

明 細 書

発明の名称： ヒト多能性幹細胞由来大脳皮質細胞製剤の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞由来の大脳オルガノイド、又は大脳皮質細胞塊、及びそれらの製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 脳血管障害による運動麻痺などの症状改善を目的として、ヒト多能性幹細胞、特にヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell；i P S細胞）から分化誘導した神経細胞を移植する細胞移植治療が期待されている。

[0003] マウス胎児由来線維芽細胞（Mouse embryonic fibroblast；M E F）等の支持細胞（フィーダー細胞と称する場合がある）の存在下で維持されたヒト胚性幹細胞（embryonic stem cell；E S細胞）から大脳オルガノイドを分化誘導する方法（Serum-free Floating culture of Embryoid Bodies-like aggregates with quick reaggregation：S F E B q法）が確立され、運動神経を含む大脳皮質Ⅴ、ⅠⅤ層の神経細胞（deep layer neuron）が得られるようになった。

[0004] 一方、臨床に使用する移植用細胞は、異種細胞の非存在下（フィーダーフリー）で製造することが望ましい。しかしながら、支持細胞の非存在下で維持されたヒト多能性幹細胞をS F E B q法により分化誘導を行うと、大脳オルガノイドを生じる効率が低いことが問題であった（非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO 2 0 1 5／0 7 6 3 8 8

特許文献2：WO 2 0 1 6／1 6 7 3 7 2

特許文献3：WO 2 0 1 6／0 6 3 9 8 5

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kitahara, et al., Stem Cell Reports 2020 Vol. 15, 467-48

1

非特許文献2: Kuwahara, et. al., Scientific Reports 2019, 9:18936

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、再生医療に有用な、ヒト多能性幹細胞由来の脳オルガノイド、脳皮質細胞を含む細胞塊、及び、これらの製造方法を提供することを目的とする。さらに詳細には、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から脳オルガノイドを製造する方法及び該方法によって得られる産物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するため、本発明者らは、支持細胞の非存在下、多能性幹細胞を、bFGFが実質的に含まれず、かつTGFβシグナルを実質的に惹起しない培養液中で培養してから、神経細胞へと分化誘導すると、脳オルガノイドを効率よく製造できることを見出し、また、Notchシグナル阻害剤を含む培養液中で脳オルガノイドを培養すると、移植に適した品質の脳皮質細胞塊を効率よく製造できることを見出した。

[0009] すなわち、本発明は以下のとおりのものを提供する。

[1] 支持細胞の非存在下、多能性幹細胞から脳オルガノイドを製造する方法であって、

(1) 多能性幹細胞を、bFGFが実質的に含まれず、かつTGFβシグナルを実質的に惹起しない培養液中で培養する工程と、

(2) 工程(1)で得られた細胞を、神経細胞へと分化誘導する工程とを含む、方法。

[2] 工程(2)が、

(2a) 工程(1)で得られた細胞を、TGFβシグナル阻害剤、及びWntシグナル伝達阻害剤を含む培養液中で浮遊培養して、細胞塊を得る工程と

、

(2 b) 工程 (2 a) で得られた細胞塊を、TGF β シグナル阻害剤及びWntシグナル伝達阻害剤を実質的に含まない培養液中で浮遊培養して、大腦オルガノイドを得る工程と

を含む、[1]に記載の方法。

[3] 工程 (2 a) の浮遊培養が静置培養である、[2]に記載の方法。

[4] 工程 (2 b) の浮遊培養が振とう培養である、[2]又は[3]に記載の方法。

[5] 工程 (1) の培養期間が3日間未満である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 工程 (1) の培養期間が12時間以上2日間以下である、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 工程 (1) の培養液が、SB431542、A-83-01、及びXAV-939からなる群から選ばれるTGF β シグナル阻害剤を含む、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 工程 (1)、工程 (2 a)、及び工程 (2 b) における培養液が、無血清培養液である、[2]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 前記多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞又はヒト胚性幹細胞である、[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[10] (3) 工程 (2) で得られた複数の細胞塊から、細胞塊の形状、内部構造、サイズ、表面の色彩若しくは模様、及び遺伝子発現からなる群から選ばれる1以上を指標とし、大腦オルガノイドを選別する工程をさらに含む、[1]～[9]のいずれかに記載の方法。

[11] [1]～[9]のいずれかに記載の方法を用いて製造される細胞培養物であって、

複数の球状の細胞塊を含み、

前記複数の球状の細胞塊に占める大腦オルガノイドの割合が40%以上である、細胞培養物。

[12] 前記大腦オルガノイドに占める大腦皮質様構造物の割合が40%

以上である、[11]に記載の細胞培養物。

[13] 大脳オルガノイドが、更に以下の(1)～(5)：

- (1) 球状の細胞塊であること、
- (2) 細胞塊の内部に、大脳皮質様構造物を有すること、
- (3) 表面に色素沈着を有さないこと、
- (4) 細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、及びバルーン状形状のいずれも有さないこと、並びに、

(5) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーを発現していること

から選択される、1以上の特徴を有する細胞塊である、[12]に記載の細胞培養物。

[14] (a) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の10%以下であり、

、

(b) 神経細胞マーカー、皮質V/VⅠ層マーカー、及び前脳マーカーからなる群から選ばれる1つ以上のマーカーが陽性である細胞数が全細胞数の70%以上であり、且つ

(c) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないことを特徴とする、大脳皮質細胞塊。

[15] 前記(a)の増殖性マーカーがKi67であり、

前記(b)の神経細胞マーカーがβⅢⅢ-Tubulinであり、皮質

V/VⅠ層マーカ―がCtip2であり、前脳マーカ―がFOXG1である、

[14]に記載の―脳皮質細胞塊。

[16] (d) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカ―をさらに発現している、[14]又は[15]に記載の―脳皮質細胞塊。

[17] SLC17A7を発現している、[16]に記載の―脳皮質細胞塊。

[18] GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない、[15]～[17]のいずれかに記載の―脳皮質細胞塊。

[19] 支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から―脳皮質細胞塊を製造する方法であって、

(i) 多能性幹細胞から―脳オルガノイドを得る工程と、

(ii) 工程(i)で得られた―脳オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤を含む培養液中で培養して、―脳皮質細胞塊を得る工程とを含む、方法。

[20] 前記工程(i)において、[1]～[10]のいずれかに記載の方法により多能性幹細胞から―脳オルガノイドを得る、[19]に記載の方法。

[21] (A) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の5%以下であり、
(B) 神経細胞マーカー、皮質V/VⅠ層マーカー、及び前脳マーカーから
選ばれる1つ以上のマーカー陽性細胞数が全細胞数の70%以上であり、且
つ

(C) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まない
ことを特徴とする、高純度大脳皮質細胞塊。

[22] 前記(A)の増殖性マーカーがKi67であり、
前記(B)の神経細胞マーカーが β III-Tubulinであり、皮質
V/VⅠ層マーカーがCtip2であり、前脳マーカーがFOXG1である
、

[21]に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

[23] (D) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1
、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、TH
SD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、C
CSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS
、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I1
1、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC
、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CA
P2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF
4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から
選ばれる少なくとも1つの遺伝子を発現している、[21]又は[22]に
記載の高純度大脳皮質細胞塊。

[24] SLC17A7、NEUROD6、及びEMX1からなる群から
選ばれる1以上の遺伝子を発現している、[23]に記載の高純度大脳皮質
細胞塊。

[25] GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からな
る群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない、[21]～[
24]のいずれかに記載の高純度大脳皮質細胞塊。

[26] 支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から高純度大脳皮質細胞塊を製造する方法であって、

(i) 多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る工程と、

(ii) 工程(i)で得られた大脳オルガノイドを、培養液中で培養する工程と、

(iii) 工程(ii)で得られた細胞培養物を、単細胞又は2～5個の細胞の集合体(Cell clump)にまで分散させる工程と、

(iv) 工程(ii)で得られた細胞培養物又は工程(iii)で得られた細胞集団を、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸、及びcAMP活性化剤を含む培養液中で培養して、細胞塊を得る工程と

を含み、前記工程(ii)の培養液及び／又は前記工程(iv)の培養液は、Notchシグナル阻害剤を含む、方法。

[27] 前記工程(i)において、[1]～[10]のいずれかに記載の方法により多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る、[26]に記載の方法。

[28] 工程(ii)に付与する大脳オルガノイドが、神経細胞への分化誘導開始から28日後～44日後の大脳オルガノイドである、[19]、[20]、[26]及び[27]のいずれかに記載の方法。

[29] 工程(ii)の培養期間が2～6日間である、[19]、[20]、及び[26]～[28]のいずれかに記載の方法。

[30] 工程(iv)の培養期間が2～14日間である、[19]、[20]、及び[26]～[29]のいずれかに記載の方法。

[31] 前記Notchシグナル阻害剤は、 γ セクレターゼ阻害剤である、[19]、[20]、及び[26]～[30]のいずれかに記載の方法。

[32] 前記 γ セクレターゼ阻害剤がN-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) 又はCompound Eである、[31]に記載の方法。

〔33〕 〔21〕～〔25〕のいずれかに記載の高純度大脳皮質細胞塊を含む細胞集団であって、前記高純度大脳皮質細胞塊のサイズ、形状又は構成細胞組成が均一である、細胞集団。

〔34〕 〔14〕～〔18〕のいずれかに記載の大脳皮質細胞塊、〔21〕～〔25〕のいずれかに記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは〔33〕に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を有効成分として含む医薬組成物。

〔35〕 〔14〕～〔18〕のいずれかに記載の大脳皮質細胞塊、〔21〕～〔25〕のいずれかに記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは〔33〕に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を含む、移植用組織。

〔36〕 〔14〕～〔18〕のいずれかに記載の大脳皮質細胞塊、〔21〕～〔25〕のいずれかに記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは〔33〕に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を有効成分として含む、脳血管障害治療薬。

〔37〕 〔14〕～〔18〕のいずれかに記載の大脳皮質細胞塊、〔21〕～〔25〕のいずれかに記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは〔33〕に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を、これを必要とする対象の大脳皮質又は大脳基底核に投与又は移植することを含む、脳血管障害の治療方法。

〔38〕 (a a) 大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊における、GAD 2、COL 1 A 1、TYR、TTR及びHOXA 2からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子又は該遺伝子によりコードされるタンパク質もしくはその断片の発現量を測定する工程、及び

(b b) 工程(a a)の測定結果に基づき、上記遺伝子の発現量が基準値以下である場合に、上記大脳オルガノイド又は上記大脳皮質細胞塊に含まれる目的外細胞の量が基準以下であると評価する工程、を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法。

[39] (AA) 大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊における、NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する工程、及び

(BB) 工程(AA)の測定結果に基づき、上記遺伝子の発現量が基準値以上である場合に、上記大脳オルガノイド又は上記大脳皮質細胞塊に含まれる目的細胞の量が基準以上であると評価する工程、を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法。

発明の効果

[0010] 本発明により、大脳皮質細胞製剤の材料として用いることができる大脳オルガノイドが、ヒト多能性幹細胞から高効率で製造できるようになる。本発明の大脳オルガノイド由来の大脳皮質細胞塊等は、脳血管障害等を治療するための治療薬又は移植用材料として有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]予備試験1における、神経細胞への分化誘導後の細胞凝集体の形態の画像を示す。

[図2]予備試験2における、マイクロアレイによるFGF2及びTGF β 経路関連遺伝子の発現解析結果を示す。

[図3]実施例1における分化誘導スキームの一例を示す。

[図4]実施例1の1-1における分化誘導後の細胞凝集体の明視野像(A)及び共焦点蛍光顕微鏡画像(B)を示す。

[図5]実施例1における分化誘導スキームの一例を示す。

[図6]実施例1の1-1における分化誘導後の大脳皮質細胞塊の共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

[図7]実施例1の1-2における分化誘導後Day35の大脳オルガノイドの共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

[図8]実施例2における分化誘導後Day18、Day27、Day34の培養物の代表的な明視野像を示す。

[図9]実施例2における分化誘導後の各条件での大脳オルガノイドの形成効率(%)を示す。

[図10]実施例3における工程(1)後(Day0)の各種マーカー遺伝子の発現解析結果を示す。

[図11]実施例4の4-1における分化誘導スキーム(A)、及び大脳オルガノイド(DAPT-、Day36)、大脳皮質細胞塊(DAPT+、Day36)、高純度大脳皮質細胞塊(Day40)の明視野像(B)を示す。

[図12]実施例4の4-1における免疫染色の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

[図13]実施例4の4-2における分化誘導スキームを示す。

[図14]実施例4の4-2における、フローサイトメトリーによるマーカー遺伝子発現の解析結果を示す。

[図15]実施例4の4-2における、フローサイトメトリーによるマーカー遺伝子発現の解析結果を示す。

[図16]実施例4の4-3におけるDAPT法のスキーム(A)、及び得られた細胞塊の遺伝子発現の変化をRT-qPCRで解析した結果(B)を示す。

[図17]実施例5における分化誘導スキーム(A)、及びDay28(4wk)、Day42(6wk)、及びDay75(10wk)の大脳オルガノイドの免疫染色の結果(B)を示す。

[図18]実施例5における、Day28(4wk)、Day35(5wk)、

Day 42 (6 wk)、及びDay 75 (10 wk) の大脳オルガノイドの各種マーカーの相対発現量の解析結果を示す。

[図19]実施例6における免疫染色した移植片の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

[図20]実施例6における免疫染色した移植片の体積の解析結果を示す。

[図21]好ましい実施形態の方法のスキームを示す。

[図22]実施例7における免疫染色の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

[図23]実施例7におけるフローサイトメトリーの解析結果を示す。

[図24]実施例8の8-1における2つの方法のスキームを示す。

[図25]実施例8の8-1におけるシングルセルDAPT法で得られた細胞塊の各マーカーの経時的遺伝子発現量のRT-qPCR解析結果を示す。

[図26]実施例8の8-1におけるシングルセルDAPT法及びオルガノイド法で得られた細胞塊の各マーカーの経時的遺伝子発現量のRT-qPCR解析結果を示す。

[図27]実施例8の8-1におけるシングルセルDAPT法及びオルガノイド法で得られた細胞塊の各マーカーの10日目の遺伝子発現量のフローサイトメトリー解析結果を示す。

[図28]実施例8の8-2におけるシングルセルDAPT法のスキームを示す。

[図29]実施例8の8-2におけるシングルセルDAPT法で得られた細胞塊の遺伝子発現をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。

[図30]実施例9の9-1におけるオルガノイドの形態の代表的な明視野像を示す。

[図31]実施例9の9-1における7つの形態学的なグループの代表的な明視野像を示す。

[図32]実施例9の9-1における各形態のオルガノイドの割合の棒グラフを示す。

[図33]実施例9の9-2における3回の分化誘導回で得られた9つのオルガ

ノイドの明視野像を示す。

[図34]実施例9の9-2における9つのオルガノイドに対してシングルセルRNA-seq解析のデータをUMAPで表示した結果を示す。

[図35]実施例9の9-2における9つのオルガノイドに対してシングルセルRNA-seq解析のデータをUMAPで表示した結果を示す。

[図36]実施例9の9-2における各クラスターの遺伝子発現に基づき、各クラスターの細胞種を同定した結果を示す。

[図37]実施例9の9-2におけるシングルセル遺伝子発現データにおいて、各クラスターに特徴的な遺伝子、既知のマーカー遺伝子の発現プロファイルをドットプロットで示す。

[図38]実施例9の9-2におけるシングルセル遺伝子発現データにおいて、各クラスターに特徴的な遺伝子、既知のマーカー遺伝子の発現プロファイルをドットプロットで示す。

[図39]実施例9の9-2における9つのオルガノイドにおける各細胞種の割合（A）、及び、各分化ステージにおける神経堤細胞の割合（B）を示す。

[図40]実施例9の9-3における各グループのオルガノイドに対し、代表的なマーカータンパク質の免疫染色結果を示す。

[図41]実施例9の9-4における各グループにつき3つのオルガノイドの明視野像を示す。

[図42]実施例9の9-4における各オルガノイドに対してRT-qPCR法でマーカー遺伝子の発現を解析した結果を示す。

[図43]実施例9の9-4における各オルガノイドに対してRT-qPCR法でマーカー遺伝子の発現を解析した結果を示す。

[図44]実施例9の9-5におけるLot 1、Lot 2、Lot 3のRosettesのオルガノイドの明視野像（A）、及び、シングルセル遺伝子発現解析のUMAPのプロット（B）を示す。

[図45]実施例9の9-5におけるオルガノイドに対してマーカー遺伝子の発現を解析し、UMAPで表示した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 1. 定義

〔幹細胞〕

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

[0013] 多能性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）及び／又は胚体外組織に属する細胞系譜すべてに分化しうる能力（分化多能性（Pluripotency））を有する幹細胞をいう。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。

[0014] 多能性幹細胞は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、組織内幹細胞、体細胞等から誘導することができる。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞：Embryonic Stem cell）、EG細胞（Embryonic Germ cell）、人工多能性幹細胞（iPS細胞：induced Pluripotent Stem cell）等を挙げることが出来る。間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell; MSC）から得られるMuse細胞（Multi-lineage differentiating stress enduring cell）、及び、生殖細胞（例えば精巢）から作製されたmGS細胞も多能性幹細胞に包含される。

[0015] 1998年にヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。胚性幹細胞は、胚盤胞期、すなわち受精後14日以内の内部細胞塊を支持細胞上又は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、US6,280,718等に記載されている。胚性幹細胞は、所定の機関よ

り入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるK h E S - 1、K h E S - 2及びK h E S - 3は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。

[0016] 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。

[0017] 人工多能性幹細胞は、2006年、山中らによりマウス細胞で樹立された（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）。

[0018] 人工多能性幹細胞は、具体的には、線維芽細胞や末梢血単核球等分化した体細胞に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を強制発現すること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。

[0019] 人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による初期化誘導で製造する方法以外に、体細胞への化合物の添加等に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; Nature, 2022, 605, pp. 325-331）。

[0020] 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iP

Sアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。株化された臨床用のiPS細胞として、例えば、京都大学で樹立されたFf-101、Ff-114、QHJ101及びQHJ114が京都大学から入手可能である。また、iPS細胞は例えば末梢血・臍帯血由来の造血前駆細胞、線維芽細胞等の体細胞から初期化因子を用いてリプログラミングすることにより製造することが可能である。本明細書で使用するS2WCB1、S2WCB3は、成人末梢血単核球から、Cytotune（商標）-2.0（IDファーマ）を用いて樹立した。

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

[0022] 本明細書において多能性幹細胞は、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。

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

[0024] [マーカー]

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、その存在又は存在量に基づいて、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。

[0025] [神経細胞]

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、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し、神経細胞が産生する神経伝達物質の違いにより、ドパミン作動性神経、セロトニン作動性神経、GABA作動性神経、グルタミン酸作

動性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。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 β I I I - T u b u l i n、MAP 2 等が挙げられる。

[0026] 〔神経幹細胞〕

本明細書において「神経幹細胞」は、神経系細胞への分化が運命づけられているが、複数の神経系細胞へ分化する能力を有し増殖性を保っている幹細胞を意味し、神経前駆細胞への分化能、及び大脳皮質細胞への分化能を共に有する細胞である。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 SOX 1、SOX 2、PAX 6 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る。本明細書における神経幹細胞には、放射状グリア (Radial Gila) が含まれる。

[0027] また、神経幹細胞から生じる、複数の神経細胞へ分化可能であってかつ未成熟な細胞を神経前駆細胞とも言う。

[0028] 〔大脳オルガノイド〕

本明細書において、「細胞培養物」は、特定の組成を有するものに限らず、細胞を培養することで得られる産物をさす用語である。細胞培養物は、複数の細胞塊の集合体であり得、さらに単細胞及び後述の 2～5 個の細胞の集合体を含んでもよい。細胞培養物は、培地又は懸濁媒体を含んでいても含まなくてもよく、本明細書において、特に明記しない限り、培地又は懸濁媒体を含まないものを指す。

[0029] 本明細書において、「大脳オルガノイド」は、神経上皮の外側に神経細胞層を備えた大脳皮質様構造物を 1 つ以上、好ましくは複数含む、球状の細胞凝集体（細胞塊）を意味する。ここにおいて、大脳皮質様構造物は、神経上皮の外側に神経細胞層を備えた、ロゼット様構造物である。したがって、大脳皮質様構造物は、神経上皮様構造を含む可能性があり、本願の大脳オルガノイドは神経上皮様構造を含んでいてもよい。

[0030] ここにおいて、「神経上皮」とは、神経幹細胞及び／又は神経前駆細胞を

主たる構成細胞とする層状の構造物であり、神経幹細胞及び／又は神経前駆細胞の局在化領域ということもできる。

[0031] ここにおいて、「神経細胞層」とは、神経細胞を含む層状の構造物である。当該神経細胞は、大腦オルガノイドの分化段階で生成し得る神経細胞であれば特に限定はないが、神経細胞マーカー、前脳マーカー、及び大腦皮質神経細胞マーカーの少なくとも1つが陽性の細胞が挙げられる。当該神経細胞層は、好ましくは、神経細胞マーカー陽性細胞、前脳マーカー陽性細胞、及び大腦皮質神経細胞若しくはその前駆細胞マーカー陽性細胞の2以上、又は全てを含む。神経細胞層は、神経上皮から生じた神経細胞（大腦皮質神経細胞）の局在化領域ということもできる。

[0032] 本明細書における大腦オルガノイドの一態様として、多能性幹細胞を分化誘導して得られる大腦オルガノイドが挙げられる。

[0033] ここで「球状」は、棒状（ロッド状）や平板状（プレート状）でないことを指し、好ましくは「球に近い三次元構造体」を意味する。例えば、二次元面に投影したときに、例えば円形又は楕円形を示すものが挙げられる。但し、滑らかな曲線を示す必要はなく、部分的に凹凸が認められる場合であっても細胞塊全体で球に近い形状であると認識できれば、「球状」に該当する。本明細書における「球状」として、必ずしも高い真球率が求められるものではないが、一例として真球率が、0.7以上、0.8以上、好ましくは0.9以上の構造体が挙げられる。

[0034] 本明細書において、神経幹細胞又は神経前駆細胞のマーカー遺伝子としては、例えば、SOX1、SOX2、PAX6等が挙げられる。

[0035] 神経細胞マーカー遺伝子としては、例えば、 β III-Tubulin、MAP2等が挙げられる。

[0036] 前脳のマーカー遺伝子としては例えば、FOXG1（BF1ともいう）、SIX3、EMX1等が挙げられる。

[0037] 大腦皮質神経細胞マーカー遺伝子としては、後述する第Ⅰ層～第ⅤⅠ層のマーカーが挙げられる。

[0038] また、各種細胞のマーカー遺伝子として、後述するとおり、下記の表6に記載の遺伝子が挙げられる。

[0039] 〔大脳皮質細胞〕

本明細書において、「大脳皮質細胞」は、大脳皮質ニューロン又は大脳皮質神経細胞ともいい、大脳皮質を構成する神経細胞を指す。

[0040] 大脳オルガノイドにおいて、神経細胞層は1層であってもよく、さらに、複数の細胞層に分かれていてもよい。例えば、神経上皮に近い側からオルガノイドの外側に向かって、大脳皮質第VⅠ層(Tbr1、Tbr2)、第V層(Ctip2、Er81、Fezf2)、第ⅠV層(Rorb)、第ⅠⅠ／ⅠⅠ層(Foxp1、Mef2c、Satb2)第Ⅰ層(Reelin)に特徴的な神経細胞がそれぞれ局在化した層が含まれていてもよい。括弧内に、各層の識別に多用されるマーカー遺伝子を表す。

[0041] 本明細書において、大脳皮質細胞は、好ましくは、前脳マーカーであるFOXG1が陽性である細胞である。本発明において、FOXG1としては、NCBIアクセッション番号NM__005249で示されるポリヌクレオチド及びこれらがコードするタンパク質が挙げられる。

[0042] 本明細書において、大脳皮質細胞は、大脳皮質の運動野の神経細胞又は上位運動ニューロン、すなわち、大脳皮質の前方の神経細胞を含んでもよく、さらに詳しくは、大脳皮質の運動野の第V層及び／又は第VⅠ層の神経細胞を含んでもよい。

[0043] 本明細書において、第V層又は第VⅠ層（併せて第V／VⅠ層ともいう）の神経細胞は、Ctip2が陽性であることを特徴とする細胞集団である。本発明において、Ctip2としては、NCBIアクセッション番号NM__001282237、NM__001282238、NM__022898又はNM__138576で示されるポリヌクレオチド及びこれらがコードするタンパク質が挙げられる。また、大脳皮質細胞は、第Ⅰ層、第ⅠⅠ／ⅠⅠⅠ層、第ⅠV層の神経細胞を含んでもよい。

[0044] 本明細書における大脳皮質細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として

製造されてもよく、大脳皮質細胞を含む細胞集団は、例えば、製造された細胞集団において15%以上、20%以上、30%以上、40%以上又は50%以上の大脳皮質細胞を含んでいてもよい。

[0045] 本明細書において、「大脳皮質細胞」は「大脳皮質前駆細胞」を含む概念であり、本発明の「大脳オルガノイド」の目的細胞としては、大脳皮質前駆細胞が含まれる。一方、より進んだ分化段階にある、本発明の「大脳皮質細胞塊（高純度大脳皮質細胞塊を含む）」の目的細胞には、大脳皮質前駆細胞は、殆ど含まれない、又は最小限数程度含まれる。

[0046] 〔細胞塊及び細胞集団〕

本明細書において「細胞塊」（Cell Aggregate；細胞凝集体ともいう）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。細胞塊には、特定の組織を形成している場合も含まれる。胚様体（Embryoid body）、スフェア（Sphere）、スフェロイド（Spheroid）は、細胞塊に包含される。細胞塊は、任意の形状を有してよく、球状の細胞塊、層状の細胞塊などが挙げられる。

[0047] 本明細書において「細胞集団」は、複数の細胞を含む集団であり、細胞塊（スフェア状細胞塊、層状の細胞塊）、又は2～5個の細胞の集合体（Cell clump）であってもよい。「細胞集団」はまた、複数の細胞塊の集団、複数の分散された単細胞の集団、若しくは複数の2～5個の細胞の集合体（Cell clump）の集団、又はこれらの任意の組合せの集団であってもよい。

[0048] 本明細書において、細胞塊が高純度であることとは、細胞塊に含まれる目的細胞の含有率が高いことを意味する。具体的な含有率は細胞の種類にもよるが、例えば、目的細胞の含有率が細胞塊の全細胞数に対して70%以上、好ましくは80%以上、90%以上である場合高純度であるといえることができる。

[0049] また、本明細書において、細胞塊が高純度であることとは、目的外細胞の

含有率が細胞塊の全細胞数に対して30%以下、好ましくは20%以下、10%以下であるということができる。更に好ましくは、細胞塊における増殖性の細胞の含有率が細胞塊の全細胞数に対して10%以下、5%以下、好ましくは3%以下、更に好ましくは2%以下であるということができる。

[0050] 本明細書において、「再凝集細胞塊」とは、細胞塊を、単細胞若しくは2～5個の細胞の集合体に分散したのち、分散された単細胞及び細胞の集合体が再度集合して形成した細胞塊（例：再凝集大脳皮質細胞塊）をいう。再凝集大脳皮質細胞塊は、高純度大脳皮質細胞塊を少なくとも含む。

[0051] 〔培養液〕

本明細書において「培養液（培地とも称する）」は、動物細胞の培養に通常用いられる培養液（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。培養液（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。

[0052] 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 199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、グルコース等の糖質、アミノ酸等の炭素源、ビタミン、無機塩類等が含まれる。

[0053] 基礎培地には、適宜目的とする分化誘導に悪影響を及ぼさない範囲で、動物細胞の培養に通常用いられる任意の成分を添加してもよい。

[0054] 本発明で使用する培地は、移植に適した細胞塊を製造するために使用するという観点から、無血清培養液であることが好ましい。

[0055] 本発明における「無血清培養液」とは、無調整又は未精製の血清を実質的

に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、無血清培養液に含まれる。無血清培養液は、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。

[0056] 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。無血清培養液の一部は、ゼノフリー培地であり得る。

[0057] 〔血清代替物〕

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N2サプリメント又はB27サプリメントが挙げられる。

[0058] 〔支持細胞〕

本明細書において、支持細胞とは、フィーダー細胞ともいい、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。支持細胞としては、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。支持細胞は、増殖抑制処理された支持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。

[0059] 本明細書において「支持細胞の非存在下（フィーダーフリーともいう）」とは、支持細胞非存在下にて培養することである。支持細胞非存在下とは、例えば、支持細胞を添加していない条件、又は、支持細胞を実質的に含まない（例えば、全細胞数に対する支持細胞数の割合が3%以下、好ましくは1%以下）の条件が挙げられる。

[0060] 「浮遊培養」

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、又は、細胞を培養容器へ非接着の状態で凝集体（スフェアとも言う）を形成させて培養することを意味する。本明細書中では、細胞は、単細胞又は複数の細胞が集まった塊（細胞塊又は細胞集団）の状態で浮遊培養される。

[0061] 浮遊培養に用いられる培養容器としては、特に限定されないが、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、バイオリアクター、ローラボトルが挙げられる。

[0062] 非接着性の条件下での培養を可能とするため、培養器は、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に

接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）、非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）又はリン脂質類似構造物（例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする水溶性ポリマー（Lipidure（登録商標）））によるコーティング処理した培養容器を使用することによって行うことができる。浮遊培養、とくにSFE Bq法において用いられる培養容器として、Prime Surface（登録商標）（タンパク質低吸着処理96穴プレート、住友ベークライト製）が挙げられる。

[0063] 本明細書において、浮遊培養は、静置培養であってもよいし、振とう培養、巡回培養又は攪拌培養であってもよい。

[0064] 本明細書において静置培養とは、細胞塊を意識的に移動させない状態で培養する培養法のことをいう。すなわち、例えば、局所的な培地温度の変化に伴って、培地が対流し、その流れによって、細胞塊が移動することがあるが、意識的に細胞塊を移動させていないことから、このような場合も含めて、本発明では静置培養という。

[0065] 振とう培養、巡回培養又は攪拌培養には、当業者に周知の機器を適宜用いることができる。

[0066] <bFGF>

本明細書において、bFGFは、塩基性線維芽細胞成長因子（basic fibroblast growth factor）を意味し、FGF2とも称されるタンパク質である。

[0067] <TGFBシグナル阻害剤>

本明細書において、TGFBシグナル阻害剤とは、TGFBの受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、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。

[0068] 本明細書において、TGFBシグナル阻害剤は、TGFB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。

- [0069] TGF β シグナル阻害剤として、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。また、TGF β シグナル阻害剤として、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。当該ALKファミリーとして具体的には、ALK4、ALK5及びALK7が挙げられる。
- [0070] TGF β シグナル阻害剤としては、例えば、Lefty-1 (NCBI Accession No. として、マウス: NM_010094、ヒト: NM_020997が例示される)、Lefty-2 (NCBI Accession No. として、マウス: NM_177099、ヒト: NM_003240及びNM_001172425が例示される)、SB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide)、SB202190 (以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01 (WO 2009146408)、Galunisertib (LY2157299)、LY3200882、SB525334、GW788388、RepSox、及びこれらの誘導体などが例示される。本発明で使用するTGF β シグナル阻害剤は、好ましくは、SB431542又はA-83-01である。

[0071] <Wntシグナル伝達阻害剤>

本明細書において、Wntシグナル伝達阻害剤とは、Wnt（例えばWn

t 3) の産生を抑制する物質、又はWntの受容体への結合から β カテニンの蓄積へと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるFrizzledファミリーへの結合を阻害する物質、又は β カテニンの分解を促進する物質などが挙げられる。

[0072] このようなWntシグナル伝達阻害剤としては、例えば、Wntタンパク質のプロセッシングに関与するPORCN（ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NP_001269096、NP_073736、NP_982299、NP_982300、又はNP_982301で表されるタンパク質が例示される）を阻害する物質、DKK1タンパク質（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_012242）、スクロスチン（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_025237）、Cerberusタンパク質、Wnt受容体阻害剤、可溶型Wnt受容体、抗Wnt抗体、カゼインキナーゼ阻害剤、ドミナントネガティブWntタンパク質等が挙げられるがこれらに限定されず、1又は複数の物質を組合せて使用してもよい。

[0073] 具体的なWntシグナル伝達阻害剤として、IWR-1-endo ((4-((3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-isoindol-2-yl]-N-8-quinolinyl-benzamide)、Merck Millipore)、IWP-2 (Sigma-Aldrich)、IWP-3 (Sigma-Aldrich)、IWP-4 (Sigma-Aldrich)、IWP-L6 (EMD Millipore)、C59 (又は、Wnt-C59) (Cellagen technology)、ICG-001 (Cellagen Technology)、LGK-974 (又は、NVP-LGK-974) (Cellagen Technology)、FH535 (Sigma-Aldrich)、WIKI4 (Sigma-Aldrich)、KYO2111 (Minami I, et al, Cell Rep. 2:1448-1460, 2012)、PNU-74654 (Sigma-Aldrich)、XAV939 (Stemgent)、及びこれらの誘導体などが例示される。なかでも、IWR-1-endo

o、C59、LGK-974等が好ましい。

[0074] <Notchシグナル阻害剤>

Notchシグナル阻害剤は、Notchによるシグナル伝達を抑制し得る物質である限り限定されない。Notchシグナル阻害剤としては、 γ -セクレターゼ阻害剤、Notch転写複合体阻害剤、例えばMAML-1阻害剤等が挙げられる。

[0075] γ -セクレターゼ阻害剤は、 γ -セクレターゼの酵素活性を阻害し得る物質である限り限定されない。具体的には、DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)、DBZ (dibenzazepine)、MDL28170 (Calpain Inhibitor III)、Compound E (N-[(1S)-2-[[[(3S)-2,3-Dihydro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]amino]-1-methyl-2-oxoethyl]-3,5-difluorobenzeneacetamide)、Compound 34 ((2S,3R)-3-(3,4-Difluorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)-4-hydroxy-N-((3S)-2-oxo-5-phenyl-2,3-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)butyramide)、 γ -セクレターゼ阻害剤XI、 γ -セクレターゼ阻害剤III等が挙げられる。Notch転写複合体阻害剤としてはCB-103 (6-[4-(1,1-dimethylethyl)phenoxy]-3-pyridinamine)、IMR-1 (2-Methoxy-4-(4-oxo-2-thioxo-thiazolidin-5-ylidenemethyl)-phenoxy]-acetic acid ethyl ester) 等が挙げられる。

[0076] <ROCK阻害剤>

ROCK阻害剤は、Rho-associated coiled-coilキナーゼ (ROCK) の阻害剤であり、ROCKの機能を抑制する物質である限り特に限定されない。ROCK阻害剤としては、Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride)、H-1152 ((S)-4-Methyl-5-((2-methyl-1,4-diazepan-1-yl)sulfonyl)isoquinoline dihydrochloride)、Fasudil (HA-1077; 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)homopiperazine Hydrochloride)、Wf-536 (4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-(pyridin-4-yl)benzamide)、Thi

a z o v i v i n (N-Benzyl-2-(pyrimidin-4-ylamino)thiazole-4-carboxamide)、R i p a s u d i l (4-Fluoro-5-[[[(2S)-hexahydro-2-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl]sulfonyl]isoquinoline)、G S K 4 2 9 2 8 (4-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-N-(6-Fluoro-1H-indazol-5-yl)-2-methyl-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydro-3-pyridinecarboxamide) 6、R K I - 1 4 4 7 (N-[(3-Hydroxyphenyl)methyl]-N'-[4-(4-pyridinyl)-2-thiazolyl]urea)、A z a i n d o l e 1 (6-chloro-N4-[3,5-difluoro-4-[(3-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)oxy]phenyl]pyrimidine-2,4-diamine)、H A - 1 1 0 0 (1-[(1,2-Dihydro-1-oxo-5-isoquinolinyl)sulfonyl]hexahydro-1H-1,4-diazepine)、Y - 3 9 9 8 3 (4-[(1R)-1-Aminoethyl]-N-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-ylbenzamide)等が挙げられる。R O C K 阻害剤として、好ましくは Y - 2 7 6 3 2 が挙げられる。

[0077] <神経栄養因子>

本明細書において、神経栄養因子 (Neurotrophic Factor) とは、神経細胞の生存、神経突起や軸索の伸展、シナプス形成等を促進する活性を有する分泌タンパク質の総称である。神経栄養因子として、Nerve Growth Factor (NGF)、Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)、Neurotrophin 3 (NT-3)、Neurotrophin 4/5 (NT-4/5)、Neurotrophin 6 (NT-6)、Glial cell line-derived Neurotrophic Factor (GDNF)、及びCiliary Neurotrophic Factor (CNTF) などが挙げられる。本発明において好ましい神経栄養因子は、GDNF、及びBDNFから成るグループより選択される因子である。神経栄養因子は、例えばWako社やR&D systems社等から市販されており容易に利用することが可能であるが、当業者に公知の方法によって細胞へ強制発現させることによって得てもよい。

[0078] <cAMP活性化剤>

本明細書において、cAMP活性化剤としては、cAMP、di but y r y l - cAMP又はフォルスコリン等が挙げられる。

[0079] 2. 大脳オルガノイドの製造方法

本発明の大脳オルガノイドの製造方法の一態様としては、下記工程（１）及び工程（２）を含む、支持細胞の非存在下、多能性幹細胞から大脳オルガノイドを製造する方法が挙げられる。「支持細胞の非存在下」は、上述のとおりであり、工程（１）及び工程（２）は共に、「支持細胞の非存在下」で行われる。

（１）多能性幹細胞を、bFGFが実質的に含まれず、かつTGFβシグナルを実質的に惹起しない培養液中で培養する工程

（２）工程（１）で得られた細胞を、神経細胞へと分化誘導する工程

<工程（１）>

本明細書において、「物質Xの存在下」での培養とは、「物質Xを含む培地」中で培養することを意味し、上記物質Xは上記培地に本来の成分として含まれているものであってもよく、外来性（e x o g e n o u s）に添加されたものであってもよい。すなわち、当該培養中に細胞又は組織によって発現、分泌若しくは産生され得る内在性（e n d o g e n o u s）の物質Xは外来性の物質Xとは区別され、外来性の物質Xを含んでいない培地は内在性の物質Xを含んでいても「物質Xを含む培地」の範疇には該当しないと解する。

[0080] 例えば、「TGFβシグナル阻害剤を含む培地」とは、TGFβシグナル阻害剤が添加された培地又はTGFβシグナル阻害剤を本来の成分として含む培地である。

[0081] また、「bFGFが実質的に含まれない」培養液とは、細胞自体が発現するbFGFの存在を否定するものではなく、本来bFGFを含んでいない、又は、外来性にbFGFが添加されていない培養液を意味する。

[0082] または、用いる細胞及び培地交換操作によっては、検出限界以下の残存するbFGFの存在は否定せず、このような場合も本願の範囲に含める。また

、本発明における神経分化の効率に影響を与えない程度にbFGFを低用量含有する培地を用いて培養することも本願は包含する。

[0083] また、「TGF β シグナルを実質的に惹起しない」培養液とは、細胞自体が発現するTGF β の存在を否定するものではなく、培養液が本来TGF β を含んでいない、又はTGF β が外来性に添加されていない培養液であることを意味する。または、外来性に添加されたTGF β を含む培養液若しくは外来性に添加されたTGF β を含まない培養液に、有効量のTGF β シグナル阻害剤が添加された培養液もまた、「TGF β シグナルを実質的に惹起しない培養液」の範疇である。

[0084] TGF β シグナルを実質的に惹起しないために、TGF β シグナル阻害剤を使用する場合、上記のTGF β シグナル阻害剤を適宜選択することができる。TGF β シグナル阻害剤の濃度は、培養液におけるTGF β シグナル活性の強度に応じて、適宜調整することができる。すなわち、培養液中におけるTGF β シグナル阻害剤の濃度は、ALK4、ALK5又はALK7シグナルの活性を阻害する濃度であれば特に限定されない。

[0085] 工程（１）の培養液に添加されるTGF β シグナル阻害剤としては、上記のTGF β シグナル阻害剤であればよく、好ましくはSB431542及びA-83-01からなる群から選ばれる。工程（１）の培養液として例えば、ES細胞若しくはiPS細胞等の多能性幹細胞の多能性を維持しつつ培養する目的で市販されている培地であって、bFGFを含まない培地を使用する場合、TGF β シグナル阻害剤の濃度としては、TGF β シグナル阻害剤としてSB431542を使用した場合における、100nM～1mM、100nM～500 μ M、100nM～100 μ M、100nM～50 μ M、100nM～40 μ M、100nM～30 μ M、100nM～25 μ M、100nM～20 μ M、100nM～15 μ M、100nM～10 μ M、500nM～30 μ M、500nM～10 μ M、100nM～7 μ M、1 μ M～20 μ M、1 μ M～10 μ M、500nM～7 μ M、1 μ M～7 μ M、100nM～3 μ M、100nM～2 μ M、100nM～1 μ M、100nM～

750 nM等に相当する濃度であるが、これらに限定されない。好ましくは、1 μ Mから10 μ Mに相当する濃度が挙げられる。他のTGF β シグナル阻害剤の場合、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。ここで、SB431542を使用する場合における濃度に相当する濃度とは、当該SB431542濃度と同程度のTGF β シグナル伝達経路の阻害作用（例えば、ALK4、ALK5又はALK7シグナルの活性を阻害する作用）を有する濃度を意味する。当該濃度は、当業者であれば容易に設定することができる。

[0086] 工程（１）で用いられる培養液として、例えば、多能性幹細胞培養用培地からbFGF不含の状態でも市販されている培地に、TGF β シグナル阻害剤を添加して用いることができる。

[0087] また、bFGFが実質的に含まれず、かつTGF β シグナルを実質的に惹起しない培養液として、例えば、多能性幹細胞を維持・増殖できる培地（例えば、Essential 8）からbFGF及びTGF β を除去した培地として市販されている培養液（例えば、Essential 6）を用いることもできる。

[0088] 工程（１）で使用される培養液は、培養に影響を与えない程度、すなわち工程（１）及び工程（２）により得られる脳オルガノイドの形成に実質的な影響を与えない程度であれば、他の物質を含んでもよいが、好ましくは、BMPシグナル、ソニック・ヘッジ・ホッグシグナル等、多能性幹細胞の分化誘導に影響を与えるシグナル伝達を亢進又は阻害する物質が、外的に添加されていないことが望ましい。また、工程（１）で使用される培養液は、Wntシグナル伝達阻害剤を含んでもよいが、Wntシグナル伝達を亢進する物質が外的に添加されていないことが望ましい。

[0089] 工程（１）に供される多能性幹細胞は、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）であり、更に好ましくはヒト人工多能性幹細胞である。

- [0090] 工程（１）において、多能性幹細胞は支持細胞非存在下で培養される。支持細胞非存在下は、フィーダーフリーともいい、培地中に支持細胞が存在しない状態をいう。ここでいう支持細胞非存在下の培養条件としては、具体的には線維芽細胞、SNL細胞、STO細胞等の支持細胞を添加していない培養条件が挙げられる。
- [0091] 工程（１）で用いられる培養液は、好ましくは血清を実質的に含まない無血清培養液であり、必要に応じ血清代替物を添加した無血清培養液を用いてもよい。血清代替物としては、上述のものが挙げられるが、好ましくは、KSR、好ましくは１～３０％のKSR等を用いることができる。
- [0092] 工程（１）で用いられる培養液は、bFGFが実質的に含まれず、かつTGF β シグナルを実質的に惹起しない培養液、好ましくは無血清培養液であれば、特に限定はないが、bFGF及びTGF β シグナルを惹起する物質以外については、多能性幹細胞の多能性を維持しつつ培養するために必要な成分を含む培地であることが望ましい。
- [0093] 多能性幹細胞の多能性を維持しつつ培養するための培地、すなわち多能性幹細胞用培地は多数市販されており、Essential 8（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、Stem medium（DSファーマバイオメディカル社製）、StemPro（サーモフィッシャー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）等が挙げられる。
- [0094] 工程（１）に供される多能性幹細胞は、凍結保存された多能性幹細胞を解凍した直後であってもよいが、好ましくは、多能性幹細胞の多能性を維持し

つつ拡大培養するのに適した培地で予め培養・継代することができる。工程（１）に供される多能性幹細胞の継代数は特に限定はないが、２～８継代されることが望ましい。

[0095] 工程（１）の培養期間は、５日間未満、４日間未満、好ましくは３日間未満、更に好ましくは１２時間以上４８時間以下、１８時間以上４８時間以下、更に好ましくは２４時間以上４８時間以下、２４時間以上３６時間以下、又は１８時間以上３６時間以下であり、最も好ましくは１日間程度である。尚、当該培養期間には、準備段階としての多能性幹細胞の継代培養の期間は含まれない。

[0096] 工程（１）の培養は、浮遊培養及び接着培養のいずれの条件で行われてもよいが、好ましくは、接着培養により行われる。

[0097] 接着培養を行う際に用いられる培養器は、「接着培養する」ことが可能なものであれば特に限定されないが、細胞接着性の培養器が好ましい。細胞接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理された培養器が挙げられ、具体的には前述した内部がコーティング剤で被覆された培養器が挙げられる。コーティング剤としては、例えば、ラミニン〔ラミニン $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ （以下、ラミニン５１１）、ラミニン $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ （以下、ラミニン１１１）、ラミニン $\alpha 1 \beta 1 \gamma 2$ （ラミニン１１２）、ラミニン $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ （ラミニン２１１）、ラミニン $\alpha 2 \beta 1 \gamma 2$ （ラミニン２１２）、ラミニン $\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$ （ラミニン２２１）、ラミニン $\alpha 2 \beta 2 \gamma 2$ （ラミニン２２２）、ラミニン $\alpha 5 \beta 1 \gamma 2$ （ラミニン５１２）等、及びラミニン断片（ラミニン５１１Ｅ８等）を含む〕、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン、ビトロネクチン（V i t r o n e c t i n）、シンセマックス（コーニング社）、マトリゲル等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等が挙げられる。また、正電荷処理等の表面加工された培養容器を使用することもできる。好ましくは、ラミニンが挙げられ、より好ましくは、ラミニン５１１Ｅ８が挙げられる。ラミニン５１１Ｅ８は、市販品を購入する事ができる（例：i M a t r i x -

511、ニッピ)。

[0098] 工程(1)における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30℃から約40℃、好ましくは約37℃である。またCO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。

[0099] 工程(1)は、支持細胞の非存在下、多能性幹細胞の多分化能を維持したまま、培養する維持培養工程であり、工程(2)(分化誘導工程)の前に行われる、神経分化準備工程(Neural-differentiation preparation step)である。この神経分化準備工程は、神経分化の誘導の前、または、神経分化の導入の前、までの期間に準備をする工程であり、工程(1)にて培養した多能性幹細胞は、TGFβ関連遺伝子の発現が抑えられ、それによって、当該多能性幹細胞を神経細胞へと分化誘導すると、大腦オルガノイドの形成効率が高い。

[0100] <工程(2)>

工程(1)で得られる細胞は、当業者に周知の方法で、神経細胞へ分化誘導することができ、これにより、大腦オルガノイドを得ることができる。

[0101] 分化誘導方法は、多能性幹細胞を、大腦オルガノイドを構成する細胞集団へ分化し得る分化誘導方法を、適宜選択することができる。当該方法は、周知であり、例えば、WO2015/076388、WO2016/167372、Sakaguchi et al., Stem Cell Reports 2019 Vol 13 458-473、Kitahara, et al., Stem Cell Reports 2020 Vol. 15, 467-481(非特許文献1)及びKadoshima et al., 2013, PNAS, vol.110, No. 50, 20284-20289等に記載された方法を用いることができる。

[0102] すなわち、工程(2)で行われる分化誘導法としては、以下の工程(2a)及び工程(2b)が挙げられる：

(2a) 工程(1)で得られた細胞を、TGFβシグナル阻害剤、及びWntシグナル伝達阻害剤を含む培養液中で浮遊培養、好ましくは静置培養して、細胞塊を得る工程

(2b) 工程(2a)で得られた細胞塊を、TGFβシグナル阻害剤又はW

n t シグナル伝達阻害剤を実質的に含まない培養液中、好ましくは、TGFβシグナル阻害剤及びW n t シグナル伝達阻害剤のいずれも含まない培養液中で浮遊培養して、大腦オルガノイドを得る工程。

[0103] <工程 (2 a) >

工程 (1) で得られる細胞は、培養液中、好ましくは血清（無調整又は未精製の血清）を実質的に含まない無血清培養液中に分散され、非接着性の条件下で培養（即ち浮遊培養）し、複数の細胞を集合させて細胞塊を形成させる。凝集時に用いられる培養液としては、血清代替物を含む無血清培養液を用いてもよい。

[0104] この細胞塊形成に用いる培養器としては、特に限定されないが、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、バイオリアクター、ローラーボトルが挙げられる。また、アルギン酸ハイドロゲル等ゲル包埋により細胞塊形成する方法も挙げられる。非接着性の条件下での培養を可能とするため、培養器は、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞非接着性となるように人工的に処理されているもの、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないもの等を使用することができる。

[0105] 細胞塊の形成に際しては、まず、工程 (1) で得られる細胞を継代培養から回収し、これを、単細胞、又はこれに近い状態にまで分散する。この分散は、適切な細胞解離液を用いて行われる。細胞解離液としては、例えば、EDTA等のキレート剤；トリプシン、コラゲナーゼⅠⅤ、メタロプロテアーゼ等のタンパク分解酵素等を単独で又は適宜組み合わせて用いることができる。なかでも細胞障害性が少ないものが好ましく、このような細胞解離液として、例えば、ディスパーゼ（エーディア）、TrypLE（Gibco社

製)又はアキュターゼ(MILLIPORE)等の市販品が入手可能である。分散された細胞は上記培地(無血清培養液、すなわち、後述の工程(2a))で使用される基礎培地)にY-27632を添加した培地中に懸濁される。

- [0106] ここで、分散により誘導される多能性幹細胞(特に、ヒト多能性幹細胞)の細胞死を抑制するために、Rho-associated coiled-coilキナーゼの阻害剤(ROCK阻害剤)を培養開始時から添加することが好ましい(WO2008/035110、Watanabe, K. et al., Nature Biotechnology, 2007, vol.25, No.6, page 681-686)。
- [0107] ROCK阻害剤としては、上記のものが挙げられ、好ましくは、Y-27632等を挙げることができる。
- [0108] ROCK阻害剤は培養開始から、例えば20日以内、15日以内、好ましくは10日以内、より好ましくは6日以内添加する。ROCK阻害剤の濃度は一定であっても、漸減させてもよい。一態様として、ROCK阻害剤の存在下で10日~20日間、好ましくは15日間~20日間、更により好ましくは約17日間から19日間培養し、かつその間にROCK阻害剤の濃度を漸減させることができる。一態様として、ROCK阻害剤の存在下で10~25日間、好ましくは12~25日間、10~20日間、更により好ましくは約15日間から20日間、又は約17日間から19日間、培養し、かつその間にROCK阻害剤の濃度を漸減させてもよい。
- [0109] 浮遊培養に用いられるROCK阻害剤の濃度は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制し得る濃度である。例えば、ROCK阻害剤としてY-27632を用いた場合における、約0.1~200 μ M、好ましくは約2~100 μ M、更に好ましくは約30~100 μ Mに相当する濃度が挙げられる。
- [0110] 上述のとおりROCK阻害剤の濃度を添加する期間内で変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させたり、工程(2a)を開始した時点から徐々に濃度を低減させたりできる。

- [0111] 工程（１）で得られる細胞を分散させた懸濁液を、上記培養器中に播き、非接着性の条件下で培養することにより、複数の細胞を集合させて細胞塊を形成する。
- [0112] 一態様として、分散した細胞を迅速に凝集させて、１つの培養コンパートメント中に１つの細胞塊を形成することが好ましい（S F E B q法）。分散した細胞を迅速に凝集させる方法としては、例えば、以下の方法を挙げることができる：
- １）比較的小さな体積（例えば、１ｍｌ以下、５００μｌ以下、２００μｌ以下、１００μｌ以下）の培養コンパートメント中に、分散した細胞を閉じ込め、該コンパートメント中に１個の細胞塊を形成する方法、又は
 - ２）遠心チューブに分散した細胞を入れ、これを遠心し、１箇所に細胞を沈殿させることにより、該チューブ中に１個の細胞塊を形成する方法。
- [0113] 上記１）において、好ましくは分散した細胞を閉じ込めた後、培養コンパートメントを静置する。培養コンパートメントとしては、マルチウェルプレート（３８４ウェル、１９２ウェル、９６ウェル、４８ウェル、２４ウェル等）、マイクロポア、チャンバースライド等におけるウェルや、チューブ、ハンギングドロップ法における培地の液滴等を挙げることができるが、これらに限定されない。該コンパートメントに閉じ込められた分散した細胞が、重力により１箇所に沈殿し、或いは細胞同士が接着することにより、１つの培養コンパートメントにつき、１つ細胞塊が形成される。マルチウェルプレート、マイクロポア、チャンバースライド、チューブ等の底の形状は、分散した細胞が１箇所へ沈殿するのが容易となるように、Ｕ底又はＶ底とすることが好ましい。
- [0114] １つの培養コンパートメント中に播く細胞の数は、１つの培養コンパートメントにつき１つの細胞塊が形成され、且つ本発明の方法によって、該細胞塊において、前脳細胞への分化誘導が可能であれば、特に限定されないが、１つの培養コンパートメントにつき、工程（１）で得られる細胞を、通常約 1×10^3 ～約 5×10^4 個、好ましくは約 1×10^3 ～約 2×10^4 個、より

好ましくは約 $2 \times 10^3 \sim$ 約 1.2×10^4 個播く。そして、細胞を迅速に凝集させることにより、1つの培養コンパートメントにつき、通常約 $1 \times 10^3 \sim$ 約 5×10^4 個、好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim$ 約 2×10^4 個、より好ましくは約 $2 \times 10^3 \sim$ 約 1.2×10^4 個の細胞塊が1個形成される。

[0115] または、1つの培養コンパートメントにつき、工程(1)で得られる細胞を、通常約 $1 \times 10^3 \sim$ 約 5×10^5 個、好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim$ 約 2×10^5 個、より好ましくは約 $2 \times 10^3 \sim$ 約 1×10^5 個播く。そして、細胞を迅速に凝集させることにより、1つの培養コンパートメントにつき、通常 $5 \times 10^2 \sim$ 約 5×10^5 個、好ましくは約 $5 \times 10^2 \sim$ 約 2×10^5 個、より好ましくは約 $1 \times 10^3 \sim$ 約 1×10^5 個の細胞塊が1個形成される。

[0116] 細胞塊形成までの時間は、1つのコンパートメントにつき1つの細胞塊が形成され、且つ、該細胞塊において、大脳オルガノイドへの分化誘導が可能な範囲で適宜決定可能であるが、好ましくは、24時間以内、より好ましくは12時間以内で、細胞塊を形成する。または、細胞塊形成までの時間は、好ましくは、48時間以内、より好ましくは24時間以内で細胞塊を形成する。

[0117] また凝集塊形成時の培養温度、 CO_2 濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは約 37°C である。また、 CO_2 濃度は、例えば約 $1 \sim 10\%$ 、好ましくは約 5% である。

[0118] 更に、同一培養条件の培養コンパートメントを複数用意し、各培養コンパートメントにおいて、1個の細胞塊を形成させることにより、質的に均一な、細胞塊の集団を得ることができる。細胞塊が質的に均一であることは、細胞塊のサイズ及び細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態及びその均一性、分化及び未分化マーカーの発現及びその均一性、分化マーカーの発現制御及びその同期性、分化効率の細胞塊間の再現性などにに基づき、評価することが可能である。ここで細胞塊の集団が「均一」とは、細胞塊の集団全体のうちの 80% 以上の細胞塊が、当該細胞塊の集団における当該パラ

メーターの平均値±20%の範囲内、好ましくは、平均値±10%、更に好ましくは、平均値±5%の範囲内であることを意味する。

[0119] 工程(2a)で用いられる培養液には、TGFβシグナル阻害剤及びWntシグナル伝達阻害剤が含まれる。TGFβシグナル阻害剤として上述のものが利用可能であり、好ましくは、SB431542、A-83-01、又はXAV-939が挙げられる。Wntシグナル伝達阻害剤として上述のものが利用可能であり、好ましくは、IWR-1-endo、C59、LGK-974、DKK-1(タンパク質)が挙げられる。

[0120] 好ましいWntシグナル伝達阻害剤とTGFβシグナル阻害剤の組み合わせは、IWR-1-endo及びSB431542である。

[0121] 培地中のWntシグナル伝達阻害剤の濃度は、細胞塊が前脳細胞への分化誘導可能な範囲で、適宜設定することができるが、Wntシグナル伝達阻害剤としてIWR-1-endoを用いる場合における、0.1~50μM、好ましくは0.3~10μM、更に好ましくは0.3~5μMに相当するWntシグナル伝達阻害活性を呈する濃度が挙げられる。

[0122] 培地中のTGFβシグナル阻害剤の濃度は、細胞塊が前脳細胞への分化誘導可能な範囲で、適宜設定することができるが、TGFβシグナル阻害剤としてSB431542を用いる場合における、0.1~100μM、好ましくは1~50μM、更に好ましくは1~10μMに相当するTGFβシグナル阻害活性を呈する濃度が挙げられる。

[0123] 工程(2a)で用いられる培養液、すなわち、細胞塊の形成時及び細胞塊の浮遊培養に用いられる培地は、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されず、上述の定義における、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地からとして調製することができる。

[0124] 工程(2a)において用いられる基礎培地として、例えば、Glasgow MEM培地、DMEM培地、F-12培地(F12培地ともいう)及びDMEM/F12培地等が挙げられる。好ましくは、Glasgow MEM培地が用いられる。

- [0125] 細胞塊の形成時に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、上述のものを使用できるが、例えば、KSR (knock out serum replacement) (Invitrogen社製)、Chemically-defined Lipid concentrated (Gibco社製)、Glutamax (Gibco社製) が挙げられる。
- [0126] 具体的には、約10～30%の血清代替物（例えば、KSR）を含む培地を用いることができる。
- [0127] または、細胞塊の形成時に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、上述のものを使用できるが、例えば、KSR (Gibco社製)、Chemically-defined Lipid concentrated (Gibco社製)、Glutamax (Gibco社製) が挙げられる。具体的には、それぞれの製品の使用マニュアルに従った適量の血清代替物（例えば、1～30%のKSR）を含む培地を用いることができる。
- [0128] 細胞塊の浮遊培養に用いられる培地は、前脳細胞への分化誘導に、悪影響を与えない範囲で、他の添加物を含むことができる。添加物としては、例えば、インスリン、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、糖類（例えばグルコース等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）等が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0129] 一態様において、細胞塊の浮遊培養に用いられる培地は、前脳細胞への分化誘導に悪影響を与えない観点から、Fgf、Wnt、Nodal、Notch、Shh等のパターン形成因子；インスリン及びLipid-rich albumin等の成長因子を含まないことが好ましい。

- [0130] 凝集塊の浮遊培養における培養温度、 CO_2 濃度、 O_2 濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約 $30\sim40^\circ\text{C}$ 、好ましくは約 37°C である。 CO_2 濃度は、例えば約 $1\sim10\%$ 、好ましくは約 5% である。 O_2 濃度は、例えば約 20% である。
- [0131] 工程(2a)における浮遊培養は、静置培養、又は振とう培養若しくは旋回培養若しくは攪拌培養のいずれであってもよいが、好ましくは静置培養である。又は、工程(2a)の一部の期間のみ静置培養を実施してもよい。
- [0132] 工程(2a)は、前脳領域への分化方向が定まり、前脳マーカー陽性細胞塊(例、Foxg1陽性細胞塊)が誘導されるのに十分な期間実施される。すなわち、工程(2a)により、前脳マーカー陽性細胞を含む細胞塊を得ることができる。
- [0133] 一態様として、工程(2a)は、少なくとも1つの前脳マーカー陽性細胞が生成する段階まで行われる。好ましくは、工程(2a)は、例えば、培養中の細胞塊のうち 50% 以上、好ましくは 70% 以上の細胞塊が前脳マーカー陽性となるまで実施される。
- [0134] 一態様として、工程(2a)は、細胞塊に含まれる細胞の 30% 以上、好ましくは 50% 以上、より好ましくは 70% 以上が、前脳マーカー陽性である細胞塊が生成する段階まで行われる。
- [0135] 工程(2a)の培養期間は、Wntシグナル伝達阻害剤及びTGF β シグナル阻害剤の種類や、培養条件に応じて変動し得るので、一概に特定することは出来ないが、例えば、ヒト多能性幹細胞を用いた場合、7日間 $\sim$ 30日間、好ましくは、15日間 $\sim$ 20日間(例、18日間)である。
- [0136] <工程(2b)>
- 工程(2b)においては、工程(2a)で得られた細胞塊を、更にTGF β シグナル阻害剤及びWntシグナル伝達阻害剤を実質的に含まない培養液中で浮遊培養することにより、大腦オルガノイドを得る。
- [0137] 一態様として、工程(2b)における浮遊培養は、高酸素分圧条件下で行われてもよい。高酸素分圧条件とは、空気中の酸素分圧(20%)を上回る

酸素分圧条件を意味する。一態様として、工程（2 b）における酸素分圧は、例えば、30～60%、好ましくは35～60%、より好ましくは38～60%である。

[0138] 工程（2 b）に用いられる培地は、工程（2 a）に用いられる培地と同様に、動物細胞の培養に用いられる培地であれば特に限定はなく、上述の定義に記載の培地を基礎培地として調製することができる。

[0139] 基礎培地としては、例えば、G l a s g o w MEM培地、DMEM培地、F-12培地、及びDMEM/F-12培地などが挙げられる。好ましくは、DMEM/F-12培地が用いられる。

[0140] 工程（2 b）に用いられる培地は、好ましくは無血清培地であり、必要に応じ、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、上述のものを使用できるが、例えば、N2サプリメント、B27サプリメント、Neurocult SM1 Neuronal supplement、KSR等が挙げられる。

[0141] 血清代替物の濃度は、適宜調整すればよいが、具体的には、例えばN2サプリメントであれば、約0.1～3%、好ましくは約1%、B27サプリメントであれば、約0.1～10%、好ましくは2%、KSRであれば、好ましくは約1～30%の血清代替物を含む培養液を用いることができる。

[0142] 工程（2 b）においては、工程（2 a）に用いられた、Wntシグナル伝達阻害剤及びTGFβシグナル阻害剤は不要である。一態様において、工程（2 b）に用いられる培地には、Wntシグナル伝達阻害剤及びTGFβシグナル阻害剤が含まれない。

[0143] 一態様において、工程（2 b）における培養液は、好ましくは血清を実質的に含まない無血清培養液であり、更に好ましくは血清代替物を含む無血清培養液である。

[0144] 工程（2 b）に用いられる培地は、大脳皮質細胞への分化誘導を促進するために、血清代替物としてN2サプリメントを含有することが好ましい。N2サプリメントは、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、プト

レスシン及び亜セレン酸ナトリウムを含む、公知の血清代替用組成物であり、Gibco/Thermo Fisher Scientific社等から購入可能である。N2サプリメントの添加量は、前脳組織、又はその前駆組織への分化誘導、又は神経細胞への分化誘導、及び/又は大脳皮質を構成する細胞又はその前駆細胞への分化誘導が促進されるように、適宜設定することができる。

- [0145] また、工程（2b）に用いられる培地は、脳室帯の長期間の維持培養のため、化学的に決定された脂質濃縮物（Chemically Defined Lipid Concentrate）を含有することが好ましい。Chemically Defined Lipid Concentrateは、それぞれ精製された、コレステロール、DL- α -トコフェロール、アラキドン酸、リノレン酸、リノール酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、及びステアリン酸を含む脂質混合物である。

Chemically Defined Lipid Concentrateは市販のものを使用することができ、例えば、Gibco/Thermo Fisher Scientific社等から購入可能である。

- [0146] 細胞塊の浮遊培養に用いられる培地は、大脳皮質細胞への分化誘導に、悪影響を与えない範囲で、他の添加物を含むことができる。添加物としては、例えば、インスリン、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、糖類（例えばグルコース等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）等が挙げられるが、これらに限定されない。

- [0147] 一態様において、工程（2b）における培地は、血清を含んでいてもよい。血清は、脳室帯の長期間の維持培養に寄与し得る。血清としては、FBS等が挙げられるが、これに限定されない。血清は非動化されていることが好

ましい。培地中の血清濃度は、脳室帯の長期間の維持培養に寄与しうる範囲で適宜調整することができるが、通常1～20% (v/v) である。

[0148] 一態様において、工程(2b)における培地は、ヘパリンを含んでいてもよい。ヘパリンは、脳室帯の長期間の維持培養に寄与し得る。培地中のヘパリン濃度は、脳室帯の長期間の維持培養に寄与しうる範囲で適宜調整することができるが、通常0.5～50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは1～10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (例、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) である。

[0149] 一態様において、工程(2b)における培地は、細胞外マトリクス成分を含んでいてもよい。細胞外マトリクスは、脳室帯の長期間の維持培養に寄与し得る。「細胞外マトリクス成分」とは、細胞外マトリクス中に通常見出される各種成分をいう。本発明の方法では、基底膜成分を用いることが好ましい。基底膜の主成分としては、例えばIV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンが挙げられる。培地に添加する細胞外マトリクス成分としては市販のものが利用でき、例えば、Matrigel (BD Bioscience)、ヒト型ラミニン (Sigma-Aldrich) などが挙げられる。Matrigelは、Engelbreth Holm Swarn (EHS) マウス肉腫由来の基底膜調製物である。Matrigelの主成分はIV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンであるが、これらに加えてTGF β 、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、組織プラスミノゲン活性化因子、EHS腫瘍が天然に産生する増殖因子が含まれる。Matrigelのgrowth factor reduced製品は、通常のMatrigelよりも増殖因子の濃度が低く、その標準的な濃度はEGFが<0.5 ng/ml、NGFが<0.2 ng/ml、PDGFが<5 pg/ml、IGF-1が5 ng/ml、TGF β が1.7 ng/mlである。本発明の方法では、growth factor reduced製品の使用が好ましい。

[0150] 培地中の細胞外マトリクス成分の濃度は、脳室帯の長期間の維持培養に寄与しうる範囲で適宜調整することができるが、Matrigelを用いる場

合には培養液の1/500~1/20の容量、さらに好ましくは1/100の容積で添加することが好ましい。

[0151] 一態様において、工程(2b)における培地は、N2サプリメント及びChemically Defined Lipid Concentrateに加えて、血清及びヘパリンを含有する。該態様においては、該培地に細胞外マトリクスを更に含んでもよい。本態様の培地は、長期間にわたる終脳若しくはその部分組織、又はその前駆組織の分化誘導を観察するのに適している。

[0152] この場合、工程(2b)の全範囲にわたり、N2サプリメント、Chemically Defined Lipid Concentrate、血清及びヘパリン(任意で更に細胞外マトリクス)を含有する培地を用いてもよいが、一部の期間のみ、当該態様の培地を用いてもよい。一態様において、工程(2b)において、まず、N2サプリメント及びChemically Defined Lipid Concentrateを含み、血清、ヘパリン及び細胞外マトリクスを含有しない培地を用い、途中から(例えば、Foxg1陽性凝集塊中に、脳室様の空洞を有した神経上皮様構造(多列円柱上皮)、例えば半球状もしくは球状の空洞を複数有する多列円柱上皮が形成された段階以降において)、N2サプリメント、Chemically Defined Lipid Concentrate、血清、ヘパリン(任意で、細胞外マトリクス)を含有する培地へ切り替えてもよい。

[0153] 工程(2b)における培養温度、CO₂濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30~40℃、好ましくは約37℃である。CO₂濃度は、例えば約1~10%、好ましくは約5%である。

[0154] 工程(2b)は、少なくとも、前脳マーカー(例えば、Foxg1)陽性細胞が生成し、大脳皮質様構造物が形成されるのに十分な期間実施される。当該大脳皮質様構造物は、顕微鏡観察により確認することが可能である。

[0155] 工程(2b)の培養期間は、工程(2a)のWntシグナル伝達阻害剤及びTGFβシグナル阻害剤の種類等に応じて変動し得るので、一概に特定す

ることは出来ないが、例えば、ヒト多能性幹細胞を用いた場合、少なくとも 10 日間、又は 10～40 日間、好ましくは 10～31 日間、更に好ましくは 15～24 日間である。

[0156] 本明細書において、工程（2b）培養工程を長期間（例、20 日以上、好ましくは 50 日以上、より好ましくは 70 日以上）に亘り実施することにより、細胞塊内において、安定的な大脳皮質様構造物の自己組織化を誘発することが可能であり、工程（2b）を継続して実施すると、時間の経過とともに、細胞凝集塊内に含まれる大脳組織の分化段階が進んでゆく。そのため、所望の分化段階、すなわち複数の大脳皮質様構造物を含む大脳オルガノイドの形成に到達するまで、工程（2b）を継続して実施するのが好ましい。

[0157] 工程（2b）において、細胞塊の浮遊培養に用いる培養器としては、特に限定されないが、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、バイオリアクター、ローラーボトルが挙げられる。非接着性の条件下での培養を可能とするため、培養器は、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞非接着性となるように人工的に処理されているものや、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないもの等を使用することができる。

[0158] 一態様として、工程（2b）において細胞塊の浮遊培養に用いる培養器として、酸素透過性のものを用いてもよい。酸素透過性の培養器を用いることにより、細胞塊への酸素の供給が向上する。工程（2b）においては、細胞凝集塊が大きく成長し、細胞塊の中の細胞にまで、十分な酸素が供給されなくなるリスクを避けるために、酸素透過性の培養器を利用してもよい。

[0159] 工程（2b）の浮遊培養に際しては、細胞塊の培養器に対する非接着状態を維持できる限り、細胞塊を静置培養してもよいし、旋回培養や振とう培養

により凝集塊を意識的に動かしてもよい。工程（2 b）の全期間を通じて静置培養を実施してもよいし、一部の期間のみ静置培養を実施してもよい。

[0160] 一態様として、工程（2 b）の浮遊培養は、静置培養である。この時、上述の高酸素分圧条件下で培養することが好ましい。

[0161] 一態様として、工程（2 b）の浮遊培養は、振とう培養である。この時、高酸素分圧条件下での培養は不要である。

[0162] 工程（2 b）により、細胞塊中に、前脳マーカー陽性の脳皮質様構造物が形成される。一態様において、脳皮質様構造物を含む細胞塊に含まれる細胞の70%以上が前脳マーカー陽性（例、Foxg1陽性）である。

[0163] 一態様において、工程（2 b）により、細胞塊中に形成された、脳皮質様構造物は、神経上皮の外側に神経細胞層を備えたロゼット様構造物である。一態様において、該脳皮質様構造物は、内腔側に神経幹細胞マーカー陽性、具体的にはPAX6及び／又はSOX2陽性の細胞層を有し、最も内腔の部分にリン酸化Histone H3陽性の有糸分裂細胞を含む。一態様において、神経上皮様の細胞層の外側には、有糸分裂後の神経細胞のマーカーであるβIII-Tubulin（βTubulin、TUBB3又はTUJ1）を発現し、脳皮質の初期皮質板マーカーであるCtip2、又はTbr1を発現する細胞が含まれる。これらは、脳皮質の第1層の神経細胞であるReelin陽性カハールレチウス細胞を含み、表層近くにはLamininを多く含んだ層を有し得る。つまり、好ましい態様において、本発明の製造方法により得られる凝集塊には、脳皮質前駆組織が含まれる。

[0164] <工程（3）>

本発明の脳オルガノイドの製造方法は、さらに脳オルガノイドを選別する工程である工程（3）を含んでよい。工程（3）は、工程（2）で得られた複数の細胞塊から、細胞塊の形状、内部構造、サイズ、表面の色彩若しくは模様、及び遺伝子発現からなる群から選ばれる1以上を指標として、所望の脳オルガノイドを選別する工程である。これらの指標のうち、2以上、3以上又は4以上を採用することが好ましく、また、指標として、細胞塊

の形状、内部構造、表面の色彩若しくは模様、及び／又は遺伝子発現であることが好ましく、細胞塊の形状、内部構造、及び／又は遺伝子発現であることがより好ましく、細胞塊の形状であることが特に好ましい。例えば、細胞塊の形状が球状（スフェア状）である場合、所望の脳オルガノイドとして選別することができる。

[0165] 脳オルガノイドを選別するための各指標は、一般的な脳オルガノイドの定義に従うものであることが好ましく、例えば、以下の（１）～（５）の少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ又は４つを満たす細胞塊を脳オルガノイドと判定してもよい。

（１）球状の細胞塊であること、

（２）細胞塊の内部に、脳皮質様構造物を有すること、

（３）細胞塊の表面に色素沈着を有しないこと、

（４）細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、バルーン状形状を有しないこと、並びに、

（５）細胞塊が、NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、又は少なくとも５つの遺伝子を発現していること。

[0166] 上記（５）について、脳オルガノイドが、SLC17A7、NEUROD6、及びEMX1からなる群から選ばれる１以上の遺伝子、好ましくは全ての遺伝子を発現していることが好ましい。

- [0167] さらに、後述する表6に記載の目的外細胞に発現する遺伝子の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ以上、又は少なくとも5つ以上を実質的に発現していないことが好ましい。さらに、GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していないことが好ましく、これらのマーカーのうち、2以上、3以上、4以上又は全部を発現しないことがより好ましい。
- [0168] 本明細書において、遺伝子が「実質的に発現していない」とは、遺伝子の発現産物であるタンパク質が、生理機能を発揮する程度の発現量に満たないことを意味する。
- [0169] 本明細書において、「実質的に発現していない」状態として、具体的には、細胞に恒常的に発現している任意のコントロール遺伝子（例えば、恒常的に発現している遺伝子としてGAPDH、ACTB、B2M、18SリボソームRNAなどが挙げられる。）の発現量を基準として、コントロール遺伝子の発現量の1/10以下である状態が挙げられる。
- [0170] 上記（1）における球状及び上記（2）における大脳皮質様構造物は上記のとおりである。ここにおいて、球状ではあるが大脳皮質様構造物を持たない細胞塊の代表例は、図31において、「Potato-like」、又は「Jelly-like」と称される細胞塊と称される細胞塊である。
- [0171] 上記（3）における色素沈着とは、細胞塊のうち一部に黒色又は茶色の領域を有することを意味する。ここにおいて、色素沈着を有する細胞塊の代表例は、図28において「Pigment」と称される細胞塊である。
- [0172] 上記（4）における細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、又はバルーン形状を有しないこととは、それぞれ細胞塊の中に、透明度が高い袋状の構造、繊維状の上皮構造、又は突起状の構造が存在しないことを意味する。
- [0173] ここにおいて、嚢胞状形状の代表例は、図31において、「Transparent」と称される形状である。ここにおいて、突起形状の代表例は、図31において「Cotton-like」と称される形状である。ここにおいて、バルーン状形状の代表例は、図31において「Balloon」と

称される形状である。上記（１）～（４）の特徴は、細胞塊を場合により拡大した上で、目視により判別し、除くことができる。または、顕微鏡の拡大画像を元に、画像解析が可能なソフトウェアを用いて装置により形状を判別してもよい。この場合、深層学習等の方法を用いて形状の判別の精度を向上させてもよい。

[0174] また、大脳オルガノイドは直径（円相当径）が約 $100\mu\text{m}$ ～ $10000\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $500\mu\text{m}$ ～ $5000\mu\text{m}$ の球状様の細胞塊であってよい。細胞塊の内部に含まれる大脳皮質様構造物は直径（円相当径）が約 $10\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ のものであってよい。

[0175] 遺伝子（マーカー）の発現はその発現量によって判定することができる。遺伝子の発現量は、当該遺伝子の発現産物（mRNA又はタンパク質若しくはその断片）の量、好ましくはmRNAの発現量で評価することができる。具体的には、定量的RT-PCR法、RT-PCR法、次世代シーケンス解析、マイクロアレイ解析、ウェスタンブロットティング法、ELISA法、免疫染色法、フローサイトメトリーなどによって判定することができる。

[0176] 判定は、細胞塊毎に行ってもよく、同一ロットの場合は、一定数の細胞塊（例えば、１個以上、３個以上、５個以上）をサンプリングして判定してもよい。細胞塊の形状、内部構造、サイズ、及び表面の色彩若しくは模様の場合は、倒立顕微鏡観察において目視で確認することによって判定でき、細胞塊毎で判定することが好ましい。遺伝子発現に関しては細胞塊毎ではなく、サンプリングすることによって判定することが好ましい。具体的には、例えば、形状及び／又は内部構造で選別した細胞塊について、定量的RT-PCR法、RT-PCR法、次世代シーケンス解析、マイクロアレイ解析、ウェスタンブロットティング法、ELISA法、免疫染色法、フローサイトメトリーなどで判定することが挙げられる。

[0177] 工程（３）において、上記判定方法によって大脳オルガノイドと判定された細胞塊を回収して、大脳オルガノイドとして選別する。工程（３）で選別された大脳オルガノイドは、選別しない場合に比べて、大脳オルガノイドが

濃縮される

。すなわち、工程（３）を経ることにより、細胞塊の集団における大腦オルガノイドの割合を更に向上させることができる。

[0178] ３．大腦オルガノイド

本発明の細胞培養物は、上述の工程（１）及び工程（２）を含む大腦オルガノイドの製造方法を用いて製造される細胞培養物であって、複数の球状の細胞凝集体を含み、該複数の球状の細胞凝集体に占める大腦オルガノイドの割合が４０％以上、好ましくは５０％以上、更に好ましくは６０％以上である細胞培養物である。ここで当該割合は、細胞培養物をサンプリングして、該サンプルにおける、球状の細胞凝集体の全数に占める大腦オルガノイドの数で算出することができる。

[0179] 大腦オルガノイドは神経上皮の外側に神経細胞層を備えた大腦皮質様構造物を１以上、好ましくは複数内包する、球状の細胞塊を意味する。大腦オルガノイドの判定方法は、上記工程（３）の方法に準ずる。

[0180] 個々の大腦オルガノイドに占める大腦皮質様構造物の割合は、２０％以上、好ましくは４０％以上、更に好ましくは５０％以上であってもよい。ここで、大腦オルガノイドに占める大腦皮質様構造物の割合は、大腦オルガノイド全体の面積又は体積に占める大腦皮質様構造物の割合であり、評価しやすい観点から、面積の割合であることが好ましい。また、当該割合は、複数（例えば２～２０個、好ましくは５個又は１０個）の大腦オルガノイドの平均値であってよい。当該割合は、例えば、大腦オルガノイドの中心部を含む切片の断面積に占める大腦皮質様構造物の割合で評価してもよい。ここで、中心部とは、大腦オルガノイドの最大径を有する断面の中心箇所を意味する。上記評価は、例えば大腦オルガノイド切片に対して免疫染色を行い、神経幹細胞マーカー及び／又は神経前駆細胞マーカー、並びに神経細胞マーカーが陽性である細胞は、大腦皮質様構造物と判定し、大腦皮質様構造物の面積が、当該切片の面積に占める割合を算出することによって行ってもよい。又は、当該大腦オルガノイドの体積に占める、当該大腦皮質様構造物の体積の割合

として算出してもよい。

- [0181] ここで上記神経幹細胞及び／又は神経前駆細胞マーカーとしては、P a x 6 が挙げられ、上記神経細胞マーカーとしては、前脳マーカーである F o x g 1、大脳皮質マーカーである C t i p 2 等が挙げられる。
- [0182] また、当該大脳オルガノイドの好ましい態様において、全細胞数の 2 0 % 以上、好ましくは 4 0 % 以上、好ましくは 7 0 % 以上が F o x g 1 陽性細胞である。
- [0183] 一態様において、大脳皮質様構造物は、内腔側に神経幹細胞マーカー：P A X 6 及び／又は S O X 2 陽性の細胞層を有し、最も内腔の部分にリン酸化 H i s t o n e H 3 陽性の有糸分裂細胞を含む。
- [0184] 一態様において、大脳皮質様構造物の神経上皮様細胞層の外側には、有糸分裂後の神経細胞のマーカーである β I I I - T u b u l i n (β T u b I I I、T U B B 3 又は T U J 1) を発現し、大脳皮質の初期皮質板マーカーである C t i p 2、及び／又は T b r 1 を発現する細胞が含まれる。これらは、大脳皮質の第 1 層の神経細胞である R e e l i n 陽性カハールレチウス細胞を含み、表層近くには L a m i n i n を多く含んだ層を有し得る。
- [0185] 一態様において、大脳オルガノイドは、上記工程 (1) 及び工程 (2) を含む大脳オルガノイドの製造方法を用いて製造される大脳オルガノイドであってよい。一態様の大脳オルガノイドは、上記工程 (3) によって選別された大脳オルガノイドであってよく、また、下記 (1) ~ (5) の特徴を有する細胞塊であってよい。
- (1) 球状の細胞塊であること、
 - (2) 細胞塊の内部に、大脳皮質様構造物を有すること、
 - (3) 表面に色素沈着を有しないこと、
 - (4) 細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、バルーン状形状を有しないこと、並びに、
 - (5) N E U R O D 6、N E U R O D 2、S S T R 2、T B R 1、Z B T B 1 8、N H L H 1、I G F B P L 1、N R N 1、R T N 1、T H S D 7 A、

NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFP M2、PCDH9、NEL L2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB4 1L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SY T4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3G AT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの遺伝子を発現していること。

[0186] 上記(5)について、大腦オルガノイドが、SLC17A7、NEURO D6、及びEMX1からなる群から選ばれる1以上、2以上又は全部を発現していることが好ましい。さらに、GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していないことが好ましく、これらのマーカーのうち、2以上、3以上、4以上又は全部を発現しないことがより好ましい。

[0187] 一態様において、大腦オルガノイドは上記のとおりであり、また、細胞塊1つ当たりの細胞数は、約 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個、好ましくは約 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 個であってよい。

[0188] 4. 大腦皮質細胞塊の製造方法1

本発明の一態様として、下記の工程(i)及び工程(ii)を含む、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大腦皮質細胞塊を製造する方法が挙げられる。

(i) 多能性幹細胞から大腦オルガノイドを得る工程、

(ii) 工程(i)で得られた大腦オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤、好ましくは γ -セクレターゼ阻害剤を含む培養液中で培養して、大腦皮質細胞塊を得る工程。

[0189] 上記工程(i)において、多能性幹細胞から大腦オルガノイドを得る方法は限定されず、当業者に周知の方法で調製することができる。このような周

知の方法としては、例えば上記2の脳オルガノイドの製造方法における工程(2)が挙げられる。

[0190] 本発明の一態様として、工程(i)において、上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法により多能性幹細胞から脳オルガノイドを得ることを含む「脳皮質細胞塊の製造方法1」が挙げられる。すなわち、脳皮質細胞塊の製造方法1は、上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法で得られる脳オルガノイドを以下の工程(i)及び工程(ii)で処理することを含む、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から脳皮質細胞塊の製造方法である。

(i) 上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法(即ち、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法を含む)により、脳オルガノイドを得る工程、

(ii) 工程(i)で得られた脳オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤、好ましくはγ-セクレターゼ阻害剤を含む培養液中で培養して、脳皮質細胞塊を得る工程。

[0191] <工程(i)>

工程(i)は上記2における工程(1)、工程(2a)及び工程(2b)に記載のとおりである。また、工程(i)は上記2における工程(3)をさらに含んでもよい。

[0192] 一態様として、工程(2b)は、約7～31日間、好ましくは約7～21日間行われる。

[0193] <工程(ii)>

上述の工程(2b)を行った後、場合により工程(3)による選別を行い、Notch阻害剤、好ましくはγ-セクレターゼ阻害剤を含む培地に培地交換を行うことにより、工程(ii)を行うことができる。あるいは、上述の工程(2b)を行った後工程(ii)を実施し、次いで工程(3)の選別を行ってもよい。

[0194] 工程(ii)において、Notchシグナル阻害剤としては、定義に記載

のものを適宜選択して使用することができる。工程 (i i) において用いられる N o t c h シグナル阻害剤として、好ましくは γ -セクレターゼ阻害剤が挙げられる。 γ -セクレターゼ阻害剤としては、定義に記載のものを適宜選択して使用することができる。好ましい γ -セクレターゼ阻害剤としては、N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) 又は Compound E が挙げられる。

[0195] 工程 (i i) において、用いられる培養液は、N o t c h シグナル阻害剤が含まれる以外は、工程 (i)、すなわち 2 の製造方法の工程 (2 b) で使用した培養液と同じものを使用することができる。又は、工程 (2 b) で使用した培養液とは異なるものを、上記 2 の製造方法の工程 (2 b) に記載されている培養条件から適宜選択してもよい。

[0196] また、工程 (i i) の培養条件は、適宜工程 (2 b) に準じればよい。

[0197] 培養液中の N o t c h シグナル阻害剤、好ましくは γ -セクレターゼ阻害剤の濃度は、細胞塊に含まれ得る神経幹細胞等の増殖性の細胞を抑制可能な範囲で、適宜設定することができる。具体的には、 γ -セクレターゼ阻害剤として DAPT を用いる場合における、0.1 ~ 1000 μ M、1 ~ 100 μ M、好ましくは 1 ~ 30 μ M、更に好ましくは 5 ~ 20 μ M に相当する γ -セクレターゼ活性又は当該 γ -セクレターゼ活性に基づく N o t c h シグナル阻害活性を呈する濃度が挙げられる。

[0198] 工程 (i i) は、工程 (i) の浮遊培養開始時点（神経細胞への分化誘導開始）から、約 28 日後 ~ 49 日後、好ましくは約 28 日後 ~ 44 日後に行われる。

[0199] 工程 (i i) の培養期間は、1 ~ 7 日間、好ましくは 2 ~ 6 日間、より好ましくは 2 ~ 4 日間である。

[0200] 5. 大脳皮質細胞塊の製造方法 2

本発明の一態様として、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大脳皮質細胞塊を製造する方法が挙げられ、当該方法が、

(i) 多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る工程と、

(i i) 工程 (i) で得られた大脳オルガノイドを、培養液中で培養する工程と、

(i i i) 工程 (i i) で得られた細胞培養物を、単細胞又は 2 ～ 5 個の細胞の集合体 (Cell clump) にまで分散させる工程と、

(i v) 工程 (i i) で得られた細胞培養物又は工程 (i i i) で得られた細胞集団を、 1 以上の神経栄養因子、アスコルビン酸、及び c A M P 活性化剤を含む培養液中で培養する工程と

を含み、上記工程 (i i i) の単細胞又は 2 ～ 5 個の細胞の集合体 (Cell clump) への分散工程は任意の工程であり、上記工程 (i i) の培養液及び／又は上記工程 (i v) の培養液は、N o t c h シグナル阻害剤を含む。

[0201] 上記工程 (i) において、多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る方法は限定されず、当業者に周知の方法で調製することができる。好ましくは、工程 (i) において、上記 2 に記載の大脳オルガノイドの製造方法、特に工程 (1) 、工程 (2 a) 及び工程 (2 b) を含む製造方法により多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る。

[0202] 上記工程 (i i) の培養液及び／又は上記工程 (i v) の培養液は、当該工程の一部又は全ての期間において N o t c h シグナル阻害剤を含む態様でもよい。N o t c h シグナル阻害剤の処理期間が一部の期間の場合は、上記工程 (i i) の培養液又は上記工程 (i v) の培養液の交換時に N o t c h シグナル阻害剤を含まない培養液を用いる。一部の期間は、N o t c h シグナル阻害剤による処理の効果が得られる限り、特に限定されず、上記工程 (i i) 又は上記工程 (i v) の培養期間のうちの数時間～数日、具体的には 1 ～ 7 日間、好ましくは 2 ～ 6 日間、より好ましくは 2 ～ 4 日間でもよい。また、極めて短い処理期間（例えば、4 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間）の繰り返しでもよい。また、N o t c h シグナル阻害剤を含む期間と、N o t c h シグナル阻害剤を含まない期間を交互に行ったり、濃度を変えた N o t c h シグナル阻害剤を用いた組み合わせも本願の範疇である。ここで用いられる N o t c h シグナル阻害剤、及びその濃度は、大脳皮質凝集塊の製

造方法 1 における工程 (i i) の記載を参照すればよい。

[0203] 本発明の一態様として、工程 (i) は上記 2 に記載の脳オルガノイドの製造方法に従って行い、且つ、工程 (i i i) を含む、「脳皮質細胞塊の製造方法 2-1」が挙げられる。すなわち、脳皮質細胞塊の製造方法 2-1 は、上記 4 に記載の脳皮質細胞塊の製造方法 1 における工程 (i) 及び工程 (i i) に加えて、以下の工程 (i i i) 及び工程 (i v-1) で処理することを含む、高純度脳皮質細胞塊の製造方法である。これは、分散再凝集された高純度脳皮質細胞塊である。ここで、工程 (i i) において、工程 (i) で得られた脳オルガノイドを、Notch シグナル阻害剤、好ましくは γ -セクレターゼ阻害剤を含む培養液中で培養する。当該工程 (i i) は、上記 4 の脳皮質細胞塊の製造方法 1 における工程 (i i) と同様に行えばよい。

(i i i) 工程 (i i) で得られた脳オルガノイドを、単細胞又は 2~5 個の細胞の集合体 (Cell clump) にまで分散する工程、

(i v-1) 工程 (i i i) で得られた細胞集団を、1 以上の神経栄養因子、アスコルビン酸及び cAMP 活性化剤 (例えば、dibutyryl cAMP (dbcAMP)) を含む無血清培養液中で培養して、(例えば 20 細胞以上の細胞からなる) 細胞塊を得る工程。

[0204] <工程 (i i i)>

工程 (i i) で得られた脳オルガノイドは、当業者に周知の方法、例えばピペティング等により物理的に、又は酵素処理により、単細胞又は 2~5 個の細胞の集合体 (Cell clump) にまで分散させることができる。ここで、分散して得られた細胞集団は、単細胞及び／又は 2~5 個の細胞の集合体 (Cell Clump) の集団であり得る。すなわち、工程 (i i i) において、当業者に周知の方法によって、工程 (i i) で得られた脳オルガノイドを単細胞、又は 2~5 個の細胞の集合体 (Cell Clump) にまで分散してよい。

[0205] <工程 (i v-1)>

工程 (i i i) で得られる細胞集団を浮遊培養することにより再凝集させ

、高純度の、大脳皮質細胞を含む細胞塊（高純度大脳皮質細胞塊）を得ることができる。

[0206] 工程（i v-1）で使用する培養液は、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体、及びcAMP活性化剤を含む培養液である。

[0207] 神経栄養因子としては上記定義に記載のものから適宜1～4、1～3、好ましくは1若しくは2因子を選択すればよい。神経栄養因子として、好ましくはBDNF及び／又はGDNFを挙げることができる。BDNFの濃度としては、1～100ng/mL、好ましくは10～30ng/mLが挙げられる。GDNFの濃度としては、1～100ng/mL、好ましくは5～20ng/mLが挙げられる。

[0208] アスコルビン酸若しくはその誘導体（例えばアスコルビン酸-2-リン酸）の濃度としては、アスコルビン酸の場合、10～500μM、好ましくは50～300μMに相当する濃度が挙げられ、誘導体においても同様な濃度が挙げられる。

[0209] cAMP活性化剤の濃度としては、例えばdbcAMPを用いた場合における、10～1000μM、好ましくは100～600μM、更に好ましくは300～500μMに相当するcAMP活性化が可能な濃度が挙げられる。

[0210] 工程（i v-1）の培養期間は、1～21日間、好ましくは2～15日間、2～10日間、2～8日間、2～6日間、更に好ましくは約4日間である。または、工程（i v-1）の培養期間は、1～40日間、好ましくは2～28日間、更に好ましくは2～14日間である。

[0211] 工程（i v-1）における浮遊培養は、上記2の工程（2b）に記載の方法を参照して行うことができる。例えば、上記2の工程（2b）と同じ培地に、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体、及びcAMP活性化剤を添加した培地を調製して用いることができる。

[0212] 工程（i v-1）で使用する培養液は、場合により、ROCK阻害剤を含んでいてもよい。ROCK阻害剤は、上述の定義に記載のものを適宜使用する

ることができ、好ましくは、Y-27632等を挙げることができる。

[0213] ここで用いられるROCK阻害剤の濃度は、例えば、ROCK阻害剤としてY-27632を用いた場合における、約0.1~200 μ M、好ましくは約2~100 μ M、更に好ましくは約30~100 μ Mに相当する濃度が挙げられる。ここで工程(iii)を経て得られる大脳皮質細胞塊は、分散-再凝集の工程を経ることにより、高純度大脳皮質細胞凝集塊である。

[0214] 6. 大脳皮質細胞塊の製造方法2-2

本発明の一態様として、上記5に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法2-1において、工程(iii)を含まない態様が挙げられる。すなわち、上記4に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法1において、工程(i)及び工程(ii)に加えて、以下の工程(iv-2)で処理することを含む、大脳皮質細胞塊の製造方法が挙げられる。ここで、工程(ii)において、工程(i)で得られた大脳オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤、好ましくは γ -セクレターゼ阻害剤を含む培養液中で培養する。

(iv-2)工程(ii)で得られた大脳オルガノイドを含む細胞培養物を、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体(例えば、アスコルビン酸-2-リン酸)、及びcAMP活性化剤(例えば、dibutyryl cAMP (dbcAMP))を含む培養液中で浮遊培養して、大脳皮質細胞塊を得る工程。

[0215] <工程(iv-2)>

工程(ii)で得られる大脳オルガノイドを含む細胞培養物を浮遊培養することにより、大脳皮質細胞を含む細胞塊(大脳皮質細胞塊)を得ることができる。

[0216] 工程(iv-2)で使用する培養液は、上記5の工程(iv-1)に記載された培養液が挙げられ、浮遊培養の条件、培養期間についても、上記5の工程(iv-1)に記載されたものが挙げられる。

[0217] 7. 大脳皮質細胞塊の製造方法3-1~3-7

本発明の一態様として、工程(ii)の培養液が、Notchシグナル阻

害剤を含む、「大脳皮質細胞塊の製造方法 3-1」が挙げられる。すなわち、大脳皮質細胞塊の製造方法 3-1 としては、以下の工程 (I) を含む、大脳皮質細胞塊の製造方法が挙げられる。

(I) 多能性幹細胞由来の大脳オルガノイドを、Notch 阻害剤、好ましくは γ-セクレターゼ阻害剤を含む培養液中で培養する工程。

ここで、工程 (I) は大脳皮質細胞塊の製造方法 1 における工程 (ii) と同様に行えばよい。

[0218] 本発明の一態様として、上記工程 (I) に加えて、以下の工程で処理することを含む、「大脳皮質細胞塊の製造方法 3-2」が挙げられる。

(II) 工程 (I) で得られた大脳オルガノイドを含む細胞培養物を、単細胞又は 2~5 個の細胞の集合体 (Cell clump) にまで分散する工程、及び

(III) 工程 (II) で得られた細胞集団を、1 以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体、及び cAMP 活性化剤を含む培養液中で培養して、大脳皮質細胞塊を得る工程。

ここで、工程 (I) は大脳皮質細胞塊の製造方法 1 における工程 (ii) と同様に行えばよく、工程 (II) 及び工程 (III) は、大脳皮質細胞塊の製造方法 2 における工程 (iii) 及び工程 (iv-1) と同様に行えばよい。また、工程 (III) を経て得られる大脳皮質細胞塊は、分散-再凝集の工程を経ており、高純度大脳皮質細胞凝集塊である。

[0219] 本発明の一態様として、上記工程 (II) を含まない態様が挙げられる。すなわち、工程 (I) に加えて、以下の工程で処理することを含む、「大脳皮質細胞塊の製造方法 3-3」が挙げられる。

(II-2) 工程 (I) で得られた大脳オルガノイドを含む細胞培養物を、1 以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体（例えば、アスコルビン酸-2-リン酸）、及び cAMP 活性化剤（例えば、dibutyryl cAMP (dbcAMP)）を含む培養液中で浮遊培養して、大脳皮質細胞塊を得る工程。

ここで、工程 (I) は大脳皮質細胞塊の製造方法 1 における工程 (ii)

と同様に行えばよく、工程（ⅰⅱⅱ－２）は大腦皮質細胞塊の製造方法２における工程（ⅱⅴ－１）と同様に行えばよい。

[0220] 本発明の一態様として、以下の工程（ⅰ－２）、工程（ⅰⅰ）及び工程（ⅰⅱⅱ－３）を含む、「大腦皮質細胞塊の製造方法３－４」が挙げられる。

（ⅰ－２）多能性幹細胞由来の大腦オルガノイドを培養液中で培養する工程、

（ⅰⅰ）工程（ⅰ－２）で得られた大腦オルガノイドを含む細胞培養物を、単細胞又は２～５個の細胞の集合体（Cell clump）にまで分散する工程、及び

（ⅰⅱⅱ－３）工程（ⅰⅰ）で得られた細胞集団を、１以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体、及びcAMP活性化剤を含む培養液中で培養して、大腦皮質細胞塊を得る工程を含み、ここで、工程（ⅰ－２）の培養液はNotchシグナル阻害剤を含まず、上記工程（ⅰⅱⅱ－３）の培養液はNotchシグナル阻害剤を含む。ここで、工程（ⅰ－２）は上記２に記載の大腦オルガノイドの製造方法における工程（２b）と同様に行えばよい。工程（ⅰ－２）は多能性幹細胞由来の大腦オルガノイドを製造する工程の一部に相当する培養であってもよく、培養期間に特に限定はない。工程（ⅰⅰ）は上記５に記載の大腦皮質細胞塊の製造方法２－１における工程（ⅱⅱⅱ）と同様に行えばよい。

工程（ⅰⅱⅱ－３）の培養液は、当該工程の一部又は全ての期間においてNotchシグナル阻害剤を含む態様でもよい。Notchシグナル阻害剤の処理期間が一部の期間の場合は、上記工程（ⅰⅱⅱ－３）の培養液の交換時にNotchシグナル阻害剤を含まない培養液を用いる。一部の期間は、Notchシグナル阻害剤による処理の効果が得られる限り、特に限定されず、上記工程（ⅰⅱⅱ－３）の培養期間のうちの数時間～数日、具体的には１～７日間、好ましくは２～６日間、より好ましくは２～４日間でもよい。また、極めて短い処理期間（例えば、４時間、１２時間、２４時間、２日間）の繰り返しでもよい。また、Notchシグナル阻害剤を含む期間と、

N o t c h シグナル阻害剤を含まない期間を交互に行ったり、濃度を変えた N o t c h シグナル阻害剤を用いた組み合わせも本願の範疇である。下記工程（111-4）及び工程（111-5）の培養液も工程（111-3）の培養液と同様に当該工程の一部又は全ての期間において N o t c h シグナル阻害剤を含む態様でもよい。

[0221] <工程（111-3）>

工程（11）で得られる細胞集団を浮遊培養することにより再凝集させ、高純度の脳皮質細胞を含む細胞塊（高純度脳皮質細胞塊）を得ることができる。

[0222] 工程（111-3）で使用する培養液としては、上記5に記載の脳皮質細胞塊の製造方法2の工程（iv-1）に記載された培養液が挙げられ、浮遊培養の条件、培養期間についても、上記5の工程（iv-1）に記載されたものが挙げられる。

[0223] 工程（111-3）において、当該浮遊培養の期間中の一部又は全部の期間において、培養液は N o t c h シグナル阻害剤、好ましくはγ-セクレターゼ阻害剤を含む。

[0224] ここで用いられる N o t c h シグナル阻害剤としては、定義に記載のものを適宜選択して使用することができるが、N o t c h シグナル阻害剤として、好ましくはγ-セクレターゼ阻害剤が挙げられる。γ-セクレターゼ阻害剤としては、定義に記載のものを適宜選択して使用することができるが、好ましいγ-セクレターゼ阻害剤としては、N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) 又はCompound Eが挙げられる。

[0225] 培養液中の N o t c h シグナル阻害剤、好ましくはγ-セクレターゼ阻害剤の濃度は、生成する細胞塊に含まれ得る増殖性の細胞を抑制可能な範囲で、適宜設定することができる。具体的には、γ-セクレターゼ阻害剤として DAPT を用いる場合における、0.1~1000 μM、1~100 μM、

好ましくは $1 \sim 30 \mu\text{M}$ 、更に好ましくは $5 \sim 20 \mu\text{M}$ に相当する γ -セクレターゼ活性又は当該 γ -セクレターゼ活性に基づくNotchシグナル阻害活性を呈する濃度が挙げられる。

[0226] 工程(111-3)において、Notchシグナル阻害剤、好ましくは γ -セクレターゼ阻害剤の存在下での培養を開始する時期に特に限定は無いが例えば、分化開始から28～42日目が挙げられる。また、当該培養の期間は、好ましくは約1日間～約20日間、さらに好ましくは2日間～8日間である。また、工程(111-3)を経て得られる大脳皮質細胞塊は、分散－再凝集の工程を経ており、高純度大脳皮質細胞凝集塊である。

[0227] 本発明の一態様として、上記工程(1)、上記工程(11)及び工程(111-4)を含み、上記工程(1)の培養液及び上記工程(111-4)の培養液のいずれもNotchシグナル阻害剤を含む態様（大脳皮質細胞塊の製造方法3-5）が挙げられる。ここで、工程(1)は上記4に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法1における工程(ii)と同様に行えばよく、工程(11)は上記5に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法2の工程(iii)と同様におこなえばよく、工程(111-4)は上記大脳皮質細胞塊の製造方法3-4の工程(111-3)と同様に行えばよい。また、工程(111-4)を経て得られる大脳皮質細胞塊は、分散－再凝集の工程を経ており、高純度大脳皮質細胞凝集塊である。

[0228] 本発明の一態様として、上記工程(1)、及び工程(111-5)を含み、上記工程(111)の培養液はNotchシグナル阻害剤を含む態様（大脳皮質細胞塊の製造方法3-6）が挙げられる。ここで、工程(1)は上記4に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法1における工程(ii)と同様に行えばよく、工程(111-5)は上記大脳皮質細胞塊の製造方法3-4における工程(111-3)と同様に行えばよい。

[0229] ここで、工程(1)及び／又は工程(111-5)において、Notchシグナル阻害剤を含む培養液で培養することとは、工程(1)及び／又は工程(111-5)の一部の培養期間又は全培養期間において使用される培養

液は、N o t c hシグナル阻害剤を含むことを意味する。

- [0230] ここで、N o t c hシグナル阻害剤の処理期間が一部の期間の場合は、上記工程（１）の培養液又は上記工程（１１１－５）の培養液の交換時にN o t c hシグナル阻害剤を含まない培養液を用いる。この一部の期間は、N o t c hシグナル阻害剤による処理の効果が得られる限り、特に限定されず、上記工程（１）又は上記工程（１１１－５）の培養期間のうちの数時間～数日、具体的には１～７日間、好ましくは２～６日間、より好ましくは２～４日間でもよい。また、短い処理期間（例えば、４時間、１２時間、２４時間、２日間）の繰り返しでもよい。また、N o t c hシグナル阻害剤を含む期間と、N o t c hシグナル阻害剤を含まない期間を交互に行ったり、濃度を変えたN o t c hシグナル阻害剤を用いた組み合わせも本願の範疇である。
- [0231] 本発明の一態様として、大脳皮質細胞塊の製造方法３－６の上記工程（１）を上記工程（１－２）に変更した態様（大脳皮質細胞塊の製造方法３－７）が挙げられる。上記工程（１）を上記工程（１－２）に変更した以外は、上記大脳皮質細胞塊の製造方法３－６に準じて行う。工程（１１１－５）の培養液は、１以上の神経栄養因子、アスコルビン酸若しくはその誘導体、及びcAMP活性化剤を含む培養液に、N o t c hシグナル阻害剤をさらに含む。
- [0232] 大脳皮質細胞塊の製造方法３－１～３－７において、工程（１）又は（１－２）で用いる大脳オルガノイドの製造方法には特に限定はなく、当業者に周知の方法で調製することができる。例えば、上記２に記載の大脳オルガノイドの製造方法に従って製造することができる。又は、上記２に記載の大脳オルガノイドの製造方法の工程（１）を実施せず、工程（２）の「工程（１）で得られる細胞」の代わりに多能性幹細胞を用いて工程（２）を実施すればよい。
- [0233] また、大脳皮質細胞塊の製造方法３－１～３－７において、（１１１）～（１１１－５）の工程による処理に替えて上記２の工程（２b）に記載の方法、又は、神経細胞を生存させる培地で培養してもよい。この場合、N o t

c h シグナル阻害剤を添加する場合、添加しない場合も選択できる。

[0234] 本明細書では、代表的な大脳皮質細胞塊の製造方法の実施態様を示したが、用いる大脳オルガノイドの性質（遺伝型、組織形状、含有する細胞種割合、成熟度、等）や工程を行う装置、器具、場所、に応じて大脳皮質細胞塊の形成効率に変化することが想定される。このため、薬剤（例えばN o t c h シグナル阻害剤）による処理の濃度、開始時期、期間、処理前後の薬剤非含有培地での培養期間、は所望の大脳皮質細胞塊が得られる限り、適宜調整できる。

[0235] 本発明の一態様として、上記4の大脳皮質細胞塊の製造方法1、上記5の大脳皮質細胞塊の製造方法2、上記6の大脳皮質細胞塊の製造方法2-2及び上記7の大脳皮質細胞塊の製造方法3-1～3-7により得られた大脳皮質細胞塊を回収し、当該細胞塊及び媒体を含む大脳皮質細胞製剤を調製する工程を含む、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大脳皮質細胞製剤を製造する方法が挙げられる。

[0236] 特に制限されないが、大脳皮質細胞製剤を調製する媒体としては、非凍結の場合、例えば生理食塩水、リン酸緩衝液（P B S（-））、H a n k 平衡塩類溶液（H B S S）、E a r l 平衡塩類溶液、アートセレブなどの溶液が挙げられる。

[0237] また、特に制限されないが、大脳皮質細胞製剤を調製する媒体としては、凍結の場合、媒体としては、凍結保護剤、例えばD M S O、グリセロール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ポリビニルピロリドン、ソルビトール、デキストラン、トレハロースなどを含む溶液や、市販の凍結保存液、例えばC e l l b a n k e r、S t e m c e l l b a n k e r、バンバンカーなどが挙げられる。

[0238] 8. 大脳皮質細胞塊

本発明の一態様として、以下の性質を有する大脳皮質細胞塊が挙げられる。当該大脳皮質細胞塊は、上記4に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法1により製造できる。

[0239] すなわち、本発明の一態様として、下記（a）～（c）の特徴を有する、
大脳皮質細胞塊が挙げられる。

- （a）増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の10%以下であること、
- （b）神経細胞マーカー、皮質V/VⅠ層マーカー、及び前脳マーカーからなる群から選ばれる1つ以上のマーカーが陽性である細胞数が全細胞数の60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上であること、
- （c）神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないこと。

[0240] 上記増殖性マーカーとしては、Ki67が挙げられる。上記神経細胞マーカーとしては、 β III-Tubulin (β TubIII) が挙げられる。上記皮質V/VⅠ層マーカーとしては、Ctip2が挙げられる。上記前脳マーカーとしては、Foxg1が挙げられる。

[0241] 一態様として、下記の特徴を有する大脳皮質細胞塊が挙げられる：

- （a'）Ki67陽性細胞数が全細胞数の5%以下であること、
- （b'） β III-Tubulin (β TubIII)、Ctip2、及びFoxg1がいずれも陽性の細胞数が全細胞数の60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上であること、
- （c）神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないこと。

[0242] 大脳オルガノイドにおける神経上皮及び大脳皮質様構造は、倒立顕微鏡観察において目視で確認可能である。

[0243] 一態様として、神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないとは、上述の神経上皮や大脳皮質様構造が、倒立顕微鏡観察等において目視で同定できないことが挙げられる。

[0244] 一態様として、上記大脳皮質細胞塊は、更に

- （d）NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFP

M2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子をさらに発現している。上記大脳皮質細胞塊は好ましくはSLC17A7、NEUROD6、及びEMX1からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を発現しており、より好ましくはGAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない。

- [0245] 一態様として、上記大脳皮質細胞塊は、更に
(e) 神経幹細胞マーカー陽性細胞が全細胞数の10%以下であり、
上記神経幹細胞マーカーとしては、Pax6、Sox1又はSox2が挙げられる。
- [0246] 一態様として、上記大脳皮質細胞塊は、更に
(f) 多能性マーカー陰性である。
- [0247] 多能性マーカー陰性とは、多能性幹細胞が実質的に検出されないこと、具体的に多能性マーカー陽性細胞が全細胞数の1%以下であることが挙げられる。上記多能性マーカーとしては、Oct4等が挙げられる。
- [0248] 一態様として、上記大脳皮質細胞塊は、更に、場合によって、(g) 皮質II乃至IV層マーカー(SATB2)陽性細胞が存在していてもよい。
- [0249] 本発明の一態様として、上記大脳皮質細胞塊を、全細胞塊の10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは、40%以上、更に好ましくは50%以上含む細胞集団が挙げられる。
- [0250] 本発明の一態様として、大脳皮質細胞塊は。直径(円相当径)が約100 μ m～1000 μ m、好ましくは約300 μ m～600 μ mの球状様の細胞塊であってよい。細胞塊1つ当たりの細胞数は、約 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個、好ましくは約 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 個であってよい。または、本発明の一態様として、大脳皮質細胞塊は、直径(円相当径)が約100 μ m～500

0 μm 、好ましくは約300 μm ～2000 μm の球状の細胞塊であってよい。細胞塊1つ当たりの細胞数は、約 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個、好ましくは約 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 個であってよい。

[0251] 本発明の一態様として、大脳皮質細胞塊の細胞集団において、直径（円相当径）の平均値は、約300 μm ～2000 μm である。

[0252] 本発明の一態様として、上記大脳皮質細胞塊、及びその細胞集団は、インビボで脳へ移植した場合に、移植部位へ生着しかつ移植片由来の細胞の増殖が抑えられていることを特徴とする。例えば、マウス脳に移植された場合、分化誘導5週目の大脳皮質細胞塊の移植3か月後の移植片の体積は、同時期の脳オルガノイドの移植片に比べ、2%～50%に抑制された。

[0253] 上記大脳皮質細胞塊、及びその細胞集団は、後述するように脳血管障害に罹患した患者、又は頭部外傷を負っている患者への細胞移植治療に有用である。

[0254] 9. 高純度大脳皮質細胞塊

本発明の一態様として、以下の性質を有する高純度大脳皮質細胞塊が挙げられる。以下の性質を有し、増殖性マーカー陽性細胞が抑制され、目的とする神経細胞の含有率が向上した高純度大脳皮質細胞塊は、上記5に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法2-1、上記6に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法2-2、又は、上記7に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法3-1乃至3-6により製造できる。

[0255] すなわち、本発明の一態様として、下記の特徴を有する、高純度大脳皮質細胞塊が挙げられる。

(A) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の5%以下、好ましくは3%以下、更に好ましくは1%以下であること、

(B) 神経細胞マーカー、皮質V/VⅠ層マーカー、及び前脳マーカーから選ばれる1つ以上のマーカー陽性細胞数が全細胞数の60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上であること、

(C) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないこと。

[0256] 上記増殖性マーカーとしては、K i 6 7 が挙げられる。上記神経細胞マーカーとしては、 β I I I - T u b u l i n (β T u b I I I) が挙げられる。上記皮質 V / V I 層マーカーとしては、C t i p 2 が挙げられる。上記前脳マーカーとしては、F o x g 1 が挙げられる。

[0257] 一態様として、下記の特徴を有する高純度大脳皮質細胞塊が挙げられる：

- (A) K i 6 7 陽性細胞数が全細胞数の 5 % 以下であること、
- (B) β I I I - T u b u l i n (β T u b I I I)、C t i p 2、及び F o x g 1 がいずれも陽性の細胞数が全細胞数の 6 0 % 以上、好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上であること、
- (C) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないこと。

[0258] 一態様として、神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないとは、上述の神経上皮や大脳皮質様構造が、倒立顕微鏡観察等において目視で同定できないことが挙げられる。

[0259] 本発明において、高純度大脳皮質細胞塊を得る方法、すなわち、大脳皮質細胞塊における大脳皮質細胞の含有率を上げ、増殖性細胞等の目的外細胞の含有率を下げるために有効な工程としては、上述の工程 (i v) もしくは工程 (I I I) に記載の工程 (N o t c h シグナル阻害剤が存在していてもよいが必須ではない) が挙げられ、さらに好ましくは、これに加えて上述の工程 (i i i) もしくは工程 (I I) に記載の大脳皮質細胞塊を分散させ、再凝集させる工程を含む工程が挙げられる。

[0260] 一態様として、上記高純度大脳皮質細胞塊は、更に

- (D) N E U R O D 6、N E U R O D 2、S S T R 2、T B R 1、Z B T B 1 8、N H L H 1、I G F B P L 1、N R N 1、R T N 1、T H S D 7 A、N R X N 1、B H L H E 2 2、C A L B 2、K H D R B S 3、C C S A P、P D E 1 A、N E U R O D 1、N P T X 1、N X P H 4、N T S、N E U R O G 2、O L F M 1、P R D M 8、C O R O 2 B、T P 5 3 I 1 1、Z F P M 2、P C D H 9、N E L L 2、S R R M 4、S C G 3、D C C、E P B 4 1 L 3、S L C 1 7 A 7、S T 1 8、N S G 2、E M X 1、C A P 2、S Y

T4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの遺伝子をさらに発現している。上記大脳皮質細胞塊は好ましくはSLC17A7、NEUROD6、及びEMX1からなる群から選ばれる1以上の遺伝子、又は全ての遺伝子を発現しており、より好ましくはGAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない。

[0261] 一態様として、上記高純度大脳皮質細胞塊は、更に
(E) 神経幹細胞マーカー陽性細胞が全細胞数の10%以下、好ましくは5%以下、更に好ましくは3%以下であり、
上記神経幹細胞マーカーとしては、Pax6、Sox1又はSox2が挙げられる。

[0262] 一態様として、上記高純度大脳皮質細胞塊は、更に
(F) 多能性マーカー陰性である。

[0263] 多能性マーカー陰性とは、多能性幹細胞が実質的に検出されないこと、具体的に多能性マーカー陽性細胞が全細胞数の1%以下であることが挙げられる。

[0264] 上記多能性マーカーとしては、Oct4等が挙げられる。

[0265] 一態様として、上記大脳皮質細胞塊は、更に、場合によって、(G) 皮質II乃至IV層マーカー(SATB2)陽性細胞が存在していてもよい。

[0266] 本発明の一態様として、上記大脳皮質細胞塊を、全細胞塊の10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは、40%以上、更に好ましくは50%以上含む細胞集団が挙げられる。

[0267] 本発明の一態様として、高純度大脳皮質細胞塊は、直径(円相当径)が約 $100\mu\text{m}$ ~ $10000\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $200\mu\text{m}$ ~ $3000\mu\text{m}$ の球状様の細胞塊であってよい。細胞塊1つ当たりの細胞数は、約 1×10^3 ~ 5×10^6 個、好ましくは約 5×10^3 ~ 3×10^6 個であってよい。

- [0268] 本発明の一態様として、高純度大脳皮質細胞塊の細胞集団において、直径（円相当径）の平均値は、約300 μm ～500 μm である。
- [0269] 本発明の一態様として、上記高純度大脳皮質細胞塊、及びそれから得られる細胞集団は、インビボで脳へ移植した場合に、移植部位へ生着しかつ移植片由来の細胞の増殖が抑えられることを特徴とする。例えば、マウスの脳に移植された場合、移植後5週における移植片の体積は、移植直後に比べて2%～50%であり得る。
- [0270] 上記高純度大脳皮質細胞塊、及びそれから得られる細胞集団は、後述するように脳血管障害に罹患した患者への細胞移植治療に有用である。
- [0271] 本発明の一態様として、上記の性質に加えて、更に高純度大脳皮質細胞塊のサイズ、構成細胞組成、又は形状が均一な高純度大脳皮質細胞塊の細胞集団が挙げられる。当該細胞集団は、上記5～7に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法2-1、2-2及び3-1～3-6により製造することができる。すなわち、当該製造方法に従って、大脳オルガノイドを分散し、再凝集により大きさ、構成細胞組成、又は形状が均一な高純度大脳皮質細胞塊の細胞集団を製造することができる。
- [0272] ここで、均一性は、例えば、高純度大脳皮質細胞塊の各種細胞のマーカー発現量、大きさ、1つの細胞塊に含まれる細胞数等の数値のバラツキが±20%以下、好ましくは±10%以下、更に好ましくは±5%以下であることを指標として同定できる。
- [0273] 上記高純度大脳皮質細胞塊、及びその細胞集団は、後述するように脳血管障害に罹患した患者、又は頭部外傷を負っている患者への細胞移植治療に有用である。
- [0274] 10. 医薬組成物
- 本発明の一態様として、上記2に記載の大脳オルガノイドの製造方法により得られる大脳オルガノイド、若しくは上記3に記載の大脳オルガノイド、これらの大脳オルガノイドから得られる大脳皮質細胞を含む細胞集団、上記4～7に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法で得られる大脳皮質細胞塊、上記

8若しくは9に記載の脳皮質細胞塊、又はこれらの細胞塊から得られる脳皮質細胞を含む細胞集団を有効成分とする、医薬組成物が挙げられる。すなわち、上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法により得られる脳オルガノイド、若しくは上記3に記載の脳オルガノイド、これらの脳オルガノイドから得られる脳皮質細胞を含む細胞集団、上記4～7に記載の脳皮質細胞塊の製造方法で得られる脳皮質細胞塊、上記8若しくは9に記載の脳皮質細胞塊、又はこれらの細胞塊から得られる脳皮質細胞を含む細胞集団は、移植用細胞塊（移植片ともいう）又は移植用細胞・移植用組織として、細胞移植治療のための有効成分として利用できる。

[0275] 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^{10} 個、 1×10^5 個～ 1×10^9 個、 1×10^6 個～ 1×10^7 個、 3×10^6 ～ 3×10^7 個、又は 1×10^6 個～ 1×10^9 個とすることができる。

[0276] 本明細書における医薬組成物、又は移植用細胞塊・移植用細胞・移植用組織（以下医薬組成物等）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、無血清培養液等）を用いることができる。医薬組成物等は、必要に応じて移植医療において、移植用細胞塊又は移植用細胞を含む医薬に、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。

[0277] 移植用細胞塊、移植用細胞又は移植用組織を、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、緩衝液で洗浄したり、低温条件下で保存し、使用時に緩衝液で洗浄して、移植医療に用いてもよい。

[0278] 具体的には、上記2の脳オルガノイドの製造方法、又は、上記4～7の脳皮質細胞塊の製造方法を実施した後に、すべての脳オルガノイド又は

細胞塊を回収し、必要に応じて、用いられていた培地、その他の培地又はリン酸緩衝液等で回収した細胞塊を洗浄したのち、医薬組成物において用いられる媒体に懸濁することができる。

[0279] 本発明の医薬組成物等は、細胞塊を分散・懸濁させた懸濁液であってもよいし、当該細胞塊を、細胞塊から細胞を分散させたりした懸濁液、シート剤であってもよい。

[0280] また、本発明の製造方法で得られた医薬組成物等は、上記2の脳オルガノイドの製造方法、又は、上記4～7の脳皮質細胞塊の製造方法を実施した後に、プレート上で培養することによってシート状に成型し二次元組織の細胞組織構造体としたり、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したりすることもできる。

[0281] 下記に記載するように、本発明の脳皮質細胞を含む細胞塊又は細胞集団を含む医薬組成物等は、脳血管障害モデル動物（例えばマウス）の脳皮質への投与において、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（例えば運動麻痺等の症状の改善）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等は、脳血管障害、又は頭部外傷の治療薬として有用である。また、本発明の医薬組成物等は、脳血管障害に罹患した患者の運動機能の改善薬として有用である。

[0282] しかも本明細書に記載する医薬組成物等に含まれる、脳皮質細胞を含む細胞塊又は細胞集団は、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。従って、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。

[0283] 11. 治療方法

本発明の一態様として、本発明の上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法で得られる脳オルガノイド、若しくは上記3に記載の脳オルガノイ

ド、これらの大脳オルガノイドから得られる大脳皮質細胞を含む細胞集団、上記４～７に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法で得られる大脳皮質細胞塊、上記８若しくは９に記載の大脳皮質細胞塊、これらの細胞塊から得られる大脳皮質細胞を含む細胞集団、又は上記１０に記載の医薬組成物の有効量を、移植を必要とする対象に移植（投与）することを含む、大脳皮質細胞の補充又は機能改善が必要な疾患、具体的には脳血管障害の治療方法が挙げられる。ここで、投与（移植）部位は大脳皮質又は大脳基底核であってよい。対象は、哺乳動物あってよく、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）であり、より好ましくはヒトである。また、脳血管障害は、頭部外傷であってもよい。また、当該治療方法は、脳血管障害の患者における運動機能（例えば運動麻痺等の症状の改善）の改善方法、脳血管障害の患者における大脳皮質細胞の補充方法等を含む概念である。

[0284] 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自家の多能性幹細胞（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塊（細胞集団）を製造し、当該細胞塊（細胞集団）又は当該細胞塊（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。

[0285] 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）の細胞塊（細胞集団）を製造し、当該細胞塊（細胞集団）又は当該細胞塊（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。

[0286] 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塊（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。

[0287] 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。

[0288] 本発明の一態様として、脳血管障害の治療における使用のための、本発明の脳皮質細胞を含む細胞塊又は細胞集団の使用が挙げられる。

[0289] 12. 毒性・薬効評価方法

本発明の一態様として、上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法で得られる脳オルガノイド、若しくは上記3に記載の脳オルガノイド、又はこれらの脳オルガノイドから得られる脳皮質細胞を含む細胞集団、上記4～7に記載の脳皮質細胞塊の製造方法で得られる脳皮質細胞塊、上記8若しくは9に記載の脳皮質細胞塊、又は、これらの細胞塊を分散させて得られる細胞集団に被験物質を接触させ、被検物質が該細胞塊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。

[0290] 上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法で得られる脳オルガノイド、若しくは上記3に記載の脳オルガノイド、又はこれらの脳オルガノイドから得られる脳皮質細胞を含む細胞集団、上記4～7に記載の脳皮質細胞塊の製造方法で得られる脳皮質細胞塊、上記8若しくは9に記載の脳皮質細胞塊、又は、これらの細胞塊を分散させて得られる細胞集団は、疾患のモデル細胞として、脳血管障害を伴う疾患の治療薬、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。

[0291] また、上記2に記載の脳オルガノイドの製造方法で得られる脳オルガノイド、若しくは上記3に記載の脳オルガノイド、又はこれらの脳オルガノイドから得られる脳皮質細胞を含む細胞集団、上記4～7に記載の脳皮質細胞塊の製造方法で得られる脳皮質細胞塊、上記8若しくは9に記載の脳皮質細胞塊、又は、これらの細胞塊を分散させて得られる細胞集団は、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、本発明の細胞塊又は細胞集団は、皮質Ⅴ／Ⅵ層組織の細胞を含むため、これらの細胞を含む神経組織（例えば、大脳皮質）の機能試験、具体的には、グルタミン酸作動性神経等の機能評価や、大脳皮質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。

[0292] 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、大脳皮質細胞の分化、軸索伸長能、発火能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、パッチクランプ法、マルチ電極アレイ（MEA）などを用いた電気生理学的解析）等が挙げられる。例えば、神経分化や軸索伸長能、発火能を促進又は阻害する化合物の探索や、脳血管障害に罹患した患者由来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。

[0293] また、これらの試験の為に細胞材料としては、例えば、本発明の細胞塊の細胞を分散し、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。

[0294] 本発明の上記２に記載の大脳オルガノイドの製造方法で得られる大脳オルガノイド、若しくは上記３に記載の大脳オルガノイド、又はこれらの大脳オルガノイドから得られる大脳皮質細胞を含む細胞集団、上記４～７に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法で得られる大脳皮質細胞塊、上記８若しくは９に記載の大脳皮質細胞塊、又は、これらの細胞塊を分散させて得られる細胞集団は、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。

[0295] １３．大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊（高純度大脳皮質細胞塊を含む）の品質評価方法

本発明の一態様として、以下の工程（a a）及び工程（b b）を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法が挙げられる。ここにおいて大脳皮質細胞塊には、本発明の高純度大脳皮質細胞塊が包含される。

(a a) 大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊における、GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる少なくとも1つ、又は全ての遺伝子の発現量を測定する工程、

(b b) 工程(a a)の測定結果に基づき、上記遺伝子の発現量が基準値以下である場合に、上記大脳オルガノイド又は上記大脳皮質細胞塊に含まれる目的外細胞の量が基準以下であると評価する工程。

[0296] また、本発明の一態様として、以下の工程(AA)及び工程(BB)を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法が挙げられる。

(AA) 大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊における、NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの遺伝子の発現量を測定する工程、

(BB) 工程(AA)の測定結果に基づき、上記遺伝子の発現量が基準値以上である場合に、上記大脳オルガノイド又は上記大脳皮質細胞塊に含まれる目的細胞の量が基準以上であると評価する工程。

[0297] 遺伝子の発現量(すなわち、mRNA又はタンパク質の発現量)及びその測定方法について上記のとおりである。上記(a a)に記載の遺伝子等の、目的外細胞のマーカーとなる各遺伝子の発現量の基準値としては、例えば、標品となる大脳オルガノイド又は大脳皮質凝集塊において測定された値が挙げられ、基準値と同等以下であることを指標として評価することができる。

また、上記（A A）に記載の遺伝子等の、目的細胞のマーカーとなる各遺伝子の基準値としては、例えば、標品となる大脳オルガノイド又は大脳皮質凝集塊において測定された値が挙げられ、基準値と同等以上であることを指標として評価することができる。

[0298] 本発明の一態様として、上記4～7に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法で得られる大脳皮質細胞塊について、大脳皮質細胞塊の細胞集団の一部をサンプリングし、上記大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法で評価し、当該評価結果に基づき、目的外細胞が基準以下である、及び／又は、目的細胞が基準値以上である大脳皮質細胞塊の集団を、移植に用いることが可能な集団として選択（同定）することができる。

[0299] 本発明の一態様として、上記4～7に記載の大脳皮質細胞塊の製造方法として、さらに上記大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法を含む、大脳皮質細胞塊の製造方法が挙げられる。

[0300] すなわち、以下の工程を含む大脳皮質細胞塊の製造方法が挙げられる：

- （1）4～7に記載の製造方法で、大脳皮質細胞塊を製造する工程、
- （2）上記品質評価方法により、目的細胞の量が基準以上であること、及び／又は、目的外細胞の量が基準以下であることを評価する工程、
- （3）（2）の評価結果に基づき、移植に用いることが可能な大脳皮質細胞塊を選択又は同定する工程。

実施例

[0301] （ヒト人工多能性幹細胞（h i P S C）の維持培養）

h i P S Cは、ラミニン511のE8フラグメントであるi M a t r i x - 5 1 1（株式会社ニッピ）を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるように6ウェルプレートに添加しコーディングしたプレート上にてS t e m F i t（登録商標）AK02N培地又はAK03N培地で（以下、「S t e m F i t」という場合がある；味の素ヘルシーサプライ社製）を用いて維持培養した。継代は、h i P S Cを $0.5 \times \text{T r y p l e S e l e c t}$ を用いて、細胞を 37°C で8分間処理し、単細胞に分離後、 $1 \sim 1.5 \times 10^4$ 細胞の細胞密度で6ウ

エルプレートに播種した。継代は7日ごとに行った。

[0302] (免疫染色解析)

オルガノイドを4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、PBS中の30% (w/v) スクロースで脱水反応を行い、O. C. T. コンパウンド (Sakura Finetek) を用いて包埋した。凍結切片は、クリオスタット (CM1850、ライカバイオシステムズ) を用いて16 μ mの厚さで作成した。0.3%又は2% (v/v) Triton-X100で透過処理し、必要に応じて抗原賦活化反応を実施した。ブロックACE (KAC) でブロッキングを実施した後、二重又は三重標識染色を行った。免疫染色に使用した一次抗体及び二次抗体は、推奨希釈濃度にて使用した。

[0303] 免疫染色に使用された一次抗体及び二次抗体を以下に示す。

L1CAM : 554273 (BD)

Ctip2 : ab18465 (Abcam)

Pax6 : EPR15858 (Abcam), 561482 (BD)

Foxg1 : M227 (Takara)

Ki67 : NCL (Leica)

Emx1 : M196 (Takara)

Gad65 : 559931 (BD)

Col1a1 : AF6220 (R&D)

TTR : A0002 (DAKO)

TYR : MA5-14177 (Thermo Fisher)

Alexa Fluor (登録商標) 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) : A21202 (Thermo Fisher)

Alexa Fluor (登録商標) 647 donkey anti-mouse IgG (H+L) : 1900251 (Thermo Fisher)

Alexa Fluor (登録商標) 594 donkey anti-rat IgG (H+L) : 1979379 (Thermo Fisher)

Alexa Fluor (登録商標) 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) : A21206 (Thermo Fisher)

rmo Fisher)

Alexa Fluor (登録商標) 647 donkey anti-rabbit IgG (H+L) : A32795 (Thermo Fisher)

Alexa Fluor (登録商標) 594 donkey anti-sheep IgG (H+L) : A11016 (Thermo Fisher)

[0304] (顕微鏡及び画像分析)

培養中のオルガノイドの画像(明視野像)は、デジタル倒立顕微鏡(Leica Biosystems、DMS1000)で撮影した。共焦点蛍光顕微鏡画像はLSM800共焦点顕微鏡(Zeiss)で撮影し、ZENBlue画像処理ソフトウェアで解析した。

[0305] (フローサイトメトリー)

大脳オルガノイド、大脳皮質細胞塊、及び高純度大脳皮質細胞塊は、神経細胞用分散液(富士フイルム和光純薬)を用いて単細胞に分散し、Fixation Buffer(BD Biosciences)を用いて4℃で30分間固定した後、Perm/Wash buffer(BD Biosciences)で室温15分間処理し、二重又は三重染色を行い、AriaIIIを用いて解析した。解析ソフトウェアは、FACS Diva software(BD)を用いた。使用した一次抗体、二次抗体は下記に示す。

PerCP-Cy5.5 Mouse IgG1 k isotype control: 550795 (BD Biosciences)

Alexa 647 Mouse Anti-human Oct3/4 antigen: 560329 (BD Biosciences)

Tra-2-49/6E-FITC antibody : FCMAB133F (Merck)

Alexa647 mouse anti β -tubulin Class III: 560394 (BD)

PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human Sox1: 561549 (BD)

Alexa647 mouse anti-Human Pax6: 561165(BD)

Alexa488 mouse anti-Ki67: 562249 (BD)

Alexa488 rat anti-Ctip2 antibody: ab123449 (Abcam)

[0306] (定量的逆転写PCR(RT-qPCR)による遺伝子発現解析)

全RNAはRNeasyMicroKit(QIAGEN)によって取得

し、SuperScript III First-Strand Synthesis System (QIAGEN) によってメーカーのプロトコルに従って逆転写反応を行った。定量的PCRは、TaqMan (商標) Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher)、若しくはSYBR Green Master Mix (Thermo Fisher) を使用して、製造元の指示に従って実行した。遺伝子の発現量は、 $\Delta\Delta C_t$ 法を使用してGAPDHで標準化した。

[0307] 使用されたプライマーセット及びTaqman Probeを以下に示す。

。

オリゴDNAプライマー

POU5F1:

Forward: AGACCATCTGCCGCTTTGAG (配列番号1)

Reverse: GCAAGGGCCGAGCTT (配列番号2)

NANOG:

Forward: GGCTCTGTTTTGCTATATCCCCTAA (配列番号3)

Reverse: CATTACGATGCAGCAAATACGAGA (配列番号4)

BMP4:

Forward: ATGATTCTGGTAACCGAATGC (配列番号5)

Reverse: CCCCGTCTCAGGTATCAAAC (配列番号6)

NODAL:

Forward: TGAGCCAACAAGAGGATCTG (配列番号7)

Reverse: TGGAAAATCTCAATGGCAAG (配列番号8)

TGFB1:

Forward: TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC (配列番号9)

Reverse: GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA (配列番号10)

SOX1:

Forward: GCGGAGCTCGTCGCATT (配列番号11)

Reverse: GCGGTAACAACTACAAAAAATTGTAA (配列番号12)

PAX6:

Forward: CTGGCTAGCGAAAAGCAACAG (配列番号 13)

Reverse: CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA (配列番号 14)

T (TBXT):

Forward: ATGGAGGAACCCGGAGACA (配列番号 15)

Reverse: TGAGGATTTGCAGGTGGACA (配列番号 16)

SOX17:

Forward: CGCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGACG (配列番号 17)

Reverse: TAGTTGGGGTGGTCCTGCATGTGCTG (配列番号 18)

hCGalpha:

Forward: ACCGCCCTGAACACATCCTGC (配列番号 19)

Reverse: GCGTGCATTCTGGGCAATCCTGC (配列番号 20)

SOX2:

Forward: GCCGAGTGGAACCTTTTGTGCG (配列番号 21)

Reverse: GGAGCGGTGTACTTATCCTTCT (配列番号 22)

Taqman probe

SLC17A7: Hs01574213

EMX1: Hs00417957

GAD2: Hs00609536

DLX2: Hs00269993

TTR: Hs00174914

COL1A1: Hs00164004

TYR: Hs00165976

HOXA2: Hs00534579

[0308] <予備試験 1> 支持細胞の存在下又は非存在下で維持培養した多能性幹細胞の神経細胞への分化誘導

ヒト胚性幹細胞 (hESC) 又はヒト iPS 細胞株 (hiPSC) を、支持細胞の存在下 (on feeder) 又は非存在下 (feeder-free)

ee) で神経細胞へ分化誘導し、生じた球状の細胞凝集体を解析し、大腦オルガノイドへの分化誘導の効率を比較した。

[0309] ヒトESであるKhes-1及びKhes-2は、京都大学再生医科学研究所より入手し、ヒトiPS細胞株である201B7細胞、1231A3細胞及びFf-101s04細胞は京都大学より入手した。

[0310] on feederの場合、支持細胞として、マウス胎児由来線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblast; MEF、オリエンタル酵母)を用いた。Khes-1などの各種幹細胞株を、90mmディッシュ1枚当たり 1.2×10^6 細胞の密度で播種し、MEFの存在下において、1% (v/v) NEAA、1% (v/v) L-Glutamine、1% (v/v) 2-Mercaptoethanol、20% (v/v) KSRを含むDMEM/F12培地に、5 ng/mlのbFGFを添加した培地で、37℃、5%CO₂で3～7日間培養した。feeder-freeの場合、各種幹細胞株を、マトリクスとしてiMatrix-511(ニッピ社製)でコーティングした6ウェルプレート上でStemFit(味の素ヘルシーサプライ社製)にて37℃、5%CO₂で7日間維持培養した。

[0311] 維持培養後の細胞は、非特許文献1に記載の方法に一部変更を加えた方法にて大腦オルガノイドへ分化誘導した。分化開始時には、各種多能性幹細胞を0.5×TrypLE Selectで処理し、単細胞に分散した。その後、50 μMのY-27632(富士フィルム和光純薬)を添加した分化培地(後述)に置換し、非細胞吸着性のV底96ウェルプレート(住友ベークライト)に9,000細胞/ウェルになるよう播種した。分化培地は、20% (v/v) KSR、5 μM SB431542(TGFβ阻害剤; TOCRIS)、及び3 μM IWR1e(Wnt阻害剤; Calbiochem)を添加したDMEM/F-12 GlutaMAX培地(Gibco)であった。分化3日目から15日目までは、分化培地を用いて、3日おきに半量培地交換を実施した。18日目に、凝集した細胞を90mmの浮遊培養用ディッシュ(住友ベークライト)に移し、分化誘導開始後35日目(Day

35)まで、1% (v/v) N2-supplement (Gibco)、1% (v/v) Chemically defined lipid concentrate (CDLC; Gibco)、0.25 μ g/ml Amphotericin B (Gibco)、100 U/ml ペニシリン、及び100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加したDMEM/F-12 GlutaMAX (Gibco) でさらに培養した。Day 35まで、3日おきに全量培地交換を実施した。

- [0312] 分化誘導後33～35日目 (Day 33～35) に得られた球状細胞凝集体中、大脳オルガノイドの数割合が約5%以上の場合に“大脳オルガノイドを形成 (good organoid)”、5%未満の場合に“大脳オルガノイド未形成 (bad organoid)”と判定した。good organoidの例は図1の(A) (201B7株) に示しており、bad organoidの例は図1の(B) (Ff-101s04株) に示した。(A) 中の矢印は、ロゼット構造を示す。各細胞株の結果を下記表1に纏めた。

[表1]

マトリクス	細胞株	MEF	iMatrix-511 (LM511E8)
培地		hESC	StemFit
hESC	KhES-1	3/3	1/3
	KhES-2	3/5	0/3
hiPSC	201B7	3/3	1/3
	1231A3	0/3	0/4
	Ff-101s04	3/3	0/4

- [0313] 表中の数字は、分母は分化誘導を行った実験回数を表し、分子は大脳オルガノイドを形成した回数を表す。例えば、“1/3”は、3回分化誘導を行い、大脳オルガノイドを形成したのが1回だったことを表す。いずれのES又はiPS細胞株でも、feeder-freeの場合は、on feederの場合よりも大脳オルガノイドの形成効率が低下したことを確認した。

- [0314] <予備試験2> 遺伝子発現の解析

予備試験1と同様にKhES-1、201B7、Ff-101s04及び

1231A3細胞株を、on feeder、feeder-free、及び、feeder conditioned mediumの3条件で培養し、分化誘導した。feeder conditioned mediumの条件は、MEFを、1% (v/v) NEAA、1% (v/v) L-Glutamine、1% (v/v) 2-Mercaptoethanol、20% (v/v) KSRを含むDMEM/F12培地で24時間培養して培地上清を回収し、フィルトレーションして、フィーダーフリーの細胞の培養に用いた。得られたこれらの細胞における、培養後分化誘導前及び分化誘導後の、FGF2及びTGF β 経路関連遺伝子 (FGF2、LEFTY、NODAL、TGF β 1、Activin) の発現をマイクロアレイで解析した。

[0315] マイクロアレイ解析は、on feeder、feeder-free、MEF conditioned mediumの3条件で培養した4種類のiPS細胞株 (KHES1、201B7、1231A3、Ff-101s04) から、TaKaRaのNucleoSpin RNA Plus XSを用いて、既定のプロトコルに従い、RNAを抽出し、Clariom S (Applied Biosystems) マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現量の解析は、Transcriptome viewer (クラボウ) を用いて実施した。

[0316] 解析結果は図2に示す。図2の(A)は培養後分化誘導前の結果であり、4種の細胞株について、on feederで培養した群 (横軸) 又はfeeder-freeで培養した群 (縦軸) について、遺伝子発現をマイクロアレイを用いて比較解析した結果を示す (nは、細胞株の種類を意味する)。on feeder培養群はfeeder-free培養群と比べて、FGF2とTGF β 経路関連遺伝子 (FGF2、LEFTY、NODAL、TGF β 1、Activin) の発現が2倍以上高値であった。

[0317] 図2の(B)は、これらの細胞株を予備試験1にしたがって、4種類の細胞株を用いて、on feeder、feeder-free、及び、feeder conditioned mediumの3条件のiPS細胞を

分化誘導し、大脳オルガノイドを形成した条件 (good organoid; 横軸) と形成しなかった条件 (bad organoid; 縦軸) に分け、2 群間の遺伝子発現を比較解析した結果を示す (n は、大脳オルガノイドの形成効率が高かった条件数を意味する)。大脳オルガノイドを形成した群では、形成しなかった群と比べて、FGF2 及び TGF β 経路関連遺伝子 (FGF2、LEFTY、NODAL、TGF β 1、Activin の発現が高値であった。on feeder で維持培養、及び大脳オルガノイドの形成効率が高かった未分化幹細胞では、内在性の bFGF、TGF β 関連遺伝子の発現が高いことが分かった。すなわち、大脳オルガノイドを形成しやすい ES/iPS 細胞及び培養条件では、多能性幹細胞内の bFGF 及び TGF β 関連遺伝子の発現レベルが高いことが明らかになった。

[0318] 知られているヒト多能性幹細胞用維持培地の組成を下記表 2 に示す。feeder-free 用の維持培地には通常、高濃度の bFGF と TGF β が添加されることがわかる。これらの培地で培養した ES/iPS 細胞では、on feeder で培養した場合と比べて、bFGF 及び TGF β 関連遺伝子の発現が低くなることが示唆された。よって、bFGF 及び TGF β 関連遺伝子の発現量の差が大脳オルガノイド形成効率の差の原因となっている可能性が考えられた。

[表2]

	on feeder	feeder-free		
	DMEM/F-12 GlutaMAX (Gibco)	Essential 8 (Thermo)	mTeSR1 (STEMCELL)	StemFit (Ajinomoto)
添加剤	20% KSR NEAA L-glutamine 2-ME	2ng/mL TGF β	23.5pM TGF β	非公開
bFGF	5 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	非公開
マトリクス	MEF	Matrigel	Geltrex Matrigel Vitronectin	iMatrix-511 (LM511-E8)

[0319] そこで、本発明者らは、ES/iPS 細胞をさまざまな化合物の存在下で培養し、その後神経細胞への分化誘導を行い、大脳オルガノイドの形成効率

を解析することで、形成効率に影響し得る化合物を探索した。その結果、意外にも、iPS細胞を「bFGFを含まず、かつ、TGF β を含まない又はTGF β シグナル伝達阻害剤を添加した培地」で培養して（工程（１））から神経細胞へ分化誘導する（工程（２））と、大脳オルガノイドの形成効率が顕著に上がることを見出した。

[0320] <実施例１> 工程（１）のオルガノイド形成効率への影響

１－１．工程（１）の維持培地について

図３又は図５に示すスキームにしたがって、工程（１）及び工程（２）を行った。ヒトiPS細胞（S2WCB1株、S2WCB3株）の維持培養は、iMatrix-511でコーティングした6ウェルプレート上（フィーダーフリー）、StemFit培地中で行った。

[0321] 培地を、

（１）StemFitのC液非添加培地（すなわち、bFGF不含培地）に5 μ M SB431542を添加したもの（図３）、又は、

（２）Essential 6培地（すなわち、bFGF不含、TGF β 不含培地）（図５）

に交換し、1日間接着培養した。

[0322] 工程（２a）Sakaguchiら（Stem Cell Reports, 13:458-473, 2019. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.05.029.）の方法を用いて、無血清培地中で神経細胞へ分化誘導した。具体的には、工程（１）で培養したヒトiPS細胞を酵素処理により単細胞に分散させた。単細胞に分散されたヒトiPS細胞を、非細胞接着性の96穴培養プレート（PrimeSurface 96V底プレート、住友ベークライト社製）に播種し（9,000細胞／ウェル／100 μ L）、0.1mM non-essential amino acids、1mM pyruvate、0.1mM 2-mercaptoethanol、20%（v／v）KnockOut（商標）serum replacement、100U／mLペニシリン、及び100 μ g／mLストレプトマイシンを添加したGlasgow MEM（GMEM；The r

mo Fisher) 培地 (以下、20GMKとも呼ぶ) に、さらに、5 μ M SB431542 (TGF β シグナル阻害剤; Tocris)、3 μ M IWR1e (Wntシグナル伝達阻害剤; Calbiochem) を添加した培地中で、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で18日間、浮遊培養した。培地交換は3日ごとに行った。Day 0でY-27632を50 μ Mとなるように添加し、以降の培地交換の際には添加しなかった。培養後に細胞塊が得られた。

[0323] 工程(2b) Day 18に、得られた細胞塊を90mmディッシュに移し、1 $\times$ N2 supplement (Thermo Fisher)、Chemically Defined Lipid Concentrate (Invitrogen)、0.25mg/mL fungizone (Gibco)、1%penicillin/streptomycin、0.1%Amphotericin Bを添加したDMEM/F12/Glu taMAX培地中で、37 $^{\circ}$ C、20%O₂、5%CO₂で、Day 35~Day 42までOrbital Shakerによる振とう培養を行った。培地交換は3~4日ごとに実施した。

[0324] Day 35の細胞培養物について、倒立顕微鏡にて観察し、代表的な画像を図4の(A)に示す。また、細胞培養物について、各マーカー(L1CAM、CTIP2、PAX6)に対して蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色は、上記の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。また、DAPIにて核染色を行った。代表的な蛍光染色画像(共焦点蛍光顕微鏡画像)は、図4の(B)に示す。

[0325] また、脳オルガノイドの形成効率(%)は、以下の式で計算した。

[数1]

$$\begin{aligned} & \text{脳オルガノイドの形成効率(\%)} \\ & = \left[\frac{\text{脳オルガノイドの数}}{\text{球状の細胞凝集体の数}} \right] \times 100 \end{aligned}$$

[0326] 工程(1)において、SB431542(以下SBと称する場合がある。)を添加した、bFGF不含有StemFit培地での維持培養(Stem

F i t - b F G F + S B) の場合、複数の明確なロゼット構造を有する細胞塊 ((B) の一番右) を確認できた。大脳皮質様構造の内側には P a x 6 陽性の神経前駆細胞層 (放射状グリア細胞) が局在し、外側には C t i p 2 と L 1 C A M を発現する神経細胞層が見られた。また、b F G F 不含有培地 (「S t e m F i t - b F G F」又は「S t e m F i t - b F G F + S B」) での維持培養 (工程 (1)) を行うと、大脳オルガノイドの形成効率 (「S t e m F i t - b F G F」の場合は < 10%、「S t e m F i t - b F G F + S B」の場合は約 40% ~ 50%) が、b F G F 含有培地での維持培養 (S t e m F i t、< 1%) に比べて顕著に上昇した。

工程 (1) において、培地として、S B 4 3 1 5 4 2 添加した E s s e n t i a l 6 (E 6) 培地を用いて維持培養して、上記と同様に分化誘導した。上記と同様に免疫染色し、代表的な細胞塊の共焦点蛍光顕微鏡画像を図 6 に示す。図 6 から分かるように、S B 4 3 1 5 4 2 を添加した E 6 培地を用いた場合において、S B 4 3 1 5 4 2 を添加した S t e m F i t 培地と同様に、大脳オルガノイドが得られた。また、大脳オルガノイドの形成効率 (%) = (22 / 39) × 100% = 56.9% であった。

[0327] 1 - 2. 工程 (1) の維持培地の添加剤について

図 3 のスキームの工程 (1) において、- D a y 1 ~ D a y 0 の期間に下記添加剤を添加した培地で培養し、D a y 0 で神経細胞に分化誘導し、D a y 3 5 で大脳オルガノイドの形成効率を評価した。免疫染色の結果を図 7 に示し、大脳オルガノイドの形成効率を表 3 に示す。なお、図 7 中の「無し」は添加剤なしを意味する。

[表3]

実験群 (Exp.)	条件		結果
	工程（１）		大脳オルガノイドの形成効率 （％）
	bFGF	添加剤	
Control	+	-	<1%
A	-		<10%
B	-	LDN-193189	<5%
C	+	SB-431542	<5%
D	-		約 40％～50%
E	+	IWR1e	<1%
F	-		<5%
G	-	LDN+SAG	<1%
H	-	BMP4, TGF β , Nodal, Activin	<1%
I	+		<1%

Control, Exp. C, E, I: StemFit の C 液添加培地 (=bFGF 含有培地) に添加剤を添加した培地

Exp. A-B, D, F-H: StemFit の C 液非添加培地 (=bFGF 不含培地) に添加剤を添加した培地

[0328] bFGF 含有培地を使用した実験群では、添加剤の種類に依らず、大脳オルガノイド形成効率が低かった。SB431542 を添加した群でも、5% 未満という低値だった (Exp. C)。これに対し、bFGF 不含培地を使用した群では、SB431542 を添加した群でのみ、ロゼット構造を多数有する大脳オルガノイドが高効率で得られた (Exp. D)。IWR1e を添加した群では、神経上皮と神経細胞は生じているものの大脳皮質様構造を形成していない、異常な細胞培養物 (Exp. F) が認められた。Exp. D で観察された大脳皮質様構造の内側には、Pax6 陽性の神経前駆細胞層 (放射状グリア細胞) が局在し、外側にはCtip2とL1CAMを発現する神経細胞層が見られた。

[0329] 実施例 1 の結果より、ヒト多能性幹細胞を「bFGF を含まず、かつ、TGF β を含まない又は TGF β シグナル伝達阻害剤を添加した培地」で培養

してから神経細胞に分化誘導すると、大脳オルガノイドの形成効率が顕著に上がることが示された。よって、多能性幹細胞を、「bFGFを実質的に含まず、かつ、TGF β シグナルを実質的に惹起しない培養液」中で培養してから神経細胞に分化誘導すると、大脳オルガノイドの形成効率が顕著に上がることが明らかになった。

[0330] <実施例2> 工程(1)の培養期間

実施例1で(1)StemFitのC液非添加培地に5 μ M SB431542を添加した「bFGF不含・SB431542添加培地」を使用する実験系において、「bFGF不含・SB431542添加培地」でiPS細胞を培養する期間を下表の通りに行った。図8はDay18、Day27、Day34の培養物の代表的な明視野像を示す。図9はDay35における大脳オルガノイドの形成効率を解析した結果を示す。

[表4]

条件	Day-6	Day-5	Day-4	Day-3	Day-2	Day-1	Day0	Day 3-18	Day 18-35
pre 1d	StemFit					StemFit w/o C SB 5 μ M	20GMK SB 5 μ M IWR1e 3 μ M Y	20GMK SB 5 μ M IWR1e 3 μ M	DMEM/F12 12 N2
pre 2d	StemFit				StemFit w/o C SB 5 μ M				
pre 3d	StemFit			StemFit w/o C SB 5 μ M					
pre 4d	StemFit		StemFit w/o C SB 5 μ M						
pre 5d	StemFit	StemFit w/o C SB 5 μ M							
pre 6d	StemFit w/o C SB 5 μ M								

StemFit w/o C: StemFitのC液非添加培地(=bFGF不含培地)

[0331] 図8及び図9に示す通り、「bFGF不含・SB431542添加培地」での処理は1日間若しくは2日間の場合は、大脳オルガノイドの形成効率が30%~40%程度であったが、3日間以上の場合は大脳オルガノイドの形成がほとんど見られなかった。「bFGF不含・SB431542添加培地

」で6日間処理した条件では、iPS細胞の増殖が著しく低下し、分化誘導に十分な細胞数を得ることができなかった。したがって、工程(1)の培養期間は、好ましくは3日間未満であり、さらに好ましくは12時間以上2日間以下、最も好ましくは1日間程度であることが明らかになった。

[0332] <実施例3> 工程(1)の遺伝子発現への影響

実施例1で(1)StemFitのC液非添加培地に5 μ M SB431542を添加した「bFGF不含・SB431542添加培地」を使用する実験系において、Day0におけるヒトiPS細胞(S2WCB1)の遺伝子発現解析を行った。Controlは、通常の維持培地であるStemFit培地(bFGF含有培地)で培養したiPS細胞であった。

[0333] 3回の分化誘導で得られたオルガノイドにおいて、各種マーカー遺伝子の発現をRT-qPCRで解析した。遺伝子解析の結果を図10に示す。各点は、各回のサンプルを表し、通常の維持培地であるStemFit培地(bFGF含有培地)で培養したiPS細胞から分化誘導したオルガノイド(Control)を黒丸で、StemFit(-bFGF、+TGF β 阻害剤)で培養した後に分化誘導したオルガノイドを白丸で示す。縦軸は、 $\Delta\Delta C_t$ 法により、GAPDHと、Controlのうち1ロットに対し補正した相対発現量を表す。図中の「TGF β i」は、TGF β 阻害剤(TGF β inhibitor)を意味する。

[0334] 図10から、工程(1)(1日間)を経たiPS細胞(白丸)では、Control(黒丸)と比べて、未分化マーカー(POU5F1、NANOG)の発現量は低く、神経外胚葉マーカー(SOX1、PAX6)、中胚葉マーカー(TBXT)、及び、内胚葉マーカー(SOX17)の発現量は高かったことが分かった。図中「T」はTBXT(別名BRACHYURY)を表す。

[0335] よって、工程(1)により、iPS細胞が、三胚葉に分化しやすい状態に変化する可能性が示唆された。すなわち、多能性幹細胞を、「bFGFを実質的に含まず、かつ、TGF β シグナルを実質的に惹起しない培養液」中で

適切な期間培養すると、三胚葉に分化しやすい状態に向かうことが示唆された。

[0336] <実施例4>工程(2)の工程(i i) - (i v)の効果1: V/VⅠ層の神経細胞の増加と増殖性細胞の減少

4-1. 分散及び再凝集あり

- Day 7 ~ Day 35までは、実施例1と同じ方法で培養した。工程(1)には、(1) StemFitのC液非添加培地(bFGF不含培地)に5 μ M SB431542を添加したものを使用した。

[0337] 図11の(A)に示すスキームのとおり、工程(i i)において、分化誘導開始後33日目(Day 33)に大脳オルガノイドを選別し、培地を工程(2b)の培地に10 μ M DAPTを添加したものに置換して、37℃、5%CO₂下で3日間浮遊培養した。これにより、大脳皮質細胞塊が得られた。

[0338] 工程(i i i)において、上記工程工程(i i)で得られた大脳皮質細胞塊を、0.5×TrypLE Select、0.25mM EDTA溶液中で37℃、20分間インキュベートし、さらに、工程(2b)の培地に25 U/mL DNase Iを添加した溶液中で37℃、10分間インキュベートした。その後、ピペティングを行って単細胞に分散させたのち、分散された細胞を、工程(2b)の培地に10 ng/mL GDNF、20 ng/mL BDNF、200 μ M アスコルビン酸、400 μ M dibutyryl-cAMP、50 μ M Y-27632を添加した培地に懸濁した。

[0339] 工程(i v)において、工程(i i i)で得られた細胞懸濁液を、非細胞接着96ウェルプレートに3万細胞/ウェルで分注し、37℃、5%CO₂下で4日間浮遊培養した。これにより、高純度大脳皮質細胞塊が得られた。大脳皮質細胞塊(Day 36)、高純度大脳皮質細胞塊(Day 40)の明視野像を図11の(B)に示す。

[0340] 大脳皮質細胞塊(Day 36)及び高純度大脳皮質細胞塊(Day 40)

については、さらに皮質V/VⅠ層前駆細胞（D e e p L a y e r）マーカーであるC t i p 2、終脳マーカーであるF o x g 1、神経幹細胞（R a d i a l G l i a）マーカーであるP a x 6/K i 6 7、及び、増殖性細胞マーカーであるK i 6 7に対して免疫染色を行った。

[0341] 免疫染色の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を図12に示す。図12の（A）の上段はD A P TなしのD a y 3 6の脳皮質細胞塊、下段はD A P TありのD a y 3 6の脳皮質細胞塊（いずれも工程（i）－（i i）を経て得られたもの）の免疫染色画像を示し、図12の（B）は、D a y 4 0の高純度脳皮質細胞塊の（工程（i）－（i v）を経て得られたもの）免疫染色画像を示す。

[0342] D A P T処理を行わずにD a y 3 6まで培養した群（（A）の上段）では、脳オルガノイドの特徴であるP a x 6・K i 6 7陽性の神経幹細胞（R a d i a l G l i a）層とその外側にC t i p 2・F o x g 1二重陽性の皮質第V/VⅠ層の神経細胞層を備えた脳皮質様の層構造が多数確認されこれに対し、D A P T処理を行った群（（A）の下段）では、P a x 6陽性細胞は認められるもののK i 6 7の発現は殆ど認められず、脳皮質様の層構造は認められなかった。一方、C t i p 2・F o x g 1陽性細胞は細胞塊全体に認められた。よって、脳皮質細胞塊では、脳皮質様の層構造が消失し、C t i p 2・F o x g 1二重陽性の皮質第V/VⅠ層の神経細胞が内部に広く分布していることが明らかになった。

[0343] さらに、脳皮質細胞塊を単細胞に分散して再凝集させて得られる高純度脳皮質細胞塊（図12の（B））では、C t i p 2・F o x g 1二重陽性の皮質第V/VⅠ層の神経細胞が内部全体に認められ、P a x 6陽性細胞は一段と少なかった。

[0344] 4－2．分散及び再凝集なし

次に、D A P T処理直後（工程（i i）を経た直後）の細胞培養物について、フローサイトメトリーを用いて構成細胞の割合を解析した。分化誘導スキームを図13に示す。D a y 4 0の脳オルガノイドに対してD A P T処

理を3日間行った後、フローサイトメトリーでマーカー遺伝子の発現を解析した。

[0345] フローサイトメトリーによる皮質V/VⅠ層前駆細胞 (Deep Layer) マーカーであるCtip2、神経細胞マーカーであるβⅢⅢ-Tubulin (βTubⅢⅢ)、神経幹細胞 (Radial Glia) マーカーであるPax6/Sox1/Ki67、増殖性細胞マーカーであるKi67の発現解析結果を図14に示す。

[0346] 図14中の各点は細胞を表す。左と中心のパネルは、生細胞全てを表示した結果、右のパネルはKi67陽性の細胞のみを表示した結果である。Ctip2・βⅢⅢ-Tubulin二重陽性細胞の割合 (左パネル) は、DAPT非処理群 (上段) では36.4%だったが、DAPT処理群 (下段) では86.1%にまで増加していた。これに対し、Pax6・Ki67二重陽性の神経幹細胞 (Radial Glia) の割合 (中パネル) は、DAPT非処理群 (上段) では46.7%だったが、DAPT処理群 (下段) では1.5%にまで減少していた。さらに、増殖性細胞であるPax6陽性/Sox1陽性/Ki67陽性細胞 (右パネル) の割合は、DAPT非処理群 (上段) は0.68%だったがDAPT処理群 (下段) では0.01%にまで減少した。

[0347] よって、大脳オルガノイドをNotchシグナル阻害剤であるDAPTの存在下で培養すると、大脳皮質様構造が消失し、増殖性細胞が大幅に減少する一方で、神経細胞 (特に、皮質第V/VⅠ層の神経細胞) が増加することが明らかになった。

[0348] さらに、Day0のiPS細胞 (未分化のiPS細胞)、DAPT処理未実施のオルガノイド (Ctrl、工程 (i i) なし)、DAPT処理を3日間 (Day40-43) 実施したオルガノイド (DAPT3d、工程 (i i) あり)、及び、DAPT処理を3日間実施後に細胞を分散させることなく、細胞塊のままDAPTを除いた培地で4日間培養を継続したオルガノイド (DAPT3d+Release4d、工程 (i i) 及び (i v) あり、工

程 (i i i) なし) について、それぞれをフローサイトメトリーで解析し、その結果を図 15 に示す。

[0349] 図 15 中、左から 1 ～ 4 列目のパネルは生細胞全てを表示した結果であり、一番右のパネルは K i 6 7 陽性の細胞のみを表示した結果である。未分化 i P S 細胞の指標である T r a 2 - 4 9 / 6 E と O c t 4 の共発現細胞は、オルガノイドではいずれの条件でも検出されなかった (左から 1 列目)。C t i p 2 と β i l l - T u b u l i n 共陽性の細胞は、「C t r l」 (上から 2 段目) では 36.4% であったのに対し、「D A P T 3 d」 (上から 3 段目) では 86.1% に、「D A P T 3 d + R e l e a s e 4 d」 (最下段) では 87.4% に上昇した (左から 2 列目)。また、K i 6 7、S o x 1、P a x 6 三重陽性細胞は、「C t r l」では 0.68% であったのに対し、「D A P T 3 d」では 0.01% に、「D A P T 3 d + R e l e a s e 4 d」では、0% に減少した (右から 1 列目)。「D A P T 3 d + R e l e a s e 4 d」では「D A P T 3 d」よりもさらに P a x 6 陽性・S o x 1 陽性・K i 6 7 三重陽性細胞の割合が減少しており、D A P T 処理後に細胞凝集体のまま培養するだけでも増殖性細胞を減少させられることが分かった。

[0350] 4-3. オルガノイド D A P T 法及びシングルセル D A P T 法 (2)

D A P T 処理期間が分化に与える影響を解析するため、図 16 (A) の示す方法スキーム (オルガノイド D A P T 法) に従って、分化誘導 7 週目の大脳オルガノイドを 10 μ M の D A P T で 3 ～ 7 日間処理し、遺伝子発現の変化を R T - q P C R で解析し、その結果を図 16 (B) に示す。縦軸は、G A P D H に対する相対発現量を表す。

[0351] 図 16 (B) から、D A P T 処理期間が長くなるほど成熟が進み、増殖性細胞が減少していたことが分かった。D A P T 処理期間に従い、皮質 V / V I 層前駆細胞のマーカーである、C t i p 2 の発現は上昇した。一方、神経前駆細胞 (放射状グリア細胞) のマーカーである、P a x 6、S o x 2、K i 6 7 の発現は、D A P T 処理期間に伴って低下した。以上より、D A P T

処理に伴って神経の分化成熟が進み、増殖性細胞の割合が低下することが明らかとなった。

[0352] <実施例5>工程 (i i) を行う時期の検討

図17の(A)は分化誘導のスキームを示す。Day 25、Day 32、Day 39、及びDay 72 (それぞれの分化誘導期間は、凡そ4週間、5週間、6週間、10週間) のオルガノイドを3日間DAPT存在下・非存在下で培養し、Day 28 (4 wk)、Day 42 (6 wk)、及びDay 75 (10 wk) のオルガノイドを各種マーカーに対して免疫染色で解析した。免疫染色の結果 (共焦点蛍光顕微鏡画像) を図17の(B)に示す。なお、Satb2は、皮質IⅡ-Ⅳ層前駆細胞 (Upper Layer) マーカーである。図17の(B)から、4週間から6週間のオルガノイドにおいて、DAPT非存在下では、Ctip2、Bf1共陽性細胞とKi67陽性細胞からなるロゼット構造が認められるが、DAPT処理後にはロゼット構造が見られなくなり、Ctip2、Bf1共陽性の細胞が増加し、Ki67陽性の細胞が減少することが分かった。10週のオルガノイドでは、DAPT処理後にロゼット構造は不明瞭になったが、Ctip2陽性細胞、Satb2陽性細胞の割合に顕著な変化は見られなかった。

[0353] さらに、Day 25、Day 32、Day 39、及びDay 72 (それぞれの分化誘導期間は、凡そ4週間、5週間、6週間、10週間) のオルガノイドを3日間DAPT存在下・非存在下で培養し、Day 28 (4 wk)、Day 35 (5 wk)、Day 42 (6 wk)、及びDay 75 (10 wk) の大脳オルガノイドに対してRT-qPCRでマーカー遺伝子の発現量を解析し、それぞれのマーカーの相対発現量の解析結果を図18に示す。図18から、4週間～6週間のオルガノイドではDAPT処理後にCtip2の発現上昇傾向、及び、Pax6、Ki67の発現低下が見られることが分かった。10週間のオルガノイドでは、Ki67の発現低下は見られず、Satb2の発現にも影響が見られなかった。

[0354] 上記の結果から、工程 (i i) の開始時期は、分化誘導開始から約20～

44日後(Day 20~Day 44)が好ましく、さらに好ましくはDay 25~Day 39であることが明らかになった。また、工程(ii)の期間は、約2日間~4日間が好ましく、さらに約3日間前後(例えば、60~84時間)が好ましいことも明らかになった。

[0355] <実施例6> 工程(2)の工程(ii)-(iv)の効果2:移植片の増大抑制効果

図17の(A)の分化誘導スキームで得られた大脳皮質細胞塊をScidマウス(日本クレア)の脳へ定位脳移植法によって 1.5×10^5 細胞を移植し、移植3か月後に、4%パラホルムアルデヒドによって脳を還流固定し、35 μ m厚の凍結切片を作成した。作成した脳切片を用いて、Ku80の免疫染色でヒト細胞の生着を評価した。免疫染色した移植片の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を図19に示す。

[0356] さらに、染色した移植片の体積の解析結果を図20に示す。移植片の体積は、免疫染色した脳切片を350 μ mに1枚の間隔で観察し、各切片につき、Ku80の染色像から移植片の面積を算出し、面積と切片の間隔を積算することによって算出した。One-way ANOVA (Tukey Multiple Test)により検定を実施した(*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.01$)。

[0357] 図19及び図20から、分化誘導開始から約5週間後又は6週間後に工程(ii)を行って得られた大脳皮質細胞塊は、工程(ii)を行わずに得られた大脳皮質細胞塊と比べて、脳内に移植後の生着率が高く、さらに、体積の増加も非常に少ないことが示された。

[0358] よって、多能性幹細胞から分化誘導した大脳オルガノイドを、DAPTの存在下で培養した後、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸、及びcAMP活性化剤を含む培養液中で培養することで形成される大脳皮質細胞塊は、脳内に移植後の生着率が高く、さらに増大しにくい(細胞増殖しにくい)ことが明らかになった。

[0359] 実施例1~6に基づき、本発明の好ましい実施形態の方法を図21に示す

。

好ましい、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大脳オルガノイドを製造する方法は、下記の工程を含む。

工程（１）：多能性幹細胞を、bFGFが実質的に含まれず、かつTGFβシグナルを実質的に惹起しない培養液中で培養する工程、

工程（２）：工程（１）で得られた細胞を、大脳オルガノイドへと分化誘導する工程。

[0360] 工程（２）は以下の工程を含む。

工程（２a）：工程（１）で得られた細胞を、TGFβシグナル阻害剤、及びWntシグナル伝達阻害剤を含む培養液中で浮遊培養して、細胞塊を得る工程、

工程（２b）：工程（２a）で得られた細胞塊を、TGFβシグナル阻害剤又はWntシグナル伝達阻害剤を実質的に含まない培養液中で浮遊培養して、大脳オルガノイドを得る工程。

[0361] 好ましい、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大脳皮質細胞塊、さらに高純度大脳皮質細胞塊を製造する方法は、下記の工程を含む。

工程（i）：工程（２）を含む方法、又は、工程（１）及び工程（２）を含む方法により、大脳オルガノイドを得る工程、

工程（ii）：工程（i）で得られた大脳オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤（DAPT等）を含む培養液中で培養して、大脳皮質細胞塊を得る工程、

工程（iii）：工程（ii）を経た細胞培養物を、単細胞又は２～５個の細胞の集合体（Cell clump）にまで分散させる工程、

工程（iv）：工程（iii）で得られた細胞を、１以上の神経栄養因子、アスコルビン酸、及びcAMP活性化剤を含む培養液中で培養して、高純度大脳皮質細胞塊を得る工程。

[0362] なお、工程（iii）をスキップして、工程（ii）を経た細胞培養物を工程（iv）の培養液中で培養しても、高純度大脳皮質細胞塊を得ることが

できる。

[0363] <実施例 7> 神経分化準備ありで誘導したオルガノイドに対する D A P T の効果の検討

— D a y 7 ~ D a y 3 5 までは、実施例 1 の図 3 のスキームと同じ方法で培養した。「神経分化準備あり」（工程（1）あり）では、工程（1）に S t e m F i t の C 液非添加培地（= b F G F 不含培地）に 5 μ M S B 4 3 1 5 4 2 を添加したものを使用し、「神経分化準備なし」（工程（1）なし）では、S t e m F i t 培地を用いた。その後、実施例 4 の工程（i i）に記載の方法で大脳皮質細胞塊を誘導し、免疫染色で評価を行った。また、実施例 4 の工程（i i i）、工程（i v）に記載の方法で単細胞に分散後、再凝集して、高密度大脳皮質細胞塊を誘導し、フローサイトメトリーで解析を行った。

[0364] 免疫染色の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像を図 2 2 に示す。神経分化準備を行わなかった場合にも、低効率ではあったが、P a x 6 陽性の神経上皮とその外側に C t i p 2 陽性の皮質第 V / V I 層の神経細胞層を備えた大脳皮質様構造が形成された。このオルガノイドを D A P T 処理したところ、神経分化準備時と同様、C t i p 2 陽性の細胞が細胞塊全体に見られるようになった。

[0365] フローサイトメトリーの解析結果を図 2 3 に示す。図 2 3 から、神経分化準備なしの場合でも、C t i p 2 $\cdot$ β T u b 1 1 1 二重陽性細胞の割合（左パネル）は、D A P T 処理により 2 2 . 5 % から 8 5 . 9 % にまで増加した。また、P a x 6 $\cdot$ K i 6 7 二重陽性の神経幹細胞（R a d i a l G l i a）の割合（中パネル）は、D A P T 処理により 5 9 . 5 % から 1 . 9 % にまで減少した。さらに、増殖性細胞である P a x 6 陽性 / S o x 1 陽性 / K i 6 7 陽性細胞の割合（右パネル）は、D A P T 処理により 1 4 . 5 % から 0 % にまで減少した。

[0366] よって、神経分化準備の有無にかかわらず、大脳皮質細胞塊では、大脳皮質様構造だけでなく神経上皮が消失し、C t i p 2 $\cdot$ β T u b 1 1 1 二重

性の皮質第Ⅴ／Ⅵ層の神経細胞が内部に広く分布すること、増殖性細胞は減少することが明らかとなった。すなわち、実施例7に基づいて、支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から大脳オルガノイドを製造する方法の上記工程(1)を省略しても、大脳皮質細胞塊及び高密度大脳皮質細胞塊を作製できることがわかった。

[0367] <実施例8> DAPT処理の時期及び方法の最適化検討

8-1. オルガノイドDAPT法及びシングルセルDAPT法(1)

—Day7～Day35までは、実施例1と同じ方法で培養した。工程(1)には、StemFitのC液非添加培地(=bFGF不含培地)に5μMSB431542を添加したものを使用した。

[0368] 図24の(A)「オルガノイドDAPT法(工程(ii)でDAPT処理を行う場合)」では、分化誘導開始後35日目に大脳オルガノイドを選別し、培地を工程(2b)の培地に10μM DAPTを添加したものに置換して、37℃、5%CO₂下で3日間浮遊培養した。これにより得られた大脳皮質細胞塊を、実施例4における工程(iii)、工程(iv)に記載の方法で単細胞に分散後、再凝集して、高純度大脳皮質細胞塊が得られた。

[0369] 図24の(B)「シングルセルDAPT法(工程(iv)でDAPT処理を行う場合)」では、分化誘導開始後38日目に大脳オルガノイドを選別し、実施例4の工程(iii)に記載の方法で単細胞に分散させたのち、当該細胞を、工程(2b)の培地に10ng/mL GDNF、20ng/mL BDNF、200μM Ascorbic Acid、400μM dibutyl-cAMP、30μM Y-27632を添加した培地に、DAPTを0μM、0.1μM、1μM、又は10μMの濃度で添加して懸濁した。次に、DAPT存在下において、実施例4の工程(iv)に記載の方法で再凝集して、1日間、2日間、又は3日間培養した。その後、培地を工程(2b)の培地に10ng/mL GDNF、20ng/mL BDNF、200μMアスコルビン酸、400μM dibutyl-cAMPを添加した培地に切り替えて、再凝集開始から10日目まで培養を継続し

た。再凝集開始から3日目、4日目、又は10日目の細胞をRT-qPCRにより、10日目の細胞をフローサイトメトリーにより、それぞれ解析し、結果を図25～27に示す。

[0370] シングルセルDAPT法（工程（iv）でDAPT処理を行う方法）において、DAPT濃度を10 μ M、DAPT処理期間を1日間、2日間、3日間としたときの、各マーカーの経時的遺伝子発現量をRT-qPCRで解析した際の結果を図25に示す。図25中、「day」は工程（iv）の日数を、「Conc.」はDAPTの濃度を、「Treatment」はDAPT処理の日数を表す。

[0371] 図25から、Notchシグナル下流で発現が活性化するHes1は、DAPT処理直後には、DAPT処理期間にかかわらず発現低下したが、DAPT処理1日間、2日間の場合には、工程（iv）の培養に伴って発現が再度上昇したことが分かった。一方、DAPT処理3日間の場合には、Hes1の発現は10日間にわたって抑制されていた。このとき、増殖性のマーカーであるKi67の発現、神経幹細胞のマーカーであるPax6の発現も低く抑えられていた。一方、神経成熟のマーカーであるMap2の発現や、皮質第V/VⅠ層の神経細胞層のマーカーであるCtip2の発現は、工程（iv）の培養に伴って上昇した。したがって、少なくとも3日間DAPT処理を行うことにより、増殖性の神経幹細胞の増殖を抑えることができ、皮質第V/VⅠ層の神経の割合が上昇することが分かった。

[0372] シングルセルDAPT法（工程（iv）でDAPT処理を行う方法）において、DAPT濃度を0 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、DAPT処理期間を3日間としたときの、各マーカーの経時的遺伝子発現量をRT-qPCRで解析した際の結果を図26に示す。比較対象として、工程（ii）で、DAPT濃度10 μ M、DAPT処理期間3日間で処理を行った場合も示す（オルガノイドDAPT法）。図26中、「day」は工程（iv）の日数を、「Conc.」はDAPTの濃度を表す。

[0373] 図26から、Notchシグナル下流で発現が活性化するHes1は、D

A P T 処理濃度が 0.1 ~ 1 μ M では十分に抑えられなかったのに対し、10 μ M では 10 日間にわたり抑制されたことが分かった。このとき、増殖性マーカーの K i 6 7、神経幹細胞マーカー P a x 6 の発現も、10 日間にわたり抑制された。一方、神経成熟のマーカーである M a p 2 の発現、皮質第 V / V I 層の神経細胞層のマーカーである C t i p 2 の発現は、工程 (i v) の培養に伴って上昇した。したがって、工程 (i v) で D A P T 処理を行った場合には、10 μ M で 3 日間 D A P T 処理を行うことにより、増殖性の神経幹細胞の増殖を抑えることができ、皮質第 V / V I 層の神経の割合が上昇すること、工程 (i i) で D A P T 処理を行った場合に比べ、同等か、それ以上の効果を得られることが分かった。

[0374] 工程 (i v) で D A P T 処理を行う場合において、D A P T 濃度を 0 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、D A P T 処理期間を 3 日間とし、工程 (i v) で 10 日間培養を行った際の、各マーカーの発現量をフローサイトメトリーで解析した際の結果を図 27 示す。比較対象として、工程 (i i) で、D A P T 濃度 10 μ M、D A P T 処理期間 3 日間で処理を行った場合も示す (オルガノイド D A P T 法)。

[0375] 図 27 から、工程 (i v) で D A P T 処理を行った場合の、C t i p 2 · β T u b l i l (T u j 1) 二重陽性細胞の割合 (上段パネル) は、D A P T 処理濃度の上昇に伴って、32.2% から 89.6% にまで増加したことが分かった。また、増殖性細胞である P a x 6 陽性 / S o x 1 陽性 / K i 6 7 陽性細胞の割合 (下段パネル) は、D A P T 処理により、35.0% から 0.8% にまで減少した。よって、工程 (i v) で D A P T 処理を行った場合にも、工程 (i i) で行った場合と同様、D A P T 処理濃度の上昇に伴って、C t i p 2 · β T u b l i l 二重陽性の皮質第 V / V I 層の神経細胞の割合が上昇し、増殖性細胞は減少することが明らかとなった。

[0376] 8-2. シングルセル D A P T 法 (2)

図 28 に示す方法スキームに従って、分化誘導 5 週目の大脳オルガノイドを、工程 (i i) で単細胞に分散後、工程 (i i i) で 10 μ M の D A P T

で3日間処理を行った。その後、DAPTを含まない培地条件下において、4日間（DAPT除去後1日）及び14日間（DAPT除去後11日）培養を継続し、得られた細胞塊に対してフローサイトメトリーでマーカー発現を解析した。解析の結果を図29に示す。

[0377] DAPT処理後の培養期間を延長すると、Ctip2/Tuj1共陽性細胞の割合は上昇した（4段目の左パネル）。一方、増殖性神経前駆細胞のマーカーである、Pax6、Ki67二重陽性細胞の割合（4段目の中パネル）、及び、Pax6、Ki67、Sox1三重陽性細胞の割合（4段目の右パネル）は、DAPT処理後の培養期間に伴って低下した。図16（B）及び図29より、DAPT処理後の培養期間に伴って、神経の分化成熟が進み、増殖性細胞の割合が低下することが明らかとなった。

[0378] <実施例9>オルガノイドの形態及び発現プロファイルの解析

9-1. オルガノイドの形態解析

Day7～Day35まで実施例1と同じ方法で培養した。12回の誘導分化ロット（Lot1～Lot12）で得られた大脳オルガノイドの明視野像を倒立顕微鏡（Leica DMS1000）を用いて撮影し、代表的な明視野像を図30に示す（スケールバー：5mm）。図30から、ロットによって、誘導されるオルガノイドの形態に違いがあったことが分かった。

[0379] 上記12回の分化誘導で得られた大脳オルガノイドを観察した結果、7つの形態学的なグループ、すなわち、ロゼット構造を細胞塊全体に含む大脳オルガノイド（ロゼット構造；Rosette）、透明度が低く明瞭な構造が認められないオルガノイド（じゃがいも状組織；Potato-like）、風船状の構造が付随したオルガノイド（風船状組織；Balloon）、繊維状の構造が付随したオルガノイド（綿状組織；Cotton-like）、透明度が高く、内部に嚢胞状の構造が見られるオルガノイド（透明性組織；Transparent）、黒色又は茶色の色素沈着が見られるオルガノイド（色素；Pigment）、透明度が高く、明瞭な構造が見られないオルガノイド（ゼリー状組織；Jelly-like）に分類できると考

えられた（図31）。上記形態分類に従って、統計した結果を図32、表5）に示す。

[表5]

Rosettes	○		○		○				○			○		
Potato-like		○	○			○							○	
Balloon							○		○	○				
Cotton-like											○			
Pigment												○	○	○
Transparent				○	○	○	○	○						○
Jelly-like								○		○				
Lot1	59	3	3	0	31	0	0	0	0	0	0	5	0	0
Lot2	53	0	0	3	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lot3	48	3	6	0	27	0	0	0	3	0	0	12	0	0
Lot4	40	0	0	0	57	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Lot5	36	7	14	0	25	4	0	0	0	0	0	14	0	0
Lot6	28	42	14	0	11	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Lot7	24	18	9	0	45	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Lot8	14	64	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lot9	8	3	0	3	50	25	6	0	0	0	0	6	0	0
Lot10	7	75	8	0	6	0	0	1	0	0	0	0	3	0
Lot11	3	0	0	0	0	21	50	16	0	5	3	0	0	3
Lot12	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0380] 表5には、各形態のオルガノイドの割合を表で示す。1つのオルガノイドの中に含まれる形態の種類によってオルガノイドを分類した。上から1～7行目において、各列は個々のオルガノイドに含まれる形態を示す。下から1～12行目は、12回の分化誘導ロットで誘導されたオルガノイドを形態によって分類した結果を示す。表5中の数値は、ロット内の全オルガノイドの中で各形態のオルガノイドが占める割合を百分率で示したものであり、色の濃淡は数値の大きさに対応する。図32には、各形態のオルガノイドの割合を棒グラフで示す。

[0381] 発生するオルガノイドグループの割合は、分化ロットによって大きく異な

っており、「ロゼット構造」、「風船状組織又は綿状組織」、「透明性組織」が共に含まれるロット、大半が「風船状組織又は綿状組織」のロット、大半が「じゃがいも状組織」のロットが見られた（図32、表5）。このように、分化誘導回によって発生するオルガノイドタイプの割合は、ロットによって変化することが分かった。尚、オルガノイドによっては上述の7つの形態分類の複数に属する特徴を併せ持っていた。また、これらのオルガノイドは、拡大して観察することにより、目視で選別可能である。

[0382] 9-2. 各形態グループのオルガノイドのシングルセル遺伝子発現解析

各形態グループのオルガノイドに含まれる細胞種を同定するため、シングルセル遺伝子発現解析を行った。解析には、3回の分化誘導回で得られた9つのオルガノイド（図33）を用いた。各オルガノイドに含まれる組織の形態を各写真の上部に示す。シングルセル遺伝子発現解析は、以下のとおりに行った。

[0383] まず、オルガノイドからシングルセルの懸濁液を調製するため、神経細胞用分散液（富士フィルム和光純薬株式会社）を用いて、推奨条件に従い、オルガノイドを単細胞に分離した。分散した細胞を、10%（v/v）KSR及び10 μ M Y-27632（富士フィルム和光純薬）を添加したHBSSで1,000細胞/ μ Lの密度で再懸濁した。チャネルあたり約4,670個の細胞をChromiumNextGEM Chip G（2000177 10X Genomics）にロードし、Chromiumコントローラーで処理してGel Beads-in-Emulsion（GEM）を取得した。ライブラリは、Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1（1000121; 10x Genomics）を使用して、製造元のプロトコル（CG000204 Rev C）に従って作製した。ライブラリの配列は、Novaseq 6000（Illumina）によって分析した。

[0384] シングルセルRNA-seqの配列のマッピングには、Cell Ranger pipelineを用いた。参照ゲノム配列としては、GRCh3

8ヒトゲノム配列を用いた。次世代シーケンサーでの解析で得られたUMIカウント値は、Seurat R packageを用いて解析した。まず、それぞれのオルガノイドのデータをLog-Normalize法で標準化した後、全てのオルガノイドのデータを統合した。次に細胞間の変化の大きい上位2000遺伝子を抽出し、これらの遺伝子のデータを用いてPrincipal component analysis (PCA)を行い、上位50個の主成分（第1主成分～第50主成分）を取得した。さらに3回の分化誘導ロットのオルガノイドを同時に解析するため、Harmony法を用いてバッチ効果補正を実施した後、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) 法による次元削減を行い2次元のデータに変換した。その後、Shared nearest neighbor graphに基づくクラスタリングを行い、全ての細胞をクラスターに分類した。さらに各クラスターに特徴的に発現する遺伝子群をもとに、各クラスターを構成する細胞種を同定した。

[0385] 個々の細胞の遺伝子発現の類似性や相違性をUMAP法により得られた2次元データを視覚化することにより評価した。具体的には、上記PCAにより、数万個の細胞はそれぞれその遺伝子発現データに基づく50次元のデータ（主成分）によって表現されているが、UMAP法により類似性や相違性を維持しながら2次元のデータに圧縮され、平面上のプロットに変換される。UMAP法により得られたプロットでは、それぞれの点は、個々の細胞を示し、遺伝子発現パターンが類似した細胞ほど近い位置にプロットされる。類似性が特に大きな細胞が多数存在するとそれらの点がごく近くに集まった塊状の構造が現れる。このような構造を構成する細胞群は、酷似した遺伝子発現を示す細胞、すなわち同種又はごく近縁の細胞種であると解釈される (Nature Biotechnology volume 37, pages 38-44 (2019))

[0386] 図34及び35には、解析した9つのオルガノイドに含まれる細胞を、シングルセルRNA-seq解析のデータをUMAP法によって表示した結果

を示す。図34から、9つのオルガノイドに含まれる細胞は10個以上の異なるクラスターに分かれ、10種類以上の特徴的な遺伝子発現パターンを示す細胞集団が含まれていると考えられた。また、オルガノイドによってプロットのパターンが異なっており（図35）、オルガノイドによって含まれる細胞種が異なると考えられた。

[0387] 各クラスターに含まれる細胞種を同定するため、Nearest Neighbourhood法により、統計学的に14個のクラスターに分類した。各クラスターに特徴的に発現する遺伝子を発現細胞の割合と平均発現量をもとに抽出し、表6に示す。表6の各細胞における遺伝子は、上から順に上位50個を記載している。また、文献情報をもとに、細胞種のアノテーションを行い、各クラスターの遺伝子発現に基づき、各クラスターの細胞種を同定した（図36）。各点は個々の細胞を表し、点の濃淡はクラスターを表す。それぞれの細胞種は、Cortical Neuron (Radial Glia (RG))：大脳皮質神経前駆細胞（放射状グリア (Radial Glia(RG)))、Cortical neuron (CR)：カハールレチウス細胞 (Cajal Retzius cell(CR))、Cortical Neuron (Glutamatergic neuron (GN))：大脳皮質神経細胞（グルタミン酸作動性神経 (Glutamatergic Neuron(GN)))、GABAergic neuron：GABA作動性神経細胞、Choroid plexus (ChP)：脈絡叢、CNS fibroblast：中枢神経系線維芽細胞、Neural Crest：神経堤細胞、Vascular Endothelial cells：血管内皮細胞、Caudal Neuron：尾側神経細胞であると考えられる。

[0388]

[表6]

Cortical neuron (Radial Glia (RG))	Cortical neuron (Glutamatergic neuron (GN))	Cortical neuron (Cajal retzius cell (CR))	GABAergic neuron-1	GABAergic neuron-2	GABAergic neuron-3	Choroid plexus (ChP)	CNS fibroblast -1	CNS fibroblast -2	Caudal neuron	Neural crest-1	Neural crest-2	Neural crest-3	Endothelial cells
SFRP1	NEUROD6	RELN	HIST1H4C	DLX2	SIX3	TTR	COL3A1	GABRP	CRABP1	HES5	LGALS1	S100A6	H19
ZFP36L1	NEUROD2	LHX1	TOP2A	PANTR1	DLX6-AS1	TPBG	COL1A1	S100A11	NEFL	ZIC1	TWIST1	S100B	KDR
ID4	SSTR2	NHLH2	HIST1H3B	DLX1	SST	TRPM3	DCN	KRT19	NEFM	MSX1	PRRX1A	OLFML2A	TFPI
HMG2	TBR1	PCP4	HIST1H3D	CENPF	PBX3	FAM89A	SPARC	KRT18	ROBO3	NES	SHOX2A	AL139393.3	CARTPT
HES1	ZBTB18	RPO3	HIST1H2AG	TOP2A	TAC1	RPO3	COL1A2	KRT8	CNTN2	ATP1A2	GPC3	PLP1	CAV1
TTYH1	NHLH1	NR2F2	NUSAP1	DLX5	RUNX1T1	RPO2	LUM	FN1	HOXA5	MIR99AHG	DNM3OS	S100A10	CD93
SOX3	IGFBPL1	PGF	HIST1H1B	ASCL1	STMN2	WLS	MGP	IGFBP3	RGMB	CCND1	PDGFR	FN1	PECAM1
SYNE2	NRN1	MAB21L1	HIST2H2AC	ZEB2	NSG2	IGFBP7	DLK1	S100A10	HOXB5	NTRK2	ID1	BCHE	GJA4
LHX2	RTN1	CDKN1A	GAD2	GAD2	RTN1	SOX2-OT	FRZB	ANXA1	LINC02381	ID1	CRABP2	S100A4	GNG11
HMG2	THSD7A	LHX5-AS1	CENPF	SLC1A3	DLX5	ID1	POSTN	CRABP2	LHX1	ID3	ID3	SOX10	CDH5
SOX2	NRXN1	SEMA5A	MKI67A	FAM181B	GRIA2	ID3	H19	HPGD	POU4F1	RFX4	KCTD12	ADAM12	CLDN5
C1orf161	BHLHE22	EBF3	HIST1H1C	NUSAP1	INA	NEAT1	S100A10	NPY	TFAP2A	CRNDE	S100A11	S100A11	ICAM2
B3GAT2	CALB2	LHX1-DT	SMC4	HIST1H1B	MAPT	HTR2C	APOE	ANXA2	HOXB3	OLIG3	NR2F2	IGFBP7	IGFBP4
GLI3	KHDRBS3	TBR1	HMG2	HIST1H3B	TTC9B	ZFP36L2	SLC9A3R1	CLDN6	LINC00682	AC082957.1	PCDH18	HIST1H1A	PRND
CENPF	CCSAP	PIDD1	HMG2	DLX6-AS1	AC004158.1	SULF1	IFITM3	MT1E	ZIC1	GRID2	ID2	LGALS1	FLT1

TOP2A	PDE1A	EMX2	TUBA1B	MKI67	DLX6	PLS3	IGFBP3	EPCAM	PHOX2B	LINC0238 ₁	CDC42E _{P5}	MMP2	ESAM
UBE2C	NEUROD ₁	MYT1L	DLX2	BIRC5	GAD2	OTX2	KRT19	IGFBP7	HOXB4	NCKAP5	TPM2	ERBB3	COL4A ₁
CKB	NPTX1	OLFM1	HIST1H4 _D	NPY	NRGN	TRIM57	FN1	EMP2	HOTAIRM ₁	AL139246 ₅	LRRC17	TFAP2A	IFITM3
LINC015 ₅₁	NXP4	THSD7 _A	DLX5	GSX2	SCG5	PCP4	KRT8	ANXA3	CACNA2 _{D1}	TOP2A	LIMA1	COL4A2	RNASE ₁
HIST1H3 _D	NTS	RTN1	ASCL1	UBE2C	MYT1L	CCK	COL5A1	TGFB1	MAB21L2	CDC25B	MECOM	LAMC1	TIMP3
HIST1H4 _C	NEURO _{G2}	INA	DLX6-AS ₁	ASPM	SCG3	EMX2	TIMP1	FOS	HOXB2	BOC	EPB41L2	ARPC1B ₃	PRSS2 ₃
TCF7L1	OLFM1	SPINK ₅	PBK	LIX1	RFXOX ₁	CA2	PLTP	AHNAK	UNCX	IRX2	COL1A2	CDH19	CD34
PCLAF	PRDM8	NHLH1	ASPM	PBK	SLC8A ₁	PRTG	KRT18	EPAS1	NRN1	MASP1	TES	SLITRK6	PLVAP
AMBN	CORO2B	CXCR4	PRC1	SCRGI	RAB3A	CLDN5	COL6A2	ANKRD1	HOXA3	SLC1A3	CCDC80	VIM	RAMP2
GAS1	TP53I11	TAGLN ₂	ZEB2	MT3	CDK5R ₁	CLU	ANXA2	MT2A	TFAP2B	WLS	HOXA10	HIST1H3 _D	CRIM1
CREB5	ZFPM2	LHX5	CDK1	RORB	GRIN2 _B	PMCH	OLFML ₃	CCN1	EBF3	CXCR4	TGFB2	CRYL1	FN1
HIST1H1 _B	PCDH9	TP73	TPX2	CDO1	CELF4	CRABP ₂	COL6A1	LGALS3	GDAP1L1	ARL4A	MIR100H _G	TAC1	EGFL7
HES5	NELL2	WNT7 _B	DLX1	ADGRV1	FOXP2	MAF	TMEM8 ₈	CTHRC1	NHLH1	FZD10	CXCL12	RXRG	ACSM3
EMX2	SRRM4	NRN1	MAD2L1	LINC018 ₉₆	GABRB ₃	BMP7	IL6ST	COL12A1	ELAVL2	ZIC4	HMG2	BCAN	TIE1
SOX9	SCG3	RGS16	NPY	HOPX	DCLK1	MSX1	CXCL14	APOE	DCC	RND2	MIR99AH _G	PRSS23	VAMP5
GNAI2	DCC	IGSF9	HMG1	PRC1	MTSS1	FOS	S100A1 ₁	SLC2A3	HOXA4	TPBG	CDH11	DST	CALCR _L
IFI44L	EPB41L3	DCC	CKS1B	ETV1	NRXN3	CACHD ₁	COL15A ₁	ARRGAP ₂₉	EBF1	GYPC	IGF2	ITM2C	S100A1 ₆
NAP1L1	SLC17A7	FNDCC5	HIST1H4 _E	TPX2	MEF2C	EGR1	PDPN	PRSS23	KLHL35	PAX3	NRP2	ZEB2	CAVIN1

PTTG1	ST18	SVEP1	BIRC5	RAB31	TMEM35A	RMST	B2M	LY6E	HOXC4	MEIS1	SFRP2	KCTD12	IGF2
QKI	EOMES	SIPA1L2	PFN2	TMEM158	SERTA4	CXCL14	HAND1	CCDC80	AC08522.1	IRX1	MFAP2	COL4A1	HLA-E
CKS2	NSG2	ELAVL2	HIST1H1E	TNC	SP9	SLC7A8	PODXL	SCUBE3	LAMP5	DLL1	SIX1	HMG20B	HSPG2
DOK5	EMX1	LMO2	SHTN1	CDK1	ISLR2	ATP1A2	COL5A2	LITD1	NHLH2	ZNF503	IL11RA	LMNA	IFITM2
PAX6	CAP2	SCG3	DLGAP5	SCGN	DPF1	ANKRD37	HAND2	KCNMA1	PRPH	EDNRB	ZFXH4A1	CLIC1	MECOM1
HEY1	SYT4	SAMD3	AURKB	SMOC1	KIF21B	ZIC2	SERPINH1	TNC	FNDC5	HOXB3	PCOLCE	NR2F2	ADGRL4
NUSAP1	SPINK5	CACNA2D1	UBE2C	CENPE	ATP1A3	CDO1	AQP1	TSTD1	POU3F1	MKI67	C1orf54	SLC25A5	COL4A2
TMEM16B-AS1	NSMF	CDK5R1	KIF11	ATAD2	SCN3B	SPRY1	RRBP1	TAGLN	IRX2	PCDH18	HMCN1	AHR	NRP1
HIST1H3B	ANK3	KLF7	C11orf96	NUF2	SLITRK6	PIFO	EGFL6	FSTL1	POU3F2	LRIG1	PCDH10	RHOC	BST2
SMC4	MYT1L	DMRTA2	UBE2S	NES	DNM3	NR2F2	SLC40A1	CXCL12	UBE2QL1	MGST1	TBX3	EDNRB	LIMS1
DMRTA2	FSTL5	SEZ6L	GTSE1	CDC20	CXXC4	LGH1	CHN1	TPM2	SCRT2	EPHA3	ITM2C	MMP17	MYH9
NASP	EBF2	CPNE4	CENPE	STK39	PCDH10	TSHZ2	TFPI2	VTCN1	SCG3	NRARP	FGFR1	PMP22	PLXND1
LINC00461	CELF4	SNAP25	CKS2	MOXD1	SYT5	DCT	EMP3	SPATS2L	SKAP2	JAG1	RAB34	MIA	IFIH6
ASPM	B3GAT1	GNG3	FBXO5	PBX3	ACTL6B	EMX20S	COL21A1	IGDCC3	NRCAM	NAV2	IRX3	FAM210B	ARHGAP29
HIST1H1C	EPHA5	CADM2	CKAP2	PCLAF	SCN3A	KLHDC8B	PITX1	CLDN4	SNAP25	HOXB2	EVA1B	CST3	ECSCR
CRYGD	NHLH2	BHLHE22	H2AFX	CDKN3	LINGO1	GJA1	BST2	PERP	C8LN1	AL39091.1	ARHGAP28	APOD1	EPAS1
H2AFX	DLL3	CABP7	KNL1	NTM	CELF3	SDC2	CDKN1C	S100A13	MYT1	APCDD1	CAST	GAS7	CLEC14A

[0389] □図 3 7 及び 3 8 は、シングルセル遺伝子発現データにおいて、各クラス

ーに特徴的な遺伝子、既知のマーカー遺伝子の発現プロファイルをドットプロットで示す。縦軸はクラスターを、横軸は遺伝子を表す。円の大きさは、クラスター内の全ての細胞に対する発現細胞の割合を百分率で表す。色の濃淡は、クラスター内の細胞の遺伝子発現量の平均値を表す。

[0390] MAP2とTUBB3は、神経細胞のマーカーとして解析した。KRT19とKRT8は、上皮系細胞のマーカーとして解析した。MKI67とTOP2Aは、増殖性細胞のマーカーとして解析した。PAX6、SOX2、HES1は放射状グリア(Radial Glia(RG))のマーカーとして解析した。EMX1は前脳背側領域のマーカーとして解析した。NEUROD6とSLC17A7は、グルタミン酸作動性神経のマーカーとして解析した。SSTR3は、ソマトスタチン受容体で、グルタミン酸作動性神経でも発現が見られることが知られる。TBR1とBCL11Bは、大脳皮質第V層と第六層の前駆体であるDeep Layerのマーカーとして解析した。RELNは、Cajal Retzius細胞のマーカーとして解析した。ASCL1、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6は、GABA作動性神経の分化過程で発現が見られるマーカーとして解析した。GAD2は、GABA作動性神経のマーカーとして解析した。SSTとTAC1はGABA作動性神経のサブタイプで発現が見られるマーカーとして解析した。TTR、RSPO3、CLIC6、HTR2C、TRPM3は、脈絡叢の発生過程で発現が見られるマーカーとして解析した。COL1A1は、CNS Fibroblastのマーカーとして解析した。DCN、LUM、DLK1はストローマ細胞で発現する遺伝子である。AQP1は、脈絡叢やくも膜顆粒で発現することが報告されている。OTX2、EMX2は領域特異的なマーカーで、終脳型の脈絡叢で発現することが知られる。HOXA5、HOXB5は尾側の神経マーカーとして解析した。ZIC1、MSX1、LGALS1、TWIST1、PRRX1、GPC3、SOX10、TFAP2Aは、Neural Crestの分化過程で発現が見られるマーカーとして解析した。そのうち、LGALS1、TWIST1、PRRX1、GPC3は

、E p i t h e l i a l - M e s e n c h y m a l T r a n s i t i o n (EMT) に関与する遺伝子であり、SOX10、TFAP2Aは、成熟したNeural Crestで発現するマーカーである。PECAM1、KDR、FLT1、ICAM2は、血管内皮細胞のマーカーとして解析した。

[0391] 解析対象とする遺伝子の選出においては、まず、“C o r t i c a l N e u r o n (GN)” のクラスターにおいて他のクラスターに対し、発現している細胞の割合が2倍以上高い遺伝子を選出した。次に、“C o r t i c a l N e u r o n (GN)” のクラスターにおいて他のクラスターに対し、発現量の平均値のF o l d C h a n g e が大きいものから50遺伝子を選出した。最後に、DAPT処理前的大脑オルガノイドと、DAPT処理後的大脑皮質細胞塊、それぞれ3ロットのシングルセル遺伝子発現解析において、全てのロットで発現が検出される46遺伝子を解析の対象とした。

[0392] 大脑皮質神経細胞 (C o r t i c a l N e u r o n) のクラスターは、前脳のマーカーであるEMX1を発現していた。そのうち、“R a d i a l G l i a (RG)” は、LHX2、R a d i a l G l i aの制御に必須の遺伝子であるSOX2、PAX6を発現していた。“G l u t a m a t e r g i c n e u r o n (GN)” は、d e e p l a y e r n e u r o n、p y r a m i d a l n e u r o nに特徴的な転写因子であるTBR1 (Robert F. Hevner, Tbr1 Regulates Differentiation of the Preplate and Layer 6, Neuron, 2001)、NEUROD6 (Tutukova S et al., The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease, Frontiers in Molecular Neuroscience, 2021)、グルタミン酸トランスポーターのSLC17A7 (V G l u T 1)、BCL11B (C t i p 2) を発現していた。また、“C a j a l R e t z i u s c e l l (CR)” は、カハールレチウス細胞のマーカー遺伝子であるRELN、TBR1などを発現していた。

[0393] G A B A e r g i c n e u r o nのクラスターは、G l u t a m a t e d e c a r b o x y l a s eのGAD2を共通して発現していた。そのう

ち、“GABAergic neuron-1、2”のクラスターでは増殖性マーカーであるMKI67 (Ki67)、分化早期 (VZ) に発現が見られるASCL1の発現が高く認められた。“GABAergic neuron-3”のクラスターでは、分化中盤以降 (SVZ) に発現が見られるDLX5、DLX6が発現していた。

[0394] Choroid Plexusのクラスターでは、脈絡叢上皮のマーカーである、TTR (Transferrin) を高く発現していた。脈絡叢には、Telencephalic型とHindbrain型が存在するが、EMX2、BMP7とも共発現していたことから、大脳皮質に付随する、Telencephalicな脈絡叢であると考えられた。

[0395] CNS Fibroblastのクラスターでは、中枢神経に付随する線維芽細胞のマーカーであるCOL1A1が高く発現していた。同時に、AQP1などの発現も認められたため、これらの細胞の一部は脈絡叢に付随する線維芽細胞である可能性が考えられる。

[0396] Neural Crestのクラスターでは、Neural crest cell (NCC) の分化過程で発現が認められる様々な遺伝子の発現が認められた (Simoes-Costa M et al., Establishing neural crest identity : a gene regulatory recipe, Development, 2015) 。“Neural crest-1”のクラスターでは、NCCの起源である、Neural Plate Borderで発現が見られるZIC遺伝子群、Msx1などの発現が認められた。“Neural crest-2”のクラスターでは、NCCへの分化初期で発現が見られる、Smadシグナル下流のID遺伝子群やEpithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 関連遺伝子 (LGALS1、TWIST1、PRRX1、GPC3 (Fazilaty H et al., A gene regulatory network to control EMT programs in development and disease, 2019) の発現が見られた。“Neural crest-3”では、NCCのMigration期に発現する、SOX10TFAP2Aなどの発現が見られた。

- [0397] Endothelial cellsのクラスターでは、KDR (VEGFR-2)、PECAM1、FLT1、ICAM2をはじめとする、多数のvascular endothelial cellのマーカーが発現していた (Gonchalov et al., Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017)。
- [0398] Caudal Neuronのクラスターでは、ニューロンのマーカーであるTUBB3の他、尾側の領域化を制御するHOXA5、HOXB5をはじめとする、多数のHOX遺伝子の発現が認められた。
- [0399] 9つのオルガノイドにおける各細胞種の割合を図39の(A)に示し、また、Neural crestのうち、各分化ステージにおける神経堤細胞の割合を図39の(B)に示す。色素細胞を含むOrganoid9は、他のオルガノイドに比べ、Neural Crestの割合が高かった。中でも、EMTに関わる遺伝子群を発現する細胞集団である“Neural Crest-2”の割合が高く、活発に移動するNeural Crestが多く含まれることが分かった。
- [0400] 9-3. 免疫染色による各マーカーの発現解析
各グループのオルガノイドに対し、代表的なマーカータンパク質の免疫染色を行った。結果を図40に示す。
- [0401] 前脳のマーカーのEMX1は、ロゼット構造が見られる領域(ロゼット)で特異的に発現が見られた。GABAergic neuronのマーカーのGAD65 (GAD2)は、「じゃがいも状組織」の領域で発現が認められた。ECM FibroblastのマーカーのCOL1A1は風船状組織、綿状組織、色素の周辺領域で発現が認められた。脈絡叢特異的なマーカーは、透明性組織で発現していた。MelanocyteマーカーのTYRは、色素沈着が見られるオルガノイド「色素」で発現が見られた。これらの結果より、シングルセル遺伝子発現解析で同定したマーカーはそれぞれ特徴的な構造を持つ領域に確かに発現していることが確認された。

[0402] 9-4. RT-qPCRによる各マーカー遺伝子の発現解析

Day 7～Day 35まで実施例1と同じ方法で培養した。各グループにつき3個のオルガノイドを取得し、倒立顕微鏡（Leica DMS1000）を用いて明視野像を撮影した（図41）。各オルガノイドに対し、RT-qPCR法でマーカー遺伝子の発現を解析した。解析結果を図42及び43に示す。

[0403] 大脳皮質神経細胞（Cortical Neuron）のマーカーとして同定した、VGluT1、EMX1は、Rosettesのオルガノイドで発現が認められた。GABAergic neuronのマーカーとして同定したDLX2、GAD2は、じゃがいも状（Potato-like）のオルガノイドで高く発現が認められた。MelanocyteのマーカーであるTYRは、Pigmentのオルガノイドで高く発現が見られた。CNS FibroblastのマーカーであるCOL1A1は、風船状組織と綿状組織で発現が見られた。Cerebral NeuronのマーカーのHOXA2はゼリー状組織で発現が見られた。

[0404] 9-5. シングルセル遺伝子発現解析による、大脳オルガノイド及び大脳皮質細胞塊の解析

Day 7～Day 35まで実施例1と同じ方法で培養した3回の分化誘導回で得られたオルガノイドから、Rosettesのオルガノイドを目視で選別した。その後、実施例4の工程（ii）に記載の方法で、大脳オルガノイドをDAPTで3日間処理し、大脳皮質細胞塊を誘導した（“DAPT+”）。対照群として、工程（ii）でDAPT非添加の群を作成した（大脳オルガノイド：“DAPT-”）。

これらの細胞を用いて、9-2と同じ方法でシングルセル遺伝子発現解析を行った。

[0405] 各分化誘導回（Lot1、Lot2、Lot3）のRosettesのオルガノイドの形態を倒立顕微鏡にて観察し、代表的な明視野像を図44の（A）に示す。シングルセル遺伝子発現解析のUMAPのプロットを図44の

(B) に示す。(Rosettes Lot 1、Rosettes Lot 2、Rosettes Lot 3)

[0406] DAPT-条件で得られるオルガノイド(大脳オルガノイド)は2つのクラスターに分かれ、2種類の細胞集団が含まれていることが分かった(図44の(B))。DAPT+条件で得られるオルガノイド(大脳皮質細胞塊)は1つのクラスターに集約し、1種類の細胞集団によって構成されることが分かった。3回の製造ロットの細胞は、分布が重なっていたことから、製造回による差は小さく、再現性良く、同様の細胞集団が得られていることが分かった。

[0407] また、上記のオルガノイドについて、さらに上記同定したマーカー遺伝子の発現を解析した(図45)。大脳オルガノイド(DAPT-)は2つのクラスターに分かれ、右側のクラスターでは、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである、SLC17A7及びNEUROD6、並びにDeep Layer NeuronのマーカーであるCtip2が高く発現しており、Glutamatergic Neuronやその前駆細胞が含まれていると考えられた。左側のクラスターでは、放射状グリアのマーカーであるPAX6やMKI67が高く発現しており、増殖性の高い放射状グリアであると考えられた。Upper NeuronのマーカーであるSatb2はほとんど発現がみられず、ほとんどが大脳皮質第V層、VI層の前駆細胞であると考えられた。また、今回同定した目的外細胞のマーカーである、TTR、COL1A1、TYR及びPECAM1はほとんど検出されなかった。このことから、形態でロゼット構造を全体に持つオルガノイドを選別、又は、他の形態のオルガノイドを排除することにより、大脳皮質の細胞を得ることができ、目的外細胞の混入を低減できることが分かった。

[0408] また、大脳皮質細胞塊(DAPT+)では、1つのクラスターに集約され、SLC17A7(VGluT1)、NEUROD6及びCtip2は発現しているが、目的外細胞のマーカーであるPax6及びMKI67を発現する細胞集団が大幅に減少した。また、TTR、COL1A1、TYR及びP

E C A M 1 はほとんど検出されなかった。このことから、D A P T 処理を行うことにより、純度の高い、グルタミン作動性ニューロンを含む大脳皮質細胞塊が得られることが分かった。

[0409] 表6に記載のそれぞれの遺伝子は、大脳皮質神経前駆細胞（広義には大脳皮質神経細胞に含まれるが、放射状グリア、R a d i a l G l i a (R G) に相当する）、大脳皮質神経細胞（グルタミン酸作動性神経（G N）、及びカハールレチウス細胞（C R）を含む）、G A B A 作動性神経細胞、脈絡叢（C h P）、中枢神経系線維芽細胞、神経堤細胞、血管内皮細胞、又は尾側神経細胞のいずれかのマーカーとしても利用できる。

[0410] また、大脳皮質神経前駆細胞、大脳皮質神経細胞（グルタミン酸作動性神経、及びカハールレチウス細胞を含む）のマーカーは、これらの細胞が大脳オルガノイドに含まれていることから、大脳オルガノイドのマーカーとして利用できる。

[0411] 特に、大脳皮質神経細胞に発現する遺伝子、具体的には、グルタミン酸作動性神経又はカハールレチウス細胞に発現する遺伝子は、本発明の大脳皮質細胞塊や本発明の高純度大脳皮質細胞塊のマーカーとして利用できる。

[0412] 大脳皮質神経細胞（放射状グリアを除く）のクラスターに属する50個の遺伝子（表6）のうち、3遺伝子（E O M E S、S P I N K 5、E B F 2）は、D A P T 処理後のオルガノイドでの発現量が少なかったことから、残りの47個の遺伝子が本発明の大脳皮質細胞塊又は本発明の高純度大脳皮質細胞塊のマーカーとして適していることがわかった。またこれらの遺伝子リストのうち、N E U R O D 6、N E U R O D 2、S S T R 2、T B R 1、N R X N 1、B H L H E 2 2、N E U R O D 1、N E U R O G 2、S L C 1 7 A 7 及びE M X 1 は、大脳皮質が発生する領域である前脳背側領域や、大脳皮質の第I I 層～第V I 層の予定領域（C o r t i c a l P l a t e）、グルタミン酸作動性神経細胞で発現が見られることが知られているが、その他の37個の遺伝子は、新たに大脳皮質神経細胞のマーカーとして同定されたものである。

[0413] すなわち、本願に規定する上記大脳皮質細胞塊や高純度大脳皮質細胞塊が目的細胞である大脳皮質神経細胞を含むことは、NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの遺伝子を発現しているか否か、又はその発現量を調べることによって評価することができる。より好ましくはSLC17A7、NEUROD6、EMX1を発現しているか否か、又はその発現量を調べることによって評価することができる。

[0414] また、表6に記載の、大脳皮質神経前駆細胞(放射状グリア)(Radial Glia(RG))、GABA作動性神経細胞(GABAergic neuron)、脈絡叢(Choroid plexus(ChP))、中枢神経系線維芽細胞(CNS fibroblast)、神経堤細胞(Neural Crest)、血管内皮細胞(Vascular Endothelial cells)又は尾側神経細胞(Caudal Neuron)に発現する遺伝子群(以下目的外細胞遺伝子群という)は、本発明の大脳皮質細胞塊又は高純度大脳皮質細胞塊における目的外細胞のマーカーとして、目的外細胞が基準以下であることを調べるために利用できることがわかった。

[0415] すなわち、本願に規定する上記大脳皮質細胞塊や高純度大脳皮質細胞塊が目的外細胞を含まない又は目的外細胞が基準以下であることを、表6における目的外細胞遺伝子群から選ばれる少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は

少なくとも3つの遺伝子の発現量が実質的に発現していないか、又は基準以下であることを指標として評価することができる。

[0416] 具体的には、放射状グリアのマーカーとして同定されたLHX2、SOX2、及びPAX6、GABA作動性神経細胞のマーカーとして同定されたGAD2DLX1、DLX2、DLX5、及びDLX6、脈絡叢のマーカーとして同定されたTTR、TRPM3、中枢神経系線維芽細胞のマーカーとして同定されたCOL1A1、神経堤細胞のマーカーとして同定されたZIC遺伝子群、Msx1、Smadシグナル下流のID遺伝子群、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 関連遺伝子 (TWIST1、PRRX1、GPC3、Sox10、及びTFAP2、血管内皮細胞のマーカーとして同定されたKDR (VEGFR-2)、PECAM1及びCDH5 (VE-Cadherin) をはじめとする多数のvascular endothelial cellのマーカー、並びに尾側神経細胞のマーカーとして同定されたTUBB3その他、尾側の領域化を制御する多数のHOX遺伝子から選ばれる、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも3つの遺伝子の発現量が実質的に発現していないか、又は基準以下であることを指標として評価することができる。また、表6に記載のマーカーの使用法はこれらに限られず、用途に応じて適宜マーカーを選択し発現を測定することにより、様々な目的に使用することができる。

[0417] より好ましくは表6におけるGAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していないか、又は基準値以下である。

[0418] 本発明に規定する製造方法により作製した脳オルガノイドは、必ずしも用途が限定されず、以下のような目的に用いてもよい。

[0419] <脳用途 (物質スクリーニング)>

低分子化合物、抗体、核酸、その他の物質を、本発明の製造方法で作製した脳オルガノイドに添加し、その影響を調べてもよい。すなわち、低分子化合物、抗体、その他の物質の影響、毒性、及び有用性を明らかにする目的

で、大脳オルガノイドを用いることができる。この場合、大脳オルガノイドにおいて形成された、組織化された神経細胞、組織化された神経ネットワークの影響を調べることができる。特に本発明に規定する大脳オルガノイドの製造方法、及び、選別方法により、発現プロファイル又は形状等又は組織構成が比較的均一な大脳オルガノイドを大量に作成することが可能である。この際に、大脳オルガノイドの品質を客観的に評価するために、上記13に記載の大脳オルガノイドの品質評価方法を用いてもよい。これらの発現プロファイル又は形状等又は組織構成が比較的均一な大脳オルガノイドを用いることにより、容易に複数回の試験を行うことができ、従来は困難であった再現性を容易に達成することができる。

[0420] <大脳用途（疾患大脳オルガノイド）>

また、特定の遺伝子型細胞由来の多能性幹細胞から誘導した大脳オルガノイドを作製し、特定の疾患に対して上記物質スクリーニングを適用してもよい。この場合、上記2に記載の大脳オルガノイドの製造方法を用いて大脳オルガノイドを作製する際に、由来する多能性幹細胞の性質に応じて最適な工程は適宜調整できる。特に、統合失調症、双極性障害、自閉症スペクトラム障害、アルツハイマー病、認知症、小頭症、等の患者から採取した細胞由来の多能性幹細胞から誘導した大脳オルガノイドを作製し（精神疾患大脳オルガノイド）、薬剤の効果を調べる他、疾患のメカニズムの解明に用いてもよい。より具体的には、興奮性神経細胞のグルタミン酸作動性神経等、抑制性神経細胞のGABA作動性神経等、グリア細胞等を健常者と比較することや、遺伝子発現、タンパク質発現、代謝状態、電気生理学的性質等の細胞特性を解析することが含まれる。

請求の範囲

- [請求項1] 支持細胞の非存在下、多能性幹細胞から大脳オルガノイドを製造する方法であって、
- (1) 多能性幹細胞を、b F G F が実質的に含まれず、かつ T G F β シグナルを実質的に惹起しない培養液中で培養する工程と、
- (2) 工程 (1) で得られた細胞を、神経細胞へと分化誘導する工程と
- を含む、方法。
- [請求項2] 工程 (2) が、
- (2 a) 工程 (1) で得られた細胞を、T G F β シグナル阻害剤、及び W n t シグナル伝達阻害剤を含む培養液中で浮遊培養して、細胞塊を得る工程と、
- (2 b) 工程 (2 a) で得られた細胞塊を、T G F β シグナル阻害剤及び W n t シグナル伝達阻害剤を実質的に含まない培養液中で浮遊培養して、大脳オルガノイドを得る工程と
- を含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 工程 (2 a) の浮遊培養が静置培養である、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項4] 工程 (2 b) の浮遊培養が振とう培養である、請求項 2 又は 3 に記載の方法。
- [請求項5] 工程 (1) の培養期間が 3 日間未満である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項6] 工程 (1) の培養期間が 1 2 時間以上 2 日間以下である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項7] 工程 (1) の培養液が、S B 4 3 1 5 4 2、A - 8 3 - 0 1、及び X A V - 9 3 9 からなる群から選ばれる T G F β シグナル阻害剤を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項8] 工程 (1)、工程 (2 a)、及び工程 (2 b) における培養液が、

無血清培養液である、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 前記多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞又はヒト胚性幹細胞である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

[請求項10] (3)工程(2)で得られた複数の細胞塊から、細胞塊の形状、内部構造、サイズ、表面の色彩若しくは模様、及び遺伝子発現からなる群から選ばれる1以上を指標とし、大脳オルガノイドを選別する工程をさらに含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

[請求項11] 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法を用いて製造される細胞培養物であって、

複数の球状の細胞塊を含み、

前記複数の球状の細胞塊に占める大脳オルガノイドの割合が40%以上である、細胞培養物。

[請求項12] 前記大脳オルガノイドに占める大脳皮質様構造物の割合が40%以上である、請求項11に記載の細胞培養物。

[請求項13] 大脳オルガノイドが、更に以下の(1)～(5)：

- (1) 球状の細胞塊であること、
- (2) 細胞塊の内部に、大脳皮質様構造物を有すること、
- (3) 表面に色素沈着を有さないこと、
- (4) 細胞塊の一部に嚢胞状形状、突起形状、及びバルーン状形状のいずれも有さないこと、並びに、

(5) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、AN

K3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーを発現していること
から選択される、1以上の特徴を有する細胞塊である、請求項12に記載の細胞培養物。

- [請求項14] (a) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の10%以下であり、
 (b) 神経細胞マーカー、皮質V/VⅠ層マーカー、及び前脳マーカーからなる群から選ばれる1つ以上のマーカーが陽性である細胞数が全細胞数の70%以上であり、且つ
 (c) 神経上皮又は大脳皮質様構造を実質的に含まないことを特徴とする、大脳皮質細胞塊。

- [請求項15] 前記(a)の増殖性マーカーがKi67であり、
 前記(b)の神経細胞マーカーがβⅢⅢ-Tubulinであり、皮質V/VⅠ層マーカーがCtip2であり、前脳マーカーがFOXG1である、
請求項14に記載の大脳皮質細胞塊。

- [請求項16] (d) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーをさらに発現している、請求項14又は15に記載の大脳皮質細胞塊。

- [請求項17] SLC17A7を発現している、請求項16に記載の脳皮質細胞塊。
- [請求項18] GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない、請求項15～17のいずれか1項に記載の脳皮質細胞塊。
- [請求項19] 支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から脳皮質細胞塊を製造する方法であって、
(i) 多能性幹細胞から脳オルガノイドを得る工程と、
(ii) 工程(i)で得られた脳オルガノイドを、Notchシグナル阻害剤を含む培養液中で培養して、脳皮質細胞塊を得る工程とを含む、方法。
- [請求項20] 前記工程(i)において、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法により多能性幹細胞から脳オルガノイドを得る、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] (A) 増殖性マーカー陽性細胞数が全細胞数の5%以下であり、
(B) 神経細胞マーカー、皮質V/VⅠ層マーカー、及び前脳マーカーから選ばれる1つ以上のマーカー陽性細胞数が全細胞数の70%以上であり、且つ
(C) 神経上皮又は脳皮質様構造を実質的に含まないことを特徴とする、高純度脳皮質細胞塊。
- [請求項22] 前記(A)の増殖性マーカーがKi67であり、
前記(B)の神経細胞マーカーがβⅢⅢ-Tubulinであり、
皮質V/VⅠ層マーカーがCtip2であり、前脳マーカーがFOXG1である、
請求項21に記載の高純度脳皮質細胞塊。
- [請求項23] (D) NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDR

BS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子を発現している、請求項21又は22に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

[請求項24] SLC17A7、NEUROD6、及びEMX1からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を発現している、請求項23に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

[請求項25] GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる1以上の遺伝子を実質的に発現していない、請求項21～24のいずれか1項に記載の高純度大脳皮質細胞塊。

[請求項26] 支持細胞の非存在下で、多能性幹細胞から高純度大脳皮質細胞塊を製造する方法であって、

(i) 多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る工程と、
(ii) 工程(i)で得られた大脳オルガノイドを、培養液中で培養する工程と、
(iii) 工程(ii)で得られた細胞培養物を、単細胞又は2～5個の細胞の集合体(Cell clump)にまで分散させる工程と、
(iv) 工程(ii)で得られた細胞培養物又は工程(iii)で得られた細胞集団を、1以上の神経栄養因子、アスコルビン酸、及びcAMP活性化剤を含む培養液中で培養して、細胞塊を得る工程と
を含み、前記工程(ii)の培養液及び／又は前記工程(iv)の培養液は、Notchシグナル阻害剤を含む、方法。

[請求項27] 前記工程(i)において、請求項1～10のいずれか1項に記載の

方法により多能性幹細胞から大脳オルガノイドを得る、請求項 26 に記載の方法。

- [請求項28] 工程 (i i) に付与する大脳オルガノイドが、神経細胞への分化誘導開始から 28 日後～44 日後の大脳オルガノイドである、請求項 19、20、26 及び 27 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項29] 工程 (i i) の培養期間が 2～6 日間である、請求項 19、20、及び 26～28 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項30] 工程 (i v) の培養期間が 2～14 日間である、請求項 19、20、及び 26～29 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項31] 前記 Notch シグナル阻害剤は、 γ セクレターゼ阻害剤である、請求項 19、20、及び 26～30 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項32] 前記 γ セクレターゼ阻害剤が N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) 又は Compound E である、請求項 31 に記載の方法。
- [請求項33] 請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の高純度大脳皮質細胞塊を含む細胞集団であって、前記高純度大脳皮質細胞塊のサイズ、形状又は構成細胞組成が均一である、細胞集団。
- [請求項34] 請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の大脳皮質細胞塊、請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは請求項 33 に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項35] 請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の大脳皮質細胞塊、請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは請求項 33 に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を含む、移植用組織。
- [請求項36] 請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の大脳皮質細胞塊、請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の高純度大脳皮質細胞塊、若しくは請求項 33 に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させ

て得られる細胞集団を有効成分として含む、脳血管障害治療薬。

[請求項37] 請求項14～18のいずれか1項に記載の脳皮質細胞塊、請求項21～25のいずれか1項に記載の高純度脳皮質細胞塊、若しくは請求項33に記載の細胞集団、又はそれらを構成細胞にまで分散させて得られる細胞集団を、これを必要とする対象の脳皮質又は脳基底核に投与又は移植することを含む、脳血管障害の治療方法。

[請求項38] (a a) 脳オルガノイド又は脳皮質細胞塊における、GAD2、COL1A1、TYR、TTR及びHOXA2からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子又は該遺伝子によりコードされるタンパク質もしくはその断片の発現量を測定する工程、及び

(b b) 工程(a a)の測定結果に基づき、前記遺伝子の発現量が基準値以下である場合に、前記脳オルガノイド又は前記脳皮質細胞塊に含まれる目的外細胞の量が基準以下であると評価する工程、を含む、脳オルガノイド又は脳皮質細胞塊の品質評価方法。

[請求項39] (A A) 脳オルガノイド又は脳皮質細胞塊における、NEUROD6、NEUROD2、SSTR2、TBR1、ZBTB18、NHLH1、IGFBPL1、NRN1、RTN1、THSD7A、NRXN1、BHLHE22、CALB2、KHDRBS3、CCSAP、PDE1A、NEUROD1、NPTX1、NXPH4、NTS、NEUROG2、OLFM1、PRDM8、CORO2B、TP53I11、ZFPM2、PCDH9、NELL2、SRRM4、SCG3、DCC、EPB41L3、SLC17A7、ST18、NSG2、EMX1、CAP2、SYT4、NSMF、ANK3、MYT1L、FSTL5、CELF4、B3GAT1、EPHA5、NHLH2、及びDLL3からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する工程、及び

(B B) 工程(A A)の測定結果に基づき、前記遺伝子の発現量が基準値以上である場合に、前記脳オルガノイド又は前記脳皮質細胞塊

胞塊に含まれる目的細胞の量が基準以上であると評価する工程、
を含む、大脳オルガノイド又は大脳皮質細胞塊の品質評価方法。