

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年5月10日(10.05.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/065763 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0735 (2010.01) A61P 5/14 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 5/24 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01) A61P 5/38 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/078250
- (22) 国際出願日: 2012年10月31日(31.10.2012)
- (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 2011-239803 2011年10月31日(31.10.2011) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人理化学研究所(RIKEN)
[JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号
Saitama (JP).
- (72) 発明者: 笹井 芳樹(SASAI, Yoshiki); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP).
須賀 英隆(SUGA, Hidetaka); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))



WO 2013/065763 A1

(54) Title: METHOD FOR CULTURING STEM CELL

(54) 発明の名称: 幹細胞の培養方法

(57) Abstract: The present invention provides methods for producing an aggregate containing a rostral hypothalamic tissue and a rostral cranial ectodermal tissue, a pituitary progenitor tissue and a pituitary hormone-producing cell by forming a homogeneous aggregate of a stem cell from a pluripotent stem cell, e.g., an ES cell, seeded at a high cell concentration using a serum-free culture medium (preferably containing substantially no proliferation factor or no insulin component) and subjecting the formed aggregate to floating culture.

(57) 要約: 本発明は、無血清培地 (好ましくは増殖因子及びインシュリン類を実質的に含まない) を用い、高細胞濃度で播種したES細胞等の多能性幹細胞から、均一な幹細胞の凝集体を形成し、形成された凝集体を浮遊培養することにより、吻側視床下部組織及び吻側頭部外胚葉組織を含む凝集体、下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞を得る方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：幹細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、幹細胞から、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織とを含んでなる胚様体を試験管内で分化誘導する方法等に関する。また、特に中枢神経組織として、下垂体前駆組織及び各種下垂体ホルモン産生細胞を試験管内で分化誘導する方法等に関する。

背景技術

[0002] これまでに、ES細胞等の多能性幹細胞から神経分化誘導を行う培養法がいくつか知られている（非特許文献1-4、特許文献1-3）。

本発明者らは、以前に、動物及びヒトのES細胞等の多能性幹細胞から神経分化誘導を行う方法として、無血清培地での分散浮遊培養（SFE B法）が有効であることを示した（非特許文献3、4及び特許文献1を参照）。その後、本発明者らは、無血清培地中で均一な幹細胞の凝集体を形成し、その凝集体を浮遊培養することにより、ES細胞等の多能性幹細胞から、大脳皮質組織、視床下部のニューロンやその前駆細胞等を効率的に分化誘導できる方法（SFE B q法）を見出した（非特許文献5及び特許文献3）。

[0003] 脊椎動物において、下垂体や感覚器（嗅上皮、水晶体、内耳など）は神経板に面した頭部非神経外胚葉組織中に形成されるプラコードから、プラコードの誘導、プラコードの陥入、細胞の分化、形態形成を経て、発生する事が知られている。

[0004] このうち下垂体は、多くのホルモンを産生・分泌する内分泌器官である。下垂体は腺性下垂体（adenohypophysis）と神経性下垂体（neurohypophysis）（下垂体後葉ともいう）とに大きく二分され、腺性下垂体はさらに、下垂体前葉と下垂体中葉（中間部）とに二分される。腺性下垂体は、下垂体ホルモンを産生・分泌する複数種の細胞を含んでいる。

- [0005] この腺性下垂体は、原始口腔の陥入により生じたラトケ嚢（R a t h k e p o u c h）に由来する。哺乳動物の初期発生において、下垂体前葉原基は、前側神経板境界の吻側に隣接する頭部非神経外胚葉（吻側頭部非神経外胚葉）中のプラコードとして形成され、このプラコードが陥入してラトケ嚢を形成する。ラトケ嚢はその後外胚葉から分離して上皮性の小嚢胞となる。次いでこの小嚢胞の前壁が下垂体前葉となり、後壁が下垂体中葉となる。
- [0006] 一方、神経性下垂体（下垂体後葉）は第三脳室の底部の突起から形成される。下垂体後葉には、視床下部の視索上核及び室傍核にある神経分泌ニューロン細胞体からの軸索が伸び、ホルモン（オキシトシン及びバソプレシン）が軸索輸送されている。
- [0007] これまでの研究によって、発生段階において、吻側視床下部と吻側頭部非神経外胚葉との相互作用がラトケ嚢の誘導に必要であることが示されている（非特許文献6）。
- [0008] このように、下垂体の後期発生プロセスは広く研究されているが、初期の外胚葉における下垂体原基の特定化については、依然理解されていない。さらに、大脳や視床下部等の神経細胞を分化誘導できる方法がこれまでに見出されているが（上記）、ES細胞等の多能性幹細胞から下垂体前駆組織や各種下垂体ホルモン産生細胞を試験管内（*i n v i t r o*）で発生させることができる方法は、未だ知られていない。

また、幹細胞を用いて糖尿病を治療することはこれまでも検討されてきたが、視床下部－下垂体の機能不全に着目した再生医療の可能性に対しては、これまでほとんど注意が払われてこなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：WO2005/123902号パンフレット
特許文献2：特開2008-99662号公報
特許文献3：WO2009/148170号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1 : Watanabe, K. et al., Nature Biotechnology 25, 681-686 (2007)

非特許文献2 : Su, H.-L. et al., Developmental Biology 290, 287-296 (2006)

非特許文献3 : Ikeda, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11331-11336 (2005)

非特許文献4 : Watanabe, K. et al., Nature Neurosci. 8, 288-296 (2005)

非特許文献5 : Wataya, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 11796-11801 (2008)

非特許文献6 : Bharti, K. et al., Development 138, 873-878 (2011)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、幹細胞から、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織とを含んでなる胚様体 (Embryonic Body) (以下「凝集体」ともいう) を試験管内で分化誘導する方法を提供することを目的とする。また、特に中枢神経組織として、下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞へと試験管内 (in vitro) で効率的に分化誘導する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 上記課題を解決するため本発明者らが鋭意検討を重ねた結果、下垂体前葉の発生を in vitro で再現することに成功し、ES細胞等の多能性幹細胞から、下垂体前駆組織及び各下垂体ホルモン産生細胞を分化誘導することに成功した。具体的には、特許文献3及び非特許文献5に開示されたSFE B q法を用いて条件をさらに検討し、1つの凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織、特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織の両方を同時に分化誘導できる条件を初めて見出した。さらにこの凝集体から、下垂体前駆組織 (ラトケ囊様の組織) を誘導し、この組織から各種下垂体ホルモン産生細胞を誘導することに成功した。こ

のような知見に基づき、本発明者らは以下の発明を完成させた。

- [0013] [1] 無血清培地中で幹細胞の凝集体を形成させる工程、及び
形成された凝集体を無血清培地中で浮遊培養する工程
を含む、視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体の製造
方法。
- [2] 浮遊培養で用いる無血清培地がShhシグナル促進剤を含む、[1]
に記載の製造方法。
- [3] 前記Shhシグナル促進剤がSAGである、[2]に記載の製造方法
。
- [4] 浮遊培養で用いる無血清培地がBMPシグナル促進剤を含む、[1]
～[3]のいずれかに記載の製造方法。
- [5] BMPシグナル促進剤がBMP2及び/又はBMP4である、[4]
に記載の製造方法。
- [6] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉が、吻側視床下部組織及びシ
ート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織である、[1]～[5]
のいずれかに記載の製造方法。
- [7] 前記吻側視床下部組織がRx陽性である、[6]に記載の製造方法。
- [8] シート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織がPitx1陽
性である、[6]記載の方法。
- [9] 前記無血清培地が、Nodalシグナル促進剤、Wntシグナル促進
剤、FGFシグナル促進剤、BMPシグナル促進剤、レチノイン酸及びイン
シュリン類を実質的に含有しない無血清培地である、[1]に記載の製造方
法。
- [10] 前記幹細胞がヒト由来である、[1]～[9]のいずれかに記載の
製造方法。
- [11] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体が
、Lim3陽性細胞を更に含む、[1]～[10]のいずれかに記載の製造
方法。

[12] 前記Lim3陽性細胞が、凝集体中に上皮性の小嚢胞を形成することを特徴とする、[11]に記載の製造方法。

[13] 浮遊培養により、幹細胞の凝集体における内因性の増殖因子の発現を増加させる、[1]に記載の製造方法。

[14] 前記内因性の増殖因子がBMP2及び／又はBMP4である、[13]に記載の製造方法。

[15] 前記BMP2及び／又はBMP4の発現が、低細胞濃度で幹細胞の凝集体を形成させた場合と比較して、mRNAレベルで2倍以上増加することを特徴とする、[14]に記載の製造方法。

[16] [1]～[15]のいずれかに記載の方法によって製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、Notchシグナル阻害剤を含む無血清培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の製造方法。

[17] 前記Notchシグナル阻害剤がDAPTである、[16]に記載の製造方法。

[18] [16]又は[17]に記載の方法で製造された副腎皮質刺激ホルモン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体において副腎皮質刺激ホルモンの分泌不全を改善する方法。

[19] [1]～[15]のいずれかに記載の方法によって製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、グルココルチコイドを含む無血清培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、成長ホルモン産生細胞の製造方法。

[20] 前記無血清培地がインシュリンをさらに含む、[19]に記載の製造方法。

[21] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、グルココルチコイドを含む無血清培地中で浮遊培養する工程の前又は同時に、GSK3β阻害剤を含む無血清培地中で浮遊培養する工程を含む、[19]又は[20]に記載の成長ホルモン産生細胞の製造方法。

[22] 前記GSK3 β 阻害剤がBIOである、[21]に記載の製造方法。

[23] [19]～[22]のいずれかに記載の方法で製造された成長ホルモン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体において成長ホルモンの分泌不全を改善する方法。

[24] [1]～[15]のいずれかに記載の方法によって製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、エストロゲンを含む無血清培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、プロラクチン産生細胞の製造方法。

[25] 前記無血清培地がインシュリンをさらに含む、[24]に記載の製造方法。

[26] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、エストロゲンを含む無血清培地中で浮遊培養する工程の前又は同時に、GSK3 β 阻害剤を含む無血清培地中で浮遊培養する工程を含む、[24]又は[25]に記載のプロラクチン産生細胞の製造方法。

[27] 前記GSK3 β 阻害剤がBIOである、[26]に記載の製造方法。

[28] [24]～[27]のいずれかに記載の方法で製造されたプロラクチン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体においてプロラクチンの分泌不全を改善する方法。

[29] [1]～[15]のいずれかの製造方法で製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、無血清培地中でストローマ細胞を培養することによって得られたストローマ細胞の馴化培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン及び/又は甲状腺刺激ホルモン産生細胞の製造方法。

[30] 前記ストローマ細胞がPA6細胞である、[29]に記載の製造方法。

[31] [29]又は[30]に記載の方法で製造された卵胞刺激ホルモン

、黄体形成ホルモン又は甲状腺刺激ホルモン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体において卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン又は甲状腺刺激ホルモンの分泌不全を改善する方法。

[32] 無血清培地中で幹細胞の凝集体を形成させる工程、及び形成された凝集体を無血清培地中で浮遊培養する工程を含む、中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織を共に含んでなる凝集体の製造方法。

[33] [32] に記載の凝集体においてプラコードが自己形成される、嗅上皮、水晶体又は内耳を形成するプラコードの製造方法。

発明の効果

[0014] 本発明の方法によれば、ES細胞等の多能性幹細胞から、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織、具体的には吻側視床下部組織及びシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織を含む凝集体や下垂体前駆組織を試験管内で分化誘導し、さらに各種下垂体ホルモン産生細胞を分化誘導することができる。下垂体は多くのホルモンを産生・分泌する中心的な内分泌器官であり、ホルモン分泌の異常は生体に対し重大な影響を及ぼす。従って、本発明の方法で得られた凝集体、下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞は、下垂体ホルモンの分泌不全によって引き起こされる疾患や下垂体ホルモンの分泌不全を引き起こす疾患の治療等に利用することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1 aは、生体内での下垂体発生を示す模式図（矢状断面）である。図1 bは、生体内（E13）におけるラトケ嚢及び隣接する腹側視床下部組織の遺伝子発現を示す図である（視床下部マーカーRx：緑；頭部非神経外胚葉マーカーPitx1：赤）。図1 cは、SFEBq/gfCDM培養（3000細胞／凝集体）したESCにおけるPitx2の発現レベルを示す。Pitx2の発現は殆ど見られなかった。図1 dは、large cell aggregation (LCA; 10000細胞／凝集体で開始) 条件（赤）下又はBMP4処理（青）により、SFEBq/CDM培養したES

CのPitx2発現が上昇したことを示す。図1e及びfは、マウスES細胞を高濃度(LCA条件)で播種し、SFEBq/gfCDM法で培養することによって得られた凝集体における、Pitx1(赤)及びRx(緑)の発現を示す図である。図1gは図1fの模式図である。図1hは、Rx+組織がChx10⁻/Nestin⁺であることを示す。図1iは、Lim3のmRNA発現量に対するShhシグナル促進剤SAG添加のタイミングの影響を示すグラフである。図1jは、SAG処理したLCA凝集体中のLim3:venus⁺集団(緑)を示すFACS分析の結果である。図1kは、SAG処理なし(左)及びSAG処理あり(右)の場合の、凝集体中のLim3発現の比較を示す。スケールバー:100μm(b、e、f);50μm(h);500μm(k)。

[図2]図2aは、SAG処理した培養13日目における凝集体中のLim3陽性細胞のクラスターを示す図である。図2bは、凝集体中のLim3陽性細胞が、神経細胞マーカーであるTuj1を発現していないことを示す図である(Lim3(緑)、Tuj1(赤)、Pitx1(白))。図2cは、凝集体において中胚葉マーカーであるBrachyuryがほとんど発現していないことを示す。図2d-fは、凝集体中のLim3陽性細胞がラトケ嚢様の小嚢胞を形成していく様子を示している(8~12日目)。図2g-jは、SAG処理した小嚢胞及びその周辺のマーカー遺伝子の発現を示す図である(Pitx1(赤)、Lim3(緑、g;白、h;赤、j)、パンサイトケラチン(緑、h)、Rx(緑、i、j))。図2kは、小嚢胞及びその周囲のマーカー遺伝子発現を示す模式図である。図2lは、生体内でのラトケ嚢及びその周辺のPitx1(赤)、aPKC(緑)(apicalマーカー)の発現を示す図である。図2m及びnは、小嚢胞の電子顕微鏡写真である。tall epithelial cell(m、頂端、上方)、基底側の剥離細胞(m、角括弧)、apical cilia(n、矢頭)、apical junction(n、矢印)。図2oは、小嚢胞の基底側のIslet1陽性細胞を示す図である(Lim3(緑)、Isl1(赤))

）。図2 pは、得られたラトケ嚢様小胞の *in vitro* 生成の模式図を示す。スケールバー、 $100\mu\text{m}$ (a-d、f、g) ; $50\mu\text{m}$ (e、i、l) ; $20\mu\text{m}$ (j) ; $2\mu\text{m}$ (k)。

[図3]図3 aは、各下垂体ホルモン産生細胞の分化を示す図である。図3 bは、SAG処理で得られた下垂体前駆組織をDAPT処理するとTbx19発現が増強されることを示す(20日目)(DAPT処理(18-19日目)/BIO処理(16-18日目))。図3 cは、22日目の非神経(N-cad-)細胞中のACTH+細胞の割合を示す(DAPT処理(18-19日目)/BIO処理(16-18日目))。図3 d-gは、SAG+DAPT処理した凝集体における遺伝子マーカーの発現を示す。赤: ACTH、緑: エカドヘリン(e)/ニューロフィラメント(f)/PC2(g)。図3 hは、ドキシサイクリン(Dox)処理によるLim3のshRNA媒介性ノックダウンにより、Tbx19及びACTHの発現が低下することを示す。図3 iは、DAPT処理したLCA+SAG SFEBq凝集体の、Rx、Lim3及びACTHの発現を示す。図3 jは、ESC由来の嚢からの副腎皮質刺激ホルモン産生細胞生成を模式的に示す。図3 kは、Pitx1発現に対するDAPT、BIO及びIWP2の影響を示すグラフである(26日目)。図3 l及びmは、LCA+SAG凝集体(33日目)における、GH+細胞の生成を示す(ヒドロコチゾン及びインスリンを20-30日目に添加)。図3 n及びoは、LCA+SAG凝集体(33日目)における、Prolactin+細胞の生成を示す(エストラジオール及びインスリンを20-30日目に添加)。図3 p-sは、LCA+SAG凝集体(33日目)における、LH+細胞、FSH+細胞、TSH+細胞(PA6のコンディショニングメEDIUM(馴化培地)を10日目から添加)の生成を示す。スケールバー、 $20\mu\text{m}$ (d、e) ; $50\mu\text{m}$ (f、g) ; $100\mu\text{m}$ (m、o、q、r、s)。

[図4]図4 aは、CRH負荷によるACTH分泌試験の模式図である。図4 bは、CRH負荷によるACTH分泌の促進を示す。図4 cは、種々の用量の

CRH負荷によるACTH分泌の促進を示す。図4 dは、凝集体からのACTH分泌に対する、SAG、DAPT及びCRH処理の影響を示す。図4 eは、CRHによるACTH分泌の促進が、ACTH分泌の負のフィードバック因子ヒドロコチゾン（F）での前処理によって抑制されることを示す。図4 fは、エストラジオール（E2）での前処理がACTH分泌に影響しないことを示す。

[図5]図5 aは、下垂体除去マウスへの凝集体の移植実験のデザイン及び術後7日目の、下垂体除去マウスの腎臓被膜下に移植した凝集体（GFP標識）の生着を示す図である（赤：ACTH⁺細胞；青：DAPI；スケールバー、100 μ m）。図5 b及びcは、下垂体除去によりACTHが産生されなくなったことを示す（CRH負荷なし（b）、あり（c））。図5 dは、CRH負荷あり（右）又はなし（左）での、移植マウスにおけるACTHレベルを示す。図5 e及びfはそれぞれ、CRH負荷によるACTH産生及びコルチコステロン産生の増加を示し、図5 g及びhは、CRH負荷なしの基底レベルのACTH産生及びコルチコステロン産生を示す。図5 i及びjは、ACTH産生細胞の移植による、下垂体除去マウスの自発運動能の改善を示す。図5 kはKaplan-Meyer法によって分析した、凝集体移植手術後の下垂体除去マウスの生存を示す。

[図6]図6は、3000細胞／凝集体（LCA⁻）又は10000細胞／凝集体（LCA⁺）で開始した、gfCDM／SFEbq培養物におけるBMP2及びBMP4の発現を示す。

[図7]図7は、ヒトES細胞12000細胞／凝集体を用い浮遊凝集塊培養を行った結果である。培養3日目にBMP4を5 nM添加した凝集塊では、R^{x+}の吻側視床下部組織の細胞が、E-カドヘリン⁺の吻側頭部非神経外胚葉組織の細胞からなる単層のシート状の連続上皮に内包された凝集体が培養17日目には形成されていた。さらに、培養25日目にはE-カドヘリン⁺の肥厚した非神経外胚葉の形成がみられた。

[図8]図8は、図7における培養17日目の細胞凝集体を用い、吻側頭部非神

経外胚葉組織のマーカーである *Pitx1* の mRNA 発現を定量的 PCR で測定した結果である。BMP4 を 5 nM 添加した凝集体では無添加の凝集体に比べ、*Pitx1* の mRNA 発現が約 10 倍増加していた。

発明を実施するための形態

[0016] 以下に本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明の製造方法によって得られる組織及び細胞

(A) 中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織を含む凝集体

本発明の製造方法（分化誘導方法という場合がある）によれば、中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織、特に吻側視床下部組織（単に視床下部組織ともいう）及びシート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織（単に頭部非神経外胚葉組織ともいう）を共に含んでなる凝集体が分化誘導される。吻側視床下部組織及びシート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織を含む凝集体は、例えば、シート状の連続上皮様の一層の *Pitx1* 陽性の細胞群からなる吻側頭部非神経外胚葉組織が培養液との接触面に存在し、その内部に *Rx* 陽性の細胞群からなる吻側視床下部組織を含む細胞塊である。本発明の分化誘導方法では、1つの凝集体中に中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織の両方の組織が同時に形成される（具体的には、1つの凝集体中、中枢神経組織の外側に、シート状の頭部非神経外胚葉組織が形成される）ため、これらの組織は局所的に相互作用することができるようになる。

[0017] 個体の発生段階において、ラトケ嚢（下垂体の前駆組織）を誘導するには、吻側視床下部組織と吻側頭部非神経外胚葉組織との相互作用が必要であることが知られている（Bharti et al (2011) Development 138, 873-878）。

例えば、1つの凝集体中、吻側視床下部組織の外側に、シート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織が形成されると、これらの組織は局所的に相互作用することができるようになり、下垂体前駆組織、ひいては下垂体ホルモン産生細胞を誘導する。

[0018] また、感覚器を形成する外胚葉性の頭部プラコードの形成にも、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織との相互作用が必要である。具体的には、嗅上

皮は、大脳組織と吻側頭部非神経外胚葉組織との相互作用により形成されるプラコード (Olfactory placode) を経て発生し；水晶体は、網膜組織と頭部非神経外胚葉組織との相互作用により形成されるプラコード (Lens placode) を経て発生し；内耳は、後脳組織と頭部非神経外胚葉組織との相互作用により形成されるプラコード (Otic placode) を経て発生する。

つまり、上述の組織の組み合わせが1つの凝集体中に上述の構成で形成されると、これらの組織は局所的に相互作用することができるようになり、各プラコードの形成、ひいては各感覚器の発生が導かれる。

[0019] 凝集体中の細胞が、中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織のいずれに属する細胞であるかは、正常に発生している生体内で観察される、中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織の遺伝子発現プロファイルに基づいて判定することができる。具体的な遺伝子発現プロファイルは以下の (D) に記載している。一態様において、吻側視床下部組織は、 Rx^+ 、 N -カドヘリン $^+$ 、 $Sox1^+$ の神経組織である。一態様において、吻側視床下部組織は、 Rx^+ 、 $Chx10^-$ 、 $Nkx2.1^+$ 、 $Nestin^+$ の神経組織である。一態様において、吻側頭部外胚葉組織 (吻側頭部非神経外胚葉) は、凝集体の表層に形成される $Pitx1$ 陽性、 N -カドヘリン $^+$ の単層の細胞からなるシート状の連続上皮組織である。

[0020] (B) ラトケ嚢様組織

生体の発生では、腺性下垂体 (下垂体前葉及び下垂体中葉) は、ラトケ嚢と呼ばれる組織から誘導される。ラトケ嚢は、個体発生のごく初期に吻側頭部非神経外胚葉に形成されたプラコードが陥入して形成され、後に外胚葉から分離して上皮性の小嚢胞となる。

本発明の方法によれば、吻側視床下部組織及び吻側頭部非神経外胚葉組織を含む上記凝集体において、ラトケ嚢と同様の上皮構造や極性を持つ小嚢胞が形成される。この小嚢胞は、生体内のラトケ嚢と同様、視床下部組織の近傍に存在し、且つ吻側頭部非神経外胚葉組織とも隣接する。つまり、本発明

の方法により、生体の下垂体発生時の微小環境を再現することができる（図2pを参照のこと）。

[0021] 従って、本発明でいう「ラトケ嚢様組織」又は「下垂体前駆組織」とは、正常に発生している生体内で観察されるラトケ嚢と同様の形態的特徴（凹状又は小嚢胞状）を有する、視床下部組織及び吻側頭部非神経外胚葉組織の近傍に存在する、生体内のラトケ嚢と同じ遺伝子発現プロファイルをもつ、などの特徴によって規定される。具体的な遺伝子発現プロファイルは以下の（D）に記載している。一態様において、ラトケ嚢様組織は、Lim3陽性の上皮性の小嚢胞である。

[0022] （C）下垂体ホルモン産生細胞

下垂体前葉からは、副腎皮質刺激ホルモン（adrenocorticotrophic hormone（ACTH））及び、成長ホルモン（growth hormone（GH））、甲状腺刺激ホルモン（thyroid-stimulating hormone（TSH））、プロラクチン（prolactin（PRL））、卵胞刺激ホルモン（follicle-stimulating hormone（FSH））、黄体形成ホルモン（luteinizing hormone（LH））（下垂体前葉ホルモン）が分泌され、下垂体中葉からは、メラニン細胞刺激ホルモン（melanocyte-stimulating hormone（MSH））（下垂体中葉ホルモン）が分泌される。MSHは、ACTH関連ペプチドの1つであり、ACTHと共通の前駆体であるプロピオメラノコルチンの酵素分解によって形成される。一方、下垂体後葉が分泌するホルモンのオキシトシン（oxytocin（OX））及びバソプレシン（vasopressin（VP））は、視床下部で産生されるホルモンであるので、本明細書中では下垂体ホルモンに含めないものとする。本明細書で下垂体ホルモンという場合、下垂体前葉ホルモンを指すものとする。

[0023] （i）副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）

コルチコトロピンともいう。下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン産生・分

泌細胞 (corticotroph) から分泌される、39アミノ酸のペプチドホルモンである。ACTHは、グルココルチコイド分泌促進作用を示す。ACTHの分泌は、視床下部から分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone (CRH)) によって促進され、グルココルチコイドによってネガティブフィードバックされる。

[0024] (ii) 成長ホルモン (GH)

ソマトトロピンともいう。下垂体前葉の成長ホルモン産生・分泌細胞 (somatotroph) から分泌される、ヒトの場合191アミノ酸のペプチドホルモンである。GHは、タンパク質合成や軟骨発育の促進作用、脂肪分解作用などの、種々の生物活性を示す。GHの分泌は、視床下部から分泌される成長ホルモン放出ホルモン (growth hormone-releasing hormone (GHRH)) によって刺激され、ソマトスタチンによって抑制される。GHの分泌は、GH自体及びIGF-1によってもネガティブフィードバックされる。

[0025] (iii) プロラクチン (PRL)

下垂体前葉のプロラクチン産生・分泌細胞 (lactotroph) から主に分泌される、199アミノ酸のペプチドホルモンである。PRLは、ヒトでは女性ホルモンの存在下で乳汁分泌や乳腺の分化・発達を促進し、妊娠維持等の作用を持つ。PRLの分泌は、プロラクチン放出因子 (PRF) (例、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、バソプレシン、血管作用性小腸ペプチド (VIP)、ペプチドヒスチジンイソロイシン (PHI)) 及びTRHによって促進され、プロラクチン放出抑制因子 (PIF) (例、ドパミン、 γ -アミノ酪酸 (GABA)) によって抑制される。

[0026] (iv) 黄体形成ホルモン (LH)

性腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン) の一種であり、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生・分泌細胞 (gonadotroph) から分泌される、 α サブユニットと β サブユニットからなる糖タンパク質である。LHは、女性

では、FSHと共に発育卵胞に作用して卵胞を発育させ、排卵及び黄体の形成を促し、エストロゲン及びプロゲステロンの産生を促進し、月経周期の形成に重要な役割を果たす。男性では、精巢のライディッヒ細胞に作用してテストステロンの分泌を促す。LHの分泌も、視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone (GnRH)) によって促進される。

[0027] (v) 卵胞刺激ホルモン (FSH)

性腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン) の一種であり、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生・分泌細胞 (gonadotroph) から分泌される、 α サブユニットと β サブユニットからなる糖タンパク質である。FSHの分泌は、視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone (GnRH)) によって促進される。FSHは、女性においては卵巣に作用して原始卵胞を発育卵胞にし、LHと協働して成熟卵胞へと発育させて、卵胞からのエストロゲン分泌を促進させる。エストロゲンが増加すると、視床下部へのフィードバックによってGnRHの分泌が抑制されてFSHの分泌も抑制されるが、エストロゲンがさらに増加すると視床下部・下垂体へのポジティブフィードバックが働き、GnRHが増加する。男性では、精巢のセルトリ細胞に作用して、テストステロンの分泌を促進し、精子形成を促進する。

[0028] (vi) 甲状腺刺激ホルモン (TSH)

下垂体前葉の甲状腺刺激ホルモン産生・分泌細胞 (thyrotroph) から分泌される、 α サブユニットと β サブユニットからなる糖タンパク質である (α サブユニットはLH、FSHと共通である)。TSHは、甲状腺に作用して、甲状腺ホルモンの産生・分泌を促進する。TSHの分泌は、視床下部から分泌される甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone (TRH)) によって刺激され、甲状腺ホルモンによってネガティブフィードバックされる。

[0029] 本発明の分化誘導方法によって得られた、これらの下垂体ホルモンのい

れかを産生し分泌し得る細胞を、本明細書中では「下垂体ホルモン産生細胞」と総称する。

[0030] 上記下垂体ホルモンのいずれかの産生・分泌の不全によって引き起こされる疾患としては、副腎皮質機能低下症、成長ホルモン分泌不全性低身長症、成人発症GH欠乏症、下垂体性小人症、クレチン病、不妊症等が挙げられる。また、汎下垂体機能低下症（エンプティセラ症候群、下垂体アポプレクシー、術後下垂体損傷が含まれる）、部分的下垂体機能低下症、下垂体前葉ホルモン単独欠損症（具体的には、ACTH単独欠損症、成長ホルモン単独欠損症、TSH単独欠損症、プロラクチン単独欠損症、性腺刺激ホルモン単独欠損症）においては、上記下垂体ホルモンの1ないし全てのホルモンの産生・分泌の不全が生じる。

[0031] (D) 組織及び細胞の同定

本発明の方法により得られた組織又は細胞は、マーカー遺伝子の発現の有無、又は下垂体ホルモン産生細胞の場合には下垂体ホルモンの培地への放出若しくは細胞内におけるその前駆タンパク質の蓄積等を指標とし、必要に応じてそれらを組み合わせることにより、いずれの組織又は細胞に分化したかを確認することができる。また、組織や細胞の形態を観察することによって、得られた組織又は細胞を特定することもできる。更に、このようなマーカー発現パターンや組織又は細胞の形態に基づき、所望の特定の組織又は細胞を単離することもできる。

[0032] 本発明で使用されるマーカーとしては、ACTH、GH、PRL、LH、FSH、TSH等の下垂体ホルモン、N-カドヘリン、Nkx2.1（神経マーカー）、Sox1（神経外胚葉マーカー）、ネスチン（神経外胚葉マーカー）、ニューロフィラメント及びNSE(neuron-specific enolase)（ニューロンマーカー）、Rx（視床下部マーカー）、Pitx1及びPitx2（頭部非神経外胚葉マーカー）、Chx10（網膜マーカー）、Lim3（初期下垂体/下垂体前駆組織マーカー）、Islet1及び2（後期ラトケ嚢マーカー）、E-カドヘリン（上皮細胞マーカー）

、Prop1及びPit1 (gonadotroph、somatotroph、lactotroph又はcaudomedial thyrotroph前駆体に特異的なマーカー)、Tbx19 (corticotrophに特異的なマーカー)、PC2 (melanotropic lineageマーカー)等が挙げられるが、これらに限定されない。これら及び他のマーカー遺伝子の発現の有無を適宜組み合わせることにより、得られた細胞の正体を特定することができる。

[0033] 本発明の分化誘導方法によって得られる組織または細胞は、生体内の実際の組織又は細胞の遺伝子発現プロファイルに従って特徴付けることができる。

例えば、上記マーカーを用いて規定すると、吻側視床下部組織の細胞は、 Rx^+ 、好ましくは Rx^+ 、 N -カドヘリン $^+$ 、ネスチン $^+$ 、 $Nkx2.1^+$ 、 $Chx10^-$ である。吻側頭部外胚葉組織 (吻側頭部非神経外胚葉) の細胞は、 $Pitx1^+$ 、好ましくは $Pitx1^+$ 、 $Pitx2^+$ 、 E -カドヘリン $^+$ である。下垂体前駆組織 (ラトケ嚢様組織) の細胞は、 $Lim3^+$ 、 $Pitx1^+$ 、 $Pitx2^+$ 、 $Isl1^+$ 、 E -カドヘリン $^+$ である (これは、下垂体原基の発現プロファイルと一致する)。下垂体性 (非ニューロン) のホルモン産生細胞は、ニューロフィラメント $^-$ 、 NSE^- である。下垂体性ACTH産生細胞は、 $ACTH^+$ 、 $Tbx19^+$ 、 $PC2^-$ であり、その他の下垂体ホルモン産生細胞は $Tbx19^-$ である。また、下垂体中葉のMSH産生細胞は $ACTH^-$ 、 $Tbx19^+$ 、 $PC2^+$ である。下垂体性のGH産生細胞、PRL産生細胞及びTSH産生細胞は、 $Pitx1^+$ の中間前駆体を経て、各下垂体ホルモン産生細胞へと分化する。

[0034] 本発明の方法によれば、上記中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織、例えば吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織 (吻側頭部非神経外胚葉) とが、1つの凝集体中に同時に分化誘導される。このとき、吻側頭部外胚葉組織 (頭部非神経外胚葉) が表層に、その内側に中枢神経組織 (吻側視床下部組織) が存在する凝集体が得られる。

本発明のさらなる方法によれば、凝集体中にラトケ嚢様組織が形成される。この小嚢胞は、下垂体前駆組織と同一のマーカー発現を示し、形態学的にも類似した上皮構造や極性を有している。さらに、生体内の下垂体前駆組織（ラトケ嚢）と同じく、R×陽性の視床下部組織の近傍に存在し、吻側頭部非神経外胚葉組織とも隣接して形成される。このことは、本発明の分化誘導法において、胚発生過程における下垂体前駆組織の発生の微小環境が模倣されたことを示す。従って、本発明においては、このラトケ嚢様組織を下垂体前駆組織とも呼ぶ。

[0035] 下垂体ホルモン産生細胞の場合には、ACTH、GH、PRL、LH、FSH、TSHのそれぞれの、培地への放出若しくは細胞内におけるその前駆タンパク質の蓄積等を指標として、各下垂体ホルモン産生細胞の分化を確認することができる。

[0036] 各下垂体ホルモン産生細胞に特異的なマーカー遺伝子の発現を指標とする場合、ACTH産生細胞はACTH及びTb×19の発現を指標として、GH産生細胞はGHの発現を指標として、PRL産生細胞はPRLの発現を指標として、TSH産生細胞はTSHの発現を指標として、FSH産生細胞はFSHの発現を指標として、LH産生細胞はLHの発現を指標として、それぞれ特徴付けることができる。下垂体ホルモンはニューロンからも分泌され得るが、本発明の製造方法によって得られる各下垂体ホルモン産生細胞は、神経マーカーのNSEやニューロフィラメントが陰性である点で、そのようなニューロンと区別することができる。

[0037] マーカー遺伝子の発現は、定量PCRを、例えば、製造者の指示に従って7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で実施し、GAPDH発現によってデータを正規化することにより解析する。定量PCRの方法は当業者に公知である。或いは、目的とするマーカー遺伝子が、マーカー遺伝子産物とGFPやvenusなどとの融合タンパク質として発現されるように、細胞を操作してもよい（ノックイン）。マーカー遺伝子産物に対して特異的な抗体を用い

て、タンパク質の発現を検出することもできる。

[0038] これらのタンパク質の検出は、免疫染色又はラジオイムノアッセイにより実施することができる。また、その他の下垂体ホルモン産生についても、産生されるホルモン等に特異的な抗体等を用いて、同様のアッセイが可能である。このような方法は当業者に公知である。

[0039] (2) 幹細胞

「幹細胞」とは、細胞分裂を経ても同じ分化能を維持することができる細胞のことをいう。幹細胞の例としては、受精卵あるいはクローン胚由来で多能性を有する胚性幹細胞（ES細胞）、生体内の組織中に存在する体性幹細胞や多能性幹細胞、各組織の基になる肝幹細胞、皮膚幹細胞、生殖幹細胞、生殖幹細胞由来の多能性幹細胞、体細胞由来で核初期化によって得られる多能性幹細胞などが挙げられる。

[0040] なかでも「多能性幹細胞」とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、胎盤を除く生体を構成するすべての細胞（三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）由来の組織）に分化しうる能力（分化万能性（pluripotency））を有する幹細胞をいい、胚性幹細胞もこれに含まれる。「多能性幹細胞」は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、組織内幹細胞から得られる。また、体細胞に数種類の遺伝子を導入することにより、胚性幹細胞に似た分化万能性を人工的に持たせた細胞（人工多能性幹細胞ともいう）も含む。多能性幹細胞は、自体公知の方法で作成することが可能である。例えば、Cell 131 (5) pp. 861-872や、Cell 126 (4) pp. 663-676に記載の方法などが挙げられる。

[0041] 幹細胞としては、例えば温血動物、好ましくは哺乳動物に由来する細胞を使用できる。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、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。

具体的に本発明の方法で用いられる幹細胞としては、例えば、着床以前の

初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等の胚性幹細胞（以下、「胚性幹細胞Ⅰ」と省略）、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培養することによって樹立した胚性幹細胞（以下、「胚性幹細胞ⅠⅠ」と省略）、体細胞へ数種類の遺伝子を導入することにより、および／または化合物を作用させることにより樹立した誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）、および胚性幹細胞Ⅰ、胚性幹細胞ⅠⅠ又はiPS細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した多能性幹細胞（以下、「改変多能性幹細胞」と省略）が挙げられる。

[0042] より具体的には、胚性幹細胞Ⅰとしては、初期胚を構成する内部細胞塊より樹立された胚性幹細胞、始原生殖細胞から樹立されたEG細胞、着床以前の初期胚の多分化能を有する細胞集団（例えば、原始外胚葉）から単離した細胞、あるいはその細胞を培養することによって得られる細胞などが挙げられる。

胚性幹細胞Ⅰは、着床以前の初期胚を、文献（Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)）に記載された方法に従って培養することにより調製することができる。

[0043] 胚性幹細胞ⅠⅠは、例えば、Wilmutら（Nature 385, 810 (1997)）、Cibelliら（Science, 280, 1256 (1998)）、入谷明ら（蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999)）、Baguisiら（Nature Biotechnology, 17, 456 (1999)）、Wakayamaら（Nature, 394, 369 (1998)；Nature Genetics, 22, 127 (1999)；Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)）、RideoutⅢら（Nature Genetics, 24, 109 (2000)）等によって報告された方法を用いることにより、例えば以下のように作製することができる。

- [0044] 哺乳類動物細胞の核を摘出後初期化（核を再び発生を繰り返すことができるような状態に戻す操作）し、除核した哺乳動物の未受精卵に注入する方法を用いて発生を開始させ、発生を開始した卵を培養することによって、他の体細胞の核を有し、かつ正常な発生を開始した卵が得られる。
- [0045] 体細胞の核を初期化する方法としては複数の方法が知られている。例えば、核を提供する側の細胞を培養している培地を、5～30%、好ましくは10%の仔ウシ胎児血清を含む培地（例えば、M2培地）から3～10日、好ましくは5日間、0～1%、より好ましくは0.5%の仔ウシ胎児血清を含む貧栄養培地に変えて培養することで細胞周期を休止期状態（G0期もしくはG1期）に誘導することで初期化することができる。
- [0046] また、同種の哺乳動物の除核した未受精卵に、核を提供する側の細胞の核を注入し、数時間、好ましくは約1～6時間培養することで初期化することができる。
- [0047] 初期化された核は除核された未受精卵中で発生を開始することが可能となる。初期化された核を除核された未受精卵中で発生を開始させる方法としては複数の方法が知られている。細胞周期を休止期状態（G0期もしくはG1期）に誘導し初期化した核を、電気融合法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植することで卵子を活性化し発生を開始させることができる。
- [0048] 同種の哺乳動物の除核した未受精卵に核を注入することで初期化した核を、再度マイクロマニピュレーターを用いた方法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植し、卵子活性化物質（例えば、ストロンチウムなど）で刺激後、細胞分裂の阻害物質（例えば、サイトカラシンBなど）で処理し第二極体の放出を抑制することで発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。
- [0049] いったん発生を開始した卵が得られれば、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbo

r Laboratory Press (1994) ; Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) ; バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) 等に記載の公知の方法を用い、胚性幹細胞を取得することができる。

[0050] iPS細胞は、体細胞（例えば線維芽細胞、皮膚細胞等）に例えばOct 3/4、Sox 2及びKlf 4（必要に応じて更にc-Myc又はn-Myc）を導入することにより製造することが出来（Cell, 126: p. 663-676, 2006; Nature, 448: p. 313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26: p. 101-106, 2008; Cell 131: 861-872, 2007）、また、Oct 3/4及びSox 2、（必要に応じて更にKlf 4）を導入し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸を作用させることにより製造することも出来る（Nature Biotechnology, 26: p. 1269-1275, 2008）が、これらに限定されない。

[0051] 改変多能性幹細胞は、例えば、相同組換え技術を用いることにより作製できる。改変多能性幹細胞の作製に際して改変される染色体上の遺伝子としては、例えば、組織適合性抗原の遺伝子、神経系細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などがあげられる。染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) ; Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) ; バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) 等に記載の方法を用い、行うことができる。

- [0052] 具体的には、例えば、改変する標的遺伝子（例えば、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など）のゲノム遺伝子を単離し、単離したゲノム遺伝子を用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲティングベクターを作製する。作製したターゲティングベクターを幹細胞に導入し、標的遺伝子とターゲティングベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子を改変した幹細胞を作製することができる。
- [0053] 標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems製) や Universal Genome Walker™ Kits (CLONTECH製) などを用いることにより、標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離することができる。
- [0054] 標的遺伝子を相同組換えするためのターゲティングベクターの作製、及び相同組換え体の効率的な選別は、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) ; バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) 等に記載の方法にしたがって作製することができる。なお、ターゲティングベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができ、また、選別方法としては、ポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。
- [0055] 選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法やPCR法等があ

げられる。

[0056] また、幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞である K h E S - 1、K h E S - 2 及び K h E S - 3 は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。マウス胚性幹細胞の例としては、E B 5 細胞などが挙げられる。

[0057] 幹細胞は、自体公知の方法により維持培養できる。例えば、幹細胞は、ウシ胎児血清 (FCS)、Knockout™ Serum Replacement (KSR)、LIF を添加した無フィーダー細胞による培養により維持できる。

[0058] (3) 均一な幹細胞凝集体の形成及びその浮遊培養

本発明の分化誘導方法で用いる、均一な幹細胞の凝集体を形成させる工程及び凝集体を浮遊培養する工程は、特許文献 3 及び非特許文献 5 に開示された「S F E B q 法」とほぼ同様のものである。

[0059] 「均一な幹細胞の凝集体を形成させる」とは、幹細胞を集合させて幹細胞の凝集体を形成させて培養させる (凝集体培養) 際に、「一定の数の分散した幹細胞を迅速に凝集」させることで質的に均一な幹細胞の凝集体を形成することをいう。さらに、特に「細胞を迅速に凝集」させることによって、幹細胞から派生する細胞の上皮化を促進させることをいう。すなわち本明細書中、「細胞を迅速に凝集」させるとは、幹細胞を均一に凝集させることによって産生される細胞の上皮様構造を再現性よく形成させることをいう。

[0060] 均一な幹細胞の凝集体を「浮遊培養する」または「浮遊凝集体 (凝集塊ともいう) として培養する」とは、上記工程で得られた集合し均一な凝集体を形成した幹細胞群を、培養培地中において、細胞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 (本明細書中、これらの工程をあわせて、「S F E B q 法」と記載する)。幹細胞を浮遊培養する場合、浮遊凝集体の形成をより容易にするため、並びに／あるいは、効率的な分化誘導 (例えば、神経系細胞等の外胚葉系細胞への分化誘導) のために、フィーダー細胞の非存在下で培養を行うのが好ましい。

[0061] 均一な幹細胞の凝集体の形成は、「細胞を迅速に凝集」させることで均一な幹細胞の凝集体が形成され、幹細胞から産生される細胞の上皮様構造を再現性よく形成することができる限りどのような方法を採用してもよく、このような方法としては、例えば、ウェルの小さなプレート（96穴プレート）やマイクロポアなどを用いて小さいスペースに細胞を閉じ込める方法、小さな遠心チューブを用いて短時間遠心することで細胞を凝集させる方法などが挙げられる。

[0062] 凝集体の形成時に用いられる培養器は、「細胞を迅速に凝集」させることで均一な幹細胞の凝集体形成が可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このような培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられるが、細胞を迅速に凝集させるためには、上述のとおり、培養スペースが比較的小さい培養器を使用することが好ましい。そしてこれらの培養器は、均一な凝集体を形成させる観点から、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないものを使用できる。

[0063] 浮遊培養で用いられる培養器は、細胞の浮遊培養が可能なものであれば特に限定されず、上記と同様のものが使用され得る。凝集体を浮遊培養する場合も、上記同様、培養器は細胞非接着性であることが好ましい。浮遊培養において用いる培養器は、凝集体形成で使用した培養器をそのまま用いてもよい。

[0064] 凝集体形成時の幹細胞の濃度は、幹細胞の凝集塊をより均一に、効率的に形成させるように当業者であれば適宜設定することができるが、凝集体における内因性の増殖因子の発現が増加され、その結果、中枢神経組織と頭部非

神経外胚葉組織（特に、吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織）の両方が同時に分化誘導されるように、高細胞濃度（HCD）（large cell-aggregation(LCA)条件ともいう）とすることが好ましい。従来技術（例えば、非特許文献5、特許文献3等）では低細胞濃度で細胞を播種して凝集体形成が行われていたが、そのような低い細胞濃度では、凝集体中の内因性の増殖因子の発現増加が起こりにくく、外からBMPシグナル促進剤（例、BMP4）による刺激を加えない限り、1つの凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織（特に、吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織）の両方が同時に分化誘導され難い。

[0065] 上記「内因性の増殖因子」とは、BMP（Bone Morphogenetic protein）、特に、BMP2、BMP4、又はBMP2及びBMP4の両方を指す。凝集体における該内因性の増殖因子の発現が「増加する」とは、高細胞濃度での培養を開始してから7日目以降の時点において、低細胞濃度（例えば3000細胞/凝集体）で凝集体形成を行った場合の内因性増殖因子の発現と比較して増加していることをいい、少なくとも1.8倍以上、好ましくは1.9倍以上、より好ましくは2.0倍以上増加することをいう。また、内因性増殖因子の発現が高すぎると、逆に、下垂体や感覚器のプラコード形成を導く中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織、特に吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織（下垂体プラコードの場合）の形成を抑制するおそれがあるため、該内因性の増殖因子の発現の増加は、通常5.0倍以下、好ましくは4.0倍以下、より好ましくは3.5倍以下である。

[0066] 内因性増殖因子の発現は、mRNAレベル又はタンパク質レベルのいずれかで測定してもよいが、mRNAレベルで測定することが好ましい。mRNA又はタンパク質の定量は、当該分野で公知の方法を用いて行えばよい。mRNAの定量は、好ましくは定量的PCR（例、リアルタイムPCR）で行う。一態様において、内因性増殖因子の発現量とは、BMP2又はBMP4のいずれか一方の発現量を指す。

[0067] 一態様において、高細胞濃度での培養を開始してから7日目以降の時点に

において、高細胞濃度で凝集体形成を行った場合の凝集体における BMP 2 又は BMP 4 のいずれか一方の発現が、低細胞濃度（例えば3000細胞/凝集体）で凝集体形成を行った場合と比較して、少なくとも 1.8 倍以上、好ましくは 1.9 倍以上、より好ましくは 2.0 倍以上である。また、同時点において、低細胞濃度と比較して、凝集体における BMP 2 又は BMP 4 のいずれか一方の発現が、通常 5.0 倍以下、好ましくは 4.0 倍以下、より好ましくは 3.5 倍以下である。

[0068] 一態様において、高細胞濃度での培養を開始してから 7 日目以降の時点において、高細胞濃度で凝集体形成を行った場合の凝集体における BMP 2 及び BMP 4 のそれぞれの発現が、低細胞濃度（例えば3000細胞/凝集体）で凝集体形成を行った場合と比較して、少なくとも 1.8 倍以上、好ましくは 1.9 倍以上、より好ましくは 2.0 倍以上である。また、同時点において、低細胞濃度と比較して、凝集体における BMP 2 及び BMP 4 のそれぞれの発現が、通常 5.0 倍以下、好ましくは 4.0 倍以下、より好ましくは 3.5 倍以下である。

[0069] 一態様において、凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織（特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織）の両方を同時に分化誘導するには、凝集体における内因性増殖因子（即ち、BMP 2 及び/又は BMP 4）の発現が上述のように「増加する」結果が得られるような細胞濃度（高細胞濃度（HCD）又は large cell-aggregation(LCA)条件）で、凝集体の形成を行うことが重要である。特に、外から BMP シグナル促進剤（例、BMP 4）による刺激を加えない場合には、凝集体における内因性増殖因子（即ち、BMP 2 及び/又は BMP 4）の発現が増加するような細胞濃度（高細胞濃度（HCD）又は large cell-aggregation(LCA)条件）で凝集体の形成を行うことが好ましい。

[0070] 必要に応じて、凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織（特に吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織）の両方を分化誘導するためには、上記条件に加えて、外因性の TGF- β スーパーファミリーのうち BMP サブ

ファミリーに属するタンパク質のシグナル促進剤を、神経分化抑制を起こさない程度の濃度であるいは神経分化抑制を起こさない程度の期間に、下記の無血清培地中に添加してもよい。ここで、BMPサブファミリーに属するタンパク質とはBMP（BMP 2／4グループ（BMP 2、BMP 4）、OP-1グループ（BMP 5、BMP 6、BMP 7、BMP 8 a、BMP 8 b）、BMP 9グループ（BMP 9、BMP 10）、GDF 5グループ（GDF 5、GDF 6、GDF 7））やGDF（Growth and Differentiation Factor）に分類されるものを言い、特にBMP 2及び／又はBMP 4が好ましく、BMP 4が最も好ましい。

[0071] 外因性のBMPサブファミリーに属するタンパク質（例、BMP）のシグナル促進剤（例、BMP 4）は、凝集体の形成時から無血清培地へ含めていてもよいし、凝集体の浮遊培養開始から一定期間経過後に、無血清培地へ添加してもよい。浮遊培養開始から凝集体の浮遊培養開始後、上記シグナル促進剤を添加するまでの期間は、通常、240時間以内、好ましくは96時間以内、より好ましくは72時間以内である。

[0072] 一態様において、神経分化を抑制しない観点から、浮遊培養開始から一定期間経過後に、無血清培地中にBMPサブファミリーに属するタンパク質（例、BMP）のシグナル促進剤（例、BMP 2及び／又はBMP 4）が添加される。即ち、上記シグナル促進剤は、浮遊培養開始から早くとも48時間経過後に、無血清培地中へ添加される。

[0073] 外因性のBMPサブファミリーに属するタンパク質（例、BMP）のシグナル促進剤の濃度は、例えば、BMP 2又はBMP 4を用いる場合、0.01～10 nMの範囲が例示される。

[0074] また、凝集体中における中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織（特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織）の分化誘導を促進するため、無血清培地はShhシグナル促進剤を含んでいてもよい。

[0075] Shhシグナル促進剤は、Shhにより媒介されるシグナル伝達を増強し得るものである限り特に限定されない。Shhシグナル促進剤としては、例

例えば、Hedgehogファミリーに属するタンパク質（例えば、Shh、Shh-N）、Shh受容体、Shh受容体アゴニスト（例、Purmorphamine、SAG）が挙げられるが、SAGが最も好ましい。

[0076] SAGはShhより数倍以上強い活性を有し、また比較的安価で高濃度まで用いることができるため、強いヘッジホッグシグナルの活性を引き起こすことが可能である（Danjo et al, JNS, 2010）。

[0077] Shhシグナル促進剤は、凝集体の形成時から無血清培地へ含めていてもよいし、凝集体の浮遊培養開始から一定期間経過後に、無血清培地へ添加してもよい。浮遊培養開始から凝集体の浮遊培養開始からShhシグナル促進剤添加までの期間は、通常、192時間以内、好ましくは168時間以内、より好ましくは144時間以内である。

[0078] 用いられるShhシグナル促進剤の濃度は、凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織（特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織）の両方を分化促進可能であるような濃度であればよい。かかる濃度は、例えばSAGを用いる場合、下記の無血清培地中、通常約10~2000nM、好ましくは約50~1000nMであり、最も好ましくは約100~400nMである。

[0079] 好ましい態様において、凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織（特に吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織）の両方を分化誘導するため、凝集体形成及び／又は浮遊培養に用いる無血清培地には、外因性のBMPサブファミリーに属するタンパク質（例、BMP）のシグナル促進剤（好ましくはBMP2及び／又はBMP4）、及びShhシグナル促進剤（好ましくは、SAG）が添加される。この場合、BMPサブファミリーに属するタンパク質（例、BMP）のシグナル促進剤は、凝集体の形成時から無血清培地へ含めていてもよいし、凝集体の浮遊培養開始から一定期間経過後に、無血清培地へ添加してもよい。浮遊培養開始から当該シグナル促進剤添加までの期間は、240時間以内、好ましくは96時間以内、より好ましくは72時間以内である。当該シグナル促進剤は、神経分化を抑制しないよう、浮遊

培養開始から早くとも48時間経過後に、無血清培地中へ添加するのが好ましい。また、Shhシグナル促進剤は、凝集体の形成時から無血清培地へ含めていてもよいし、凝集体の浮遊培養開始から一定期間経過後に、無血清培地へ添加してもよい。浮遊培養開始からShhシグナル促進剤添加までの期間は、通常、192時間以内、好ましくは168時間以内である。各因子の濃度範囲は、上述の通りである。

[0080] マウスの幹細胞を使用する場合、凝集体形成時の幹細胞の濃度は、幹細胞の凝集塊をより均一に、効率的に形成させるように当業者であれば適宜設定することができるが、凝集体における内因性の増殖因子の発現が増加し、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織の両方、例えば吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織の両方が同時に分化誘導されるべく、1つの凝集体につき $5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個（好ましくは $8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個）の幹細胞を含む幹細胞の凝集体が形成されるように、凝集体形成時の幹細胞の濃度は、高細胞濃度で開始することが好ましい。例えば96穴マイクロウェルプレートを用いる場合、1ウェル（ $150 \mu\text{l}$ ）あたり約 $4.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 細胞、好ましくは約 $5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 細胞、最も好ましくは約 $8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 細胞となるように調製した液を添加し、プレートを静置して凝集体を形成させる。培養スペースが十分に小さい培養容器を使用することにより、ウェル1つにつき1個の凝集体を形成させることができる。この場合、形成される凝集体に含まれる幹細胞の数と同数（ $5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個、好ましくは $8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個）か、それをやや上回る数の幹細胞を1ウェルに加え、培養することにより、目的とする1つの凝集体につき $5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個（好ましくは $8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個）の幹細胞を含む幹細胞の凝集体を形成させることができる。当業者であれば、ウェルの大きさ、形状、培地の体積等の条件を考慮し、1つの凝集体につき $5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個（好ましくは $8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個）の幹細胞を含む幹細胞の凝集体を形成させることができる、1ウェルあたりに加える細胞数を容易に適宜調節することが出来る。

[0081] ヒトの幹細胞を使用する場合にも、凝集体形成時の幹細胞の濃度は、幹細胞の凝集塊をより均一に、効率的に形成させるように当業者であれば適宜設定することができ、凝集体における内因性の増殖因子の発現が増加し、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織の両方（特に吻側視床下部組織と吻側頭部外胚葉組織の両方）が同時に分化誘導されるように、高い細胞濃度で開始することが好ましい。ヒトの場合、1つの凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織の両方（特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織）の両方が同時に分化誘導されるためには、上記マウスの場合の濃度よりもさらに細胞数を多くする必要が有り得る。例えば、ヒトの場合の高細胞濃度は、1つの凝集体につき約 $0.9 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 個の幹細胞を含む幹細胞の凝集体が形成されるような濃度とすることが好ましい。例えば96穴マイクロウェルプレートを用いる場合、1ウェル（ $150 \mu\text{l}$ ）あたり約 $0.9 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 細胞かそれよりやや多い細胞となるように調製し、目的とする1つの凝集体につき $0.9 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 個の幹細胞を含む幹細胞の凝集体を形成させることができる。一方、上述のように、BMPサブファミリーに属するタンパク質（例、BMP）のシグナル促進剤（例、BMP2及び／又はBMP4）を、無血清培地に添加する場合、必ずしも高細胞濃度である必要は無く、1つの凝集体につき $0.3 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 個の幹細胞を含む幹細胞の凝集体が形成されるような濃度とすることが好ましい。当業者であれば、ウェルの大きさ、形状、培地の体積等の条件を考慮し、適切な細胞数を適宜調節することが出来る。

[0082] マウス及びヒト以外の幹細胞を使用する場合であっても、凝集体における内因性の増殖因子の発現が増加し、中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織の両方、特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織の両方が同時に分化誘導されるように、その幹細胞が由来する動物種に応じて、1つの凝集体当たりの幹細胞数を適宜調節することができる。

[0083] また凝集体形成時の培養温度、 CO_2 濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、

好ましくは約37℃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。

[0084] 凝集体形成までの時間は、細胞を迅速に凝集させることができる限り、用いる幹細胞によって適宜決定可能であるが、均一な凝集体を形成するために出来る限り早く行われることが望ましい。このような凝集体形成は2日間ほどの時間をかけて行なわれていたが（例えば、Watanabe, K. ら、Nature Neurosci. 8, 288-296、Schuldiner M, Benvenisty N. Factors controlling human embryonic stem cell differentiation. Methods Enzymol. 2003; 365: 446-461を参照のこと）、この時間を短くすることにより、目的の組織又は細胞等の効率よい分化誘導をもたらすことが可能となる。例えばマウス胚性幹細胞の場合、好ましくは12時間以内、より好ましくは6時間以内に凝集体を形成させることが望ましい。一方ヒト胚性幹細胞の場合は、好ましくは24時間以内、より好ましくは12時間以内に凝集体を形成させることが望ましい。この時間を超えると、均一な幹細胞の凝集体が形成できず、後の分化効率が著しく低下する原因となり得る。この凝集体形成までの時間は、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。

[0085] 幹細胞の凝集体が「均一に」形成されたことや、凝集体を形成する各細胞において上皮様構造が形成されたことは、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、分化効率の凝集体間の再現性などにに基づき、当業者であれば判断することが可能である。

[0086] 均一な幹細胞の凝集体の形成として具体的には、例えば胚性幹細胞の維持培養後、分散処理（例えば、トリプシン/EDTA処理）した胚性幹細胞を適切な培地（目的とする組織又は細胞に応じて後述する培地に切り替える）

に懸濁し、細胞非接着性のU底96穴培養プレートに、1ウェルあたり好ましくは $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 細胞、より好ましくは $3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ 細胞になるように150 μ Lの上記培地に浮遊させ、凝集体を速やかに形成させる方法が挙げられる。

[0087] 凝集体の浮遊培養における培養温度、CO₂濃度等の他の培養条件も適宜設定でき、例えば、凝集体形成時の培養条件として上記したのと同様の条件が挙げられる。本工程の時間は特に限定されないが、通常48時間以上である。

[0088] 凝集体の形成時に用いられる培地と浮遊培養に用いられる培地とは、同じでも異なってもよいが、凝集体の形成で用いた培地をそのまま浮遊培養に用いても構わない。

[0089] 凝集体の形成時／浮遊培養時に用いられる培地は、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、 α MEM培地、DMEM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地など、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。

[0090] 凝集体の形成時／浮遊培養時に用いられる無血清培地とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。本発明においては、上述したようなものが挙げられる。

[0091] 無血清培地では、一般に血清の代替としていくつかの増殖因子(Wnt、TGF β 、BMP、レチノイン酸、FGF、lipid-richアルブミンなど)を添加することが多い。しかし、下垂体前駆組織の分化には、これらの増殖因子はいずれも阻害的に働く。しかも、最も頻繁に無血清培地に添加されるインシュリンも強く下垂体前駆組織の分化を阻害する。この阻害は、インシュリンの下流シグナルであるAktという細胞内酵素(リン酸化酵

素)の活性化が原因であると考えられる(特許文献3及び非特許文献5)。

[0092] 従って、上記無血清培地、特に浮遊培養に用いる培地(本明細書中で「分化培地」とも呼ぶ)は、増殖因子(Nodalシグナル促進剤、Wntシグナル促進剤、FGFシグナル促進剤、BMPシグナル促進剤、レチノイン酸等が挙げられるが、好ましくはこれらに限定されない任意の増殖因子)並びにインシュリン類を実質的に含有しない無血清培地であることが好ましい。

[0093] 上記無血清培地は、例えば、血清代替物を含有するものであり得る。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、インシュリン、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、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、knockout Serum Replacement(KSR)、Chemically-defined Lipid concentrated(Gibco社製)、Glutamax(Gibco社製)が挙げられる。

[0094] これらの血清代替物が増殖因子及びインシュリン類を含む場合には、以下に記載するように、当該増殖因子及びインシュリン類に対する阻害剤を培地に添加することが好ましいが、増殖因子及びインシュリン類を含む血清代替物を用いないことが最も好ましい。血清代替物は、増殖因子及びインシュリン類を含まないことが明らかな、化学的に規定された(Chemically-defined)ものであることが好ましい。

[0095] ただし、ヒトを含む霊長類の多能性幹細胞の場合には、以下に記載するように、インシュリン類なしで浮遊培養すると生存が悪くなる場合があるので、このような場合には必要に応じてインシュリン類を培地に添加することもまた好ましい。

[0096] また、本発明の方法で用いられる無血清培地は、必要に応じて、脂肪酸又は脂質、アミノ酸(例えば、非必須アミノ酸)、ビタミン、増殖因子、抗酸

化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を含有できるが、上記と同様、増殖因子を含有しないことが最も好ましい。

[0097] 「増殖因子及びインシュリン類を実質的に含有しない無血清培地」とは、増殖因子及びインシュリン類を全く含有しない無血清培地、あるいは下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞への選択的分化に不利な影響を与えない程度の量の増殖因子及び／又はインシュリン類を含有する無血清培地をいう。このような無血清培地は、例えば、培地成分としての増殖因子及びインシュリン類の未添加、または増殖因子及びインシュリン類を含有する培地からのこれらの因子の除去処理により調製できる。

[0098] 或いは、増殖因子及びインシュリン類を実質的に含有しない無血清培地は、増殖因子及びインシュリン類が実質的に不活化された無血清培地であり得、この培地は、増殖因子及びインシュリン類含有無血清培地に対する増殖因子シグナル阻害剤及び／又はインシュリンシグナル阻害剤の添加により、下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞の選択的分化に不利な影響を与えない程度にまで増殖因子及びインシュリン類の活性が喪失した無血清培地をいう。

[0099] 本明細書中で「増殖因子を実質的に含有しない培地」という場合の「増殖因子」とは、無血清培地での細胞培養において、血清代替物として一般に添加される因子であって、ES細胞からの下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞の選択的分化を阻害／抑制する作用を有する任意の因子を意味する。例えば、この「増殖因子」としては、Nodalシグナル促進剤、Wntシグナル促進剤、FGFシグナル促進剤、BMPシグナル促進剤、レチノイン酸等を挙げることができるが、これらに限定されない。好ましくは、「増殖因子を実質的に含有しない培地」は、Nodalシグナル促進剤、Wntシグナル促進剤、FGFシグナル促進剤、BMPシグナル促進剤及びレチノイン酸の全てを、実質的に含有しない培地である。また、lipid-richアルブミンも「増殖因子」に含まれ、本発明において使用される培地は好ましくはlipid-richアルブミンを含有しない培地である。

- [0100] 本明細書中で使用する場合、「インシュリン類」とは、インシュリンシグナルを促進する化合物を意味する。インシュリンシグナル促進剤とは、インシュリン類によるシグナルの伝達に対して促進的に作用するものである限り特に限定されず、インシュリンシグナル伝達経路のどの段階で作用するものであってもよい（インシュリンの上流または下流に対して作用する因子、インシュリンのアゴニスト、類似物質など）。
- [0101] インシュリン類には、インシュリン及びインシュリンの類似物質（アナログ）が含まれる。インシュリンの類似物質とは、インシュリン様の作用（本明細書中では、多能性幹細胞からの、下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞への選択的分化を阻害／抑制する作用をいう）を有する任意の物質をいい、例えば、IGF-1等が挙げられる。
- [0102] 上記無血清培地を得るための増殖因子及びインシュリン類含有培地からの増殖因子及びインシュリン類の除去処理には、例えば、上記増殖因子（例えば、Nodalシグナル促進剤、Wntシグナル促進剤、FGFシグナル促進剤、BMPシグナル促進剤、レチノイン酸、lipid-richアルブミンなど）及びインシュリン類に対する抗体を用いることができる。また、増殖因子及びインシュリン類の不活化は、増殖因子シグナル阻害剤及びインシュリンシグナル阻害剤の添加によって実施され得る。このような阻害剤は、増殖因子又はインシュリンによるシグナル伝達経路の上流又は下流を阻害する任意の物質であり得、例えば、増殖因子／インシュリンに対する抗体、増殖因子／インシュリンの可溶性受容体、増殖因子／インシュリン受容体に対する抗体、増殖因子／インシュリンのアンタゴニストなどが挙げられる。これらの物質は、所望の効果（下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞への選択的分化）を得るのに適した量で培地に添加される。
- [0103] ただし、上述の通り、上記無血清培地は、凝集体中に中枢神経組織と頭部非神経外胚葉組織の両方、特に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織の両方が同時に分化誘導されるように、神経分化抑制を起こさない程度の濃度で、外因性のBMP2及び/又はBMP4のシグナル

促進剤（例えば、BMP 2 及び／又は BMP 4）を含んでいてもよい。BMP 2 及び／又は BMP 4 を添加する場合、神経分化を抑制しにくいように 0.01 ~ 10 nM の濃度となるように添加することが好ましい。

[0104] 以下、上に具体的に列挙した増殖因子／インシュリン類の除去処理に使用され得る物質について説明するが、それ以外の増殖因子／インシュリン類についても、それらの除去処理に使用され得る物質の選択や使用量の調整などは、当業者の通常の技術範囲内であることは言うまでもない。

[0105] Nodal シグナル阻害剤は、Nodal 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。Nodal シグナル阻害剤としては、例えば、SB431542 (Sigma)、Lefty-A、Lefty-B、Lefty-1、Lefty-2、可溶性 Nodal 受容体、Nodal 抗体、Nodal 受容体阻害剤が挙げられるが、なかでも、SB431542 (4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide) が好ましい。

[0106] Wnt シグナル阻害剤は、Wnt 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。Wnt シグナル阻害剤としては、例えば、Dkk1、Cerberus タンパク質、Wnt 受容体阻害剤、可溶性 Wnt 受容体、Wnt 抗体、カゼインキナーゼ阻害剤、ドミナントネガティブ Wnt タンパク質が挙げられるが、なかでも、Dkk1 が好ましい。

[0107] FGF シグナル阻害剤は、FGF 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。FGF シグナル阻害剤としては、例えば、抗 FGF 抗体、可溶性 FGF 受容体、FGF 受容体阻害剤（例えば、Su5402）が挙げられる。

[0108] BMP シグナル阻害剤は、BMP 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。BMP シグナル阻害剤としては、例えば、BMP Rf c (R&D)、抗 BMP 抗体、可溶性 BMP 受容体、BMP 受容体阻害剤が挙げられるが、なかでも BMP Rf c が好ましい。

- [0109] レチノイン酸 (RA) 阻害剤は、RA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。RA阻害剤としては、例えば、抗RA抗体、可溶性RA受容体、RA受容体阻害剤が挙げられる。
- [0110] 浮遊培養に用いられる上記各シグナル阻害剤の濃度は、視床下部ニューロンの前駆細胞への選択的分化を達成可能であるような濃度であり得る。例えば、SB431542について、このような濃度は、約0.1~100nM、好ましくは約5~30nMである。Dkk1については、約10~1000ng/ml、好ましくは約100~1000ng/mlである。また、BMPRFcについては、約0.1~10μg/ml、好ましくは約0.5~3μg/mlである。
- [0111] 上記各シグナル阻害剤は、多能性幹細胞の培養開始時に培地に添加しておくことが最も好ましい。
- [0112] インシュリンの細胞内シグナル伝達には、大きく分けて2つの経路 (MAPK経路とPI3K-Akt経路) が関与しているが、本発明の浮遊培養で使用されるインシュリンシグナル阻害剤としては、インシュリンシグナル伝達経路の下流因子であるPI3Kの阻害剤、そしてさらに下流の因子であるAktの阻害剤が挙げられる。本発明において使用され得るPI3K阻害剤としては、LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride) (Cayman Chemical)、Wortmannin (FERMENTEK) などが挙げられるが、好ましくはLY294002である。本発明において使用され得るAkt阻害剤としては、Akt inhibitor 1~X (Calbiochem) などが挙げられるが、好ましくはAkt inhibitor VIII (1,3-Dihydro-1-(1-((4-(6-phenyl-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-yl)phenyl)methyl)-4-piperidinyl)-2H-benzimidazol-2-one) である。

[0113] インシュリンシグナルが阻害され、下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞の選択的分化が達成される限り、浮遊培養においては、上記P I 3 K阻害剤及びA k t阻害剤から選択されるいずれか一方の阻害剤を単独で用いてもよく、あるいはP I 3 K阻害剤とA k t阻害剤とを併用してもよい。各阻害剤から2種以上を選択して併用することもできる。

[0114] 浮遊培養に用いられるP I 3 K阻害剤/A k t阻害剤の濃度は、下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞への選択的分化を達成可能であるような濃度であり得る。例えば、L Y 2 9 4 0 0 2について、このような濃度は、約0.5~30 μ M、好ましくは約2~10 μ Mである。A k t i n h i b i t o r V I I I Iについては、約0.1~10 μ M、好ましくは約0.5~5 μ Mである。

[0115] 好ましい態様において、本発明で使用される分化培地は、上述の増殖因子もインシュリン類も含有しない、化学的に規定された (C h e m i c a l l y d e f i n e d) 培地 (g r o w t h f a c t o r - f r e e C D M ; g f C D M と呼ぶ) である。具体的には、この分化培地として、I s c o v e ' s M o d i f i e d D u l b e c c o ' s M e d i u m (I M D M) / H a m s F 1 2 1 : 1 (I n v i t r o g e n) に、1 \times C h e m i c a l l y - d e f i n e d l i p i d c o n c e n t r a t e (I n v i t r o g e n)、モノチオグリセロール (450 μ M; S i g m a) および牛血清アルブミン (>99%の純度の再結晶精製品; S i g m a) を添加したものが用いられる (W a t a y a ら、P N A S. 1 0 5 (3 3) , 1 1 7 9 6 - 1 1 8 0 1)。このg f C D M培地は、以前に報告されたC D M培地 (M o l. C e l l. B i o l. 1 5 : 1 4 1 - 1 5 1 (1 9 9 5)) を改変したものである。

内因性の増殖因子/インシュリンの作用を抑制するため、このようなg f C D M培地あるいは他の培地に増殖因子阻害剤/インシュリン阻害剤をさらに添加してもよい。

[0116] 別の好ましい態様において、本発明で使用される分化培地は、P I 3 K阻

害剤及びAkt阻害剤からなる群より選択される少なくとも1つの阻害剤並びにインシュリン類を含有し、且つインシュリン以外の上述の増殖因子を実質的に含有しない無血清培地である。例えば、特に霊長類の多能性幹細胞の分化誘導においては、インシュリンを含有しない培地により浮遊培養を行うと、細胞が死滅して増殖しにくい場合がある。このような細胞死を回避するために、細胞増殖を亢進させるためのインシュリン添加を実施し、同時にインシュリンの分化誘導阻害効果に拮抗するインシュリンシグナル阻害剤（例、PI3K阻害剤/Akt阻害剤）を添加することが好ましい。この場合、分化培地に含まれるインシュリン類の濃度は、多能性幹細胞の増殖を促進し得る濃度である。例えば、インシュリンについてこのような濃度は、通常約0.02~40 µg/ml、好ましくは約0.1~10 µg/mlである。PI3K阻害剤及びAkt阻害剤の濃度範囲は上述の通りである。

[0117] PI3K阻害剤/Akt阻害剤は、多能性幹細胞の培養開始時に培地に添加しておくことが最も好ましいが、げっ歯類（例えばマウス）多能性細胞の分化の場合は少なくとも培養6日目まで（好ましくは少なくとも培養2日目までに添加する）の時期に、霊長類（例えばヒト）多能性細胞の分化の場合は少なくとも培養24日目まで（好ましくは少なくとも培養9日目までに添加する）の時期には、分化培地に添加すべきである。

[0118] 分散浮遊培養時の細胞死を抑制するために、インシュリン添加に加えて、ROCK阻害剤（Y-27632（(+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride）；渡辺ら、Nature Biotechnology, 25, 681-686, 2007）を培養開始時から添加することが好ましい。浮遊培養に用いられるROCK阻害剤の濃度は、分散浮遊培養時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0.1~200 µM、好ましくは約2~50 µMである。

[0119] (4)さらなる分化誘導

本発明では、上述のように、高細胞濃度の多能性幹細胞の条件で凝集体を形成させることにより、幹細胞の凝集体における内因性の増殖因子の発現が増加して、吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織の両方が同時に分化誘導される。このような凝集体において、L i m 3 陽性細胞の分化誘導を促進するため、ラトケ嚢様組織（下垂体前駆組織）の分化誘導を促進するため、或いは得られた下垂体前駆組織から下垂体ホルモン産生細胞をさらに分化させるために、以下に記載する培地を用いて浮遊培養を行なうことができる。

生体内での下垂体発生の模式図は図 1 a に、各種下垂体ホルモン産生細胞の発生の模式図は図 3 a に示す。

[0120] (A) L i m 3 陽性細胞及び下垂体前駆組織の分化誘導

本発明においては、高細胞濃度の多能性幹細胞の条件で凝集体を形成させることにより、幹細胞の凝集体における内因性の増殖因子の発現が増加して、1つの凝集体に吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部外胚葉組織の両方が分化誘導されるが、該凝集体内に含まれる細胞のL i m 3 陽性細胞への分化を促進し、下垂体前駆組織（ラトケ嚢）への分化を促進するために、浮遊培養に用いる無血清培地中はS h hシグナル促進剤を含んでもよい。

[0121] 用いられるS h hシグナル促進剤の濃度は、L i m 3 陽性細胞への分化を促進可能であるような濃度であればよい。かかる濃度は、例えばS A Gを用いる場合、無血清培地（好ましくはg f C D M）中、通常約10～2000 nM、好ましくは約50～1000 nMであり、最も好ましくは約100～400 nMである。

[0122] S h hシグナル促進剤を無血清培地に添加する時期は、凝集体中におけるL i m 3 陽性細胞の誘導を促進する限り特に限定されず、浮遊培養開始時に培地に添加されていなくてもよい。しかしながら、浮遊培養開始からS h hシグナル促進剤の添加までの時間が長くなるほど、凝集体中に誘導されるL i m 3 m R N Aの発現量が少なくなるので（図 1 i 参照）、S h hシグナ

ル促進剤を浮遊培養（分化培養ともいう）開始時から添加することが好ましい。例えば、S h hシグナル促進剤は、好ましくは浮遊培養開始時～浮遊培養3日後、より好ましくは浮遊培養開始時～浮遊培養2日後、より好ましくは浮遊培養開始時～浮遊培養1日後、最も好ましくは浮遊培養開始時に、培地中に添加する。

[0123] S h hシグナル促進剤を含む無血清培地中での浮遊培養の期間は、L i m 3陽性細胞を誘導するのに十分な期間であれば特に限定されないが、例えばマウスの凝集体の場合、通常7～14日程度、ヒト凝集体の場合、通常10～30日程度である。

[0124] 培地中のS h hシグナル促進剤の濃度は、必要に応じて培養途中で切り替えてもよい。例えば、凝集体中にL i m 3陽性細胞が誘導されるまで、凝集体をS h hシグナル促進剤を含む無血清培地中で浮遊培養し、一旦L i m 3陽性細胞が誘導された後は、S h hシグナル促進剤を含有しない無血清培地中で浮遊培養を継続することができる。一実施態様において、S A Gを使用する場合、下垂体前駆組織の分化誘導の促進には、浮遊培養開始時からL i m 3陽性細胞が誘導されるまで（例、培養10日目まで）100 nM乃至400 nMの濃度のS A G含有培地、その後S A Gなしの培地を用いることができる。一実施態様において、下垂体前駆組織から各種下垂体ホルモン産生細胞を分化誘導させる場合には、浮遊培養開始～培養7日目まで400 nMのS A G含有培地、その後培養10日目まで100 nMのS A G含有培地、その後S A Gなしの培地を用いることができ、別の実施形態において、浮遊培養開始～培養10日目まで400 nMのS A G含有培地を用い、その後培地を半分交換して8日間まで培養してもよいが、下垂体前駆組織の分化誘導が促進される限り、これらの条件に限定されない。L i m 3陽性細胞が誘導された後、引き続きS h hシグナル促進剤を含有する無血清培地中で浮遊培養を継続して、下垂体ホルモン産生細胞の分化誘導まで行うこともできるが、好ましくは、凝集体中にL i m 3陽性細胞が誘導されるまで、凝集体をS h hシグナル促進剤を含む無血清培地中で浮遊培養し、一旦L i m 3陽性細胞

胞が誘導された後は、S h hシグナル促進剤を含有しない無血清培地中で浮遊培養を継続することにより、凝集体中のL i m 3陽性細胞が、L i m 3陽性の上皮性の小嚢胞（即ち、下垂体前駆組織）を形成する。

[0125] 一態様において、無血清培地中に、1つの凝集体につき $8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ 個の幹細胞を含む幹細胞の凝集体（マウス幹細胞の場合）或いは1つの凝集体につき $9 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ 個の幹細胞を含む幹細胞の凝集体（ヒト幹細胞の場合）を形成させ、形成された凝集体をS h hシグナル促進剤を含有する無血清培地中で浮遊培養することにより、視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含む凝集体が形成され、該凝集体中にL i m 3陽性細胞が誘導され、その結果、視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含み、且つL i m 3陽性細胞を含む凝集体を得ることができる。

[0126] 一態様において、視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含む凝集体（好ましくは、L i m 3陽性細胞を更に含む）をS h hシグナル促進剤を実質的に含有しない無血清培地中で更に浮遊培養することにより、該凝集体中にL i m 3陽性の上皮性の小嚢胞が形成され、下垂体前駆組織を得ることができる。

[0127] (B) 下垂体前駆組織の分化誘導の促進

下垂体前駆組織の分化誘導において、下垂体前駆組織の分化誘導を促進するため、即ち、凝集体におけるL i m 3陽性の上皮性の小嚢胞の形成数を増加させるため又はL i m 3 m R N Aの発現量を増加させるために、上記S h hシグナル促進剤を含む無血清培地での浮遊培養後、F G Fシグナル促進剤を含む培地を用いることもできる。

[0128] F G Fシグナル促進剤は、F G Fにより媒介されるシグナル伝達を増強し得るものである限り特に限定されない。F G Fシグナル促進剤としては、好ましくは、F G F（例、F G F 1～23）、F G Fアゴニスト、F G F受容体アゴニストペプチドが挙げられる。好ましいF G Fシグナル促進剤は、F G F 8および／又はF G F 10である。

[0129] 用いられるF G Fシグナル促進剤の濃度は、L i m 3発現細胞の形成数増

加又はL i m 3 m R N Aの発現量増加が達成可能であるような濃度であればよい。かかる濃度は、例えばF G F 8又はF G F 10の場合、無血清培地、好ましくはg f C D M中、約2～1000 n g / m l、好ましくは約20～400 n g / m lであり、最も好ましくは約200 n g / m lである。

[0130] F G Fシグナル促進剤は、凝集体の浮遊培養の任意の時点で培地に添加してもよいが、好ましくは、上記S h hシグナル促進剤を含む無血清培地中での培養後に使用するS h hシグナル促進剤を含まない培地中に添加する。例えば、凝集体中にL i m 3陽性細胞が誘導されるまで、凝集体をS h hシグナル促進剤を含む無血清培地中で浮遊培養し、一旦L i m 3陽性細胞が誘導された後は、S h hシグナル促進剤を含有せず、且つF G Fシグナル促進剤（好ましくはF G F 8又はF G F 10）を含有する無血清培地中で浮遊培養を継続することができる。一実施態様において、浮遊培養開始からL i m 3陽性細胞が誘導されるまで（例、培養10日目まで）S A G含有培地（例えば、100 n M乃至400 n MのS A Gを含有する培地）を用い、その後S A Gを含有せず、且つF G Fシグナル促進剤（好ましくはF G F 8又はF G F 10）を含有する培地を用いる。この場合、F G Fシグナル促進剤（好ましくはF G F 8又はF G F 10）は、L i m 3陽性細胞の誘導後（例、培養10日目以降）のいずれの時点で添加してもよいが、好ましくは培養10日目～培養18日目の間、より好ましくは培養10日目～培養13日目の間に、好ましくは3日間、F G Fシグナル促進剤（好ましくはF G F 8又はF G F 10）を上記濃度範囲内で維持する。

[0131] (C) A C T H産生細胞の分化誘導

形成された下垂体前駆組織からA C T H産生細胞を分化誘導するために、下垂体前駆組織の形成が達成された後、N o t c hシグナル阻害剤を含有する無血清培地中で、下垂体前駆組織をさらに浮遊培養することができる。本明細書中で使用する「A C T H産生細胞」は、下垂体性A C T H産生細胞を指し、A C T H⁺ニューロンは含まれない。

[0132] N o t c hシグナル阻害剤は、N o t c h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。N o t c hシグナル阻害剤としては、例えば、D A P T、D B Z、M D L 2 8 1 7 0などが挙げられるが、なかでも、D A P Tが好ましい。

[0133] 用いられるN o t c hシグナル阻害剤の濃度は、A C T H産生細胞の分化誘導を達成可能であるような濃度であり得る。かかる濃度は、例えばD A P Tの場合は、無血清培地中、好ましくはg f C D M培地中、約0. 1~1 0 0 0 μ M、好ましくは約0. 5~5 0 0 μ M、より好ましくは約1~1 0 0 μ M、最も好ましくは約1 0 μ Mであり得る。

[0134] N o t c hシグナル阻害剤を含む無血清培地は、上記浮遊培養によって下垂体前駆組織が形成された後に使用する。このような培地は、下垂体前駆組織が形成された後のいずれの時点で使用してもよい。N o t c hシグナル促進剤を含む無血清培地は、S h hシグナル促進剤を含有しないことが好ましい。例えば、上記のように、培養開始時からL i m 3陽性の上皮性の小嚢胞が形成されるまで（例、培養1 0日目まで）S A G含有培地（例えば、培養開始時~7日目まで4 0 0 nMのS A Gを含有する培地、7日目~1 0日目まで1 0 0 nMのS A Gを含有する培地）を用い、その後S A Gなしの培地を用いる場合、N o t c hシグナル阻害剤（例、D A P T）は、凝集体中にL i m 3陽性の上皮性の小嚢胞が形成された後（即ち、下垂体前駆組織が形成された後）のいずれの時点で添加してもよい。好ましくは浮遊培養1 0日目~培養3 0日目、より好ましくは培養1 4日目~培養2 2日目、より好ましくは培養1 8日目~培養2 2日目、最も好ましくは培養1 8~1 9日目の間又は培養2 0日目~2 1日目の間に、約3日間、好ましくは約1日間にわたり、N o t c hシグナル阻害剤（例、D A P T）を上記濃度範囲内で含有する無血清培地（好ましくはg f C D M培地）中で、下垂体前駆組織を浮遊培養する。一実施形態では、S A G含有培地での培養後、培養1 8日目に1 0 μ MのD A P Tが培地中に含まれるようにし、1 9日目に培地を半分交換して1日間培養する。

[0135] (D) A C T H産生細胞以外の下垂体ホルモン産生細胞の分化誘導

形成された下垂体前駆組織から、ACTH産生細胞以外の下垂体ホルモン産生細胞（GH産生細胞、PRL産生細胞、LH産生細胞、FSH産生細胞及びTSH産生細胞）を分化誘導するために、下垂体前駆組織の形成が達成された後、それぞれ以下の培地を用いて、下垂体前駆組織をさらに浮遊培養することができる。

[0136] (i) GH産生細胞の分化誘導

GH産生細胞の分化誘導には、グルココルチコイドを含む無血清培地が使用され得る。グルココルチコイドの例としては、ヒドロコチゾン（コルチゾールともいう）、コルチコステロン、或いはそれらと同様の生物活性を有する合成化合物（デキサメタゾンなど）などが挙げられる。GH産生細胞の分化誘導の効率を上昇させるためには、この無血清培地がインシュリン類をさらに含むことが好ましい。インシュリン類の例としては、既に本明細書中で列挙したものなどが挙げられる。

例えば、本発明においてGH産生細胞を分化誘導するために使用され得る培地は、ヒドロコチゾンを約2～約2000 ng/ml、好ましくは約20～1000 ng/ml、最も好ましくは約200 ng/ml、あるいはデキサメタゾンを約0.1～約100 ng/ml、好ましくは約1～50 ng/ml、最も好ましくは10 ng/ml 含み、インシュリン類を約0.2～30 nM、好ましくは約0.5～10 nM、最も好ましくは約1 nM 含む、無血清培地、好ましくはgfCDM培地である。

[0137] 上記培地は、Shhシグナル阻害剤処理の後に使用することが好ましい。例えば、培養開始時からLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成されるまで（例、培養10日目まで）SAG含有培地（例えば、培養開始時～7日目まで400 nMのSAGを含有する培地、7日目～10日目まで100 nMのSAGを含有する培地）を用い、その後SAGなしの培地を用いる場合、グルココルチコイド及びインシュリン類は、凝集体中にLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成された後（即ち、下垂体前駆組織が形成された後）のいずれの時点で添加してもよい。好ましくは、浮遊培養開始10日目～40日目、好

ましくは浮遊培養開始15日目～35日目、好ましくは浮遊培養開始20～33日目の間、最も好ましくは浮遊培養開始20日目～30日目の間、グルココルチコイド及びインシュリン類を含有する無血清培地中で下垂体前駆組織を浮遊培養する。

[0138] (i i) PRL産生細胞の分化誘導

PRL産生細胞の分化誘導には、エストロゲンを含む無血清培地が使用され得る。エストロゲンの例としては、エストラジオール、エストロン、エストリオール、エステトロール、或いはそれらと同様の生物活性を有する合成化合物などが挙げられる。PRL産生細胞の分化誘導の効率を上昇させるためには、この無血清培地がインシュリン類をさらに含むことが好ましい。インシュリン類の例としては、既に本明細書中で列挙したものなどが挙げられる。

例えば、本発明においてPRL産生細胞を分化誘導するために使用され得る培地は、エストラジオールを約5～約500ng/ml、好ましくは約10～200ng/ml、最も好ましくは約50ng/ml含み、インシュリン類を約0.2～30nM、好ましくは約0.5～10nM、最も好ましくは約1nM含む、無血清培地、好ましくはgfCDM培地である。

[0139] 上記培地は、Shhシグナル阻害剤処理の後に使用することが好ましい。例えば、培養開始からLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成されるまで（例、培養10日目まで）SAG含有培地（例えば、培養開始時～7日目まで400nMのSAGを含有する培地、7日目～10日目まで100nMのSAGを含有する培地）を用い、その後SAGなしの培地を用いる場合、エストラジオール及びインシュリン類は、凝集体中にLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成された後（即ち、下垂体前駆組織が形成された後）のいずれの時点で添加してもよい。好ましくは、浮遊培養開始10日目～40日目、好ましくは培養開始14日目～34日目、好ましくは浮遊培養開始20～33日目の間、最も好ましくは浮遊培養開始20日目～30日目の間、エストラジオール及びインシュリン類を含有する無血清培地中で下垂体前駆組織を浮遊培

養する。

- [0140] (i i i) LH産生細胞、FSH産生細胞及びTSH産生細胞の分化誘導
例えば、ストローマ細胞を無血清培地（好ましくはgfCDM）中で（4～10日間）培養することによって得られた培養上清（ストローマ細胞の馴化培地）を含有する無血清培地中で下垂体前駆組織を浮遊培養することにより、LH産生細胞、FSH産生細胞及びTSH産生細胞を分化誘導することができる。

ここで「ストローマ細胞の馴化培地」とは、ストローマ細胞由来の可溶性因子を含む培地をいい、ストローマ細胞の培養後培地の上清を回収することにより調製することができる。

- [0141] ストローマ細胞としては、PA6細胞、MEF細胞、OP9細胞などが挙げられるが、PA6細胞が特に好ましい。

- [0142] 上記無血清培地は、Shhシグナル阻害剤処理の後に使用することが好ましい。例えば、培養開始時からLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成されるまで（例、培養10日目まで）SAG含有培地（例えば、培養開始時～7日目まで400nMのSAGを含有する培地、7日目～10日目まで100nMのSAGを含有する培地）を用い、その後SAGなしの培地を用いる場合、ストローマ細胞の馴化培地は、凝集体中にLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成された後（即ち、下垂体前駆組織が形成された後）のいずれの時点で添加してもよい。好ましくは、培養開始10日目～30日目、好ましくは培養開始10日目～20日目、最も好ましくは培養開始10日目～15日目の間、ストローマ細胞の馴化培地を含有する無血清培地中で下垂体前駆組織を浮遊培養する。

- [0143] 上記(i)～(i i i)の下垂体ホルモン産生細胞のうち、Pitx1陽性の中間前駆細胞を経て分化する細胞（即ち、GH産生細胞、PRL産生細胞及びTSH産生細胞）を分化誘導する場合、分化誘導のために添加される各成分を含有する無血清培地中に、Wntシグナル促進剤を更に添加した培地を用いることにより、各ホルモン産生細胞の割合をさらに増加させること

ができる（図3aを参照）。例えば、上記培養条件において、培養開始10日目～30日目の間、好ましくは培養開始12日目～24日目の間、最も好ましくは培養開始16日目～18日目の間に、好ましくは少なくとも2日間にわたり、Wntシグナル促進剤を含む培地を用いることができる。GH産生細胞又はPRL産生細胞を分化誘導する場合、Wntシグナル促進剤は、グルココルチコイド又はエストロゲン（及び必要に応じてインシュリン）の添加前に無血清培地中に添加しても同時に添加してもよいが、グルココルチコイド又はエストロゲン（及び必要に応じてインシュリン）の添加前に無血清培地中に添加することが好ましい。

[0144] Wntシグナル促進剤は、Wntにより媒介されるシグナル伝達を増強し得るものである限り特に限定されない。Wntシグナル促進剤としては、例えば、Wntファミリーに属する蛋白（例えば、Wnt1～16）、GSK3β阻害剤、Wnt受容体、Li⁺イオンなどが挙げられるが、なかでもGSK3β阻害剤が好ましい。

GSK3β阻害剤としては、GSK-3β Inhibitor I, VI, VII, VIII, XI, XII, CHIR 99021, Valproic Acid, TDZD-8, SB-216763, BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime)などが挙げられるが、これらに限定されない。

Wntシグナル促進剤の濃度は、Wntシグナル促進剤なしの場合と比較して下垂体ホルモン産生細胞の割合を増加させることができる濃度である限り限定されないが、例えば、BIOを使用する場合、その濃度は、通常約20～2000nM、好ましくは約50～500nM、最も好ましくは約250nMである。

一実施形態において、培養開始16日目からBIOを250nM含む無血清培地を用い、18日目に培地を半分交換して2日間培養を行う。

[0145] (5) 下垂体ホルモン分泌の促進

上述の方法により得られた各下垂体ホルモン産生細胞に対し、それぞれの

下垂体ホルモンの産生・分泌を促進する物質を作用させることにより、下垂体ホルモンの産生・分泌を刺激することができる。下垂体ホルモンの産生・分泌を刺激・促進する物質（ホルモン分泌促進物質ともいう）としては、各下垂体ホルモン産生細胞を直接的に作用する物質であってもよいし、例えば、移植等の後で *in vivo* で作用する場合などには、間接的に作用する物質であってもよい。

具体的には、ACTHの産生・分泌はCRH等によって促進され、GHの産生・分泌はGHRH等によって促進され、TSHの産生・分泌はTRH等によって促進され、PRLの産生・分泌はPRF（具体例は上述のとおり）及びTRH等によって促進され、FSH及びLHの産生・分泌はGnRH等によって促進される。これらの促進物質は、天然の供給源から単離したものをを用いてもよいし、組換えなどによって合成してもよい。

[0146] 下垂体ホルモン産生細胞から下垂体ホルモンを分泌させるための培養条件は、下垂体ホルモン産生細胞の生存や増殖に悪影響を与えず、下垂体ホルモンの産生・分泌が促進される限り、適宜設定できる。例えば、500 μ lのHBSS液当たり、下垂体ホルモン産生細胞を含む凝集体8個を入れ、37°Cで10分間のプレインキュベーション後、適切な最終濃度の各刺激物質を添加し、37°Cでさらに10分間インキュベーションする。

[0147] 分化したACTH産生細胞をCRHで刺激する場合、通常約10 ng/ml以上のCRHを用いるとACTHの産生・分泌が顕著に誘導される。CRHは、好ましくは約10~10000 ng/ml、より好ましくは約100~10000 ng/ml、より好ましくは約1000~10000 ng/mlの濃度で用いられる。

[0148] GHの産生・分泌をGHRHによって刺激する場合、好ましい濃度範囲は100 nM~500 nMであり、TSHの産生・分泌をTRHによって刺激する場合、好ましい濃度範囲は、1 nM~5 nMであり、PRLの産生・分泌をPRF（例、上記したようなプロラクチン放出ペプチド）によって刺激する場合、好ましい濃度範囲は2 nM~10 nMであり、FSHの産生・分

泌をGnRHによって刺激する場合、好ましい濃度範囲は1 nM～20 nMであり、LHの産生・分泌をGnRHによって刺激する場合、好ましい濃度範囲は1 nM～20 nMである。

[0149] 下垂体ホルモン産生細胞から産生された下垂体ホルモンは、培養物から単離・精製することができる。下垂体ホルモンは、例えば培養上清から、ペプチド及びタンパク質の単離・精製のための自体公知の方法（ゲルろ過及びイオン交換クロマトグラフィーのような公知の方法）を用いることによって、単離・精製することができる。

[0150] (6) 細胞培養物、及び医薬としての使用

本発明はまた、本発明の方法により得られる細胞培養物を提供する。本発明の細胞培養物は、例えば、幹細胞又は幹細胞から分化した細胞を含む浮遊凝集体、浮遊凝集体を分散処理（例えば、トリプシン／EDTA処理）した細胞、分散処理細胞の培養により得られる細胞などであり得る。また、本発明は、かかる細胞培養物より被験体に投与し得る程度に単離・精製された下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞を提供する。

[0151] 「培養物」とは、細胞を培養することにより得られる結果物をいい、細胞、培地、場合によっては細胞分泌性成分等が含まれる。「単離」とは目的とする組織又は細胞以外の成分（細胞、タンパク質、培地等）を除去することを意味する。

[0152] 本発明の方法により得られた下垂体前駆組織若しくは下垂体ホルモン産生細胞は、下記疾患の治療薬として、その他の原因による下垂体組織又は下垂体ホルモン産生細胞の損傷状態において、当該下垂体組織又は細胞を補充するためなどに用いることができる。

或いは、本発明の方法により得られた下垂体ホルモン産生細胞によって産生される下垂体ホルモンは、下記疾患の治療薬として、任意の下垂体組織又は各下垂体ホルモン産生細胞の損傷状態によって引き起こされる下垂体ホルモン分泌不全において、適切な下垂体ホルモンを補充するため（ホルモン補充療法）などに用いることができる。

- [0153] 本発明の方法によって得られる下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞又は下垂体ホルモンによって治療され得る疾患としては、副腎皮質機能低下症、成長ホルモン分泌不全性低身長症、成人発症GH欠乏症、下垂体性小人症、クレチン病、不妊症、汎下垂体機能低下症（エンptyセラ症候群、下垂体アポプレキシー、術後下垂体損傷が含まれる）、部分的下垂体機能低下症、下垂体前葉ホルモン単独欠損症（具体的には、ACTH単独欠損症、成長ホルモン単独欠損症、TSH単独欠損症、プロラクチン単独欠損症、性腺刺激ホルモン単独欠損症）などが挙げられる。
- [0154] また、本発明の方法により得られた下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞を、下垂体組織又は下垂体ホルモン産生細胞の障害に基づく疾患の治療薬として用いる場合、当該下垂体前駆組織又は細胞の純度を高めた後に被験体に移植することが好ましい。
- [0155] 細胞の純度を高める方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができるが、例えば、フローサイトメーターを用いる方法（例えば、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)、Int. Immunol., 10, 275 (1998) 参照）、パニング法（例えば、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)、J. Immunol., 141, 2797 (1988) 参照）、シヨ糖濃度の密度差を利用する細胞分画法（例えば、組織培養の技術（第三版）、朝倉書店（1996）参照）が挙げられる。
- [0156] 本発明の細胞の純度を高める方法は、上述のような幹細胞を分化誘導して

得られた下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含む。これにより、未分化な状態の細胞を除去することができ、より純度の高い分化細胞を得ることが可能で、医薬としてより好適となる。即ち、抗癌剤で処理することにより、目的とする分化細胞以外の細胞、例えば未分化な細胞を除去することができる。

- [0157] ここで、抗癌剤としては、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、アラCまたはメトトレキサートなどが挙げられる。これら抗癌剤は、分化誘導した細胞よりも未分化な状態の細胞に、より細胞毒性を示す濃度で用いることが好ましい。具体的には、上述した培養方法に準じて、これら抗癌剤を用いた培養を行い、至適濃度を決定することができ、例えば、これら抗癌剤を生体に用いる日本薬局方記載の濃度の100分の1~1倍の濃度で含む培地を用い、5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターで、37℃で数時間、好ましくは2時間培養する方法を挙げることができる。
- [0158] ここで使用する培地としては、分化誘導した下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞を培養することが可能な培地であればいかなるものも用いることができる。具体的には、上述の培地等を挙げることができる。
- [0159] 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、体細胞の核を核移植した幹細胞、又は染色体上の遺伝子を改変した幹細胞を用いることで当該問題を克服できる。
- [0160] また、体細胞の核を核移植した幹細胞を用いて分化誘導することで、体細胞を提供した個体の下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞を得ることができる。このような個体の組織又は細胞は、その組織又は細胞自身が移植医療として有効のみならず、既存の薬物がその個体に有効か否かを判断する診断材料としても有用である。さらに、分化誘導した組織又は細胞を長期に培養することで酸化ストレスや老化に対する感受性の判定が可能であり、他の個体由来の細胞と機能や寿命を比較することで上記疾患等に対する個体のリスクを評価することができ、それら評価データは将来の発病率が高いと診

断される疾患の効果的な予防法を提供するために有用である。

[0161] 下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞を移植する被験体は、温血動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは元の幹細胞が由来する動物と同種の動物である。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、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。疾患の治療目的で移植する場合、被験体としてはヒト患者が好ましい。

[0162] 本発明の方法により幹細胞から分化誘導された下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞は、自体公知の方法により下垂体前葉やそれに相当する部位に移植できる。

[0163] 下垂体ホルモンの産生・分泌を目的とした場合には、下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞は、そのホルモンの産生・分泌が誘導される限り、被験体の任意の部位に移植できる。例えば、下垂体前駆組織又は下垂体ホルモン産生細胞は、被験体の下垂体中又はその近傍、或いは下垂体が除去されている場合には下垂体が存在すべき部位（即ちトルコ鞍）に、或いは分泌された下垂体ホルモンが作用する対象器官の近傍などに（例えば、ACTH産生細胞の場合、腎臓被膜下等）、移植することができる。実施例に示されるように、ACTH産生細胞は、異所的に移植してもACTH産生機能を果たすことができる。

[0164] 移植後の被験体における各下垂体ホルモンの産生・分泌は、上述のようなホルモン分泌促進物質を被験体に投与することによって刺激してもよいし、内因性のそのような物質によって自然に刺激されてもよい。移植の目的及び被験体の状態等に依存して適宜選択され得る。

[0165] 具体的には、被験マウスに下垂体ホルモン産生細胞を移植する方法としては、本発明の分化誘導方法によって得られた当該細胞を含む細胞凝集体として1個～1000個程度、好ましくは5～500個程度、より好ましくは10個～50個程度、ハミルトンシリンジ等を用いて、腎臓被膜下に注入する

方法が挙げられる。移植された細胞の生着が確保できる限り、この方法に限定されない。下垂体前駆組織（ラトケ嚢様組織）として移植する場合、ラトケ嚢様組織を細胞凝集体より単離し、それをハミルトンシリンジ等を用いて、腎臓皮膜下に注入する方法が挙げられる。

被験体がヒトである場合、皮下組織あるいは下垂体近傍に細胞凝集体を移植する方法が挙げられるが、この方法に限定されない。

[0166] 移植された組織又は細胞の生着は、移植後十分な時間が経過した後に（例えば、移植の7日後）、その細胞が産生・分泌する下垂体ホルモン又はその他の適切なマーカー遺伝子産物の、蛍光抗体を用いた組織化学染色等によって、確認することができる。

或いは、当該下垂体ホルモンによってその産生・分泌が促進される他のホルモン等（例えば、ACTHの場合にはグルココルチコイド（例、コステロン））の産生、例えば血中濃度を測定することによっても、確認することができる。その他の下垂体ホルモンが産生・分泌を促進する他のホルモン等は、上述のとおりである。

[0167] 特に、ACTH産生細胞の移植の効果は、レシピエントの自発的運動（Spontaneous locomotor activity）の改善によって評価することもできる。例えば、マウスの自発的運動は、1日当たりのケージ内での自発的移動距離や、1日当たりの回し車（running wheel）の自発的回転数によって評価する。ケージ内でのマウスの移動距離は、MDC-W02（Brain Science Idea, Osaka）というIRセンサーを用いた解析システムなどを用いて計測することができ、回し車の回転数は、ENV-044（Med Associates, Georgia）などを用いて計測することができる。これらの計測は、別々の実験として行ない、計測するマウスが平素飼育されているケージ（ホームケージ）内にそれぞれの装置を設置して行なう。これにより、低ストレス下での自発運動量を測定することが出来る。

[0168] ACTH産生細胞の移植の効果は、レシピエントの生存率によっても評価

できる。例えば、ACTH産生細胞の移植後の生存率は、Kaplan-Mayer法によって分析できる。

[0169] また、本発明の方法によって得られる凝集体及び下垂体前駆組織は、生体内での下垂体発生時の微小環境をよく再現しているため、下垂体の発生や下垂体ホルモン産生細胞の誘導等に関する研究材料としても有用である。

[0170] さらに本発明の方法は、再生医療の分野や上述の医薬等の創薬、毒性試験などに有用な「組織材料」を提供することができる点でも極めて有用である。

[0171] (7) スクリーニング方法

本発明は、本発明の細胞培養物または本発明の培養産物を用いることを特徴とする、被検物質のスクリーニング方法を提供する。特に本発明の培養産物は、生体における下垂体前駆組織の組織形成の初期過程と極めて類似した下垂体前駆組織を構築し、また、生体における下垂体ホルモン産生細胞ときわめて類似した細胞を含んでいるため、下垂体組織又は各種下垂体ホルモン産生細胞の障害に基づく疾患の治療薬のスクリーニング、その他の原因による細胞損傷状態における治療薬のスクリーニング、またはそれらの毒性試験、さらには神経系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。

[0172] ここで「被検物質」としては、例えば上記疾患の治療薬として有効性を確認したい物質や、その他の疾患の治療薬であって下垂体組織又は各種下垂体ホルモン産生細胞への影響（例えば、毒性）を確認することが必要な物質が挙げられる。当該物質は、低分子化合物、高分子化合物、タンパク質、遺伝子（DNA、RNAなど）、ウイルスなど、どのようなものであってもよい。このような物質は、当業者が適宜選択することができる。

[0173] 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

[0174] 実施例 1 : E S 細胞の無血清浮遊凝集塊培養による、前脳組織と頭部非神経外胚葉の同時の試験管内分化誘導

(方法)

マウス E S 細胞を前脳、特に視床下部組織への選択分化させる方法である S F E B q / g f C D M 法 (Wataya et al, 2008, PNAS vol.105, pp.11796-11801) を用いて、凝集体培養を 7 日間行なった。具体的には、トリプシン処理で単一分散させたマウス E S 細胞を、細胞低吸着コーティングした 96 穴 U 字型ウェルあたり 3000、8000、10000 あるいは 15000 細胞を播種して、凝集塊を形成させた。培地には、化学合成培地 g f C D M (Wataya et al, 2008, PNAS vol.105, pp.11796-11801) を用いた。視床下部組織のマーカーとして R x : : G F P (G F P を R x 遺伝子座にノックイン)、頭部非神経外胚葉マーカーとして P i t x 1 抗体を用いて検出した。

(結果)

7 日間 S F E B q / g f C D M 法で培養した E S 細胞浮遊凝集塊は、すべての培養条件で、視床下部マーカー R x : : G F P 陽性、神経マーカー N e c a d h e r i n および S o x 1 陽性の視床下部組織を含んでいた。ウェルあたり 8000 ~ 15000 細胞を凝集させた培養では、5 日間培養以降の浮遊凝集塊の表層 (R x : : G F P 陽性のさらに表層) に P i t x 1 陽性のシート状の連続上皮組織が 9 割以上の凝集塊で形成された (図 1 f)。3000 細胞からの凝集では、P i t x 1 の細胞は少数散在するのみで、連続的な大きな上皮を形成しなかった。また別の頭部非神経外胚葉マーカー P i t x 2 を用いた q P C R では、3000 細胞からの凝集塊に比して、10000 細胞からの凝集塊は 4 倍の P i t x 2 R N A の発現が誘導され、B M P 2 及び B M P 4 の m R N A の発現量が約 2 ~ 3 倍に増大していた (図 6)。凝集塊形成時の細胞数を増加させることだけでなく、B M P 4 を 0.5 n M の濃度で培地中に添加することによっても、P i t x 2 の発現が上昇することが見出された (図 1 d)。

[0175] 実施例 2 : E S 細胞の無血清浮遊凝集塊培養とヘッジホッグシグナル処理に

よる下垂体前駆組織の試験管内分化誘導

(方法)

マウスES細胞をSFEBq/gfCDM法 (Wataya et al, 2008, PNAS vol.105, pp.11796-11801) を用いて、1凝集体あたり10000細胞で形成させ、実施例1のように浮遊培養した。分化培養開始直後より、ヘッジホッグのアゴニストであるSAG (Danjo et al, JNS, 2011, vol.31, pp.1919-1933) を100あるいは400 nM添加し、合計10-13日間培養した。SAGはShhより数倍以上強い活性を有し、また比較的安価で高濃度まで用いることができるため、強いヘッジホッグシグナルの活性を引き起こすことが可能である (Danjo et al, JNS, 2011, vol.31, pp.1919-1933)。下垂体前駆組織 (ラトケ嚢) のマーカーであるLim3などの発現をPCRあるいは蛍光抗体法による凍結切片の細胞化学染色で確認した。Lim3の発現は、Lim3::GFPのノックインES細胞を用いても確認した。

(結果)

SAGを100あるいは400 nM添加した群では、10日以降にLim3の著明な遺伝子発現 (未分化ES細胞の15倍、SAG非添加群の7倍) がPCRで確認された (図1j, kも参照)。このLim3の誘導は、ヘッジホッグ受容体のアンタゴニストであるSANT-1で阻害されたため、SAGの作用はヘッジホッグシグナルを介した効果であることが判った。

さらに3日間gfCDMで培養すると (合計13日間)、SAG添加群では、凝集塊の中に数個 (1-7個) のLim3陽性の上皮性の小嚢胞が形成された (図2a)。小嚢胞が形成されていく様子は図2d-fに示されている (d8~d10)。Lim3陽性組織は、肥厚したプラコード上皮としてまず出現し、次いで陥入し、最後に中空の上皮小胞を形成した。これらの小嚢胞は、RxやSox1やNestin陰性で、Pitx1やPitx2陽性であり (図2g-j)、下垂体前駆組織と同一のマーカー発現を示し、また13日目までには、Lim3に加えて、後期ラトケ嚢マーカーIslet1/2を発現し始めた (図2o)。形態学的にも下垂体前駆組織と類似した

上皮構造や極性を有していた（図2 m、n）。しかも、生体内の下垂体前駆組織（ラトケ嚢）と同じく、R \times 陽性の視床下部組織の近傍に存在し、またPit \times 1陽性でLim3陰性の頭部非神経外胚葉組織とも隣接して形成されていた（図2 h、k）。このことは、このES細胞の浮遊凝集塊培養系において、胚発生過程の下垂体前駆組織の発生の微小環境が模倣されたことを示唆した。このようなラトケ嚢様の組織の形成は、3000細胞の凝集塊から開始した培養では、ほとんど形成されなかった。

なお、培養10–13日の間はSAGを含まないgfCDMで培養した。この間にFGF8を200 ng/ml添加したところ、Lim3の発現組織が3–5割増加した。

[0176] 実施例3：ES細胞由来の下垂体前駆組織からのACTH産生細胞の産生とDAPT処理

（方法）

マウスES細胞を実施例2の方法を用いて、SAG処理（400 nM 7日間、100 nM 3日間の計10日間）により下垂体前駆組織に分化させた。さらにgfCDM培地を用いて、4%O₂、5%CO₂下で合計12日間培養した（合計22日間）。さらに培養18–19日の間又は20–21日間の1日間、Notchシグナルの阻害剤DAPT 10 μ Mで処理した。ACTH産生細胞に発現するTbx19やACTHの発現を蛍光抗体法による凍結切片の細胞化学染色で確認した。

（結果）

蛍光抗体法での解析の結果、DAPT処理をした上記の凝集塊では、DAPT処理なしの場合と比較してTbx19発現が増強され（図3 b）、ACTH陽性細胞の割合が増加し（図3 c）、Tbx19やACTH強陽性の多数細胞（>30細胞以上）の集合が複数箇所に含まれていた。DAPT処理をしていないものでは、Tbx19やACTH陽性の少数細胞が散在しているだけであった。このACTH陽性細胞は、NSE及びニューロフィラメントなどの神経マーカーが陰性であったことから、脳のACTH⁺ニューロンで

はないと考えられ（図3 f）、またメラニン産生細胞系統のマーカーPC2も発現していなかった（図3 g）。さらに、このACTH+細胞は、*in vivo*の場合と同様、E-カドヘリン陰性であった（図3 e）。

*in vivo*では、下垂体の発生時、Tbx19陰性の前駆体はPitx1陽性の中間前駆体を生じ、この前駆体がその後GH産生細胞、PRL産生細胞、TSH産生細胞へと分化する。Pitx1の発現を確認したところ、DAPT処理では発現は増加せずむしろ減少し、BIO処理では大きく増加した。WntインヒビターIWP2処理では、Pitx1の発現は低下傾向であった（図3 k）。

[0177] 実施例4：ES細胞由来の下垂体前駆組織からのACTH以外の下垂体ホルモン産生細胞の産生

（方法）

マウスES細胞を実施例2の方法を用いて、SAG処理（400 nM 7日間、100 nM 3日間の計10日間）により下垂体前駆組織に分化させた。さらに40%O₂、5%CO₂下で継続的に浮遊培養した。培地は、副腎皮質ホルモン（200 ng/ml ハイドロコチゾン）と1 nMインスリンを含むgfCDM、エストロゲン（50 ng/ml エストラジオール）と1 nMインスリンを含むgfCDM、あるいはマウスのフィーダー細胞PA6細胞のgfCDMによる培養上清（馴化培地）のいずれかを用いた。

成長ホルモン（GH）、プロラクチン（PRL）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）の発現を蛍光抗体法による凍結切片の細胞化学染色で確認した。

（結果）

副腎皮質ホルモン（200 ng/ml ハイドロコチゾン）と1 nMインスリンを含むgfCDMで培養20日より10日間培養したものでは、多数のGH陽性細胞が凝集塊の中に確認された（図3 l、m）。さらに、GSK3βの阻害剤で、Wnt経路を刺激するBIO（250 nM）を培養16-18日の間に処理すると、GH陽性細胞が3-5割さらに増加した。エ

ストロゲン（50 ng/ml エストラジオール）と1 nM インスリンを含むgfCDMで培養20日より10日間培養したものでは、多数のProlactin陽性細胞が凝集塊の中に確認された（図3 n、o）。PA6細胞のgfCDMによる培養上清で培養10日より15日間培養したものでは、多数のLH陽性細胞及びFSH陽性細胞が確認されるとともに、少数のTSH陽性細胞が認められた（LH陽性細胞>FSH陽性細胞>TSH陽性細胞）（図3 p-s）。

[0178] 実施例5：ES細胞由来のACTH産生細胞からのCRHによる試験管内のACTH分泌

（方法）

マウスES細胞を実施例3の方法を用いて、SAG処理とDAPT処理によりACTH産生細胞に分化させた（合計22日間）。この凝集塊に対して、CRH（副腎皮質刺激ホルモン放出因子）を作用させて、ACTHの分泌を定量した。具体的には、500 μlのHBSS液あたり、8個の凝集体を入れ、37度で10分間プレインキュベーション後、最終濃度10-10000 ng/mlのCRHを添加し、さらに10分間インキュベーション後の培養上清を回収し、ELISA法で計測した（図4 a）。

（結果）

CRHを加えない群では、培養上清のACTHの濃度は0.2 pg/ml以下であったが、10 ng/ml CRH群では1.4 pg/ml、100 ng/ml CRH群では4 pg/ml、1000および10000 ng/ml CRH群では8.5-9.5 pg/mlのACTHが検出された（図4 c）。一方、SAG処理をしなかった凝集塊では、1000 ng/ml CRHの添加によっても、ACTHの分泌の有意な上昇は認められず、SAG処理したがDAPT処理をしなかった凝集塊では、CRHを加えてもACTHの分泌はあまり高くならなかった（図4 d）。なお、このACTHの分泌の誘導はCRH特異的であり、他の放出ホルモンを加えても観察されなかった（図4 b）。

さらに、下垂体からのACTH分泌を抑制することが知られているヒドロコチゾン（100 ng/ml）で60分間前処理を行なった場合、CRHによるACTHの分泌促進効果をほぼ完全に抑制した（図4 e）が、エストラジオールによる前処理はACTH分泌に影響しなかった（図4 f）。

[0179] 実施例6：ES細胞由来のACTH産生細胞からのCRHによる生体内でのACTHと副腎皮質ホルモンの分泌

（方法）

マウスES細胞を実施例3の方法を用いて、SAG処理とDAPT処理によりACTH産生細胞に分化させた細胞塊を、下垂体除去手術を施したマウスの腎臓被膜下に移植した（図5 a右）。これらのマウスについては、ACTHの分泌能（CRHへの反応性）が失われたことを移植前に確認した（図5 b、c）。

具体的には、合計22日間の培養後に、細胞凝集塊をハミルトンシリンジにより、下垂体除去マウスの腎臓被膜下に注入した。移植7日後に、CRH腹腔内投与による負荷のもと、血漿を回収し、ACTHおよび副腎皮質ホルモン（Corticosteron）濃度をELISA法で計測した。

（結果）

腎臓皮下移植したES細胞由来のACTH陽性細胞は、移植後7日後も局所に生着していることが、蛍光抗体法による組織化学染色で確認された（図5 a左）。対照群（sham operation）では、CRH負荷後も血中ACTHは1 pg/ml未満、Corticosteronも3 pg/ml未満であった。一方、ES細胞由来のACTH陽性細胞移植群では、ACTHは25-30 pg/ml、Corticosteronは300 pg/mlの濃度にCRH負荷後に達した（図5 e、f：CRH負荷あり；図5 g、h：CRH負荷なし）。

[0180] 実施例7：ES細胞由来のACTH産生細胞の異所性移植による下垂体除去マウスの生存及び活動性の改善

（方法）

マウスES細胞由来のACTH産生細胞を実施例6と同様に、下垂体除去手術を施したマウス（9週齢）の腎臓被膜下に移植した。移植マウスの生存および体重の増加を経過観察し、対照群（sham operation）と比較した。マウスの自発的運動についても検討した。マウスの自発的運動は、IRセンサー（MDC-W02（Brain Science Idea, Osaka））を用いて、ケージの中でマウスが1日にどのくらい自発的に移動するかを計測した。また、ENV-044（Med Associates, Georgia）を用いて、マウスが自発的にrunning wheelを1日に何回転させたかも別途計測した。

（結果）

対照群の下垂体除去マウスでは、sham operation後8週までに全個体が死亡したが、ES細胞由来のACTH産生細胞の移植群では、その時点で約85%の個体が生存していた（図5k）。また、対照群がすべて死亡した8週の段階で、移植群では6割のマウスが、移植時より体重が増加していた。

また、移植群のマウスは、コントロールよりも高いレベルの自発的運動を示した（図5i、j）。

[0181] 実施例8：ヒトES細胞からの下垂体前駆細胞の分化誘導

（方法）

トリプシンにて単一分散したヒトES細胞12000細胞をROCK阻害剤Y-27632 10 μ M存在下に（Watanabe et al, Nature Neuroscience, 2007）実施例1のように浮遊凝集塊培養を行なった。培養液には、gfCDMに5%KSRを加えたものを用いた。培養3日目より0.5 nM、1.5 nMまたは5.0 nMのBMP4を培養液に添加し、培養6日目より1000 nMのSAGを添加し浮遊培養を継続した。

（結果）

培養17日後には、いずれの凝集塊も多数のR \times 陽性の神経前駆細胞を凝集塊内部に含み、またその表面にE-cadおよびサイトケラチン陽性の非神経外

胚葉細胞がマウス E S 細胞の培養と同様に、単層の細胞からなるシート状の上皮構造を形成していた（図 7）。qPCR 解析により、Pitx1 の発現誘導も 5 nM BMP 処理をした群でしていない群に比して、約 10 倍の誘導を認められた（図 8）。BMP 処理した群では、培養 25 日後には、Rx 陽性の神経上皮構造の表面に E-cad 陽性の非神経外胚葉が存在し、マウス培養での下垂体プラコード形成と同様に、その一部が肥厚してプラコード様の構造を呈していた（図 7）。

[0182] トリプシンにて単一分散したヒト E S 細胞 3000 個及び 6000 個からスタートした場合でも、同等の結果が得られた。従って、培地中に BMP4 を添加した場合には、比較的少数の細胞からなる凝集塊を用いても、吻側視床下部組織とシート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織の両方を同時に分化誘導できる可能性が示された。

[0183] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様の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「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。

ここで述べられた特許および特許出願明細書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。

産業上の利用可能性

[0184] 本発明の方法によれば、E S 細胞等の多能性幹細胞から、中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織を含む凝集体、特に吻側視床下部組織及び吻側頭部外胚葉組織を含む凝集体や下垂体前駆組織を試験管内で分化誘導し、さらに各種下垂体ホルモン産生細胞を分化誘導することができる。下垂体は多くのホルモンを産生・分泌する中心的な内分泌器官であり、ホルモン分泌の異常は生体に対し重大な影響を及ぼす。従って、本発明の方法で得られた凝集体、下垂体前駆組織及び下垂体ホルモン産生細胞は、特に、下垂体ホルモンの

分泌不全によって引き起こされる疾患や下垂体ホルモンの分泌不全を引き起こす疾患の治療等に利用することができる。

中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織を含む凝集体からは、下垂体だけでなく、嗅上皮、水晶体、内耳等の感覚器のプラコードも形成され得る。

[0185] 本出願は日本で出願された特願2011-239803（出願日：2011年10月31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。

請求の範囲

- [請求項1] 無血清培地中で幹細胞の凝集体を形成させる工程、及び形成された凝集体を無血清培地中で浮遊培養する工程を含む、視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体の製造方法。
- [請求項2] 浮遊培養で用いる無血清培地がS h hシグナル促進剤を含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記S h hシグナル促進剤がS A Gである、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項4] 浮遊培養で用いる無血清培地がB M Pシグナル促進剤を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項5] B M Pシグナル促進剤がB M P 2及び／又はB M P 4である、請求項4に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉が、吻側視床下部組織及びシート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織である、請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記吻側視床下部組織がR x陽性である、請求項6に記載の製造方法。
- [請求項8] シート状の連続上皮である吻側頭部非神経外胚葉組織がP i t x 1陽性である、請求項6記載の方法。
- [請求項9] 前記無血清培地が、N o d a lシグナル促進剤、W n tシグナル促進剤、F G Fシグナル促進剤、B M Pシグナル促進剤、レチノイン酸及びインシュリン類を実質的に含有しない無血清培地である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項10] 前記幹細胞がヒト由来である、請求項1～9のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項11] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体が、L i m 3陽性細胞を更に含む、請求項1～10のいずれか1項に記

載の製造方法。

- [請求項12] 前記L i m 3陽性細胞が、凝集体中に上皮性の小嚢胞を形成することを特徴とする、請求項11に記載の製造方法。
- [請求項13] 浮遊培養により、幹細胞の凝集体における内因性の増殖因子の発現を増加させる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項14] 前記内因性の増殖因子がB M P 2及び／又はB M P 4である、請求項13に記載の製造方法。
- [請求項15] 前記B M P 2及び／又はB M P 4の発現が、低細胞濃度で幹細胞の凝集体を形成させた場合と比較して、m R N Aレベルで2倍以上増加することを特徴とする、請求項14に記載の製造方法。
- [請求項16] 請求項1～15のいずれか1項に記載の方法によって製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、N o t c hシグナル阻害剤を含む無血清培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の製造方法。
- [請求項17] 前記N o t c hシグナル阻害剤がD A P Tである、請求項16に記載の製造方法。
- [請求項18] 請求項16又は17に記載の方法で製造された副腎皮質刺激ホルモン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体において副腎皮質刺激ホルモンの分泌不全を改善する方法。
- [請求項19] 請求項1～15のいずれか1項に記載の方法によって製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、グルココルチコイドを含む無血清培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、成長ホルモン産生細胞の製造方法。
- [請求項20] 前記無血清培地がインシュリンをさらに含む、請求項19に記載の製造方法。
- [請求項21] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、グルココルチコイドを含む無血清培地中で浮遊培養する工程の前又は同時に、G S K 3 β 阻害剤を含む無血清培地中で浮遊培養する工程

を含む、請求項19又は20に記載の成長ホルモン産生細胞の製造方法。

[請求項22] 前記GSK3 β 阻害剤がBIOである、請求項21に記載の製造方法。

[請求項23] 請求項19～22のいずれか1項に記載の方法で製造された成長ホルモン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体において成長ホルモンの分泌不全を改善する方法。

[請求項24] 請求項1～15のいずれか1項に記載の方法によって製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、エストロゲンを含む無血清培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、プロラクチン産生細胞の製造方法。

[請求項25] 前記無血清培地がインシュリンをさらに含む、請求項24に記載の製造方法。

[請求項26] 前記視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、エストロゲンを含む無血清培地中で浮遊培養する工程の前又は同時に、GSK3 β 阻害剤を含む無血清培地中で浮遊培養する工程を含む、請求項24又は25に記載のプロラクチン産生細胞の製造方法。

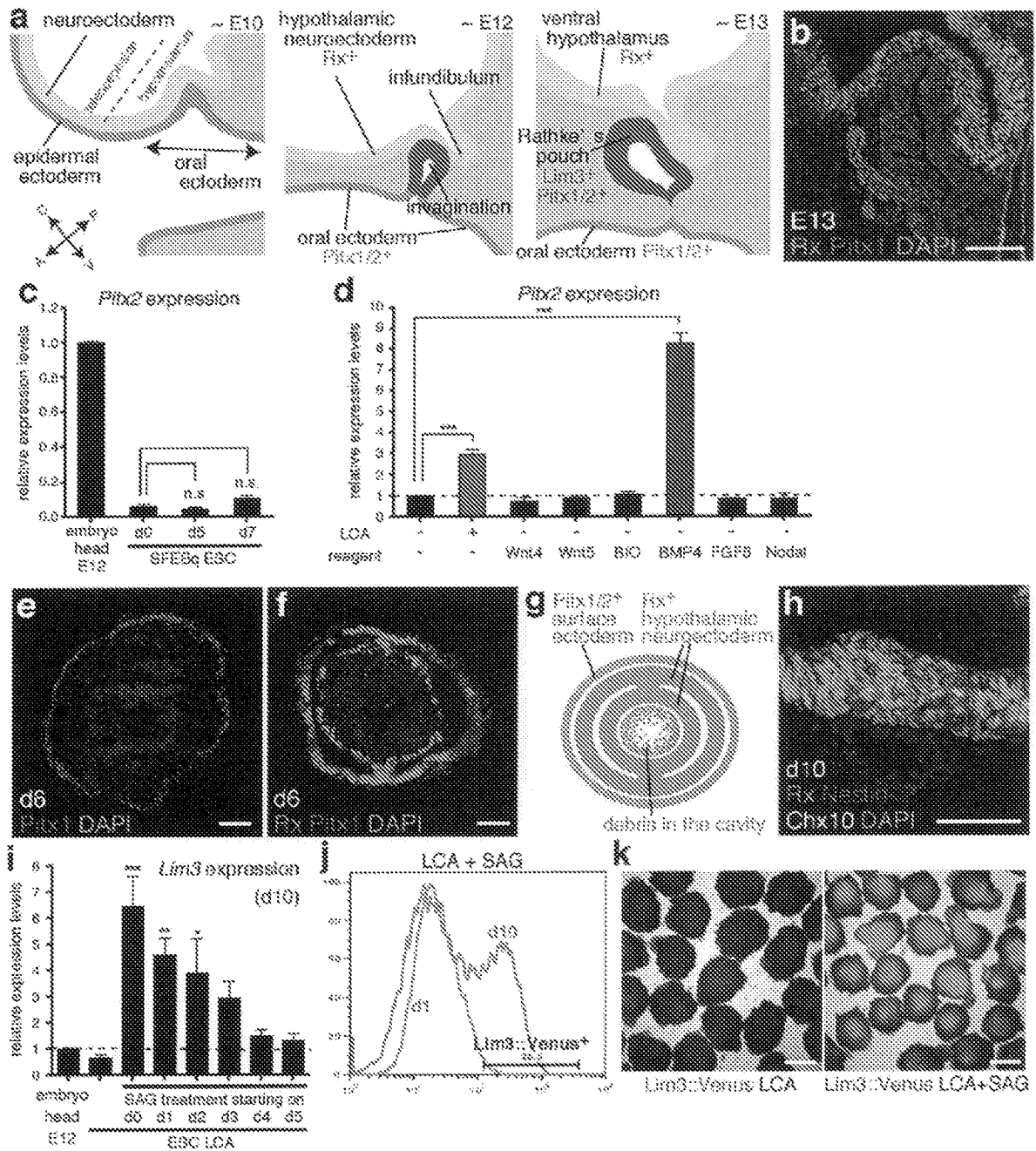
[請求項27] 前記GSK3 β 阻害剤がBIOである、請求項26に記載の製造方法。

[請求項28] 請求項24～27のいずれか1項に記載の方法で製造されたプロラクチン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体においてプロラクチンの分泌不全を改善する方法。

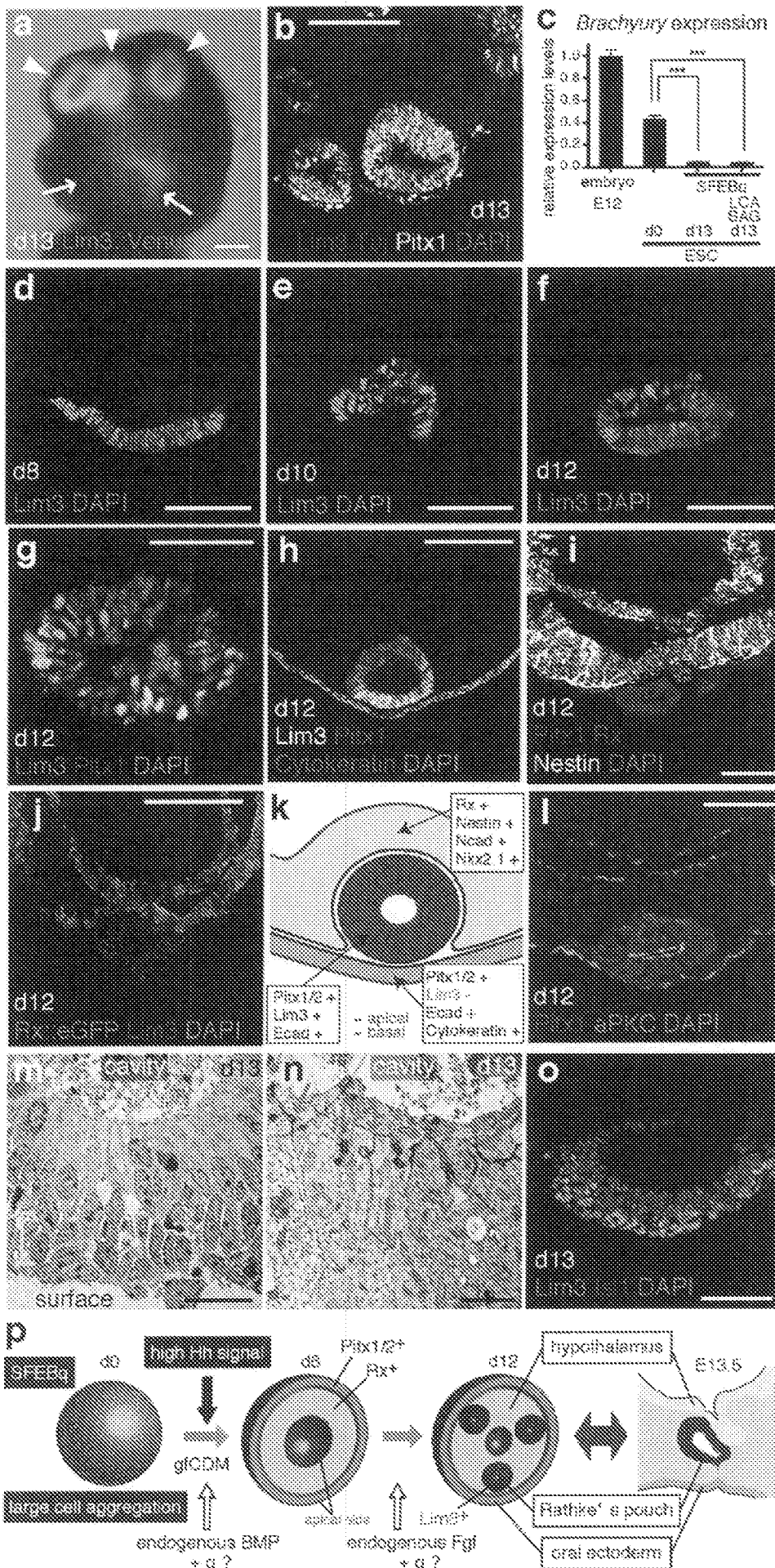
[請求項29] 請求項1～15のいずれか1項に記載の製造方法で製造された視床下部組織及び頭部非神経外胚葉を共に含んでなる凝集体を、無血清培地中でストローマ細胞を培養することによって得られたストローマ細胞の馴化培地中でさらに浮遊培養する工程を含む、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン及び/又は甲状腺刺激ホルモン産生細胞の製造方法。

- [請求項30] 前記ストローマ細胞がP A 6細胞である、請求項29に記載の製造方法。
- [請求項31] 請求項29又は30に記載の方法で製造された卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン又は甲状腺刺激ホルモン産生細胞を被験体に移植することを含む、被験体において卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン又は甲状腺刺激ホルモンの分泌不全を改善する方法。
- [請求項32] 無血清培地中で幹細胞の凝集体を形成させる工程、及び形成された凝集体を無血清培地中で浮遊培養する工程を含む、中枢神経組織及び頭部非神経外胚葉組織を共に含んでなる凝集体の製造方法。
- [請求項33] 請求項32に記載の凝集体においてプラコードが自己形成される、嗅上皮、水晶体又は内耳を形成するプラコードの製造方法。

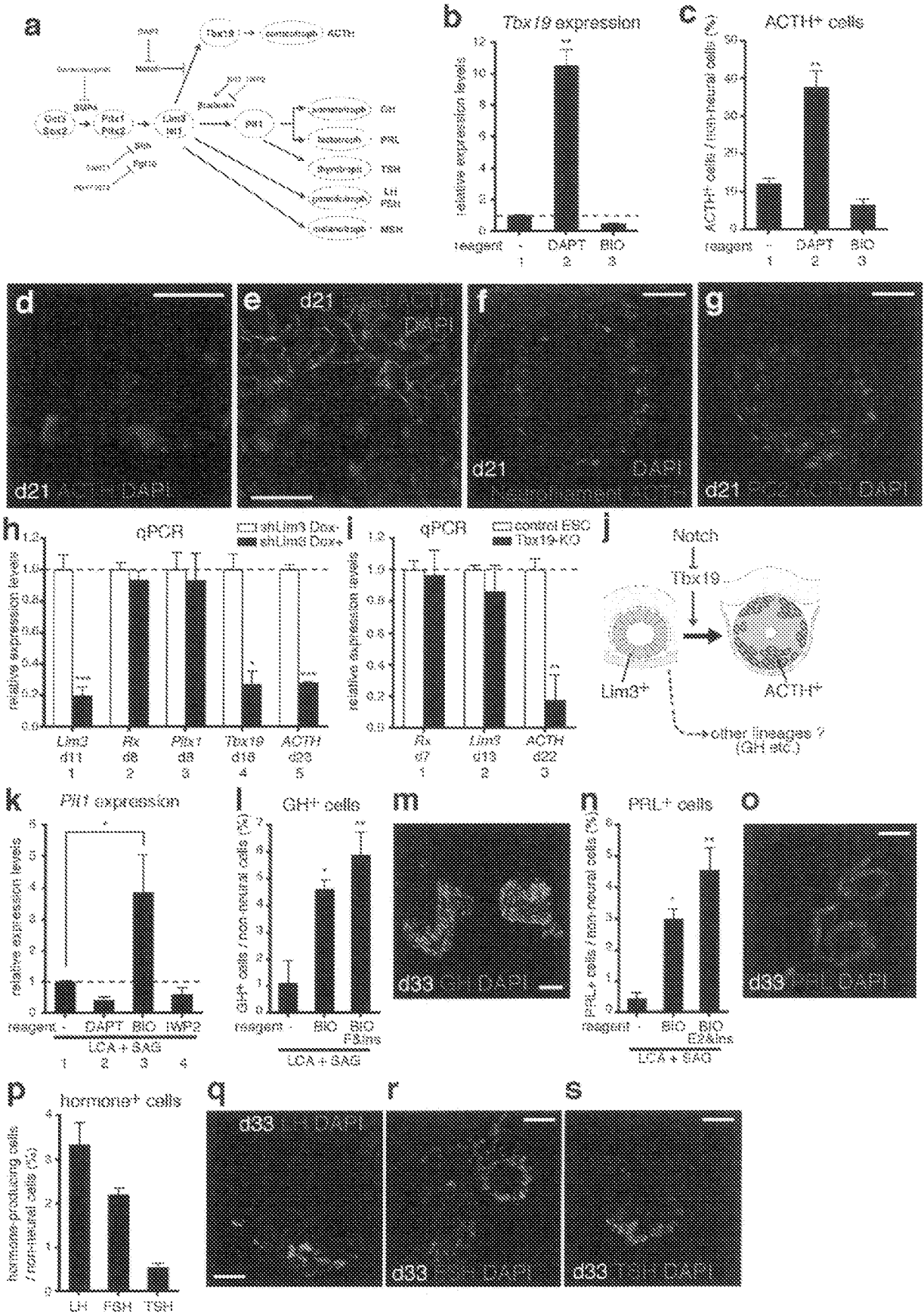
[Figure 1]



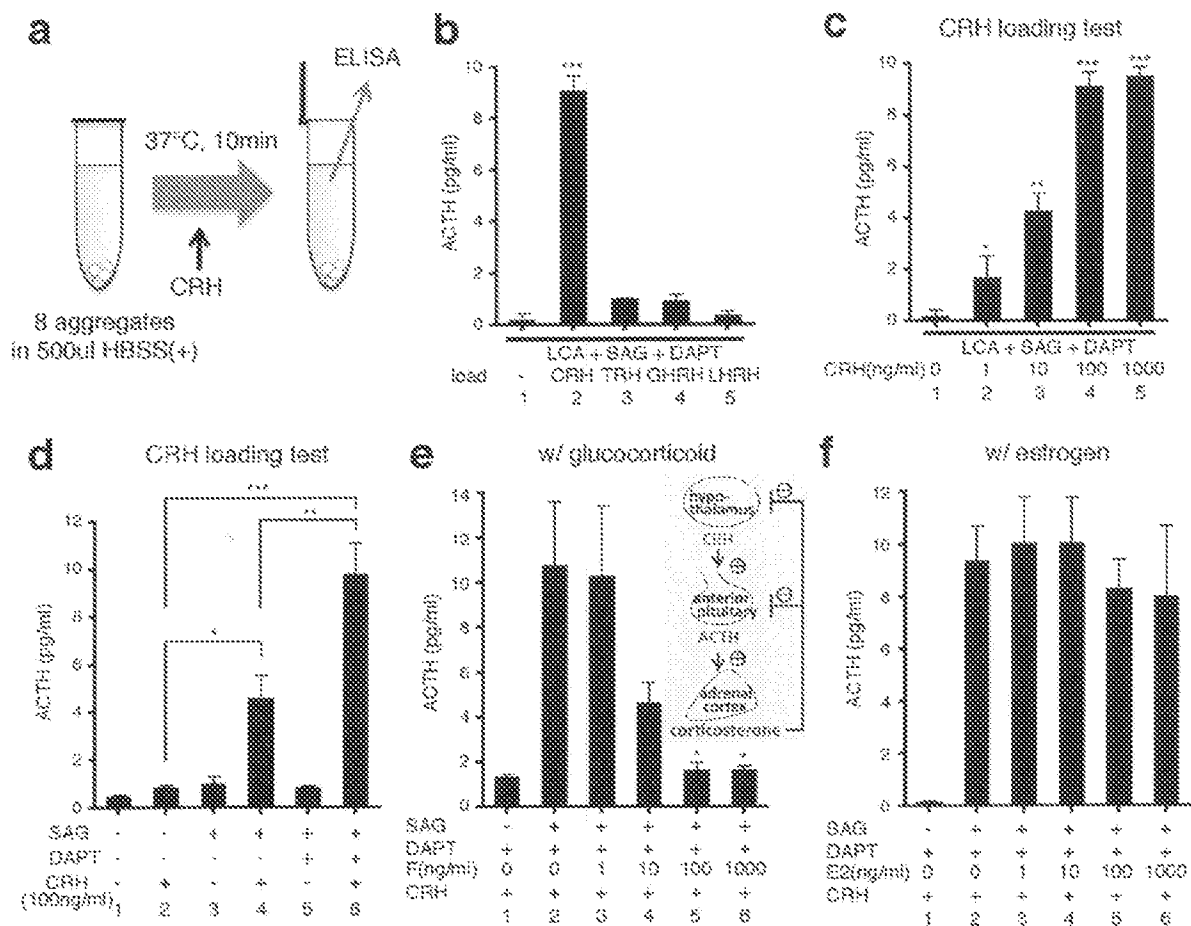
[圖2]



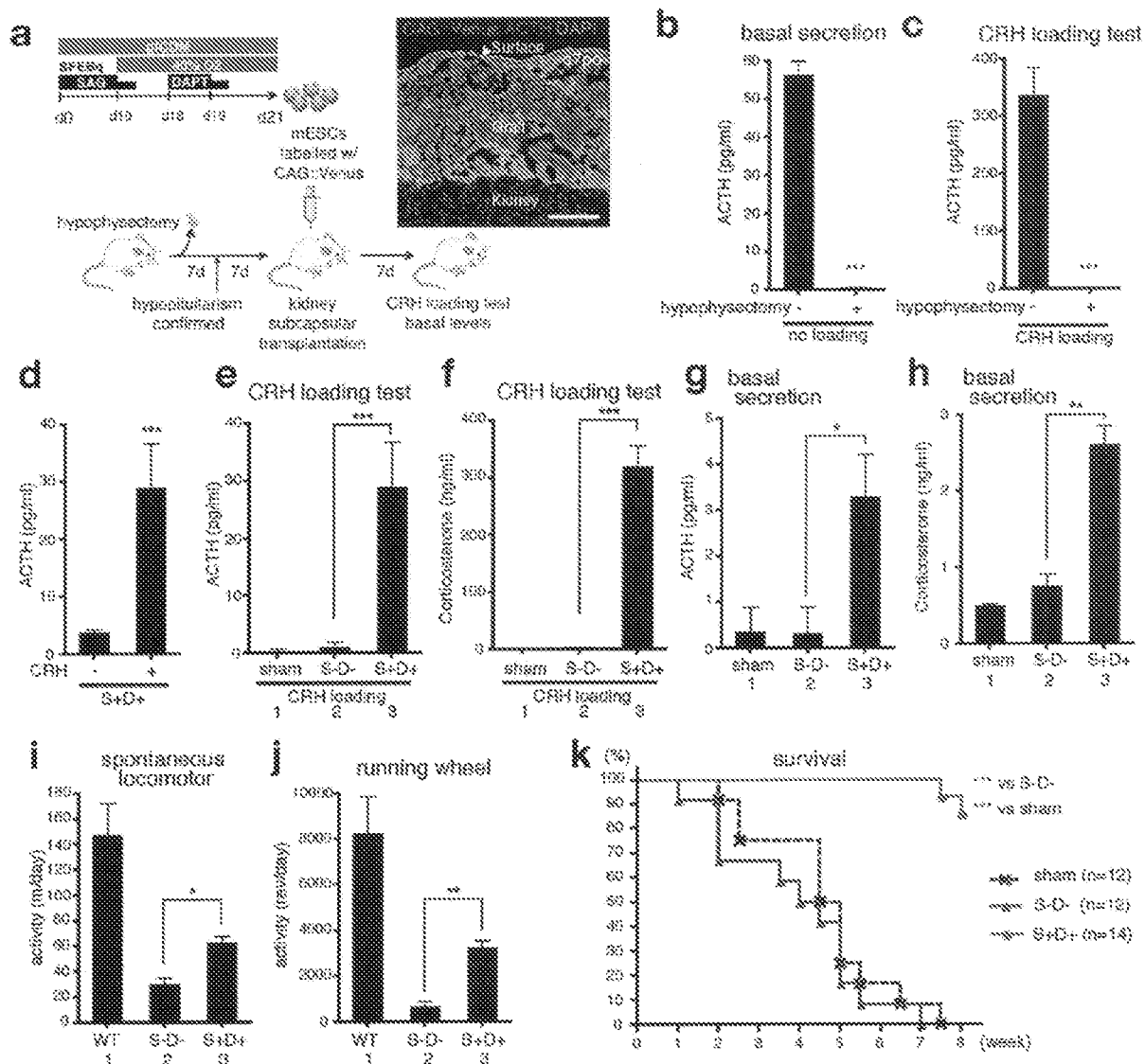
[FIG 3]



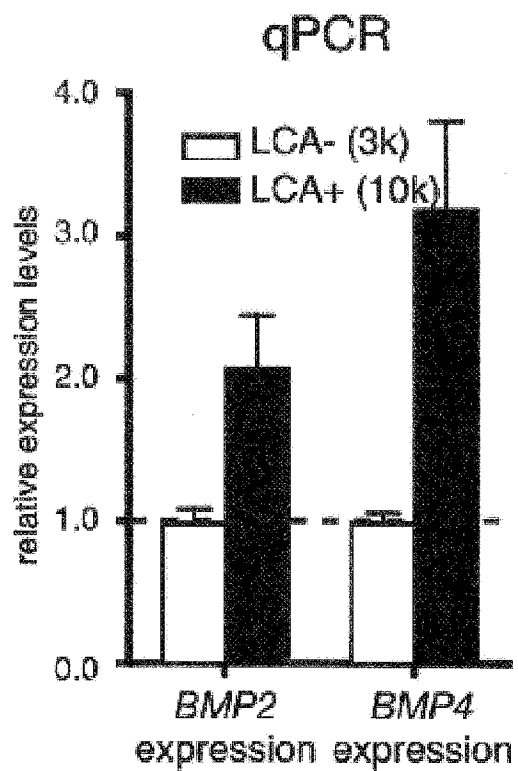
[圖4]



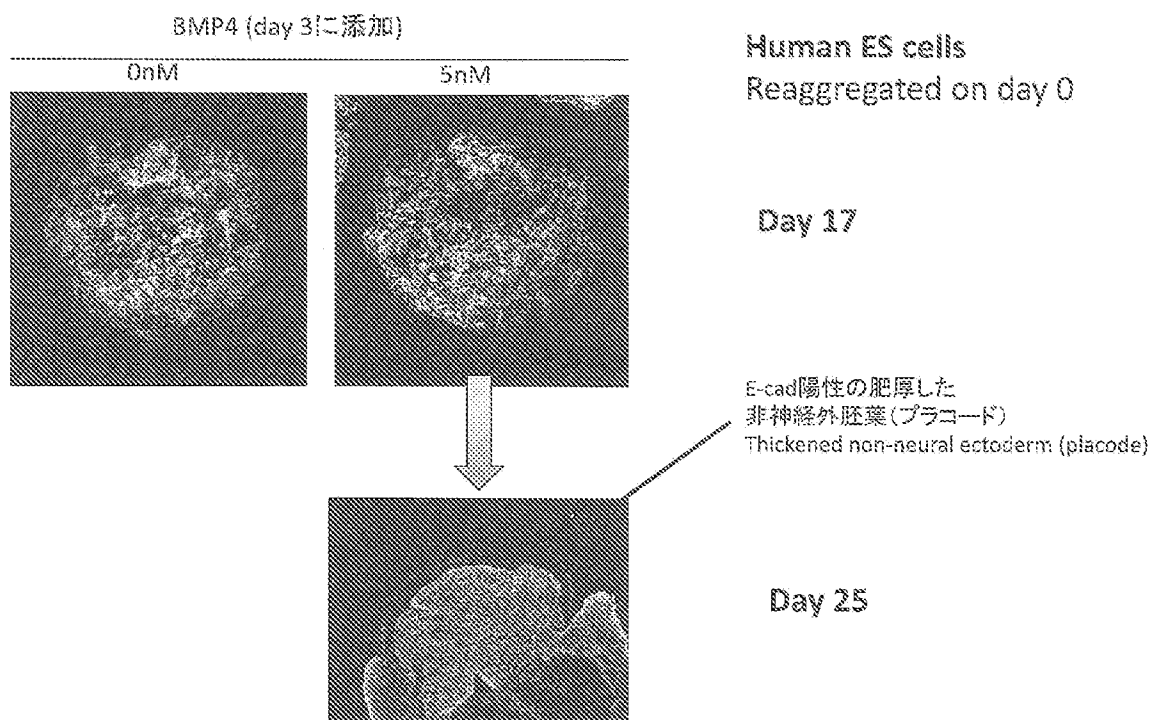
[5]



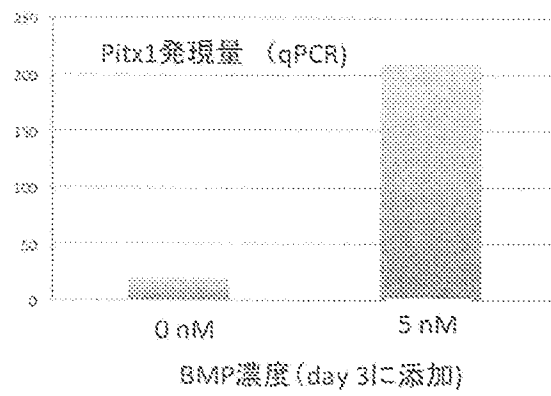
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/0735(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P5/00(2006.01)i, A61P5/06(2006.01)i, A61P5/14(2006.01)i, A61P5/24(2006.01)i, A61P5/38(2006.01)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)

C12N5/0735, A61K35/12, A61P5/00, A61P5/06, A61P5/14, A61P5/24, A61P5/38

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WATAYA, T. et al., Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2008.08.19, Vol.105, No.33, pp. 11796-801	1-22, 24-27, 29-30, 32-33
T	SUGA, H. et al., Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture., Nature, 2011.11.09, Vol.480, No.7375, pp.57-62	1-22, 24-27, 29-30, 32-33

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
23 January, 2013 (23.01.13)

Date of mailing of the international search report
05 February, 2013 (05.02.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078250

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 23, 28, 31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23, 28 and 31 pertain to method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy (see PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines 16.17).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0735(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P5/00(2006.01)i, A61P5/06(2006.01)i, A61P5/14(2006.01)i, A61P5/24(2006.01)i, A61P5/38(2006.01)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. C12N5/0735, A61K35/12, A61P5/00, A61P5/06, A61P5/14, A61P5/24, A61P5/38

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	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013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)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI

C. 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
A	WATAYA, T. et al., Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2008.08.19, Vol.105, No.33, pp.11796-801	1-22, 24-27, 29-30, 32-33
T	SUGA, H. et al., Self-formation of functional adenohipophysis in three-dimensional culture., Nature, 2011.11.09, Vol.480, No.7375, pp.57-62	1-22, 24-27, 29-30, 32-33

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ー

「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

23.01.2013

国際調査報告の発送日

05.02.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)

幸田 俊希

4 N

4671

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 23, 28, 31 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項23, 28, 31に係る発明は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法に該当する（PCT国際調査及び予備審査ガイドライン16.17参照。）。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。