

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6680681号
(P6680681)

(45) 発行日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月24日(2020.3.24)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/0735	(2010.01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	5/079	(2010.01)	C 1 2 N 5/079
C 1 2 N	1/00	(2006.01)	C 1 2 N 1/00 G

請求項の数 17 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2016-547441 (P2016-547441)	(73) 特許権者	503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(86) (22) 出願日	平成27年9月8日(2015.9.8)	(73) 特許権者	000002093 住友化学株式会社 東京都中央区新川二丁目27番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/075412	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02016/039317	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87) 国際公開日	平成28年3月17日(2016.3.17)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
審査請求日	平成30年7月30日(2018.7.30)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(31) 優先権主張番号	特願2014-182758 (P2014-182758)		
(32) 優先日	平成26年9月8日(2014.9.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小脳前駆組織の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊を、ROCK阻害剤、TGF シグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子を含む培地中で培養することを含む、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊の製造方法であって、第1の線維芽細胞増殖因子はFGF2又はFGF8であって、第1の線維芽細胞増殖因子が20 ng/ml ~ 100 ng/mlの濃度で含まれる培地での培養期間は、浮遊培養開始から2~4日目のいずれかの時点から、2日間以上19日間以内である、製造方法。

【請求項2】

第1の線維芽細胞増殖因子が含まれる培地での培養期間が、少なくとも浮遊培養開始の4日目から7日目までの期間を含む、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

第1の線維芽細胞増殖因子が含まれる培地での培養期間が、5日間以上12日間以内である、請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】

該浮遊培養において、複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊をBMP4により処理しない、請求項1~3のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項5】

該浮遊培養において、複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊をソニッ

クヘッジホッグ阻害剤により処理しない、請求項1~4のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項6】

(I) 複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子を含む培地中で培養することにより、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊を得ることであって、第1の線維芽細胞増殖因子はFGF2又はFGF8であって、第1の線維芽細胞増殖因子が20 ng/ml ~ 100 ng/mlの濃度で含まれる培地での培養期間は、浮遊培養開始から2~4日目のいずれかの時点から、2日間以上19日間以内であること、及び

(II) 得られた中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊を、更に無血清培地中で浮遊培養に付すことにより、該神経前駆組織内の神経前駆細胞による神経上皮構造の形成を誘導し、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得ることを含む、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊の製造方法。

10

【請求項7】

工程(I)の浮遊培養において、複数のヒト多能性幹細胞を集合させて形成される凝集塊を更に第2の線維芽細胞増殖因子を含む培地中で培養することを含み、第2の線維芽細胞増殖因子はFGF19、FGF17又はFGF8であって、第2の線維芽細胞増殖因子が50 ng/ml ~ 300 ng/mlの濃度で含まれる培地での培養期間は、浮遊培養開始から10~14日目のいずれかの時点から、2日間以上11日間以内である、請求項6記載の製造方法。

【請求項8】

第1の線維芽細胞増殖因子が含まれる培地での培養期間が、少なくとも浮遊培養開始の4日目から7日目までの期間を含む、請求項6又は7に記載の製造方法。

20

【請求項9】

第1の線維芽細胞増殖因子が含まれる培地での培養期間が、4日間以上7日間以内である、請求項6~8のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項10】

工程(II)の浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞を含むヒト細胞凝集塊をstromal cell-derived factor 1(SDF1)を含む培地中で培養することを含む、請求項6~9のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項11】

工程(II)の浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞を含むヒト細胞凝集塊をgrowth/differentiation factor 7(GDF7)を含む培地中で培養することを含む、請求項6記載の製造方法。

30

【請求項12】

小脳板組織が、GABA作動性神経前駆細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞を含む神経上皮構造である、請求項7記載の製造方法。

【請求項13】

神経上皮構造が背腹軸極性を有する、請求項12記載の製造方法。

【請求項14】

小脳板組織が、細胞凝集塊の表層域の連続的な小脳神経上皮構造及び菱脳唇様組織を含む、請求項10記載の製造方法。

40

【請求項15】

小脳板組織が、頂端面より、脳室帯、プルキンエ細胞層及び菱脳唇由来細胞層の順で層をなす三層構造を有する、請求項14記載の製造方法。

【請求項16】

(I) 請求項6~15のいずれか1項記載の製造方法により、ヒト多能性幹細胞から、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得ること、

(II) 得られたヒト細胞凝集塊からGABA作動性神経前駆細胞を得ること、及び

(III) GABA作動性神経前駆細胞を、哺乳動物小脳顆粒細胞前駆細胞と共培養し、該GABA作動性神経前駆細胞からプルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞への分化を誘導す

50

ること

を含む、ヒトプルキンエ細胞、ヒトゴルジ細胞又はヒト介在神経細胞の製造方法。

【請求項17】

(I) 請求項6～15のいずれか1項記載の製造方法により、ヒト多能性幹細胞から、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得ること、

(II) 得られたヒト細胞凝集塊から、小脳顆粒細胞前駆細胞を得ること、

(III) 小脳顆粒細胞前駆細胞を、哺乳動物小脳細胞と共培養し、小脳顆粒細胞への分化を誘導すること

を含む、ヒト小脳顆粒細胞の製造方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、インビトロにおいて、ヒト多能性幹細胞から小脳前駆組織への分化を誘導する技術に関する。

【背景技術】

【0002】

運動系の主要構成因子である小脳は、数多くの、詳細に明らかにされた型の細胞の高次脳構造を有する。小脳の初期発生は、ヒトを含む有羊膜類において保存されている。小脳発生の最初のフェーズは、峡部オーガナイザーの形成であり、これは中脳後脳境界(MHB)において生じる。その誘導的影響下で、小脳原基が菱脳節1(r1)の背側領域(翼域)に生じる(非特許文献1~3)。小脳細胞はr1の2つの異なる胚帯において産生される。1つは小脳板の脳室帯(vz)であり、これは塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(bHLH)転写因子Ptf1aを発現する。Ptf1a⁺前駆細胞は、小脳皮質のGABA作動性ニューロン(プルキンエ細胞及び介在ニューロン)及び深部小脳核(DCN)のGABA作動性ニューロンを産生する。他方の帯は菱脳唇(RL)であり、これは他のbHLH因子であるAtoh1(Math1としても知られる)を発現する。Atoh1⁺前駆細胞は、顆粒細胞(GC)、unipolar brush cell、及びlarge DCN projection neuronを含む小脳グルタミン酸作動性ニューロンを産生する(非特許文献4~9)。過去10年にわたり、小脳の細胞分化の制御に関する理解が目覚ましく進歩した。そのような知識は、多能性幹細胞から小脳ニューロン性構成因子をインビトロで産生することについての技術的進歩を促進した(非特許文献10~13)。しかしながら、産生された細胞性構成因子がどのようにして集合し、小脳の複雑な構造を形成するかについては、ほとんど分かっていないままである。

20

30

【0003】

本発明者らは、三次元(3D)培養において自己誘導性シグナリング微小環境を反復することにより、マウス胚性幹細胞(mESCs)から小脳ニューロンを効率的に産生したことを報告した(非特許文献11)。mESCsは、Fgf2及びインスリンに応答して、凝集塊内で峡部オーガナイザー組織を形成する能力を有する。これらの条件下では、内在性のShhシグナリングを阻害剤で阻害すると、mESC由来神経系前駆細胞は、プルキンエ細胞前駆体マーカーであるKirrel2(Neph3としても知られる)を発現する小脳板NEへ分化する。一方、培養中へのBMPシグナルの添加は、Atoh1⁺GCs及びTbr1⁺DCNニューロンへの分化を促進したが、mESC凝集塊中のプルキンエ細胞の産生を抑制した。小脳ニューロン分化はmESC中で成功裏に誘導することはできるが、小脳原基構造の3D形成は、これまで十分には再現できていない。

40

【0004】

Fgf19は、マウスFgf15(MHBにおいて発現している)のヒトオルソログであり、後脳における背側前駆細胞の発生に参与することが報告されている(非特許文献14及び15)。

【0005】

SDF1(CXCL12としても知られる)は、ケモカイン受容体4(CXCR4)の分泌性リガンドであり、髄膜細胞において発現し、CXCR4を発現する外顆粒(EGL)細胞の浸潤に決定的な役割を果たしている(非特許文献16~19)。SDF1又はCXCR4欠損マウスは、不規則な外顆粒

50

層 (EGL) 及び異所性に存在するプルキンエ細胞を伴う、異常な発生を示した。

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、Rho-associated coiled-coilキナーゼ (ROCK) の阻害剤が、分散により誘導される多能性幹細胞 (特に、ヒト多能性幹細胞) の細胞死を抑制することを見出している (特許文献1及び2)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】特開2008 - 99662号公報

【特許文献 2】W02008 / 035110

10

【非特許文献】

【 0 0 0 8 】

【非特許文献 1】Wingate, R.J.T, and Hatten, M.E. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* 126, 4395-4404.

【非特許文献 2】Joyner, A.L., Liu, A., and Millet, S. (2000). Otx2, Gbx2 and Fgf 8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell Biolo.* 12, 736-741.

【非特許文献 3】Zervas, M., Millet, S., Ahn, S., and Joyner, A.L. (2004). Cell behavior and genetic lineage of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 43,345-357.

20

【非特許文献 4】Ben-Arie, N., Bellen, H.J., Armstrong, D.L. McCall, A.E., Gordadze, P.R., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Zoghbi, H. (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390, 169-172.

【非特許文献 5】Hoshino, M., Nakamura, S., Mori, K., Kawauchi, T., Terao, M., Nishimura, Y.V., Fukuda, A., Fuse, T., Matsuo, N., Sone, M., Watanabe, M., Bito, H., Terashima, T., Wright, C.V.E., Kawaguchi, Y., Nakano, K., and Nabeshima, Y. (2005). Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* 47, 201-213.

【非特許文献 6】Machold, R., and Fishell, G. (2005). Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 48, 17-24.

30

【非特許文献 7】Wang, V.Y., Rose, M.F., and Zoghbi, H.Y. (2005). Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* 48, 31-43.

【非特許文献 8】Fink, A.J., Englund, C., Daza, R.A.M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: Transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J. Neurosci.* 26, 3066-3076.

【非特許文献 9】Carletti, B., and Rossi, F. (2008). Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist* 14, 91-100.

40

【非特許文献 10】Su, H.-L., Muguruma, K., Matsuo-Takasaki, M., Kengaku, M., Watanabe, K., and Sasai, Y. (2006). Generation of cerebellar neuron precursors from embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 290, 287-296.

【非特許文献 11】Muguruma, K., Nishiyama, A., Ono, Y., Miyawaki, H., Mizuhara, E., Hori, S., Kakizuka, A., Obata, K., Yanagawa, Y., Hirano, T., and Sasai, Y. (2010). Ontogeny-recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. *Nature Neurosci.* 13, 1171-1180.

【非特許文献 12】Tao, O., Shimazaki, T., Okada, Y., Naka, H., Kohda, K., Yuzaki, M., Mizusawa, H., and Okano, H. (2010). Efficient generation of mature cerebellar Purkinje cells from mouse embryonic stem cells. *J. Neurosci. Res.* 88, 234-24

50

7.

【非特許文献13】Erceg, S., Ronaghi, M., Zipancic, I., Lainez, S., Rosello, M.G., Xiong, C., Moreno-Manzano, V., Rodriguez-Jimenez, F.J., Planells, R., Alvarez-Dolado, M., Bhattacharya, S.S., and Stojkovic, M. (2010). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into functional cerebellar-like cells. *Stem Cells Dev.*, 19, 1745-1756.

【非特許文献14】Gimeno, L., and Martinez, S. (2007) Expression of chick Fgf19 and mouse Fgf15 orthologs is regulated in the developing brain by Fgf8 and Shh. *Dev. Dyn.* 236, 2285-2297.

【非特許文献15】Fischer, T., Faus-Kessler, T., Welzl, G., Simeone, A., Wurst, W., and Prakash, N. (2011) Fgf15-mediated control of neurogenic and proneural gene expression regulates dorsal midbrain neurogenesis. *Dev. Biol.* 350, 496-510. 10

【非特許文献16】Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9448-9453.

【非特許文献17】Reiss, K., Mentlein, R., Sievers, J., and Hartmann, D. (2002). Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and act as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neurosci.* 115, 295-305. 20

【非特許文献18】Zou, Y.-R., Kottmann, A.H. Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

【非特許文献19】Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X.-C., Nagasawa, T., Wu, J.Y., and Rao, Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nature Neurosci.* 5, 719-720.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上述の通り、マウスの多能性幹細胞を、FGF2とインスリンを含む培地中で浮遊凝集塊培養に付すと、小脳前駆細胞へ分化し得ることは報告されていた(非特許文献11)。しかし、マウス多能性幹細胞の培養条件をヒト多能性幹細胞へ直接適用すると、ヒト多能性幹細胞の小脳分化はサポートされず、小脳分化を見ないばかりか、凝集塊が崩壊するなどの神経培養そのものが継続できないことを見出した。また、マウス多能性幹細胞からの小脳前駆組織の分化誘導を大きく促進したHedgehog阻害剤(Cyclopamine)は、ヒト多能性幹細胞からの小脳板形成を有意に促進しなかった。逆に、Sonic Hedgehogのヒト多能性幹細胞培養系への添加は、極性をもった小脳板形成を促進するなど、ヒト多能性幹細胞からの小脳前駆組織分化の条件は、マウスのそれとは大きく異なることが示唆された。 30

【0010】

そこで、本発明は、ヒト多能性幹細胞から、小脳組織やその前駆組織をインビトロで効率的に誘導する技術を提供することを目的とする。 40

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、インビトロにおいてヒト小脳組織を発生させるため、自己形成原理をヒトESC培養に適用した。ROCK阻害剤(Y-27632)やTGF-beta阻害剤(SB431542)の添加を行い、Hedgehog阻害剤の添加を行わないなどの培養条件の改変を加えることにより、インビトロにおけるヒト多能性幹細胞からの小脳前駆組織分化を初めて可能とした。更に、3D培養条件を最適化する過程で、本発明者らは、Fgf19及びSDF1という2つの因子が、異なる態様で、規則正しい小脳板様組織の自己形成を促進することを見出した。凝集塊培養へFgf19を添加すると、ヒト多能性幹細胞からの小脳板形成が促進されるとともに、凝集塊内の 50

中脳-後脳境界領域の神経組織の背腹（DV）極性が強化された。小脳組織のための自己形成hESC培養における追加的なSDF1処理は、初期小脳板において見られるような、重層化された、連続的な小脳板NEの形成を誘導した。更に、神経外胚葉（NE）周縁部が、Atoh1⁺/Barhl1⁺細胞からなる異なるRL様胚帯を形成した。また、小脳前駆組織（小脳板組織）を自己組織化させる過程でGdf7を添加することにより、小脳板組織内での菱脳唇の形成が促進された。

【0012】

本発明者らは、上記知見に基づき更に検討を加え、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は下記の通りである：

【0013】

[1] ヒト多能性幹細胞の凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子により処理することを含む、小脳前駆組織を含むヒト細胞凝集塊の製造方法。

[2] 小脳前駆組織が、中脳後脳境界領域の神経前駆組織である、[1]記載の製造方法。

[3] 該浮遊培養において、ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊をBMP4により処理しない、[1]又は[2]記載の製造方法。

[4] 該浮遊培養において、ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊をソニックヘッジホッグ阻害剤により処理しない、[1]～[3]のいずれか記載の製造方法。

[5] 第1の線維芽細胞増殖因子がFGF2又はFGF8である、[1]～[4]のいずれか記載の製造方法。

[6] (I) ヒト多能性幹細胞の凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子により処理することにより、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊を得ること、及び (II) 得られた中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊を、更に無血清培地中で浮遊培養に付すことにより、該神経前駆組織内の神経前駆細胞による神経上皮構造の形成を誘導し、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得ることを含む、[1]記載の製造方法。

[7] 工程(I)の浮遊培養において、ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を更に第2の線維芽細胞増殖因子で処理することを含む、[6]記載の製造方法。

[8] 第2の線維芽細胞増殖因子がFGF19、FGF17又はFGF8である、[7]記載の製造方法。

[9] 工程(II)の浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞を含むヒト細胞凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊をSDF1により処理することを含む、[6]～[8]のいずれか記載の製造方法。

[10] 工程(II)の浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞を含むヒト細胞凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊をGDF7により処理することを含む、[6]記載の製造方法。

[11] 小脳板組織が、GABA作動性神経前駆細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞を含む神経上皮構造である、[7]又は[8]記載の製造方法。

[12] 神経上皮構造が背腹軸極性を有する、[11]記載の製造方法。

[13] 小脳板組織が、細胞凝集塊の表層域の連続的な小脳神経上皮構造及び菱脳唇様組織を含む、[9]記載の製造方法。

[14] 小脳板組織が、頂端面より、脳室帯、プルキンエ細胞層及び菱脳唇由来細胞層の順で層をなす三層構造を有する、[13]記載の製造方法。

[15] [1]～[14]のいずれか1項記載の製造方法により得られるヒト細胞凝集塊。

[16] (I) [6]～[14]のいずれか記載の製造方法により、ヒト多能性幹細胞から、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得ること、

10

20

30

40

50

(II) 得られたヒト細胞凝集塊からGABA作動性神経前駆細胞を得ること、及び
 (III) GABA作動性神経前駆細胞を、哺乳動物小脳顆粒細胞前駆細胞と共培養し、該GABA作動性神経前駆細胞からプルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞への分化を誘導すること

を含む、ヒトプルキンエ細胞、ヒトゴルジ細胞又はヒト介在神経細胞の製造方法。

[17] (I) [6] ~ [14] のいずれか記載の製造方法により、ヒト多能性幹細胞から、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得ること、

(II) 得られたヒト細胞凝集塊から、小脳顆粒細胞前駆細胞を得ること、

(III) 小脳顆粒細胞前駆細胞を、哺乳動物小脳細胞と共培養し、小脳顆粒細胞への分化を誘導すること

を含む、ヒト小脳顆粒細胞の製造方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、ヒト多能性幹細胞から、小脳前駆組織をインビトロで効率的に誘導することができる。中脳-後脳境界領域の前駆組織のインビトロ形成が、ヒト多能性幹細胞で初めて可能となる。生体に見られる背腹軸の極性を、この中脳-後脳境界領域の前駆組織中に再現することができる。本発明によれば、ヒト多能性幹細胞由来の細胞の凝集塊中に、小脳前駆組織(小脳板組織)を、連続上皮構造を持った形で自己組織化させることができる。このヒト小脳板組織中では、生体に見られる2つの主要領域である小脳神経上皮(小脳プルキンエ細胞や介在神経細胞の前駆組織)と菱脳唇(小脳顆粒細胞と小脳核神経細胞の前駆組織)とが隣接して自己形成され得る。また、このインビトロ誘導されたヒト小脳板組織から、プルキンエ細胞、小脳介在神経細胞、小脳顆粒細胞、小脳核細胞等への分化を更に誘導することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】 Gbx2(緑)、Otx2(赤)及びN-cadherin(青)に対する抗体を用いた、細胞凝集塊の蛍光抗体染色像を示す。

【図2】 定量的核酸増幅法による領域特異的遺伝子発現の解析を示す。Six3及びOtx2(前脳); En2(中脳); Gbx2(後脳吻側); Pax2及びHoxa2(後脳尾側)。左側のカラム(CD MI)はFgf2非添加条件を、右側のカラム(+Fgf2)はFgf2添加条件を、それぞれ示す。

【図3】 分化誘導35日目の細胞凝集塊の蛍光抗体染色像を示す。a: N-cadherin(緑)、Kirrel2(赤)。b: Kirrel2(緑)。c: Kirrel2(緑)、Ptf1a(赤)。全ての像において、DAPI(青)により核を対比染色した。

【図4】 抗Kirrel2抗体によるFACS解析を示す。左: 対照群、右: FGF2添加群。

【図5】 分離したKirrel2細胞をマウス上菱脳唇由来細胞と共培養することにより得られるプルキンエ細胞(a-e)又はゴルジ細胞(f)の蛍光抗体染色像を示す。a: L7(緑)、Calbindin(赤)。b: L7(緑)。c: L7(緑)、GluRdelta2(赤)。d: L7(緑)、GluRdelta2(赤)。e: Calbindin(緑)、GluRdelta2(白)、Cbln1(赤)。f: Neurogranin(赤)。

【図6】 分化誘導35日目の細胞凝集塊の蛍光抗体染色像を示す。a: Kirrel2(緑)、Atoh1(赤)。b: Sox2(緑)、Atoh1(赤)。c: Barhl1(緑)、Atoh1(赤)。d: Zic1(緑)、Atoh1(赤)。

【図7】 分化誘導35日目(aおよびb)と53日目(c)の細胞凝集塊の蛍光抗体染色像を示す。a: Barhl1(緑)、Atoh1(赤)、DAPI(青)。b: Barhl1(緑)、Atoh1(赤)、Lhx2(青)。c: Tbr1(緑)、SMI32(赤)。

【図8】 再凝集培養後5日目(上段)と8日目(下段)の蛍光抗体染色像を示す。a: GFP(緑)、Barhl1(白)、Map2(赤)。b: GFP(緑)、Barhl1(白)、Map2(赤)。c: GFP(緑)、Pax6(白)、Map2(赤)。d: GFP(緑)。e: Pax6(白)、Map2(赤)。f: GFP(緑)。

【図9】 FGF2により誘導された2つの構造的に異なるKirrel2+/N-cadherin+神経上皮(NE

10

20

30

40

50

）の免疫組織化学解析を示す。A: 小さな口ゼット状のNE。N-cadherin (緑)、Kirrel2 (赤)。B: 平楕円状の連続的なNE。N-cadherin (緑)、Kirrel2 (赤)。C: FGF19添加による、小さな口ゼット状のNEを有する細胞凝集塊と平楕円状の連続的なNEを有する細胞凝集塊の割合を示すグラフ。

【図10】分化誘導35日目の細胞凝集塊の蛍光抗体染色像を示す。a: Kirrel2 (緑)、Ptf1a (赤)。b: Kirrel2 (緑)、SKOR2 (白)、DAPI (青)。c: Kirrel2 (赤)、Nkx6.1 (白)、DAPI (青)。d: Kirrel2 (緑)、Nestin (白)、Nkx6.1 (赤)。e: Kirrel2 (緑)、Foxa2 (白)、Nkx6.1 (赤)、DAPI (青)。

【図11】ヒトES細胞由来神経上皮及び胚性マウスロンボメア1の背腹軸の模式図を示す。

【図12】培養35日目の細胞凝集塊の蛍光抗体染色像 (左及び中央) 及び定量的遺伝子増幅法によるAtoh1遺伝子発現解析 (右) を示す。Atoh1 (赤)、DAPI (青)。

【図13】ヒトES細胞凝集塊における神経上皮構造の自己形成を示す。PKC (緑)、N-cadherin (赤)。

【図14】SDF1処理による小脳組織形成試験における培養35日目の細胞凝集塊の蛍光抗体染色像を示す。a: Kirrel2 (緑)。b: PKC (緑)、Sox2 (赤)。c: Kirrel2 (緑)、Skor2 (赤)。d: Sox2 (赤)、PH3 (白)。e: Kirrel2 (緑)、Atoh1 (赤)。f: Barhl1 (緑)、Atoh1 (赤)。g: Kirrel2 (緑)、Ptf1a (赤)。h: Sox2 (緑)、Oligo2 (赤)、Lhx5 (白)。i: Oligo2 (赤)、Sox2 (白)。j: Barhl1 (緑)、Sox2 (白)。k: Kirrel2 (緑)、Atoh1 (赤)。l: Kirrel2 (緑)、Atoh1 (赤)、Barhl1 (白)。

【図15】FGF19及び追加的なSDF1により、それぞれ誘導される、極性化された小脳NE及びRL様構造を有する連続的なNEの2つの報告の自己形成の模式図を示す。SVZ: 脳室下帯、VZ: 脳室帯。

【図16】ヒト多能性幹細胞凝集塊から誘導したブルキンエ細胞において観察された、ブルキンエ細胞に特徴的な電気生理学的所見を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

(1) 多能性幹細胞

「多能性幹細胞」とは、生体を構成するすべての細胞に分化しうる能力 (分化多能性) と、細胞分裂を経て自己と同一の分化能を有する娘細胞を生み出す能力 (自己複製能) とを併せ持つ細胞をいう。

【0017】

分化多能性は、評価対象の細胞を、ヌードマウスに移植し、三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) のそれぞれの細胞を含むテラトーマ形成の有無を試験することにより、評価することができる。

【0018】

多能性幹細胞としては、胚性幹細胞 (ES細胞)、胚性生殖細胞 (EG細胞)、誘導多能性幹細胞 (iPS細胞) 等を挙げることができるが、分化多能性及び自己複製能を併せ持つ細胞である限り、これに限定されない。本発明においては、胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞が好適に用いられる。

【0019】

胚性幹細胞 (ES細胞) は、例えば、着床以前の初期胚、当該初期胚を構成する内部細胞塊、単一割球等を培養することによって樹立することができる (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Thomson, J. A. et al., Science, 282, 1145-1147 (1998))。初期胚として、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を用いてもよい (Wilmut et al. (Nature, 385, 810 (1997)), Cibelli et al. (Science, 280, 1256 (1998)), 入谷明ら (蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999)), Baguisi et al. (Nature Biotechnology, 17, 456 (1999)), Wakayama et al. (Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)), Rideout III et al. (Nature

10

20

30

40

50

Genetics, 24, 109 (2000)、Tachibana et al. (Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell (2013) in press))。初期胚として、単為発生胚を用いてもよい (Kim et al. (Science, 315, 482-486 (2007))、Nakajima et al. (Stem Cells, 25, 983-985 (2007))、Kim et al. (Cell Stem Cell, 1, 346-352 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 9, 432-449 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 10, 11-24 (2008))。

【0020】

ES細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合ES細胞も、本発明の方法に用いられる胚性幹細胞に含まれる。

【0021】

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

【0022】

胚性生殖細胞 (EG細胞) は、始原生殖細胞を、LIF、bFGF及びSCFの存在下で培養すること等により樹立することができる (Matsui et al., Cell, 70, 841-847 (1992)、Shamblo tt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(23), 13726-13731 (1998)、Turnpenny et al., Stem Cells, 21(5), 598-609, (2003))。

【0023】

誘導多能性幹細胞 (iPS細胞) とは、体細胞 (例えば線維芽細胞、皮膚細胞、リンパ球等) へ核初期化因子を接触させることにより、人為的に分化多能性及び自己複製能を獲得した細胞をいう。iPS細胞は、体細胞 (例えば線維芽細胞、皮膚細胞等) にOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycからなる核初期化因子を導入する方法で初めて見出された (Cell, 126: p. 663-676, 2006)。その後、多くの研究者により、リプログラム因子の組み合わせや因子の導入法について様々な改良が進められており、多様な誘導多能性幹細胞の製造法が報告されている。

【0024】

核初期化因子は、線維芽細胞等の体細胞から分化多能性及び自己複製能を有する細胞を誘導することができる物質 (群) であれば、タンパク性因子またはそれをコードする核酸 (ベクターに組み込まれた形態を含む)、あるいは低分子化合物等のいかなる物質から構成されてもよい。核初期化因子がタンパク性因子またはそれをコードする核酸の場合、好ましくは以下の組み合わせが例示される (以下においては、タンパク性因子の名称のみを記載する)。

(1) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc (ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。さらに、c-MycはT58A (活性型変異体)、N-Myc, L-Mycで置換可能である。)

(2) Oct3/4, Klf4, Sox2

(3) Oct3/4, Klf4, c-Myc

(4) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28

(5) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28

(6) Oct3/4, Klf4, Sox2, bFGF

(7) Oct3/4, Klf4, Sox2, SCF

(8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, bFGF

(9) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SCF

【0025】

これらの組み合わせの中で、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4, Sox2及びKlf4の3因子の組み合わせが好ましい。一方、iPS細胞を治療用途に用いることを念頭に置かない場合 (例えば、創薬スクリーニング等の研究ツールとして用いる場合など) は、Oct3/4, Klf4, Sox2及びc-Mycの4因子か、それにLin28またはNanogを加えた5因子が好ましい。

10

20

30

40

50

【0026】

自家移植用途にはiPS細胞が好適に用いられる。

【0027】

染色体上の遺伝子を公知の遺伝子工学の手法を用いて改変した多能性幹細胞も、本発明において使用できる。多能性幹細胞は、公知の方法を用いて、分化マーカーをコードする遺伝子に標識遺伝子（例えばGFP等の蛍光タンパク質）をインフレームにノックインすることにより、標識遺伝子の発現を指標として対応する分化段階に達したことを識別可能とした細胞であってもよい。

【0028】

多能性幹細胞としては、例えば温血動物、好ましくは哺乳動物の多能性幹細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジー等の霊長類を挙げることができる。多能性幹細胞は、好ましくは、げっ歯類（マウス、ラット等）又は霊長類（ヒト等）の多能性幹細胞であり、最も好ましくはヒト多能性幹細胞である。

10

【0029】

多能性幹細胞は、自体公知の方法により維持培養できる。例えば、臨床応用の観点では、多能性幹細胞は、KnockoutTMSerum Replacement (KSR) などの血清代替物を用いた無血清培養や、無フィーダー細胞培養により維持することが好ましい。

【0030】

本発明において使用される多能性幹細胞は、好ましくは単離されている。「単離」とは、目的とする細胞や成分以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。「単離されたヒト多能性幹細胞」の純度（総細胞数に占めるヒト多能性幹細胞数の百分率）は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは99%以上、最も好ましくは100%である。

20

【0031】

(2) 多能性幹細胞の凝集塊の形成

多能性幹細胞の凝集塊は、分散させた多能性幹細胞を、培養器に対して、非接着性の条件下で培養し（即ち、浮遊培養し）、複数の多能性幹細胞を集合させて凝集塊を形成させることにより、得ることができる。

30

【0032】

この凝集塊形成に用いる培養器としては、特に限定されないが、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチウェルプレート（384ウェル、192ウェル、96ウェル、48ウェル、24ウェル等）、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられる。非接着性の条件下での培養を可能とするため、培養器は、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞非接着性となるように人工的に処理されているものや、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないもの等を使用することができる。

40

【0033】

マルチウェルプレート、マイクロポア、チャンバースライド、チューブ等の底の形状は、分散した多能性幹細胞が1箇所へ沈殿するのが容易となるように、U底又はV底とすることが好ましく、最も好ましくはV底である。V底容器とは、容器の底面が斜面を有しており、且つ該斜面が底面全体にわたって均一な傾斜角度（例、水平面から30~60°）を有する容器をいう。

【0034】

凝集塊の形成時に用いられる培地は、哺乳動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地

50

、Eagle MEM培地、MEM培地、DMEM培地、八ム培地、Ham's F-12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal培地およびこれらの混合培地など、哺乳動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。一態様において、IMDM培地及びHam's F-12培地の混合培地が用いられる。混合比は、容量比で、例えば、IMDM:Ham's F-12=0.8~1.2:1.2~0.8である。

【0035】

培養に用いる培地は、血清含有培地又は無血清培地であり得る。無血清培地とは、無調製又は未精製の血清を含まない培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分(例えば、増殖因子)が混入している培地は無血清培地に該当するものとする。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明においては、無血清培地が好適に用いられる。

10

【0036】

凝集塊の形成時に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものであり得る。かかる血清代替物は、例えば、W098/30679記載の方法により調製できる。また、本発明の方法をより簡便に実施するために、血清代替物は市販のものを利用できる。かかる市販の血清代替物としては、例えば、KSR(knockout serum replacement)(Life Technologies社製)、Chemically-defined Lipid concentrated(Life Technologies社製)が挙げられる。

20

【0037】

凝集塊の形成に用いられる培地は、多能性幹細胞から、小脳又はその前駆組織への分化誘導に、悪影響を与えない範囲で、他の添加物を含むことができる。添加物としては、例えば、インスリン、鉄源(例えばトランスフェリン等)、ミネラル(例えばセレン酸ナトリウム等)、糖類(例えばグルコース等)、脂質(例えばコレステロール等)、有機酸(例えばピルビン酸、乳酸等)、血清蛋白質(例えばアルブミン等)、アミノ酸(例えばL-グルタミン等)、還元剤(例えば2-メルカプトエタノール、モノチオグリセロール等)、ビタミン類(例えばアスコルビン酸、d-ピオチン等)、抗生物質(例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、緩衝剤(例えばHEPES等)等が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0038】

また、凝集塊の形成に用いられる培地は、好ましくは、後述する、工程(1)において用いられる培地であってもよい。

【0039】

多能性幹細胞の凝集塊の形成に際しては、まず、多能性幹細胞を継代培養から回収し、これを、単一細胞、又はこれに近い状態にまで分散する。多能性幹細胞の分散は、適切な細胞解離液を用いて行われる。細胞解離液としては、例えば、EDTA;トリプシン、コラゲナーゼIV、メタロプロテアーゼ等のタンパク分解酵素等を単独で又は適宜組み合わせ用いることができる。なかでも細胞障害性が少ないものが好ましく、このような細胞解離液として、例えば、ディスペラーゼ(エーディア)、TrypLE(Life Technologies)又はアクユターゼ(MILLIPORE)等の市販品が入手可能である。分散された多能性幹細胞は上記培地中に懸濁される。

40

【0040】

分散により誘導される多能性幹細胞(特に、ヒト多能性幹細胞)の細胞死を抑制するために、Rho-associated coiled-coilキナーゼ(ROCK)の阻害剤を培養開始時から添加することが好ましい(特開2008-99662)。ROCK阻害剤を添加する期間は、多能性幹細胞の細胞死を抑制し得る限り、特に限定されないが、例えば培養開始から15日以内の期間添加される。ROCK阻害剤としては、Y-27632((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride)等を挙げることができる。浮遊培養に用いられるROCK阻害剤の濃度は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制し得る濃度で

50

ある。例えば、Y-27632について、このような濃度は、通常約0.1~200 μ M、好ましくは約2~50 μ Mである。ROCK阻害剤の濃度を添加する期間内で変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

【0041】

尚、分散により誘導される多能性幹細胞（特に、ヒト多能性幹細胞）の細胞死を抑制するため、上述の細胞解離液中にROCK阻害剤を添加し、ROCK阻害剤の存在下で、多能性幹細胞の分散を行ってもよい。

【0042】

分散された多能性幹細胞の懸濁液を、上記培養器中に播き、分散させた多能性幹細胞を、培養器に対して、非接着性の条件下で培養することにより、複数の多能性幹細胞を集合させて凝集塊を形成する。この際、分散された多能性幹細胞を、10cmディッシュのような、比較的大きな培養器に播種することにより、1つの培養コンパートメント中に複数の多能性幹細胞の凝集塊を同時に形成させてもよいが、こうすると凝集塊ごとの大きさや、凝集塊中に含まれる多能性幹細胞の数に大きなばらつきが生じ、このばらつきが原因で、多能性幹細胞から、小脳又はその前駆組織への分化の程度に、凝集塊間で差が生じ、結果として分化誘導の効率が低下してしまうおそれがある。そこで、分散した多能性幹細胞を迅速に凝集させて、1つの培養コンパートメント中に1つの凝集塊を形成することが好ましい。このような分散した多能性幹細胞を迅速に凝集させる方法としては、例えば、以下の方法を挙げることができる：

(1) 比較的小さな体積（例えば、1ml以下、500 μ l以下、200 μ l以下、100 μ l以下）の培養コンパートメント中に、分散した多能性幹細胞を閉じ込め、該コンパートメント中に1個の凝集塊を形成する方法。好ましくは分散した多能性幹細胞を閉じ込めた後、培養コンパートメントを静置する。培養コンパートメントとしては、マルチウェルプレート（384ウェル、192ウェル、96ウェル、48ウェル、24ウェル等）、マイクロポア、チャンバースライド等におけるウェルや、チューブ、ハンギングドロップ法における培地の液滴等を挙げることができるが、これらに限定されない。該コンパートメントに閉じ込められた分散した多能性幹細胞が、重力にうながされて1箇所へ沈殿し、或いは細胞同士が接着することにより、1つの培養コンパートメントにつき、1つの凝集塊が形成される。マルチウェルプレート、マイクロポア、チャンバースライド、チューブ等の底の形状は、分散した多能性幹細胞が1箇所へ沈殿するのが容易となるように、U底又はV底とすることが好ましく、最も好ましくはV底である。

(2) 遠心チューブに分散した多能性幹細胞を入れ、これを遠心し、1箇所に多能性幹細胞を沈殿させることにより、該チューブ中に1個の凝集塊を形成する方法。

【0043】

1つの培養コンパートメント中に播く多能性幹細胞の数は、1つの培養コンパートメントにつき1つの凝集塊が形成され、且つ本発明の方法によって、該凝集塊において、多能性幹細胞から、小脳又はその前駆組織への分化誘導が可能であれば、特に限定されないが、1つの培養コンパートメントにつき、通常約 1×10^3 ~ 約 5×10^4 個、好ましくは約 1×10^3 ~ 約 2×10^4 個、より好ましくは約 2×10^3 ~ 約 1.2×10^4 個、更に好ましくは約 5×10^3 ~ 約 7×10^3 個（例、6000個）の多能性幹細胞を播く。そして、多能性幹細胞を迅速に凝集させることにより、1つの培養コンパートメントにつき、通常約 1×10^3 ~ 約 5×10^4 個、好ましくは約 1×10^3 ~ 約 2×10^4 個、より好ましくは約 2×10^3 ~ 約 1.2×10^4 個、更に好ましくは約 5×10^3 ~ 約 7×10^3 個（例、6000個）の多能性幹細胞からなる細胞凝集塊が1個形成される。

【0044】

凝集塊形成までの時間は、1つのコンパートメントにつき1つの凝集塊が形成され、且つ本発明の方法によって、該凝集塊において、多能性幹細胞から、小脳又はその前駆組織への分化誘導が可能な範囲で適宜決定可能であるが、この時間を短くすることにより、目的とする小脳又はその前駆組織への効率よい分化誘導が期待できるため、この時間は短いほうが好ましい。好ましくは、24時間以内、より好ましくは12時間以内、さらに好ましくは6時間以内、最も好ましくは、2~3時間で、多能性幹細胞の凝集塊を形成する。この凝集

塊形成までの時間は、細胞を凝集させる用具や、遠心条件などを調整することで当業者であれば適宜調節することが可能である。

【0045】

また凝集塊形成時の培養温度、CO₂濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約30~40℃、好ましくは約37℃である。また、CO₂濃度は、例えば約1~10%、好ましくは約5%である。

【0046】

更に、同一培養条件の培養コンパートメントを複数用意し、各培養コンパートメントにおいて、1個の多能性幹細胞の凝集塊を形成させることにより、質的に均一な、多能性幹細胞の凝集塊の集団を得ることができる。多能性幹細胞の凝集塊が質的に均一であることは、凝集塊のサイズおよび細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態およびその均一性、分化および未分化マーカーの発現およびその均一性、分化マーカーの発現制御およびその同期性、分化効率の凝集塊間の再現性などに基づき、評価することが可能である。一態様において、本発明の方法に用いる、多能性幹細胞の凝集塊の集団は、凝集塊中に含まれる多能性幹細胞の数が均一である。特定のパラメーターについて、多能性幹細胞の凝集塊の集団が「均一」とは、凝集塊の集団全体のうちの90%以上の凝集塊が、当該凝集塊の集団における当該パラメーターの平均値±10%の範囲内、好ましくは、平均値±5%の範囲内であることを意味する。

【0047】

(3) 小脳前駆組織の誘導

本発明は、多能性幹細胞の凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFβシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子により処理することを含む、小脳前駆組織を含むヒト細胞凝集塊の製造方法を提供するものである。

【0048】

小脳前駆組織としては、中脳後脳境界領域の神経前駆組織；小脳板組織；それら部分組織（例、脳室帯、菱脳唇）等が挙げられるが、これらに限定されない。中脳後脳境界領域とは、胚発生の過程で中脳と後脳前部の発生を制御する形成体である。中脳後脳境界領域は、中脳後脳境界領域マーカーの発現で特定することが出来る。中脳後脳境界領域マーカーとしては、En2（中脳マーカー）、Gbx2（後脳吻側マーカー）等を挙げることが出来る。中脳後脳境界領域は、En2陽性の神経前駆細胞、及びGbx2陽性の神経前駆細胞からなる群から選択される少なくとも1つ、好ましくは両方の細胞を含む。神経前駆細胞は、N-cadherin陽性細胞として特定することが出来る。一態様において、中脳後脳境界領域は、En2陽性及び/又はGbx2陽性の神経前駆組織である。小脳板組織の定義については、後述する。

【0049】

本発明において、組織とは、形態や性質が異なる複数種類の細胞が一定のパターンで立体的に配置した構造を有する細胞集団の構造体をいう。

【0050】

本発明の製造方法においては、具体的には、多能性幹細胞の凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFβシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子により処理することにより、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含む細胞凝集塊を得る（工程（I））。そして、更に小脳分化を進行させることを希望する場合には、工程（I）で得られた中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含む細胞凝集塊を、更に無血清培地中で浮遊培養に付すことにより、該神経前駆組織内の神経前駆細胞による神経上皮構造の形成を誘導し、小脳板組織を含む細胞凝集塊を得る（工程（II））。工程（I）において、多能性幹細胞から、中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が誘導され、工程（II）において、中脳後脳境界領域の神経前駆組織から小脳板組織への更なる分化が誘導される。

【0051】

本発明の方法においては、細胞凝集塊内において、小脳前駆組織の自己組織化が誘発されるので、時間の経過とともに、細胞凝集塊内に含まれる小脳前駆組織の分化段階が進んでいく。従って、目的とする小脳前駆組織の分化段階に応じて、培養期間や培養条件を適宜調節することが好ましい。

【0052】

(3.1) 工程(1)

工程(1)においては、多能性幹細胞の凝集塊を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養に付し、該浮遊培養において、該多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子により処理する。

10

【0053】

多能性幹細胞の凝集塊の「浮遊培養」とは、多能性幹細胞の凝集塊を、培地中において、培養器に対して非接着性の条件下で培養することをいう。

【0054】

浮遊培養に用いられる培地は、インスリンを含む。培地中のインスリン濃度は、細胞凝集塊において、多能性幹細胞から中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化を誘導可能な範囲で、適宜設定することができるが、その濃度は、通常0.1 µg/ml以上、好ましくは、1 µg/ml以上である。中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化に悪影響がない限り、上限値は特にないが、培養コストの観点から、通常、100 µg/ml以下、好ましくは20 µg/ml以下である。一態様において、培地中のインスリン濃度は、通常0.1~100 µg/ml、好ましくは1~20 µg/ml(例、7 µg/ml)である。インスリンは、特に、多能性幹細胞又はこれに由来する細胞の増殖の促進に寄与するので、この効果を達成し得る濃度で培地に含まれる。

20

【0055】

浮遊培養に用いられる培地は、哺乳動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、MEM培地、DMEM培地、ハム培地、Ham's F-12培地、RPMI1640培地、Fischer's培地、Neurobasal培地およびこれらの混合培地など、哺乳動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。一態様において、IMDM培地及びHam's F-12培地の混合培地が用いられる。混合比は、容量比で、例えば、IMDM:Ham's F-12=0.8~1.2:1.2~0.8である。

30

【0056】

化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、浮遊培養には、無血清培地を用いる。

【0057】

細胞凝集塊の浮遊培養に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものであり得る。かかる血清代替物は、例えば、WO98/30679記載の方法により調製できる。また、本発明の方法をより簡便に実施するために、血清代替物は市販のものを利用できる。かかる市販の血清代替物としては、例えば、Chemically-defined Lipid concentrated(Life Technologies社製)が挙げられる。血清代替物は、含有成分が化学的に決定されたものが好ましい。また、血清代替物は、培養する細胞の動物種とは異なる動物から単離された成分(異種動物由来成分)(例えば、ヒト細胞を培養する場合、非ヒト動物から単離された成分)を含有しないものが好ましい。化学的に未決定な血清代替物や異種動物由来成分を含む血清代替物(例、KSR(Knockout serum replacement))は、多能性幹細胞から中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化誘導を阻害するおそれがあるため、好ましくは使用しない。

40

50

【0058】

細胞凝集塊の浮遊培養に用いられる培地は、多能性幹細胞から中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化誘導に、悪影響を与えない範囲で、他の添加物を含むことができる。添加物としては、例えば、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、糖類（例えばグルコース等）、脂質（例えばコレステロール等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール、モノチオグリセロール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0059】

一態様において、細胞凝集塊の浮遊培養に用いられる培地は、中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化誘導に悪影響を与えない観点から、本明細書において培地に含まれることが特に記載されたもの以外の成長因子を含まないことが望ましい。ここにいう「成長因子」には、Fgf；BMP；Wnt、Nodal、Notch、Shh等のパターン形成因子；Lipid-rich albumin；細胞外マトリクスが包含される。成長因子を含まない培地としては、例えば、Watabe et al, Proc Natl Acad Sci USA, 105(33): 11796-11801, 2008に、開示されたgfCDMを挙げることができる。

【0060】

浮遊培養に用いる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、含有成分が化学的に決定された培地である。

20

【0061】

浮遊培養に用いる培地は、好ましくは異種動物由来成分を含有しない。

【0062】

細胞凝集塊の浮遊培養における培養温度、CO₂濃度、O₂濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30～40℃、好ましくは約37℃である。CO₂濃度は、例えば約1～10%、好ましくは約5%である。O₂濃度は、例えば約20%である。

【0063】

工程(1)の浮遊培養においては、多能性幹細胞から小脳前駆組織への分化誘導が可能な限り、フィーダー細胞の存在下/非存在下いずれの条件で細胞凝集塊の浮遊培養を行ってもよいが、未決定因子の混入を回避する観点から、フィーダー細胞非存在条件下で細胞凝集塊の浮遊培養を行うのが好ましい。

30

【0064】

細胞凝集塊の浮遊培養に用いることのできる容器としては、上記(2)の多能性幹細胞の凝集塊の形成に用いることができる容器として列挙したものを挙げることが出来る。細胞凝集塊が1か所に安定的に位置し、凝集塊の崩壊を回避するため、容器の底の形状はU底又はV底とすることが好ましく、最も好ましくはV底である。

【0065】

好ましい態様において、質的に均一な、多能性幹細胞の凝集塊の集団を、インスリンを含む無血清培地中で浮遊培養する。質的に均一な、多能性幹細胞の凝集塊の集団を用いることにより、中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化の程度についての凝集塊間での差を最小限に抑制し、目的とする分化誘導の効率を向上することができる。質的に均一な、多能性幹細胞の凝集塊の集団の浮遊培養には、以下の態様が包含される。

40

(1) 複数の培養コンパートメントを用意し、1つの培養コンパートメントに1つの多能性幹細胞の凝集塊が含まれるように、質的に均一な、多能性幹細胞の凝集塊の集団を播く。(例えば、96ウェルプレートの各ウェルに1つずつ、多能性幹細胞の凝集塊を入れる。)そして、各培養コンパートメントにおいて、1つの多能性幹細胞の凝集塊をインスリンを含む培地中で浮遊培養する。

(2) 1つの培養コンパートメントに複数の多能性幹細胞の凝集塊が含まれるように、質的に均一な、多能性幹細胞の凝集塊の集団を1つの培養コンパートメントに播く。(例えば

50

、10cmディッシュに、複数の多能性幹細胞の凝集塊を入れる。)そして、該コンパートメントにおいて、複数の多能性幹細胞の凝集塊をインスリンを含む培地中で浮遊培養する。

【0066】

本発明の方法を通じて、(1)及び(2)のいずれの態様を採用してもよく、また、培養の途中で態様を変更してもよい((1)の態様から(2)の態様へ、或いは(2)の態様から(1)の態様へ)。一態様において、工程(1)においては(1)の態様を採用し、工程(11)において(2)の態様を採用する。

【0067】

工程(1)においては、上記浮遊培養において、多能性幹細胞凝集塊又はこれに由来する細胞凝集塊を、ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子により処理する。これらの因子による細胞凝集塊の処理は、浮遊培養に、ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子をそれぞれ添加し、培地中で、多能性幹細胞凝集塊又はこれに由来する細胞凝集塊をROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤、及び第1の線維芽細胞増殖因子に接触させることにより達成させることが出来る。

【0068】

Rho-associated coiled-coilキナーゼ(ROCK)阻害剤は、分散により誘導される多能性幹細胞(特に、ヒト多能性幹細胞)の細胞死を抑制し、グロースをサポートする効果を有する。ROCK阻害剤としては、幾つかの化合物が知られている(例、Ishizakiら, Mol. Pharmacol. 57,976-983 (2000)及びNarumiyaら, Methods Enzymol. 325,273-284 (2000))。具体的には、ROCK阻害剤としては、Y-27632((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyr-20
idyl)cyclohexanecarboxamide)(好ましくは、2塩酸塩);Fasudil(5-(1-Homopiperaziny)sulfonylisoquinoline)(好ましくは、塩酸塩);H-1152((S)-(+)-2-Methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinolinyl)sulfonyl]-hexahydro-1H-1,4-diazepine)(好ましくは、2塩酸塩)等を挙げる事が出来る。ROCK阻害剤は、好ましくはY-27632である。

【0069】

細胞凝集塊をROCK阻害剤で処理する時期及び期間は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制し、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が可能である限り、特に制限はない。分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を効果的に抑制するため、多能性幹細胞凝集塊の浮遊培養開始から好ましくは2時間以内に、より好ましくは浮遊培養開始から0.5時間以内に、更に好ましくは浮遊培養開始時からROCK阻害剤を培地中に添加し、細胞凝集塊をROCK阻害剤で処理する。ROCK阻害剤による処理期間は、通常、12時間以上、好ましくは2、4、又は7日間以上である。ROCK阻害剤による処理期間の上限値は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が可能である限り、特に制限はないが、該分化への不測の悪影響を回避する観点から、通常21日以内、好ましくは、14日以内である。ROCK阻害剤による処理期間経過後、ROCK阻害剤は培地から除去される。ROCK阻害剤処理時の培地中のROCK阻害剤濃度は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制し得る濃度である。例えば、Y-27632について、このような濃度は、通常約0.1~200µM、好ましくは約2~50µMである。ROCK阻害剤の濃度を処理期間中変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

【0070】

TGFシグナル阻害剤は、多能性幹細胞の中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進する効果を有する。TGFシグナル阻害剤は、TGFにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されない。TGFシグナル阻害剤としては、SB431542(4-(5-ベンゾール[1,3]ジオキサール-5-イル-4-ピリジン-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル)-ベンズアミド)、LY-364947、SB-505、A-83-01等が挙げられるが、これらに限定されない。なかでも、SB431542が好ましい。

【0071】

細胞凝集塊をTGFシグナル阻害剤で処理する時期及び期間は、多能性幹細胞の中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進し得る限り、特に制限はない。中胚葉分化を効果的に抑制し、神経外胚葉への分化を効果的に促進するため、多能性幹細胞の凝集塊の浮

10

20

30

40

50

遊培養開始から好ましくは2時間以内に、より好ましくは浮遊培養開始から0.5時間以内に、更に好ましくは浮遊培養開始時からTGFシグナル阻害剤を培地中に添加し、細胞凝集塊をTGFシグナル阻害剤で処理する。TGFシグナル阻害剤による処理期間は、通常2日間以上、好ましくは7日間以上である。TGFシグナル阻害剤による処理期間の上限値は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が可能である限り、特に制限はないが、該分化への不測の悪影響を回避する観点から、通常21日以内、好ましくは、14日以内である。TGFシグナル阻害剤による処理期間経過後、TGFシグナル阻害剤は培地から除去される。TGFシグナル阻害剤処理時の培地中のTGFシグナル阻害剤濃度は、多能性幹細胞の中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進し得る濃度である。例えば、SB431542について、このような濃度は、通常約0.1~200 μ M、好ましくは約2~50 μ M、より好ましくは約10~30 μ Mである。TGFシグナル阻害剤の濃度を処理期間中変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

10

【0072】

第1の線維芽細胞増殖因子は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域への分化を促進し、前脳への分化を抑制する効果を有するFGFである。線維芽細胞増殖因子は、中脳後脳境界領域への分化を促進するものである限り、特に限定されない。線維芽細胞増殖因子(FGF)としては、ヒト及びマウスにおいては、FGF1~FGF23が確認されている。ヒトFGF19はマウスFGF15のオルソログであるので、ヒト及びマウスのFGFファミリーは22のメンバーで構成される。本明細書において、FGFの呼称はヒトFGFのノメンクラチャに従うものとする。第1の線維芽細胞増殖因子は、好ましくはFGF2又はFGF8であり、より好ましくはFGF2である。FGF2は、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)とも呼ばれる、公知のサイトカインであり、そのアミノ酸配列も公知である。本発明に用いるFGF2は、通常哺乳動物のFGF2である。哺乳動物としては、上記のものを挙げることができる。FGF2は、多くの哺乳動物の種間で交差反応性を有するので、本発明の目的を達成し得る限り、いずれの哺乳動物のFGF2を用いてもよいが、好適には、培養する細胞と同一種の哺乳動物のFGF2が用いられる。例えば、げっ歯類(マウス、ラット等)又は霊長類(ヒト等)のFGF2が用いられる。ここで、マウスFGF2とは、FGF2が、マウスが生体内で天然に発現するFGF2のアミノ酸配列を有することを意味する。本明細書中、他のタンパク質等についても、同様に解釈する。マウスFGF2の代表的なアミノ酸配列としては、NCBIのアクセッション番号で、NP_032032.1(2014年2月18日更新)、このアミノ酸配列からN末端シグナル配列(1-9)を除いたアミノ酸配列(成熟型マウスFGF2アミノ酸配列)等を例示することができる。ヒトFGF2の代表的なアミノ酸配列としては、NCBIのアクセッション番号で、NP_001997.5(2014年2月18日更新)等を例示することができる。

20

30

【0073】

細胞凝集塊を第1の線維芽細胞増殖因子で処理する時期及び期間は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域への分化を促進し得る限り、特に制限はない。多能性幹細胞凝集塊の浮遊培養開始時を0日目(d0)としたときに、好ましくはd2~d4のいずれかの時点、より好ましくはd2に、第1の線維芽細胞増殖因子を培地中に添加し、第1の線維芽細胞増殖因子による細胞凝集塊の処理を開始する。第1の線維芽細胞増殖因子による処理期間は、通常2日間以上、好ましくは5日間以上である。第1の線維芽細胞増殖因子による処理期間の上限値は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が可能である限り、特に制限はないが、該分化への不測の悪影響を回避する観点から、通常19日以内、好ましくは、12日以内である。第1の線維芽細胞増殖因子による処理期間経過後、第1の線維芽細胞増殖因子は培地から除去される。第1の線維芽細胞増殖因子処理時の培地中の第1の線維芽細胞増殖因子濃度は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域への分化を促進し得る濃度である。第1の線維芽細胞増殖因子は、多能性幹細胞の維持培養にも用いられるが、中脳後脳境界領域への分化促進濃度は、通常、維持培養用の濃度を上回る。第1の線維芽細胞増殖因子としてFGF2を用いる場合、培地中の濃度は、好ましくは20 ng/ml以上、より好ましくは40 ng/ml以上、更に好ましくは50 ng/ml以上である。中脳後脳境界領域への分化に悪影響がない限りFGF2濃度の上限値は特にないが、培養コストの観点から、好ましくは1000 ng/ml以下

40

50

、より好ましくは300 ng/ml以下、更に好ましくは100 ng/ml以下である。一態様において、培地中のFGF2濃度は、好ましくは20~1000 ng/ml、好ましくは40~300 ng/ml、更に好ましくは50~100 ng/mlである。第1の線維芽細胞増殖因子の濃度を処理期間中変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

【0074】

好ましい態様において、浮遊培養開始時から第1の線維芽細胞増殖因子による処理開始前までは、細胞凝集塊を第1の線維芽細胞増殖因子により刺激しない。即ち、浮遊培養開始時から第1の線維芽細胞増殖因子による処理開始前までは、浮遊培養の培地は、好ましくは第1の線維芽細胞増殖因子を実質的に含まない。「第1の線維芽細胞増殖因子を実質的に含まない」とは、培地中の第1の線維芽細胞増殖因子濃度が、中脳後脳境界領域への分化促進濃度を下回ることを意味する。一態様において、浮遊培養開始時から第1の線維芽細胞増殖因子による処理開始前までの期間の培地中の第1の線維芽細胞増殖因子の濃度は、通常1ng/ml未満、好ましくは0.1ng/ml未満、より好ましくは0.01 ng/ml未満である。

【0075】

一態様において、工程(1)は、浮遊培養において、ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、更に第2の線維芽細胞増殖因子で処理することを含む。

【0076】

第2の線維芽細胞増殖因子は、工程(1)で得られる細胞凝集塊を用いて実施される工程(11)において形成される神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与える効果を有するFGFである。線維芽細胞増殖因子(FGF)としては、ヒト及びマウスにおいては、FGF1~FGF23が確認されている。第2の線維芽細胞増殖因子は、好ましくはFGF19、FGF17、又はFGF8であり、より好ましくはFGF19である。FGF19は、公知のサイトカインであり、そのアミノ酸配列も公知である。本発明に用いるFGF19は、通常哺乳動物のFGF19である。哺乳動物としては、上記のものを挙げることができる。本発明の目的を達成し得る限り、いずれの哺乳動物のFGF19を用いてもよいが、好適には、培養する細胞と同一種の哺乳動物のFGF19が用いられる。例えば、げっ歯類(マウス、ラット等)又は霊長類(ヒト等)のFGF19が用いられる。ヒトFGF19の代表的なアミノ酸配列としては、NCBIのアクセッション番号で、NP_005108.1(2014年4月27日更新)、このアミノ酸配列からN末端シグナル配列(1-22)を除いたアミノ酸配列(成熟型ヒトFGF19)等を例示することができる。

【0077】

細胞凝集塊を第2の線維芽細胞増殖因子で処理する時期及び期間は、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与える限り、特に制限はない。多能性幹細胞凝集塊の浮遊培養開始時を0日目(d0)としたときに、好ましくはd10~d14のいずれかの時点、より好ましくはd14に、第2の線維芽細胞増殖因子を培地中に添加し、第2の線維芽細胞増殖因子による細胞凝集塊の処理を開始する。第2の線維芽細胞増殖因子による処理期間は、通常2日間以上、好ましくは4日間以上である。第2の線維芽細胞増殖因子による処理期間の上限値は、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与える限り、特に制限はないが、中脳後脳境界領域以外の部位への分化の可能性を抑制する観点から、通常14日以内、好ましくは11日以内、より好ましくは7日以内である。第2の線維芽細胞増殖因子による処理期間経過後、第2の線維芽細胞増殖因子は培地から除去される。第2の線維芽細胞増殖因子処理時の培地中の第2の線維芽細胞増殖因子濃度は、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与える濃度である。第2の線維芽細胞増殖因子としてFGF19を用いる場合、培地中の濃度は、好ましくは30 ng/ml以上、より好ましくは40 ng/ml以上、更に好ましくは50 ng/ml以上である。中脳後脳境界領域への分化に悪影響がない限りFGF19濃度の上限値は特にないが、培養コストの観点から、好ましくは1000 ng/ml以下、より好ましくは500 ng/ml以下、更に好ましくは300 ng/ml以下である。一態様において、培地中のFGF2濃度は、好ましくは30~1000 ng/ml、好ましくは40~500 ng/ml、更に好ましくは50~300 ng/mlである。第2の線維芽細胞増殖因子の濃度を処理期間中変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

【0078】

好ましい態様において、浮遊培養開始時から第2の線維芽細胞増殖因子による処理開始前までは、細胞凝集塊を第2の線維芽細胞増殖因子により刺激しない。即ち、浮遊培養開始時から第2の線維芽細胞増殖因子による処理開始前までは、浮遊培養の培地は、好ましくは第2の線維芽細胞増殖因子を実質的に含まない。「第2の線維芽細胞増殖因子を実質的に含まない」とは、培地中の第2の線維芽細胞増殖因子濃度が、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与える濃度を下回ることを意味する。一態様において、浮遊培養開始時から第2の線維芽細胞増殖因子による処理開始前までの期間の培地中の第2の線維芽細胞増殖因子の濃度は、通常1ng/ml未満、好ましくは0.1ng/ml未満、より好ましくは0.01ng/ml未満、最も好ましくは0 ng/mlである。

【0079】

本発明において使用されるインスリン、第1の線維芽細胞増殖因子及び第2の線維芽細胞増殖因子は、好ましくは単離されている。「単離」とは、目的とする成分や細胞以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。従って、「単離されたタンパク質X」には、培養対象の細胞や組織から産生された内在性のタンパク質Xは含まれない。「単離されたタンパク質X」の純度（総タンパク質量に占めるタンパク質Xの重量の百分率）は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは99%以上、最も好ましくは100%である。浮遊培養に用いられる培地に含まれる単離されたインスリン、第1の線維芽細胞増殖因子及び第2の線維芽細胞増殖因子は、培地中へ外因的に添加されたものである。従って、一態様において、本発明は、単離されたインスリン/単離された第1の線維芽細胞増殖因子/単離された第2の線維芽細胞増殖因子をそれぞれ提供する工程を含む。また、一態様において、工程(1)の浮遊培養に用いる培地中へ、単離されたインスリン/単離された第1の線維芽細胞増殖因子/単離された第2の線維芽細胞増殖因子をそれぞれ外因的に添加する工程を含む。

【0080】

好ましいROCK阻害剤、TGF シグナル阻害剤及び第1の線維芽細胞増殖因子の組み合わせは、Y27632、SB431542及びFGF2である。

【0081】

好ましいROCK阻害剤、TGF シグナル阻害剤、第1の線維芽細胞増殖因子及び第2の線維芽細胞増殖因子の組み合わせは、Y27632、SB431542、FGF2及びFGF19である。

【0082】

一態様において、工程(1)の浮遊培養において、該多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、該浮遊培養開始時から、ROCK阻害剤で処理し、該浮遊培養開始時から、TGF シグナル阻害剤で処理し、且つ浮遊培養開始後2~4日目から、第1の線維芽細胞増殖因子で処理する。ROCK阻害剤処理の期間は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制するのに十分な期間（例、12時間（2日、4日、又は7日）~21日（又は14日））である。TGF シグナル阻害剤処理の期間は、中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は7日）~21日（又は14日））である。第1の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は5日）~19日（又は12日））である。

【0083】

一態様において、工程(1)の浮遊培養において、該多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、該浮遊培養開始時から、ROCK阻害剤で処理し、該浮遊培養開始時から、TGF シグナル阻害剤で処理し、浮遊培養開始後2~4日目から、第1の線維芽細胞増殖因子で処理し、且つ浮遊培養開始後10~14日目から第2の線維芽細胞増殖因子で処理する。ROCK阻害剤処理の期間は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制するのに十分な期間（例、12時間（2日、4日、又は7日）~21日（又は14日））である。TGF シグナル阻害剤処理の期間は、中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は7日）~21日（又は14日））である。第1の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は5日）~19日（又は12日））である。第2の線維芽細胞増

10

20

30

40

50

殖因子処理の期間は、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与えるのに十分な期間（例、2日（又は4日）～14日（11日又は7日））である。

【0084】

好ましい態様において、上記(2)の多能性幹細胞の凝集塊の形成に際して、本工程(1)において用いる培地を用いて多能性幹細胞凝集塊を形成させ、そのまま凝集塊の浮遊培養を継続することによって、工程(1)を実施する。即ち、分散された多能性幹細胞を、本工程(1)において用いる培地（インスリンを含む無血清培地）中に懸濁し、多能性幹細胞の懸濁液を、上記培養器中に播き、分散させた多能性幹細胞を、培養器に対して、非接着性の条件下で培養することにより、複数の多能性幹細胞を集合させて凝集塊を形成し、形成された多能性幹細胞凝集塊をそのまま継続して同培地中で浮遊培養する。分散された多能性幹細胞は、浮遊培養を開始すると短時間で凝集塊を形成するので、本態様においては、分散された多能性幹細胞の培養開始時を、工程(1)の浮遊培養開始時とみなすことが出来る。

10

【0085】

一態様において、インスリン、ROCK阻害剤及びTGFシグナル阻害剤を含む無血清培地中に分散された多能性幹細胞を、培養器中で浮遊培養に付すことにより、多能性幹細胞凝集塊を形成し、更に得られた多能性幹細胞凝集塊を同無血清培地中で継続して浮遊培養に付す。この浮遊培養において、多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を更に、第1の線維芽細胞増殖因子（及び任意的に第2の線維芽細胞増殖因子）で処理する。

20

【0086】

一態様において、インスリン、ROCK阻害剤及びTGFシグナル阻害剤を含む無血清培地中に分散された多能性幹細胞を浮遊培養に付すことにより、多能性幹細胞凝集塊を形成し、更に得られた多能性幹細胞凝集塊を同無血清培地中で継続して浮遊培養に付す。この浮遊培養において、多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来する細胞凝集塊を浮遊培養開始後2～4日目から、更に、第1の線維芽細胞増殖因子で処理する。ROCK阻害剤処理の期間は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制するのに十分な期間（例、12時間（2日、4日、又は7日）～21日（又は14日））である。TGFシグナル阻害剤処理の期間は、中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は7日）～21日（又は14日））である。第1の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は5日）～19日（又は12日））である。

30

【0087】

一態様において、インスリン、ROCK阻害剤及びTGFシグナル阻害剤を含む無血清培地中に分散された多能性幹細胞を浮遊培養に付すことにより、多能性幹細胞凝集塊を形成し、更に得られた多能性幹細胞凝集塊を同無血清培地中で継続して浮遊培養に付す。この浮遊培養において、多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来する細胞凝集塊を、浮遊培養開始後2～4日目から、第1の線維芽細胞増殖因子で処理し、且つ浮遊培養開始後10～14日目から第2の線維芽細胞増殖因子で処理する。ROCK阻害剤処理の期間は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制するのに十分な期間（例、12時間（2日、4日、又は7日）～21日（又は14日））である。TGFシグナル阻害剤処理の期間は、中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は7日）～21日（又は14日））である。第1の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は5日）～19日（又は12日））である。第2の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与えるのに十分な期間（例、2日（又は4日）～14日（11日又は7日））である。

40

【0088】

工程(1)の浮遊培養は、多能性幹細胞から中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が誘導されるのに十分な期間実施される。その結果、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を

50

含む細胞凝集塊を得る。中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化は、例えば、中脳後脳境界領域マーカー特異的プローブを用いたRT-PCRや、中脳後脳境界領域マーカー特異的抗体及び神経前駆組織特異的抗体を用いた免疫組織化学により検出することができる。例えば、工程(1)の浮遊培養は、細胞凝集塊に含まれる細胞のうち20%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上が、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞となるまで実施される。培養期間は、多能性幹細胞の動物種；ROCK阻害剤、TGFシグナル阻害剤及び第1の線維芽細胞増殖因子の種類や濃度に応じて変動し得るので、一概に特定することは出来ないが、例えば、ヒト多能性幹細胞を用いた場合、第1の培養工程は、通常14~30日(例、21日)である。

【0089】

中脳後脳境界領域マーカーとしては、En2(中脳マーカー)、Gbx2(後脳吻側マーカー)等を挙げることが出来る。神経前駆細胞マーカーとしては、N-cadherinを挙げることが出来る。従って、一態様において、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞は、En2又はGbx2陽性、且つN-cadherin陽性の細胞として特定される。

【0090】

工程(1)は、細胞凝集塊中に中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が誘導されたことを確認する工程を含んでいてもよい。該確認工程は、一部の細胞凝集塊を分離し、中脳後脳境界領域マーカー特異的プローブを用いたRT-PCRや、中脳後脳境界領域マーカー特異的抗体及び神経前駆組織特異的抗体を用いた免疫組織化学解析に付すことにより実施することが出来る。

【0091】

一態様において、工程(1)の浮遊培養には、ソニックヘッジホッグ阻害剤が添加されず、工程(1)の浮遊培養は、その全期間を通じて、ソニックヘッジホッグ阻害剤を含まない。即ち、多能性幹細胞凝集塊又はこれに由来する凝集塊がソニックヘッジホッグ阻害剤により処理されない。Muguruma, K. et al., Nature Neurosci. 13, 1171-1180, 2010の方法では、マウスES細胞からの小脳分化にソニックヘッジホッグ阻害剤を要するが、本発明の方法においては、ソニックヘッジホッグ阻害剤を添加しなくても、多能性幹細胞(特にヒト多能性幹細胞)から中脳後脳境界領域の神経前駆組織への効果的な分化が可能である。むしろ、ソニックヘッジホッグ阻害剤の添加は、中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化に抑制的である。ソニックヘッジホッグ阻害剤としては、シクロパミン、ジェルピン、GANT61、SANT-2、トマチジン、ゼルンボン、GDC-0449、XL139、IPI926、IPI609、LDE225、トリパラノール、AY9944等の低分子化合物を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0092】

一態様において、工程(1)の浮遊培養には、BMP4が添加されず、工程(1)の浮遊培養は、その全期間を通じて、BMP4を実質的に含まない。即ち、多能性幹細胞凝集塊又はこれに由来する凝集塊がBMP4により処理されない。Muguruma, K. et al., Nature Neurosci. 13, 1171-1180, 2010の方法では、マウスES細胞からの小脳分化にBMP4を要するが、本発明の方法においては、BMP4を添加しなくても、多能性幹細胞(特にヒト多能性幹細胞)から中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化が可能である。「BMP4を実質的に含まない」とは、培地中のBMP4濃度が、生理活性発現量を下回ることを意味する。具体的には、培地中のBMP4濃度は、通常0.1ng/ml未満、好ましくは0.01ng/ml未満、より好ましくは0.001ng/ml未満、最も好ましくは0ng/mlである。

【0093】

好ましい態様において、工程(1)の浮遊培養には、ソニックヘッジホッグ阻害剤及びBMP4が添加されず、工程(1)の浮遊培養は、その全期間を通じて、ソニックヘッジホッグ阻害剤を含まず、BMP4を実質的に含まない。即ち、多能性幹細胞凝集塊又はこれに由来する凝集塊がソニックヘッジホッグ阻害剤及びBMP4により処理されない。

【0094】

(3.2)工程(II)

10

20

30

40

50

工程(11)においては、工程(1)で得られた中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊を、更に無血清培地中で浮遊培養に付すことにより、該神経前駆組織内の神経前駆細胞による神経上皮構造の形成を誘導し、小脳板組織を含むヒト細胞凝集塊を得る。

【0095】

工程(11)に用いられる培地は、工程(1)と同様に、哺乳動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、工程(1)について記載された基礎培地を挙げることができる。好ましい態様において、工程(11)に用いられる培地は、ヒト神経細胞の培養に用いられている培地を基礎培地として調製される。そのような基礎培地としては、Neurobasal培地を挙げることが出来る。

10

【0096】

工程(11)に用いられる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、無血清培地である。

【0097】

工程(11)に用いられる培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'-チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものであり得る。かかる血清代替物としては、N2、B27、KSR等を挙げることができる。N2は、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、プトレスシン及び亜セレン酸ナトリウムを含む、公知の血清代替用組成物である。B27の組成は、J. Neurosci. Res., vol. 35, p. 567-576, 1993, Brain Res., vol. 494, p. 65-74, 1989等に記載されている。N2、B27は、Life Technologies等から購入可能である。培地中に添加される血清代替物の量は、小脳板組織への分化誘導を達成し得る限り特に限定されないが、例えば、Life Technologies社製のN2サプリメントであれば、それぞれ、培地全体の容量の1/500~1/10容量が添加される。好適な態様において、工程(11)に用いられる培地は、N2を含む。血清代替物は、含有成分が化学的に決定されたものが好ましい。また、血清代替物は、培養する細胞の動物種とは異なる動物から単離された成分(異種動物由来成分)(例えば、ヒト細胞を培養する場合、非ヒト動物から単離された成分)を含有しないものが好ましい。化学的に未決定な血清代替物や異種動物由来成分を含む血清代替物(例、KSR(Knockout serum replacement))は、好ましくは使用しない。

20

30

【0098】

工程(11)に用いられる培地は、小脳板組織の分化誘導に、悪影響を与えない範囲で、他の添加物を含むことができる。添加物としては、例えば、インスリン、鉄源(例えばトランスフェリン等)、ミネラル(例えばセレン酸ナトリウム等)、糖類(例えばグルコース等)、有機酸(例えばピルビン酸、乳酸等)、血清蛋白質(例えばアルブミン等)、アミノ酸(例えばL-グルタミン等)、還元剤(例えば2-メルカプトエタノール等)、ビタミン類(例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等)、抗生物質(例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、緩衝剤(例えばHEPES等)等が挙げられるが、これらに限定されない。尚、L-グルタミンを含む培地中での長期培養は、アンモニア毒性を生じるおそれがあるので、L-グルタミンに代えて、L-アラニル-L-グルタミン ジペプチドを用いてもよい。好ましい態様において、工程(11)に用いられる培地は、L-アラニル-L-グルタミン ジペプチドを含む。L-アラニル-L-グルタミン ジペプチドは、例えばGlutamax(Life Technologies社製)等として市販されている。

40

【0099】

工程(11)に用いられる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、含有成分が化学的に決定された培地である。

【0100】

工程(11)に用いられる培地は、好ましくは異種動物由来成分を含有しない。

【0101】

工程(11)における培養温度、CO₂濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度

50

は、例えば約30～40、好ましくは約37である。CO₂濃度は、例えば約1～10%、好ましくは約5%である。

【0102】

工程(II)の浮遊培養においては、中脳後脳境界領域の神経前駆組織から小脳板組織への分化誘導が可能な限り、フィーダー細胞の存在下/非存在下いずれの条件で細胞凝集塊の浮遊培養を行ってもよいが、未決定因子の混入を回避する観点から、フィーダー細胞非存在条件下で細胞凝集塊の浮遊培養を行うのが好ましい。

【0103】

細胞凝集塊の浮遊培養に用いることのできる容器としては、上記(2)の多能性幹細胞の凝集塊の形成に用いることができる容器として列挙したものを挙げることが出来る。一態様において、ペトリディッシュのような平面の底面を有する容器を用いる。

10

【0104】

工程(II)における浮遊培養は、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞による神経上皮構造の形成が誘導されるのに十分な期間実施される。工程(II)を実施することにより、細胞凝集体内に、GABA作動性神経前駆細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞を含む神経上皮構造、即ち、小脳板組織が形成される。当該神経上皮構造は、上皮管腔組織であり得る。GABA作動性神経前駆細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞を含む神経上皮構造の形成は、例えば、GABA作動性神経前駆細胞マーカー(例、Kirrel2、Ptf1a、Sox2)に対する特異的抗体、及び小脳顆粒細胞前駆細胞マーカー(例、Atoh1、Barhl1)に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学により、GABA作動性神経前駆細胞マーカー陽性細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞マーカー陽性細胞を含む神経上皮構造(即ち、GABA作動性神経前駆細胞マーカー陽性且つ小脳顆粒細胞前駆細胞マーカー陽性の神経上皮構造)の形成を検出することにより、確認することができる。例えば、培養中の細胞凝集塊に含まれる神経上皮構造(例、N-cadherin陽性神経上皮構造)のうち30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上がGABA作動性神経前駆細胞マーカー陽性且つ小脳顆粒細胞前駆細胞マーカー陽性となるまで、工程(II)の浮遊培養が実施される。培養期間は、多能性幹細胞の動物種;培地組成等の培養条件に応じて変動し得るので、一概に特定することは出来ないが、例えば、ヒト多能性幹細胞を用いた場合、工程(II)の浮遊培養開始から3日程度で、神経上皮構造の形成が始まるので、浮遊培養の培養期間は3日以上である。GABA作動性神経前駆細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞を含む神経上皮構造が維持される限り、工程(II)の培養期間に上限はないが、培養期間が長すぎると、細胞凝集塊のフラジャリティが上昇し、細胞凝集塊が崩れてしまうおそれがあるので、培養期間は、通常40日以内、好ましくは32日以内である。

20

30

【0105】

一態様において、当該神経上皮構造は頂端 基底極性を有する。頂端 基底極性は、頂端側マーカー(例、PKC)や、基底側マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学解析により確認することが出来る。神経上皮構造が上皮管腔組織である場合、頂端側が管腔に面する(apical side in)。

【0106】

ここで、上記工程(I)が、ヒト多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、更に第2の線維芽細胞増殖因子で処理することを含む場合、工程(II)において得られる細胞凝集塊中の小脳板組織(神経上皮構造)は、背腹軸極性を獲得する。より具体的には、各神経上皮構造において、小脳神経前駆細胞マーカー(例、Kirrel2、Ptf1a、Atoh1、SKOR2)(これは、胚発生においては、神経管の背側に発現する)陽性細胞が、細胞凝集塊を基準として外周側に局在し、神経上皮構造内の管腔をはさんで対極の領域に、腹側マーカー(例、Nkx6.1、Foxa2)陽性細胞が局在する。即ち、胚発生における神経管の背腹軸に沿った極性を持った構造を、インビトロにおいて細胞凝集塊内に再現することができる。

40

【0107】

また、工程(I)で第2の線維芽細胞増殖因子による処理を行わない場合には、大多数の細胞凝集塊は、小さな口ゼット状の神経上皮構造を有するが、第2の線維芽細胞増殖因子

50

による処理を行うことにより、神経上皮構造の形成が促進され、より大きな平楕円状の神経上皮構造を含む細胞凝集塊が大多数（例、70%以上）となる。

【0108】

一態様において、工程（II）は、浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、GDF7により処理することを含む。GDF7で処理することにより、小脳顆粒細胞前駆細胞（例、Atoh陽性細胞）への分化が促進され、菱脳唇の形成が促進される。

【0109】

GDF7は、公知のサイトカインであり、そのアミノ酸配列も公知である。本発明に用いるGDF7は、通常哺乳動物のGDF7である。哺乳動物としては、上記のものを挙げることができる。本発明の目的を達成し得る限り、いずれの哺乳動物のGDF7を用いてもよいが、好適には、培養する細胞と同一種の哺乳動物のGDF7が用いられる。例えば、げっ歯類（マウス、ラット等）又は霊長類（ヒト等）のGDF7が用いられる。ヒトGDF7の代表的なアミノ酸配列としては、NCBIのアクセッション番号で、NP_878248.2（2014年1月26日更新）、このアミノ酸配列の第322番から第450番アミノ酸までの部分配列（成熟型ヒトGDF7）等を例示することができる。

10

【0110】

細胞凝集塊をGDF7で処理する時期及び期間は、小脳顆粒細胞前駆細胞への分化を促進する限り、特に制限はない。小脳顆粒細胞前駆細胞への分化を効果的に促進するため、工程（II）における細胞凝集塊の浮遊培養開始から好ましくは2日以内に、より好ましくは浮遊培養開始から1日以内に、更に好ましくは浮遊培養開始時からGDF7を培地中に添加し、細胞凝集塊をGDF7で処理する。GDF7による処理期間は、通常2日以上、好ましくは7日以上である。GDF7による処理期間の上限値は、細胞凝集塊における小脳板組織への分化が可能である限り、特に制限はないが、該分化への不測の悪影響を回避する観点から、通常21日以内、好ましくは、14日以内である。GDF7による処理期間経過後、GDF7は培地から除去される。GDF7処理時の培地中のGDF7濃度は、小脳顆粒細胞前駆細胞への分化を促進する濃度である。例えば、このような濃度は、通常約10 ng/ml以上、好ましくは50 ng/ml以上、より好ましくは100 ng/ml以上である。GDF7濃度の上限値は、小脳顆粒細胞前駆細胞への分化に悪影響を及ぼさない限り特に限定されないが、培養コストの観点から、通常、1000 ng/ml以下、好ましくは500 ng/ml以下、より好ましくは300 ng/ml以下である。GDF7濃度を処理期間中変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

20

30

【0111】

一態様において、工程（II）は、浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含むヒト細胞凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、SDF1により処理することを含む。SDF1で処理することにより、小脳板組織内における神経上皮構造の形成が促進される。特に連続した小脳板神経上皮の形成に効果的である。また、その神経上皮構造と連続して菱脳唇が形成され得る。

【0112】

SDF1は、CXCL12とも称される公知のケモカインであり、そのアミノ酸配列も公知である。本発明に用いるSDF1は、通常哺乳動物のSDF1である。哺乳動物としては、上記のものを挙げることができる。本発明の目的を達成し得る限り、いずれの哺乳動物のSDF1を用いてもよいが、好適には、培養する細胞と同一種の哺乳動物のSDF1が用いられる。例えば、げっ歯類（マウス、ラット等）又は霊長類（ヒト等）のSDF1が用いられる。ヒトSDF1の代表的なアミノ酸配列としては、NCBIのアクセッション番号で、NP_001171605.1（2014年5月25日更新）、このアミノ酸配列からN末端シグナル配列（1-22）を除いたアミノ酸配列（成熟型ヒトSDF1）等を例示することができる。

40

【0113】

細胞凝集塊をSDF1で処理する時期及び期間は、小脳板組織内における神経上皮構造の形成を促進する限り、特に制限はない。SDF1は小脳内の細胞の位置取りに関与する因子であるので、細胞凝集塊内にGABA作動性神経前駆細胞及び小脳顆粒細胞前駆細胞を含む神経上

50

皮構造（小脳板組織）が一定程度形成された段階で、細胞凝集塊をSDF1で処理することが好ましい。この観点から、工程（II）における細胞凝集塊の浮遊培養開始から好ましくは4日目～10日目のいずれかの時点、より好ましくは6日目～8日目のいずれかの時点で、SDF1を培地中に添加し、細胞凝集塊をSDF1で処理する。SDF1による処理期間は、通常2日以上、好ましくは7日以上である。SDF1による処理期間の上限値は、細胞凝集塊における小脳板組織への分化が可能である限り、特に制限はないが、該分化への不測の悪影響を回避する観点から、通常21日以内、好ましくは、14日以内である。SDF1による処理期間経過後、SDF1は培地から除去される。SDF1処理時の培地中のSDF1濃度は、神経上皮構造の形成を促進する濃度である。例えば、このような濃度は、通常50 ng/ml以上、好ましくは100 ng/ml以上である。SDF1濃度の上限値は、神経上皮構造の形成を促進する限り特に限定されないが、培養コストの観点から、通常、1000 ng/ml以下、好ましくは500 ng/ml以下である。SDF1濃度を処理期間中変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

10

【0114】

好ましい態様において、工程（II）における浮遊培養開始からSDF1処理開始前までは、細胞凝集塊をSDF1により刺激しない。即ち、工程（II）における浮遊培養開始時からSDF1処理開始前までは、浮遊培養の培地は、好ましくはSDF1を実質的に含まない。「SDF1を実質的に含まない」とは、培地中のSDF1濃度が、神経上皮構造の形成促進濃度を下回ることを意味する。一態様において、工程（II）における浮遊培養開始時からSDF1処理開始前までの期間の培地中のSDF1濃度は、通常1ng/ml未満、好ましくは0.1ng/ml未満、より好ましくは0.01 ng/ml未満である。

20

【0115】

一態様において、工程（I）の浮遊培養において、多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来する細胞凝集塊を、第2の線維芽細胞増殖因子（例、FGF19）で処理し、更に工程（II）の浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆組織を含む細胞凝集塊又はこれに由来する細胞凝集塊をSDF1により処理する。上述したように、工程（I）における第2の線維芽細胞増殖因子（例、FGF19）での処理により、工程（II）において得られる細胞凝集塊中の小脳板組織（神経上皮構造）は、背腹軸極性を獲得する。具体的には、各神経上皮構造において、小脳神経前駆細胞マーカー陽性細胞が、細胞凝集塊を基準として外周側に局在し、神経上皮構造内の管腔をはさんで対極の領域に、腹側マーカー陽性細胞が局在する。このような背腹軸極性を有する小脳板組織（神経上皮構造）を含む細胞凝集塊をSDF1で更に処理することにより、連続した小脳板神経上皮の形成が促進され、細胞凝集塊の表層域に連続的な小脳神経上皮構造（例、Kirrel2陽性神経上皮構造）が形成される。この神経上皮構造は、頂端側（例、Sox2+ VZ細胞、PKC 陽性細胞）が外側（細胞凝集塊の表面）に位置し、基底側（例、Skor2+プルキンエ前駆細胞）が深部に位置するという極性を有する。また、SDF1処理は、胚における初期小脳発生において見られるような、小脳神経上皮構造の、頂端 基底軸に沿った三層への層化（lamination）を促進し、頂端側から基底側へ向かって、脳室帯（例、aPKC+、Sox2+、Ptf1a+、Kirrel2+）、プルキンエ細胞前駆体帯（例、Skor2+、Olig2+、GAD+、Lhx5+）及び菱脳唇由来神経細胞帯（例、Atoh1+、Barhl1+）からなる三層構造を生じさせる。更に、連続した小脳神経上皮構造の端に菱脳唇様組織の形成を生じる。この菱脳唇様組織は、巻いた構造を呈し、Atoh1+細胞及びBarhl1+細胞を含む。このように、工程（I）における第2の線維芽細胞増殖因子（例、FGF19）での処理と、工程（II）におけるSDF1による処理とを組み合わせることにより、より高次の構造を有する小脳前駆組織を形成することができる。

30

40

【0116】

一態様において、工程（I）の浮遊培養において、該多能性幹細胞の凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、該浮遊培養開始時から、ROCK阻害剤で処理し、該浮遊培養開始時から、TGF シグナル阻害剤で処理し、浮遊培養開始後2～4日目から、第1の線維芽細胞増殖因子で処理し、且つ浮遊培養開始後10～14日目から第2の線維芽細胞増殖因子で処理し、更に工程（II）の浮遊培養において、中脳後脳境界領域の神経前駆細胞を含むヒト

50

細胞凝集塊又はこれに由来するヒト細胞凝集塊を、該浮遊培養開始後4日目～10日目からSDF1で処理する。ROCK阻害剤処理の期間は、分散により誘導される多能性幹細胞の細胞死を抑制するのに十分な期間（例、12時間（2日、4日、又は7日）～21日（又は14日））である。TGFシグナル阻害剤処理の期間は、中胚葉分化を抑制し、神経外胚葉への分化を促進するのに十分な期間（例、2日（又は7日）～21日（又は14日））である。第1の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、多能性幹細胞の中脳後脳境界領域の神経前駆組織への分化を促進するのに十分な期間（例、2（又は5日）～19日（又は12日））である。第2の線維芽細胞増殖因子処理の期間は、神経上皮構造に、神経管の背腹軸に沿った極性を与えるのに十分な期間（例、2（又は4日）～14日（11日又は7日））である。SDF1処理の期間は、小脳板組織内における神経上皮構造の形成を促進するのに十分な期間（例、2（又は7日）～21日（又は14日））である。

10

【0117】

本発明において使用されるGDF7及びSDF1は、好ましくは単離されている。浮遊培養に用いられる培地に含まれる単離されたGDF7及びSDF1は、培地中へ外因的に添加されたものである。従って、一態様において、本発明は、単離されたGDF7/単離されたSDF1をそれぞれ提供する工程を含む。また、一態様において、本発明は、工程(11)の浮遊培養に用いる培地中へ、単離されたGDF7/単離されたSDF1をそれぞれ外因的に添加する工程を含む。

【0118】

(4) プルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞の誘導

上記本発明の製造方法により得られる小脳板組織を含む細胞凝集塊には、GABA作動性神経前駆細胞が含まれているので、これを更に分化条件下で培養することにより、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞を製造することが出来る。具体的には、まず、上記本発明の製造方法により得られた小脳板組織を含む細胞凝集塊から、GABA作動性神経前駆細胞を得て、このGABA作動性神経前駆細胞を、哺乳動物小脳顆粒細胞前駆細胞と共培養し、該GABA作動性神経前駆細胞からプルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞への分化を誘導する。

20

【0119】

GABA作動性神経前駆細胞は、GABA作動性神経前駆細胞を含む多能性幹細胞由来細胞集団として提供してもよいが、好ましくは、単離されたGABA作動性神経前駆細胞として提供される。GABA作動性神経前駆細胞の単離は、GABA作動性神経前駆細胞に特異的なマーカーに対する抗体を用いて、FACSにより実施することが出来る。GABA作動性神経前駆細胞特異的なマーカーとしては、Kirrel2等を挙げる事が出来る。

30

【0120】

小脳顆粒細胞前駆細胞は、菱脳唇中に豊富に含まれているので、非ヒト哺乳動物（例、マウス）胎仔の菱脳唇を単離し、これを適切な細胞分散用液（例、トリプシン-EDTA、TrypLE等）で分散することにより得られる菱脳唇由来細胞を、小脳顆粒細胞前駆細胞として用いることが出来る。

【0121】

GABA作動性神経前駆細胞と小脳顆粒細胞前駆細胞の共培養は、GABA作動性神経前駆細胞と小脳顆粒細胞前駆細胞とを適切な割合（例、GABA作動性神経前駆細胞：小脳顆粒細胞前駆細胞=1:5～1:20）で混合し、これをラミニン等の細胞外マトリクスでコートした培養器上で培養する。培養に用いる培地としては、小脳神経細胞の培養に用いられている種々の培地を用いることができる。該培地には、N2及びTri-iodothyronineを添加することが好ましい。また培地には、Cytosine beta-D-arabinofuranoside (Ara-C)を添加してもよい（Tabata, T. et al., J. Neurosci. Method. 104, 45-53）。例えば、N2及びTri-iodothyronineを添加したDMEM/Ham F-12等を使用することが出来る。

40

【0122】

培養期間は、GABA作動性神経前駆細胞からプルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞への分化に十分な期間であれば特に限定されないが、通常15日以上である。

【0123】

50

プルキンエ細胞又は介在神経細胞への分化へは、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞に特異的なマーカーの発現、細胞の形状、電気生理学的性質等を評価することにより確認することが出来る。本発明の方法は、このような確認工程を含んでいても良い。プルキンエ細胞特異的なマーカーとしてはL7/pcp2、Calbindin等を挙げることが出来る。ゴルジ細胞のマーカーとしては、Neurogranin等を挙げることが出来る。介在神経細胞のマーカーとしてはParvalbumin等を挙げることが出来る。

【0124】

プルキンエ細胞への分化の過程では、軸索及び樹状突起を有するプルキンエ細胞特異的なマーカー（L7/pcp2、Calbindin）陽性細胞がまず生じる。この細胞を更に培養することにより成熟化が進み、樹状突起棘が形成され、GluRdelta2が発現し、成熟プルキンエ細胞へと至る。成熟プルキンエ細胞は、(1)自発的な活動電位の繰り返し発火、(2)過分極で活性化されるカチオンチャンネル電流（I_h電流）、及び(3) NMDA受容体を介さず、AMPA受容体に依存するグルタミン酸受容、という特徴的な電気生理学的特徴を有する。

10

【0125】

そして、共培養物からプルキンエ細胞、ゴルジ細胞又は介在神経細胞を単離することにより、プルキンエ細胞又は介在神経細胞を得ることが出来る。単離は、それぞれの細胞に特異的なマーカーに対する抗体を用いたFACSやパニング等により実施することができる。

【0126】

GABA作動性神経前駆細胞と小脳顆粒細胞前駆細胞との共培養については、Muguruma, K. et al., Nature Neurosci. 13, 1171-1180, 2010を参照のこと。

20

【0127】

(5)小脳顆粒細胞の誘導

上記本発明の製造方法により得られた小脳板組織を含む細胞凝集塊には、小脳顆粒細胞前駆細胞が含まれているので、これを更に分化条件下で培養することにより、小脳顆粒細胞を製造することが出来る。具体的には、まず、上記本発明の製造方法により得られた小脳板組織を含む細胞凝集塊から、小脳顆粒細胞前駆細胞を得て、この小脳顆粒細胞前駆細胞を、哺乳動物小脳細胞と共培養し、該小脳顆粒細胞前駆細胞から小脳顆粒細胞への分化を誘導する。

【0128】

小脳顆粒細胞前駆細胞は、小脳顆粒細胞前駆細胞を含む多能性幹細胞由来細胞集団として提供してもよく、単離された小脳顆粒細胞前駆細胞として提供してもよい。小脳顆粒細胞前駆細胞の単離は、小脳顆粒細胞前駆細胞に特異的なマーカーに対する抗体を用いて、FACS、パニング、磁性ビーズ等により実施することが出来る。小脳顆粒細胞前駆細胞特異的なマーカーとしては、Atoh1、Barhl1、Pax6等を挙げることが出来る。

30

【0129】

小脳細胞は、非ヒト哺乳動物（例、マウス）の小脳を単離し、これを適切な細胞分散液（例、トリプシン-EDTA、TrypLE等）で分散することにより得ることが出来る。好適には、非ヒト哺乳動物の新生児（例、生後2日以内）の小脳が用いられる。

【0130】

小脳顆粒細胞前駆細胞と小脳細胞の共培養は、小脳顆粒細胞前駆細胞と小脳細胞とを適切な割合（例、小脳顆粒細胞前駆細胞：小脳細胞 = 1：5～1：40）で混合し、これをラミニン等の細胞外マトリクスでコートした培養器上で培養することにより実施することが出来る。培養に用いる培地としては、小脳神経細胞の培養に用いられている種々の培地を用いることができる。該培地には、N2を添加することが好ましい。例えば、N2及び血清を添加したDMEM/Ham F-12等を使用することが出来る。

40

【0131】

培養期間は、小脳顆粒細胞前駆細胞から小脳顆粒細胞への分化に十分な期間であれば特に限定されないが、通常3～10日（好ましくは、5～8日）程度である。

【0132】

小脳顆粒細胞への分化へは、小脳顆粒細胞に特異的なマーカーの発現、細胞の形状等を

50

評価することにより確認することが出来る。本発明の方法は、このような確認工程を含んでいても良い。小脳顆粒細胞特異的なマーカーとしてはBarhl1, Pax6, MAP2等を挙げる事が出来る。

【0133】

分化した小脳顆粒細胞は、神経突起に沿って移動し、その後細胞の移動方向がそれまでの接線方向に対して垂直方向に変化する、という特徴的な移動パターンを示すので、そのような移動パターンの軸索を有する細胞を、小脳顆粒細胞として特定することが出来る。

【0134】

そして、共培養物から小脳顆粒細胞を単離することにより、小脳顆粒細胞を得ることが出来る。単離は、小脳顆粒細胞に特異的なマーカーに対する抗体を用いたFACSやパニング等により実施することができる。

10

【0135】

(6)細胞凝集塊、単離された小脳前駆組織、小脳前駆組織構成細胞、小脳構成細胞、及びその用途

更なる局面において、上記本発明の製造方法により得られた細胞凝集塊から、小脳前駆組織(小脳板組織等)を単離することができる。また、小脳前駆組織を、適切な細胞分散液で分散することにより、小脳前駆組織を構成する各種の細胞を単離することができる。本発明は上記本発明の製造方法により得られる細胞凝集塊、小脳前駆組織、及び小脳前駆組織構成細胞を提供する。また、本発明は、上記(4)及び(5)に記載された方法により得られる、小脳構成細胞(プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、介在神経細胞、顆粒細胞、深部小脳核)を提供する。

20

【0136】

本発明により得られた細胞凝集塊、小脳前駆組織、小脳前駆組織構成細胞、及び小脳構成細胞は、移植医療のために使用することができる。例えば、小脳の障害に基づく疾患の治療薬として、或いは小脳の損傷状態において、該当する損傷部分を補充するために、本発明の方法により得られた細胞凝集塊、小脳前駆組織、小脳前駆組織構成細胞、又は小脳構成細胞を用いることができる。小脳の障害に基づく疾患、又は小脳の損傷状態の患者に、本発明により得られた細胞凝集塊、小脳前駆組織、小脳前駆組織構成細胞、又は小脳構成細胞を移植することにより、小脳の障害に基づく疾患、又は小脳の損傷状態を治療することができる。小脳の障害に基づく疾患としては、症候性皮質小脳変性症、オリブ橋小脳萎縮症、Shy-Drager症候群、脊髄小脳変性症(SCA)(例、遺伝性脊髄小脳変性症、孤発性脊髄小脳変性症(例、多系統萎縮症(MSA)、皮質性小脳萎縮症(CCA)))、Dandy-Walker症候群などが挙げられる。また小児でよく見られる髄芽腫は小脳虫部がその好発部位であり、そのような小脳における髄芽腫も小脳の障害に基づく疾患に包含される。さらに、これら小脳の損傷状態としては、小脳摘出後の患者、小脳内腫瘍への放射線照射後の患者、外傷が挙げられる。

30

【0137】

移植医療においては、組織適合性抗原の違いによる拒絶がしばしば問題となるが、移植のレシピエントの体細胞から樹立した多能性幹細胞(例、誘導多能性幹細胞)を用いることで当該問題を克服できる。即ち、好ましい態様において、本発明の方法において、多能性幹細胞として、レシピエントの体細胞から樹立した多能性幹細胞(例、誘導多能性幹細胞)を用いることにより、当該レシピエントについて免疫学的自己の細胞凝集塊、小脳前駆組織、小脳前駆組織構成細胞、又は小脳構成細胞を製造し、これが当該レシピエントに移植される。

40

【0138】

さらに、本発明により得られた細胞凝集塊、小脳前駆組織、小脳前駆組織構成細胞、又は小脳構成細胞を、小脳の障害に基づく疾患や、小脳の損傷状態の治療用の薬物のスクリーニングや評価のために使用することができる。特に、本発明により得られる小脳前駆組織は、生体における小脳前駆組織と類似した高次構造を有するので、小脳の障害に基づく疾患や、小脳の損傷状態の治療薬のスクリーニング、医薬品の副作用・毒性試験、小脳に

50

おける疾患の新たな治療方法の開発などに適用することができる。例えば、上述の小脳の障害に基づく疾患、特に遺伝性の障害に基づく疾患のヒト患者から、iPS細胞を作成し、このiPS細胞を用いて本発明の方法により、小脳前駆組織を含む細胞凝集塊を製造する。得られた細胞凝集塊に含まれる小脳前駆組織は、その患者が患っている疾患の原因となる小脳の障害をインビトロで再現し得る。該障害を有する小脳前駆組織を含む細胞凝集塊、或いはこれから単離された障害を有する小脳前駆組織を、被検物質の存在下又は非存在下（ネガティブコントロール）で培養する。そして、被検物質で処理した細胞凝集塊、或いは小脳前駆組織における障害の程度を、ネガティブコントロールと比較する。その結果、その障害の程度を軽減した被検物質を、当該障害に基づく疾患の治療薬の候補物質として、選択することができる。また、被検物質として医薬品としての安全性が確認されている物質を用いることにより、選択された物質の治療的有効量を、スクリーニングに用いた細胞凝集塊、或いは小脳前駆組織が由来する患者に投与することにより、当該患者における小脳の障害に基づく疾患を治療し得る。更には、該障害を有する小脳前駆組織を含む細胞凝集塊、或いはこれから単離された障害を有する小脳前駆組織を用いて、該障害に基づく疾患に対する医薬品の副作用・毒性試験、新たな治療方法の開発を実施することができる。

10

【0139】

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0140】

20

[実施例1] ヒト多能性幹細胞からの中脳後脳境界領域の神経前駆組織の形成
(方法)

ヒトES細胞 (KhES-1)を常法によりMEF上で維持培養したものをを用いた。無血清浮遊凝集塊培養法 (SFEBq法)によりヒトES細胞を分化させるために、Nakanoら(Cell Stem Cell, 10(6), 771-785, 2012)の方法に準じて、ヒトES細胞を酵素により単一細胞へ分散させた上、低細胞接着性のV底96穴プレート(住友ベークライト)を用いて再凝集させた。1穴につき、6,000個の細胞を播種し、分化培地としてCDM培地[成長因子を含まない化学合成培地(growth-factor-free Chemically Defined Medium; gfCDM; Wataya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 11796-11801, 2008)にインスリン7 μ g/mlとapo-transferrin 15 μ g/mlを加えたもの]を用いて、5% CO₂下に37 $^{\circ}$ Cで培養した。

30

播種日を分化培養0日として、0日目から7日目まで10 μ M Y-27632 (ROCK阻害剤; 分散時の細胞死抑制剤: Watanabeら、Nature Neuroscience, 8, 288-296, 2007)および10 μ M SB431542 (TGF-beta阻害剤)を添加した。培養2日目から7日目までは、最終濃度50 ng/mlのFGF2を培地に添加した。7日目には、Y-27632、SB431542およびFgf2を含まない分化培地で1/3量の培地交換を行った。培養14日目には、Y-27632、SB431542およびFGF2を含まない分化培地に完全置換した。細胞凝集塊は固定後に薄切し、蛍光抗体法および定量的核酸増幅法で組織分化についての解析を行った。

【0141】

(結果)

分化培養開始14日目には細胞凝集塊の9割以上の細胞がN-cadherin陽性の神経前駆細胞へと分化した。後脳吻側領域のマーカーGbx2の発現が14日目には認められ、21日目には8割以上のN-cadherin陽性細胞においてGbx2陽性であった。このとき、中脳より吻側領域のマーカーであるOtx2の発現は殆ど認められなかった(図1)。また、神経管吻尾軸に沿った領域特異的遺伝子のうち、中脳後脳境界領域のマーカーであるEn2、Gbx2の発現がFGF2の添加によって著明に増加した(図2)。FGF2によるEn2及びGbx2の発現上昇は、培養開始14日目、21日目にも見られた。FGF2は前脳マーカーであるSix3及びOtx2の発現を抑制したが(図2)、胚の中脳後脳境界領域における峡部オーガナイザー形成の機能に関与すると考えられているFgf8及びWnt1の発現を増強した(10日目及び14日目)。これらの結果は、本方法においてFGF2が中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への自己組織化を促した事を示すものである。

40

50

【0142】

尚、上記方法において、Y-27632を添加しないと、ヒトES細胞が塊を形成しなかったことから、ROCK阻害剤は、分散時の細胞死抑制と共に、多能性幹細胞の細胞塊形成及び増殖をサポートする効果を有することが示唆された。

【0143】

SB431542は、10-30 μM の濃度範囲において、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への分化を誘導した。3 μM の濃度でも当該神経前駆細胞への分化誘導が観察された。

【0144】

FGF2は、20 ng/ml及び100 ng/mlの濃度においても、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への分化を促進した。ES細胞の維持培養に用いる濃度(5~10 ng/ml)のFGF2では、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への分化促進は認められなかった。FGF2を0、または1日目から培地に添加しても、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への顕著な分化促進は認められなかった。2-14日目、3-7日目、4-7日目のそれぞれの期間FGF2を添加することによっても、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への分化促進効果が認められたが、2-7日目の期間にFGF2を添加した時が、効果が最も高かった。FGF2に代えて、FGF8bを用いた場合も、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞への分化が促進されたが、FGF2よりは効果が弱かった。

【0145】

7日目に培地交換を行わなかった場合でも、14日目まで細胞凝集塊の培養を維持し、中脳後脳境界領域にある神経前駆細胞へ分化させることはできたが、細胞塊のフラジャリティが上昇し、壊れやすくなった。

【0146】

[実施例2] ヒト多能性幹細胞からの連続上皮構造を持つ小脳板組織の自己形成(方法)

実施例1の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養した。21日目以降は、低細胞接着性の10cmディッシュにサンプルを移し、神経培養用培地(Neurobasal/GlutaMax1/N2, いずれもLife Technologies社)を用いて、培養を行った。培養28日目に同神経培養培地で全量培地交換を行い、培養35日目に組織の分化を蛍光抗体法で解析した。

【0147】

(結果)

ひとつの凝集塊内にN-カドヘリン陽性の神経上皮構造が複数形成され、7割以上の神経上皮細胞は小脳のGABA作動性神経前駆細胞に特異的なKirrel2陽性であった(図3左、中央)。Kirrel2を発現する神経上皮構造の8割以上で、同じくGABA作動性神経前駆細胞に特異的なPtf1aをも発現した(図3右)。Kirrel2陽性の神経上皮構造は、En2も陽性であった。これらの結果は、実施例1の方法で分化誘導された中脳後脳境界領域の前駆細胞が、神経上皮構造の形成を伴いながら小脳神経板へと自己組織化が促された事を明確に示すものである。

【0148】

尚、神経培養用培地への交換のタイミングを、14日目、18日目及び28日目とした場合でも、それぞれ21日目で交換した場合と同様のN-カドヘリン陽性の神経上皮構造が形成された。21日目で交換した場合に、最もきれいな神経上皮構造が形成された。

【0149】

尚、ヘッジホッグ阻害剤であるシクロパミン(1 μM)を、7-14日目、14-21日目、又は21-35日目に添加したが、Kirrel2陽性細胞への分化を更に増強することはなかった。

【0150】

[実施例3] ヒト多能性幹細胞由来の小脳板組織の分散培養によるプルキンエ細胞および小脳介在神経細胞の分化

(方法)

実施例1および2の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養し、培養35日目に小脳のGABA作動性神経前駆細胞マーカーであるKirrel2に対する抗体を用いて、FACSによりKirrel2陽性

10

20

30

40

50

細胞の分離を行った。分離されたKirrel2陽性細胞と、胎生14日齢のマウス上菱脳唇から調製した小脳顆粒細胞前駆細胞を、細胞分散酵素(TrypLE, Life Technologies社)で単一細胞に分散し、DMEM/F12/10% FBSの培地中、ポリD-リジン/ラミニンをコートしたカバーガラス上で共培養を行った(5% CO₂、37℃)。共培養においては、マウス由来の小脳顆粒細胞前駆細胞10容に対して、ヒト多能性幹細胞由来のKirrel陽性細胞を1容の割合で混和した。6~12時間後に、DMEM/F12/N2/BSA/Tri-iodothyronine(T3)を加える事によってFBS濃度を約0.8%に減少させた。以降、週一度の頻度で培地の半量をDMEM/F12/N2/BSA/Tri-iodothyronine(T3)/Cytosine β-D-arabinofuranoside (Ara-C)を用いて交換する事により、培養を維持した(Muguruma et al., Nature Neurosci., 13, 1171-1180, 2010)。共培養開始後、15日目から115日目に細胞の成熟を蛍光抗体法によって解析した。

10

【0151】

(結果)

実施例1および2の方法に従ってヒト多能性幹細胞を培養し35日目に抗kirrel2抗体を用いてFACSによる細胞の分離を行ったところ、Fgf2を添加した細胞では約3割の細胞がkirrel2陽性を示した(図4右)。

【0152】

分離後の細胞をマウス上菱脳唇由来細胞と共培養したところ、15日目(分化誘導後、延べ日数50日目)にはプルキンエ細胞の特異的マーカーL7/pcp2とCalbindinの発現が認められ、これらのマーカー陽性細胞からは軸索の伸長と未成熟な樹状突起の形成が確認できた(図5a)。共培養58日目(延べ日数93日目)ではL7陽性細胞の樹状突起の分枝・伸展を認められた(図5b)。こうしたL7陽性細胞の出現は、ヒトES細胞のみならず、同様に培養したヒトiPS細胞(4株)においても認められた。さらに、共培養110日目(延べ日数145日目)では、プルキンエ細胞樹状突起棘特異的なGluRdelta2の発現と形態学的にも明瞭な樹状突起棘の形成を確認できた(図5c, d)。樹状突起棘に発現しているGluRdelta2にはそのリガンドであるCBLN1が結合している事も確認できた(図5e)。本共培養系では分離したkirrel2陽性細胞は殆どがプルキンエ細胞へと分化しているが、長期共培養(58~113日)により、同じくkirrel2陽性のGABA作動性介在細胞ゴルジ細胞(図5f, neurogranin陽性細胞)、Parvalbumin陽性介在神経細胞へと分化しているものもあった。

20

【0153】

[実施例4] ヒト多能性幹細胞由来の小脳板組織内の神経上皮および菱脳唇組織の形成(方法)

30

実施例1および2の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養し、培養35日目に組織の分化を蛍光抗体法で解析した。

【0154】

(結果)

培養35日目にはkirrel2陽性の神経上皮組織内に小脳顆粒細胞前駆細胞特異的なAtoh1陽性の細胞が認められた(図6a, c)。Atoh1陽性細胞はBarhl1, Sox2, Zic1など他の小脳顆粒細胞のマーカーも発現していた(図6b, d, e)。小脳の神経細胞はkirrel2陽性の脳室帯とAtoh1陽性の菱脳唇から生み出されるが、本結果は実施例1および2の方法に従って、ヒト多能性幹細胞からkirrel2陽性の脳室帯とAtoh1陽性の菱脳唇が分化誘導され、小脳板組織が形成されたことを示している。

40

【0155】

尚、FGF2処理をしたマウスES細胞由来神経上皮構造からのAtoh1陽性細胞の誘導には、BMP4の添加を要したが(Muguruma et al., Nature Neurosci., 13, 1171-1180, 2010)、ヒト多能性幹細胞においては、BMP4を添加しなくてもAtoh1陽性細胞が誘導された。

【0156】

[実施例5] ヒト多能性幹細胞由来の小脳板組織からの小脳顆粒細胞および小脳核細胞の分化

(方法)

実施例1および2の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養し、21日目以降は、神経培養用

50

培地 (Neurobasal/GlutaMax1/N2) を用いて培養を行った。培養28日目以降は同培地を週一度の頻度で全量交換することにより培養を継続し、培養35日目と53日目に蛍光抗体法で解析した。

【0157】

また、ヒト多能性幹細胞由来のAtoh1陽性細胞が小脳顆粒細胞へと分化することを再凝集培養系によって解析した。すなわちヒト多能性幹細胞を上記の方法に従って培養し、42~49日目に細胞分散試薬 (TrypLE, Life Technologies社) を用いて単一細胞へと分散した。電気穿孔法によってpCAG-GFPを細胞内に遺伝子導入することによって細胞の標識を行った。一方、生後2日目のICR系マウスから取り出した小脳を単一細胞へ分散し、GFPで標識したヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞1容に対して20容の割合で混和した。細胞混和液を遠心によって細胞凝集塊を形成し、ポリD-リジン/ラミニンをコートしたカバーガラス上でDMEM/F12/N2/10%FBSを用いて培養を行った (5% CO₂, 37 °C) (Muguruma et al., Nature Neurosci., 13, 1171-1180, 2010)。再凝集培養後、5日目と8日目に蛍光抗体法で解析した。

10

【0158】

(結果)

培養35日目の神経上皮組織内のBarhl1およびAtoh1共発現細胞の外周にはBarhl1単独の細胞が存在し、さらにその外側にはLhx2陽性の細胞が局在していた (図7a, b)。これはAtoh1陽性の菱脳層由来小脳神経前駆細胞がヒト多能性幹細胞由来小脳板組織内を移動し、顆粒細胞前駆細胞 (Barhl1) や小脳核前駆細胞 (Lhx2) へと分化が進んでいることを示している。さらに培養53日目には菱脳層由来小脳核細胞前駆細胞のマーカーであるTbr1とSMI32を共発現している大型細胞が凝集塊の中に局在していた (図7c)。

20

【0159】

再凝集培養後5日目では、GFPで標識されたヒト多能性幹細胞由来細胞は長い神経突起を細胞凝集塊の外に伸長させていた (図8a)。GFP陽性細胞は神経細胞特異的マーカーMAP2陽性であり、その細胞体は小脳顆粒細胞前駆細胞の特異的マーカーBarhl1, Pax6を発現し、神経突起に沿って移動していることがわかった (図8b, c)。8日目には細胞体の移動方向がそれまでの接線方向に対して垂直方向に変化していた (図8d)。移動方向を変更した細胞もMAP2とPax6を発現していることが確認できた。これらの結果は、再凝集培養系において小脳顆粒細胞が菱脳層から小脳板表層を接線方向に移動し、発生に従って接線方向から小脳板深層部に向かって垂直に移動方向を変更する様子を再現していることから、ヒト多能性幹細胞から小脳顆粒細胞が分化誘導できたことを示している。

30

【0160】

[実施例6] FGF19の添加による背腹軸のパターンを持つ小脳板組織およびその周囲組織の形成の促進

(方法)

実施例1および2の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養した。培養14日目にFGF19を終濃度100ng/mlで添加した。21日目以降は、神経培養用培地 (Neurobasal/GlutaMax1/N2) を用いて培養を行った。培養28日目に同培地で全量交換を行い、培養35日目に組織の分化を蛍光抗体法で解析した。

40

【0161】

(結果)

FGF19を添加しない場合、35日目におけるKirrel2陽性神経上皮構造には、異なる2つのタイプが細胞凝集塊中に見出された。大多数の細胞凝集塊においては、小さなロゼット様の神経上皮構造を有していた (図9A)。残りの細胞凝集塊 (~30%) には、少し大きな平楕円状の神経上皮構造が含まれていた (図9B)。後者の型の神経上皮は、連続的でより厚かった。興味深いことに、小脳板神経上皮マーカーであるKirrel2は、各平楕円状の神経上皮構造の、細胞凝集塊を基準としてより外側に発現していた (図9B)。反対に、細胞凝集塊中の小さなロゼットは、Kirrel2の明確に極性を持った局在を示さなかった (図9A)。

50

【0162】

FGF19の添加によって細胞凝集塊における連続的な平楕円状の神経上皮構造の形成が促進された(図9C)。FGF19の添加によってヒト多能性幹細胞由来の神経上皮構造に神経管の背腹軸に沿った極性を持った構造が形成された。すなわち、小脳神経前駆細胞のマーカーであり神経管の背側に発現するKirrel2, Ptf1a, SKOR2陽性細胞は細胞凝集塊を基準として外側に局在し、各々の神経上皮構造の1/3~1/2の領域を占めた。Atoh1も外側に発現した。これに対し、その対極の領域(細胞凝集塊を基準として内側)には腹側のマーカーであるNkx6.1, Foxa2が発現していた(図10)。これらの結果から、FGF19が、三次元ヒト多能性幹細胞培養において、背側を表面とする(dorsal side superficial)明確な背腹極性を有する吻側後脳神経管様構造の自己形成を促進することが示された(図11)。

10

【0163】

尚、FGF19は、50 ng/mlの濃度においても、神経上皮構造に神経管の背腹軸に沿った極性を持った構造の形成を促進したが、その効果(頻度)は、100 ng/mlの場合の1/3程度であった。300 ng/mlのFGF19によっても、同様に背腹軸パターン形成を促進した。その効果(頻度)は、100 ng/mlの場合と同程度であった。FGF19を培養10日目に添加した場合でも、効率は低くなるものの、背腹軸パターン形成が促進された。FGF19に代えて、FGF8又はFGF17を用いた場合も、FGF19と同様の背腹軸パターン形成を促進したが、その効果は、FGF19よりは弱かった。

【0164】

[実施例7] GDF7の添加による小脳板組織内での菱脳唇の形成の促進
(方法)

20

実施例6の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養した。21日目にGDF7を終濃度100ng/mlで添加し、神経培養用培地(Neurobasal/GlutaMax1/N2)を用いて培養を継続した。28日目にGDF7を含まない同培地で全量交換を行った。培養35日目に蛍光抗体法と定量的遺伝子増幅法で解析した。

【0165】

(結果)

GDF7の添加はヒト多能性幹細胞由来神経前駆組織内でのAtoh1陽性細胞の発現を促した(図12左、中央)。遺伝子レベルにおいてもFGF2を添加したものに比べ約220倍、FGF2を加えたものに対してでも1.5倍に増加した(図12右)。これらの結果は、培養21日目のGDF7の添加が菱脳唇の形成を促進した事を示すものである。

30

【0166】

GDF7を培養14日目から添加した場合でも、Atoh1陽性細胞が誘導されたが、細胞塊の成長が阻害され、細胞塊の大きさが小さくなり、神経上皮構造が崩れる傾向が認められた。また、28日目以降もGDF7を培地中から除去しなくても、菱脳唇の形成に悪影響は認められなかった。

【0167】

マウスにおいては、BMP4が菱脳唇の形成を促進することが知られているが、上記試験系で、GDF7に代えてBMP4を用いても、ヒト多能性幹細胞からの菱脳唇の形成は誘導できなかった。このことは、マウスとヒトでは、インビトロにおいて多能性幹細胞から菱脳唇を誘導するために必要な因子が異なること、及びヒトにおいてはGDF7が菱脳唇の形成に重要であり、これはBMP4では代替できないことを示唆する。

40

【0168】

[実施例8] SDF1の添加による小脳板組織内での菱脳唇の形成と小脳板の3層構造の形成の促進

(方法)

実施例6の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊を培養した。21日目以降は、神経培養用培地(Neurobasal/GlutaMax1/N2)を用いて培養を行った。培養28日目に同培地で全量交換を行い、SDF1を終濃度300ng/mlで添加した。培養35日目に組織の分化を蛍光抗体法で解析した。

50

【0169】

(結果)

SDF1非添加条件で、大きな平楕円状神経上皮の自己形成の経時変化(temporal aspect)を調べた。21日目には、細胞凝集塊中に形成された神経組織は、ほとんど上皮化や頂端基底極性を示さなかった(図13A)。24~28日目にかけて、頂端基底極性を有する神経上皮構造が形成されたが、ほとんどは小さな口ゼットであった(図13B、C)。35日目までに神経上皮口ゼットは、頂端側が内側の(apical side in)大きく平楕円状の構造へと変換した(図13D)。

【0170】

SDF1の添加は連続したkirrel2陽性の神経上皮構造の形成を促進した(図14a-c)。SDF1非処理神経上皮とは異なり、SDF1処理小脳神経上皮(Kirrel2+)は、細胞凝集塊の表面領域上に、頂端側が外側(apical side out)として、連続的に形成された(図14a及びb; この考えと一致し、Sox2+脳室帯細胞が、神経上皮の表層側に位置し、Shor2+プルキンエ前駆細胞が深部に位置した; 図14c)。kirrel2陽性の神経上皮の端にはSox2陽性の神経前駆細胞が巻込んだ形の組織を形成され、Atoh1, barhl1陽性の細胞が局在していた(図14d-f)。これらの結果は、SDF1の添加がヒト多能性幹細胞からkirrel2陽性の神経上皮構造の形成を促進し、菱脳唇を連続して配置することを可能にしたことを示す。さらに連続した神経上皮は、頂端面より脳室帯(Kirrel2, Sox2, Ptf1a陽性)、プルキンエ細胞層(Lhx5, Oligo2陽性)、菱脳唇由来神経細胞層(Atoh1, Barhl1陽性)の3層の構造が連続的に自己形成していることも明らかになった(図14g-l)。

【0171】

100ng/ml及び500ng/mlの濃度のSDF1によっても、小脳板組織内での菱脳唇の形成と小脳板の3層構造の形成が促進された。また21日目からSDF1を添加した場合でも、28日目から添加した場合と同様の効果が確認された。マトリゲル又はラミニンでは、SDF1に代替できなかった。

【0172】

以上より、FGF2及びFGF19で処理したヒト多能性幹細胞由来凝集塊は背腹極性を有する連続した神経上皮を自己形成することができ、追加的なSDF1処理により、初期小脳発生で見られるような、Atoh+/Barhl1+菱脳唇様構造と層化した小脳神経上皮構造の自発的な形成を促進することが示された(図15)。

【0173】

【実施例9】 ヒト多能性幹細胞から誘導したプルキンエ細胞の機能解析

(方法)

実施例3の方法でヒト多能性幹細胞凝集塊から成熟プルキンエ細胞を分化させた。パッチクランプ法を用いて、その電気生理学的な反応を解析した。

【0174】

(結果)

プルキンエ細胞の特徴的な4つの電気生理学的な反応を観ることができた(図16)。1つ目は、自発的な活動電位の繰り返し発火である。2つ目は、過分極で活性化されるカチオンチャンネル電流(Ih電流)である。3つ目は、微小興奮性シナプス後電流が、AMPA受容体阻害剤(NBQX)で抑制されることである。4つ目は、微小興奮性シナプス後電流がNMDA受容体阻害剤では抑制されない。これらの特徴は、プルキンエ細胞に特徴的である「グルタミン酸受容体がNMDA受容体を介さず、AMPA受容体に依存する」ことを示す。

【産業上の利用可能性】

【0175】

本発明によれば、ヒト多能性幹細胞から、小脳前駆組織をインビトロで効率的に誘導することができる。本発明は、小脳の障害に基づく疾患に対する医薬品の開発や、副作用や毒性試験、該疾患の新たな治療方法の開発等に有用である。

【0176】

本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様に変更され得ることは

当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「特許請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

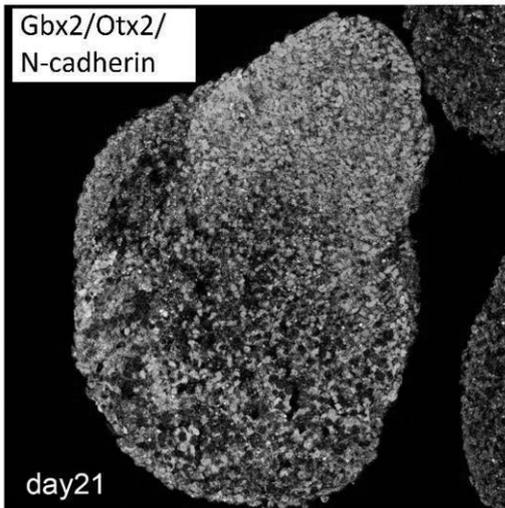
【 0 1 7 7 】

ここで述べられた特許、特許出願明細書及び科学文献を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

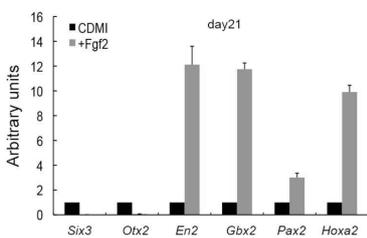
【 0 1 7 8 】

本出願は、日本で出願された特願2014-182758（出願日：2014年9月8日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

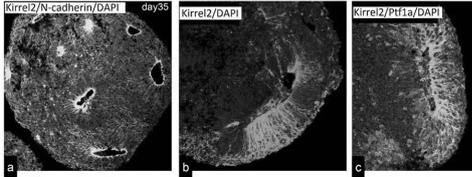
【 図 1 】



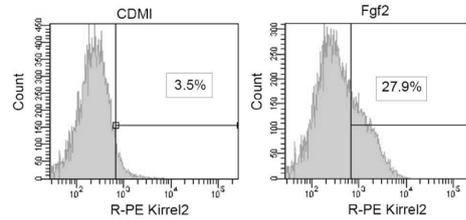
【 図 2 】



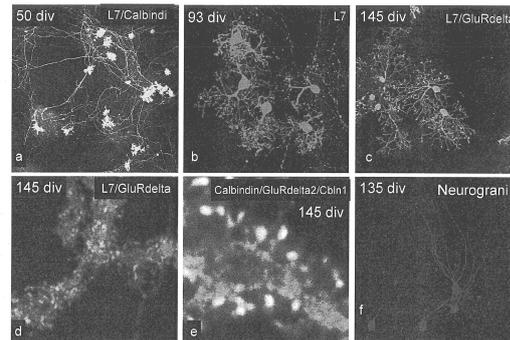
【 図 3 】



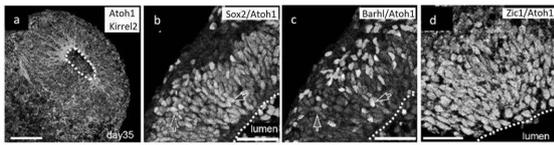
【 図 4 】



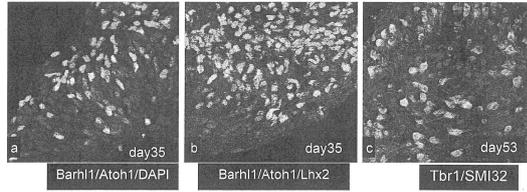
【 図 5 】



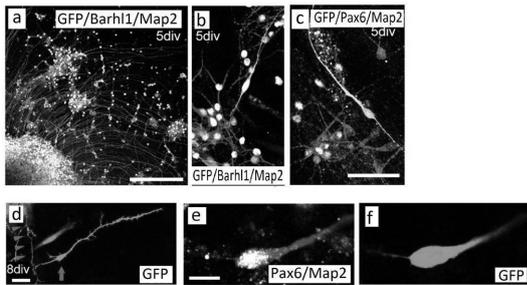
【 図 6 】



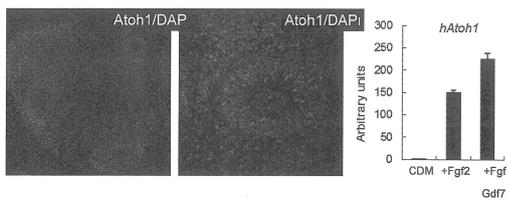
【 図 7 】



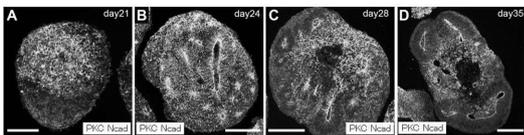
【 図 8 】



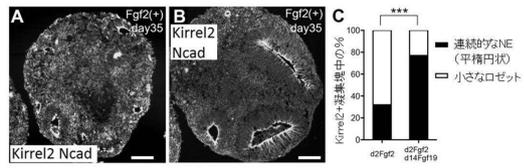
【 図 1 2 】



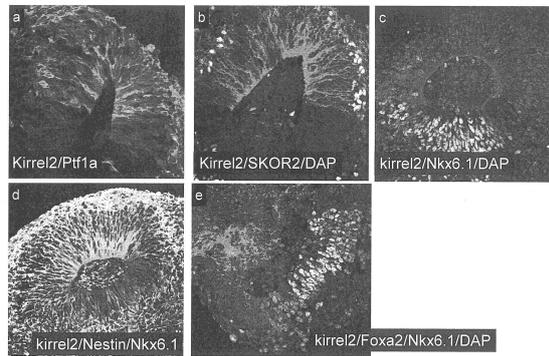
【 図 1 3 】



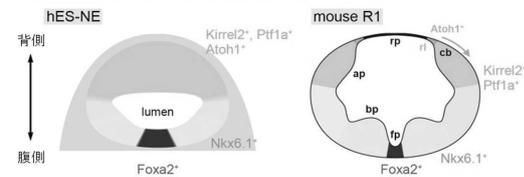
【 図 9 】



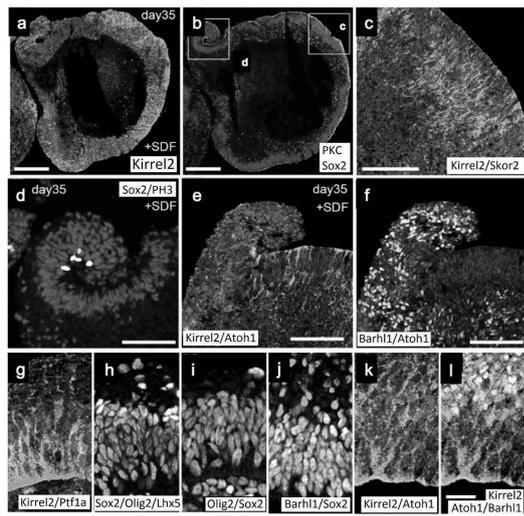
【 図 1 0 】



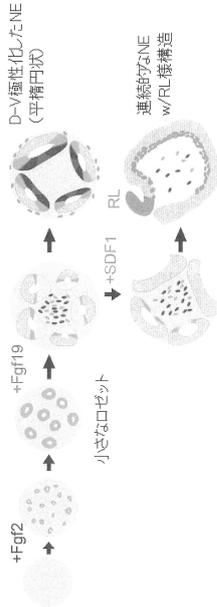
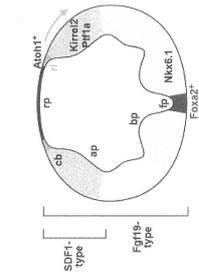
【 図 1 1 】



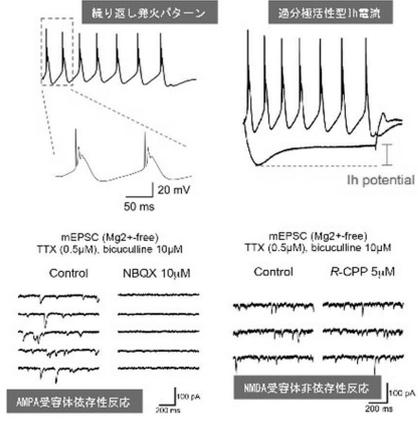
【 図 1 4 】



【 図 15 】



【 図 16 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
- (72)発明者 笹井 芳樹
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 六車 恵子
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 特開 2 0 1 4 - 0 2 3 4 5 7 (J P , A)
- TEN DONKELAAR H.J. et al., , Clinics in Perinatology, 2009, Vol.36, pp.513-530
- MUGURUMA K. et al., , Nature Neuroscience, 2010, Vol.13, pp.1171-1180, Supplemental Information
- WATAYA T. et al., , Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2008, Vol.105, pp.11796-11801
- WATANABE K. et al., , Nature Biotechnology, 2007, Vol.25, pp.681-686
- CHAMBERS S.M. et al., , Nature Biotechnology, 2009, Vol.27, pp.275-280
- ZHU Y. et al., , Development, 2009, Vol.136, pp.1919-1928
- CHENG F.Y. et al., , PLoS ONE, 2012, Vol.7, No.4, e35541, pp.1-12
- MUGURUMA K. et al., , Development, growth and differentiation, 2012, Vol.54, pp.349-357
- NAKANO T. et al., , Cell Stem Cell, 2012, Vol.10, No.6, pp.771-785, Supplemental Information

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d