E D T A (エチレンジアミン四酢酸) / P B S (リン酸生理食塩水、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) で単一細胞に分離し、 9 6 ウェル低接着性プレート (商品名: P r i m e S u r f a c e (登録商標) プレート 9 6 V、住友ベークライト社製) 上に、 9 0 0 0 細胞 / ウェルで播種し、播種日を分化 0 日として 5 % C O ₂ / 5 % O ₂ 下に 3 7 ° C で誘導を開始した。表 2 に示す各因子を添加した胚様体形成培地 (A K O 3 N - C 培地) を用い、毎日半量培地交換を行った。

[表2]

分化開始 からの日数	胚様体形成培地	因子
分化0日目	AK03N-C培地	10 μ M Y-27632(富士フィルム和光純薬社製)、 3 μ M SB431542(ステムジェン社製)、 100nM LDN-193189(ステムジェン社製)及び 3 μ M CHIR99021(ステムジェン社製)
分化1日目 ～7日目	AK03N-C培地	3 μ M SB431542(ステムジェン社製)、 100nM LDN-193189(ステムジェン社製)及び 3 μ M CHIR99021(ステムジェン社製)
分化7日目 ～14日目	AK03N-C培地	1 μ M レチノイン酸(RA、シグマアルドリッチ社)

[0226] 分化14日目に胚様体を96ウェルプレートから回収し、DMEM/F-12(商品名:D-MEM/Ham's F-12; Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12、富士フィルム和光純薬社製)にて1度洗浄した。その後、分化14日目から21日目までに表3に示す1、2、3及び4の条件にて、低接着性フラスコ(商品名: Ultra-Low Attachment 75cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap、コーニング社製)にて、5%CO₂/20%O₂下に37℃で、3日に1回培地交換を行い7日間培養した。

[表3]

条件	培地	因子
1	神経・グリア増殖用培地	1 μ M レチノイン酸(RA、シグマアルドリッチ社)
2	神経・グリア増殖用培地	1 μ M パルモルファミン(PM、ミリポア社製)
3	神経・グリア増殖用培地	1 μ M RA及び1 μ M PM
4	AK03N-C培地	1 μ M RA及び1 μ M PM

[0227] 表3中の神経・グリア増殖用培地として、DMEM/F-12(3.15 g/L グルコース、15 mM HEPES、2.5 mM L-グルタミン

ン、0.5 mMピルビン酸ナトリウム含有、富士フィルム和光純薬社製)に、B27サプリメント(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、N2サプリメント(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、60 ng/ml T3 (3, 3', 5-トリヨード-L-チロニン ナトリウム塩、シグマアルドリッチ社製)、10 ng/ml PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor-AA、ペプロテック社製)、10 ng/ml IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1、R&D Systems社製)、10 ng/ml NT-3 (Neurotrophin-3、ペプロテック社製)、10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor、ペプロテック社製)、20 ng/ml FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2、ペプロテック社製)を添加した培地を用いた。

[0228] 分化21日目に胚様体を回収し、TrypLE Selectを用いて単一細胞へ分散させた後に1 μ M PMを含む神経・グリア増殖用培地で組織培養用フラスコ(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)にて7日に1回培地交換を行い、浮遊培養を行った(継代数1)。14日後、分化35日目の時点で再び単一細胞へ分散させた後に神経・グリア増殖用培地で浮遊培養を行った(継代数2)。分化35日目と49日目での明視野像を図1Aに示す。

[0229] また、分化49日目で得られた細胞凝集体について終末分化能を確認するため、DMEM/F-12にて希釈した1%マトリゲル基底膜マトリックスグロースファクター リデュースト(コーニング社製)処理をした8ウェルチャンバースライドガラス(イワキ社製)に細胞凝集体の状態で播種し、マトリゲル上に接着させて、成熟化培地にて14日間培養し、終末分化させた。成熟化培地として、KBM Neural Stem Cell(コージンバイオ社製)に、B27サプリメント、1%非必須アミノ酸(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、60 ng/ml T3、10 ng

／m l N T - 3、25 n g／m l C N T F、及び10 n g／m l L I Fを添加した培地を用いた。

[0230] 終末分化14日目（分化63日目）の細胞を用いて、各マーカーに対して蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色は、6種類の1次抗体及びそれらに対応する蛍光標識された2次抗体を使用した。1次抗体は表4に示すように3種類ずつ混合して、ブロッキング液で希釈して2種類の1次抗体液（1次抗体液1及び1次抗体液2）を調製した。2次抗体も同様に表4に示すように3種類ずつ混合して、さらに核染色のためのH o e c h s t 3 3 3 4 2（希釈倍率1：1000、同仁化学社製）も加えて、ブロッキング液で希釈して2種類の2次抗体液（2次抗体液1及び2次抗体液2）を調製した。

[表4]

1次抗体液1	2次抗体液1
マウスIgM O4抗体 (希釈倍率1:500、ミリポア社製)	Alexa Fluor 488標識された ヤギ抗マウスIgM*
ラットIgG2a抗GFAP抗体 (希釈倍率1:1000、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)	Alexa Fluor 555標識された ヤギ抗ラットIgG*
マウスIgG2b抗 β III tubulin (Tuj1) 抗体 (抗体希釈倍率1:500、シグマアルドリッチ社製)	Alexa Fluor 647標識された ヤギ抗マウスIgG2b*
1次抗体液2	2次抗体液2
マウスIgG3抗GalC抗体 (希釈倍率1:1000、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)	Alexa Fluor 488標識された ヤギ抗マウスIgG3*
ラットIgG2a抗MBP抗体 (希釈倍率1:1000、バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)	Alexa Fluor 555標識された ヤギ抗ラットIgG*
マウスIgG1抗MAP2抗体 (希釈倍率1:500、シグマアルドリッチ社製)	Alexa Fluor 647標識された ヤギ抗マウスIgG1*
1次抗体液3	2次抗体液3
マウスIgM O4抗体 (希釈倍率1:500、ミリポア社製)	Alexa Fluor 488標識された ヤギ抗マウスIgM*
ラットIgG2a抗GFAP抗体 (希釈倍率1:1000、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)	Alexa Fluor 555標識された ヤギ抗ラットIgG*
マウスIgG1抗MAP2抗体 (希釈倍率1:500、シグマアルドリッチ社製)	Alexa Fluor 647標識された ヤギ抗マウスIgG1*

*: 希釈倍率1:1000、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製

[0231] 蛍光免疫染色は、終末分化14日目（分化63日目）に、条件1、2、3及び4で得られたそれぞれの細胞を4%パラフォルムアルデヒド（PFA、富士フィルム和光純薬社製）にて室温で25分間固定し、PBSで3度洗浄した後に、10%ヤギ血清（富士フィルム和光純薬社製）／PBSをブロッキング液として室温で1時間インキュベートした。その後、上記表4に示す1次抗体液（1次抗体液1又は1次抗体液2）を添加し、4℃で1晩インキュベートし、共染色を行った。その後、PBSで3度洗浄し、更に1次抗体液に対応した2次抗体液（2次抗体液1又は2次抗体液2）を添加し、室温で1時間インキュベートした。その後、PBSで3度洗浄し、4℃で保存した。

[0232] 顕微鏡観察及び画像取得は、蛍光顕微鏡BX-710（キーエンス社製）を用いて行われた。蛍光免疫染色像を図1Bに示す。なお、Mergeは3種類の蛍光を重ねた画像である。条件1、2、3及び4のいずれの条件でもニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが検出されたが、条件1では終末分化14日目の時点でO4陽性細胞の形態が未熟であること、GalC陽性細胞が検出されなかったことから成熟が遅いこと、条件2ではGFAP非陽性細胞集団が検出されたことから、条件3又は4が最も良い条件であることが明らかとなった。

[0233] 以上の検討から、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法を確立した（図2）。なお、図2中、胚様体形成培地はAKO3N-C培地であり、神経・グリア増殖用培地は上記の神経・グリア増殖用培地であり、化合物のSはSB431542を、LはLDN193189を、CはCHIR99021を、YはY-27632を、RAはレチノイン酸を、PMはパルモルファミンをそれぞれ表す。

[0234] <実施例2 細胞凝集体の特性評価1（分化誘導過程での遺伝子発現変化）>

分化誘導過程での遺伝子発現変化を検討するため、分化誘導の中間産物についてRNA-seqによる遺伝子発現解析を実施した。Q

HJ101s04株を用いて実施例1の条件3の方法で分化誘導を開始し、分化前(iPS細胞株)、分化7日目、14日目、21日目、35日目の細胞からRNeasy Plus Miniキット(キアゲン社製)を用いてトータルRNAを抽出し、Illumina社のTruSeq Stranded mRNA Library Prep kitを用いてライブラリーを作成し、HiSeq 2500を用いて80サイクルのシーケンスを行った。1細胞あたり3000万リード以上のデータにて遺伝子発現解析を行った(図3A~3D)。

[0235] 分化誘導前(iPS細胞)と分化7日目の遺伝子発現プロファイルと比較した結果、分化7日目の時点で多能性マーカーであるNANOG及びPOU5F1(OCT3/4)の発現量は顕著に低下しており、また、分化7日目では神経幹細胞マーカーであるSOX1、PAX6、HES4及びHES5の発現量は顕著に上昇した(図3A)。分化7日目と分化14日目の遺伝子発現プロファイルと比較した結果、分化14日目で分化7日目に比較して遺伝子発現が上昇する遺伝子として、ASCL1、HEY1、DCX、 β III tubulin(TUBB3)、ELAVL3、ZBTB20、SLIT1、HOXB3、HOXA4、HOXB4、HOXB6、HOXB8等が挙げられた(図3B)。また、分化14日目と分化21日目の遺伝子発現プロファイルと比較した結果、分化21日目の時点で分化14日目に比較して遺伝子発現が上昇する遺伝子としてHEY2、NKX6.2、NKX2.2、OLIG1、OLIG2等が挙げられた(図3C)。分化21日目と分化35日目の遺伝子発現プロファイルと比較した結果、分化35日目の時点で分化21日目に比較して発現量が上昇する遺伝子として、NFIA、NFI B、SLC1A3、S100B、FABP7が挙げられた(図3D)。また、PAX6の発現量が顕著に低下した(図3A)。

[0236] <実施例3 細胞凝集体の特性評価2(細胞凝集体の蛍光免疫染色)>

iPS細胞株として、京都大学iPS細胞研究所にて樹立された臍帯血由来フィーダーフリーiPS細胞株であるFf-WJ14s01株を用いて、

実施例 1 の条件 3 の方法でグリア前駆細胞を含む細胞凝集体を作製し、各分化マーカーに対する蛍光免疫染色を実施した。蛍光免疫染色は、8種類の1次抗体及びそれらに対応する蛍光標識された2次抗体を使用した。1次抗体は表5に示すように2又は3種類ずつ混合して、ブロッキング液で希釈して3種類の1次抗体液（1次抗体液1、1次抗体液2、1次抗体液3）を調製した。2次抗体も同様に表5に示すように2又は3種類ずつ混合して、さらに核染色のためのHoechst 33342（希釈倍率1：1000、同仁化学社製）も加えて、ブロッキング液で希釈して3種類の2次抗体液（2次抗体液1、2次抗体液2、2次抗体液3）を調製した。

[表5]

1次抗体液1	2次抗体液1
ラットIgG2a抗GFAP抗体 (希釈倍率1:1000、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)	Alexa Fluor 488標識された ロバ抗ラットIgG*
マウスIgG1抗NESTIN抗体 (希釈倍率1:300、ミリポア社製)	Alexa Fluor 555標識された ヤギ抗マウスIgG1*
マウスIgG2b抗 β III tubulin (Tuj1)抗体 (抗体希釈倍率1:500、シグマアルドリッチ社製)	Alexa Fluor 647標識された ヤギ抗マウスIgG2b*
1次抗体液2	2次抗体液2
マウスIgG2a抗OLIG2抗体 (希釈倍率1:300、ミリポア社製)	Alexa Fluor 488標識された ヤギ抗マウスIgG2a*
ラビット抗PDGFR α 抗体 (希釈倍率1:300、セルシグナリングテクノロジー社製)	Alexa Fluor 555標識された ロバ抗ラビットIgG
マウスIgG2b抗ELAVL3/4抗体 (希釈倍率1:100、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)	Alexa Fluor 647標識された ヤギ抗マウスIgG2b*
1次抗体液3	2次抗体液3
マウスIgG1抗MAP2抗体 (希釈倍率1:500、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)	Alexa Fluor 647標識された ヤギ抗マウスIgG1*
ラビット抗NFIA抗体 (希釈倍率1:100、シグマアルドリッチ社製)	Alexa Fluor 555標識された ロバ抗ラビットIgG*

*:希釈倍率1:1000、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製

[0237] 分化77日目の時点で細胞凝集体を4%PFAにて室温で20分間固定し、PBSで3度洗浄した。固定後の細胞をO.C.T.コンパウンド（スクラファインテックジャパン社製）を用いてドライアイス上で凍結包埋を行い、10 μ m厚の凍結切片を作製し、-80℃にて保管した。凍結切片を1度PBSで洗浄後、10%ヤギ血清（富士フィルム和光純薬社製）/PBSをブロッキング液として室温で1時間インキュベートした。その後、上記表5に示す1次抗体液（1次抗体液1、1次抗体液2又は1次抗体液3）を添加

し、4℃で1晩インキュベートし、共染色を行った。その後、PBSで3度洗浄し、更に1次抗体液に対応した2次抗体液（2次抗体液1又は2次抗体液2又は2次抗体液3）を添加し、室温で1時間インキュベートした。マウント剤パーマフロー（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）でマウント後に4℃で保存した。

[0238] 顕微鏡観察及び画像取得は、蛍光顕微鏡BZ-X710（キーエンス社製）を用いて行われた。蛍光免疫染色像を図4Aに示す。GFAP陽性細胞、NESTIN陽性細胞、Tuj1陽性細胞、OLIG2陽性細胞、EVAL3陽性細胞、MAP2陽性細胞、NFIA陽性細胞が認められた。また、1スフェア（細胞凝集体）を構成する全細胞数当たりのOLIG2陽性細胞及びNFIA陽性細胞の割合をBZ-X710付属の解析ソフト（BZ-H3C）にて定量し、6スフェアの平均を算出した。その結果、OLIG2陽性細胞が $30.9 \pm 6.6\%$ 、NFIA陽性細胞が $87.6 \pm 1.8\%$ の割合で存在した（図4B）。

[0239] <実施例4 細胞凝集体の特性評価3（シングルセル遺伝子発現解析）>

グリア前駆細胞を含む細胞凝集体に特徴的な遺伝子を探索した。実施例1の条件3の方法でFf-WJ14s01株から作製したグリア前駆細胞を含む細胞凝集体（Gliogenic NPC）と、非特許文献2の方法でFf-WJ14s01株から作製した神経への分化指向性が高い細胞を多く含む細胞凝集体（Neurogenic NPC）について「Hayashi et al., Nature Communications, volume 9, Article number 619 (2018)」に記載の方法でシングルセルRNA-seq（RamDA-seq）を行った。IlluminaのHiSeq 2500を用いて、Single-Endモードにて50サイクルのシーケンスを行った。品質評価をクリアしたGliogenic NPC：150個、Neurogenic NPC：91個（計241個）について遺伝子発現解析を行った。

[0240] 遺伝子発現プロファイルから、241個の細胞は3つのクラスター（C1

～C3)に分類された。解析されたNeurogenic NPC全細胞数の91.2%はC1に、8.8%はC3に分類され、C2には分類されなかった。一方、解析されたGliogenic NPC全細胞数の5.3%はC1に、58.0%はC2に、36.7%はC3に分類された(図5)。よって、Neurogenic NPCとGliogenic NPCでは遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示唆された。

[0241] 各クラスターにおいて特徴的に発現する遺伝子(上位10個)を表6に示す。Gliogenic NPCのみが分類されたC2に属する細胞で高発現する遺伝子として、HEY2、C1ORF61、FAM181B、NFIB、ITM2B、NFIA、LHFPL3、MLC1が見出された(表6、図6A、図6B)。また、その他、Neurogenic NPCに比べてGliogenic NPCにて発現が高い遺伝子として、ASCL1、MEIS1、MEIS2、DLL3、HEY1、ZBTB20、SOX9、SLC1A3、S100B、SLIT1、SPARCL1、TIMP3、TIMP4、SPON1、KLF9、GRIK3、SOX6、EPHA3、NTRK2、GRIA2、PTPRO、KCND3、SERPINE2が見出された(図6A、図6B)。なお、表6に記載の遺伝子の一部のGenBankアクセッション番号は、表1に示す。また、LOC541471は、Oncol Lett. 2019 Feb; 17(2): 2457-2464に記載されている。

[表6]

クラスター	C1	C2	C3
各クラスターにおいて特徴的に発現する遺伝子 (上位10個)	ALK	HEY2	ATCAY
	LAMA1	C1ORF61	AKR1C1
	FKBP5	FAM181B	ACTL6B
	MGC12916	NFIB	CELF4
	SFRP2	ITM2B	SLC8A2
	MMRN1	NFIA	LMTK3
	IMPA2	LHFPL3	KIF3C
	LOC541471	MLC1	STXBP1
	HS3ST3B1	IFI44L	DYNC1I1
	LINC00152	IFI44	ASPHD1

[0242] <実施例5 細胞凝集体の特性評価4（終末分化能評価）>

グリア前駆細胞を含む細胞凝集体について、終末分化後にニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統に分化するかを蛍光免疫染色により検討した。実施例1の条件3の方法で作製したFf-WJ14s01株由来のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体（分化77日目）について、実施例1に記載の方法で成熟化培地を用いて終末分化誘導を行った。終末分化31日後（分化108日目）に細胞を実施例1に記載の方法で4%PFAにて室温で25分間固定し、PBSで3度洗浄した後に蛍光免疫染色を行った。顕微鏡観察及び画像取得は、蛍光顕微鏡BX-X710（キーエンス社製）、及び共焦点蛍光顕微鏡LSM880（ツァイス社製）を用いて行われた。その結果、Tuj1及びMAP2陽性ニューロン、GFAP陽性アストロサイト、O4陽性、GalC陽性及びMBP陽性オリゴデンドロサイトが検出された。よって、3系統への分化能が確認された（図7A）。また、各陽性細胞率を、In Cell Analyzerの解析ソフトDeveloper Toolbox（GEヘルスケア社製）を用いて定量した。その結果、陽性細胞率はO4陽性細胞が10%程度、GFAP陽性細胞が30%程度、Tuj1陽性細胞が30%程度であった（図7B）。

[0243] <実施例6 細胞凝集体の特性評価5（終末分化前後の遺伝子発現変化）>

グリア前駆細胞を含む細胞凝集体について、終末分化前後での各分化細胞マーカーの遺伝子発現レベルを解析した。実施例1の条件3の方法でQHJ101s04株から作製したグリア前駆細胞を含む細胞凝集体（分化48日目）について、実施例1に記載の方法で成熟化培地を用いて終末分化誘導を行った。終末分化前（分化48日目）と終末分化34日後（分化82日目）の細胞から、RNeasy Plus Miniキット（キアゲン社製）を用いてトータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAについて、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR（サーモフィッシャーサイエントフィック社製）を用いてcDNAに逆転写した。その後、Fast S

YBR (商標) Green Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いて定量的RT-PCR法でGFAP、CSPG4 (NG2)、OLIG2、PLP1 (PLP)、PDGFRA (PDGFR α)、SOX10、CNP、MBP、TUBB3 (β III tubulin)、MAP2の発現量をStep One Plus Real time PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いて測定した。なお、内在性コントロールとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

- [0244] 標的遺伝子の増幅反応に使用したプライマーのセットを表7に示す。結果を図8に示す。終末分化後の発現量が終末分化前の発現量(1とする)に対する相対発現量になるように示した。終末分化後の細胞ではアストロサイトマーカー及びオリゴデンドロサイトマーカーの発現量が上昇したことから、成熟化培地による終末分化誘導により、成熟したアストロサイト及びオリゴデンドロサイトへ分化したことが示唆された。神経マーカーである β III tubulinとMAP2の遺伝子発現量は終末分化前後でほとんど変わらなかったが、実施例3にて検討した細胞凝集体の蛍光免疫染色の結果からも、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体は、終末分化前の細胞凝集体の時点から β III tubulin及びMAP2を発現しており、終末分化後も発現が維持されることが考えられた。

[表7]

遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー
GAPDH	GGTCGGAGTCAACGGATTTG (配列番号1)	TCAGCCTTGACGGTGCCATG (配列番号2)
GFAP	GTTCTCTCGGAGTATCTGG (配列番号3)	GATATCCCACCTCATAAAAACC (配列番号4)
CSPG4	ACTTGCATCCGCGGCTTCCTTCTT (配列番号5)	ACAACGTGGCCCAGCCCTCTA (配列番号6)
OLIG2	GGCGCGCAACTACATCCT (配列番号7)	CGCTCACCAGTCGCTTCAT (配列番号8)
PDGFRA	CTATCCACACTGTCAAACAGGTTG (配列番号9)	ACTGCTGGACTGAGAAGTTTCATC (配列番号10)
PLP	CTGCTCACCTTCATGATTGC (配列番号11)	TGACTTGCAGTTGGGAAGTC (配列番号12)
SOX10	ATCCAGGCCCACTACAAGAG (配列番号13)	GAAGTCGATGTGAGGCTTCC (配列番号14)
CNP	AAGGAGAAGAACCAGTGGCA (配列番号15)	CAAGTCCATCTTCTCCCTGG (配列番号16)
MBP	GAGCCCTCTGCCCTCTCATGCC (配列番号17)	TCAGGGACAGTCCTCTCCCTTTCCC (配列番号18)
TUBB3	TGATGAGCATGGCATCGAC (配列番号19)	GGCCTGAAGAGATGTCCAAA (配列番号20)
MAP2	GGATCAACGGAGAGCTGAC (配列番号21)	TCAGGACTGCTACAGCCTCA (配列番号22)

[0245] <実施例7 亜急性期脊髄損傷モデルマウスに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の移植実験>

NOD-SCID (NOD, CB17-Prkdcscid・J) マウス (チャールズ リバー ラボラトリーズ社) は慶應義塾大学及びNIHの動物実験ガイドラインに従って取り扱われた。動物実験計画は、慶應義塾大学内の動物実験委員会にて承認された。8週齢のメスNOD-SCIDマウスにケタミン (100mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) を腹腔内投与により麻酔をかけた。「Scheff et al., Journal of neurotrauma 20, 179-193 (2003)

」に記載の方法で、第10胸椎レベルにIH impactor (60-70 kdyn、Precision Systems and Instrumentation社製)で圧挫損傷を加え、直後にアンピシリン (12.5 mg/kg)を筋肉内注射した。損傷を加えて7日後に、「Basso et al., Journal of Neurotrauma, 23: 635-59 (2006)」に記載の方法でBasso Mouse Scale (BMS)を用いて後肢運動機能を評価した。損傷後7日の時点でBMSが2.5以上に自然回復している個体は、細胞移植効果が測定できないことから除外し、2群 (対照群12匹と細胞移植群14匹)に分け、各群のBMS平均が同じになるように群分けをした。

[0246] 損傷後9日目 (亜急性期)に、定位固定インジェクションシステム (室町機械社製)を用いて、28Gのメタルニードルにて細胞移植群には細胞懸濁液を、対照群にはPBSを2 μ l損傷中心部に移植した。細胞はFf-WJ14s01株由来のグリア前駆細胞を含む細胞凝集体 (5.0 $\times$ 10⁵細胞)を2 μ lのPBS中に集めた状態で移植に用いた。移植後12週間まで各種運動機能評価を実施した。また、移植後12週間の時点で深麻酔の下、4% PFAを心臓内に灌流することによって脊髄を固定し、4℃保管を行った。その後、固定した脊髄を30%スクロース/PBS中で4℃保管した後にO.C.T.コンパウンドを用いて凍結包埋を行い、矢状 (14 μ m厚)及び横断 (16 μ m厚)切片を作製し、-80℃にて保管した。組織染色は、組織像観察のためにヘマトキシリン-エオシン (HE)染色、及び髄鞘組織染色のためにルクソールファストブルー (LFB)染色を行った。

[0247] また、より詳細な組織評価のために蛍光免疫染色を行った。PBSで3度洗浄した後に0.1% Triton X-100を含有するブロッキングワン (ナカライテスク社製)をブロッキング液として室温で1時間インキュベートした。その後、1次抗体をブロッキング液で希釈した1次抗体液を調製し、4℃で1晩インキュベートした。本実施例で使用した1次抗体は、ヒト抗Hu抗体 (希釈倍率: 1:1000、ロックフェラー大 Dr. Robe

rt D a r n e l lより提供)、マウス抗GFAP抗体(希釈倍率1:5000、アブカム社製)、マウス抗APC抗体(希釈倍率1:300、アブカム社製)、ラビット抗ヒト特異的NESTIN抗体(希釈倍率1:200、IBL社製)、ラビット抗Ki67抗体(希釈倍率1:1000、ライカバイオシステムズ社製)、マウス抗OCT3/4抗体(希釈倍率1:100、サンタクルズ社製)、マウス抗ヒト特異的核抗体(HNA)(希釈倍率1:100、ミリポア社製)、マウス抗ヒト特異的細胞質抗体(STEM121)(希釈倍率1:100、ミリポア社製)、マウス抗ヒトTau抗体(希釈倍率1:500、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)、マウス抗Bassoon抗体(希釈倍率1:200、ジーンテックス社製)、マウス抗ヒトSynaptophysin抗体(希釈倍率1:200、ミリポア社製)であった。その後、PBSで3度洗浄した後、更に1次抗体に対応したAlexa Fluor標識2次抗体と核染色のためのHoechst 33342(希釈倍率1:1000、同仁化学社製)をそれぞれブロッキング液で希釈した2次抗体液を調製し、室温で1時間インキュベートした。PBSで3度洗浄後、マウント剤パーマフロー(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いてマウント後に4℃で保存した。サンプルは蛍光顕微鏡BX710(キーエンス社製)及び共焦点蛍光顕微鏡LSM700(ツァイス社製)を用いて観察及び画像取得を行った。

[0248] <実施例8 亜急性期脊髄損傷モデルマウスに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の有効性評価>(BMSスコアリング)

実施例7に記載した実験において、移植細胞の有効性評価を検討するため、BMSスコアリングによる後肢運動機能評価を移植後12週間まで7日に1回実施した。細胞移植群では、損傷後14日目(移植後5日目)の時点から損傷後91日目(移植後82日目)の評価最終日まで対照群に比べてBMSスコアが有意に(*: $p < 0.05$)増加した(図9)。

[0249] <実施例9 亜急性期脊髄損傷モデルマウスに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の有効性評価(ロータロッドテスト)>

移植後12週間の時点で協調運動評価（ロータロッドテスト）を実施した。1分間当たり20回転しているロータロッド（室町機械社製）上で歩行可能な時間を測定した。細胞移植群では、対照群に比べて有意に（*： $p < 0.05$ ）長い時間ロータロッド上で歩行可能であった（図10）。

[0250] <実施例10 亜急性期脊髄損傷モデルマウスに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の有効性評価（歩様パターン評価）>

移植後12週間の時点で歩様パターン評価を、Digigaitシステム（Mouse Specific社製）を用いて実施した。トレッドミル（7cm/秒）上で歩行させ、歩幅と歩行角度を計測した。細胞移植群では対照群に比べて有意に（**： $p < 0.01$ ）歩幅が長かった（図11A）。また、細胞移植群では進行方向に対して肢をつく角度が対照群に比べて有意に（*： $p < 0.05$ ）小さいことから、両肢を平行に接地させ、より正常に近い歩行パターンであることが示唆された（図11B）。

[0251] <実施例11 亜急性期脊髄損傷モデルマウスに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の有効性評価（キネマティクス解析）>

移植後12週間の時点で、関節の動きを評価するため、三次元動作解析ソフトKinemaTracer（キッセイコムテック社製）を用いて解析を実施した。肩関節、股関節、膝関節、足関節、足趾にマーカーラベルしたマウスをトレッドミル上で歩行させ、両側面前後4方向から高速度デジタルカメラ（GoPro社製）にて動画撮影し、各マーカーの軌跡を三次元的に可視化させた。図12の（A）に後肢が地面から離れてから接地するまでの軌跡の代表例を示す。細胞移植群では、対照群に比べてより肢が地面から離れており、よりスムーズな軌跡を示した。また、図12の（B）に歩行周期1周期における股関節、膝関節、足関節、足趾の関節角度変化を示す。6個体に対して5ステップずつ解析を行い、各図は細い線は1個体分の5ステップの平均の関節角度変化を示しており、太い線は6個体の平均を示す。細胞移植群では、対照群に比べて歩行ごとの関節の動きにばらつきが小さいことが示唆された。

[0252] <実施例 1 2 亜急性期脊髄損傷モデルマウスの脊髄の組織評価>

移植後 1 2 週間の時点で、移植細胞を検出するため、矢状切片について S T E M 1 2 1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った（図 1 3 の（A））。移植細胞は、損傷中心部から離れた部位にも広範囲にわたって検出され、移植細胞の生着が確認された。また、隣接する切片について H E 染色を実施し、頭側から尾側まで広範囲の組織像を観察した結果、腫瘍様構造は認められなかった（図 1 3 の（B））。また、損傷中心部（2）、損傷中心部から頭側 4 m m （1）、損傷中心部から尾側 4 m m （3）の横断切片について抗 H N A 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った（図 1 3 の（C））。移植部位である損傷中心部及び頭側 4 m m、尾側 4 m m の切片において H N A 陽性細胞が検出されたことから、移植細胞が広範囲に遊走していることが示唆された。

[0253] より詳細な移植細胞の特性解析のため、矢状切片についてヒト特異的マーカーと各種マーカーとの蛍光免疫共染色を実施した。まず、i P S 細胞由来神経前駆細胞が腫瘍化すると O C T 3 / 4 陽性になるとの報告（非特許文献 8）から、抗 O C T 3 / 4 抗体及び抗 K i 6 7（増殖性マーカー）抗体と抗 H N A 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。また、移植細胞の特性解析のため、抗 N E S T I N（神経幹細胞マーカー）抗体、抗 H u（神経マーカー）抗体、抗 G F A P（アストロサイトマーカー）抗体、抗 A P C（オリゴデンドロサイトマーカー）抗体、抗 H N A 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。

[0254] その結果、H N A + / O C T 3 / 4 + 共陽性細胞は検出されなかったことから、移植細胞は腫瘍化していないことが示唆された（図 1 4 A）。H N A + / K i 6 7 + 共陽性細胞は $4.71 \pm 0.20\%$ であり、移植細胞中に増殖性細胞が存在することが示唆された。また、H N A + / N E S T I N + 共陽性神経前駆細胞は $17.02 \pm 3.10\%$ 、H N A + / H u + 共陽性の神経細胞は $18.12 \pm 1.22\%$ 、H N A + / G F A P + 共陽性アストロサイトは $27.23 \pm 1.92\%$ 、H N A + / A P C + 共陽性オリゴデンドロサイトは $36.56 \pm 2.82\%$ であった（図 1 4 B）。よって、移植後 9 1 日の時点で、

一部未熟な神経前駆細胞及びグリア前駆細胞が存在するものの、移植細胞の大半がニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統に分化することが示唆された。

[0255] 次に、移植細胞由来のニューロンがホストのマウスニューロンと神経回路を形成しているかを検討するため、矢状切片について、T u j 1 抗体、抗H N A 抗体と抗マウス特異的B a s s o o n (前シナプスマーカー) 及び抗ヒトS y n a p t o p h y s i n (シナプス小胞タンパク質) 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、H N A ⁺ / T u j 1 ⁺ 共陽性の移植細胞由来ニューロンがマウス特異的B a s s o o n と共局在した(図15の(A))。また、H N A ⁻ / T u j 1 ⁺ のホストニューロンがヒト特異的S y n a p t o p h y s i n と共局在した(図15の(B))。これらの結果から、ホストのマウスニューロンと移植細胞由来ニューロンが神経回路を形成していることが示唆された。

[0256] 次に、細胞移植による再髄鞘化効果を検討した。図16Aに、頭側(R o s t r a l) 0. 48mm、損傷中心部(E p i - c e n t e r) 及び尾側(C a u d a l) 0. 48mmのそれぞれのL F B 染色画像を示す。損傷中心部から頭尾側0. 96mmまでの横断切片についてL F B 染色により髄鞘組織を観察し、L F B 陽性領域を定量した。その結果、細胞移植群では、観察した全ての切片においてL F B 陽性面積が対照群に比べて有意に(*: p < 0. 05; **: p < 0. 01) 増大した(図16A、図16B)。また、横断切片について成熟オリゴデンドロサイトマーカーM B P とS T E M 1 2 1 の蛍光免疫染色を行った。その結果、S T E M 1 2 1 ⁺ / M B P ⁺ 共陽性領域が検出された(図17)。さらに、より詳細な観察のため、「S h i b a t a e t a l. , F r o n t i e r s i n N e u r a l C i r c u i t s, . 2019; 13: 29.」に記載の方法で、横断切片についてS T E M 1 2 1 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法を行い、S T E M 1 2 1 抗体反応部位を、金コロイド粒子を標識した二次抗体により検出した。電子顕微鏡下で髄鞘を観察した結果、金コロイド粒子が髄鞘に検出された(図18

矢印)。これらの結果から、移植細胞由来の成熟オリゴデンドロサイトが神経軸索を再髄鞘化していることが示唆された。

[0257] <実施例 13 慢性期脊髄損傷モデルラットに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の移植実験>

Nude (F344/NJcl-rnu/rnu) ラット (日本クレア社) は慶應義塾大学及びNIHの動物実験ガイドラインに従って取り扱われた。動物実験計画は、慶應義塾大学内の動物実験委員会にて承認された。8週齢のメスNudeラットに三種混合麻酔 (メドミジン: 0.375 mg/kg、ミダゾラム: 2 mg/kg、ブトルファノール: 2.5 mg/kg) を腹腔内投与により麻酔をかけた。「Scheff et al., Journal of neurotrauma 20, 179-193 (2003)」に記載の方法で、第10胸椎レベルにIH impactor (220 kdyn、Precision Systems and Instrumentation社製) で圧挫損傷を加え、オルビフロキサシン (5 mg/kg) を皮下注射した後、ミドミジン拮抗薬 (アチパメゾール: 0.75 mg/kg) の腹腔内投与により覚醒を促した。損傷を加えた翌日及び損傷後1週毎に、「Basso et al., Journal of Neurotrauma, 12: 1-21 (1995)」に記載の方法でBasso Beattie Bresnahan (BBB) を用いて後肢運動機能を評価した。損傷後41日の時点でBBBが9以上に自然回復している個体は、細胞移植効果が測定できないことから除外し、2群 (対照群13匹と細胞移植群18匹) に分け、各群のBBB平均が同じになるように群分けをした。

[0258] 損傷後42日目 (慢性期) に、定位固定インジェクションシステム (室町機械社製) を用いて、27Gのメタルニードルにて細胞移植群には細胞懸濁液を、対照群にはPBSを、損傷中心部の頭尾側2ヶ所に2 µlずつ移植した。細胞懸濁液は、QHJ101s04株由来グリア前駆細胞を含む細胞凝集体 (5.0×10^5 細胞/2 µl) をPBS中に集めた状態で移植に用いた

。移植後12週間まで後肢運動機能評価を実施した。また、移植後12週間の時点で歩様パターン評価を実施した後、深麻酔の下、4% PFAを心臓より全身に灌流することによって脊髄を固定・採取し、4% PFA浸漬下で4℃保管を行った。その後、固定した脊髄を30%スクロース/PBS中で4℃保管した後にO. C. T. コンパウンドを用いて凍結包埋を行い、矢状（14 μm厚）及び横断（20 μm厚）切片を作製し、-80℃にて保管した。組織染色は、組織像観察のためにヘマトキシリン-エオシン（Hematoxylin Eosin: HE）染色、及び蛍光免疫染色を行った。

[0259] <実施例14 慢性期脊髄損傷モデルラットに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の有効性評価>（BBBスコアリング）

実施例13に記載した実験において、移植細胞の有効性評価を検討するため、BBBスコアリングによる後肢運動機能評価を移植後12週間まで7～14日に1回実施した。細胞移植群では、損傷後63日目（移植後21日目）の時点から損傷後126日目（移植後84日目）の評価最終日まで対照群に比べてBBBスコアが有意に（*：p<0.05、**：p<0.01）増加した（図19）。

[0260] <実施例15 慢性期脊髄損傷モデルラットに対するグリア前駆細胞を含む細胞凝集体の有効性評価（歩様パターン評価）>

移植後12週間の時点で歩様パターン評価を、Digigaitシステム（Mouse Specific社製）を用いて実施した。トレッドミル（10cm/秒）上で歩行させ、歩幅と歩行角度を計測した。細胞移植群では対照群に比べて有意に（**：p<0.01）歩幅が長かった（図20の（A））。また、細胞移植群では進行方向に対して肢をつく角度が対照群に比べて有意に（**：p<0.01）小さいことから、両肢を平行に接地させ、より正常に近い歩行パターンであることが示唆された（図20の（B））。

[0261] <実施例16 慢性期脊髄損傷モデルラットの脊髄の組織評価>

実施例13に記載の方法で作製した矢状切片についてHE染色を実施した

結果、腫瘍様構造は認められなかった（図21の（A））。また、隣接する切片について抗HNA抗体を用いて蛍光免疫染色を実施した。その結果、HNA陽性細胞が広範囲で検出されたことから、移植細胞の生着が確認された（図21の（B））。

[0262] より詳細な移植細胞の特性解析のため、実施例12に記載の方法で、矢状切片についてヒト特異的マーカーと各種マーカーとの蛍光免疫共染色を実施した。造腫瘍性を評価するため、抗OCT3/4抗体と抗HNA抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、HNA+/OCT3/4+共陽性細胞は検出されなかったことから、移植細胞は腫瘍化していないことが示唆された（図22の（A））。また、移植細胞の終末分化能を検討するため、抗Hu（神経マーカー）抗体、抗GFAP（アストロサイトマーカー）抗体及び抗APC（オリゴデンドロサイトマーカー）抗体と抗HNA抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、HNA+/Hu+共陽性細胞（図22の（B））、HNA+/GFAP+共陽性細胞（図22の（C））、HNA+/APC+共陽性細胞が検出された（図22の（D））。よって、移植細胞がラット脊髄内でニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化することが示唆された。

[0263] <実施例17 均一サイズの細胞凝集体の作製>

実施例1の条件3の方法でQHJ101s04株から作製したグリア前駆細胞を含む細胞凝集体を分化49日の時点でTrypLE Selectを用いて単一細胞へ分散させた後に、96ウェル低接着性プレート（商品名：PrimeSurface（登録商標）96スリットウェルプレート、住友ベークライト社製）に、10000細胞及び20000細胞/ウェル播種し、5%CO₂/20%O₂下に37℃で神経・グリア増殖培地中で培養した。その結果、播種翌日から細胞凝集体の形成が確認された。3日に1回半量培地交換を行い、8日間及び14日間培養した（図23）。培養8日及び14日（分化57日及び63日）の時点で細胞凝集体1個をDMEM/F-12にて希釈した1%マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクター リ

デュースト（コーニング社製）処理をした96ウェルプレート（コーニング社製）1ウェルに移し、成熟化培地にて28日間培養し、終末分化誘導を行った。

[0264] 終末分化28日（分化85日及び91日）の時点で4%PFAにて室温で25分間固定し、PBSで3度洗浄した後に、10%ヤギ血清（富士フィルム和光純薬社製）／PBSをブロッキング液として室温で1時間インキュベートした。その後、上記表4に示す1次抗体液3を添加し、4℃で1晩インキュベートし、共染色を行った。その後、PBSで3度洗浄し、更に1次抗体液3に対応した2次抗体液3を添加し、室温で1時間インキュベートした。その後、PBSで3度洗浄し、4℃で保存した。

[0265] 顕微鏡観察及び画像取得は、蛍光顕微鏡BZ-X710（キーエンス社製）を用いて行われた。蛍光免疫染像を図24に示す。検討した全ての条件（播種細胞数（10000細胞及び20000細胞）と培養日数（8日間（A）及び14日間（B））で、O4陽性オリゴデンドロサイト、GFAP陽性アストロサイト、MAP2陽性ニューロンが検出された。

[0266] <実施例18 グリア前駆細胞を含む細胞凝集体由来分泌因子の検出>

実施例1の条件3の方法でQHJ101s04株からグリア前駆細胞を含む細胞凝集体を作製した。分化45日の時点で神経・グリア増殖培地に培地交換を行い、5%CO₂／20%O₂下に37℃で培養した。48時間後に培養液を回収し、遠心分離（1000rpm、5分）により培養上清を回収した。残りの細胞ペレットをTrypLE Selectを用いて単一細胞へ分散させ、総細胞数を計測した。また、神経・グリア増殖培地に含まれるサイトカイン濃度を測定するため、神経・グリア増殖培地のみを同一条件（5%CO₂／20%O₂／37℃）で48時間処理した後に回収した。

[0267] 培養上清中の分泌因子を2つの方法で検出した。第1の方法として、Bio-Plex Pro（登録商標）ヒトサイトカインスクリーニング48-Plexパネル（バイオ・ラッド社製）を用いて製造業者の説明書に従い、48種類のサイトカイン（FGF basic、Eotaxin、G-CS

F、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-1 α 、IL-2R α 、IL-3、IL-12 (p40)、IL-16、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1 (MCAF)、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、VEGF、CTACK、MIF、TRAIL、IL-18、M-CSF、及びTNF- β) 濃度を測定した。

[0268] まず、Conjugated magnetic beadsを96ウェルプレートに50 μ lずつ添加し、キット付属のWash Bufferで2回洗浄した。なお、洗浄工程については自動化された磁気洗浄システム (Bio-Plex Pro 11 Wash Station、バイオ・ラッド社製) を用いて実施した。次に、各ウェルにキット付属のStandardを用いて作製した8段階の4倍希釈系列 ($n=2$) とサンプル (培養上清と培地のみ、 $n=3$) を50 μ lずつ添加し、850rpmで振とうさせながら室温で30分間、遮光下で反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにキット付属のDetection Antibodiesを25 μ lずつ添加し、850rpmで振とうさせながら室温で30分間、遮光下で反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにキット付属のStreptavidin-Phycoerythrinを50 μ lずつ添加し、850rpmで振とうさせながら室温で10分間、遮光下で反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。各ウェルにキット付属のAssay Bufferを125 μ lずつ添加し、Bio-Plex 200システム (バイオ・ラッド社製) を用いて蛍光値を測定した。

[0269] 各サイトカインのStandard希釈系列の測定データから、標準曲線を、Bio-Plex Manager ソフトウェア ver 6.1 (

バイオ・ラッド社)を用いて5パラメーターロジスティック曲線回帰により作成し、各サンプル中のサイトカイン濃度を定量した。その後、培養上清の測定データから、培地のみの測定データをバックグラウンドとして差引くことにより、培養上清中に分泌されたサイトカイン濃度を算出した。培養上清中に検出されたサイトカインの上位10個の濃度及び細胞あたりの分泌量を表8に示す。

[表8]

	pg/ml	pg/1000 細胞
MIF	433	1.50
MCP-1	250	0.867
IL-8	11.5	0.0398
SCF	8.83	0.0306
M-CSF	6.65	0.0230
HGF	5.48	0.0190
GRO- α	5.43	0.0188
LIF	3.29	0.0114
IFN- γ	3.07	0.0106
TRAIL	3.01	0.0104

[0270] MIF、MCP-1、IL-8、及びGRO- α はアストロサイト由来の分泌因子として報告があり（非特許文献9）、また、SCF、HGF、及びMIFは神経前駆細胞の増殖・分化を促進すること（非特許文献10～12）、並びに、M-CSFはオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・分化に重要な役割を果たすこと（非特許文献13）から、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体から神経新生に寄与するサイトカインが分泌されていることがわかった。

[0271] また第2の方法として、Human SPARC-like 1/SPARCL1 DuoSet ELISA（R&Dシステムズ社製）とDuoSet Ancillary Reagent Kit 2（R&Dシステムズ社製）を用いて培養上清中のSPARCL1の濃度を測定した。

[0272] まず、製造業者の説明書に従い、Human SPARC-like 1

Capture Antibodyを96ウェルプレートに100 μ lずつ添加し、室温で一晩吸着させた。その後、キット付属のWash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにキット付属のReagent Diluentを300 μ lずつ添加し、室温で80分間反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにキット付属のStandardを用いて作製した11段階の2倍希釈系列（ $n=2$ ）とサンプル（培養上清と培地のみ、 $n=3$ ）を100 μ lずつ添加し、室温で2時間、遮光下で反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにキット付属のHuman SPARC-like 1 Detection Antibodyを100 μ lずつ添加し、室温で2時間、遮光下で反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにキット付属のStreptavidin-Horse radish peroxidaseを100 μ lずつ添加し、室温で20分間、遮光下で反応させた。その後、Wash Bufferで3回洗浄した。次に、各ウェルにSubstrate Solution（キット付属のColor Reagent AとColor Reagent Bを1:1で混合したもの）を100 μ lずつ添加し、室温で20分間、遮光下で反応させた。続いて、各ウェルにキット付属のStop Solutionを50 μ lずつ添加し反応を停止させ、すぐにプレートリーダーEnspire（パーキンエルマー社製）を用いて吸光度を測定し、450nmでの吸光度から540nmでの吸光度を差し引いた値を算出した。

[0273] Standard希釈系列の測定データからエクセル（マイクロソフト社製）を用いて、両対数スケールでのプロットから検量線を作成し、各サンプル中のSPARCL1濃度を定量した。培養上清の測定データから、培地みの測定データをバックグラウンドとして差引くことにより、培養上清中に分泌されたSPARCL1濃度を算出した。また、細胞あたりのSPARCL1分泌量を算出した（表9）。

[表9]

	ng/ml	ng/1000 細胞
SPARCL1	6489.09	22.47

[0274] 解析の結果、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の培養上清中には、高濃度のSPARCL1が存在することが明らかとなった。SPARCL1はアストロサイト由来の分泌因子であり、シナプス形成を制御することが知られている（非特許文献14）ことから、SPARCL1はグリア前駆細胞の培養上清中に検出されるマーカーとして妥当性を有すると考えられる。したがって、SPARCL1は、単独又は他のマーカーと組み合わせて用いることによって、製造工程において、目的細胞が取得できていることを確認するためのマーカーとして有用である。

請求の範囲

〔請求項1〕 グリア前駆細胞を含む細胞凝集体の製造方法であって、以下の工程

■

(1) 1以上のSMADシグナル伝達阻害剤及び1以上のWntシグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地中で、フィーダー細胞非存在下、多能性幹細胞を5日間～10日間浮遊培養することにより、細胞凝集体を形成させる工程、

(2) (1) で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含む胚様体形成培地中で、浮遊培養する工程、

(3) (2) で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及び 1 以上の SHH シグナル伝達活性化剤を含む胚様体形成培地又は神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程、並びに

(4) (3) で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸を含まず、1 以上の S H H シグナル伝達活性化剤を含む神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程

を含み、更に以下の工程：

(5) (4) で得られた細胞凝集体を、レチノイン酸及びSHHシグナル伝達活性化剤を共に含まない神経・グリア増殖用培地中で、浮遊培養する工程

を含んでいてもよい、製造方法。

[請求項2] (1)の工程において、多能性幹細胞を、複数の均一な形状の孔を有する培養容器を用いて培養する、請求項1に記載の製造方法。

〔請求項3〕 (1)の工程において、(1)の工程開始時に比べて、以下の条件

■ ■

1) SOX1、PAX6、HES4及びHES5のうち少なくとも1つのRNAの発現量が100倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、

2) OCT 3/4のRNAの発現量が200分の1以下に低下した細胞

胞凝集体が得られること、並びに

3) NANOGのRNAの発現量が400分の1以下に低下した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(1)の工程を持続してから、(2)の工程が開始される、請求項1又は2に記載の製造方法。

[請求項4] (2)の工程において、(2)の工程開始時に比べて、以下の条件

:

1) ASCL1、DCX、HEY1、ZBTB20、 β III tubulin、ELAVL3及びSLIT1のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに

2) HOXB3、HOXA4、HOXB4、HOXB6及びHOXB8のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(2)の工程を持続してから、

(3)の工程が開始される、請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項5] (2)の工程が4日間～11日間行われる、請求項1～4のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項6] (1)及び(2)の工程において、酸素濃度が3%～10%である、請求項1～5のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項7] (3)の工程において、(3)の工程開始時に比べて、以下の条件

:

1) HEY2、NKX6.2及びNKX2.2のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が5倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに

2) OLIG1及び／又はOLIG2のRNAの発現量が10倍以上上昇した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(3)の工程を持続してから、
(4)の工程が開始される、請求項1～6のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項8] (3)の工程が4日間～11日間行われる、請求項1～7のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項9] (4)の工程において、(4)の工程開始時に比べて、以下の条件
:

1) NF1A、NF1B、SLC1A3、S100B及びFABP7のうち、少なくとも1つのRNAの発現量が10倍以上上昇した細胞凝集体が得られること、並びに

2) PAX6のRNAの発現量が5倍以下に低下した細胞凝集体が得られること

の少なくとも1つが充足されるまで、(4)の工程を持続してから、
(5)の工程が開始される、請求項1～8のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項10] (4)の工程が4日間以上行われる、請求項1～9のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項11] (4)の工程において、当該工程開始時に(3)の工程で得られた細胞凝集体を分散させてから、分散された細胞を浮遊培養することにより再度細胞凝集体を形成させる、請求項1～10のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項12] 前記方法が(5)の工程を含み、(5)の工程において、当該工程開始時に(4)の工程で得られた細胞凝集体を分散させてから、分散された細胞を5日間～100日間浮遊培養することにより再度細胞凝集体を形成させる、請求項1～11のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項13] 前記方法が(5)の工程を含み、(5)の工程において、O4抗原、NG2、OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、F

AM181B、TIMP4、SOX6、GRK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPから選択される1以上のマーカーが発現するまで、(5)の工程を持続する、請求項1～12のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項14] 前記方法が(5)の工程を含み、(5)の工程において、細胞凝集体を培養する培地中において、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、GRO- α 、LIF、IFN- γ 及びTRAILからなる群から選択される1以上のタンパク質が検出されるまで(5)の工程を持続する、請求項1～12のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項15] SMADシグナル伝達阻害剤が、TGF β 阻害剤及びBMP阻害剤である、請求項1～14のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項16] TGF β 阻害剤が、SB431542、A83-01、SB202190、SB505124、NPC30345、SD093、SD908、SD208、LY2109761、LY364947、LY580276、Galunisertib (LY2157299)、LY3200882、SB525334、GW788388、RepSox、及びLefty-1からなる群から選択される1以上である、請求項15に記載の製造方法。

[請求項17] BMP阻害剤が、Noggin、LDN-193189、LDN-212854、Dorsomorphin、K02288、Chordin及びFollistatinからなる群から選択される1以上である、請求項15又は16に記載の製造方法。

[請求項18] Wntシグナル伝達活性化剤が、GSK3 β 阻害剤、Wnt3a、Wntアゴニスト、Dkk及びR-Spondinからなる群から選択される1以上である、請求項1～17のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項19] Wntシグナル伝達活性化剤が、CHIR99021、BIO、K

enpaulione、SB216763及びL803-mtsからなる群から選択される1以上である、請求項1～17のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項20] SHHシグナル伝達活性化剤が、Purmorphamine、SAG、SHHタンパク質及びSHH断片からなる群から選択される1以上である、請求項1～19のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項21] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1～20のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項22] 多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項1～20のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項23] グリア前駆細胞を含む細胞凝集体が、以下の特徴：
 (a) オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含むこと、
 (b) 脊髄領域マーカーを発現していること、及び
 (c) フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の異種細胞由来成分を含まないこと
 を有する、請求項1～22のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項24] オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団の製造方法であって、請求項1～23のいずれか一項に記載の製造方法により製造された、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体を、成熟化培地を用いて5日間～60日間培養する工程を含む、製造方法。

[請求項25] オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団が、
 (i) O4抗原、GalC、MBP、APC、GST π 、CNP、PLP、OLIG2、SOX10、PDGFR α 及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、
 (ii) β III tubulin、MAP2及びELAVL3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、並びに

(iii) SLC1A3、S100B、AQP4、GFAP及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む、請求項24に記載の製造方法。

[請求項26] 成熟化培地が、T3、NT-3及びLIFのうち少なくとも1つを含む培地である、請求項24又は25に記載の製造方法。

[請求項27] 成熟化培地が、さらにCNTFを含む、請求項26に記載の製造方法。

[請求項28] 請求項1～23のいずれか一項に記載の製造方法により得られた、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体。

[請求項29] 以下の特徴：

(a) オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイト前駆細胞及び神経前駆細胞を含むこと、

(b) 脊髄領域マーカーを発現する細胞を含むこと、

(c) フィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の異種細胞由来成分を含まないこと、及び

(d) オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有すること

を有する、グリア細胞前駆細胞を含む細胞凝集体。

[請求項30] 脊髄領域マーカーがHOXB3、HOXB4、HOXB6及びHOXD8からなる群より選択される1以上のマーカーである、請求項29に記載の細胞凝集体。

[請求項31] さらに、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.1及びNKX6.2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む、請求項29又は30に記載の細胞凝集体。

[請求項32] 以下の特徴：

(I) NFIA、NFI B、SOX9、HEY1、HEY2、FABP7、ZBTB20、SLC1A3、S100B、MLC1、SLIT1、TIMP3、SPARCL1、GFAP及びAQP4からなる

群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

(I I) OLIG2、PDGFR α 、SOX10、SPON1、FAM181B、TIMP4、SOX6、GRK3、LHFPL3、KLF9、A2B5抗原、CNP及びPLPからなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

(I I I) DCX、 β III tubulin、MAP2、ELAVL3、NTRK2、GRIA2、PTPRO及びEPHA3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

(I V) SOX1、SOX2、NESTIN、MEIS1、MEIS2、DLL3及びASCL1からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含むこと；

並びに、

(V) (i) O4抗原、GalC、MBP、APC、GST π 、CNP、PLP、OLIG2、SOX10、PDGFR α 及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、

(i i) β III tubulin、MAP2及びELAVL3からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞、及び

(i i i) SLC1A3、S100B、AQP4、GFAP及びNG2からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞を含む細胞集団へ分化する能力を有すること

を有する、請求項29～31のいずれか一項に記載の細胞凝集体。

[請求項33] さらに、(V I) C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1又は複数のマーカーを発現する細胞を含む、請求項29～32のいずれか一項に記載の細胞凝集体。

[請求項34] さらに、SPARCL1、MIF、MCP-1、IL-8、SCF、M-CSF、HGF、GRO- α 、LIF、IFN- γ 及びTRAILからなる群より選択される1以上のマーカーを発現又は分泌する細胞を含む、請求項29～33のいずれか一項に記載の細胞凝集体。

- [請求項35] 請求項24～27のいずれか一項に記載の製造方法により得られた、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及び神経細胞を含む細胞集団。
- [請求項36] 請求項28～34のいずれか一項に記載の細胞凝集体、又は請求項35に記載の細胞集団を有効成分として含有する、医薬組成物。
- [請求項37] 請求項28～34のいずれか一項に記載の細胞凝集体、又は請求項35に記載の細胞集団の有効量を、移植を必要とする対象に移植することを含む、脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患の治療方法。
- [請求項38] 脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患が急性期、亜急性期又は慢性期の脊髄損傷である、請求項37に記載の治療方法。
- [請求項39] 脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患の治療における使用のための、請求項28～34のいずれか一項に記載の細胞凝集体、又は請求項35に記載の細胞集団。
- [請求項40] 脱髄疾患及びグリア細胞の障害に基づく若しくはグリア細胞の障害を伴う疾患が急性期、亜急性期又は慢性期の脊髄損傷である、請求項39に記載の細胞凝集体、又は細胞集団。
- [請求項41] 被験物質の毒性又は薬効を評価するための方法であって、請求項28～34のいずれか一項に記載の細胞凝集体、又は請求項35に記載の細胞集団に前記被験物質を接触させ、前記被験物質が前記細胞凝集体又は前記細胞集団に及ぼす影響を検出又は定量することを含む、評価方法。
- [請求項42] C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上のマーカーが発現しているか否かを指標として、グリア前駆細胞を含む細胞凝集体が移植に適していることを判別する方法。
- [請求項43] C1ORF61及びSERPINE2からなる群より選択される1以上の遺伝子、当該遺伝子によりコードされるタンパク質、及びこれ

らの断片を検出することを含む、グリアへの分化指向性が高いグリア前駆細胞若しくは神経幹細胞の同定方法。