

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有權機關

國際事務局

(43) 國際公開日

2018年11月1日(01.11.2018)



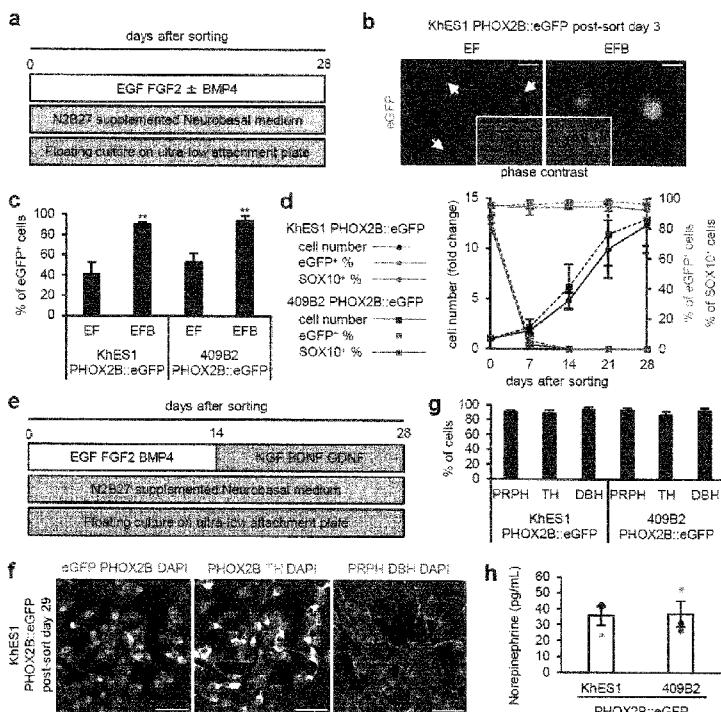
(10) 国際公開番号

WO 2018/199142 A1

- |  |   |  |
|--|---|--|
| (51) 国際特許分類:   | <i>C12N 5/079</i> (2010.01) <i>A61P 25/02</i> (2006.01)<br><i>A61K 35/30</i> (2015.01) <i>C12N 5/0775</i> (2010.01)<br><i>A61K 35/545</i> (2015.01) <i>C12N 5/0793</i> (2010.01)<br><i>A61L 27/38</i> (2006.01) | (72) 発明者: 中畠 龍俊 ( <b>NAKAHATA, Tatsutoshi</b> );<br>〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 斎藤潤 ( <b>SAITO, Megumu</b> ); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 桐野 浩輔 ( <b>KIRINO, Kosuke</b> ); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). |
| (21) 国際出願番号 :  | PCT/JP2018/016758   |  |
| (22) 国際出願日 :   | 2018年4月25日(25.04.2018)  |  |
| (25) 国際出願の言語 :   | 日本語   |  |
| (26) 国際公開の言語 :   | 日本語   |  |
| (30) 優先権データ :  |   |  |
|  | 特願 2017-088926 2017年4月27日(27.04.2017) JP  |  |
| (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP). |   | (74) 代理人: 佐貫 伸一, 外 ( <b>SANUKI, Shinichi et al.</b> );<br>〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo (JP).   |
|  |   | (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,   |

**(54) Title:** METHOD FOR PRODUCING NEURAL CREST CELLS AND SYMPATHETIC NEURONS

(54) 発明の名称： 神経堤細胞および交感神経細胞の製造方法



**(57) Abstract:** Pluripotent stem cells are cultured in a culture solution containing FGF2, retinoic acid and BMP4 to thereby produce neural crest cells. The neural crest cells are cultured in a culture solution containing a cytokine and BMP4 to thereby produce sympathetic neuron precursors. Further, the sympathetic neuron precursors are cultured in a culture solution containing a neurotrophic factor to thereby produce sympathetic neurons.



HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告（条約第21条(3)）

- 
- (57) 要約 : 多能性幹細胞を FGF2、レチノイン酸および BMP4 を含む培養液中で培養することにより神経堤細胞を製造し、神経堤細胞をサイトカインおよび BMP4 を含む培養液中で培養することにより交感神経前駆細胞を製造し、さらに、交感神経前駆細胞を神経栄養因子を含む培養液中で培養することにより交感神経細胞を製造する。

## 明細書

### 発明の名称：神経堤細胞および交感神経細胞の製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞から神経堤細胞を製造する方法、および神経堤細胞から交感神経前駆細胞さらには交感神経細胞を製造する方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 交感神経は末梢自律神経であり、循環、呼吸、消化、発汗・体温調節、内分泌機能、生殖機能、および代謝といった不随意な機能を制御する。発生学的には交感神経細胞は体幹部神経堤細胞に由来することが知られており、動物モデルにおいて分化誘導に関する様々な因子が同定されている。多能性幹細胞より交感神経細胞を誘導する方法についてこれまでに幾つかの報告があるが、分化効率は十分ではない（非特許文献1～4）。

#### 先行技術文献

##### 非特許文献

[0003] 非特許文献1 : Huang, M. et al. Generating trunk neural crest from human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 6, 19727 (2016).

非特許文献2 : Oh, Y. et al. Functional coupling with cardiac muscle promotes maturation of hPSC-derived sympathetic neurons. *Cell Stem Cell* 19, 95–106 (2016).

非特許文献3 : Zeltner, N. et al. Capturing the biology of disease severity in a PSC based model of familial dysautonomia. *Nat. Med.* 22, 1421–1427 (2016).

非特許文献4 : Denham, M. et al. Multipotent caudal neural progenitors derived from human pluripotent stem cells that give rise to lineages of the central and peripheral nervous system. *Stem Cells* 33, 1759–1770 (2015).

#### 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0004] 上記の通り、交感神経分化プロトコルについて幾つかの報告があるが、分化効率は十分ではない。特異的な細胞表面マーカーが知られていないこと、および体幹部神経堤細胞の分化誘導法に関する報告が少ないことが、ヒト多能性幹細胞から交感神経への分化誘導系構築を妨げていると考えられる。

そこで、本発明は、多能性幹細胞から交感神経細胞を効率良く製造することを一つの課題とする。

## 課題を解決するための手段

[0005] 発明者らはまず PHOX2B – eGFP レポーター発現多能性幹細胞を使用して各分化ステージを詳細に検討することにより神経堤細胞 (NCC) を経て機能的交感神経細胞を得るための効率的なプロトコルを確立した。そしてこのプロトコルによって多能性幹細胞から高純度で交感神経細胞を得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

[1] 多能性幹細胞を FGF (Fibroblast growth factor) 2、レチノイン酸および BMP (Bone morphogenetic protein) 4 を含む培養液中で培養する工程を含む、神経堤細胞の製造方法。

[2] FGF2 の濃度が 1ng/ml ~ 100ng/ml であり、レチノイン酸の濃度が 10nM ~ 10μM であり、BMP4 の濃度が 5 ng/ml ~ 150 ng/ml である、[1] に記載の神経堤細胞の製造方法。

[3] 多能性幹細胞を GSK (Glycogen synthase kinase) 3β 阻害剤および TGF (Transforming growth factor) β 阻害剤を含む培養液中で培養し、その後、FGF2、レチノイン酸および BMP4 を含む培養液中で培養する、[1] または [2] に記載の神経堤細胞の製造方法。

[4] 前記培養は浮遊培養で行われる、[1] ~ [3] のいずれかに記載の神経堤細胞の製造方法。

[5] CD49d による選別工程を含む、[1] ~ [4] のいずれかに記載の神経堤細胞の製造方法。

[6] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[1]～[5]のいずれかに記載の神経堤細胞の製造方法。

[7] 神経堤細胞をサイトカインおよびBMP4を含む培養液中で培養し、交感神経前駆細胞を誘導する工程を含む、交感神経前駆細胞の製造方法。

[8] サイトカインがEGF (Epidermal growth factor) およびFGF2である、[7]に記載の交感神経前駆細胞の製造方法。

[9] BMP4の濃度が5 ng/ml～150 ng/mlであり、EGFの濃度が1ng/ml～100ng/mlであり、FGF2の濃度が1ng/ml～100ng/mlである、[8]に記載の交感神経前駆細胞の製造方法。

[10] 前記培養は浮遊培養で行われる、[7]～[9]のいずれかに記載の交感神経前駆細胞の製造方法。

[11] 神経堤細胞が[1]～[6]のいずれかに記載の方法によって得られた、[7]～[10]のいずれかに記載の交感神経前駆細胞の製造方法。

[12] [1]～[6]のいずれかに記載の方法によって神経堤細胞を製造し、得られた神経堤細胞を用いて[7]～[10]のいずれかに記載の方法によって交感神経前駆細胞を製造する、交感神経前駆細胞の製造方法。

[13] [7]～[12]のいずれかに記載の方法により交感神経前駆細胞を製造する工程、および得られた交感神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養して交感神経前駆細胞を交感神経細胞に成熟させる工程を含む、交感神経細胞の製造方法。

[14] 前記神経栄養因子は、NGF (Nerve growth factor) 、BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) およびGDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) である、[13]に記載の方法。

[15] [13]または[14]に記載の方法によって得られた交感神経細胞。

[16] [13]または[14]に記載の方法によって得られた交感神経細胞を含む交感神経障害治療用組成物。

## 発明の効果

[0007] 本発明によれば、従来採取困難であったヒト交感神経細胞をヒト多能性幹細胞から作り出すことで、多くの研究に利用することが可能である。近年、多種多様な神経細胞がヒト多能性幹細胞から分化誘導され、それらを用いた再生医療・疾患モデルの作成・創薬スクリーニング・神経毒性評価などに用いられている。本発明で分化誘導された交感神経細胞も上記と同様に、再生医療や疾患モデルの作成、創薬などに応用可能であると考えられる。

### 図面の簡単な説明

[0008] [図1] PHOX2B : : eGFP 導入ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の分化条件と細胞プロファイル等についての解析結果を示す図。 (a) hPSC の前後軸と背腹軸の決定を調節するための培養条件の図。 (b) 様々な条件下で分化させた K h E S 1 PHOX2B : : eGFP 株の分化 10 日目における eGFP<sup>+</sup> 細胞のパーセンテージを示すヒートマップ像。 (c) b の条件 (i) ~ (iv) の下の 10 日目の K h E S 1 PHOX2B : : eGFP 株由来凝集体の代表的な FCM プロット。 (d) 条件 (i) ~ (iv) の下の 10 日日の凝集体の PHOX2B, SOX1, PAX6, SOX10, FOXD3, HOXB1, HOXB2, HOXB4, HOXB6, HOXB8 および HOXC9 についての RT-PCR 解析。右の図はロンボメア (r1 ~ 8) および脊髄 (頸髄および胸髄) 領域における HOX 遺伝子の発現パターンを示している。SB = SB431542, CHIR = CHIR99021, RA = レチノイン酸、Pur = プルモルファミン、BMP = BMP4, NT = 神経管、NCC = 神経堤細胞、HB = 後脳、SC = 脊髄。

[図2] PHOX2B : : eGFP 導入ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の分化条件とマーカー発現プロファイル等についての解析結果を示す図。 (a) 交感神経系 NCC 分化のための培養条件の図。 (b) K h E S 1 対照および K h E S 1 PHOX2B : : eGFP 株に由来する 10 日目の凝集体の代表的な画像 (スケールバー = 100 μm)。 (c) 無選別および CD49d<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> 選別済みの 10 日目の分化細胞の PHOX2B および SOX10 についての免疫細胞化学分析 (スケールバー = 50 μm)。白線の囲みは右のパネ

ルにおいて拡大されている領域を示す。白色の矢頭は PHOX2B<sup>+</sup>SOX10-細胞を示している。(d) cにおけるPHOX2B<sup>+</sup>細胞とSOX10<sup>+</sup>細胞の定量(平均値±SEM、n=3)。(e) 分化の0日目および10日目(CD49d<sup>+</sup>eGFP<sup>+</sup>選別済み)におけるHOXB7についての免疫細胞化学分析(スケールバー=50 μm)。(f) eにおけるHOXB7<sup>+</sup>細胞の定量(平均値±SEM、n=3)。SB=SB431542、CHIR=CHIR99021、RA=レチノイン酸。

[図3]NCCから交感神経細胞への分化についての解析結果を示す図。(a) FACS精製後の交感神経系NCC培養のための培養条件の図。(b) EF条件およびEFB条件の下の選別後3日目のニューロスフィアの代表的な画像(スケールバー=100 μm)。(c) EF条件およびEFB条件の下の選別後7日目のニューロスフィア中でのeGFP<sup>+</sup>細胞のFCM分析による定量(平均値±SEM、n=3、P<0.01)。(d) 選別後のEFB条件下で28日間の培養中の細胞数、eGFP<sup>+</sup>細胞のパーセンテージおよびSOX10<sup>+</sup>細胞のパーセンテージの変化(平均値±SEM、n=3)。細胞数が0日目における数に対する変化倍率として記載されている。(e) FACS精製後の交感神経細胞分化のための培養条件の図。(f) 選別後29日目におけるeGFP、PHOX2B、TH、PRPHおよびDBHについての免疫細胞化学分析(スケールバー=50 μm)。(g) fにおけるPRPH<sup>+</sup>細胞、TH<sup>+</sup>細胞およびDBH<sup>+</sup>細胞の定量(平均値±SEM、n=3)。(h) 選別後30日日の培養神経細胞から放出されたノルアドレナリンの定量(平均値±SEM、n=3)。EF=EGF+FGF2、EFB=EGF+FGF2+BMP4。

[図4]細胞選別を行わない高純度交感神経細胞の誘導についての解析結果を示す図。(a) 細胞選別を行わない交感神経細胞分化のための培養条件の図。(b) aに示されている分化の10日目、17日目および31日目におけるeGFP<sup>+</sup>細胞のFCM分析。(c) bにおけるeGFP<sup>+</sup>細胞の定量。3回の独立した実験のデータが各グラフに示されている。(d) 分化の32日目

におけるeGFP、TH、PRPHおよびDBHについての免疫細胞化学分析（スケールバー=50 μm）。(e) dにおけるPRPH<sup>+</sup>細胞、TH<sup>+</sup>細胞およびDBH<sup>+</sup>細胞の定量（平均値±SEM、n=3）。(f) 10日目と17日目におけるPHOX2BおよびSOX10についてと32日目におけるTH、DBHおよびPRPHについての免疫細胞化学分析（スケールバー=50 μm）。10日目の画像の中の白線の囲みは同じパネルの左側において拡大されている領域を示す。(g) fの10日目と17日目におけるPHOX2B<sup>+</sup>細胞とSOX10<sup>+</sup>細胞の定量（平均値±SEM、n=3）。(h) fの32日目におけるPHOX2B<sup>+</sup>細胞、TH<sup>+</sup>細胞、DBH<sup>+</sup>細胞およびPRPH<sup>+</sup>細胞の定量（平均値±SEM、n=3）。SB=SB431542、CHIR=CHIR99021、RA=レチノイン酸。

[図5] PHOX2B : : eGFPノックインhPSCクローンの構築についての結果を示す図。(a) TALEN介在性ゲノム編集を用いるPHOX2B遺伝子ターゲティングの模式図。(b) PHOX2Bの3'UTR領域での標的化組込みを示すゲノムPCR。(c) eGFP<sup>+</sup>細胞におけるPHOX2B<sup>+</sup>細胞(PHOX2B/eGFP)の定量とPHOX2B<sup>+</sup>細胞におけるeGFP<sup>+</sup>細胞(eGFP/PHOX2B)の定量。左の画像はCHIR<sup>2.0 μM</sup> BMP4 RA<sup>100 nM</sup>条件下で10日目におけるeGFPとPHOX2Bについての免疫細胞化学の発見を示している（スケールバー=50 μm）。右のグラフは定量的データを示している（平均値±SEM、n=3）。DSB=二重鎖切断、CHIR=CHIR99021、RA=レチノイン酸。

[図6] hPSCからのNMP様細胞とそれらの派生物の誘導についての結果を示す図。(a) 様々な濃度のCHIR99021を使用した3日目の凝集体におけるSOX2、BRACHYURY、TBX6、HOXB1、HOXB2、HOXB4およびHOXB6についてのRT-PCR分析。(b) 様々な条件下で409B2 PHOX2B : : eGFP株を使用する分化の10日目におけるeGFP<sup>+</sup>細胞のパーセンテージを示すヒートマップ像。(c) CHIR<sup>1.5 μM</sup> Pur RA<sup>100 nM</sup>条件下で10日目におけるeGFP<sup>+</sup>細胞

と C D 4 9 d<sup>+</sup>細胞の F C M 分析による定量（平均値土 S E M、n = 3）。(d) e G F P<sup>+</sup> C D 4 9 d<sup>-</sup>細胞由来の神経細胞における e G F P、P H O X 2 B、C h A T および T U B B I I I についての免疫細胞化学分析（28日目、スケールバー=50 μm）。(e) d における e G F P<sup>+</sup>細胞と C h A T<sup>+</sup>細胞の定量（平均値土 S E M、n = 3）。C H I R=C H I R 9 9 0 2 1、R A=レチノイン酸、P u r=プルモルファミン。

[図7] P H O X 2 B 発現性 N C C の誘導における R A の効果を示す図。(a) C H I R 2. 0 μM B M P R A 0 nM 条件および C H I R 2. 0 μM B M P R A 1 0 0 nM 条件の下の 10 日目の K h E S 1 P H O X 2 B : : e G F P 株由来の凝集体の代表的な F C M プロット。(b) C H I R 2. 0 μM B M P 4 R A 0 nM 条件および C H I R 2. 0 μM B M P 4 R A 1 0 0 nM 条件の下の分化の 10 日目における P H O X 2 B および S O X 1 0 についての免疫細胞化学分析（スケールバー=50 μm）。(c) b における S O X 1 0<sup>+</sup>細胞と P H O X 2 B<sup>+</sup>細胞の定量（平均値土 S E M、n = 3）。C H I R=C H I R 9 9 0 2 1、B M P=B M P 4、R A=レチノイン酸。

[図8] C H I R 2. 0 μM B M P 4 R A 1 0 0 nM 条件下の凝集体中の細胞の解析結果を示す図。(a) e G F P 発現と C D 4 9 発現のタイムコース F C M 分析。(b) a のタイムコース分析における G F P<sup>+</sup>細胞と C D 4 9 d<sup>+</sup>細胞の定量（平均値土 S E M、n = 3）。(c) 10 日目の凝集体における e G F P、C D 4 9 d および T U B B I I I の F C M 分析。C D 4 9 d の細胞外染色、固定、および透過処理の後に細胞内の e G F P と T U B B I I I が染色された。(d) c の F C M 分析における C D 4 9 d<sup>+</sup>細胞、微弱な T U B B I I I の細胞、T U B B I I I<sup>+</sup>細胞の定量（平均値土 S E M、n = 3）。(e) 無選別および C D 4 9 d<sup>+</sup> e G F P<sup>+</sup>選別済みの 10 日目の分化細胞の P H O X 2 B および S O X 1 0 についての免疫細胞化学分析 (4 0 9 B 2 P H O X 2 B : : e G F P 株、スケールバー=50 μm)。白線の囲みは右のパネルにおいて拡大されている領域を示す。白色の矢頭は P H O X 2 B<sup>+</sup> S O X 1 0<sup>-</sup> 細胞を示している。(f) 分化の 10 日目 (C D 4 9 d<sup>+</sup> e G F P<sup>+</sup>選別済み

) におけるHOXB7についての免疫細胞化学分析 (409B2 PHOX2B : : eGFP株、スケールバー=50 μm)。

[図9] CD49d<sup>+</sup>eGFP<sup>+</sup>細胞からのニューロスフィア培養による交感神経細胞の誘導についての結果を示す図。 (a) BMP4を使用した、または使用しない選別後7日目のニューロスフィア細胞のeGFP発現のFCM分析(灰色)。PHOX2B : : eGFPレポーターを含まない親クローンを陰性対照に使用した(白色)。(b) 選別後7日目、14日目および28日目におけるSOX10についての免疫細胞化学分析。(c) 選別後7日目、14日目、21日目および28日目のニューロスフィア細胞のTUBB111発現のFCM分析(灰色)。アイソタイプ対照を使用して陰性集団を定量した(白色)。(d) cのFCM分析におけるTUBB111<sup>+</sup>細胞の定量(平均値±SEM、n=3)。(e) BMP4を使用して接着培養されている選別後14日目の細胞のeGFPとSMAについての免疫細胞化学分析。(f) NF処理を用いた、または用いないニューロスフィア細胞の形態。(g) 409B2 PHOX2B : : eGFP hiPSC株由来の神経細胞のeGFP、TH、PRPHおよびDBHについての免疫細胞化学分析(選別後29日目、スケールバー=50 μm)。EF=EGF+FGF2、EFB=EGF+FGF2+BMP4、SMA=平滑筋アクチン。

[図10]ニューロスフィア培養の手順とマーカー発現解析等の結果を示す図。

(a) ニューロスフィア培養の神経細胞誘導のための培養条件の図。(b) aの様々な神経細胞誘導条件下でのeGFP、TH、PRPHおよびDBHについての免疫細胞化学分析(スケールバー=50 μm)。(c) bにおけるPRPH<sup>+</sup>細胞、TH<sup>+</sup>細胞およびDBH<sup>+</sup>細胞の定量(平均値±SEM、n=3)。(d) ニューロスフィア細胞の貯蔵と融解後の培養の図。(e) 融解日における数に対する変化倍率として記載されている融解から7日後のニューロスフィア細胞の細胞数(平均値±SEM、n=3)。(f) 貯蔵されたニューロスフィア細胞の神経細胞誘導培養後のeGFP、TH、PRPHおよびDBHについての免疫細胞化学分析(スケールバー=50 μm)。(g)

g) fにおけるPRPH<sup>+</sup>細胞、TH<sup>+</sup>細胞およびDBH<sup>+</sup>細胞の定量（平均値±SEM、n=3）。EFB=EGF+FGF2+BMP4、NFs=神経栄養因子；NGF、BDNFおよびGDNF。

### 発明を実施するための形態

[0009] 本発明は、多能性幹細胞から交感神経細胞を製造する方法を提供する。当該製造方法は、（1）多能性幹細胞から神経堤細胞を誘導する工程、（2）神経堤細胞から交感神経前駆細胞を誘導する工程、および（3）交感神経前駆細胞から交感神経細胞を誘導する工程、を含む。以下、説明する。

#### [0010] 多能性幹細胞

多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、少なくとも本発明で使用される造血前駆細胞に誘導される任意の細胞が含まれる。多能性幹細胞は哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることがより好ましい。

多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（ntES）細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹（iPS）細胞、培養線維芽細胞や臍帯血由来の多能性幹細胞、骨髄幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、製造工程において胚、卵子等の破壊をしないで入手可能であるという観点から、iPS細胞であり、より好ましくはヒトiPS細胞である。

[0011] iPS細胞の製造方法は当該分野で公知であり、任意の体細胞へ初期化因子を導入することによって製造され得る。ここで、初期化因子とは、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/11882

0、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), *Stem Cells*, 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 3:475-479、Marson A, (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), *Nat. Cell Biol.*, 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), *Nature*, 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), *Cell Stem Cell*, 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), *Cell Stem Cell*, 6:167-74、Han J, et al. (2010), *Nature*, 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), *Stem Cells*, 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), *Nature*, 474:225-9. に記載の組み合わせが例示される。

[0012] 体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば(1)神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2)組織前駆細胞、(3)血液細胞(末梢血細胞、臍帯血細胞等)、リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、臍細胞(臍外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分

化した細胞などが例示される。体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

[0013] 多能性幹細胞から神経堤細胞を誘導する工程

神経堤(neural crest)とは、脊椎動物の発生における神経管形成時、神経外胚葉と表皮外胚葉との境界に現れる一過的組織のことをいい、ここから脱上皮化して遊走する細胞群のことを神経堤由来細胞neural crest cellsという (J Cell Biochem 107, 1046-52 (2009))。

神経堤由来細胞は、例えば、神経堤マーカーであるSOX10とFOXP3などの存在により定義付けられる。

[0014] 多能性幹細胞から神経堤細胞を誘導する工程は好ましくは下記の工程を含む。

- (i) 多能性幹細胞をTGF $\beta$ 阻害剤およびGSK3 $\beta$ 阻害剤を含む培養液中で培養する工程、
- (ii) 得られた細胞をFGF2、レチノイン酸およびBMP4を含む培地で培養する工程。

[0015] 神経堤細胞の製造のための多能性幹細胞の培養に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へTGF $\beta$ 阻害剤、GSK3 $\beta$ 阻害剤またはFGF2、レチノイン酸およびBMP4等を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Essential 6培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが含まれる。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、ROCK阻害剤、Purmorphamine、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化

剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、ヘパリンなどの1つ以上の物質も含有し得る。

[0016] 工程(i)で使用されるTGF $\beta$ 阻害剤は、TGF $\beta$ ファミリーのシグナル伝達に干渉する低分子阻害剤であり、例えばSB431542、SB202190(R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20(2003))、SB505124(GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208(Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276(Lilly Research Laboratories)などが含まれ、例えば、TGF $\beta$ 阻害剤がSB431542である場合、培地中の濃度は、好ましくは0.5 $\mu$ M～100 $\mu$ M、より好ましくは5 $\mu$ M～30 $\mu$ Mである。

[0017] 工程(i)で使用されるGSK3 $\beta$ 阻害剤は、GSK(glycogen synthase kinase)-3 $\beta$ タンパク質のキナーゼ活性(例えば、 $\beta$ -カテニンをリン酸化する能力)を阻害する物質として定義され、多くの阻害剤がすでに知られている。その具体例として、BI0(別称: GSK-3 $\beta$ インヒビターIX; 6-ブロモインジルビン-3'-オキシム)などのインジルビン(indirubin)誘導体、SB216763(3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)などのマレイイミド誘導体、GSK-3 $\beta$ インヒビターVII(4-ジブロモ-アセトフェノン)などの $\alpha$ -ブロモメチルケトン化合物、CHIR99021(6-[(2-{[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチルイミダゾール-2-イル)ピリミジン-2-イル]アミノ}エチル)アミノ]ピリジン-3-カルボニトリル)(W01999/65897; CAS番号 252917-06-9)、L803-mtsなどの細胞膜透過性リン酸化ペプチド、およびそれらの誘導体が挙げられる。例えば、GSK3 $\beta$ 阻害剤がCHIR99021である場合、培地中の濃度は、好ましくは0.5 $\mu$ M～100 $\mu$ M、より好ましくは1 $\mu$ M～10 $\mu$ Mである。

[0018] 工程(ii)で使用される培地におけるレチノイン酸の濃度は、通常、10nM～10 $\mu$ M、好ましくは、50nM～5 $\mu$ Mである。

[0019] 工程(ii)で使用される培地におけるBMP4(Bone morphogenetic protein 4)の濃度は、通常、5 ng/mlから150 ng/mlであり、好ましくは、10 ng/mlから100 ng/mlであり、より好ましくは、20 ng/mlから80 ng/mlである。

[0020] 工程 (ii) で使用される培地におけるFGF2 (fibroblast growth factor 2: 別名bFGF) の濃度は、例えば、1ng／ml～100ng／ml、好ましくは5ng／ml～50ng／ml、より好ましくは10ng／ml～30ng／mlである。

[0021] 神経堤細胞の製造において、多能性幹細胞の培養方法は、接着培養または浮遊培養であってもよいが、浮遊培養が好ましい。例えば、多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーを分離し、単細胞に解離させたのちに、浮遊培養に供することができる。多能性幹細胞の分離方法としては、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(商標)およびAccumax(商標)など）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。

浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態で培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させるための人工的処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）がされていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）または非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）によるコーティング処理）した培養容器を使用して行うことができる。浮遊培養の際には、胚様体（EB）を形成させて培養することが好ましい。

[0022] 本発明において、神経堤細胞を製造するための培養する際の温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37℃～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、神経堤細胞が得られる限り日数は特に限定されないが、例えば、工程 (i) の培養期間が1～4日であり、工程 (ii) の培養期間は例えば3～10日である。

[0023] 本発明において、得られた神経堤細胞は精製して次の工程に使用されることが好ましい。精製（選別）する場合、例えば、CD49d（インテグリンα4）を用いることができ、当該精製の方法は、当業者に周知の方法を用いることができ、例えば、抗CD49d抗体を用いたフローサイトメトリーによる精製

する方法等を用いて精製する方法が挙げられる。

[0024] 神経堤細胞から交感神経前駆細胞を誘導する工程

本発明において、交感神経前駆細胞とは、神経栄養因子を添加して培養することにより交感神経に分化しうる細胞を意味し、例えば、PHOX2B (Nature 399, 366–370 (1999)) およびCD49dが陽性であることによって認識することができる。

[0025] 交感神経前駆細胞は神経堤細胞をサイトカインおよびBMP4を含む培養液中で培養することによって得ることができる。

[0026] 本発明において交感神経前駆細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地とし、これにサイトカインおよびBMP4を添加して調製することができる。

基礎培地には、上記と同様の培地が使用できる。

[0027] BMP4の濃度は、例えば、5 ng/ml～150 ng/mlであり、好ましくは10 ng/ml～100 ng/mlであり、より好ましくは20 ng/ml～80 ng/mlである。

[0028] サイトカインとしてはEGF (Epidermal growth factor) とFGF2が好ましい。

EGFの濃度は、例えば、1ng/ml～100ng/ml、好ましくは5ng/ml～50ng/ml、より好ましくは10ng/ml～30ng/mlである。

FGF2の濃度は、例えば、1ng/ml～100ng/ml、好ましくは5ng/ml～50ng/ml、より好ましくは10ng/ml～30ng/mlである。

[0029] 交感神経前駆細胞の製造において、細胞非接着性の培養器を使用して浮遊培養を行うことが好ましく、上記のように多能性幹細胞を胚様体 (EB) を形成させて培養し、神経堤細胞を得た後、得られたEBを解離してサイトカインおよびBMP4を添加した培養液中で培養することによってニューロスフェアを形成させて培養することが好ましい。

[0030] 交感神経前駆細胞を製造するために神経堤細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37°C～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、交感神経前駆細胞が得られる

限り日数は特に限定されないが、例えば、10日間以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、または24日以上であり、30日以下、または48日以下である。

[0031] 交感神経前駆細胞から交感神経細胞を誘導する工程

交感神経細胞は、例えば、チロシンヒドロキシラーゼ（T H）および／またはドーパミン $\beta$ ヒドロキシラーゼ（D B H）の陽性細胞として特定され、好ましくはさらにペリフェリン（P R P H）陽性である。

[0032] 本発明において、交感神経細胞は、上記の交感神経前駆細胞を神経栄養因子を添加した培養液中で培養する工程を含む方法によって製造することができる。

ここで、神経栄養因子は、運動ニューロンの生存と機能維持に重要な役割を果たしている膜受容体へのリガンドであり、例えば、Nerve Growth Factor (NGF)、Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)、Neurotrophin 3 (NT-3)、Neurotrophin 4/5 (NT-4/5)、Neurotrophin 6 (NT-6)、Glia cell line-derived Neurotrophic Factor (GDNF)、Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) およびLIFなどが挙げられる。好ましい神経栄養因子は、NGF、BDNFおよびGDNFから成るグループより選択される因子である。

[0033] 添加する神経栄養因子の濃度については、当業者がその効力により適宜選択して用いてよく、例えば、1ng/ml～100ng/mlであり、好ましくは、5ng/ml～50ng/mlである。

[0034] 交感神経細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へ神経栄養因子を添加して調製することができる。基礎培地には、上述したような培地が使用できる。

[0035] 本発明において神経栄養因子を製造するために交感神経前駆細胞を培養する際の温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37°C～約39°C程度が好ましい。また、培養期間については、交感神経細胞が得られる限り日数は特に限定されないが、例えば、例えば、10日間以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、または24日以上であり、3

0日以下、または48日以下である。

#### [0036] <交感神経障害治療剤のスクリーニングへの利用>

本発明の方法によって得られた交感神経細胞は、交感神経障害治療用化合物（例えば医薬化合物、溶媒、小分子、ペプチド、またはポリヌクレオチド）のスクリーニングに用いることもできる。例えば、候補医薬化合物を、交感神経細胞に加え、当該細胞の形態または機能的な変化により、評価を行うことができる。機能的な変化の例として当該細胞から產生されるノルエピネフリンの量を計測することで評価することができる。ここで、交感神経細胞が由来する人工神経前駆細胞は、治療対象となる交感神経障害と同様の表現型を呈する細胞が好ましく、特に好ましくは、交感神経障害に侵された体細胞から作製された人工多能性幹細胞である。

#### [0037] <再生医療への応用>

本発明の方法によって得られた交感神経細胞は、損傷した交感神経系組織の正常化のために再生医療の分野で有効に使用し得る。それゆえ、この細胞は、あらゆる交感神経系細胞の障害に関する疾患（交感神経の損傷や自律神経失調症など）の治療用細胞になり得る。

#### [0038] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されない。

### 実施例

#### [0039] 方法

##### 研究承認

日本の文部科学省（M E X T）によってヒトE S Cの使用が承認された。京都大学の組換えD N A実験安全委員会によって組換えD N A研究の研究計画が承認された。

#### [0040] 細胞株

K h E S 1とK h E S 3のh E S C株は末盛博文博士（京都大学再生医学研究所）から提供していただいた。4 0 9 B 2と6 0 4 A 1のヒトi P S細胞株は山中伸弥博士（京都大学i P S細胞研究所）から提供していただい

た。これらの細胞株は、mTeSR1培地（STEMCELL Technologies社）を含むグロースファクター・リデューストMatrigelマトリックス（Corning社）被覆細胞培養プレート上で維持された。

#### [0041] プラスミド構築

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）プラスミドの構築のためにTAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://talent.cac.corneil.edu/>) を使用してTALEN反復可変二残基（RVD）をデザインした。Golden Gate TALENおよびTAL Effect or Kit 2.0とTALENコードプラスミドの組立てのためのそのプロトコル（Addgene）を使用してTALENコードプラスミドを組み立てた。改変型FokIを含む哺乳類発現ベクターは広島大学の山本卓博士から頂戴した。

ターゲティングベクターの構築のためにloxP-neo-loxPカセットベクターの3'側に1kbのPCR增幅ホモジーアームをクローニングした。次にIn-Fusion HDクローニングキット（Clontech社）を使用して1kbの5'側ホモジーアーム（PCR增幅物）、T2Aペプチド配列（オリゴヌクレオチド対をアニールした物）およびeGFPオープン・リーディング・フレーム（第1ATGを含まないORF；PCR增幅物）をloxP-neo-loxPカセットベクターの5'側に継目なくクローニングした。PCR増幅にPrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼ（TaKaRa社）を使用し、PCR増幅された全てのDNA断片をクローニングした後にそれらの配列を完全にシーケンス解析した。

Cre発現ベクターの構築のために核移行シグナルを含むCre（NLS-Cre）のORFをpLV-EF1α-MCS-IRE-S-RFP-Puroベクター（Biosettia社）のマルチクローニング部位にクローニングした。

## [0042] 形質移入と安定株の生成

T A L E N によるゲノム編集のためにスупエレクトロポレーター N E P A 2 1 (ネッパジーン株式会社) を製造業者の指示に従って使用して形質移入を実施した。具体的には S t e m P r o アキュターゼ細胞解離試薬 (G i b c o) を使用して細胞を個々の細胞に解離させた。次に 1 つのキュベットの中で 1 0 0 万個の細胞に 2  $\mu$  g の各 T A N E N プラスミドと 6  $\mu$  g のターゲティングベクタープラスミドを形質移入し、そして 5 0  $\mu$  M の Y 2 7 6 3 2 (Merck Millipore 社) が添加された m T e S R 1 培地を含むグロースファクター・リデュースト M a t r i g e l マトリックス被覆 6 cm 細胞培養ディッシュ (BD Falcon 社) にすぐに再播種した。形質移入から 2 4 ~ 4 8 時間後に Y 2 7 6 3 2 (1 0  $\mu$  M) を使用して細胞生存を促進した。1 0 0 m g / m l の G 4 1 8 (和光純薬工業株式会社) を使用する選択を形質移入から 3 日後から開始して細胞を選択した。薬剤選択から 1 0 ~ 1 4 日後に生存クローニングを単離し、その後の実験のために増殖させた。

C r e - I o x P の欠失のために 3. 5 cm ディッシュ内で h P S C を通常通りに継代処理した (BD Falcon 社)。2 日後、F u G e n e H D 形質移入試薬 (Promega 社) を製造業者の指示に従って使用して 3  $\mu$  g の C r e 発現プラスミドを形質移入した。5 0 0 n g / m l のピューロマイシン (Invitrogen 社) を使用する選択を形質移入から 2 日後から開始して細胞を選択した。形質移入から 4 日後に生存細胞を解離させ、5 n g / m L の F G F 2 (和光純薬工業株式会社) および 1 0  $\mu$  M の Y 2 7 6 3 2 が添加された 靈長類 ES 細胞用培地 (株式会社リプロセル) を含む有糸分裂が不活性化された S N L フィーダー細胞上にそれらの生存細胞を継代処理した。次の日に Y 2 7 6 3 2 を除去した。継代処理から 1 4 日後に個々のコロニーを単離し、その後の実験のために増殖させた。

## [0043] ゲノム PCR

Q I A a m p DNA Blood Mini Kit (Q I A G E N 社)

) を製造業者の指示に従って使用してゲノムDNAを抽出した。Primus TAR GXL DNAポリメラーゼを使用して標的部位でのゲノムへの組込みを検出するためのゲノムPCRを実施した。

#### [0044] hPSCの分化

NMP様細胞誘導のためにStemProアキュターゼ細胞解離試薬を使用して維持されていたhPSCを個々の細胞に解離させ、96ウェル・ウルトラロウ・アタッチメント・マルチウォールプレート(Corning社)を使用して10μMのSB431542(シグマ・アルドリッヂ社)、様々な濃度のCHIR99021(Merck Millipore社)および10μMのY27632が添加された100μLのEssential 6培地(Gibco)の中でそれらの細胞をすぐに再凝集させた(10000細胞/ウェル)。1日目に10μMのSB431542(シグマ・アルドリッヂ社)および0日目と同じ濃度のCHIR99021が添加された50μLのEssential 6培地をそれらの96ウェルプレートの各ウェルに添加した。

背腹軸の改変のために1. 5 μM、2. 0 μM、または3. 0 μMのCHIR99021で処理された3日目の凝集体を20ng/mLのFGF2および/またはレチノイン酸(RA、全トランス型、シグマ・アルドリッヂ社)が添加されたEssential 6培地の中で培養した。BMP4(50ng/mL; R&D Systems社)または1μMのPurmorphamine(Tocris Bioscience社)を表示されている条件に加えた。培地を一日おきに10日目まで交換した。

頭蓋運動神経細胞分化のために1. 5 μMのCHIR99021で処理された3日目の凝集体を20ng/mLのFGF2、1μMのRAおよび1μMのPurmorphamineが添加されたEssential 6培地の中で10日目まで培養した。培地を一日おきに交換した。10日目にStemProアキュターゼ細胞解離試薬を使用してそれらの細胞を個々の細胞に解離させ、蛍光活性化細胞選別(FACS、下記参照)によってeGFP+ C

D49d-細胞を選別した。1×Glutamax I (Gibco)、N2およびB27サプリメント (Gibco)、100nMのコンパウンドE (Abcam社)、10ng/mLのBDNF (R&D Systems社)、10ng/mLのGDNF (R&D Systems社)が添加されたNeurobasal培地 (Gibco)を含むグロースファクター・リデューストMatrigelマトリックス被覆培養プレート上で選別済みの細胞を培養し、20μMのY27632を選別後の最初の2日の間に添加した。培地を一日おきに交換し、選別後の7～10日の時点でそれらの細胞を一度継代処理した。

交感神経系NCCおよびSN (Sympathetic neurons) の分化のために2.0μMのCHIR99021で処理された3日目の凝集体を20ng/mLのFGF2、100nMのRAおよび50ng/mLのBMP4が添加されたEssential 6培地の中で10日目まで培養した。培地を一日おきに交換した。10日目にStemProアキュターゼ細胞解離試薬を使用してそれらの細胞凝集体を個々の細胞に解離させ、FACSによってeGFP+CD49d+細胞を選別した。ウルトラロウ・アタッチメント・ディッシュ (10cm) またはマルチウォールプレート (6ウェル) (Corning社) の中の1×Glutamax I (Gibco)、N2およびB27サプリメント、20ng/mLのFGF2、20ng/mLのEGF (R&D Systems社)、50ng/mLのBMP4および2μg/mLのヘパリン (シグマ・アルドリッヂ社) が添加されたNeurobasal培地の中で選別済みの細胞を500000細胞/mLの密度で培養した。培地を3～4日毎に交換し、0.05%のトリプシンと10μg/mLのDNase I (STEMCELL Technologies社)を使用し、続いて穏やかにピペッティングして細胞を解離させることにより細胞塊を7日毎に継代処理した。

神経細胞の成熟のために1×Glutamax I (Gibco)、N2およびB27サプリメント、神経栄養因子 (NF) であるNGF (R&D

S y s t e m s 社)、B D N F および G D N F (1 0 n g / m L ずつ) が添加された N e u r o b a s a l 培地を含むウルトラロウ・アタッチメント・ディッシュまたはマルチウォールプレート上に細胞塊を移した。培地を 3 ~ 4 日毎に交換した。N F 処理から 1 4 日後に 0. 0 5 % トリプシンおよび 1 0 μ g / m L の D N a s e I とそれに続く穏やかなピペッティングによってそれらの細胞塊を解離させた。グロースファクター・リデュースト M a t r i g e l マトリックス被覆培養プレートまたはガラスボトムディッシュ（松浪硝子工業株式会社）上の 1 0 % (体積／体積) の F B S (H y c l o n e )、1 × G l u t a m a x I (G i b c o)、N F (1 0 n g / m L ずつ) および 2 0 μ M の Y 2 7 6 3 2 が添加された D M E M (ナカライテスク株式会社) の中に解離済みの細胞を播種した。その後、Y 2 7 6 3 2 を含まない培地で前記培地の半分を交換することにより 2 日毎にそれらの培養物に栄養供給した。

B Z - X 7 0 0 蛍光顕微鏡（株式会社キーエンス）を使用して培養細胞の画像を取得した。

#### [0045] フローサイトメトリー分析と F A C S

P E 結合マウス抗 C D 4 9 d 抗体 (B i o L e g e n d 社)、A l e x a F l u o r 4 8 8 ラット抗 G F P 抗体 (B i o L e g e n d 社) および A l e x a F l u o r 6 4 7 マウス抗クラス I I I ベータチューブリン (T U B B I I I ) 抗体 (B D バイオサイエンス社) を製造業者のプロトコルに従って使用した。M A C S Q u a n t A n a l y z e r 1 0 (ミルテニーバイオテク社) を使用してフローサイトメトリーを実施した。B D F A C S A r i a I I (B D バイオサイエンス社) によって F A C S を実施した。全ての実験において対照集団としてアイソタイプ対照を使用した。

#### [0046] R N A 単離と R T - P C R

R N e a s y M i n i k i t (Q I A G E N 社) を使用して細胞からの全 R N A 抽出を実施した。P r i m e S c r i p t R T M a s t e r M i x (T a K a R a 社) を使用する逆転写に全 R N A (1 μ g) を使用

した。Ex Taq Hot Startバージョン (Takara社) またはPrimeStar GXL DNAポリメラーゼ (Takara社) を使用してRT-PCRを実施した。

#### [0047] 免疫細胞化学と顕微鏡観察

4 %のパラホルムアルデヒド中で細胞を室温で20分間にわたって固定し、0.2 %のトリトンX-100中でそれらの細胞を室温で10分間にわたって透過処理した。次にあらゆる非特異的な結合を防止するためにBlock Ace (DSファーマバイオメディカル社)と共にそれらの細胞を定温放置した後にそれらの細胞を一次抗体と共に4℃で12時間または室温で2時間にわたって定温放置した。FITC、Alexa647、Cy-3 (Jackson ImmunoResearch社; 1/200) またはAlexa555 (Invitrogen; 1/1000) のどれかに結合している適切な種特異的抗血清を使用して二次抗体との定温放置を1時間にわたって実施した。DAPI (シグマ・アルドリッヂ社; 1/1000) で細胞核を染色した後にFV1000またはFV10i共焦点顕微鏡 (オリンパス株式会社) を使用して細胞像を取得した。全ての抗体がBlock Ace中に希釈された。次の一次抗体を表示されている濃度で使用した：ニワトリ抗GFP (Abcam社; 1/5000)、ヤギ抗PHOX2B (Santa Cruz社; 1/200)、ヤギ抗ChAT (Millipore社; 1/200)、マウス抗TUBBIII (Biologend社; 1/100)、ウサギ抗SOX10 (Abcam社; 1/200)、マウス抗HOXB7 (R&D Systems社; 1/50)、ウサギ抗TH (Millipore社; 1/1000)、ウサギ抗DBH (ImmunoStar社; 1/400)、ヤギ抗PRPH (Santa Cruz社; 1/200)、マウス抗 $\alpha$ 平滑筋アクチン (Abcam社; 1:400)。

#### [0048] 免疫細胞化学分析結果の定量

同一のゲインと露光の設定で試料の画像を取得した。DAPI<sup>+</sup>細胞、PHOX2B<sup>+</sup>細胞、SOX10<sup>+</sup>細胞、eGFP<sup>+</sup>細胞、HOXB7<sup>+</sup>細胞、また

はTH<sup>+</sup>細胞の平均数を算出するためにImageJソフトウェアプログラムを使用して調製物当たり9視野を自動計測した。ChAT<sup>+</sup>細胞、PRPH<sup>+</sup>細胞、またはDBH<sup>+</sup>細胞の平均数を算出するために調製物当たり9視野を手動計測した。

#### [0049] ノルエピネフリン定量

Cell Stem Cell 19, 95–106 (2016)に報告されたようにして培養上清中のノルエピネフリン濃度を測定した。培養されたSNをHBSS (Gibco) を用いて15分間培養した。対照としてその培地を収集した。それらの細胞を50 mMのKClを含むHBSS中でさらに15分間にわたって培養し、その後で培地を収集した。培地収集後に培地を300 gで5分間にわたって遠心分離して細胞または細胞破片を排除した。ノルエピネフリンの分解を防止するために1 mMのEDTA (Gibco) と4 mMのメタ重亜硫酸ナトリウム（ナカライトスク株式会社）をそれらの試料に添加し、分析までそれらの試料を−80°Cで貯蔵した。エピネフリン／ノルエピネフリンELISAキット（Abnova社）を製造業者の指示に従って使用して試料中の総ノルエピネフリンレベルを定量した。対照試料における計算されたエピネフリンレベルを50 mMのKClで処理した試料のエピネフリンレベルから減算してノルエピネフリン放出レベルを決定した。

#### [0050] 統計分析

統計分析のためにMicrosoft Excel 2013ソフトウェアプログラムを使用した。結果が平均値±標準誤差 (SEM) として表されている。スチューデントのt検定を用いて統計的有意性を決定した。「n」は独立した実験の数を表している。

#### [0051] <結果>

レポーターを利用して分化中のPHOX2B発現を追跡することにした。PHOX2Bはマウスにおける交感神経節、副交感神経節および腸管神経節などの自律神経系神経堤派生物の発生に必須の転写因子である。長期持続性のPHOX2B発現（交感神経系NCCから成熟神経細胞まで）を考慮して

、PHOX2B発現の追跡が分化プロトコルの最適化に有用であり得るとの仮説を立てた。PHOX2B座位の3'UTR領域を標的とし、2種類のhPSCクローン、すなわちヒト胚性幹細胞(hESC、細胞株：Khes1)およびヒト人工多能性幹細胞(hiPSC、細胞株：409B2)からPHOX2B::eGFPノックインレポーター株を生成した(図5a、b)。

[0052] SNは体幹部NCCに由来し、体幹部NCCはNMPに由来する。NMPは胚の体軸発生時に後部神経板および沿軸中胚葉について両能性である。NMP誘導のためにはhPSCのWNT介在性後方化が重要である。凝集培養の最初の3日間におけるWNT活性化因子CHIR99021の効果をまず評価した。Hox遺伝子の発現上昇には1.5μM以上のCHIRを用いる処理が有効であった。このことはこれらの条件下の細胞が3日間の初期分化の間に後方化を開始したことを見ている(図6a)。NMPのマーカーであるBRACHURYとSOX2もこれらの条件下で発現し、3日目のCHIR処理凝集体がNMPの特徴を有していることを確認した。中胚葉特異的転写因子TBX6の発現が上昇したので、より高い投与量のCHIR(5μM)での処理がhPSCを中胚葉への発生運命に導く可能性が高い。

[0053] 身体の後方領域では様々なサブタイプの神経前駆細胞(NPC)とNCCが背腹軸決定を経てNMP由来の神経板から生成される。それ故、我々はこれらの3日目の凝集体の背腹軸を改変した。骨形成タンパク質(BMP)シグナルとソニック・ヘッジホッグ(SHH)シグナルがそれぞれ背方化および腹方化にとって重要であるので、BMP4とSHHアゴニストであるプルモルファミン(Pur)を1.5μM、2.0μM、または3.0μMのCHIRで処理した3日目の凝集体に添加した(図1a)。加えて、レチノイン酸(RA)はNMPを経たNPC誘導に有効であり、且つ、神経管外植物または胚性自律神経節からの初代神経堤幹細胞の神経細胞誘導がRAの存在下で実施されていたので、RAをこの状況で使用した。幾つかの条件では40%を超える純度でPHOX2B::eGFP<sup>+</sup>細胞が検出された(図1bお

および図6 b)。それらのうち、次の(i) C H I R<sup>1. 5 μM</sup>P u r+R A<sup>100 nM</sup>、(ii) C H I R<sup>2. 0 μM</sup>P u r+R A<sup>100 nM</sup>、(iii) C H I R<sup>1. 5 μM</sup>B M P+R A<sup>100 nM</sup>および(iv) C H I R<sup>2. 0 μM</sup>B M P+R A<sup>100 nM</sup>という4条件に焦点を当てた。3. 0 μMのC H I R処理では1. 5 μMまたは2. 0 μMのC H I R処理と比較して比較的に低い頻度(0%~10%)でe G F P+細胞が検出された(データを示さず)。

[0054] P H O X 2 Bは自律神経堤派生物だけではなく後脳における中枢神経系(C N S)神経細胞およびそれらの神経細胞の前駆細胞においても発現する。C D 4 9 d(インテグリンα4)は遊走性N C Cおよびそれらの派生物において発現するので、C N S中のN P Cなどの他の系譜からN C Cを区別するためにC D 4 9 dを使用した。P u r処理条件下(条件(i)および(ii))よりもB M P処理条件下(条件(iii)および(iv))でより多くのC D 4 9 d+細胞が検出された(図1 c)。B M P 4処理細胞(条件(iii)および(iv))だけがN C CマーカーであるS O X 1 0とF O X D 3を発現したが、一方でP u r処理細胞ではN P CマーカーであるS O X 1とP A X 6がより強く発現している(図1 d)。興味深いことに我々の実験ではP u r処理条件下だけではなくB M P 4処理条件下でもP H O X 2 Bの発現上昇にR Aが重要であった(図1 b、図6 bおよび図7 a)。R Aがあつても無くともS O X 1 0+細胞が検出されたがS O X 1 0+とP H O X 2 B+の二重陽性細胞はR Aを含む条件下でのみ見出された(図7 b、c)。このことはB M P 4がN C C誘導に関与し、R AがN C Cの発生運命を自律系譜に向かうよう改変することを示している。

前後軸決定のレベルはW N Tシグナル量によって決定されることが幾つかのこれまでの報告に記載された。これと一致して我々の実験ではC H I R濃度が高くなるほど細胞がより後方に規定された。1. 5 μMでのC H I R処理によって細胞が後脳および頸髄領域(H O X B 4+H O X B 8+H O X C 9-)に割り当てられ、一方で2. 0 μMのC H I R処理によって細胞が頸髄から胸髄の領域(H O X B 4-H O X B 8+H O X C 9+)に割り当てられた(図

1 d)。

[0055] Pur 条件下では e G F P + 細胞の大半が C D 4 9 d を発現しなかった (図 1 c および図 6 c)。S H H シグナルは神経上皮細胞を腹方化するので、条件 (i, iii) の下では e G F P + 細胞は腹方後脳内の頭蓋運動神経細胞の前駆細胞であると仮説を立てた。実際にこれらの C D 4 9 d - e G F P + 細胞は、運動神経細胞マーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ (C h A T) を発現する神経細胞に分化した (図 6 d, e)。

[0056] こうして、1) C H I R で処理した 3 日目の凝集体は C N S 神経前駆細胞と N C C の両方を生じさせ得ること、2) B M P 処理と R A 処理が P H O X 2 B 発現性 N C C の誘導に必須であること、および3) 2. 0  $\mu$ M の C H I R 処理によって h P S C について体幹部レベルの前後軸が決定されることが確認された。e G F P + 細胞は実際にこれらの条件下で P H O X 2 B タンパク質を発現し、このことによって我々のレポーター系の漏出の可能性が除外された (図 5 c)。

[0057] 我々の培養における交感神経系 N C C の誘導を確認するために次に C H I R 2. 0  $\mu$ M B M P + R A 100 nM 条件下の C D 4 9 d + e G F P + 細胞の特徴を分析した (図 2 a, b)。分化中に C D 4 9 d + e G F P + 細胞は 8 日目の後から出現し、e G F P + 細胞の中には 10 日目の後に C D 4 9 d 発現を喪失する細胞もあった (図 8 a, b)。このことは異なるステージの細胞が共存することを示唆している。予期された通り、e G F P + 細胞の中では大半の C D 4 9 d + 細胞が神経細胞マーカー T U B B I I I を弱く発現し、一方で C D 4 9 d - 細胞が T U B B I I I を強く発現した (図 8 c, d)。このことは C D 4 9 d - e G F P + 細胞が神経細胞分化系列決定の後期ステージにあることを示している。C D 4 9 d + e G F P + 細胞の大半が S O X 1 0 と P H O X 2 B について二重陽性であった (図 2 c, d および図 8 e)。このことはこれらの細胞がマウス胚性交感神経節に局在する S O X 1 0 と P H O X 2 B の二重陽性前駆細胞に対応することを示唆している。C D 4 9 d + e G F P + 細胞の大半が H O X B 7 を発現するので (図 2 e, f および図 8 f)、これらの細胞は

体幹部レベルの前後軸に規定された。まとめると、 $\text{CHIR}^{2.0\mu\text{M}} \text{BMP} + \text{RA}^{100\text{nM}}$ 条件下の $\text{CD49d}^+ \text{eGFP}^+$ 細胞における必須転写因子の発現は生体内および生体外のマウス交感神経系NCCにおける必須転写因子の発現と同等であることが確認された。

[0058] 次にSNの誘導のために $\text{CD49d}^+ \text{eGFP}^+$ 細胞の培養条件を最適化した。SNは分化を通してPHOX2Bの発現を維持しており、一方で交感神経系NCC由来の非神経細胞はPHOX2B発現を喪失しているので、eGFP発現を再度追跡した。ニューロスフィア培養法によってインビトロで胚性マウス交感神経節中の交感神経系NCCを選択的に増殖させることができるので、EGFおよびFGF2を使用して選別済みの $\text{CD49d}^+ \text{eGFP}^+$ 交感神経系NCC富化細胞を懸濁培養して凝集体を形成した(図3a)。しかしながら、それらの細胞の約半数が選別後の培養の最初の7日の間にeGFP発現を喪失した(図3b、c)。生体内および生体外での動物実験では交感神経系NCCの初期神経細胞分化系列決定にBMP4が必要である。それ故、BMP4を添加し、そのBMP4によって細胞の大半(90%超)においてeGFPの発現が維持された。さらに、より長く(選別後28日まで)それらの細胞を培養すると、この条件によってeGFP発現を喪失せずに細胞数が10倍を超えて拡大した(図3d)。

その延長された凝集培養の間にSOX10の発現が急速に低下し、14日後にSOX10を発現する細胞はほとんど無かった(図3dおよび図9b)。SOX10の喪失と共にPHOX2Bの維持により交感神経系NCCが神経細胞分化系列決定に導かれることを考慮すると、BMP4を使用するニューロスフィア培養は交感神経系NCCを選択的に増殖させるようであり、それらの交感神経系NCCの発生を神経細胞へと促す。実際にBMP4を使用するとTUB111B<sup>+</sup>細胞の数が培養の最初の14日の間に増加した(図9c、d)。接着培養ではBMP4の存在下でも大半の細胞がeGFP発現を喪失し、NC由来筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ 平滑筋アクチンを発現する細胞もあった(図9e)。このことは神経細胞系譜への決定に凝集体の浮

遊培養が重要であることを示している。まとめると、我々は P H O X 2 B 発現を維持しながら交感神経系譜細胞を増殖させる培養系の確立に成功した。

- [0059] 次にニューロスフィア培養から S N を誘導し、それらの S N の純度を評価した。播種された B M P 4 処理凝集体は神経細胞の形態を示さず（図 9 f ）、おそらくそれはそれらの凝集体が未熟であることによるものであった。神経前駆細胞の成熟のため、全てが S N の初期神経細胞分化系列決定に関与することが報告されているが、成熟型神経細胞の誘導にとって充分ではない E G F 、 F G F 2 および B M P 4 を除き、交感神経細胞発生を促進する神経栄養因子（ N F ）である N G F 、 B D N F および G D N F を添加した（図 3 e ）。この改変プロトコルを用いた 14 日の培養後にそれらの細胞は軸索形態を示した（図 9 f ）。この時点において、両方ともカテコールアミン合成の触媒酵素であり、したがってノルアドレナリン作動性神経細胞のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ（ T H ）とドーパミン β ヒドロキシラーゼ（ D B H ）についてそれらの細胞の大半（ 85 % 超）が陽性であった（図 3 f 、 g ）。これらの細胞は末梢神経細胞特異的中間径フィラメントであるペリフェリン（ P R P H ）も発現した。したがって、これらの神経細胞は体幹部 N C C に由来する末梢（ P R P H + ）ノルアドレナリン作動性（ T H + D B H + ）神経細胞であり、 S N に対応する。この成熟ステップは選別後の培養の様々な時点のニューロスフィア細胞に適用可能であった（図 10 a ~ c ）。それ故、大半の P H O X 2 B 発現性ニューロスフィア細胞は培養が延長された（ 28 日の）ときも最終的に分化した神経細胞を生じさせる。さらに、ニューロスフィア細胞は生存性または神経細胞分化能を失わずに一般的方法によって凍結保存され得る（図 10 d ~ g ）。最後に、 S N の神経伝達物質であるノルエピネフリンの放出をこれらの神経細胞の機能上の態様として確認した（図 3 h ）。 h P S C 由来の S N から放出されたノルエピネフリンの量はこれまでの報告におけるものと同等であった。

- [0060] 培養条件の改良によって段階的に h P S C を S N に分化させることに成功した。しかしながら、細胞選別ステップが P H O X 2 B 発現性 N C C の精製

に必要であるので、そのような分化は P H O X 2 B : : e G F P レポーター h P S C 株を使用する場合にのみ可能であった。我々の最終的な目標は様々な h P S C 株に適用可能である堅固で普遍的な分化方法を開発することであるので、次に P H O X 2 B レポーターを含まない h P S C 株に我々の系を適用することを試みた。

[0061] この目的のために P H O X 2 B : : e G F P h P S C 株を使用する細胞選別を除いて上記と同じ方法を繰り返した（図 4 a）。驚くべきことにニューロスフィア培養に移した後に e G F P + 細胞が高頻度（17 日目； 75%～85%）で精製され、神経細胞成熟ステップ後にニューロスフィア細胞として高頻度（31 日目； 75%～90%）で維持される（図 4 b、c）ことがタイムコース分析によって示された。免疫染色によってそれらの細胞の 75%～80%において P H O X 2 B + T H + D B H + P R P H + 末梢ノルアドレナリン作動性神経細胞の特徴が示された（図 4 d、e）。このことは細胞選別が無くとも本プロトコルが交感神経系 N C C およびそれらの派生物を選択的に増殖させ得ることを示している。

[0062] この原理のさらなる証拠として、 P H O X 2 B : : e G F P レポーターを含まない 4 種類の異なる h P S C 株（h E S C 株としての K h E S 1 株と K h E S 3 株、 h i P S C 株としての 4 0 9 B 2 株と 6 0 4 A 1 株）を使用して同じ方法を実施した。この実験シリーズではニューロスフィア培養での選択的増殖により 70%～80% の純度で S O X 1 0 - P H O X 2 B + 交感神経前駆細胞と S N の両方がしっかりと生成された（図 4 f～h）。これらのデータは様々な h P S C 株からの S N の生成についての我々のプロトコルの確実性を示している。

## 請求の範囲

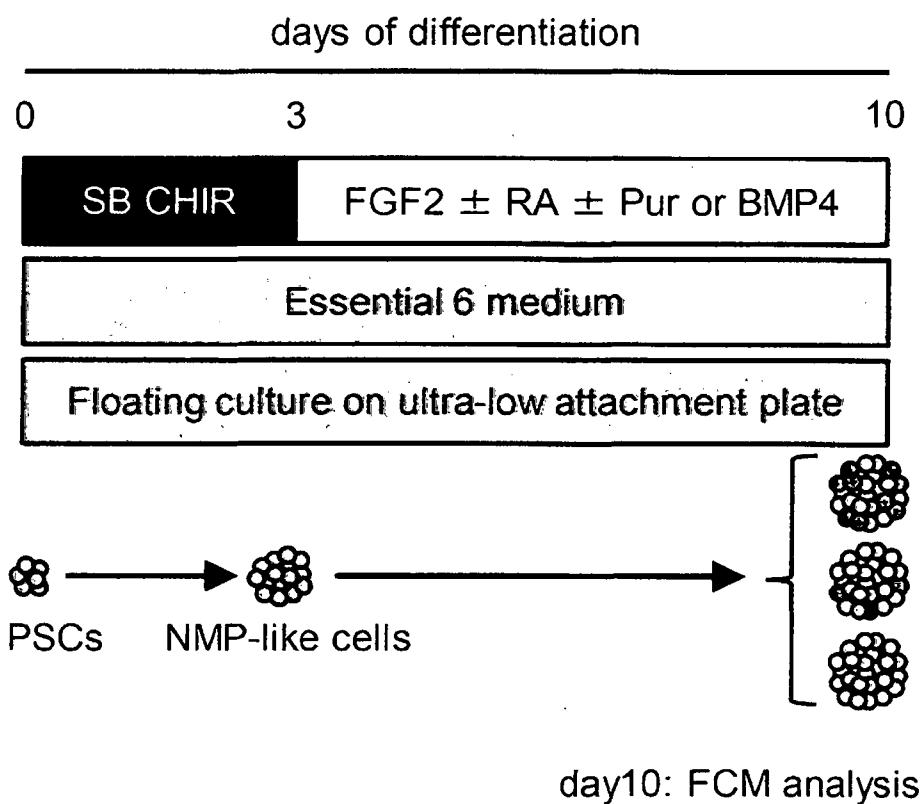
- [請求項1] 多能性幹細胞をFGF (Fibroblast growth factor) 2、レチノイン酸およびBMP (Bone morphogenetic protein) 4を含む培養液中で培養する工程を含む、神経堤細胞の製造方法。
- [請求項2] FGF2の濃度が1ng／ml～100ng／mlであり、レチノイン酸の濃度が10nM～10 μMであり、BMP4の濃度が5 ng/ml～150 ng/mlである、請求項1に記載の神経堤細胞の製造方法。
- [請求項3] 多能性幹細胞をGSK (Glycogen synthase kinase) 3β阻害剤およびTG F (Transforming growth factor) β阻害剤を含む培養液中で培養し、その後、FGF2、レチノイン酸およびBMP4を含む培養液中で培養する、請求項1または2に記載の神経堤細胞の製造方法。
- [請求項4] 前記培養は浮遊培養で行われる、請求項1～3のいずれか一項に記載の神経堤細胞の製造方法。
- [請求項5] CD49dによる選別工程を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の神経堤細胞の製造方法。
- [請求項6] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1～5のいずれか一項に記載の神経堤細胞の製造方法。
- [請求項7] 神経堤細胞をサイトカインおよびBMP4を含む培養液中で培養し、交感神経前駆細胞を誘導する工程を含む、交感神経前駆細胞の製造方法。
- [請求項8] サイトカインがEGF (Epidermal growth factor) およびFGF2である、請求項7に記載の交感神経前駆細胞の製造方法。
- [請求項9] BMP4の濃度が5 ng/ml～150 ng/mlであり、EGFの濃度が1ng／ml～100ng／mlであり、FGF2の濃度が1ng／ml～100ng／mlである、請求項8に記載の交感神経前駆細胞の製造方法。
- [請求項10] 前記培養は浮遊培養で行われる、請求項7～9のいずれか一項に記載の交感神経前駆細胞の製造方法。
- [請求項11] 神経堤細胞が請求項1～6のいずれか一項に記載の方法によって得られた、請求項7～10のいずれか一項に記載の交感神経前駆細胞の製

造方法。

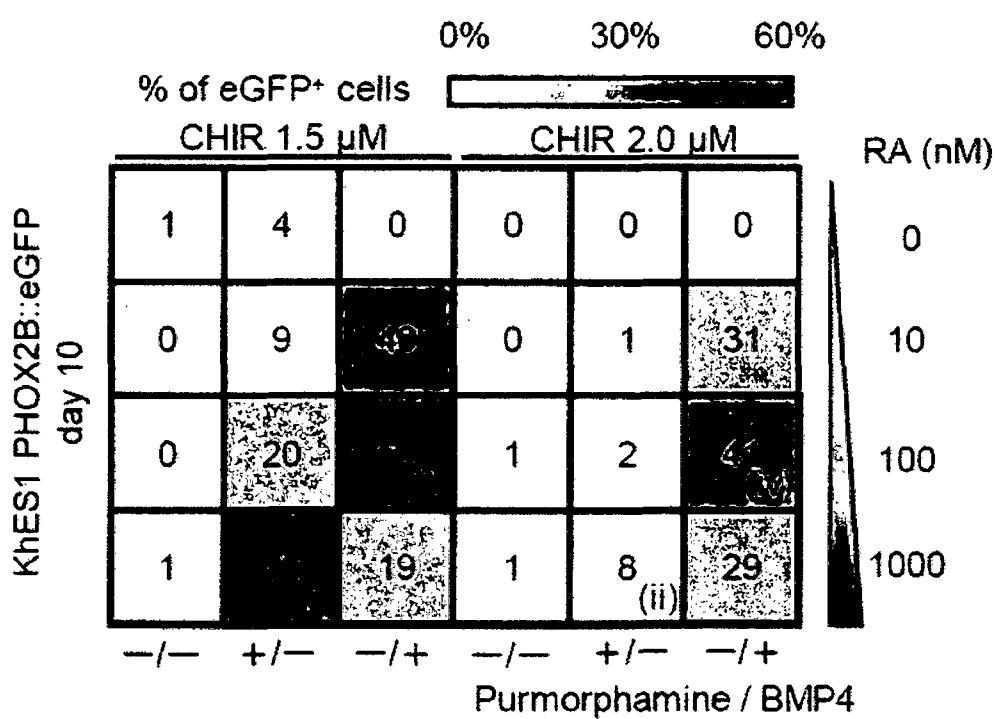
- [請求項12] 請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法によって神経堤細胞を製造し、得られた神経堤細胞を用いて請求項 7～10 のいずれか一項に記載の方法によって交感神経前駆細胞を製造する、交感神経前駆細胞の製造方法。
- [請求項13] 請求項 7～12 のいずれか一項に記載の方法により交感神経前駆細胞を製造する工程、および得られた交感神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養して交感神経前駆細胞を交感神経細胞に成熟させる工程を含む、交感神経細胞の製造方法。
- [請求項14] 前記神経栄養因子は、NGF (Nerve growth factor)、BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) および GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) である、請求項 13 に記載の方法。
- [請求項15] 請求項 13 または 14 に記載の方法によって得られた交感神経細胞。
- [請求項16] 請求項 13 または 14 に記載の方法によって得られた交感神経細胞を含む交感神経障害治療用組成物。

[図 1]

a

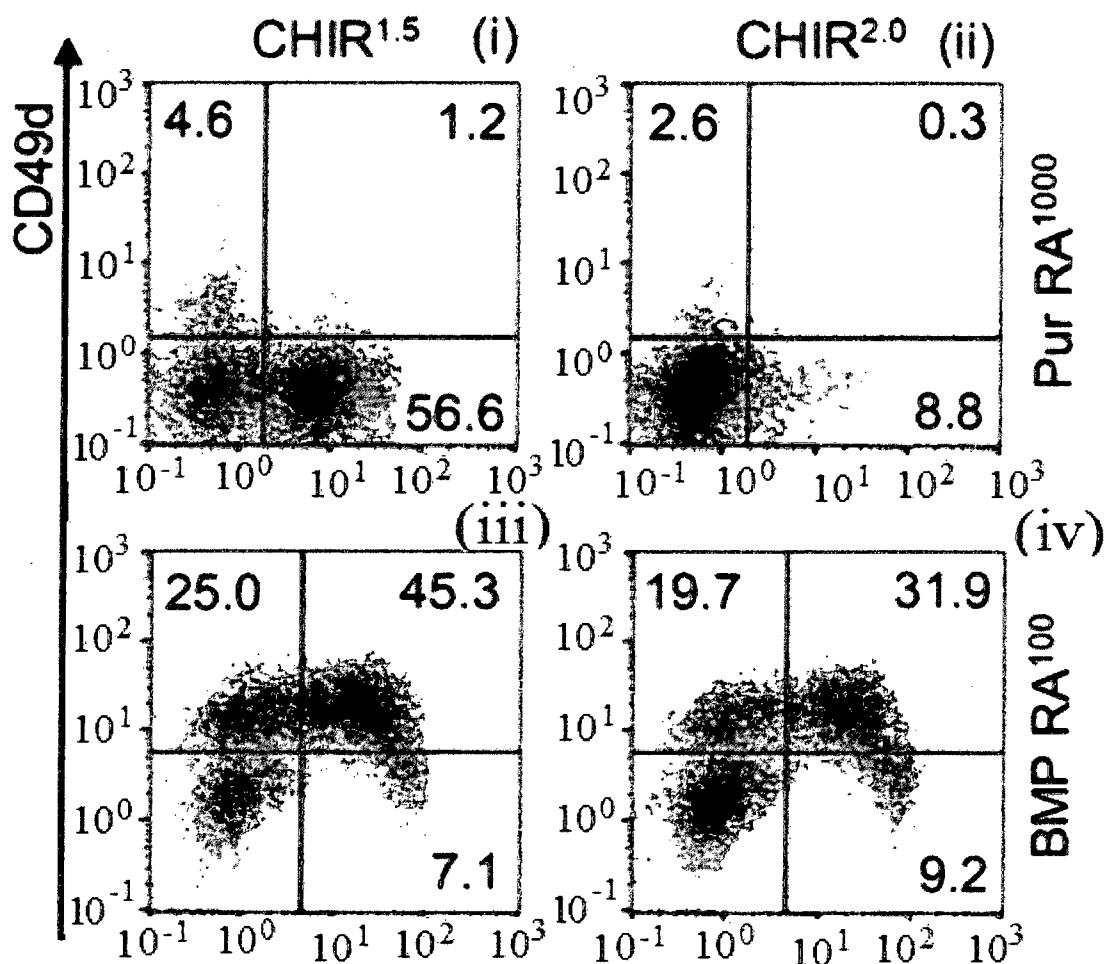


b



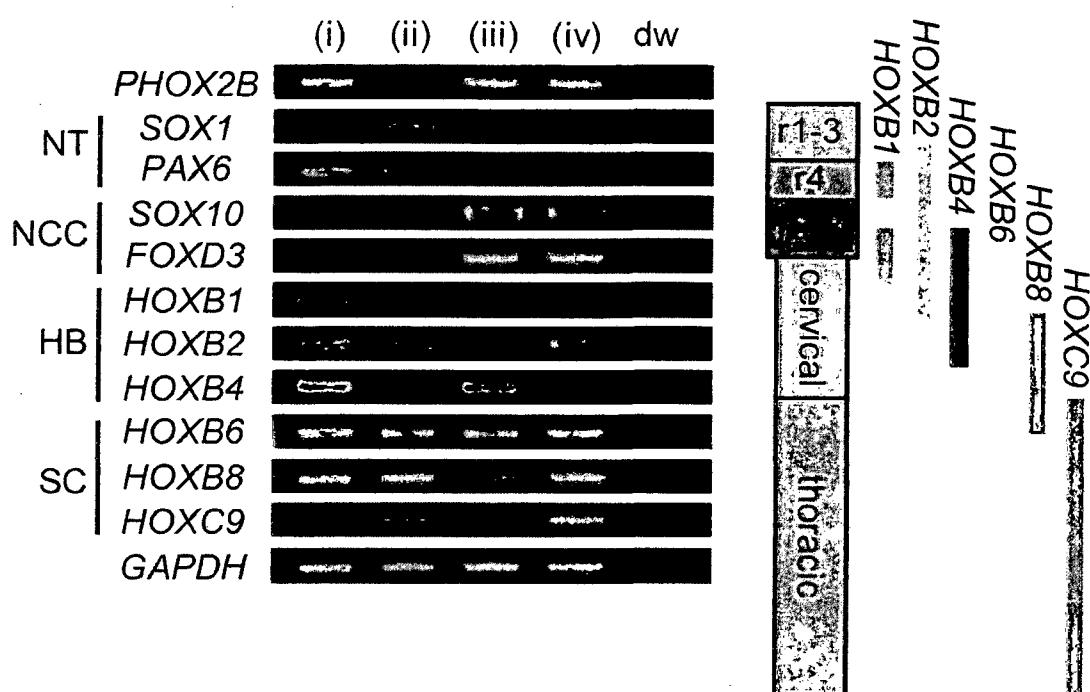
c

## KhES1 PHOX2B::eGFP day 10

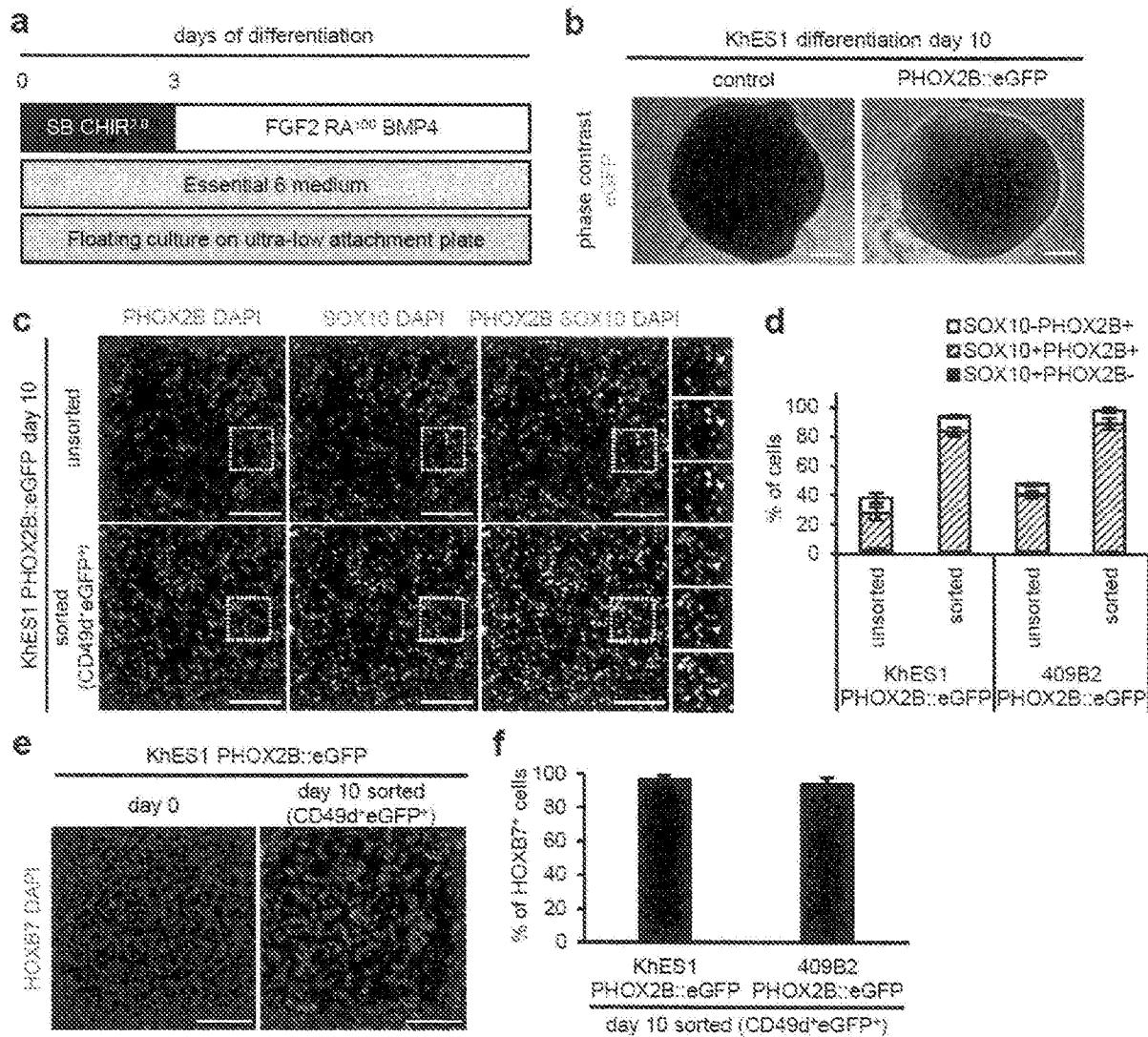


d

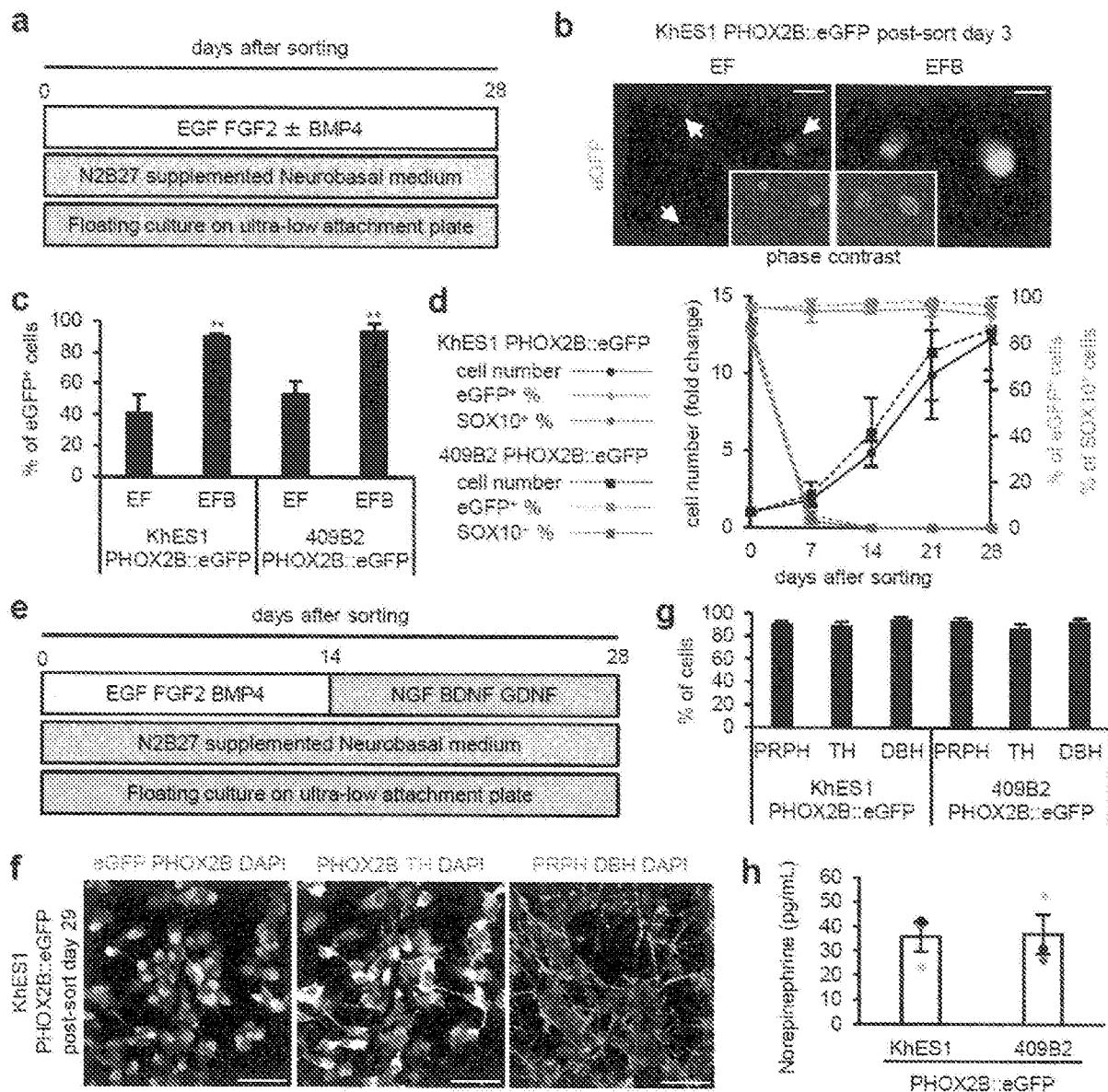
## KhES1 PHOX2B::eGFP day 10



## [図2]

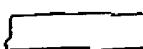
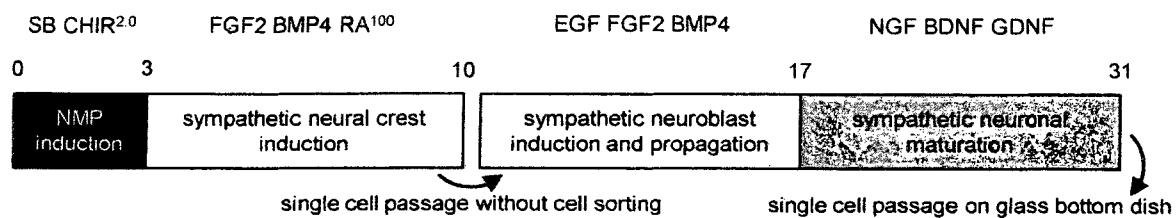


## [図3]

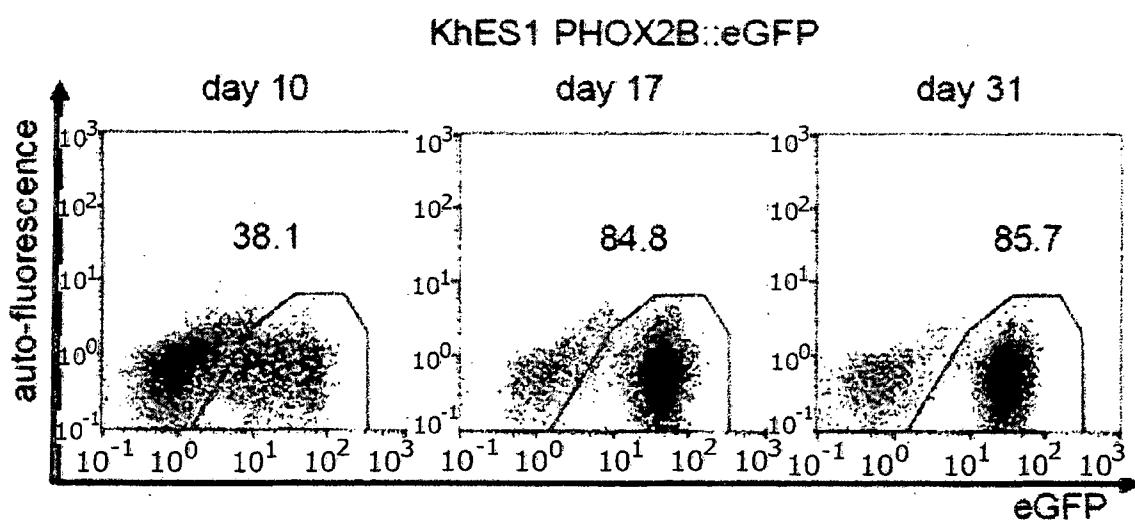


[図 4]

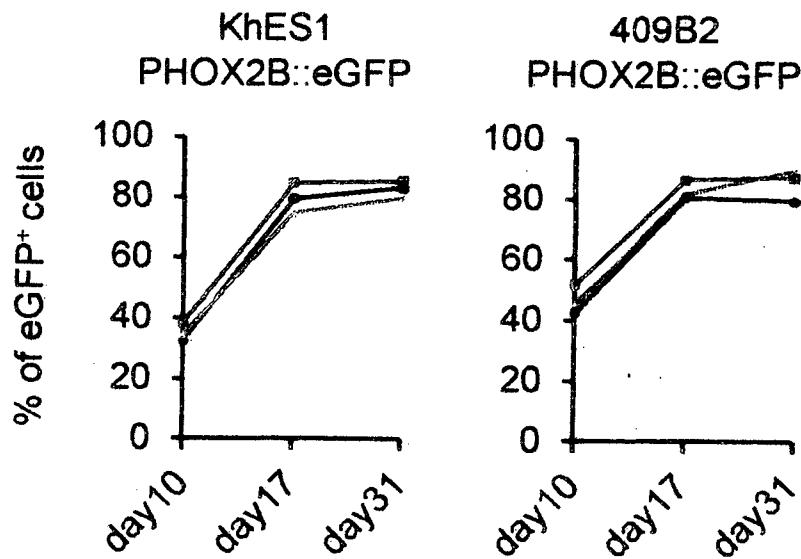
a



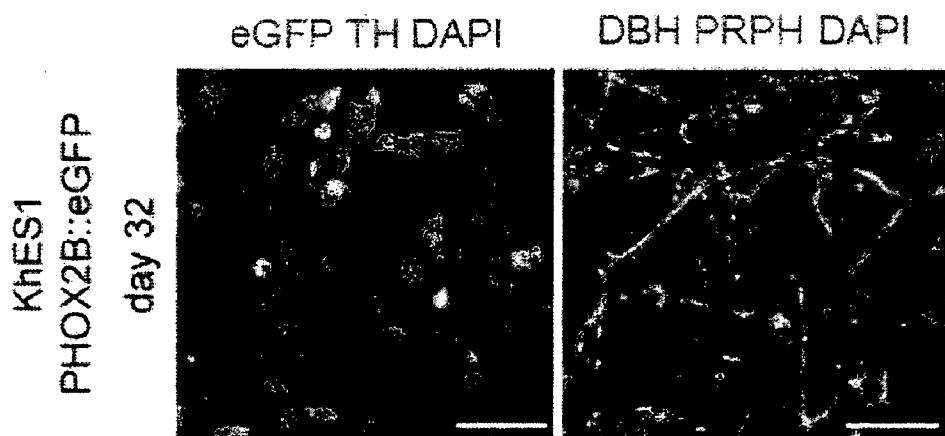
b



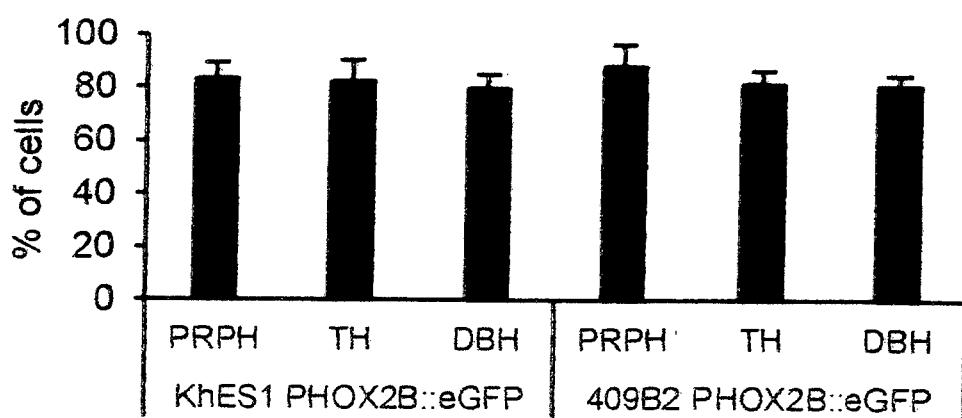
c



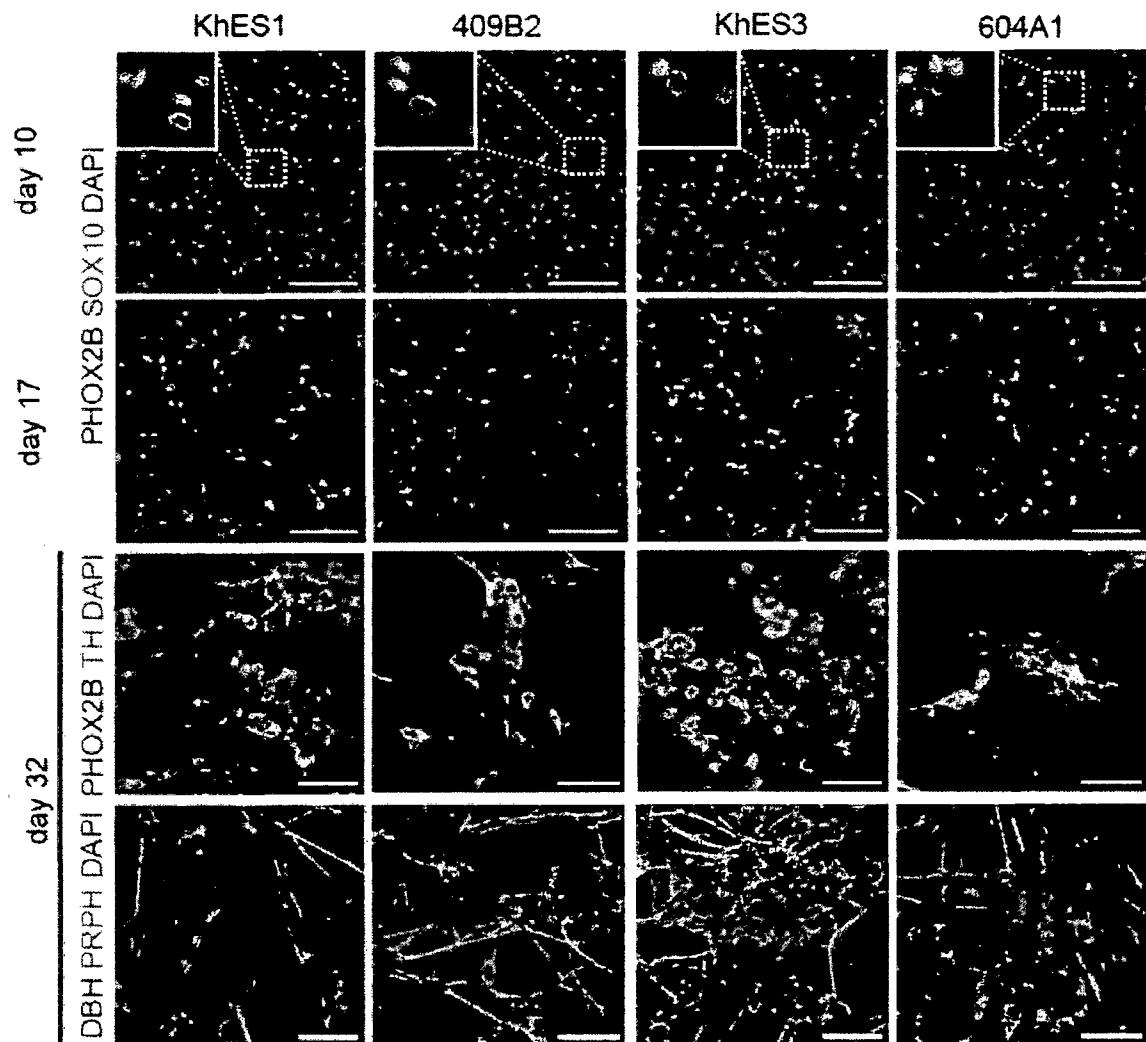
d



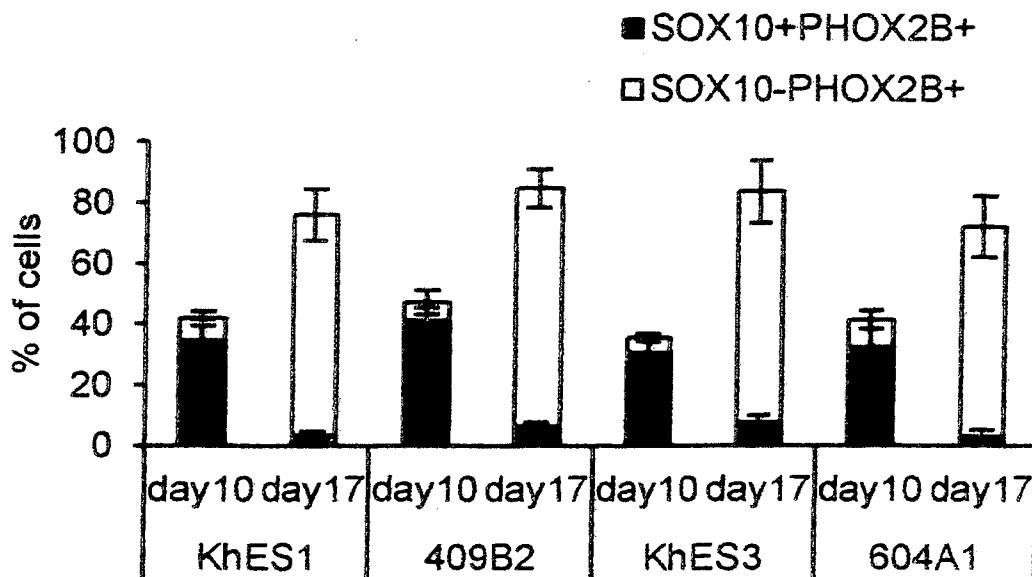
e



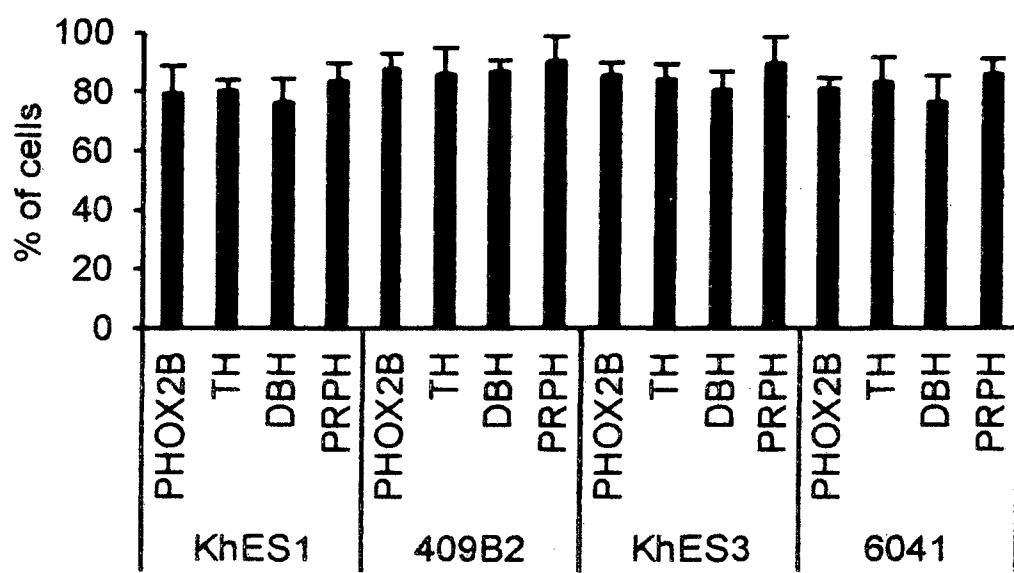
f



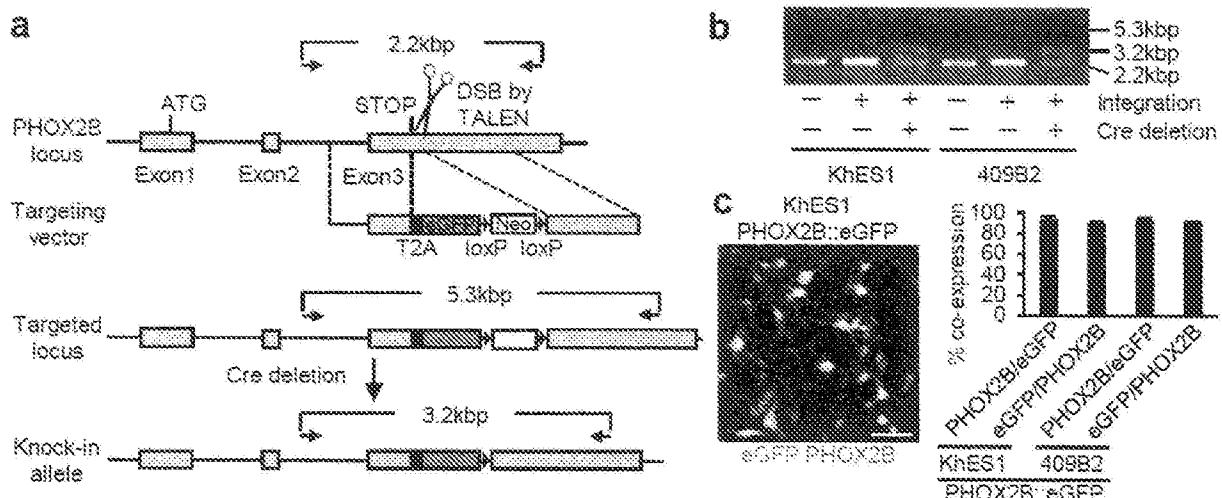
g



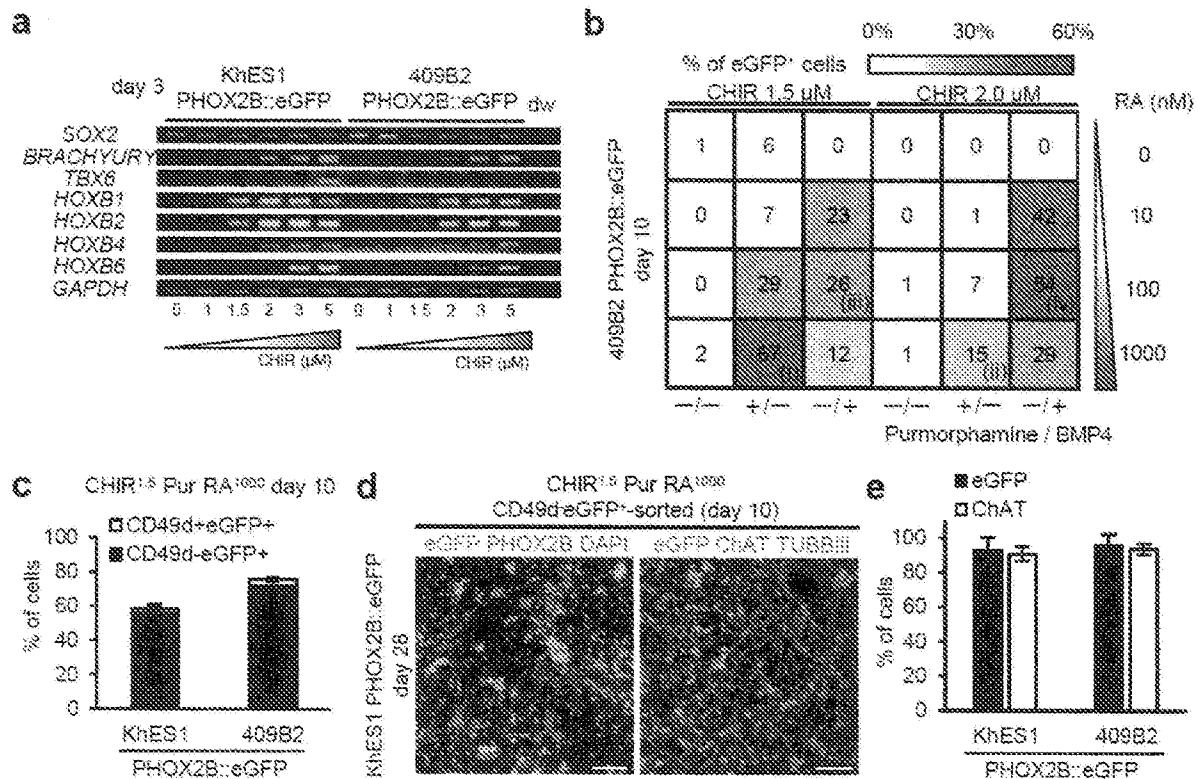
h



## [図5]



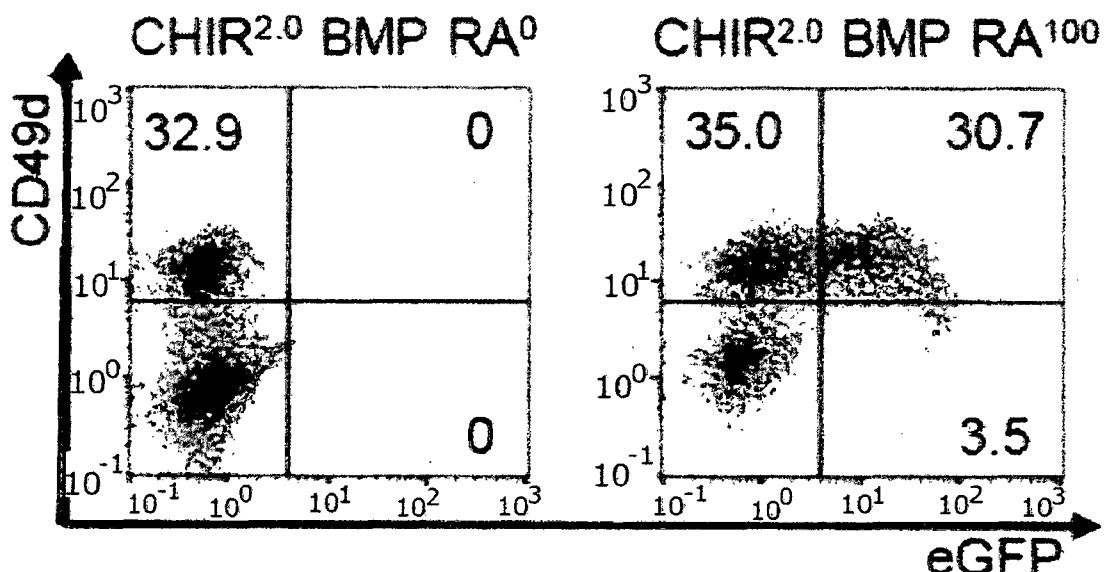
## [図6]



[図 7 ]

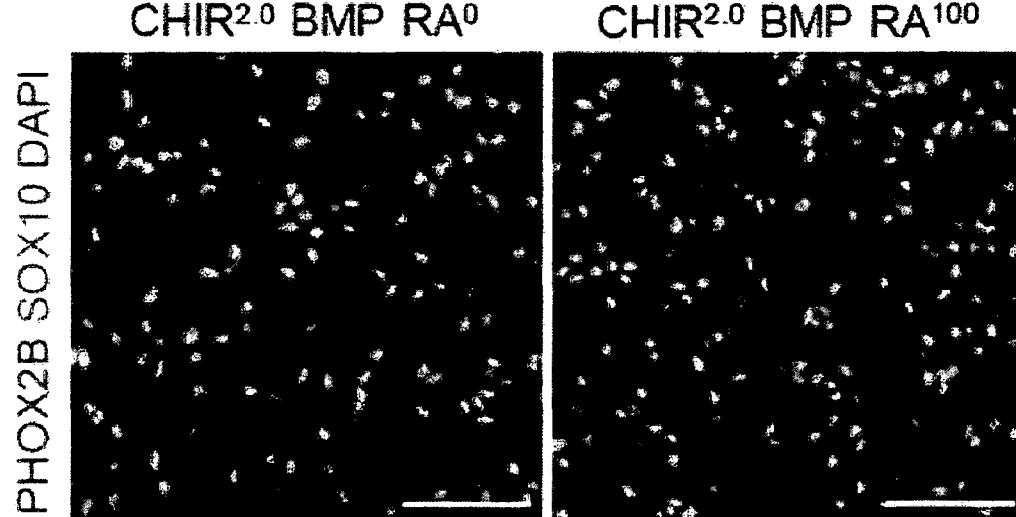
a

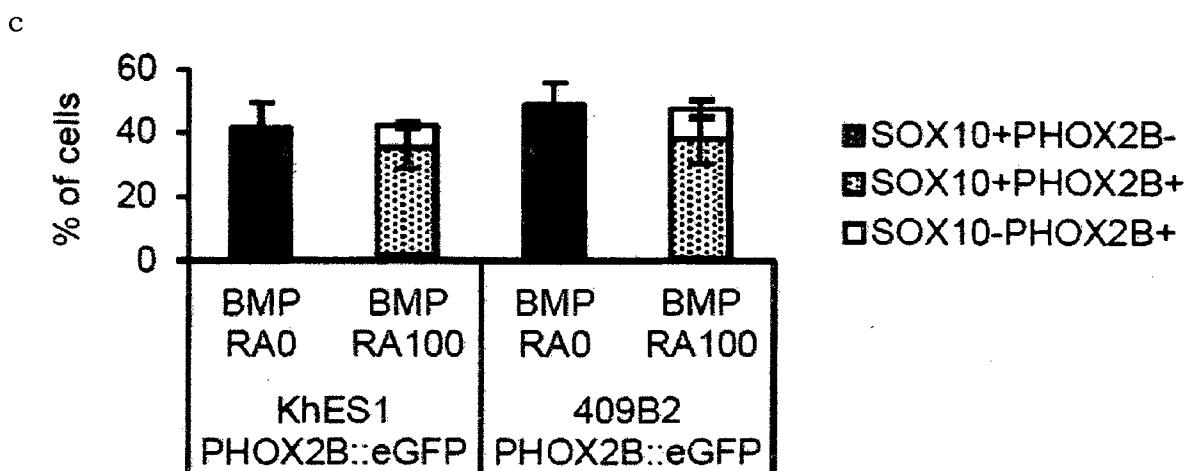
## KhES1 PHOX2B::eGFP day 10



b

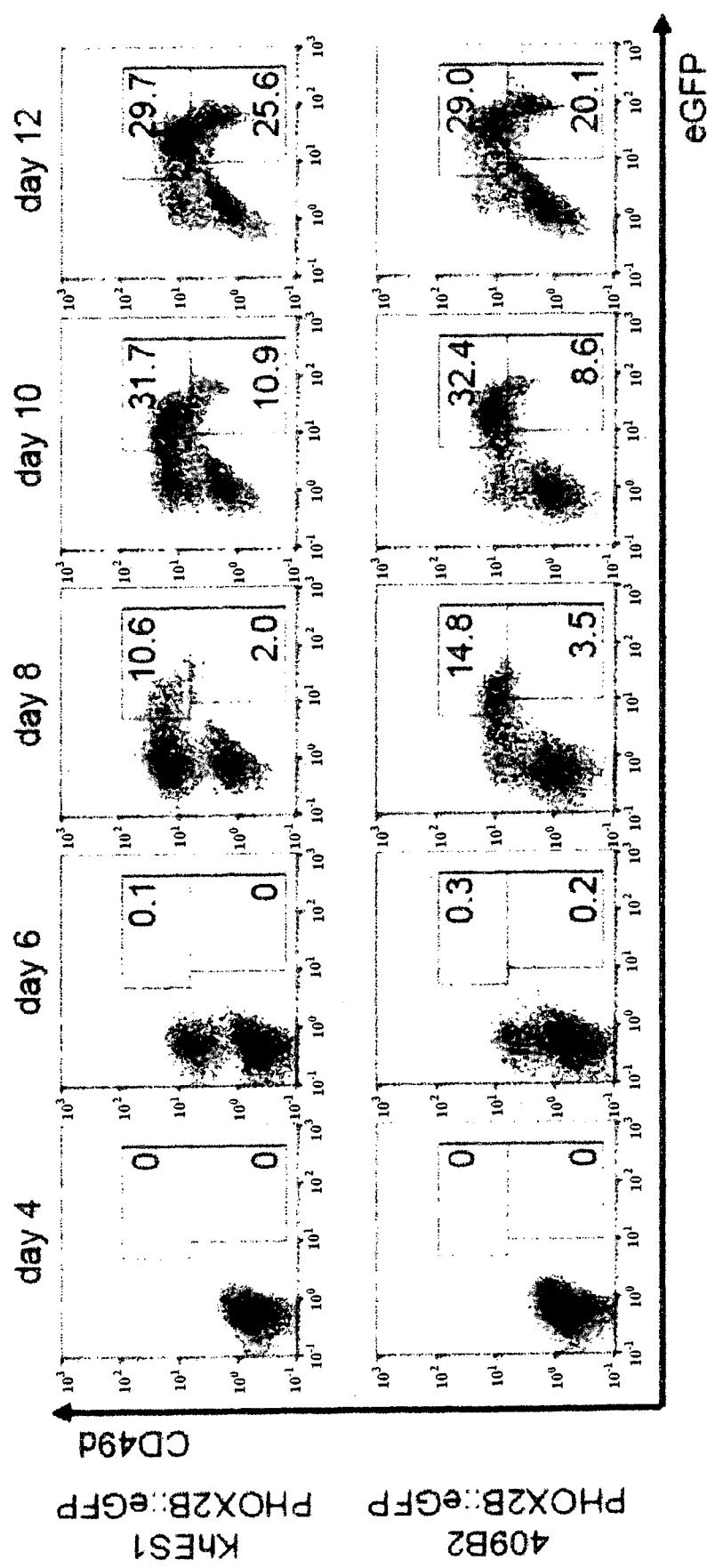
## KhES1 PHOX2B::eGFP day 10



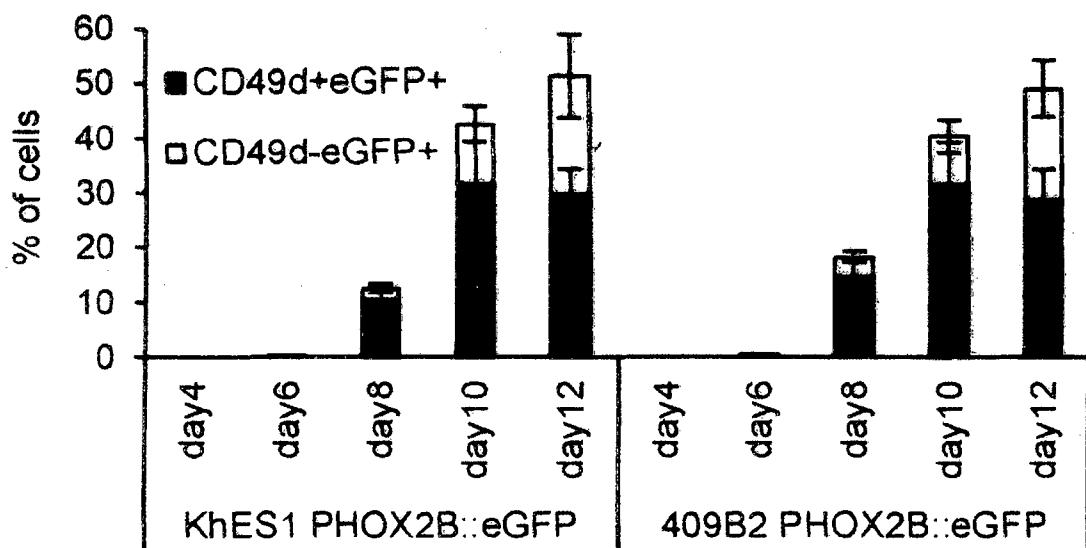


[図 8]

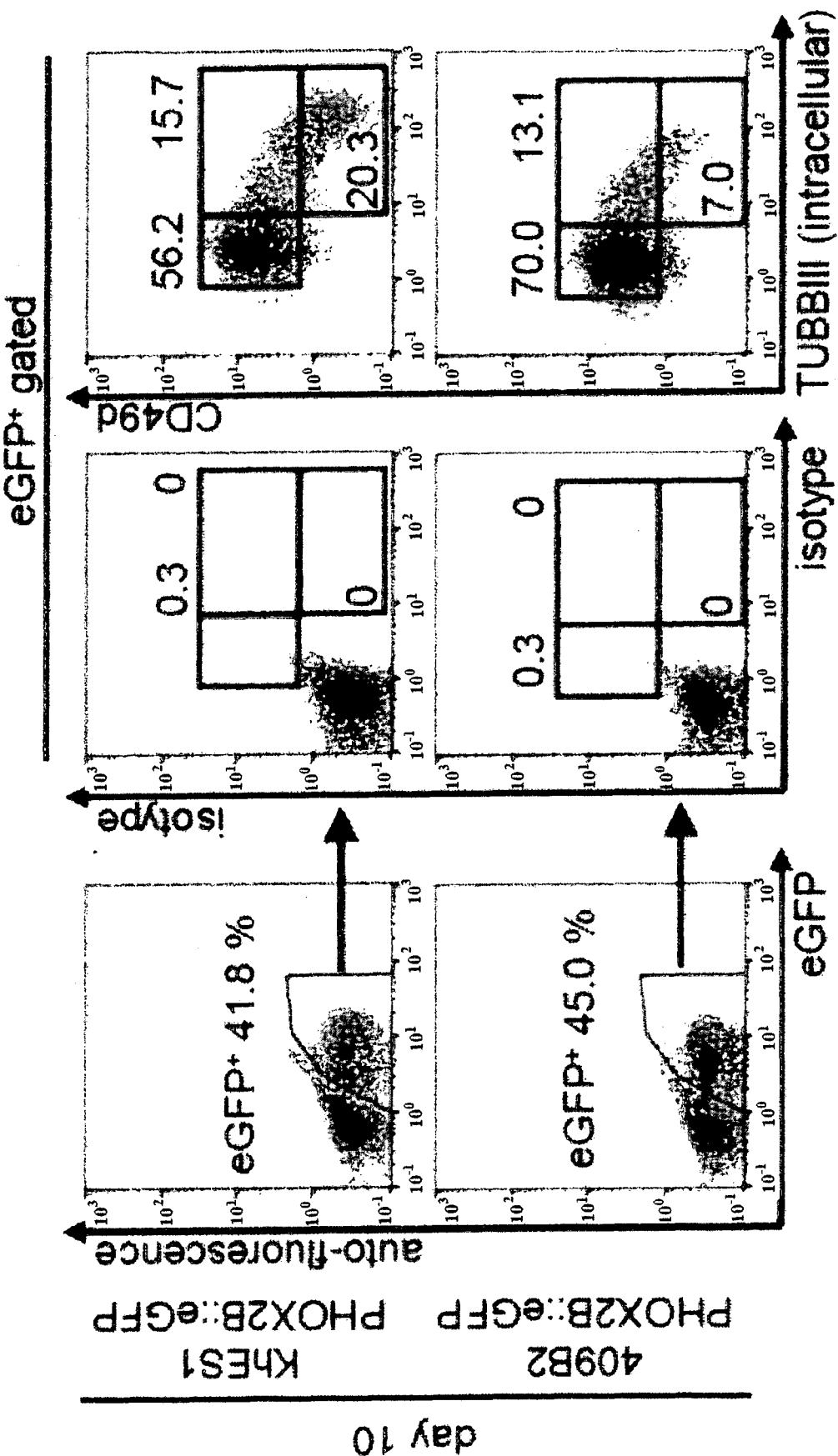
a



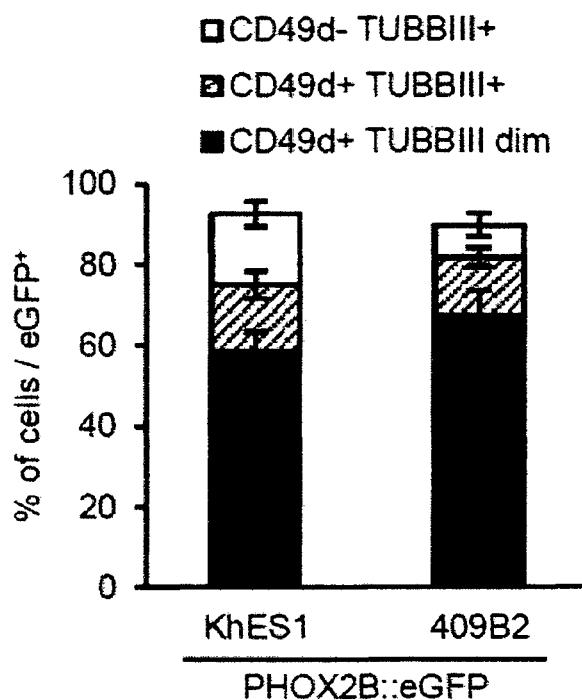
b



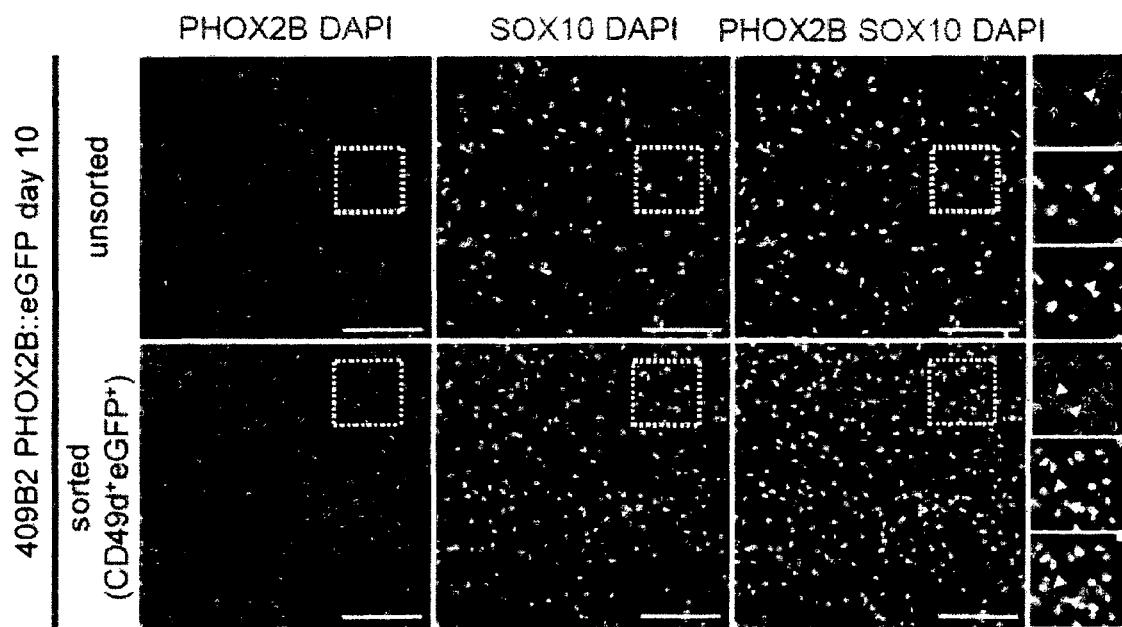
c



d



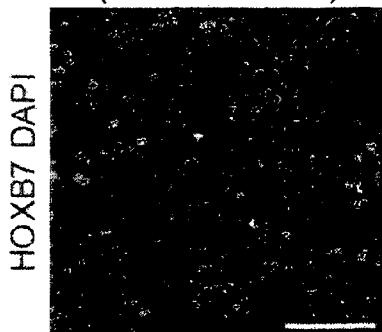
e



f

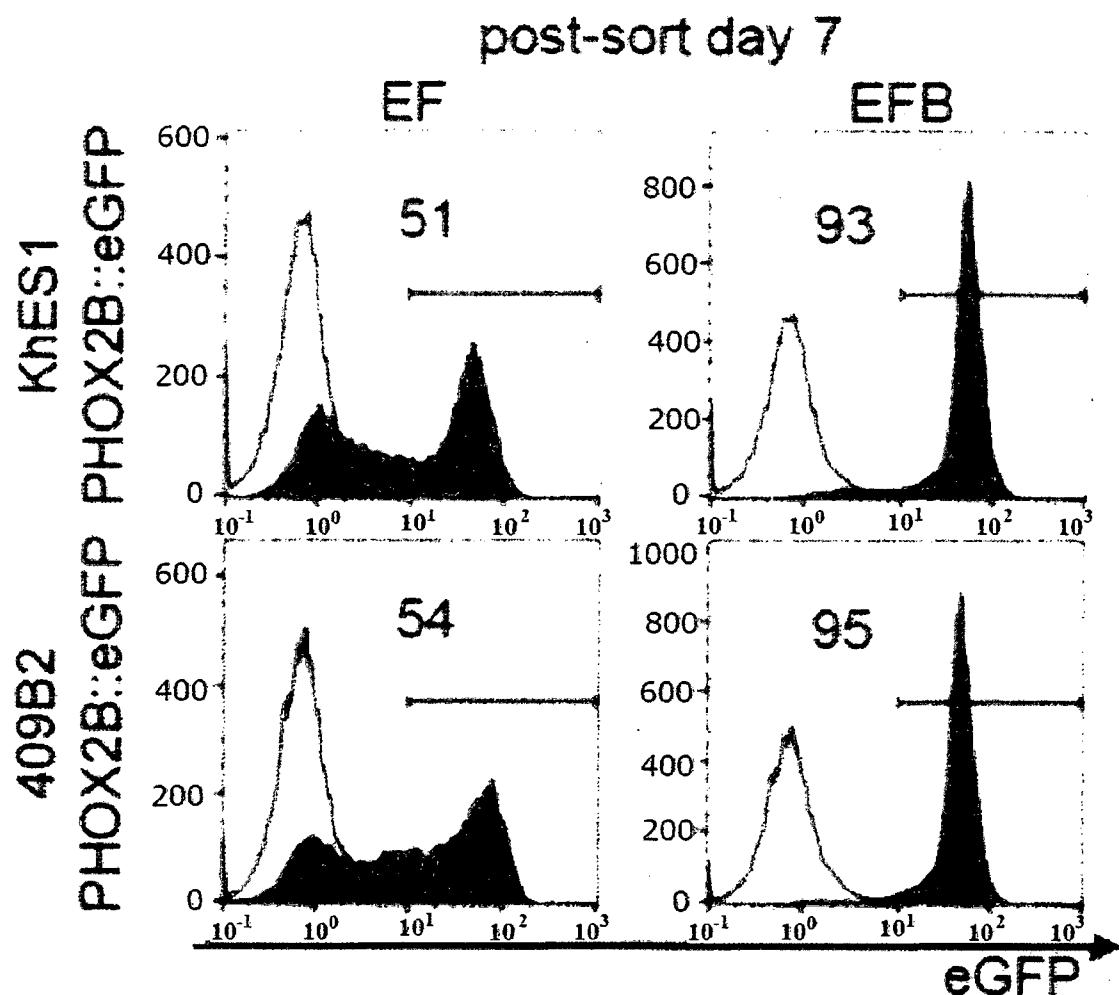
409B2  
PHOX2B::eGFP

day10 sorted  
(CD49d<sup>+</sup>eGFP<sup>+</sup>)

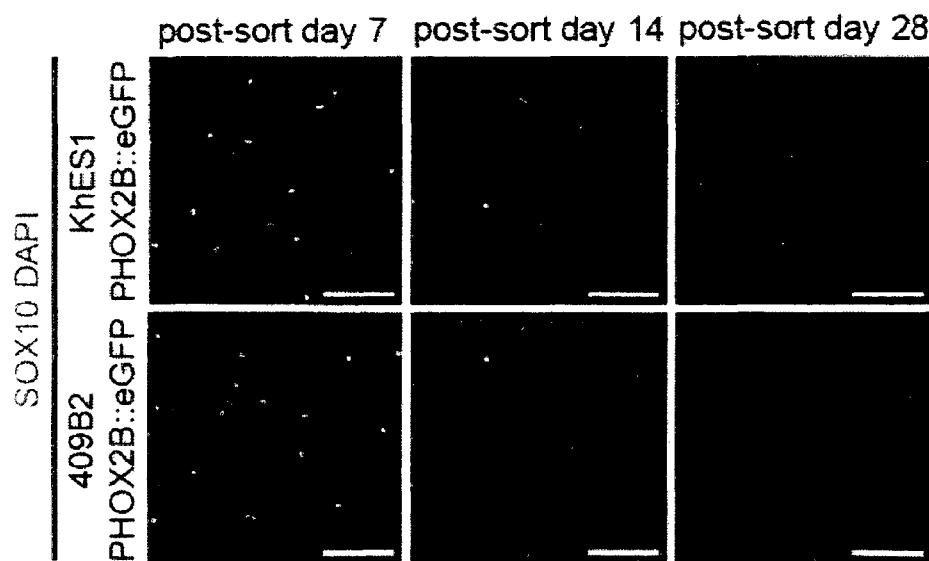


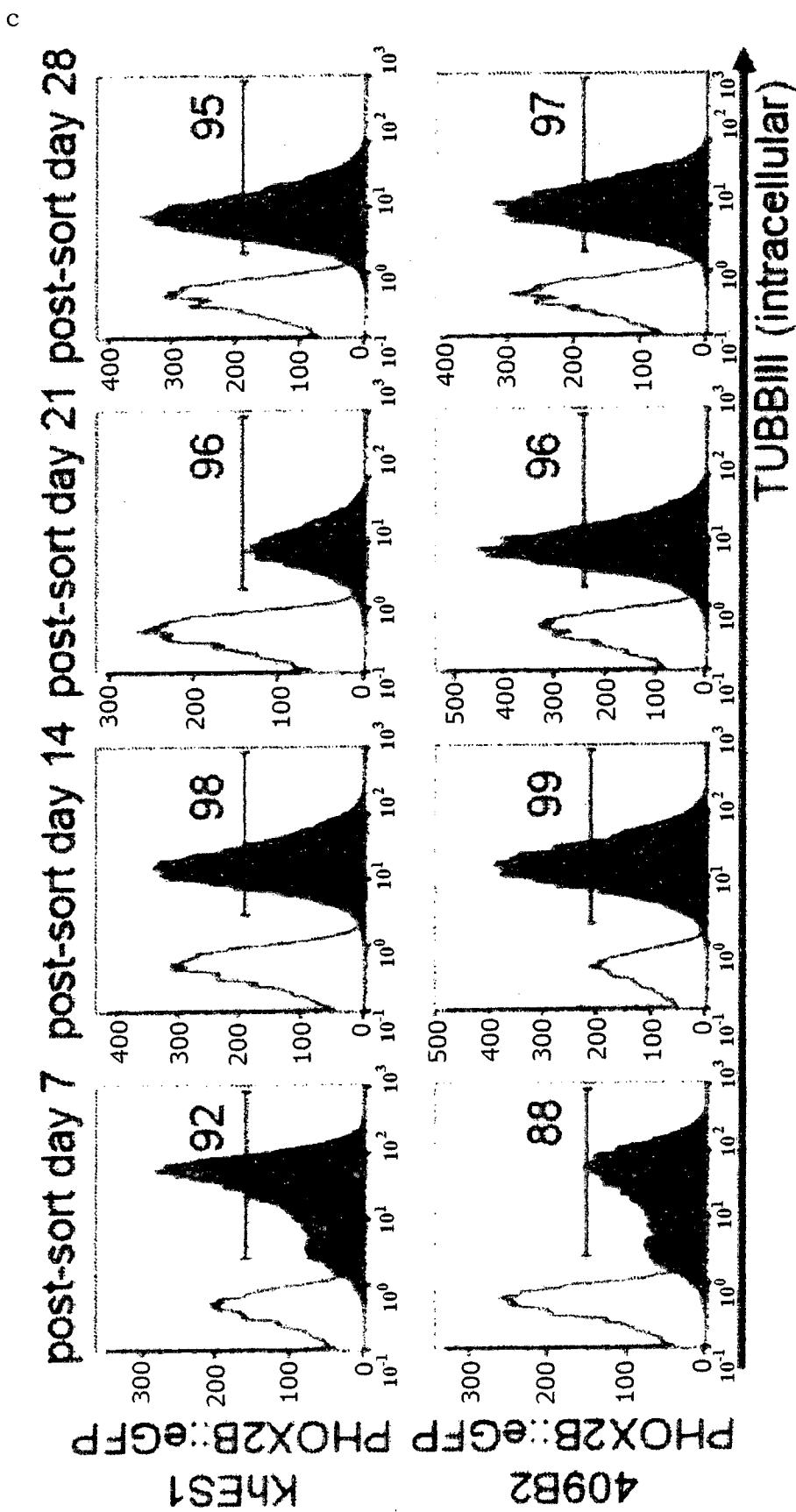
[図 9]

a

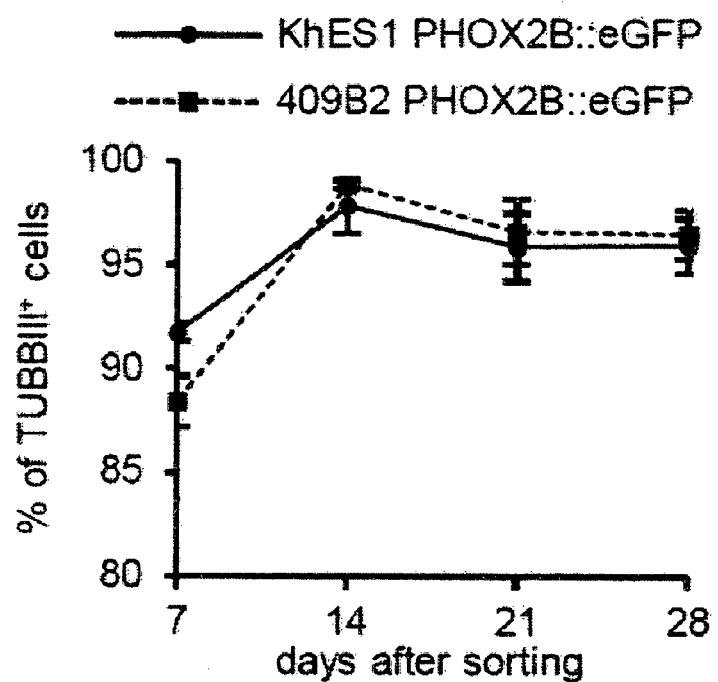


b

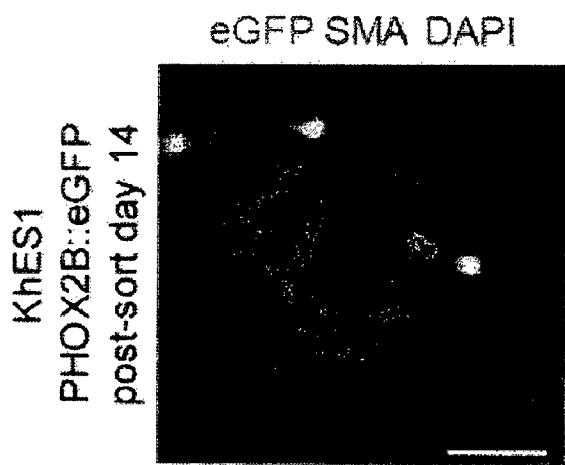




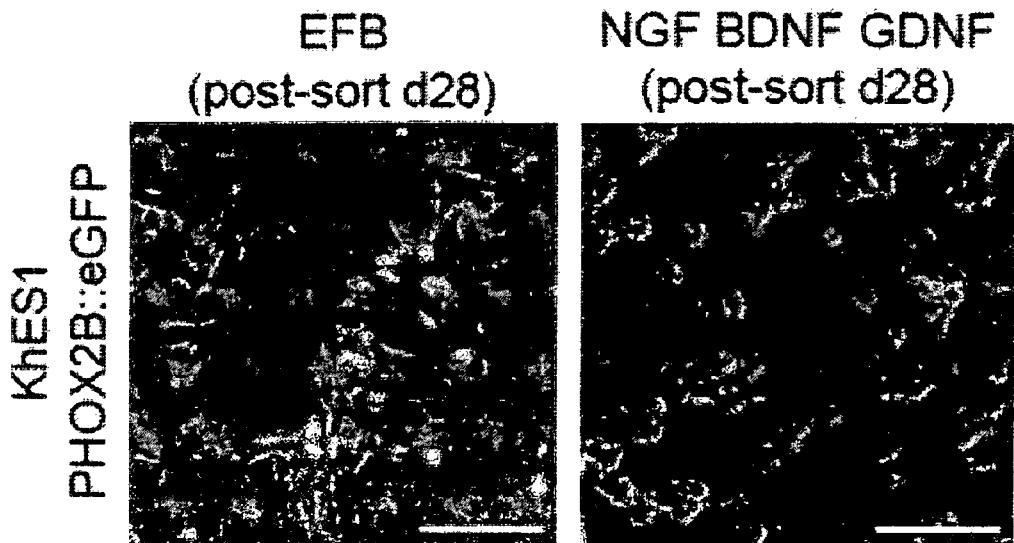
d



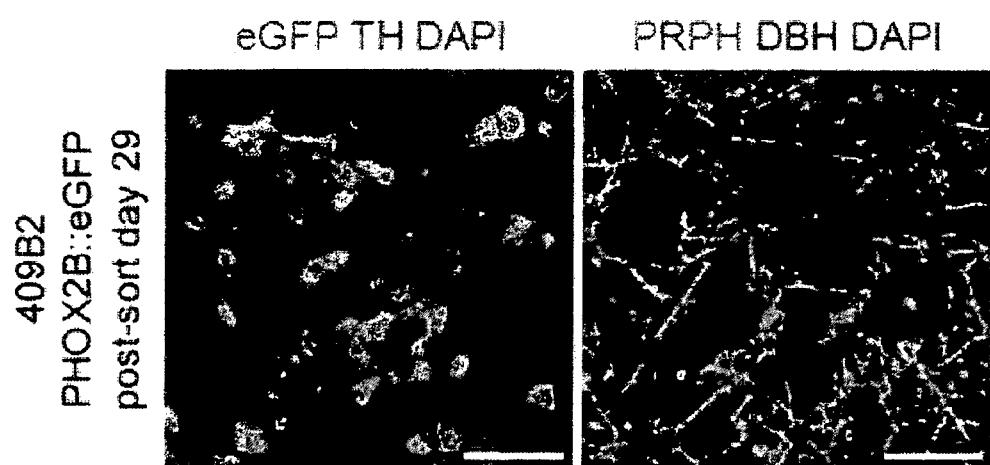
e



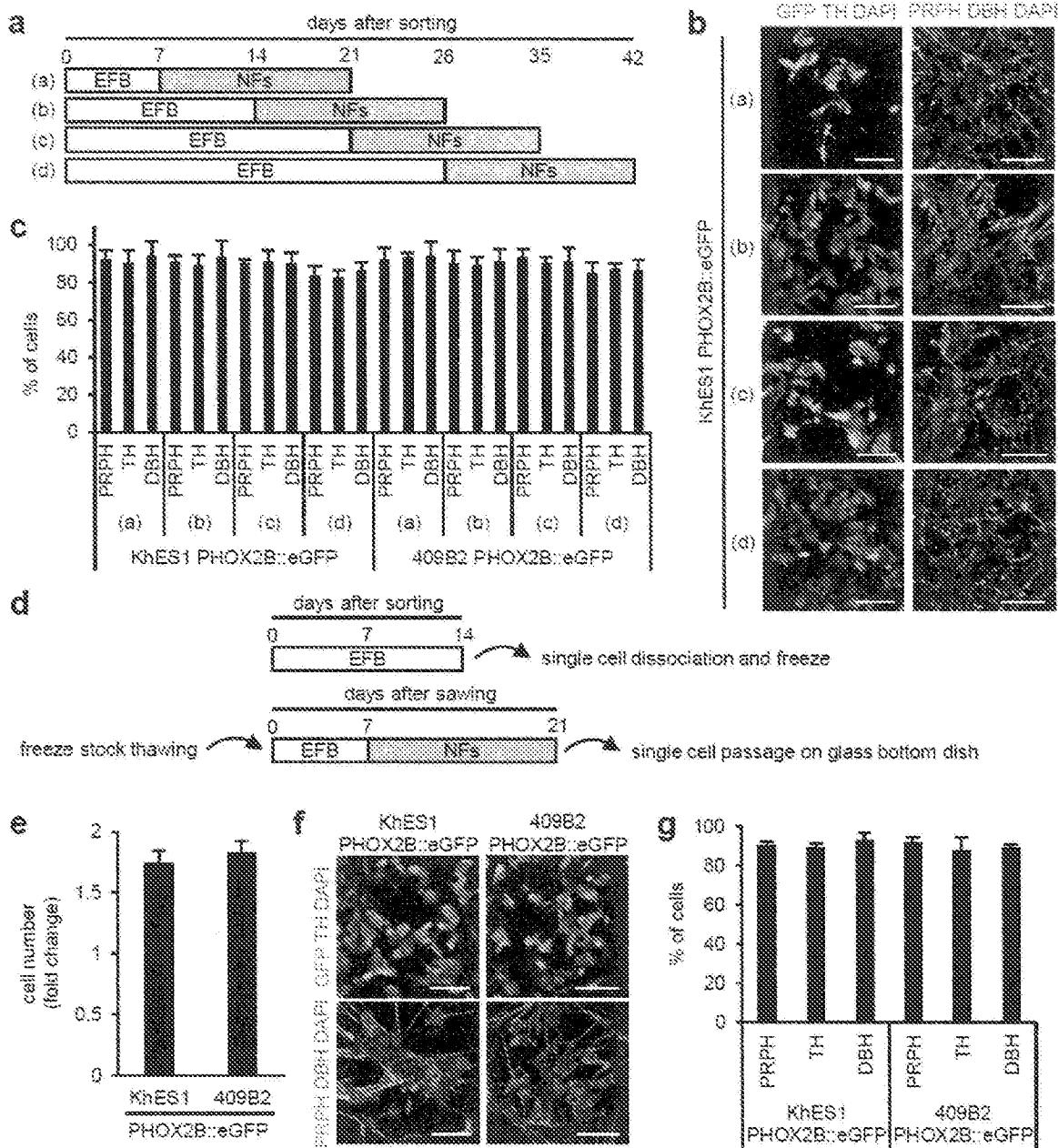
f



gg



[図10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/016758

### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N5/079 (2010.01) i, A61K35/30 (2015.01) i, A61K35/545 (2015.01) i, A61L27/38 (2006.01) i, A61P25/02 (2006.01) i, C12N5/0775 (2010.01) i, C12N5/0793 (2010.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N5/079, A61K35/30, A61K35/545, A61L27/38, A61P25/02, C12N5/0775, C12N5/0793

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/194522 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 December 2016, claims, examples, fig. 1, 16, paragraph [0015] & EP 3305889 A1, claims, examples, fig. 1, 16, paragraph [0026]	7, 10-11, 13-16
Y		11-16
A		1-6, 8, 9
Y	WO 2010/140698 A1 (TOHOKU UNIVERSITY) 09 December 2010, claims, examples, fig. 3-5, paragraphs [0056], [0057] (Family: none)	1-6, 11-16
A		7-10
Y	WO 2012/157612 A1 (TOKUSHIMA UNIVERSITY) 22 November 2012, claims, examples & US 2014/0093960 A1 & EP 2711419 A1, claims, examples 1-10	1-6, 11-16
A		7-10
Y	WO 2016/104574 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 30 June 2016, claims, example 2, fig. 2 (Family: none)	3-6, 11-16
A		1-2, 7-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 July 2018 (20.07.2018)

Date of mailing of the international search report  
31 July 2018 (31.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/016758

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	FUKUTA, M. et al., "Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media", PLOS ONE, 02 December 2014, 9(12), e112291, abstract, materials and methods, fig. 1-4, DOI:10.1371/journal.pone.012291	3-6, 11-16 1-2, 7-10
Y A	TOMOKIYO, A. et al., "A Multipotent Clonal Human Periodontal Ligament Cell Line with Neural Crest cell Phenotypes Promotes Neurocytic Differentiation, Migration, and Survival", J Cell Physiol., 2012, vol. 227, no. 5, pp. 2040-2050, abstract, fig. 1B, p. 2046, right column, lines 25-29	5-6, 11-16 1-4, 7-10
Y A	MATSUMURA, S. et al., "Characterization of mesenchymal progenitor cell populations from non-epithelial oral mucosa", Oral Dis., 2015, vol. 21, no. 3, pp. 361-372, abstract, p. 367, right column, lines 3-6	5-6, 11-16 1-4, 7-10
A	JP 2008-200033 A (TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE) 04 September 2008, paragraphs [0024], [0025] & US 2010/0119997 A1, paragraphs [0048], [0049] & WO 2008/090826 A1 & EP 2119768 A1	1-16
T	WO 2017/112901 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 29 June 2017, fig. 1A, pp. 90-91 (Family: none)	1-16

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/079(2010.01)i, A61K35/30(2015.01)i, A61K35/545(2015.01)i, A61L27/38(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/0793(2010.01)i

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/079, A61K35/30, A61K35/545, A61L27/38, A61P25/02, C12N5/0775, C12N5/0793

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2016/194522 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 2016.12.08, 特許請求の範囲, 実施例, 図1, 図16, 【0015】	7, 10-11, 13-1
Y	& EP 3305889 A1, Claims, Examples, Fig1, Fig16, [0026]	6
A		11-16
		1-6, 8, 9
Y	WO 2010/140698 A1 (国立大学法人東北大学) 2010.12.09, 特許請求 の範囲, 実施例, 図3-5, 【0056】, 【0057】(ファミリー なし)	1-6, 11-16
A		7-10

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20.07.2018	国際調査報告の発送日 31.07.2018
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 山本 匠子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2012/157612 A1 (国立大学法人徳島大学) 2012.11.22, 特許請求の範囲, 実施例 & US 2014/0093960 A1 & EP 2711419 A1, Claims, Example1-10	1-6, 11-16 7-10
Y A	WO 2016/104574 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.06.30, 特許請求の範囲, 実施例2, 図2 (ファミリーなし)	3-6, 11-16 1-2, 7-10
Y A	FUKUTA M. et al., Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media, PLOS ONE, 2014.12.02, 9(12), e112291, Abstract, Materials and Methods, Figure 1-4, DOI:10.1371/journal.pone.012291	3-6, 11-16 1-2, 7-10
Y A	TOMOKIYO A. et al., A Multipotent Clonal Human Periodontal Ligament Cell Line with Neural Crest cell Phenotypes Promotes Neurocytic Differentiation, Migration, and Survival, J Cell Physiol., 2012, Vol. 227, No. 5, p. 2040-2050, Abstract, Fig. 1B, p. 2046, right column, line 25-29	5-6, 11-16 1-4, 7-10
Y A	MATSUMURA S. et al., Characterization of mesenchymal progenitor cell populations from non-epithelial oral mucosa, Oral Dis., 2015, Vol. 21, No. 3, p. 361-372, Abstract, p. 367, right column, line 3-6	5-6, 11-16 1-4, 7-10
A	JP 2008-200033 A (学校法人東京理科大学) 2008.09.04, 【0024】 , 【0025】 & US 2010/0119997 A1, [0048][0049] & WO 2008/090826 A1 & EP 2119768 A1	1-16
T	WO 2017/112901 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 2017.06.29, FIG. 1A, p. 90-91 (ファミリーなし)	1-16