

明 細 書

発明の名称：腸管神経前駆細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、腸管神経前駆細胞の製造方法および拡大培養方法ならびにこれらに用いられる培地に関する。

[0002] [発明の背景]

神経堤細胞（Neural Crest Cell: NCC）は、発生初期において神経板から神経管が形成される際に、神経外胚葉と表皮外胚葉の間から発生する細胞である。腸管神経前駆細胞（Enteric Neural Precursor: ENP）は、このNCCから発生し、腸管神経細胞系譜へと分化した細胞である。ENPは、腸管神経細胞およびグリア細胞への分化能を有する。

[0003] 先天的な腸管神経節細胞の欠損に起因する疾患として、消化管の運動の抑制を呈するヒルシュスプルング（Hirschsprung）病がある。近年、患者から採取してex vivoで増殖させたENPを自家移植することによりヒルシュスプルング病を治療することを目指した基礎的な試みが報告されている（非特許文献1）。

[0004] ENPを含む細胞医薬の製造のために、誘導性多能性幹細胞（inducible Pluripotent Stem Cell: iPSC）等の多能性幹細胞からNCCを誘導し、さらにNCCからENPを誘導することが検討されている。

[0005] 例えば、非特許文献2には、ヒト多能性幹細胞から腸管神経系前駆細胞（enteric nervous system progenitor）を作製したことが記載されている。非特許文献2には、PHOX2B陽性の腸管神経前駆細胞は示されておらず、さらに、ニューレグリン1（Neuregulin-1:NRG1）に関する記載もなされていない。

また、非特許文献3には、ヒトiPSCをTGF β 阻害剤、GSK3 β 阻害剤およびNRG1を含む培地で培養することにより、シュワン前駆細胞（Schwann cell precursor）を作製したことが記載されている。非特許文献3に記載される方法はレチノイン酸を用いておらず、得られるシュワン前駆細胞はENPとは異なる細胞である（例えば、ENPはPHOX2B発現が陽性であるが、同文献に記載されるシ

ユワン前駆細胞は陰性である)。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: "Postnatal human enteric neuronal progenitors can migrate, differentiate, and proliferate in embryonic and postnatal aganglionic gut environments", Pediatric Research, 2017, 81, 5, 838-846.

非特許文献2: "Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease", Nature, 2016, 531, 105-109.

非特許文献3: "Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair", Stem Cell Reports, 2017, 8, 1714-1726.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] ENPを用いた細胞治療等の実現のため、ENPを大量に供給可能な技術が求められる。上述のように、ヒト多能性幹細胞から腸管神経系前駆細胞 (enteric nervous system progenitor) を誘導する方法が報告されているものの (非特許文献2)、誘導されたENPを増殖させ拡大培養するための手法はいまだ開発されていない。

[0008] 本発明は、ENPを、腸管神経細胞およびグリア細胞への分化能 (多能性 (multipotency)) を維持したまま増殖させるための技術を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上記課題解決のため、本発明は、以下の[1]～[27]を提供する。

[1] 以下の工程を含む、腸管神経前駆細胞の製造方法。

(A1) 腸管神経前駆細胞を提供する工程。

(A2) ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中で腸管神経前駆細胞を培養する工程。

[2] 前記培地が、さらにTGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含む、[1]の製造方法。

[3] 前記培地が、さらにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む、[1]または[2]の製造方法。

[4] 前記培地が、さらにGDNFを含む、[1]～[3]のいずれかの製造方法。

[5] 前記培地が、さらにマトリゲルを含む、[1]～[4]のいずれかの製造方法。

[6] 前記ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストが、NRG1である、[1]～[5]のいずれかの製造方法。

[7] [1]～[6]のいずれかの製造方法によって得られる腸管神経前駆細胞。

[0010] [8] [7]の腸管神経前駆細胞を含む凍結ストック。

[9] [7]の腸管神経前駆細胞を含む細胞医薬。

[0011] [10] 以下の工程を含む、腸管神経前駆細胞の製造方法。

(B1) 神経堤細胞を提供する工程。

(B2) ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト、ならびにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む培地中で神経堤細胞を培養する工程。

[11] 前記神経堤細胞が、迷走神経堤細胞である、[10]の製造方法。

[12] 前記迷走神経堤細胞が、SOX10陽性、HOXB5陽性、HOXB9陰性かつPHOX2B陰性であり、
前記腸管神経前駆細胞が、SOX10陽性かつPHOX2B陽性である、[11]の製造方法。

[12a] 前記培地が、さらにTGF β 阻害剤および／またはGSK3 β 阻害剤を含む、[10]～[12]の製造方法。

[12b] 前記培地が、さらにレチノイン酸および／またはその誘導体を含

む、[10]～[12a]のいずれかの製造方法。

[12c] 前記培地が、さらにGDNFを含む、[10]～[12b]のいずれかの製造方法。

[12d] 前記培地が、さらにマトリゲルを含む、[10]～[12c]のいずれかの製造方法。

[12e] 前記ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストが、NRG1である、[10]～[12d]のいずれかの製造方法。

[12f] [10]～[12e]のいずれかの製造方法によって得られる腸管神経前駆細胞。

[0012] [13] ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む、腸管神経前駆細胞培地。

[14] さらにTGF β 阻害剤および／またはGSK3 β 阻害剤を含む、[13]の培地。

[15] さらにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む、[13]または[14]の培地。

[16] さらにGDNFを含む、[13]～[15]のいずれかの培地。

[17] さらにマトリゲルを含む、[13]～[16]のいずれかの培地。

[18] 前記ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストが、NRG1である、[13]～[17]のいずれかの培地。

[0013] [19] 以下の工程を含む、腸管神経前駆細胞の拡大培養方法。

(C1) 腸管神経前駆細胞を提供する工程。

(C2) ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中で腸管神経前駆細胞を培養する工程。

[0014] [20] 腸管神経前駆細胞と後腸細胞とを共培養する工程を含む、腸管オルガノイドの製造方法。

[21] 腸管神経前駆細胞と後腸細胞とを共培養することにより腸管オルガノイドを得る工程と、前記腸管オルガノイドを生体内に移植して人工腸管

を形成させる工程と、を含む人工腸管の製造方法。

[21a] 腸管神経前駆細胞と後腸細胞とを共培養することにより腸管オルガノイドを得る工程と、前記腸管オルガノイドをヒト以外の哺乳動物の生体内に移植して人工腸管を形成させる工程と、を含む人工腸管の製造方法。

[22] 前記腸管神経前駆細胞が、[1]～[6]のいずれか1項に記載の製造方法によって得られた腸管神経前駆細胞である、[20]～[21a]記載の製造方法。

[23] [20]または[22]の製造方法によって得られる腸管オルガノイド。

[24] [21]～[22]のいずれかの製造方法によって得られる人工腸管。

[0015] [25] ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む、腸管神経前駆細胞培地用添加剤。

[26] ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストの、腸管神経前駆細胞の拡大培養のための使用。

[27] 前記ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストが、NRG1である、[25]の添加剤または[26]の使用。

[0016] 本発明において、「神経堤細胞 (Neural Crest Cell: NCC)」とは、発生初期において神経板から神経管が形成される際に神経外胚葉と表皮外胚葉の間から発生する細胞であり、神経細胞、グリア細胞、間葉系間質細胞、骨細胞、軟骨細胞、角膜細胞および色素細胞などの多くの種類の細胞へ分化する多能性 (multipotency) と自己増殖能とを有する。NCCは、SOX10陽性である。

[0017] 「頭部神経堤細胞 (Cranial NCC)」とは、発生期において耳胞よりも頭部側から生じ、顔面の骨、軟骨および神経などに分化する細胞集団である。頭部神経堤細胞は、神経堤細胞マーカーであるSOX10陽性であり、H0XB遺伝子群 (H0XB1-10) が陰性の細胞である。

「迷走神経堤細胞 (Vagal NCC)」とは、発生期において体節1番～7番に相

当する部位から生じ、腸管神経系などに分化する細胞集団である。迷走神経堤細胞は、神経堤細胞マーカーであるSOX10陽性であり、HOXB5陽性、HOXB9陰性、かつPHOX2B陰性である。好ましくは、SOX10陽性であり、HOXB1-7陽性、HOXB9陰性、HOXB10陰性、かつPHOX2B陰性である。

「体幹神経堤細胞 (Trunk NCC)」とは、発生期において体節8番から尾側に相当する部位から生じ、自律神経系、感覚神経、色素細胞および副腎髄質のクロマフィン細胞などに分化する細胞集団である。体幹神経堤細胞は、神経堤細胞マーカーであるSOX10陽性であり、HOXB1-9陽性、HOXB10陰性かつPHOX2B陰性である。

「仙骨神経堤細胞 (Sacral NCC)」とは、発生期において最尾側に相当する部位から生じ、大腸の一部の腸管神経系などに分化する細胞集団である。仙骨神経堤細胞は、神経堤細胞マーカーであるSOX10陽性でありHOXB1~10陽性かつPHOX2B陰性である。

[0018] 「腸管神経前駆細胞 (Enteric Neural Precursor: ENP)」とは、迷走神経堤細胞および仙骨神経堤細胞から分化し、神経堤細胞およびグリア細胞のマーカーであるSOX10陽性かつPHOX2B陽性の細胞である。ENPは、PHOX2B陽性かつSOX10陰性の腸管神経細胞、および、S100 β 陽性、PLP1陽性かつSOX10陽性のグリア細胞への分化能を有する。

「腸管神経細胞」とは、腸管神経前駆細胞に由来し、PHOX2B陽性かつSOX10陰性である。

「グリア細胞」とは、S100 β 陽性、PLP1陽性かつSOX10陽性であるか、またはGFAP陽性である。本明細書においては、グリア細胞を特に「腸管グリア細胞」と称する場合がある。腸管グリア細胞は、例えば、腸管神経前駆細胞をグリア細胞へ分化させることにより得ることができる。

「腸管神経前駆細胞培地」とは、ENPの製造および／またはENPの拡大培養のために用いられる培地である。ENPの製造とは、iPS細胞、ES細胞およびNCC等の幹細胞からENPへ分化させることを含み得る。

[0019] 「腸管オルガノイド」とは、生体外で作製される組織構造体であって、ヒ

ト等の哺乳動物の腸が有する複数の機能（例えば、蠕動運動機能、粘液分泌機能、物質吸収機能等）あるいはこれらに類似した機能の1以上を有する組織構造体を意味する。腸管オルガノイドは、例えば、後腸細胞、前腸細胞等の腸管を構成する種々の細胞の由来元の細胞、および、後腸細胞、前腸細胞、腸管神経細胞、腸管神経前駆細胞、腸幹細胞（LGR5陽性）、Paneth細胞（LYZ陽性）、杯細胞（Mucin陽性）および分泌細胞等の腸管を構成する種々の細胞、ならびにこれらの細胞の由来元の細胞から選ばれる少なくとも一種の細胞を含む細胞集団により構成される。

「人工腸管」とは、腸管オルガノイドをヒトまたはヒト以外の哺乳動物の生体内に移植して成熟化させて得られる組織構造体であって、ヒト等の哺乳動物の腸が有する複数の機能（例えば、蠕動運動機能、粘液分泌機能、物質吸収機能等）あるいはこれらに類似した機能の1以上を有する組織構造体を意味する。人工腸管は、例えば、腸管オルガノイドをマウス等の哺乳動物の体内（例えば、腹腔内）に移植し、一定期間経過させることにより作製される。人工腸管は、例えば、後腸細胞、前腸細胞等の腸管を構成する種々の細胞の由来元の細胞、および、後腸細胞、前腸細胞、腸管神経細胞、腸管神経前駆細胞、腸幹細胞（LGR5陽性）、Paneth細胞（LYZ陽性）、杯細胞（Mucin陽性）および分泌細胞等の腸管を構成する種々の細胞、ならびにこれらの細胞の由来元の細胞から選ばれる少なくとも一種の細胞を含む細胞集団を含む。さらに、人工腸管は、例えば、筋肉細胞およびペースメーカー細胞などをも含み得るものであり、この場合において神経細胞は筋肉細胞間に配置される。

「後腸細胞」とは、発生過程においては内胚葉から分化する細胞であり、CDX2陽性であることを特徴とする。後腸細胞塊は、後腸細胞に加えて、上皮細胞（E-cadherin陽性）および間葉系細胞（Vimentin陽性）を含み得る。

「胚体内胚葉」とは、発生過程においては前方原始線条から分化する細胞であり、SOX17陽性かつFOXA2陽性であることを特徴とする。

[0020] 「ERBB3」とは、ERBB3遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼ受容体

であり、EGFレセプターファミリーの一つである。HER3 (human epidermal growth factor receptor 3)とも呼ばれる。ERBB3は、ERBB2とヘテロダイマーを形成し、細胞の増殖や分化に関わるシグナル経路を活性化する。ERBB3は、腸管神経前駆細胞で発現することが知られている。ERBB3にはスプライシングバリエーションが存在することが知られているが、本発明でのERBB3にはこれらのバリエーションが特に限定されることなく包含される。

「ERBB3アゴニスト」とは、ERBB3と結合してその下流のシグナル経路を活性化する能力（ERBB3アゴニスト活性）を有する物質であればよく、タンパク質、ペプチド、核酸および低分子化合物並びにこれらの誘導体などであってよい。ERBB3アゴニストには、例えば、NRG1、NRG2およびNRG6等のタンパク質がある。NRG1、NRG2およびNRG6等のタンパク質は、全長タンパク質であっても、ERBB3アゴニスト活性を有するその断片であってもよい。

「ERBB4」とは、ERBB4遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼ受容体であり、EGFレセプターファミリーの一つである。HER4 (human epidermal growth factor receptor 4)とも呼ばれる。ERBB4は、ERBB2とヘテロダイマーを形成し、細胞の増殖や分化に関わるシグナル経路を活性化する。ERBB4には、種々のスプライシングバリエーションが存在することが知られているが、本発明でのERBB4にはこれらのバリエーションが特に限定されることなく包含される。

「ERBB4アゴニスト」とは、ERBB4と結合してその下流のシグナル経路を活性化する能力（ERBB4アゴニスト活性）を有する物質であればよく、タンパク質、ペプチド、核酸および低分子化合物並びにこれらの誘導体などであってよい。ERBB4アゴニストには、例えば、NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、NRG5、BTC、EPRおよびHBEGF等のタンパク質がある。NRG1-5、BTC、EPRおよびHBEGF等のタンパク質は、全長タンパク質であっても、ERBB4アゴニスト活性を有するその断片であってもよい。

「ニューレグリン1 (Neuregulin-1: NRG1)」とは、NRG1遺伝子によりコードされるEGF様増殖因子である。Heregulinとも呼ばれる。ERBB3およびERBB4と結合し、その下流のシグナル経路を活性化することが知られている。

「グリア細胞由来神経栄養因子 (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor: GDNF)」とは、GDNF遺伝子によりコードされる因子であり、GFR α 1およびRETのアゴニストとして作用する。神経細胞およびグリア細胞の保護や、腸管神経前駆細胞の増殖に関連することが知られている。

[0021] 「マトリゲル」は、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含むEngelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品のことであり、主成分は、ラミニン、コラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ならびにエンタクチン/ニドジェン1および2であり、これらにTGF β 、上皮細胞増殖因子 (EGF)、インシュリン様成長因子 (IGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、組織プラスミノゲン活性化因子3および4、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)腫瘍に自然に産生される他の増殖因子が含まれるものである。

[0022] 「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、増殖させ (成長させ)、かつ/又は分化させることを指す。「培養する」とは、組織外又は体外で、例えば、細胞培養ディッシュ又はフラスコ中で細胞を維持し、増殖させ (成長させ)、かつ/又は分化させることを意味する。

「拡大培養」とは、所望の細胞集団を増殖させ、細胞数を増加させることを目的として培養することを意味する。細胞数の増加は、細胞の増殖による増数が死滅による減数を超えることによって達成されるものであればよく、細胞集団の全ての細胞が増殖することを要さない。細胞数の増加は、拡大培養の開始前に比して1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍以上でありうる。

「維持培養」とは、所望の細胞集団をそれらの数を維持しながら培養することを意味する。細胞数の維持は、細胞が増殖することなく生存することにより達せられるものであっても、細胞の増殖による増数と死滅による減数とが拮抗することによって達せられるものであってもよい。細胞数の維持は、細胞の数が完全に同一に維持される必要はなく、本発明の目的に照らして細胞の数が実質的に同一に維持されればよい。

「細胞集団」とは、同じ種類又は異なる種類の2以上細胞を意味する。「

細胞集団 (population) 」は、同じ種類又は異なる種類の細胞の一塊 (mass)) をも意味する。

[0023] 「接着培養」とは、細胞を容器に付着させた状態、例えば適切な培地の存在下で細胞を滅菌プラスチック (又はコーティングされたプラスチック) の細胞培養ディッシュ又はフラスコに付着させた状態、で培養することを意味する。

「浮遊培養」とは、細胞を容器に付着させずに適切な培地中に分散させた状態で培養することを意味する。

[0024] 「多能性 (pluripotency) 」とは、種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、3 胚葉のどの系統の細胞にも分化し得る能力を意味する。「多能性 (pluripotency) 」は、胚盤には分化できず、したがって個体を形成する能力はないという点で、胚盤を含めて、生体のあらゆる組織に分化しうる「全能性 (totipotency) 」とは区別される。

[0025] 「多能性 (multipotency) 」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を意味する。例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞はmultipotentだが、pluripotentではない。ENPは、神経細胞およびグリア細胞へ分化する多能性 (multipotency) を有する。

[0026] 「マーカー」とは、「マーカータンパク質」又は「マーカー遺伝子」であって、所定の細胞型において細胞表面、細胞質内および／又は核内等に特異的に発現されるタンパク質又はその遺伝子を意味する。マーカーは、陽性選択マーカー或いは陰性選択マーカーでありうる。好ましくは、マーカーは細胞表面マーカーであり、特に細胞表面陽性選択マーカーによれば、生存細胞の濃縮、単離、および／又は検出が実施可能となる。

マーカータンパク質の検出は、当該マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーなどを利用して行うことができる。マーカータンパク質に特異的な抗体としては、マーカータンパク質における特定のアミノ酸配列又はマーカータンパク質に結合した特定の糖鎖等に結合する抗体を用いることができる。また、

細胞内に発現し、細胞表面には現れないマーカートンパク質（例えば転写因子またはそのサブユニットなど）の場合は、当該マーカートンパク質とともにレポータータンパク質を発現させ、当該レポータータンパク質を検出することによって対象とするマーカートンパク質を検出できる（例えば、非特許文献4）。この方法は、適当な細胞表面マーカーが認められない場合に好ましく用いられ得る。マーカー遺伝子の検出は、当該分野で公知の核酸増幅方法および／又は核酸検出方法、例えば、RT-PCR、マイクロアレイ、バイオチップおよびRNAseq等を利用して行うことができる。

[0027] 「発現 (expression)」とは、細胞内のプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／又は翻訳として定義される。

「陽性 (positive)」または「発現する」とは、タンパク質又は遺伝子が当該分野で公知の手法による検出可能量で発現していることを意味する。タンパク質の検出は、抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。また、細胞内に発現し、細胞表面には現れないタンパク質（例えば転写因子またはそのサブユニットなど）の場合は、当該タンパク質とともにレポータータンパク質を発現させ、当該レポータータンパク質を検出することによって対象とするタンパク質を検出できる。遺伝子の検出は、例えば、RT-PCR、マイクロアレイ、バイオチップ及びRNAseq等の核酸増幅方法及び／又は核酸検出方法を利用して行うことができる。

「陰性 (negative)」または「発現されない」とは、タンパク質又は遺伝子の発現量が、上記のような公知手法の全てあるいはいずれかによる検出下限値未満であることを意味する。タンパク質又は遺伝子の発現の検出下限値は、各手法により異なりえる。

[0028] 「SOX10」は、全ての神経堤細胞、腸管神経前駆細胞およびそれに由来するグリア細胞で発現が認められる。一方、SOX10は、腸管神経細胞では発現されない。

「H0XB5」は、迷走神経堤細胞、体幹神経堤細胞および仙骨神経堤細胞で発

現しており、腸管神経細胞の正常発生に必要であることが知られている。一方、H0XB5は、頭部神経堤細胞では発現されない。

「H0XB9」は、体幹神経堤細胞および仙骨神経堤細胞で発現している。一方、H0XB9は、頭部神経堤細胞および迷走神経堤細胞では発現されない。

「PH0XB2」は、腸管神経前駆細胞およびそれに由来する腸管神経細胞で発現が認められる。

「GFAP (Glial fibrillary acidic protein)」は、グリア細胞で発現している。一方、GFAPは腸管神経前駆細胞および腸管神経細胞では発現していない。

[0029] 「～を含む (comprise(s)又はcomprising)」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。

[0030] 「約」又は「およそ」とは、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%まで変動する値を示す。好ましくは、「約」又は「およそ」という用語は、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ15%、10%、5%、又は1%の範囲を示す。

発明の効果

[0031] 本発明により、ENPを、腸管神経細胞およびグリア細胞への分化能を維持したまま増殖させるための技術が提供される。

図面の簡単な説明

[0032] [図1]本発明の第二実施形態に係るENPの製造方法の工程の一例を示す図である。

[図2]ヒトiPSCから分化された迷走神経堤細胞の遺伝子発現プロファイルを示す図である。(A)はH0XB2、H0XB3、H0XB4、H0XB5、H0XB7およびH0XB9の発現量を示し、(B)はSOX10およびEDNRBの発現量を示す。縦軸は、発現量 (Fold change) を頭部神経堤細胞における発現量を1とした比をlog2で表した値により示す。

[図3]腸管神経前駆細胞培地で迷走神経堤細胞を継代培養した際の総細胞数 (

accumulated cell number) の経時変化を示す図である。

[図4]腸管神経前駆細胞培地で迷走神経堤細胞を培養して得られた細胞のフローサイトメトリ解析結果を示す図である。(A)は培養11日目の迷走神経堤細胞におけるSOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPの発現を、(B)は継代回数(1~6回)の腸管神経前駆細胞におけるSOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPの発現を示す。

[図5]腸管神経前駆細胞培地あるいは該培地からNRG1又はGDNFを除去した培地で迷走神経堤細胞を培養して得られた細胞の蛍光像とフローサイトメトリによるSOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPの発現解析結果を示す図である。蛍光像において、赤がSOX10-tdTomatoの蛍光を、緑がPHOX2B-emGFPの蛍光を示す。

[図6]腸管神経前駆細胞培地で迷走神経堤細胞を培養して得られた細胞の遺伝子発現プロファイルを示す図である。EDNRBおよびRETは、それぞれ「endothelin receptor type B」および「ret proto-oncogene」を表す。

[図7]腸管神経誘導培地で腸管神経前駆細胞を培養して得られた細胞の蛍光免疫染色画像である。蛍光免疫染色画において、緑がPHOX2B-emGFPの蛍光を示し、紫がChAT、nNOS、GABAまたは5-HTの発現を示す。

[図8]腸管オルガノイドから形成された人工腸管の蛍光免疫染色画像であり、PHOX2B-emGFPおよびSOX10-tdTomato陽性の腸管神経前駆細胞に由来する細胞を示す。上段右画像は上段左画像の部分拡大であり、下段右画像は下段左画像の部分拡大である。蛍光免疫染色画像において、赤がSOX10-tdTomatoの蛍光を、緑がPHOX2B-emGFPの蛍光を示し、青は核を示す。

[図9]腸管オルガノイドから形成された人工腸管の蛍光免疫染色画像であり、腸管神経前駆細胞に由来するS100 β 陽性(A)、GFAP陽性(B)またはTUBB3(C)陽性の神経細胞またはグリア細胞を示す。蛍光免疫染色画像において、赤がSOX10-tdTomatoの蛍光を、緑がPHOX2B-emGFPの蛍光を示し、黄がS100 β 、GFAPまたはTUBB3の発現を示し青は核を示す。

[図10]腸管オルガノイドから形成された人工腸管の電気刺激に対する収縮弛

緩反応を計測した結果を示すグラフである。

[図11]腸管オルガノイドから形成された人工腸管の電気刺激に対する収縮弛緩反応を計測した結果を示すグラフである。

[図12]腸管オルガノイドから形成された人工腸管の電気刺激に対する収縮弛緩反応を計測した結果を示すグラフである。

[図13]拡大培養後に凍結融解した腸管神経前駆細胞の増殖能と分化能を評価した結果を示す。(A)は、拡大培養時の細胞数の経時変化(左図)と、全細胞に占める腸管神経前駆細胞の割合の経時変化(右図)を示す。(B)は、腸管神経前駆細胞(ENP、左図)とこれから分化させた腸管神経細胞(ENS、右図)におけるPHOX2BおよびSOX10の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。(C)は、腸管神経前駆細胞から分化させた腸管神経細胞およびグリア細胞の蛍光免疫染色像を示す。蛍光免疫染色像において、緑がPHOX2B-emGFPの蛍光またはGFAPの発現を示し、紫はPeripherin, ChAT, nNOS, GABA, THまたはSSTの発現を示す。

[図14]拡大培養後の腸管神経前駆細胞から分化させたグリア細胞の蛍光免疫染色画像である。

[図15]拡大培養後の腸管神経前駆細胞をマウス盲腸壁に移植して1週間経過後の移植部位の蛍光免疫染色画像である。蛍光免疫染色画像において、青は核を示し、緑がPHOX2B-emGFPの蛍光を、赤がSOX10-tdTomatoの蛍光を示し、紫はTUBB3の発現を示す。(b)は(a)の部分拡大である。

[0033] [発明の詳細な説明]

以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0034] 本発明者らは、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストの存在下で腸管神経前駆細胞(ENP)を培養することにより、ENPを腸管神経細胞およびグリア細胞への分化能を維持したまま増殖させ得ることを見出した。

この知見に基づき、本発明は、第一実施形態として、以下の工程(A1)

および工程（A 2）を含む、ENPの製造方法を提供する。

（A 1）ENPを提供する工程、ならびに

（A 2）ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中でENPを培養する工程。

[0035] 工程（A 2）においてENPは増殖するものであり、この観点において第一実施形態に係るENPの製造方法はENPの拡大培養方法と同義である。

[0036] 本発明に係るENPの製造方法においては、ENPは神経堤細胞（NCC）から分化させられて増殖させられるものであってもよい。この観点において、本発明は、第二実施形態として、以下の工程（B 1）および工程（B 2）を含む、ENPの製造方法を提供する。

（B 1）NCCを提供する工程、ならびに

（B 2）ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト、ならびにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む培地中でNCCを培養する工程。

[0037] 本発明は、第三実施形態として、以下の工程（C 1）および工程（C 2）を含む、ENPの拡大培養方法を提供する。

（C 1）ENPを提供する工程、ならびに

（C 2）ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中でENPを培養する工程。

[0038] 以下、第一実施形態に係るENPの製造方法の工程（A 1）および（A 2）、第二実施形態に係るENPの製造方法の工程（B 1）および（B 2）、ならびに第三実施形態に係るENPの拡大培養方法の工程（C 1）および（C 2）について順に説明する。

[0039] [第一実施形態に係る製造方法（ENPの増殖工程を伴う方法）]

[第一実施形態 工程（A 1）：腸管神経前駆細胞を提供する工程]

本工程では、ENPが提供される。本工程には少なくともENPが提供されればよく、単一のENP細胞、ENPの細胞集団またはENPを含む細胞集団が提供されてもよい。

本工程で提供されるENPは、商業的に入手されたENPであっても、生体から

分離されたENPであってもよく、さらに後述の方法によりNCC等から誘導したENPであってもよい。商業的に入手されるENPは、培養状態にあるENPであっても、凍結状態にあるENPであってもよい。また、ENPがNCC等からの誘導したENPである場合も、培養状態にあるENPであっても、凍結状態にあるENPであってもよい。

[0040] 生体からENPを分離する方法としては、例えば、腸管組織を1 mm四方に切り出し、酵素的処理（ディスパーゼおよびコラゲナーゼタイプXI、37℃、90分）を施した後に、得られた細胞をEGFおよびFGFを含む培地で培養し、凝集細胞としてENPを分離する方法等が知られている。分離の際に、抗CD271抗体によるセルソーティングを組み合わせ、ENPの純度を高めることも可能である。

[0041] 〔第一実施形態 工程（A2）：腸管神経前駆細胞を培養する工程〕

本工程では、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中でENPが培養される。

[0042] ERBB3アゴニストは、ERBB3と結合してその下流のシグナル経路を活性化する能力（ERBB3アゴニスト活性）を有する物質であればよく、タンパク質、ペプチド、核酸および低分子化合物並びにこれらの誘導体などであってよい。ERBB3アゴニストには、例えば、NRG1、NRG2およびNRG6等のタンパク質がある。NRG1、NRG2およびNRG6等のタンパク質は、全長タンパク質であっても、ERBB3アゴニスト活性を有するその断片であってもよい。

ERBB4アゴニストは、ERBB4と結合してその下流のシグナル経路を活性化する能力（ERBB4アゴニスト活性）を有する物質であればよく、タンパク質、ペプチド、核酸および低分子化合物並びにこれらの誘導体などであってよい。ERBB4アゴニストには、例えば、NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、NRG5、BTC、EPRおよびHBEGF等のタンパク質がある。NRG1-5、BTC、EPRおよびHBEGF等のタンパク質は、全長タンパク質であっても、ERBB4アゴニスト活性を有するその断片であってもよい。

NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、NRG5、NRG6、BTC、EPRおよびHBEGF等のタンパク質には、培養の対象とする細胞の由来種に合わせて、ヒト由来のタンパク質

、あるいは例えばサル、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット等のヒト以外の哺乳動物由来のタンパク質を適宜用いる。

これらのタンパク質は、通常の分子生物学的手法を用いてリコンビナントタンパク質として調製でき、また市販の試薬として入手することもできる。

[0043] ERBB3アゴニストおよびERBB4アゴニストは、NRG1あるいはERBB3アゴニスト活性またはERBB4アゴニスト活性を有するその断片であることが好ましい。

ヒトNRG1の全長アミノ酸配列を配列番号1 (NCBI Accession number: NP_039250) に示す。

ERBB3アゴニスト活性またはERBB4アゴニスト活性を有するNRG1の断片としては、配列番号1のアミノ酸配列から生じる、例えばアミノ酸数10~300、20~150、あるいは30~100の断片が挙げられる。

NRG1の断片は、例えば、ERBB3又はERBB4への結合ドメイン (EGF-like domain) を含む断片であってよい。結合ドメインは、配列番号1中アミノ酸番号190~220とされている。

NRG1およびその断片は、通常の分子生物学的手法を用いてリコンビナントタンパク質として調製でき、また市販の試薬として入手することもできる。ERBB3又はERBB4への結合ドメイン (EGF-like domain) を含むNRG1断片が商業的に入手可能である (例えば、Recombinant Human Heregulin β -1, Catalog Number:100-03, PEPROTECH)。

NRG1又はその断片は、配列番号1記載のアミノ酸配列又はその部分配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加された改変アミノ酸配列からなり、ERBB3アゴニスト活性またはERBB4アゴニスト活性を有するものであってもよい。

ここで、数個とは20個以下、好ましくは10個以下、より好ましくは5個以下、さらに好ましくは3個以下、最も好ましくは2個を意味する。

改変アミノ酸配列としては、配列番号1のアミノ酸配列に対して80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列とされ得る。ア

ミノ酸配列の同一性は、汎用の解析ツールにより計算することができ、例えば全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）が提供するBLASTが利用できる。

また、NRG1又はその断片は、ERBB3アゴニスト活性またはERBB4アゴニスト活性を保持し得る限りにおいて、他のタンパク質との融合タンパク質あるいは他の分子が結合された修飾タンパク質であってもよい。

[0044] タンパク質断片等についてのERBB3アゴニスト活性またはERBB4アゴニスト活性の評価は、市販のキットを用いて行うことができる。例えばPathHunter（登録商標）ERBB2-ERBB3 Functional Assay あるいはPathHunter（登録商標）ERBB4 Functional Assay（いずれもDiscoverX社）を用いて、キットに含まれる細胞株を種々の濃度のアゴニスト候補物質存在下で培養後に β -ガラクトシダーゼ活性を測定する。 β -ガラクトシダーゼ活性が高値を示した候補物質はアゴニスト活性を有する。

[0045] 本工程における培地中のERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストの濃度は、添加するERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストの種類によって適宜調整されるが、例えば1～1000 ng/mL、好ましくは50～200 ng/mLとできる。

ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストとしてNRG1を用いる場合、その培地中の濃度は、例えば1～1000 ng/mL、好ましくは50～200 ng/mL、特に好ましくは約100 ng/mLとできる。

[0046] 培地は、TGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含んでいてもよい。

「TGF β 阻害剤」とは、TGF β （トランスフォーミング増殖因子 β ）に対する阻害活性を有する物質である。TGF β は2種類のセリン／スレオニンプロテインキナーゼ型受容体に結合するサイトカインであり、Smad(R-Smad)の活性化を主としたシグナル伝達を介して細胞増殖、細胞分化、細胞死などを制御する。TGF β 阻害活性を有する物質としては、TGF β とその受容体の結合を阻害する物質、又は、TGF β が受容体に結合後の下流シグナルを阻害する物質が挙げられる。当該下流シグナルとしては、TGF β II型受容体によるTGF β I型受

容体のリン酸化、リン酸化TGF β I型受容体によるSmadのリン酸化などが例示される。本発明で用いられる「TGF β 阻害剤」はTGF β 阻害活性を有すれば特に限定されない。

[0047] TGF β 阻害剤としては、SB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide)、A83-01 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide)、LDN193189 (4-[6-[4-(1-Piperazinyl)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline)、GW788388 (4-[4-[3-(2-Pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-pyridinyl]-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-benzamide)、SM16 (4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(6-methyl-2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-bicyclo[2.2.2]octane-1-carboxamide)、IN-1130 (3-[5-(6-Methyl-2-pyridinyl)-4-(6-quinoxaliny)-1H-imidazol-2-yl]methyl]-benzamide)、GW6604 (2-Phenyl-4-[3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]pyridine) およびSB505124 (2-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-(1,1-dimethylethyl)-1H-imidazol-5-yl]-6-methyl-pyridine) 等が挙げられる。これらは、2以上を組み合わせ用いてもよい。

[0048] 本工程における培地中のTGF β 阻害剤の濃度は、添加するTGF β 阻害剤の種類によって適宜調整されるが、例えば0.1~50 μ M、好ましくは1~20 μ Mとできる。

TGF β 阻害剤としてSB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide) を用いる場合、その培地中の濃度は、例えば1~100 μ M、好ましくは5~20 μ M、特に好ましくは約10 μ Mとできる。

[0049] 「GSK3 β 阻害剤」とは、GSK3 β (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β) に対する阻害活性を有する物質である。GSK3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ3) は、セリン/スレオニンプロテインキナーゼの一種であり、グリコーゲンの産生やアポトーシス、幹細胞の維持などにかかわる多くのシグナル経路に関与する。GSK3には α と β の2つのアイソフォームが存在する。本発明で用いられる「GSK3 β 阻害剤」は、GSK3 β 阻害活性を有すれば特に限定されず、GSK3 β 阻害活性と合わせてGSK3 α 阻害活性を併せ持つ物質であってもよい。

。

[0050] GSK3 β 阻害剤としては、CHIR98014 (N⁶-[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(1H-imidazol-1-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]-3-nitro-2,6-pyridinediamine)、CHIR99021(6-{2-[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)pyrimidin-2-ylamino]ethylamino}nicotinonitrile)、CP21R7 (3-(3-aminophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione)、LY2090314 (3-[9-Fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-2-(1-piperidinylcarbonyl)pyrrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepin-7-yl]-4-imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl-1h-pyrrole-2,5-dione)、TDZD-8(4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione)、SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione)、TWS-119(3-[[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)、ケンパウロン (Kenpaulone)、1-アザケンパウロン (Azakenpaulone)、SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)-amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrol-2,5-dione) およびAR-A0144-18 (1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-3-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)urea)、CT99021、CT20026、BIO ((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime)、BIO-アセトキシム、ピリドカルバゾール-シクロペンタジエニルルテニウム複合体、OTDZT、アルファ-4-ジブロモアセトフェノン、リチウム等が挙げられる。これらは、2以上を組み合わせて用いてもよい。

GSK3 β 阻害剤はこれらに限定されるものではなく、GSK3 β のmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA、GSK3 β に結合する抗体、ドミナントネガティブGSK3 β 変異体等もGSK3 β 阻害剤として使用することができ、これらは商業的に入手可能であるか公知の方法に従って合成することができる。

。

[0051] 本工程における培地中のGSK3 β 阻害剤の濃度は、添加するGSK3 β 阻害剤の種類によって適宜調整されるが、例えば0.1~10 μ M、好ましくは0.5~2 μ Mとできる。

GSK3 β 阻害剤としてCHIR99021を用いる場合、その培地中の濃度は、例えば

0.1~10 μM 、好ましくは0.5~2 μM 、特に好ましくは約1 μM とできる。

[0052] 本工程における培地は、さらにレチノイン酸 (RA) および／またはその誘導体 (以下、単に「RA等」とも称する)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、およびマトリゲルのいずれかー以上を含んでいてもよい。

[0053] レチノイン酸 (RA) の誘導体としては、レチノール、レチナール、レチノイン、イソレチノイン、アリトレチノイン、エトレチナート、アシトレチン、タザロテン、ベキサロテン、アダパレンが用いられ得る。これらは、2以上を組み合わせて用いてもよい。

[0054] 本工程における培地中のRA等の濃度は、添加するRA等の種類によって適宜調整されるが、例えば0.001~50 μM 、好ましくは0.1~10 μM とできる。

RA等としてRAを用いる場合、その培地中の濃度は、例えば0.001~50 μM 、好ましくは0.1~10 μM 、特に好ましくは約1 μM とできる。

[0055] 本工程における培地中のGDNFの濃度は、例えば1~1000 ng/mL、好ましくは50~200 ng/mLとできる。

[0056] 本工程における培地中のマトリゲルの濃度は、例えば0.2~20% (v/v)、好ましくは1~4% (v/v)、特に好ましくは約2% (v/v) である。

[0057] 基礎培地は、特に限定されないが、例えばStemFit AK03 (味の素ヘルシーサプライ) のA液およびB液を混合したもの、TeSR1培地ならびにChemically Defined Medium (CDM) 培地が好適に用いられる。この他、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM (IMEM) 培地、Improved MDM (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地 (High glucose、Low glucose)、DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地等も用いられ得る。

[0058] CDM培地としては、特に限定されないが、例えば、Iscove's modified Dulbecco's medium (GEヘルスケア社製) から調製される培地が使用され得る。

基礎培地には、アポトランスフェリン、モノチオグリセロール、ウシ血清アルブミン (BSA)、インスリンおよび／又は抗生物質等の通常の細胞培養に用いられる物質が添加され得る。

[0059] ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含み、好ましくはさらにTGF β 阻害剤、GSK3 β 阻害剤、RA等、GDNFおよびマトリゲルのいずれかー以上を含む培地中でENPを培養することにより、ENPを多能性（multipotency）を維持したまま培養し、増殖させることができる。

[0060] 本工程の培養期間は、ENPが増殖して目的の細胞数に達する期間であればよく、特に限定されないが、例えば7日間以上、10日間以上、14日間以上、20日間以上、25日間以上、30日間以上、40日間以上、50日間以上、60日間以上、70日間以上、80日間以上、90日間以上、7～100日間、100日間以上とできる。

この間の細胞の増殖速度は、細胞倍加時間で約75時間という非常に高い速度が達成される。

[0061] 本工程は、接着培養によることが好ましいが、浮遊培養によってもよい。

接着培養には、ディッシュ、フラスコ、マイクロプレート、およびOptiCell（製品名、Nunc）等の細胞培養シートなどの培養容器が用いられる。

接着培養に用いる容器は、細胞との接着性（親水性）を向上させるための表面処理や、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル、ビトロネクチンなどの細胞接着用基質でコーティングされていてもよいが、これらの表面処理やコーティングがなされていない容器を用いることがより好ましい。

浮遊培養では、培地中に細胞を分散させ、攪拌または振盪により培地成分および培地内酸素濃度を均一化しながら細胞凝集塊を形成させる。好適な攪拌速度は、細胞密度と培養容器の大きさに応じて、適宜設定されるが、過度の攪拌または振盪は細胞に対して物理的ストレスを与え、細胞凝集塊形成を阻害する。したがって、培地成分および培地内酸素濃度を均一化でき、かつ、細胞凝集塊形成を阻害しないように攪拌または振盪速度を制御する。攪拌または振盪することなく、静置して浮遊培養を行うこともできる。

浮遊培養には、Prime surface（製品名、住友ベークライト株式会社）などの低接着コートの容器を用いることが好ましい。

培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行うこと

ができる。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば5%程度とできる。

[0062] [第二実施形態に係る製造方法（NCCのENPへの分化とENPの増殖を伴う方法）]

[第二実施形態 工程（B1）：神経堤細胞を提供する工程]

本工程では、NCCが提供される。本工程には少なくともNCCが提供されればよく、単一のNCC細胞、NCCの細胞集団またはNCCを含む細胞集団が提供されてもよい。

本工程で提供されるNCCは、商業的に入手されたNCCであっても、生体から分離されたNCCであってもよく、さらに幹細胞（stem cell）等から分化させたNCCであってもよい。商業的に入手されるNCCは、培養状態にあるNCCであっても、凍結状態にあるNCCであってもよい。また、NCCが幹細胞等から分化させたNCCである場合も、NCCは、培養状態にあるNCCであっても、凍結状態にあるNCCであってもよい。

[0063] 市販のNCCとしては、例えば、ヒト毛包外毛根鞘細胞（コスモ・バイオ社製）、09-1 Mouse Cranial Neural Crest Cell Line（メルクミリポア社製）等が挙げられる。

また、NCCは、受精後30日前後のヒト胚の神経管、胎生9日目前後のマウス胚の神経管、ヒト、ブタおよびげっ歯類の成体の皮膚等に存在していることが報告されている（Betters et al., Developmental biology, 2010, 344(2):578-592、Jiang et al., Development, 2000, 127(8):1607-1616、Dupin et al., Developmental biology, 2012, 366(1):83-95、Nagoshi et al., Cell Stem Cell 2, April 2008, 392-403）。NCCを公知の方法（例えば、Motohashi et al., Biology open, 2016, 5:311-322、Pfaltzgraff et al., Journal of Visualized Experiments, 2012, 64:4134）を用いて採取し、本工程に供することも可能である。

[0064] NCCへの分化に用いられる幹細胞は、例えば、多能性幹細胞（pluripotent stem cell）が挙げられる。本発明において使用可能な「多能性幹細胞（pluripotent stem cell）」とは、生体の種々の異なった形態や機能を持つ組織や

細胞に分化でき、3胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力を有する幹細胞を指す。それには、特に限定されないが、例えば、胚性幹細胞（ESC）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞、精子幹細胞、胚性生殖細胞、人工多能性幹細胞（本明細書中、「iPSC」と称することもある）などが挙げられる。また、本発明において使用可能な「多能性幹細胞（multipotent stem cell）」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を有する幹細胞を指す。本発明において使用可能な「多能性幹細胞（multipotent stem cell）」としては、例えば、歯髄幹細胞、口腔粘膜由来幹細胞、毛包幹細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の体性幹細胞などが挙げられる。好ましい多能性幹細胞（pluripotent stem cell）は、ESCおよびiPSCである。

[0065] 「ESC」としては、マウスESCであれば、inGenious targeting laboratory社、理研（理化学研究所）等が樹立した各種マウスESC株が利用可能であり、ヒトESCであれば、ウィスコンシン大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医療研究センターおよびCellartis社などが樹立した各種ヒトESC株が利用可能である。たとえば、ヒトESC株としては、ESI Bio社が分譲するCHB-1～CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1～HUES28株等、WiCell Researchが分譲するH1株、H9株等、理研が分譲するKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。

[0066] 「人工多能性幹細胞」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676）のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.）、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPSC（Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nat

ure 448, 313-317.)、c-Mycを含まない方法で作製されたiPSC (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101 - 106)、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPSC (Okita K et al. Nat. Methods 2011 May;8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.)等も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28の4因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞 (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.)、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞 (Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146)、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞 (特開2008-307007号)等も用いることができる。

このほか、公開されているすべての論文 (例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)、あるいは特許 (例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、W02007-069666、W02008-118220、W02008-124133、W02008-151058、W02009-006930、W02009-006997、W02009-007852)に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種iPSC株が利用可能である。例えば、ヒトiPSC株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等、京都大学の253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A1株、1231A3株等が挙げられ、1231A1株、1231A3株が好ましく、1231A3株がより好ましい。

[0067] 幹細胞からNCCへの分化は、文献公知 (例えば、非特許文献2)の方法に従って行うことができる。ヒトiPSCからNCCへ分化させる場合の工程の一例を図1に示す。まず、iPSCをディッシュ等に播種して接着培養した後、TGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含む培地で接着培養し (図1、工程i)、その後RA

および／またはその誘導体をさらに加えた培地で接着培養することでNCCへと分化させる（工程 i i）。

[0068] 本工程における培地中のTGF β 阻害剤の濃度は、添加するTGF β 阻害剤の種類によって適宜調整されるが、例えば0.1～50 μ M、好ましくは1～20 μ Mとできる。

TGF β 阻害剤としてSB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide) を用いる場合、その培地中の濃度は、例えば1～100 μ M、好ましくは5～20 μ M、特に好ましくは約10 μ Mとできる。

[0069] 本工程における培地中のGSK3 β 阻害剤の濃度は、添加するGSK3 β 阻害剤の種類によって適宜調整されるが、例えば0.1～10 μ M、好ましくは0.5～2 μ Mである。

GSK3 β 阻害剤としてCHIR99021を用いる場合、その培地中の濃度は、例えば0.1～10 μ M、好ましくは0.5～2 μ M、特に好ましくは約1 μ Mとできる。

[0070] 幹細胞は、工程 i i におけるRA等の培地中の濃度に応じて、頭部神経堤細胞 (Cranial NCC)、迷走神経堤細胞 (Vagal NCC)、体幹神経堤細胞 (Trunk NCC)、仙骨神経堤細胞 (Sacral NCC) のいずれかに分化させることができる。

[0071] 例えば、ヒトiPSCから頭部神経堤細胞へ分化させる場合、RA等は添加されない。

ヒトiPSCから迷走神経堤細胞あるいは体幹神経堤細胞分化させる場合のRA等の培地中の濃度は、例えば0.001～50 μ M、好ましくは0.1～10 μ Mである。

ただし、RA等の培地中の濃度は、添加するRA等の種類によって適宜調整されるものである。

後段の工程 (B 2) において腸管神経細胞およびグリア細胞への高い分化能を有するENPを得るため、迷走神経堤細胞 (Vagal NCC) へ分化させることが好ましい。

[0072] TGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含む培地での培養期間 (図 1、工程 i)

は、例えば0～12日間とでき、特には約6日間とできる。

RA等をさらに加えた培地での培養期間（工程 i i）は、例えば1～12日間とでき、特には約5日間とできる。

[0073] 基礎培地には上述したものをを用いることができる。

[0074] 接着培養には、上述した培養容器が使用できる。

培養容器は、細胞との接着性（親水性）を向上させるための表面処理や、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル、ビトロネクチンなどの細胞接着用基質でコーティングされていることが好ましい。

培養温度は、特に限定されないが、30～40℃（例えば、37℃）で行う。また、培養容器中の二酸化炭素濃度は例えば約5%である。

[0075] 〔第二実施形態 工程（B 2）：神経堤細胞を培養する工程〕

本工程では、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト、ならびにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む培地中でNCCが培養される（図1、工程 i i i）。ここで用いられるNCCは、好ましくは迷走神経提細胞（Vagal NCC）である。

[0076] 用いるERBB3アゴニスト、ERBB4アゴニストおよびRA等、ならびにそれらの培地中の濃度は、工程（A 2）と同じであってよい。

[0077] 培地は、さらにTGF β 阻害剤および／またはGSK3 β 阻害剤を含んでいてもよい。

用いるTGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤、ならびにそれらの培地中の濃度は、工程（A 2）と同じであってよい。

[0078] 培地は、さらにGDNFおよびマトリゲルのいずれか一以上を含んでいてもよい。

GDNFおよびマトリゲルの培地中の濃度、ならびに用いる基礎培地も、工程（A 2）と同じであってよい。

[0079] 本工程は、工程（A 2）と同様に接着培養によることが好ましいが、浮遊培養によってもよい。

- [0080] ERBB3アゴニストおよびERBB4アゴニストおよびRA等を含み、好ましくはさらにTGF β 阻害剤、GSK3 β 阻害剤、GDNFおよびマトリゲルのいずれか一以上を含む培地中でENPを培養することにより、ENPを多能性（multipotency）を維持したまま増殖させることができる。
- [0081] 本工程の培養期間は、ENPが増殖して目的の細胞数に達する期間であればよく、特に限定されないが、例えば7日間以上、10日間以上、14日間以上、20日間以上、25日間以上、30日間以上、40日間以上、50日間以上、60日間以上、70日間以上、80日間以上、90日間以上、7～100日間、100日間以上とできる。
- この間の細胞の増殖速度は、細胞倍加時間で約75時間という高い速度が達成される。
- [0082] [第三実施形態に係る拡大培養方法]
- [第三実施形態 工程（C1）：腸管神経前駆細胞を提供する工程]
- 本工程では、ENPが提供される。
- 本工程で提供されるENPは、工程（A1）と同じであってよい。
- [0083] [第三実施形態 工程（C2）：腸管神経前駆細胞を培養する工程]
- 本工程では、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中でENPが培養される。
- [0084] 用いるERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト、ならびにそれらの培地中の濃度は、工程（A2）と同じであってよい。
- [0085] 培地は、さらにTGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含んでもよい。
- 用いるTGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤、ならびにそれらの培地中の濃度は、工程（A2）と同じであってよい。
- [0086] 培地は、さらにRA等、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、およびマトリゲルのいずれか一以上を含んでもよい。
- 用いるRA等、およびそれらの添加濃度は、工程（A2）と同じであってよい。
- [0087] GDNFおよびマトリゲルの培地中の濃度、ならびに用いられる基礎培地も、工程（A2）と同じであってよい。

- [0088] 本工程は、工程（A 2）と同様に接着培養によることが好ましいが、浮遊培養によってもよい。
- [0089] ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストならびにRA等を含み、好ましくはさらにTGF β 阻害剤、GSK3 β 阻害剤、GDNFおよびマトリゲルのいずれか一以上を含む培地中でENPを培養することにより、ENPを多能性（multipotency）を維持したまま培養し、増殖させることができる。
- [0090] 本工程の培養期間は、ENPが増殖して目的の細胞数に達する期間であればよく、特に限定されないが、例えば7日間以上、10日間以上、14日間以上、20日間以上、25日間以上、30日間以上、40日間以上、50日間以上、60日間以上、70日間以上、80日間以上、90日間以上、7～100日間、100日間以上とできる。
- この間の細胞の増殖速度は、細胞倍加時間で約75時間という高い速度が達成される。

[0091] [腸管神経前駆細胞培地]

本発明は、上述のENPの製造方法または拡大培養方法で用いられるENP培地をも提供する。培地の好ましい組成は上述したとおりである。ENPの製造とは、iPSC、ESCおよびNCC等の幹細胞からENPへ分化させることを含み得る。

本発明の一態様において、腸管神経前駆細胞培地は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む。本発明の別の態様において、腸管神経前駆細胞培地は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストに加えて、TGF β 阻害剤および／またはGSK3 β 阻害剤を含んでもよく、TGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含むことが好ましい。本発明の別の態様において、腸管神経前駆細胞培地は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストに加えて、GDNFを含んでもよい。本発明の別の態様において、腸管神経前駆細胞培地は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストに加えて、マトリゲルを含んでもよい。本発明の別の態様において、腸管神経前駆細胞培地は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストに加えて、GDNFおよびマトリゲルを含んでもよい。本発明の別の態様において、腸管神経前駆細胞培地は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト

に加えて、TGF β 阻害剤、GSK3 β 阻害剤、GDNFおよびマトリゲルを含んでいてもよい。これらの腸管神経前駆細胞培地はさらにRA等を含んでいてもよい。腸管神経前駆細胞培地中のERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト、TGF β 阻害剤、GSK3 β 阻害剤、GDNF、マトリゲルおよびRA等の濃度はそれぞれ工程（A2）と同じであってよい。

他の一側面において、本発明は、ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含むENP培地添加剤、およびERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストのENP拡大培養のための使用をも提供する。

[0092] [腸管神経前駆細胞]

本発明に係るENPの製造方法または拡大培養方法によれば、腸管神経細胞およびグリア細胞への分化能（多能性（multipotency））を維持したENPを大量に得ることができる。

[0093] 「多能性（multipotency）を維持したENP」であることは、複数の方法により評価することができる。その方法としては特に限定されないが、例えば、評価対象であるENPを腸管神経細胞およびグリア細胞へ分化させる方法が挙げられる。評価対象であるENPが実際に腸管神経細胞およびグリア細胞に分化できれば、評価対象であるENPは「多能性（multipotency）を維持したENP」であると判断できる。

別の方法では、例えば、マーカータンパク質や遺伝子の発現を測定する方法が挙げられる。評価対象であるENPにおいて、転写因子であるSOX10およびPHOX2Bが発現していれば、評価対象であるENPは「多能性（multipotency）を維持したENP」であると判断できる。

[0094] SOX10およびPHOX2Bの検出は、当該マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーなどを利用して行うことができる。マーカー遺伝子の検出は、当該分野で公知の核酸増幅方法および／又は核酸検出方法、例えば、RT-PCR、マイクロアレイ、バイオチップ等を利用して行うことができる。また、SOX10およびPHOX2B遺伝子の下流にレポータータンパク質（例えば、Nano-Lantern (Saito K. et

al., "Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging." Nat. Commun., 2012; 3: 1262.)) をコードする塩基配列が挿入された細胞であって、S0X10等のプロモーターの制御下でレポータータンパク質あるいはこれとS0X10等との融合タンパクを発現する細胞であれば、該レポータータンパク質を検出する（例えば、蛍光強度を測定する）方法も用いることができる。

[0095] [細胞医薬・凍結ストック]

本発明に係る製造方法または拡大培養方法で得られるENPは、腸管神経細胞の欠損または異常に起因する疾患の予防または治療のための細胞医薬として適用され得る。このような疾患としては例えば、ヒルシュスプルング（Hirschsprung）病、食道アカラシア、胃運動機能不全、先天性肥厚性幽門狭窄症、慢性特発性偽性腸閉塞症、神経因性便秘あるいはシャーガス病などが挙げられる。

[0096] 細胞医薬が含有するENPは、例えば培養中の細胞を剥離して回収された細胞であっても、凍結保存液中に凍結された細胞であってもよい。拡大培養して得られる同ロットの細胞を小分けして凍結保存したものを使用すると、安定して同様の作用効果が得られる点、取扱い性に優れる点等において好ましい。

[0097] 細胞医薬は、用途や形態に応じて、常法に従って、薬学的に許容される担体や添加物等のその他の成分を含有させてもよい。担体や添加物としては、例えば、等張化剤、増粘剤、糖類、糖アルコール類、防腐剤（保存剤）、殺菌剤又は抗菌剤、pH調節剤、安定化剤、キレート剤、油性基剤、ゲル基剤、界面活性剤、懸濁化剤、流動化剤、分散剤、緩衝剤、抗酸化剤等が挙げられる。

[0098] 細胞医薬により、該細胞医薬の治療有効量を患者に投与することを含む、上記疾患の治療方法が提供される。

治療有効量とは、ENPを患者に投与した場合に、投与していない対照と比較して上記疾患に対して治療効果を得ることができるENPの量である。具体的な

治療有効量としては、ENPの投与形態、投与方法、使用目的および患者の年齢、体重、症状等によって適宜設定され得る。ヒト（例えば成人）の1回の治療あたりの有効量は、例えば200,000～1,00,000,000個/kg体重である。これらの細胞は単一細胞の状態に分散されていてもよいし、複数の細胞が集まった細胞塊（sphere）になっていてもよいし、これらが混合されたものであってもよい。

- [0099] 細胞医薬の投与方法としては、例えば、腹腔内注射、皮下注射、リンパ節内注射、静脈内注射、胸腔内注射、開腹による消化器官の局所（例えば、食道、胃、十二指腸、小腸、空腸、回腸、結腸、直腸）への直接注射、並びに直腸腔内投与などが挙げられる。
- [0100] 本発明は、上述の製造方法または拡大培養方法で得られる、ENPを含む凍結ストックをも提供する。
- [0101] 凍結ストックは、得られたENPを遠心分離により培地から分離し、凍結保存液中に懸濁して凍結することにより製造できる。凍結保存液には、従来細胞の凍結保存に用いられている試薬を用いればよい。例えば、Cryostem Freezing Medium（商品名）およびStemcell Banker GMP Grade（日本全薬工業株式会社）などが市販されている。
- [0102] 凍結ストックは、ENPを分化させて腸管神経細胞およびグリア細胞を得るための出発材料として利用され得る。また、凍結ストックは、ENPを構成要素とする組織モデルの作製のために利用され得る。
- [0103] [腸管神経前駆細胞の腸管神経細胞またはグリア細胞への誘導]
得られたENPおよびこれを文献公知の手法により分化させて得られる神経細胞およびグリア細胞は、再生医療用の細胞製剤として有用であり得、また各種スクリーニング系の構築にも好適に利用され得る。
- [0104] ENPの腸管神経細胞への誘導は、例えば非特許文献2を参照できる。また、ENPのグリア細胞への誘導には、従来公知の手法（例えば“A novel bidirectional interaction between endothelin-3 and retinoic acid in rat enteric nervous system precursors”, Gisser, J. M. et al., PLoSOne 2013）を

適用できる。

[0105] [腸管オルガノイド・人工腸管の製造方法]

本発明に係る腸管オルガノイドの製造方法は、ENPと後腸細胞とを共培養する工程を含む。

[0106] ENPは、上述のENPの製造方法または拡大培養方法により得られたものとする。

[0107] 後腸細胞は、従来公知の手法に従って幹細胞から分化させることができる。例えば、ヒト人工多能性幹細胞幹細胞をActivin A、BMP4およびbFGFを含む培地で培養し、胚体内胚葉を得て、胚体内胚葉をFGF4およびGSK3 β 阻害剤を含む培地で培養することにより後腸細胞を得る手法がある。

胚体内胚葉誘導時及び後腸細胞誘導時の基礎培地にも上述した基礎培地を用いることができる。

胚体内胚葉誘導時のActivin Aの培地中の濃度は、例えば10～1000 ng/mL、好ましくは50～500 ng/mL、より好ましくは約100 ng/mLとできる。また、BMP4の培地中の濃度は、例えば1～100 ng/mL、好ましくは5～50 ng/mL、より好ましくは約10 ng/mLとできる。bFGFの培地中の濃度は、例えば1～200 ng/mL、好ましくは5～100 ng/mL、より好ましくは約20 ng/mLとできる。培養期間は、例えば1～10日、好ましくは2～6日、より好ましくは約4日とされ得る。

後腸細胞誘導時のFGF4の培地中の濃度は、例えば10～1000 ng/mL、好ましくは50～500 ng/mL、より好ましくは約100 ng/mLとできる。GSK3 β 阻害剤の培地中の濃度は、例えばCHIR99021を用いる場合、例えば1～30 μ M、好ましくは4～10 μ M、より好ましくは約6 μ Mとできる。培養期間は、例えば4～12日、好ましくは6～10日、より好ましくは約8日とされ得る。

[0108] ENPと後腸細胞との共培養には、従来公知のNCCと後腸細胞との共培養による腸管オルガノイドの製造手法を適宜改変の上適用することができる。

例えば、マトリゲル溶液に懸濁した後腸細胞とENPとをプレートに播種しゲル化させ、R-Spondin-1、Noggin、Wnt3a、EGF、Prostaglandin-E2およびROCK阻害剤を含む培地を添加して培養する手法がある。共培養により得られた腸

管オルガノイドは、必要に応じて、マトリゲル溶液に再懸濁した上で同様の手法を再適用することで成熟化させることもできる。

また、例えば、マトリゲル溶液に懸濁した後腸細胞をプレートに播種しゲル化させ、R-Spondin-1、Noggin、Wnt3a、EGF、Prostaglandin-E2およびROCK阻害剤を含む培地を添加して培養を行って腸管オルガノイドを得た後、腸管オルガノイドを一旦分散させてENPの細胞懸濁液と混合し、混合液を遠心分離して得られる細胞ペレットをR-Spondin-1、Noggin、Wnt3a、EGF、Prostaglandin-E2およびROCK阻害剤を含む培地で培養する手法もある。この場合も、共培養により得られた腸管オルガノイドは、必要に応じて成熟化されてよい。

ENPと後腸細胞との共培養時の基礎培地にも上述した基礎培地を用いることができる。

R-Spondin-1の培地中の濃度は、例えば100～10,000 ng/mL、好ましくは500～5000 ng/mL、より好ましくは約1000 ng/mLとできる。

Nogginの培地中の濃度は、例えば10～1000 ng/mL、好ましくは50～500 ng/mL、より好ましくは約100 ng/mLとできる。

Wnt3aの培地中の濃度は、例えば10～1000 ng/mL、好ましくは50～500 ng/mL、より好ましくは約100 ng/mLとできる。

EGFの培地中の濃度は、例えば10～1000 ng/mL、好ましくは50～500 ng/mL、より好ましくは約100 ng/mLとできる。

Prostaglandin-E2の培地中の濃度は、例えば0.5～10 μ M、好ましくは1～5 μ M、より好ましくは約2.5 μ Mとできる。

ROCK阻害剤は、例えばY27632を用いる場合、1～100 μ M、好ましくは5～50 μ M、より好ましくは約10 μ Mとできる。

培養期間は、例えば15～40日、好ましくは20～30日、より好ましくは24～25日とされ得る。

[0109] 本発明に係る人工腸管の製造方法は、上記で得られた腸管オルガノイドを生体内に移植して人工腸管を形成させる工程と、を含む。

[0110] 生体内への移植は、特に限定されないが、例えば腸管オルガノドの分散液

を遠心分離して得た細胞ペレットを適当な足場材料（スキャフォールド）に接着させ、腸管膜脂肪上に留置することにより行うことができる。足場材料には、各種市販のものを利用でき、例えばネオベールシート（グンゼ）やpoly-L-lactide（DURECT）を用いることができる。

移植先の動物としては、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ及びサルなどの非ヒト哺乳動物あるいはヒト動物であってよく、好ましくは非ヒト哺乳動物が選択される。また、免疫不全である動物が好ましく用いられ得る。

[0111] 移植後の腸管オルガノイドは、生体内で分化し、成熟し、人工腸管を形成する。分化及び成熟のために必要な期間は、移植する細胞数や使用する足場材料、移植先の動物及び部位によって異なり得るが、例えば5週以上、好ましくは10週以上、より好ましくは約13-20週である。

得られる人工腸管は、ENPに由来する神経細胞およびグリア細胞を含み、電気刺激に応答して収縮弛緩反応を示し得る。

また、当該神経細胞は、人工腸管内でアセチルコリンおよびアドレナリンを産生して筋肉を収縮させ、また一酸化窒素を産生して筋肉を弛緩させたり、電気刺激に応答して筋肉を弛緩させたりする機能を有している。

実施例

[0112] [試験例1：ヒトiPSCの維持培養]

ヒトiPSCには、1231A3株（Scientific Reports, 2014, 4, 3594参照）を用いた。

iPSCの維持培養は、iMatrix 511 Silk（株式会社ニッピ）をコートしたプレートを用いて、フィーダー細胞を使用しないで行った。培養は、37℃、5% CO₂下で行った。維持培養時の培地には、StemFit AK03N（味の素ヘルシーサプライ株式会社）のA液、B液およびC液を混合したものを用了。

培地交換は毎日行い、継代は6～7日ごとに行った。継代は、0.5 mM EDTAを添加したリン酸緩衝液（以下「PBS」と記載する）で2倍希釈したTrypLE Select CTS（Life Technologies）を用いてiPSCをシングルセル化してプレート

から剥離させた後、剥離させたiPSCをiMatrix 511 Silkでコートした新しいプレート上に播種することにより行った。播種時の培地には、10 μ MのY27632（富士フイルム和光純薬株式会社）を添加したStemFit AK03NのA液、B液およびC液を混合したものをを用いた。

[0113] [試験例2：SOX10::tdTomato-PHOX2B::emGFPレポーターヒトiPSC株の樹立]

シングルセル化した上記ヒトiPSCに、Neon Transfection system (Life Technologies) を用いてSpCas9 D10A nickase発現プラスミド、SOX10 sgRNA発現プラスミド、SOX10-F2A-tdTomatoドナープラスミド、puromycin耐性遺伝子発現プラスミド（富士フイルム和光純薬株式会社）を共導入した。

得られた細胞をpuromycin処理による薬剤選抜後にコロニーピッキングし、拡大培養した。得られたコロニーのうち、PCRにより目的配列の挿入が確認されたものをSOX10::tdTomato株とした。

[0114] さらに、シングルセル化したヒトiPSC (SOX10::tdTomato株) に、Neon Transfection system (Life Technologies社) を用いてSpCas9 D10A nickaseタンパク、PHOX2B gRNA (IDT)、PHOX2B-F2A-emGFPドナープラスミド、puromycin耐性遺伝子発現プラスミド（富士フイルム和光純薬株式会社）を共導入した。

得られた細胞はpuromycin処理による薬剤選抜後にコロニーピッキングし、拡大培養した。得られたコロニーのうち、PCRにより目的配列の挿入が確認されたものをSOX10::tdTomato-PHOX2B::emGFP株とした。

[0115] [試験例3：ヒトiPSCから迷走神経堤細胞への分化]

(1) iPSCの前培養

試験例1に記載の方法で維持培養したヒトiPSC (SOX10::tdTomato-PHOX2B::emGFP株) を、iMatrix 511 Silkをコートした6穴プレートあるいは10 cmディッシュにそれぞれ $2 \sim 4 \times 10^4$ あるいは $2.4 \sim 4.9 \times 10^5$ 個/ウェルまたはディッシュの密度で播種し、37°C、5%CO₂下で3~4日間培養（前培養）した。播種時の培養液には、10 μ MのY27632（富士フイルム和光純薬株式会社）を添加したStemFit AK03NのA液、B液およびC液を混合したものをを用いた。

[0116] (2) iPSCから迷走神経堤細胞への分化

前培養後、培地を、10 μ M SB431542（富士フイルム和光純薬株式会社）および1 μ M CHIR99021（Axon MedChem）を含む培地に交換し（培養0日目）、37°C、5%CO₂下で6日間培養した。その後、さらに1 μ M レチノイン酸（富士フイルム和光純薬株式会社）を含む培地に交換し、37°C、5%CO₂下で5日間培養した（計11日間）。ここで、上記培地としては、StemFit AK03NのA液およびB液を混合したものをを用いた。なお、これらの培養期間中、培地交換は毎日行った。

[0117] 培養11日目において、迷走神経堤細胞を得た。

また、レチノイン酸を添加しない以外は同条件でiPSCの培養を行い、頭部神経堤細胞を誘導した。

迷走神経堤細胞の分化マーカーの発現を調べるため、培養11日目の細胞を回収し、RNeasy（Qiagen）を用いて全RNA画分を精製した。Prime Script RT reagent kit（タカラバイオ）を用いてcDNAを合成した後、定量RT-PCRを実施して、迷走神経堤細胞マーカーであるSOX10およびendothelin receptor type B (EDNRB)ならびに前後軸の位置情報を規定するHOX遺伝子群のうち、HOXB2、HOXB3、HOXB4、HOXB5、HOXB7およびHOXB9遺伝子発現量を測定した。遺伝子発現量は、内在性コントロールのGAPDHの発現量に対する比として求めた。

各遺伝子の発現量を図2に示す。図中、縦軸は、Fold change（頭部神経堤細胞における発現量を1とした比をlog2で表した値）を示す。SOX10、EDNRB、HOXB2、HOXB3、HOXB4、HOXB5およびHOXB7を発現しており、HOXB9を発現していなかったことから、迷走神経堤細胞への分化が確認できた。

[0118] [試験例4：迷走神経堤細胞から腸管神経前駆細胞への分化および拡大培養]

試験例3の方法で得られた、培養11日目の細胞（迷走神経堤細胞）を酵素的処理により分散させ回収した。酵素的処理は以下のようにして実施した。

培地を吸引除去してPBSに置換後、細胞をセルスクレーパーで剥離した。剥離した細胞塊はAccutase（Innovative Cell Technologies）中でピペッティ

ングにより分散させた。その後、MACS Buffer（ミルテニーバイオテク）を加え、40 μm のセルストレイナーを通しシングルセル化した。得られた細胞懸濁液は300 $\times$ g、3分間遠心後に上清を除去し、腸管神経前駆細胞培地に懸濁した。腸管神経前駆細胞培地には、StemFit AK03NのA液およびB液を混合したものに、10 μM SB431542（富士フイルム和光純薬株式会社）、1 μM CHIR99021（Axon MedChem）、1 μM レチノイン酸（富士フイルム和光純薬株式会社）、100 ng/mL Neuregulin1(NRG1)（Pepro Tech）および50 mg/mL Glial Cell-derived Neurotrophic Factor(GDNF)（富士フイルム和光純薬株式会社）を含むものを使用した。接着培養をする場合は、細胞懸濁液に2%となるようにマトリゲル（Corning）を添加し、マルチウェルプレート（Corning）で培養した。浮遊培養をする場合は細胞低接着処理を施したマルチウェルプレート（Corning）を使用した。培養はいずれも37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂下で実施した。

[0119] 接着培養の際の継代方法を以下に示す。

培地を吸引除去してPBSに置換後、PBSを吸引除去し、TrypLE Select CTS（Life Technologies）を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間静置した。その後、TrypLE Select CTSを吸引除去し、腸管神経前駆細胞培地を加え、ピペティングにより細胞を分散させた。

分散後の細胞を2 $\sim$ 10 $\times$ 10⁴個/cm²の密度で播種した。細胞播種後、2%（w/v）となるようにマトリゲルを添加した。

得られた細胞は1 $\sim$ 2週間に1回継代を実施した。継代ごとに自動セルカウンターで総細胞数、生細胞数および死細胞数をカウントした。継代時に播種した生細胞数および次回継代時に得られた生細胞数から総細胞数（accumulated cell number）を算出した。

総細胞数（accumulated cell number）の経時変化を図3に示す。細胞は少なくとも7回継代可能であり、線形の細胞増殖を示した。

[0120] [試験例5：腸管神経前駆細胞のフローサイトメトリー解析]

試験例4で培養した細胞におけるSOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPの発現を、フローサイトメトリーを用いて、継代の都度に解析した。

継代時に得られた細胞分散液を300×g、3分間遠心し、上清除去後、DAPIおよび1%の牛血清アルブミンを含むHBSSに細胞を懸濁し、FACS Aria Fusion（日本ベクトン・ディッキンソン）による解析に供した。

SOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPの発現解析結果を図4に示す。図中、P1～P6は継代回数（1～6回）を意味する。継代を経るごとに、SOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPを共発現する腸管神経前駆細胞の占める割合が上昇した。5回継代以降は腸管神経前駆細胞の占める割合は80%以上となった。

[0121] [試験例6：腸管神経前駆細胞培地の組成に関する検討]

腸管神経前駆細胞培地にNRG1および／またはGDNFを添加しない以外は試験例4と同条件で腸管神経前駆細胞培地迷走神経堤細胞を培養し、蛍光顕微鏡（BZ-X700、キーエンス）で観察した。また、試験例5と同様の方法でフローサイトメトリ解析を実施した。

細胞の蛍光像とSOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPの発現解析結果を図5に示す。NRG1を含まない条件では、細胞増殖が非常に遅く、フローサイトメトリを実施するために必要な細胞数が得られなかった。GDNFを含まない条件では、SOX10-tdTomatoおよびPHOX2B-emGFPを共発現する腸管神経前駆細胞が得られるものの、GDNFを含む条件に比して細胞の増殖が遅かった。

[0122] [試験例7：腸管神経前駆細胞の遺伝子発現解析]

試験例4において継代時に得られた細胞から全RNAを抽出し、腸管神経前駆細胞のマーカーであるSOX10、PHOX2B、HOXB5、EDNRBおよびret proto-oncogene (RET) の遺伝子発現を確認した。遺伝子発現解析は前述の方法と同様に実施した。

結果を図6に示す。図中、縦軸は、Expression level（内在性コントロールのGAPDHの発現量に対する比）あるいはFold change（iPSCにおける発現量を1とした比をlog2で表した値）を示す。腸管神経前駆細胞培地で培養した細胞は、継代を経てもSOX10、PHOX2B、HOXB5、EDNRBおよびRETを発現していた。

[0123] [試験例8：腸管神経前駆細胞の腸管神経系への分化]

試験例4と同様にして得た腸管神経前駆細胞を腸管神経分化用培地で培養して腸管神経への分化を行った。腸管神経分化用培地には、Neurobasal Medium (Life Technologies) にB27 (Life Technologies)、N2サプリメント (富士フイルム和光純薬株式会社)、L-グルタミン (富士フイルム和光純薬株式会社)、ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies)、100 μ M アスコルビン酸 (富士フイルム和光純薬株式会社) および25 ng/mL GDNFを添加したものを使用した。

[0124] 培養40日目に4%PFAを添加して室温で固定を行い、種々の腸管神経サブタイプへの分化能を評価するために蛍光免疫染色に供した。1次抗体として抗choline acetyltransferase (ChAT) 抗体 (ab224267、Abcam)、抗neuronal nitric oxide synthases (nNOS) 抗体 (ab76067、Abcam)、抗gamma-Aminobutyric acid (GABA) 抗体 (A2052、シグマ) または抗5-hydroxytryptamine (5-HT) 抗体 (S5545、シグマ) と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせたAlexa647標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

蛍光免疫染色像を図7に示す。ChAT、nNOS、GABAおよび5-HT陽性の神経が確認され、それぞれcholinergic neuron、inhibitory neuron、GABAergic neuronおよびserotonergic neuronであることが示された。従って、本培養方法で得られた腸管神経前駆細胞は種々の腸管神経サブタイプへの分化能を保持していることが示された。

[0125] [試験例9：ヒトiPSCの維持培養]

ヒトiPSCには、253G1株 (Nature Biotechnology, 2008, 26, (1):101-106 参照) を用いた。

iPSCの維持培養は、Vitronectin (TN-N) Recombinant Human Protein, Truncated (サーモフィッシャー社製) をコートしたプレートを用いて、フィーダー細胞を使用しないで行った。培養は、37°C、5%CO₂下で行った。

維持培養時の培地には、Essential 8 Flex Medium Kit (サーモフィッシャー) のBasal MediumおよびSupplementを混合したものを用いた。培地交換は

毎日行い、継代は6～7日ごとに行った。

継代は、0.5 mM EDTAを添加したPBSを用いてiPSCをシングルセル化してプレートから剥離させた後、剥離させたiPSCをVitronectin (TN-N) Recombinant Human Protein, Truncatedをコートした新しいプレート上に播種することにより行った。

播種時の培地には、Essential 8 Flex Medium kitのBasal MediumおよびSupplementを混合したものに10 μ M Y27632（富士フイルム和光純薬株式会社）を添加して用いた。

[0126] [試験例 10 : LGR5::*emGFP*レポーターヒトiPSC株の樹立]

試験例 9 のヒト iPSC をシングルセル化した後、NEPA21（ネッパジーン）を用いてSpCas9発現プラスミド、LGR5 sgRNA発現プラスミド、LGR5::*emGFP*ドナープラスミド（LGR5のN末端に「キメリックイントロン+emGFP+SV40polyA」をノックイン可能なコンストラクト）を共導入した。

得られた細胞をpuromycin処理による薬剤選抜後にコロニーピックアップし、拡大培養した。得られたコロニーのうち、PCRにより目的配列の挿入が片アレル性に確認されたものをLGR5::*emGFP*株とした。

[0127] [試験例 11 : ヒト iPSC から腸管オルガノイドへの分化]

(1) iPSCの前培養

試験例 10 のLGR5::*emGFP*株を、マトリゲル（Corning）をコートした12穴プレートにそれぞれ 4×10^5 個／ウェルの密度で播種し、37°C、5%CO₂下で2日間培養（前培養）した。播種時の培養液には、Essential 8 Flex Medium KitのBasal MediumおよびSupplementを混合したものに10 μ M Y27632を添加して用いた。

[0128] (2) ヒト iPSC から胚体内胚葉への分化

前培養後、培地を100 ng/mL Activin A（PeproTech）、10 ng/mL BMP4（R&D Systems）、20 ng/mL bFGF（富士フイルム和光純薬株式会社）を含む培地に交換し（培養0日目）、37°C、5%CO₂下で4日間培養した。上記培地としては、RPMI 1640（サーモフィッシャー）にB-27 Supplement, minus insulin（サ

ーモフィッシャー)とPenicillin-Streptomycin (サーモフィッシャー)を混合したものを用いた。培養期間中、培地交換は毎日行った。

胚体内胚葉への分化を確認するために、培養4日後の細胞を回収し、定量RT-PCRにより胚体内胚葉マーカーであるSOX17およびFOXA2が発現していることを確認した。

[0129] (3) 胚体内胚葉から後腸への分化

胚体内胚葉分化後、培地を100 ng/mL FGF4 (PeproTech) および6 μ M CHIR 99021 (Axon MedChem)を含む培地に交換し(培養4日目)、37°C、5%CO₂下で4日間培養した(計8日間)。上記培地には、RPMI 1640 (サーモフィッシャー)にB-27 Supplement, minus vitamin A (サーモフィッシャー)とPenicillin-Streptomycin (サーモフィッシャー)を混合したものを用いた。培養4日目は培地の全量を交換した。培養5日目から7日目は培地の半量を交換した。後腸への分化を確認するために、培養8日後の細胞を回収し、定量RT-PCRにより後腸マーカーであるCDX2が発現していることを確認した。

[0130] (4) 腸管オルガノイドの分化 1

ウェル内で形成された後腸細胞塊を培養上清とともに回収した。後腸細胞塊を含む溶液に、試験例4で作製した腸管神経前駆細胞を含む細胞懸濁液を添加し、遠心した後に培養上清を除去した。マトリゲル溶液に再懸濁した後腸細胞塊および腸管神経前駆細胞を、50 μ L/ウェルで24穴プレート上に播種し、37°C、5%CO₂下で30日間培養しマトリゲルをゲル化させた。ゲル化したマトリゲル上に1000 ng/mL R-Spondin-1 (富士フイルム和光純薬株式会社)、100 ng/mL Noggin (PeproTech)、100 ng/mL Wnt3a (R&D Systems)、100 ng/mL EGF、2.5 μ M Prostaglandin-E2を含む培地を添加し、37°C、5%CO₂下で培養した。上記培地には、Advanced DMEM/F-12 (サーモフィッシャー)にB-27 Supplement, minus vitamin A (サーモフィッシャー)、N-2 Supplement (サーモフィッシャー)、10 μ M Y27632、10 mM HEPES (サーモフィッシャー)、Penicillin-Streptomycin (サーモフィッシャー)を混合したものを用いた。

培養約2週間後に、後腸細胞塊と腸管神経前駆細胞から分化した腸管オルガノイドを含むマトリゲルに4℃のD-PBS (-) (富士フイルム和光純薬株式会社) を添加し、マトリゲルを溶解させた。遠心して培養上清を除去した。マトリゲル溶液に再懸濁した腸管オルガノイドを、50 μ L/ウェルで24穴プレート上に播種し、37℃、5%CO₂下で30分間培養しマトリゲルをゲル化させた。ゲル化したマトリゲル上に1000 ng/mL R-Spondin-1、100 ng/mL Noggin、100 ng/mL Wnt3a、100 ng/mL EGF、2.5 μ M Prostaglandin-E2、Y27632を含む培地を添加し、37℃、5%CO₂下で培養した(腸管オルガノイド培養期間計24~25日間)。

[0131] (5) 腸管オルガノイドの分化2

ウェル内で形成された後腸細胞塊を培養上清とともに回収した。遠心して培養上清を除去した。マトリゲル溶液に再懸濁した細胞塊を、50 μ L/ウェルで24穴プレート上に播種し、37℃、5%CO₂下で30分間培養しマトリゲルをゲル化させた。ゲル化したマトリゲル上に1000 ng/mL R-Spondin-1、100 ng/mL Noggin、100 ng/mL Wnt3a、100 ng/mL EGF、2.5 μ M Prostaglandin-E2を含む培地を添加し、37℃、5%CO₂下で培養した。上記培地には、Advanced DMEM/F-12 (サーモフィッシャー) にB-27 Supplement, minus vitamin A (サーモフィッシャー)、N-2 Supplement (サーモフィッシャー)、10 μ M Y27632、10 mM HEPES (サーモフィッシャー)、Penicillin-Streptomycin (サーモフィッシャー) を混合したものを用了。

培養約2週間後に、後腸細胞塊から分化した腸管オルガノイドを含むマトリゲルに4℃のD-PBS(-)を添加し、マトリゲルを溶解させた。腸管オルガノイドを含む溶液に、試験例4で作製した腸管神経前駆細胞を含む細胞懸濁液を添加し、遠心して培養上清を除去した。上清除去後の細胞ペレットに1000 ng/mL R-Spondin-1、100 ng/mL Noggin、100 ng/mL Wnt3a、100 ng/mL EGF、2.5 μ M Prostaglandin-E2、10 μ M Y27632を含む培地を添加し、37℃、5%CO₂下で2日間培養した。培養後にマトリゲル溶液に再懸濁した腸管オルガノイドを、50 μ L/ウェルで24穴プレート上に添加し、37℃、5%CO₂下で30分間培養し

マトリゲルをゲル化させた。ゲル化したマトリゲル上に1000 ng/mL R-Spondin-1、100 ng/mL Noggin、100 ng/mL Wnt3a、100 ng/mL EGF、2.5 μ M Prostaglandin-E2、Y27632を含む培地を添加し、37°C、5%CO₂下で培養した（腸管オルガノイド培養期間計24～25日間）。

[0132] [試験例12：腸管オルガノイドからの人工腸管のin vivo形成]

(1) 腸管オルガノイドのマウスへの移植

試験例11で得られた、腸管オルガノイドを含むマトリゲルを、4°CのD-PBS(-)を添加して溶解させた。腸管オルガノイドを含む溶液を遠心して培養上清を除去した。上清除去後の細胞ペレットにCollagen I (Corning) を添加した。ネオベールシート（グンゼ）とpoly-L-lactide (DURECT) を用いて作製したスキャフォールドに細胞ペレットとCollagen Iを含む溶液を添加して、細胞ペレットをスキャフォールドに接着させた。

6週齢の免疫不全マウス（雄性NOGマウス、実験動物中央研究所）をイソフルランによる麻酔下で開腹した。細胞ペレットを接着させたスキャフォールドを腸管膜脂肪上に留置し、縫合した。移植後13週間マウスを飼育した。

[0133] (2) 移植した腸管オルガノイドの採取

マウスをイソフルランによる麻酔下で開腹した。腸管膜脂肪上で形成された人工腸管を腸管膜脂肪から分離して採取した。

[0134] (3) 人工腸管の組織学的解析

採取した人工腸管を4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（富士フィルム和光純薬株式会社）により固定し、蛍光免疫染色に供した。1次抗体として抗TUBB3抗体（Abcam）、抗S100 β 抗体（Abcam）、抗GFAP抗体（Abcam）と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせた蛍光標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

蛍光免疫染色像を図8、9に示す。図8のように、PHOX2B-emGFPおよびSOX10-tdTomatoが陽性である腸管神経前駆細胞に由来する細胞（神経細胞およびグリア細胞）が存在していた。また、図9のように、PHOX2B-emGFPまたはSOX10-tdTomato陽性像に一致してあるいは近接してS100 β （A）、GFAP（B）ま

たはTUBB3 (C) の陽性像がみられ、腸管神経前駆細胞に由来する細胞が神経細胞およびグリア細胞に分化していることが確認された。実施例4で得られた腸管神経前駆細胞が、腸管神経細胞へ分化し人工腸管を構成する能力を有していることが示された。

[0135] (4) 人工腸管の運動機能解析

採取した人工腸管を短冊状の組織片に切り、オーガンバスアッセイ装置 (Panlab) のチャンバー内にその一端を吊るした。もう一端を圧トランスデューサー (バイオリサーチセンター社製) に接続し、組織片の収縮弛緩反応を定量的にモニターできるようにした。チャンバー内にクレブス溶液 (NaCl : 120 .7 mM、KCl : 5.9 mM、NaHCO₃ : 15.5 mM、NaH₂PO₄ : 1.2 mM、MgCl₂ : 1.2 mM、CaCl₂ : 2.5 mM、Glucose : 11.5 mM) を充填し、溶液中に95%O₂を暴露させた。チャンバー内の組織片を電気刺激して、収縮弛緩反応を計測した。

[0136] 結果を図10～12に示す。電気刺激に応答して、収縮弛緩反応が認められた (図10参照)。ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害剤であるAtropine Sulfate Monohydrate (富士フイルム和光純薬株式会社) を1 μ M、 α アドレナリン作動性効果遮断薬であるPhenoxybenzamine Hydrochloride (東京化成工業株式会社) を10 μ M、または β アドレナリン受容体効果遮断薬であるPropranolol Hydrochloride (富士フイルム和光純薬株式会社) を10 μ M添加することにより、収縮応答は部分的に解除された (図11参照)。このことから、実施例4で得られた腸管神経前駆細胞が、人工腸管内でアセチルコリンおよびアドレナリンを産生して筋肉を収縮させる神経を形成していることが示唆された。

[0137] 一方、電気刺激に依存した弛緩反応は残存した。一酸化窒素合成酵素の阻害剤であるNG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochlorideの添加により、弛緩応答は消失した (図11参照)。このことから、実施例4で得られた腸管神経前駆細胞が、人工腸管内で一酸化窒素を産生して筋肉を弛緩させる神経を形成することが示唆された。

[0138] さらに、1 μ M Atropine Sulfate Monohydrate、10 μ M Phenoxybenzamine

Hydrochlorideまたは10 μ M Propranolol Hydrochlorideの添加による収縮応答の解除は、3 μ M Tetrodotoxin（富士フイルム和光純薬株式会社）添加によって消失した。このことから、腸管神経前駆細胞が分化した神経細胞は、電気刺激に応答して筋肉を弛緩させる機能を有することが示唆された。

[0139] [試験例 1 3：拡大培養した腸管神経前駆細胞の凍結ストック作製、および当該凍結ストック融解後の特性評価]

試験例 4 と同様にして得た腸管神経前駆細胞を用いて凍結ストックを作製した。また、凍結ストック融解後の腸管神経前駆細胞の増殖能および分化能の確認を行った。

分化76日目の腸管神経前駆細胞の細胞分散液を300×g、3分間遠心し、上清除去後、Stemcell Banker GMP Grade（日本全薬工業株式会社）に20万個/200 μ Lの濃度で細胞を懸濁し、-80℃で凍結保存した。

凍結ストックを37℃で融解した。腸管神経前駆細胞培地に細胞を懸濁後、300×g、3分間遠心し、上清除去後、腸管神経前駆細胞培地に再懸濁した。試験例 4 に記載の方法で培養を行った。また、試験例 4 及び 5 に記載の方法で継代及びフローサイトメトリー解析を実施した。さらに、試験例 8 及び 1 4 に記載の方法に従って腸管神経細胞及びグリア細胞への分化能を確認した。

[0140] 結果を図 1 3 に示す。（A）は、拡大培養時の細胞数の経時変化と、拡大培養時の全細胞に占める腸管神経前駆細胞の割合の経時変化を示す。（B）は、腸管神経前駆細胞（ENP）とこれから分化させた腸管神経細胞（ENS）におけるPHOX2BおよびSOX10の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。（C）は、腸管神経前駆細胞から分化させた腸管神経細胞およびグリア細胞の蛍光免疫染色像を示す。凍結融解後の腸管神経前駆細胞は優れた増殖能を維持していることが確認された。また、凍結融解後の腸管神経前駆細胞が、腸管神経細胞（PHOX2BおよびPeripherin陽性であってSOX10陰性）およびグリア細胞（GFAP陽性）への分化能を保持していることが確認された。腸管神経細胞には、nNOS (neuronal nitric oxide synthase)、TH (tyrosine hydroxylase)、ChAT (choline acetyltransferase)、GABA (gamma amino

butyric acid) あるいはSST (somatostatin) を発現する様々なサブタイプが含まれていた。

[0141] [試験例 1 4 : 腸管神経前駆細胞のグリア細胞への分化]

試験例 4 と同様にして得た腸管神経前駆細胞を用い、グリア細胞への分化を行った。

グリア細胞分化用培地には、Astrocyte maturation kit (Stem Cell Technologies) に、Penicillin-Streptomycin (Life Technologies) を添加したものを使用した。

培養46日目の細胞をパラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液により固定し、蛍光免疫染色に供した。1次抗体として抗GFAP抗体 (CST#3670、Cell Signaling) と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせた蛍光標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

蛍光免疫染色像を図 1 4 に示す。GFAP陽性グリア細胞が確認された。従って、本培養方法で得られた腸管神経前駆細胞はグリア細胞への分化能を保持していることが示された。

[0142] [試験例 1 5 : 腸管神経前駆細胞の免疫不全マウス腸管における生着性確認]

試験例 4 と同様にして得た腸管神経前駆細胞を用い、免疫不全マウス腸管における生着性確認を行った。

[0143] (1) 移植用腸管神経前駆細胞の細胞塊の調製

腸管神経前駆細胞を腸管神経前駆細胞培地に懸濁し、sphere culture plate (RB500 400 NA 24、クラレ) に320,000個/ウェルで播種し、3日間培養して細胞塊 (sphere) を構築した。

[0144] (2) 腸管神経前駆細胞のマウスへの移植

得られた細胞塊 (sphere) を回収し、麻酔下で開腹した免疫不全マウス (NOD, CB17-Prkdc ^{scid}/J、オス、6週齢、日本チャールス・リバー株式会社) の盲腸壁にシリンジニードル (30ゲージ) を用いて580 sphere/site/匹で移植した。移植時の媒体はマトリゲルと腸管神経前駆細胞培地を1:1 (v/v)

で混合したものを使用した。1週間後、動物を安楽死させ、移植部位周囲を採取し4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。

[0145] (3) 移植後サンプルの組織学的解析

固定したサンプルを蛍光免疫染色に供した。1次抗体として抗TUBB3抗体 (Abcam) と反応させ、さらに2次抗体として1次抗体の免疫動物に合わせた蛍光標識2次抗体と順次反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

[0146] 蛍光免疫染色像を図15に示す。マウス腸管の粘膜下層から筋層に相当する部位にPHOX2B-emGFPおよびSOX10-tdTomatoが陽性である腸管神経前駆細胞に由来する細胞 (神経細胞およびグリア細胞に分化しつつあると考えられる細胞) が存在しており (a及びb)、腸管神経前駆細胞のマウス腸管への生着が確認された。また、PHOX2B-emGFPまたはSOX10-tdTomato陽性像に一致してあるいは近接してTUBB3陽性像がみられ (c)、腸管神経前駆細胞に由来する細胞が神経細胞に分化しつつあることが確認された。

配列表フリーテキスト

[0147] 配列番号1 : ヒトNRG1の全長アミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、腸管神経前駆細胞の製造方法：
(A 1) 腸管神経前駆細胞を提供する工程、ならびに
(A 2) ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中で腸管神経前駆細胞を培養する工程。
- [請求項2] 前記培地が、さらにTGF β 阻害剤およびGSK3 β 阻害剤を含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記培地が、さらにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む、請求項1または2に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記培地が、さらにGDNF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] 前記培地が、さらにマトリゲルを含む、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ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストが、NRG1である、請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法によって得られる腸管神経前駆細胞。
- [請求項8] 請求項7記載の腸管神経前駆細胞を含む凍結ストック。
- [請求項9] 請求項7記載の腸管神経前駆細胞を含む細胞医薬。
- [請求項10] 以下の工程を含む、腸管神経前駆細胞の製造方法：
(B 1) 神経堤細胞を提供する工程、ならびに
(B 2) ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニスト、ならびにレチノイン酸および／またはその誘導体、を含む培地中で神経堤細胞を培養する工程。
- [請求項11] 前記神経堤細胞が、迷走神経堤細胞である、請求項10に記載の製造方法。
- [請求項12] 前記迷走神経堤細胞が、SOX10陽性、HOXB5陽性、HOXB9陰性かつPHOX2B陰性であり、

前記腸管神経前駆細胞が、SOX10陽性かつPHOX2B陽性である、請求項 1 1 に記載の製造方法。

[請求項13] ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む、腸管神経前駆細胞培地。

[請求項14] さらにTGF β 阻害剤および／またはGSK3 β 阻害剤を含む、請求項 1 3 に記載の培地。

[請求項15] さらにレチノイン酸および／またはその誘導体を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載の培地。

[請求項16] さらにGDNFを含む、請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の培地。

[請求項17] さらにマトリゲルを含む、請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の培地。

[請求項18] 前記ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストが、NRG1である、請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の培地。

[請求項19] 以下の工程を含む、腸管神経前駆細胞の拡大培養方法：
(C 1) 腸管神経前駆細胞を提供する工程、ならびに
(C 2) ERBB3アゴニストおよび／またはERBB4アゴニストを含む培地中で腸管神経前駆細胞を培養する工程。

[請求項20] 腸管神経前駆細胞と後腸細胞とを共培養する工程を含む、腸管オルガノイドの製造方法。

[請求項21] 腸管神経前駆細胞と後腸細胞とを共培養することにより腸管オルガノイドを得る工程と、
前記腸管オルガノイドを生体内に移植して人工腸管を形成させる工程と、を含む人工腸管の製造方法。

[請求項22] 前記腸管神経前駆細胞が、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法によって得られた腸管神経前駆細胞である、請求項 2 0 又は 2 1 記載の製造方法。