

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 30 日(30.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/115120 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 9/99 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/054175
- (22) 国際出願日: 2012 年 2 月 21 日(21.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-035192 2011 年 2 月 21 日(21.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人 大阪大学(OSAKA UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号
Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 橋本 均
(HASHIMOTO, Hitoshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹
田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内
Osaka (JP). 馬場 明道(BABA, Akemichi) [JP/JP]; 〒
6508530 兵庫県神戸市中央区港島 1 丁目 3 番 6
兵庫医療大学内 Hyogo (JP). 山▲崎▼ 淳史
(YAMASAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹
田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内
Osaka (JP).

- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒
5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番
1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

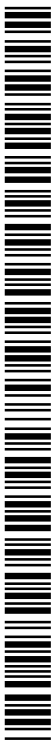
- 国際調査報告(条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD OF PREPARING 5-HT NEURONS

(54) 発明の名称: 5-H T 神経細胞の製造方法

(57) Abstract: The present invention provides a method of preparing 5-HT neurons by culturing stem cells upon polymerized extra-cellular matrix proteins in the presence of a BMP receptor kinase inhibitor, a 5-HT₇ receptor agonist, or a type-I TGF-β receptor ligand.

(57) 要約: 本発明は、BMP 受容体キナーゼ阻害剤、5-H T₇受容体アゴニスト、または I 型 TGF-β 受容体リガンドの存在下、重合化した細胞外マトリクスタンパク質上において幹細胞を培養する、5-H T 神経細胞製造方法などを提供する。



WO 2012/115120 A1

明 細 書

発明の名称： 5－HT神経細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、5－HT神経細胞の製造方法などに関する。

背景技術

[0002] 脳内のセロトニン（5－hydroxytryptamine；5－HT）神経系は脳幹の縫線核を起始核とし、大脳皮質辺縁系、基底核、視床下部、下位脳幹や脊髄など広範囲の中樞神経系に投射している。機能的にも、攻撃性、摂食行動、記憶学習を制御するなど様々であり、いくつかの精神疾患の治療薬が、5－HT神経系の機能を調節することなどから、精神疾患の病態との関連性が深いと考えられている。

5－HT神経系は、胎生期の早期から認められ、細胞の分裂・分化、神経系細胞の遊走、シナプス形成などを調節することが示されている。また、発達期の5－HT神経系の異常に伴い、脳の発達異常が起こることが示されている。さらに、神経伝達物質5－HTそのものが、5－HT神経の分化を促進する働きを有することが知られている（非特許文献1、2）。5－HT受容体には多くのサブタイプの存在が知られているが、これらの5－HT神経分化での役割については分かっていない。これら5－HT受容体のうち、5－HT₇受容体は、うつ病、不安、疼痛、統合失調症などに関わる可能性が指摘されている。

[0003] 神経細胞の発生段階を研究する上で有用なツールとして、胚性幹細胞（embryonic stem cells；ES細胞）からの神経誘導系が注目されている（非特許文献3－5）。本発明者らは、基底膜調製品であるマトリゲル上でES細胞を培養することによって、神経細胞が誘導されることを見出しており（マトリゲル法）、さらにはBMP（bone morphogenetic protein）に直接結合してその作用を遮断するBMPアンタゴニストであるNogginをその培養系に添加することで、

E S細胞からの5-HT神経分化誘導系（マトリゲル-N o g g i n法）を確立することに成功している（特許文献1）。この誘導系は、フィーダー細胞や血清を用いないシンプルな系であるため、分子基盤解析を行いやすく、また生体の発達過程と類似の機構で5-HT神経分化が進行することから、この誘導系のメカニズムの解析は、生体の5-HT神経分化メカニズムの解明に結び付くものであると考えられる。しかし、E S細胞からの5-HT神経分化における、5-HT受容体に作用する薬物あるいはBMP受容体シグナルに作用する薬物の作用については知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2008-125448号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：De Vitry F et al., Proc Natl Acad Sci USA., Vol. 83, 8629-8633, 1986

非特許文献2：Parga J et al., Dev Neurobiol., Vol. 67, 10-22, 2007

非特許文献3：Lee SH et al., Nat Biotechnol., Vol. 18, 675-679, 2000

非特許文献4：Perrier AL et al., Proc Natl Acad Sci USA., Vol. 101, 12543-12548, 2004

非特許文献5：Zhang SC., Brain Pathol., Vol. 16, 132-142, 2006

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、E S細胞からの5-HT神経分化誘導系によって得られた新規5-HT神経細胞誘導因子を用いた5-HT神経細胞製造方法および該製造キットを提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明では、5-HT神経分化メカニズムの解明を目指し、マトリゲル-N o g g i n法を用いて分化誘導機構の検討を行った。その結果、N o g g

i nの作用は他のBMPアンタゴニストでは引き起こされない作用ではあるが、BMPシグナルの遮断を介して引き起こされることを見出した。また、5-HT₇受容体を介した作用により、ES細胞からの5-HT神経への分化を促進できることを明らかにすることに成功した。さらに、本発明では、BMP受容体キナーゼの阻害剤が5-HT神経への分化を促進できること、ならびにNogginの5-HT神経分化誘導作用が、I型TGF-β受容体キナーゼ阻害剤によって阻害されることを見出し、I型TGF-β受容体シグナルが5-HT神経への分化に関与していることを見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、

[1] BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガンドの存在下、重合化した細胞外マトリクスタンパク質上において幹細胞を培養する、5-HT神経細胞製造方法；

[2] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineまたは4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinolineから少なくとも1つ選択される、[1]記載の製造方法；

[3] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineである、[2]記載の製造方法；

[4] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin、4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)

-1-piperazinehexanamide hydrochloride、4-[2-(Methylthio)phenyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1-piperazinehexanamide hydrochlorideから少なくとも1つ選択される、[1]記載の製造方法；

[5] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralinである、[4]記載の製造方法；

[6] I型TGF- β 受容体リガンドが、TGF- β 、Activin、Nodal、GDF-1、GDF-8またはGDF-11から少なくとも1つ選択される、[1]記載の製造方法；

[7] nogginの共存在下において培養する、[1]-[6]のいずれか1つに記載の製造方法；

[8] 幹細胞がES細胞またはiPS細胞である、[1]-[7]のいずれか1つに記載の製造方法；

[9] 細胞外マトリクスタンパク質、幹細胞、5-HT神経細胞誘導剤としてのBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを含む、5-HT神経細胞製造キット；

[10] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineまたは4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinolineから少なくとも1つ選択される、[9]記載の5-HT神経細胞製造キット；

[11] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineである、[10]記載の5-HT神経細胞製造キット；

[12] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S) - (+) - 5 - (1, 3, 5-Trimethylpyrazol-4-yl) - 2 - (dimethylamino) tetralin、4 - (2-Diphenyl) - N - (1, 2, 3, 4-tetrahydronaphthalen-1-yl) - 1-piperazinehexanamide hydrochloride、4 - [2 - (Methylthio) phenyl] - N - (1, 2, 3, 4-tetrahydro-1-naphthalenyl) - 1-piperazinehexanamide hydrochlorideから少なくとも1つ選択される、[9] 記載の5-HT神経細胞製造キット；

[13] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S) - (+) - 5 - (1, 3, 5-Trimethylpyrazol-4-yl) - 2 - (dimethylamino) tetralinである、[12] 記載の5-HT神経細胞製造キット；

[14] I型TGF-β受容体リガンドが、TGF-β、Activin、Nodal、GDF-1、GDF-8またはGDF-11から少なくとも1つ選択される、[9] 記載の5-HT神経細胞製造キット；

[15] nogginをさらに含む、[9] - [14] のいずれか1つに記載の5-HT神経細胞製造キット；

[16] 幹細胞がES細胞またはiPS細胞である、[9] - [15] のいずれか1つに記載の5-HT神経細胞製造キット；

[17] BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガンドを含む、5-HT神経細胞再生剤；

[18] BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガンドを患者に有効量投与することを含む、5-HT神経細胞再生方法；

[19] 5-HT神経細胞再生剤として使用するための、BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガ

ンド；

〔20〕〔1〕－〔8〕のいずれか1つに記載の製造方法によって製造される5-HT神経細胞を含む、精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療のための移植用組成物；

〔21〕〔1〕－〔8〕のいずれか1つに記載の製造方法によって製造される5-HT神経細胞を患者に有効量移植することを含む、精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療方法；

〔22〕精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療のための移植用組成物として使用するための、〔1〕－〔8〕のいずれか1つに記載の製造方法によって製造される5-HT神経細胞；

を提供する。

発明の効果

[0009] 本発明の5-HT神経細胞製造方法によれば、5-HT神経細胞誘導剤として新たに見出したBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを用いることで、幹細胞を効率的に5-HT神経細胞へ分化させることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、各種濃度のLDN-193189の存在下、マトリゲル上でES細胞を14日間培養した際の結果を示す。Luminescence intensityは、5-HT神経分化の指標となる、ETS (Pet1)のエンハンサー領域の活性であり、薬物非添加時を100%として示している。データを平均値±平均値標準誤差として表した。* $p < 0.05$ by Dunnett test.

[図2]図2は、各種濃度の5-HTアゴニスト、アンタゴニストまたはSSRIの存在下、マトリゲル上でES細胞を14日間培養した際の結果を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。* $p < 0.05$ by Dunnett test.

[図3]図3Aは、各種濃度の5-HT₇アゴニストまたはアンタゴニストの存

在下、N o g g i n の添加時のマトリゲル上で E S 細胞を 14 日間培養した際の結果を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。；図 3 B は、N o g g i n (左) および N o g g i n + 5 - H T₇ アнтаゴニスト S B 269970 10 μM (右) の存在下、マトリゲル上で 14 日間培養した細胞における、H o e c h s t 33258 による核と、抗 5 - H T ポリクローナル抗体による 5 - H T の共染色像を示す図である。スケールバー；200 μm

[図4]図 4 は、5 - H T₇ アゴニスト (A S - 19) の存在下または非存在下、E S 細胞をマトリゲル上で 18 日間培養した際のドパミン (D A) およびセロトニン (5 - H T) 濃度を測定した結果を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。

[図5]図 5 は、N o g g i n の存在下または非存在下、E S 細胞をマトリゲル上で培養した際の 5 - H T_{1A} 受容体の m R N A 発現レベルを測定した結果を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。* * p < 0.01 by two-way repeated ANOVA., # p < 0.05, ## p < 0.01 by Turkey-Kramer test.

[図6]図 6 は、N o g g i n の存在下または非存在下、E S 細胞をマトリゲル上で培養した際の 5 - H T₇ 受容体の m R N A 発現レベルを測定した結果を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。* * p < 0.01 by two-way repeated ANOVA., # p < 0.05, ## p < 0.01 by Turkey-Kramer test.

[図7]図 7 は、各種濃度の S B 431542 の存在下、N o g g i n の添加時のマトリゲル上で E S 細胞を 14 日間培養した際の結果を示す。L u m i n e s c e n c e i n t e n s i t y は、5 - H T 神経分化の指標となる、E T S (P e t 1) のエンハンサー領域の活性であり、薬物非添加時を 100% として示している。データを平均値±平均値標準誤差として表した。* * p < 0.01, ## p < 0.01 by Dunnett test.

[図8]図 8 は、各種濃度の S B 431542 の存在下、N o g g i n の添加時

のマトリゲル上でES細胞を14日間培養した際の全神経細胞に対する5-HT細胞の割合を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。；左図は、NogginおよびNoggin+I型TGF- β 受容体アゴニストSB431542の存在下、神経分化マーカーである抗Tuj1モノクローナル抗体と、抗5-HTポリクローナル抗体による、神経細胞に対する5-HT細胞の割合を示す。右図は、NogginおよびNoggin+SB431542の存在下、Hoechst33258、神経分化マーカーである抗Tuj1モノクローナル抗体および抗Map2抗体染色による全細胞に対する神経細胞の割合を示す。* $p < 0.01$ by Dunnett test.

[図9]図9は、Nogginの存在下または非存在下、ES細胞をマトリゲル上で培養した際のBMP受容体およびI型TGF- β 受容体のそれぞれの下流遺伝子のmRNA発現レベルを測定した結果を示す。データを平均値±平均値標準誤差として表した。* $p < 0.01$ by Student's test.

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドの存在下、重合化した細胞外マトリクスタンパク質上において幹細胞を培養することを含む、5-HT神経細胞製造方法を提供する。また、本発明の方法により製造された5-HT神経細胞の用途は特に限定されず、5-HT神経細胞に関するあらゆる試験・研究に用いるモデル細胞、または統合失調症、うつ病、自閉症、摂食障害、睡眠障害などの精神疾患もしくは脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛などを伴う症状の治療・改善に用いる移植用細胞としての用途が提供される。

[0012] 本発明の5-HT神経細胞製造方法において用いられる幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成する複数系列の細胞に分化しうる細胞をいう。具体的にはES細胞、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞（EG細胞：Proc Natl Acad Sci U

S A. 1998, 95:13726-31)、精巣由来の多能性幹細胞 (GS細胞: Nature. 2008, 456:344-9)、体細胞由来人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS細胞)、ヒトの体性幹細胞 (組織幹細胞) が挙げられ、好ましくは、iPS細胞、ES細胞である。

[0013] ES細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来するES細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。ES細胞の好ましい例としては、ヒトまたはマウスに由来するES細胞が挙げられる。

ES細胞の具体例として、着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等のES細胞、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立したES細胞、及びこれらのES細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変したES細胞が挙げられる。

各ES細胞は当該分野で通常実施されている方法や、公知文献に従って調製することができる。

マウスのES細胞は、1981年にエバンスら (Evans et al., 1981, Nature 292:154-6) や、マーチンら (Martin GR. et al., 1981, Proc Natl Acad Sci 78:7634-8) によって樹立されており、例えば大日本住友製薬株式会社 (大阪、日本) などから購入可能である。

ヒトのES細胞は、1998年にトムソンら (Thomson et al., Science, 1998, 282:1145-7) によって樹立されており、WiCell研究施設 (WiCell Research Institute、ウェブサイト: <http://www.wicell.org/>、マジソン、ウイスコンシン州、米国)、米国国立衛生研究所 (National Institute of Health)、京都大学など

から入手可能であり、例えばCellartis社（ウェブサイト：<http://www.cellartis.com/>、スウェーデン）などから購入可能である。

[0014] iPS細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来するiPS細胞を使用できる。該哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。iPS細胞の好ましい例としては、ヒトまたはマウスに由来するiPS細胞が挙げられる。

iPS細胞の具体例として、皮膚細胞等の体細胞に複数の遺伝子を導入して得られる、ES細胞同様の多分化能を獲得した細胞が挙げられ、例えばOct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、C-Myc遺伝子及びSox2遺伝子を導入することによって得られるiPS細胞、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子及びSox2遺伝子を導入することによって得られるiPS細胞（Nat Biotechnol 2008; 26: 101-106）が挙げられる。他にも、導入遺伝子をさらに減らした方法（Nature. 2008 Jul 31; 454 (7204): 646-50）、低分子化合物を利用した方法（Cell Stem Cell. 2009 Jan 9; 4 (1): 16-9、Cell Stem Cell. 2009 Nov 6; 5 (5): 491-503）、遺伝子の代わりに転写因子タンパク質を利用した方法（Cell Stem Cell. 2009 May 8; 4 (5): 381-4）などが挙げられる。

作成されたiPS細胞は、その作出方法によらずいずれも本発明に用いられる。

ヒトiPS細胞株としては、具体的には、253G1株（36歳女性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4を発現させて作成されたiPS細胞株）、201B7株（36歳女性の皮膚線維芽細胞にOCT4/SOX2/KLF4/c-MYCを発現させて作成されたiPS細胞株）、1503-iPS（297A1）（73歳女性の皮膚線維芽細胞にOCT4/S

O X 2 / K L F 4 / c - M Y C を発現させて作成された i P S 細胞株)、 1 3 9 2 - i P S (2 9 7 F 1) (5 6 歳男性の皮膚線維芽細胞に O C T 4 / S O X 2 / K L F 4 / c - M Y C を発現させて作成された i P S 細胞株)、 N H D F - i P S (2 9 7 L 1) (新生児男性の皮膚線維芽細胞に O C T 4 / S O X 2 / K L F 4 / c - M Y C を発現させて作成された i P S 細胞株) 等が挙げられる。

[0015] 本発明の 5 - H T 神経細胞製造方法では、前記幹細胞を重合化した細胞外マトリクスタンパク質上において培養する。

本発明において、細胞外マトリクスタンパク質は、細胞の外側の空間を構成するタンパク質であって、細胞接着作用を有し、そこで培養される細胞が正常な細胞の機能維持、自己増殖及び分化を行うことができるものであれば、その種類は特に制限されないが、基底膜を構成する細胞外マトリクスタンパク質が好ましい。そのような細胞外マトリクスタンパク質としては、例えば、ラミニン、コラーゲン、エンタクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ナイドジェン、フィブロネクチン、ゼラチン、ビトロネクチン、エラスチンおよびテネイシンなどが挙げられ、そのうち、コラーゲン中でも I V 型コラーゲン、プロテオグリカンの中でもヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン、ナイドジェン、エンタクチンおよびフィブロネクチンは基底膜を構成する細胞外マトリクスタンパク質として好ましい。また、細胞外マトリクスタンパク質としては市販されているものも用いることができ、例えば、E n g e l b r e t h - H o l m - S w a r m (E H S) マウス肉腫から抽出された基底膜成分で構成されるマトリゲル (B D B i o s c i e n c e s) は、本発明において好ましく用いることができる。

前記細胞外マトリクスタンパク質は、本発明の 5 - H T 神経細胞製造方法に用いる際に、予め細胞培養器上で重合化される。重合化は、前記細胞外マトリクスタンパク質を、予め低温で溶解させておき、22～35℃でインキュベートすることによって、容易に重合化させることができる。重合化される細胞外マトリクスタンパク質でコートされる細胞培養器としては、例えば

、フラスコ、組織培養用フラスコ、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられる。好ましくは、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート等である。

[0016] 幹細胞は、モノセルとして懸濁した該細胞を、培地中に懸濁し、前記の重合化された細胞外マトリクスタンパク質上に 1.0×10^3 の密度で播種すればよい。培養は、通常、5%CO₂/95% air、37℃のインキュベーター内で7～20日間、好ましくは12～20日間培養し、幹細胞を神経系細胞へと分化させることができる。

用いられる培地としては、通常、幹細胞を培養するのに用いられる培地（以下、基礎培地）であってよく、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地及びこれらの混合培地等、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。これらの培地は、Life Technologies社、SIGMA社、和光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一商品名の培地であれば培地の組成は製造元によらず同等である。

本発明の5-HT神経細胞製造方法で用いられる培地は、血清含有培地であってもよいが、無血清培地であることが好ましい。ここで、無血清培地とは、無調整又は未精製の血清を含まない基礎培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混入している培地は無血清培地に該当するものとする。

本発明の5-HT神経細胞製造方法で用いられる培地はまた、血清代替物

を含んでいてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレン）、B-27サプリメント、N2サプリメント、ノックアウトシーラムリプレースメント、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、又はこれらの均等物が挙げられる。これらの培地中の濃度は、例えば、通常0.01~20重量%、好ましくは0.1~10重量%である。

ノックアウトシーラムリプレースメントはLife Technologies社から購入可能である。その他の血清代替物については、Life Technologies社、SIGMA社、和光純薬工業社、大日本住友製薬社などから購入可能であり、同一名称あるいは同一商品名の試薬あるいは添加物であれば組成は製造元によらず同等である。

[0017] 本発明の5-HT神経細胞製造方法で用いられる培地はまた、脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、抗生物質（例えばペニシリンやストレプトマイシン）又は抗菌剤（例えばアンホテリシンB）等を含含有してもよい。これらの培地中の濃度は、前記した血清代替物の培地中の濃度と同様である。

[0018] 本発明の5-HT神経細胞製造方法においては、幹細胞の培養は5-HT神経細胞誘導剤としてBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを培地中に添加して行われる。

BMP受容体は、細胞外に分泌されるタンパク質であるBMP（骨形成タンパク質：Bone Morphogenetic Protein）の受容体型セリン／スレオニンキナーゼであり、I型受容体およびII型受容体に大別される。BMP受容体としてALK（Activin like kinase）が知られている。BMP受容体キナーゼ阻害剤としては、4-（6-（4-（piperazin-1-yl）phenyl）pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl）quinoline

(LDN-193189)、4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline (DMH-1) などが挙げられる。その中でも、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline が好ましく用いられる。

5-HT₇受容体は、トリプトファンから合成されるセロトニンをリガンドとしたセロトニン受容体サブタイプの1つであり、Gタンパク質結合型受容体である。5-HT₇受容体アゴニストとしては、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin (AS-19)、4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride (LP12)、4-[2-(Methylthio)phenyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride (LP44) などが挙げられる。その中でも、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin が好ましく用いられる。

TGF- β 受容体は、BMPとファミリーを形成するTGF- β の受容体型セリン／スレオニンキナーゼであり、BMP受容体と同様、I型受容体およびII型受容体に大別される。I型TGF- β 受容体リガンドとしては、例えば、TGF- β 、Activin、Nodal、GDF-1、GDF-8またはGDF-11が挙げられる。TGF- β 、Activin、Nodal、GDF-1、GDF-8またはGDF-11は、例えばR&D Systems, Incから購入することができる。また、上記リガンドはアクセッション番号 (GenBank) として、例えば、TGF- β 1の場合、N

C_000019.9 (NP_000651.3) (ヒト)、NC_000073.5 (NP_035707.1) (マウス) として、TGF- β 2の場合、NC_000001.10 (NP_001129071.1) (ヒト)、NC_000067.5 (NP_033393.2) (マウス) として、TGF- β 3の場合、NC_000014.8 (NP_003230.1) (ヒト)、NC_000078.5 (NP_033394.2) (マウス) として、Activinは、NC_000007.13 (NP_002183.1) (ヒト)、NC_000079.5 (NP_032406.1) (マウス) として、Nodalは、NC_000010.10 (NP_060525.3) (ヒト)、NC_000076.5 (NP_038639.2) (マウス) として、GDF-1は、NC_000019.9 (NP_001483.3) (ヒト)、NC_000074.5 (NP_001156754.1) (マウス) として、GDF-8は、NC_000002.11 (NP_005250.1) (ヒト)、NC_000067.5 (NP_034964.1) (マウス) として、GDF-11は、NC_000012.11 (NP_005802.1) (ヒト)、NC_000076.5 (NP_034402.1) (マウス) として、タンパク質の塩基配列（アミノ酸配列）を容易に入手することができるので、当業者は周知の組換えタンパク質技術を用いて各種リガンドを容易に作製することができる。

前記BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドは、幹細胞培養中のいかなる時点において添加してもよいが、BMP受容体キナーゼ阻害剤については、培養開始後0～5日目までに培地に添加することが好ましく、5-HT₇受容体アゴニストについては、培養開始後6～14日に添加することが好ましいが、本発明の製造方法においては、成熟神経細胞は培養8日目以降に誘導されるため、5-HT₇受容体アゴニストのうちAS-19の場合は、培養開始後6～7日目以降に添加することが好ましい。また、I型TGF- β 受容体リガンドについては、培養開始後0～5日に添加することが好ましい。

BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガンドは、それぞれ単独で添加されてもよいし、同時に添加されてもよい。さらに、BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガンドはそれぞれ2種類以上の剤、リガンドが同時に添加されてもよい。

前記BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF-β受容体リガンドの培地中への添加量は、当業者が適宜決定することができる。しかし、例えば、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineであれば、1nM~1000nM、好ましくは、10nM~300nMで添加することが例示される。また、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralinであれば、0.1μM~100μM、好ましくは、1μM~10μMで添加することが例示される。当業者は前記の範囲を変更して用いることもできる。

[0019] また、前記5-HT神経細胞誘導剤としては、さらにnogginを共存させていてもよい。nogginは、前記I型TGF-β受容体リガンドと同様、例えばR&D Systems, Incから購入することができる。また、nogginはアクセッション番号(GenBank)として、例えば、Np__032737(マウス)、AAH34027(ヒト)として、タンパク質のアミノ酸配列および塩基配列を容易に入手することができるので、当業者は周知の組換えタンパク質技術を用いてnogginを容易に作製することができる。

[0020] 本発明の5-HT神経細胞製造方法においては、前記の培養の結果、幹細胞から分化誘導された5-HT神経細胞の確認を行う。

上記5-HT神経細胞に分化誘導されたことの確認は、

- (1) 5-HT量を計測すること、又は
- (2) 5-HT神経細胞のマーカーを免疫染色すること

の少なくともいずれか一方を行うことで確認することができるが、これらの方法に限定されず、5-HT神経細胞が存在することを検証できればよい。

[0021] 5-HT量の計測は、これに限るものではないが、既存の生体アミン量の測定方法 (Matsuda et al., European Journal of Pharmacology 1989, 170:75-82) を用いて行うことができる。すなわち、培養したES細胞に対し、高濃度（例えば56mM）のK⁺を含む溶液を加えてインキュベートし、該溶液をHPLC/ECD等により測定することで行うことができる。K⁺を含む溶液としてはHanks液等の緩衝塩類溶液を用いることができるが、これに限られない。

[0022] また、5-HT神経細胞のマーカーとしては、5-HTまたは5-HT合成酵素を用いることができるがこれに限られない。セロトニン神経に特異的に発現している公知のマーカーを用いればよい。

[0023] 5-HT及び5-HT合成酵素に対する抗体を用いて免疫染色する場合、5-HT及び5-HT合成酵素は細胞表面には発現していないため、染色すべき細胞を周知の方法により固定化した後、界面活性剤等により細胞膜の透過性を増大させることにより抗体分子を細胞内に到達できるようにすることが好ましい。

[0024] なお、5-HT神経細胞の細胞表面に発現している適切なマーカーが存在しないため、例えばFACSを用いて濃縮する場合、5-HT神経特異的にGFP（緑色蛍光タンパク質）等を発現するように予め形質転換する方法等を用いる必要がある。ただし、本発明に係る方法を用いて作製した5-HT神経細胞標品を用いれば、適当な細胞表面マーカーを見出すことができる可能性がある。

[0025] 本発明はまた、5-HT神経細胞を製造するキットとして、細胞外マトリクスタンパク質、幹細胞、5-HT神経細胞誘導剤としてのBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを含む、5-HT神経細胞製造キットを提供する。

本発明の5-HT神経細胞製造キットは試薬、器具、装置等が含まれていればよく、特に限定されるものではない。細胞外マトリクスタンパク質、5-HT神経細胞誘導剤としてのBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドは、前記5-HT神経細胞製造方法において述べたものと同一のものをを用いることができ、5-HT神経細胞誘導剤としては、前記5-HT神経細胞製造方法と同様にnogginをさらに含んでよい。また、それらは、乾燥状態で提供されても、溶液状態で提供されてもよい。該キットを用いて、前記5-HT神経細胞製造方法を実施することにより、5-HT神経細胞を作製することができる。また、BMP受容体キナーゼ阻害剤としては、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline、4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinolineなどが好ましく含まれてよく、その中でも、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineがより好ましい。5-HT₇受容体アゴニストとしては、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin、4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride、4-[2-(Methylthio)phenyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1-piperazinehexanamide hydrochlorideなどが好ましく含まれてよく、その中でも、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralinがより好ましい。I型TGF- β 受容体リガンドとして

は、 $TGF-\beta$ 、Activin、Nodal、 $GDF-1$ 、 $GDF-8$ または $GDF-11$ などが好ましく含まれる。また、BMP受容体キナーゼ阻害剤、 $5-HT_7$ 受容体アゴニスト、またはI型 $TGF-\beta$ 受容体リガンドは2種類以上が含まれていてもよい。さらに、本キットは幹細胞として、前記 $5-HT$ 神経細胞製造方法において述べたものと同一のものをを用いることができ、好ましくは、ES細胞またはiPS細胞として含まれてよい。

[0026] $5-HT$ 神経の機能不全は、攻撃性及び衝動性の増加や摂食障害等の一因であることが知られており、幾つかの精神疾患（例えば、統合失調症、うつ病、自閉症、摂食障害、睡眠障害など）、脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の原因の一つとして挙げられている。前記疾患、症状を改善・緩和するストラテジーとしては、機能不全に陥った $5-HT$ 神経細胞を新たな $5-HT$ 神経細胞に代替させることが想定される。本発明では、BMP受容体シグナル、 $5-HT_7$ 受容体シグナルまたはI型 $TGF-\beta$ 受容体シグナルが、幹細胞からの $5-HT$ 神経細胞への分化に関与していることを見出した。従って、本発明は、BMP受容体キナーゼ阻害剤、 $5-HT_7$ 受容体アゴニスト、またはI型 $TGF-\beta$ 受容体リガンドを含む、 $5-HT$ 神経細胞再生剤を提供する。

[0027] 本発明の $5-HT$ 神経細胞再生剤の投与形態・剤型は、経口投与、非経口投与のいずれでもよく、経口投与剤としては、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、チュアブル剤などの固形剤、溶液剤、シロップ剤などの液剤が、また、非経口投与剤としては、注射剤、軟膏、スプレー剤などが挙げられる。好ましくは非経口投与、さらに好ましくは注射剤である。

[0028] 本発明の $5-HT$ 神経細胞再生剤の製剤上の必要に応じて添加される成分としては、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、滑沢剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤などが挙げられる。賦形剤としては、乳糖、ブドウ糖、D-マンニトールなどの糖類、でんぷん類、結晶セルロースなどのセルロース類などの有機系賦形剤、炭酸カルシウム、

カオリンなどの無機系賦形剤などが、結合剤としては、 α 化デンプン、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、D-マンニトール、トレハロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどが、滑沢剤としては、ステアリン酸、ステアリン酸塩などの脂肪酸塩、タルク、珪酸塩類などが、溶剤としては、精製水、生理的食塩水などが、崩壊剤としては、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、化学修飾されたセルロースやデンプン類などが、溶解補助剤としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが、懸濁化剤あるいは乳化剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、アラビアゴム、ゼラチン、レシチン、モノステアリン酸グリセリン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが、等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン、尿素などが、安定化剤としては、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸ナトリウム、その他のアミノ酸類などが、無痛化剤としては、ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカインなどが、防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが、抗酸化剤としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが、矯味矯臭剤としては、医薬分野において通常に使用される甘味料、香料などが、着色剤としては、医薬分野において通常に使用される着色料が挙げられる。

[0029] 特に好ましい剤形である水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤には抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、溶解補助剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。

抗酸化剤、等張化剤、懸濁剤、安定化剤、溶解補助剤及び防腐剤としては、前記されたものが、それぞれ挙げられる。緩衝液としては、例えば、TE緩衝液（10 mM トリス、1 mM EDTA [pH 8.0]）、PBS（リン酸緩衝液）等を適宜選択し使用できるが、pHが6～9の緩衝液が好ましい。制菌剤としては、オキシリン酸、オルメトプリム、トリメトプリム、サルファ剤、ホスホマイシン、ペニシリン系抗菌剤、セファロスポリン系抗菌剤、バンコマイシン、テトラサイクリン系抗菌剤、リファンピシン、フルオロキノロン系抗菌剤などが挙げられ、増粘剤としてはアラビアゴム、リピオドール、ポリアクリル酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどが挙げられる。

[0030] 注射剤であった場合、本発明の5-HT神経細胞再生剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容可能な担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。

[0031] 本発明の5-HT神経細胞再生剤の投与量及び投与回数は、投与対象の年齢・体重・病態、投与方法などによっても異なるが、通常、例えば、投薬単位剤形当たりBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニストまたはI型TGF- β 受容体リガンドを通常5～500 mg、とりわけ注射剤では5～100 mg、その他の剤形では10～250 mg含有されていることが好ましい。投与は単回投与でもよく、また複数回投与してもよい。

[0032] また投与の一態様において、本発明の5-HT神経細胞再生剤は、脳内に直接投与されてもよい。投与方法としては、適切な緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）など）に懸濁した本発明の5-HT神経細胞再生剤を、手術腔へ注射により投与する方法、カテーテルを通じて投与する方法などが挙げられる。

[0033] 本発明はまた、BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドの存在下、重合化した細胞外マトリ

クスタンパク質上において幹細胞を培養することによって得られる5-HT神経細胞を含む、精神疾患（例えば、統合失調症、うつ病、自閉症、摂食障害、睡眠障害など）または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療のための移植用組成物を提供する。5-HT神経細胞自体を移植、定着させることで、前記再生剤によって神経幹細胞の*in vivo*分化誘導が達成できない場合に、有効である。

[0034] 本発明の5-HT神経細胞を含む移植用組成物は低毒性であり、特に、本発明の5-HT神経細胞の製造方法はフィーダー細胞や血清を用いる必要がないため、移植の際にレシピエント側に外来性因子を持ち込む懸念がない点で好適である。また、幹細胞として患者自身に由来するiPS細胞を用いれば、HLAの不一致の問題がなく免疫応答による拒絶反応を回避できる。従って、本発明の製造方法で得られた5-HT神経細胞をそのまま移植してもよいし、または一旦凍結保存し、用時に解凍して用いることもできる。移植される患者（対象）としては、ヒトまたは他の哺乳動物（例、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）などが挙げられる。

[0035] 本発明の5-HT神経細胞を含む移植用組成物は、5-HT神経細胞のほかに移植上適切な無菌の水性液に懸濁することによって調製できる。無菌の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が挙げられる。

[0036] 本発明の5-HT神経細胞を含む移植用組成物に含まれる細胞数は、移植対象、移植範囲、対象疾患、その重篤度などによっても異なるが、例えば、成人の精神疾患患者の場合、本発明の5-HT神経細胞を含む移植用組成物を1回移植量として、通常10～100,000細胞数程度、好ましくは100～10,000細胞数程度を移植することができる。また、移植は定着の程度をみて、日数を置いて複数回実施してもよい。

実施例

[0037] 以下において、実施例および参考例により本発明をより具体的にするが、

この発明はこれらに限定されるものではない。

[0038] 材料および方法

(1) ES細胞の培養

マウスES細胞(E14株)を、0.1%ゼラチンによりコーティングした10cm tissue culture dishに1000U/mL LIF (Leukemia Inhibitory Factor) 存在下、10%牛胎児血清、ESM [0.1mM NEAA (non-essential amino acid; Sigma)、1mM sodium pyruvate (Sigma)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma) を含むGMEM (Glasgow)] を用いて播種し、5%CO₂/95% air、37℃のインキュベーター内で培養した。継代は trypsin-EDTA (0.25% trypsin, 1mM EDTA·4Na) (GIBCO BRL) を用いて1日おきに行った。

(2) マトリゲルを用いたES細胞培養系

マトリゲル (Growth Factor Reduced) (BD Biosciences) 30μl/well を48-well plate に入れて広げ、過剰に残るマトリゲル約15μlを除いた後、37℃、30分の静置により重合化させたものを用いて培養を行った。シングルセルに分散し懸濁した未分化ES細胞を、 8×10^2 cells/well の濃度で、ES differentiation medium [ESM/10% Knockout Serum Replacement (GIBCO BRL)] 中に懸濁し、150μL/well を播種した。これを、5%CO₂/95% air、37℃のインキュベーター内で14日間培養し、ES細胞を神経系細胞に分化させた。培養開始から、毎日培地を交換した。

(3) 各種因子の添加

因子として、Noggin (発明者らが作製)、BMP受容体キナーゼ阻害剤のLDN-193189 (STEMGENT)、5-HT作動薬としてセロトニン塩酸塩 (Sigma-Aldrich)、GR 127935

塩酸塩水和物 (Sigma-Aldrich)、シサプリドー水和物 (Sigma-Aldrich)、AS 19 (Tocris)、SB 269970 塩酸塩 (Tocris)、フルオキセチン塩酸塩 (LKT laboratories)、I型TGF- β 受容体キナーゼ阻害剤としてSB431542をそれぞれ用いた。Noggin、BMP受容体キナーゼ阻害剤は培養0～5日、5-HT作動性薬は培養6～14日、I型TGF- β 受容体キナーゼ阻害剤は培養0～5日に培養液中に添加した。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

5-HT神経分化の指標となる、Pet-1 (FEV (ETS oncogene family)) 遺伝子のエンハンサー領域の配列 (マウス Pet1 exon 1の5'末端の65bp上流から始まる1,845bp)の下流にGaussialルシフェラーゼ遺伝子を機能可能に連結した融合遺伝子をトランスフェクションしたES細胞を前記各種因子の存在下または非存在下において培養し、該培養液からルシフェラーゼタンパク質を回収し、BioLux Gaussia Luciferase Flex Assay Kit (NEB) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。まず1サンプルにつき、Buffer 25 μ l、Stabilizer 4 μ l、Substrate 0.25 μ lを混合し、25分間、室温、遮光条件下で静置した。そしてその溶液を、測定するサンプル 5 μ lを入れておいた96well Microtiter Plate (Thermo) に25 μ l添加し、10分後にマイクロミノメーター (Lumi Count Packard) を用いて各サンプルの発光量を計測した。

(5) 細胞免疫染色

24-well plateで分化培養を行い、培養14日目の細胞に対して免疫染色した。まず細胞をPBSで2回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで4℃、10分間固定化した。これをPBSで1回洗浄後、PBST (0.1mM PBS with 0.3% Triton) / 10% FBSでブロッキング処理を行った。一次抗体としてマウス抗GFPモノクロ

ーナル抗体（５００倍希釈、C l o n t e c h）、ラビット抗セロトニンポリクローナル抗体（１０００倍希釈、D i a S o r i n）、マウス抗T u j 1モノクローナル抗体（５００倍希釈、C o v a n c e）、ラビット抗M a p 2抗体（５００倍希釈、C h e m i c o n）をブロッキング溶液で希釈し、４℃で一晩反応させた。

一次抗体反応後は、P B S Tで３７℃、１０分間、２回洗浄した。そして、二次抗体としてA l e x a 5 9 4 - c o n j u g a t e d 抗マウスI g G（１０００倍希釈、M o l e c u l a r P r o b e s）、A l e x a 4 8 8 - c o n j u g a t e d 抗ラビットI g G（１０００倍希釈、J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s）、H o e c h s t 3 3 2 5 8（１０００倍希釈、C A L B I O C H E M）をブロッキング溶液で希釈し、３７℃、１時間反応させた。その後、P B S Tで３７℃、１０分間、３回洗浄した後、スライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

（６）ドパミン、セロトニン濃度の測定

E S細胞をマトリゲル上での培養１０日目からA S - 1 9を添加して培養し、H B S S（H a n k s b a l a n c e d s a l t s o l u t i o n）で２回洗浄し、５６ｍＭ K^{+} を含むH B S Sを５００ μ l/wellに加え、３７℃で１５分間インキュベートして、培養１８日目にサンプルとして回収した。測定は高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出器（H P L C／E C D）システムにサンプル１０ μ lをマニュアルインジェクションし、ドパミンおよびセロトニンを同時検出した。測定条件として、カラムにはE i c o m p a k C A - 5 0 D S（２．１ｍｍ i . d . × 1 5 0 m m, E i c o m）を、H P L Cの移動相には５００ｍｇ／lデカンスルホン酸ナトリウム、１３４ μ M E D T A、２０％（v/v）メタノールを含む１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6. 0）を用い、流速０．２３ml/min、カラム温度２５℃、E C Dの加圧電圧は４５０mVとし、参照電極にはA g / A g C l 電極、作用電極にはグラファイト標準電極（E i c o m）

を用いて測定した。

(7) Real-Time PCR

RNA抽出はグアニジンチオシアネート酸性フェノール法により行った。また、逆転写反応はES細胞あるいは分化誘導した細胞より抽出したtotal RNA 1.0 μ gを鋳型として、逆転写酵素M-MLV (GIBCO BRL)を用いて行い、cDNAプールを作製した。得られたcDNAプールを20倍希釈したものを鋳型として、各遺伝子に特異的なプライマー、GoTaq (登録商標) qPCR Master Mix (Promega)、CFX 96 Real time System (BIO-RAD)を用いてreal-time PCRを行った。内部標準としてはラット β -actinを用いた。反応条件は95°C 15秒、58~66°C 60秒を1サイクルとして40サイクル行った。用いた特異的プライマーの配列と、それぞれのアニーリング温度は、下記の通りである。

β -actin : 60°C

5' -ACCCACACTGTGCCCATCTA-3' (配列番号1)

5' -GCCACAGGATTCCATACCCA-3' (配列番号2)

5-HT₇受容体 : 66°C

5' -TCCAGTGCCAGTACCGGAATATCAAC-3' (配列番号3)

5' -TACTTCTTCTCCAGGGTTCCGCTCT-3' (配列番号4)

5-HT_{1A}受容体 : 60°C

5' -TCGCTCACTTGGCTCATTTGGCTTT-3' (配列番号5)

5' -TTCCACCTTCTTGACCGTCTTGCG-3' (配列番号6)

Id-1 : 64°C

5' -GAGTCTGAAGTCGGGACCAC-3' (配列番号7)

5' -GATCGTCGGCTGGAACAC-3' (配列番号8)

Id-2 : 58°C

5' -ACAGAACCCAGGCGTCCAG-3' (配列番号9)

5' -AGCTCAGAAGGGAATTCAGATG-3' (配列番号
10)

Id-3 : 66°C

5' -CATAGACTACATCCTCGACCTTCA-3' (配列
番号11)

5' -CACAAAGTTCCGGAGTGAGC-3' (配列番号12)

Smad7 : 66°C

5' -GGCCGGATCTCAGGCATTC-3' (配列番号13)

5' -TTGGGTATCTGGAGTAAGGAGG-3' (配列番号
14)

Pitx2 : 64°C

5' -CGTGTGGACCAACCTTACG-3' (配列番号15)

5' -AAGCCATTCTTGACAGCTC-3' (配列番号16
)

Lefty1 : 66°C

5' -TCGATCAACCGCCAGTCCTG-3' (配列番号17
)

5' -TGGGGACAGCCTCTTTTGCC-3' (配列番号18
)

Lefty2 : 64°C

5' -GAACAGGTCCTGAGCAGTCTACTG-3' (配列
番号19)

5' -CCTCTCGAAAATTCTGGCTGAA-3' (配列番号
20)

[0039] 実施例1 : BMP受容体キナーゼ阻害剤による5-HT神経分化誘導

発明者らはN o g g i nが5-H T神経分化誘導作用をもつことと同時に、他の主なBMPアンタゴニストであるC h o r d i nやF o l l i s t a t i nには同様な作用が全く認められないことを明らかにした。

そこで、本実施例ではBMPアンタゴニストとは異なる作用点からBMPシグナルの遮断を引き起こす、BMP受容体キナーゼ阻害剤の選択的阻害剤L D N-193189を用いて、5-H T神経分化誘導作用を検討した。

L D N-193189 (S T E M G E N T) を培養0～5日に培養液中に添加し、E S細胞をマトリゲル上で培養した。用いたE S細胞および培養方法は前記に従い、培養14日目における5-H T神経分化を評価した。その結果、L D N-193189 (3～100 nM) が、5-H T神経の分化誘導作用をもつことが明らかになった (図1)。

[0040] 実施例2：5-H Tが5-H T神経分化に与える影響

5-H Tが5-H T神経の分化に影響を与えうることが、げっ歯類の胎児脳の初代培養細胞を用いた研究によって報告されているが、E S細胞やi P S細胞のような多能性の未分化幹細胞からの神経分化系において、5-H Tや5-H T受容体に作用する薬物が5-H T神経分化にどのような作用をもつのかについては、全く不明であった。そこで、各種5-H T受容体アゴニスト、アンタゴニストが5-H T神経分化に与える影響を検討した。

[0041] 5-H Tが5-H T神経分化に与える影響

5-H T、5-H T_{1B/1D}受容体アンタゴニスト、S S R I、5-H T_{4,7}受容体アゴニストを加え、培養14日後の5-H T神経分化を評価した (図2)。5-H T、5-H T_{1B/1D}受容体アンタゴニストであるG R 127935、S S R IであるF l u o x e t i n e、5-H T₄受容体アゴニストであるC i s a p r i d eは5-H T神経分化を促進しなかった。これに対して、5-H T₇受容体アゴニストであるA S-19 (1～10 μM) は、5-H T神経分化を促進することが明らかになった。次に、5-H T₇受容体のアゴニスト、アンタゴニストを、N o g g i nの添加時でも調べたところ、5-H T₇受容体アゴニストA S-19はN o g g i n単独の効果をさらに促進

する傾向を示し、逆に5-HT₇受容体アンタゴニストSB 269970は、Nogginによる作用を強く阻害した(図3A)。またこのとき、抗5-HT抗体を用いた免疫染色によって、SB 269970が、Nogginによって誘導された5-HT神経を含むコロニー内の5-HT神経細胞数を減少させることが確認された(図3B)。

[0042] 実施例3：5-HT₇受容体アゴニスト(AS-19)による5-HT神経分化誘導

5-HT₇受容体アゴニストであるAS-19の存在または非存在下、ES細胞をマトリゲル上で18日培養し、5-HT神経分化をドパミン、セロトニン濃度の測定することによって評価した。AS-19はマトリゲル培養10日目から10μMで添加を開始した。その結果、AS-19を添加した場合は、AS-19を添加しなかった場合(control)に比べて、セロトニン濃度が有意に高いことが明らかとなった(図4)。

[0043] 実施例4：Nogginによる5-HT神経分化誘導

Nogginの存在または非存在下、ES細胞をマトリゲル上で培養し、5-HT神経分化を5-HT_{1A}受容体および5-HT₇受容体のmRNA発現レベルを測定することによって評価した。Nogginはマトリゲル培養開始から5日目まで200ng/mL相当量で添加を開始し、培養後8、10、12、14日目に細胞を回収し、該細胞から抽出したmRNAを鋳型としてReal-time PCRを実施した。その結果、Nogginを添加した場合は、Nogginを添加しなかった場合(control)に比べて、5-HT_{1A}受容体および5-HT₇受容体のmRNA発現レベルが有意に高いことが明らかとなった(図5、6)。

[0044] 実施例5：5-HT₇受容体アゴニストが5-HT神経分化に与える影響

5-HT₇受容体アゴニストである、AS-19がマトリゲル上でES細胞を効率的に5-HT神経細胞に分化誘導し、またアンタゴニストがNogginの5-HT神経細胞誘導効果を抑制したことから、5-HT₇受容体が5-HT神経細胞への分化に関与することをうかがわせる。

そこで、各種5-HT₇受容体アゴニストを用いて、マトリゲル上でES細胞を5-HT神経細胞に効率的に分化させるか否かの検討を行う。5-HT₇受容体アゴニストとしては、AS-19以外にも、4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride (LP12)、4-[2-(Methylthio)phenyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride (LP44)などを用いる。前記5-HT₇受容体アゴニストの存在下、未処理細胞に比して、有意に5-HT神経分化が促進されれば、5-HT神経細胞誘導剤として選抜できる。また、Nogginを添加し、その5-HT神経細胞誘導効果をさらに高める5-HT₇受容体アゴニストを5-HT神経細胞誘導剤として選抜してもよい。また、かかる評価は、5-HTに対する免疫染色や5-HT量の計測によっても評価することができる。

[0045] 実施例6：SB431542がセロトニン神経分化に与える影響（ルシフェラーゼアッセイ）

TGF- β シグナルの阻害剤SB431542は単独またはBMPアンタゴニストNogginとの共処置でヒトES細胞から神経細胞への分化を促進することが報告されている。そこで、5-HT神経分化に対してはSB431542がどのような作用を示すのか検討を行うことにした。

48 well plateでNogginとSB431542は培養開始から5日目まで添加を行い、Nogginは200 ng/mL相当量で、SB431542は0.1~10 μ Mで添加した。培養14日目にそれぞれの培養液を回収しルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、SB431542の10 μ MはNogginの5-HT神経分化誘導作用を有意に抑制することが明らかとなった。このことから、TGF- β シグナルを抑制することで5-HT神経への分化が抑制されることが明らかとなった（図7）。

[0046] 実施例7：SB431542がセロトニン神経分化に与える影響（免疫染色）

24 well plateでNogginは200 ng/mL相当量、SB431542は1～10 μ Mで培養開始から5日目まで添加を行い14日間培養を行った。培養14日目に2 units/mLのDispase (Gibco)を400 μ L/wellで加え、5%CO₂/95%air, 37℃のインキュベーター内で2時間静置させた後、剥離したコロニーを1.5 mL tubeに回収して遠心（5000 rpm、5分）し、上清を除いた。そしてPBSで洗浄した後、Trypsin-EDTA（0.25% Trypsin, 1 mM EDTA・4 Na）を100 μ L/tubeで加えよくピペティングを行った。その3分後、ESM/10%FBSを500 μ L加え反応を止め、再び遠心（5000 rpm、5分）し、上清を除いた。そして、ESM/10%ノックアウトシーラムリプレースメントで4×10⁶ cells/mLになるように懸濁を行い、0.075%poly-L-lysineでコーティングしたカバーガラスをのせた24 well plateの上に500 μ L/wellで播種した。そして5%CO₂/95%air, 37℃のインキュベーター内で6時間静置させた後免疫染色を行った。その結果、SB431542を1 μ M以上の濃度で添加すると有意に神経細胞における5-HT神経細胞の割合が低下した（図8）。しかし、全細胞における神経細胞の割合はいずれの濃度においても変化しなかった。これよりSB431542によりTGF- β シグナルを阻害すると、5-HT神経細胞への分化が特異的に阻害されることが明らかとなった。

[0047] 実施例8：NogginがTGF- β およびBMPシグナルの下流遺伝子の発現に与える影響

Nogginの存在または非存在下、ES細胞をマトリゲル上で培養し、TGF- β およびBMPシグナルの下流遺伝子の発現に対する影響をmRNA発現レベルを測定することによって評価した。Nogginはマトリゲル培養開始から2日目まで200 ng/mL相当量で添加し、培養後2日目に

細胞を回収し、該細胞から抽出したmRNAを鋳型としてReal-Time PCRを実施した。その結果、Nogginの添加によりBMPシグナルの下流遺伝子として知られるId遺伝子はいずれも発現が減少しており、逆にTGF- β の下流遺伝子として知られるLeftyの発現が上昇していた。ただし、同じくTGF- β の下流遺伝子として知られているSmad7やPitx2はNogginによる発現変化が認められなかった（図9）。以上より、NogginによりBMPシグナルが抑制されているだけでなく、TGF- β シグナルが少なくとも部分的に活性化していることが明らかになり、また、実施例6, 7の通り、TGF- β シグナルの阻害剤SB431542がTGF- β シグナルを阻害すると、5-HT神経分化が特異的に抑制されることから、Nogginの5-HT神経分化促進作用にTGF- β シグナルの活性化が関与している可能性が新たに示唆された。

産業上の利用可能性

[0048] 本発明において、5-HT₇受容体の5-HT神経細胞分化への関与が初めて見出され、5-HT神経細胞が、統合失調症、うつ病、自閉症、摂食障害、睡眠障害などの精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛などを伴う症状への関与の可能性が疑われることから、BMP受容体、5-HT₇受容体、I型TGF- β 受容体の該疾患、症状との関わりを解明することは将来的な該疾患の治療剤の開発に利用可能である。

本出願は、日本で出願された特願2011-035192（出願日：平成23年2月21日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドの存在下、重合化した細胞外マトリクスタンパク質上において幹細胞を培養する、5-HT神経細胞製造方法。
- [請求項2] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineまたは4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinolineから少なくとも1つ選択される、請求項1記載の製造方法。
- [請求項3] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineである、請求項2記載の製造方法。
- [請求項4] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S)-(+) -5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin、4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride、4-[2-(Methylthio)phenyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1-piperazinehexanamide hydrochlorideから少なくとも1つ選択される、請求項1記載の製造方法。
- [請求項5] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S)-(+) -5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(di

methy l a m i n o) t e t r a l i nである、請求項4記載の製造方法。

[請求項6] I型TGF- β 受容体リガンドが、TGF- β 、Activin、Nodal、GDF-1、GDF-8またはGDF-11から少なくとも1つ選択される、請求項1記載の製造方法。

[請求項7] nogginの共存在下において培養する、請求項1-6のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項8] 幹細胞がES細胞またはiPS細胞である、請求項1-7のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項9] 細胞外マトリクスタンパク質、幹細胞、5-HT神経細胞誘導剤としてのBMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを含む、5-HT神経細胞製造キット。

[請求項10] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineまたは4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinolineから少なくとも1つ選択される、請求項9記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項11] BMP受容体キナーゼ阻害剤が、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinolineである、請求項10記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項12] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralin、4-(2-Diphenyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaph-

halen-1-yl)-1-piperazinehexanamide hydrochloride、4-[2-(Methylthio)phenyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1-piperazinehexanamide hydrochlorideから少なくとも1つ選択される、請求項9記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項13] 5-HT₇受容体アゴニストが、(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimethylpyrazol-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralinである、請求項12記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項14] I型TGF- β 受容体リガンドが、TGF- β 、Activin、Nodal、GDF-1、GDF-8またはGDF-11から少なくとも1つ選択される、請求項9記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項15] nogginをさらに含む、請求項9-14のいずれか1項に記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項16] 幹細胞がES細胞またはiPS細胞である、請求項9-15のいずれか1項に記載の5-HT神経細胞製造キット。

[請求項17] BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを含む、5-HT神経細胞再生剤。

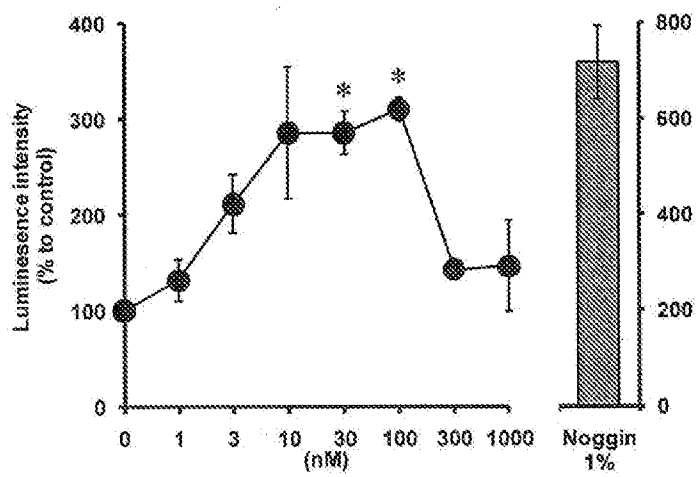
[請求項18] BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンドを患者に有効量投与することを含む、5-HT神経細胞再生方法。

[請求項19] 5-HT神経細胞再生剤として使用するための、BMP受容体キナーゼ阻害剤、5-HT₇受容体アゴニスト、またはI型TGF- β 受容体リガンド。

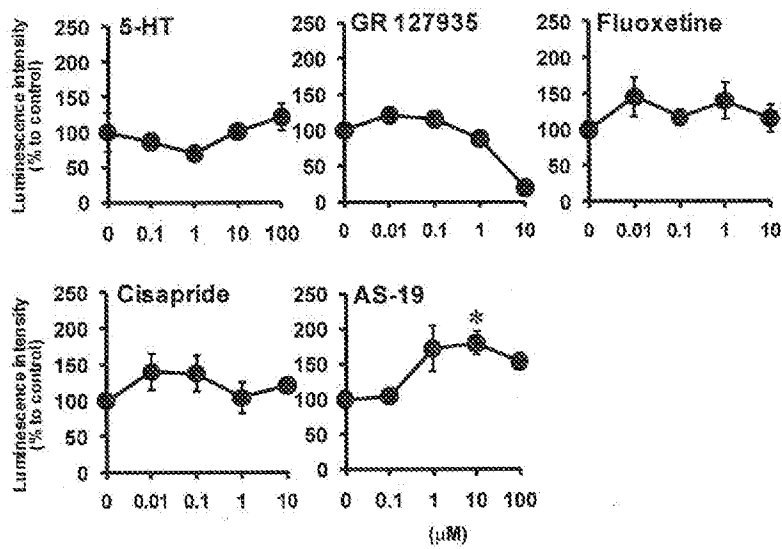
[請求項20] 請求項1-8のいずれか1項に記載の製造方法によって製造される5-HT神経細胞を含む、精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療のための移植用組成物。

- [請求項21] 請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載の製造方法によって製造される 5－HT 神経細胞を患者に有効量移植することを含む、精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療方法。
- [請求項22] 精神疾患または脊椎損傷後の運動機能障害、疼痛の治療のための移植用組成物として使用するための、請求項 1－8 のいずれか 1 項に記載の製造方法によって製造される 5－HT 神経細胞。

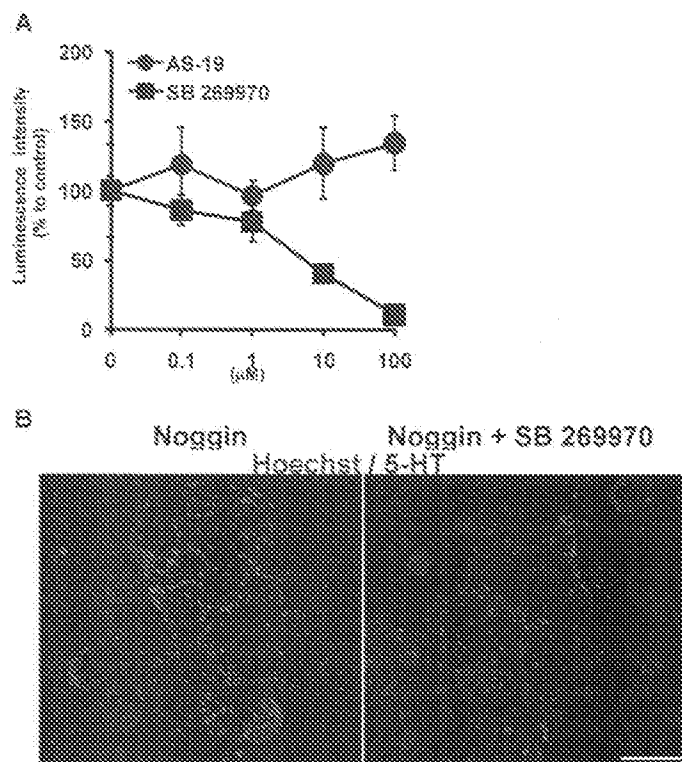
[図1]



[図2]

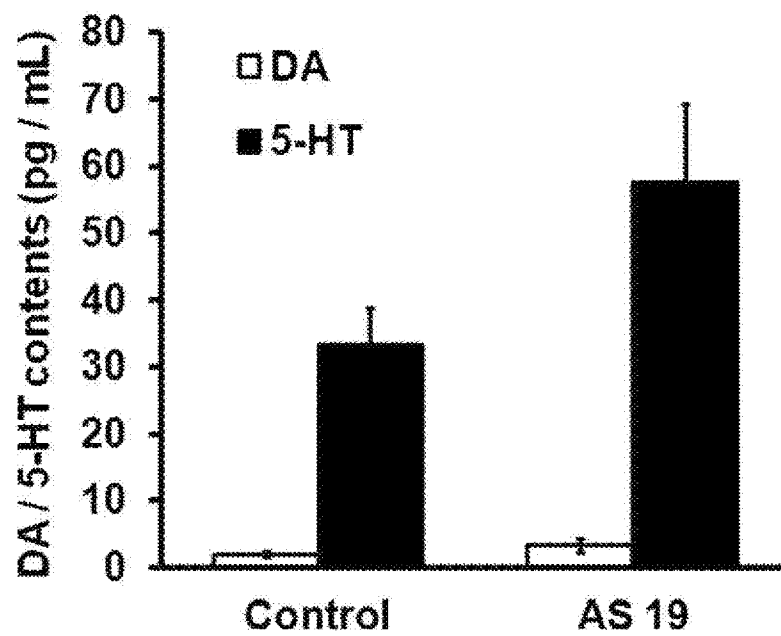


[図3]



[図4]

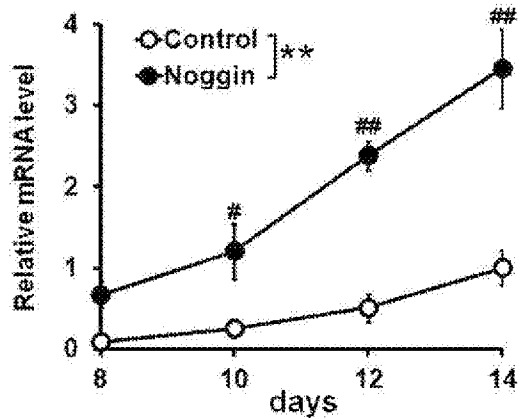
HPLC



[図5]

real time PCR

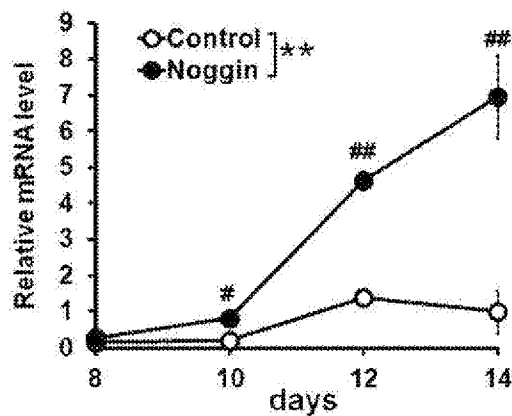
5-HT1A



Data are presented as means $\pm$ SEM. (n = 3) * * P < 0.01 vs. Noggin untreated control by two-way repeated ANOVA., #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. Noggin untreated control by Tukey-Kramer test.

[図6]

5-HT7

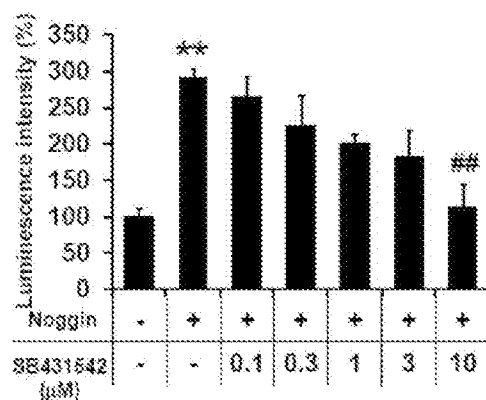


Data are presented as means $\pm$ SEM. (n = 3) * * P < 0.01 vs. Noggin untreated control by two-way repeated ANOVA., #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. Noggin untreated control by Tukey-Kramer test.

[図7]

Noggin + SB431542

ルシフェラーゼアッセイ

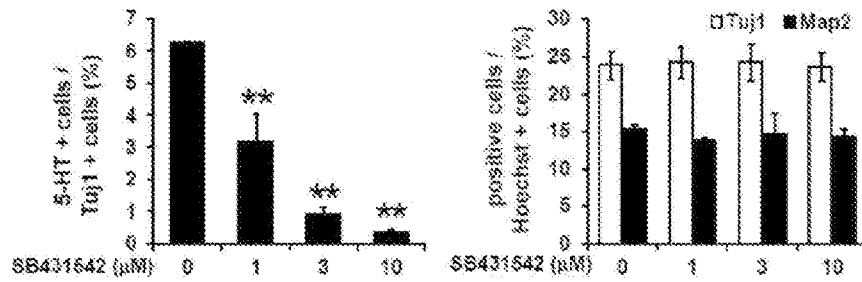


Data are presented as means $\pm$ SEM. (n = 3) * * P < 0.01 vs. untreated control by Dunnett test, ##P < 0.01 vs. Noggin by Dunnett test.

[図8]

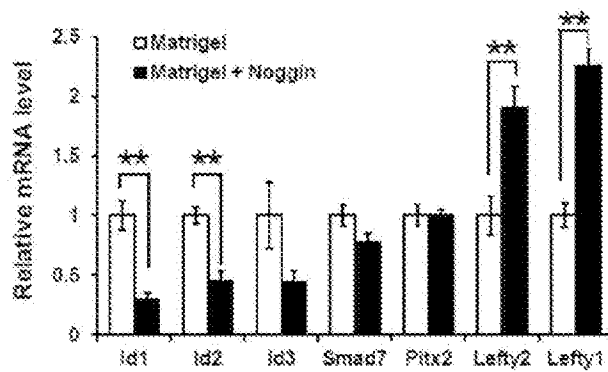
Noggin + SB431542

免疫染色

Data are presented as means $\pm$ SEM. (n = 3) ** P < 0.01 vs. untreated control by Dunnett test.

[図9]

BMP受容体およびI型TGF-β受容体の下流遺伝子mRNAの発現

Data are presented as means $\pm$ SEM. (n = 3) ** P < 0.01 vs. untreated control by Student's T test.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C07K14/705
(2006.01)n, C12N9/12(2006.01)n, C12N9/99(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/00, C12N5/0735, C12N5/10, C07K14/705, C12N9/12, C12N9/99, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII), PubMed,
WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/019092 A1 (KYOTO UNIVERSITY), 17 February 2011 (17.02.2011), Y (Family: none)	1-6, 8-14, 16, 17, 19, 20, 22 7, 15
X	JP 2008-125448 A (Osaka University), Y 05 June 2008 (05.06.2008), (Family: none)	22 7, 15
Y	ALENINA N.et al., Specification and differentiation of serotonergic neurons, Stem Cell Rev., 2006, 2(1), p.5-10	1-17, 19, 20, 22
Y	GALTER D.et al., Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor-betas, J.Neurosci. Res., 1999, 56(5), p.531-8	1-17, 19, 20, 22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 May, 2012 (14.05.12)

Date of mailing of the international search report

22 May, 2012 (22.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054175

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 18, 21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 18 and 21 pertain to "methods for treatment of the human body by therapy" and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Claims 1-17, 19, 20 and 22 set forth an invention related to a BMP receptor kinase inhibitor, an invention related to a 5-HT₇ receptor agonist and an invention related to a TGF- β type I receptor ligand.

The technical feature common to those inventions is "a method for producing 5-HT nerve cells, wherein stem cells are cultured on a polymerized extracellular matrix protein in the presence of a certain compound". The common technical feature, however, cannot be considered as a special technical feature since it does not make a contribution over the prior art in view of the disclosure of a publicly known document (JP 2008-125448 A). In addition, there is no other same or corresponding special technical feature among those inventions.

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

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)n,
C12N9/12(2006.01)n, C12N9/99(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00, C12N5/0735, C12N5/10, C07K14/705, C12N9/12, C12N9/99, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2011/019092 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 2011.02.17, (ファミリーなし)	1-6, 8-14, 16, 17, 19, 20, 22
Y		7, 15
X	JP 2008-125448 A (国立大学法人大阪大学) 2008.06.05, (ファミリーなし)	22
Y		7, 15

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

名和 大輔

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 4 3 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ALENINA N. et al., Specification and differentiation of serotonergic neurons, Stem Cell Rev., 2006, 2(1), p. 5-10	1-17, 19, 20, 22
Y	GALTER D. et al., Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor-betas, J. Neurosci. Res., 1999, 56(5), p. 531-8	1-17, 19, 20, 22

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

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

1. ☒ 請求項 18, 21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 18, 21に係る発明は、[治療による人体の処置方法に関するもの]であって、
PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項 1-17, 19, 20, 22には、BMP受容体キナーゼ阻害剤に係る発明、5-HT₇受容体アゴニストに係る発明、及び、I型TGF- β 受容体リガンドに係る発明が記載されている。

これらの発明は、「ある化合物の存在下、重合化した細胞外マトリクスタンパク質上において幹細胞を培養する、5-HT神経細胞製造方法」という共通の技術的特徴を有しているが、当該技術的特徴は、公知文献（JP 2008-125448 A）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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