(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6723918号
(P6723918)
(45)発行日　令和2年7月15日(2020.7.15)　(24)登録日　令和2年6月26日(2020.6.26)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 5/071 (2010.01)　　C12N 5/071 ZNA
C12N 5/0797 (2010.01)　　C12N 5/0797

請求項の数 37　(全 133 頁)

(21)出願番号　特願2016-532598(P2016-532598)
(86)(22)出願日　平成26年11月21日(2014.11.21)
(65)公表番号　特表2016-538856(P2016-538856A)
(43)公表日　平成28年12月15日(2016.12.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/066952
(87)国際公開番号　WO2015/077648
(87)国際公開日　平成27年5月28日(2015.5.28)
審査請求日　平成29年11月15日(2017.11.15)
(31)優先権主張番号　61/907,302
(32)優先日　平成25年11月21日(2013.11.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　500213834
メモリアル　スローン　ケタリング　キャンサー　センター
アメリカ合衆国　ニューヨーク　１００６５，　ニューヨーク，　ヨーク　アベニュー　１２７５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　チェンバーズ，　スチュアート
アメリカ合衆国　ニューヨーク　１００６５，　ニューヨーク，　イー．　６８ティーエイチ　ストリート　４１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト多能性幹細胞からの機能的頭蓋プラコード派生体の特定

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の分化を誘導するための方法であって、
多能性幹細胞または多分化能性幹細胞を、スモールマザーズアゲインストデカペンタプレジック（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の阻害剤および骨形成タンパク質（ＢＭＰ）と接触させて、プラコード先駆体の集団を得るステップ
を含み、前記細胞を、ＳＭＡＤシグナル伝達の阻害剤と少なくとも約６日間接触させ、前記細胞を、約３日間までＢＭＰと接触させ、前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤が、Ｌｅｆｔｙ、アクチビン、およびＴＧＦβからなる群から選択されるシグナル伝達経路を阻害する、方法。
【請求項２】
前記細胞が、約１１日間まで前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤と接触される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記プラコード先駆体が、検出可能なレベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記細胞が、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３の発現を誘導するＷｎｔシグナル伝達の活性化因子と接触される、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】

前記ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞が、三叉神経プラコード細胞である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記三叉神経プラコード細胞が、検出可能レベルのＧＤ２を発現する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
検出可能レベルのＧＤ２を発現する細胞を単離するステップをさらに含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記三叉神経プラコード細胞が、検出可能レベルのＣＤ５７を発現する、請求項５～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
検出可能レベルのＣＤ５７を発現する細胞を単離するステップをさらに含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記Ｗｎｔシグナル伝達の活性化因子が、グリコーゲン合成キナーゼ３β（ＧＳＫ３β）シグナル伝達の阻害剤である、請求項４～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記Ｗｎｔシグナル伝達の活性化因子が、ＣＨＩＲ９９０２１、Ｗｎｔ－１、Ｗｎｔ３Ａ、その誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項４～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記細胞の前記Ｗｎｔシグナル伝達の活性化因子との接触が、前記細胞の前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤との最初の接触から約２日後に開始される、請求項４～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記細胞が、約２日間前記Ｗｎｔシグナル伝達の活性化因子と接触される、請求項４～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記細胞が、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）シグナル伝達の活性化因子および少なくとも１つのＦＧＦと接触させられて、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１の発現を誘導する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞が、下垂体プラコード細胞である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＳＨＨシグナル伝達の活性化因子が、ＳＨＨタンパク質、プルモルファミン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１４または１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＳＨＨタンパク質が、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）およびソニックＣ２５ＩＩからなる群から選択される、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記細胞の前記ＳＨＨシグナル伝達の活性化因子および前記少なくとも１つのＦＧＦとの接触が、前記細胞の前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤との最初の接触から約６日後に開始される、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記細胞が、約１０日間前記ＳＨＨシグナル伝達の活性化因子および前記少なくとも１つのＦＧＦと接触される、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記細胞を培養して、検出可能なＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３の発現を誘導する、請求項

１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現する細胞が、水晶体プラコード細胞である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の分化を誘導するための方法であって、前記方法が、
多能性幹細胞または多分化能性幹細胞をＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤およびＢＭＰと接触させるステップであって、前記細胞が、約３日間まで前記ＢＭＰと接触される、ステップと、
前記細胞を、ＢＲＬ－５４４４３、パルテノリド、フェナントロリンおよびそれらの組合せからなる群から選択される化合物と接触させて、プラコード先駆体を得るステップとを含み、前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤が、Ｌｅｆｔｙ、アクチビン、およびＴＧＦβからなる群から選択されるシグナル伝達経路を阻害する、方法。
【請求項２３】
前記プラコード先駆体が、検出可能なレベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記細胞の前記化合物との接触が、前記細胞の前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤との最初の接触から約３日後に開始される、請求項２２または２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記細胞が、約３日間前記化合物と接触される、請求項２２～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤が、未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）のリン酸化を遮断する、請求項１～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＡＬＫが、ＡＬＫ４、ＡＬＫ５、およびＡＬＫ７からなる群から選択される、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤が、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）またはその誘導体である、請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の阻害剤が、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）である、請求項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の分化を誘導するための方法であって、
多能性幹細胞または多分化能性幹細胞をＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤およびＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤と接触させるステップ；および
前記細胞を、ＢＲＬ－５４４４３、パルテノリド、フェナントロリンおよびそれらの組合せからなる群から選択される化合物と接触させて、プラコード先駆体の集団を得るステップ
を含み、前記細胞の前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤との接触が、前記多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤との最初の接触から２日後または３日後に中断され、
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤が、ＢＭＰ経路の阻害剤であり、
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤が、Ｌｅｆｔｙ、アクチビン、お

およびＴＧＦβからなる群から選択されるシグナル伝達経路を阻害する、方法。
【請求項３１】
前記プラコード先駆体が、検出可能なレベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤が、Ｎｏｇｇｉｎ、ドルソモルフィン、ＬＤＮ－１９３１８９、その誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項３０または３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤が、Ｎｏｇｇｉｎである、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤が、未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）のリン酸化を遮断する、請求項３０～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記ＡＬＫが、ＡＬＫ４、ＡＬＫ５、およびＡＬＫ７からなる群から選択される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤が、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）またはその誘導体である、請求項３０～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ＳＭＡＤタンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤が、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）である、請求項３０～３６のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の引用
本願は、２０１３年１１月２１日に出願した米国仮出願第６１／９０７，３０２号に対する優先権を主張する。この出願の内容は、これにより、その全体が本明細書に参考として援用される。
【０００２】
発明の分野
本発明は一般に、幹細胞の細胞生物学の分野、より詳細には、新規の培養条件を使用する、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）、体性幹細胞、およびヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）を含む、多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の指向性分化に関する。特に、頭蓋プラコードは、前プラコード段階におけるさらなる運命特定と合わせた神経誘導の二重ＳＭＡＤ阻害戦略により、ヒト多能性幹細胞から派生する。その方法は、プラコードから派生した三叉神経節、成熟水晶体線維、および下垂体前葉ホルモン産生細胞を生成する。これらの細胞の適用は、感覚疾患および内分泌疾患におけるヒト細胞ベースの療法を含むがこれらに限定されない。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
胚性幹細胞および体性幹細胞の分化能により、遺伝疾患、悪性疾患、および変性疾患のための細胞置換療法への可能性が開かれている。神経変性障害、状態、および疾患、なら

びに細胞ベースの療法によるその処置は、症状を防止するか、軽減するか、または消失させる有望な手段を表す。このような障害は、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、および筋委縮性側索硬化症を含む。それらはまた、（ｉ）疾患の処置のために有用でありうるか；または（ｉｉ）神経組織の細胞運命を決定するために有用でありうる、極めて重要な低分子についてスクリーニングするための細胞供給源ももたらす。さらに、これらの細胞は、正常系列または病理学的系列において関連する、鍵となる遺伝子、ｍＲＮＡ転写物、およびタンパク質を特徴付けるためにも研究された。

【０００４】

神経発生は、神経先駆体の識別を命令する複雑なシグナルセットにより、時間内および空間内で指示される。動物モデルでは顕著な進歩がなされているが、ヒト神経発生は、依然としてごくわずかしか理解されていない。

【０００５】

先行研究により、前／後（Ａ／Ｐ）および背／腹（Ｄ／Ｖ）のＣＮＳ識別を規定するパターン化因子に応答した、マウスＥＳＣ（Wichterleら、２００２年；Barberiら、２００３年；Watanabeら、２００５年）およびヒト（Perrierら、２００４年；Liら、２００８年；Eirakuら、２００８年）ＥＳＣの、特異的なニューロン型への指向性分化が報告された。これらの研究により、主要なＣＮＳ領域を特定するシグナル伝達系の進化における保存が裏付けられる。哺乳動物では、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）は、初代神経外植片内（BriscoeおよびEricson、１９９９年）およびマウスＥＳ細胞内（Mizusekiら、２００３年）で、フロアプレート（ＦＰ）を発現させる細胞を含む、多様な腹側細胞型を特定するように、用量依存的に作用する腹側化因子である。ＳＨＨの、ｈＥＳＣから派生した神経細胞への適用は、多様な腹側ニューロン型を誘導することが示されたが、フロアプレート（ＦＰ）組織自体の派生は報告されなかった。ＦＰは、分化経路と、後続のコミットした系列とを誘導する、１つのシグナル伝達中心であるので、ＦＰをヒトＥＳ細胞から産生することができれば、早期ヒト神経発生についてのさらなる研究において大きな前進となろう。さらに、ヒトにおけるＦＰの発生については、組織への接近可能性の欠如のために、ほとんど知られていない。

【０００６】

動物では、ＦＰは、ＳＨＨ産生の主要な部位であり、ある特定の形態の全前脳症および小眼球症、多様な口蓋裂症候群を含む骨格障害、ならびに、ＳＨＨ受容体であるＰａｔｃｈｅｄ１内の突然変異により引き起こされるまれな遺伝障害である、ゴーリン症候群などの腫瘍状態を含む、複数のヒト発達障害が、正中線ＳＨＨシグナル伝達の変化と関連している（Mullorら、２００２年）。しかし、同様な正中線ＳＨＨシグナル伝達の変化であれば、ヒトにおいてもこれらの疾患を誘導するのかどうかは知られていない。

【０００７】

したがって、ヒトフロアプレート細胞の供給源を提供するために、ヒトフロアプレート組織をヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）から誘導することが火急に必要とされている。これらのヒトフロアプレート細胞は、ヒトにおける発達性疾患の原因を決定するための医学的研究、およびヒトにおける発達性疾患の処置における使用のために必要であり、ヒト神経のパターン化および軸索誘導についての比較発生研究にも必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Wichterleら(2002)Cell 110, 385-397
【非特許文献２】Barberiら(2003)Nat Biotechnol. 10:1200-1207
【非特許文献３】Watanabeら(2005)Nat Neuro 3, 288-296
【非特許文献４】Perrierら(2004)Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12543-12548
【非特許文献５】Liら(2008)Stem Cells 4, 886-89399
【非特許文献６】Eirakuら(2008)Cell Stem Cell 3, 519-53
【非特許文献７】Briscoe, J.およびEricson, J.(1999)Semin Cell Dev Biol. 3:3

53-62
【非特許文献８】Mizusekiら(2003)Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5828-5833
【非特許文献９】Mullorら(2002)Trends Cell Biol 12, 562-569

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本発明は一般に、幹細胞の細胞生物学の分野、より詳細には、新規の培養条件を使用する、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）、体性幹細胞、およびヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）を含む、多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の指向性分化に関する。特に、頭蓋プラコードは、前プラコード段階におけるさらなる運命特定と合わせた神経誘導の二重ＳＭＡＤ阻害戦略により、ヒト多能性幹細胞から派生される（derived）。その方法は、プラコードから派生した三叉神経節、成熟水晶体線維、および下垂体前葉ホルモン産生細胞を生成する。これらの細胞の適用は、感覚疾患および内分泌疾患におけるヒト細胞ベースの療法を含むがこれらに限定されない。
【００１０】
一実施形態では、本発明は、ａ）複数の頭蓋プラコード先駆細胞を、Ｎ２細胞培養培地中に提供するかまたはこれにプレーティングするステップと；ｂ）前記複数のプラコード先駆細胞を、脳由来神経栄養因子を含む組成物と接触させるステップであって、複数の三叉神経プラコード細胞を創出するステップとを含む方法を想定する。一実施形態では、方法は、三叉神経プラコード細胞を、三叉神経ニューロンが創出されるような条件下でインキュベートするステップをさらに含む。一実施形態では、頭蓋プラコード先駆細胞は、ＳＩＸ１、ＰＡＸ６、およびＴＦＡＰ２Ａを発現する。一実施形態では、三叉神経プラコード細胞は、ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現させる。一実施形態では、三叉神経プラコード先駆細胞を使用して、感覚ニューロンの感染作用物質を阻害する薬剤を同定することができる。一実施形態では、感覚ニューロンの感染作用物質は、水痘帯状疱疹ウイルス（例えば、その感染の結果として水疱瘡がもたらされる）を含む。一実施形態では、感染した感覚ニューロンは、三叉神経ニューロンである。
【００１１】
一実施形態では、本発明は、ａ）複数の頭蓋プラコード先駆細胞を、細胞培養培地中に提供するかまたはこれにプレーティングするステップと；ｂ）前記複数のプラコード先駆細胞を、ソニックヘッジホッグ、プルモルファミン、およびγ－セクレターゼ阻害剤を含む組成物と接触させるステップであって、複数の下垂体プラコード細胞を創出するステップとを含む方法を想定する。一実施形態では、方法は、前記下垂体プラコード細胞を、性腺刺激ホルモン分泌細胞、副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞、および成長ホルモン分泌細胞を含むがこれらに限定されない、複数の下垂体細胞であって、ホルモンを分泌することが可能な下垂体細胞が創出されるような条件下で、インキュベートするステップをさらに含む。一実施形態では、分泌されるホルモンは、ステロイドホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、および／または成長ホルモンを含むがこれらに限定されない。一実施形態では、頭蓋プラコード先駆細胞は、ＳＩＸ１、ＰＡＸ６、およびＴＦＡＰ２Ａを発現する。一実施形態では、下垂体プラコード細胞は、ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する。
【００１２】
一実施形態では、本発明は、ａ）複数の頭蓋プラコード先駆細胞を、細胞培養培地中に提供するかまたはこれにプレーティングするステップと；ｂ）前記複数のプラコード先駆細胞を、ソニックヘッジホッグ、プルモルファミン、γ－セクレターゼ阻害剤、およびＦＧＦ阻害剤を含む組成物と接触させるステップであって、複数の水晶体プラコード細胞を創出するステップとを含む方法を想定する。一実施形態では、方法は、水晶体プラコード細胞を、水晶体線維が創出されるような条件下でインキュベートするステップをさらに含む。一実施形態では、頭蓋プラコード先駆細胞は、ＳＩＸ１、ＰＡＸ６、およびＴＦＡＰ２Ａを発現する。一実施形態では、水晶体プラコード細胞は、ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現させる。

【００１３】
一実施形態では、本発明は、三叉神経プラコード細胞を、疼痛症候群の少なくとも１つの症状を発現する被験体へと移植するステップを含み、疼痛症候群の前記少なくとも１つの症状が軽減される方法を想定する。一実施形態では、疼痛症候群は、三叉神経麻痺、三叉神経痛、および／または片頭痛の疼痛（migraine pain）を含むがこれらに限定されない。一実施形態では、移植するステップは、橋上で実施する。一実施形態では、三叉神経プラコード細胞は、三叉神経核へと遊走する。
【００１４】
一実施形態では、本発明は、下垂体プラコード細胞を、神経内分泌障害の少なくとも１つの症状を発現する被験体へと移植するステップを含み、神経内分泌障害の前記少なくとも１つの症状が軽減される方法を想定する。一実施形態では、移植された下垂体プラコード細胞は、成長ホルモンを分泌する。一実施形態では、移植された下垂体プラコード細胞は、副腎皮質刺激ホルモンを分泌する。一実施形態では、生着は、脚筋上でなされる。一実施形態では、生着は、視床下部－下垂体軸上でなされる。一実施形態では、生着は、視床下部上でなされる。一実施形態では、生着は、トルコ鞍上でなされる。一実施形態では、神経内分泌障害は、糖尿病を含む。一実施形態では、神経内分泌障害は、下垂体機能低下症を含む。一実施形態では、神経内分泌障害は、下垂体腫瘍を含む。一実施形態では、神経内分泌障害は、放射線療法を含む。
【００１５】
一実施形態では、本発明は、水晶体プラコード細胞を、眼障害の少なくとも１つの症状を発現する被験体へと移植するステップを含み、眼障害の前記少なくとも１つの症状が軽減される方法を想定する。一実施形態では、眼障害の少なくとも１つの症状は、失明を含む。一実施形態では、眼障害の少なくとも１つの症状は、黄斑変性を含む。一実施形態では、眼障害の少なくとも１つの症状は、白内障を含む。一実施形態では、眼障害の少なくとも１つの症状は、乱視を含む。一実施形態では、眼障害の少なくとも１つの症状は、近視を含む。一実施形態では、眼障害の少なくとも１つの症状は、遠視を含む。一実施形態では、移植された水晶体プラコード細胞は、複数の水晶体線維タンパク質を分泌する。一実施形態では、複数の水晶体線維タンパク質は、αβ－クリスタリン水晶体線維タンパク質を含む。一実施形態では、複数の水晶体線維タンパク質は、積層されている。
【００１６】
一実施形態では、本発明は、ａ）ヒト多能性幹細胞を含む細胞培養物を、培養培地中に提供するかまたはこれにプレーティングするステップと；ｂ）前記細胞培養物を、スモールマザーズアゲインストデカペンタプレジック（Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ；ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤および４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）と接触させるステップと；ｃ）前記第１のＳＭＡＤ阻害剤を、頭蓋プラコード先駆細胞が形成されるような条件下で除去するステップとを含む方法を想定する。一実施形態では、第１のＳＭＡＤ阻害剤は、Ｎｏｇｇｉｎ、Ｎｏｇｇｉｎのジスルフィド連結された二量体、ドルソモルフィン、ＬＤＮ－１９３１８９、およびこれらの混合物からなる群から選択される。一実施形態では、頭蓋プラコード先駆細胞は、ＳＩＸ１、ＰＡＸ６、およびＴＦＡＰ２Ａを発現する。一実施形態では、培養培地は、Ｎ２培地を含む。一実施形態では、培養培地は、ｋｎｏｃｋｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ培地を含む。一実施形態では、除去するステップは、接触させるステップの少なくとも４８時間後に実施する。
【００１７】
本発明は、ヒト神経細胞（神経幹細胞、ニューロン亜型、成熟ニューロン、神経系列の細胞）を、（ｉ）幹細胞（ｈＥＳＣ、ｈｉＰＳＣ、体性幹細胞、がん幹細胞、ヒト多能性もしくは多分化能性細胞または哺乳動物多能性もしくは多分化能性細胞）を得；（ｉｉ）ヒト幹細胞を、ＳＭＡＤシグナル伝達を遮断する条件下で培養することにより生成する方法を提供する。好ましい実施形態では、培養のための方法は、フィーダー非含有系内の条

件を含む。好ましい実施形態では、幹細胞を、単層で培養する。好ましい実施形態では、化合物である、Ｎｏｇｇｉｎおよび／またはドルソモルフィンならびにＳＢ４３１５４２を補充した培地の使用を想定した。

【００１８】

一実施形態では、本発明は、Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤とＳｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤とを含むキットを提供する。一実施形態では、前記第１の阻害剤は、Ｎｏｇｇｉｎのジスルフィド連結された二量体（配列番号１）、ドルソモルフィン、ＬＤＮ－１９３１８９、これらの組合せ、およびこれらの混合物からなる群から選択される。一実施形態では、前記Ｎｏｇｇｉｎは、マウスＮｏｇｇｉｎ、ヒトＮｏｇｇｉｎ、ラットＮｏｇｇｉｎ、およびアフリカツメガエルＮｏｇｇｉｎから選択される。一実施形態では、前記はＮｏｇｇｉｎであり、（配列番号１）である。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、未分化リンパ腫キナーゼによるシグナル伝達経路を阻害する。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、Ｌｅｆｔｙ、アクチビン、およびＴＧＦベータからなる群から選択されるシグナル伝達経路を阻害する。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、アクチビンシグナル伝達およびｎｏｄａｌシグナル伝達の両方を阻害する。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）およびその誘導体である。一実施形態では、前記キットは、ヒト幹細胞をさらに含む。一実施形態では、キットは、指示書をさらに含む。

【００１９】

一実施形態では、本発明は、幹細胞、Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤、およびＳｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤を含む組成物を提供する。一実施形態では、前記第１の阻害剤は、Ｎｏｇｇｉｎのジスルフィド連結された二量体、ドルソモルフィン、ＬＤＮ－１９３１８９、これらの組合せ、およびこれらの混合物からなる群から選択される。一実施形態では、前記Ｎｏｇｇｉｎは、マウスＮｏｇｇｉｎ、ヒトＮｏｇｇｉｎ、ラットＮｏｇｇｉｎ、およびアフリカツメガエルＮｏｇｇｉｎから選択される。一実施形態では、前記は、Ｎｏｇｇｉｎであり、（配列番号１）である。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、Ｌｅｆｔｙ／アクチビン／ＴＧＦベータ経路を、ＡＬＫ４、ＡＬＫ５、およびＡＬＫ７受容体のリン酸化を遮断することにより阻害する。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、アクチビン／ｎｏｄａｌシグナル伝達を阻害する。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）およびその誘導体である。一実施形態では、前記幹細胞は、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）、体性幹細胞、およびヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）からなる群から選択される。

【００２０】

一実施形態では、本発明は、幹細胞内の分化を誘導するための方法であって、ａ）ｉ）ヒト幹細胞を含む細胞培養物と、ｉｉ）Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤と、ｉｉｉ）Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第２の阻害剤とを提供するステップと、ｂ）前記幹細胞を、前記Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の第１の阻害剤および前記被験化合物と、幹細胞内で非デフォルト分化細胞への分化を誘導するための条件下で接触させるステップとを含む方法を提供する。一実施形態では、前記第１の阻害剤は、Ｎｏｇｇｉｎのジスルフィド連結された二量体、ドルソモルフィン、ＬＤＮ－１９３１８９、これらの組合

せ、およびこれらの混合物からなる群から選択される。一実施形態では、前記Ｎｏｇｇｉｎは、マウスＮｏｇｇｉｎ、ヒトＮｏｇｇｉｎ、ラットＮｏｇｇｉｎ、およびアフリカツメガエルＮｏｇｇｉｎから選択される。一実施形態では、前記は、Ｎｏｇｇｉｎであり、（配列番号１）である。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、ＡＬＫ４受容体阻害剤である。一実施形態では、前記第２の阻害剤は、４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］ベンズアミド（ＳＢ４３１５４２）およびその誘導体である。一実施形態では、前記非デフォルト分化細胞は、神経前駆細胞である。一実施形態では、前記非デフォルト分化細胞は、培養細胞の集団の一部である。一実施形態では、前記非デフォルト分化細胞は、前記培養細胞の集団のうちの、少なくとも１０％～１００％である。一実施形態では、培養細胞の集団内の前記非デフォルト分化細胞は、ｐａｉｒｅｄ　ｂｏｘ遺伝子６タンパク質を発現する。一実施形態では、前記ｐａｉｒｅｄ　ｂｏｘ遺伝子６タンパク質は、前記培養細胞の集団のうちの少なくとも１０％において発現する。一実施形態では、前記幹細胞は、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）、ヒト体性幹細胞、およびヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）からなる群から選択される。一実施形態では、前記非デフォルト分化細胞は、神経細胞である。一実施形態では、前記神経細胞は、ドーパミン陽性ニューロンおよびフロアプレート細胞からなる群から選択される。

【００２１】

一実施形態では、本発明は、単離ヒト胚神経細胞を含む組成物を提供する。一実施形態では、前記単離ヒト胚神経細胞は、ヒト胚細胞から派生した。一実施形態では、前記ヒト胚神経細胞を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養する。一実施形態では、前記ヒト胚神経細胞は、付着細胞である。一実施形態では、前記組成物は、第２の細胞型をさらに含む共培養物である。

【００２２】

一実施形態では、本発明は、生物学的薬剤をスクリーニングするための方法であって、ａ）ｉ）ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）を含む細胞培養物と、ｉｉ）被験化合物とを提供するステップと、ｂ）前記幹細胞を、前記被験化合物と、神経フロアプレート細胞を誘導するための条件下で接触させるステップとを含む方法を提供する。一実施形態では、前記被験化合物は、ソニックヘッジホッグまたはその断片である。一実施形態では、前記ヒト胚性幹細胞は、ロゼット段階の神経細胞である。

【００２３】

一実施形態では、本発明は、分化細胞を提供するための方法であって、ａ）ｉ）ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）の細胞培養物と、ｉｉ）分化を誘導するための化合物とを提供するステップと、ｂ）前記幹細胞を、前記被験化合物と、神経フロアプレート細胞を誘導するための条件下で接触させるステップとを含む方法を提供する。一実施形態では、前記化合物は、ソニックヘッジホッグタンパク質またはその断片である。一実施形態では、前記誘導することは、平面状の細胞形状、ソニックヘッジホッグを発現させること、フォークヘッドボックスタンパク質Ａ２（ＦＯＸＡ２）を発現させること、Ｎｅｔｒｉｎ－１を発現させること、およびＦ－Ｓｐｏｎｄｉｎを発現させることからなる群から選択される特徴を、前記被験化合物を伴わずに培養された前記ヒト胚性幹細胞内で発現した前記特徴と比較して増大させることからなる。一実施形態では、前記誘導することは、ロゼット構造、ＢＦ１発現、ｐａｉｒｅｄ　ｂｏｘホメオティック遺伝子６（ＰＡＸ６）発現、ＮＫ６ホメオボックス（ＮＫＸ６．１）、ホメオボックスタンパク質ＳＩＸ６の発現からなる群から選択される特徴を、前記被験化合物を伴わずに培養された前記ヒト胚性幹細胞内の前記特徴と比較して減少させることからなる。一実施形態では、方法は、Ｎｏｇｇｉｎタンパク質およびアクチビン受容体様キナーゼ４（ＡＬＫ４）受容体、アクチビン受容体様キナーゼ５（ＡＬＫ５）受容体、およびアクチビン受容体様キナーゼ７（ＡＬＫ７）受容体からなる群から選択される受容体のリン酸化を遮断するための薬剤をさらに提供し、前記ヒト幹細胞を、前記Ｎｏｇｇｉｎおよび前記薬剤と、前記化合物を、ヒト幹細胞へと添加する前に接触させるステップをさらに含む。一実施形態では、方法は、ｄｉｃｋｋｏｐｆ

ｈｏｍｏｌｏｇ１（ＤＫＫ－１）抗体である抗体をさらに提供し、前記幹細胞を、前記抗体と、ＤＫＫ－１タンパク質の機能を低減するために接触させるステップを含む。一実施形態では、方法は、ｗｉｎｇｌｅｓｓ－ｔｙｐｅ　ＭＭＴＶ　ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅ　ｆａｍｉｌｙ，ｍｅｍｂｅｒ１（Ｗｎｔ－１）およびレチノイン酸（ＲＡ）からなる群から選択される尾方化因子をさらに提供し、これらをさらに含む。一実施形態では、方法は、ニューロン誘導性化合物をさらに提供し、前駆体ニューロンを誘導するために、前記ニューロン誘導性化合物を添加するステップｃ）をさらに含む。一実施形態では、前記ドーパミンニューロンは、セリンペプチダーゼであるコリン（ＣＯＲＩＮ）および神経芽腫過剰発現遺伝子（ＮＯＶ）からなる群から選択されるマーカーを発現させる。一実施形態では、前記前駆体ニューロンは、ドーパミンニューロンであり、ＬＩＭ　ｈｏｍｅｏｂｏｘ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ　１，ｂｅｔａ（ＬＭＸ１Ｂ）およびｎｅｕｒｏｇｅｎｉｎ　２（ＮＧＮ２）からなる群から選択されるマーカーを発現させる。一実施形態では、方法は、幹細胞をさらに提供し、前記ヒト神経フロアプレート細胞を、前記幹細胞と、前記幹細胞からの神経突起伸長をもたらすために共培養するステップｄ）をさらに含む。

【００２４】

一実施形態では、本発明は、本明細書で記載される方法により生成される神経フロアプレート細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書で記載される方法により生成されるプラコード細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書で記載される方法により生成される水晶体細胞を提供する。

【００２５】

本発明は、派生した神経細胞の神経識別を評価するための方法を想定する。この方法は、ある特定の系列と関連するタンパク質についての形態的手段、機能的評価、およびこれらの発現または下方調節の測定を介することが可能である。好ましい方法では、運動ニューロンについてのドーパミン作動活性アッセイまたは機能アッセイを活用する。

【００２６】

本方法を用いて、薬剤または神経細胞を、脳へと、疾患、障害の診断、予防、処置に有効な量で、または神経損傷型脳卒中を患う患者に有効な量で送達することができる。このような細胞は、神経運命へと共コミットしている。

【００２７】

一実施形態では、本発明は、単離ヒト胚フロアプレート細胞を含む組成物を想定する。一実施形態では、単離ヒト胚フロアプレート細胞は、ヒト胚細胞から派生した。一実施形態では、ヒト胚フロアプレート細胞を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養する。一実施形態では、ヒト胚フロアプレート細胞は、付着細胞である。一実施形態では、組成物は、第２の細胞型をさらに含む共培養物である。

【００２８】

一実施形態では、本発明は、生物学的薬剤をスクリーニングするための方法であって、ａ）ｉ）ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）を含む細胞培養物と、ｉｉ）被験化合物とを提供するステップと、ｂ）前記幹細胞を、前記被験化合物と、神経フロアプレート細胞を誘導するための条件下で接触させるステップとを含む方法を想定する。一実施形態では、被験化合物は、ソニックヘッジホッグまたはその断片である。一実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、ロゼット段階の神経細胞である。

【００２９】

一実施形態では、本発明は、分化細胞を提供するための方法であって、ａ）ｉ）ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）の細胞培養物と、ｉｉ）分化を誘導するための化合物とを提供するステップと、ｂ）前記幹細胞を、前記被験化合物と、神経フロアプレート細胞を誘導するための条件下で接触させるステップとを含む方法を想定する。一実施形態では、化合物は、ソニックヘッジホッグタンパク質またはその断片である。一実施形態では、誘導することは、平面状の細胞形状、ソニックヘッジホッグを発現させること、フォークヘッドボックスタンパク質Ａ２（ＦＯＸＡ２）を発現させること、Ｎｅｔｒｉｎ－１を発現させるこ

と、およびＦ－Ｓｐｏｎｄｉｎを発現させることからなる群から選択される特徴を、前記被験化合物を伴わずに培養された前記ヒト胚性幹細胞内で発現した前記特徴と比較して増大させることからなる。一実施形態では、誘導することは、ロゼット構造、ＢＦ１発現、ｐａｉｒｅｄ　ｂｏｘホメオティック遺伝子６（ＰＡＸ６）発現、ＮＫ６ホメオボックス（ＮＫＸ６．１）、ホメオボックスタンパク質ＳＩＸ６の発現からなる群から選択される特徴を、前記被験化合物を伴わずに培養された前記ヒト胚性幹細胞内の前記特徴と比較して減少させることからなる。一実施形態では、方法は、Ｎｏｇｇｉｎタンパク質およびアクチビン受容体様キナーゼ４（ＡＬＫ４）受容体、アクチビン受容体様キナーゼ５（ＡＬＫ５）受容体、およびアクチビン受容体様キナーゼ７（ＡＬＫ７）受容体からなる群から選択される受容体のリン酸化を遮断するための薬剤をさらに提供し、前記ヒト幹細胞を、前記Ｎｏｇｇｉｎおよび前記薬剤と、前記化合物を、ヒト幹細胞へと添加する前に、接触させるステップをさらに含む。一実施形態では、方法は、ｄｉｃｋｋｏｐｆ　ｈｏｍｏｌｏｇ１（ＤＫＫ－１）抗体である抗体をさらに提供し、前記幹細胞を、前記抗体と、ＤＫＫ－１タンパク質の機能を低減するために接触させるステップをさらに含む。一実施形態では、方法は、ｗｉｎｇｌｅｓｓ－ｔｙｐｅ　ＭＭＴＶ　ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ　ｓｉｔｅ　ｆａｍｉｌｙ，ｍｅｍｂｅｒ１（Ｗｎｔ－１）およびレチノイン酸（ＲＡ）からなる群から選択される尾方化因子をさらに提供し、これらをさらに含む。一実施形態では、方法は、ニューロン誘導性化合物をさらに提供し、前駆体ニューロンを誘導するために、前記ニューロン誘導性化合物を添加するステップｃ）をさらに含む。一実施形態では、ドーパミンニューロンは、セリンペプチダーゼであるコリン（ＣＯＲＩＮ）および神経芽腫過剰発現遺伝子（ＮＯＶ）からなる群から選択されるマーカーを発現させる。一実施形態では、前駆体ニューロンは、ドーパミンニューロンであり、ＬＩＭ　ｈｏｍｅｏｂｏｘ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ　１，ｂｅｔａ（ＬＭＸ１Ｂ）およびｎｅｕｒｏｇｅｎｉｎ　２（ＮＧＮ２）からなる群から選択されるマーカーを発現させる。一実施形態では、方法は、幹細胞をさらに提供し、前記ヒト神経フロアプレート細胞を、前記幹細胞と、前記幹細胞からの神経突起伸長をもたらすために共培養するステップｄ）をさらに含む。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目１）

細胞を培養する方法であって、

ａ）細胞培養培地中に検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する複数の細胞を提供するステップと、

ｂ）前記複数の細胞を、前記複数の細胞内でのＳＩＸ１およびＰＡＸ３の検出可能レベルの発現を誘導するのに有効な量の、脳由来神経栄養因子を含む組成物と接触させるステップと

を含む方法。

（項目２）

前記ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞を、前記細胞が三叉神経ニューロンへと分化するように誘導するのに十分な条件下で培養するステップをさらに含む、項目１に記載の方法。

（項目３）

前記ＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞が、検出可能レベルのＴＦＡＰ２Ａをさらに発現する、項目１に記載の方法。

（項目４）

ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞が、三叉神経プラコード細胞である、項目１に記載の方法。

（項目５）

細胞を培養する方法であって、

ａ）細胞培養培地中に検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する複数の細胞を提供するステップと、

ｂ）前記複数の細胞を、前記複数の細胞内でのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１の検出可能レベルの発現を誘導するのに有効な量の、ソニックヘッジホッグ、プルモルファミン、およびγ－セクレターゼ阻害剤を含む組成物と接触させるステップと
を含む方法。
（項目６）
前記ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞を、前記細胞が性腺刺激ホルモン分泌細胞、副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞、および成長ホルモン分泌細胞からなる群から選択される下垂体細胞へと分化するように誘導するのに十分な条件下でインキュベートするステップをさらに含む、項目５に記載の方法。
（項目７）
前記ＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞が、検出可能レベルのＴＦＡＰ２Ａをさらに発現する、項目５に記載の方法。
（項目８）
ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞が、下垂体プラコード細胞である、項目５に記載の方法。
（項目９）
細胞を培養する方法であって、
ａ）細胞培養培地中に検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する複数の細胞を提供するステップと、
ｂ）前記複数の細胞を、前記複数の細胞内でのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３の検出可能レベルの発現を誘導するのに有効な量の、ソニックヘッジホッグ、プルモルファミン、γ－セクレターゼ阻害剤、およびＦＧＦ阻害剤を含む組成物と接触させるステップと
を含む方法。
（項目１０）
前記ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞を、前記細胞が水晶体線維へと分化するように誘導するのに十分な条件下で培養するステップをさらに含む、項目９に記載の方法。
（項目１１）
前記ＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞が、検出可能レベルのＴＦＡＰ２Ａをさらに発現する、項目９に記載の方法。
（項目１２）
ＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現する細胞が、水晶体プラコード細胞である、項目５に記載の方法。
（項目１３）
処置を必要とする被験体を処置する方法であって、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞を、疼痛症候群の少なくとも１つの症状を発現する被験体へと移植するステップを含み、前記細胞を移植することにより、前記疼痛症候群の前記少なくとも１つの症状が軽減される方法。
（項目１４）
前記疼痛症候群が、三叉神経麻痺、三叉神経痛、および片頭痛の疼痛からなる群から選択される、項目１３に記載の方法。
（項目１５）
前記細胞が、前記被験体の橋組織へと移植される、項目１３に記載の方法。
（項目１６）
前記細胞が、三叉神経核へと遊走する、項目１３に記載の方法。
（項目１７）
処置を必要とする被験体を処置する方法であって、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞を、神経内分泌障害の少なくとも１つの症状を発現する被験体へと移植するステップを含み、前記細胞を移植することにより、前記神経内分泌障害の前記少なくとも１つの症状が軽減される方法。
（項目１８）

前記細胞が、成長ホルモンを発現する、項目１７に記載の方法。
（項目１９）
前記細胞が、副腎皮質刺激ホルモンを発現する、項目１７に記載の方法。
（項目２０）
前記細胞が、前記被験体の脚筋へと移植される、項目１７に記載の方法。
（項目２１）
前記細胞が、前記被験体の視床下部－下垂体軸の組織へと移植される、項目１７に記載の方法。
（項目２２）
前記細胞が、前記被験体の視床下部へと移植される、項目１７に記載の方法。
（項目２３）
前記細胞が、前記被験体のトルコ鞍へと移植される、項目１７に記載の方法。
（項目２４）
前記神経内分泌障害が、糖尿病、下垂体機能低下症、下垂体腫瘍、および放射線療法の副作用からなる群から選択される、項目１７に記載の方法。
（項目２５）
処置を必要とする被験体を処置する方法であって、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現する細胞を、眼障害の少なくとも１つの症状を発現させる被験体へと移植するステップを含み、前記細胞を移植することにより、前記眼障害の前記少なくとも１つの症状が軽減される方法。
（項目２６）
眼障害の前記少なくとも１つの症状が、失明、黄斑変性、白内障、乱視、近視、および遠視からなる群から選択される、項目２５に記載の方法。
（項目２７）
前記細胞が、複数の水晶体線維タンパク質を発現する、項目２５に記載の方法。
（項目２８）
前記複数の水晶体線維タンパク質が、αβ－クリスタリン水晶体線維タンパク質を含む、項目２７に記載の方法。
（項目２９）
前記複数の水晶体線維タンパク質が、積層されている、項目２７に記載の方法。
（項目３０）
項目１から１２のいずれか一項に記載の方法に従って調製された細胞。
（項目３１）
細胞の分化を誘導するための方法であって、
ａ）複数の細胞を提供するステップと、
ｂ）前記複数の細胞を、スモールマザーズアゲインストデカペンタプレジック（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の阻害剤と接触させるステップと、
ｃ）前記複数の細胞を、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）活性剤と接触させるステップとを含み、前記複数の細胞を、前記複数の細胞内でのＳＩＸ１およびＰＡＸ６の検出可能な発現を誘導するのに有効な量の前記ＳＭＡＤの阻害剤および前記ＢＭＰ活性剤と接触させる方法。
（項目３２）
項目３１に記載の方法に従って調製される、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞。
（項目３３）
検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞であって、
ａ）複数の細胞を提供するステップと、
ｂ）前記複数の細胞を、スモールマザーズアゲインストデカペンタプレジック（ＳＭＡＤ）タンパク質シグナル伝達の阻害剤と接触させるステップと、
ｃ）前記複数の細胞を、第２のＳＭＡＤ阻害剤と接触させるステップと

を含み、前記複数の細胞は、前記複数の細胞内でのＳＩＸ１およびＰＡＸ６の検出可能な発現を誘導するのに有効な量の第１のＳＭＡＤ阻害剤および前記第２のＳＭＡＤ阻害剤と接触される方法によって調製される、細胞。

（項目３４）

処置を必要とする被験体の処置における使用のための、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞。

（項目３５）

前記被験体が、疼痛症候群の少なくとも１つの症状を発現する、項目３４に記載の、使用のための、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する細胞。

（項目３６）

処置を必要とする被験体の処置における使用のための、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞。

（項目３７）

前記被験体が、神経内分泌障害の少なくとも１つの症状を発現する、項目３６に記載の、使用のための、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞。

（項目３８）

処置を必要とする被験体の処置における使用のための、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現する細胞。

（項目３９）

前記被験体が、眼障害の少なくとも１つの症状を発現する、項目３８に記載の、使用のための、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現する細胞。

（項目４０）

項目３０および３２から３９のいずれか一項に記載の細胞を含むキット。

（項目４１）

項目１から２９および３１のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１ａ－ｃ】図１は、高度に効率的なフィーダー非含有の神経誘導を、接着培養物中で、７日間以内に可能とした、例示的な二重ＳＭＡＤ阻害を示す。（ａ）神経誘導を達成するために使用される分化スキームが、ＳＢ４３１５４２と、ＡＬＫ阻害剤と、ＢＭＰ阻害剤であるＮｏｇｇｉｎとの組合せにより達成された。（ｂ）二重ＳＭＡＤ阻害により、神経分化（ＰＡＸ６発現、緑）が、８０％超まで大幅に改善される。単一の因子を使用したところ、低頻度の神経分化（＜１０％のＰＡＸ６$^{+}$細胞）が観察された。（ｃ）早期胚葉マーカーであるＣＤＸ２、ＳＯＸ１、ＳＯＸ１７、およびブラキウリについてのリアルタイムＰＣＲ。（ｄ）ＯＣＴ４発現（赤）およびＰＡＸ６発現（緑）についての免疫蛍光により、７日目までに急速な神経化が生じることが指し示される。（ｅ）二重ＳＭＡＤ阻害時におけるＰＡＸ６、ＯＴＸ２、ＦＧＦ５、ＯＣＴ４についてのリアルタイムＰＣＲにより、５日目において、エピ幹細胞中間体が明らかにされる。（ｆ）二重ＳＭＡＤ阻害時における神経マーカーおよびニューロンマーカーについてのリアルタイムＰＣＲにより、神経外胚葉への分化が指し示される。（ｇ）ＭＳ５間質細胞（Ｎｏｇｇｉｎを伴う）または二重ＳＭＡＤ阻害（ＳＢ４３１５４２およびＮｏｇｇｉｎ）を使用する方法のために、ＢＡＣレポーター細胞系（ＨＥＳ５－ＧＦＰ）を使用して、神経誘導の百分率を定量化した。誤差バーは、Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表し、ｐ値は、スチューデントのＴ検定を使用して決定した。略号：Ｎ：Ｎｏｇｇｉｎ；ＳＢ：ＳＢ４３１５４２；ＫＳＲ：ｋｎｏｃｋ－ｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ培地；Ｎ２：Ｎ２培地である。スケールバー：（ｂ）２００μｍ；（ｄ）５０μｍである。

【図１ｄ－ｇ】図１は、高度に効率的なフィーダー非含有の神経誘導を、接着培養物中で、７日間以内に可能とした、例示的な二重ＳＭＡＤ阻害を示す。（ａ）神経誘導を達成するために使用される分化スキームが、ＳＢ４３１５４２と、ＡＬＫ阻害剤と、ＢＭＰ阻害剤であるＮｏｇｇｉｎとの組合せにより達成された。（ｂ）二重ＳＭＡＤ阻害により、神

経分化（ＰＡＸ６発現、緑）が、８０％超まで大幅に改善される。単一の因子を使用したところ、低頻度の神経分化（＜１０％のＰＡＸ６$^{+}$細胞）が観察された。（ｃ）早期胚葉マーカーであるＣＤＸ２、ＳＯＸ１、ＳＯＸ１７、およびブラキウリについてのリアルタイムＰＣＲ。（ｄ）ＯＣＴ４発現（赤）およびＰＡＸ６発現（緑）についての免疫蛍光により、７日目までに急速な神経化が生じることが指し示される。（ｅ）二重ＳＭＡＤ阻害時におけるＰＡＸ６、ＯＴＸ２、ＦＧＦ５、ＯＣＴ４についてのリアルタイムＰＣＲにより、５日目において、エピ幹細胞中間体が明らかにされる。（ｆ）二重ＳＭＡＤ阻害時における神経マーカーおよびニューロンマーカーについてのリアルタイムＰＣＲにより、神経外胚葉への分化が指し示される。（ｇ）ＭＳ５間質細胞（Ｎｏｇｇｉｎを伴う）または二重ＳＭＡＤ阻害（ＳＢ４３１５４２およびＮｏｇｇｉｎ）を使用する方法のために、ＢＡＣレポーター細胞系（ＨＥＳ５－ＧＦＰ）を使用して、神経誘導の百分率を定量化した。誤差バーは、Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表し、ｐ値は、スチューデントのＴ検定を使用して決定した。略号：Ｎ：Ｎｏｇｇｉｎ；ＳＢ：ＳＢ４３１５４２；ＫＳＲ：ｋｎｏｃｋ－ｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ培地；Ｎ２：Ｎ２培地である。スケールバー：（ｂ）２００μｍ；（ｄ）５０μｍである。

【図２】図２は、ｈＥＳＣ細胞を、ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５２で２４時間にわたり処理する場合に減殺される、例示的なＳＭＡＤ４の核局在化を示す。ある比率のＳＭＡＤ４が、核周囲の局在化へと再分配される結果として、細胞質～核境界が明確でなくなる。

【図３】図３は、提起される機構であって、ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２の作用に寄与する機構についての例示的なモデルを示す。これらは、ＴＧＦ／アクチビンにより媒介される多能性ネットワークおよびＮａｎｏｇにより媒介される多能性ネットワークの不安定化、内因性のアクチビンシグナルおよびｎｏｄａｌシグナルの阻害を介する中内胚葉運命の抑制、ならびに／またはＢＭＰ阻害による原始外胚葉の神経化の促進を介する中内胚葉運命の抑制を含むがこれらに限定されない。（ａ）高密度では主に、ＰＡＸ６＋であるＣＮＳ細胞であって、Ｒ－ＮＳ細胞、ならびに運動ニューロンおよびドーパミン作動性ニューロンによるパターン化可能なニューロン集団をもたらすことが可能なＣＮＳ細胞が、分化後１９日以内に形成される。（ｂ）低密度では、（ａ）で記載した特性を伴うＣＮＳ運命および神経堤運命の両方が観察される。神経堤系列は、パターン化応答および亜型指定応答に従う、メラニン細胞および神経堤先駆細胞を含む。細胞密度に加えて、ＢＭＰ経路を含むシグナル伝達経路のさらなる操作によっても、ＣＮＳ運命の、神経堤運命と対比した比は、不均等になりうる可能性が高い。実線の矢印は、裏付けられた細胞運命ポテンシャルを指し示し、破線の矢印は、最新の文献に基づき提起された細胞運命を指し示す。

【図４】図４は、例示的なリアルタイムのＮａｎｏｇ遺伝子発現を示す。ｋｎｏｃｋ－ｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ（ＫＳＲ）、ＫＳＲ中のＮｏｇｇｉｎ（Ｎ）、ＳＢ４３１５４２（ＳＢ）、またはＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２（Ｎ＋ＳＭ）で処理されたｈＥＳＣを、Ｎａｎｏｇ発現について検討した。最も劇的な下方調節は、ＳＢ４３１５４２の添加と共に観察された。誤差バーは、Ｓ．Ｅ．Ｍ．を表す。

【図５】図５は、ＨＥＳ５－ＧＦＰ　ＢＡＣレポーターｈＥＳＣ細胞系による例示的なＧＦＰ発現を示す。ＧＦＰは、神経誘導のためのいずれの条件（ＭＳ５上のＮｏｇｇｉｎまたはＳＢ４３１５４２を伴うＮｏｇｇｉｎ）下でも、分化の１３日目において観察された。

【図６】図６は、ＭＳ５フィーダー細胞上の、例示的なＥｎｄｏｇｌｉｎ（ＣＤ１０５）発現を示す。ｈＥＳＣを分化させるのに使用されるＭＳ５細胞は、ＦＡＣＳ解析に基づくＥｎｄｏｇｌｉｎ（ＣＤ１０５）発現について、ＳＭＡＤ抑制の組合せを使用して１３日目に分化したｈＥＳＣと比較して、均一に陽性である。Ｅｎｄｏｇｌｉｎ発現を使用して、ＭＳ５細胞を、ＨＥＳ５－ＢＡＣ　ｈＥＳＣから弁別および除去した。

【図７ａ－ｌ】図７は、ドーパミン作動性ニューロンポテンシャルおよび運動ニューロンポテンシャルを伴う、プレロゼットの神経幹細胞を可能とする、二重ＳＭＡＤ阻害による

、ｈＥＳＣの例示的な神経化を示す。ＰＡＸ６陽性神経組織（緑）は、ロゼットマーカー（赤）である（ａ）Ｎｅｓｔｉｎ、（ｂ）ＰＬＺＦ、（ｃ）ＺＯ１を発現させた。（ｄ）ロゼットは、ＰＡＸ６$^{+}$組織を、ロゼットを促進する条件（ＢＡＳＦ）下で継代培養すると形成され、ＫＩ６７発現（緑）およびインターキネティック核移動の証拠である、管腔内のホスホヒストンＨ３発現（赤）により確認される。局所的なニューロン特異性を付与する因子の非存在下では、ＰＡＸ６$^{+}$神経組織（緑）が、（ｅ）ＯＴＸ２および（ｆ）ＢＦ１を発現させたことから、前脳特定への組織デフォルトが指し示される。神経堤は、（ｇ）ＡＰ２、（ｈ）ＨＮＫ１、（ｉ）ＰＡＸ７、および（ｊ）ｐ７５の発現（赤）に基づき、ＰＡＸ６陽性組織（緑）の周辺部上で同定することができた。継代培養すると、神経堤細胞は、（ｌ）ＨＭＢ４５を発現させる（緑）（ｋ）色素性細胞をもたらしたことから、メラノソーム合成が指し示される。（ｍ）ドーパミン作動性ニューロンのパターン化を、５～９日目におけるスーパーソニックの添加に続く、９～１２日目における、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ、およびＦＧＦ８の添加により誘発した。ドーパミン作動性細胞は、１２～１９日目に、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ＧＤＮＦ、ＴＧＦｂ３、およびｃＡＭＰにより成熟させた。運動ニューロンのパターン化は、５日目において、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ、およびレチノイン酸の添加により誘発した。細胞は、１１日目に継代培養した。（ｎ～ｐ）継代培養せずにおいたところ、１９日目までに、チロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）陽性細胞を観察することができた。（ｐ）１２日目に、ひとまとめにして継代培養したところ、ＴＨ陽性細胞からの成熟過程の増大が観察された。運動ニューロン誘導では、運動ニューロンマーカーである（ｑ）ＩＳＬ１および（ｒ）ＨＢ９の核発現が、ｈＥＳＣからの分化後のべ１９日以内に観察された。スケールバー：（ａ、ｂ、ｃ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｏ、ｐ、ｑ、およびｒ）１００μｍ；（ｃ、ｄ）５０μｍ；（ｋ、ｌ、ｎ）２００μｍである。

【図７ｍ－ｒ】図７は、ドーパミン作動性ニューロンポテンシャルおよび運動ニューロンポテンシャルを伴う、プレロゼットの神経幹細胞を可能とする、二重ＳＭＡＤ阻害による、ｈＥＳＣの例示的な神経化を示す。ＰＡＸ６陽性神経組織（緑）は、ロゼットマーカー（赤）である（ａ）Ｎｅｓｔｉｎ、（ｂ）ＰＬＺＦ、（ｃ）ＺＯ１を発現させた。（ｄ）ロゼットは、ＰＡＸ６$^{+}$組織を、ロゼットを促進する条件（ＢＡＳＦ）下で継代培養すると形成され、ＫＩ６７発現（緑）およびインターキネティック核移動の証拠である、管腔内のホスホヒストンＨ３発現（赤）により確認される。局所的なニューロン特異性を付与する因子の非存在下では、ＰＡＸ６$^{+}$神経組織（緑）が、（ｅ）ＯＴＸ２および（ｆ）ＢＦ１を発現させたことから、前脳特定への組織デフォルトが指し示される。神経堤は、（ｇ）ＡＰ２、（ｈ）ＨＮＫ１、（ｉ）ＰＡＸ７、および（ｊ）ｐ７５の発現（赤）に基づき、ＰＡＸ６陽性組織（緑）の周辺部上で同定することができた。継代培養すると、神経堤細胞は、（ｌ）ＨＭＢ４５を発現させる（緑）（ｋ）色素性細胞をもたらしたことから、メラノソーム合成が指し示される。（ｍ）ドーパミン作動性ニューロンのパターン化を、５～９日目におけるスーパーソニックの添加に続く、９～１２日目における、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ、およびＦＧＦ８の添加により誘発した。ドーパミン作動性細胞は、１２～１９日目に、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ＧＤＮＦ、ＴＧＦｂ３、およびｃＡＭＰにより成熟させた。運動ニューロンのパターン化は、５日目において、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ、およびレチノイン酸の添加により誘発した。細胞は、１１日目に継代培養した。（ｎ～ｐ）継代培養せずにおいたところ、１９日目までに、チロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）陽性細胞を観察することができた。（ｐ）１２日目に、ひとまとめにして継代培養したところ、ＴＨ陽性細胞からの成熟過程の増大が観察された。運動ニューロン誘導では、運動ニューロンマーカーである（ｑ）ＩＳＬ１および（ｒ）ＨＢ９の核発現が、ｈＥＳＣからの分化後のべ１９日以内に観察された。スケールバー：（ａ、ｂ、ｃ、ｅ、ｆ、ｇ、ｈ、ｉ、ｊ、ｏ、ｐ、ｑ、およびｒ）１００μｍ；（ｃ、ｄ）５０μｍ；（ｋ、ｌ、ｎ）２００μｍである。

【図８】図８は、ＣＮＳ細胞の発生と対比したＰＮＳ細胞の発生に影響を及ぼす、例示的なプレーティング密度を示す。初期のｈＥＳＣプレーティング密度は、分化の１１日目において存在する、神経堤（ＨＮＫ１、ｐ７５；赤）の、神経組織（ＰＡＸ６；緑）に対する比を決定し、神経分化に好適なのは高密度である。

【図９】図９は、二重ＳＭＡＤ阻害を使用して神経組織へと分化させ、ドーパミン作動性ニューロンおよび運動ニューロンへとパターン化することが可能な、例示的な人工多能性幹細胞（ＩＰＳ）を示す。（ａ－ｉ、ｉｉ）２つのＩＰＳクローン（ＩＰＳ^{C14}、ＩＰＳ^{C27}）を生成し、ＯＣＴ４（赤）のほか、さらなる多能性因子（Ｔｒａ－１－８１、Ｔｒａ－１－６０、ＳＳＥＡ－４、およびＮａｎｏｇ）についてスクリーニングした。（ｂ－ｉ、ｉｉ）２つのクローンを、二重ＳＭＡＤ阻害（ＰＡＸ６発現、緑）により神経化させたところ、ＨＮＫ１染色により神経堤を観察することができた（ｃ－ｉ、ｉｉ）。ＩＰＳクローンからの神経組織を誘導して、ＫＩ－６７発現（赤）およびホスホヒストンＨ３発現（緑）に基づくロゼット－ＮＳＣ（ｄ－ｉ、ｉｉ）、ＨＢ９発現（緑）に基づく運動ニューロン（ｅ－ｉ、ｉｉ）、ならびにＴＵＪ１（緑）とＴＨ（赤）との共発現に基づくドーパミン作動性ニューロン（ｆ－ｉ、ｉｉ）を形成することができた。スケールバー：２００μｍ（ａ）；５０μｍ（ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、ｆ）である。

【図１０】図１０は、神経誘導の最初の５日間における、ＳＭＡＤ阻害の例示的な組合せを示す。均質なＰＡＸ６発現は、培地中に補充されたＳＢ４３１５４２およびＮｏｇｇｉｎを、５日目に中断したところ、１１日目に観察された。

【図１１Ａ－Ｂ】図１１は、改変Ｎ－ＳＢプロトコールを使用する、Ｓｉｘ１＋プラコード先駆細胞の例示的な派生を示す。　Ａ）プラコード細胞特定における内因性ＢＭＰシグナル伝達に対する時間的要件を決定する、ある時間をおいての（timed）ｎｏｇｇｉｎ中断パラダイムについての概略的例示。　Ｂ）（Ａ）で記載した改変Ｎ－ＳＢプロトコールを、分化を通して維持されるＮ－ＳＢ処理（ＳＢＮ条件）と比較して、プラコードマーカーの相対誘導（Ｄｌｘ３、Ｅｙａ１、およびＳｉｘ１）。細胞を、ｎｏｇｇｉｎで４８時間にわたり処理したところ、Ｄｌｘ３、Ｅｙａ１、およびＳｉｘ１の最適な共発現が観察された。データは、１１日目において、ｑＲＴ－ＰＣＲにより測定されたｍＲＮＡ発現の倍数変化を表す。

【図１１Ｃ－Ｄ】図１１は、改変Ｎ－ＳＢプロトコールを使用する、Ｓｉｘ１＋プラコード先駆細胞の例示的な派生を示す。Ｃ）分化の１１日目における、Ｓｉｘ１（プラコードマーカー）発現およびＰａｘ６（前部神経外胚葉マーカー）発現を示す免疫細胞化学解析。改変Ｎ－ＳＢプロトコール（分化の２日後におけるｎｏｇｇｉｎ中断）で処理された細胞は、高百分率のＳｉｘ１＋細胞を示す。Ｄ）改変Ｎ－ＳＢ条件（２日間にわたるｎｏｇｇｉｎ）を使用して生成された細胞のうちの約７０パーセントは、標準的な（前部神経外胚葉誘導性）、１１日間にわたるｎｏｇｇｉｎ処理と比較して、Ｓｉｘ１＋であることを示す。

【図１２Ａ】図１２は、ヒトＥＳ細胞から派生したプラコード特定時における、例示的な経時的グローバル遺伝子発現プロファイルを示す。Ａ～Ｄ）分化の５日目、７日目、９日目、および１１日目における、改変（プラコード誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコール下に置かれたｈＥＳＣ子孫内で示差的に発現する遺伝子の大半についての、標準（前部神経外胚葉誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比した、対応のある比較。

【図１２Ｂ】図１２は、ヒトＥＳ細胞から派生したプラコード特定時における、例示的な経時的グローバル遺伝子発現プロファイルを示す。Ａ～Ｄ）分化の５日目、７日目、９日目、および１１日目における、改変（プラコード誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコール下に置かれたｈＥＳＣ子孫内で示差的に発現する遺伝子の大半についての、標準（前部神経外胚葉誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比した、対応のある比較。

【図１２Ｃ】図１２は、ヒトＥＳ細胞から派生したプラコード特定時における、例示的な経時的グローバル遺伝子発現プロファイルを示す。Ａ～Ｄ）分化の５日目、７日目、９日目、および１１日目における、改変（プラコード誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコール下に置かれたｈＥＳＣ子孫内で示差的に発現する遺伝子の大半についての、標準（前部神経外胚葉

誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比した、対応のある比較。
【図１２Ｄ】図１２は、ヒトＥＳ細胞から派生したプラコード特定時における、例示的な経時的グローバル遺伝子発現プロファイルを示す。Ａ～Ｄ）分化の５日目、７日目、９日目、および１１日目における、改変（プラコード誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコール下に置かれたｈＥＳＣ子孫内で示差的に発現する遺伝子の大半についての、標準（前部神経外胚葉誘導性）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比した、対応のある比較。
【図１２Ｅ】図１２は、ヒトＥＳ細胞から派生したプラコード特定時における、例示的な経時的グローバル遺伝子発現プロファイルを示す。Ｅ）マイクロアレイデータに教師なしのクラスター化を施すことにより、多連、経時的サンプリング、および処理条件に従って、データが区分される。
【図１２Ｆ】図１２は、ヒトＥＳ細胞から派生したプラコード特定時における、例示的な経時的グローバル遺伝子発現プロファイルを示す。Ｆ）ヒトＥＳ細胞の分化時における試料の、後の分化段階における、改変Ｎ－ＳＢで処理された細胞の、標準Ｎ－ＳＢで処理された細胞と対比した区別の増大との緊密な時間的相関を確認する、データの主成分分析。
【図１３】図１３は、ｈＥＳＣプラコードから派生した感覚ニューロンの例示的な派生を示す。Ａ～Ｃ）分化の２０日目における免疫細胞化学解析により、プラコード先駆細胞は、Ｓｉｘ１発現を当初保持するニューロンを効率的にもたらすことが裏付けられる。Ｄ、Ｅ）感覚ニューロンの識別は、Ｂｒｎ３ＡおよびＩｓｌ１の、Ｓｉｘ１＋クラスターから派生されたニューロンの大部分における発現により確認される。Ｆ）分化の４０日目に、ニューロンにより、ペリフェリンの発現の増大と、成熟末梢ニューロン運命に特徴的なＴｕｊ１染色レベルの低下とが示される。Ｇ）ｈＥＳＣから派生したプラコード細胞からの、感覚ニューロン特定時におけるマーカー発現についての概略的例示。
【図１４Ａ－Ｂ】図１４は、ｈＥＳＣから派生したプラコード先駆体の、例示的なプロスペクティブ単離を示す。Ａ）分化の１１日目において、ｈＥＳＣから派生した細胞は、相互に排他的な、ｐ７５＋およびＦｏｒｓｅ１＋先駆細胞ドメインへと区分される。Ｂ）分化の１１日目における、ｐ７５発現およびＨＮＫ１発現についてのＦＡＣＳ解析。
【図１４Ｃ－Ｄ】図１４は、ｈＥＳＣから派生したプラコード先駆体の、例示的なプロスペクティブ単離を示す。Ｃ）ｐ７５発現およびＨＮＫ１発現に基づく細胞の区別に従い、Ｓｉｘ１　ｍＲＮＡ発現についてのｑＲＴ－ＰＣＲデータ。ｐ７５についてだけ陽性であり、ＨＮＫ１については陰性である細胞（プロスペクティブなプラコード先駆体）は、Ｓｉｘ１　ｍＲＮＡ発現の、他の群と比較した劇的な増大を示した。Ｄ）改変（プラコード誘導性）Ｎ－ＳＢ誘導条件下で派生された先駆体を、標準（前部神経外胚葉誘導性）Ｎ－ＳＢ誘導条件と比較すると、ｐ７５について陽性であり、ＨＮＫ１について陰性である細胞の画分の増大が観察される。
【図１５Ａ－Ｄ】図１５は、例示的な高ＳＨＨレベル、ＦＯＸＡ２発現の増大、およびＢＦ１発現の減少を示す。（Ａ）神経分化後２１日目の１代目の継代培養物は、１５日目に添加された場合のＳＨＨ処理の効果を示さないことを示す。定量化された結果を右に示す。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝３である。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｂ）神経分化後２１日目には、９日目におけるＳｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理の後で、ロゼット様構造の低減が示される。定量化されたロゼットの喪失を右に示す。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝４である。スケールバー：１００ｕｍである。（Ｃ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理により、２１日目において、ＢＦ１の減少およびＦｏｘａ２の増大が結果としてもたらされる。定量化は右に示す。＊ｐ＜０．０５、Ｎ＝４である。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｄ）神経分化後２１日目には、ＺＯ１／ＢＦ１＋ロゼット構造の減少が明らかにされる。この減少は、定量化されている。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝４である。スケールバー：５０ｕｍである。
【図１５Ｅ－Ｇ】図１５は、例示的な高ＳＨＨレベル、ＦＯＸＡ２発現の増大、およびＢＦ１発現の減少を示す。（Ｅ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理後２１日目における、ＰＡＸ６発現の減少。この減少は、定量化されている。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝４である。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｆ）ＳｏｎｉｃのＦＯＸＡ２誘導に対する有効性と、Ｓｏ

ｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩのＦＯＸＡ２誘導に対する有効性とを比較する用量反応曲線。（Ｅ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩについての用量反応曲線であって、ＦＰマーカー（ＦＯＸＡ２およびＮｅｔｒｉｎ－１）の誘導を、別のＳＨＨ応答性遺伝子であるＮＫＸ６．１と比較する用量反応曲線。

【図１６Ａ－Ｂ】図１６は、経時的パターン化域が早期で短期間である、例示的なフロアプレート誘導を示す。（Ａ）神経誘導プロトコールにおける、異なる時点にわたるＳｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ添加を示す概略図。（Ｂ～Ｃ）左の見出しにより、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩを添加した日を表示し、上の見出しにより、アッセイを終了した日を表示する。Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩの添加が早期であり、細胞の曝露が長期にわたるほど、極めて高百分率のＦＯＸＡ２がもたらされる。

【図１６Ｃ－Ｅ】図１６は、経時的パターン化域が早期で短期間である、例示的なフロアプレート誘導を示す。Ｂ～Ｃ）左の見出しにより、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩを添加した日を表示し、上の見出しにより、アッセイを終了した日を表示する。Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩの添加が早期であり、細胞の曝露が長期にわたるほど、極めて高百分率のＦＯＸＡ２がもたらされる。（Ｃ）この結果は、定量化されている。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝３である。スケールバー：２００ｕｍであり、高拡大率：５０ｕｍである。（Ｄ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩによる処理の延長（９日間にわたる曝露）は、ＦＯＸＡ２誘導の増大をもたらさない。（Ｅ）残りの研究に使用される、ＦＯＸＡ２誘導に最適なプロトコールについての概略図。

【図１７－１】図１７は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰであって、機能的なＦＰを示す。（Ａ）いつ馴化培地を回収したのかを示す概略図。（Ｂ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩを、神経誘導のために早期に添加する場合に、９および１１日目において、培地へと分泌されるＮｅｔｒｉｎ－１レベルの上昇を示すＥＬＩＳＡ。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝３である。（Ｃ）ＮＳＢおよびＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩによる馴化培地を回収し、ＮＳＢから派生した神経先駆細胞を含有する培養物上に置いた。腹側遺伝子（ＮＫＸ６．１およびＮＫＸ２．１）ならびにＳＨＨ応答性遺伝子（ＧＬＩ２）の誘導を示すｑＲＴ－ＰＣＲである。これらの誘導は、ＳＨＨアンタゴニストであるシクロパミンの存在下で抑制される。（Ｃ’）ＧＦＰ発現細胞系を使用して、ＮＫＸ６．１の誘導を、タンパク質レベルで示す。＊ＮＳＢ　ＣＭと比較したｐ＜０．０１、＃ＦＰ　ＣＭと比較したｐ＜０．０５、Ｎ＝３である。スケールバー：２００ｕｍである。

【図１７－２】図１７は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰであって、機能的なＦＰを示す。（ＤおよびＥ）ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩによる組織と共培養されたＥ８．５神経外胚葉から単離された神経外植片により、異所性ＦＯＸＡ２染色が示される。挿入図は、Ｍ６（緑）とＦＯＸＡ２（赤）との共局在化を示す。（Ｅ）このデータは、定量化されている。＊ｐ＜０．００１、Ｎ＝４の外植片である。スケールバー：５０ｕｍである。

【図１８Ａ－Ｆ】図１８は、ＦＰの発生に関与する新規の遺伝子を明らかにした、例示的な転写解析を示す。（Ａ～Ｊ）１１日間プロトコールの長さにわたり発現の時間経過を示す、ｑＲＴ－ＰＣＲデータ。検討される遺伝子は、ＦＰマーカー（Ａ～Ｄ）、ＳＨＨ応答性遺伝子（Ｅ～Ｇ）、神経マーカー（Ｈ）、ＡＮマーカー（ＩおよびＪ）、ならびに中胚葉コミットメントおよび内胚葉コミットメントに関与する遺伝子（ＫおよびＬ）を含む異なる集団を表した。

【図１８Ｇ－Ｌ】図１８は、ＦＰの発生に関与する新規の遺伝子を明らかにした、例示的な転写解析を示す。（Ａ～Ｊ）１１日間プロトコールの長さにわたり発現の時間経過を示す、ｑＲＴ－ＰＣＲデータ。検討される遺伝子は、ＦＰマーカー（Ａ～Ｄ）、ＳＨＨ応答性遺伝子（Ｅ～Ｇ）、神経マーカー（Ｈ）、ＡＮマーカー（ＩおよびＪ）、ならびに中胚葉コミットメントおよび内胚葉コミットメントに関与する遺伝子（ＫおよびＬ）を含む異なる集団を表した。

【図１８Ｍ－Ｐ】図１８は、ＦＰの発生に関与する新規の遺伝子を明らかにした、例示的な転写解析を示す。（Ｍ～Ｒ）詳細な時間経過を伴うマイクロアレイ解析。（Ｍ～Ｎ）７

日目（Ｍ）および１１日目（Ｎ）について、ＮＳＢ対照と比較した増大または減少を示すＧＯタームを示す。ＦＰ状態は、軸索ガイダンスと関連する遺伝子および分泌されるタンパク質の濃縮を示す一方で、前部神経外胚葉の発生と関連する遺伝子の減少を示す。

【図１８Ｑ－Ｒ】図１８は、ＦＰの発生に関与する新規の遺伝子を明らかにした、例示的な転写解析を示す。（Ｏ～Ｒ）３日目（Ｏ）、５日目（Ｐ）、７日目（Ｑ）、および１１日目（Ｒ）において、ＮＳＢ対照条件と比較して上方調節または下方調節された遺伝子を示す、対応のある比較。

【図１９Ａ－Ｅ】図１９は、ＦＰ誘導のうちの例示的なＤＫＫ－１阻害を示す。（Ａ）対照ＮＳＢ条件下の、経時的なＤＫＫ－１発現についてのｑＰＣＲ。（Ｂ）５、７、および１１日目における、培地中のＤＫＫ－１タンパク質レベルを測定するＥＬＩＳＡにより、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理の後におけるＤｋｋ－１レベルの低下が示される。＊ｐ＜０．０５、Ｎ＝３である。（Ｃ）ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ条件下の、経時的なＤＫＫ－１発現についてのｑＰＣＲ。（ＤおよびＥ）ＢＦ１（Ｄ）およびＦＯＸＡ２（Ｅ）についてのｑＰＣＲであって、ＤＫＫ－１添加の後における、ＢＦ１の増大およびＦＯＸＡ２の減少、ならびにＤＫＫ－１抗体を添加する場合の、ＦＯＸＡ２の増大を示すｑＰＣＲ。

【図１９Ｆ－Ｈ】図１９は、ＦＰ誘導のうちの例示的なＤＫＫ－１阻害を示す。（Ｆ）ＦＯＸＡ２についての免疫染色であって、ＤＫＫ－１を添加する場合の、ＦＯＸＡ２＋細胞の減少を示す免疫染色。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｇ）ＢＦ１発現についてのｑＰＣＲであって、ＤＫＫ－１抗体処理により、初期時点（３～５日目）において、発現の低下がもたらされることを示すｑＰＣＲ。（ＨおよびＩ）早期におけるＤＫＫ－１抗体の添加は、ＦＯＸＡ２発現の増大をもたらすが、後の時点で添加される場合は、効果を及ぼさない。

【図１９Ｉ－Ｋ】図１９は、ＦＰ誘導のうちの例示的なＤＫＫ－１阻害を示す。（ＨおよびＩ）早期におけるＤＫＫ－１抗体の添加は、ＦＯＸＡ２発現の増大をもたらすが、後の時点で添加される場合は、効果を及ぼさない。（Ｉ）分化の５日目から（またはその後に）始まるＤｋｋ－１処理は、ＳＨＨにより媒介されるＦＯＸＡ２発現を増強しないことを裏付ける免疫細胞化学データ。（Ｊ～Ｋ’’）対照またはＢＦ１　ｓｈＲＮＡ（ＪおよびＫ）を形質導入されたｈＥＳＣを示す図であり、ＧＦＰは、形質導入のマーカーである（Ａ’およびＢ’）。神経組織へと分化させると、ＢＦ１の、対照と比較した低減が、タンパク質レベルで見られる（Ｊ’’およびＫ’’）。スケールバー：（ＡおよびＢ）１００ｕｍであり、（Ｊ’’およびＫ’’）２００ｕｍである。

【図１９Ｌ－Ｍ】図１９は、ＦＰ誘導のうちの例示的なＤＫＫ－１阻害を示す。（Ｌ）１１日目におけるｑＲＴ－ＰＣＲ解析により、ＢＦ１　ｓｈＲＮＡ細胞系内のＦＰマーカー（ＦＯＸＡ２、ＳＨＨ、Ｎｅｔｒｉｎ－１、およびＦ－Ｓｐｏｎｄｉｎ）の、対照と比較した増大が示される。ｐ＜０．０１、Ｎ＝３である。（Ｍ）ＢＦ１　ｓｈＲＮＡにより、タンパク質レベルで見られる、ＦＯＸＡ２の上方調節がもたらされる。スケールバー：２００ｕｍである。

【図２０Ａ－Ｃ】図２０は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰが、Ａ／Ｐ軸に沿ってシフトしたことを示す。（Ａ）免疫染色により、ＦＧＦ８、Ｗｎｔ－１、およびレチノイン酸に応答したＦＯＸＡ２の増大が明らかにされる。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｂ）ＦＧＦ８、Ｗｎｔ－１、およびレチノイン酸（ＲＡ）などの尾方化剤により、ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩと比較して、ＦＯＸＡ２の増大およびＳＩＸ６の低減がもたらされることを示すｑＰＣＲ。（Ｃ）中脳ＦＰマーカー（ＣＯＲＩＮおよびＮＯＶ）および中脳ＤＡ前駆体マーカー（ＬＭＸ１Ｂ、ＮＧＮ２、およびＥＮ１）のパネルについてのｑＰＣＲ。特に、Ｗｎｔ－１処理により、中脳ＦＰマーカーおよび中脳ＤＡ前駆体マーカーの両方の上方調節が引き起こされる。

【図２０Ｄ－Ｅ】図２０は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰが、Ａ／Ｐ軸に沿ってシフトしたことを示す。（Ｄ）ＦＰ細胞に、発現を前方腹側軸（ＳＢＥ２）または中脳腹側軸（ＳＢＥ１）へと駆動するＳｈｈ増強因子をトランスフェクトした。デフォルトＦＰは

、ＳＢＥ２活性を呈示することから、前方の位置が指し示される。これは、Ｗｎｔ１およびＦＧＦ８を添加すると失効化され、今や、ＳＢＥ１活性が見られることから、前方識別から中脳へのシフトが示唆される。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｅ）ｈＥＳＣ分化時におけるＦＰ特定を、ＡＮ特定と対比して示す概略図。神経分化は、ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２への曝露時に誘発される。分化の１日目から始まるＳＨＨへの曝露により、ＦＰへの分化が誘導され、ＤＫＫ－１およびＢＦ１の阻害を介して、ＡＮ特定が抑制される。結果として得られるＦＰ細胞の局所的識別は、デフォルトでは前方であるが、Ｗｎｔ－１、ＦＧＦＦ８、またはＲＡなど、尾方化因子の存在下では、後方ＦＰ組織が誘導された。

【図２１Ａ－Ｂ】図２１は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰであって、適切なマーカーを発現させるＦＰを示す。（Ａ）１１日目におけるｑＲＴ－ＰＣＲデータであって、フロアプレートマーカーである、ＦＯＸＡ２、ＳＨＨ、Ｎｅｔｒｉｎ－１、およびＦ－Ｓｐｏｎｄｉｎの、対照ＮＳＢ条件と比べた増大を示すデータ。（Ｂ）免疫染色実験の結果を定量化する表。

【図２１Ｃ－Ｆ】図２１は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰであって、適切なマーカーを発現させるＦＰを示す。（Ｃ～Ｆ）ＦＯＸＡ２＋細胞の免疫染色により、（Ｃ）Ｎｅｓｔｉｎ、（Ｄ）ＳＯＸ２、（Ｅ）Ｎｋｘ２．２、および（Ｆ）Ｔｕｊ１など、少数のマーカーによる共標識化が明らかにされる。スケールバー：（ＤおよびＦ）５０ｕｍ、（ＥおよびＧ）１００ｕｍである。

【図２１Ｇ－Ｈ】図２１は、例示的なｈＥＳＣから派生したＦＰであって、適切なマーカーを発現させるＦＰを示す。スケールバー：（ＤおよびＦ）５０ｕｍ、（ＥおよびＧ）１００ｕｍである。（Ｇ～Ｈ）１１日目におけるｑＲＴ－ＰＣＲデータであって、ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理により分化させた細胞内、および内胚葉系列へと分化した細胞内のＦＯＸＡ２およびＳＯＸ１７のレベルを示すデータ。ＳＯＸ１７は、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ条件下では発現しないが、内胚葉内では高度に発現する。これは、免疫染色により、タンパク質レベルで示される（Ｈ）。スケールバー：２００ｕｍである。

【図２２】図２２は、小脳板外植片の、ＦＰ細胞上の例示的な共培養物であって、神経突起伸長を誘導する共培養物を示す。Ｅ８．５マウスからの小脳外植片を、ＮＳＢによる神経細胞上またはＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ（ＦＰ）細胞上にプレーティングした。３日後、ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ（ＦＰ）条件下では、対照と比較して、大幅な神経突起伸長が観察された。

【図２３】図２３は、マイクロアレイ内の遺伝子変化について検証する、例示的なｑＰＣＲを示す。（Ａ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ条件下において、ＮＳＢ対照と比較した濃縮を示すＦＰ遺伝子についてのｑＰＣＲ。（Ｂ～Ｄ）Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ条件下において、ＮＳＢ対照条件と比較して変化する、新規の遺伝子について検証するｑＰＣＲ。

【図２４Ａ－Ｄ】図２４は、ＦＰ誘導を阻害する、例示的なＢＦ１発現を示す。（Ａ）神経分化時の２つの時点におけるｑＲＴ－ＰＣＲであって、ＢＦ　ｓｈＲＮＡ　ｈＥＳＣ細胞系内のＢＦ１レベルの、対照と比較した低下を示すｑＲＴ－ＰＣＲ。＊ｐ＜０．０１、Ｎ＝３である。（Ｂ）細胞周期解析では、２つの細胞系の細胞周期動態の差異が明らかにされなかった。（Ｃ）ＢＦ１を発現させるｈＥＳＣであって、ＧＦＰにより視覚化されたｈＥＳＣ。スケールバー：２０ｕｍである。（Ｄ）ＢＦを過剰発現させる細胞は、ＦＯＸＡ２＋発現を欠く。スケールバー：２００ｕｍである。

【図２４Ｅ】図２４は、ＦＰ誘導を阻害する、例示的なＢＦ１発現を示す。（Ｅ）１１日目におけるｑＲＴ－ＰＣＲデータであって、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理の後における、ＢＦ１を発現させるｈＥＳＣ内のＦＰ誘導の欠如を示すデータ。

【図２５】図２５は、ＦＰへの分化に沿った、例示的な早期のＷＮＴ１添加であって、ＤＡニューロンへの分化を引き起こしうるＷＮＴ１添加を示す。（Ａ）ＷＮＴまたはＧＳＫ３β阻害剤（ＢＩＯ　１００ｎＭ）の早期の添加により、ＦＯＸＡ２発現を増大させうる。（Ｂ）ＷＮＴ１の、後の段階である神経ロゼット細胞への添加は、ＦＯＸＡ２誘導に対して効果を及ぼさない。スケールバー：２００ｕｍである。（Ｃ）ＷＮＴ１で処理された

ＦＰ培養物は、ＦＯＸＡ２を発現させるＤＡニューロンをもたらしうる。スケールバー：５０ｕｍである。

【図２６】図２６は、例示的な「Gray's Anatomy」の図版Ａ：イヌの胚を前方～後方へと通した一連の横断面であるＩ～Ｖを提示する。断面Ｉは、最も前方である。Ｖ内では、神経板は、ほぼ平面状に広がっている（Henry Gray、「Gray's Anatomy」）。

【図２７Ａ－Ｃ】図２７は、多様なヒトＥＳＣ細胞系およびヒトｉＰＳＣ細胞系にわたる、プラコード誘導、プロトコールの特徴付けおよび検証についての例示的なデータを提示する。誤差バーは、ＳＥＭを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。スケールバーは、５０μｍに対応する。 Ａ）ヒト神経板段階の胚についての背側図（（O'Rahilly、１９８７年）に基づく）についての概略的例示。モデル生物における運命研究により、頭方外胚葉内の固有の馬蹄形テリトリーであって、全てのプラコード先駆体を含有し、前プラコード領域（ＰＰＲ；ここでは、赤でマークされる）と呼ばれる領域が同定されている。神経外胚葉は、神経板（明るい青でマークされる）を形成する。神経板の最も側方の側面は、将来の神経堤細胞をもたらす神経ひだ（ピンクでマークされる）を形成する。 Ｂ）ＢＭＰ４処理により、形状が栄養外胚葉様の系列が誘導される。 Ｃ）ＢＭＰ４処理後またはＳＢ＋ＢＭＰ４処理後の１１日目における、ＣＤＸ２発現。データは、ｑＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ発現の倍数変化を、Ｎ－ＳＢ条件と比較して表す。

【図２７Ｄ－Ｆ】図２７は、多様なヒトＥＳＣ細胞系およびヒトｉＰＳＣ細胞系にわたる、プラコード誘導、プロトコールの特徴付けおよび検証についての例示的なデータを提示する。誤差バーは、ＳＥＭを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。スケールバーは、５０μｍに対応する。 Ｄ）分化の１１日目における、ＳＩＸ１発現（赤）およびＰＡＸ６発現（緑）。 Ｅ）Ｎ－ＳＢ条件下およびＰＩＰ条件下のＤＡＣＨ１（赤）発現についての免疫細胞化学。 Ｆ）ＳＯＸ１０：：ＧＦＰ ｈＥＳＣレポーター細胞系を使用するＰＩＰの１１日目における、ＳＯＸ１０発現についてのフロー解析。

【図２７Ｇ－Ｉ】図２７は、多様なヒトＥＳＣ細胞系およびヒトｉＰＳＣ細胞系にわたる、プラコード誘導、プロトコールの特徴付けおよび検証についての例示的なデータを提示する。誤差バーは、ＳＥＭを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。スケールバーは、５０μｍに対応する。 Ｇ、Ｈ）プラコード誘導プロトコール（ＰＩＰ）は、複数のｈＥＳＣ細胞系（Ｈ９、Ｉ６、およびＨｓ２９３）およびｈｉＰＳＣ細胞系（Ｃ１４、Ｍ３Ｘ、およびＣ２７）にわたり頑健であった。ＳＩＸ１／ＰＡＸ６の免疫細胞化学についての代表的な画像を、各細胞系について（Ｇ）に示し、高拡大率の挿入図、およびＰＩＰ条件下におけるＳＩＸ１＋細胞の百分率の定量化を（Ｈ）に示す。 Ｉ）ＥＹＡ１：：ＧＦＰ増強因子の特異性を、哺乳動物系において調べる実験デザインのスキーム。Ｅ１１．５マウス胚からの初代培養物である、嗅覚（ＯＬＦ）領域および中脳（ＭＢ）領域を単離し、プラコード特異的ＥＹＡ１：：ＧＦＰ増強因子をヌクレオフェクトした。

【図２７Ｊ－Ｋ】図２７は、多様なヒトＥＳＣ細胞系およびヒトｉＰＳＣ細胞系にわたる、プラコード誘導、プロトコールの特徴付けおよび検証についての例示的なデータを提示する。誤差バーは、ＳＥＭを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。スケールバーは、５０μｍに対応する。 Ｊ）初代嗅覚培養物（ＯＬＦ）だけがＥＹＡ１増強因子の活性化を示す一方、中脳初代培養物は、ＧＦＰ発現を示さなかった。 Ｋ）ＧＦＰ発現を、ＦＡＣＳ解析により、ＰＩＰ条件下およびＮ－ＳＢ条件下で定量化する。

【図２８Ａ－Ｂ】図２８は、改変二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを使用する、Ｓｉｘ１＋プラコード先駆体の派生についての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。 Ａ）プラコード特定時における、内因性ＢＭＰシグナル伝達についての時間的要件を決定する、ある時間をおいてのＮｏｇｇｉｎ

中断パラダイムについての概略的例示。プロトコールは、ＣＮＳ誘導のために開発されたＮｏｇｇｉｎ＋ＳＢ４３１５４２（ＮＳＢ）プロトコール（Chambersら、２００９年）を改変することに基づく。　Ｂ）改変ＮＳＢプロトコール（多様な時点にわたるＮｏｇｇｉｎ中断）を、分化を通して維持されるＮ－ＳＢ処理（ＮＳＢ条件）と比較する、プラコードマーカーの相対誘導。データは、１１日目において、ｑＲＴ－ＰＣＲにより測定されたｍＲＮＡ発現の倍数変化を表す。

【図２８Ｃ－Ｄ】図２８は、改変二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを使用する、Ｓｉｘ１＋プラコード先駆体の派生についての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。　Ｃ）分化の１１日目における、ＳＩＸ１発現およびＰＡＸ６発現についての免疫細胞化学解析。挿入図は、クラスター内のＳＩＸ１発現を裏付ける、共焦点断面を示す。スケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｄ）Ｎ－ＳＢ条件下と対比した、改変Ｎ－ＳＢ（ＳＢ３＝プラコード誘導（ＰＩＰ）プロトコール）下で生成されたＳｉｘ１＋細胞についての百分率の定量化。

【図２８Ｅ】図２８は、改変二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを使用する、Ｓｉｘ１＋プラコード先駆体の派生についての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。　Ｅ）プラコードクラスター内のプラコードマーカーである、ＥＹＡ１、ＤＡＣＨ１、およびＦＯＸＧ１についての免疫細胞化学解析。挿入図は、それぞれのマーカーについての高拡大率の画像を示す。スケールバーは、５０μｍに対応する。Ｆ～Ｈ）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールにおける遺伝子発現についての経時的解析。値は、未分化ｈＥＳＣ内で観察される発現に照らして標準化する。

【図２８Ｆ－Ｈ】図２８は、改変二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを使用する、Ｓｉｘ１＋プラコード先駆体の派生についての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。対照Ｎ－ＳＢ条件と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。　Ｆ）多能性マーカー（ＮＡＮＯＧ、ＯＣＴ４／ＰＯＵ５Ｆ１）および栄養外胚葉（ＴＥ）マーカーの発現の喪失。　Ｇ；Ｈ）多能性マーカー（ＮＡＮＯＧ、ＯＣＴ４）、栄養外胚葉マーカー（ＣＤＸ２）、中胚葉マーカー（Ｔ）、内胚葉マーカー（ＳＯＸ１７）、およびプラコードマーカー（ＤＬＸ３、ＳＩＸ１、ＦＯＸＧ１）の時間経過にわたる発現をモニタリングすることによる、Ｇ）中胚葉マーカーであるＴの発現の欠如；Ｈ）非神経運命の発現の欠如およびプラコード運命の誘導。

【図２９Ａ】図２９は、ＣＮＳ（ＮＳＢ条件）運命と対比したプラコード（ＰＩＰ条件）運命についての経時的遺伝子発現解析の例示的なデータを示す。　Ａ）ｈＥＳＣ分化時における試料の、後の分化段階における、ＰＩＰで処理された細胞の、Ｎ－ＳＢで処理された細胞と対比した区別の増大との緊密な時間的相関を確認する、データの主成分分析。

【図２９Ｂ】図２９は、ＣＮＳ（ＮＳＢ条件）運命と対比したプラコード（ＰＩＰ条件）運命についての経時的遺伝子発現解析の例示的なデータを示す。　Ｂ）マイクロアレイデータの、ｑＲＴ－ＰＣＲによる確認。

【図２９Ｃ－Ｅ】図２９は、ＣＮＳ（ＮＳＢ条件）運命と対比したプラコード（ＰＩＰ条件）運命についての経時的遺伝子発現解析の例示的なデータを示す。　Ｃ）ＰＩＰプロトコールの７日目において上方調節された遺伝子についての遺伝子オントロジー解析。　Ｄ）ＰＩＰの５、７、および９日目において上方調節された遺伝子の比較についてのベン図。　Ｅ）ＰＩＰの７、９、および１１日目において上方調節された遺伝子の比較についてのベン図。

【図３０Ａ】図３０は、ｈＥＳＣから派生したプラコード特定時における、経時的グローバル遺伝子発現プロファイルについての例示的なデータを示す。　Ａ）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールにおける、示差的に調節された遺伝子のクラスター化。

【図３０Ｂ】図３０は、ｈＥＳＣから派生したプラコード特定時における、経時的グローバル遺伝子発現プロファイルについての例示的なデータを示す。　Ｂ～Ｅ）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールの５、７、９、および１１日目において、倍数変化で最も顕著に上方調節された遺伝子（赤）および下方調節された遺伝子（青）の上位２０。

【図３０Ｃ】図３０は、ｈＥＳＣから派生したプラコード特定時における、経時的グローバル遺伝子発現プロファイルについての例示的なデータを示す。Ｂ～Ｅ）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールの５、７、９、および１１日目において、倍数変化で最も顕著に上方調節された遺伝子（赤）および下方調節された遺伝子（青）の上位２０。

【図３０Ｄ】図３０は、ｈＥＳＣから派生したプラコード特定時における、経時的グローバル遺伝子発現プロファイルについての例示的なデータを示す。　Ｂ～Ｅ）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールの５、７、９、および１１日目において、倍数変化で最も顕著に上方調節された遺伝子（赤）および下方調節された遺伝子（青）の上位２０。

【図３０Ｅ】図３０は、ｈＥＳＣから派生したプラコード特定時における、経時的グローバル遺伝子発現プロファイルについての例示的なデータを示す。　Ｂ～Ｅ）Ｎ－ＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールの５、７、９、および１１日目において、倍数変化で最も顕著に上方調節された遺伝子（赤）および下方調節された遺伝子（青）の上位２０。

【図３０Ｆ－Ｉ】図３０は、ｈＥＳＣから派生したプラコード特定時における、経時的グローバル遺伝子発現プロファイルについての例示的なデータを示す。　Ｆ～Ｇ）ＰＩＰ条件下（１１日目）における、ＩＳＬ１発現およびＴＦＡＰ２Ａ発現の、タンパク質レベルでの確認。　Ｈ）ＯＶＯＬ２発現（１１日目）の、免疫細胞化学による確認。　Ｉ）ＰＩＰプロトコール、Ｎ－ＳＢプロトコール、および神経堤（ＮＣ）プロトコールにおける、ＯＶＯＬ２遺伝子発現についての経時的解析。Ｆ、Ｇ、およびＨにおけるスケールバーは、５０μｍに対応する。

【図３１Ａ－Ｃ】図３１は、ＦＧＦシグナル伝達をモジュレートしたときの、プラコード運命と対比した表皮運命の誘導、ならびにヒトプラコード誘導時における、ＢＭＰシグナル伝達およびＷＮＴシグナル伝達の役割についての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＥＭを表す。（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１（ｎ＝３の独立の実験）である。　Ａ）早期の角化細胞誘導のために使用される分化条件についての概略的概要。　Ｂ）４２日目において、Ｅ－ＣＡＤＨＥＲＩＮ（緑）およびＫＲＴ１４（赤）を共発現させる角化細胞のパッチ。　Ｃ）４２日目において、ＫＩ６７を発現させるパッチの中心を示す一方で、ＫＩ６７陽性細胞が、６０日目までに減殺される。ＫＲＴ１４陽性細胞は、ＫＩ６７について陰性である。スケールバーは、５０μｍに対応する。

【図３１Ｄ－Ｅ】図３１は、ＦＧＦシグナル伝達をモジュレートしたときの、プラコード運命と対比した表皮運命の誘導、ならびにヒトプラコード誘導時における、ＢＭＰシグナル伝達およびＷＮＴシグナル伝達の役割についての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＥＭを表す。（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１（ｎ＝３の独立の実験）である。　Ｄ）ＰＩＰの３日目から始まる、ＷＮＴシグナル伝達の薬理学的阻害剤（ＸＡＶ９３９）および活性化因子（ＣＨＩＲ９９０２１）による処理後１１日目における、ＳＩＸ１発現およびＳＯＸ１０発現についての解析。　Ｅ）ＰＩＰの３日目から始まる、ＢＭＰシグナル伝達の阻害剤（Ｎｏｇｇｉｎ）および活性化因子（ＢＭＰ４）による処理後１１日目における、ＣＤＸ２発現およびＳＩＸ１発現についての解析。

【図３２Ａ－Ｂ】図３２は、ＦＧＦシグナル伝達により、非神経外胚葉／表皮運命と対比したプラコード運命が決定される、例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。ＰＩＰ条件の対照と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ

＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。ＣおよびＧにおけるスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ａ～Ｂ）ＰＩＰ条件下における、ＴＦＡＰ２ＡおよびＳＩＸ１の誘導についての時間経過。

【図３２Ｃ－Ｄ】図３２は、ＦＧＦシグナル伝達により、非神経外胚葉／表皮運命と対比したプラコード運命が決定される、例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。ＰＩＰ条件の対照と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。ＣおよびＧにおけるスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｃ）ＴＦＡＰ２Ａ（緑）は、プラコード内および表面外胚葉内で発現するのに対し、ＳＩＸ１（赤）は、プラコード細胞内だけで発現する。内因性ＦＧＦシグナル伝達の薬理学的阻害を介してＰＩＰを遮断することにより、ＳＩＸ１＋細胞の形成が遮断される。　Ｄ）ＦＧＦ阻害剤であるＳＵ５４０２による処理後における、ＳＩＸ１遺伝子発現の喪失についての定量化。

【図３２Ｅ－Ｇ】図３２は、ＦＧＦシグナル伝達により、非神経外胚葉／表皮運命と対比したプラコード運命が決定される、例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＤを表す。ＰＩＰ条件の対照と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。ＣおよびＧにおけるスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｅ）早期表皮マーカーであるＫＲＴ８の発現。データは、１１日目における、ｑＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ発現の、ＰＩＰ条件と比較した倍数変化を表す。

Ｆ）角化細胞分化時における、後期表皮マーカーであるＫＲＴ１４の発現。データは、１１日目および４２日目における、ｑＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ発現の、ｈＥＳＣと比較した倍数変化を表す。　Ｇ）長期にわたりＳＵ５４０２で処理された培養物は、ＫＲＴ１４タンパク質を発現していることから、表皮／角化細胞運命が示唆される。

【図３３Ａ－Ｅ】図３３は、複数のヒトＥＳＣ系列およびヒトｉＰＳＣ系列にわたる、プラコードから派生した三叉神経感覚ニューロン系列の特徴付けについての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＥＭ（ｎ＝３の独立の実験）を表す。　Ａ）分化の２０日目における免疫細胞化学解析により、ＳＩＸ１＋プラコードクラスターが、ＳＩＸ１発現を当初保持する、多数のＴＵＪ１陽性ニューロンを効率的にもたらすことが裏付けられる。　Ｂ）４２日目において、分化したニューロンは、ペリフェリン（緑）を発現させる。　Ｃ～Ｅ）短期（２３日目）および長期（５５日目）にわたり培養される三叉神経ニューロンによる、Ｃ）ＲＵＮＸ１受容体、Ｄ）ＲＥＴ１受容体、Ｅ）ＴＲＫ受容体のｍＲＮＡ発現。データは、ｈＥＳＣに照らして標準化されたｍＲＮＡ発現の倍数変化（ＦＣ）を表す。

【図３３Ｆ－Ｇ】図３３は、複数のヒトＥＳＣ系列およびヒトｉＰＳＣ系列にわたる、プラコードから派生した三叉神経感覚ニューロン系列の特徴付けについての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＥＭ（ｎ＝３の独立の実験）を表す。　Ｆ）ＴＲＫＡについての三叉神経ニューロン染色（生細胞染色）。　Ｇ）三叉神経感覚ニューロンのための分化プロトコールについての概略表示。クラスターは、１３～１７日目において、手作業で継代培養する。

【図３３Ｈ】図３３は、複数のヒトＥＳＣ系列およびヒトｉＰＳＣ系列にわたる、プラコードから派生した三叉神経感覚ニューロン系列の特徴付けについての例示的なデータを示す。誤差バーは、ＳＥＭ（ｎ＝３の独立の実験）を表す。　Ｈ）三叉神経型感覚ニューロンを、同じＰＩＰ条件下、多様なｈＥＳＣ（Ｉ６）細胞系およびｈｉＰＳＣ（Ｃ２７、Ｍ３Ｘ、Ｊ１－５）細胞系から、高効率で得る可能性がある。

【図３４Ａ－Ｇ】図３４は、ｈＥＳＣから派生した三叉神経型感覚ニューロンの派生、特徴付け、および移植についての例示的なデータを示す。全てのスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ａ）前プラコード細胞の発生中に派生した多様なプラコードであって、ホルモン産生細胞（下垂体プラコード）、水晶体線維（水晶体プラコード）などの構造細胞、および感覚ニューロン（三叉神経プラコード）を含むプラコードについての概略表示。ＰＩＰ条件下では、三叉神経プラコード運命（オレンジで強調される）は、デフォルトであると考えられる。　Ｂ）三叉神経プラコードマーカーであるＰＡＸ３は、１１日目のプラコード段階において、ＳＩＸ１＋プラコードクラスター内で発現する。　Ｃ）プラコー

ドクラスターは、デフォルトで、ＩＳＬ１およびＨＮＫ１などの感覚ニューロンマーカーを発現させる細胞を急速にもたらす。　Ｄ）分化の２０日目における免疫細胞化学解析により、ＳＩＸ１＋プラコードクラスターが、ＳＩＸ１発現を当初保持する、多数のＴＵＪ１陽性ニューロンを効率的にもたらすことが裏付けられる。　Ｅ）感覚ニューロンの識別は、ＳＩＸ１＋クラスターから派生したニューロンの大部分におけるＢＲＮ３Ａの発現によりさらに確認される。　Ｆ）分化の４２日目において、ニューロンは、ペリフェリンの発現の増大、およびＴＵＪ１染色レベルの低下を示すことから、より多くの成熟末梢ニューロン運命の採用が示唆される。　Ｇ）グルタメートについての三叉神経ニューロン染色。

【図３４Ｈ－Ｋ】図３４は、ｈＥＳＣから派生した三叉神経型感覚ニューロンの派生、特徴付け、および移植についての例示的なデータを示す。全てのスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｈ）ＲＵＮＸ因子の発現。　Ｉ）ＴＲＫ受容体。　Ｊ、Ｋ）温（ＴＲＰＶ１）感覚および冷（ＴＲＰＭ８）感覚ならびに炎症性疼痛（Ｐ２Ｘ３；ｎ＝３の独立の実験）の一因となる、三叉神経ニューロン内の侵害受容器特異的チャネルおよび侵害受容器特異的受容体。

【図３４Ｌ－Ｏ】図３４は、ｈＥＳＣから派生した三叉神経型感覚ニューロンの派生、特徴付け、および移植についての例示的なデータを示す。全てのスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｌ、Ｍ）分化の５３日目における、ｈＥＳＣから派生した三叉神経型ニューロン内の単一細胞パッチクランプによる電気生理学的解析についての例。　Ｎ）刺激の強度は、－１２５ｐＡから始め、単一の活動電位が観察されるまで、２５ｐＡずつ増大させた。示される段階は、２５ｐＡの増分に対応する。　Ｏ）定量的電気生理学的パラメータの概要により、双極型ニューロンおよび三極型ニューロンの両方について同等なパターンを示す。

【図３４Ｐ－Ｓ】図３４は、ｈＥＳＣから派生した三叉神経型感覚ニューロンの派生、特徴付け、および移植についての例示的なデータを示す。全てのスケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｐ～Ｓ）ニワトリ胚内の三叉神経原基への移植。Ｐ）移植の２日後における、ＧＦＰ標識細胞および移植片の形状。　Ｑ）低解像度の画像により、ＧＦＰ＋線維束：ＧＦＰ（緑）およびＤＡＰＩ（青）を示す。挿入図：中脳レベルにおける断面により、三叉神経原基に隣接するＧＦＰ＋線維束を示す。　Ｒ）ヒト線維束は、ヒト細胞質マーカー（緑）および感覚ニューロンマーカーであるペリフェリン（赤）を発現させる。　Ｓ）ｉｎ　ｖｉｖｏの神経節様クラスター内には、ＧＦＰ＋／ペリフェリン＋細胞体が配置されている。

【図３５】図３５は、ｈＥＳＣから派生した三叉神経ニューロン先駆体のｉｎ　ｖｉｖｏ特性を評価するためのパラダイムについての例示的なデータを示す。　Ａ）ｈＥＳＣから派生した三叉神経ニューロンは、白丸により示される通り、分化時（３０日目）に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける束状構造を形成する。　Ｂ）ニワトリおよびマウスへの移植実験についての概略図。　Ｃ）ニワトリ胚実験の移植時および回収時。　Ｄ）神経板領域におけるニワトリ切片内の移植についての陰性染色対照。　Ｅ～Ｈ）移植されたｈＥＳＣから派生した三叉神経ニューロンの軸索側枝が、三叉神経核内の標的に達する能力について調べるための、三叉神経ニューロン先駆体の、成体マウス橋への移植。Ｅ）移植１カ月後における、橋核（Ｐｎ）内に移植されたＧＦＰ（緑）標識ヒト三叉神経ニューロンの位置および形状。Ｆ）ヒトＧＦＰニューロンの神経突起が、三叉神経核へと、中脳水道（Ａｑ）を進む。Ｇ）移植された細胞内の、ＢＲＮ３Ａ（赤）、ＧＦＰ（緑）、およびＤＡＰＩ（青）の共発現についての免疫組織化学。Ｈ）ｈＮＣＡＭおよびＧＦＰを共発現させるヒトニューロン線維束。

【図３６Ａ－Ｃ】図３６は、推定前プラコードおよびヒト水晶体プラコード系列への指向性分化の同定についての例示的なデータを示す。（Ｇ）におけるスケールバーは、５０μｍに対応する。誤差バーは、ＳＤを表す。ＰＩＰ条件の対照と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。　Ａ）分化の３日目における、ＴＦＡＰ２ＡおよびＰＡＸ６についての免疫細胞化学解

析。Ｂ）ＰＩＰによる分化の５、７、９、および１１日目における経時的解析により、分化の７および９日目において、ＴＦＡＰ２ＡおよびＰＡＸ６の共発現が示される。　Ｃ）Ｎ－ＳＢによる分化の５、７、９、および１１日目における経時的解析により、ＣＮＳ神経外胚葉細胞内のＴＦＡＰ２Ａ発現が欠如する一方で、ＰＡＸ６は発現することが示される。Ａ～Ｃにおけるスケールバーは、２５μｍに対応する。

【図３６Ｄ－Ｈ】図３６は、推定前プラコードおよびヒト水晶体プラコード系列への指向性分化の同定についての例示的なデータを示す。（Ｇ）におけるスケールバーは、５０μｍに対応する。誤差バーは、ＳＤを表す。ＰＩＰ条件の対照と比較した、（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である（ｎ＝３の独立の実験）。　Ｄ）ＮＳＢプロトコールと対比したＰＩＰプロトコールにおけるＰＡＸ３遺伝子発現についての経時的解析。　Ｅ）ＰＩＰ時の、ＦＧＦシグナル伝達（ＦＧＦ８、ＳＵ５４０２）およびＷＮＴシグナル伝達（ＣＨＩＲ９９０２１、ＸＡＶ９３９）の活性化因子または阻害剤による処理（７～１１日目）後における、ＰＡＸ３発現レベル。Ｆ）（Ｅ）における処理と同じ処理を使用するときの、ＰＡＸ６発現レベル。　Ｆ）４つのシグナル伝達経路（ＰＩＰの７～１１日目に添加された、ＢＭＰシグナル伝達、ＦＧＦシグナル伝達、ＷＮＴシグナル伝達、およびＳＨＨシグナル伝達のモジュレーター）についてのスクリーンの結果。水晶体プラコードマーカーであるＰＩＴＸ３誘導は、ｑＲＴ－ＰＣＲにより、ＢＭＰシグナル伝達の活性化因子（ＢＭＰ４）またはＦＧＦシグナル伝達の阻害剤（ＳＵ５４０２）による処理時に観察された。　Ｇ）改変プラコード培養物が、分化の５７日目までに、成熟水晶体線維形状を伴うクリスタリン＋細胞へと分化する。

【図３７】図３７は、前プラコード細胞は、ＢＭＰで処理すると、水晶体プラコードへとさらに分化しうるという例示的なデータを示す。スケールバーは、５０μｍに対応する。

Ａ）ＴＦＡＰ２Ａ、ＰＡＸ６とＳＩＸ１との共発現により、ＰＩＰ条件下における、一過性の推定前プラコード段階がマーキングされる。ＰＩＰ条件下の分化の７日目における、ＳＩＸ１（赤）、ＴＦＡＰ２Ａ（青）およびＰＡＸ６（緑）についての免疫細胞化学解析である。スケールバーは、５０μｍに対応する。　Ｂ）早期における水晶体誘導のために使用される分化条件についての概略表示。

【図３８Ａ－Ｄ】図３８は、ホルモン産生下垂体プラコード派生体の特定および機能的特徴付けについての例示的なデータを示す。スケールバーは、（Ｃ、Ｐ）では１００μｍであり、（Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｊ、Ｑ、Ｒ、Ｓ）では５０μｍであり、（Ｋ）では１０μｍである。誤差バーは、ＳＥＭを表す。（Ｂ）におけるＰＩＰ条件、（Ｅ、Ｆ、Ｇ；ｎ＝３の独立の実験）におけるｈＥＳＣ、（Ｌ）における、細胞を伴わないＨＢＳＳ、および（Ｎ、Ｏ；ｎ＝３およびｎ＝５匹の動物）における、ｍａｔｒｉｇｅｌだけを注射された（偽処理）動物からの血漿試料について、対照と比較した（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である。　Ａ）ｉｎ　ｖｉｖｏにおける、正常下垂体系列の発生についての概略的例示（Tabar、２０１１年）。本発明者らの改変ＰＩＰを使用して生成されたホルモン産生細胞の例を、太字で列挙する（ＡＣＴＨ、ＧＨ、ＦＳＨ）。

Ｂ）ＰＩＰによる分化の７～１１日目における、ＳＨＨによる処理が、ｑＲＴ－ＰＣＲにより評価されるＰＩＴＸ１発現およびＳＩＸ６発現を誘導した。ＰＩＴＸ１およびＳＩＸ６により、下垂体原基がマーキングされる。低ＳＨＨ：２０ｎｇ／ｍｌのＣ２５ＩＩ　ＳＨＨ；高ＳＨＨ：１００ｎｇ／ｍｌのＣ２５ＩＩ　ＳＨＨ＋１μＭのプルモルファミンである。　Ｃ）免疫細胞化学解析により、ＳＨＨ処理の存在下における、クラスターのサブセット内のＳＩＸ６の発現を、タンパク質レベルで示した。　Ｄ）１６日目（ＳＨＨ処理時）における、ＬＨＸ３の発現についての免疫細胞化学解析。

【図３８Ｅ－Ｇ】図３８は、ホルモン産生下垂体プラコード派生体の特定および機能的特徴付けについての例示的なデータを示す。スケールバーは、（Ｃ、Ｐ）では１００μｍであり、（Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｊ、Ｑ、Ｒ、Ｓ）では５０μｍであり、（Ｋ）では１０μｍである。誤差バーは、ＳＥＭを表す。（Ｂ）におけるＰＩＰ条件、（Ｅ、Ｆ、Ｇ；ｎ＝３の独立の実験）におけるｈＥＳＣ、（Ｌ）における、細胞を伴わないＨＢＳＳ、および（Ｎ、Ｏ；ｎ＝３およびｎ＝５匹の動物）における、ｍａｔｒｉｇｅｌだけを注射された（偽処理

）動物からの血漿試料について、対照と比較した（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である。　Ｅ～Ｇ）規定された内分泌先駆体系列の誘導。Ｅ）２０日目までに、ＴＢＸ１９発現が高度に誘導された。Ｆ）分化の２０および３２日目における、ＰＩＴ１発現（処理パラダイムについては、図５７Ａを参照されたい）。Ｇ）分化の２０および３２日目におけるＧＡＴＡ２発現。

【図３８Ｈ－Ｋ】図３８は、ホルモン産生下垂体プラコード派生体の特定および機能的特徴付けについての例示的なデータを示す。スケールバーは、（Ｃ、Ｐ）では１００μｍであり、（Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｊ、Ｑ、Ｒ、Ｓ）では５０μｍであり、（Ｋ）では１０μｍである。誤差バーは、ＳＥＭを表す。（Ｂ）におけるＰＩＰ条件、（Ｅ、Ｆ、Ｇ；ｎ＝３の独立の実験）におけるｈＥＳＣ、（Ｌ）における、細胞を伴わないＨＢＳＳ、および（Ｎ、Ｏ；ｎ＝３およびｎ＝５匹の動物）における、ｍａｔｒｉｇｅｌだけを注射された（偽処理）動物からの血漿試料について、対照と比較した（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である。　Ｈ～Ｌ）ホルモン産生についての免疫細胞化学による証拠。Ｈ）ＣＧＡ発現が、１６日目までに、ＳＨＨで処理されたＰＩＰ培養物中でたやすく検出された。Ｉ）ＦＳＨが、２７日目までに発現した。　Ｊ）ＡＣＴＨ発現が、分化の３０日目までに、ＳＨＨで処理されたＰＩＰ培養物中で極めて夥多となった。Ｋ）分化の３０日目におけるＧＨ発現。

【図３８Ｌ－Ｒ】図３８は、ホルモン産生下垂体プラコード派生体の特定および機能的特徴付けについての例示的なデータを示す。スケールバーは、（Ｃ、Ｐ）では１００μｍであり、（Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｊ、Ｑ、Ｒ、Ｓ）では５０μｍであり、（Ｋ）では１０μｍである。誤差バーは、ＳＥＭを表す。（Ｂ）におけるＰＩＰ条件、（Ｅ、Ｆ、Ｇ；ｎ＝３の独立の実験）におけるｈＥＳＣ、（Ｌ）における、細胞を伴わないＨＢＳＳ、および（Ｎ、Ｏ；ｎ＝３およびｎ＝５匹の動物）における、ｍａｔｒｉｇｅｌだけを注射された（偽処理）動物からの血漿試料について、対照と比較した（＊）Ｐ＜０．０５；（＊＊）Ｐ＜０．０１；（＊＊＊）Ｐ＜０．００１である。　Ｈ～Ｌ）ホルモン産生についての免疫細胞化学による証拠。Ｈ）ＣＧＡ発現が、１６日目までに、ＳＨＨで処理されたＰＩＰ培養物中でたやすく検出された。Ｉ）ＦＳＨが、２７日目までに発現した。　Ｊ）ＡＣＴＨ発現が、分化の３０日目までに、ＳＨＨで処理されたＰＩＰ培養物中で極めて夥多となった。Ｋ）分化の３０日目におけるＧＨ発現。　Ｌ）ＨＢＳＳ中の曝露の１０分後の、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるホルモン産生についてのＥＬＩＳＡ測定。　Ｍ）ヌードラット宿主における移植パラダイムについての概略的例示。　Ｎ）移植の４および６週間後における、移植された成体ヌードラットおよび偽移植対照における、血漿ＡＣＴＨレベル。　Ｏ）ヒト特異的ＥＬＩＳＡ（移植の６週間後における）を使用して、血漿ＧＨレベル。Ｐ～Ｒ）移植の６週間後における組織学解析。Ｐ）ｈＮＣＡＭ＋ヒト細胞の頑健な生存。Ｑ）ＡＣＴＨの発現。（Ｒ）ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＧＨ発現細胞。

【図３９】図３９は、ｉｎ　ｖｉｖｏ移植研究のために、下垂体前葉プラコードおよびホルモン産生細胞を生成するプロトコールについての例示的なデータを示す。　Ａ）早期下垂体誘導のために使用される分化条件についての概略表示。　Ｂ、Ｃ）ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスにおける、ｈＥＳＣから派生したＧＦＰ＋早期下垂体細胞の皮下注射時における、短期のｉｎ　ｖｉｖｏ解析。　Ｄ）マウス移植片内のＧＳＵ（ＣＧＡ）標識細胞およびＧＦＰ標識細胞の共発現。　Ｅ）マウス移植片内のＦＳＵ標識細胞およびＧＦＰ標識細胞の共発現。

【図４０－１】図４０は、ｈＰＳＣからのヒトプラコードの派生についての提起されたモデルについての例示的なデータを示す。プラコードの誘導は、ｄＳＭＡＤｉプロトコールを使用する、ＢＭＰシグナル伝達の抑制解除に依存する。持続的なＢＭＰ抑制は、ＣＮＳ運命を誘導したが、ＳＵ５４０２によるＦＧＦシグナル伝達の阻害と組み合わせたＢＭＰの抑制解除は、表皮運命を誘発する。前プラコード細胞は、分化の７日目において、ＦＧＦシグナル伝達、ＢＭＰシグナル伝達、またはＳＨＨシグナル伝達をモジュレートすることにより、特異的プラコード運命へとさらにパターン化し、機能的な水晶体、三叉神経ニューロン、および下垂体前葉の派生体をもたらすことができる。

【図４０－２】図４０は、ｈＰＳＣからのヒトプラコードの派生についての提起されたモデルについての例示的なデータを示す。プラコードの誘導は、ｄＳＭＡＤｉプロトコールを使用する、ＢＭＰシグナル伝達の抑制解除に依存する。持続的なＢＭＰ抑制は、ＣＮＳ運命を誘導したが、ＳＵ５４０２によるＦＧＦシグナル伝達の阻害と組み合わせたＢＭＰの抑制解除は、表皮運命を誘発する。前プラコード細胞は、分化の７日目において、ＦＧＦシグナル伝達、ＢＭＰシグナル伝達、またはＳＨＨシグナル伝達をモジュレートすることにより、特異的プラコード運命へとさらにパターン化し、機能的な水晶体、三叉神経ニューロン、および下垂体前葉の派生体をもたらすことができる。

【図４１Ａ】図４１Ａ～Ｅは、（Ａ～Ｃ）ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰレポーター細胞系を生成するのに使用されるプロトコールについて描示する概略図；および（Ｄ～Ｅ）ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰレポーター構築物を発現させるプラコード細胞を示す。

【図４１Ｂ－Ｅ】図４１Ａ～Ｅは、（Ａ～Ｃ）ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰレポーター細胞系を生成するのに使用されるプロトコールについて描示する概略図；および（Ｄ～Ｅ）ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰレポーター構築物を発現させるプラコード細胞を示す。

【図４２】図４２Ａ～Ｂは、（Ａ）細胞をＥ８／Ｅ６細胞培養培地中で培養するのに使用されるＰＩＰプロトコールであって、培養の０～１１日目にわたり、培養培地に、ＳＭＡＤ阻害剤であるＳＢ４３１５４２を補充し、０～２日目にわたり、ＳＭＡＤ阻害剤であるＬＤ１９３１８９を補充するＰＩＰプロトコール；（Ｂ）ＰＩＰプロトコールおよびＥ８／Ｅ６培地を使用して誘導される細胞内の、プラコード先駆体マーカーであるＳＩＸ１およびＰＡＸ６の発現を示す。

【図４３】図４３Ａ～Ｃは、（Ａ）培養の０～３日目において、Ｅ８／Ｅ６培地に、ＢＭＰ４および単一のＳＭＡＤ阻害剤であるＳＢ４３１５４２を補充する、改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールのためのプロトコール；（Ｂ～Ｃ）０、１、５、１０、１５、および２０ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ４を伴うＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って培養された細胞内のＡＰ２発現を示す。

【図４４】図４４Ａ～Ｃは、（Ａ）ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰ細胞を培養するために使用されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコール；（Ｂ）ＢＭＰ４が、培養培地中に、０～３日目にわたり、１ｍｌ当たりのＢＭＰ４　５ｎｇの濃度で存在する場合に誘導された細胞内のＡＰ２およびＳＩＸ１の発現；ならびに（Ｃ）ＢＭＰ４が、培養培地中に、０～３日目にわたり、１ｍｌ当たりのＢＭＰ４　２０ｎｇの濃度で存在する場合に誘導された細胞内のＡＰ２およびＳＩＸ１の発現を示す。

【図４５】図４５Ａ～Ｂは、（Ａ）ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰ細胞を培養するために使用されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールであって、（Ｂ）０～１、０～２、および０～３日間の培養日にわたり、５ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ４を使用するＰＩＰ－Ｅ６プロトコールと、結果として得られるＳＩＸ１およびＡＰ２の発現とを示す。ＳＩＸ１およびＡＰ２発現の最高レベルは、０～３日間にわたるプロトコールの後で生じた。

【図４６－１】図４６は、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコール（培養後３日目にＢＭＰ４を中断する）に従う、ＳＩＸ：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰ細胞の培養時の経時的な、多様なプラコードマーカーの遺伝子発現レベル。また、多能性（ＯＣＴ４）の喪失、筋肉誘導（ＭｙｏＤ）または全般的な中胚葉誘導（ブラキウリ）の欠如、および内胚葉誘導（ＳＯＸ１７）または神経堤誘導（ＳＯＸ１０）の欠如も示される。

【図４６－２】図４６は、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコール（培養後３日目にＢＭＰ４を中断する）に従う、ＳＩＸ：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰ細胞の培養時の経時的な、多様なプラコードマーカーの遺伝子発現レベル。また、多能性（ＯＣＴ４）の喪失、筋肉誘導（ＭｙｏＤ）または全般的な中胚葉誘導（ブラキウリ）の欠如、および内胚葉誘導（ＳＯＸ１７）または神経堤誘導（ＳＯＸ１０）の欠如も示される。

【図４７】図４７は、多様なタンパク質の染色により、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコール（培養後３日目にＢＭＰ４を中断する）を使用して、Ｅ８／Ｅ６培地中で培養された細胞内のプラコード識別を確認することを示す。

【図４８】図４８は、ＰＩＰ－Ｅ６（Ｅ８／Ｅ６培地）プロトコールおよびＰＩＰ（ＫＳ

Ｒ培地）プロトコールを使用して生成されたプラコード先駆細胞の収量およびばらつきを示す。ＰＩＰ－Ｅ６がもたらすプラコード先駆細胞は、ＰＩＰと比較して少数であったが、ばらつきは小さかった。

【図４９】図４９Ａ～Ｂは、（Ａ）デフォルトプラコードとしての三叉神経プラコードを誘導するように、ＣＨＩＲ（Ｗｎｔ活性化因子）を補充される（培養の２～４日目において補充される）ＰＩＰ－Ｅ６プロトコール；ならびに（Ｂ）培養の１１および１２日後において、改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って培養された細胞が発現させる、三叉神経プラコードマーカーであるＳＩＸ１およびＰＡＸ３。

【図５０】図５０は、ＰＩＰ－Ｅ６培養プロトコールを使用して誘導されうる、下垂体プラコード、水晶体プラコード、および三叉神経プラコードを示す。

【図５１】図５１は、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞内で濃縮される細胞表面マーカーであるＧＤ２を示す。

【図５２】図５２は、ＧＤ２の化学構造を示す。

【図５３Ａ】図５３Ａ～Ｂは、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞内の、ＧＤ２およびプラコードマーカーであるＳＩＸ１：：ＧＦＰの共発現を示す。

【図５３Ｂ】図５３Ａ～Ｂは、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞内の、ＧＤ２およびプラコードマーカーであるＳＩＸ１：：ＧＦＰの共発現を示す。

【図５４Ａ】図５４Ａ～Ｂは、ＣＤ２４およびＳＩＸ１：：ＧＦＰが発現する陽性対照細胞であって、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞を含む全ての神経細胞の中の陽性対照細胞を示す。

【図５４Ｂ】図５４Ａ～Ｂは、ＣＤ２４およびＳＩＸ１：：ＧＦＰが発現する陽性対照細胞であって、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞を含む全ての神経細胞の中の陽性対照細胞を示す。

【図５５】図５５は、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞内で濃縮される細胞表面マーカーであるＣＤ５７（ＨＮＫ１）を示す。

【図５６Ａ】図５６Ａ～Ｂは、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞内の、ＣＤ５７（ＨＮＫ１）およびＳＩＸ１：：ＧＦＰの共発現を示す。

【図５６Ｂ】図５６Ａ～Ｂは、培養の２～４日目において、ＣＨＩＲを補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導された、三叉神経プラコード細胞内の、ＣＤ５７（ＨＮＫ１）およびＳＩＸ１：：ＧＦＰの共発現を示す。

【図５７】図５７は、デフォルトプラコード運命としての三叉神経プラコード運命をもたらすのに使用されうるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールであって、プラコードが、それらによるＧＤ２マーカーの発現に基づき単離および分取されるプロトコールを示す。

【図５８】図５８は、分化の２８日後（ＧＤ２による分取の１４日後）において、改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコール（ＣＨＩＲを補充される）を使用して誘導されたＧＤ２陽性三叉神経細胞の形状を、ＧＤ２陰性細胞と比較して示す。

【図５９】図５９は、分化の４８日後に（ＧＤ２による分取の３３日後）において、改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコール（ＣＨＩＲを補充される）を使用して誘導された三叉神経ニューロンを示す。

【図６０】図６０は、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して、プラコード誘導を促進する化合物についてのハイスループットスクリーンであって、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールの３日目において、被験化合物を、培養培地へと添加するスクリーンについての概略図を示す。

【図６１】図６１は、プラコード誘導を促進する化合物についてのハイスループットスク

リーンの結果を示す。スクリーンでは、３つの候補化合物を、誘導増強因子：ＢＲＬ－５４４４３、フェナントロリン一水和物、およびパルテノリドとして同定した。
【図６２】図６２は、候補プラコード誘導増強因子である、ＢＲＬ－５４４４３、フェナントロリン一水和物、およびパルテノリドの構造を示す。
【図６３】図６３Ａ～Ｂは、（Ａ）下垂体プラコード細胞を誘導するのに使用されたＰＩＰ－Ｅ－６プロトコールであって、下垂体パターン化因子を、ＰＩＰ－Ｅ６培地へと、培養の６～１５日目に補充するプロトコール；ならびに（Ｂ）下垂体プラコードマーカーである、Ｐｉｔｘ１、Ｐｉｔｘ２、Ｌｈｘ３、およびＬｈｘ４の発現により証拠立てられる通り、下垂体プラコードが誘導されたことを示す。
【図６４】図６４は、改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して３０日目までの分化の後で、下垂体プラコード細胞が、３つの下垂体先駆体系列全ての派生体に対応するホルモン発現細胞へと分化したことを示す。
【図６５】図６５は、３つの下垂体先駆体系列の各々の比率が、細胞をＮｏｔｃｈシグナル伝達の阻害剤（ＤＡＰＴ）で処理することによりモジュレートされ、より小さな程度において、ＣＨＩＲ（Ｗｎｔの活性化因子）によりモジュレートされたことを示す。
【図６６】図６６は、培養の６日目における下垂体パターン化因子の添加により改変されたＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って誘導された下垂体ホルモン発現細胞が、外部刺激に対して応答性であったことを示す。ソマトクリニンに応答して、細胞は、成長ホルモン（ＧＨ）を放出する。ナファレリンに応答して、細胞は、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）を放出した。
【図６７】図６７は、ＢＭＰ２を補充されるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って細胞を培養することにより、複数の下垂体亜型特異的マーカーの収量を増大させることが可能であったことを示す。
【図６８】図６８は、下垂体前葉細胞を誘導するための改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを示し、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って、ＳＩＸ１：：ＧＦＰ　ｈＰＳＣを培養し、６～１４日目にわたり、ＦＧＦ８、ＦＧＦ１０、またはＳＨＨなどの下垂体パターン化因子を、培養培地中に組み入れたことを示す。
【図６９】図６９は、Ｋｉ６７およびＳｏｘ２の発現により証拠立てられる通り、培養の６～１４日目にＦＧＦ２またはＦＧＦ８を補充されるＰＩＰ－Ｅ６に従って、ＳＩＸ１：：ＧＦＰ　ｈＰＳＣを培養することにより、推定下垂体幹細胞の数を増大させうることを示す。
【図７０】図７０は、改変ＰＩＰ－Ｅ６（下垂体パターン化因子を補充された）プロトコールを使用することにより、下垂体ホルモン発現運命へと誘導された細胞は、非損傷成体ラット脳（下垂体／視床下部に隣接する）へと移植されると存続し、移植された動物において、対照と比較して検出可能なＡＣＴＨレベルの上昇をもたらしたことを示す。
【図７１】図７１は、誘導された下垂体ホルモン放出細胞の混合物を、下垂体摘出ラットへと移植したところ、ＡＣＴＨレベルは、移植された動物３匹中２匹において増大すると考えられたことを示す。
【発明を実施するための形態】
【００３１】
定義
シグナル伝達標的またはシグナル伝達標的経路の阻害に言及して本明細書で使用される「阻害剤」という用語は、非処理細胞または処理された細胞もしくは組織を阻害しない化合物で処理された細胞と比較した場合に、特定の分化アウトカムなど、結果として得られる標的分子または標的化合物または標的過程に干渉する（すなわち、これを低減するか、または消失させるか、または抑制する）（例えば、デフォルト細胞型の分化を促進する活性のシグナル伝達経路を抑制し、これにより、分化を、非デフォルト細胞型へと誘導する）化合物を指す。
【００３２】
本明細書で使用される「Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｔｈｅｒｓ　Ａｇａｉｎｓｔ　Ｄｅｃａｐｅ

ｎｔａｐｌｅｇｉｃ」または「ＳＭＡＤ」という用語は、シグナル伝達分子を指す。

【００３３】

本明細書で使用される「神経細胞」または「ニューロン細胞」という用語は、ｉｎ　ｖｉｖｏで神経系の一部となり、培養物中で、本発明の方法により得られる細胞、例えば、ＣＮＳ前駆細胞、運動ニューロンおよびドーパミン作動性ニューロン、プラコード先駆細胞、高効率運動ニューロン細胞などのパターン化可能なニューロン集団（すなわち、さらなる分化を経ることが可能な細胞）を指す。

【００３４】

本明細書で使用される「高効率運動ニューロン細胞」という用語は、電流を通すことが可能なニューロン細胞を指す。

【００３５】

「細胞運命の決定」など、細胞に言及して本明細書で使用される「運命」という用語は一般に、遺伝子的に決定された系列であって、その子孫細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏであるのか、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏの培養条件にあるのかに応じて、様々な細胞型または少数の特殊な細胞型になることが可能な系列を伴う細胞を指す。言い換えれば、細胞の所定の運命は、その環境により、細胞が、別の細胞型ではなく、１つの細胞型になるように、特定の分化経路に運命付けられる（ｄｅｓｔｉｎｅｄ）ように決定される、例えば、幹細胞の子孫細胞の「神経運命」は、筋細胞または皮膚細胞ではなく、神経細胞になるように決定される。細胞の「運命」は、高度な特異的条件下を除き、不可逆的なことが典型的である。別の例では、「ＣＮＳ運命」とは、中枢神経系と関連する細胞になることが可能な細胞を指す。逆に、神経細胞になるように運命付けられた（ｆａｔｅｄ）細胞は、「神経前駆細胞」と呼ぶことができる。

【００３６】

本明細書で使用される「神経前駆細胞」という用語は、神経膠細胞などの神経細胞など、神経系の一部を形成することが可能な細胞を指す。

【００３７】

本明細書で使用される「ニューロン亜型」という用語は、ドーパミン発現ニューロン細胞、ペリフェリン$^{+}$ニューロン細胞、運動ニューロン細胞など、ニューロン系の任意の細胞を指す。

【００３８】

本明細書で使用される「神経系列の細胞」という用語は、神経先駆体経路に沿って分化した細胞を指す。

【００３９】

細胞に言及して本明細書で使用される「プラコード」という用語は、感覚神経系と関連する細胞になることが可能な細胞を指す。一実施形態では、プラコード細胞は、Ｓｉｘ１＋について陽性であり、ｐ７５についても陽性であるが、ＨＮＫ１については陰性である。一実施形態では、本発明の方法を使用して得られるプラコード細胞は、水晶体細胞を形成することが可能である。

【００４０】

細胞に言及して本明細書で使用される「下垂体前葉先駆体」という用語は、そのｉｎ　ｖｉｖｏにおける子孫細胞が、下垂体の一部であるかまたは下垂体の一部になる細胞を指す。本発明の下垂体前葉先駆細胞は、Ｌｈｘ３およびＣＧＡを発現させることが可能な細胞を指す。

【００４１】

遺伝子またはタンパク質に関して本明細書で使用される「発現させること」という用語は、マイクロアレイアッセイ、抗体染色アッセイなどのアッセイを使用して観察されうる、ｍＲＮＡまたはタンパク質の作製を指す。

【００４２】

ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤など、シグナル伝達分子またはシグナル伝達分子の経路を阻害することに言及して本明細書で使用される「ＳＭＡＤ阻害剤」という用語は、分子ま

たは経路のシグナル伝達機能に干渉する（すなわち、これを低減するか、または消失させるか、または抑制する）化合物を指す。一実施形態では、本発明の阻害剤は、分化を、デフォルト細胞型から、非デフォルト細胞型へと誘導する（変化させる（ｃｈａｎｇｅ））または変化させる（ａｌｔｅｒ）、例えば、２つのＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤を含む本発明の方法のうちの１つは、非デフォルトの神経前駆細胞をもたらす。

【００４３】

本明細書で使用される「スモールマザーズアゲインストデカペンタプレジック」または「ＳＭＡＤ」という用語は、シグナル伝達分子を指す。

【００４４】

本明細書で使用される「細胞分化」という用語は、それほど特化していない細胞（すなわち、幹細胞）が、より顕著に異なる形態および機能（すなわち、神経板）を保有するように発生または成熟する経路を指す。

【００４５】

本明細書で使用される、分化している細胞系内の細胞に関して使用される「分化」という用語は、細胞が、１つの細胞型（例えば、多分化能性、全能性、または多能性の分化可能細胞）から、標的分化細胞など、別の細胞型へと分化する過程を指す。

【００４６】

経路に言及して本明細書で使用される「細胞分化」という用語は、それほど特化していない細胞（すなわち、幹細胞）が、より顕著に異なる形態および／または機能を保有するように、より特化した細胞または分化細胞、（すなわち、神経細胞、神経板細胞、下垂体細胞、副腎細胞など）へと発生または成熟または分化する過程を指す。

【００４７】

本明細書で使用される「神経幹細胞」または「ＮＳＣ」という用語は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、ニューロン、星状細胞、希突起膠細胞、神経膠細胞などになることが可能であり、培養物中で、ニューロン細胞子孫および神経膠子孫になることが可能であるが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける、それらの、複数の領域特異的なニューロン型への分化ポテンシャルは低い細胞を指す。

【００４８】

細胞分化経路に言及して本明細書で使用される「デフォルト」または「受動的」という用語は、それほど特化していない細胞が、ある特定の化合物で処理しない場合の培養物中で、すなわち、通常の細胞培養条件下で、ある特定の分化細胞型になる経路を指す。言い換えれば、細胞に、分化細胞型を変化させることが可能な分子（すなわち、モルフォゲン）を接触させない場合は、デフォルト細胞が生じる。これに対し、細胞に言及するときの「非デフォルト」とは、結果として生じる分化細胞型であり、デフォルト細胞とは異なる分化細胞型を指す、すなわち、非デフォルト細胞は、ドーパミン陽性神経細胞、フロアプレート細胞、後方ＦＰ組織などを含む、本発明の細胞など、非デフォルト条件から生じる分化細胞型である。デフォルト細胞はまた、細胞を、非デフォルト細胞になるように、モルフォゲンと接触させた後のデフォルト細胞であり、後続の形態発生性化合物を伴わない場合のデフォルト細胞であって、本発明の非デフォルト細胞のうちで、その後、デフォルトの後方ＦＰ細胞になる、非デフォルトのフロアプレート細胞などのデフォルト細胞でもありうる。

【００４９】

ＳＭＡＤ分子に言及して本明細書で使用される「ホモ二量体」という用語は、ジスルフィド連結などにより一緒に連結された、ＳＭＡＤの少なくとも２つの分子を指す。

【００５０】

本明細書で使用される「Ｎｏｇｇｉｎ」という用語は、骨形成タンパク質４（bone morphogenetic protein-4；ＢＭＰ４）など、シグナル伝達タンパク質の形質転換増殖因子ベータ（ＴＧＦ－β）スーパーファミリーのメンバーに結合し、これらを不活化する、分泌型のホモ二量体糖タンパク質を指す。

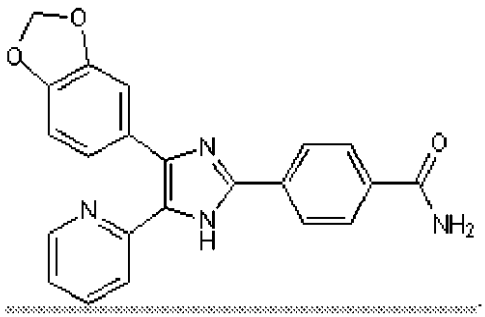
【００５１】

Ｎｏｇｇｉｎは典型的に、ヒト細胞内では、グリコシル化され、ジスルフィド連結された二量体として発現する、６５ｋＤａのタンパク質である（Groppeら（２００２年）、Nature、４２０巻、６３６～６４２頁；Xuら（２００５年）、Nat Methods ２巻、１８５～１９０頁；Wangら（２００５年）、Biochem Biophys Res Commun、３３０巻、９３４～９４２頁）。Ｎｏｇｇｉｎのアミノ酸配列の一例は、受託番号Ｕ７９１６３：単一アミノ酸であるマウスＮｏｇｇｉｎ（配列番号１）：MERCPSLGVTLYALVVVLGLRAAPAGGQHYLHIRPAPSDNLPLVDFTLIEHPDPIFDPKEKDLNETLLRSLLGGHYDPGFMATSPPEDRPGGGGGPAGGAEDLAELFTDQLLRQRPSGAMPSEIKGLEFSEGLAQGKKQRLSKKLRRKLQMWLWSQTFCPVLYAWNDFTLGSRFWPRYVKVGSCFSKRSCSVPEGMVCKPSKSVHLTVLRWRCQRRGGQRCGWIPIQYFTPIISECKCSCである。

【００５２】

本明細書で使用される「ＳＢ４３１５４２」という用語は、ＣＡＳ番号３０１８３６－４１－９を伴い、分子式を$C_{22}H_{18}N_4O_3$とし、名称を４－［４－（１，３－ベンゾジオキソール－５－イル）－５－（２－ピリジニル）－１Ｈ－イミダゾール－２－イル］－ベンズアミドとする分子を指し、例えば、下記の構造：

【化１】

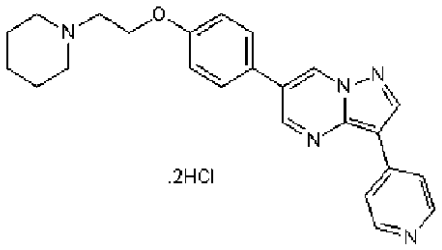


を参照されたい。

【００５３】

本明細書で使用される「ドルソモルフィン」という用語は、ＣＡＳ番号８６６４０５－６４－３を伴い、分子式を$C_{24}H_{25}N_5O$とし、名称を６－［４－［２－（１－ピペリジニル）エトキシ］フェニル］－３－（４－ピリジニル）－ピラゾロ［１，５－ａ］ピリミジン二塩酸塩とする分子を指し、例えば、下記の構造：

【化２】



を参照されたい。

【００５４】

本明細書で使用される「Ｌｅｆｔｙ」という用語は、ＴＧＦベータを阻害する、形質転換増殖因子ベータスーパーファミリーの新規のメンバーであって、「ＥＢＡＦ」または「子宮内膜出血関連因子」または「左右決定因子Ａ」（left-right determination, factor A）としてもまた公知の、ＬＥＦＴＹ１、ＬＥＦＴＹ２、ＬＥＦＴＹＡなどを含むがこれらに限定されないメンバーを指す。Ｌｅｆｔｙタンパク質は、哺乳動物における器官系の左右非対称性の決定に要求される。

【００５５】

本明細書で使用される「アクチビン」という用語は、アクチビンＡ、アクチビンＢなど、形質転換増殖因子ベータ（ＴＧＦ－β）スーパーファミリーのメンバーを指す。

【００５６】
本明細書で使用される「形質転換増殖因子ベータ」または「ＴＧＦ－β」という用語は、多岐にわたる種類の細胞の増殖および分化を調節するサイトカインを指す。
【００５７】
本明細書で使用される「Ｎｏｄａｌ」という用語は、シグナル伝達分子のＴＧＦ－βファミリーのメンバーを指す。Ｎｏｄａｌシグナル伝達は、神経外胚葉のデフォルト経路に沿った、ヒト胚性幹細胞の分化を阻害する（Vallierら、Dev. Biol.、２７５巻、４０３～４２１頁）。
【００５８】
本明細書で使用される「ＡＬＫ」または「未分化リンパ腫キナーゼ」または「未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ」または「Ｋｉ－１」という用語は、膜会合チロシンキナーゼ受容体を指す。
【００５９】
Ｉ型セリン／トレオニンキナーゼ受容体に言及して本明細書で使用される「ＡＬＫ４」という用語は、アクチビンに結合して、アクチビン受容体として機能する、未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ４受容体を指す。
【００６０】
Ｉ型セリン／トレオニンキナーゼ受容体に言及して本明細書で使用される「ＡＬＫ５」という用語は、ＴＧＦ－β１に結合して、ＴＧＦ－β１受容体として機能する、未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ５受容体を指す。
【００６１】
Ｉ型セリン／トレオニンキナーゼ受容体に言及して本明細書で使用される「ＡＬＫ７」という用語は、ＮｏｄａｌおよびＮｏｄａｌ関連タンパク質に結合して、Ｎｏｄａｌ受容体およびＮｏｄａｌ関連タンパク質受容体として機能する、未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ７受容体を指す。
【００６２】
本明細書で使用される「ｐａｉｒｅｄ　ｂｏｘ遺伝子６」または「ＰＡＸ６」という用語は、非デフォルトの神経前駆細胞のマーカーを指す。
【００６３】
本明細書で使用される「キット」という用語は、材料を納付するための任意の納付システムを指す。細胞分化の文脈では、キットとは、幹細胞を接触させるための材料の組合せを指す場合があり、このような納付システムは、適切な容器（試験管など）内の反応試薬（例えば、化合物、タンパク質、検出剤（ＰＡＸ６抗体など）など、および／または支援材料（例えば、細胞分化を実施するための緩衝液、指示書など）の保管、１つの場所から別の場所への輸送もしくは納付を可能とするシステムを含む。例えば、キットは、関連する反応試薬（Ｎｏｇｇｉｎ（もしくはＮｏｇｇｉｎ代替物）およびＳＢ４３１５４２（もしくはＳＢ４３１５４２代替物）など）ならびに／または支援材料を含有する、１または複数の格納物（例えば、箱またはバッグなど）を含む。
【００６４】
細胞に言及して本明細書で使用される「分化を誘導すること」という用語は、デフォルト細胞型（遺伝子型および／または表現型）を、非デフォルト細胞型（遺伝子型および／または表現型）へと変化させることを指す。したがって、「幹細胞内の分化を誘導すること」とは、細胞が、遺伝子型（すなわち、マイクロアレイなど、遺伝子解析により決定される遺伝子発現の変化）および／または表現型（すなわち、ＰＡＸ６などのタンパク質、またはＨＭＢ４５陽性（＋）であるが、ＳＯＸ１０について陰性（－）であるなど、タンパク質のセットの発現の変化）など、幹細胞と異なる特徴を伴う子孫細胞へと分かれるように誘導することを指す。
【００６５】
本明細書で使用される細胞を本発明の化合物と「接触させること」という用語は、「接触させた」細胞をもたらすために、化合物を、それが細胞に触れることを可能とする位置

に置くことを指す。接触させることは、任意の適切な方法を使用して達成することができる。例えば、一実施形態では、接触させることは、化合物を細胞の試験管へと添加することを介する。接触させることはまた、化合物を細胞の培養物へと添加することによって達成することもできる。

【００６６】

本明細書で使用される「幹細胞」という用語は、全能性または多能性または多分化能性であり、胚性幹細胞、器官から単離された幹細胞、例えば、皮膚幹細胞など、１または複数の異なる細胞型へと分化することが可能である細胞を指す。

【００６７】

本明細書で使用される「胚性幹細胞」という用語は、ＷＡ－０９など、幹細胞系の細胞、または胚もしくは胎盤もしくは臍帯から単離された細胞を指す。

【００６８】

本明細書で使用される「成体幹細胞」という用語は、出生後の生物から派生した幹細胞を指す。

【００６９】

本明細書で使用される「神経幹細胞」または「ＮＳＣ」という用語は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、ニューロン、星状細胞、希突起膠細胞、神経膠細胞になることが可能であり、培養物中で、ニューロン子孫および神経膠子孫になることが可能であるが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける、それらの、複数の領域特異的なニューロン型への分化ポテンシャルは低い細胞を指す。

【００７０】

本明細書で使用される「中胚葉細胞系」という用語は、中胚葉細胞と関連する特徴を提示する細胞系を指す。

【００７１】

本明細書で使用される「内胚葉細胞系」という用語は、内胚葉細胞と通常関連する特徴を提示する細胞系を指す。

【００７２】

本明細書で使用される「神経細胞系」という用語は、神経細胞と通常関連する特徴を提示する細胞系を指す。このような特徴の例は、ＦＯＸＡ２、ＳＨＨ、Ｎｅｔｒｉｎ－１、Ｆ－Ｓｐｏｎｄｉｎなどの発現を含むがこれらに限定されない。

【００７３】

本明細書で使用される「全能性」という用語は、分化生物における任意の種類の細胞のほか、胎盤など、胚体外物質の細胞などへと分化する細胞の能力を指す。

【００７４】

本明細書で使用される「多能性」という用語は、任意の分化細胞型へと分化することが可能な細胞系を指す。

【００７５】

本明細書で使用される「多分化能性」という用語は、少なくとも２つの分化細胞型へと分化することが可能な細胞系を指す。

【００７６】

分化する細胞系内の細胞に関して本明細書で使用される「分化」という用語は、細胞が、１つの細胞型（例えば、多分化能性、全能性、または多能性の分化可能細胞）から、標的分化細胞など、別の細胞型へと分化する過程を指す。

【００７７】

本明細書で使用される「細胞培養物」という用語は、細胞の、任意のｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養物を指す。この用語には、連続細胞系（例えば、不死化表現型を伴う）、初代細胞培養物、有限細胞系（例えば、非形質転換細胞）、およびｉｎ　ｖｉｔｒｏで維持された、卵母細胞および胚を含む、他の任意の細胞集団が含まれる。

【００７８】

本明細書で使用される「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ」という用語は、人工環境および人工環境内

で生じる過程または反応を指す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ環境は、試験管および細胞培養物からなりうるがこれらに限定されない。「ｉｎ　ｖｉｖｏ」という用語は、天然環境（例えば、動物または細胞）および天然環境内で生じる過程または反応を指す。

【００７９】

本明細書で使用される「神経板」または「髄板」という用語は、発生しつつある胚の中心体領域内の、外胚葉の肥厚した帯状部（神経管の、未癒合の腹側の、長型の帯域）であって、神経管および神経堤へと発生する（分化する）帯状部を指す（図１２を参照されたい）。胚発生時において、神経板細胞は、一連の発生段階を経、その後、脳、脊髄、および中枢神経系の他の組織を形成する細胞へと発生する。

【００８０】

本明細書で使用される「フロアプレート」または「ＦＰ」または「腹側板」または「底板」または「神経フロアプレート」という用語は、神経板の正中線において発生し、神経管の腹側正中線に位置する、細胞の領域を指す（図１２を参照されたい）。

【００８１】

細胞に言及して本明細書で使用される「神経フロアプレート細胞」または「ＦＰ細胞」または「フロアプレート細胞」という用語は、「特化した神経上皮細胞」ともまた呼ばれる細胞群であって、神経フロアプレート内の発生しつつある胚内で見出される細胞群を指す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるＦＰ細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＦＰ細胞内でもまた見出されるが、他の細胞内では見出されない、ある特定の細胞マーカーを発現させる細胞である。

【００８２】

本明細書で使用される「ルーフプレート」または「蓋板」または「背側ルーフプレート」という用語は、形成されつつあるかまたは形成された神経管領域の背側領域、神経管の未癒合の背側の長型の帯域に位置する細胞群を指す。

【００８３】

本明細書で使用される「神経管」という用語は、神経外胚葉細胞が、脳細胞および脊髄細胞へと分化しうるように、神経溝の閉止により、早期胚の神経外胚葉細胞から形成される、神経上皮細胞による中空の円筒状の構造を指す。

【００８４】

細胞または細胞領域に言及して本明細書で使用される「予定」または「前駆体」という用語は、適切な条件下で、すなわち、適正な増殖因子、化合物、細胞外シグナル、細胞内シグナルなどと接触させると、発生する（分化する）細胞または細胞領域の種類を指す。例えば、「前駆体ニューロン」とは、ニューロンへと発生する能力を有する細胞を指す。

【００８５】

本明細書で使用される「ドーパミンニューロン」または「ドーパミン作動性ニューロン」とは一般に、ドーパミンを発現させることが可能な細胞を指す。「中脳ドーパミンニューロン」または「ｍＤＡ」という用語は、前脳構造内の予定ドーパミン発現細胞および前脳構造内のドーパミン発現細胞を指す。

【００８６】

細胞分化経路に言及して本明細書で使用される「デフォルト」という用語は、それほど特化していない細胞が、分化細胞型を変化させる分子に接触させない場合に、ある特定の分化細胞型になる経路を指す。

【００８７】

本明細書で使用される「細胞分化」という用語は、それほど特化していない細胞（すなわち、幹細胞）が、より顕著に異なる形態および機能（すなわち、神経板）を保有するように発生または成熟する経路を指す。

【００８８】

本明細書で使用される「神経突起伸長」（neurite　outgrowth）という用語は、細胞質の、細胞からの、細長い、膜で取り囲まれた突出部についての観察を指す。

【００８９】

本明細書で使用される「付着細胞」という用語は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで増殖する細胞であって、培養ディッシュの底面または側面に接触する細胞を指し、この場合、付着細胞は、細胞外マトリックス分子などを介してディッシュに接触しうる。懸濁培養物中の細胞と対比される用語である。

【００９０】

本明細書で使用される「マーカー」または「細胞マーカー」という用語は、特定の細胞または細胞型を同定する遺伝子またはタンパク質を指す。細胞についてのマーカーは、１つのマーカーに限定されない場合もあり、マーカーとは、指定されたマーカー群により、細胞または細胞型を、別の細胞または細胞型から識別しうるような、マーカーの「パターン」を指す場合もある。例えば、本発明のＦＰ細胞は、ＦＰ細胞、すなわち、ＦＯＸＡ２陽性／ＢＦ１陰性細胞を、非ＦＰ細胞、すなわち、ＦＯＸＡ２陰性／ＢＦ１陽性細胞から区別する、１または複数のマーカーを発現させる。

【００９１】

本明細書で使用される「被験化合物」という用語は、本発明の細胞を提供するのに使用される、任意の化学的実体、医薬、薬物などを指す。

【００９２】

本明細書で使用される「ロゼット段階の神経細胞」または「Ｒ－ＮＳＣ」という用語は、中枢神経系（ＣＮＳ）細胞（運命）および末梢神経系（ＰＮＳ）細胞（運命）を形成することが可能な、広範な分化ポテンシャルを伴い、かつ、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける生着が可能な、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける神経幹細胞型を指す。言い換えれば、ロゼット段階の神経細胞は、ロゼット構造を形成することが可能であり、ロゼット段階の神経細胞集団は、ニューロン分化の特徴を有する。

【００９３】

細胞に言及して本明細書で使用される「ロゼット構造」または「ロゼット」という用語は、ハロー型またはスポーク車輪型の細胞配置を指す。

【００９４】

特徴に言及して本明細書で使用される「増大させること」という用語は、被験化合物を伴い培養されたヒト胚性幹細胞内のマーカーの量と、被験化合物を伴わずに培養されたヒト胚性幹細胞内のマーカーの量を比較する場合など、対照における前記特徴と比較した場合に、特徴の量が大きいことを指す。

【００９５】

特徴に言及して本明細書で使用される「減少させること」という用語は、被験化合物を伴い培養されたヒト胚性幹細胞内のマーカーの量と、被験化合物を伴わずに培養されたヒト胚性幹細胞内のマーカーの量を比較する場合など、対照における前記特徴と比較した場合に、特徴の量が小さいことを指す。

【００９６】

本明細書で使用される「タンパク質機能を低減すること」または「機能の喪失」という用語は、その機能を低下させるために、機能に干渉するかまたはこれを遮断すること、例えば、遮断抗体によりＤＫＫ－１の機能を低下させることを指す。

【００９７】

本明細書で使用される「ニューロン誘導性化合物」という用語は、ニューロン細胞をもたらす細胞経路に沿って分化を引き起こすための物質を指す。

【００９８】

本明細書で使用される「受容体のリン酸化を遮断するための薬剤」という用語は、受容体の機能を低減するための物質、すなわち、リン酸化を低減することにより受容体の機能を低減するための物質を指す。

【００９９】

アッセイに言及する場合に本明細書で使用される「応答」という用語は、検出可能なシグナルの発生（例えば、レポータータンパク質の蓄積、イオン濃度の増大、検出可能な化学生成物の蓄積）を指す。

【０１００】
「試料」という用語は、その最も広範な意味において使用される。１つの意味では、「試料」とは、細胞または組織を指す場合がある。別の意味では、「試料」とは、任意の供給源から得られる検体または培養物を含むことを意図し、流体、固体、および組織を包摂する。環境試料は、表面物、土壌、水、および工業試料などの環境材料を含む。これらの例は、本発明に適用可能な試料の種類を限定するものとはみなさないものとする。
【０１０１】
本明細書で使用される「精製された」、「精製する」、「精製」、「単離された」、「単離する」、「単離」という用語、およびこれらの文法的同等物は、試料からの少なくとも１つの夾雑物の量の低減を指す。例えば、細胞型は、少なくとも１０％、好ましくは少なくとも３０％、より好ましくは少なくとも５０％、さらにより好ましくは少なくとも７５％精製され、最も好ましくは少なくとも９０％精製されるが、これは、分化したＦＰ細胞の、混合細胞培養物中に存在する細胞など、非ＦＰ細胞からの単離など、所望されない細胞型の量の低減である。したがって、細胞型の精製は、「濃縮」、すなわち、試料中のヌクレオチド配列の量の増大を結果としてもたらす。
【０１０２】
対象物（例えば、細胞、組織など）および／または化学物質（例えば、タンパク質、アミノ酸配列、核酸配列、コドンなど）へと適用される場合に本明細書で使用される「自然発生の」という用語は、対象物および／または化合物が、天然で見出される／見出されたことを意味する。例えば、自然発生の細胞とは、生物において存在する細胞であって、胚細胞など、天然の供給源から単離されうる細胞を指し、この場合、細胞は、実験室において、人為により意図的に改変されていない。
【０１０３】
本明細書で使用される「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ」という用語は、人工環境および人工環境内で生じる過程または反応を指す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ環境は、試験管および細胞培養物として例示されるがこれらに限定されない。
【０１０４】
本明細書で使用される「ｉｎ　ｖｉｖｏ」という用語は、胚発生、細胞分化、神経管形成など、天然環境（例えば、動物または細胞）および天然環境内で生じる過程または反応を指す。
【０１０５】
本明細書で使用される「増殖」という用語は、細胞数の増大を指す。
【０１０６】
本明細書で使用される「リガンド」という用語は、第２の分子に結合する分子を指す。特定の分子は、リガンドおよび第２の分子の一方または両方として言及することができる。第２の分子の例は、リガンドの受容体と、リガンドに結合する抗体とを含む。
【０１０７】
本明細書で開示される任意の細胞に言及して使用される場合の「から派生した」または「から確立された」または「から分化した」という用語は、細胞系内、組織（限定なしに述べると、単一細胞の単離、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける培養、例えば、タンパク質、化学物質、放射線、ウイルスの感染、モルフォゲンなど、ＤＮＡ配列のトランスフェクションを使用する処理および／または突然変異誘発、培養された親細胞内に含有される任意の細胞の選択（継代培養によるなど）など、任意の操作を使用して解離させた胚または体液など）内の親細胞から得られた（例えば、単離された、精製されたなど）細胞を指す。派生した細胞は、増殖因子、サイトカインへの応答、選択的な一連のサイトカイン処理、接着性、接着性の欠如、分取手順などにより、混合集団から選択することができる。
【０１０８】
本明細書で使用される「生物学的に活性の」という用語は、構造的機能、調節的機能、および／または生化学的機能を有する分子（例えば、ペプチド、核酸配列、炭水化物分子、有機分子、または無機分子など）を指す。

【０１０９】
本明細書で使用される「初代細胞」という用語は、培養物の非存在下で、動物の組織（例えば、血液）または器官から直接得られる細胞である。初代細胞は、必ずではないが、典型的に、老化および／または増殖の停止の前に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、１０代またはこれより少ない世代数の継代培養を経ることが可能である。これに対し、「培養細胞」とは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、１０代またはこれを超える継代にわたり維持され、かつ／または繁殖させた細胞である。
【０１１０】
本明細書で使用される「培養細胞」という用語は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、増殖の停止および／または老化の前に、同じ供給源からの初代細胞と比較して、大きな世代数にわたる継代培養が可能な細胞を指す。培養細胞は、「細胞系」および「初代培養細胞」を含む。
【０１１１】
本明細書で使用される「細胞培養物」という用語は、細胞の任意のｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養物を指す。この用語には、継代細胞系（例えば、不死化表現型を伴う）、初代細胞培養物、有限継代細胞系（例えば、非形質転換細胞）、およびｉｎ　ｖｉｔｒｏで維持された、胚および胚細胞を含む、他の任意の細胞集団が含まれる。
【０１１２】
本明細書で使用される「細胞系」という用語は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養された細胞であって、初代細胞系、有限継代細胞系、継代細胞系、および形質転換細胞系を含むが、培養物中の無際限な世代数にわたる継代培養が可能なことを要求しない細胞を指す。細胞系は、自発的に生成することもあり、形質転換により生成することもある。
【０１１３】
本明細書で使用される「初代細胞培養物」および「初代培養物」という用語は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、動物組織など、細胞から直接得られた細胞培養物を指す。これらの培養物は、成体組織および胎仔組織からも派生することができる。
【０１１４】
本明細書で使用される「単層」、「単層培養物」、および「単層細胞培養物」という用語は、基質に接着し、細胞１個の厚さである層として増殖する細胞を指し、言い換えれば、「付着細胞」を指す。単層は、フラスコ、試験管、カバースリップ（例えば、シェルバイアル）、ローラーボトルなどを含むがこれらに限定されない、任意のフォーマットで増殖させることができる。
【０１１５】
本明細書で使用される「フィーダー細胞層」または「フィーダー細胞集団」という用語は、隣接細胞のための付着分子および／または増殖因子を提給するのに使用される単層の細胞、例えば、共培養物中で、多能性幹細胞を維持するのに使用される単層の細胞を指す。
【０１１６】
本明細書で使用される「懸濁」および「懸濁培養物」という用語は、基質へと付着させずに生存および増殖する細胞を指す。懸濁培養物は、造血細胞、形質転換細胞系、および悪性腫瘍からの細胞を使用して作製されることが典型的である。
【０１１７】
本明細書で使用される「培養培地」および「細胞培養培地」という用語は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける細胞（すなわち、細胞培養物、細胞系など）の増殖を支援するのに適する培地を指す。用語は、任意の特定の培養培地に限定されることを意図するものではない。例えば、定義は、成長培地のほか、維持培地も包摂することを意図する。実際、用語は、目的の細胞培養物および細胞の増殖に適する、任意の培養培地を包摂することを意図する。
【０１１８】
「細胞生物学」または「細胞生物学」という用語は、細胞の解剖学および機能、例えば

、細胞の生理学的特性、構造、小器官、それらの環境との相互作用、それらの生活環、分裂、および死など、生細胞についての研究を指す。

【０１１９】

本明細書で使用される「細胞」という用語は、単一の細胞および細胞の集団（すなわち、１つを超える細胞）を指す。集団は、ニューロン細胞の集団または未分化胚細胞の集団など、１つの細胞型を含む純粋な集団でありうる。代替的に、集団は、１つを超える細胞型、例えば、混合細胞集団も含みうる。集団内の細胞の数を限定することを意図するものではなく、例えば、細胞の混合集団は、少なくとも１つの分化細胞も含みうる。一実施形態では、混合集団は、少なくとも１つの分化細胞も含みうる。本発明では、細胞集団が含みうる細胞型の数に対する限定を施さない。

【０１２０】

染色に関して本明細書で使用される「陽性細胞」という用語は、マーカーを発現させる細胞を指し、したがって、検出可能な定量的な量および／または定性的な量におけるそのマーカーについての、対照細胞または比較細胞を上回る「染色」を指す。陽性細胞はまた、ＦＯＸＡ２などの分子について染色される細胞も指す。

【０１２１】

本明細書で使用される「陰性細胞」という用語は、ＦＯＸＡ２抗体との接触を介する検出法などの後で染色されない細胞など、マーカーについての検出可能なシグナルを提示しない細胞を指す。

【０１２２】

本明細書で使用される「尾方化」という用語は、胚発生時における、背側化された外胚葉内の神経発生の後方経路の誘発を指し、例えば、背側化された外胚葉は、尾方化の程度に応じて、多様なレベルの後方神経組織を発生させる。

【０１２３】

本明細書で使用される「尾方化剤」または「尾方化因子」という用語は、Ｗｎｔ－１およびレチノイン酸（ＲＡ）など、尾方化を誘導する化合物を指す。

【０１２４】

本明細書で使用される「レポーター遺伝子」または「レポーター構築物」という用語は、着色タンパク質、蛍光タンパク質、またはベーターガラクトシダーゼ（ｌａｃＺ遺伝子）などの酵素など、容易に検出可能であるか、または容易にアッセイ可能なタンパク質をコードする核酸を含む遺伝子構築物を指す。

【０１２５】

本明細書で使用される「遺伝子ターゲティング」という用語は、外因性ＤＮＡの、細胞のゲノムへの、その発現が適切に制御されうる部位における組込みを指す。この組込みは、相同組換えの結果として生じる。

【０１２６】

本明細書で使用される「ノックイン」手法とは、レポーター遺伝子をコードする配列など、所望の核酸配列を、相同組換えを介して、宿主細胞内の特異的な遺伝子座へと挿入する手順を指す。

【０１２７】

本明細書で使用される「ゲノム」という用語は、生物の遺伝子素材（例えば、染色体）を指す。

【０１２８】

「目的のヌクレオチド配列」という用語は、その操作が、任意の理由（例えば、疾患を処置する、品質の改善を付与する、宿主細胞内の目的のタンパク質の発現、リボザイムの発現など）で、当業者により所望されるとみなされうる、任意のヌクレオチド配列（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）を指す。このようなヌクレオチド配列は、構造遺伝子（例えば、レポーター遺伝子、選択マーカー遺伝子、がん遺伝子、薬物耐性遺伝子、増殖因子など）のコード配列、およびｍＲＮＡ産物またはタンパク質産物をコードしない非コード調節配列（例えば、プロモーター配列、ポリアデニル化配列、終結配列、エンハンサー配列な

ど）を含むがこれらに限定されない。
【０１２９】
本明細書で使用される「目的のタンパク質」という用語は、目的の核酸によりコードされるタンパク質を指す。
【０１３０】
本明細書で使用される「外因性遺伝子」という用語は、宿主生物もしくは細胞に天然では存在しないか、または宿主生物もしくは細胞へと人工的に導入される遺伝子を指す。
【０１３１】
「遺伝子」という用語は、ポリペプチドまたは先駆体（例えば、プロインスリン）の産生に必要なコード配列を含む核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）配列を指す。ポリペプチドは、全長または断片の、所望の活性または機能的特性（例えば、酵素活性、リガンドの結合、シグナル伝達など）が保持される限りにおいて、全長コード配列によりコードされる場合もあり、コード配列のうちの任意の部分によりコードされる場合もある。用語はまた、構造遺伝子のコード領域も包摂し、遺伝子が、全長ｍＲＮＡの長さに対応するように、５’端および３’端の両方において、いずれの末端においても、約１ｋｂまたはこれを超える距離にわたり、コード領域に隣接して位置する配列を含む。コード領域の５’側に位置し、ｍＲＮＡ上に存在する配列を、５’側非翻訳配列と称する。３’側またはコード領域の下流に位置し、ｍＲＮＡ上に存在する配列を、３’側非翻訳配列と称する。「遺伝子」という用語は、遺伝子のｃＤＮＡ形態およびゲノム形態の両方を包摂する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と称する非コード配列で中断されたコード領域を含有する。イントロンとは、核ＲＮＡ（ｈｎＲＮＡ）へと転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサーなどの調節エレメントを含有しうる。イントロンは、核または一次転写物から除去または「スプライスアウト」され、したがって、イントロンは、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）転写物内には存在しない。ｍＲＮＡは、翻訳において、創出されつつあるポリペプチド内のアミノ酸の配列または順序を特定するように機能する。
【０１３２】
本明細書で使用される「遺伝子発現」という用語は、遺伝子の「転写」により（すなわち、ＲＮＡポリメラーゼの酵素作用を介して）、遺伝子内でコードされる遺伝情報を、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、またはｓｎＲＮＡ）へと転換する過程を指し、タンパク質をコードする遺伝子では、ｍＲＮＡの「翻訳」により、タンパク質へと転換する過程を指す。遺伝子発現は、過程内の多くの段階で調節されうる。「上方調節」または「活性化」とは、遺伝子発現産物（すなわち、ＲＮＡまたはタンパク質）の産生を増大させる調節を指すのに対し、「下方調節」または「抑制」とは、産生を減少させる調節を指す。上方調節または下方調節に関与する分子（例えば、転写因子）は、それぞれ、「活性化因子」および「抑制因子」と呼ばれることが多い。
【０１３３】
本明細書で使用される「をコードする核酸分子」、「をコードするＤＮＡ配列」、「をコードするＤＮＡ」、「をコードするＲＮＡ配列」、および「をコードするＲＮＡ」という用語は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのデオキシリボ核酸またはリボ核酸に沿った順序または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの順序により、アミノ酸の、ポリペプチド（タンパク質）鎖に沿った順序が決定される。したがって、ＤＮＡ配列またはＲＮＡ配列は、アミノ酸配列をコードする。
【０１３４】
本明細書で使用される「を有することが疑われる」という用語は、患者により呈示される、医学的状態または医学的状態のセット（例えば、前駆症状）であって、鑑別診断をもたらすには不十分な、医学的状態または医学的状態のセットを指す。それにもかかわらず、呈示された状態により、診断を基づかせるさらなる情報を得るためのさらなる検査（例えば、自己抗体検査）が正当化される。
【０１３５】

本明細書で使用される「の危険性がある」という用語は、患者により呈示される、医学的状態または医学的状態のセットであって、患者の特定の疾患または疾病への素因を示す、医学的状態または医学的状態のセットを指す。例えば、これらの状態は、行動学的影響、情緒的影響、化学的影響、生化学的影響、または環境的影響を含むがこれらに限定されない影響から生じうる。

【０１３６】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、医薬組成物の特定の量であって、臨床的に有益な結果（すなわち、例えば、症状の軽減）を達成する治療剤を含む量を指す。このような組成物の毒性および治療有効性は、細胞培養物中または実験動物における標準的な薬学的手順であって、例えば、ＬＤ５０（集団のうちの５０％に対して致死性の用量）およびＥＤ５０（集団のうちの５０％において治療的に有効な用量）を決定するための手順により決定することができる。毒性作用と治療的効果との用量比は、治療指数であり、ＬＤ５０／ＥＤ５０の比として表すことができる。大きな治療指数を呈示する化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよびさらなる動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲を処方するのに使用することができる。このような化合物の投与量は、毒性をほとんどまたは全く伴わずにＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、用いられる剤形、患者の感受性、および投与経路に応じて、この範囲内で変化する。

【０１３７】

本明細書で使用される「症状」という用語は、患者により観察される、疾患または身体的障害についての、任意の主観的証拠または客観的証拠を指す。例えば、主観的証拠は通例、患者の自己報告に基づき、疼痛、頭痛、視覚障害、悪心、および／または嘔吐を含みうるがこれらに限定されない。代替的に、客観的証拠とは通例、体温、完全な血液カウント、脂質パネル、甲状腺パネル、血圧、心拍、心電図、組織および／または全身のイメージングスキャンを含むがこれらに限定されない医学的検査の結果である。

【０１３８】

本明細書で使用される「疾患」または「医学的状態」という用語は、生存する動物体もしくは植物体、またはそれらの部分のうちの１つの正常状態に対する任意の機能障害であって、死活的機能の実行を中断させるかまたは変化させる機能障害を指す。典型的には、顕著に異なる徴候および症状により顕在化される「疾患」または「医学的状態」は通例、ｉ）環境因子（栄養不良、産業危険、または気候など）；ｉｉ）特殊な感染性作用物質（蠕虫、細菌、またはウイルスなど）；ｉｉｉ）生物の遺伝的欠損（遺伝子異常など）；および／またはｉｖ）これらの因子の組合せに対する応答である。

【０１３９】

非処置被験体における任意の症状の、処置された被験体と比べた発現に言及する場合の、「を低減する」、「を阻害する」、「を減殺する」、「を抑制する」、「を減少させる」、「を予防する」という用語、およびこれらの文法的同等物（「低度の」、「少ない」などを含む）は、処置された被験体における症状の量および／または大きさが、非処置被験体における量および／または大きさより、任意の医療技術分野における当業者が臨床的に関連すると認識する任意の量だけ小さいことを意味する。一実施形態では、処置された被験体における症状の量および／または大きさは、非処置被験体における症状の量および／または大きさより、少なくとも１０％小さく、少なくとも２５％小さく、少なくとも５０％小さく、少なくとも７５％小さく、かつ／または少なくとも９０％小さい。

【０１４０】

本明細書で使用される「患者」または「被験体」という用語は、ヒトまたは動物であり、入院している必要はない。例えば、外来患者、養護施設の入所者も、「患者」である。患者は、任意の年齢のヒトまたは非ヒト動物も含むことが可能であり、したがって、成人および若年者（すなわち、小児）の両方を含む。「患者」という用語は、医学的処置に対する必要を含意することを意図するものではなく、したがって、患者は、臨床試験の場合であれ、基礎医学研究を支援する場合であれ、自発的または非自発的に実験の一部であり

うる。

【０１４１】

「移植片」、「生着する」、「生着」、または「移植」という用語は、ドナーの生存組織を、レシピエントの生存組織へと植え込む任意の方法を指す。例えば、複数の生存プラコード細胞は、ドナー細胞を、生存可能な形で接合させ、正常に発生させるような条件下で、レシピエントの生存組織へと植え込むことができる。

【０１４２】

発明の詳細な説明

本発明は一般に、幹細胞の細胞生物学の分野、より詳細には、新規の培養条件を使用する、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）、体性幹細胞、およびヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）を含む、多能性幹細胞または多分化能性幹細胞の指向性分化に関する。特に、頭蓋プラコードは、前プラコード段階におけるさらなる運命特定と合わせた神経誘導の二重ＳＭＡＤ阻害戦略により、ヒト多能性幹細胞から派生する。その方法は、プラコードから派生する三叉神経節、成熟水晶体線維、および下垂体前葉ホルモン産生細胞を生成する。これらの細胞の適用は、感覚疾患および内分泌疾患におけるヒト細胞ベースの療法を含むがこれらに限定されない。

【０１４３】

Ｉ．ニューロンの分化経路

【０１４４】

形質転換増殖因子（ＴＧＦベータ）、ならびに骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、Ｎｏｄａｌ、およびアクチビンを含むがこれらに限定されない、それらのファミリーメンバーは、多様な器官の発生および維持に関与することが可能であり、ここで、幹細胞は、有用な役割を果たす。胚の外胚葉は、神経外胚葉（中枢神経系および末梢神経系、神経堤細胞、ならびにこれらの派生体）をもたらすと考えられている。複数の線に沿った証拠により、神経誘導時におけるＳｍａｄシグナル伝達の役割が示唆されている。一般に、Ｓｍａｄタンパク質は、ＴＧＦベータスーパーファミリーのリガンドの下流にあり、それらの特異的受容体が活性化されると、受容体調節型Ｓｍａｄ（Ｒ－Ｓｍａｄ：Ｓｍａｄ１、Ｓｍａｄ２、Ｓｍａｄ３、Ｓｍａｄ５、およびＳｍａｄ８；Ｓｍａｄ２およびＳｍａｄ３は、アクチビン／ＮｏｄａｌおよびＴＧＦベータＩ型受容体により特異的に活性化され、Ｓｍａｄ１、Ｓｍａｄ５、およびＳｍａｄ８は、ＢＭＰ　Ｉ型受容体により活性化される）のリン酸化を刺激する。Ｓｍａｄ４では、２つの顕著に異なる経路が交差する。

【０１４５】

カエルにおける研究により、コーディン（Sasaiら、Cell、７９巻（５号）：７７９頁（１９９４年））、フォリスタチン（Hemmati-Brivanlouら、Cell、７７巻（２号）：２８３頁（１９９４年））、およびＮｏｇｇｉｎ（Smithら、Cell、７０巻（５号）：８２９頁（１９９２年））を含む骨形成タンパク質（ＢＭＰ）阻害剤が、スピアマンオーガナイザーにおける極めて重要な神経誘導性因子として同定された。哺乳動物Ｎｏｇｇｉｎ（Valenzuelaら、Ｊ　Neurosci、１５巻（９号）：６０７７頁（１９９５年））は、同等な神経誘導特性を有し、組換えＮｏｇｇｉｎによる処理は、複数のｈＥＳＣ神経誘導プロトコール（Leeら、Stem　Cells、２５巻（８号）：１９３１頁（２００７年）；Elkabetzら、Genes　Dev、２２巻（２号）：１５２頁（２００８年））において使用されている。より近年では、ＳＢ４３１５４２という薬物が、胚様体（ＥＢ）ベースのｈＥＳＣ神経誘導プロトコールにおいて、神経誘導を増強することが示された（Smithら、Dev　Biol、３１３巻（１号）：１０７頁（２００８年））。ＳＢ４３１５４２は、ＡＬＫ４受容体、ＡＬＫ５受容体、ＡＬＫ７受容体のリン酸化を遮断することにより、Ｌｅｆｔｙ／アクチビン／ＴＧＦβ経路を阻害する。Ｎｏｇｇｉｎ処理またはＳＢ４３１５４２処理により、神経誘導の効率が改善されるが、いずれの処理も、規定された条件下または接着条件下で、ｈＥＳＣを神経へと転換するのに、単独では十分でない。

【０１４６】

ＩＩ．幹細胞培養法

【０１４７】
頑健かつ高度に再現可能な条件下で幹細胞を培養し、交差夾雑の可能性を最小化しようとする取組みは、完全には成功していない。十分に規定された培地および方法を確立するための取組みにより、幹細胞の治療剤としての使用のための再現可能性および精度を可能とすることができ、非ヒト添加物および未規定の因子を含有しない培地および培養条件を確立するための研究がなされている。細胞培養系の改変は、近年の多数の特許の焦点となっている。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，００５，２５２号は、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）およびフィーダー細胞層の存在下ではあるが、動物血清の非存在下における、霊長動物胚性幹細胞の増殖について論じている。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，２９７，５３９号は、線維芽細胞増殖因子含有培地中の細胞外マトリックスは含有するが、フィーダー層は伴わない系を活用する多能性幹細胞の増殖について論じている。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，２１１，４３４号は、多能性を維持するのに使用される別のサイトカインである、白血病阻害性因子を含有する、哺乳動物胚性幹細胞無血清／フィーダー層非含有培地を培養するための方法について記載している。具体的かつ組成既知である化合物の、胚性幹細胞の運命を制御するための、培地への添加物としての同定は、使用される多数の特許であって、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，３３２，３３６号、同第７，２９４，５１０号、および同第７，２５２，９９５号を含む特許の焦点である。
【０１４８】
ヒト幹細胞は、細胞置換療法における使用について示唆されており、体細胞の、人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）への再プログラム化における近年の進歩により、再生医療および疾患モデル作製のために、患者特異的細胞を生成することへの扉が開かれている（Takahasiら、２００７年；Kimら、Cell、１３６巻（３号）：４１１～４１９頁（２００９年））。しかし、これらの手法の潜在的可能性を十分に実現するには、神経誘導性ストーマ（ＰＡＸ６またはＭＳ５細胞（Kawasakiら、２０００年；Leeら、２００７年））、神経子孫の選択的生存に基づくプロトコールによる、収量の乏しいＥＢ分化の異質的性格など、未規定の因子の使用を排する、分化プロトコールの改善が要求される。神経適応に必要かつ十分なシグナル伝達経路を理解し、ｈＥＳＣ内で選択的に誘発することが、この取組みの目標である。
【０１４９】
幹細胞から派生する神経幹細胞の前駆体および神経亜型は、多数の学術刊行物および特許出願の焦点となっているが、これらの開示は、幹細胞運命を制御するために最も所望される条件であって、多数の細胞から出発し、高度に均質な所望の細胞運命を達成し、フィーダー非含有プロトコールおよび接着条件を使用する能力を含む条件を欠いている。ShangらおよびReubinoffら、Nature Biotechnology、１９巻、１１３４～１１４０頁（２００１年）は、神経細胞型の受動的発生を可能としているが、神経分化を制御することはできていない。
【０１５０】
ＩＩＩ．幹細胞の分化
【０１５１】
参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２００９／００３５２８５号は、ＥＢ形成およびロゼット形成に依拠して神経細胞を生成する方法について教示している。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第６，８３３，２６９号は、細胞の分化が、フィーダー細胞の使用およびＥＢ形成に依拠すると規定している。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，０１１，８２８号と、参照により本明細書に組み込まれる、出願公開第２００５０２６７４７号と、参照により本明細書に組み込まれる、同第２００６００７８５４３号とは、神経前駆細胞、ニューロン、または神経膠細胞へと分化する、濃縮ｈＥＳＣ集団の増殖について教示している。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第６，８８７，７０６号は、ＦＧＦ２を使用して、ｈＥＳＣを、神経先駆細胞へと分化させる方法であって、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける分化を、ＦＧＦ２の中断、

ならびにオルニチン基質およびラミニン基質へのプレーティングにより誘導する方法について教示している。米国特許第７，３６８，１１５号は、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる、神経幹細胞または神経幹細胞子孫の分化について教示している。

【０１５２】

参照により本明細書に組み込まれる、Ercegら、Stem Cells、２７巻（１号）：７８～８７頁（２００９年１月）による総説において、著者は、近年公表された、幹細胞の神経系列への分化プロトコールの最も重要な関心事が、（ｉ）非神経細胞による夾雑の危険性；（ｉｉ）幹細胞系、Ｍａｔｒｉｇｅｌ、または馴化培地の使用であって、ＥＢ形成に依拠する手順を含む使用は、病原体の交差伝搬の危険性をはらむことであると述べた。前出の特許または特許出願のうちのいずれも、神経細胞系列の均質な集団の、本発明で提示される条件下における幹細胞からの派生体化（derivatization）については教示していない。

【０１５３】

本発明はさらに、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）から派生する神経前駆細胞の集団を得る方法であって、特に、神経板フロア組織を得るための方法にも関する。具体的には、本発明の一部の方法では、ドーパミン（ＤＡ）神経細胞を得るために、神経板フロアの発生を、ｈＥＳＣ内で誘導する。さらに、本発明の一部の方法を使用して得られた神経板フロア組織は、分化経路、すなわち、パターン化をシフトさせるための誘導因子としての他の組織との共培養における使用のためにも想定される。

【０１５４】

ヒトＥＳ細胞（ｈＥＳ）における、現行の神経誘導プロトコールは、胚様体の形成、間質フィーダーとの共培養、または選択的生存条件に依拠し、各戦略は、培養条件の未規定、分化の長期化、および低収量など、顕著な欠点を提示している。

【０１５５】

一実施形態では、本発明は、２つのＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤の相乗的作用を含む方法を想定する。例えば、ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２は、接着培養条件下で、ｈＥＳＣの急速かつ完全な神経転換を誘導するのに十分である（二重ＳＭＡＤ阻害プロトコール）ことが発見された。経時的運命解析により、一過性のＦＧＦ５＋胚盤葉上層様段階に続いて、ロゼット形成コンピテントのＰＡＸ６＋神経細胞が明らかになる。初期細胞密度により、神経堤子孫と対比したＣＮＳ比が決定される。ｈｉＰＳＣの、中脳ドーパミンニューロンおよび脊髄運動ニューロンへの指向性分化により、新規の誘導プロトコールの頑健性および一般的な適用可能性が確認される。Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５２４２ベースの神経誘導は、再生医療および疾患モデル作製におけるｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの使用を大幅に容易とし、間質フィーダーベースまたはＥＢベースのプロトコールに対する必要を回避するはずである。さらに、この方法を、培養系へと適合させたが、これにより、神経細胞を派生させる容易さ、収率、速度を増強することができる。これは、限定的なものと考えるべきではなく、さらなる分子もしくは増殖因子を伴う培養物、または当技術分野における他の方法の組込みも検討された。

【０１５６】

複数の線に沿った証拠は、神経誘導時における、ＳＭＡＤシグナル伝達の役割について裏付けている。ＮｏｇｇｉｎまたはＳＢ４３１５４２での共処理により、神経誘導の効率が改善されるが、いずれの処理も、規定された条件下または接着条件下で、ｈＥＳＣを神経へと転換するのに、単独では十分でない。本明細書で提示されるデータにより、ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２を使用する、ＳＭＡＤシグナル伝達の遮断の組合せが、完全な神経転換を達成し、ＥＢベースまたは間質フィーダーベースのプロトコールに対する必要を回避するのに十分であるのかどうかについて調べる。

【０１５７】

一実施形態では、本発明は、ｈＥＳＣの均質な神経分化を誘導するために、均一な細胞分布を確立する方法を想定する。この目的のために、未分化ｈＥＳＣを、単一の細胞へと

解離させ、Ｍａｔｒｉｇｅｌでコーティングされたディッシュ上の、ＲＯＣＫ阻害剤であるＹ－２７６３２を補充した馴化培地中へと再プレーティングした（Wananabeら、２００７年）。７２時間後、細胞を、ｈＥＳＣ条件から、Ｎｏｇｇｉｎ、ＳＢ４３１５２４２、または両方の因子を含有する、ｋｎｏｃｋ－ｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ培地（ＫＳＲ）へと切り替え、のべ１１日間にわたり分化させた（図１ａ）。ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２の両方が存在する場合は、必須の共ＳｍａｄであるＳｍａｄ４の核局在化の低減が、２４時間後に観察された（図２）。神経誘導は、神経外胚葉分化の早期マーカーであるＰＡＸ６（Callaertsら、Annu Rev Neurosci、２０巻：４８３頁（１９９７年））の発現によりモニタリングした。

【０１５８】

ＮｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２を伴う組合せ処理により、神経誘導の効率は、ＮｏｇｇｉｎまたはＳＢ４３１５４２を単独で使用した場合の、１０％未満のＰＡＸ６$^{+}$細胞と比較して、全細胞のうちの８０％超まで劇的に増大した（図１ｂ）。相乗作用は、予測外のものであり、ＮｏｇｇｉｎとＳＢ４３１５４２との相乗作用に寄与しうる、複数の潜在的機構が存在する。これらは、アクチビンにより媒介される多能性ネットワークおよびＮａｎｏｇにより媒介される多能性ネットワークの不安定化（Xuら、Cell Stem Cell、３巻（２号）：１９６頁（２００８年））、栄養膜系列へのＢＭＰ誘導性分化の抑制（Xuら、Nat Biotechnol、２０巻（１２号）：１２６１頁（２００２年））、内因性のアクチビンシグナルおよびＢＭＰシグナルを阻害することによる、中／内胚葉運命の抑制（D’Amouら、Nat Biotechnol、２３巻（１２号）：１５３４頁（２００５年））、ならびにＢＭＰ阻害による、原始外胚葉の神経化の促進（Laflammeら、Nat Biotechnol、２５巻（９号）：１０１５頁（２００７年））を含むがこれらに限定されない。

【０１５９】

遺伝子発現についての経時的解析により、ＳＢ４３１５４２による処理は、Ｎａｎｏｇ発現の急速な喪失（図４）およびＣＤＸ２発現の劇的な増大（図１ｃ）を誘導することが明らかにされた。これらのデータは、ＳＢ４３１５４２により媒介される多能性の喪失が、栄養膜系列への分化と関連することを示唆した。ＮｏｇｇｉｎまたはＮｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２の存在下におけるＣＤＸ２の抑制により、Ｎｏｇｇｉｎの１つの役割は、内因性ＢＭＰシグナルの抑制であって、分化時に栄養膜運命を駆動する抑制であることが裏付けられる。Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２処理培養物中のＳＯＸ１の顕著な誘導により、二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールにおける、神経外胚葉系列への強力なバイアスが確認された。また、Ｎｏｇｇｉｎにより媒介されるＳＯＸ１７（内胚葉系列）の抑制およびＳＢ４３１５４２により媒介されるブラキウリ（中胚葉系列）の抑制など、代替的な胚葉の抑制についての証拠も認められる（図１ｃ）。まとめると、これらの結果により、ＳＢ４３１５４２およびＮｏｇｇｉｎは、分化の複数の段階で相乗的に働いて、効率的なｈＥＳＣの神経転換を達成することが指し示される。

【０１６０】

２つの阻害剤を添加した後における、ｈＥＳＣ子孫の系列としての発育を特徴付けした。免疫細胞化学解析により、５日目までにＯＣＴ４発現の喪失が示され、７日目までにＰＡＸ６の強力な発現が示された（図１ｄ）。これらのデータは、細胞型の分化の５日目において、ＯＣＴ４およびＰＡＸ６のいずれについても陰性である中間体の存在を指し示した。遺伝子発現解析により、分化の５日目における、胚盤葉上層マーカーであるＦＧＦ５のピーク発現であって、その発現が、神経運命へのコミットメントにおいて維持される、別の胚盤葉上層マーカーであるＯｔｘ２の高発現と共時的なピーク発現が明らかにされた（図１ｅ）。最早期に発現した神経マーカーは、ＳＯＸ１であり（図１ｆ）、ＺＩＣ１またはＰＡＸ６など、他の神経上皮マーカー（neurepithelial marker）の誘導に先行し、前方ＣＮＳマーカー（ＦＯＸＧ１）および神経堤マーカー（ｐ７５）の発現にも先行した。早期におけるＳＯＸ１の誘導は、ＳＯＸ１誘導に先行するＰＡＸ６発現を示唆したかつての研究と顕著に異なる（Munoz-Sanjuanら、Nat Rev Neurosci、３巻（４号）：２７１頁（２００２年））。この祖語を説明する１つの可能性は、ＳＭＡＤシグナル伝達によ

る、ＳＯＸ１転写の直接的なモジュレーションでありうる。近年、安定的なマウス（Munoz-Sanjuanら、Nat Rev Neurosci、３巻（４号）：２７１頁（２００２年））およびｈＥＳＣ（Placantonakisら、Stem Cells、２７巻（３号）：５２１～５３２頁（２００９年））によるトランスジェニックレポーター細胞系であって、細胞型特異的プロモーターの制御下でＧＦＰを発現させるように操作された細菌人工染色体（ＢＡＣ）を保有するトランスジェニックレポーター細胞系を確立するための方法が記載された。本明細書で提示されるデータでは、神経幹細胞および神経先駆細胞の子孫をマーキングするＨＥＳ５：：ｅＧＦＰ ＢＡＣによるｈＥＳＣトランスジェニックレポーター細胞系を使用して、神経誘導の効率を測定した（Tesar、Nature、４４８巻：１９６～１９９頁（２００７年）；Placantonakisら、Stem Cells、２７巻（３号）：５２１～５３２頁（２００９年））。

【０１６１】

二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを、Ｎｏｇｇｉｎの存在下で、標準的なＭＳ５プロトコール（Perrierら、Proc Natl Acad Sci Ｕ Ｓ Ａ、１０１巻（３４号）：１２５４３頁（２００４年））と比較した。この目的のために、ＨＥＳ５：：ｅＧＦＰ細胞を、ＭＳ５フィーダー細胞またはＳＢ４３１５４２の存在下で、Ｎｏｇｇｉｎを補充された培地中にプレーティングし、１３日間にわたり分化させたが、この段階では、いずれの条件下でも、ＧＦＰ$^{+}$細胞がたやすく観察された（図４）。ＧＦＰ発現は、フローサイトメトリーにより定量化した。非改変Ｈ９細胞を、陰性対照として使用した。ＭＳ５細胞は、細胞表面分子であるＣＤ１０５についての陰性選択に基づき、解析から除外した（図５）。二重ＳＭＡＤ阻害は、１３日目において、８２％のＧＦＰ$^{+}$細胞をもたらしたが、これは、ＭＳ５／Ｎｏｇｇｉｎプロトコールと比較して、３倍を超える増大であった（図１ｆ）。

【０１６２】

ｈＥＳＣコロニーを低密度でプレーティングすることを要求するＭＳ５プロトコール（Liら、Nat Biotechnol、２３巻（２号）：２１５頁（２００５年））とは対照的に、Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２条件は、高いプレーティング密度を可能とした。したがって、高百分率に加えて、二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールはまた、各培養プレート当たり大きな絶対数のＨｅｓ５：：ｅＧＦＰ$^{+}$細胞も結果としてもたらした。

【０１６３】

神経堤幹細胞（ＮＣＳＣ）の、ｈＥＳＣからの発生（Leeら、Stem Cells、２５巻（８号）、１９３１頁（２００７年））に加えて、ロゼット神経幹細胞（Ｒ－ＮＳＣ）の、ｈＥＳＣからの単離も、報告された（Elkabetzら、Genes Dev.、２２巻、１５２～１６５頁（２００８年））。本明細書で開示されるデータにより、二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールで観察される、早期ＰＡＸ６$^{+}$神経外胚葉細胞の、既に記載された、Ｒ－ＮＳＣ集団およびＮＣＳＣ集団との系列関係が決定される。免疫細胞化学解析により、Ｒ－ＮＳＣと同様に、ＰＡＸ６$^{+}$神経外胚葉細胞も、Ｎｅｓｔｉｎなど、一般的なＮＳＣマーカーと、ＰＬＺＦを含むＲ－ＮＳＣマーカーとを発現させることが示された（図７ａおよびｂ；分化の１１日目）。しかし、細胞アーキテクチャーおよびＺＯ１発現により、神経上皮細胞は、これらの条件下では、非極性であり、ＥＳＣ様の細胞アーキテクチャーを呈示することが指し示された。これらの非極性領域は、極性の円柱状上皮細胞からなるＲ－ＮＳＣ様領域を散在させていた（図７ｃ）。これらの２つの細胞集団の発生上の階層については、後続の継代培養において、さらに探索した。これらの条件下では、早期神経上皮細胞は、頂端部におけるＺＯ１発現およびインターキネティック核移動の証拠を伴うロゼット構造へと自発的に転換された（図７ｃ、７ｄ）。これらのデータは、Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２プロトコールにより、ロゼット形成が可能な早期ＰＡＸ６$^{+}$神経上皮集団がもたらされることを示唆した。したがって、早期ＰＡＸ６$^{+}$細胞は、現在までに単離された、最も始原的な、ｈＥＳＣから派生した神経先駆体段階を表しうる。Ｒ－ＮＳＣは、デフォルトでは、前方ＣＮＳマーカーを獲得することが示されている（Elkabetzら、Genes Dev.、２２巻：１５２～１６５頁（２００８年））。二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを介して生成されたＰＡＸ６$^{+}$神経上皮細胞は、Ｏｔｘ２およびＦｏｘＧ１Ｂの発現により証拠立てられる通り、Ｒ－ＮＳＣ（Elkabetzら、Genes Dev.、２２巻：１５２～１６５頁（２

００８年））と同様に、前方ＣＮＳ特徴を呈示した（図７ｅ、ｆ）。ＰＡＸ６陰性細胞は、これらの条件下では、ＡＰ２、ＨＮＫ１、ＰＡＸ７、およびｐ７５（ＮＧＦＲ）を含む神経堤のマーカーを共発現させた（図２ｇ～ｊ）。初期ｈＥＳＣプレーティング密度の操作により、ＰＡＸ６$^{-}$神経堤様細胞と対比したＰＡＸ６$^{+}$ＣＮＳ比を不均等にした。高プレーティング密度が、ＰＡＸ６$^{+}$細胞へのバイアスがかかった分化を結果としてもたらしたのに対し、低密度は、神経堤様分化を促進した（図８）。ロゼット形成の前における、多数の神経堤様細胞の存在は、二重ＳＭＡＤ阻害により、Ｒ－ＮＳＣから派生したＮＣＳＣ（Leeら、Stem Cells、２５巻（８号）：１９３１頁（２００７年））と顕著に異なる早期神経堤集団がもたらされることを示唆した。潜在的細胞が、メラノソームマーカーであるＨＭＢ４５を共発現させる色素性細胞についてたやすく濃縮できたことから、顕著に異なる系列を伴う早期神経堤集団という考えが裏付けられる（図７ｋおよびｌ、詳細については、実施例を参照されたい）。これに対し、Ｒ－ＮＳＣから派生したＮＣＳＣは、同等な条件下では、色素性細胞をもたらさないことが典型的である（Leeら、Stem Cells、２５巻（８号）：１９３１頁（２００７年））。しかし、一部のＨＭＢ４５$^{+}$細胞は、神経堤マーカーであるＳＯＸ１０を共発現させないことから、ＰＡＸ６$^{+}$網膜色素上皮細胞を含む、他の色素性細胞集団の存在が示唆される。

【０１６４】

前後（ＡＰ）識別および背腹（ＤＶ）識別と、ニューロン亜型ポテンシャルとは、レチノイン酸、ＦＧＦ８、およびＳＨＨなど、形態発生性因子への早期曝露に依存する。また、二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを介して生成された細胞のパターン化ポテンシャルについても評価した。Ｏｃｔ４発現は、３～５日目の間にサイレンシングされ、神経マーカーであるＰＡＸ６は、細胞の大部分において、５～７日目の間に活性化される（図１ｄ、ｅ）ので、例えば、分化の５日目は、神経のパターン化に適切な発生域を提示しうる。ドーパミンニューロンのマーカーを発現させる細胞の派生は、それぞれ、分化の５日目および９日目から始まる、ＳＨＨおよびＦＧＦ８への曝露（Tomishimaら、Stem Cells、２５巻（１号）、３９頁（２００７年））に続いて観察された（図２ｍ）。ＳＨＨへの曝露の１週間後、ＦＧＦ８およびＳＨＨのいずれも中断し、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ＧＤＮＦ、ＴＧＦ－β３、およびサイクリックＡＭＰ（ＢＡＧＴＣ（Tomishimaら、Stem Cells、２５巻（１号）、３９頁（２００７年））、図７ｍを参照されたい）を含有する培地中でさらに分化させた。分化の１９日目において、Ｔｕｊ１$^{+}$ニューロンのうちの大きな比率が、ドーパミンの合成における律速酵素である、チロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）を共発現させた（図７ｎ、ｏ）。ＴＨ$^{+}$ニューロンは、これらの条件下では、細胞の継代培養の非存在下であってもなお、自発的に出現した。しかし、長い神経突起を伴う、より成熟したＴＨ$^{+}$細胞の派生は、分化の１２日目における、機械的単離およびひとまとめの継代培養に続いて促進された。

【０１６５】

運動ニューロンマーカーであるＩＳＬ１およびＨＢ９の核内発現は、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ＳＨＨ、およびレチノイン酸（ＢＡＳＲ；分化の１９日目）へと曝露して２週間後に観察されたことから、体細胞型運動ニューロンの派生が確認される（図７ｑ、ｒ）。運動ニューロンの派生は、分化の約１１日目に継代培養された培養物に限定されたことから、ｈＥＳＣ由来のＲ－ＮＳＣについて観察される（Elkabetzら、Genes Dev、２２巻（２号）、１５２頁（２００８年））極めて高い細胞密度における、パターン化応答の低減が示唆される。これらのデータにより、Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２で処理された神経子孫内の頑健なパターン化応答、および間質フィーダー介在型誘導プロトコールを使用する場合の３０～５０日間（Leeら、Stem Cells、２５巻（８号）、１９３１頁（２００７年）；Tomishimaら、Stem Cells、２５巻（１号）、３９頁（２００７年））と比較して短い分化期間（約１９日間）後における、関連するニューロン亜型の派生が裏付けられる。

【０１６６】

本発明で使用される特異的Ｓｍａｄ阻害剤に対する代替法として、代替的な阻害剤また

は機構を使用して、顕著に異なるＳｍａｄ経路の両方を遮断することも可能である。ドルソモルフィンは、Ｎｏｇｇｉｎに対する代替的低分子であり、同じ経路をターゲティングする。濃度は、１０ｕＭ～３０ｎＭの範囲にわたり、各個別の量は、１０ｕＭのＳＢ４３１５４２へと添加された。効率は、ＰＡＸ６＋細胞の百分率に基づき、Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２と比較した場合ほど高くなかったが、ドルソモルフィンの、ＳＢ４３１５４２との組合せにより、同等の効率および細胞生存率を得るために必要なＮｏｇｇｉｎ濃度を１５分の１に低減することが可能となった。現行では、ＳＢ４３１５４２に対する代替的な低分子であって、標的を全範囲にわたり遮断する低分子は知られていないが、他の分子を活用することもまた可能ではあるが、この例により、全Ｓｍａｄは、２つの公知の経路をクローキングし、高度に均質な神経細胞集団をもたらす、頑健な相乗作用を結果としてもたらすことが裏付けられる。これらの代替法はまた、干渉性ＤＮＡ（アンチセンス、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、および当技術分野で公知の標準的な方法を含む）、またはＳｍａｄ４機能を遮断するか、これと競合するか、もしくはこれを他の形で防止しうるタンパク質の過剰発現（Ｓｍａｄ７の過剰発現など）を含むがこれらに限定されない機構による、Ｓｍａｄの遮断も含みうる。

【０１６７】

特異的な細胞運命を、哺乳動物において、所望の通りに生存し、遊走し、機能するそれらの能力について調べた。Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２プロトコールに続いて、ドーパミンニューロン誘導プロトコールを使用して分化させたｈｉＰＳＣからの神経性組織の移植を、レシピエントマウス（具体的には、Ｎｏｄ／ＳＣＩＤ）の脳へと施し、細胞の生着可能性について評価する。

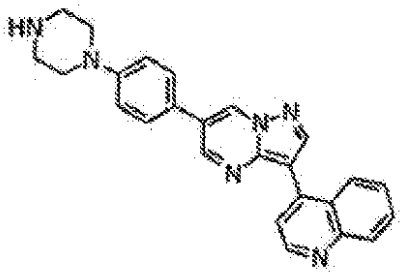
【０１６８】

さらに、細胞を、Ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２プロトコールから、より成熟したニューロン（運動ニューロンおよびドーパミンニューロンの両方）へとさらに分化させる場合は、色素性細胞を観察することも可能である。このデータは、メラニン細胞および網膜色素上皮の両方が生成されつつあることを示唆する。加えて、ＰＡＸ６＋中枢神経系前駆細胞およびＰＡＸ６－ＨＮＫ１＋末梢神経系前駆細胞も観察された。近年の刊行物は、ヒト体細胞の、人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）への再プログラム化について報告している（Takahashiら、Cell、１３１巻（５号）、８６１頁（２００７年）；Suterら、Stem Cells、２７巻、４９～５８頁（２００８年））。

【０１６９】

次に、二重ＳＭＡＤ阻害を使用して、ｈｉＰＳＣから派生した神経細胞型の広範なレパートリーを、信頼できる形で生成しうるのかどうかを決定した。ｈｉＰＳＣクローン間で予測される内因性のばらつきを踏まえると、再現可能な分化結果により、本明細書で開示される分化プロトコールの頑健性が確認される。例えば、レンチウイルスによる、ヒト胎児肺線維芽細胞への、ｃＭＹＣ、ＫＬＦ４、ＯＣＴ４、およびＳＯＸ２の形質導入を使用して、２つのｈｉＰＳクローン（ＩＰＳ^{Ｃ１４}、ＩＰＳ^{Ｃ１７}；図９ａ－ｉおよびａ－ｉｉ）を生成した。いずれのクローンも、未分化状態では、Ｎａｎｏｇ、Ｔｒａ－１－６０、およびＳＳＥＡ－３を含む多能性マーカーを発現させ、３つの胚葉の派生体へと分化することが可能である。ｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２プロトコールを介する神経誘導時において、いずれのクローンも、分化の１１日目までに、ほぼ均質なＰＡＸ６＋細胞集団をもたらした（図９ｂ－ｉ、ｂ－ｉｉ）。上記で記載した戦略を使用して、細胞密度、継代培養、およびパターン化因子を操作したところ、いずれのｈｉＰＳＣクローンにも、ＨＮＫ１＋推定神経堤子孫（図９ｃ－ｉ、ｃ－ｉｉ）、ｈｉＰＳＣから派生したＲ－ＮＳＣ（図９ｄ－ｉ、ｄ－ｉｉ）、ならびに体細胞性運動ニューロン（図９ｅ－ｉ、ｅ－ｉｉ）およびドーパミンニューロン（図９ｆ－ｉ、ｆ－ｉｉ）を含む、ｈｉＰＳＣから派生した特異的ニューロン亜型の生成へとたやすくバイアスをかけることができた。これらのデータにより、二重ＳＭＡＤ阻害戦略の、ｈＥＳＣからの分化を凌駕する頑健性およびモジュラー性が裏付けられる。一実施形態では、本明細書で開示される方法は、ｈｉＰＳＣから派生した神経細胞型の迅速な生成のための、効率的で、規定されており、頑健なプラット

フォームをもたらす。
【０１７０】
　こうして、少なくとも２つのシグナル伝達阻害剤、すなわち、ＳＢ４３１５４２とＮｏｇｇｉｎとを組み合わせることにより、神経分化の新規の方法が発見された。本明細書で提示される研究の大半では、１１日の処理期間を使用したが、後続の研究により、処理を、最初の５日間にわたる分化へと短縮しても、同等レベルの神経誘導が達成されることが示された（図１０）。この処理期間の短縮により、特に、組換えＮｏｇｇｉｎの場合、煩雑さおよび費用がさらに節減されるはずである。一部の実施形態では、ＳＭＡＤシグナル伝達阻害剤を、骨形成タンパク質（ＢＭＰシグナル伝達）経路の阻害剤で置きかえる。ＢＭＰ経路の低分子阻害剤であって、ｎｏｇｇｉｎ機能を潜在的に代替し、費用をさらに節減しうる低分子阻害剤もまた、利用可能である。したがって、一部の実施形態では、ｎｏｇｇｉｎを、ドルソモルフィンで置きかえる。他の実施形態では、ｎｏｇｇｉｎを、ＬＤＮ－１９３１８９で置きかえるが、例示的な構造については、
【化３】



を参照されたい（別の例：「Ｓｔｅｍｏｌｅｃｕｌｅ（商標）ＢＭＰ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ：ＬＤＮ－１９３１８９」、ＳｔｅｍＧｅｎｔ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｔｓ）。
【０１７１】
　頭蓋プラコードとは、水晶体、鼻腔上皮、耳構造、下垂体前葉細胞、および三叉神経節を含む複数の脳神経の形成に極めて重要な、一過性の発生構造である。発生時における組織の接近不可能性および検証されるマーカーの欠如のために、ヒトプラコード生物学については、ほとんど知られていない。当技術分野は、アフリカツメガエル、セブラフィッシュ、ニワトリなど、他の種からの外植と、より低い程度において、マウスにおける発生に限定されている。
【０１７２】
　一実施形態では、本発明は、頭蓋プラコードおよびプラコードから派生した感覚ニューロンの、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）からの派生を想定する。ｈＥＳＣから派生したＳｉｘ１＋プラコード先駆体は、改変二重ＳＭＡＤ阻害剤プロトコールを使用して、分化の１１日以内に、高収率（全細胞のうちの７１％）で得られる。ｅｙｅｓ　ａｂｓｅｎｔ　ｈｏｍｏｌｏｇ１（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）（Ｅｙａ１）、Ｄａｃｈｓｈｕｎｄ　ｈｏｍｏｌｏｇ１（Ｄａｃｈ１）、ｅｙｅｓ　ａｂｓｅｎｔ　ｈｏｍｏｌｏｇ４（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）（Ｅｙａ４）、およびｓｉｘ　ｈｏｍｅｏｂｏｘ３（Ｓｉｘ３；ｓｉｎｅ　ｏｃｕｌｉｓ　ｈｏｍｅｏｂｏｘ　ｈｏｍｏｌｏｇ３（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））など、他の推定プラコードマーカーを共発現させるＳｉｘ１＋細胞、ならびに経時的トランスクリプトーム解析により、さらなるプラコード特異的マーカーおよびサブプラコード特異的マーカーが同定される。ＨＮＫ１発現の非存在下におけるｐ７５の発現に基づき、プロスペクティブな汎プラコード先駆細胞を単離した。特異的増強因子ＧＦＰ構築物は、プラコード領域のサブセットに対する推定特異性を伴うプラコード細胞をマーキングすることを可能とする。ヒトＥＳＣから派生したプラコード細胞は、インスリン遺伝子増強因子タンパク質ＩＳＬ－１（Ｉｓｌ１）、脳特異的ホメオボックス／ＰＯＵドメインタンパク質３Ａ（Ｂｒｎ３ａ）、β－ＩＩＩ－チューブリン（Ｔｕｊ１）、およびペリフェリンを発現させる、純粋な感覚ニューロン集団へと、高度に効率的に転換された。ｈＥＳＣから派生した

プラコードの単離は、ヒトプラコードの発生について研究するための新規のモデル系を表し、従来接近不可能であった、無限数の感覚ニューロン集団の、感覚機能および疼痛の研究のための派生を可能とする。

【０１７３】

頭蓋プラコードとは、末梢嗅覚系、水晶体、下垂体前葉、耳構造、および三叉神経ニューロンを含む感覚神経節をもたらす、一過性の発生構造である。プラコード発生の欠損は、ある範囲にわたるヒト先天性奇形であって、失明、難聴、および嗅覚障害を含むヒト先天性奇形に関与する（参照により本明細書に組み込まれる、Bakerら、Dev Biol、２３２巻（１号）：１～６１頁（２００１年）；Baileyら、Curr Top Dev Biol、７２巻：１６７～２０４頁（２００１年））。頭蓋プラコード発生は、Ｘｅｎｏｐｕｓ属、ニワトリおよびセブラフィッシュを含む多様なモデル生物において十分に特徴付けされている（それらのすべてが参照により本明細書に組み込まれる、Bakerら、Dev Biol、２３２巻（１号）：１～６１頁（２００１年）；Baileyら、Curr Top Dev Biol、７２巻：１６７～２０４頁（２００６年）；Bhattacharyyaら、Curr Opin Genet Dev.、１４巻（５号）：５２０～６頁（２００４年）；およびBakerら、Development、２０００年、１２７巻（１４号）：３０４５～５６頁）。しかし、発生および疾患におけるプラコード生物学の重要性にも拘らず、ヒトプラコード発生は、依然として探索されないままである。これは大部分、早期ヒトプラコード組織の接近不可能性、ならびにこれに関連する適切なマーカーおよび技法の欠如のためである。

【０１７４】

胚性幹細胞は、成体生物を構成する、全ての多様な細胞型へと分化する能力を保持しながら、ほぼ無際限に自己再生する固有の能力を有する。ヒト発生時において、ヒトＥＳ細胞が派生する内部細胞塊（ＩＣＭ）および胚盤葉上層の多能性細胞は、３つの胚葉と、プラコード細胞を含む、後続の全ての派生体とをもたらす。１つの問題は、ヒトＩＣＭのｉｎ ｖｉｖｏにおける分化ポテンシャルが、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるヒトＥＳ細胞ベースの培養系を使用して生かされたのかどうかである。

【０１７５】

過去数年間にわたり、ヒトＥＳ細胞の、多様な組織特異的細胞型であって、中脳ドーパミンニューロン（参照により本明細書に組み込まれる、Perrierら、Proc Natl Acad Sci USA、１０１巻（３４号）：１２５４３～８頁（２００４年））、脊髄運動ニューロン（参照により本明細書に組み込まれる、Liら、Nat Biotechnol、２３巻（２号）：２１５～２１頁（２００５年））、多分化能性間葉系先駆体（参照により本明細書に組み込まれる、Barberiら、PLoS Med、２巻（６号）：ｅ１６１頁（２００５年）；Barberiら、Nat Med、２００７年、１３巻（５号）：６４２～８頁）、心臓細胞（参照により本明細書に組み込まれる、Laflammeら、Nat Biotechnol、２５巻（９号）：１０１５～２４頁（２００７年））、および肝細胞様細胞（参照により本明細書に組み込まれる、Agarwalら、Stem Cells、２６巻（５号）：１１１７～２７頁（２００８年））などの細胞型への指向性分化のための、多数のプロトコールが開発されている。末梢ニューロンの識別を有する細胞への指向性分化は、神経堤先駆体中間体を介して達成されている。ヒトＥＳ細胞から派生した神経堤細胞の生成についての初期プロトコール（参照により本明細書に組み込まれる、Leeら、Nat Biotechnol、２５巻（１２号）：１４６８～７５頁（２００７年））は、神経誘導を促進するＭＳ５共培養系（参照により本明細書に組み込まれる、Perrierら、Proc Natl Acad Sci USA、１０１巻（３４号）：１２５４３～８頁（２００４年）；Barberiら、Nat Biotechnol、２１巻（１０号）：１２００～７頁（２００３年））に基づいた。ＭＳ５培養系は、多様な神経堤運命を、ヒトＥＳ細胞およびヒトＩＰＳ細胞から派生および単離し、神経堤から派生したニューロンに影響を及ぼす、まれなヒト遺伝障害である、家族性自律神経失調症（ＦＤ）（参照により本明細書に組み込まれる、Leeら、Nature、４６１巻（７２６２号）：４０２～６頁（Ｅｐｕｂ、２００９年８月１９日））をモデル化するために使用されて成功した。

【０１７６】

近年、ＢＭＰシグナル伝達経路と、ＴＧＦｂ／アクチビン／Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路との共時的阻害に基づく、規定された神経誘導戦略が報告された（参照により本明細書に組み込まれる、Chambersら、Nat Biotechnol、２７巻（３号）：２７５～８０頁（２００９年））。Ｎｏｇｇｉｎ（Ｎ）およびＳＢ４３１５４２（ＳＢ）への曝露は、接着培養条件下で、ヒトＥＳ細胞またはＩＰＳ細胞の、神経運命への、同期化された急速な分化をもたらし、したがって、誘導過程における共培養および胚様体の形成のいずれに対する必要も回避する。Ｎ－ＳＢプロトコールを使用する、より急速で同期化された分化応答は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける、発生運命へのバイアス付与における、特異的モルフォゲンの正確な関係について調べることを可能とする。

【０１７７】

一部の実施形態では、改変Ｎ－ＳＢプロトコールは、高度に濃縮されたプラコード先駆体集団の効率的な派生を可能とする。プラコード運命は、Ｎ－ＳＢ誘導の４８時間後の、ｎｏｇｇｉｎ処理の中断時に、神経外胚葉細胞を代償として誘導される。これらのデータは、非ＣＮＳ派生体の発生を最適化する、Ｎ－ＳＢ誘導系の使用について例示したが、ｈＥＳＣ分化における内因性ＢＭＰシグナル伝達の重要性を裏付けており、頭蓋感覚ニューロンなど、無限数のプラコード派生体の、感覚機能および疼痛の研究のための派生を可能とする。

【０１７８】

本明細書で記載される研究による複数の観察を、本発明の方法のうちの一部における使用のために、以下の通りに提示する。

【０１７９】

Ａ． ｈＥＳＣ分化時における、ＢＭＰ依存性のプラコード運命特定

【０１８０】

ＢＭＰは、ｉｎ ｖｉｖｏにおける早期胚運命特定に対して、広範にわたる効果を及ぼし、多様な胚外構造の特定、最終的な中胚葉細胞の決定、非神経外胚葉組織、プラコード組織、および神経堤組織の特定に関与する。Ｎ－ＳＢ培養系の使用は、ヒトＥＳ細胞の、高度に同期化された効率的な分化を可能とする。Ｎ－ＳＢ系について研究する本明細書におけるデータから、ＢＭＰ用量および適用タイミングの両方により、プラコード運命特定をモジュレートしうることが明らかになる。系が、非神経外胚葉運命への分化および始原的な皮膚先駆細胞の発生を最適化するのにも同様に使用されたのかどうかに関しては、重要な問題が残る。データにより、Ｓｉｘ１陰性細胞のサブセットは、改変Ｎ－ＳＢ培養条件下で、発生時における早期表皮先駆体についての公知のマーカーである、ｐ６３を発現させることが指し示された。

【０１８１】

Ｂ． ヒト胚性幹（ＥＳ）細胞分化時における、推定汎プラコード運命の出現

【０１８２】

ヒトＥＳ細胞の分化時における、高度に効率的なＳｉｘ１＋運命への分化、およびＩＳＬ ＬＩＭホメオボックス１としてもまた公知の、インスリン遺伝子増強因子タンパク質ＩＳＬ－１（Ｉｓｌ１）＋細胞の急速な出現は、ｈＥＳＣから派生した細胞が、前プラコード先駆体運命を当初採用しうることを示唆する。前プラコード領域（ｒｅｇｉｏｎ）の出現については、アフリカツメガエルおよびセブラフィッシュの発生時において、前部神経外胚葉細胞を取り囲む胚の最前方領域（ｒｅｇｉｏｎ）内の馬蹄形領域（ａｒｅａ）をマーキングすることが記載されている。本明細書で提示されるデータは、感覚ニューロン先駆体の、Ｓｉｘ１＋プラコード領域からの発生について報告する。しかし、将来の研究は、代替的な分化レジメンへの曝露における、これらのプラコード細胞の可塑性についても取り組みうる。特に関心の対象となるのは、多様なホルモン産生細胞型の特定について研究するための、下垂体前葉細胞の派生でありうる。このような細胞は、発生研究を目的とし、ホルモン放出の薬理学的制御の規定を目的とする研究のためのものである。Ｓｉｘ１＋段階にある細胞のうちの約１５％は、下垂体前葉先駆細胞のマーカーであるＬｈｘ３を発現させる。改変Ｎ－ＳＢプロトコールのヒトＥＳ細胞の分化時には、分化の１１日目

に、下垂体前葉ホルモンの産生における先駆体タンパク質である、ＣＧＡの発現が観察された（図１２Ｄ）。Ｌｈｘ３＋推定下垂体前葉先駆細胞の存在およびＣＧＡの発現は、下垂体前葉細胞系列が、改変Ｎ－ＳＢプロトコールを使用してたやすく誘導されることを示した。

【０１８３】

Ｃ．　Ｓｉｘ１＋プラコード先駆体からの感覚ニューロン特定

【０１８４】

本明細書で開示される知見により、改変Ｎ－ＳＢプロトコールで生成される感覚ニューロン集団のプラコード起源が指し示される。これは、後続の感覚ニューロンの生成のために単離された先駆体クラスター内のＳｉｘ１の発現と、早期段階の感覚ニューロン内のｓｉｘ－１の共発現とに基づく。プラコードから派生した感覚ニューロンは、Ｂｒｎ３Ａ、Ｉｓｌ１、およびペリフェリンなど、多様なマーカーを、神経堤系列から派生された感覚ニューロンと共有する。しかし、改変Ｎ－ＳＢプロトコールは、ＦｏｘＧ１Ｂ、ならびにプラコード先駆体内では発現するが、早期神経堤系列内では発現しない、他の前方マーカーの高度に効率的な誘導を示す。初期細胞密度（Chambersら、Nature Biotechnology、２７巻（３号）、２７５～２８０頁、２００９年；Corrigendum、Nature Biotechnology、２７巻（４号）：１頁）およびＷｎｔシグナル伝達のモジュレーション（参考文献）により、神経堤から派生した感覚ニューロン集団と対比した、プラコードによる感覚ニューロン集団の特定を可能とすることができる。高度に精製された頭蓋感覚ニューロン集団への接近は、ハイスループット薬物発見アッセイの将来における開発のための新規のツールを表す。例えば、プラコードから派生した三叉神経ニューロンをモジュレートする化合物は、三叉神経機能不全と関連する周知の臨床症候群を踏まえると、特に関心の対象でありうる。

【０１８５】

Ｅ．　ヒト胚性幹細胞からの機能的フロアプレート組織の特定は、前部神経外胚葉を代償として生じる

【０１８６】

フロアプレート（ＦＰ）は、神経発生時における、極めて重要なシグナル伝達中心であって、胚の腹側正中線に沿って位置するシグナル伝達中心である。ヒトにおけるＦＰの発生については、組織への接近可能性の欠如のために、ほとんど知られていない。本開示は、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ－）の派生、ならびにその後派生されたＦＰ組織であって、Ｎｅｔｒｉｎ－１およびＳＨＨを分泌し、初代組織およびｈＥＳＣから派生した組織のパターン化に影響を及ぼすことが可能なＦＰ組織について記載する。ｈＥＳＣ内のＦＰの誘導は、ＳＨＨへの早期曝露に依存し、前部神経外胚葉（ＡＮ）を代償として生じる。グローバル遺伝子発現機能研究により、ＳＨＨにより媒介されるＤＫＫ－１の阻害が、ＡＮ抑制において鍵となる因子として同定されている。ｈＥＳＣから派生したＦＰ組織は、前方ＳＩＸ６＋特徴を有するが、ＳＩＸ６の発現を抑制し、領域特異的ＳＨＨ増強因子の発現のシフトを誘導する尾方化因子に対して応答性であることが示されている。これらのデータにより、実験モデル系としてのｈＥＳＣから派生したＦＰが確立され、ＡＮ特定と対比したＦＰ特定をモジュレートする早期シグナル伝達イベントが規定される。

【０１８７】

神経発生は、神経先駆体の識別を命令する複雑なシグナルセットにより、時間内および空間内で指示される。動物モデルでは著明な進歩がなされているが、ヒト神経発生は、依然としてごくわずかしか理解されていない。ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）は、ヒト発生の早期段階をモデル化する、接近可能で操作可能な細胞プラットフォームをもたらす。

【０１８８】

先行研究により、前／後（Ａ／Ｐ）および背／腹（Ｄ／Ｖ）のＣＮＳ識別を規定するパターン化因子に応答した、マウスＥＳＣ（Wichterleら、２００２年；Barberiら、２００３年；Watanabeら、２００５年）およびヒト（Perrierら、２００４年；Liら、２００８年；Eirakuら、２００８年）ＥＳＣの、特異的なニューロン型への指向性分化が報告され

ている。これらの研究により、進化における、主要なＣＮＳ領域を特定するシグナル伝達系の保存が裏付けられる。哺乳動物では、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）は、初代神経外植片内（BriscoeおよびEricson、１９９９年）およびマウスＥＳ細胞内（Mizusekiら、２００３年）で、フロアプレート（ＦＰ）を発現させる細胞を含む、多様な腹側細胞型を特定するように、用量依存的に作用する腹側化因子である。ＳＨＨの、ｈＥＳＣから派生した神経細胞への適用は、多様な腹側ニューロン型を誘導することが示されているが、フロアプレート（ＦＰ）組織自体の派生は、いまだ報告されていない。ＦＰは、１つのシグナル伝達中心であるので、ＦＰをヒトＥＳ細胞から生成することができれば、早期ヒト神経発生についてのさらなる研究において大きな前進となる。

【０１８９】

ＦＰは、脊髄から、中脳を通って、間脳まで、最も尾方へと伸びる腹側神経管の、最も正中線側の面に沿って走り、その前方の限界は、視床内境界帯（ｚｏｎａ　ｌｉｍｉｔａｎｓ　ｉｎｔｒａｔｈａｌａｍｉｃａ）のすぐ下方にある（Jessellら、１９８９年）。最前面では、ＦＰは、前部神経外胚葉（ＡＮ）が起始し、研究により、ＡＮコミットメントが、細胞の、ＦＰ誘導性シグナルへの応答を不可能とすることが示されている（Placzekら、２００３年）地点で止まる。古典的研究では、ＦＰ細胞は、固有の平面状の形状を呈示し、ＳＨＨ、ＦＯＸＡ２、Ｆ－Ｓｐｏｎｄｉｎ、およびＮｅｔｒｉｎ－１を含むＦＰ特異的マーカーを発現させることが示されている（Placzek、１９９５年）。マウス胚およびニワトリ胚における研究により、ＦＰについて、２つの主要なオーガナイザー機能：腹側神経管をパターン化するモルフォゲンであるＳＨＨの分泌（PlaczekおよびBriscoe、２００５年）、および交連軸索を正中線にわたり誘導するＮｅｔｒｉｎ－１の発現（Charronら、２００３年）が同定されている。ＦＰは一般に、非神経性領域であると考えられる。しかし近年、マウスにおける遺伝子系列マッピング研究により、中脳ＦＰは、神経性ポテンシャルを選択的に呈示し、腹側中脳ドーパミンニューロンの供給源であることが報告されている（Kittappaら、２００７年；Onoら、２００７年；Joksimovicら、２００９年）。

【０１９０】

現在のところ、ヒトにおけるＦＰの発生については、組織への接近可能性の欠如のために、ほとんど知られていない。動物では、ＦＰは、ＳＨＨ産生の主要な部位であり、ある特定の形態の全前脳症および小眼球症、多様な口蓋裂症候群を含む骨格障害、ならびに、ＳＨＨ受容体であるＰａｔｃｈｅｄ　１内の突然変異により引き起こされるまれな遺伝障害である、ゴーリン症候群などの腫瘍状態を含む、複数のヒト発達障害が、正中線ＳＨＨシグナル伝達の変化と関連している（Mullorら、２００２年）。したがって、ヒトＦＰをどのようにして生成するのかを理解することは、ヒト神経のパターン化および軸索誘導についての比較発生研究の一助となり、結果として得られる細胞は、潜在的に、ＦＰ起源の特異的なニューロン型の供給源として用いられうる。

【０１９１】

本明細書で提示されるデータにより、ｈＥＳＣの、ＦＰ組織への例示的な指向性分化が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるヒト発生のオーガナイザー構造生成の最初の例として裏付けられる。例えば、ヒトＦＰの特定は、ＤＫＫ１により媒介されるＡＮの特定を抑制する、早期の高用量のＳＨＨシグナル伝達に依存しうる。ＦＰの機能性は、Ｎｅｔｒｉｎ－１およびＳＨＨの分泌、ならびに初代マウス外植片内および初代ラット外植片内で、異所性ＦＰ組織の増殖および神経突起伸長を誘導する能力により裏付けられる。

【０１９２】

ヒトＥＳＣから派生したＦＰは、デフォルトでは前方識別を採用するが、尾方化キューに応答して後方運命へと特定され、領域特異的ＦＰ組織への接近をもたらしている。本明細書で提示され、ＳＭＡＤシグナル伝達の二重阻害による、ヒトＥＳ細胞およびヒトｉＰＳ細胞の高度に効率的な神経転換について、２００９年３月１日にオンラインで公表され、２００９年３月１６日の印字版の後で補正された、Chambersら、Nat. Biotechnol.、２６巻、２７５～２８０頁（２００９年）に記載された組成物および方法と組み合わせた

実験系によれば、早期ヒト神経発生時において極めて重要な、ＦＰにより媒介されるシグナル伝達イベントについての研究が容易となるはずである。

【０１９３】

ＩＶ．幹細胞系

【０１９４】

本発明は、任意の特定の種類のヒト幹細胞の使用に限定されるわけではない。実際、様々な種類のヒト幹細胞の使用が想定されている。全能性細胞または多能性細胞を、ヒト、サル、マウス、ラット、ブタ、ウシ、およびヒツジから得るための方法については、既に記載されている。例えば、米国特許第５，４５３，３５７号；同第５，５２３，２２６号；同第５，５８９，３７６号；同第５，３４０，７４０号；および；同第５，１６６，０６５号（これらの全てが参照により具体的に本明細書に組み込まれる）のほか、Evansら、Theriogenology、３３巻（１号）：１２５～１２８頁、１９９０年；Evansら、Theriogenology、３３巻（１号）：１２５～１２８頁、１９９０年；Notarianniら、Ｊ．Reprod. Fertil.、４１巻（増刊号）：５１～５６頁、１９９０年；Gilesら、Mol. Reprod. Dev.、３６巻：１３０～１３８頁、１９９３年；Gravesら、Mol. Reprod. Dev.、３６巻：４２４～４３３頁、１９９３年；Sukoyanら、Mol. Reprod. Dev.、３３巻：４１８～４３１頁、１９９２年；Sukoyanら、Mol. Reprod. Dev.、３６巻：１４８～１５８頁、１９９３年；Iannacconeら、Dev. Biol.、１６３巻：２８８～２９２頁、１９９４年；EvansおよびKaufman、Nature、２９２巻：１５４～１５６頁、１９８１年；Martin、Proc Natl Acad Sci USA、７８巻：７６３４～７６３８頁、１９８１年；Doetschmanら、Dev Biol、１２７巻：２２４～２２７頁、１９８８年）；Gilesら、Mol Reprod Dev、３６巻：１３０～１３８頁、１９９３年；GravesおよびMoreadith、Mol Reprod Dev、３６巻：４２４～４３３頁、１９９３年；ならびにBradleyら、Nature、３０９巻：２５５～２５６頁、１９８４年も参照されたい。

【０１９５】

一部の実施形態では、例えば、細胞系ＷＡ０９など、未分化ヒト胚細胞系を、使用のために想定する。

【０１９６】

Ｖ．二重ＳＭＡＤによる分化

【０１９７】

本明細書で記載される研究による１つの知見は、胚細胞から派生したＦＰ組織の「デフォルト」的性格および前方バイアスである。本明細書で提示される、ＮＳＢ（Chambersら、２００９年；図１８）プロトコールおよびＦＰ（図１８）誘導プロトコールの両方における、明白な中胚葉中間体の欠如は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける、神経外胚葉およびＦＰ組織の派生が、さらなる中胚葉由来のシグナルに依存しないことを示唆する。Ｎｏｄａｌがｆｐ誘導に不可欠であると考えられている（PlaczekおよびBriscoe、２００５年により総説されている）、セブラフィッシュにおけるデータとは対照的に、ＦＰ誘導は、ＴＧＦｂ／アクチビン／Ｎｏｄａｌシグナル伝達の阻害剤であるＳＢ４３１５４２の存在下であってもなお、たやすく生じる。本明細書で報告される、ＦＰ組織の前方デフォルトは、ｈＥＳＣから派生した神経外胚葉細胞内で観察される前方デフォルトを想起させる。ニワトリの発生における研究により、後方ＦＰと対比した前方ＦＰの２つの顕著に異なる起源、すなわち、胚盤葉上層内および軸性中胚葉内の前駆体が提起されている（Placzekら、２００３年）。このデータにより、ヒトＦＰ先駆細胞も、神経外胚葉細胞と同様、ＦＧＦ８およびＷｎｔ－１を含む尾方化因子に応答した、後方ＦＰ識別への再特定が可能であることが指し示された。

【０１９８】

現在のところ、ＡＮマーカーの発現がある特定の系列をもたらす細胞の能力を阻害するのかどうかは、明確に示されていない。ｈＥＳＣから派生した神経ロゼット細胞では、ＢＦ１の発現は、ＨＢ９＋体細胞運動ニューロンを含む、後方ＣＮＳ運命へのパターン化を除外しない。

【０１９９】
しかし、尾方ニューロン運命を生じる効率は、ＢＦ１陰性ロゼットと比較して顕著に低減される（Elkabetzら、２００８年）。初代マウス外植片における先行研究は、ＡＮ細胞が、単独でＳＨＨに応答してＦＰ細胞へと分化する程度にコンピテントではないことを示した（Placzekら、１９９３年）。本発明による発生時における、本明細書で記載される方法および結果は、ＦＰ特定が可能でないＡＮコミットメントを示した。
【０２００】
本明細書で記載される、さらなる鍵となる知見は、ＮＳＢにより媒介される神経分化時における、ＤＫＫ－１の劇的な（強力な）誘導である。外因性ＤＫＫ－１へと曝露されたマウスＥＳＣの神経分化時には、血清非含有胚様体（ＳＦＥＢ）条件下で、ＡＮ誘導が増強された（Watanabeら、２００５年）。したがって、本発明の一部の実施形態は、神経分化時における内因性ＤＫＫ－１の早期誘導は、少なくとも部分的に、ｈＥＳＣ内で観察される、ＡＮのデフォルトの表現型の一因となることを想定する。本明細書における機能的研究は、遮断抗体を使用するＤＫＫ－１の阻害により、ＦＰ収量が著明に改善されることを裏付けた。さらに、５日目またはその後の時点において、ＳＨＨと共にＤＫＫ－１抗体を添加しても、ＦＰコンピテンシーの時間域を拡大するのに十分ではなかった（図１９Ｈおよび１９Ｉ）。同様に、ＷＮＴ（Ｗｎｔ－１、Ｗｎｔ３Ａ、またはＧＳＫ阻害剤（ＢＩＯ））を、神経ロゼット段階の細胞へと添加しても、ＦＰコンピテンシーの誘導には十分でなかった（図２５）。これらのデータにより、極めて早期のＤＫＫ１により媒介されるＡＮバイアスは、ｈＥＳＣから派生した先駆体のＦＰポテンシャルを抑制することが裏付けられた。
【０２０１】
ＢＦ１ノックダウンｈＥＳＣ細胞系におけるさらなるデータは、ＨＢ９＋運動ニューロンなど、後方ＣＮＳ細胞型の収量の改善を伴う、ＦＰ収量の増強を示した。したがって、本明細書で提示されるモデル系は、Ｃｅｒｂｅｒｕｓ（Bouwmeesterら、１９９６年）など、ＷＮＴ阻害機能を伴う他の分子の、ＡＮ特定およびＦＰ運命の抑制への寄与を評価するのに適することが想定される。最後に、本明細書で記載される系および方法は、ＤＫＫ－１発現の潜在的な上流の調節因子であって、ｈＥＳＣ内のＡＮデフォルトを調節するの調節因子の同定を可能とすることが想定される。
【０２０２】
ＳＨＨは、古典的な腹側化因子であり、神経発生時におけるＡＰ特定に対して効果を及ぼすことは公知でなかったので、高レベルの外因性ＳＨＨへの早期曝露を介する、ＤＫＫ－１の抑制と、その後のＡＮ運命の抑制の結果は、驚くべき結果であった。本発明者らの研究は、ＳＨＨによるＤＫＫ－１の調節が、直接的なものであるのか、ＤＫＫ－１発現を欠く代替的な先駆体集団を誘導することにより引き起こされるものなのかについて取り組むものではなかった。ＤＫＫ－１は、ＦＰ誘導を阻害したが、ＷＮＴ１への曝露は、ＦＰ組織の、ｈＥＳＣからの派生を増強した。これらのデータは、ＦＰ収量の同様な増大を誘導するＲＡであれば、ＷＮＴシグナル伝達に影響を及ぼすのかどうか、または後方運命の誘導により、Ｗｎｔシグナル伝達とは独立に、ＦＰ収量が増強されるのかどうかという問題を提起した。
【０２０３】
規定された局所的な識別を有する無限数のＦＰ細胞の利用可能性により、ヒト神経発生について研究するのに有用なツールがもたらされる。マウスにおける近年の研究は、ＦＰの一部の領域を、神経のパターン化および軸索経路の発見における役割を超えて、中脳ドーパミンニューロンを含む、特異的なニューロン型の供給源として用いうることを示唆する。ｈＥＳＣから派生したＦＰの局所的な識別の再特定は、中脳特異的マーカーの発現および中脳特異的ＳＨＨ増強エレメントの活性化に基づき、中脳特徴へと裏付けられた。ｈＥＳＣから派生したＦＰ組織は、ＴＨ＋／ＦＯＸＡ２＋推定中脳ＤＡニューロンをもたらしうるという証拠が見出された（図２５）。本明細書で示される結果は、ヒトＡＮ運命と対比したヒトＦＰ運命の誘導および局所的な特定に対する洞察をもたらし、ｈＥＳＣを、

機能的なオーガナイザー組織を創出する強力なモデル系であって、ヒト発生時におけるより複雑な相互作用のモデル化に適するモデル系として確立した。

【０２０４】

結論として述べると、本明細書で示される例示的なデータは、ＤＫＫ－１を上方調節し、その後、ＢＦ１を上方調節することを介する、神経分化の、ＡＮ運命へのｈＥＳＣデフォルトを示す一方で、ＡＮコミットメントが、ｈＥＳＣ子孫内のＦＰコンピテンシーを能動的に抑制することを示した。しかし、早期の高レベルＳＨＨにより、ＤＫＫ－１レベルが低減されることから、ＡＮを代償とするＦＰ誘導が可能となる一方で、ＤＫＫ－１またはＢＦ１の機能喪失により、ＦＰの産生が増大した。したがって、ヒトＥＳＣから派生したＦＰは、デフォルトでは前方であるが、尾方化因子に応答して後方化された。これを、図６Ｅにまとめる。

【０２０５】

こうして、本発明の多数の実施形態が、以下の表にまとめられる。

【０２０６】

【表Ａ】

表 A:本発明の神経細胞を得るための化合物の量についての例示的な範囲

	Noggin 濃度	ドルソモルフィン濃度	SB431542 濃度	Sonic C25H(SHH) 濃度
SB431542 を伴うNoggin	125 ～ 500 ng/ml	該当なし	0.001～1000 μM	該当なし
SB431542 および SHH を伴うNoggin	500 ng/ml	該当なし	0.001～1000 μM	200～2000 ng/ml
SB431542 を伴うドルソモルフィン	該当なし	100 ～ 5000 nM、最良の結果:600nM	0.001～1000 μM	該当なし
SB431542 を伴うドルソモルフィンを伴うNoggin	25 ～ 500 ng/ml、30ng/ml まで高効率	100 ～ 5000 nM、最良の結果:600nM	0.001～1000 μM	該当なし

【０２０７】

【表Ｂ】

表 B:本発明の神経細胞型を生成するための、本発明の化合物の例示的な添加時間

出発細胞型および条件	iPS および hESC を含む幹細胞 低密度の細胞:KSR 培地または馴化培地	iPS および hESC を含む幹細胞 高密度の細胞:KSR 培地または馴化培地	iPS および hESC を含む幹細胞 低密度または高密度の細胞:KSR 培地または馴化培地	改変 N-SB で処理された hESC または iPS:KSR 培地または馴化培地	N-SB で処理された、非接着胚様体内の hESC または iPS
SB431542 を伴う、N-SB:Noggin および/またはドルソモルフィン	培養の 0 日目に両方を添加し、細胞をフィードするときに調製したてのアリコートの添加を続ける	培養の 0 日目に両方を添加し、細胞をフィードするときに調製したてのアリコートの添加を続ける	培養の 0 日目に両方を添加し、細胞をフィードするときに調製したてのアリコートの添加を続ける	該当なし	培養の 0 日目に両方を添加し、細胞をフィードするときに調製したてのアリコートの添加を続ける;7 日目またはその前後における SB の中断
改変 N-SB:N-SB による誘導の 2 日(1～3)後における Noggin/ドルソモルフィンの中断	該当なし	該当なし	該当なし	培養の 0 日目に両方を添加し、1 日目(0 日目の後であり、6 時間～4 日間の範囲にわたる)に、Noggin および/またはドルソモルフィンを伴わない細胞培地で置きかえる	該当なし
SHH または C25II	該当なし	該当なし	N-SB 添加の 1 日後に添加する(0～5 日の範囲):5～11 日目の間に、KSR 培地を、N2 培地で、徐々に置き換える	該当なし	該当なし
結果として得られる細胞	CNS 前駆細胞(PAX6+)および PNS 前駆細胞(p75+、HNK-1+)	CNS 前駆細胞(PAX6+)(分化開始後 19 日以内における、R-NS 細胞、ならびに運動ニューロンおよびドーパミン作動性ニューロンによる、パターン化可能なニューロン集団)	FOXA2+(BF1 を低減された)SOX17-神経細胞、すなわち、前方 FP 細胞をデフォルト型とする FP への分化であるが、Wnt-1、FGFF8、または RA など、尾方化因子の存在下で、後方 FP 組織を誘導することができる	未成熟ニューロン細胞である、Tuj1+ニューロン、ペリフェリン+ニューロン、および成熟ニューロンをもたらす、Brn3a+前駆細胞をもたらす、Six1+プラコード先駆体	高効率運動ニューロン細胞

【０２０８】

ＶＩ．頭蓋プラコード細胞の特定

【０２０９】

一実施形態では、本発明は、三叉神経系列、水晶体系列、および下垂体前葉プラコード系列の特定を含む方法を想定する。一実施形態では、方法は、改変ＰＩＰ条件を使用する、先駆プラコード細胞の特定をさらに含む。本発明の機構を理解することは必要でないが

、ここでもまた改変ＰＩＰ条件を使用して、他のプラコード運命にもまた接近可能であることが考えられる。例えば、前プラコード細胞のＦＧＦ８への曝露により、嗅覚プラコード運命に適合的なＡＳＣＬ１発現が濃縮される（BalmerおよびLaMantia、２００５年）。ＷＮＴ３Ａなど、尾方化キューへの曝露は、耳プラコード運命に適合的な、ＳＩＸ１およびＳＯＸ１０を共発現させる細胞集団の誘導をもたらす。これらの条件は、さらなる最適化を要求するが、ＰＩＰは、頭蓋プラコード運命特定のためのユニバーサルプラットフォームを表すという考えを裏付ける。

【０２１０】

頭蓋プラコードは、感覚器官および内分泌器官の発生に不可欠の胎児構造である。ヒトプラコード発生は、プラコードから派生した組織の機能不全により引き起こされる重篤な医学的状態にもかかわらず、大部分は、依然として、接近不可能である。一部の実施形態では、頭蓋プラコードの、ヒト多能性幹細胞からの効率的な派生が開示される。例えば、神経誘導の二重ＳＭＡＤ阻害戦略の構成要素である、ＢＭＰ阻害剤Ｎｏｇｇｉｎのある時間をおいての除去により、他のＣＮＳ運命を代償として、プラコード誘導が誘発される。代替的に、ＦＧＦシグナル伝達の共時的阻害により、プラコード派生を破壊し、表面外胚葉を誘導することもできる。前プラコード段階における、さらなる運命特定は、ｉｎ ｖｉｖｏにおける生着が可能なプラコードから派生した三叉神経節、成熟水晶体線維、ならびに、移植されると、ヒトＧＨおよびヒトＡＣＴＨをｉｎ ｖｉｖｏにおいて産生する、下垂体前葉ホルモン産生細胞を含むがこれらに限定されない、頭蓋プラコード細胞の選択的生成を可能とする。本明細書で開示されるデータは、ヒト頭蓋プラコードの発生を研究するための強力な実験プラットフォームを確立し、感覚疾患および内分泌疾患におけるヒト細胞ベースの療法を開発するための土台作りをする。

【０２１１】

ヒト頭蓋プラコード発生の理解は、扱いやすい実験系の欠如、早期ヒト発生時における、この一過性の構造に対する接近不可能性、および検証されたヒトプラコードマーカーの非存在のために難題となっている。本明細書で開示されるデータは、これらの主要な難題を解消し、ヒトプラコード発生およびヒト外胚葉発生の研究のための多目的なプラットフォームを確立する（図４０）。かつての研究では、水晶体（Ootoら、２００３年；Zhangら、２０１０年）または耳プラコードから派生した細胞（Chenら、２０１２年；Oshimaら、２０１０年）など、ある特定のプラコード派生体の出現が観察されれいるが、特異的プラコード誘導の機構については取り組まれておらず、これらの研究では、プラコード特定についての一般的モデルが示唆されなかった。

【０２１２】

ごく近年の研究は、多能性幹細胞を、プラコード運命へと方向付ける能力について報告している（Leungら、２０１３年；MengarelliおよびBarberi、２０１３年；Shiら、２００７年）。しかし、これらの条件下では、機能的なヒトプラコード派生体が生成されていない。これに対し、マウスＥＳＣにおける研究は、機能的な耳プラコード派生体（Koehlerら、２０１３年）および下垂体プラコード派生体（Sugaら、２０１１年）を派生することに成功している。

【０２１３】

特に関心の対象となる発生問題は、プラコード細胞の起源である。当技術分野で一般的な仮説は、プラコード組織は、隣接する神経組織からの誘導性シグナルに応答して、非神経外胚葉から生じるということである（Schlosser、２００６年）。本明細書で開示されるデータにより、ヒトプラコード発生は同様に、ＴＦＡＰ２Ａの発現がＳＩＸ１の誘導に先行するという結果に基づいても、非神経外胚葉から生じるが、ＴＦＡＰ２Ａは、Ｎ－ＳＢによる誘導時には抑制されることが指し示される。ＢＭＰベースの、ＴＦＡＰ２ＡおよびＧＡＴＡ３の誘導は、プラコード誘導にコンピテントな非神経外胚葉系列を確立するのに有用でありうる（Kwonら、２０１０年）。

【０２１４】

ＦＧＦシグナル伝達の阻害により、非神経外胚葉を代償とするプラコード誘導を遮断す

る能力は、非神経外胚葉起源をさらに裏付け、内因性ＦＧＦシグナルが、ＰＩＰにおけるプラコードデフォルトの一因となる神経シグナルでありうることを示唆する。一実施形態では、分化の７日目における細胞（前プラコード）の処理は、多様なプラコード運命の間の切替えは誘導するが、非神経外胚葉運命と対比したプラコード細胞の比には影響を及ぼさなかったことを踏まえ、方法により、プラコード運命への発生コミットメントの時点が、７日目までと表示される。

【０２１５】

かつての研究では、ＦＯＸＧ１およびＤＡＣＨ１が、ｈＰＳＣ分化時における、前部神経外胚葉細胞および神経ロゼット段階の細胞についてのマーカーとして記載された（Chambersら、２００９年；Elkabetzら、２００８年）。本明細書で提示されるデータにより、ＮＳＢ条件下では、低百分率のＳＩＸ１＋細胞が自発的に出現することが裏付けられる。したがって、ＣＮＳ系列を生成することを目的とする分化研究では、夾雑プラコード組織が、ｈＰＳＣから派生した神経培養物中に存在するのかどうかに取り組むべきである。

【０２１６】

本発明の機構を理解することは必要でないが、これらの自発的に出現するプラコード細胞は、おそらく水晶体様体および過去の神経分化研究において観察された他のプラコード派生体の供給源であると考えられる。本明細書で提示される遺伝子発現データにより、一連の広範なプラコードマーカーが規定されることが考えられる。例えば、ＯＶＯＬ２は、マウス胚盤葉上層内およびマウス表面外胚葉内で発現することが既に報告されており、ＯＶＯＬ２の喪失は、早期の胚致死性をもたらす（Mackayら、２００６年）。

【０２１７】

一実施形態では、本発明は、ＯＶＯＬ２をヒト前プラコードマーカーとして想定する。他の実施形態では、ＦＯＸＣ１およびＩＳＬ１が、前プラコード段階において特異的に発現する、さらなる転写因子である。本明細書で開示されるデータは、頭蓋プラコード識別を、早期ＣＮＳ、神経堤、および表面外胚葉の識別から区別する転写ネットワークを規定するための枠組みを提示する。

【０２１８】

一実施形態では、本発明は、多様な特異的プラコード識別を採用する程度にコンピテントな一過性の前プラコード集団を含む方法を想定する。前プラコード領域の出現については、Ｘｅｎｏｐｕｓ属およびセブラフィッシュの発生時における出現が記載されている（Baileyら、２００６年；MartinおよびGroves、２００６年；Schlosser、２００６年）。本明細書で記載されるデータは、ＰＩＰは当初、ＰＡＸ６＋／ＳＩＸ１＋前方前プラコード集団をもたらすが、この集団は、おそらく、内因性ＦＧＦシグナルおよびＷＮＴシグナルの尾方化効果のために、さらなる分化時には、より後方のＰＡＸ３＋眼三叉神経運命を自発的に採用することを示す。

【０２１９】

他の実施形態では、分化の７日目における、ＳＨＨへの曝露またはＦＧＦシグナル伝達の抑制により、推定前プラコード先駆体を、下垂体前葉プラコード運命および水晶体プラコード運命へと方向付ける。水晶体プラコードは、ニワトリプラコード発生において、デフォルト状態として示唆されており、嗅覚プラコード運命を特定するには、ＦＧＦ８で必要かつ十分である（Baileyら、２００６年）。マウスＥＳＣ（Koehlerら、２０１３年；Sugaら、２０１１年）における他の研究では、洗練された３Ｄ培養系を使用して、ホルモン産生下垂体細胞および耳感覚ニューロンのそれぞれを生成する可能性が示されている。

【０２２０】

本明細書で開示されるデータにより、改変ＰＩＰ条件は、複雑な３Ｄ培養条件に対する必要を伴わずに、効率的にヒト下垂体先駆体をもたらすことが裏付けられる。ＡＣＴＨ産生細胞を含む、ＴＢＸ１９関連下垂体系列を優先的に生成するバイアスが観察されたが、３つの主要な先駆体系列全て（ＧＡＴＡ－２、ＴＢＸ１９、およびＰＩＴ１系列、図３８Ａ）を派生することができた。したがって、プロトコールのさらなる最適化により、個々の下垂体ホルモン系列への選択的接近がもたらされる可能性が高い。

【０２２１】
一実施形態では、本発明は、頭蓋プラコード細胞を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて生着させるステップを含む方法を想定する。一実施形態では、頭蓋プラコード細胞は、下垂体前葉細胞を含む。一実施形態では、生着は、脚筋上でなされる。一実施形態では、生着は、視床下部－下垂体軸上でなされる。一実施形態では、生着は、視床下部上でなされる。一実施形態では、生着は、トルコ鞍上でなされる。一実施形態では、生着した下垂体プラコード細胞は、下垂体ホルモンを産生および分泌する。
【０２２２】
一実施形態では、本発明は、三叉神経感覚ニューロンを派生することが可能な、ＰＩＰベースの分化を含む方法を想定する。三叉神経ニューロンは、三叉神経麻痺、三叉神経痛、および片頭痛の疼痛など、複数の疼痛症候群に関与することが報告されている（LoveおよびCoakham、２００１年）。したがって、多数の三叉神経ニューロンを生成する可能性は、ヒト侵害受容をモデル化し、疼痛研究における細胞ベースの薬物スクリーンを開発するために、特に有用である。別の重要な適用は、ヒトｉＰＳＣを使用する、単純ヘルペス脳炎のモデル化であろう（Lafailleら、２０１２年）。ＨＳＶ－１とは、三叉神経節内に潜伏形態で特異的に生存するウイルスである（Barnettら、１９９４年）。
【０２２３】
三叉神経ニューロンを患者特異的ｉＰＳＣから派生させることが可能であれば、ウイルスの潜伏に対する制御の欠損が、単純ヘルペス脳炎に寄与しているのかどうかについての取組みがなされるはずである。三叉神経プラコード先駆体の、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける頑健な生存により、機械的損傷、放射線誘導性損傷、または化学療法誘導性損傷の後における神経修復を目標とする、将来の再生法を開発する可能性が提起される。
【０２２４】
本発明の機構を理解することは必要でないが、再生医療に対する潜在的に大きな影響は、機能的なホルモン産生細胞を派生させることからもたらされうることが考えられる。例えば、下垂体機能低下症とは、先天性欠損、頭部傷害、または下垂体腫瘍を伴う患者もしくは放射線療法を施される患者における治療的介入の一般的な帰結である（Tabar、２０１１年）。補充ホルモンを施して、患者における休息時血清レベルを正常化しうるが、このような生涯にわたる処置のための財務費、運搬費、および医療費は、高額である。さらに、ホルモン補充療法は、概日リズム、または環境もしくはストレスによる刺激による生理学的変化への急速な調整に応答した動的放出を可能としない。したがって、多数の機能的なＡＣＴＨ産生細胞およびＧＨ産生細胞を生成する可能性により、小児患者および成人患者における、内分泌機能を回復するための、長期にわたる治療的細胞補充戦略の可能性が立ち上がる。
【０２２５】
Ａ．頭蓋プラコードの発生
【０２２６】
頭蓋プラコードは、水晶体、鼻腔上皮、耳構造、下垂体前葉、および三叉神経節など、脳神経のサブセットを含むがこれらに限定されない、感覚器官の細胞をもたらすと考えられる。
【０２２７】
発生時において、感覚プラコードは、将来の中枢神経系（ＣＮＳ）の前方部分を取り囲む、非神経外胚葉と神経板との界面において形成される（図２７Ａ）。
【０２２８】
プラコード発生の欠損は、失明および難聴～ホルモン不均衡または嗅覚障害の範囲にわたる、広範なスペクトルのヒト先天性奇形を引き起こしうる（Abdelhakら、１９９７年；BakerおよびBronner-Fraser、２００１年；Rufら、２００４年）。現在のところ、頭蓋プラコード発生は、カエル、セブラフィッシュ、ニワトリ、および、より小さな程度において、マウスを含むモデル生物において特徴付けされている（BakerおよびBronner-Fraser、２００１年；BhattacharyyaおよびBronner-Fraser、２００４年；Schlosser、２００６

年）。しかし、ヒトプラコード発生は、早期ヒト組織への接近の欠如および特異的プラコードマーカーの欠如のために、依然として大部分未探索のままである。

ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）およびヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）を含むヒト多能性幹細胞（ｈＰＳＣ）は、極めて広範な分化ポテンシャルを保持しながら、自己再生するポテンシャルを有する。過去数年間にわたり、ｈＥＳＣの運命を、特定の細胞系列へと方向付けるためのプロトコールが開発されている。例えば、ＣＮＳ細胞の派生は、当該技術分野で開発された、最初のｈＥＳＣ分化プロトコールにおいてなされた（Reubinoffら、２００１年；Zhangら、２００１年）。また、ｈＥＳＣの、末梢神経系細胞への分化も達成されている（Leeら、２００７年；Menendezら、２０１１年）。

【０２２９】

規定されたＣＮＳ細胞型およびＮＣから派生した細胞型の派生および適用の成功とは対照的に、ｈＰＳＣ内の頭蓋プラコード発生のモデル化における成功は限定されている。近年、骨形成性タンパク質（ＢＭＰ）シグナル伝達経路、およびＴＧＦβ／アクチビン／Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路の共時的阻害に基づく神経誘導戦略（二重ＳＭＡＤ阻害（ｄＳＭＡＤｉ）が報告された（Chambersら、２００９年））。この戦略では、ｈＰＳＣを、Ｎｏｇｇｉｎ（Ｎ）およびＳＢ４３１５４２（ＳＢ）へと曝露し、これにより、ｈＰＳＣの、様々なＣＮＳ細胞運命への、同期化された、急速で、効率的な分化をもたらす。

【０２３０】

一実施形態では、本発明は、ｄＳＭＡＤｉ誘導性分化における、内因性ＢＭＰシグナル伝達の抑制解除であって、ヒト頭蓋プラコードの選択的誘導に十分な抑制解除を含む方法を想定する。一実施形態では、新規のプラコード誘導プロトコール（ＰＩＰ）により、分化の１１日目までに、全ての細胞のうちの＞７０％が、ＳＩＸ１＋頭蓋プラコード先駆体運命を採用するように誘導する。

【０２３１】

一実施形態では、本発明は、三叉神経感覚ニューロン、成熟水晶体線維、および／または下垂体前葉のホルモン産生細胞を含むがこれらに限定されない、選択的プラコード運命へと分化する程度にコンピテントな、前プラコード系列を同定する方法を想定する。一実施形態では、三叉神経感覚ニューロンは、マーカー発現、電気生理学、ならびに発生しつつあるニワトリ胚および／または成体マウスＣＮＳへの移植を含むがこれらに限定されない技法により特徴付けられる。他の実施形態では、方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、成長ホルモン（ＧＨ）および／または副腎皮質刺激ホルモン（ＡＣＴＨ）を産生する、ヒト下垂体細胞を派生することが可能である。

【０２３２】

Ｂ．内因性ＢＭＰシグナル伝達の脱抑制は、神経外胚葉を代償として、プラコードを誘導する

【０２３３】

既に報告されたｄＳＭＡＤｉプロトコール（前出）が、プラコード細胞の派生に適するのかどうかに取り組むため、適切なプラコードマーカーのセットを規定した。モデル生物における研究に基づき、転写因子のｓｉｘファミリー、ＥＹＡファミリー、およびＤＬＸファミリーのメンバーは、ヒトプラコード運命をマーキングすることが報告されている（BakerおよびBronner-Fraser、２００１年；Schlosser、２００６年）。外胚葉系列内では、ＳＩＸ１は、プラコード特異的であり、早期前プラコード領域および多様な特異的プラコードの両方をマーキングする（Schlosser、２００６年）。ニワトリ胚における研究に基づくと、プラコード誘導は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける早期外胚葉パターン化における、ＦＧＦシグナル、ＢＭＰシグナル、およびＷＮＴシグナルの複雑な相互作用に依拠する（Litsiouら、２００５年）。外胚葉内のＢＭＰ活性はまた、運命の割り当てにおいても、特に有用であると考えられる。例えば、当初は、高レベルのシグナル伝達により、表皮運命が促進され、中程度のレベルにより、プラコードが誘導され、中間レベルにより、ＮＣが特定され、神経板の形成には、ＢＭＰ活性の完全な非存在が要求されるモデルが提起された（Wilsonら、１９９７年）。より近年の研究では、プラコードコンピテンスの確立に

おける、ＢＭＰシグナル伝達の早期の役割を確認することにより、上記のモデルを改訂している（Kwonら、２０１０年）一方で、後続の段階は、ＢＭＰの活性化ではなく、ＢＭＰ阻害を要求することが示された（AhrensおよびSchlosser、２００５年；Kwonら、２０１０年；Litsiouら、２００５年）。

【０２３４】

早期のＢＭＰ曝露が、ＳＩＸ１＋プラコード細胞の派生を促進するのかどうかについて調べるため、ＳＢ（ＴＧＦβ阻害剤）で処理されたｈＥＳＣを、多様な濃度のＢＭＰ４へと曝露した。しかし、ＳＢの存在下におけるＢＭＰ４の添加は、劇的な形態変化を引き起こし、既に報告されている（Xuら、２００２年）、ＢＭＰにより媒介される栄養外胚葉様系列の誘導と同様に、ＣＤＸ２の誘導を誘発した（図２７Ｂ、２７Ｃ）。

【０２３５】

また、Ｎ－ＳＢによる分化時における、ＢＭＰ阻害剤であるＮｏｇｇｉｎのある時間をおいての中断についても調べて、内因性ＢＭＰシグナル伝達の抑制解除を介して、プラコード運命を誘導しうるのかどうかを決定した。Ｎｏｇｇｉｎを、Ｎ－ＳＢプロトコールの異なる時点において除去する、経時的解析を実施した（図２８Ａ）。１１日目における遺伝子発現解析により、分化の２または３日目において、Ｎｏｇｇｉｎを中断した場合の、ＤＬＸ３、ＳＩＸ１、およびＥＹＡ１の頑健な誘導が明らかにされた（図２８Ｂ）。これに対し、分化の１日目において、Ｎｏｇｇｉｎを中断したところ、ＳＩＸ１発現の非存在下で、ＥＹＡ１の誘導がもたらされ、形態変化ならびにＣＤＸ２発現が誘発されたことから、栄養外胚葉分化が示唆された（ＣＤＸ２およびＥＹＡ１はまた、ｈＥＳＣから派生した中胚葉系列内でも発現しうる（Bernardoら、２０１１年）が）。

【０２３６】

これらのデータにより、ＥＹＡ１は、栄養外胚葉およびプラコード系列の両方において発現し、ＳＩＸ１との共発現により、プラコード系列が規定されうることが指し示される。分化の１１日目における、ｈＥＳＣ子孫についての免疫細胞化学解析により、３日目におけるＮｏｇｇｉｎ中断（ＰＩＰ条件）は、Ｎ－ＳＢ条件下における、８２％のＰＡＸ６＋神経外胚葉細胞から、ＰＩＰ下における、７１％のＳＩＸ１＋推定プラコード先駆細胞への切替えを誘導することが裏付けられた（図２８Ｃ、２８Ｄ、２７Ｄ）。ＳＩＸ１＋クラスターは、ＥＹＡ１、ＤＡＣＨ１、およびＦＯＸＧ１（ＢＦ１）など、他のプラコードマーカーも発現させた（図２８Ｅ）。

【０２３７】

また、前部神経外胚葉細胞内では、ＤＡＣＨ１も発現し（Elkabetzら、２００８年）、神経ロゼットをマーキングする一方、ＰＩＰで処理された培養物中では、ＤＡＣＨ１は、プラコードクラスターをマーキングする（図２７Ｅ）。ＰＩＰ条件下における遺伝子発現についての経時的解析により、多能性マーカー（ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ）、ならびに栄養外胚葉マーカー（ＣＤＸ２）（図２８Ｆ）、中胚葉マーカー（Ｔ）、および内胚葉マーカー（ＳＯＸ１７）の急速な下方調節が明らかにされた（図２８Ｇ）。ヒト初代組織内では、プラコード内のＳＩＸ１発現が確認された（カーネギー発生段階１５、約５．５週ｐ．ｃ．；データは示さない）。ＳＩＸ１はまた、骨格筋細胞、胸腺細胞、および腎臓細胞の先駆体内でも発現した。

【０２３８】

しかし、ＰＩＰにおいては、骨格筋マーカー（ＭＹＯＤ）、内胚葉マーカー（ＳＯＸ１７）、または中胚葉マーカー（ブラキウリ（Ｔ））の発現が検出されなかったことから、ｈＥＳＣから派生したＳＩＸ１＋細胞は、プラコード識別であることが確認される。ＰＩＰ条件下において、免疫細胞化学によるＳＯＸ１０発現およびＳＯＸ１０：：ＧＦＰレポーター細胞系発現（Chambersら、２０１２年；Micaら、２０１３年）に基づき観察されるＮＣ系統の細胞は、極めて少数（＜１％）であった（図２７Ｆ）。

【０２３９】

頭蓋プラコードマーカーの誘導は、５日目までに、ＦＯＸＧ１により観察され、ＳＩＸ１およびＤＬＸ３の発現に先行した（図２８Ｈ）。ＰＩＰプロトコールは、複数のｈＥＳ

ＣおよびｈｉＰＳＣ細胞系内で検証した（図２７Ｇ、２７Ｈ）。保存的Ｅｙａ１増強エレメント（Ishiharaら、２００８年）を使用して、ｈＥＳＣから派生したプラコード先駆体の識別についてさらに検証した。ＧＦＰ発現は、嗅覚プラコード内の増強因子のヌクレオフェクション後にはたやすく観察されたが、年齢をマッチさせた中脳培養物中では確認されなかった（図２７Ｉ～Ｊ）ことから、特異性が確認される。ｈＥＳＣから派生したプラコード内では、ＰＩＰにおいて、増強因子活性を伴う細胞百分率の、Ｎ－ＳＢと対比して８倍の増大が観察された（図２７Ｋ）。

【０２４０】

Ｃ．マイクロアレイ解析は、新規のヒトプラコード先駆体の遺伝子発現を明らかにする

【０２４１】

経時的トランスクリプトーム解析を実施して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるプラコード誘導過程について、バイアスのかからない分子評価を確立した。対照Ｎ－ＳＢ対ＰＩＰで処理された培養物中、５つの時点（１、３、５、７、および１１日目）において、三連でＲＮＡを回収した（図３０Ａ～Ｅ；全ての生データは、ＧＥＯ：ncbi.nlm.nih.gov/geo/で入手可能である：受託番号保留）。マイクロアレイ解析の前に、各試料の品質を、プラコードマーカーのパネル（ＳＩＸ１、ＤＬＸ３、ＥＹＡ１）の発現、および他の系列マーカー（ＦＯＸＡ２（内胚葉）、ＳＯＸ１７（内胚葉）、ＭＹＯＤ（骨格筋）、ＣＤＸ２（栄養膜）、およびＴ（中胚葉））の非存在について検証した。

【０２４２】

クラスター分析および主成分分析により、分化の７日目までに、Ｎ－ＳＢと対比したＰＩＰで処理された細胞内のトランスクリプトームデータの経時的セグリゲーションが示された（図３０Ａ、２９Ａ）。トランスクリプトームデータはまた、プラコード運命を、神経外胚葉運命から区別する遺伝子のセットも規定した（表Ｓ１、２）。プラコード誘導時に示差的に発現する特異的遺伝子への洞察を得るため、対応のある比較を、各分化時点について実施した（図３０Ｂ～Ｅ）。ＰＩＰ条件下において最も高度に濃縮された転写物の中には、ＧＡＴＡ３、ＤＬＸ５、ＤＬＸ３、ＴＦＡＰ２Ａ、およびＴＦＡＰ２Ｃなど、公知のプラコードマーカーが見られた。マイクロアレイ解析において、ＳＩＸ１は、分化の９日目までに、著明に上方調節されたが、最も示差的に調節された遺伝子の中には入らなかった。これらの遺伝子およびさらなる遺伝子についての示差的発現を、ｑＲＴ－ＰＣＲにより検証した（図２９Ｂ）。

【０２４３】

ＷＮＴ経路の阻害剤であるＤＫＫ－１、ならびにＢＭＰシグナル伝達の公知の転写標的である（Grotewoldら、２００１年）、ＧＲＥＭＬＩＮ－１およびＢＡＭＢＩなどのＢＭＰアンタゴニストの増大など、ＷＮＴ経路およびＢＭＰ経路の構成要素の著明な転写変化が観察された（図３０Ｂ～Ｄ）。興味深いことにまた、感覚ニューロン、運動ニューロン、心臓前駆体、および膵島細胞について報告されているマーカーである、ＩＳＬ１も誘導された（HunterおよびRhodes、２００５年）。ＩＳＬ１発現の早期開始と、中胚葉運命の非存在とに基づき、ＰＩＰ条件下において、ＩＳＬ１は、早期ヒトプラコードマーカーを表すことが推定された。ＩＳＬ１は、ＰＩＰによる分化時に誘導される最初のマーカーのうちの１つであった。ＴＦＡＰ２ＡおよびＳＩＸ１（図３０Ｆ）と同様、ＩＳＬ１タンパク質も、ＳＩＸ１と部分的に共局在化しながら、分化の１１日目まで、大部分の細胞内で発現し続けた（図３０Ｇ）。

【０２４４】

本明細書で開示されるマイクロアレイ発現データ中で同定された、別の新規のプラコードマーカーは、亜鉛フィンガー転写因子のＯｖｏファミリーのメンバーである、ＯＶＯＬ２である。ＯＶＯＬ２は、ＰＩＰにおいて、分化の５日目までに濃縮され、プラコードクラスターは、ＯＶＯＬ２に対する強力な免疫反応性を示した（図３０Ｈ）。これに対し、ＣＮＳ運命を促進する条件下（Ｎ－ＳＢ）または神経堤運命を促進する条件下（Ｎ－ＳＢ／ＣＨＩＲ（Chambersら、２０１２年；Micaら、２０１３年））では、ＯＶＯＬ２は、下方調節された（図３０Ｉ）。

【０２４５】
また、前方プラコード特定時に示差的に発現するさらなる遺伝子であって、ＦＯＸＣ１およびＨＡＰＮＬ１（ＣＲＴＬ１としてもまた公知の）を含む遺伝子も同定された。ＦＯＸＣ１は、ニワトリの発生時には、水晶体プラコードをマーキングする（Baileyら、２００６年）が、また、前プラコード段階においても発現しうる（SasakiおよびHogan、１９９３年）。ＨＡＰＮＬ１は、ＰＩＰにおいて最も示差的に発現する遺伝子のうちの１つであり、表面外胚葉内およびニワトリ神経板境界においても発現することが既に示された（ColasおよびSchoenwolf、２００３年）。ＤＡＶＩＤ（david.abcc.ncifcrf.gov/；Dennisら、２００３年）を使用する、遺伝子オントロジー（ＧＯ）解析により、Ｎ－ＳＢ条件と対比したＰＩＰ条件では、ＢＭＰ経路およびＷＮＴ経路の転写物であって、感覚器官、外胚葉、および表皮の発生と関連する転写物は、分化の７日目および９日目において高度に濃縮されることが指し示された（図２９Ｃ）。示差的に発現する遺伝子の総数は、分化の７日目までに増大し（図２９Ｄ、２９Ｅ）、プラコードコミットメントについて提起される時間枠に合致する。まとめると、本発明で実施された分子解析は、ヒトプラコード発生の予備的なロードマップおよび将来の機能的研究のための重要な資源を提供する。

【０２４６】
Ｄ．　ＦＧＦ阻害剤による早期の処理は、プラコードを抑制し、表面外胚葉運命を誘導する

【０２４７】
複数の脊椎動物種における系列研究により、頭蓋プラコード先駆体は、神経由来ではなく、表面外胚葉から生じ、隣接する神経外胚葉から発生するシグナルにより誘導されることが指し示される（Pieperら、２０１２年）。しかし、ヒト発生については、このようなデータは入手可能でない。

【０２４８】
ヒトプラコード誘導の推定タイミング（約２０日ｐ．ｃ．（O'Rahilly、１９８７年））のために、この段階は、実験操作に大部分接近不可能なものとなっている。ＰＩＰにおける遺伝子発現データにより、ＴＦＡＰ２Ａは、最早期に上方調節され、示差的に発現する遺伝子のうちの１つであることが指し示される（図３０Ｂ～Ｅ）。マウス発生時において、オルソログ遺伝子であるＴｃｆａｐ２ａの早期発現（Ｅ７．５）は、将来の表面外胚葉に限局される（ArkellおよびBeddington、１９９７年）。

【０２４９】
本明細書で提示されるデータにより、ＰＩＰの５日目におけるＴＦＡＰ２Ａ誘導の初期検出が裏付けられるが、Ｎ－ＳＢプロトコールでは、ＴＦＡＰ２Ａ誘導の初期検出は見られない（図３２Ａ）。この観察は、ＰＩＰの３～５日目の間の期間が、表面外胚葉発生へのコミットメントに対応することを示唆する。ＳＩＸ１は、ＴＦＡＰ２Ａの２日後に誘導された（図３２Ａ、３２Ｂ）ことから、表面外胚葉中間体がさらに指し示される。

【０２５０】
ｉｎ　ｖｉｖｏにおける遺伝子研究は、ＦＧＦシグナル伝達の非存在下では、高レベルのＢＭＰにより、表皮運命が促進されるのに対し、ＦＧＦ活性化時にＢＭＰレベルを低減すると、プラコード細胞が確立されることを指し示す（Kudohら、２００４年；Litsiouら、２００５年）。本発明の機構を理解することは必要でないが、ＰＩＰ条件下において、内因性ＦＧＦシグナル伝達を遮断すると、プラコード誘導が破壊され、表皮運命が誘発されうることが考えられる。例えば、本データは、ＦＧＦシグナル伝達を阻害する低分子であるＳＵ５４０２は、分化の３～１１日目において（図３２Ａ）、ＳＩＸ１＋クラスターの出現を抑制する一方で、ＴＦＡＰ２Ａ発現を維持した（図３２Ｃ）ことを示す。

【０２５１】
１１日目における、ＳＩＸ１およびＴＦＡＰ２Ａの遺伝子発現の定量化により、プラコードマーカー発現の完全な喪失（図３２Ｄ）が確認される一方で、ＴＦＡＰ２Ａ発現は維持された。ＴＦＡＰ２Ａ＋細胞の外胚葉先駆体識別は、表皮先駆体マーカーであるＫＲＴ８の、ＰＩＰ＋ＳＵ５４０２で処理された培養物中の発現により裏付けられた（図３２Ｅ

）。さらに、長期にわたる培養物（４２～６０日目）は、成熟角化細胞マーカーであるＫＲＴ１４の頑健な誘導を示し（図３２Ｆ）、周辺部にＫＲＴ１４免疫反応性細胞を伴うＥ－ＣＡＤＨＥＲＩＮ陽性パッチを形成した（図３１Ｂ）。表皮先駆体の増殖能についての解析は、主にＥ－ＣＡＤＨＥＲＩＮ＋／ＫＲＴ１４－細胞内のＫＩ６７発現を示した。細胞増殖は、６０日目までに低下し、ＫＲＴ１４を発現する細胞の百分率の増大と共時的であった（図３２Ｇ、３１Ｃ）。内因性ＦＧＦシグナル伝達に対する要求に加えて、低ＷＮＴレベルおよび低ＢＭＰレベルも、表面外胚葉運命（３日目）から、早期プラコード運命への移行についての、他の有用なパラメータとして観察された。高濃度のＣＨＩＲまたはＢＭＰ４への曝露は、ＮＣまたは推定栄養外胚葉のそれぞれを代償とするプラコードを抑制した（図３１Ｄ、３１Ｅ）。

【０２５２】

Ｅ．　プラコード先駆体は、三叉神経型感覚ニューロンへと効率的に分化する

【０２５３】

頭蓋プラコードは、広範にわたる特化細胞型であって、下垂体前葉のホルモン産生細胞、眼内の水晶体線維などの構造細胞、および三叉神経ニューロンを含むがこれらに限定されない感覚ニューロンを含むがこれらに限定されない特化細胞型をもたらすと考えられている（図３４Ａ）。プラコードは、特異的ＰＡＸ遺伝子の発現により特徴付けることができる（McCauleyおよびBronner-Fraser、２００２年）。本明細書で提示されるデータは、標準的なＰＩＰ条件下で、大半のＳＩＸ１＋クラスターが、ＰＡＸ３を共発現させた（図３４Ｂ）ことから、眼三叉神経プラコード識別が示唆されることを示す（McCabeら、２００４年；Starkら、１９９７年）。ニューロン形状を伴うＨＮＫ１＋（Metcalfeら、１９９０年）細胞の自発的発生、およびＩＳＬ１の共発現により、末梢感覚ニューロンの識別が確認された（図３４Ｃ）。ＰＩＰ条件下における感覚ニューロンのプラコード起源をさらに確認するため、ニューロンマーカーの、ＳＩＸ１との共発現について評価した（図３４Ｄ、３３Ａ）。ＰＩＰベースの感覚ニューロン分化時における、ＳＯＸ１０発現の欠如により、神経堤起源が除外された。分化の２０日目（再プレーティングの７日後）までに、細胞は、ニューロンが長く伸長し、放射状の突起を伴い、感覚ニューロンマーカーであるＢＲＮ３Ａの核内発現を伴う神経節様構造を形成した（図３４Ｄ、３４Ｅ）。大半のニューロンは、分化の４２日目まで、ＩＳＬ１発現を保持し、末梢ニューロンマーカーであるペリフェリンの発現を獲得した（図３４Ｆ、３３Ｂ）。神経伝達物質表現型についての免疫細胞化学解析により、グルタメートの発現が明らかにされた（図３４Ｇ）が、ＴＨおよびＧＡＢＡの発現は欠いた（データは示さない）。これらのデータは、グルタミン酸作動性三叉神経感覚ニューロンの発生に適合的である。遺伝子発現解析により、ＲＵＮＸ１（図３４Ｈ、３３Ｃ）およびＲＥＴ（図３３Ｄ）の誘導が示されたことから、感覚／侵害受容系列が指し示される。ＮＴＲＫ１およびＮＴＲＫ２を含むＴＲＫ受容体の発現（図３４Ｉ、３３Ｅ）は、侵害受容感覚ニューロンおよび非侵害受容感覚ニューロンの両方の存在を指し示す（図３３Ｅ～Ｇ）。

【０２５４】

侵害受容ニューロン識別の診断用マーカーは、特異的なナトリウムチャネル（ＳＣＮ９Ａ、ＳＣＮ１０Ａ、ＳＣＮ１１Ａ；図３４Ｊ）ならびにカプサイシン受容体（ＴＲＰＶ１）、冷温感覚の受容体（ＴＲＰＭ８）、およびＡＴＰにより媒介される炎症性疼痛の感覚に極めて重要なＰ２Ｘ３受容体などの古典的疼痛受容体の発現を含む（図３４Ｋ）。長期にわたる（５５日目）三叉神経ニューロン培養物中の遺伝子発現解析は、ＲＥＴ１およびＲＵＮＸ１の持続的発現を示した（図３３Ｃ、３３Ｄ）。

【０２５５】

全細胞パッチクランプ記録により、プラコードから派生した感覚ニューロンについての機能解析を実施した（図３３Ｇ）。双極形または三極形を呈示する記録用ピペットにより、ニューロンに、Ｌｕｃｉｆｅｒ　ｙｅｌｌｏｗを充填した（図３４Ｌ、３４Ｍ）。一連の過分極パルスおよび脱分極パルスに対する応答を測定した（図３４Ｎ）。ｈＥＳＣから派生したニューロンは、初代胎児三叉神経ニューロンについて報告されている（Grigaliu

nasら、２００２年）機能的特性に合致する脱分極閾値において、単一の活動電位をもたらした。平均静止膜電位（ｒｅｓｔｉｎｇ　ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）（ＲＭＰ）は、－６５．６±６．７であった（図３４Ｌ、３４Ｍ）。受動的膜電位および活動電位特性は、図３４Ｏにまとめられる通り、双極感覚ニューロンと三極感覚ニューロンとで同等であったことから、２つの形態的に顕著に異なる集団が、機能的に顕著に異なる亜群を反映するわけではないことが示唆される。三叉神経感覚ニューロン誘導プロトコールの頑健性を、複数のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣ細胞系にわたりさらに評価したところ、ＩＳＬ１発現ニューロンと、ＢＲＮ３Ａ発現ニューロンとの同等な百分率が観察された（図３３Ｈ）。

【０２５６】

Ｆ．　発生しつつあるニワトリ胚ＣＮＳおよび成体マウスＣＮＳにおける、ｈＥＳＣから派生した三叉神経ニューロンについてのｉｎ　ｖｉｖｏ解析

【０２５７】

ｈＥＳＣから派生した三叉神経プラコード先駆体のｉｎ　ｖｉｖｏ特性について評価するため、構成的にＧＦＰを発現させるｈＥＳＣ細胞系から派生された、ＰＩＰ誘導性ニューロンクラスター（図３５Ａ、３５Ｂ）を、発生しつつあるニワトリ胚へと注射し、Ｈ＆Ｈ段階１０～１２の早期三叉神経原基を標的とした（図３５Ｃ）。ヒト細胞は、ＧＦＰ発現および細胞質抗原（ｈＣＡ）に対するヒト特異的抗体の使用に基づき同定した。ｉｎ　ｏｖｏ移植の２日後、生存するＧＦＰ＋細胞が、内因性ニワトリ三叉神経節領域内に分散して見出された（図３４Ｐ）。ｈＣＡおよびペリフェリンを共発現させる、広範なＧＦＰ＋ヒト線維束が観察された（図３４Ｑ、３４Ｒ）。これに対し、胚の神経管内では、ｈＣＡ発現も、ペリフェリン発現も検出されなかった（図３５Ｄ）。移植の２日後における、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける線維伸長は、再プレーティングされた三叉神経ニューロンクラスターの、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける広範な線維伸長を想起させた（図３５Ａ）。ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるペリフェリン発現（図３４Ｓ）により、移植された細胞の末梢ニューロン識別が確認された。

【０２５８】

ｈＥＳＣから派生した三叉神経ニューロンを、それらが、成体マウスＣＮＳ内で生着し、生理学的標的へと突出しうるのかどうかについて評価した。脳幹内の三叉神経核は、三叉神経の感覚神経節からの求心性神経支配を受け、これは、対側の視床へと受け渡される。手術により接近可能であり、三叉神経節からの求心性入力を受容する三叉神経脳幹核の近位に位置するので、橋を、移植のための部位として選択した。そこで、定位手術を介して、ＧＦＰ＋ヒト三叉神経ニューロンクラスターを、成体ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスへと注射した。移植の４週間後における組織学解析は、ＧＦＰ＋ヒト細胞移植片の、腹側橋内の生存を示した（図３５Ｅ）。ＧＦＰ＋細胞体は、注射部位において、依然として、緊密にクラスター化していたが、ＧＦＰ＋線維は、内因性三叉神経核を含む宿主脳（Ｎ＝６）への、広範な突起を示した（図３５Ｆ）。ＢＲＮ３Ａの発現により、細胞の感覚ニューロン識別が確認された（図３５Ｇ）。移植片から派生したヒト線維束（ｈＮＣＡＭ＋／ＧＦＰ＋）が、移植片コアから発生しているのが観察された（図３５Ｈ）。

【０２５９】

これらのデータにより、ニワトリ胚脳および成体マウス脳における、三叉神経プラコード派生体のｉｎ　ｖｉｖｏにおける生存、感覚ニューロン系列に沿った分化、および関連する内因性標的への軸索突起の確立が裏付けられる。

【０２６０】

データは、三叉神経感覚ニューロンが、疼痛症候群および片頭痛のための薬物スクリーニングに有用でありうることを示唆する。例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける電気生理学により、三叉神経プラコード細胞から生成された三叉神経ニューロンについての読取りを行いうるであろう。本明細書で提示されるデータは、プラコード－三叉神経感覚ニューロンが、初代三叉神経感覚ニューロンについて記録された機能特性に合致する、単一の活動電位を有することを示す。さらに、これらの細胞は、侵害受容ニューロンの識別について

の診断用マーカーも発現させ、特異的ナトリウムチャネルの発現も含む。
【０２６１】
Ｇ．　推定前プラコード段階の同定
【０２６２】
本明細書で提示されるデータにより、ＰＩＰ条件が、眼三叉神経プラコード運命を効率的に誘導することが指し示される。改変ＰＩＰ条件を使用して、他のプラコード運命も生成しうるのかどうかについて探索するため、培養系内の推定前プラコード細胞の存在について取り組んだ。
【０２６３】
脊椎動物の発生において、前プラコードは、プラコード識別を決定するシグナルに応答する程度にコンピテントな先駆細胞を含有する発生原基として特徴付けられる（Martinおよ
びGroves、２００６年）。多様なモデル生物における前プラコード細胞は、Ｓｉｘ１を発現させ、外胚葉運命および神経運命の両方のマーカーを共発現させることが示されている。しかし、ヒト前プラコードの発生については、依然として未探索のままである。
【０２６４】
ＴＦＡＰ２Ａ（早期外胚葉マーカー）およびＰＡＸ６（早期神経外胚葉マーカー（Zhangら、２０１０年））についての経時的共発現解析を実施した。分化の最初の３日間には、ＰＡＸ６発現細胞またはＴＦＡＰ２Ａ発現細胞の少数の散在的パッチだけが観察され、共発現の証拠を伴わなかった（図３６Ａ）。Ｎｏｇｇｉｎ中断（ＰＩＰ）の２日後である５日目に、ＰＩＰ条件下では、ＴＦＡＰ２Ａ＋細胞の数が増大し（図３６Ｂ）、Ｎ－ＳＢ条件下では、ＴＦＡＰ２Ａ＋細胞の共時的喪失が見られた（図３６Ｃ）。７日目において、Ｎ－ＳＢ条件が、ＴＦＡＰ２Ａ発現を欠くＰＡＸ６＋細胞もたらした（図３６Ｃ）のに対し、ＰＩＰで処理された培養物は、ＴＦＡＰ２ＡおよびＰＡＸ６の広範な共発現を示したことから、前プラコード識別が指し示される（図３６Ｂ）。ＴＦＡＰ２Ａ／ＰＡＸ６二重陽性細胞の出現は、分化の約７日目における、ＳＩＸ１遺伝子発現およびＳＩＸ１＋クラスターの出現の開始と符合した（図３２Ｂ、３７Ａ）。１１日目まで、プラコードクラスターは、ＰＡＸ６について陰性であったが、ＴＦＡＰ２Ａの発現を保持した（図３６Ｂ）ことから、早期前方ＰＡＸ６＋前プラコード細胞が、ＰＡＸ３＋について濃縮された、ＰＡＸ６陰性後方プラコード集団をもたらすことが示唆される。この分化モデルは、ＰＩＰの７～１１日目における、頑健なＰＡＸ３の増大を示す遺伝子発現データによりさらに裏付けられた（図３６Ｄ）。ＰＩＰの７～１１日目における、ＷＮＴシグナル伝達またはＦＧＦシグナル伝達の阻害剤による処理はは、ＰＡＸ３の誘導を抑制する（図３６Ｅ）一方、ＰＡＸ６は維持した（図３６Ｆ）。
【０２６５】
これらの結果により、内因性シグナルは、前方ＰＡＸ６＋前プラコード系列から、後方ＰＡＸ３＋プラコード系列への移行に寄与することが指し示される。１１日目のＮ－ＳＢ培養物中の、少数のＴＦＡＰ２Ａ細胞（図３６Ｃ）は、ＰＡＸ６発現を欠く神経堤先駆体を表す可能性が高い（Chambersら、２００９年）。ＰＩＰ条件下では、１１日目における、夾雑ＳＯＸ１０＋　ＮＣ細胞の百分率は、＜１％であった（図２７Ｆ）。
【０２６６】
Ｈ．　前プラコード段階における、ＦＧＦ阻害剤であるＳＵ５４０２による処理は、水晶体運命を誘導する
【０２６７】
推定前プラコード細胞を、それらが、三叉神経ニューロン以外の特異的プラコード運命へと分化しうるのかどうかについて調べた。水晶体先駆体（水晶体様体）の、霊長動物ＥＳＣおよびｈＥＳＣからの自発的出現については、既に報告されている（Ootoら、２００３年；Zhangら、２０１０年）が、これらの研究では、系列の起源および誘導性シグナルについては、依然として、未探索のままである。
【０２６８】
ＢＭＰシグナル伝達、ＦＧＦシグナル伝達、ＷＮＴシグナル伝達、およびヘッジホッグ

シグナル伝達の活性化因子および阻害剤を使用することにより、４つの発生シグナル伝達経路の、水晶体プラコード特定に対する影響について調べた。水晶体プラコード運命の誘導を定量化するため、分化の１６日目において、水晶体先駆体マーカーであるＰＩＴＸ３発現をモニタリングした（図３７Ｂ）。ＰＩＴＸ３発現は、組換えＢＭＰ４の存在下において、またはＦＧＦ阻害性分子であるＳＵ５４０２への曝露時において、著明に誘導された（図３６Ｆ）。ＢＭＰおよびＦＧＦの役割については、ニワトリにおける発生研究で既に提起されている（Sjoedalら、２００７年）。さらなる分化により、５７日目までに、αβ－クリスタリンの強力な誘導および成熟水晶体線維構造の形成が明らかにされた（図３６Ｇ、左パネル）。水晶体線維の特徴的な層化（図３６Ｇ、右パネル）は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて発生しつつある水晶体の構造的特性を模倣した。

【０２６９】

Ｉ．　前プラコード段階における、ＳＨＨによる処理は、下垂体前葉細胞を誘導する

【０２７０】

本明細書で提示されるデータは、前プラコード細胞は、下垂体前葉プラコードへと分化することが可能であり、多様な下垂体先駆体およびホルモン産生細胞型を再創出しうることを示す（図３８Ａ）。前プラコード段階（７～１１日目）における、ＳＨＨシグナル伝達に対するアゴニストによるさらなる処理（図３９Ａ）により、下垂体発生についての主要な調節因子である、口腔外胚葉マーカーＳＩＸ６およびＰＩＴＸ１の発現が誘導される（図３８Ｂ）（Tremblayら、１９９８年）。転写物レベルおよびタンパク質レベルにおけるＰＩＴＸ１およびＳＩＸ６の誘導は、ＳＨＨ用量に依存した（図３８Ｂ、３８Ｃ）。さらに、ＳＨＨ処理により、最終的な下垂体先駆体マーカーであるＬＨＸ３の発現が誘発された（図３８Ｄ）。

【０２７１】

下垂体前葉の内分泌細胞は、３つの主要な先駆体系列から派生する（ScullyおよびRosenfeld、２００２年）。ＰＩＰ＋ＳＨＨ処理の後で、ＴＢＸ１９の頑健な誘導が観察された（図３８Ｅ）が、これは、ＡＣＴＨ産生細胞およびＭＳＨ産生細胞をもたらす先駆体に特異的であった。ＰＩＴ１およびＧＡＴＡ２先駆体系列の誘導は、それほど効率的でなかったが、γ－セクレターゼ阻害剤であるＤＡＰＴによる処理の後で増大した（図３８Ｆ、３８Ｇ）。

【０２７２】

下垂体ホルモンについての免疫細胞化学は、１６日目までに、ＣＧＡの発現を示したが、ＦＳＨ、ＡＣＴＨ、およびＧＨのタンパク質発現も、分化の２５～３０日目までに初めて観察された（図３８Ｈ～Ｋ）。ＡＣＴＨ＋細胞の誘導は、特に効率的であり（図３８Ｊ）、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるＡＣＴＨホルモンの放出は、ＥＬＩＳＡによりたやすく検出することができた（図３８Ｌ）。

【０２７３】

さらに、これらのｈＥＳＣから派生した下垂体細胞は、マウス異種移植モデルおよびラット異種移植モデルにおける、ｉｎ　ｖｉｖｏの生存および機能が可能である（図３８Ｍ、３９Ｂ、３９Ｃ）。ＧＦＰでマーキングされたｈＥＳＣから派生した下垂体先駆体の、成体雄ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスへの皮下注射（分化の１６日目）により、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるＧＳＵ細胞およびＦＳＨ細胞の生存が裏付けられた（図３９Ｄ、３９Ｅ）。

【０２７４】

雄ヌードラット（ｎ＝８；移植の４～６週間後）における長期の生存研究は、早朝の時間（概日周期における、内因性ＡＣＴＨ発現の最低点）に測定される血清ＡＣＴＨレベルの著明な上昇を示した（図３８Ｎ）。ヒトＧＨレベルは、ヒトＧＨは選択的に検出するが、マウスＧＨは検出しない、ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて測定した（図３８Ｏ）。

【０２７５】

ラット宿主への移植は、採血の反復を可能とし、移植動物における、偽注射（ｍａｔｒｉｇｅｌだけ）動物と比較した、ＡＣＴＨレベルおよびＧＨレベルの一貫した上昇を示し

た。最後に、組織学解析により、移植の６週間後における、平均０．４６±０．０１５×１００万個の生存ｈＮＣＡＭ＋細胞が裏付けられた（図３８Ｐ）。生存ヒト細胞のうちの約１０％が、ＡＣＴＨを発現させ（図３８Ｑ）、細胞のうちの６％が、ＧＨに対して免疫反応性であった（図３８Ｒ）。

【０２７６】

マウスＥＳＣにおけるかつての研究であって、下垂体系列を誘導する複雑な共培養系に対する必要を示唆する研究（Sugaら、２０１１年）を踏まえると、改変ＰＩＰ条件を介して、機能的なホルモン産生下垂体細胞をｈＥＳＣから派生させる可能性は、特に魅力的である。ｉｎ　ｖｉｖｏにおける生存および移植片から派生したＡＣＴＨおよびＧＨ産生は、遺伝的であるか、手術によるか、または放射線により誘導された下垂体機能低下症を患う患者のための橋渡しの可能性を示唆する（Tabar、２０１１年）。

【０２７７】

下垂体プラコード細胞から派生した、ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＡＣＴＨ産生下垂体細胞を使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ＡＣＴＨを産生させうるであろう。ＡＣＴＨは、乳児けいれんを処置するのに極めて重要である。さらに、市販の一組成物（Ａｃｔｈａｒ　Ｇｅｌ）は、乳児けいれんを処理するのに使用される、長期作用型の動物生成物である。Ａｃｔｈａｒ　Ｇｅｌには、現行では極めて高価な医薬品であるという欠点がある。バイアル１本あたりの価格は、＄３６，０００という高額に上る。成長ホルモンはまた、成長ホルモン欠乏症など、代謝性障害のためにも使用されうるであろう。

【０２７８】

ＶＩＩ．プラコード細胞の、非プラコード細胞からの誘導

【０２７９】

ある特定の実施形態では、本発明は、プラコード先駆細胞を、例えば、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）を含む胚性幹細胞（ＥＳＣ）、またはヒトｉＰＳＣを含む人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）などの非プラコード細胞から誘導するための組成物、キット、および方法を提供する。ある特定の実施形態では、プラコード先駆細胞は、非プラコード細胞を、本明細書で記載されるＳＭＡＤの阻害剤と共に培養することにより誘導する。ある特定の実施形態では、ＳＭＡＤ阻害剤は、ＡＬＫ阻害剤である。ある特定の実施形態では、ＡＬＫ阻害剤は、ＡＬＫ４、ＡＬＫ５および／またはＡＬＫ７受容体のリン酸化を遮断することにより、Ｌｅｆｔｙ／アクチビン／ＴＧＦベータ経路を阻害する。ある特定の実施形態では、ＳＭＡＤ阻害剤は、ＳＢ４３１５４２である。ある特定の実施形態では、組成物、キット、および方法は、ＢＭＰ活性剤、例えば、ＢＭＰ４をさらに含む。ある特定の実施形態では、非プラコード細胞を、ＳＭＡＤ阻害剤およびＢＭＰ活性剤を含む培地中で培養するが、この場合、ＢＭＰ活性剤を、１、または２、または３、または４、または５、または６、または７、または８、または９、または１０日間にわたる培養の後で、培地から除去する。ある特定の実施形態では、ＢＭＰ活性剤を、培養の３日後に、培地から除去する。ある特定の実施形態では、ＢＭＰ活性剤は、培養培地中に、約０．５～約２０ｎｇ／ｍＬの間、または約１～約１５ｎｇ／ｍｌの間、または約２～約１０ｎｇ／ｍｌの間、または約３～約５ｎｇ／ｍｌの間の濃度で存在する。ある特定の実施形態では、ＢＭＰ活性剤は、培養培地中に、約５ｎｇ／ｍｌの濃度で存在する。

【０２８０】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載される方法に従って非プラコード細胞を培養することにより、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞の分化を誘導する。ある特定の実施形態では、細胞はまた、検出可能レベルのＴＦＡＰ２Ａも発現させる。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞は、プラコード先駆細胞である。

【０２８１】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載される方法に従って非プラコード細胞を培養することにより、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現させる細胞を誘導する。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現させる細胞

は、三叉神経プラコード細胞である。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現させる細胞は、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞（例えば、プラコード先駆細胞）を、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）および／またはＷｎｔなどの三叉神経プラコード誘導剤と共に培養することにより誘導する。ある特定の実施形態では、ＢＤＮＦおよびＷｎｔは、ヒトＢＤＮＦおよびヒトＷｎｔである。ある特定の実施形態では、三叉神経プラコード誘導剤を、本明細書で記載されるプラコード誘導細胞培養プロトコールの３日目、または４日目、または５日目、または６日目、または７日目、または８日目、または９日目、または１０日目において、培養培地へと添加する。

【０２８２】

ある特定の実施形態では、ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する誘導細胞はまた、検出可能レベルのＧＤ２も発現させる。ある特定の実施形態では、ＳＩＸ１、ＰＡＸ３、およびＧＤ２を発現させる細胞は、三叉神経プラコード細胞である。ある特定の実施形態では、本発明は、検出可能レベルのＧＤ２を発現させる細胞を、検出可能レベルのＧＤ２を発現させない細胞の混合物から単離または分取する方法を提供する。ある特定の実施形態では、前記方法は、ＦＡＣＳによる分取法または当技術分野で公知の、他の任意の細胞分取法を含む。

【０２８３】

ある特定の実施形態では、ＳＩＸ１およびＰＡＸ３を発現する誘導細胞はまた、検出可能レベルのＣＤ５７（ＨＮＫ１）も発現させる。ある特定の実施形態では、ＳＩＸ１、ＰＡＸ３、およびＣＤ５７（ＨＮＫ１）を発現させる細胞は、三叉神経プラコード細胞である。ある特定の実施形態では、本発明は、検出可能レベルのＣＤ５７（ＨＮＫ１）を発現させる細胞を、検出可能レベルのＣＤ５７（ＨＮＫ１）を発現させない細胞の混合物から単離または分取する方法を提供する。ある特定の実施形態では、前記方法は、ＦＡＣＳによる分取法または当技術分野で公知の、他の任意の細胞分取法を含む。

【０２８４】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載される方法に従って非プラコード細胞を培養することにより、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現させる細胞を誘導する。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現させる細胞は、水晶体プラコード細胞である。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ３を発現させる細胞は、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞（例えば、プラコード先駆細胞）を、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、プルモルファミン、γ－セクレターゼ阻害剤、および／またはＦＧＦ阻害剤などの水晶体プラコード誘導剤と共に培養することにより誘導する。ある特定の実施形態では、ＳＨＨは、ヒトＳＨＨである。ある特定の実施形態では、水晶体プラコード誘導剤を、本明細書で記載されるプラコード誘導細胞培養プロトコールの３日目、または４日目、または５日目、または６日目、または７日目、または８日目、または９日目、または１０日目において、培養培地へと添加する。

【０２８５】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載される方法に従って非プラコード細胞を培養することにより、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞を誘導する。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞は、下垂体プラコード細胞である。ある特定の実施形態では、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＩＴＸ１を発現する細胞は、検出可能レベルのＳＩＸ１およびＰＡＸ６を発現する細胞（例えば、プラコード先駆細胞）を、下垂体パターン化因子、例えば、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、プルモルファミン、γ－セクレターゼ阻害剤、ＦＧＦ８、ＦＧＦ１０、ＢＭＰ２、および／または視床下部ＣＭと共に培養することにより誘導する。ある特定の実施形態では、ＳＨＨ、ＦＧＦ８、ＦＧＦ１０、ＢＭＰ２、および視床下部ＣＭは、ヒトＳＨＨ、ＦＧＦ８、ＦＧＦ１０、ＢＭＰ２、および視床下部ＣＭである。ある特定の実施形態では、下垂体パターン化因子を、本明細書で記載されるプラコード誘導培養プ

ロトコールの３日目、または４日目、または５日目、または６日目、または７日目、または８日目、または９日目、または１０日目において、培養培地へと添加する。ある特定の実施形態では、本明細書で記載される条件下で培養された下垂体プラコードは、下垂体ホルモン発現細胞へとさらに分化する。

【０２８６】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書で記載される方法に従って誘導された下垂体プラコード細胞および／または下垂体ホルモン発現細胞を、それを必要とする被験体、例えば、下垂体機能低下症と診断されるか、またはその危険性がある被験体へと移植する方法を提供する。ある特定の実施形態では、細胞を、被験体の脳または下垂体へと移植する。

【０２８７】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書で記載される方法に従って調製される細胞を提供する。

【０２８８】

ある特定の実施形態では、「検出可能」レベルのタンパク質とは、タンパク質が、当技術分野で公知の免疫細胞化学法により検出可能であることを意味する。

【０２８９】

ある特定の実施形態では、「人工多能性幹細胞」とは、例えば、成体細胞、および成体体細胞、または他の任意の分化細胞もしくは成熟細胞など、非多能性細胞から生成された多能性幹細胞を指す。

【０２９０】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載される方法に従って調製され、本明細書で記載される治療目的で、レシピエント被験体へと投与または移植される細胞は、細胞のレシピエントに対して、異種（ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ）、自家、同種、異種（ｘｅｎｏｇｅｎｅｉｃ）、または同系である。

【０２９１】

ＶＩＩＩ．プラコード誘導剤のためのスクリーン

【０２９２】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書で記載される方法に従って培養された非プラコード細胞から誘導される、プラコードおよびプラコード先駆細胞の誘導を増強する化合物についてスクリーニングする方法を提供する。

【０２９３】

ある特定の実施形態では、スクリーニングする方法は、本明細書で記載される方法に従って非プラコード細胞を培養するステップであって、被験化合物を、１日目、または２日目、または３日目、または４日目、または５日目、または６日目、または７日目において、培養培地へと添加するステップを含む。ある特定の実施形態では、被験化合物を、３日目において、培養培地へと添加する。ある特定の実施形態では、スクリーニングする方法は、被験化合物と共に培養された細胞内の、ＳＩＸ１および／またはＰＡＸ６および／またはＴＦＡＰ２Ａなど、プラコード先駆体マーカーの検出可能な発現のレベルを決定するステップと、前記レベルを、被験化合物を伴わない培地中で培養された細胞内の同じマーカーの発現レベルと比較するステップであって、被験化合物と共に培養された細胞内のマーカーの発現レベルの上昇により、被験化合物が、プラコード先駆体の誘導を増強することが指し示されるステップとを含む。

【０２９４】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書で記載されるプラコード先駆体の誘導を増強する化合物を提供する。ある特定の実施形態では、化合物は、ＢＲＬ－５４４４３、またはＢＲＬ－５４４４３マレイン酸塩など、その塩である。

【０２９５】

ある特定の実施形態では、化合物は、パルテノリドである。

【０２９６】

ある特定の実施形態では、化合物は、フェナントロリンである。

【０２９７】

ある特定の実施形態では、本発明は、プラコード先駆細胞の誘導を増強する方法であって、非プラコード細胞を、本明細書で記載される方法に従って培養し、細胞培養培地に、プラコード先駆体の誘導を増強する化合物を、約０．００１～約２０ｍＭの間、または約０．０１～約１５ｍＭの間、または約０．１～約１０ｍＭの間、または約１～約１０ｍＭの間、または約２～５ｍＭの間の濃度で補充する方法を提供する。

【０２９８】

参考文献

【０２９９】

参考文献リスト１

以下の参考文献は、それらの全体において本明細書に組み込まれる。Barberiら(2003). Nat Biotechnol. 10:1200-1207; Bouwmeesterら (1996). Nature 382:595-601; Briscoe, J.,およびEricson, J. (1999). Semin Cell Dev Biol. 3:353-62; Chambersら(2009). Nat Biotechnol 27, 275-280; Charrierら(2002). Development 129:4785-4796; Charronら(2003). Cell 113:11-23; D'Amourら(2005). Nat Biotechnol 23, 1534-1541; Dennisら(2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol 4, P3; Eirakuら(2008). Cell Stem Cell 3, 519-53; Elkabetzら(2008). Genes Dev 22:152-165; Ericsonら (1996). Cell 87, 661-673. ; Fasanoら(2007). Cell Stem Cell 1, 87-99; Fasanoら(2009). Genes Dev 23, 561-574; Glinkaら(1998). Nature 391, 357-362; Haungら(2009). Nat Protoc 4, 44-57; Hunterら(1991). Proc Natl Acad Sci USA 88, 3666-3670; Ivanovaら(2006). Nature 442, 533-538; Jeongら(2003). Development 130, 3891-3902; Jeongら(2005). Development. 133, 7761-7772; Jeongら(2008) Nat Genet 40, 1348-1353; Jessell, (2000). Nat Rev Genet 1, 20-29; Jessellら(1989). Ciba Found Symp 144, 255-276; discussion 276-280, 290-255; Joksimovicら(2009). Nat Neurosci 12, 125-131; Kimura-Yoshidaら(2006). PNAS 104, 5919-59249; Kittappaら(2007). PLoS Biol 5, e325; Liら(2008). Stem Cells 4, 886-89399; Loisら(2002). Science 295, 868-872; Lyuksyutovaら(2003). Science 302, 1903-1904; Matiseら(1998). Development 125, 2759-2770; Mizusekiら(2003). Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5828-5833; Mukhopadhyayら(2001). Dev Cell 3, 423-434; Mullorら(2002).Trends Cell Biol 12, 562-569; Onoら(2007). Development 134, 3213-3225; Perrierら(2004). Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12543-12548; Placzekら(1993). Development 117, 205-218; Placzek, M. (1995). Curr Opin Genet Dev 5, 499-506; Placzekら(2003). Development 130, 4809-4821; Placzekら(2005). Nat Rev Neurosci 6, 230-240; Roelinkら(1994). Cell 76, 761-775; Shenら(2006). Nat Neurosci 9, 743-751; Shirasakiら(1995). Neuron 14, 961-972; SuterらStem Cells, 27(1):49-58 (2009); Veneziaら(2003). PLoS Biol 10, e301; Watanabeら(2005). Nat Neuro 3, 288-296; Weinsteinら(1999). Annu Rev Cell Dev Biol 15, 411-433; Wichterleら(2002). Cell 110, 385-397; ZhangらNature Biotechnology 19, 1129 - 1133 (2001);およびZoltewiczら(1999). Development 126, 5085-5095.

【０３００】

参考文献リスト２

Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud, C., Sahly, I., Leibovici, M.ら(1997). A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. Nature genetics 15, 157-164.

Ahrens, K.,およびSchlosser, G. (2005). Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in Xenopus laevis. Developmental biology 288, 40-59.

Arkell, R., およびBeddington, R. S. (1997). BMP-7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos. Development 124, 1-12.

Bailey, A. P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., およびStreit, A. (2006). Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. Dev Cell 11, 505-517.

Baker, C. V., およびBronner-Fraser, M. (2001). Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. Dev Biol 232, 1-61.

Balmer, C. W., およびLaMantia, A. S. (2005). Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 234, 464-481.

Barnett, E. M., Jacobsen, G., Evans, G., Cassell, M., およびPerlman, S. (1994). Herpes simplex encephalitis in the temporal cortex and limbic system after trigeminal nerve inoculation. J Infect Dis 169, 782-786.

Bernardo, A. S., Faial, T., Gardner, L., Niakan, K. K., Ortmann, D., Senner, C. E., Callery, E. M., Trotter, M. W., Hemberger, M., Smith, J. C.ら(2011). BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. Cell Stem Cell 9, 144-155.

Bhattacharyya, S., およびBronner-Fraser, M. (2004). Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. Curr Opin Genet Dev 14, 520-526.

Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., およびStuder, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol 27, 275-280.

Chambers, S. M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X. J., Niu, L., Bilsland, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P.ら(2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. Nat Biotechnol 30, 715-720.

Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S. J., Johnson, S. L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J. K., Andrews, P. W., Marcotti, W.ら (2012). Restoration of auditory evoked responses by human EScell-derived otic progenitors. Nature 490, 278-282.

Colas, J. F., およびSchoenwolf, G. C. (2003). Localization of cartilage linking protein 1 during primary neurulation in the chick embryo. Brain Res Dev Brain Res 141, 141-148.

Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., およびLempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biology 2003 4:P3 4, P3.

Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., およびStuder, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. Genes Dev 22, 152- 165.

Grigaliunas, A., Bradley, R. M., MacCallum, D. K., およびMistretta, C. M. (2002). Distinctive neurophysiological properties of embryonic trigeminal and geniculate neurons in culture. Journal of Neurophysiology 88, 2058-2074.

Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T., およびRuether, U. (2001). Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. Mech Dev 100, 327-330.

Hunter, C. S., およびRhodes, S. J. (2005). LIM-homeodomain genes in mammalian development andhuman disease. Mol Biol Rep 32, 67-77.

Ishihara, T., Sato, S., Ikeda, K., Yajima, H., およびKawakami, K. (2008). Multiple evolutionarily conservedenhancers control expression of Eya1. Dev Dyn 237, 3142-3156.

Koehler, K. R., Mikosz, A. M., Molosh, A. I., Patel, D., およびHashino, E. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. Nature doi: 10.1038/nature12298.

Kudoh, T., Concha, M. L., Houart, C., Dawid, I. B., およびWilson, S. W. (2004). Combinatorial Fgf andBmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. Development 131, 3581-3592.

Kwon, H. J., Bhat, N., Sweet, E. M., Cornell, R. A., およびRiley, B. B. (2010). Identification of early requirements for preplacodal ectoderm and sensory organ development. PLoS Genet 6, e1001133.

Lafaille, F. G., Pessach, I. M., Zhang, S.-Y., Ciancanelli, M. J., Herman, M., Abhyankar, A., Ying, S.-Y., Keros, S., Goldstein, P. A., Mostoslavsky, G.ら (2012). Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. Nature 491, 769-773.

Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., およびStuder, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 25, 1468-1475.

Leung, A. W., Kent Morest, D., およびLi, J. Y. (2013). Differential BMP signaling controls formation and differentiation of multipotent preplacodal ectoderm progenitors from human embryonic stem cells. Dev Biol 379, 208-220.

Litsiou, A., Hanson, S., およびStreit, A. (2005). A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. Development 132, 4051-4062.

Love, S., およびCoakham, H. B. (2001). Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. Brain 124, 2347-2360.

Mackay, D. R., Hu, M., Li, B., Rhe'aume, C., およびDai, X. (2006). The mouse Ovol2 gene is required for cranial neural tube development. Dev Biol 291, 38-52.

Martin, K., およびGroves, A. K. (2006). Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signaling suggests a two-step model of otic placode induction. Development 133, 877-887.

McCabe, K. L., Manzo, A., Gammill, L. S., およびBronner-Fraser, M. (2004). Discovery of genes implicated in placode formation. Dev Biol 274, 462-477.

McCauley, D. W., およびBronner-Fraser, M. (2002). Conservation of Pax gene expression in ectodermal mplacodes of the lamprey. Gene 287, 12

9-139.
Menendez, L., Yatskievych, T. A., Antin, P. B., およびDalton, S. (2011). Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 19240-19245.
Mengarelli, I., およびBarberi, T. (2013). Derivation of multiple cranial tissues and isolation of lens epithelium-like cells from human embryonic stem cells. Stem Cells Transl Med 2, 94-106.
Metcalfe, W. K., Myers, P. Z., Trevarrow, B., Bass, M. B., およびKimmel, C. B. (1990). Primary neurons that express the L2/HNK-1 carbohydrate during early development in the zebrafish. Development 110, 491-504.
Mica, Y., Lee, G., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., およびStuder, L. (2013). Modeling neural crest induction, melanocyte specification, and disease-related pigmentation defects in hESCs and patient specific iPSCs. Cell Rep 3, 1140-1152.
O'Rahilly, R. M., F. (1987). Developmental stages in human embryos, Vol 637, (Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington).
Ooto, S., Haruta, M., Honda, Y., Kawasaki, H., Sasai, Y., およびTakahashi, M. (2003). Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 2689-2693.
Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A. W., Ricci, A. J., およびHeller, S. (2010). Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. Cell 141, 704-716.
Pieper, M., Ahrens, K., Rink, E., Peter, A., およびSchlosser, G. (2012). Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. Development 139, 1175-1187.
Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., およびBen-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. Nature biotechnology 19, 1134-1140.
Ruf, R. G., Xu, P. X., Silvius, D., Otto, E. A., Beekmann, F., Muerb, U. T., Kumar, S., Neuhaus, T. J., Kemper, M. J., Raymond, R. M., Jr.ら (2004). SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 8090-8095.
Sasaki, H., およびHogan, B. L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. Development 118, 47-59.
Schlosser, G. (2006). Induction and specification of cranial placodes. Dev Biol 294, 303-351. Scully, K. M., and Rosenfeld, M. G. (2002). Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. Science 295, 2231-2235.
Shi, F., Corrales, C. E., Liberman, M. C., およびEdge, A. S. (2007). BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. Eur J Neurosci 26, 3016-3023.
Sjoedal, M., Edlund, T., およびGunhaga, L. (2007). Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes ex vivo. Dev Cell 13, 141-149.

Stark, M. R., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., およびMarcelle, C. (1997). Neural tube-ectoderm interactions are required for trigeminal placode formation. Development 124, 4287-4295.

Suga, H., Kadoshima, T., Minaguchi, M., Ohgushi, M., Soen, M., Nakano, T., Takata, N., Wataya, T., Muguruma, K., Miyoshi, H.ら (2011). Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. Nature 480, 57-62.

Tabar, V. (2011). Making a pituitary gland in a dish. Cell Stem Cell 9, 490-491.

Tremblay, J. J., Lanctot, C., およびDrouin, J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Limhomeodomain gene Lim3/Lhx3. Mol Endocrinol 12, 428-441.

Wilson, P. A., Lagna, G., Suzuki, A., およびHemmati-Brivanlou, A. (1997). Concentration-dependent patterning of the Xenopus ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. Development 124, 3177-3184.

Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P., およびThomson, J. A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. Nat Biotechnol 20, 1261-1264.

Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., およびThomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19, 1129-1133.

Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J., Pankratz, M. T., Xi, J., Li, J., Yang, Y., Lavaute, T. M., Li, X., Ayala, M.ら (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. Cell Stem Cell 7, 90-100.

【０３０１】

参考文献リスト３

Amit, M., およびItskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. Journal of Anatomy 200, 225-232.

Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., およびStuder, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol 27, 275-280.

Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., Smuga-Otto, K., Howden, S. E., Diol, N. R., Propson, N. E.ら (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. Nat Methods 8, 424-429.

Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., およびLempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biology 2003 4:P3 4, P3.

Downey, T. (2006). Analysis of a multifactor microarray study using Partek genomics solution. Methods Enzymol 411, 256-270.

Huang, D. W., Sherman, B. T., およびLempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols 4, 44-57.

O'Rahilly, R. M., F. (1987). Developmental stages in human embryos, Vol 637, (Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington).

【実施例】
【０３０２】
実験
【０３０３】
以下の実施例は、本発明のある特定の実施形態および側面を例示するのに用いられ、その範囲を限定するものとはみなされないものとする。後続する実験の開示では、以下の略号：Ｎ（規定度）；Ｍ（モーラー）；ｍＭ（ミリモーラー）；μＭ（マイクロモーラー）；モル（モル）；ｍｍｏｌ（ミリモル）；μｍｏｌ（マイクロモル）；ｎｍｏｌ（ナノモル）；ｐｍｏｌ（ピコモル）；ｇ（グラム）；ｍｇ（ミリグラム）；μｇ（マイクログラム）；ｎｇ（ナノグラム）；ｐｇ（ピコグラム）；Ｌおよび（リットル）；ｍｌ（ミリリットル）；μｌ（マイクロリットル）；ｃｍ（センチメートル）；ｍｍ（ミリメートル）；μｍ（マイクロメートル）；ｎｍ（ナノメートル）；Ｕ（単位）；分（ｍｉｎ（ｍｉｎｕｔｅ））；秒（ｓおよびｓｅｃ（ｓｅｃｏｎｄ））；度（ｄｅｇ（ｄｅｇｒｅｅ））；ならびに℃（摂氏度（ｄｅｇｒｅｅｓ　Ｃｅｎｔｉｇｒａｄｅ／Ｃｅｌｓｉｕｓ））が適用される。
【０３０４】
以下は、一般的な細胞培養物処方である。
【０３０５】
維持用ｈＥＳＣ培地（１リットル）：
８００ｍＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２、２００ｍＬのＫｎｏｃｋｏｕｔ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、２００ｍＭのＬ－グルタミン酸５ｍＬ、５ｍＬのペニシリン／ストレプトマイシン、１０ｍＭのＭＥＭ最小非必須アミノ酸溶液１０ｍＬ、１０００μＬのβ－メルカプトエタノール、ｂＦＧＦ（最終濃度を４ｎｇ／ｍＬとする）
【０３０６】
ｈＥＳＣ分化用のＫＳＲ培地（１リットル）：
８２０ｍＬのＫｎｏｃｋ　ｏｕｔ　ＤＭＥＭ、１５０ｍＬのＫｎｏｃｋ　ｏｕｔ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、２００ｍＭのＬ－グルタミン酸１０ｍＬ、１０ｍＬのペニシリン／ストレプトマイシン、１０ｍＭのＭＥＭ　１０ｍＬ、１ｍＬのβ－メルカプトエタノール
【０３０７】
ｈＥＳＣ分化用のＮ２培地（１リットル）：
ＤＭＥＭ／Ｆ１２粉末を伴う、９８５ｍｌの蒸留H_2O、１．５５ｇのグルコース、２．００ｇの$NaHCO_3$、２５ｍｇのインスリン、０．１ｇのアポトランスフェリン、３０ｎＭの亜セレン酸ナトリウム、１００μＭのプトレシン、２０ｎＭのプロゲステロン
ＰＭＥＦを調製するための、１０％のＦＢＳを伴うＤＭＥＭ（１リットル）：
８８５ｍＬのＤＭＥＭ、１００ｍＬのＦＢＳ、１０ｍＬのペニシリン／ストレプトマイシン、５ｍＬのＬ－グルタミン
【０３０８】
ＭＳ－５　フィーダーを調製するための、１０％のＦＢＳを伴うアルファＭＥＭ（１リットル）：
８９０ｍＬのアルファＭＥＭ、１００ｍＬのＦＢＳ、１０ｍＬのペニシリン／ストレプトマイシン
【０３０９】
ゼラチン溶液（５００ｍｌ）：
０．５ｇのゼラチンを、加熱した（５０～６０℃）Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水５００ｍｌ中で溶存させる。室温まで冷却する。
【０３１０】
Ｎｏｇｇｉｎは、Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍから、型番７１９－ＮＧ：Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｍｏｕｓｅ　Ｎｏｇｇｉｎ　Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａとして購入した。
【０３１１】

（実施例Ｉ）

【０３１２】

骨形成タンパク質（ＢＭＰ）レベルは、プラコード運命の識別を決定する：

感覚プラコードとは、早期神経外胚葉組織と非神経外胚葉組織との界面において形成される発生構造である。Ｎ－ＳＢ培養系が、プラコード細胞の派生に適するのかどうかに取り組むため、マーカーのセットを確立して、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）から派生した培養物中のプラコード識別を同定した。他のモデル生物における研究によれば、ｈＥＳＣ分化時におけるヒトプラコード先駆体を同定する多数の候補マーカーは、転写因子のｓｉｘファミリー、Ｅｙａファミリー、およびＤｌｘファミリーのメンバーを含むがこれらに限定されない。しかし、モデル生物における前プラコード領域およびプラコード細胞をマーキングするＳｉｘ１はまた、骨格筋先駆体内でも発現する。免疫細胞化学解析により、Ｎ－ＳＢによる分化の１１日目において、６％±４％のＳｉｘ１＋細胞が明らかにされた。Ｓｉｘ１＋細胞内の骨格筋マーカーの発現の非存在により、プラコード先駆細胞の識別が示唆された。

【０３１３】

多数の発生研究により、ｉｎ　ｖｉｖｏの早期外胚葉のパターン化における、ＢＭＰシグナル伝達の役割が裏付けられている。１つのモデルは、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける外胚葉内のＢＭＰ活性の勾配により、異なる細胞運命が割り当てられ、高レベルのシグナル伝達により、表皮が促進され、中程度のレベルにより、プラコードが誘導され、中間レベルにより、ＮＣが特定され、神経板の形成には、ＢＭＰ活性の完全な非存在が要求されることを示唆する（参照により本明細書に組み込まれる、Streitら、Dev　Biol、２００４年、２７６巻（１号）：１～１５頁）。外因性ＢＭＰの添加により、Ｓｉｘ１＋細胞の派生が増強されるのかどうかについて調べるために、ＳＢ４３１５４２（１μＭ）で処理されたｈＥＳＣを、多様な濃度のＢＭＰ４へと曝露した。しかし、早期ＢＭＰ４の添加は、細胞の劇的な形態変化およびｃｄｘ２誘導を引き起こしたことから、栄養外胚葉運命への分化が示唆される。ＳＢ４３１５４２の非存在により、ＢＭＰへの早期曝露は、ｈＥＳＣ分化時における、栄養外胚葉運命を駆動しうることが裏付けられた（参照により本明細書に組み込まれる、Chambersら、Nat　Biotechnol、２００９年、２７巻（３号）：２７５～８０頁；Xuら、Nat　Biotechnol、２００２年、２０巻（１２号）：１２６１～４頁）。

【０３１４】

Ｎ－ＳＢによる分化時における、ＢＭＰ阻害剤であるｎｏｇｇｉｎの中断は、内因性ＢＭＰシグナル伝達の抑制解除により、プラコード運命の出現を増強しうる。この目的のために、ＮＳＢプロトコールの異なる時点において、ｎｏｇｇｉｎを除去することにより、経時研究を実施する（図１１Ａ）一方で、分化の１１日目において、ｑＲＴ－ＰＣＲ解析により、プラコードマーカー、栄養外胚葉マーカー、神経外胚葉マーカーの誘導をモニタリングした（図１１Ｂ）。分化の２または３日目におけるｎｏｇｇｉｎの中断は、Ｓｉｘ１の効率的な誘導をもたらしたが、分化の１日目におけるｎｏｇｇｉｎ中断は、Ｓｉｘ１発現の非存在下で、Ｅｙａ１の誘導をもたらした。１日目のｎｏｇｇｉｎ中断下に置かれた培養物中の、形態変化の誘導およびＣｄｘ２の発現により、栄養外胚葉運命への分化が指し示され、Ｅｙａ１は、プラコード細胞内に加えて、栄養外胚葉先駆体内でも発現することが示唆された。免疫細胞化学解析により、分化の３日目におけるｎｏｇｇｉｎ中断により、主に、標準Ｎ－ＳＢ条件下で得られるＰａｘ６＋神経外胚葉細胞から、７１％のＳｉｘ１＋推定プラコード先駆細胞からなる集団への切替えが誘導されることが裏付けられた（図１１Ｃ、Ｄ）。共標識化研究により、骨格筋運命のマーカーの非存在下で、Ｅｙａ１など、Ｓｉｘ１＋細胞内の他のプラコードマーカーの共発現が裏付けられた。

【０３１５】

マイクロアレイ解析は、新規のヒトプラコード前駆体による遺伝子発現を明らかにする：

プラコード先駆細胞の識別を有するプラコード誘導についてのバイアスのかからない尺度を得るために、本発明者らは、Ｉｌｌｕｍｉｎａビーズアレイプラットフォームを使用して、グローバル遺伝子発現についての経時的解析を実施した。分化の５つの時点（１、

３、５、７、および１１日目）において、対照Ｎ－ＳＢ培養物（前方神経板細胞をもたらす；１～１１日目にわたるｎｏｇｇｉｎ／ＳＢ４３１５４２処理）中、およびプラコード運命を促進する条件下（前方プラコード細胞；１１日間にわたるＳＢ４３１５４２処理；１～３日目におけるＮｏｇｇｉｎ処理）で、ＲＮＡを回収した。マイクロアレイ解析の前に、各試料の品質を、プラコードマーカーのパネル（Ｓｉｘ１、Ｄｌｘ３、Ｅｙａ１）の発現、および他の系列マーカー（Ｆｏｘａ２（内胚葉）、Ｓｏｘ１７（内胚葉）、ＭｙｏＤ（骨格筋）、ｃｄｘ２（栄養膜）、およびＴ（ブラキウリ）（中胚葉））の非存在について検証した。グローバル遺伝子発現研究は、３つの独立の試料中で、各時点および各培養条件について実行した。データは、ｌｏｇ２比へと転換して、分化時におけるプラコード内の遺伝子発現レベルを、Ｎ－ＳＢプロトコールと対比して比較した（図１２Ａ～Ｄ）。

【０３１６】

経時データを、ＤＡＶＩＤ（参照により本明細書に組み込まれる、http://david.abcc.ncifcrf.gov/；Dennisら、Genome Biology、２００３年、４巻（５号）：３頁）を使用する遺伝子オントロジー（ＧＯ）濃縮解析であって、プラコードの転写プロファイルについてのバイアスのかからない評価としてのＧＯ濃縮解析にかけた。分化の５日目および７日目のプラコード条件において、ＮＳＢ対照培養物と対比して高度に濃縮された転写物の中には、感覚器官の発生、ＢＭＰ経路およびＷｎｔ経路、内耳の発生および神経のパターン化と関連する遺伝子が見られた。感覚器官の発生および神経のパターン化因子の濃縮により、改変Ｎ－ＳＢプロトコールを使用して派生された培養物の、前方プラコード識別がさらに確認される。改変Ｎ－ＳＢ（分化の２日後におけるｎｏｇｇｉｎ中断）ではまた、神経板マーカーおよびニューロンマーカーも、ＮＳＢ（すなわち、少なくとも２つのＳＭＡＤシグナル伝達化合物またはＢＭＰシグナル伝達化合物による細胞の処理）プロトコールと対比して下方調節された。

【０３１７】

プラコード特定時において示差的に発現する特異的遺伝子への洞察を得るため、本発明者らは、各分化段階についての対応のある比較を実施した。分化の５日目および７日目において顕著に調節された（１日目と比較して）遺伝子の大部分が、ＮＳＢと改変Ｎ－ＳＢプロトコールとで共有されたのに対し、転写物のサブセットは、示差的に調節された。特に、改変Ｎ－ＳＢプロトコールでは、感覚ニューロンの発生についてごく周知のマーカーであるＩｓｌｅｔ－１の増大が観察された。Ｉｓｌ１は、また、運動ニューロン、心臓前駆体、および膵島細胞など、他の系列においても発現する。ｈＥＳＣ分化時における早期の発現開始は、Ｉｓｌｅｔ－１が、ゼブラフィッシュの発生時におけるその発現であって、前方前プラコード領域における馬蹄形をマーキングする発現と同様に、早期プラコード先駆細胞もマーキングすることを示唆する。したがって、Ｉｓｌｅｔ－１は、ヒト多能性幹細胞の分化時に発現する最初のプラコードマーカーのうちの１つである。改変Ｎ－ＳＢプロトコールは、５日目、７日目、９日目、および１１日目において、Ｉｓｌｅｔ－１の、ＮＳＢ条件と比較した場合の高度に濃縮された発現を誘導した。マイクロアレイデータでは、プラコード遺伝子である、ＧＡＴＡ３、Ｄｌｘ５、ＴＦＡＰ２ａ、およびＴＦＡＰ２ｃが濃縮される。また、Ｗｎｔ経路およびＢＭＰ経路の構成要素の顕著な変化も観察された。例えば、早くも５日目には、Ｗｎｔ経路阻害剤であるＤＫＫ－１の顕著な増大が見られ、この増大は、プロトコールの経過にわたり持続した。Ｎｏｇｇｉｎの除去に応答して、複数のＷｎｔ受容体の顕著な下方調節が観察された。ＢＭＰシグナル伝達に応答して活性化されるｇｒｅｍｌｉｎ－１およびＢＡＭＢＩなどのＢＭＰアンタゴニストの誘導により、Ｎｏｇｇｉｎ中断は、ｈＥＳＣ分化時における、内因性ＢＭＰシグナル伝達の変化であって、下流における遺伝子の対応する増大を伴う変化を引き起こすことが確認される。

【０３１８】

さらに、前方プラコード特定時において示差的に発現する、多数のさらなる遺伝子であって、Ｓｈｉｓａ２、Ｏｖｏｌ２、およびＦｏｘｃ１を含む遺伝子も同定した。これらの

遺伝子およびさらなる遺伝子についての示差的発現は、ｑＲＴ－ＰＣＲで検証した。Ｏｖｏｌ２とは、多様なモデル生物における表面外胚葉およびプラコード運命についての公知のマーカーである。マウスでは、Ｏｖｏｌ２のノックアウトは、致死性であり、Ｏｖｏｌ２－／－マウス胚は、眼杯および耳胞など、プラコードから派生した組織を発生させない。

【０３１９】

遺伝子クラスター解析により、遺伝子の発現が最高度であるとき：最大発現時（ＴＯＭ）および遺伝子の発現が最低度であるとき：最小発現時（ＴＩＭ）が示された。ＧＯオントロジータームをこの解析へとマッピングしたところ、プラコード先駆細胞の特定時における正確な発生域を同定することが可能であった。これらのデータにより、ｈＥＳＣから派生したプラコード組織の識別も加えて確認され、プラコードに関与するマーカーおよび経路も、前方神経板（ＡＮ）の特定と対比して明らかにされた。

【０３２０】

示差的に発現する転写物のクラスター化（図１２Ｅ）により、全ての多連試料の正確なマッチングが明らかにされた。これらのデータはまた、処理とは独立の、試料の緊密な時間的マッチングを明らかにする一方で、神経外胚葉をプラコード先駆体から区別する遺伝子（図１２Ｅ内の枠囲いされた領域）のサブセットもピンポイントで指し示した。主成分分析により、試料の、後の分化段階における、神経外胚葉とプラコード先駆細胞との分岐の増大との高度な時間的相関が確認された（図１２Ｆ）。

【０３２１】

プラコード前駆体は、感覚ニューロンをもたらすと考えられている。Ｓｉｘ１＋プラコード先駆体の単離に続く、無血清条件下における培養により、Ｓｉｘ１発現を保持するニューロンへの効率的な分化が明らかにされた（図１３Ａ～Ｃ）。これらの細胞の感覚ニューロン識別は、分化の２０日目において測定されるＢｒｎ３Ａ、Ｉｓｌ－１の発現により確認された（図１３Ｄ、Ｅ）。長期にわたる分化研究（４０日目）は、末梢ニューロンマーカーであるペリフェリンの強力な発現（図１３Ｆ）および感覚ニューロン子孫のｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける成熟に適合的なＴｕｊ１発現の低減を伴う細胞を結果としてもたらした。プラコード先駆体の識別から、成熟感覚ニューロン運命への、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける発生の進行については、図１３Ｇに概略的に例示する。

【０３２２】

結果は、Ｎ－ＳＢプロトコールの単純な改変により、神経外胚葉から、プラコード先駆体への分化の切替えが誘導されることを示した。ある時間をおいてのｎｏｇｇｉｎ中断を使用して、本発明者らは、Ｓｉｘ１を発現する全細胞のうちの７１％の収率を得た。純粋なプラコード先駆体の単離は、プラコード運命をプロスペクティブに同定するマーカーを要求する。プロスペクティブマーカーの同定もまた、プラコード細胞を、ＣＮＳ先駆体、神経堤系列、および非神経外胚葉など、他の代替的な系列から、信頼できる形で区別するのに有用である。特に関心の対象となるのは、神経堤から派生したニューロン集団を、プラコードから派生したニューロン集団から信頼できる形で分け隔てるための、プラコードから派生した先駆体の、神経堤から派生した先駆体からの区別である。かつて、早期の神経分化時における、ｐ７５＋／ＨＮＫ１＋細胞の単離により、神経堤識別へと運命付けられた細胞集団がマーキングされることが裏付けられた（参照により本明細書に組み込まれる、Leeら、Nature Biotechnology、２５巻（１２号）：１４６８～７５頁（２００７年））。本発明では、プラコード系列内のこれらのマーカーの関係について調べた。ＮＧＦＲは、改変Ｎ－ＳＢプロトコールにおけるプラコード培養物を、前部神経外胚葉運命と既に関連しているマーカーであるＦｏｒｓｅ１（参照により本明細書に組み込まれる、Elkabetz, G&D、２００８年）を発現させる先駆体の集団と分け隔てて、効率的にマーキングする（図１４Ａ）ことが観察された。ｐ７５発現およびヒトナチュラルキラー１（ＨＮＫ１）エピトープ（ＣＤ５７としてもまた公知の）発現についての二重分取により、ｑＲＴ－ＰＣＲ解析に基づき、ＨＮＫ１について陰性である、ｐ７５単一陽性細胞は、Ｓｉｘ１発現時に劇的に濃縮されることが明らかにされた（図１４Ｂ、Ｃ）。細胞のプラコード識

別は、プラコード誘導改変Ｎ－ＳＢプロトコールにおける、ｐ７５＋／ＨＮＫ１－細胞数の、古典的な神経外胚葉誘導Ｎ－ＳＢプロトコールと比較した増大によりさらに裏付けられる（図１４Ｄ）。

【０３２３】

（実施例ＩＩ）

ｉＰＳ細胞の生成：

【０３２４】

ｈＯｃｔ４、ｈＳｏｘ２、ｈＫｌｆ４、およびｃ－ｍｙｃをコードするｃＤＮＡ（Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから購入された）を、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターにより駆動される自己不活化レンチウイルスベクターへとサブクローニングした。レンチウイルスベクター上清は、プラスミドＤＮＡをコードするベクター、ｐＣＭＶΔＲ８．９１、およびｐＵＣＭＤ．Ｇの、２９３Ｔ細胞への三重共トランスフェクションにより生成した。ＡＴＣＣ（ＣＣＬ－１７１）から購入されたヒト胎児肺線維芽細胞（ＭＲＣ－５）を、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を補充した最小必須イーグル培地中、１ｃｍ^{2}当たりの細胞１．５×１０^{4}個で播種した。翌日、線維芽細胞に、４つのレンチウイルスベクターの等量の上清を、４ｕｇ／ｍｌのポリブレンの存在下で、約１６時間にわたり形質導入した。形質導入の６日後において、線維芽細胞をトリプシン化により採取し、マイトマイシンＣで処理されたマウス胎仔線維芽細胞（ＣＦ－１）によるフィーダー層上、６０ｍｍのディッシュ１枚当たりの細胞２×１０^{4}個でプレーティングした。翌日、培地を、ｈＥＳＣ培地へと切り替えた。ｈｉＰＳ細胞系は、免疫蛍光およびフローサイトメトリーにより、Ｔｒａ－１－８１、Ｔｒａ－１－６０、ＳＳＥＡ－４、およびＮａｎｏｇについて陽性であることが確認された。いずれのｈｉＰＳクローン内でも、４つのベクターによりコードされるトランス遺伝子がサイレンシングされていることが見出された。

【０３２５】

材料および方法：

【０３２６】

細胞および培養条件（二重ＳＭＡＤおよびフロアプレート）。ｈＥＳＣ（ＷＡ－０９；第３５～４５代の継代培養物）を、１ｃｍ2当たりの細胞１２～１５，０００個でプレーティングされたマウス胎仔線維芽細胞（ＭＥＦ、Ｇｌｏｂａｌ　Ｓｔｅｍ）上で培養した。ＤＭＥＭ／Ｆ１２、２０％のｋｎｏｃｋｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＧＩＢＣＯ）、０．１ｍＭのｂ－メルカプトエタノール、６ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ－２による培地は、毎日交換した。細胞は、ｈＥＳＣ培地中に６Ｕ／ｍＬのディスパーゼを使用して継代培養し、洗浄し、１：５～１：１０の希釈率で再プレーティングした。

【０３２７】

神経誘導（二重ＳＭＡＤ）

【０３２８】

ｈＥＳＣ培養物は、アキュターゼを使用して、２０分間にわたり脱凝集させ、ｈＥＳＣ培地を使用して洗浄し、ゼラチン上、ＭＥＦを除去するＲＯＣＫ阻害剤の存在下で、３７℃で１時間にわたり前プレーティングした。非接着性ｈＥＳＣを洗浄し、１０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ－２およびＲＯＣＫ阻害剤をスパイクされた、ＭＥＦで調整されたｈＥＳＣ培地（ＣＭ）中、ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ）でコーティングされたディッシュ上、１ｃｍ^{2}当たりの細胞１０，０００～２５，０００個の密度で、ｍａｔｒｉｇｅｌ上にプレーティングした。理想的な細胞密度は、１ｃｍ^{2}当たりの細胞１８，０００個であることが見出された。ＲＯＣＫ阻害剤を中断し、ｈＥＳＣを、ＣＭ中で３日間にわたり、またはそれらがほぼコンフルエントとなるまで増殖させた。初期分化培地条件は、１０ｎＭのＴＧＦベータ阻害剤（ＳＢ４３１５４２、Ｔｏｃｒｉｓ）および５００ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎ（Ｒ＆Ｄ）を伴うｋｎｏｃｋｏｕｔ　ｓｅｒｕｍ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＫＳＲ）培地を含んだ。分化の５日目に、ＴＧＦ－ｂ阻害剤を中断し、量を増大させるＮ２培地（２５％、５０％、７５％）を、ＫＳＲ培地へと、５００ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎを維持しな

がら、隔日で添加した。ＭＳ５の誘導のためには、既に報告されている、確立された方法を使用した[18]。

【０３２９】

定量的リアルタイム（二重ＳＭＡＤ）

【０３３０】

全ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して抽出した。各試料につき１ｕｇずつの全ＲＮＡを、ＤＮＡの夾雑について処理し、Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ ＲＴキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して逆転写した。増幅された材料は、Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ ＳＹＢＲ ｇｒｅｅｎプローブおよびＰＣＲキット（Ｑｉａｇｅｎ）を、Ｍａｓｔｅｒ ｃｙｃｌｅｒ ＲｅａｌＰｌｅｘ２（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で使用して検出した。結果は、ＨＰＲＴ対照に照らして標準化し、各データ点において２～３例ずつの独立の生体試料に対する技法上の４～６回反復から得た。

【０３３１】

ニューロンのパターン化および分化（二重ＳＭＡＤ）

【０３３２】

ドーパミン作動性パターン化は、既に報告されている[18]通り、Ｎ２培地中でＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ、およびＦＧＦ８を使用して誘発し、成熟は、ＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ＧＤＮＦ、ＴＧＦｂ－１、およびサイクリックＡＭＰの存在下で施した。運動ニューロンのパターン化は、既に報告されている[16]通り、Ｎ２培地中でＢＤＮＦ、アスコルビン酸、ソニックヘッジホッグ、およびレチノイン酸を使用して実施した。

【０３３３】

顕微鏡法、抗体、およびフローサイトメトリー（二重ＳＭＡＤ）

【０３３４】

組織は、４％のパラホルムアルデヒドを使用して、２０分間にわたり固定し、ＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中に０．５％のＴｒｉｔｏｎ Ｘを使用して透過処理し、ＰＢＳ中に１％のＢＳＡを使用してブロッキングした。顕微鏡法のために使用される初代抗体は、ＰＡＸ６（Ｃｏｖａｎｃｅ）、Ｏｃｔ４（Ｂｉｏｖｉｓｉｏｎ）、ＡＰ２（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）、ＧＢＸ２（Ｓｉｇｍａ）、ＨＮＫ１（Ｓｉｇｍａ）、ＨＯＸＢ４（Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ Ｓｔｕｄｉｅｓ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ Ｂａｎｋ（ＤＳＨＢ））、Ｎｅｓｔｉｎ（Ｒ＆Ｄ）、ＮＫＸ６．１（ＤＳＨＢ）、ＯＴＸ２（恵与）、ｐ７５（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｔａｒｇｅｔ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＰＡＸ７（ＤＳＨＢ）、ＰＬＺＦ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、ＴＵＪ１（Ｃｏｖａｎｃｅ）、ＺＯ１（Ｚｙｍｅｄ）、ＢＦ１（ＦＯＸＧ１、Esseng Laiによる恵与）、ＴＨ（Ｓｉｇｍａ）、ＨＢ９（ＤＳＨＢ）、ＩＳＬ１（ＤＳＨＢ）を含んだ。ＣＤ１０５－ＰＥ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）は、ＦＡＣＳｃａｎ（ＢＤ）上のフローサイトメトリーのために、ＭＳ５間質細胞を排除するために使用した。

【０３３５】

フロアプレート：神経誘導

【０３３６】

ＭＳ５の誘導のためには、既に報告されている、確立された方法を使用した（Perrierら、２００４年）。フィーダー非含有の神経誘導は、既に記載されている（Chambersら、２００９年）通りに実行した。略述すると、ｈＥＳＣ培養物は、アキュターゼを使用して、２０分間にわたり脱凝集させ、ｈＥＳＣ培地を使用して洗浄し、ゼラチン上、ＭＥＦを除去するＲＯＣＫ阻害剤の存在下で、３７℃で１時間にわたり前プレーティングした。非接着性ｈＥＳＣを洗浄し、１０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ－２およびＲＯＣＫ阻害剤をスパイクされた、ＭＥＦで調整されたｈＥＳＣ培地（ＣＭ）中、ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ）でコーティングされたディッシュ上、１ｃｍ２当たりの細胞２０，０００個の密度で、ｍａｔｒｉｇｅｌ上にプレーティングした。ＲＯＣＫ阻害剤を中断し、ｈＥＳＣを、ＣＭ中で３日間にわたり、またはそれらがほぼコンフルエントとなるまで増殖させた。初期分化培地条

件は、１０ｎＭのＴＧＦ－ｂ阻害剤（ＳＢ４３１５４２、Ｔｏｃｒｉｓ）および５００ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎ（Ｒ＆Ｄ）を伴うｋｎｏｃｋｏｕｔ ｓｅｒｕｍ ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＫＳＲ）培地を含んだ。分化の５日目に、量を増大させるＮ２培地（２５％、５０％、７５％）を、ＫＳＲ培地へと、５００ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎおよびＴＧＦ－ｂ阻害剤を維持しながら、隔日で添加した。ＦＰ誘導のために、Ｓｏｎｉｃ Ｃ２５ＩＩを、２００ｎｇ／ｍｌで添加した。一部の実験では、ＤＫＫ－１（Ｒ＆Ｄ；１００ｎｇ／ｍｌ）、ＦＧＦ８（Ｒ＆Ｄ；５０ｎｇ／ｍｌ）、Ｗｎｔ－１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ；５０ｎｇ／ｍｌ）、およびレチノイン酸（Ｒ＆Ｄ；１ｕＭ）を添加した。

【０３３７】

定量的リアルタイムＰＣＲ

【０３３８】

全ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して抽出した。各試料につき１ｕｇずつの全ＲＮＡを、ＤＮＡの夾雑について処理し、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して逆転写した。増幅された材料は、ＴａｑｍａｎプローブおよびＰＣＲミックス（ＡＢＩ）を、Ｍａｓｔｅｒｃｙｃｌｅｒ ＲｅａｌＰｌｅｘ２（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で使用して検出した。全ての結果は、ＨＰＲＴ対照に照らして標準化し、各データ点において３例ずつの独立の生体試料に対する技法上の３回反復から得た。

【０３３９】

マイクロアレイ解析

【０３４０】

全ＲＮＡは、Ｔｒｉｚｏｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、分化の２、３、５、７、および１１日目において、対照（ＮＳＢ）およびＦＰ（ＮＳＢ＋Ｓｈｈ Ｃ２５ＩＩ）の両方から単離した。時点１つ当たり生物学的３連を使用した。全ての試料は、ＭＳＫＣＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｃｏｒｅ Ｆａｃｉｌｉｔｙで加工し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｈｕｍａｎ ６オリゴヌクレオチドアレイ上でハイブリダイズさせた。標準化およびモデルベースの発現測定は、オープンソースのＢｉｏｃｏｎｄｕｃｔｏｒ ｐｒｏｊｅｃｔ（ｗｗｗ.bioconductor.org）を介して入手可能な、Ｉｌｌｕｍｉｎａ解析パッケージ（ＬＵＭＩ）を、統計学のプログラミング言語であるＲ（http://cran.r-project.org/）内で使用して実施した。ＮＳＢと、ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃとの対応のある比較は、Ｂｉｏｃｏｎｄｕｃｔｏｒを介して入手可能な、Ｌｉｎｅａｒ Ｍｏｄｅｌｓ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｄａｔａパッケージ（ＬＩＭＭＡ）を使用して実施した。補正ｐ値＜０．０５であり、倍数変化が２を超えることが見出された遺伝子は、有意であると考えた。発現の差異は、倍数変化のｌｏｇ２として報告する。遺伝子オントロジー濃縮は、遺伝子リストを、Ｄａｔａｂａｓｅ ｆｏｒ Ａｎｎｏｔａｔｉｏｎ, Ｖｉｓｕａｌｉｚａｔｉｏｎ, ａｎｄ Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＤＡＶＩＤ；http://www.david.niaid.nih.gov）（Huangら、２００９年；およびDennisら、２００３年）へと入力することにより決定した。最大発現時および最小発現時は、既に報告されている（Veneziaら、２００４年）通りに計算した。

【０３４１】

略述すると、回帰直線を、ＮＳＢ＋Ｓｏｎｉｃ Ｃ２５ＩＩ条件およびＮＳＢ条件の両方に当てはめた。これらの傾向線から、どの時点でその最大発現および最小発現が生じたのかに基づき、遺伝子を類別した。

【０３４２】

顕微鏡法、抗体、およびフローサイトメトリー

【０３４３】

組織は、４％のパラホルムアルデヒドおよびピクリン酸を使用して、１５分間にわたり固定し、ＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中に０．３％のＴｒｉｔｏｎ Ｘを使用して透過処理し、１０％のロバ血清を使用してブロッキングした。顕微鏡法のために使用される抗体は、ＰＡＸ６（Ｃｏｖａｎｃｅ）、ＴＵＪ１（Ｃｏｖａｎｃｅ）、ＺＯ１（Ｚｙｍｅｄ）、Ｂ

Ｆ１（ＦＯＸＧ１、E.Laiによる恵与）、ＴＨ（Ｐｅｌｆｒｅｅｚ）、ＮＫＸ６．１（ＤＳＨＢ）およびＦＯＸＡ２（ＳａｎｔａＣｒｕｚ）を含んだ。

【０３４４】

ベクターのデザインおよびレンチウイルスによる産生

【０３４５】

第三世代のレンチウイルスベクター（Loisら、２００２年）は、ＢＦ１　ＯＲＦをＵｂ－Ｃプロモーター（Fasanoら、２００９年）から発現させ、ＢＦ１　ｓｈＲＮＡを、記載されている通り（Fasanoら、２００７年；Ivanovaら、２００６年）に、Ｈ１プロモーターから発現させるように改変した。Ｆｏｘｇ１　ｓｈＲＮＡ構築物は、既に記載されている通り（Shenら、２００６年）に使用した。ｓｈＲＮＡを発現させるレンチウイルスプラスミドを、プラスミドであるｐＶＳＶ－ＧおよびｐＣＭＶｄ８．９と共に、２９３ＦＴ細胞へと共トランスフェクトした。ウイルス含有培地を回収し、濾過し、超遠心分離により濃縮した。ウイルス力価を、ＮＩＨ　３Ｔ３細胞に対する希釈系列により測定した後で、７２時間後のフローサイトメトリー解析にかけた。

【０３４６】

ＢＦ１　ｓｈＲＮＡの産生およびこれを過剰発現させるヒトＥＳ細胞系

【０３４７】

ｈＥＳＣ（ＷＡ－０９；継代３５代）を解離させ、Ｍａｔｒｉｇｅｌ上に、ＲＯＣＫ阻害剤と共に、単一細胞としてプレーティングした。プレーティングの２４時間後、ＥＳ細胞に、対照（空ベクター）、ＢＦ１　ｓｈＲＮＡ、またはＢＦ－１　ＯＲＦを含有するベクターを形質導入した。１週間後、ＧＦＰを発現させるコロニーを手作業で採取し、ＭＥＦ上にプレーティングした。次いで、細胞を増殖させ、マイコプラズマおよび正常核型について調べた。

【０３４８】

初代外植片の摘出

【０３４９】

Ｅ８．５のＴＰ　Ｔａｃｏｎｉｃ　Ｓｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒ雌マウスを解剖し、胚を取り出した。神経外胚葉組織を摘出し、ＦＰ細胞上にプレーティングされる塊として放置した。神経突起成長アッセイのために、Ｅ１２．５のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの小脳板組織を摘出し、ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞上または対照の神経外胚葉細胞上（ＮＳＢプロトコール）にプレーティングした。共培養の３日目において、ラット外植片組織からの伸長について解析した。

【０３５０】

馴化培地およびＥＬＩＳＡ

【０３５１】

ｈＥＳＣを神経細胞またはＦＰ細胞へと分化させ、６日目にＳｈｈを除去し、培養の９日目および１１日目の両方において培地を採取した。製造元のプロトコールに従ってヒトＮｅｔｒｉｎ－１　ＥＬＩＳＡキット（Ａｘｘｏｒａ）を使用して、Ｎｅｔｒｉｎ－１タンパク質レベルを検出した。共培養実験のために、培地を濾過し、培養物へと、希釈せずに、または未使用の培地中に１：２希釈率で添加した。

【０３５２】

統計学的解析

【０３５３】

示される結果は、平均＋ｓ．ｅ．ｍ．である。アステリスクおよびポンド記号により、ｔ検定、一元ＡＮＯＶＡ、または、該当する場合は、多重比較のためのボンフェローニの正確検定を伴う二元ＡＮＯＶＡ（ｐ値：０．０５）により、対照群と有意に異なった実験群を同定する。

【０３５４】

（実施例ＩＩＩ）

早期における高用量ＳＨＨへの曝露は、ＦＯＸＡ２を誘導し、ＢＦ１を抑制する

【０３５５】
ロゼット段階におけるｈＥＳＣから派生した神経細胞を、ＣＮＳおよびＰＮＳ子孫の両方へと分化させ、Ａ／Ｐ軸およびＤ／Ｖ軸に沿って（Elkabetzら、２００８年）、複数の細胞運命へとパターン化させた。これらの結果により、ロゼット段階の細胞は、高度に可塑性であり、ＳＨＨを含むパターン化キューに対して応答性であることが裏付けられた。マウス発生時における、前駆細胞の、ＦＰ組織およびＦＰ細胞への特定は、早期神経系列内のＳＨＨシグナル伝達に依存すると考えられた。本発明者らは、ロゼット段階の神経細胞が、ＳＨＨに応答したＦＰ特定を経る程度にコンピテントであるのかどうかについて調べた。マウス発生時においてＦＰを誘導するには、高濃度のＳＨＨが必要とされた（Roelinkら、１９９４年；Ericsonら、１９９６年）。組換えＮ末端ＳＨＨは、完全なＳＨＨ作用に要求される翻訳後修飾の欠如のために、活性範囲が限定されている。近年、ＳＨＨが２つのイソロイシンへとテザリングされ、哺乳動物のＳＨＨタンパク質の効力をより緊密に模倣する、組換えＳＨＨの改変形（Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）が利用可能となった。大半の機能アッセイでは、Ｃ２５ＩＩは、非改変のＮ末端ＳＨＨより約１０倍強力であった。

【０３５６】
しかし、本発明による発生時において、従来型ＳＨＨおよびＳＨＨ－Ｃ２５ＩＩの両方を伴って、確立されたロゼット段階の神経細胞上でなされた用量反応研究は、被験条件のいずれの下でも、ＦＯＸＡ２（ＦＰマーカー）など、ＦＰマーカーを発現させる細胞をもたらさなかった。細胞の大部分は、既に記載された通り（Elkabetzら、２００８年）、ロゼット細胞アーキテクチャーおよびＡＮマーカーであるＢＦ１についての染色を保持した（図１Ａ）。これらの結果は、驚きであった、すなわち、高ＳＨＨへの曝露は、確立されたロゼット段階細胞を、ＦＰへと転換するのに十分ではなかった。

【０３５７】
マウスにおけるＦＰ特定は、神経誘導時または神経誘導前の早期の発生段階で生じるという仮説に基づき、本発明者らは、古典的な間質フィーダー介在型神経誘導プロトコール（Elkabetzら、２００８年）を使用して、ロゼット特定時である９日目におけるＳＨＨ誘導研究を繰り返した。このパラダイム下において、本発明者らは、ＳＨＨ－Ｃ２５ＩＩで処理された細胞に限局された、根本的な細胞形状の変化に注目した（図１Ｂ）。細胞は、ロゼット構造を欠く平面状の形状を呈示した。さらに、本発明者らは、ＦＯＸＡ２＋細胞の頑健な上方調節と、ＢＦ１＋細胞の共時的な減少（図１Ｃ）と、ＺＯ１＋ロゼット総数の減少（図１Ｄ）とを観察した。ＢＦ１の発現の低下に加えて、本発明者らはまた、ＡＮ内で発現する別のマーカーである、ＰＡＸ６の発現の低下も観察した（図１Ｅ）。用量反応研究により、ＦＯＸＡ２＋細胞の誘導と、ＢＦ１発現およびＰＡＸ６発現の共時的減少とは、ＳＨＨ　Ｃ２５ＩＩの濃度を１２５～５００ｎｇ／ｍｌとして達成されることが裏付けられた（図１Ｆ；および図示しない）。効率的なＦＯＸＡ２＋細胞の誘導は、未改変のＮ末端ＳＨＨを使用して調べた濃度のいずれによっても観察されなかった。本発明者らは、ＦＰマーカーがいかに誘導されるかを、低濃度のＳＨＨに応答することが公知の遺伝子であるＮＫＸ６．１発現の誘導と比較して理解するために、用量反応研究を実施した。Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩを低濃度としたところ、ＦＰマーカーであるＦＯＸＡ２およびＮｅｔｒｉｎ－１の発現は見られず、ＮＫＸ６．１発現の頑健な増大が見られた。高濃度では、ＦＰマーカーが急速に上昇する一方で、ＮＫＸ６．１発現は減衰する（図１Ｇ）。これらのデータにより、高レベルのＳＨＨへの早期曝露は、前方ＡＮマーカーを減少させ、ＦＰマーカーであるＦＯＸＡ２を誘導することが裏付けられた。

【０３５８】
（実施例ＩＶ）
ＦＰ誘導のコンピテンシーは、狭い分化域に限局される

【０３５９】
ＦＯＸＡ２の頑健な（染色など、観察される強力なシグナル）上方調節は、初期手順によっても誘導されたが、古典的な間質フィーダー介在型神経誘導を使用したところ、約２

１日間にわたる培養の後で陽性だったのは、細胞のうちのわずか約３０％であった。したがって、本発明者らは、ＦＯＸＡ２を発現させる培養細胞の総数を増大させるための、複数種類の培養組成物および培養法について調べた。

【０３６０】

近年、本発明者らは、迅速で規定された、有意に多数の神経細胞をもたらす神経誘導パラダイムであって、ｎｏｇｇｉｎおよびＳＢ４３１５４２への曝露を介するＳＭＡＤシグナル伝達の阻害に基づく神経誘導パラダイムを開発し、これについて記載した（ＮＳＢプロトコール；（Chambersら、２００９年））。このプロトコールを、本発明の組成物および方法と組み合わせて使用して、本発明者らは、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩを、神経誘導における異なる時点で添加し、ＦＯＸＡ２発現についてアッセイすることにより、ＦＰへの分化を最適化することを目標とした。分化は、ＮＳＢへの曝露時に誘発し、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩを、１日目、３日目、５日目、または７日目に添加した（図２Ａ）。最も効率的なＦＯＸＡ２誘導は、分化の１日目から始まるＳＨＨで処理された培養物中で観察され、ＦＯＸＡ２＋細胞は、全細胞のうちの約６５％を表した（図２Ｂおよび２Ｃ）。ＳＨＨ処理を、分化の１１日目を超えて延長しても、ＦＯＸＡ２収量は増大しなかった（図２Ｄ）。これらのデータにより、ＦＰ識別を確立するには、早期の高ＳＨＨシグナルが必要とされることが裏付けられたが、これは、ＦＰ特定のための、極めて重要なコンピテンシー域を示唆する。さらに、分化条件により、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてヒトＦＯＸＡ２＋細胞を誘導するための頑健なプラットフォームが確立される。

【０３６１】

ＦＯＸＡ２は、ＦＰ発生の鍵となるマーカーである。しかし、ＦＯＸＡ２はまた、内胚葉内でも高度に発現する。ｈＥＳＣから派生した推定ＦＰ組織をさらに特徴付けるため、本発明者らは、１１日目に、候補マーカーについてのｑＲＴ－ＰＣＲ解析を実施した。ＮＳＢプロトコールを対照として使用して、本発明者らは、ＦＯＸＡ２、ならびにＳＨＨ、Ｆ－Ｓｐｏｎｄｉｎ、およびＮｅｔｒｉｎ－１を含む他のＦＰマーカーの発現の劇的な増大を確認した（図７）。本発明者らは、神経先駆体マーカー、神経膠マーカー、ニューロンマーカー、および非神経マーカーのパネルを使用して、ＦＯＸＡ２＋推定ＦＰ細胞の性質についてさらに特徴付けした（図７）。ＦＯＸＡ２＋細胞を、Ｎｅｓｔｉｎ（８６％）およびＳＯＸ２（１７％）を含む、これらのマーカーの限定されたサブセットだけで共標識した。ｈＥＳＣから派生したＦＰ内のＦＯＸＡ２発現を、内胚葉組織内のＦＯＸＡ２発現と対比して区別するために、本発明者らは、ｈＥＳＣを、内胚葉へと分化させた（D'Amourら、２００５年）。予測される通り、ＦＰ分化条件下および内胚葉分化条件下のいずれにおいても、本発明者らは、ＦＯＸＡ２発現の、ＮＳＢで処理された対照細胞と比較した増大を観察した。しかし、内胚葉マーカーであるＳＯＸ１７の誘導は、内胚葉条件に限定され、ＳＯＸ１７は、ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞内に存在しなかった（図７）。本発明者らはまた、ＡＦＰ発現およびアルブミン発現など、他の内胚葉マーカーの発現も、ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞内では観察しなかった。これらのデータにより、ＮＳＢ＋ＳＨＨプロトコールにおけるｈＥＳＣから派生したＦＯＸＡ２＋細胞は、ＦＰおよび早期神経先駆体マーカーを発現させ、内胚葉マーカーの発現を欠くことが裏付けられた。

【０３６２】

（実施例Ｖ）

ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞は、機能的である

【０３６３】

ＦＰは、発生時の神経のパターン化および軸索経路の発見において、重要な機能的役割を果たす（Jessell、２０００年）。ｈＥＳＣから派生したＦＰの機能的特性について評価するために、馴化培地を９および１１日目に単離し、ＥＬＩＳＡを使用して、培地中のＮｅｔｒｉｎ－１の発現について調べた（図３Ａ）。通常のＮＳＢ条件下では、Ｎｅｔｒｉｎ－１は、９日目に検出可能となり、１１日目に減少するが、ＮＳＢ＋ＳＨＨ条件では、Ｎｅｔｒｉｎ－１レベルが３．５倍となり、１１日目に増大する（図３Ｂ）。ＳＨＨは、ＦＰ細胞により分泌される、極めて重要なパターン化因子であり、腹側細胞型を用量依

存的に特定する。ｈＥＳＣから派生したＦＰが腹側先駆体ドメインを特定しうる因子を分泌するのかどうかについて調べるため、分化の９および１１日目に、馴化培地（ＣＭ）を単離した。６日目において、外因性ＳＨＨを除去し、培養物を洗浄して、外因的に添加されたＳＨＨを培地から消失させた。ナイーブ神経前駆細胞を、対照（ＮＳＢ）プロトコールの１１日目に単離し、ＮＳＢ　ＣＭまたはＦＰ　ＣＭと共に培養した。培養の５日目の後に、ＣＭの存在下で、本発明者らは、腹側先駆体マーカーの発現およびＳＨＨ応答性遺伝子であるＧＬＩ２の発現についてプローブした。本発明者らは、ＮＳＢ対照培養物から得られたＣＭと比較して、ｈＥＳＣから派生したＦＰ組織によるＣＭは、ＮＫＸ２．１およびＮＫＸ６．１を含む腹側遺伝子の発現を、効率的に誘導することを見出した（図３Ｃ）。腹側マーカーの発現の増大は、タンパク質レベルで確認された（図３Ｃ’）。

【０３６４】

この結果が、ＳＨＨに媒介されたものであるのかどうかを見るために、本発明者らは、ｈＥＳＣから派生したＦＰによるＣＭへの曝露時における、ＧＬＩ２の発現の増大を裏付けた。この実験を、ＳＨＨアンタゴニストであるシクロパミンの存在下で繰り返したところ、ＮＫＸ２．１、ＮＫＸ６．１、およびＧＬＩ２の３つの遺伝子全てが、有意に低減された（図３Ｃ）ことから、パターン化応答の、ＳＨＨシグナル伝達への依存が裏付けられた。

【０３６５】

古典的研究では、ＦＰ外植片が、異所性ＦＰを、早期神経外胚葉組織内で誘導しうることが裏付けられた（Placzekら、１９９３年）。ｈＥＳＣから派生したＦＰが、ＦＰマーカーを、初代マウス外植片内で誘導することが可能であるのかどうかについて調べるため、神経外胚葉組織を、Ｅ８．５のマウス胚から単離し、ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞と直接的に接触させた。共培養の３日後、外植片を、マウス特異的Ｍ６マーカーの発現に基づき同定し、すすぎ、スライド上にマウントして、ＦＯＸＡ２について染色した。対照条件としては、ＮＳＢプロトコールを使用して、マウス外植片を、ｈＥＳＣから派生した神経組織と共に共培養した。対照ｈＥＳＣから派生した神経組織との共培養が、ＦＯＸＡ２＋細胞をもたらさなかったのに対し、ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞と共に共培養された外植片は、特に、外植片の周辺部において、頑健なＦＯＸＡ２＋細胞の誘導を示した（図４Ｄおよび４Ｅ）。ｈＥＳＣから派生したＦＰ細胞の神経突起成長促進効果は、初代齧歯動物ＦＰ組織の軸索成長促進効果を裏付けるために既に使用されたアッセイである、ラットＥ１２．５ラット初代小脳板外植片内で観察された（図８）（Shirasakiら、１９９５年）。これらの実験により、ｈＥＳＣから派生したＦＰは、ナイーブのｈＥＳＣから派生した神経先駆細胞および初代マウス神経先駆細胞を腹側化することが可能な、Ｎｅｔｒｉｎ－１およびＳＨＨを分泌することにより、初代ＦＰ組織の、オーガナイザーとしての機能的特性を模倣しうることが裏付けられた。

【０３６６】

（実施例ＶＩ）

経時的トランスクリプトーム解析は、ＦＰ特定がＡＮを代償として生じることを明らかにする

【０３６７】

ヒトＦＰの特定に極めて重要な因子に対する、さらなる洞察を得るため、候補マーカーについての高分解度の経時的遺伝子発現プロファイルを、１１日間プロトコールの６つの時点において実施した。ＦＯＸＡ２発現は、分化の３日目から始まる、転写物レベルの安定的な増大（ＮＳＢと比較して）として観察され、免疫染色データと符合した（図４Ａ）。興味深いことに、他のＦＰマーカーであるＳＨＨ、Ｎｅｔｒｉｎ－１、およびＦ－Ｓｐｏｎｄｉｎは、異なる発現パターンに従った（図４Ｂ～４Ｄ）。３つのマーカー全ては、誘導のより大きな遅延（ＮＳＢ条件と比較して）を示し、発現の劇的な増大は、分化の７日目においてであった。

【０３６８】

ＰＴＣＨ１発現は一般に、ＳＨＨ活性についての転写の読取りとしてだけ使用される。

ＰＴＣＨ１発現の劇的な増大は、早くも分化の３日目に観察され、次の２日間にわたり、レベルはさらに３倍となった（図４Ｅ）。既に、ＳＨＨの下流におけるエフェクターであるＧＬＩ２は、ＦＰ誘導に不可欠であるが、ＦＰ発生の後の段階を減殺し（Matiseら、１９９８年）、ＧＬＩ２は、ＦＯＸＡ２発現を直接活性化させうることが示されている（JeongおよびEpstein、２００３年）。ＧＬＩ２発現およびＦＯＸＡ２発現の両方の早期の増大（図４Ａおよび４Ｆ）が、ＧＬＩ２の減少に続いて、１１日目に観察されたことは、特異的にＦＰ誘導時における、ＧＬＩ２の役割と符合する。はるかに低い誘導レベルでではあるが、ＧＬＩ１についても同様な傾向が観察される（図４Ｇ）。

【０３６９】

ＳＯＸ１は、早期神経マーカーであり、正中線側ＦＰ内では発現しない（Charrierら、２００２年）。ＳＯＸ１が、ＮＳＢ条件において、急速に上方調節され、時間と共に増大し続けたことは、急速な神経誘導と符合する。ＳＨＨを添加すると、３日目において、対照ＮＳＢ条件と比較してはるかに小さなＳＯＸ１レベルの増大が観察される（図４Ｈ）。ＮＳＢ条件は、ＡＮバイアスを伴う神経細胞であって、ＢＦ１を高レベルで発現させる神経細胞をもたらす（Chambersら、２００９年）。しかし、ＳＨＨを、培養物へと添加すると、７日目において、ＰＡＸ６およびＢＦ１の根本的な低減が見られる（図４Ｉおよび４Ｊ）。内胚葉マーカーであるＳＯＸ１７および中胚葉マーカーであるブラキウリの誘導は、観察されなかった（図４Ｋおよび４Ｌ）ことから、ＮＳＢプロトコールを使用して、ＡＮ誘導と同様に、ＦＰ誘導も、明白な中胚葉中間体または内胚葉中間体の寄与を伴わずに、もたらされることが示唆される。これらのデータにより、ＧＬＩ２発現およびＦＯＸＡ２発現により誘発される、ｈＥＳＣから派生したＦＰ内の適切なマーカー発現に続いて、Ｎｅｔｒｉｎ－１、ＳＨＨ、およびＦ－Ｓｐｏｎｄｉｎなど、機能的なＦＰマーカーの発現が裏付けられた。ＦＰ特定時におけるＰＡＸ６発現およびＢＦ１発現の低下は、ＦＰの誘導がＡＮを代償として生じることを示唆する。

【０３７０】

（実施例ＶＩＩ）

ｈＥＳＣから派生したＦＰ特定時における、グローバルトランスクリプトーム解析

【０３７１】

本発明による発生の分化時の５つの時点（１、３、５、７、および１１日目）において、対照ＮＳＢ培養物（ＡＮをもたらす）中、およびＳｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩで処理された培養物（ＦＰをもたらす；図２Ｅを参照されたい）中の、グローバル遺伝子発現についての経時的プロファイルを確立した。マイクロアレイ解析の前に、各試料の品質を、ＦＰマーカーのパネルの発現について検証した（図９）。グローバル遺伝子発現研究は、３つの独立の試料中で、各時点および各培養条件について実行した。データは、分化時におけるＦＰ内の遺伝子発現レベルを、ＮＳＢプロトコールと対比して、ｌｏｇ２比へと転換した（図４ｌ～４Ｑ）。生データは、ＧＥＯデータベース（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）による受託番号：ＧＳＥＸＸＸ（公開時に利用可能な番号）において利用可能である。

【０３７２】

経時データを、ＤＡＶＩＤ（http://david.abcc.ncifcrf.gov/；Dennisら、２００３年）を使用する遺伝子オントロジー（ＧＯ）濃縮解析であって、ＦＰの転写プロファイルについてのバイアスのかからない評価としてのＧＯ濃縮解析にかけた。分化の７および１１日目の、ＳＨＨで処理された培養物中で、ＮＳＢ対照培養物と対比して高度に濃縮された転写物の中には、Ｗｎｔ経路およびヘッジホッグ経路、軸索ガイダンス、ならびに分泌タンパク質と関連する遺伝子が見られた（図４Ｌおよび４Ｍ）。パターン化因子および軸索ガイダンス因子の濃縮により、ＳＨＨで処理された培養物のＦＰ識別がさらに確認される。さらに、前脳発生に関与する遺伝子を含む転写物が、フロアプレート細胞を作製するためのＦＰ培養法において、ＮＳＢプロトコールにより培養された細胞と比較した場合より大きな量の下方調節を示したときには、ＳＨＨにより媒介されるＡＮの抑制も裏付けられた（図４Ｌ、Ｍ）。

【０３７３】
ＦＰ特定時において示差的に発現する特異的遺伝子への洞察を得るため、本発明者らは、各分化段階についての対応のある比較を実施した。分化の３日目および５日目において顕著に調節された（１日目と比較して）遺伝子の大部分が、ＮＳＢプロトコールとＦＰプロトコールとで共有されたのに対し、転写物のサブセットは、示差的に調節された（図４Ｎ～４Ｑ）。特に、ＳＨＨシグナル伝達の構成要素であり、転写の下流における公知の標的である、Ｐａｔｃｈｅｄ－１（ＰＴＣＨ１）の増大が注目された。このプロトコールでは、ＰＴＣＨ１は、それが減少し始める１１日目を除き、全ての時点において高度に濃縮される（図４Ｎ～４Ｑ）。
【０３７４】
本発明者らは、Ｗｎｔ経路の構成要素の顕著な変化を観察した。早くも５日目には、Ｗｎｔ経路阻害剤であるＤＫＫ－１の顕著な減少が見られ、この減少は、プロトコールの経過にわたり持続した（図４Ｎ～４Ｑおよび図７）。また、マウス発生時における正中線軸索ガイダンスに関与することが既に示されている（Lyuksyutovaら、２００３年）、複数のＦｒｉｚｚｌｅｄ遺伝子の、正中線における顕著な上方調節（図４Ｐおよび４Ｑ）も観察された。加えて、ＦＰ特定時において示差的に発現する、多数のさらなる遺伝子であって、ＳＩＸ６、ＣＡＰＮ６、ＩＧＦＢＰ３、およびＦＩＢＬＮ１を含む遺伝子も同定した（図４Ｎ～４Ｑ）。これらの遺伝子およびさらなる遺伝子についての示差的発現は、ｑＲＴ－ＰＣＲで検証した（図９）。推定ヒトＦＰマーカーについて検証するには、マウス胚組織内およびヒト胚組織内の体系的なｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションによるスクリーンが要求されるであろうが、文献およびＭＧＩ（マウス遺伝子発現データベース）に基づくと、ＨＥＳＸ１（Zoltewiczら、１９９９年）またはＲＢＰ１（ＣＲＢＰ１：Hunterら、１９９１年）のそれぞれなど、同定された遺伝子の多くは、前方正中線内およびフロアプレート組織内で適合性の発現パターンを有する。
【０３７５】
（実施例ＶＩＩＩ）
また、遺伝子クラスター解析も施したが、これにより、遺伝子の発現が最高度であるとき：最大発現時（ＴＯＭ）および遺伝子の発現が最低度であるとき；最小発現時（ＴＩＭ）が示された。ＧＯオントロジータームをこの解析へとマッピングしたところ、ＦＰ特定過程における正確な発生域を同定することが可能であった。これらのデータにより、ｈＥＳＣから派生したＦＰ組織の識別もさらに確認され、神経外胚葉運命の特定時と対比した、ＦＰ運命の特定時に示差的に発現する遺伝子に対する洞察がもたらされた。
【０３７６】
（実施例ＩＸ）
ＤＫＫ－１の抑制は、ＡＮコミットメントを遮断し、ＦＰの作製を増強する
【０３７７】
ＦＰコミットメントは、ＡＮを代償として生じるという、本発明者らの観察は、本明細書で得られるグローバル遺伝子発現プロファイルであって、Ｗｎｔシグナル伝達阻害剤であるＤＫＫ－１の急速な下方調節を明らかにするグローバル遺伝子発現プロファイルにより強化された。ＤＫＫ－１は、当初、頭方発生を誘導するのに必要かつ十分な、アフリカツメガエルの頭方オーガナイザー内で発現する因子として同定された（Glinkaら、１９９８年）。マウス発生時における、ＤＫＫ－１により媒介される、Ｗｎｔシグナル伝達の阻害は、前方脳発生に不可欠であり（Mukhopadhyayら、２００１年）、ＦＯＸＡ２ノックアウト胚は、Ｅ７．５において、外胚葉内のＤＫＫ－１の発現の増大を示す（Kimura-Yoshidaら、２００６年）。ＮＳＢによる誘導時において、５日目において、ＤＫＫ－１転写物レベルが、２００～５０００倍と急激に上昇し、次いで、元通りに低下することが観察されたが、これは、ＤＫＫ－１の、ＡＮ誘導因子としての役割と符合する。ＥＬＩＳＡアッセイを行って、培地中のＤＫＫ－１タンパク質レベルを測定し、１２ｎｇ／ｍｌという高レベルを見出した（図５Ａ、Ｂ）。Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩ処理の早くも２日後には、ｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの両方における、ＤＫＫ－１の根本的な低減が観察

された（図５Ｂ、Ｃ）。ＤＫＫ－１発現の減少は、持続的であり、ＰＡＸ６、ＢＦ１、ＯＴＸ１、ＯＴＸ２、およびＥＭＸ１を含むＡＮマーカーの減少を伴った（図４）。

【０３７８】

ＤＫＫ－１が、ＦＰ特定におけるｈＥＳＣ分化に機能的に関与するのかどうかについて調べるため、本発明者らは、組換えＤＫＫ－１を、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩと組み合わせて添加し、ＦＰマーカー発現について評価した。Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩによる処理が、単独で、ＡＮマーカーであるＢＦ１の減少と、ＦＯＸＡ２の上方調節とを結果としてもたらした（図５Ｄ～Ｆ）のに対し、ＤＫＫ－１の添加は、ＦＯＸＡ２のメッセージおよびタンパク質の減少と、ＢＦ１転写物のより急速な上昇とを引き起こした（図５Ｄ～Ｆ）。逆に、ＮＳＢプロトコールにおける、ＤＫＫ－１抗体の、細胞への添加は、ＢＦ１発現の顕著な遅延およびＢＦ１発現レベルの低下を引き起こした。これらのデータにより、内因性ＤＫＫ－１レベルは、ＡＮ特定に極めて重要であることが指し示された。次に、ｈＥＳＣを、Ｓｏｎｉｃ　Ｃ２５ＩＩおよびＤＫＫ－１中和抗体の両方の存在下で分化させた。これらの条件下では、５日目において、ＢＦ１転写物の早期で一過性の誘導が抑制され、ＦＯＸＡ２レベルの上昇を伴った（図５Ｅおよび５Ｇ）。

【０３７９】

本発明による発生時に得られるデータにより、神経誘導時における、極めて重要なＦＰ特定域が明らかにされた。ＤＫＫ－１発現により、ＦＯＸＡ２発現が阻害されうるという観察と共に、ＤＫＫ－１遮断抗体の添加が、ＳＨＨ介在型ＦＰ誘導のコンピテンシー域を拡大するのかどうかを裏付けるために、以下の試験をデザインした。ＤＫＫＫ－１抗体は、分化の１日目、５日目、および９日目に添加した。ＳＨＨへの曝露も、同じ時点に開始し、９日間にわたるＳＨＨへの曝露に続き、ＦＯＸＡ２の発現をアッセイした。Ｄｋｋ－１を、１日目に、ＳＨＨと共に添加したところ、ＦＯＸＡ２＋細胞の増大が観察された。しかし、ＤＫＫＫ－１抗体を、５日目または９日目に添加したところ、ＦＯＸＡ２＋細胞は観察されなかった（図５Ｈおよび５Ｉ）。これらのデータにより、ＮＳＢプロトコールにおける、早期の高内因性レベルのＤＫＫ－１は、ＡＮコミットメントを誘発し、ＦＰコンピテンシーを抑制したことが指し示される。早期におけるＳＨＨによる処理は、ＤＫＫ－１介在型ＡＮ特定を抑制し、ＦＰ系列への分化を可能とした。しかし、後の段階である５日目におけるＤＫＫ－１の阻害は、ＦＰ誘導の時間域を拡大しなかった。

【０３８０】

（実施例Ｘ）

ＢＦ１発現は、ＦＰコミットメントを抑制する

【０３８１】

本発明者らは、ＳＨＨの、幹細胞培養物への添加により、少なくとも部分的に、ＤＫＫ－１の阻害を介して、ＡＮを代償とするＦＰへの分化が引き起こされることを発見した。ＤＫＫ－１は、ＢＦ１＋神経外胚葉を特定することが示されており（Mukhopadhyayら、２００１年）、ＢＦ１は、ＮＳＢによる誘導時において、大半の神経細胞内で発現する（図４および５）。フォークヘッド因子ＢＦ１の発現が、神経誘導時におけるＦＰコンピテンシーを直接抑制するのかどうかについて調べるため、ｈＥＳＣに、ＢＦ１　ｓｈＲＮＡ構築物を形質導入し（Fasanoら、２００９年；Shenら、２００６年）、クローン細胞系が派生された。ＢＦ１は、ｈＥＳＣ内では高度に発現せず、細胞形状またはコロニーサイズの差異は見られなかった（図１０））。

【０３８２】

しかし、ｈＥＳＣが神経分化すると、ＢＦ１タンパク質発現の減少（図５Ｊ”および５Ｋ”）および、ＢＦ１転写物の８０％の減少（図１０）が見られた。神経先駆体段階におけるＢＦ１機能の喪失は、増殖および細胞周期進行の欠損と関連しているが、ｈＥＳＣ段階におけるＢＦ１ノックダウン細胞系は、対照ベクターを形質導入された細胞系と同等な細胞周期動態を示した（図１０）。次いで、ＢＦ１ノックダウンｈＥＳＣおよび対照ｈＥＳＣを、ＦＰへと分化させ、ＦＰマーカーのパネルについてのｑＲＴ－ＰＣＲ解析にかけた。分化の１１日後において、ＢＦ１　ｓｈＲＮＡ条件下では、全てのＦＰマーカーの発

現の顕著な増大が見られた（図５Ｌ）。さらに、免疫細胞化学解析により、ＦＯＸＡ２＋細胞数の顕著な増大が明らかにされたが、これは、ＢＦ１ノックダウンｈＥＳＣ細胞系の全細胞のうちの９０％超を占める（図５Ｍ）。

【０３８３】

既に記載されている（Fasanoら、２００９年）ベクターを使用して、ＢＦ１を過剰発現させることによりｈＥＳＣ細胞系を生成した。次いで、これらのトランスジェニック細胞を、ＦＰ系列への分化を誘導する条件下で培養した。１１日目において、対照ＧＦＰ発現クローンと比較して、ＦＯＸＡ２＋細胞の低減およびＦＰマーカー発現の減少が見られた（図１０）。これらのデータにより、ＢＦ１発現により、ｈＥＳＣから派生したＦＰの派生が阻害されることが裏付けられた。

【０３８４】

（実施例ＸＩ）

ＦＰのＡ／Ｐ軸は、尾方化剤により変化した

【０３８５】

ＦＯＸＡ２発現およびＮｅｔｒｉｎ－１発現など、ある特定の特徴は、全てのＦＰ細胞の中で共有されるているが、Ａ／Ｐ軸に沿った、フロアプレートの異なる領域の間では、差異も報告されている（PlaczekおよびBriscoe、２００５年）。特に、近年の研究では、中脳ＦＰは、ＣＯＲＩＮ（Onoら、２００７年）およびＮＯＶ（PlaczekおよびBriscoe、２００５年）などのマーカーを発現させることが示されている。

【０３８６】

加えて、中脳ＦＰは、神経性であり、中脳ＤＡニューロンをもたらし、ＬＭＸ１ＢおよびＮＧＮ２など、ＤＡ前駆体のマーカーを発現させることも示された（Joksimovicら、２００９年）。これに対し、後脳ＦＰおよび脊髄ＦＰのいずれも、非神経性であると考えられる。ｈＥＳＣから生成されたＦＰ細胞のＡ／Ｐ識別をよりよく理解するために、中脳ＦＰマーカーであるＣＯＲＩＮおよびＮＯＶについてのｑＲＴ－ＰＣＲ解析、ならびにＤＡ前駆体マーカーであるＬＭＸ１ＢおよびＥＮ１についての解析を行った。しかし、これらのマーカーの発現は、検出されなかった。次に、遺伝子発現データセットを、使用して、示差的に調節される転写物マーカーであって、ＦＰ細胞の位置識別に光を投げかけうる転写物マーカーを同定した。

【０３８７】

マウスにおける的確な研究により、特異的増強エレメントが、ＦＰのＡ／Ｐ軸に沿った異なる領域内でＳｈｈ発現を方向付けることが示された（Jeongら、２００５年）。ＳＩＸ６は、ＮＳＢ対照条件と比較したＦＰ誘導時において、劇的に増大した（分化の５日目における、ｍＲＮＡレベルの約５０，０００倍の上昇；図９）。ＳＩＸ６は、ＳＢＥ２として公知の増強因子領域であって、ＳＨＨ発現を、腹側脳の最も前面へと方向付ける増強因子領域において、ＳＨＨ遺伝子に結合することが示された（Jeongら、２００８年）。本発明者らは、ＳＩＸ６の、前方ＦＰ識別の推定マーカーとしての使用を想定した。したがって、ｈＥＳＣから派生したＦＰのＳＩＸ６状態を使用して、ＦＧＦ８、Ｗｎｔ－１、およびレチノイン酸など、公知の尾方化剤に応答した再特定をマーキングした。これらの尾方化因子の各々を、ＳＨＨと組み合わせて添加し、結果として得られる組織を、ＦＰマーカーであるＦＯＸＡ２およびＮＥＴＲＩＮ－１、ＡＮマーカーであるＢＦ１、ならびに推定前方ＦＰマーカーであるＳＩＸ６の発現について評価した。ＦＰの発生は、尾方化因子の存在下で損なわれないことが見出された。実際、Ｗｎｔ－１またはＲＡの添加は、ＦＯＸＡ２およびＮｅｔｒｉｎ－１発現に基づき、ＦＰの産生を有意に強化した（図６Ａおよび６Ｂ）。ＲＡ群内およびＷｎｔ－１群内のＦＰマーカーの発現の増強は、ＢＦ１発現の劇的な低減と相関したことから、ＡＮコミットメントは、ＦＰ誘導に対抗するという考えがさらに裏付けられた（図６Ｂ）。目覚ましことに、全ての条件において、ＳＩＸ６の発現の顕著な低減が見られ、Ｗｎｔ－１条件およびＲＡ条件が、前方ＦＰ識別の抑制に最も有効であった。

【０３８８】

（実施例ＸＩＩ）

本実施例は、本発明で使用される方法（条件）のうちのいずれかが、中脳ＦＰマーカーおよびＤＡ前駆体マーカーの上方調節をもたらすのかどうかを決定するようにデザインされた、例示的な実験を示す。本発明者らは、異なる因子により、マーカー発現に対する効果が変化することを発見した（図６Ｂ）。特に、Ｗｎｔ－１への曝露は、中脳ＦＰマーカーであるＣＯＲＩＮおよびＮＯＶの顕著な増大、ならびにＤＡ前駆体マーカーであるＬＭＸ１Ｂ、ＥＮ１、およびＮＧＮ２の増大を結果としてもたらした。先行研究は、Ｗｎｔシグナル伝達は、中脳ＦＰの神経性応答に極めて重要であることを示した（Joksimovicら、２００８年）。

【０３８９】

上述の通り、研究により、ＳＨＨ発現を、腹側軸に沿った異なるＡ／Ｐ領域へと方向付ける、異なる増強因子が同定された（Jeongら、２００８年）。尾方化因子の添加により、結果として得られるＦＰ組織のＡ／Ｐ識別が再特定されることをさらに裏付けるために、Ｗｎｔ－１またはＦＧＦ８の存在下または非存在下で、ｈＥＳＣから派生したＦＰを生成し、結果として得られる組織に、ＦＰの異なるＡ／Ｐドメイン内でＬａｃＺ発現を駆動する、２つのＳＨＨ増強因子構築物をトランスフェクトした。ＳＢＥ１構築物が、ＳＨＨ発現を、フロアプレートの中脳領域へと方向付けるのに対し、ＳＢＥ２増強因子は、ＳＨＨ発現を、Ｓｉｘ６が結合することが示されている、ＦＰの最前方領域へと方向付ける。本実施例の、尾方化因子の非存在下では（ＳＨＨ　Ｃ２５ＩＩ単独）、ＬａｃＺ発現は、ＳＢＥ２のトランスフェクション後に観察されたが、ＳＢＥ１増強因子のトランスフェクション後には観察されなかったことから、ｈＥＳＣから派生したＦＰは、デフォルトでは前方であるという仮説が裏付けられる（図６Ｃ）。これに対し、ＳＢＥ２活性は、Ｗｎｔ１またはＦＧＦ８で処理すると失効化されるのに対し、ＳＢＥ１活性は、これらの条件下で誘導された。これらのデータにより、ＦＧＦ８処理またはＷｎｔ１処理は、ＦＰ識別の、より尾方の中脳様識別へのシフトを誘導することが指し示された（図６Ｃ）。

【０３９０】

結論として述べると、本発明者らのデータにより、ＤＫＫ－１を上方調節し、その後、ＢＦ１を上方調節することを介する、神経分化の、ＡＮ運命へのｈＥＳＣデフォルトを示す一方で、ＡＮコミットメントが、ｈＥＳＣ子孫内のＦＰコンピテンシーを能動的に抑制することが裏付けられた。しかし、早期の高レベルＳＨＨにより、ＤＫＫ－１レベルが低減されることから、ＡＮを代償とするＦＰ誘導が可能となる一方で、ＤＫＫ－１またはＢＦ１の機能喪失により、ＦＰの産生が増大した。ヒトＥＳＣから派生したＦＰは、デフォルトでは前方であるが、尾方化因子に応答して後方化された。これを、図６Ｅにまとめる。

【０３９１】

（実施例ＸＩＩＩ）

細胞培養物：ｈＥＳＣ（ＷＡ－０９；第３５～４５代の継代培養物）、ｈｉＰＳＣ細胞系（ｉＰＳ－１４、ｉＰＳ－２７；第２０～３０代の継代培養物）、およびＩ６を、未分化状態で維持し、既に記載した二重ＳＭＡＤ阻害プロトコールを使用して、ＣＮＳ系列へと分化させた。プラコード誘導プロトコール（ＰＩＰ）では、分化の３日目において、Ｎｏｇｇｉｎを除去した。一部の実験では、ＢＭＰ－４、Ｎｏｇｇｉｎ、ＤＫＫ－１、ＦＧＦ８、ＳＵ５４０２、Ｗｎｔ－３ａ、ＤＡＰＴ、ＣＨＩＲ９９０２１、シクロパミン、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）、およびプルモルファミンを添加した。三叉神経感覚運命への分化のためには、プラコードクラスターを、Ｎ２培地中で維持し、アスコルビン酸およびＢＤＮＦを補充した。下垂体運命は、ＰＩＰの７～１１日目における、ＳＨＨおよびプルモルファミンへの曝露により誘導するのに続き、ＤＡＰＴで処理して、ＰＩＴ１＋運命を促進した。

【０３９２】

（実施例ＩＶＸ）

細胞の特徴付け：ｑＲＴ－ＰＣＲデータは、ＨＰＲＴに照らして標準化したものであり

、少なくとも３つの独立の実験による技法上の４～６回反復に基づく。グローバル遺伝子発現解析は、製造元（Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｈｕｍａｎ－６オリゴヌクレオチドアレイ）の仕様に従い、ＭＳＫＣＣ ｇｅｎｏｍｉｃｓ ｃｏｒｅにより実施された。免疫細胞化学解析のための初代抗体の使用、およびフロー解析、および電気生理学的解析についての詳細な情報は、補助法への拡張において提示する。

【０３９３】

（実施例ＸＶ）

動物研究：動物研究は、本発明者らの施設のＡｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより承認されたプロトコールに準拠し、かつ、ＮＩＨガイドラインに従い行った。ホルモン産生細胞を、成体雄ＮＯＤ－ＳＣＩＤ ＩＬ２Ｒｇｃマウスおよび成体の８の雄ヌードラットへと皮下注射した。移植の４～６週間後に血液を回収した後で、ホルモンレベルを決定するためのＥＬＩＳＡ解析にかけた。ＨＨ段階９～１０でニワトリ移植研究を実施し、ＨＨ段階２０で胚を採取した。成体ＮＯＤ－ＳＣＩＤ ＩＬ２Ｒｇｃマウスの橋への注射は、定位手術により実施した。

【０３９４】

（実施例ＸＶＩ）

統計学的解析：ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ５．０ｂ（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して、統計学的解析を実施した。全てのデータは、少なくとも３つの独立の実験から派生した。アステリスクは、スチューデントの両側ｔ検定、またはＡＮＯＶＡに続く、複数の独立の処理群に対する対照を比較するダネット検定により、対照群と有意に異なる実験群の目印である。そうでないことが指し示されない限りにおいて、データは、平均±ＳＥＭとして提示する。

【０３９５】

（実施例ＸＶＩＩ）

細胞および培養条件：ｈＥＳＣ（ＷＡ－０９；ＸＸ、第３５～４５代の継代培養物）、ｈｉＰＳＣ細胞系（ｉＰＳ－１４、ｉＰＳ－２７；第２０～３０代の継代培養物）（Chambersら、２００９年）、およびＩ６（Amit and Itskovitz-Eldor、２００２年）を、１ｃｍ２当たりの細胞１２～１５，０００個でプレーティングされたマウス胎仔線維芽細胞（ＭＥＦ、Ｇｌｏｂａｌ Ｓｔｅｍ）上で培養し、毎日交換される、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、２０％のｋｎｏｃｋｏｕｔ ｓｅｒｕｍ ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＧＩＢＣＯ）、０．１ｍＭのｂ－メルカプトエタノール、６ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ－２からなる培地中、またはｈＥＳＣ用品質のＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、San Ｊｏｓｅ、ＣＡ）でコーティングされたプレート上のｍＴｅＳＲ（商標）１（ＳｔｅｍＣｅｌｌ、Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、Ｃａｎａｄａ）中で維持した。細胞は、ｈＥＳＣ培地中に６Ｕ／ｍＬのディスパーゼを使用して継代培養し、洗浄し、１：１０～１：１５の希釈率で再プレーティングした。

【０３９６】

（実施例ＸＶＩＩＩ）

神経誘導およびプラコード誘導：フィーダー非含有神経誘導は、既に記載されている（Chambersら、２００９年）通りに実行した。略述すると、ｈＥＳＣ培養物は、アキュターゼを使用して、２０分間にわたり脱凝集させ、ｈＥＳＣ培地を使用して洗浄し、ゼラチン上、ＭＥＦを除去するＲＯＣＫ阻害剤の存在下で、３７℃で１時間にわたり前プレーティングした。非接着性ｈＥＳＣを洗浄し、１０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ－２およびＲＯＣＫ阻害剤をスパイクされた、ＭＥＦで調整されたｈＥＳＣ培地（ＣＭ）中、ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ）でコーティングされたディッシュ上、１ｃｍ２当たりの細胞６０，０００個の密度で、ｍａｔｒｉｇｅｌ上にプレーティングした。２４時間後にＲＯＣＫ阻害剤を中断し、ｈＥＳＣを、ＣＭ中で２日間にわたり、またはそれらが９５％のコンフルエントとなるまで増殖させた。初期分化培地条件は、１０μＭのＴＧＦ－β阻害剤（ＳＢ４３１５４２、Ｔｏｃｒｉｓ）および２５０ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎ（Ｒ＆Ｄ）を伴うｋｎｏｃｋｏｕｔ ｓｅｒｕｍ ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＫＳＲ）培地を含んだ。分化の５日目に、量

を増大させるＮ２培地（２５％、５０％、７５％）を、ＫＳＲ培地へと、５００ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎおよびＴＧＦ－β阻害剤を維持しながら、隔日で添加した。ＫＳＲ非含有条件（ＢＭＰシグナル伝達の調整後におけるＥ６培地（Chenら、２０１１年）；データは示さない）を使用しても、同様の結果がを得ることができるであろう。プラコード誘導では、分化の３日目において、Ｎｏｇｇｉｎを除去した。一部の実験では、ＢＭＰ－４（Ｒ＆Ｄ、５０ｎｇ／ｍｌ）、Ｎｏｇｇｉｎ（Ｒ＆Ｄ、２５０ｎｇ／ｍｌ）、ＤＫＫ－１（Ｒ＆Ｄ、１００ｎｇ／ｍｌ）、ＦＧＦ８（Ｒ＆Ｄ、５０ｎｇ／ｍｌ）、ＳＵ５４０２（Ｔｏｃｒｉｓ、１０μＭ）、Ｗｎｔ－３ａ（Ｒ＆Ｄ、５０ｎｇ／ｍｌ）、ＤＡＰＴ（Ｔｏｃｒｉｓ、１０μＭ）、ＣＨＩＲ９９０２１（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ、３μＭ）、シクロパミン（Ｔｏｃｒｉｓ、１０μＭ）、ソニックヘッジホッグ（Ｃ２５ＩＩ－Ｒ＆Ｄ、１００ｎｇ／ｍｌ）、およびプルモルファミン（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ、１μＭ）を添加した。

【０３９７】

（実施例ＩＸＸ）

三叉神経感覚ニューロンの終末分化：プラコードクラスターを、１３～１７日目において、手作業で単離した。クラスターを、１５μｇ／ｍＬのポリオルニチン、１μｇ／ｍＬのラミニン（Ｐｏ／Ｌａｍ）であらかじめコーティングされた培養ディッシュへと再プレーティングし、アスコルビン酸（ＡＡ、０．２ｍＭ）およびＢＤＮＦ（２０ｎｇ／ｍＬ）を補充されたＮ２培地中で維持した。電気生理学実験では、チャンバー内の細胞の生存を延長するＡＣＳＦ中で、ＮＧＦ阻害剤およびＲＯＣＫ阻害剤を使用した。

【０３９８】

（実施例ＸＸ）

ホルモン産生細胞の分化：プラコード誘導プロトコールでは、ＰＩＰの７～１１日目の間において、ソニックヘッジホッグ（Ｃ２５ＩＩ－Ｒ＆Ｄ、１００ｎｇ／ｍｌ）およびプルモルファミン（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ、１μＭ）を添加して、下垂体プラコード原基への分化を促進した。細胞は、Ｎ２培地中の継代培養を伴わずに維持し、分化の１３日目～１７日目の間において、ＤＡＰＴ（Ｔｏｃｒｉｓ、１０μＭ）など、さらなる因子で処理して、ＰＩＴ１＋／ＧＡＴＡ２＋先駆細胞を誘導した（図３９Ａを参照されたい）。

【０３９９】

（実施例ＸＸＩ）

定量的リアルタイムＰＣＲ：全ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）またはＴｒｉｚｏｌを使用して抽出した。各試料について、１μｇずつの全ＲＮＡを、ＤＮＡａｓｅで処理し、Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ　ＲＴキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して逆転写した。増幅された材料は、ＴａｑｍａｎプローブおよびＰＣＲミックス（ＡＢＩ）を、Ｍａｓｔｅｒｃｙｃｌｅｒ　ＲｅａｌＰｌｅｘ２（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で使用して検出した。全ての結果は、ＨＰＲＴハウスキーピング遺伝子対照に照らして標準化したものであり、少なくとも３つの独立の実験の各々による技法上の４～６回反復に基づく。

【０４００】

（実施例ＸＸＩＩ）

【０４０１】

マイクロアレイ解析：全ＲＮＡは、Ｔｒｉｚｏｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、分化の１、３、５、７、９、および１１日目において、対照（ＮＳＢ）およびＰＩＰの両方から単離した。時点１つ当たり生物学的３連を使用した。全ての試料は、ＭＳＫＣＣ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙで加工し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｈｕｍａｎ－６オリゴヌクレオチドアレイ上でハイブリダイズさせた。四分位数による標準化およびモデルベースの発現測定は、Ｐａｒｔｅｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　Ｓｕｉｔｅ（Ｐａｒｔｅｋ　ＧＳ）（Downey、２００６年）を使用することにより実施した。ＮＳＢとＰＩＰとの対応のある比較を実施した。補正されたｐ値が＜０．００１であり、倍数変化が２を超えることが見出された遺伝子は、有意であると考えた。発現の差異は、倍数変化のｌｏｇ２として報告する。遺伝子オントロジー濃縮は、遺伝子リストを、Ｄａｔａｂａｓｅ　ｆｏｒ　Ａｎｎｏｔａｔｉｏｎ，　Ｖｉｓｕａｌｉｚａｔｉｏｎ，　ａｎｄ　Ｉｎｔｅｇｒ

ａｔｅｄ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＤＡＶＩＤ；david.niaid.nih.gov）（Dennisら、２００３年；Huangら、２００９年）へと入力することにより決定した。

【０４０２】

（実施例ＸＸＩＩＩ）

顕微鏡法、抗体、およびフローサイトメトリー：細胞は、４％のパラホルムアルデヒドを使用して、１５分間にわたり固定し、ＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中に０．３％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘを使用して透過処理し、１％のＢＳＡを使用してブロッキングした。顕微鏡法のために使用される抗体は、ＰＡＸ６（Ｃｏｖａｎｃｅ、ＤＳＨＢ）、ＴＵＪ１（Ｃｏｖａｎｃｅ）、ＢＲＮ３Ａ（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）、ＡＰ２ａ（ＤＳＨＢ）、ＨＮＫ１（Ｓｉｇｍａ）、ＰＡＸ３（ＤＳＨＢ）、ＳＩＸ１（ＡＢＲ、Ａｔｌａｓ）、ＩＳＬ１（ＤＳＨＢ）、ペリフェリン（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ＧＳＵ（A. McNeillyによる恵与）、ＣＲＹＡＢ（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）、ＤＡＣＨ１（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ）、ＥＹＡ１（Kawakamiによる恵与）、Ｅ－ＣＡＤＨＥＲＩＮ（Ａｂｃａｍ）、ＦＳＨ（A. McNeillyによる恵与）、ＧＡＴＡ２（Ａｂｃａｍ）、ニワトリＧＦＰ（Ａｂｃａｍ）、ｈＮＣＡＭ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、グルタメート（Ｓｉｇｍａ）、ＫＲＴ１４（Ｌａｂｖｉｓｉｏｎ）、ＳＩＸ６（Ａｔｌａｓ）、ＬＨＸ３（Ａｂｃａｍ）、ＯＶＯＬ２（Ａｖｉｖａ）、ＴＦＡＰ２Ａ（ＤＳＨＢ）、ＦＯＸＧ１（E. Laiによる恵与）、ｈＣＡ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ）、およびＫｉ６７（Ｓｉｇｍａ）を含んだ。適切な二次抗体であるＡｌｅｘ４８８、Ａｌｅｘ５６８、Ａｌｅｘ６４７（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）および／またはＤＡＰＩ対比染色は、視覚化のために使用した。フローサイトメトリーのためには、２５℃で２０分間にわたる、アキュターゼへの曝露の後で、細胞を機械的に解離させた。ＦＡＣＳ解析における死滅細胞集団を消失させるため、本発明者らは、製造元の推奨に従い、ＤＡＰＩまたは７－ＡＡＤを使用した。細胞は、ＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）およびＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ，Ｉｎｃ．）を使用して解析した。

【０４０３】

（実施例ＩＶＸＸ）

電気生理学：クラスターを、スライドガラス上に播種した。スライドガラスは、以下：１１９ｍＭのＮａＣｌ、２．５ｍＭのＫＣｌ、２６．２ｍＭのＮａＨＣＯ３、２．５ｍＭのＣａＣｌ２、１．３ｍＭのＭｇＣｌ２、１ｍＭのＮａＨ２ＰＯ４、および２０ｍＭのグルコース（ｐＨ７．４、浸透圧：３００ｍＯｓｍ）を含有する、人工ＣＳＦ（ＡＣＳＦ）中で回収し、記録の前に、室温で最短で１時間にわたり、５％のＣＯ２／９５％のＯ２で通気処理する。記録中、切片は、常時、ＡＣＳＦで還流した。全細胞記録は、クラスターから遊走するニューロンであって、クラスターの中心における細胞より成熟している傾向があるニューロンから作成した。パッチ電極に、以下：１３０ｍＭのグルコン酸Ｋ、１６ｍＭのＫＣｌ、２ｍＭのＭｇＣｌ２、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、０．２ｍＭのＥＧＴＡ、４ｍＭのＮａ２－ＡＴＰ、および０．４ｍＭのＮａ３－ＧＴＰ（ｐＨ７．２５、浸透圧：２９０ｍＯｓｍ）を含有する細胞内溶液（５～８Ｍ）を充填した。各細胞の膜電位は、パッチが破裂した直後に、かつ、実験の経過にわたり定期的に同定して、細胞健康に顕著な劣化が見られないことを確認した。自発的な微小シナプス電流を、－６０ｍＶに保持された電圧クランプ方式で記録した。段階的な脱分極電流および過分極電流（０．２Ｈｚ；持続時間：５００ミリ秒）を、細胞へと適用して、それらの電気生理学的プロファイルを特徴付ける一助とした。各細胞について最低３回の試行では、全てのパラメータを測定し、平均値を計算した。

【０４０４】

（実施例ＸＸＶ）

ｉｎ　ｖｉｖｏにおける移植：全ての動物実験は、動物福利のために、本発明者らの施設のＡｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより承認されたプロトコールに準拠し、かつ、ＮＩＨガイドラインに従い行った。ホルモン産生細胞のマウスへの皮下注射：皮下移植では、０．５ｍｌのｍａｔｒｉｇｅｌ中に１×１０６個のｈＥ

ＳＣから派生した下垂体細胞（分化の１６日目および３２日目における）またはｍａｔｒｉｇｅｌ単独（対照としての）を、８週齢の成体雄ＮＯＤ－ＳＣＩＤ　ＩＬ２Ｒｇｃヌル株マウスおよび８週齢の成体雄ヌードラット（Ｔａｃｏｎｉｃ）へと注射した。ＲＡＲＣガイドラインに準拠する、全血液回収または眼窩後血液回収は、。移植の１週間、４週間、および６週間後に、血漿からのホルモン測定のために実施した。動物は、移植の２日後、１週間後、および６週間後において屠殺し、組織学のために加工した。成体マウスからのＭａｔｒｉｇｅｌプラグを、４％のパラホルムアルデヒド中で固定し、免疫組織化学解析のために、低温切片化した。

【０４０５】

（実施例ＸＸＶＩ）

ニワトリ三叉神経節原基への移植：ｉｎ　ｏｖｏ移植では、受精卵（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）を、加湿インキュベーター内、３７℃でインキュベートした。ＧＦＰ　ｈＥＳＣ－プラコードから派生したニューロンを、ＨＨ段階９～１０のニワトリ胚のプロスペクティブな三叉神経節へと移植した。受精卵は、ＨＨ段階２０までインキュベートした。ニワトリ胚は、中脳神経管水準で、横断的に切片化して、三叉神経節を視覚化した。

【０４０６】

（実施例ＸＸＶＩＩ）

マウス橋領域への移植：定位手術［座標は、ラムダ：－０．７７、ブレグマ：－４．１６、Ｄ／Ｖ：４．６５、およびＭ／Ｌ：＋０．５（右）とした］を使用することにより、分化の２２日目における、ＧＦＰを発現させるｈＥＳＣから派生した三叉神経ニューロン／前駆細胞を、９週齢のＮＯＤ－ＳＣＩＤ　ＩＬ２Ｒｇｃヌル株マウスの右側橋へと移植した。各動物には、細胞２００，０００個を、１μｌ当たり１０万個の密度で移植した。ニワトリ胚および成体マウスからの組織を、４％のパラホルムアルデヒド中で固定し、免疫組織化学解析のために、低温切片化した。

【０４０７】

（実施例ＸＸＶＩＩＩ）

ＡＣＴＨおよびＧＨの放出についてのｉｎ　ｖｉｔｒｏ解析およびｉｎ　ｖｉｖｏ解析：ホルモン産生ｈＥＳＣから派生した細胞を、分化の３６日目において解析した。細胞をＨＢＳＳですすぎ、その後、未使用のＨＢＳＳへと曝露した（５００μｌ中、３７℃で１０分間にわたる）。その後、上清を回収し、ＡＣＴＨ　ＬｕｍＥＬＩＳＡキット（Ｃａｌｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、ＥＬＩＳＡにかけた。ＡＣＴＨはまた、ＥＬＩＳＡにかけた馴化培地からもたやすく検出された。ｉｎ　ｖｉｖｏ研究では、ｈＥＳＣから派生した下垂体前葉細胞およびｍａｔｒｉｇｅｌだけの対照を生着させたマウスおよびラットからの血液試料は、ストレスを最小化する条件下で、午前８時に、Ｋ２　ＥＤＴＡで処理されたＢＤ　Ｍｉｃｒｏｔａｉｎｅｒ　ＭＡＰ（ＢＤ）へと回収した。血漿は、冷蔵された遠心分離機を使用して、２，０００ｇで２０分間にわたる遠心分離により単離した。ホルモンレベルを測定するＥＬＩＳＡのために、上清を回収した。ＧＨレベルは、Ｈｕｍａｎ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｈｏｒｍｏｎｅ　ＥＬＩＳＡキット（Ｃａｌｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、移植後において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏのいずれにおいても同様に測定した。

【０４０８】

（実施例ＸＸＩＸ）

Ｅ８／Ｅ６細胞培養培地を使用するＰＩＰプロトコール：Ｅ８／Ｅ６細胞培養培地（Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ８（商標）／Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ６（商標）；Nat Methods.、２０１１年5月、8巻（5号）：４２４～9頁）は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、アスコルビン酸、セレン（selenum）、インスリン、$NaHCO_3$、トランスフェリン、ＦＧＦ２、およびＴＧＦβの成分を含む。Ｅ８／Ｅ６培地は、活性のＢＭＰ成分またはＷｎｔ成分を含まないという点で、本明細書で記載されるＫＳＲ培地と異なる。本実施例では、ＢＭＰ非含有Ｅ８／Ｅ６培地を活用する改変ＰＩＰプロトコールについて記載する。

【０４０９】

Ｓｉｘ１ノックインＧＦＰレポーター細胞系（ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰ）は、細胞が、いつ、プラコード運命へと転換されたのかについてモニタリングするために開発された（図４１Ａ～Ｅ）。レポーター細胞を、本明細書で記載されるＫＳＲ　ＰＩＰプロトコールに従って、Ｅ８／Ｅ６培地中で培養し、ここで、細胞を、ＳＭＡＤ阻害剤であるＳＢ４３１５４２およびＬＤＮ１９３１８９を含む培地中で培養し、培養の２日後において、ＬＤＮ１９３１８９を中断することにより、培養の１１日後において、低レベルのプラコード細胞がもたらされた（図４２Ａ～Ｂ）。Ｅ８／Ｅ６培地中に存在しないＢＭＰ４は、マーカーであるＡＰ２の発現により証拠立てられる通り、細胞が非神経外胚葉およびプラコードへと分化するのに必要である（図４３Ａ～Ｃ）。ＳＢ４３１５４２およびＢＭＰ４を含むＥ８／Ｅ６中で、ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰレポーター細胞を培養し、ここで、ＢＭＰ４培地中に５ｎｇ／ｍｌの濃度で存在する場合、培養の３日後において、ＢＭＰ４を中断することにより、プラコード発生が結果としてもたらされた。しかし、２０ｎｇ／ｍｌの濃度では、または５ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ４を伴う、５日間超にわたる培養では、プラコード先駆体ではなく、非神経外胚葉（皮膚先駆体）の誘導が結果としてもたらされた（図４４Ａ～Ｃ）。ＳＩＸ１：：Ｈ２Ｂ－ＧＦＰ細胞を、ＳＢ４３１５４２および５ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ４を伴うＥ８／Ｅ６中で培養し、ここで、培養の３日後において、ＢＭＰ４を中断する（１または２日間にわたる培養の後における中断と比較して）ことにより、Ｅ８／Ｅ６培地中でのべ６日間にわたる培養の後で、最高収量のプラコード先駆体がもたらされた（図４５Ａ～Ｂ）。改変ＰＩＰプロトコール（ＰＩＰ－Ｅ６であり、この場合、ＢＭＰ４は、５ｎｇ／ｍｌの濃度で存在し、３日目の後で中断される）に従って細胞を培養することにより、培養の１１日後において、多様なプラコードマーカーの誘導が結果としてもたらされた。また、多能性（ＯＣＴ４）の喪失、筋肉誘導（ＭｙｏＤ）または全般的な中胚葉誘導（ブラキウリ）の欠如、および内胚葉誘導（ＳＯＸ１７）または神経堤誘導（ＳＯＸ１０）の欠如も結果としてもたらされた（図４６および４７）。ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して誘導されるプラコード細胞の収量は低量であるが、誘導は、ＫＳＲ　ＰＩＰプロトコールと比較して、高度に一貫していた（図４８）。

【０４１０】

（実施例ＸＸＸ）

三叉神経プラコードをデフォルトとして誘導する改変ＰＩＰ－Ｅ６：ＫＳＲと異なり、Ｅ８／Ｅ６は、Ｗｎｔ活性化合物を含まない。三叉神経プラコード運命を、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して培養する場合のデフォルトの運命とするために、ＣＨＩＲ（Ｗｎｔ活性化因子）を、培養プロトコールへと添加することにより、ＰＩＰ－Ｅ６を改変した。ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールの２～４日目において、ＣＨＩＲを培地中に組み入れることにより、デフォルトプラコードとしての三叉神経プラコードの誘導を結果としてもたらした（図４９Ａ～Ｂ）。図５０は、ＰＩＰ－Ｅ６培養プロトコールを使用して誘導されうる、下垂体プラコード、水晶体プラコード、および三叉神経プラコードについて描示する。

【０４１１】

（実施例ＸＸＸＩ）

三叉神経プラコードマーカーであるＧＤ２およびＣＤ５７（ＨＮＫ１）の同定：Ｓｉｘ１：：ＧＦＰマーカー細胞を、図４９により記載されている通りに、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って培養した。培養の１１日後に、以下のステップを実施した。

・細胞を、９６ウェル１枚当たりの細胞５０，０００個の濃度で再プレーティングした。

・細胞を、４時間にわたる付着期において、プレートへと付着させた。

・ＢＤ　Ｌｙｏｐｌａｔｅを使用して、生細胞の染色を行った。

・２４２のヒト細胞表面抗原を検出した（大半はＣＤタンパク質）。

・細胞を、二次抗体による染色の後で固定した。

・翌日、Ｏｐｅｒｅｔｔａを使用して、細胞をイメージングした。

・Ｓｉｘ１：：ＧＦＰ＋／マーカー＋（Ａｌｅｘａ６４７＋）およびマーカー＋（Ａｌｅｘａ６４７＋）の％を定量化した。

【０４１２】
三叉神経プラコードについて濃縮される表面マーカーを、図５１に示す。マーカーＧＤ２を、三叉神経プラコードについてのマーカーとして同定し、その後、三叉神経プラコードの、本明細書で記載される条件下で培養されたヒトＥＳＣ／ｉｐＳＣ細胞からの単離のために使用した。ＧＤ２は、神経芽細胞腫など、神経外胚葉起源の腫瘍を含む神経組織上で発現するジシアロガングリオシドである。ＧＤ２の構造を、図５２に示す。図５３Ａ～Ｂは、三叉神経プラコード細胞内の、ＧＤ２およびプラコードマーカーであるＳＩＸ１：：ＧＦＰの共発現を示す。図５４Ａ～Ｂは、陽性対照細胞を示し、ここでは、ＣＤ２４およびＳＩＸ１：：ＧＦＰが、三叉神経プラコードを含む全ての神経細胞内で発現する。
【０４１３】
また、ＣＤ５７（ＨＮＫ１）も、三叉神経プラコードを同定および単離するのに有用でありうるマーカーとして同定した（図５５）。プラコード細胞内の、ＣＤ５７（ＨＮＫ１）およびＳＩＸ１：：ＧＦＰの共発現を、図５６Ａ～Ｂに示す。
【０４１４】
図５７は、デフォルトプラコードとしての三叉神経プラコード運命をもたらすのに使用されうるＰＩＰ－Ｅ６プロトコールであって、プラコードが、それらによるＧＤ２マーカーの発現に基づき単離および分取されるプロトコールについて記載する。これらの培養条件下において、細胞を、ＳＢ４３１５４２、ＢＭＰ４、およびＣＨＩＲ９９０２１（Ｗｎｔ）を補充されたＥ８／Ｅ６培地中で培養するが、ここでは、培養の３日後において、ＢＭＰを中断し、約１．５～３．５日目において、ＣＨＩＲ９９０２１（Ｗｎｔ）を、培地中に組み入れる。分取後、細胞を、培地中で（ＢＤＮＦ、ＧＤＮＦ、ＮＧＦ、およびＤＡＰＴ（Ｎｏｔｃｈ阻害剤）を補充されたＮＢＭ／Ｂ２７培地中で）培養して、三叉神経分化を支援した。図５８は、分化の２８日後における（ＧＤ２による分取の１４日後における）、ＧＤ２陽性三叉神経細胞の形状を、ＧＤ２陰性細胞と比較して示す。図５９は、分化の４８日後における（ＧＤ２による分取の３３日後における）三叉神経ニューロンを示す。
【０４１５】
（実施例ＸＸＩＩ）
プラコード誘導を促進する化合物についてのハイスループットスクリーン：ＳＩＸ１：：ＧＦＰ細胞を、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って培養した。１２８０の被験化合物を、プラコード誘導を増強するそれらの能力についてスクリーニングした。各被験化合物を、３日目において、細胞培養培地へと添加し、６日目において、細胞をイメージングして、プラコード誘導のレベルを決定した（図６０）。図６１は、スクリーンの結果を示す。３つの候補化合物：ＢＲＬ－５４４４３、フェナントロリン一水和物、およびパルテノリドを、プラコード誘導を促進する化合物として同定した（図６１および図６２）。
【０４１６】
（実施例ＸＸＩＩＩ）
下垂体前葉細胞の誘導：下垂体プラコード細胞は、ＳＩＸ１：：ＧＦＰ細胞を、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って培養することにより誘導したが、ここでは、６～１５日目において、下垂体因子である、ＳＨＨ、ＦＧＦ８、ＦＧＦ１０、および／または視床下部ＣＭを、培養培地中に補充した（図６３Ａ）。図６３Ｂに示す、マーカーであるＰｉｔｘ１、Ｐｉｔｘ２、Ｌｈｘ３、およびＬｈｘ４の発現により証拠立てられる通り、下垂体プラコードは、誘導された。下垂体マーカーは、補充物質を伴わずに、ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを単独で使用して誘導されたプラコード内の、１０～１００倍発現した。改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用する、３０日目までの分化の後で、下垂体プラコード細胞は、３つの下垂体先駆体系列全ての派生体に対応するホルモン発現細胞へと分化した（図６４および図６５）。３つの先駆体系列各々の比率は、細胞をＮｏｔｃｈシグナル伝達の阻害剤（ＤＡＰＴ）で処理することによりモジュレートされ、より小さな程度において、ＣＨＩＲ（Ｗｎｔの活性化因子）によりモジュレートされた（図６５）。
【０４１７】

ホルモン発現細胞は、外部刺激に対して応答性であった。特に、ソマトクリニンによる刺激に応答して、細胞は、成長ホルモン（ＧＨ）を放出し、ナファレリンに応答して、細胞は、濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）を放出した（図６６）。改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って誘導された下垂体細胞を、ＢＭＰ２および／またはＦＧＦ８と共に培養して、このような薬剤により、亜型特異的マーカーである、Ｔｂｘ１９、Ｐｉｔ１、ＧＡＴＡ２、ＰＯＭＣ１、ＧＨ１、ＦＤＨＭ、およびＬＨＢを発現する下垂体細胞の収量を操作しうるのかどうかを決定した。ＢＭＰ２は、複数の亜型特異的マーカーの収量を増大させることが可能であった（図６７）。

【０４１８】

（実施例ＸＸＸＩＶ）

下垂体前葉細胞の誘導：ＳＩＸ１：：ＧＦＰ　ｈＰＳＣを、改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールに従って培養したが、ここでは、６～１４日目において、ＦＧＦ８、ＦＧＦ１０、またはＳＨＨなどの下垂体因子を、培養培地中に組み入れた。細胞は、ＳＩＸ１：：ＧＦＰの発現に基づき分取し、ＰＯ／Ｌ／Ｆ上、１ｃｍ^{2}当たりの細胞１０，０００個の濃度で再プレーティングし、低分子／増殖因子と共に、２週間にわたりインキュベートした（図６８）。図６９に示す、Ｋｉ６７およびＳｏｘ２の発現により証拠立てられる通り、ＦＧＦ２およびＦＧＦ８は、推定下垂体幹細胞の数を増大させうる（図６９）。

【０４１９】

（実施例ＸＸＸＶ）

ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける下垂体ホルモン放出細胞の分化混合物のラットへの移植：先行する２つの実施例で記載した改変ＰＩＰ－Ｅ６プロトコールを使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ヒトＰＳＣから派生した下垂体ホルモン放出細胞の混合物を、下垂体／視床下部に隣接する、非罹患成体ラット脳へと移植した。移植された細胞は、存続し、移植された動物における、検出可能なＡＣＴＨレベルを、対照と比較して上昇させた（図７０）。誘導された下垂体ホルモン放出細胞の混合物を、下垂体摘出ラットへと移植したところ、ＡＣＴＨレベルは、移植された動物３匹中２匹において増大すると考えられた（図７１）。

【０４２０】

上記の明細書で言及された全ての刊行物および特許は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の範囲および精神から逸脱しない限りにおいて、本発明の記載された方法および系の多様な改変および変更は、当業者には明らかであろう。本発明を、具体的な好ましい実施形態との関係で記載してきたが、特許請求される本発明を、このような具体的な実施形態に、不必要に限定するべきではないことを理解されたい。実際、本発明を実行するための記載された方式についての多様な改変であって、細胞生物学、神経生物学、がん細胞生物学、分子生物学、生化学、化学、有機合成、または関連する分野における当業者に明白な改変は、以下の特許請求の範囲内にあることを意図する。

【図１ａ－ｃ】

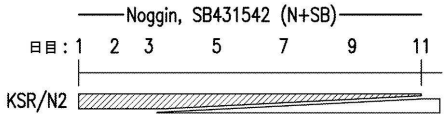


FIG.1a

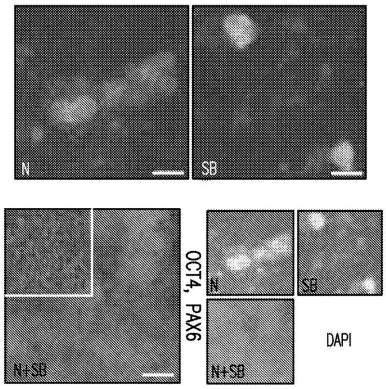


FIG.1b

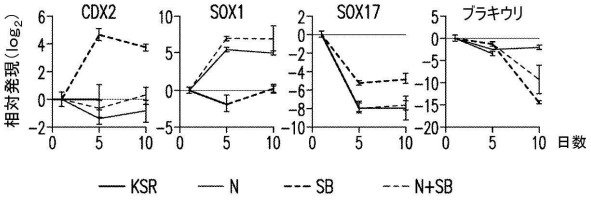


FIG.1c

【図１ｄ－ｇ】

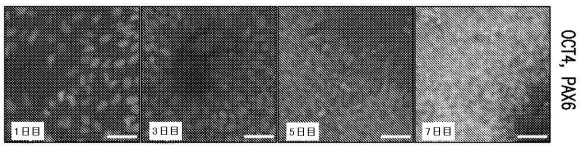


FIG.1d

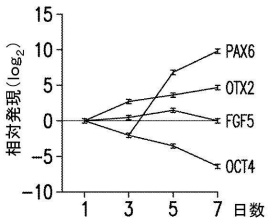


FIG.1e

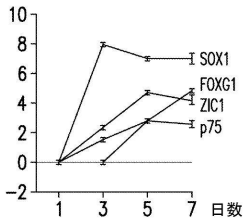


FIG.1f

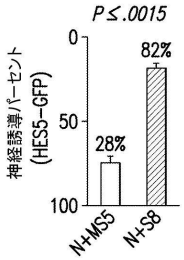


FIG.1g

【図２】

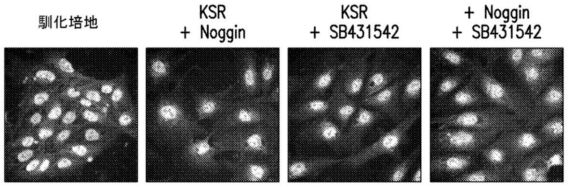


FIG. 2

【図４】

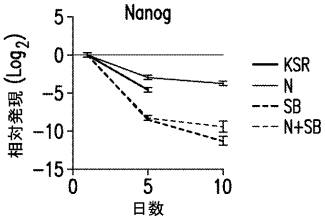


FIG. 4

【図３】

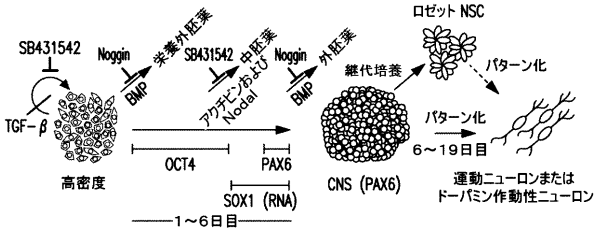


FIG. 3a

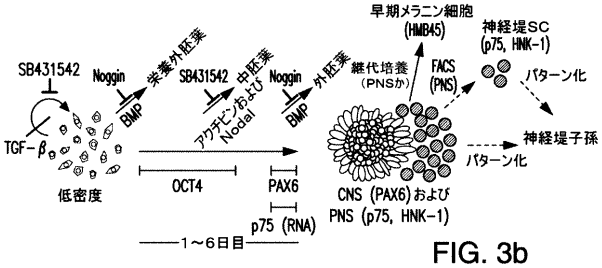


FIG. 3b

【図５】

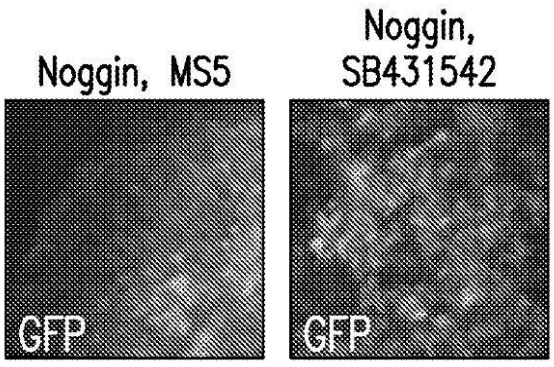


FIG. 5

【図６】

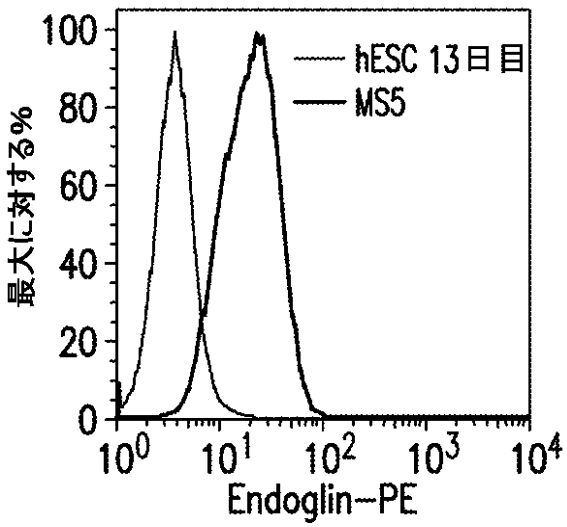


FIG. 6

【図７ａ－ｌ】

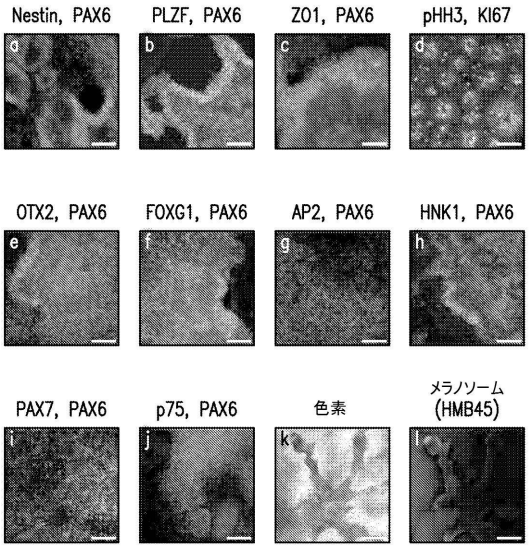


FIG. 7

【図７ｍ－ｒ】

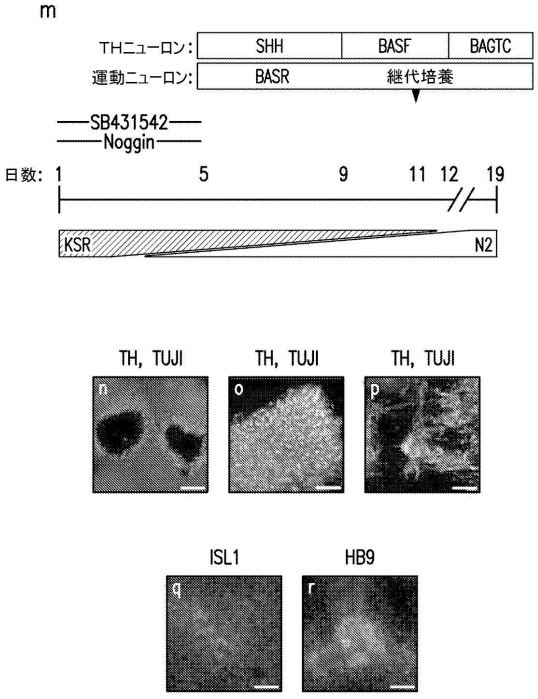


FIG. 7（続き）

【図８】

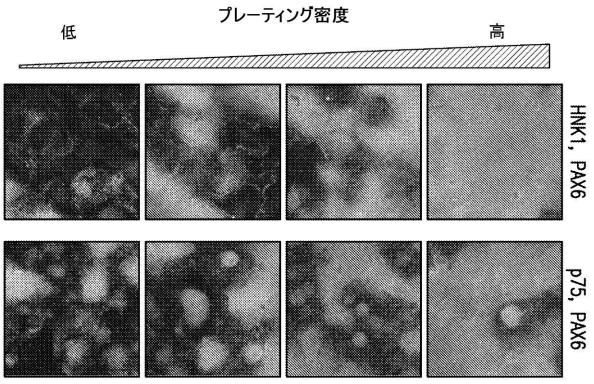


FIG. 8

【図９】

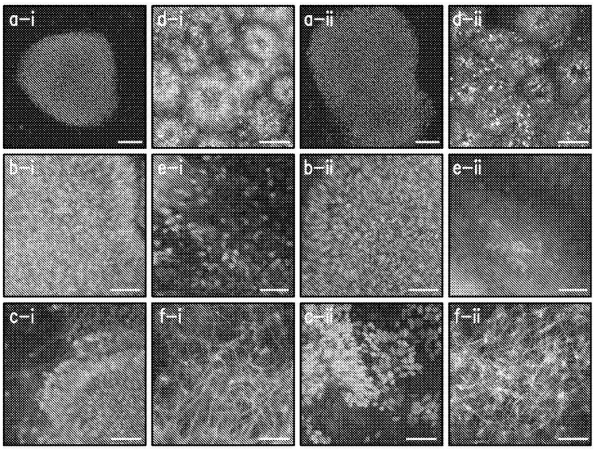


FIG. 9

【図１０】

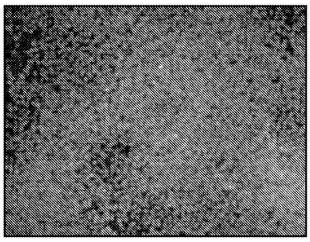


FIG. 10

【図１１Ａ－Ｂ】

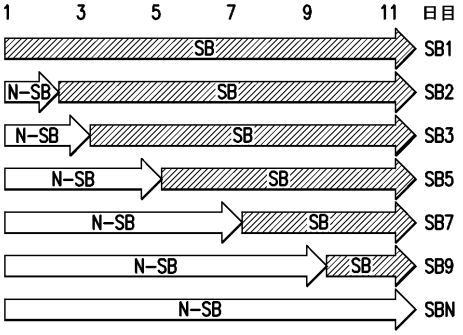


FIG. 11A

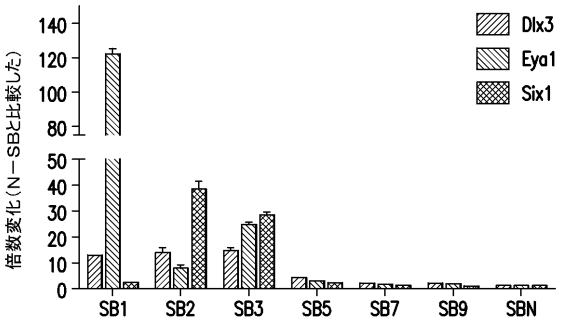


FIG. 11B

【図１１Ｃ－Ｄ】

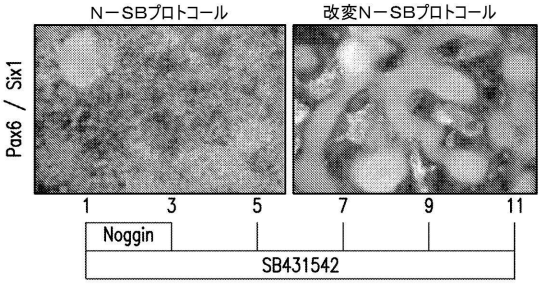


FIG. 11C

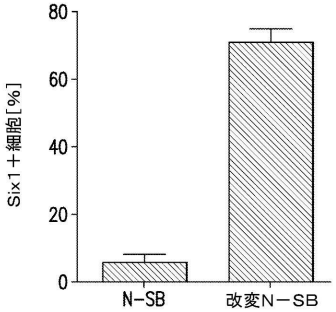


FIG. 11D

【図１２Ａ】

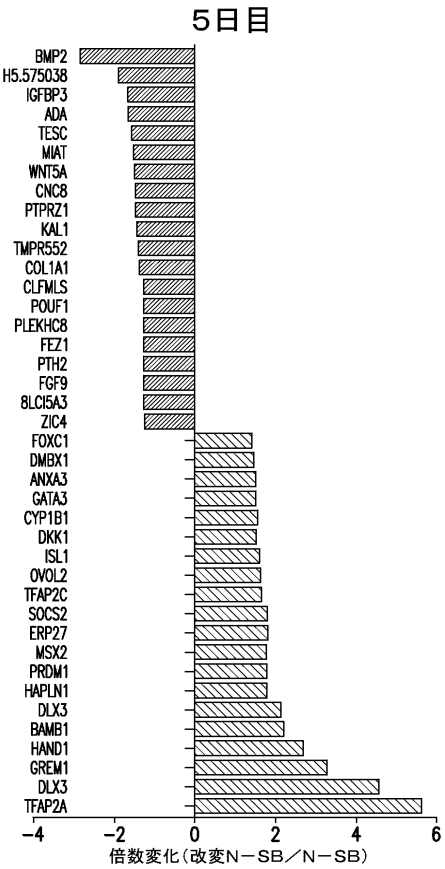


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

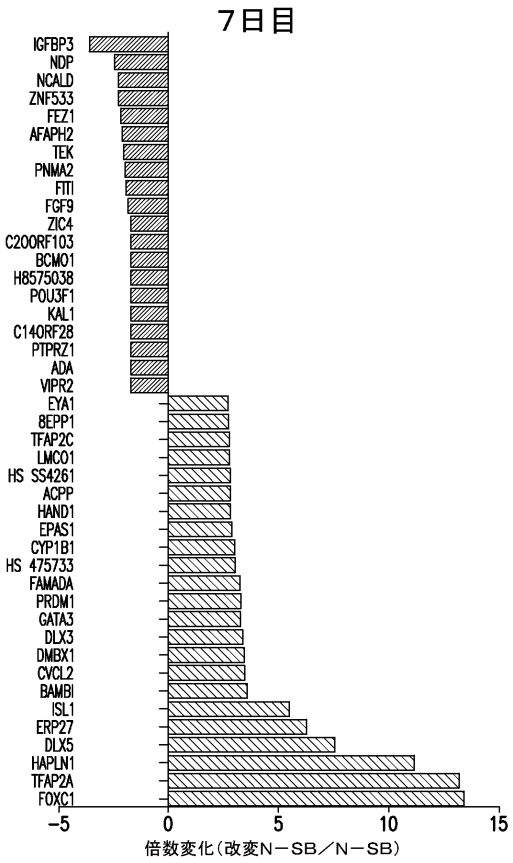


FIG. 12B

【図１２Ｃ】

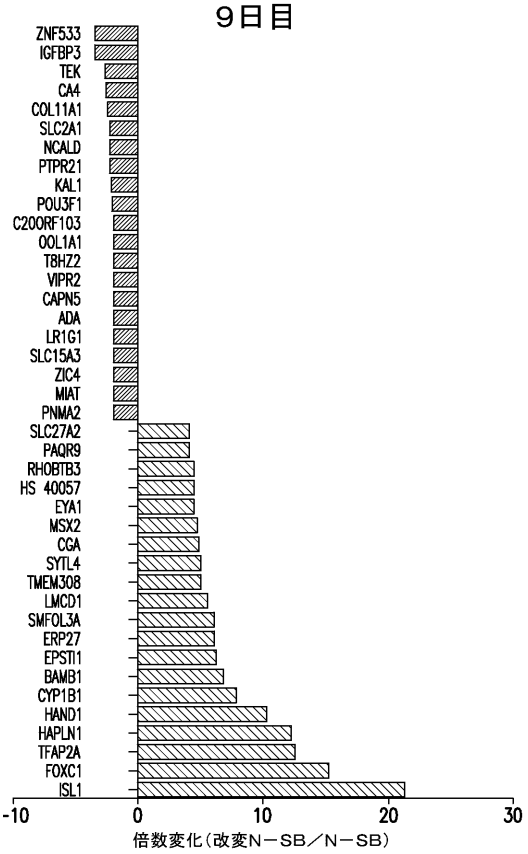


FIG. 12C

【図１２Ｄ】

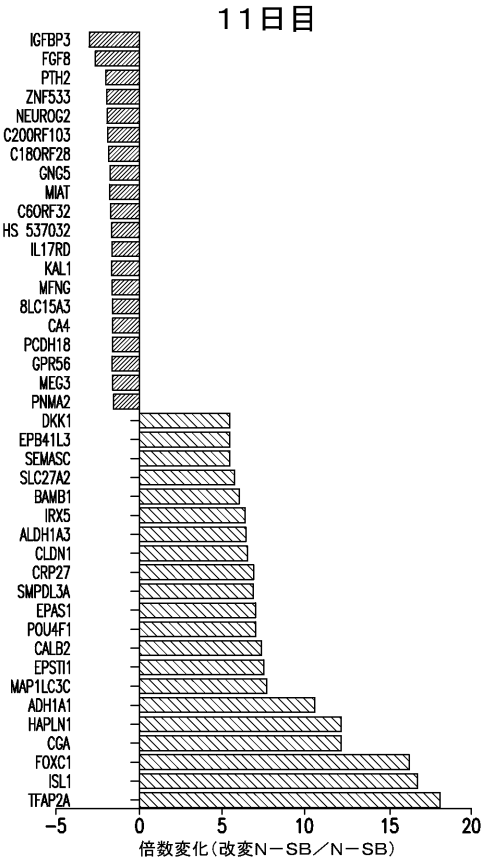


FIG. 12D

【図１２Ｅ】

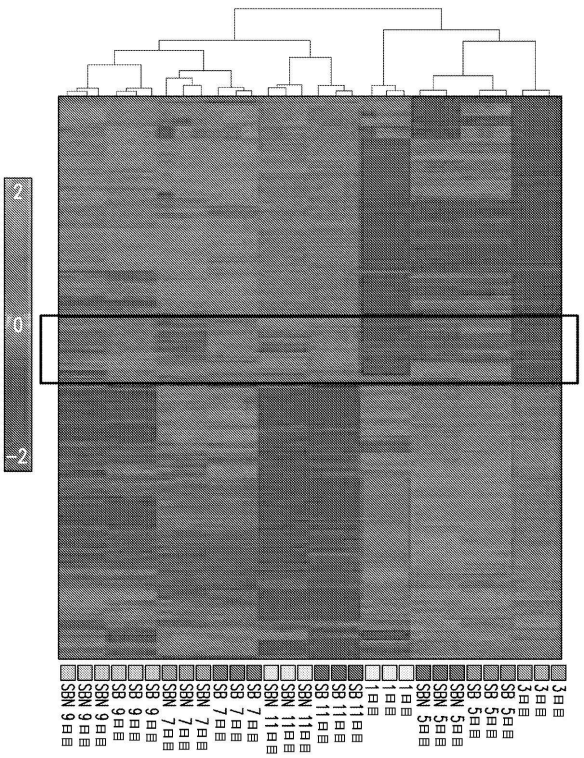


FIG. 12E

【図１２Ｆ】

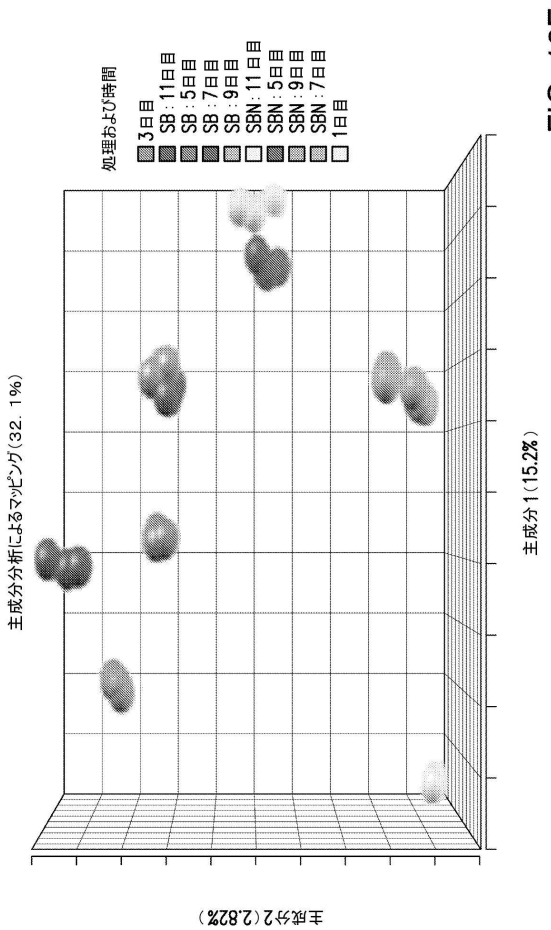


FIG. 12F

【図１３】

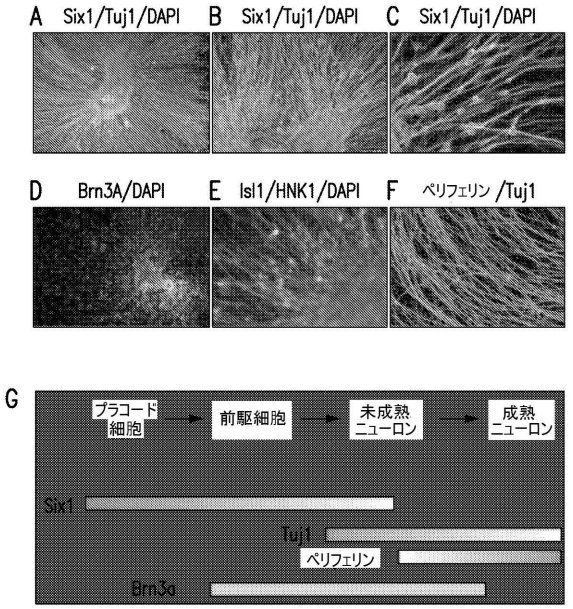


FIG. 13

【図１４Ａ－Ｂ】



FIG. 14A

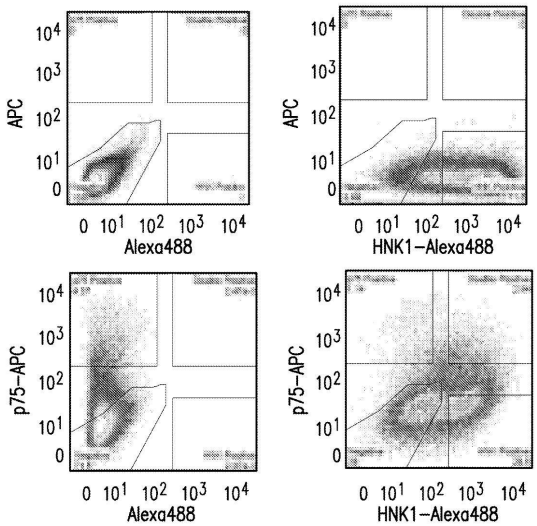


FIG. 14B

【図１４Ｃ－Ｄ】

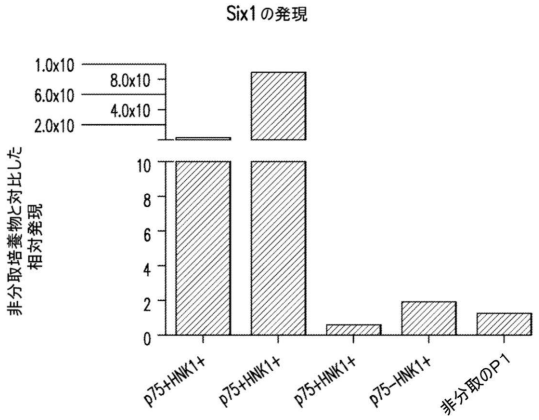


FIG. 14C

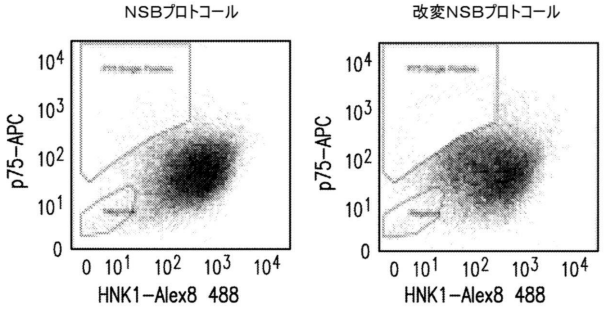


FIG. 14D

【図１５Ａ－Ｄ】

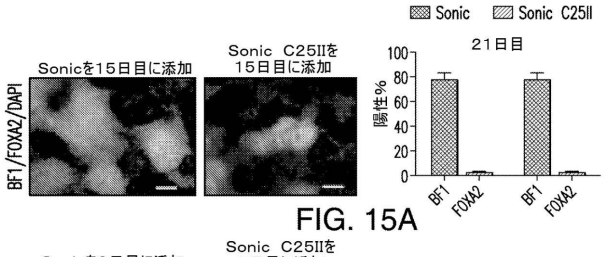


FIG. 15A

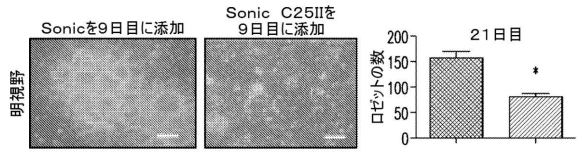


FIG. 15B

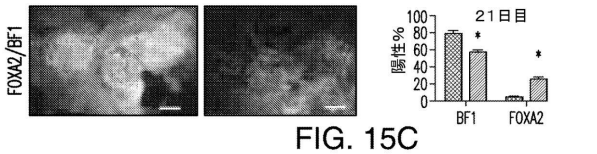


FIG. 15C

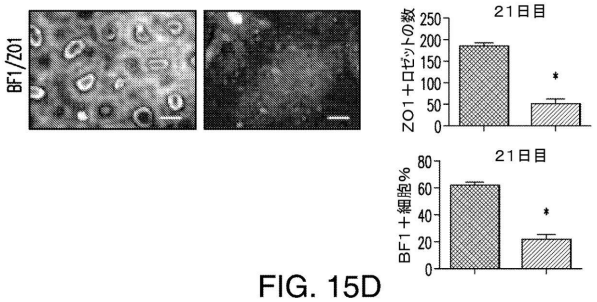


FIG. 15D

【図１５Ｅ－Ｇ】

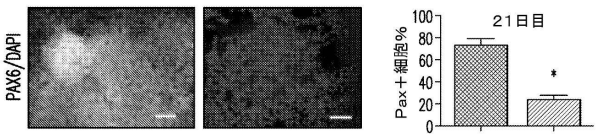


FIG. 15E

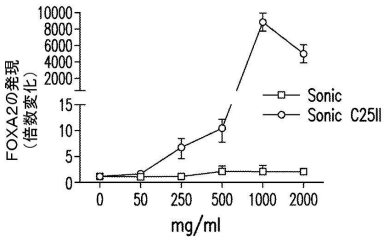


FIG. 15F

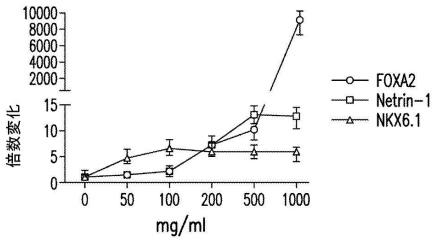


FIG. 15G

【図１６Ａ－Ｂ】

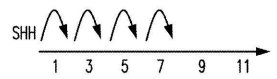


FIG. 16A

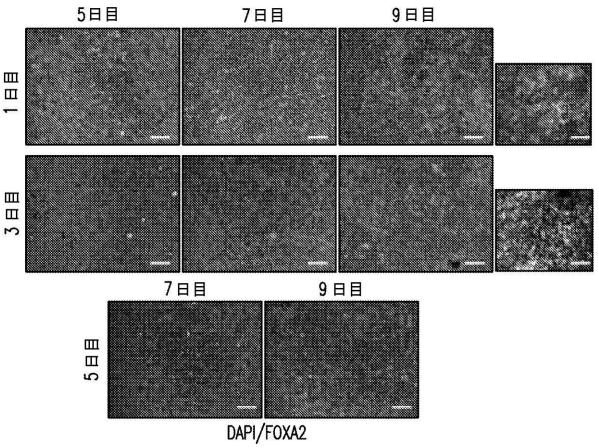


FIG. 16B

【図１６Ｃ－Ｅ】

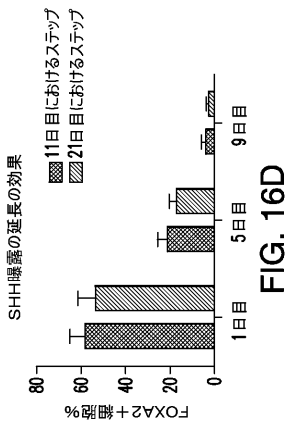


FIG. 16D

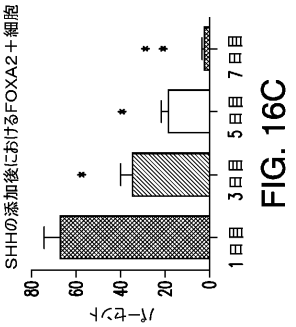


FIG. 16C

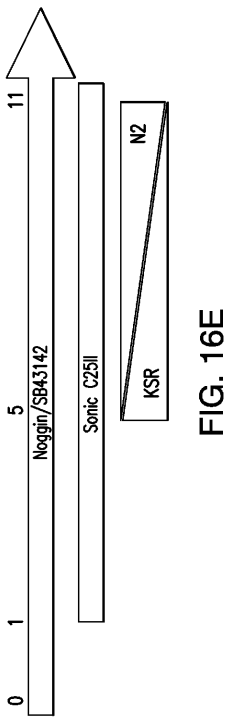


FIG. 16E

【図１７－１】

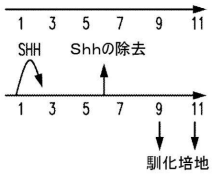


FIG. 17A

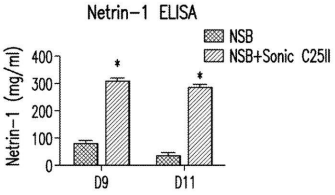


FIG. 17B

【図１７－２】

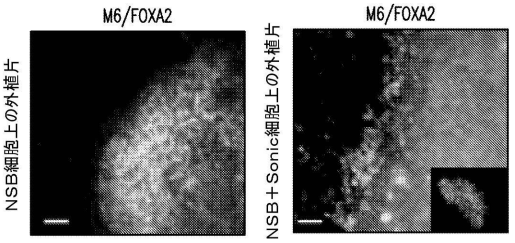


FIG. 17D

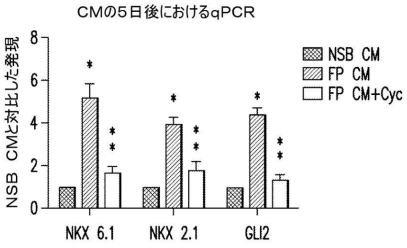


FIG. 17C

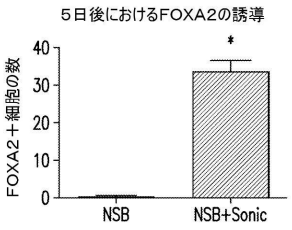


FIG. 17E

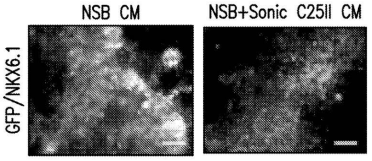


FIG. 17C'

【図１８Ａ－Ｆ】

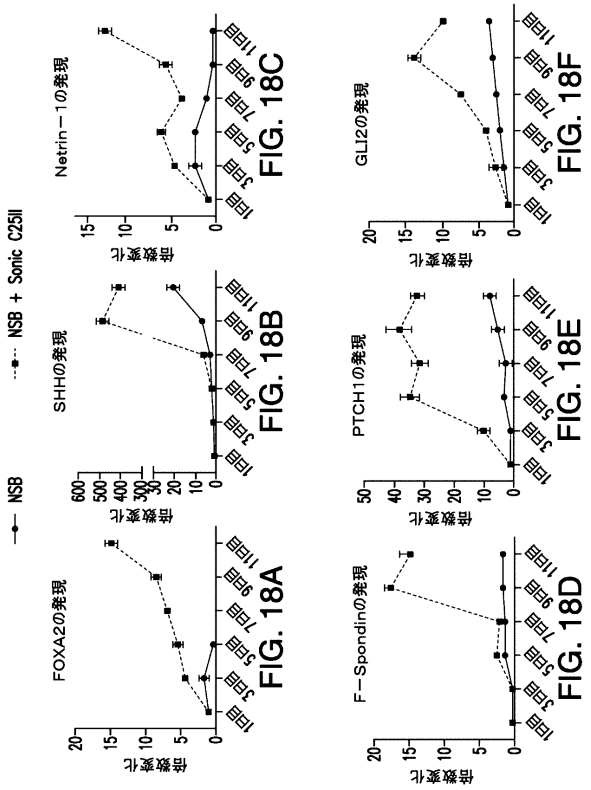


FIG. 18A
FIG. 18B
FIG. 18C
FIG. 18D
FIG. 18E
FIG. 18F

【図１８Ｇ－Ｌ】

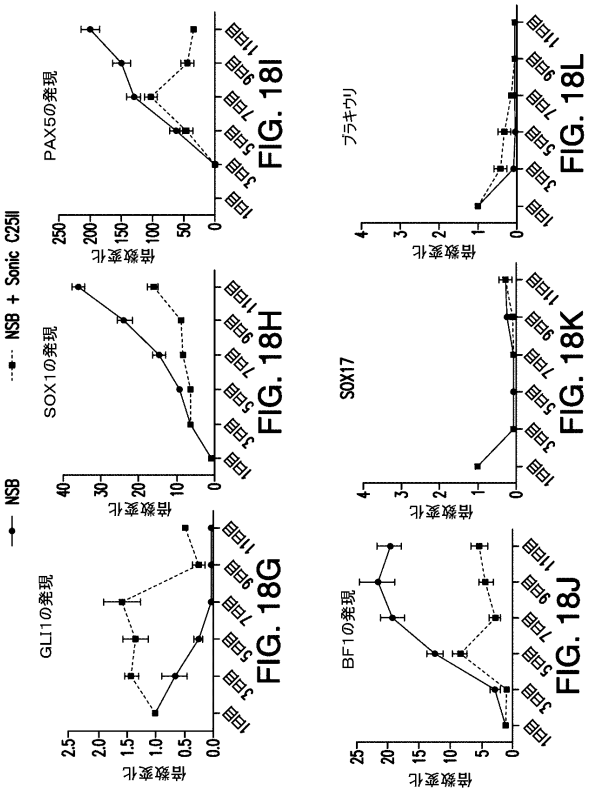


FIG. 18G
FIG. 18H
FIG. 18I
FIG. 18J
FIG. 18K
FIG. 18L

【図１８Ｍ－Ｐ】

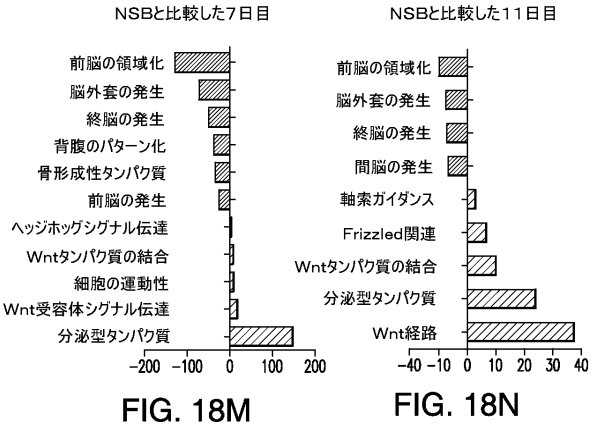


FIG. 18M　FIG. 18N

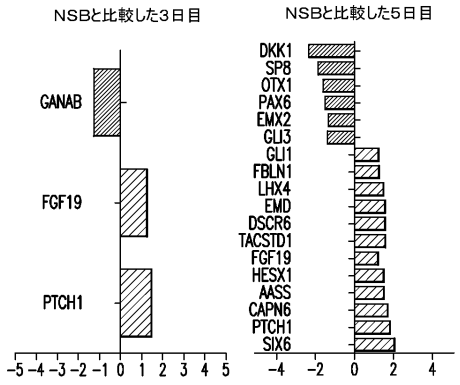


FIG. 18O　FIG. 18P

【図１８Ｑ－Ｒ】

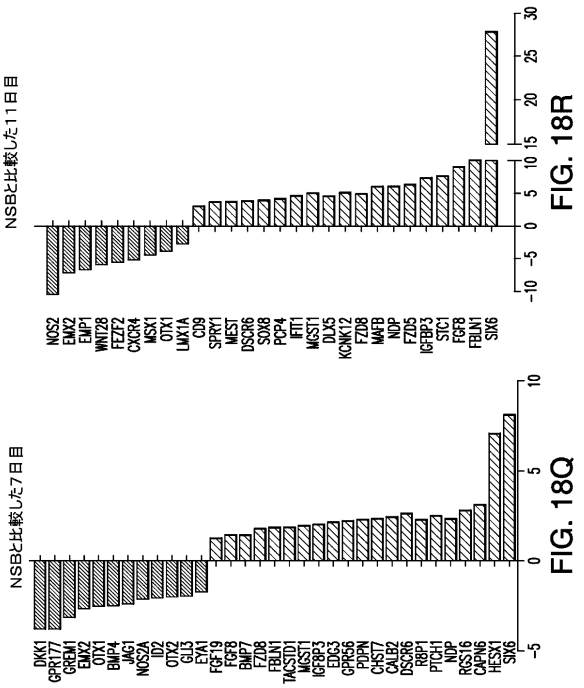


FIG. 18R　FIG. 18Q

【図１９Ａ－Ｅ】

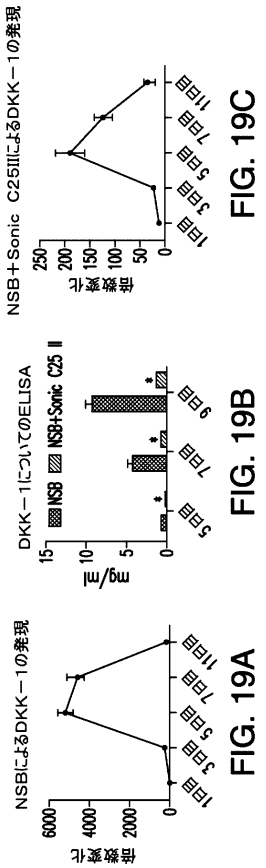


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

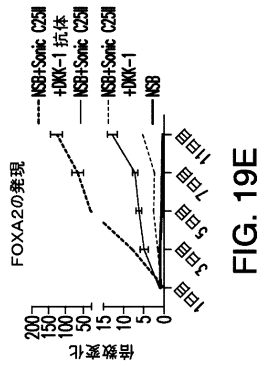


FIG. 19E

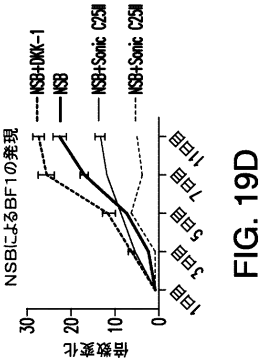


FIG. 19D

【図１９Ｆ－Ｈ】

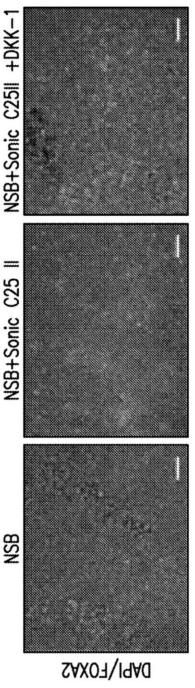


FIG. 19F

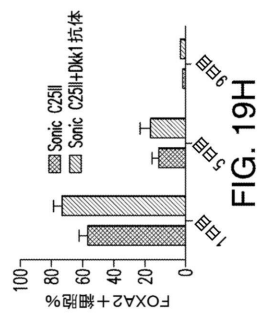


FIG. 19H

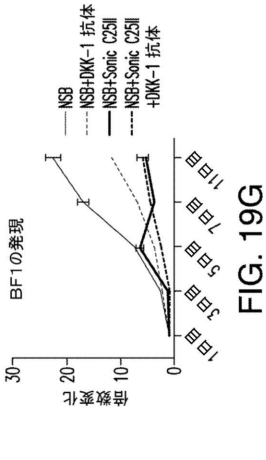


FIG. 19G

【図１９Ｉ－Ｋ】

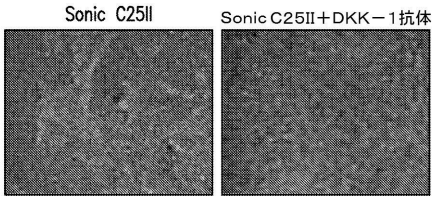


FIG. 19I

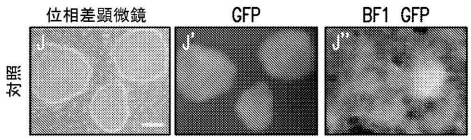


FIG. 19J

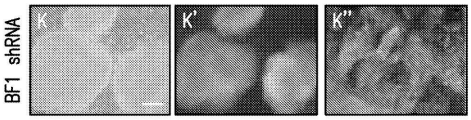


FIG. 19K

【図１９Ｌ－Ｍ】

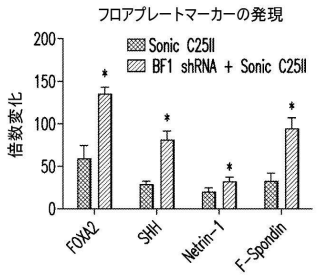


FIG. 19L

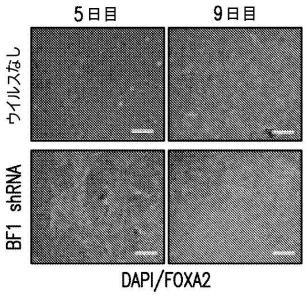


FIG. 19M

【図２０Ａ－Ｃ】

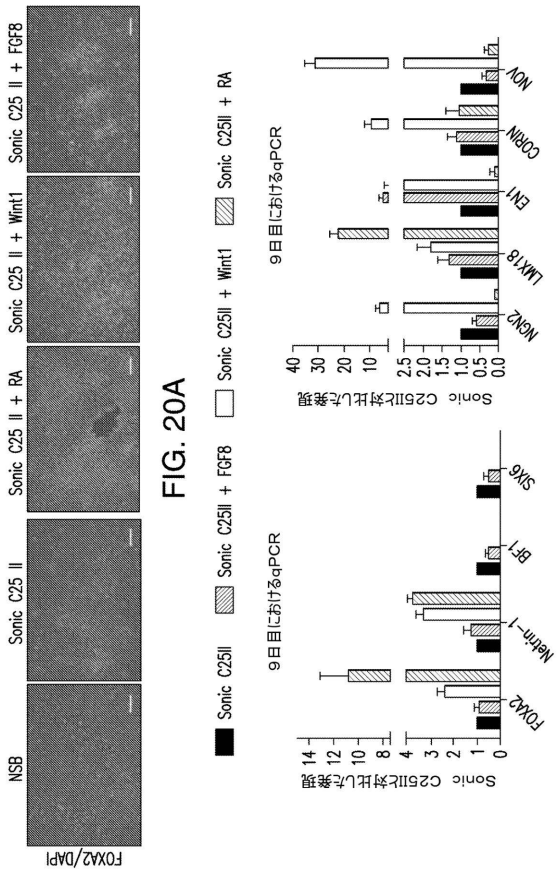


FIG. 20A

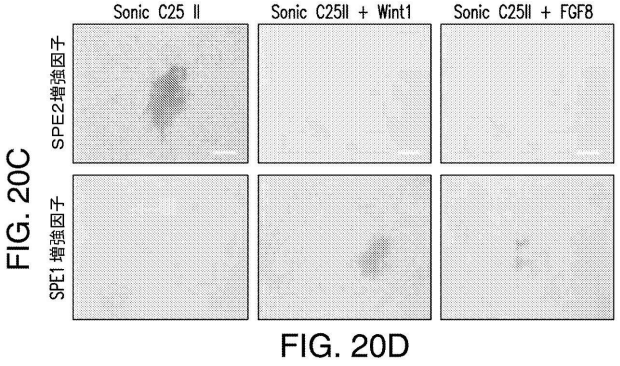


FIG. 20D

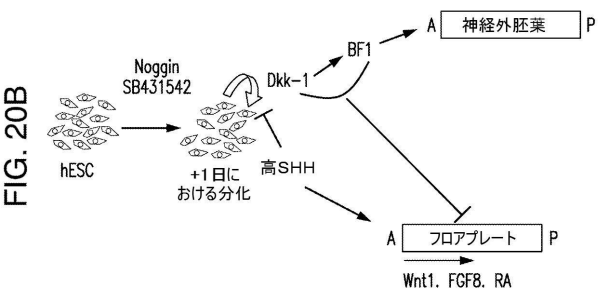


FIG. 20B

FIG. 20E

【図２１Ａ－Ｂ】

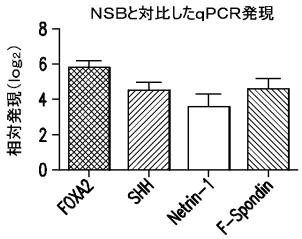


FIG. 21A

抗体名	染色	百分率
Nestin	+++	86 ± 6
Tuj1	++	37 ± 7
Nkx2.2	+	13 ± 4
TH	+	4 ± 1
SOX2	+	17 ± 5
SOX17	−	
AFP	−	
アルブミン	−	
BF1	−	
DCX	−	
S100B	−	
PAX6	−	
SOX1	−	
ブラキウリ	−	
ムサシ	−	

FIG. 21B

【図２１Ｃ－Ｆ】

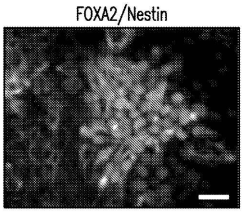


FIG. 21C

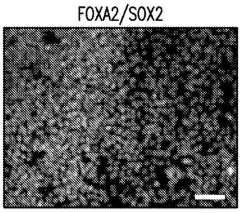


FIG. 21D

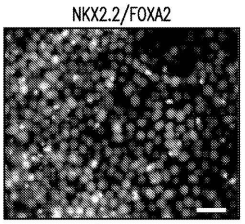


FIG. 21E

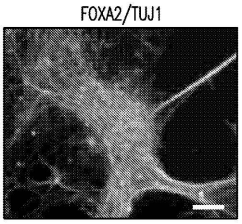


FIG. 21F

【図２１Ｇ－Ｈ】

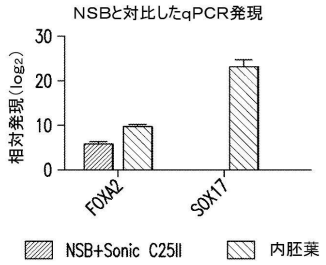


FIG. 21G

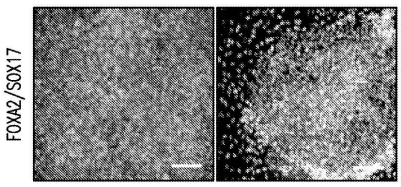


FIG. 21H

【図２２】

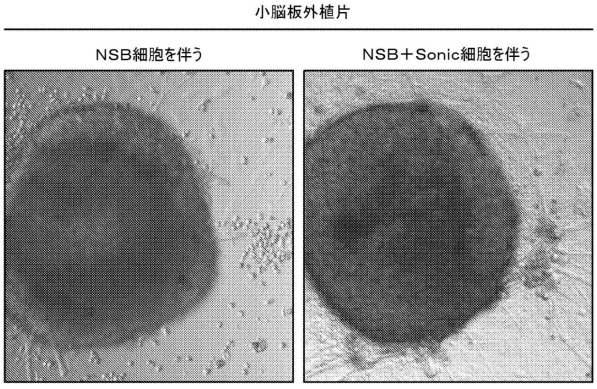
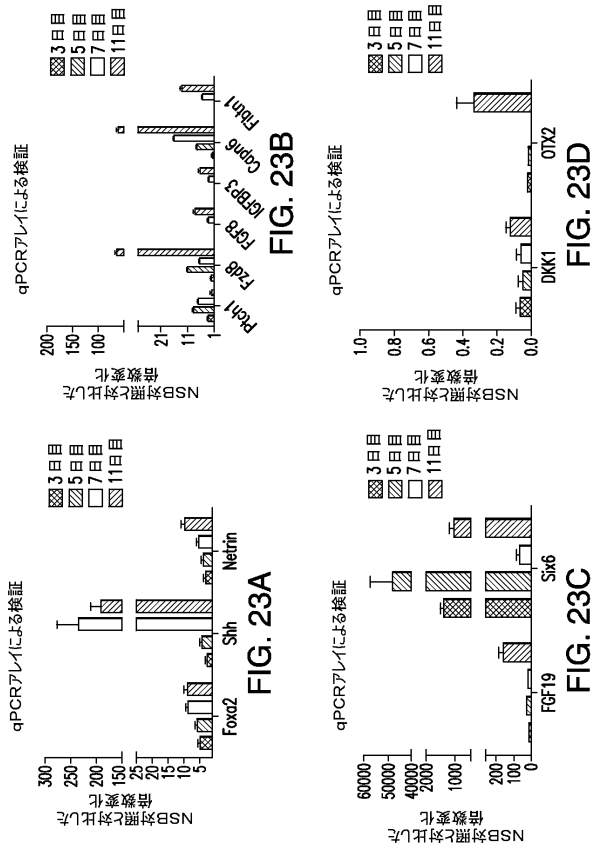
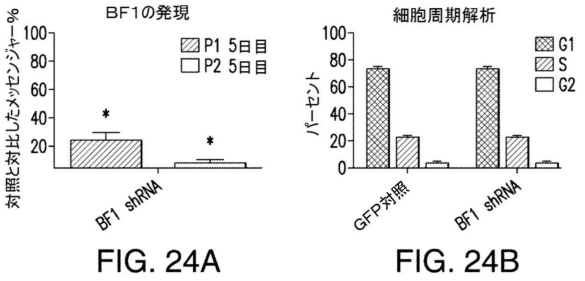


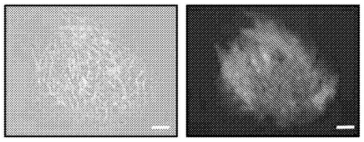
FIG. 22

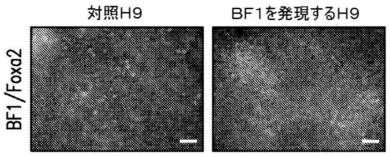
【図２３】



【図２４Ａ－Ｄ】




FIG. 24C



【図２４Ｅ】

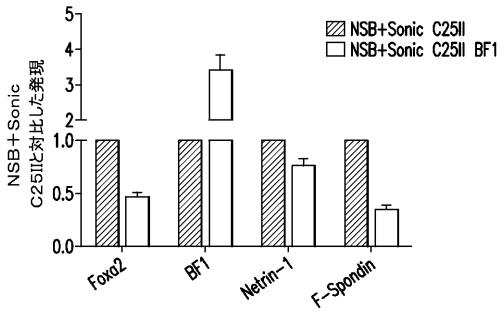


FIG. 24E

【図２５】

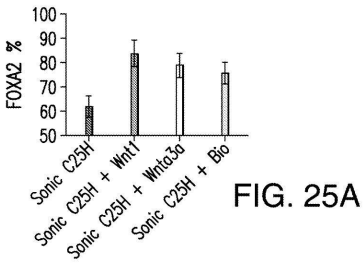


FIG. 25A

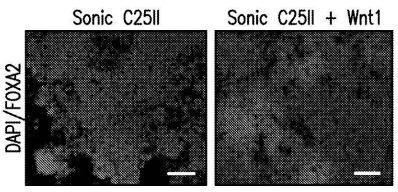


FIG. 25B

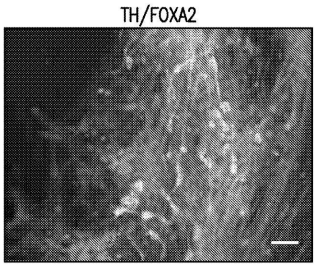


FIG. 25C

【図２６】

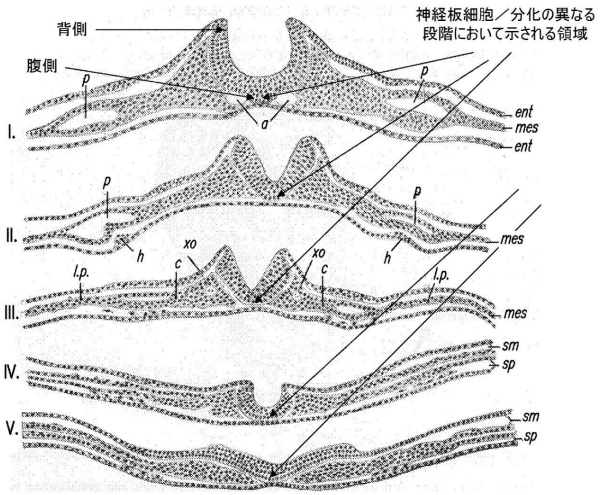


FIG. 26

【図２７Ａ－Ｃ】

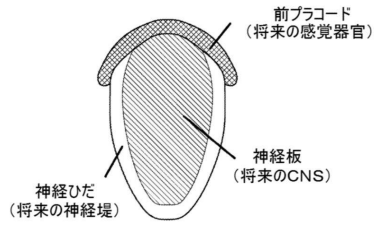


FIG. 27A

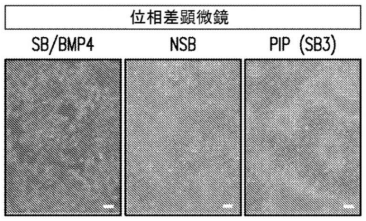


FIG. 27B

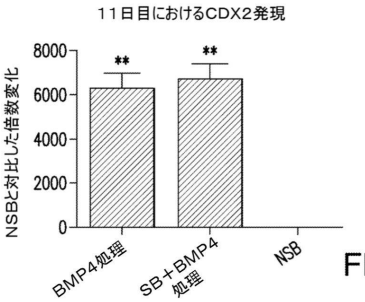


FIG. 27C

【図２７Ｄ－Ｆ】

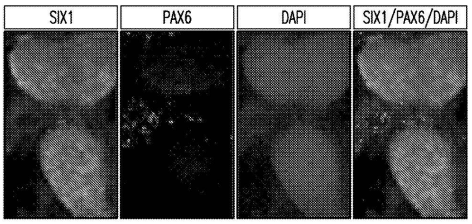


FIG. 27D

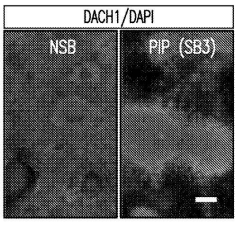


FIG. 27E

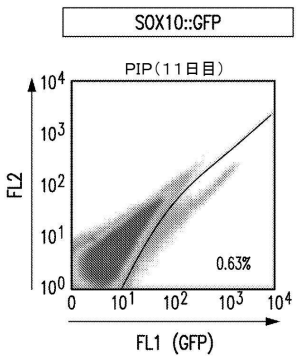


FIG. 27F

【図２７Ｇ－Ｉ】

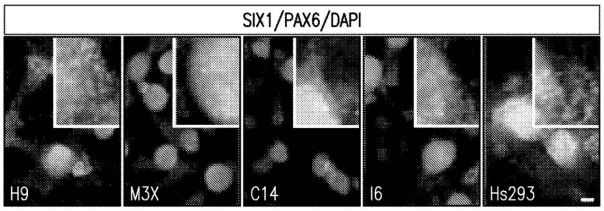


FIG. 27G

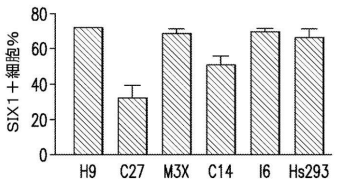


FIG. 27H

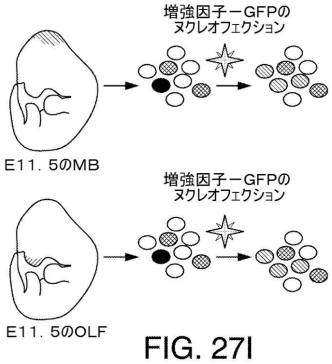


FIG. 27I

【図２７Ｊ－Ｋ】

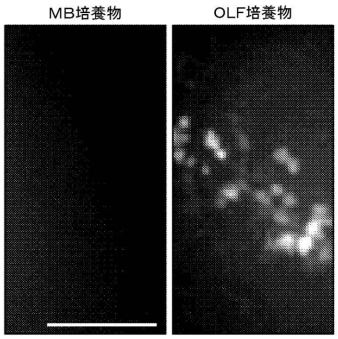


FIG. 27J

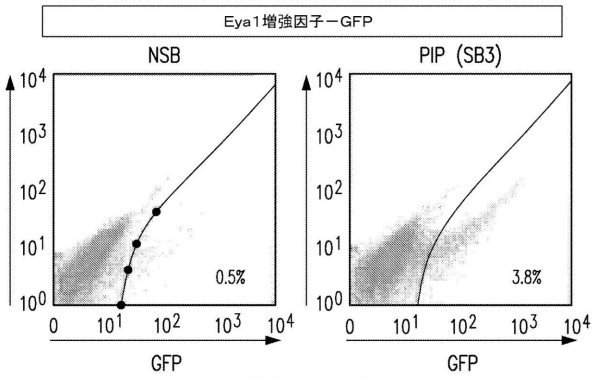


FIG. 27K

【図２８Ａ－Ｂ】

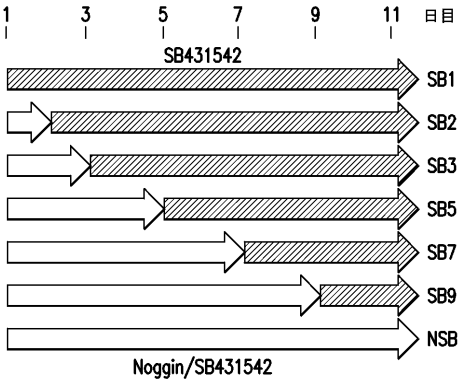


FIG. 28A

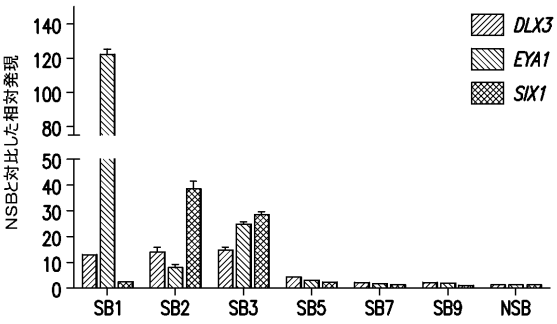


FIG. 28B

【図２８Ｃ－Ｄ】

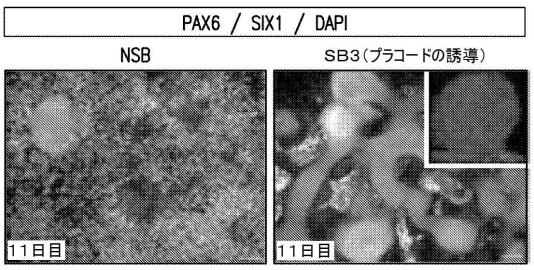


FIG. 28C

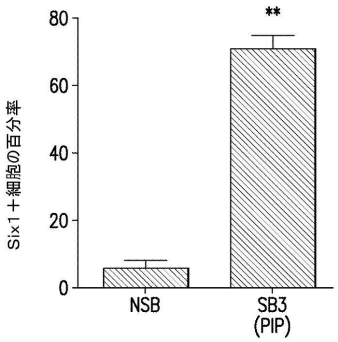


FIG. 28D

【図２８Ｅ】

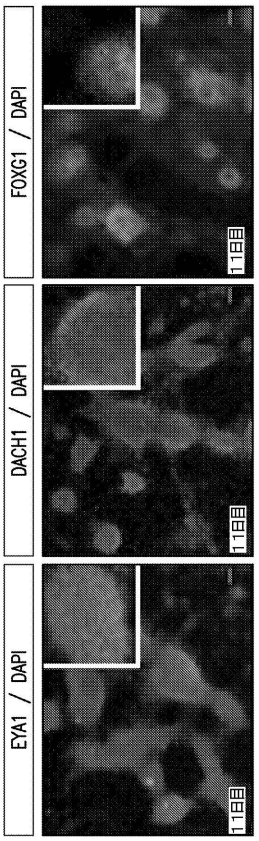


FIG. 28E

【図２８Ｆ－Ｈ】

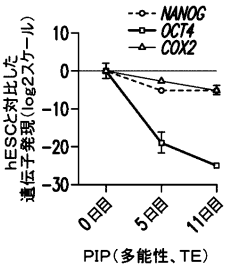


FIG. 28F

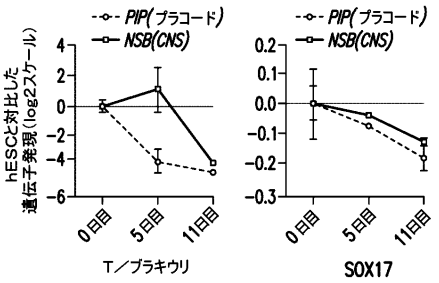


FIG. 28G

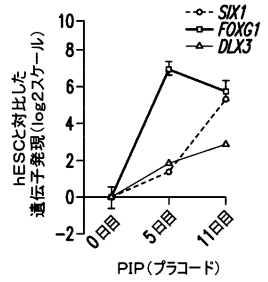


FIG. 28H

【図２９Ａ】

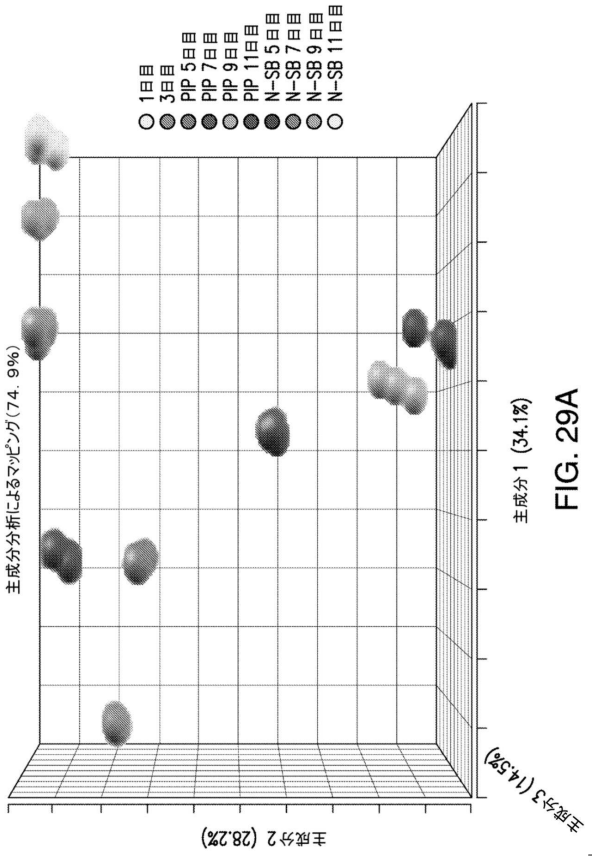


FIG. 29A

【図２９Ｂ】

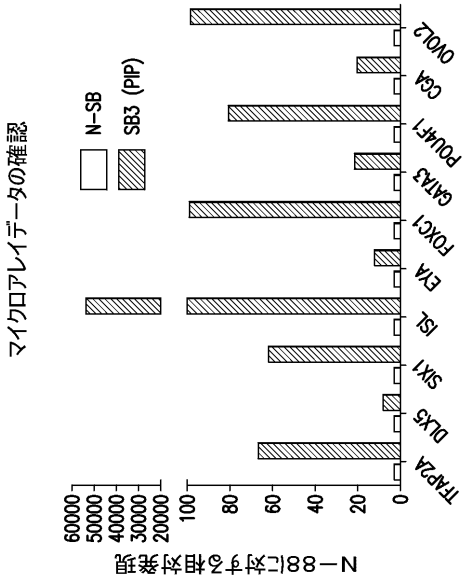


FIG. 29B

【図２９Ｃ－Ｅ】

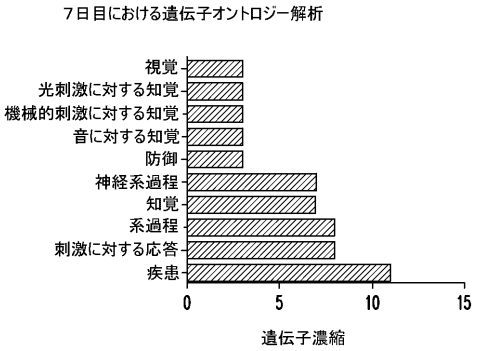


FIG. 29C

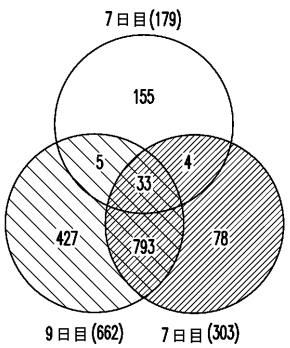


FIG. 29D

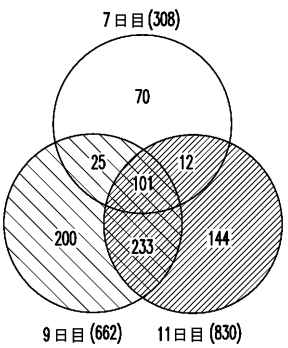


FIG. 29E

【図３０Ａ】

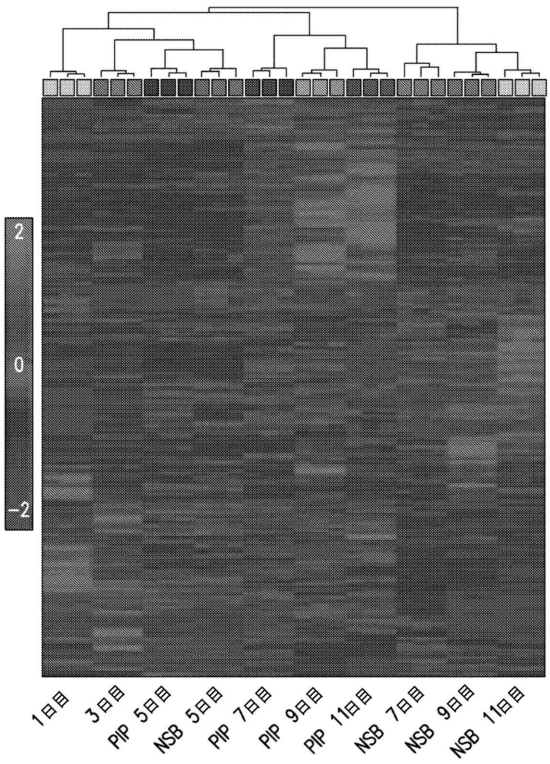


FIG. 30A

【図３０Ｂ】

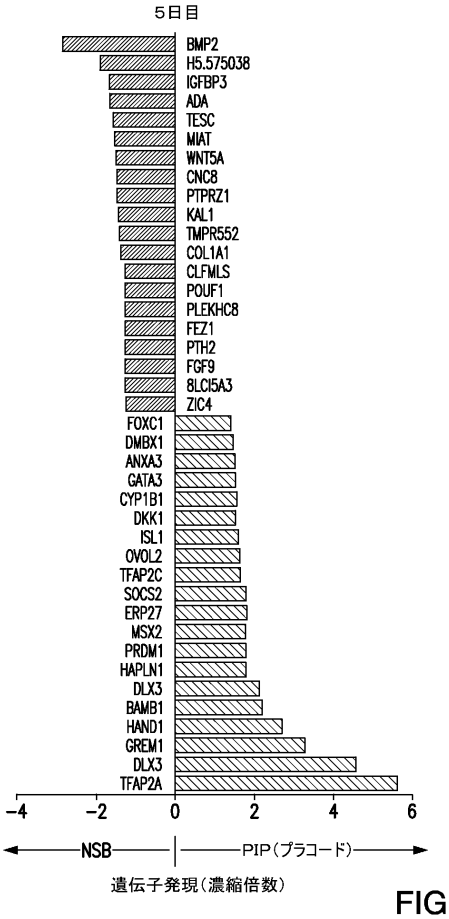


FIG. 30B

【図３０Ｃ】

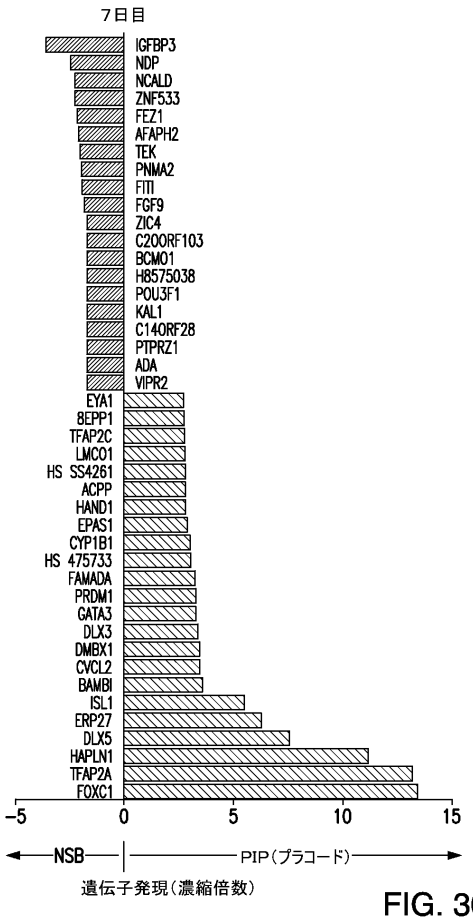


FIG. 30C

【図３０Ｄ】

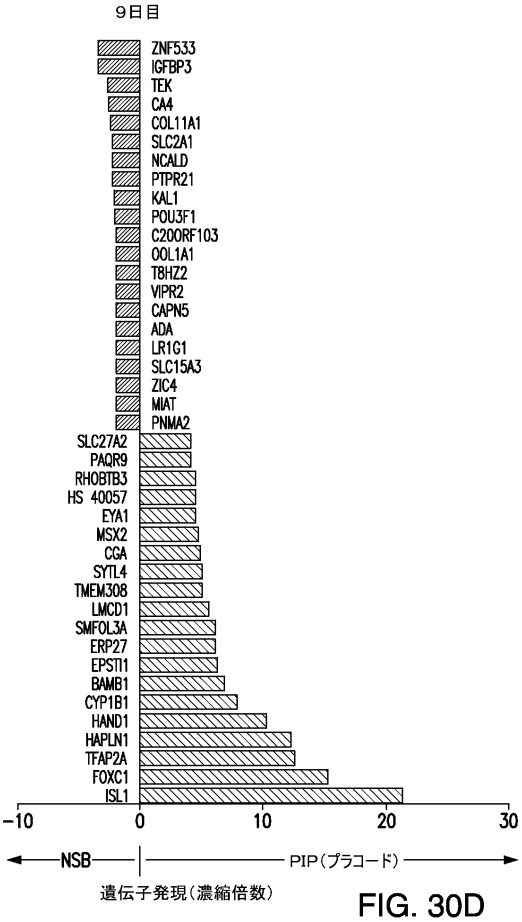


FIG. 30D

【図３０Ｅ】

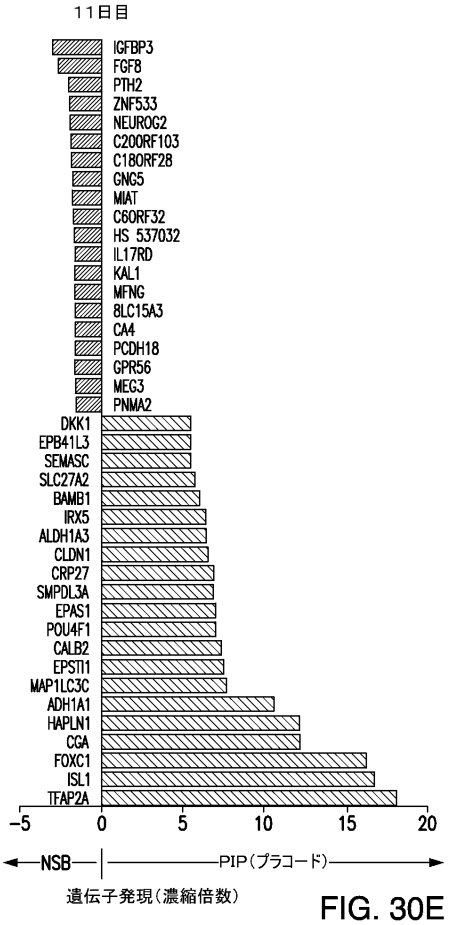


FIG. 30E

【図３０Ｆ－Ｉ】

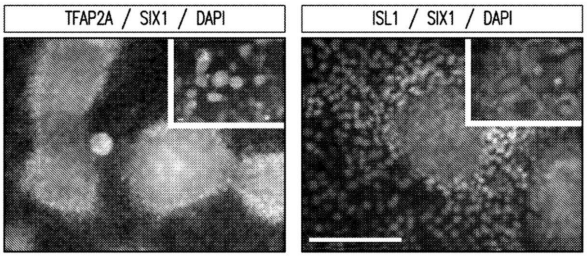


FIG. 30F FIG. 30G

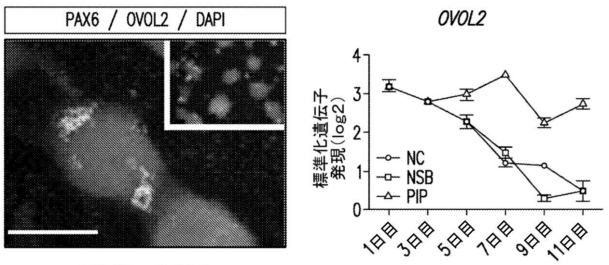


FIG. 30H FIG. 30I

【図３１Ａ－Ｃ】

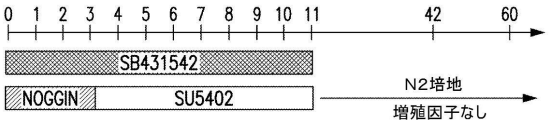


FIG. 31A

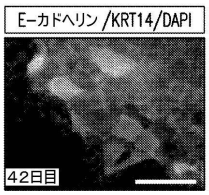


FIG. 31B

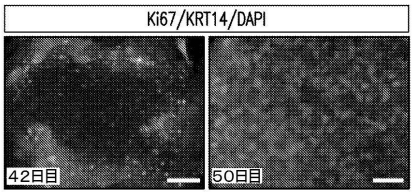


FIG. 31C

【図３１Ｄ－Ｅ】

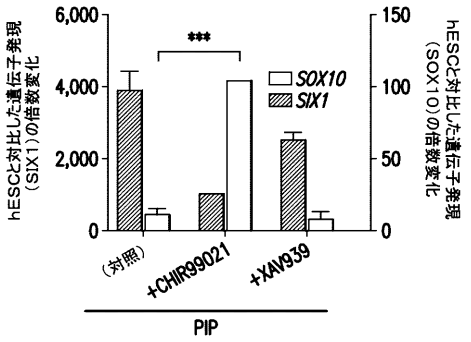


FIG. 31D

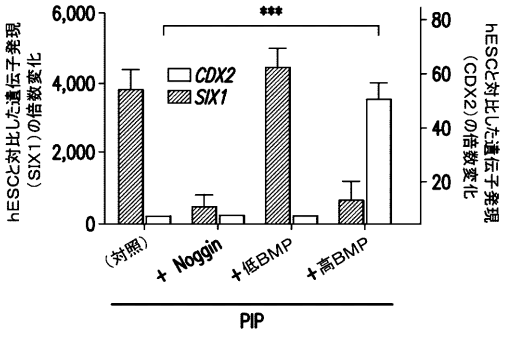


FIG. 31E

【図３２Ａ－Ｂ】

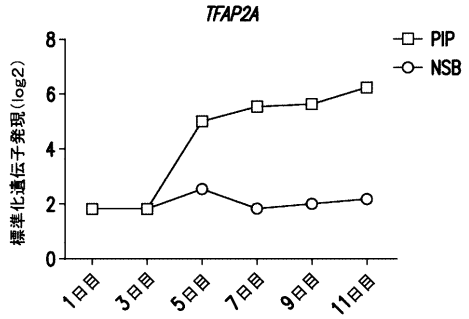


FIG. 32A

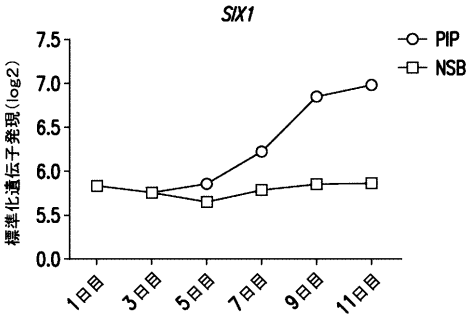


FIG. 32B

【図３２Ｃ－Ｄ】

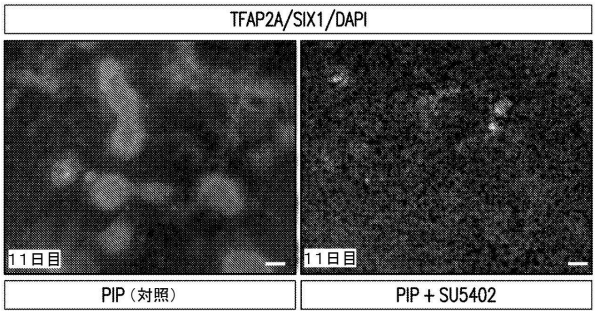


FIG. 32C

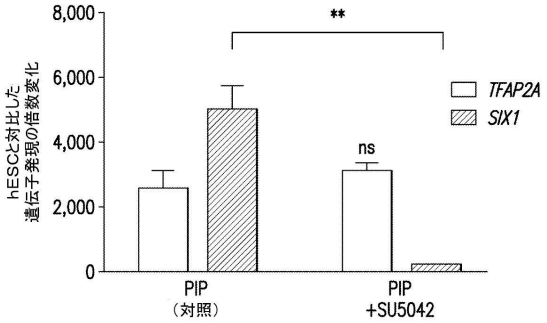


FIG. 32D

【図３２Ｅ－Ｇ】

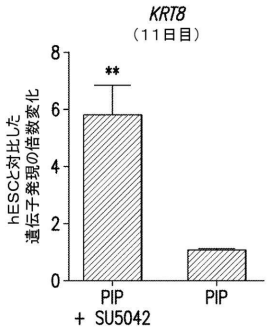


FIG. 32E

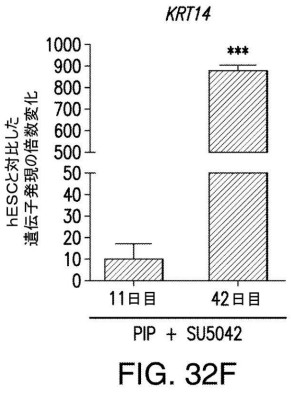


FIG. 32F

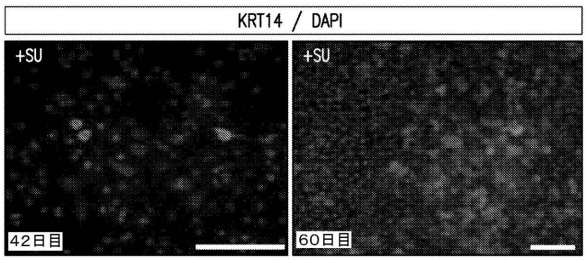


FIG. 32G

【図３３Ａ－Ｅ】

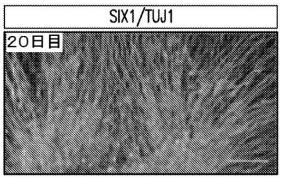


FIG. 33A

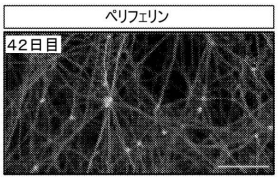


FIG. 33B

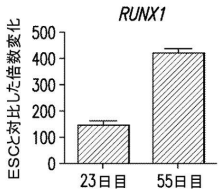


FIG. 33C

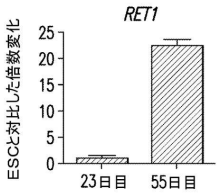


FIG. 33D

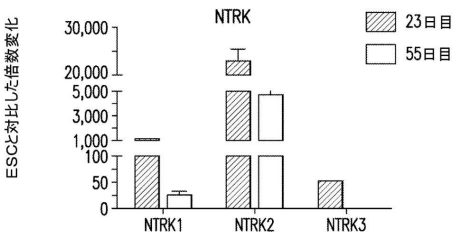


FIG. 33E

【図３３Ｆ－Ｇ】

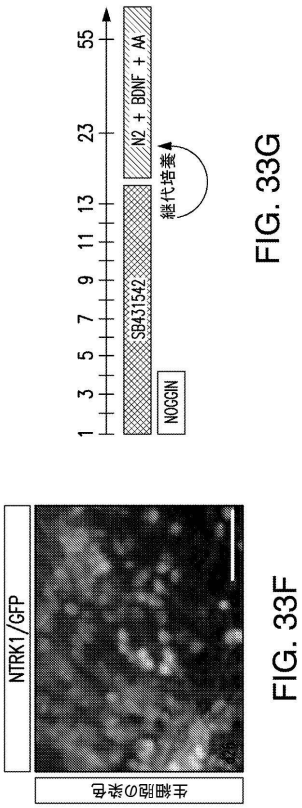


FIG. 33G

FIG. 33F

【図３３Ｈ】

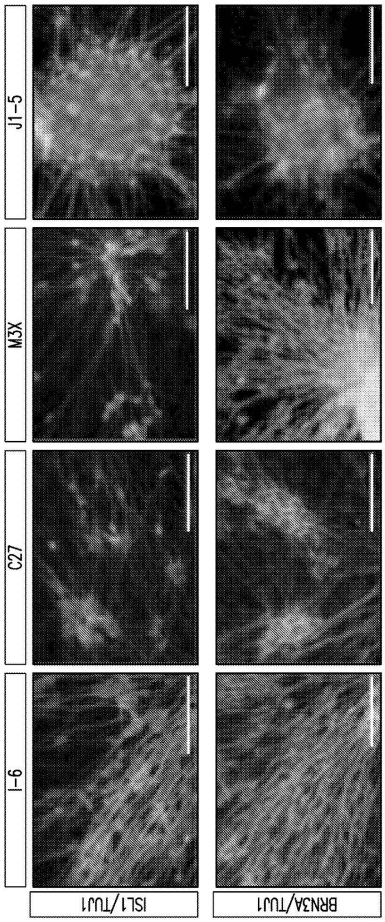


FIG. 33H

【図３４Ａ－Ｇ】

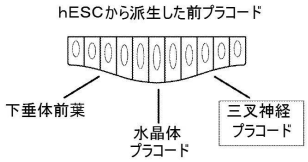


FIG. 34A

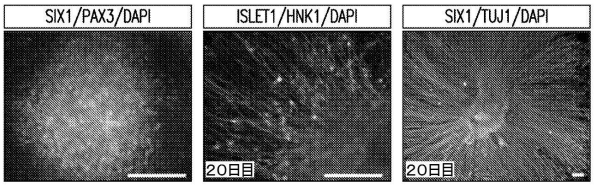


FIG. 34B FIG. 34C FIG. 34D

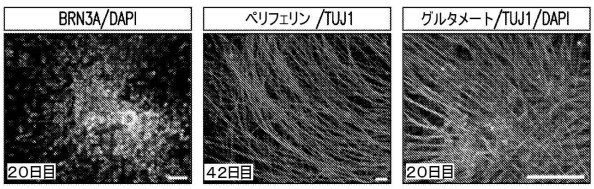


FIG. 34E FIG. 34F FIG. 34G

【図３４Ｈ－Ｋ】

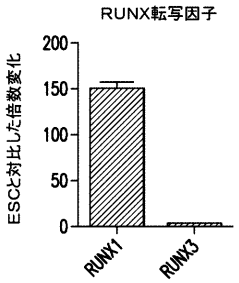


FIG. 34H

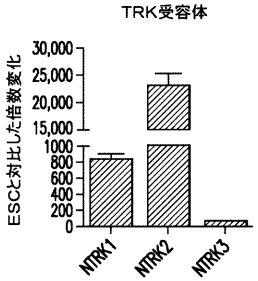


FIG. 34I

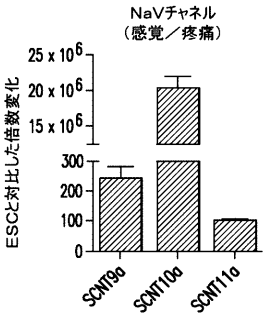


FIG. 34J

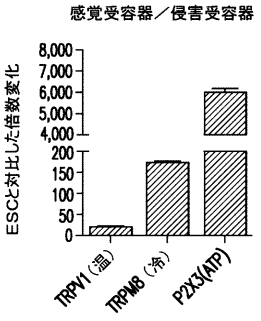


FIG. 34K

【図３４Ｌ－Ｏ】

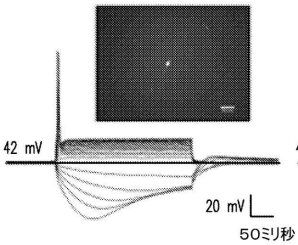


FIG. 34L

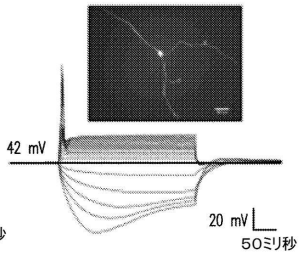


FIG. 34M

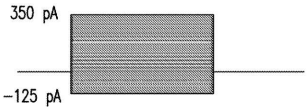


FIG. 34N

	双極型（N＝7）	三極型（n＝6）
静止膜電位（mv）	−66.0 ± 3.3	−65.2 ± 1.8
閾値（mV）	−18.9 ± 4.6	−23.2 ± 4.3
閾値（pA）	317.9 ± 44.2	−275.0 ± 53.2
ピーク（mV）	24.9 ± 6.3	30.8 ± 6.2
AP（mV）	90.9 ± 7.4	96 ± 6.8
入力抵抗（MΩ）	325.4 ± 92.3	388.2 ± 123.0
Rm（MΩ）	281.4 ± 81.8	349.2 ± 113.2
Cm（pF）	30.0 ± 5.60	37.2 ± 10.5

FIG. 34O

【図３４Ｐ－Ｓ】

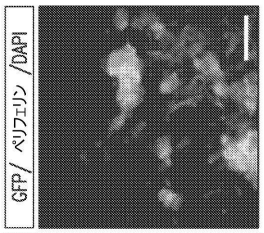


FIG. 34S

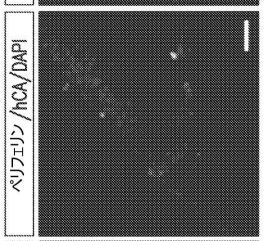


FIG. 34R

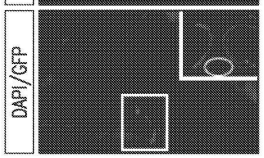


FIG. 34Q

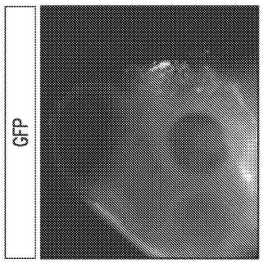


FIG. 34P

三叉神経原基
（ニワトリ胚）

【図３５】

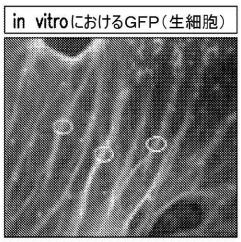


FIG. 35A

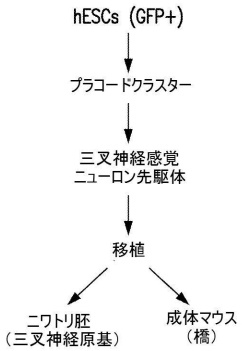


FIG. 35B

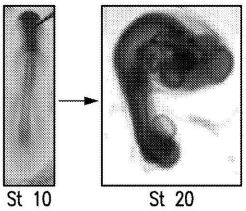
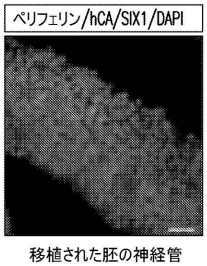


FIG. 35C



移植された胚の神経管

FIG. 35D

【図３６Ａ－Ｃ】

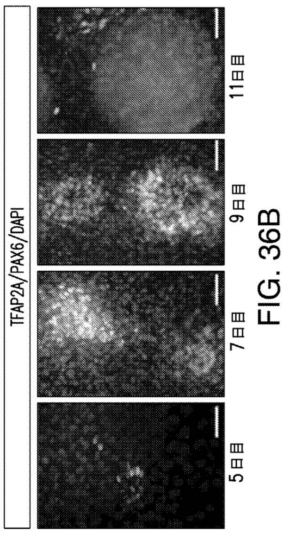


FIG. 36B

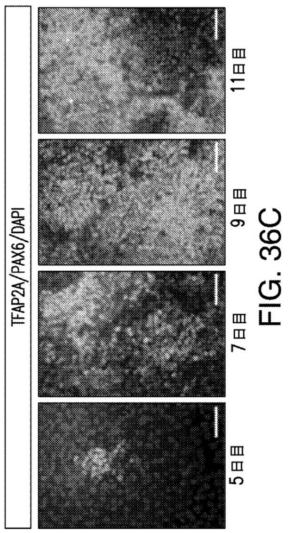


FIG. 36C

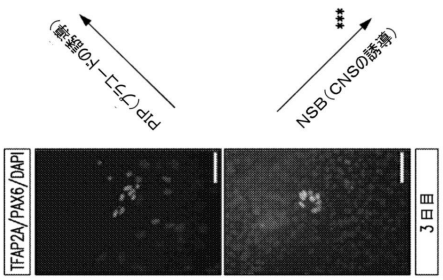


FIG. 36A

【図３６Ｄ－Ｈ】

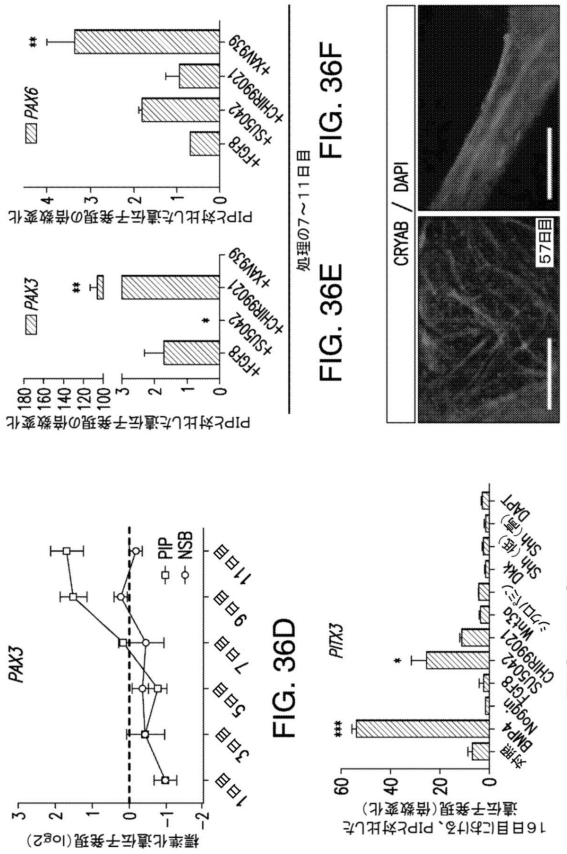


FIG. 36D　FIG. 36E　FIG. 36F　FIG. 36G　FIG. 36H

【図３７】

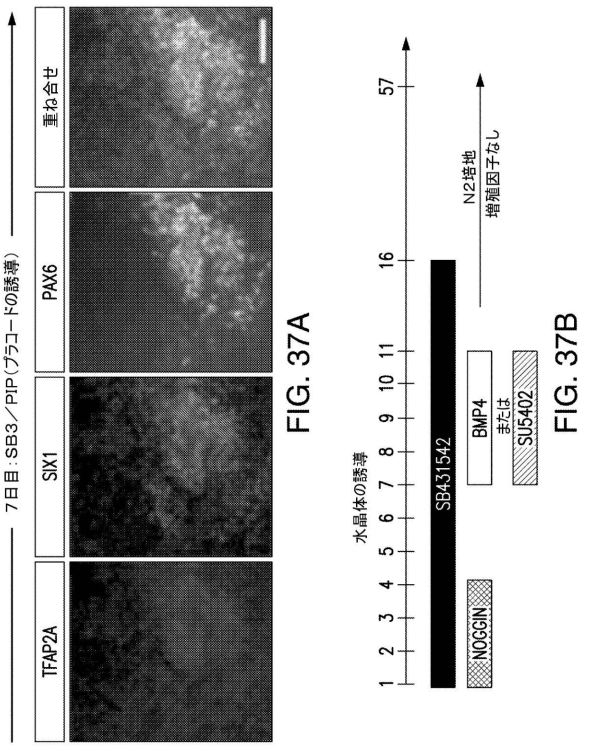


FIG. 37A　FIG. 37B

【図３８Ａ－Ｄ】

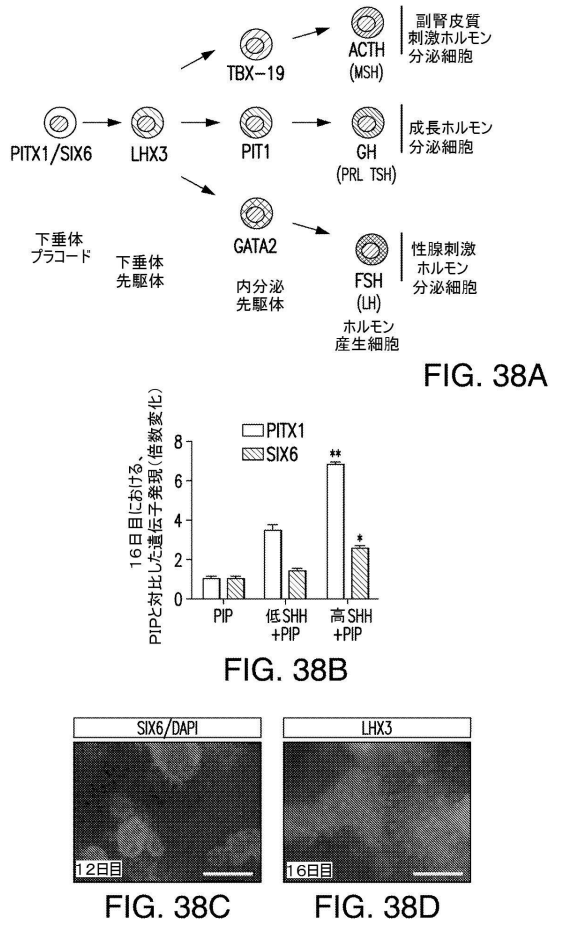


FIG. 38A　FIG. 38B　FIG. 38C　FIG. 38D

【図３８Ｅ－Ｇ】

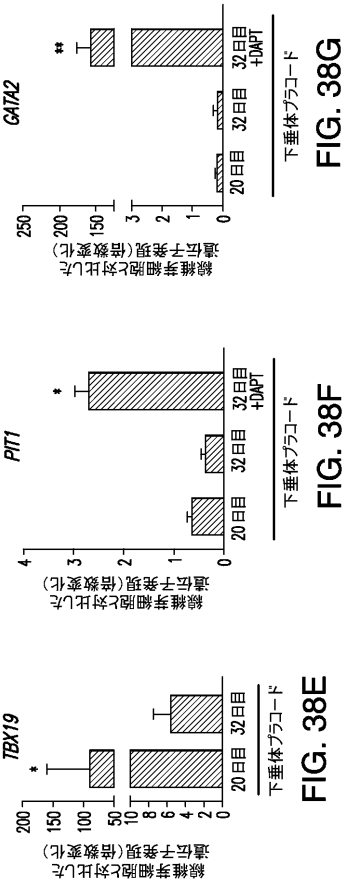


FIG. 38E　FIG. 38F　FIG. 38G

【図３８Ｈ－Ｋ】

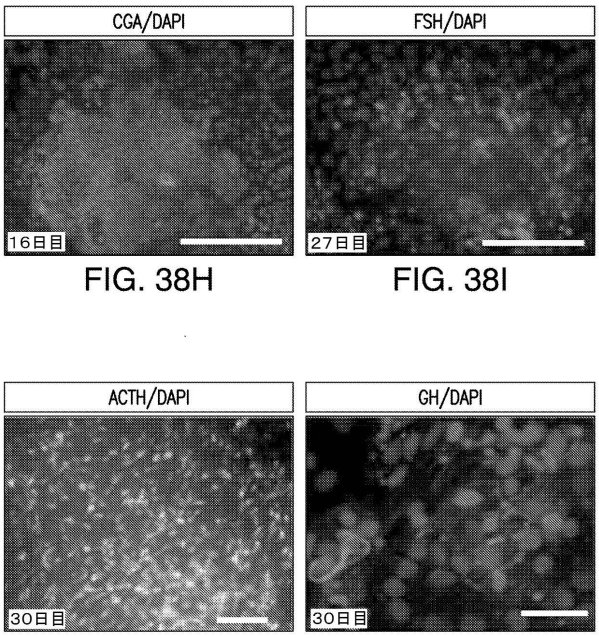


FIG. 38H　FIG. 38I

FIG. 38J　FIG. 38K

【図３８Ｌ－Ｒ】

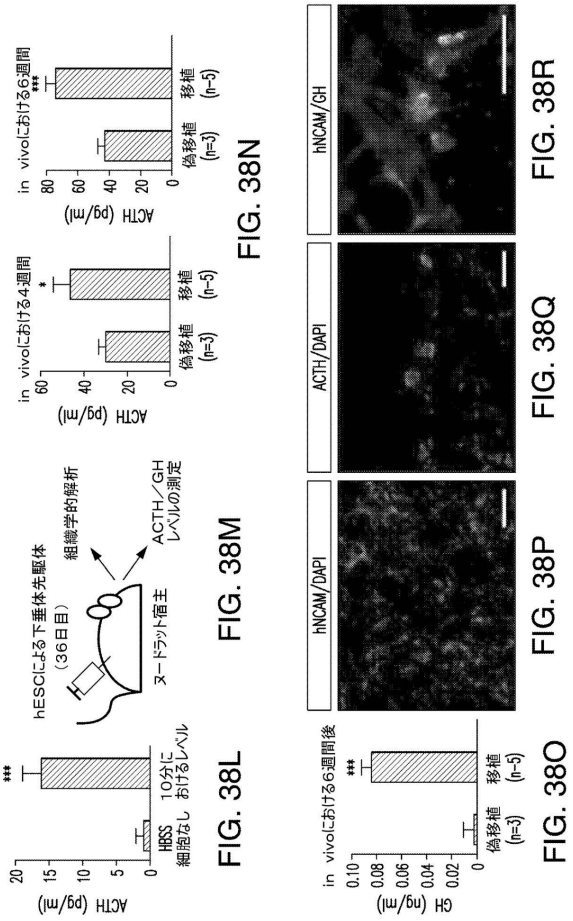


FIG. 38N　FIG. 38R

FIG. 38M　FIG. 38Q

FIG. 38L　FIG. 38P

FIG. 38O

【図３９】

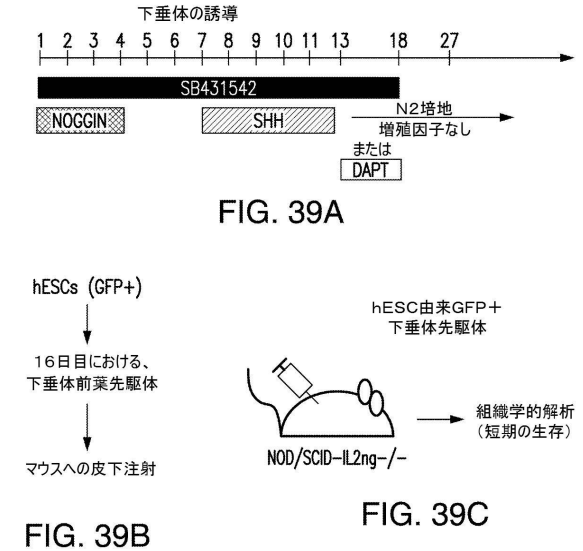


FIG. 39A

FIG. 39B　FIG. 39C

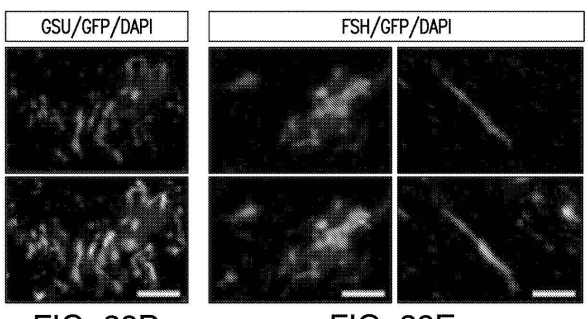


FIG. 39D　FIG. 39E

【図４０－１】

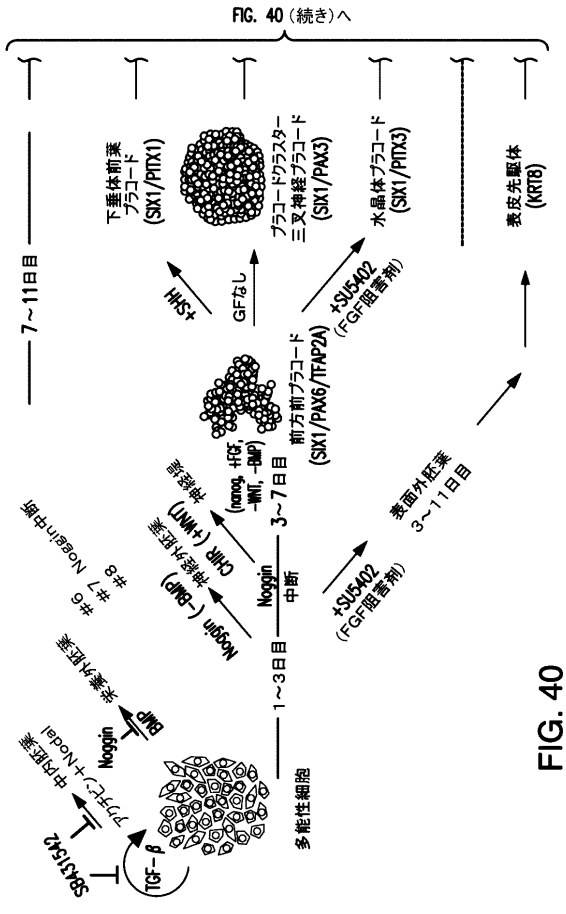


FIG. 40

【図４０－２】

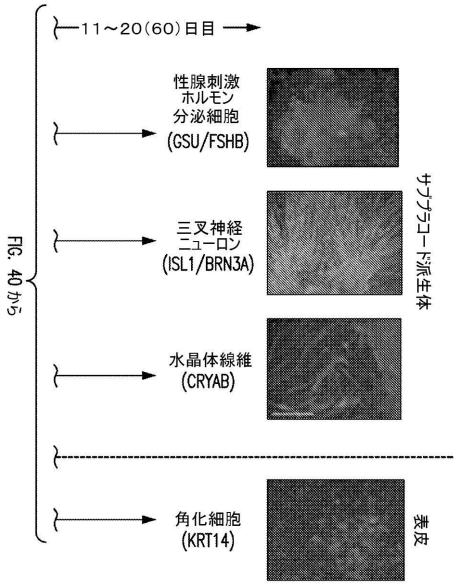


FIG. 40（続き）

【図４１Ａ】

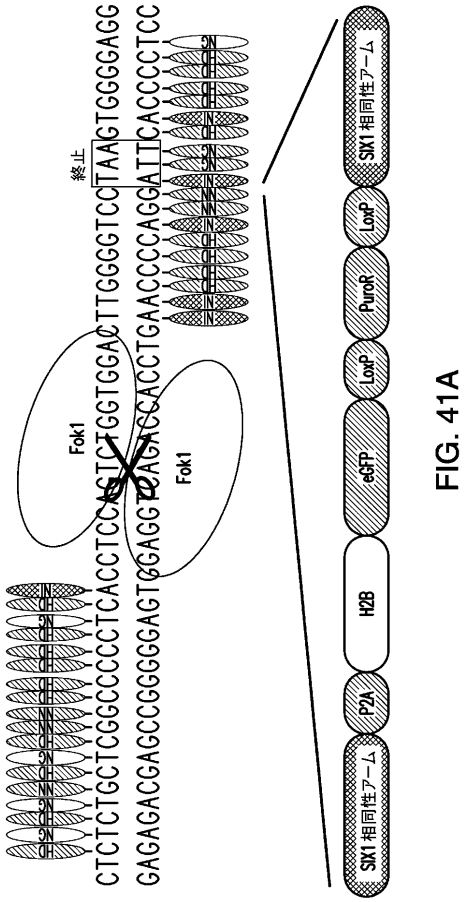


FIG. 41A

【図４１Ｂ－Ｅ】

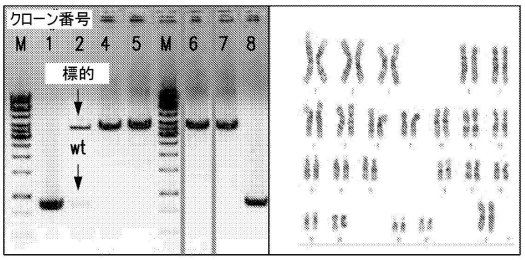


FIG. 41B

FIG. 41C

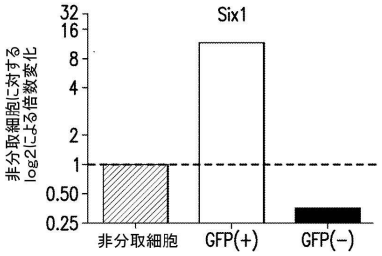


FIG. 41D

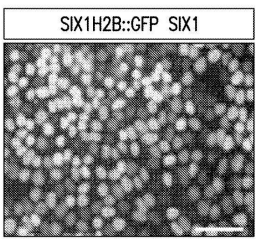


FIG. 41E

【図４２】

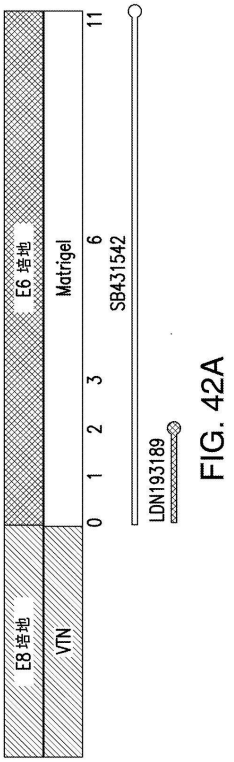


FIG. 42A

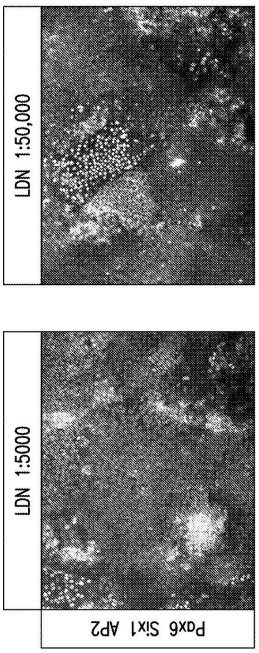


FIG. 42B

【図４３】

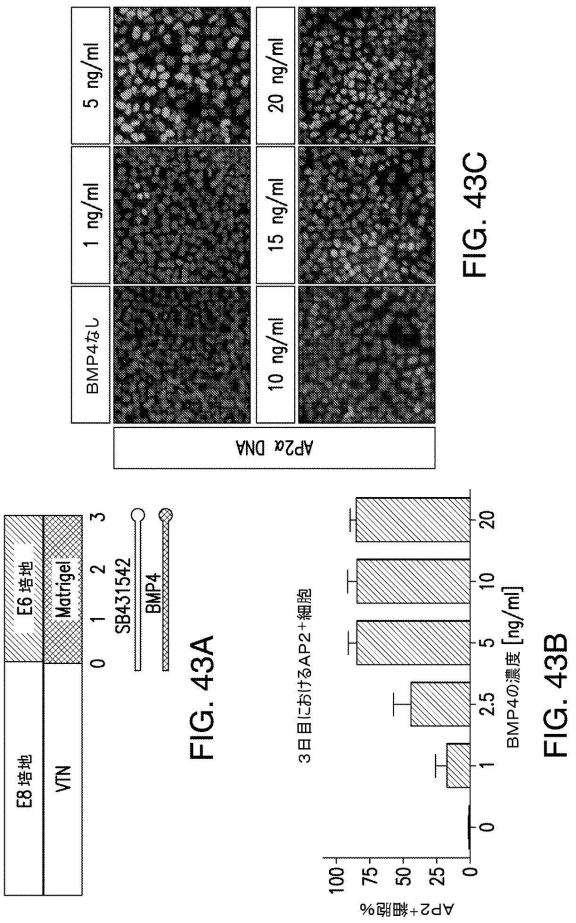


FIG. 43A

FIG. 43B

FIG. 43C

【図４４】

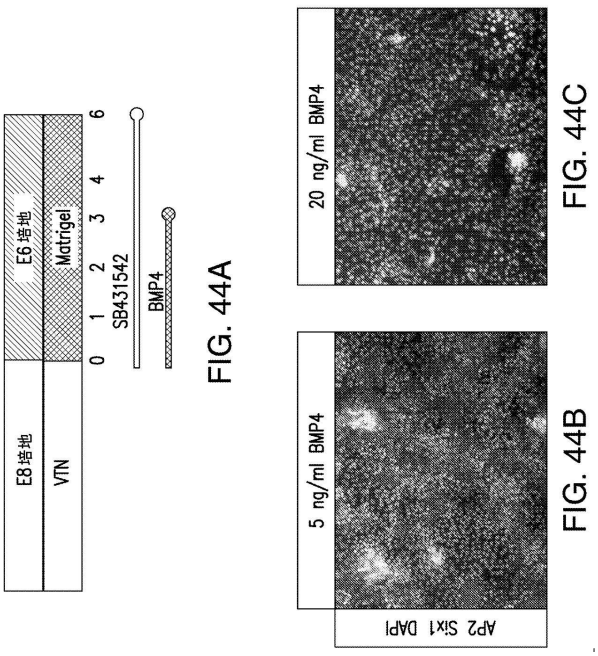


FIG. 44A

FIG. 44B

FIG. 44C

【図４５】

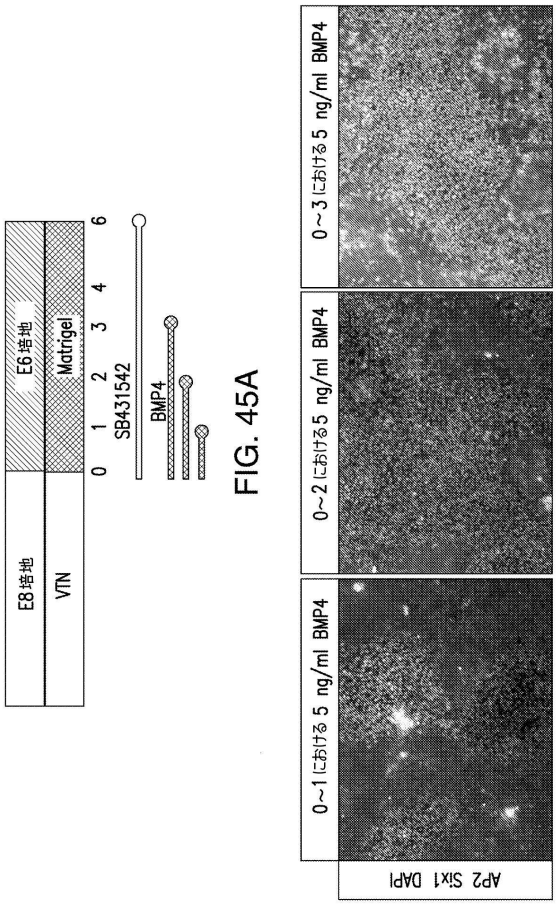


FIG. 45A

FIG. 45B

【図４６－１】

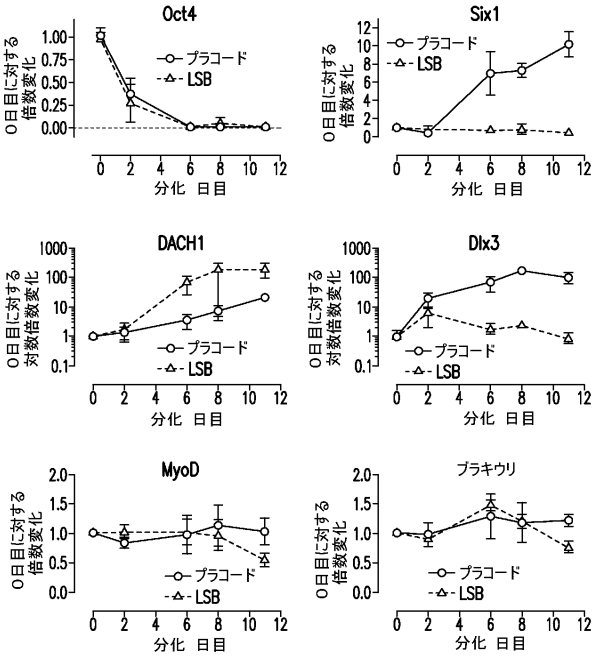


FIG. 46

【図４６－２】

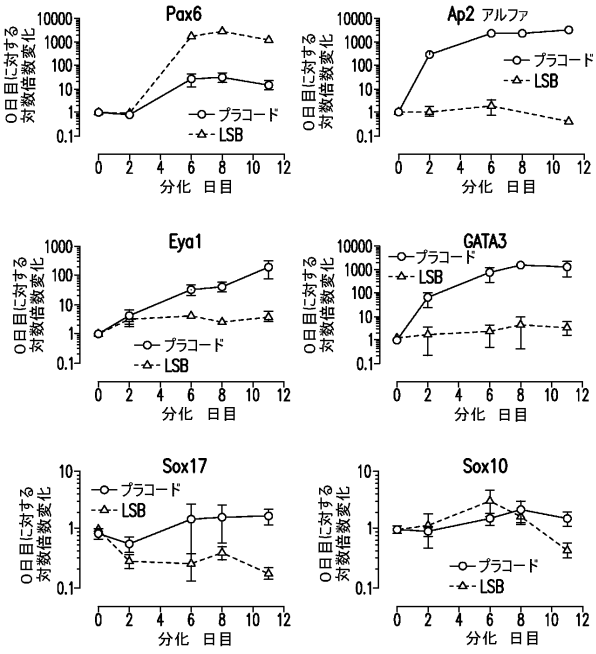


FIG. 46（続き）

【図４７】

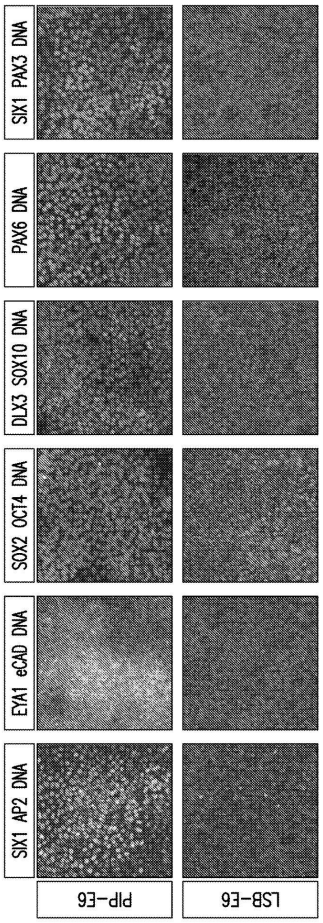


FIG. 47

【図４８】

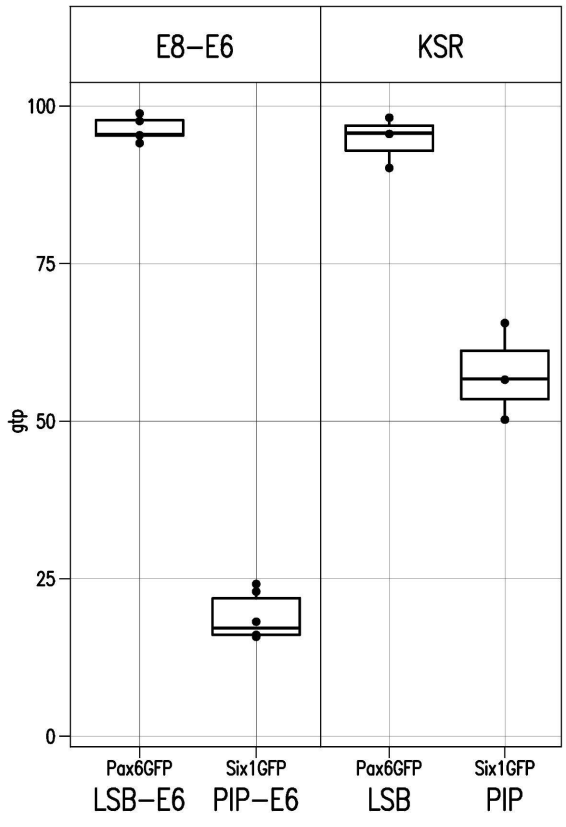


FIG. 48

【図４９】

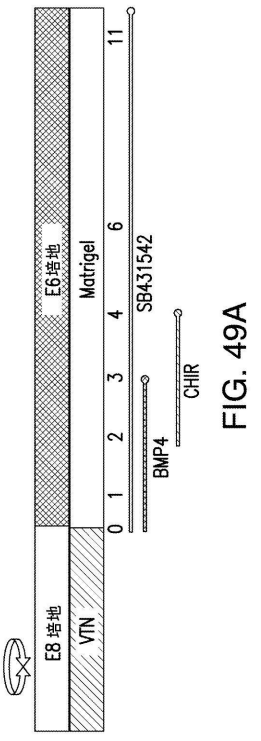


FIG. 49A

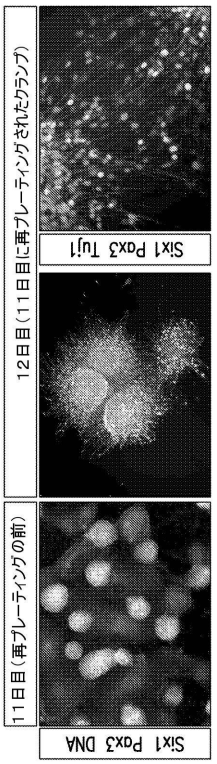


FIG. 49B

【図５０】

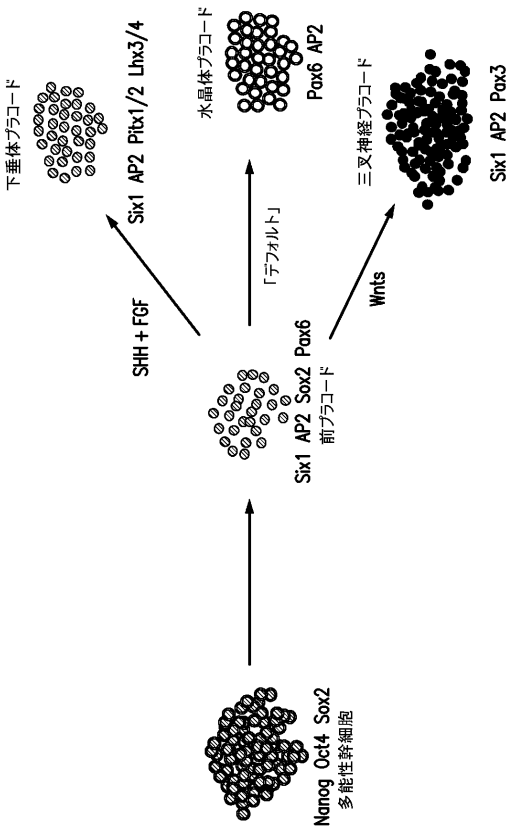


FIG. 50

【図５１】

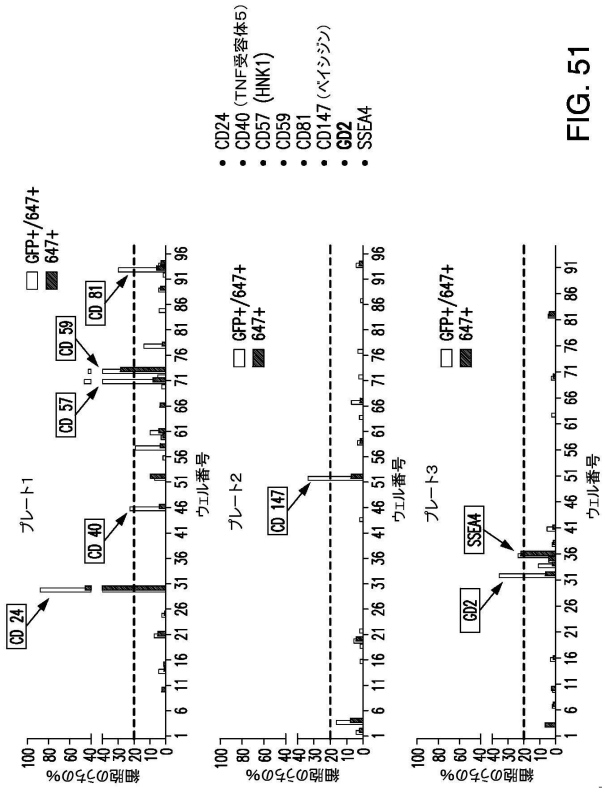


FIG. 51

【図５２】

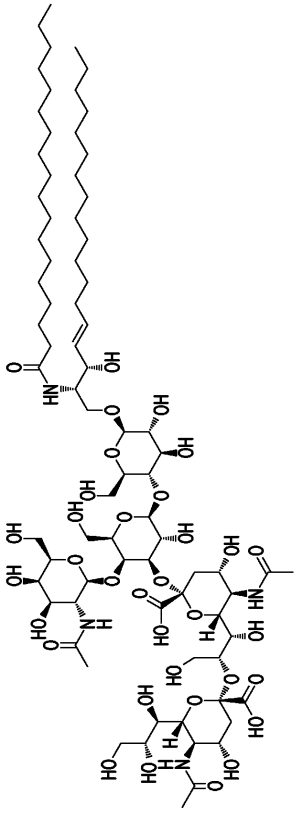


FIG. 52

【図５３Ａ】

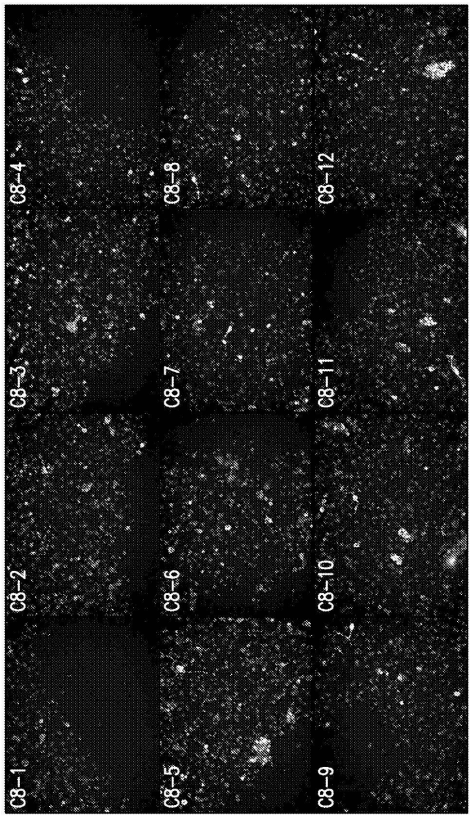


FIG. 53A

【図５３Ｂ】

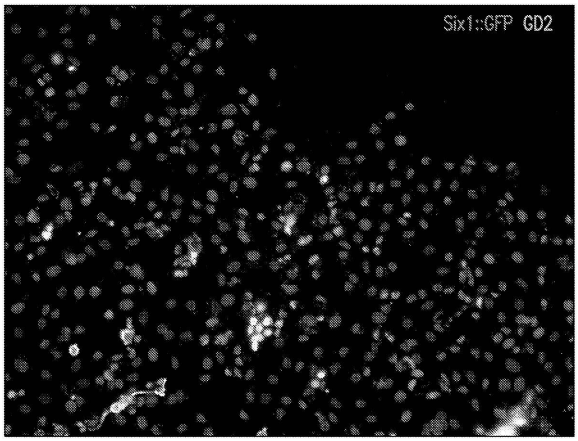


FIG. 53B

【図５４Ａ】

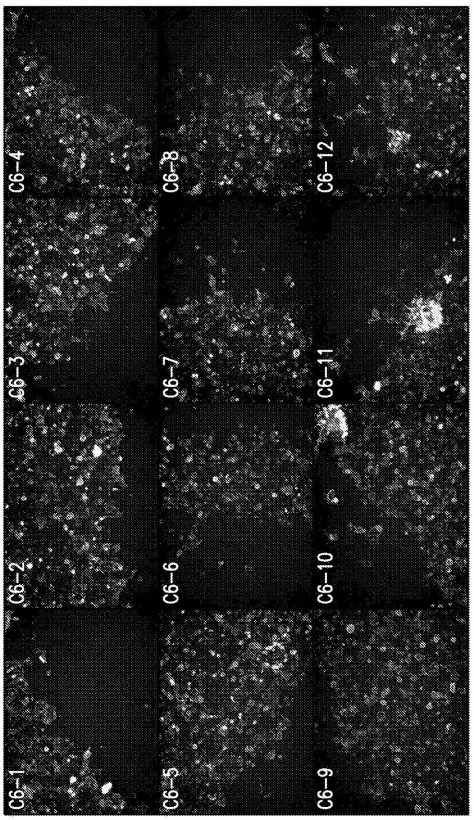


FIG. 54A

【図５４Ｂ】

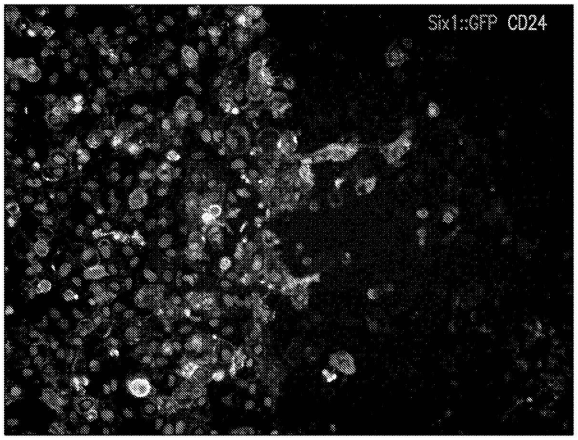


FIG. 54B

【図５５】

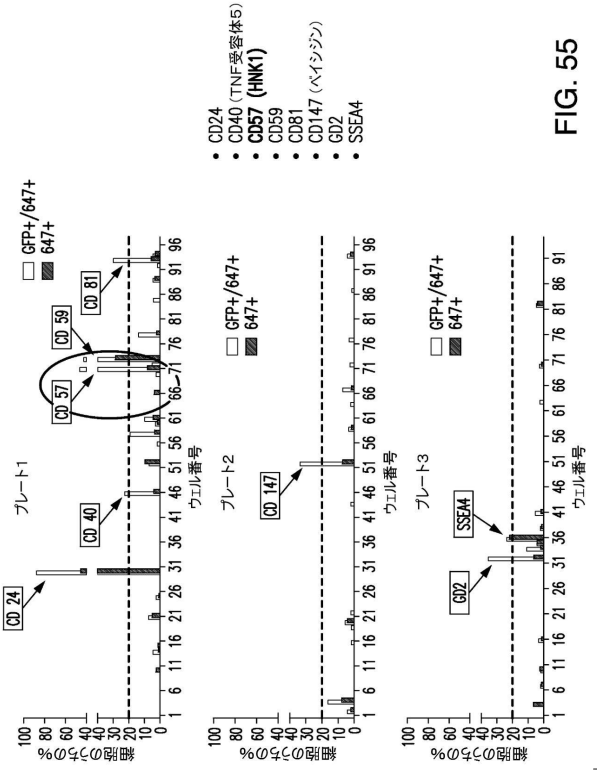


FIG. 55

【図５６Ａ】

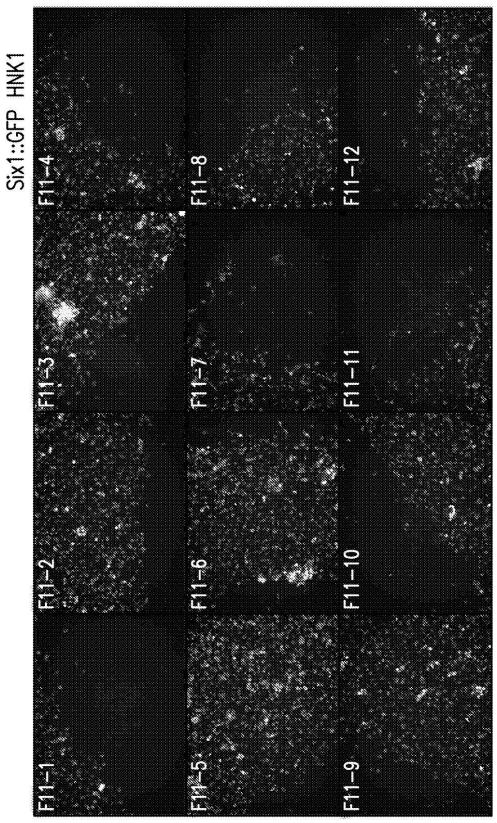


FIG. 56A

【図５６Ｂ】

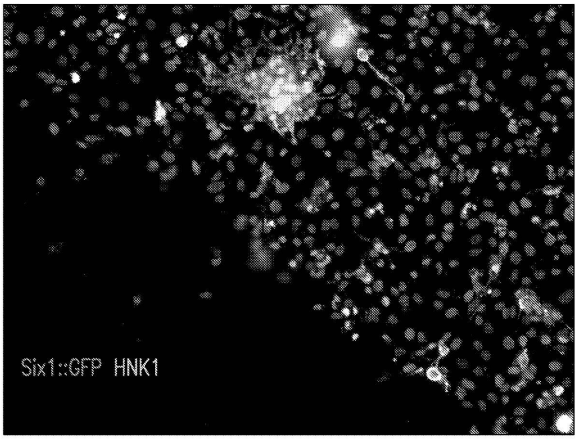


FIG. 56B

【図５７】

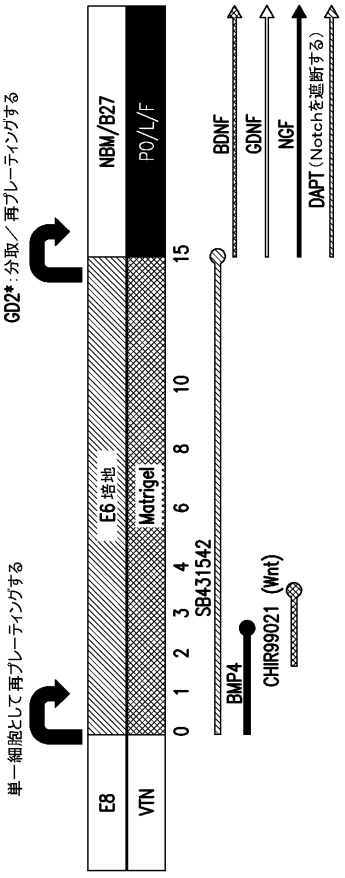


FIG. 57

【図５８】

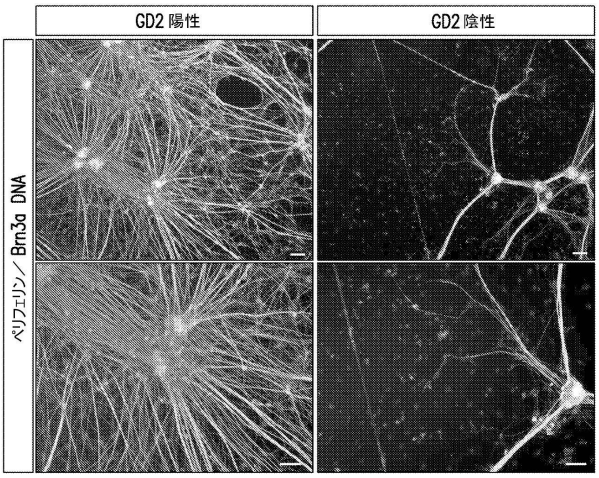


FIG. 58

【図５９】

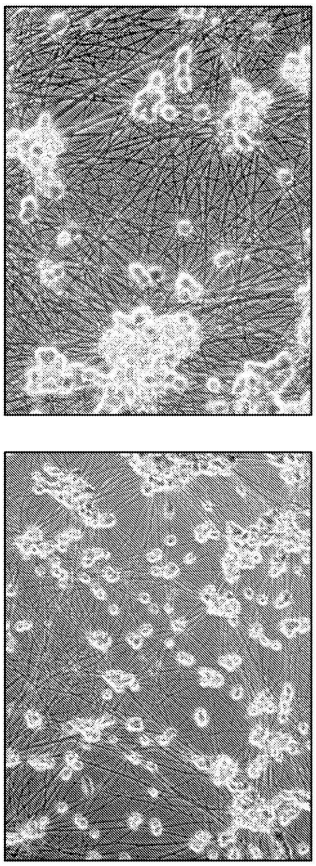


FIG. 59

【図６０】

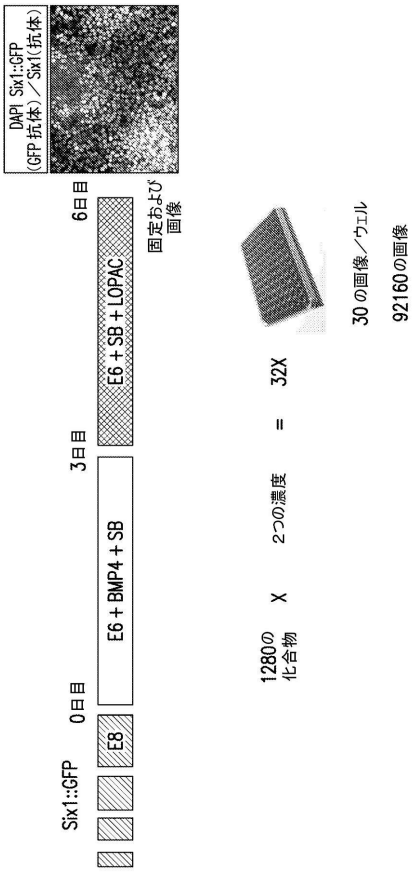


FIG. 60

【図６１】

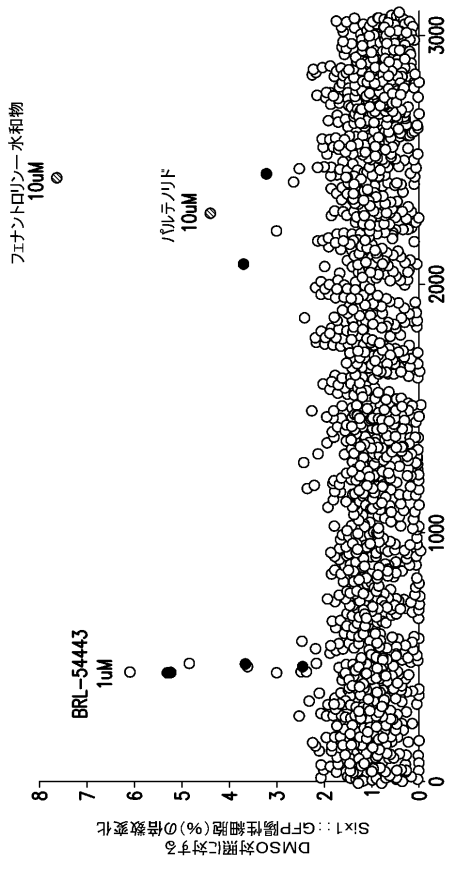


FIG. 61

【図６２】

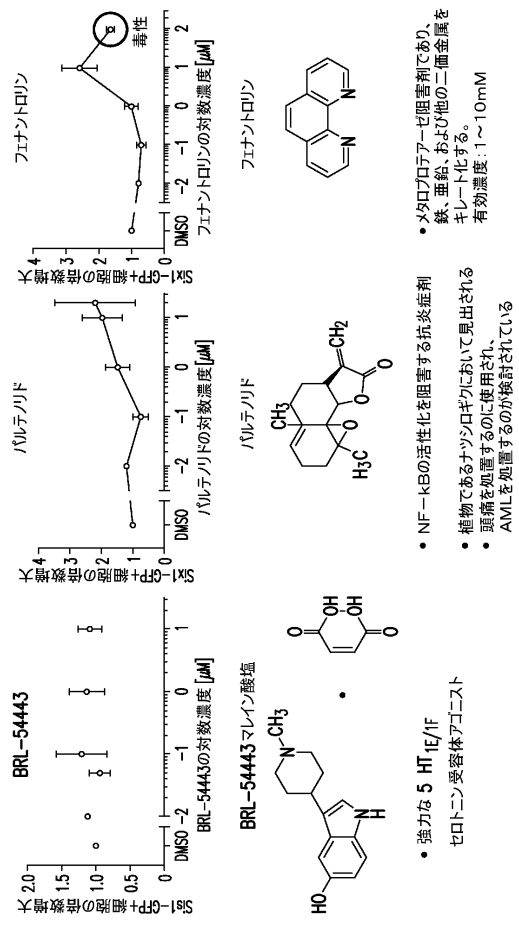


FIG. 62

【図６３】

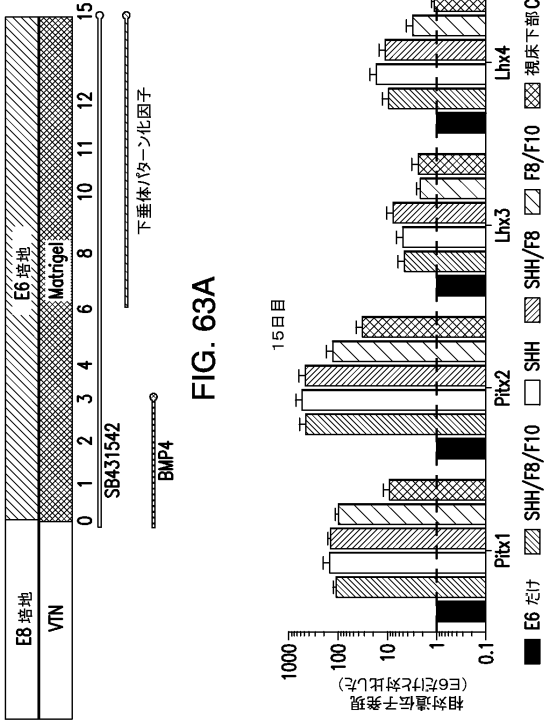
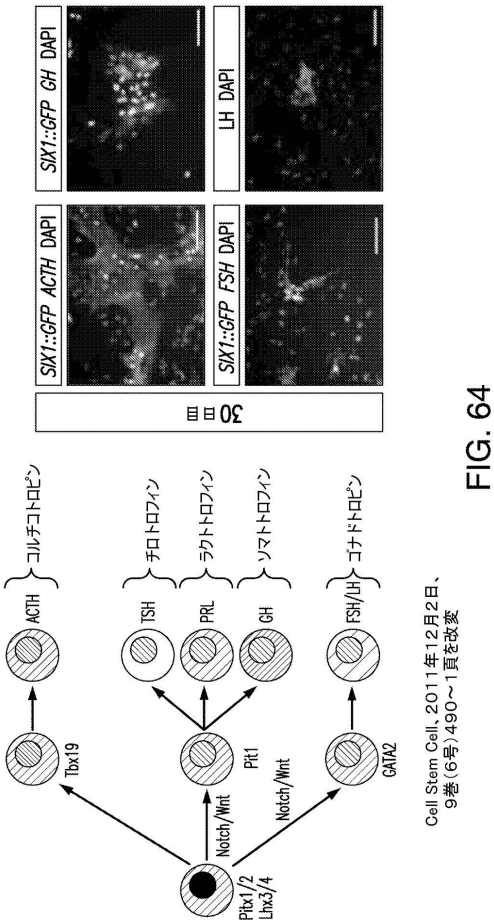


FIG. 63A

FIG. 63B

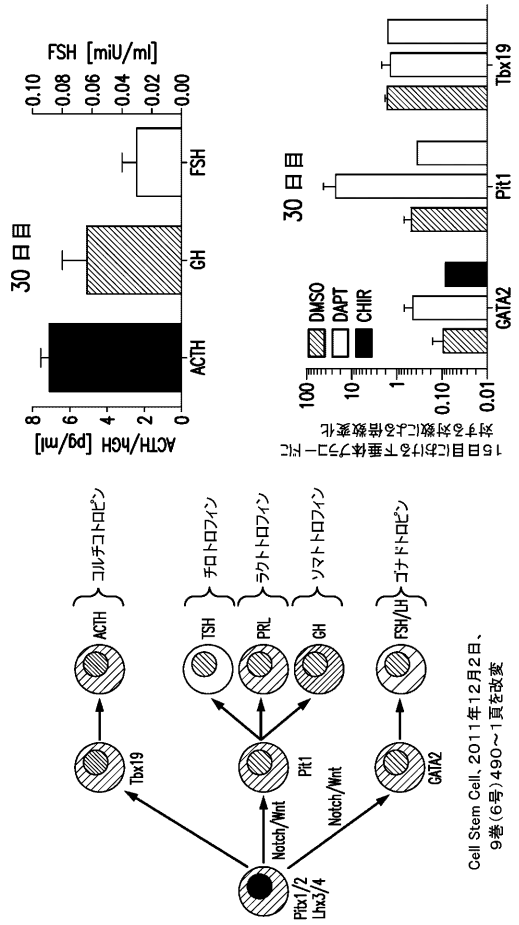
【図６４】



Cell Stem Cell, 2011年12月2日、
9巻(6号)490～1頁を改変

FIG. 64

【図６５】



Cell Stem Cell, 2011年12月2日、
9巻(6号)490～1頁を改変

FIG. 65

【図６６】

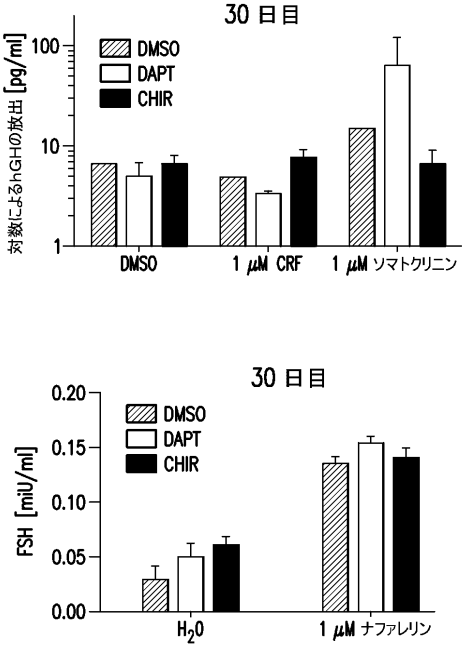


FIG. 66

【図６７】

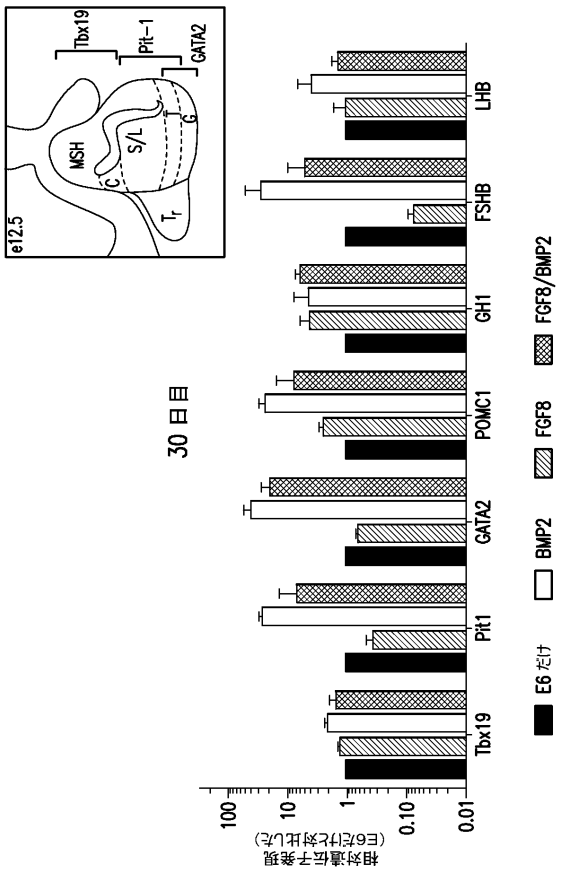


FIG. 67

【図６８】

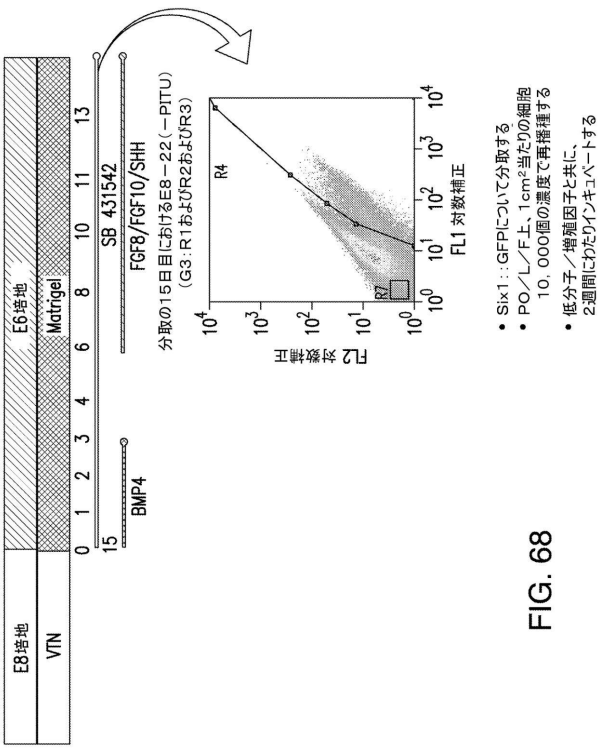


FIG. 68

【図６９】

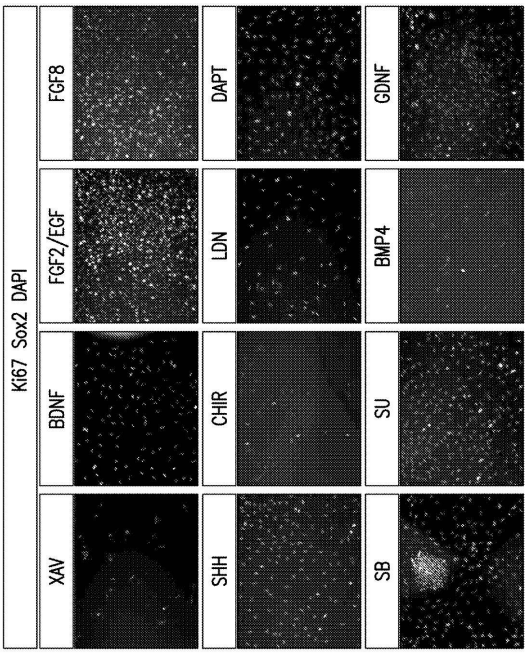


FIG. 69

【図７０】

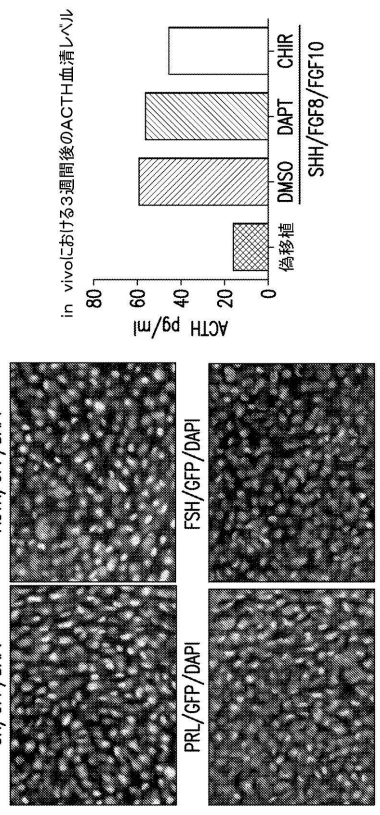


FIG. 70

【図７１】

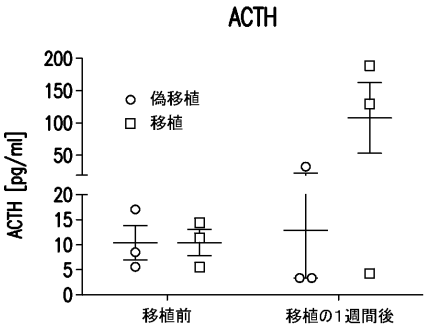


FIG. 71

【配列表】

0006723918000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ステューダー, ローレンツ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００６５, ニューヨーク, イー. ６８ティーエイチ ストリート ４１５
(72)発明者 ディンサー, ゼーラ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２５, ニューヨーク, リバーサイド ドライブ ３７５, アパートメント ７ビー
(72)発明者 ジマー, バスティアン
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００４４, ニューヨーク, メイン ストリート ４７５, アパートメント ２エヌ

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１２／００９４３８１（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１３／１６６４８８（WO，Ａ１）
LEUNG A. W. et al., Developmental Biology, 379(2013 Apr), p.208-220
CHAMBERS. S. M. et al., Nat. Biotechnol., Vol.27 No.3(2009), p.275-280
DINCER Z. et al., Cell Reports, 5(Epub 2013 Nov 27), p.1387-1402

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／００－５／２８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）