

明 細 書

発明の名称：

高増殖性細胞の製造方法、高増殖性細胞およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、高増殖性細胞の製造方法、高増殖性細胞、およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 再生医療の分野において、生体内の種々の細胞、種々の分化段階の細胞、または特定方向へ分化誘導された細胞などが利用されている。生体での使用を考慮すれば、これらの細胞については、遺伝子改変を伴わないことが望ましい。これまで、内胚葉性の成熟細胞に特定の低分子化合物を接触させことにより、遺伝子改変を伴うことなく、該成熟細胞を、幹細胞または前駆細胞にリプログラミングできることが報告されている（国際公開第2017/119512号および国際公開第2020/080550号）。

発明の概要

[0003] 一方、遺伝子改変を行わずに得られる細胞、なかでも比較的、成熟細胞に近い細胞の多くは、増殖能に制限があって、長期にわたって生体内外で維持できない傾向がある。このため、細胞の機能の長期利用、または、細胞が生成する有用物質の大量生産などに有効な高増殖性の細胞に対する要請が、依然として残されている。特に、神経系の細胞を含む外胚葉性細胞については、内胚葉性細胞と異なり十分に利用できていない。

発明が解決しようとする課題

[0004] 本開示の目的は、高増殖性細胞を製造する方法、高増殖性細胞、およびその用途を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、低分子シグナル伝達経路阻害剤を外胚葉性細胞に接触させることで、高増殖性細胞が得られることを見出した

。

[0006] すなわち、本開示は以下の形態を含む：

[1] 高増殖性細胞の製造方法であって、

(i) 原料となる外胚葉性細胞を用意すること、

(ii) 低分子シグナル伝達経路阻害剤を含む培地中で、該阻害剤を前記原料となる外胚葉性細胞に接触させて培養すること、および、

(iii) 前記接触後、前記阻害剤を含む培地中で追加培養を行い、前記原料となる外胚葉性細胞よりも細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を含む培養物を得ること

を含む、高増殖性細胞の製造方法；

[2] 前記高増殖性細胞は、前記阻害剤と接触させた28日超の培養期間後の細胞数が、該阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数の1.0倍を超える増殖能を有する、[1]に記載の製造方法；

[3] 前記原料となる外胚葉性細胞が、中枢神経系の細胞を含む、[1]または[2]に記載の製造方法；

[4] 前記原料となる外胚葉性細胞が、アストロサイトを含む、[1]～[3]のいずれか1項に記載の製造方法；

[5] 前記阻害剤が、TGF β 受容体阻害剤およびROCK阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の製造方法；

[6] 前記TGF β 受容体阻害剤の濃度が、0.001 μ M～100 μ Mの範囲内である、[5]に記載の製造方法；

[7] 前記ROCK阻害剤の濃度が、0.001 μ M～100 μ Mの範囲内である、[5]または[6]に記載の製造方法；

[8] 前記高増殖性細胞が、成熟細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を前記原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、前駆細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を前記原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以

上に発現する、〔１〕～〔７〕のいずれか１項に記載の製造方法；

〔９〕前記高増殖性細胞が、*Musashi1*、*Notch1*、*Nestin*、および*SOX2*からなる群より選択される少なくとも１つが陰性である、〔１〕～〔８〕のいずれか１項に記載の製造方法；

〔１０〕外胚葉性細胞の特徴を備え、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた２８日超の培養期間後の細胞数が、該阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数の１．０倍を超える増殖能を有する、高増殖性細胞；

〔１１〕前記高増殖性細胞が、*Musashi1*、*Notch1*、*Nestin*、および*SOX2*からなる群より選択される少なくとも１つが陰性である細胞を含む、〔１０〕に記載の細胞；

〔１２〕*NG2*の発現量が、前記阻害剤非接触の外胚葉性細胞における*NG2*の発現量よりも高い、〔１０〕または〔１１〕に記載の細胞；

〔１３〕〔１〕～〔９〕のいずれか１項に記載の製造方法より得られる高増殖性細胞または〔１０〕～〔１２〕のいずれか１項に記載の高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物を含む培養物を得ること、および、前記細胞分泌物を、前記培養物から分離することを含む、細胞分泌物の製造方法；

〔１４〕細胞分泌物が、エクソソームである、〔１３〕に記載の方法；

〔１５〕外胚葉性前駆細胞の製造方法であって、

前記外胚葉性前駆細胞は、高増殖性細胞であり、

（ｉ）原料となる外胚葉性細胞を用意すること、

（ｉｉ）低分子シグナル伝達経路阻害剤を含む培地中で、該阻害剤を前記原料となる外胚葉性細胞に接触させて、２８日超の期間にわたり培養すること、および

（ｉｉｉ）前記接触後、前記阻害剤を含む培地中で追加培養を行い、前記原料となる外胚葉性細胞よりも細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を含む培養物を得ること

を含む、外胚葉性前駆細胞の製造方法；

[16] 前記培養物から、前記高増殖性細胞を単離することを更に含む、[15] に記載の製造方法；

[17] タンパク質および／またはmiRNAを含む細胞分泌物であって、前記タンパク質は、ピンキュリン(P18206)、インテグリン β -1、CD29(P05556)、ピルビン酸キナーゼM1/2(P14618)、およびエフリンタイプ-A受容体2(P29317)の組み合わせを含み、

前記miRNAは、hsa-miR-382-5p(MIMAT0000737)、hsa-miR-155-5p(MIMAT0000646)、hsa-miR-379-5p(MIMAT0000733)、hsa-miR-16-5p(MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p(MIMAT0000737)、hsa-miR-16-5p(MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p(MIMAT0000737)、hsa-miR-21-5p(MIMAT0000076)、hsa-let-7a-5p(MIMAT0000062)、hsa-miR-16-5p(MIMAT0000069)、hsa-miR-409-3p(MIMAT0001639)、hsa-let-7a-5p(MIMAT0000062)、およびhsa-let-7f-5p(MIMAT0000067)の組み合わせを含む、細胞分泌物；

[18] エクソソームである、[17] に記載の細胞分泌物；

[19] [1] もしくは[2] に記載の製造方法により得られた高増殖性細胞または[10]～[12]のいずれか1項に記載の高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物と、

[17] または[18] に記載の細胞分泌物と、
のいずれかの細胞分泌物を含む、末梢神経細胞または中枢神経細胞に関する障害の予防または治療に用いられる医薬組成物；

[20] [1] もしくは[2] に記載の製造方法により得られた高増殖性細胞または[10]～[12]のいずれか1項に記載の高増殖性細胞から分泌

された細胞分泌物と、

[17] または [18] に記載の細胞分泌物と、

のいずれかの細胞分泌物を神経細胞に接触させることを含む、交感神経系の抑制方法。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、高増殖性細胞を製造する方法、高増殖性細胞、およびその用途を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、実施例1に係る長期培養後の外胚葉性細胞の形態を示す。

[図2]図2は、実施例2に係る回収用培地への培地交換の前後における外胚葉性細胞の細胞形態を示す。

[図3A]図3Aは、実施例2に係るNormal群の追加培養後に回収された培養上清中の粒子の粒径分布を示す。

[図3B]図3Bは、実施例2に係るNHA-YA群の追加培養後に回収された培養上清中の粒子の粒径分布を示す。

[図4A]図4Aは、実施例4に係るNHA-YA由来エクソソームのプロテオーム解析により選出されたタンパク質を示す。

[図4B]図4Bは、実施例4に係るNHA-YA由来エクソソームのプロテオーム解析により選出されたタンパク質を示す。

[図5]図5は、実施例5に係るNHA-YA由来エクソソームのmiRNA解析により選出されたパーキンソン病マーカーとしてのmiRNAを示す。

[図6]図6は、実施例5に係るNHA-YA由来エクソソームのmiRNA解析により選出されたアルツハイマー病マーカーとしてのmiRNAを示す。

[図7]図7は、実施例5に係るNHA-YA由来エクソソームのmiRNA解析により選出されたアルツハイマー病マーカーとしてのmiRNAを示す。

[図8]図8は、実施例5に係るNHA-YA由来エクソソームのmiRNA解析により選出されたアルツハイマー病マーカーとしてのmiRNAを示す。

[図9]図9は、実施例5に係るNHA-YA由来エクソソームのmiRNA解

析により選出されたアルツハイマー病マーカーとしてのmiRNAを示す。

[図10]図10は、実施例5に係るNHA-YA由来エクソソームのmiRNA解析により選出されたうつ病マーカーとしてのmiRNAを示す。

発明を実施するための形態

[0009] <1>高増殖性細胞の製造方法

本開示に係る高増殖性細胞の製造方法は、

(i) 原料となる外胚葉性細胞を用意すること、

(ii) 低分子シグナル伝達経路阻害剤を含む培地中で、該阻害剤を前記原料となる外胚葉性細胞に接触させて培養すること、および、

(iii) 前記接触後、前記阻害剤を含む培地中で追加培養を行い、前記原料となる外胚葉性細胞よりも細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を含む培養物を得ること

を含む。

[0010] 本明細書において、用語「細胞」には、特に断らない限り、少なくともひとつの細胞が含まれる用語として解釈されるべきである。このため、特に断らない限り、用語「細胞」が意味する細胞は、一細胞であることに限定されず、細胞集団と同義として使用され得る。

[0011] 本明細書において、用語「細胞集団」には、特に断らない限り、少なくとも1種類の細胞が含まれる用語として解釈されるべきである。このため、特に断らない限り、用語「細胞集団」が意味する細胞は、1種類の細胞であることに限定されない。

[0012] 「外胚葉」とは、後生動物の発生途中に生ずる三胚葉の一つである。外胚葉は、胚の外側の層に由来し、皮膚、神経系および感覚器に発達する。皮膚としては、例えば、表皮、髪、爪および皮膚腺が挙げられ、神経系としては、例えば、脳神経、脊髄および末梢神経が挙げられ、感覚器としては、例えば、視覚器、聴覚器、平衡覚器、味覚器、嗅覚器および触覚器が挙げられる。

[0013] 本開示で用いられる「外胚葉性細胞」は、例えば神経系の細胞、例えば、

中枢神経系の細胞および末梢神経系の細胞を含む。したがって、本開示において、「原料となる外胚葉性細胞」は、例えば中枢神経系の細胞を含むことができる。原料となる外胚葉性細胞は、アストロサイトを含んでもよい。

[0014] 本開示の製造方法で用いる外胚葉性細胞は、いかなる起源から提供されてもよく、例えば、哺乳動物から提供される。哺乳動物としては、例えば、ヒト、ラット、マウス、ネコ、イヌ、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシおよびサルが挙げられる。哺乳動物は、好ましくはヒト、ラット、マウス、ネコ、またはイヌであり、より好ましくはヒト、ラットまたはマウスである。

[0015] 本開示で使用される「外胚葉性細胞」は、「外胚葉性組織」および「外胚葉性器官」を構成する細胞である。「外胚葉性組織」および「外胚葉性器官」としては、例えば、中枢神経（脳および脊髄）、下垂体、末梢神経、腸神経、副腎髄質、メラノサイト、顔面軟骨、歯の象牙質、表皮、髪、爪、皮膚、皮脂腺、唾液腺、汗腺、乳腺、鼻腔、鼻の粘膜、口上皮、口腔、目、膀胱、肛門を挙げることができる。脳は、大脳、小脳および脳幹に大きく分けることができる。大脳はさらに、終脳および間脳に分けられ、脳幹はさらに、中脳、橋および延髄に分けられる。中枢神経は、神経細胞およびグリア細胞から構成され、これらの細胞を出発材料に選ぶことができる。これらの組織または器官には、最終分化段階を終えた成熟細胞が多く存在する。

[0016] 原料となる外胚葉性細胞は、例えば、グリア細胞に分類されるアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞（あるいはポリデンドロサイトとも言われる。）、上皮細胞、シュワン細胞および衛星細胞からなる群より選択される少なくとも1つを選択することができる。これらの細胞は、生体から得られた初代細胞、樹立された細胞株、または、ES細胞などの多能性幹細胞もしくは人工多能性幹細胞（iPS細胞）から誘導された外胚葉性細胞であってもよい。

[0017] 本開示の方法に用いる細胞は、例えば、哺乳動物から摘出した脳から単離精製された細胞であってもよい。

- [0018] 例えばラットの場合、10週齢～20週齢の成体ラットから摘出した脳を用いることが好ましいが、2ヶ月齢以下の幼若ラット由来の脳を用いてもよい。ヒトの場合、生検または外科手術により得ることができる。例えば、神経細胞およびグリア細胞は、いずれも生検により採取することができる。外科手術の場合は、切除した成人の脳組織片を用いることも、死亡胎児から切除した脳を用いることもできる。あるいは、これら摘出した脳から神経細胞またはグリア細胞を単離精製した後、凍結した細胞を用いることもできる。
- [0019] 原料となる外胚葉性細胞は、外胚葉性細胞の特徴を示す細胞として定義することができる。外胚葉性細胞の特徴としては、細胞の形態、細胞に特有の遺伝子（「マーカー遺伝子」と称する場合がある。）の発現等を挙げることができる。外胚葉性細胞であることは、分化段階のいずれかにおいて、例えば、GFAP、S100B、SLC1A2（「EAAT2」または「GLT-1」としても既知である。）、およびNG2からなる群より選択される少なくとも1つのマーカー遺伝子の発現があることで、確認することができる。外胚葉性細胞のマーカー遺伝子の発現は、遺伝子およびタンパク質のいずれに基づいて確認してもよい。遺伝子またはタンパク質の発現の確認は、発現の有無、測定方法に依存した具体的な発現量、特定の細胞における同一遺伝子またはタンパク質の発現量との比較など、当業界で公知の方法によって行うことができる。
- [0020] なお、本明細書において、マーカー遺伝子の発現は、当業界で公知の技術を用いて確認することができ、例えば、定量PCR（「qPCR」と記載することがある。）等を用いた遺伝子の発現量の測定、ELISA、フローサイトメトリー法等の免疫測定法を用いたタンパク質量の測定などによって、確認することができる。
- [0021] 上記のようにして用意された原料となる外胚葉性細胞を、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。接触は、インビトロであってよい。本方法に使用可能な低分子シグナル伝達経路阻害剤としては特に制限はなく、いずれも使用可能である。低分子シグナル伝達経路阻害剤としては、例えば、トラ

ンスフォーミング増殖因子 (Transforming growth factor; TGF) β 受容体阻害剤、ROCK [Rho結合タンパク質キナーゼ (Rho-associated protein kinase)] 阻害剤およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (Glycogen synthase kinase 3; GSK3) 阻害剤が挙げられる。

[0022] 本開示に係る製造方法において、前記阻害剤は、TGF β 受容体阻害剤、ROCK阻害剤およびGSK3阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含んでよい。本開示に係る製造方法において、前記阻害剤は、TGF β 受容体阻害剤およびROCK阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含んでよい。

[0023] TGF β 受容体阻害剤は、TGF β 受容体の機能を阻害する作用を有するものであれば特に限定されることはなく、例えば、2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-4-イル-2-tert-ブチル-1H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン、3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾール(A-83-01)、[2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジルアミノ)]プテリジン(SD-208)、3-(ピリジン-2-イル)-4-(4-キノニル)]-1H-ピラゾール、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン(以上、いずれもメルク社)、SB431542(Sigma Aldrich社)およびCultureSure(登録商標)A-83-01(富士フイルム和光純薬株式会社)が挙げられる。TGF β 受容体阻害剤は、好ましくはCultureSure(登録商標)A-83-01である。TGF β 受容体阻害剤には、TGF β 受容体アンタゴニストも含まれる。これらのTGF β 受容体阻害剤は、1種のみを用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0024] ROCK阻害剤は、Rho結合タンパク質キナーゼの機能を阻害する作用を有するものであれば特に限定されることはなく、ROCK阻害剤としては

、例えば、GSK269962A (Axon medchem社)、Fasudil hydrochloride (Tocris Bioscience社)、CultureSure (登録商標) Y-27632 (富士フイルム和光純薬株式会社) およびH-1152 dihydrochloride (富士フイルム和光純薬株式会社) が挙げられる。ROCK阻害剤は、好ましくはCultureSure (登録商標) Y-27632である。ROCK阻害剤は、1種のみを用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0025] GSK3阻害剤は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK) 3の機能を阻害する作用を有するものであれば特に限定されることはなく、GSK3阻害剤としては、例えば、SB216763 (Selleck社)、CHIR 98014 (Axon medchem社)、CHIR 99021 (Axon medchem社)、SB415286 (Tocris Bioscience社) およびKenpaullone (コスモ・バイオ社) が挙げられる。GSK3阻害剤は、好ましくはCHIR 99021である。GSK3阻害剤は、1種のみを用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0026] 本製造方法において用いられる低分子シグナル伝達経路阻害剤は、TGF β 受容体阻害剤およびROCK阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つとすることができる。すなわち、本製造方法において使用される低分子シグナル伝達経路阻害剤は、

- ・ TGF β 受容体阻害剤とROCK阻害剤との組み合わせ、
- ・ TGF β 受容体阻害剤、または
- ・ ROCK阻害剤

であってよい。一態様において、使用される低分子シグナル伝達経路阻害剤は、TGF β 受容体阻害剤とROCK阻害剤との組み合わせである。本明細書において、「低分子シグナル伝達経路阻害剤」の語は、単に「阻害剤」と称することもある。

[0027] 本開示の態様としては、例えば、以下の阻害剤が含まれる：

(1) 2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-4-イル-2-tert-ブチル-1H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン、3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾール(A-83-01)、[2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジルアミノ)]プテリジン(SD-208)、3-(ピリジン-2-イル)-4-(4-キノニル)]-1H-ピラゾール、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、SB431542およびCultureSure(登録商標)A-83-01からなる群より選択される少なくとも1の化合物；

(2) 2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-4-イル-2-tert-ブチル-1H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン、3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾール(A-83-01)、[2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジルアミノ)]プテリジン(SD-208)、3-(ピリジン-2-イル)-4-(4-キノニル)]-1H-ピラゾール、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、SB431542およびCultureSure(登録商標)A-83-01からなる群より選択される少なくとも1の化合物と、

GSK269962A、Fasudil hydrochloride、CultureSure(登録商標)Y-27632およびH-1152 dihydrochlorideからなる群より選択される少なくとも1の化合物との組み合わせ；ならびに、

(3) GSK269962A、Fasudil hydrochloride、CultureSure(登録商標)Y-27632およびH-1152 dihydrochlorideからなる群より選択される少なく

とも1の化合物。

[0028] 培地中のTGF β 受容体阻害剤の濃度は、例えば0.001 μ M~100 μ M、0.01 μ M~50 μ M、または0.05 μ M~30 μ Mの範囲内であり、用いるTGF β 受容体の種類によって適宜調整可能である。一態様において、培地中のTGF β 受容体阻害剤、例えばCulture Sure（登録商標）A-83-01の濃度は、0.1 μ M~3 μ Mである。

[0029] 培地中のROCK阻害剤の濃度は、例えば0.001 μ M~100 μ M、0.01 μ M~80 μ M、または0.1 μ M~50 μ Mの範囲内であり、用いるROCK阻害剤の種類によって適宜調整可能である。一態様において、培地中のROCK阻害剤、例えばCulture Sure（登録商標）Y-27632の濃度は、1 μ M~30 μ Mである。

[0030] 培地中のGSK3阻害剤の濃度は、例えば0.001 μ M~100 μ M、0.01 μ M~80 μ M、または0.1 μ M~50 μ Mの範囲内であり、用いるGSK3阻害剤の種類によって適宜調整可能である。

[0031] 上記濃度範囲は、TGF β 受容体阻害剤、ROCK阻害剤およびGSK3阻害剤がそれぞれ単独で使用される場合、および、これらの阻害剤が組み合わせて使用される場合のいずれにも適用可能である。また、上記阻害剤が、水不溶性または水難溶性である場合、少量の低毒性の有機溶媒（例えば、DMSO等）に溶解した後、上記の最終濃度となるよう培地に添加することができる。

[0032] 原料となる外胚葉性細胞と低分子シグナル伝達経路阻害剤との接触は、上記阻害剤を含む培地中で、原料となる外胚葉性細胞を培養することによって行われる。具体的には、培地中に、上記阻害剤を有効な濃度で添加して培養を行う。

[0033] 原料となる外胚葉性細胞を低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた後、該阻害剤を含む培地中で更なる培養に供する。ここで、更なる培養は、「追加培養」または「第2の培養」とも称する。これに対して、原料となる外胚葉性細胞を低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させるまでの培養、すな

わち、低分子シグナル伝達経路阻害剤を含まない培地中での外胚葉性細胞の培養を、「前培養」または「第1の培養」とも称する。該阻害剤との接触後、追加培養を行うことにより、細胞増殖能が高められた高増殖性細胞が得られる。なお、追加培養中においても、培地中には阻害剤が含まれているため、細胞と阻害剤との接触は継続している。

[0034] 本開示において、前培養および追加培養で用いる培地としては、広く動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として使用することができ、市販されている基礎培地を使用してもよい。市販の基礎培地としては、例えば、アストロサイト培地 (Astrocyte Growth Medium; AGM)、最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変最小必須培地 (DMEM)、RPMI 1640培地、199培地、Ham's F12培地、William's E培地、および、NS基礎培地 (富士フィルム和光純薬株式会社) が挙げられるが、これらに特に限定されない。培地としては、上記のものを単独で用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0035] 培地に添加される添加剤としては、例えば、サイトカイン、増殖因子 (例えば、上皮増殖因子 (EGF)、および線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2))、ホルモン (例えば、インスリン、エストラジオール、プロゲステロン、テストステロンおよびチロキシン)、ステロイド (例えば、デキサメタゾン (Dex))、血漿由来タンパク質 (例えば、トランスフェリン)、各種アミノ酸 (例えば、L-グルタミンおよびL-プロリン)、各種無機塩 (例えば、亜セレン酸塩および NaHCO_3)、各種ビタミン (例えば、ニコチンアミドおよびアスコルビン酸誘導体)、N2サプリメント (富士フィルム和光純薬株式会社)、NSサプリメント (富士フィルム和光純薬株式会社)、B-27 Plus Supplement (Thermo Fisher Scientific)、各種抗生物質 (例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシン)、抗真菌剤 (例えば、アンホテリシン)、ならびに緩衝剤 (例えば、HEPES等のグッド緩衝剤) が挙げられる。

[0036] 前培養 (第1の培養) および追加培養 (第2の培養) で用いられる培地に

は、血清添加培地または無血清培地のいずれを用いてもよい。

[0037] 血清添加培地を使用する場合、血清としては、例えば、ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を用いることができる。また、エクソソーム分離を容易にするために、エクソソームを除去した FBS を用いることもできる。市販のエクソソーム除去培地としては、例えば、FBS exosome-depleted, OneShot format (Gibco (登録商標)、Thermo Fisher Scientific) を挙げることができる。培地中の血清の濃度は、例えば、0.5~25% (v/v)、1~25% (v/v)、1~20% (v/v)、1~15% (v/v)、2~15% (v/v)、2~10% (v/v)、3~10% (v/v)、3~8% (v/v)、および、3~5% (v/v) である。具体的な一態様において、培地中の血清の濃度は、3% (v/v) である。

[0038] 無血清培地を使用する場合、血清代替物を添加してもよい。血清代替物としては、例えば、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA)、ノックアウト血清代替物 (KnockOut Serum Replacement; KSR)、ヒト血清アルブミン (Human serum albumin; HSA または Human albumin, serum; HAS) 等が挙げられる。ヒト血清アルブミンとしては、ヒト血漿から分離されたヒト血清アルブミン、または、ヒト血清アルブミン遺伝子を発現するイネから精製されたヒト血清アルブミン (富士フィルム和光純薬) を使用することができる。通常、増殖因子 (hEGF 等)、サイトカイン、ホルモンなどの因子が培地に更に添加される。これらの添加される因子としては、例えば、上皮増殖因子 (EGF)、インスリン、トランスフェリン、ヒドロコルチゾン 21-ヘミコハク酸またはその塩、および、デキサメタゾン (Dex)、N2 サプリメント (富士フィルム和光純薬株式会社)、NS サプリメント (富士フィルム和光純薬株式会社) および B-27 Serum Free Supplement (Thermo Fisher Scientific) が挙げられるが、それらに限定されない。

- [0039] 培養に用いられる培養容器は、接着培養に適したものであれば特に限定されず、例えば、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、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイおよび培養バックが挙げられる。培養容器としては、細胞の浮遊培養を行うために細胞が接着できないように表面が加工された培養容器を用いることもできる。あるいは、接着培養の場合は、内表面が、細胞との接着性を向上させる目的で細胞支持用基質によりコーティングされたものを用いることができる。かかる細胞支持用基質としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、マトリゲル、ポリーレーリジン、ラミニンおよびフィブロネクチンが挙げられる。好ましい細胞支持用基質は、コラーゲンまたはマトリゲルである。
- [0040] 原料となる外胚葉性細胞は、例えば $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 細胞 / cm^2 、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 細胞 / cm^2 、または $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 細胞 / cm^2 の細胞密度で培養容器上に播種することができる。
- [0041] 培養には、一般に外胚葉性細胞の培養に適用される条件をそのまま適用可能である。培養には、 CO_2 インキュベータを用いることができ、その場合の培養温度および CO_2 濃度としては、一般的に用いられるものであればよく、例えば、 37°C および 5 % (v/v) とすることができる。
- [0042] 培養期間は、YA と共に培養している期間であり、当該期間は、連続する期間でもよく、不連続な期間、すなわち、不連続な複数の期間を合計した期間であってよい。培養期間は、28 日超であればよく、例えば 5 週間以上、6 週間以上または 7 週間以上とすることができる。培養期間の上限としては、例えば 3 か月程度または 100 日間とすることができる。継代は、培養容器内の細胞密度、培地の状態または細胞の状態などに応じて適宜行うことができ、継代間隔は、例えば、2 ~ 20 日間程度とすることができる。
- [0043] 本製造方法で得られる高増殖性細胞 (highly proliferating cells) (本明細書では、「HP 細胞」と称することがある) とは、増殖能が高められた細胞であり、低分子シグナル伝達経路阻害剤を

含まない培地を用いる以外は当該細胞の培養条件と同一の条件下で培養した対照となる外胚葉性細胞と比較して、細胞増殖活性が高く、より短時間で増殖する性質、すなわち細胞倍加時間がより短いという性質、より長期間に亘って増殖する性質、またはこれら双方を満たす性質を備えている細胞であることを意味する。本製造方法で得られる培養物に含まれる細胞集団は、HP細胞だけでなく、HP細胞に加えて、増殖能が高められておらず、元の細胞の増殖能と変わらない細胞、即ち、非高増殖性細胞（non-highly proliferating cells）（本明細書では、「non-HP細胞」と称することがある）を含むことができる。本製造方法で得られる細胞集団におけるHP細胞の割合は、細胞数基準で50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上であってもよい。

[0044] 高増殖性細胞は、阻害剤と接触させた28日超の培養期間（本明細書では、「期間T」とする。）後の細胞数（本明細書では、「高増殖性細胞の細胞数N」とする。）が、阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数（本明細書では、「外胚葉性細胞の細胞数N'」とする。）の1.0倍を超える増殖能を有することができる。この場合の培養条件としては、例えば、 4×10^3 細胞/cm²の播種密度、37℃の培養温度、5%CO₂濃度とすることができる。高増殖性細胞の細胞数Nを確認する際に用いられる培地には、上記前培養および追加培養に用いられる培地として挙げたもののいずれも用いることができる。高増殖性細胞の細胞数Nと外胚葉性細胞の細胞数N'とをそれぞれ確認する際に用いられる2種類の培地には、阻害剤の有無以外の組成は同一となる培地を用いることができる。

[0045] 一態様において、期間Tは、例えば90日間、80日間、70日間、60日間、50日間、45日間、42日間、40日間、35日間、32日間、30日間または29日間である。

[0046] 一態様において、高増殖性細胞の細胞数Nは、外胚葉性細胞の細胞数N'

の 1.0 倍超であれば特に制限はなく、例えば細胞数 N' の 1.1 倍以上、1.2 倍以上、1.3 倍以上、1.4 倍以上または 1.5 倍以上であってもよい。好ましくは、高増殖性細胞の細胞数 N が、外胚葉性細胞の細胞数 N' の 1.5 倍以上である。

[0047] 高増殖性細胞は、細胞特有遺伝子、すなわちマーカー遺伝子の発現によって特定してもよい。高増殖性細胞のマーカー遺伝子の発現は、本明細書において前述したように、遺伝子およびタンパク質のいずれに基づいて確認してもよく、遺伝子またはタンパク質の発現の確認方法は、発現の有無、測定方法に依存した具体的な発現量、特定の細胞における同一遺伝子またはタンパク質の発現量との比較などによって行うことができる。

[0048] 本明細書では、遺伝子またはタンパク質の発現に関して「陽性」または「陰性」と表現することがある。遺伝子またはタンパク質の発現に関して、「陽性」とは、対象となる遺伝子またはタンパク質の発現が認められる場合を意味し、一方、「陰性」とは、対象となる遺伝子またはタンパク質の発現が認められない場合を意味する。遺伝子またはタンパク質の発現に関して「発現が高い」もしくは「陽性」、または「発現が低い」もしくは「陰性」と表現する場合に、高増殖性細胞とは異なる特定の細胞を比較対照とすることができる。比較対照となる特定の細胞、すなわち、「対照細胞」は、対象となる遺伝子またはタンパク質の発現量が極めて低い細胞であってもよく、原料となる外胚葉性細胞、すなわち阻害剤非接触の外胚葉性細胞であってよく、または、成熟細胞もしくはその前駆細胞であってもよい。

[0049] 例えば、高増殖性細胞が、マーカー遺伝子の発現に関し、「陽性」であるとは、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた後の該マーカー遺伝子の発現量が、該阻害剤と非接触で培養された外胚葉性細胞での該マーカー遺伝子の発現量の 1.0 倍以上であることを意味することができる。これに対し、高増殖性細胞が、マーカー遺伝子の発現に関し、「陰性」であるとは、前記阻害剤と接触させた後の該マーカー遺伝子の発現量が、該阻害剤と非接触で培養された外胚葉性細胞での該マーカー遺伝子の発現量の 1.0 倍未満で

あることを意味することができる。

- [0050] 発現量の確認方法に供与する高増殖性細胞および阻害剤と非接触の外胚葉性細胞の培養条件は、阻害剤と接触または非接触であること以外は同一とすることができるが、例えば、細胞の状態、増殖性および細胞数等に基づいて、同一の培養期間、同一の細胞継代数および同様の細胞密度など、対象となる細胞が同一または極めて同一の状態となるように適宜調整することができ、当業者は細胞の状態に基づいて選択可能である。
- [0051] ここで、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた一定期間以上の培養期間後の該マーカー遺伝子の発現量は、コントロール遺伝子に対する発現量として表される。コントロール遺伝子としては、例えば、`beta-actin` (`ACTB`) および `Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase` (`GAPDH`) が使用可能である。
- [0052] 一態様において高増殖性細胞は、成熟細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、前駆細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現することができる。
- [0053] 本明細書において「前駆細胞 (`Progenitor cell`)」とは、成熟細胞に至るまでの分化段階の細胞であって、幹細胞から発生して体を構成する最終分化細胞へと分化することができる細胞を意味する。
- [0054] 成熟細胞に特有の遺伝子、例えばアストロサイト等で比較的高く発現している遺伝子としては、例えば、`GFAP`、`S100B` および `SLC1A2` を挙げるることができる。前駆細胞に特有の遺伝子、例えば、オリゴデンドロサイト前駆細胞、神経上皮細胞および放射状グリア細胞で比較的高く発現している遺伝子としては、例えば、`NG2`、`Notch1`、`Nestin` および `SOX2` を挙げるることができる。
- [0055] 高増殖性細胞は、上述したような高い増殖能を有する細胞であれば、如何なるマーカー遺伝子の発現パターンを特徴として備える細胞であってもよく、換言すれば、如何なる特徴を備える細胞を含む細胞集団であってもよい。

高増殖性細胞は、次に挙げるようなマーカー遺伝子の発現パターンを示すものであってよい。これらのマーカー遺伝子の発現パターンにしたがって、本開示に係る高増殖性細胞を、迅速に特定し、抽出することができる。

[0056] 高増殖性細胞は、Musashi1 (MSI1)、Notch1、Nestin、およびSOX2からなる群より選択される少なくとも1つが陰性である細胞を含むことができる。

[0057] 例えば、高増殖性細胞は、GFAP陽性細胞を含むことができる。他の一態様では、高増殖性細胞は、GFAPが陽性、かつ、NG2が陽性の細胞を含むことができ、または、GFAPを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現することができる。他の一態様では、高増殖性細胞は、GFAPおよびS100Bが陽性、かつ、NG2が陽性の細胞を含むことができ、または、GFAPおよびS100Bを、原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現することができる。

[0058] 別の一態様において高増殖性細胞は、成熟細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、前駆細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞を含むことができる。

[0059] 一態様において、高増殖性細胞は、NG2が陽性の細胞を含むことができ、または、NG2を低分子シグナル伝達経路阻害剤非接触の外胚葉性細胞におけるNG2の発現量よりも多く発現する細胞を含むことができる。すなわち、この態様において、高増殖性細胞は、NG2の発現量が、低分子シグナル伝達経路阻害剤非接触の外胚葉性細胞におけるNG2の発現量よりも高いものであってもよい。

[0060] 例えば、高増殖性細胞は、S100Bが陽性、かつ、NG2が陽性の細胞を含むことができ、またはS100Bを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に

に発現することができる。

- [0061] 一態様において、高増殖性細胞が含む上述の細胞は、*Musashi 1* (*MSI1*)、*Notch 1*、*Nestin*、および*SOX 2*からなる群より選択される少なくとも1つが陰性である。すなわち、高増殖性細胞が含む細胞は、前記阻害剤と接触させた後の、*Musashi 1*、*Notch 1*、*Nestin*、および*SOX 2*からなる群より選択される少なくとも1つのマーカー遺伝子の発現量が、低分子シグナル伝達経路阻害剤と非接触で培養された外胚葉性細胞での該マーカー遺伝子の発現量の1.0倍未満であることができる。好ましい態様において、高増殖性細胞が含む上述の細胞は、*Musashi 1*、*Notch 1*、*Nestin*、および*SOX 2*からなる群より選択される2以上、3以上、またはこれらすべてが陰性である。
- [0062] 一態様において、*Musashi 1*、*Notch 1*、*Nestin*、および*SOX 2*からなる群より選択される少なくとも1つが陰性である細胞の発現量は、コントロール遺伝子に対する発現量として表されることができる。この場合、「陰性」とは、コントロール遺伝子としては、例えば、*beta-actin* (*ACTB*) および*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) を使用したときに、コントロール遺伝子の発現量の1.0倍未満である。
- [0063] 本開示に係る高増殖性細胞の細胞集団は、高い増殖能を有する高増殖性細胞、特に高増殖性外胚葉性細胞であれば分化段階は問わず、成熟細胞および前駆細胞の両方が含まれたヘテロな細胞集団であってもよく、あるいは比較的分化段階の近い複数種の外胚葉性細胞が極めて大多数を占める細胞集団であってもよい。
- [0064] 一態様では、本製造方法により得られる高増殖性細胞の細胞集団は、高増殖性外胚葉性前駆細胞を主要な構成成分として含む集団、または、高増殖性外胚葉性前駆細胞および高増殖性外胚葉性成熟細胞の双方を含む集団であってよい。ここで細胞集団における「主要な構成成分」とは、細胞集団において細胞数基準で少なくとも50%を占める細胞を意味する。本明細書において

て「極めて大多数」とは、細胞集団において、対象となる細胞の細胞数が、細胞数基準で 95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または 99.5%以上であることを意味する。

[0065] 得られた高増殖性細胞の細胞集団における外胚葉性成熟細胞の割合は、細胞数基準で、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満であってよい。したがって、本開示は、原料となる外胚葉性細胞に低分子シグナル伝達経路阻害剤を接触させることを含む、細胞増殖能が高められた外胚葉性細胞の富化方法も包含する。原料となる外胚葉性細胞の低分子シグナル伝達経路阻害剤との接触はインビトロで行うことができる。

[0066] 本製造方法において、原料となる外胚葉性細胞がアストロサイトである場合、高増殖性細胞の細胞集団には、アストロサイトに関連する外胚葉性細胞系統の細胞が含まれていてもよい。アストロサイトに関連する外胚葉性細胞系統の細胞としては、例えば、アストロサイト、放射状グリア細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞（ポリデンドロサイトとも言われる）、オリゴデンドロサイトおよび神経上皮細胞が挙げられる。加えて、アストロサイトに関連する外胚葉性細胞系統の細胞集団には、高められた細胞増殖能を示す細胞集団である限り、外胚葉性細胞に見られる特徴の一部を備え、かつ、上述した細胞のいずれにも分類できない細胞が含まれてもよい。

[0067] 本開示の別の側面は、高増殖性細胞に関する。本高増殖性細胞は、先述の製造方法により得られる高増殖性細胞であってもよく、その他の製造方法によって得られる高増殖性細胞であってもよい。

[0068] 本開示の一側面に係る高増殖性細胞は、外胚葉性細胞の特徴を備え、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた28日超の培養期間後の細胞数が、低分子シグナル伝達経路阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数の1.0倍を超える増殖能を有する、高増殖性細胞である。上記のように、低分子シグナル伝達経路阻害剤と外胚葉性細胞とを接触させることによって、外胚葉性細胞への遺

伝子導入または遺伝子改変を伴うことなく、細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を得ることができる。これにより、阻害剤非接触群と比較して、阻害剤接触群では、より長期間に亘って培養を行うことができ、得られる細胞数についても、阻害剤接触群の細胞数は、阻害剤非接触群の細胞数に対して多い。

[0069] 一態様では、ヒト初代成熟アストロサイトを TGF β 受容体阻害剤および ROCK 阻害剤の組み合わせと接触させて培養して得られた細胞群（阻害剤接触群）と、ヒト初代成熟アストロサイトを該阻害剤の組み合わせと接触させずに培養して得られた細胞群（阻害剤非接触群）とを比較して、阻害剤接触群では、より長期間に亘って培養を行うことができる。すなわち、阻害剤接触群では、阻害剤非接触群に比較して、より長期間、細胞の増殖が継続する。また、増殖によって最終的に得られる細胞数については、阻害剤接触群の細胞数は、阻害剤非接触群の細胞数に対して、例えば 2 倍以上、5 倍以上、10 倍以上、50 倍以上、100 倍以上、200 倍以上、または 400 倍である。

[0070] このように、得られた高増殖性細胞は細胞増殖能が高められているため、長期培養によって多数の細胞が得られる。高増殖性細胞は、以下で説明するような細胞分泌物を生成可能であるため、長期培養によって多数の細胞が得られれば、回収できる細胞分泌物の量も増加し得る。

[0071] 本側面に係る高増殖性細胞については、本製造方法の製造結果物として記載した事項をそのまま適応する。ただし、細胞として、外胚葉性細胞の特徴を備え、阻害剤と接触させた 28 日超の培養期間後の細胞数が、阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数の 1.0 倍を超える増殖能を有する限り、本製造方法の製造結果物であることに限定されない。

[0072] 本開示の高増殖性細胞は、上述したように、GFAP、NG2 および S100B からなる群より選択される少なくとも 1 つが陽性である細胞を含むことができる。高増殖性細胞は、例えば以下の細胞 (I) ~ (VII) からな

る群より選択される少なくとも1つを含むことができる：

(I) GFAP陽性細胞、例えば、GFAPを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞；

(II) NG2陽性細胞、例えば、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞；

(III) S100B陽性細胞、例えば、S100Bを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞；

(IV) GFAPが陽性、かつ、NG2が陽性の細胞、例えば、GFAPを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞；

(V) GFAPが陽性、かつ、S100Bが陽性の細胞、例えば、GFAPを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、S100Bを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞；

(VI) S100Bが陽性、かつ、NG2が陽性の細胞、例えば、S100Bを、原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞；

(VII) GFAPが陽性、S100Bが陽性、かつ、NG2が陽性の細胞、例えば、GFAPを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、S100Bを原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、NG2を原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する細胞。

[0073] 本開示の高増殖性細胞は、SLC1A2が陽性である細胞を含むこともできる。具体的には、高増殖性細胞は、上記の遺伝子の少なくとも1つが陽性であり、かつ、SLC1A2が陽性である細胞を含むこともできる。

[0074] 本開示の高増殖性細胞が、少なくともGFAPが陽性の細胞を含む場合、好ましくは、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた後のGFAP遺伝子の発現量が、該阻害剤と非接触で培養された外胚葉性細胞でのGFAP遺伝子の発現量の1.0倍以上4.0倍未満である。

[0075] 本開示の高増殖性細胞は、GFAP、NG2、およびS100Bからなる

群より選択される少なくとも1つが陽性であり、かつ、Musashi1、Notch1、Nestin、およびSOX2から選択される少なくとも1つが陰性である細胞を含むことができる。すなわち、この態様において、上記(Ⅰ)～(Ⅶ)の細胞は、Musashi1、Notch1、Nestin、およびSOX2から選択される少なくとも1つが陰性である。

[0076] 高増殖性細胞の単離には、特定の細胞を単離する公知の手段を適用することができ、例えば、前述したマーカー遺伝子に由来するタンパク質の発現に基づく蛍光活性化セルソーティング(Fluorescence-activated cell sorting; FACS)法、および、ダイナビーズ(Dynabeads)等を用いた磁気細胞分離法を利用することができる。得られる高増殖性細胞の増殖能が高いため、長期培養を行うことによって高増殖性細胞の割合が極めて高い細胞集団を得ることで、高増殖性細胞を実質的に単離するものであってもよい。

[0077] <2>外胚葉性前駆細胞およびその製造方法

本開示に係る製造方法により得られる高増殖性細胞には、出発材料である原料となる外胚葉性細胞よりも未成熟な分化段階の特徴を示す細胞が含まれていてもよい。このような未成熟段階の外胚葉性細胞、すなわち外胚葉性前駆細胞は、阻害剤を含まない培地を用いる以外は当該細胞の培養条件と同一の培養条件で培養した対照となる外胚葉性細胞と比較して細胞増殖活性が高く、より短時間で増殖する性質、より長期間に亘って増殖する性質、またはこれら双方を満たす性質を備えることができる。この高増殖性を示す外胚葉性前駆細胞を、本明細書では高増殖性前駆細胞と称することがある。本明細書における「高増殖性細胞」には、高増殖性前駆細胞を包含することがある。これにより、未成熟段階の外胚葉性細胞をより長期にわたって成育させて、例えば、外胚葉性前駆細胞が生成する細胞分泌物を、対照となる外胚葉性細胞と比較して、より短時間で大量に得ることができるなどの利点を有する。

[0078] 本開示の別の側面は、外胚葉性前駆細胞の製造方法に関し、前記外胚葉性前駆細胞は、高増殖性細胞であり、該製造方法は、

(i) 原料となる外胚葉性細胞を用意すること、

(ii) 低分子シグナル伝達経路阻害剤を含む培地中で、該阻害剤を前記原料となる外胚葉性細胞に接触させて、28日超の期間にわたり培養すること、および、

(iii) 前記接触後、前記阻害剤を含む培地中で追加培養を行い、前記原料となる外胚葉性細胞よりも細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を含む培養物を得ること

を含む。本開示の外胚葉性前駆細胞の製造方法は、前記培養物から、前記高増殖性細胞を単離することを更に含んでもよい。

[0079] 本開示の外胚葉性前駆細胞の製造方法における、原料となる外胚葉性細胞、および、低分子シグナル伝達経路阻害剤としては、例えば、本開示の高増殖性細胞の製造方法に関して記載した、原料となる外胚葉性細胞、および、低分子シグナル伝達経路阻害剤をそれぞれ使用することができる。

[0080] 高増殖性前駆細胞の単離には、特定の細胞を単離する公知の手段を適用することができる。例えば、前駆細胞に特有の前述したマーカー遺伝子に由来するタンパク質の発現に基づく蛍光活性化セルソーティング (Fluorescence-activated cell sorting; FACS) 法、および、ダイナビーズ (Dynabeads) 等を用いた磁気細胞分離法を利用することができる。得られる高増殖性前駆細胞の増殖能が高いため、長期培養を行うことによって高増殖性前駆細胞の割合が極めて高い細胞集団を得ることで、高増殖性前駆細胞を実質的に単離するものであってもよい。

[0081] 本開示に係る製造方法により得られる高増殖性細胞では、出発材料である原料となる外胚葉性細胞が、最終分化段階に到達したアストロサイトを含む場合、得られた高増殖性細胞には、アストロサイトよりも未成熟な分化段階の特徴を示す細胞が含まれていてもよい。このような未成熟段階の外胚葉性細胞は、高められた増殖能を有することに加え、更に、以下の (a) または (b) の特性を有することができる：

(a) アストロサイトと比較して、GFAPおよびS100Bの組み合わせ、GFAPおよびSLC1A2の組み合わせ、S100BおよびSLC1A2の組み合わせ、GFAPおよびNG2の組み合わせ、NG2およびSLC1A2の組み合わせ、またはNG2およびS100Bの組み合わせの発現量が増加している。

(b) アストロサイトと比較して、GFAP、S100BおよびNG2の組み合わせ、GFAP、SLC1A2およびNG2の組み合わせ、S100B、SLC1A2およびNG2の組み合わせ、またはGFAP、S100B、SLC1A2およびNG2の組み合わせの発現量が増加している。

[0082] 本開示のさらに別の側面は、本開示に係る外胚葉性前駆細胞およびその用途に関する。

[0083] 上記製造方法により得られた外胚葉性前駆細胞は、例えば、神経障害治療剤の評価方法に使用することができる。具体的には、神経障害治療剤の候補薬剤を、前記外胚葉性前駆細胞と接触させることにより、神経障害治療剤の候補薬剤の有用性を評価することができる。したがって、本開示は、神経障害治療剤の候補薬剤を、前記外胚葉性前駆細胞と接触させることを含む、神経障害治療剤の評価方法にも関する。更には、先述の外胚葉性前駆細胞を使用することを含む、神経疾患モデルの評価方法にも関する。

[0084] 本開示はさらに、本開示に係る製造方法により得られた外胚葉性前駆細胞を、成熟条件下に供して外胚葉性前駆細胞の分化を誘導し、外胚葉性成熟細胞を得ることを含む、外胚葉性成熟細胞の製造方法にも関する。

[0085] ここで「成熟条件下」とは、既知の分化誘導因子を用いた培養条件を意味する。分化誘導因子としては、例えば、線維芽細胞成長因子-2 (Fibroblast growth factor-3; FGF-2); 白血病阻害因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF) または毛様体神経栄養因子 (Ciliary neurotrophic factor; CNTF) などのIL-6ファミリーサイトカイン; BMP2またはBMP4などのBone morphogenetic pro

tein (BMP) ファミリーサイトカイン、Notchファミリータンパク質；Wnt 遺伝子ファミリータンパク質；ソニック・ヘッジホッグタンパク質；およびレチノイン酸が挙げられる。さらに成熟細胞の増殖または維持に必要な因子として、例えば、神経成長因子 (Nerve growth factor；NGF)、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor；BDNF)、Neurotrophin-3 (NT-3)、Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)、および血小板由来成長因子 (Platelet-derived growth factor；PDGF) を挙げることができる。

[0086] 分化誘導因子を用いた培養条件としては、分化誘導因子による分化誘導方法において適用される既知の分化誘導条件を適用することができ、該分化誘導条件は、用いる分化誘導因子の種類によって適宜選択できる。

[0087] <3>阻害剤の用途

先述の製造方法で使用される阻害剤は、外胚葉性細胞の増殖能を維持または促進させるために用いることができる。したがって、本開示の更なる側面は、低分子シグナル伝達経路阻害剤、例えばTGF β 受容体阻害剤およびROCK阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つを含む、外胚葉性細胞の増殖性調整剤に関する。具体的に、本開示は、先述の製造方法により得られる高増殖性細胞、または外胚葉性細胞の増殖能を維持または促進させるために使用される、増殖性調整剤にも関する。ここで、本明細書において、用語「増殖性調整」とは、細胞の増殖維持および増殖促進の少なくとも一方を達成することを意味することができる。用語「増殖維持」および「増殖促進」については、細胞が培養期間にわたって細胞数が維持または増加している限り、特に区別されない。細胞の増殖性調整のための増殖性調整剤の使用濃度としては、先述した製造方法における使用濃度に関して記述した濃度をそのまま適用することができる。

[0088] さらに本開示は、先述の製造方法により得られる高増殖性細胞または外胚葉性細胞の培養方法であって、低分子シグナル伝達経路阻害剤、例えばTG

F β 受容体阻害剤およびR O C K 阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つの阻害剤の存在下で、前記細胞集団または前記細胞を継代培養することを含む、培養方法に関する。ここで、「培養方法」には、高増殖性細胞または外胚葉性細胞の増殖性調整方法が包含されるものとする。本培養方法に用いる場合の阻害剤の使用濃度としては、先述した製造方法における使用濃度に関して記述した濃度をそのまま適用することができる。

[0089] <4>細胞分泌物およびその製造方法

本開示のさらに別の側面は、本開示に係る高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物を含む培養物を得ること、および、前記細胞分泌物を、前記培養物から分離することを含む、細胞分泌物の製造方法に関する。本製造方法は、必要に応じて任意の工程をさらに含んでもよい。本開示に係る高増殖性細胞は、細胞増殖能が高められた高増殖性細胞であるので、阻害剤を含まない培地を用いる以外は当該高増殖性細胞の培養条件と同一の培養条件で培養した対照となる細胞と比較して、より短時間で増殖し、より長期間に亘って増殖し、またはより短時間で増殖すると共に長期間に亘って増殖する。したがって、本細胞分泌物の製造方法では、高増殖性細胞が分泌する細胞分泌物を、対照となる細胞と比較して、より短時間で大量に得ることができる。

[0090] 細胞分泌物は、「セクレトーム」とも称され、細胞から分泌される物質であれば特に制限されず、例えば、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小胞等の細胞外小胞；サイトカイン、ホルモン、抗体等の機能性タンパク質などが挙げられる。一形態では、細胞分泌物は、細胞外小胞であってもよく、なかでも、エクソソームであってもよい。

[0091] 本開示に係る細胞分泌物の製造方法において用意される培養物は、上記のいずれかの態様により得られた高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物を含む。細胞分泌物を含む培養物は、本開示に係る高増殖性細胞の製造方法を実施して製造したものであってもよく、本開示に係る高増殖性細胞を入手して培養することで得たものであってもよく、本開示に係る製造方法を実施することで得られた培養物を別途入手したものであってもよく、本開示に係る高

増殖性細胞の培養物を別途入手したものであってもよい。本明細書において「培養物」とは、細胞を培養することによって得られる培養細胞と培養上清（馴化培地（*conditioned medium*））との組み合わせを意味する。

[0092] 本開示に係る細胞分泌物の製造方法は、前記細胞分泌物を、前記培養物から分離することを含む。培養物からの細胞分泌物の分離方法には、例えば、上清の除去および遠心分離などの公知の分離方法を使用することができる。培養物から分離された細胞分泌物は、細胞分泌物を含有する組成物の形態で得てもよい。細胞分泌物が細胞分泌物を含有する組成物、すなわち細胞分泌物含有組成物である場合、細胞分泌物含有組成物は、細胞分泌物および水性媒体を含むことができる。水性媒体としては、細胞分泌物の種類等に応じて選択される公知の水性媒体であれば特に制限はなく、例えば、培養上清、水、緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、グッド緩衝液）、生理食塩水および培地を挙げることができる。

[0093] 細胞分泌物の製造方法は、さらに、分離された細胞分泌物を精製または単離することを含むことができる。細胞分泌物の精製方法または単離方法としては、細胞分泌物の種類に応じて公知の方法を、特に制限なく適用することができる。

[0094] 細胞分泌物の単離または精製方法としては、例えば、ろ過および濃縮を挙げることができる。例えば、サイズまたは分子量カットオフ値を有する膜を用いてろ過を行って、細胞分泌物を単離または精製することができる。他の方法として、例えば、タンジェンシャルフローフィルトレーションまたは限外ろ過を用いて、細胞分泌物をろ過または濃縮してもよい。細胞分泌物は、細胞分泌物を含有する組成物の形態、または単離もしくは精製後に得られる単離細胞分泌物の形態で、使用することができる。細胞分泌物は、組成物もしくは単離細胞分泌物の形態のままで、または噴霧乾燥、凍結乾燥処理等の公知の処理に供することによって、保管、冷蔵保存または冷凍保存することができる。

[0095] 本開示に係る細胞分泌物は、具体的には、タンパク質および／またはmiRNAを含む細胞分泌物であって、タンパク質は、図4Aおよび図4Bに示すものから選択され、miRNAは、図5～10に示すものから選択される。図4Aおよび図4Bにおいて、各タンパク質名に続くカッコ内の記載は、UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) におけるアクセッション番号を意味する。図5～図10において、各miRNA名に続くカッコ内の記載は、miRBase (Release 21) (<https://www.mirbase.org/>) におけるアクセッション番号を意味する。細胞分泌物は、これらのタンパク質から選択される少なくともひとつ、またはこれらのmiRNAから選択される少なくともひとつを含むものであればよく、これらのタンパク質から選択される少なくともひとつと、これらのmiRNAから選択される少なくともひとつと、を含むものであってよい。

[0096] 一実施形態において細胞分泌物は、タンパク質として、

- ・PA群：ピンキュリン (P18206)、インテグリン β -1, CD29 (P05556)、ピルビン酸キナーゼM1/2 (P14618)、およびエフリンタイプ-A受容体2 (P29317) の組み合わせを少なくとも含むものであってよく、

- ・PB群：ピンキュリン (P18206)、インテグリン β -1, CD29 (P05556)、ピルビン酸キナーゼM1/2 (P14618)、およびエフリンタイプ-A受容体2 (P29317) の組み合わせと、アミノペプチダーゼN (P15144)、アネキシンA2 (P07355)、アネキシンA6 (P08133)、ミオフェルリン (Q9NZM1)、および5'-ヌクレオチダーゼ, CD73 (P21589) からなる群より選択される少なくとも1つとを少なくとも含むものであってもよく、

- ・PC群：ピンキュリン (P18206)、インテグリン β -1, CD29 (P05556)、ピルビン酸キナーゼM1/2 (P14618)、およびエフリンタイプ-A受容体2 (P29317) の組み合わせと、アミノペ

プチダーゼN (P15144)、アネキシンA2 (P07355)、アネキシンA6 (P08133)、ミオフィェルリン (Q9NZM1)、および5'-ヌクレオチダーゼ、CD73 (P21589) の組み合わせと、モエシン (P26038)、インテグリン α -2, CD49b (P17301)、インテグリン α -3, CD49c (P26006)、2', 3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ (P09543)、Fアクチンキャッピングタンパク質 β サブユニット (P79136)、ニューロピリン1 (O14786) およびテネイシンC (P24821) からなる群より選択される少なくとも1つと、を含むものであってもよく、あるいは、

・PD群：図4Aおよび図4Bに記載されたすべてのタンパク質を含むものであってもよい。

[0097] 一実施形態において細胞分泌物は、miRNAとして、

・RA群：hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-155-5p (MIMAT0000646)、hsa-miR-379-5p (MIMAT0000733)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-21-5p (MIMAT0000076)、hsa-let-7a-5p (MIMAT0000062)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-409-3p (MIMAT0001639)、hsa-let-7a-5p (MIMAT0000062)、およびhsa-let-7f-5p (MIMAT0000067) の組み合わせを少なくとも含むものであってもよく、

・RB群：hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-155-5p (MIMAT0000646)、hsa-miR-379-5p (MIMAT0000733)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p (

MIMAT0000737)、hsa-miR-16-5p (MIMAT000069)、hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-21-5p (MIMAT0000076)、hsa-let-7a-5p (MIMAT0000062)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-409-3p (MIMAT0001639)、hsa-let-7a-5p (MIMAT0000062)、およびhsa-let-7f-5p (MIMAT0000067)の組み合わせと、hsa-miR-151a-3p (MIMAT0000757)、hsa-miR-93-5p (MIMAT0000093)、hsa-miR-29a-3p (MIMAT0000086)、hsa-miR-9-5p (MIMAT0000441)、hsa-miR-25-3p (MIMAT0000081)、hsa-miR-92a-3p (MIMAT0000092)、hsa-miR-34a-5p (MIMAT0000255)、hsa-miR-26a-5p (MIMAT0000082)、hsa-miR-26b-5p (MIMAT0000083)、hsa-miR-29a-3p (MIMAT0000086)、hsa-miR-9-5p (MIMAT0000441)、hsa-miR-155-5p (MIMAT0000646)、hsa-miR-92a-3p (MIMAT0000092)、hsa-miR-103a-3p (MIMAT0000101)、およびhsa-miR-26a-5p (MIMAT0000082)からなる群より選択される少なくとも1つと、を少なくとも含むものであってもよく、

・RC群: hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-155-5p (MIMAT0000646)、hsa-miR-379-5p (MIMAT0000733)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-382-5p (MIMAT0000737)

7)、hsa-miR-21-5p (MIMAT0000076)、hsa-let-7a-5p (MIMAT0000062)、hsa-miR-16-5p (MIMAT0000069)、hsa-miR-409-3p (MIMAT0001639)、hsa-let-7a-5p (MIMAT0000062)、およびhsa-let-7f-5p (MIMAT0000067)の組み合わせと、hsa-miR-151a-3p (MIMAT0000757)、hsa-miR-93-5p (MIMAT0000093)、hsa-miR-29a-3p (MIMAT0000086)、hsa-miR-9-5p (MIMAT0000441)、hsa-miR-25-3p (MIMAT0000081)、hsa-miR-92a-3p (MIMAT0000092)、hsa-miR-34a-5p (MIMAT0000255)、hsa-miR-26a-5p (MIMAT0000082)、hsa-miR-26b-5p (MIMAT0000083)、hsa-miR-29a-3p (MIMAT0000086)、hsa-miR-9-5p (MIMAT0000441)、hsa-miR-155-5p (MIMAT0000646)、hsa-miR-92a-3p (MIMAT0000092)、hsa-miR-103a-3p (MIMAT0000101)、およびhsa-miR-26a-5p (MIMAT0000082)の組み合わせと、hsa-miR-128-3p (MIMAT0000424)、hsa-miR-222-3p (MIMAT0000279)、hsa-miR-31-5p (MIMAT0000089)、hsa-miR-381-3p (MIMAT0000736)、hsa-miR-128-3p (MIMAT0000424)、hsa-miR-24-3p (MIMAT0000080)、hsa-miR-26b-5p (MIMAT0000083)、hsa-miR-24-3p (MIMAT0000080)、hsa-miR-30a-3p (MIMAT0000088)、hsa-miR-31-5p (MIMAT0000089)、hsa-miR-128-3p (MIMAT0000424)、hsa-miR-23a-3p

(MIMAT0000078)、hsa-miR-24-3p (MIMAT0000080)、hsa-let-7d-5p (MIMAT0000065)、およびhsa-miR-654-3p (MIMAT0004814)からなる群より選択される少なくとも1つと、を少なくとも含むものであってもよく、あるいは、

・RD群：図5～図10に記載されたすべてのmiRNAを含むものであってもよい。

[0098] 他の一実施形態において細胞分泌物は、タンパク質として、上述したPA群、PB群、PC群またはPD群のタンパク質群と、miRNAとして、上述したRA群、RB群、RC群またはRD群のmiRNA群とを含むものであってよい。これにより、一実施形態に係る細胞分泌物は、これらのタンパク質およびmiRNAに起因した既知の作用を有する医薬組成物として使用することができる。

[0099] 一態様において、細胞外小胞は、脂質二重層を含む小胞である。細胞外小胞の直径は、例えば、50nm～5μm、または50nm～1000nmである。細胞外小胞のひとつであるエクソソームの直径は、例えば50nm～200nmである。エクソソームは、タンパク質、核酸、糖質、脂質等の様々な生理活性物質を含むことから、疾患の治療および診断法、医薬品、化粧品等への利用が期待される。

[0100] エクソソームは、接着細胞から培養物中、特に、培養上清中に分泌される。また、エクソソームは、非接着細胞が細胞懸濁液中に存在する場合、非接着細胞から培養上清中または細胞懸濁液中に分泌される。接着細胞または非接着細胞に由来するエクソソームとしては、外胚葉性接着細胞または外胚葉性非接着細胞から得られるものであれば特に制限されない。例えば、ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース 323巻、225頁～239頁（2020年）に記載されているエクソソームが挙げられる。

[0101] エクソソームは、分子量、大きさ、形状、組成または生物活性に基づいて単離することができる。具体的には、超遠心分離による沈降物の分取、密度

勾配超遠心による分画の分取、サイズ排除クロマトグラフィーを用いた分取、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、C I M m u l t u sTM E V（B I A s e p a r a t i o n s 製）を用いた分取、タンパク質（例えば、M a g C a p t u r eTM エクソソームアイソレーションキット P S（富士フイルム和光純薬株式会社））を用いた捕捉による分取、抗体を用いた捕捉による分取、ポリエチレングリコール等のポリマーを用いた沈澱物の分取などによって単離することができる。これらの方法は、1つまたは複数を組み合わせて実施することができる。

[0102] エクソソームの性質は、細胞分泌物としてのエクソソームの製造方法において、エクソソームの活性を追跡するために使用し得る。例えば、エクソソームの活性は、静的光散乱、動的光散乱、紫外可視検出器、蛍光検出器または示差屈折率検出器を使用して確認することができる。

[0103] 純度よくエクソソームを得る観点から、エクソソームの単離または精製に際し、通常、得られた高増殖性細胞が含まれる培養用培地を、回収用培地に交換して、追加培養を行うことができる。回収用培地は、具体的には、培養上清回収用培地である。追加培養は、培養用培地による培養後に行う回収用培地による短時間の培養を意味する。追加培養の期間は、例えば6時間以上、12時間以上、18時間以上、24時間以上、36時間以上、48時間以上、または60時間以上とすることができ、例えば、96時間以下、または72時間以下とすることができる。追加培養をすることによって、高増殖性細胞とは異なる起源に由来するエクソソームであって培養用培地に含まれ得るエクソソームの混入率を下げて、目的とする高増殖性細胞に由来するエクソソームの純度を上げることができる。

[0104] 回収用培地としては、例えば、血清無添加の培地およびエクソソーム除去処理済みの培地を挙げることができる。市販のエクソソーム除去処理済み培地としては、例えば、F B S e x o s o m e - d e p l e t e d, O n e S h o t f o r m a t（G i b c o（登録商標）、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）を挙げることができる。

[0105] 回収用培地を用いた場合には、追加培養後に、遠心分離を実施して、エクソソーム含有組成物として培養上清を分取し、必要に応じて、分取された培養上清を上述したエクソソームの単離または精製方法に供することによって、エクソソームを得ることができる。

[0106] <5>高増殖性細胞および細胞分泌物の用途

一実施形態に係る高増殖性細胞から分離された細胞分泌物、例えば、上記のようにして分離または精製されたエクソソームは、種々の細胞種に対する種々の作用、例えば、神経突起伸長抑制作用、神経突起伸張作用、神経突起ネットワーク形成作用、神経細胞死予防作用および神経細胞増殖促進作用を有することが予想される。これらの機能に基づいて末梢神経細胞または中枢神経細胞に関係する障害に対する予防または治療用の医薬組成物としての有用性が期待される。

例えば、高増殖性細胞から分離された細胞分泌物の神経突起伸張抑制作用は、末梢神経細胞の分化に関して、より未分化な細胞から末梢神経細胞、特に交感神経細胞への分化を抑制することができる。このため、本開示に係る細胞分泌物を末梢神経細胞に対して用いることによって、末梢神経系、特に交感神経系を抑制することが期待できる。また例えば、高増殖性細胞から分離された細胞分泌物を中枢神経細胞に対して用いることによって、その神経突起伸張作用、神経突起ネットワーク形成作用、神経細胞死予防作用および神経細胞増殖促進作用等に基づいて、中枢神経系を活性化することが期待できる。

[0107] したがって、高増殖性細胞から分離された治療または予防としての有効量の細胞分泌物および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物、ならびに、本医薬組成物を対象へ投与することを含む治療または予防方法も本開示の範囲に包含される。本明細書において「治療」との文言には、障害の根治だけでなく、緩和および寛解など、障害の症状の改善も含まれる。

[0108] 治療または予防対象の障害としては、末梢神経細胞または中枢神経細胞に関係する障害であればよく、例えば、がん、疼痛、アルツハイマー病、パー

キンソン病、うつ病、統合失調症および痴呆症からなる群より選択される。末梢神経細胞、特に、交感神経細胞に関係する障害としては、例えば、交感神経細胞に関係するがん、疼痛等が挙げられる。中枢神経細胞に関係する障害は、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、統合失調症および痴呆症からなる群より選択される。

[0109] 薬学的に許容可能な担体としては、特に制限はなく、当該分野で公知のものが使用され、例えば生理食塩水等が挙げられる。さらに、上記作用に関連して、高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物、具体的にはエクソソームを神経細胞、例えば交感神経細胞に接触させることを含む、交感神経系の抑制方法、神経突起の伸長抑制方法等も本開示の範囲に包含される。

[0110] 本明細書において、「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。本明細書に段階的に記載されている数値範囲において、ある段階の数値範囲の上限値または下限値は、他の段階の数値範囲の上限値または下限値と任意に組み合わせることができる。

[0111] 本開示は、以下の日本国特許出願に基づくものであって、当該日本国特許出願による優先権の利益を享受するものである。また、以下の日本国特許出願の全体の内容が参照により本開示に組み入れられる：

「高増殖性細胞の製造方法、高増殖性細胞およびその用途」と題して2021年7月29日に提出された日本国特許出願第2021-124172。

[0112] 本開示に記載されたすべての文献、特許出願、および技術規格は、参照によりその全体が本開示に組み入れられる。

実施例

[0113] 実施例1：阻害剤添加培地によるヒトアストロサイトの長期培養

以下に示す材料および試薬、培養用製品を用いて、ヒトアストロサイトの長期培養を行った。

[0114] <材料>

・Normal Human Astrocytes (NHA) (CC-

2565、Lonza)

<使用試薬および培養用製品>

- ・培養用培地：AGM Astrocyte Growth Medium Bullet Kit (CC-3186、Lonza) (AGMの組成：基礎培地、FBS (3% (v/v))、L-グルタミン、アスコルビン酸、hEGF、インスリン、抗生物質)、
- ・阻害剤Y：Culture Sure (登録商標) Y-27632 (034-24024、富士フイルム和光純薬株式会社)、終濃度：10 μ M、
- ・阻害剤A：Culture Sure (登録商標) A-83-01 (035-24113、富士フイルム和光純薬株式会社)、終濃度：0.5 μ M、
- ・細胞剥離剤：Accutase (AT104、ICT)、
- ・細胞用緩衝液：リン酸緩衝塩水溶液 (ダルベッコ；カルシウムおよびマグネシウム不含) (BND SBN200、KAC)、
- ・細胞凍結用培地：CELLBANKER 1 (CB011 TaKaRa (日本全薬工業株式会社))、
- ・細胞培養用ディッシュ 60mm (150462、Thermo Fisher Scientific)、
- ・細胞培養用ディッシュ 100mm (150466、Thermo Fisher Scientific)、
- ・細胞培養用ディッシュ 150mm (150468、Thermo Fisher Scientific)、
- ・Stericup Quick Release-GP Sterile Vacuum Filtration System (S2GPU02RE、Merck Millipore)、
- ・培養上清回収用阻害剤非含有培地：DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (C11995500CP、Gibco (登録商標)、Thermo Fisher Scientific) およびN-2 Supplement (100X) (17502-04

8、Gibco（登録商標）、Thermo Fisher Scientific）

[0115] <長期培養の手順>

長期培養は下記の手順に従って行った。ヒトアストロサイト細胞（NHA）の凍結チューブを37℃のウォーターバスで融解した。次いで、溶解後の細胞を計10mLになるよう培養用培地に移し、180×g、3分間、室温で遠心分離に供した後、培地を除去した。細胞を阻害剤Yのみ添加群（以下、NHA-Y群）、阻害剤Aのみ添加群（以下、NHA-A群）、阻害剤Y＋阻害剤A添加群（以下、NHA-YA群）、無添加群（Normal群）の4群に分けて、再度、培養用培地に懸濁し、6ウェルプレート（細胞培養用マルチディッシュ 6 well（140675、Thermo Fisher Scientific。以下、省略）へ4.2×10³細胞/cm²の播種密度で播種した。翌日、培地を、表2に記載のとおり各群に対して各阻害剤含有（または非含有）培養用培地（各阻害剤の濃度は、上述のとおり）に交換し、培養を継続させた。培養期間中、顕微鏡による細胞の観察と写真撮影を行った。

[0116] 培地交換は、1日または2日おきにとし、それぞれ阻害剤含有（または非含有）の新鮮な培養用培地に交換した。80～90%コンフルエントに達したあたりで細胞剥離剤を用いて細胞を剥がし、各阻害剤含有（または非含有）培養用培地に懸濁して、6ウェルプレートへ4.2×10³細胞/cm²の播種密度で継代した。継代を交えながら41日間、各阻害剤含有（または非含有）培養用培地で培養を行った。

[0117] 各群の細胞の継代回数と最終継代日までの日数を下記表1に、培養日数と総細胞数との関係を表2に、それぞれ示す。

[0118]

[表1]

阻害剤の 添加パターン	継代回数 (回)	最終継代日までの 日数 (日)
Y	5	29
A	4	30
YA	6	37
Normal	3	22

[0119] [表2]

培養 日数 (日)	細胞数 ($\times 10^4$ 個)			
	Y	A	YA	Normal
0	8.00	8.00	8.00	8.00
5	87.25	55.75	28.00	104.50
8	245.39			
9			128.63	
13	391.09		751.65	182.88
15		264.81		
16				
19	733.30		5026.68	
20				
22				234.31
23		595.83		
26			22305.87	
27				
29	756.21			
30		1005.46		
33				
35				
37			98285.24	

[0120] 表1に示されるとおり、Normal群では、阻害剤接触後22日間経過後に増殖が停止したが、NHA-YA群では、最大阻害時接触後37日間、細胞の増殖が継続したことがわかった。さらに、表2からわかるとおり、増殖によって得られた細胞数についても、NHA-YA群の細胞数は、Normal群の細胞数の約400倍であった。全ての実験群において、最終継代

日以降、培地交換しながら培養開始後41日目まで観察し続けた。培養開始後41日目の細胞形態(100倍に拡大)を図1に示す。なお、図1において「P」は継代数を示し、例えば「Y-P5」とは、5継代細胞であって、阻害剤Yを含む培地を用いて培養された細胞群であることを意味する。

[0121] 実施例2：培養上清中のエクソソームの回収および確認

＜ヒトアストロサイト細胞の培養上清の回収＞

以下の手順に沿って、YA含有培養用培地または阻害剤非含有培地を用いてヒトアストロサイト細胞を培養したときの培養上清をそれぞれ回収した。

[0122] (1) YA含有培養用培地でのヒトアストロサイト細胞の培養における培養上清回収

凍結しておいたヒトアストロサイト細胞を、実施例1と同様に、融解して一度培地でウォッシュ後、細胞を培養用培地に再度懸濁し、60mm細胞培養用ディッシュに、 3.5×10^3 細胞/cm²の播種密度で播種した。翌日、YA含有培養用培地で培地交換し、培養を継続させた。80～90%コンフルエントに達したあたりで細胞剥離剤を用いて細胞を剥がし、YA含有培養用培地に懸濁して100mm細胞培養用ディッシュへ 3.5×10^3 細胞/cm²の播種密度で継代した。YA含有培養用培地で培養された細胞群を、実施例1と同様に、NHA-YA群と称する。

[0123] NHA-YA群について、5回継代し、計60日YA含有培養用培地で培養してかなりの細胞数が確保できたため、150mm細胞培養用ディッシュへ 8×10^3 細胞/cm²の播種密度で播種した。このとき播種した細胞数は1ディッシュあたり 1.16×10^6 細胞であり、ディッシュを6枚使用したため、播種総細胞総数は 6.96×10^6 細胞であった。

[0124] 翌日、培地をYA含有培養用培地から回収用培地に、20ml/150mmディッシュの容量で交換し、追加培養を開始した。なお、回収用培地として、YA含有培養用培地からFBSのみを除いた培地を用いた。追加培養開始の2日後に、ディッシュから追加培養の培養上清を回収してチューブに移し、2,000×g、10分間、4℃で遠心分離した後、0.22μmフィ

ルターシステムでろ過し、4℃で保存した。培養上清回収後のディッシュ上に残った細胞を、細胞剥離剤を用いて剥がし、細胞数をカウントしたところ、NHA-YA群として得られた総細胞数は 5.10×10^6 細胞であり、播種総細胞総数に対する残存率は73.3%であった。

[0125] (2) 阻害剤非含有培養用培地（対照）中でのヒトアストロサイト細胞の培養における培養上清回収

凍結しておいたヒトアストロサイト細胞を、実施例1と同様に、融解して一度培地でウォッシュ後、細胞を培養用培地に再度懸濁し、60mm細胞培養用ディッシュへ 3.5×10^3 細胞/cm²の播種密度で播種した。阻害剤を含まない培養用培地で培養された細胞群を、実施例1と同様に、Normal群と称する。

[0126] Normal群について、2回継代し、計26日間阻害剤を含まない培養用培地で培養し、150mm細胞培養用ディッシュへ 8×10^3 細胞/cm²の播種密度で播種した。このとき播種した細胞数は1ディッシュあたり 1.16×10^6 細胞であり、ディッシュを2枚使用したため、播種総細胞総数は 2.32×10^6 細胞であった。

[0127] 翌日、培地を培養用培地から、DMEMにN-2 Supplementを加えた回収用培地に、20ml/150mmディッシュの容量で交換して追加培養を開始した。追加培養開始の2日間後に、ディッシュから追加培養の培養上清を回収してチューブに移し、2,000×g、10分間、4℃で遠心分離した後、0.22μmフィルターシステムでろ過し、4℃で保存した。培養上清回収後のディッシュ上に残った細胞を、細胞剥離剤を用いて剥がし、細胞数をカウントしたところ、Normal群として得られた総細胞数は 8.25×10^5 細胞であり、播種総細胞総数に対する残存率は35.6%であった。上清を2,000×g、10分間、4℃で遠心した後、0.22μmフィルターシステムでろ過し、4℃で保存した。回収用培地に交換する前後の細胞形態を図2に示す。

[0128] <培養上清中の細胞数、粒子数および粒径分布の測定>

上記で回収されたNormal群およびNHA-YA群それぞれの追加培養の培養上清を、細胞用緩衝液（使用前に0.22 μ mフィルターでろ過したもの）で5倍希釈した後、NanoSight LM10（Malvern Panalytical）により、粒子数と粒径分布を確認した。ブランクとして、細胞用緩衝液中の粒子数も測定し、各培養上清の測定値から細胞用緩衝液中の粒子数を減算することによって、培養上清中の粒子数を計算した。粒子数と粒径分布の確認はそれぞれ2回行った。回収された追加培養の培養上清に含まれる粒子の粒子数と粒子サイズの一例を表3に、粒径分布を図3Aおよび図3Bにそれぞれ示す。なお図3Aおよび図3Bにおいて、粒子数（10⁶個/mL）を縦軸に示し、粒子サイズ（nm）を横軸に示す。

[0129] [表3]

追加培養の 培養上清種類	粒子数 ($\times 10^8$ /mL)	粒子サイズ (ピーク、nm)
Normal群	7.54	93, 128, 207
NHA-YA群	27.10	112, 155, 192, 360

[0130] 表3および図3Bから明らかなように、NHA-YA群の培養上清中には、粒径100nm～200nmに複数のピークが確認でき、エクソソームが含まれていることがわかった。また、NHA-YA群の培養上清に含まれるエクソソームの量は、Normal群と比較して多いことも確認できた。その後、タンジェンシャルフローフィルトレーション、限外ろ過等の精製方法によって、後述するように、粒径100nm～200nmのピークの粒子を単離または精製することができた。

[0131] 実施例3-1：定量PCRによる外胚葉性細胞マーカーの確認（1）

実施例1の培養に出発材料として用いたアストロサイトの細胞群と、得られた外胚葉性細胞集団について、以下の外胚葉性細胞マーカー遺伝子について発現量を検討した。以下に記載したNCBIのデータベースであるRefSeqのaccession番号で登録されている配列を元に検出用プライ

マーを作製した。

- ・ Notch1 (vX1も含む) (NM_017617)
- ・ Nestin (NM_006617)
- ・ SOX2 (SRY-box transcription factor 2) (NM_003106)
- ・ S100B (S100 calcium binding protein B) (NM_006272)
- ・ NG2 (Chondroitin sulfate proteoglycan 4) (NM_001897)
- ・ GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (v1, v4, vX1, vX3) (NM_002055)

[0132] <cDNAの合成>

以下のサンプルより常法に従ってRNAを抽出し、当該RNAを用いてcDNAを合成した。RNA試料の調製および反応条件の設定は、製品添付のプロトコールにしたがった。

サンプル：

- ・ Normal Human Astrocytes (NHA) (購入した初代細胞を起眠して増殖させ凍結したものを、再び起眠し4日間培養したもの。継代なし。)、
- ・ NHA-YA (購入した初代細胞を起眠して増殖させ凍結したものを、再び起眠しYAを含む培地で28日間培養した後凍結したものを、再々起眠しYAを含む培地で14日間培養したもの。14日間の培養期間中、1回継代した。)

- [0133] 試薬：High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (アプライド・バイオシステムズ)、
- 機器：SimpliAmp Thermal Cycler (アプライド・バイオシステムズ)

[0134] <定量PCR>

作製した検出用プライマーを下記表4に示す。これらプライマーを用いて、定量PCRによって外胚葉性細胞マーカー遺伝子の発現を検討した。RNA試料の調製および反応条件の設定は、製品添付のプロトコールに従った。

[0135] [表4]

遺伝子	フォワードプライマー		リバースプライマー	
	塩基配列	配列番号	塩基配列	配列番号
Notch1	CACAAGGTGTCTTCCAGATCCT	1	GGCATCCACATTGTTACGG	2
Nestin	GCGTTGGAACAGAGTTGGA	3	GAGCGATCTGGCTCTGTAGG	4
SOX2	CATGGACAGTTACGCGCAC	5	AGCTGGTCATGGAGTTGACTG	6
S100B	GGTGAGACAAGGAAGAGGATGT	7	GATGAGCTCCTCAGTTCGGA	8
NG2	TGCTGTTCTCACACAGAGGAAC	9	TTCAGCGAGAGGAGCACTTG	10
GFAP	CTTGCAAGGAGTACCAGGACC	11	TTGAGGTGGCCTTCTGACAC	12
ACTB (コントロール)	TGAAGGTCGGAGTCAACGATTGGT	13	GAAGATGGTGATGGGATTTC	14
GAPDH (コントロール)	ATTGCCGACAGGATGCAGA	15	GAGTACTTGCCTCAGGAGGA	16

[0136] 試薬: Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (インビトロジェン)、

機器: StepOnePlus Real-Time PCR System (アプライド・バイオシステムズ)

[0137] 定量PCRによる、神経上皮細胞のマーカーであるNotch1、Nestin、SOX2の各マーカーならびに放射状グリア細胞のマーカーであるNestinの各マーカーの発現確認結果、および、アストロサイトのマーカーであるGFAPおよびS100Bならびにオリゴデンドロサイト前駆体細胞のマーカーであるNG2の発現確認結果を、それぞれ、表5および表6に示す。

[0138] 表5および表6では、NHA-YAでの各マーカー遺伝子の発現量（コントロール遺伝子に対する発現量）を、NHAでの各発現量を「1」としたときの相対値として示した。表5は、コントロール遺伝子としてACTB遺伝子を用いた場合の各マーカーの発現量を、表6は、コントロール遺伝子としてGAPDH遺伝子を用いた場合の各マーカーの発現量を表す。

[0139]

[表5]

遺伝子種類		発現量
対象	コントロール	NHA-YA
Notch1	ACTB	0.70
Nestin	ACTB	0.33
SOX2	ACTB	0.26
GFAP	ACTB	2.48
S100B	ACTB	5.32
NG2	ACTB	4.06

[0140] [表6]

遺伝子種類		発現量
対象	コントロール	NHA-YA
Notch1	GAPDH	0.53
Nestin	GAPDH	0.25
SOX2	GAPDH	0.20
GFAP	GAPDH	1.89
S100B	GAPDH	4.04
NG2	GAPDH	3.08

[0141] 表5および表6に示されるように、得られた細胞集団（NHA-YA）においては、原料として用いたアストロサイト（NHA）と比較して、アストロサイトのマーカーであるGFAPおよびS100Bとオリゴデンドロサイト前駆体細胞のマーカーであるNG2との双方において、より高い発現が認められた。

[0142] これらの結果から、得られた細胞集団（NHA-YA）は、成熟細胞であるアストロサイトの特徴と前駆細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞の特徴とを兼ね備え、アストロサイトよりも高い増殖能を有する細胞であることがわかった。このNHA-YAは、アストロサイトよりも短時間でより多く増殖することができる。また、短時間でより多くのエクソソームを得るには、NHA-YAを用いることが有利であることがわかる。

[0143] 実施例 3-2 : 定量 PCR による外胚葉性細胞マーカーの確認 (2)

実施例 1 の培養に出発材料として用いたアストロサイトの細胞群と、得られた外胚葉性細胞集団について、実施例 3-1 と同様にして、以下の外胚葉性細胞マーカー遺伝子の発現量を定量 PCR によって測定した。各マーカー遺伝子の検出用プライマーは、以下に記載した NCBI のデータベースである RefSeq の accession 番号で登録されている配列を元に作製した。

・ SLC1A2 (solute carrier family 1 member 2) (v1、v2、v3、vX1~vX7 も含む) (NM_004171)

・ SLC1A3 (solute carrier family 1 member 3) (v1~v5、vX1、vX2、vX3) (NM_004172)

・ OLIG2 (oligodendrocyte transcription factor 2) (NM_005806)

・ PAX6 (paired box 6) (v1~v48) (NM_000280)

・ ALDH1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1) (v1、v2、v3、vX1、vX2、vX3) (NM_001270364)

・ Musashi1 (musashi RNA binding protein 1; MSI1) (v1、vX1~vX10) (NM_002442)

[0144] 作製した検出用プライマーを下記表 7 に示す。これらプライマーを用いて、定量 PCR によって外胚葉性細胞マーカー遺伝子の発現を検討した。RNA 試料の調製および反応条件の設定は、製品添付のプロトコールに従った。なお、定量 PCR の測定機器としては、Musashi1 については、SimpliAmp Thermal Cycler (アプライド・バイオシス

テムズ) またはCFX96 Touch Real-time PCR Detection system (バイオ・ラッド) を使用し、その他のマーカー遺伝子については、実施例3-1で使用したのと同じ測定機器を使用した。

[0145] [表7]

遺伝子	フォワードプライマー		リバースプライマー	
	塩基配列	配列番号	塩基配列	配列番号
SLC1A2	GCCGGATAGTGCTGAAGAGG	17	GGCATATTGTTGGCACCTTCC	18
SLC1A3	TGACATCTGTCGGCCTGC	19	GGAGGCGATCCAGGAACC	20
OLIG2	ATAGATCGACGCGACACCAG	21	CTTTCGCAGGGTCCTCCTTC	22
PAX6	CAAGCAACAACAGCAGCACA	23	CGGATGTCTGTCCACTCTCAC	24
ALDH1L1	CGTGCGGAGAGTGGTAGAAG	25	GGCAGTACTCCATCAGCTTCA	26
Musashi1	AATCCGTGTAGAGCGGACC	27	GCAGTGAGAGGAATGGCTGT	28

[0146] 結果を表8および表9に示す。表8および表9では、NHA-YAでの各マーカー遺伝子の発現量（コントロール遺伝子に対する発現量）を、NHAでの各発現量を「1」としたときの相対値として示した。表8は、コントロール遺伝子としてACTB遺伝子を用いた場合の各マーカーの発現量を、表9は、コントロール遺伝子としてGAPDH遺伝子を用いた場合の各マーカーの発現量を表す。

[0147] [表8]

遺伝子種類		発現量
対象	コントロール	NHA-YA
SLC1A2	ACTB	12.52
SLC1A3	ACTB	1.22
OLIG2	ACTB	0.09
PAX6	ACTB	0.22
ALDH1L1	ACTB	0.25
Musashi1	ACTB	0.83

[0148]

[表9]

遺伝子種類		発現量
対象	コントロール	NHA-YA
SLC1A2	GAPDH	9.49
SLC1A3	GAPDH	0.92
OLIG2	GAPDH	0.07
PAX6	GAPDH	0.17
ALDH1L1	GAPDH	0.16
Musashi1	GAPDH	0.72

[0149] 実施例4：NHA-YA由来エクソソームのプロテオーム解析

＜NHA-YA由来エクソソームの回収＞

NHAを含有する細胞培養液が保管された凍結チューブを37℃のウォーターバスで融解した。次いで、溶解後の細胞を計10mLになるようYA含有培養用培地に移し、180×g、3分間、25℃で遠心分離に供した後、培地を除去した。得られたNHAをYA含有培養用培地に懸濁させ、6ウェルプレートへ4、 2×10^3 細胞/cm²の播種密度で継代した。2回の継代を交えながら11日間、YA含有培養用培地で培養を行った。

[0150] その後、培地をYA含有培養用培地から回収用培地に、20mL/150mmディッシュの容量で交換し、追加培養を37℃で72時間行った。回収用培地として、YA含有培養用培地中のFBSの代わりにエクソソームが除去されたFBS[3%(v/v)]を含有する培地を使用した。追加培養は1、 1.6×10^5 細胞/150mmディッシュの播種密度で行った。追加培養後、ディッシュから追加培養の培養上清を回収してチューブに移し、2,000×g、10分間、4℃で遠心分離した後、0.22μmフィルターシステムでろ過し、エクソソーム含有溶液を調製した。

[0151] ＜エクソソームのプロテオーム解析1＞

上記で得たエクソソーム含有溶液をトリクロロ酢酸で沈殿処理し、次いで、5mM ジチオステイトールのTris緩衝液溶液を加え、35℃、2時間の還元処理を行った。還元後のサンプルに、14mM ヨードアセトアミ

ドのT r i s緩衝液溶液を加え、遮光条件下、25℃、30分間反応を行った。次いで、トリプシン処理を37℃で、20時間行い、エクソソームを分解した。得られたエクソソームの分解物を陽イオン交換カラムにて溶媒置換した後、脱塩および濃縮し、LC-MS/MS分析に供した。HPLC装置にはEASY-nLC 1200 System (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を、カラムには、EASY-Spray column、15cm×75μmID、3μm particles、100Å pore size (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を使用した。LC-MS/MS分析により得られたスペクトルのプロダクトイオン測定データを元に、MASCOT server (<https://www.matrixscience.com/help.html>) を用いてデータベース検索を行った。続いて、得られた結果を以下の2つのデータベースに照らし合わせて、エクソソーム画分と培地成分とを合わせて合計1798種類のタンパク質断片を検出した。

・ヒト由来タンパク質：SwissProt (配列数20376)

・ウシ由来タンパク質：UniProtKB (配列数47043)

[0152] エクソソーム画分のSwissProt上で検出された全1285個のマーカタンパク質からQuantitative Value (検出されたスペクトル数。補正あり。) が5以上のものを選出し、520個のマーカタンパク質を抽出した。抽出した520個のタンパク質の中から、特徴的なタンパク質を選出し、選出したタンパク質が培地中の成分ではないことを確認すると共に、ウシ由来タンパク質であった場合には、ヒト由来タンパク質での同定確率を検討し、同定確率が高いものを選出した。以下に、特徴的なタンパク質の選出ステップについて述べる。

[0153] a : 大脳に特徴的なタンパク質の選出ステップ

(a1) 上記で抽出した520個のタンパク質をTissue Enrich (<https://tissueenrich.gdc.b.iasta>

te. edu) で検索した。ここで、Human Protein Atlas のデータセット、および組織特異的遺伝子の全てを検索対象とした；

(a 2) 大脑に特異的な遺伝子を 22 個選出した；

(a 3) 上記 (a 2) で選出した 22 個の遺伝子のうち、培地サンプルで検出されなかった遺伝子を 12 個選出した；

(a 4) 上記 (a 3) で選出した 12 個の遺伝子のうち、ヒトタンパク質である可能性が高い遺伝子を 8 個選出した；

(a 5) 上記 (a 4) で選出した 8 個の遺伝子のうち、疾患との関連が高い遺伝子を 5 個選出した。

上記ステップ (a 1) ～ (a 5) により選出された 5 個の遺伝子がコードするタンパク質を図 4 に記す。

[0154] b : 膜タンパク質、細胞外領域等に特徴的なタンパク質の選出ステップ

(b 1) 上記で抽出した 520 個のタンパク質のうち、Scaffold Proteome viewer の GO で「membrane」に括られているタンパク質として 409 個のタンパク質を選出した；

(b 2) 上記で抽出した 520 個のタンパク質のうち、Scaffold Proteome viewer の GO で「extracellular region」に括られているタンパク質として 443 個のタンパク質を選出した；

(b 3) 上記で抽出した 520 個のタンパク質のうち、Scaffold Proteome viewer の GO で「membrane」と「extracellular region」のいずれにも括られていないタンパク質として 15 個のタンパク質を選出した；

(b 4) 上記ステップ (b 1)、(b 2) および (b 3) で抽出したタンパク質のうち、培地サンプルに含まれていないタンパク質として 35 個のタンパク質を選出した。選出した 35 個のうち、14 個については、下記のステップ (c 1) ～ (c 3) により選出されたタンパク質と重複する。

上記ステップ (b 1) ～ (b 4) により選出された 35 個のタンパク質を

図4に記す。

[0155] <エクソソームのプロテオーム解析2>

上記選出ステップaおよび選出ステップbとは異なる選出ステップcで特徴的なタンパク質を選出した。

c： 特徴的なタンパク質の選出ステップ

(c1) SwissProt_Homo sapiensとUniProtKB_Bos taurusとを合わせた、全1562個の配列からエクソソーム画分のQuantitative Valueが20以上のものを103個選出した；

(c2) 上記(c1)で選出した103個の配列の中で、培地サンプルでのQuantitative Valueが10以下のものを65個選出した；

(c3) 上記ステップ(c2)で選出した65個の配列について、論文検索サイトPubMed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)により中枢神経疾患と関連するもの、または脳、神経細胞の増殖、発生、分化、形態形成、移動、代謝などに関与していることが推定されるものを20個選出した。選出した20個のうち、14個については、上記ステップ(b1)～(b4)により選出されたタンパク質と重複する。

上記ステップ(c1)～(c3)により選出された20個のタンパク質を図4に記す。

[0156] 上記選出ステップa～cによって、合計46個のタンパク質を選出することができた(図4参照)。

[0157] 実施例5：NHA-YA由来エクソソームのmiRNA解析

<NHA-YA由来エクソソームの回収>

NHAを含有する細胞培養液が保管された凍結チューブを37℃のウォーターバスで融解した。次いで、溶解後の細胞を計10mLになるようYA含有培養用培地に移し、180×g、3分間、25℃で遠心分離に供した後、

培地を除去した。得られたNHAをYA含有培養用培地に懸濁させ、6ウェルプレートへ4、 2×10^3 細胞/cm²の播種密度で継代した。4回の継代を交えながら47日間、YA含有培養用培地で培養を行った。

[0158] その後、培地をYA含有培養用培地から回収用培地に、20mL/150mmディッシュの容量で交換し、追加培養を37℃で48時間行った。回収用培地として、実施例4で用いた回収用培地を使用した。追加培養は1、 16×10^6 細胞/150mmディッシュの播種密度で行った。追加培養後、ディッシュから追加培養の培養上清を回収してチューブに移し、2,000×g、10分間、4℃で遠心分離した後、0.22μmフィルターシステムでろ過し、エクソソーム含有溶液を調製した。

[0159] <NHA-YA由来エクソソームからのRNAの抽出>

上記で得られたエクソソーム含有溶液205mLを、超遠心機Optima XE-90 (Beckman Coulter) を用いて、250,000×g、70分間、4℃で遠心分離に供した後、上清を除去し、エクソソーム画分を得た。次いで、miRNeasy Mini Kit (217004、Qiagen) を用いて、得られたエクソソーム画分からRNAを抽出した。その結果、エクソソーム画分230μLからトータルRNA41.8ngを回収した。

[0160] <RNA解析>

上記で得られたRNAをAgilent RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies) およびAgilent small RNA kit (Agilent Technologies) を使用してAgilent 2100 Bioanalyzerによりクオリティーチェックを行った。クオリティーチェック後、ディレクショナル (Stranded) 用RNAライブラリー調製キット、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illuminaを用いて、上記で得られたトータルRNAからRNAライブラリーを調製した。調製したRNAライブ

ラリーを用いてmRNA-Seq解析を行い、6538個のmRNAを検出した。

[0161] 同様にmiRNAライブラリー調製キット、QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen)、およびQIAseq miRNA NSG 96 Index IL (Qiagen)を用いて、上記で得られたトータルRNAからmiRNAライブラリーを調製した。調製したmiRNAライブラリーを用いてmiRNA-Seq解析を行い、370個のmiRNAを検出した。

[0162] シークエンスライブラリーのクオリティーチェックはHigh Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies)を使用し、Agilent 2100 Bioanalyzerにより行った。

[0163] NGSはNextSeq500、Illuminaを用いて行った(シングルエンド、75bp、平均リード数約1,000万リード)。

[0164] シーケンス後のデータは、リードの品質評価(FastQC)を行った後、GeneGlobe:Data Analysis Center (QIAGEN)にてリファレンスゲノム(Human hg38)にアライメント(マッピング)し、Trimmed mean of M values (TMM)で発現量を正規化し、各miRNAのアノテーション情報とSmall RNA組成の分類集計を含むExcel形式のファイルを作成した(解析ツール:StrandNGS v4.0、R v3.6.2;アノテーション情報:miRBase Release 21準拠)。その後、データ解析として発現変動遺伝子抽出後、ターゲット遺伝子予測からのGO解析、およびPathway解析を実施した。

[0165] <機能的マーカーmiRNAの選出>

1. パーキンソン病マーカーとしてのmiRNA

以下の文献を参照し、パーキンソン病のヒト脳組織で発現が低下しているmiRNAを42個選出した。当該miRNAを含有するエクソソームをパ

ーキンソン病患者の細胞に投与することにより、パーキンソン病患者において、外因性に当該miRNAの機能が補完され、パーキンソン病の治療効果が期待される。

文献: MicroRNAs in Parkinson's disease and emerging therapeutic targets, Neural Regeneration Research, 12 (12), pp. 1945-1959 (2017)

[0166] 次いで、この中から、NHA-YA由来のエクソソームmiRNAとして検出されるmiRNAを16個選出した。選出した16個のmiRNAを図5に示す。

[0167] 2. アルツハイマー病マーカーとしてのmiRNA

IMOTA (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/imota/>) を用いて、アルツハイマー病の病態に関連するタンパク質、特にアルツハイマー病治療薬の薬理作用に寄与する複数のタンパク質と関連することが知られる下記のタンパク質と関連付けられるmiRNAを選抜した。

[0168] 2-1. アルツハイマー病マーカーとしてのmiRNA (1)

IMOTAを用いて、大脳皮質においてアミロイド前駆体タンパク質 (APP: Amyloid Precursor Protein) と関連付けられるmiRNAを70個選出した。APPは、アルツハイマー病発症の原因の一つに上げられる老人斑、すなわち、アミロイドβタンパクの沈着物の主要構成成分である。

[0169] 次いで、この中から、NHA-YA由来のエクソソームmiRNAとして検出されるmiRNAを23個選出した。選出した23個のmiRNAを図6に示す。

[0170] 2-2. アルツハイマー病マーカーとしてのmiRNA (2)

IMOTAを用いて、大脳皮質においてBACE1 (β -site APP cleaving enzyme) と関連付けられるmiRNAを42

個選出した。アルツハイマー病発症時BACE1はAPPのN末端部分を切断することにより、異常なアミロイド β タンパクを産生する。

[0171] 次いで、この中から、NHA-YA由来のエクソソームmiRNAとして検出されるmiRNAを20個選出した。選出した20個のmiRNAを図7に示す。

[0172] 2-3. アルツハイマー病マーカーとしてのmiRNA (3)

IMOTA (<https://ccb-web.cs.unisaa.rland.de/imota/>)を用いて、大脳皮質においてNMDA受容体(N-methyl-D-aspartate receptor)と関連付けられるmiRNAを66個選出した。アルツハイマー病発症時、脳内に異常なタンパク質が蓄積することで、神経を興奮させる物質が過剰に放出される。この興奮物質によりNMDA受容体が過剰に活性化されることで、神経伝達や記憶が障害される。

[0173] 次いで、この中から、NHA-YA由来のエクソソームmiRNAとして検出されるmiRNAを27個選出した。選出した27個のmiRNAを図8に示す。

[0174] 2-4. アルツハイマー病マーカーとしてのmiRNA (4)

IMOTA (<https://ccb-web.cs.unisaa.rland.de/imota/>)を用いて、大脳皮質においてグルコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β (GSK-3 β : Glycogen synthase kinase-3 β)と関連付けられるmiRNAを58個選出した。GSK-3 β は、様々な蛋白質をリン酸化する酵素で、複数のパスウェイ制御を介して細胞の生命維持や生理機能の調節に多様な働きをしている。アルツハイマー病においては脳内でのアミロイド β タンパクの沈着や神経細胞中にタウタンパク質の蓄積を促進する。その結果として神経細胞のアポトーシスを誘発する。

[0175] 次いで、この中から、NHA-YA由来のエクソソームmiRNAとして検出されるmiRNAを24個選出した。選出した24個のmiRNAを図

9に示す。

[0176] 3. うつ病マーカーとしてのmiRNA

以下の文献を参照し、うつ病の個人における血漿中で発現が低下しているmiRNAを24個選出した。当該miRNAを含有するエクソソームをうつ病患者の細胞に投与することにより、うつ病患者において、外因性に当該miRNAの機能が補完され、うつ病の治療効果が期待される。

文献: MicroRNAs expressed in depression and their associated pathways: A systematic review and a bioinformatics analysis (Journal of Chemical Neuroanatomy 100 (2019) 101650)

[0177] 次いで、この中から、NHA-YA由来のエクソソームmiRNAとして検出されるmiRNAを13個選出した。選出した13個のmiRNAを図10に示す。

[0178] 実施例6: NHA-YA由来エクソソームによるPC-12細胞の神経突起伸長抑制試験

NHA-YA由来エクソソームによる機能性評価試験として、ラット副腎褐色細胞腫由来細胞株、PC-12細胞(RCB0009、RIKEN Bank)に対する神経突起伸長抑制試験を行った。コントロールとしては、実施例1で使用したNHA細胞に由来するエクソソームを用いた。

[0179] <試薬および培養用製品>

以下の試薬および培養用製品を使用した。

・増殖用培地:

組成: 基礎培地、10% (w/v) FBS、10% (w/v) HS、抗生物質、

基礎培地: DMEM, high glucose, pyruvate (11995-073; Gibco)、

FBS: Fetal Bovine Serum, qualified,

B r a z i l (1 0 2 7 0 - 1 0 6 ; G i b c o) 、

H S : H o r s e S e r u m , h e a t i n a c t i v a t e d , N
e w Z e a l a n d o r i g i n (2 6 0 5 0 - 0 8 8 ; G i b c o)

、

抗生物質 : A n t i b i o t i c - A n t i m y c o t i c (1 0 0 X)
(1 5 2 4 0 - 0 6 2 ; G i b c o)

・細胞剥離剤 1 : A c c u t a s e (A T 1 0 4 、 I C T) 、

・細胞剥離剤 2 : T r y p L E E x p r e s s E n z y m e (1 X) ,
フェノールレッド非含有 (1 2 6 0 4 - 0 1 3 、 G i b c o) 、

・細胞用緩衝液 : リン酸緩衝塩水溶液 (ダルベッコ ; カルシウムおよびマグ
ネシウム不含) (B N D S B N 2 0 0 、 K A C) 、

・アッセイ用培地 :

組成 : 基礎培地、添加剤、抗生物質、

基礎培地 : A d v a n c e d D M E M (1 2 4 9 1 - 0 1 5 、 G i
b c o) 、

添加剤 : G l u t a M A X S u p p l e m e n t (1 0 0 X) (3
5 0 5 0 - 0 6 1 、 G i b c o) 、

抗生物質 : A n t i b i o t i c - A n t i m y c o t i c (1 0 0
X) (1 5 2 4 0 - 0 6 2 、 G i b c o) 、

・陽性コントロール試薬 : ラット由来神経成長因子 (N G F) - β (N 2 5
1 3 - , 1 M G 、 S i g m a - A l d r i c h) 、

・培養用培地 : A G M A s t r o c y t e G r o w t h M e d i u m
B u l l e t K i t (C C - 3 1 8 6 、 L o n z a) (A G M の組成 :

基礎培地、FBS (3 % (v / v)) 、L-グルタミン、アスコルビン酸、h
E G F 、インスリン、抗生物質) (実施例 1 で使用したのと同じもの) 、

・阻害剤 Y : C u l t u r e S u r e (登録商標) Y - 2 7 6 3 2 (0 3 4
- 2 4 0 2 4 、富士フイルム和光純薬株式会社) 、終濃度 : 1 0 μ M (実施
例 1 で使用したのと同じもの) 、

- ・阻害剤A : Culture Sure (登録商標) A-83-01 (035-24113、富士フイルム和光純薬株式会社)、終濃度 : $0.5 \mu\text{M}$ (実施例1で使用したのと同じもの)、
- ・エクソソーム除去ウシ血清 : Exosome-Depleted Fetal Bovine Serum Qualified One shot (A2720803、Gibco)、
- ・ $0.22 \mu\text{m}$ フィルターシステム : Stericup Quick Release-GP Sterile Vacuum Filtration System (S2GPU02RE、Merck Millipore)、
- ・培養上清回収用培地 : AGM Astrocyte Growth Medium Bullet Kit (CC-3186、Lonza) 中の成分であるウシ血清 (FBS) の代わりに3% (w/v) のエクソソーム除去ウシ血清 (A2720803 ; Gibco) が添加されたもの、
- ・96ウェルプレート : コラーゲンIコート96ウェルプレート (4860-010、IWAKI)、
- ・細胞培養用フラスコ T-75 (430641、Corning)、
- ・細胞培養用ディッシュ 100mm : 150466、Thermo Fisher Scientific (実施例1で使用したのと同じもの)、
- ・細胞培養用ディッシュ 150mm : 150468、Thermo Fisher Scientific (実施例1で使用したのと同じもの)。

[0180] <評価用サンプルの調製>

下記の手順に従い、以下の評価用サンプルを調製し、神経突起伸長抑制試験に使用した。

(1) 対照培地 (Control medium (CM)) : 培養上清回収用培地を超速心分離して得られたもの。

(2) NHA AGM P6 : 6回継代目のNHAの培養上清を超速心分離して得られたもの。

(3) NHA-YA P6 : 6回継代目のNHA-YAの培養上清を超遠心分離して得られたもの。

上記(2)および(3)は、エクソソーム量の最終濃度が $10\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようアッセイ用培地に添加して調製した。また、上記(1)～(3)の各評価用サンプルの調製に際して使用した超遠心分離は、超遠心機(本体: Optima XE-90、ローター: SW41 Ti; Beckman Coulter)を使用して $250,000\times g$ 、70分間、 4°C の条件で行った。

[0181] <培養上清中のエクソソームの回収および確認>

以下に示す材料、試薬、および培養用製品を用いて、YA含有培養用培地または阻害剤非含有培地を用いてヒトアストロサイト細胞を培養したときの培養上清をそれぞれ回収した。

1. 材料

NHAとして、実施例1で使用したのと同じ材料を使用した。

[0182] 2. ヒトアストロサイト細胞の培養上清の回収

培養上清の回収は以下の手順に沿って行った。ヒトアストロサイト細胞(NHA)の凍結チューブを 37°C のウォーターバスで融解した。次いで、溶解後の細胞を計 10mL になるよう培養用培地に移し、 $180\times g$ 、3分間、室温で遠心分離に供した後、培地を除去した。細胞を培養用培地に懸濁し、T-75培養用フラスコ(Corning)へ 1.25×10^4 細胞/ cm^2 の播種密度で播種した。その後、 37°C で約12時間培養を行い、細胞を接着させた後、培地を「阻害剤Y+阻害剤A添加群(以下、NHA-YA群)」および「無添加群(NHA群)」のいずれかの培養用培地(各阻害剤の濃度は、上述のとおり)に交換し、培養を継続させた。

[0183] 培地交換は、1日または2日おきとし、それぞれ阻害剤含有(または非含有)の新鮮な培養用培地に交換した。7日間培養後、細胞剥離剤1を用いて細胞(継代数: 1)を剥がし、阻害剤含有培養用培地、すなわちYA含有培養用培地、および阻害剤非含有培養用培地の各培地に懸濁して、 150mm

細胞培養ディッシュへ3. 3×10^4 細胞/ cm^2 の播種密度で継代培養した。9日間培養後、同様の方法で、150mm細胞培養ディッシュへ3. $3 \sim 6.6 \times 10^4$ 細胞/ cm^2 の播種密度で5日間培養の継代を繰り返し、全5回の継代培養を合計31日間かけて行った。実施例1と同じくYA含有培養用培地で培養された細胞群をNHA-YA群、阻害剤非含有培養用培地で培養された細胞群をNormal群と称する。

[0184] 6継代目として150mm細胞培養ディッシュ5枚へNHA-YA群を3. 3×10^4 細胞/ cm^2 、Normal群を2. 3×10^4 細胞/ cm^2 の播種密度で播種した。播種総細胞総数はNHA-YA群で 5.0×10^6 細胞、Normal群で 3.5×10^6 細胞であった。

[0185] 播種後、4日間培養し、誘導後（阻害剤との接触後）35日目に、40～60%コンフルエントに達したことを確認し、培地を培養用培地から培養上清回収用培地に20mL/150mmディッシュの容量で交換し、追加培養を開始した。追加培養開始の48時間後に、ディッシュから追加培養の培養上清を回収し、その後、回収した培養上清を0.22 μm フィルターシステムでろ過し、細胞残渣が除去された、エクソソーム含有培養上清を得た。得られたろ過済みのエクソソーム含有培養上清を4℃で保存した。次いで、ディッシュに残った細胞に新しい培養上清回収用培地を添加し、培養を48時間行い、同様の方法によりろ過済みのエクソソーム含有培養上清を得た。同様の操作を合計3回行い、ろ過済みのエクソソーム含有培養上清を約300mL回収した。誘導後41日目に、培養上清を回収した後、ディッシュ上に残った細胞を、細胞剥離剤1を用いて剥がし、細胞数をカウントしたところ、得られた総細胞数はNHA-YA群で 4.42×10^7 細胞、NHA群で 1.51×10^7 細胞であり、播種総細胞総数に対する残存率はNHA-YA群で94.1%、Normal群で84.0%であった。

[0186] エクソソーム機能評価の際の対照培地（Control medium (CM)）として、細胞を播種していない150mm細胞培養ディッシュに培養上清回収用培地を20mL/150mmディッシュの容量に加え、細胞培

養時と全く同条件で培養上清を回収した。

[0187] 3. 培養上清中のエクソソームの濃縮

上記で回収されたNHA-YA群、NHA群、およびCMの培養上清180 mL分をチューブに移し、前記超遠心機を使用して250,000×g、70分間、4℃で遠心分離を行った。上清を除去した後、得られた沈降物を洗浄するために、当該沈殿物にリン酸緩衝塩水溶液を添加した後、250,000×g、70分間、4℃で遠心分離を行った。上清を除去し、洗浄された沈殿物を得た。洗浄された沈降物は培養上清容積の凡そ1/1000となるようリン酸緩衝塩水溶液にて再懸濁した。

[0188] 4. 懸濁液中の粒子数、およびタンパク量の測定

上記の方法により濃縮された培養上清由来の懸濁液を、使用前に0.22 μmフィルターでろ過したリン酸緩衝塩水溶液で100倍希釈した後、希釈液中の粒子数をZetaView X20 (Particle Metrics) により測定した。測定で得られた粒子数に希釈率、すなわち100を乗じて懸濁液中の総粒子数を算出した。アッセイ用培地中の粒子数を、リン酸緩衝塩水溶液で100倍希釈した後に測定し、得られたアッセイ用培地中の粒子数を各培養上清の測定値から減算することによって、培養上清中の粒子数を計算した。また併せて、NanoDrop (Thermo Scientific) により280 nmでの吸光度を測定し、懸濁液中のタンパク濃度を測定した。測定で得られたタンパク濃度に懸濁液の液量を乗じて懸濁液中の総タンパク量を算出した。測定結果を表10に示す。表10の「総粒子数」の欄における「aE+b」なる表記は、 $a \times 10^b$ を意味する。表10に示されるように、NHA-YA群では総タンパク量が最も多く含まれており、また、粒子数も対照培地 (CM) に比較して顕著に多いことが分かった。

[0189] [表10]

評価用サンプル	タンパク濃度 (μg/mL)	液量 (μL)	総タンパク量 (μg)	総粒子数
(1) 対照培地 (CM)	26	180	4.68	2.89E+08
(2) NHA AGM P6	123	180	22.14	5.00E+10
(3) NHA-YA P6	292	180	52.56	4.63E+10

[0190] <評価実験プロトコール>

上記のPC-12細胞の凍結チューブを37℃のウォーターバスで融解した。次いで、溶解後の細胞を計10mLになるよう増殖用培地に移し、180×g、5分間、室温で遠心分離に供した後、培地を除去した。続いて細胞を増殖用培地に懸濁し、細胞培養用ディッシュ 100mmに凡そ5,300細胞/cm²の播種密度で播種した。2日または3日おきに培地を交換しながら37℃で培養を行い、継代を交えながら細胞を増殖させた。得られたPC-12細胞を、細胞剥離剤2を用いて剥がし、アッセイ用培地にて洗浄した後、アッセイ用培地にて3.96×10⁴個/mLの密度で再懸濁した。懸濁した細胞を96ウェルプレート中に1ウェルあたり1.98×10³個/50μL培地、すなわち、6000細胞/cm²の播種密度で播種し、約12時間細胞を接着させた後、培地を上記の各評価用サンプルに交換した。その後、37℃で培養を行い、培養開始3日目、4日目、および5日目のPC-12細胞の状況を顕微鏡(BZ-X710、KEYENCE)にて観察し、観察画像を取得した。当該画像における神経様突起の長さおよび細胞数を、画像解析ソフトFiji(ImageJ2 ver. 2.3.0)のMulti-pointツール(細胞数)とStraightツール(伸長突起長)を使用して計測した。統計処理にはMicrosoft-Excelを使用した。

[0191] その結果、交感神経細胞であるPC-12細胞株に対して、エクソソームを含む上記(2)および(3)では、(1)と比較して有意な神経突起伸長が観測されず、神経突起の伸張を抑制していることが示された。

したがって、本開示のエクソソームが、PC-12細胞の神経突起を伸長する機能を備えておらず、むしろ、神経突起の伸張を抑制する機能を備えていることが示唆された。これにより、本開示のエクソソームは、交感神経系を抑制することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 高増殖性細胞の製造方法であって、
- (i) 原料となる外胚葉性細胞を用意すること、
 - (i i) 低分子シグナル伝達経路阻害剤を含む培地中で、該阻害剤を前記原料となる外胚葉性細胞に接触させて培養すること、および、
 - (i i i) 前記接触後、前記阻害剤を含む培地中で追加培養を行い、前記原料となる外胚葉性細胞よりも細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を含む培養物を得ること
- を含む、高増殖性細胞の製造方法。
- [請求項2] 前記高増殖性細胞は、前記阻害剤と接触させた28日超の培養期間後の細胞数が、該阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数の1.0倍を超える増殖能を有する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記原料となる外胚葉性細胞が、中枢神経系の細胞を含む、請求項1または2に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記原料となる外胚葉性細胞が、アストロサイトを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記阻害剤が、TGF β 受容体阻害剤およびROCK阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記TGF β 受容体阻害剤の濃度が、0.001 μ M～100 μ Mの範囲内である、請求項5に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記ROCK阻害剤の濃度が、0.001 μ M～100 μ Mの範囲内である、請求項5または6に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記高増殖性細胞が、成熟細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を前記原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現し、かつ、前駆細胞に特有の少なくとも1つの遺伝子を前記原料となる外胚葉性細胞と同じかそれ以上に発現する、請求項1～7のいずれか1項に記載の

製造方法。

- [請求項9] 前記高増殖性細胞が、Musashi1、Notch1、Nestin、およびSOX2からなる群より選択される少なくとも1つが陰性である、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項10] 外胚葉性細胞の特徴を備え、低分子シグナル伝達経路阻害剤と接触させた28日超の培養期間後の細胞数が、該阻害剤と非接触である以外は同一の培養条件で同一の培養期間にわたり培養された外胚葉性細胞の細胞数の1.0倍を超える増殖能を有する、高増殖性細胞。
- [請求項11] 前記高増殖性細胞が、Musashi1、Notch1、Nestin、およびSOX2からなる群より選択される少なくとも1つが陰性である細胞を含む、請求項10に記載の細胞。
- [請求項12] NG2の発現量が、前記阻害剤非接触の外胚葉性細胞におけるNG2の発現量よりも高い、請求項10または11に記載の細胞。
- [請求項13] 請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法より得られる高増殖性細胞または請求項10～12のいずれか1項に記載の高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物を含む培養物を得ること、および、前記細胞分泌物を、前記培養物から分離することを含む、細胞分泌物の製造方法。
- [請求項14] 細胞分泌物が、エクソソームである、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 外胚葉性前駆細胞の製造方法であって、
前記外胚葉性前駆細胞は、高増殖性細胞であり、
(i) 原料となる外胚葉性細胞を用意すること、
(ii) 低分子シグナル伝達経路阻害剤を含む培地中で、該阻害剤を前記原料となる外胚葉性細胞に接触させて、28日超の期間にわたり培養すること、および
(iii) 前記接触後、前記阻害剤を含む培地中で追加培養を行い、前記原料となる外胚葉性細胞よりも細胞増殖能が高められた高増殖性細胞を含む培養物を得ること

を含む、外胚葉性前駆細胞の製造方法。

[請求項16] 前記培養物から、前記高増殖性細胞を単離することを更に含む、請求項15に記載の製造方法。

[請求項17] タンパク質および／またはmiRNAを含む細胞分泌物であって、前記タンパク質は、ピンキュリン（P18206）、インテグリン β -1、CD29（P05556）、ピルビン酸キナーゼM1/2（P14618）、およびエフリンタイプ-A受容体2（P29317）の組み合わせを含み、

前記miRNAは、hsa-miR-382-5p（MIMAT000737）、hsa-miR-155-5p（MIMAT0000646）、hsa-miR-379-5p（MIMAT0000733）、hsa-miR-16-5p（MIMAT0000069）、hsa-miR-382-5p（MIMAT0000737）、hsa-miR-16-5p（MIMAT0000069）、hsa-miR-382-5p（MIMAT0000737）、hsa-miR-21-5p（MIMAT0000076）、hsa-let-7a-5p（MIMAT0000062）、hsa-miR-16-5p（MIMAT0000069）、hsa-miR-409-3p（MIMAT0001639）、hsa-let-7a-5p（MIMAT0000062）、およびhsa-let-7f-5p（MIMAT0000067）の組み合わせを含む、細胞分泌物。

[請求項18] エクソソームである、請求項17に記載の細胞分泌物。

[請求項19] 請求項1もしくは2に記載の製造方法により得られた高増殖性細胞または請求項10～12のいずれか1項に記載の高増殖性細胞から分泌された細胞分泌物と、

請求項17または18に記載の細胞分泌物と、

のいずれかの細胞分泌物を含む、末梢神経細胞または中枢神経細胞に關係する障害の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[請求項20] 請求項 1 もしくは 2 に記載の製造方法により得られた高増殖性細胞
または請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の高増殖性細胞から分
泌された細胞分泌物と、
請求項 17 または 18 に記載の細胞分泌物と、
のいずれかの細胞分泌物を神経細胞に接触させることを含む、交感神
経系の抑制方法。