

明 細 書

発明の名称：下垂体組織を含む細胞塊の製造方法及びその細胞塊 技術分野

[0001] 本発明は、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法及びその細胞塊に関するものである。さらに、細胞塊中に神経系細胞又は神経組織と、下垂体組織と、間葉系細胞とを含む細胞塊に関するものである。

背景技術

[0002] 下垂体は頭部に存在する内分泌器官であり、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、成長ホルモンといった生体の維持、成長に重要な各種の下垂体ホルモンを産生する。下垂体の形成不全や下垂体機能低下症、下垂体腺腫等の疾患により下垂体の機能不全が生じた場合、成長障害、生殖器関連の異常、副腎や甲状腺の異常に類する重篤な症状が生じる。一般に、障害を受けた下垂体組織が自然に再生し機能を回復することは稀である。

特許文献1及び非特許文献1、2には、ヒト多能性幹細胞をBMPシグナル伝達経路阻害因子乃至作用因子、ソニック・ヘッジホッグ（本明細書において、Shhと記載することがある）シグナル伝達経路作用因子、及びTGF- β シグナル伝達経路阻害剤存在下で分化誘導することにより、下垂体細胞を含む頭部プラコード由来細胞を製造したことが報告されている。しかしながら、製造された細胞は二次元的に培養されたものであり、機能の発揮に重要な生体の複雑な下垂体組織の構造を再現するには至っていない。そのため、効率よく立体的な下垂体組織を製造できる方法が切望されていた。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2016-538856号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Dincer et al. Cell Reports 5, 1387-1402, 2013.

非特許文献2：Zimmer et al. Stem Cell Reports 6, 858-872, 2016

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、多能性幹細胞から下垂体組織を含む細胞塊を効率よく製造する手法を提供することである。特に、下垂体組織幹細胞を組織中に含有する高品質な下垂体組織を含む細胞塊を効率よく製造する手法を提供することである。具体的には、フィーダーフリー培養された多能性幹細胞を出発材料とすることができ、高価な組み換えタンパク質の使用量を低減してより安価に製造することで、効率よく製造する手法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、上記課題を解決すべく検討を重ねたところ、多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、BMPシグナル伝達経路作用物質とソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を添加することにより下垂体組織を含む細胞塊を効率よく製造できることを見出した。さらに、前記Wntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養する前に、多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1) TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2) 未分化維持因子を含む培地で培養することにより細胞塊の製造効率を改善できることを見出した。加えて、BMPシグナル伝達経路作用物質の添加条件を最適化し、浮遊培養開始から72時間以内という最適な添加時期を同定することにより、従来よりも低濃度のBMP4による下垂体組織の分化誘導に成功した。すなわち、本発明は以下に関する。

[0007] [1] 下記工程(1)及び(2)を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；

(1) 多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程。

〔2〕下記工程（a）、（1）及び（2）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；

（a）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1）TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2）未分化維持因子を含む培地で培養するa工程、

（1）a工程で培養された多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

（2）第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含有する細胞塊を得る第二工程。

〔3〕下記工程（1）、（2-1）及び（2-2）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；

（1）多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

（2-1）第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程（1）、

（2-2）第二工程（1）で浮遊培養された凝集体を、BMPシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程（2）。

〔4〕下記工程（a）、（1）、（2-1）及び（2-2）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；

（a）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1）TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2）未分化維持因子を含む培地で培養するa工程、

（1）a工程で培養された多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

（2-1）第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質

及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程（１）、

（２－２）第二工程（１）で得られた凝集体を、ＢＭＰシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程（２）。

〔５〕前記工程（２）又は工程（２－１）におけるＢＭＰシグナル伝達経路作用物質が、前記工程（１）における多能性幹細胞の浮遊培養開始時から０．５時間以降、７２時間以内に添加されることを特徴とする〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の製造方法。

〔６〕前記工程（２）又は工程（２－１）におけるＢＭＰシグナル伝達経路作用物質が、前記工程（１）で形成された凝集体の表層の細胞の１割以上が密着結合を形成している期間内に添加されることを特徴とする〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の製造方法。

〔７〕前記ＢＭＰシグナル伝達経路作用物質が、ＢＭＰ２、ＢＭＰ４、ＢＭＰ７及びＧＤＦ７からなる群から選ばれる少なくとも１種のタンパク質である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の製造方法。

〔８〕前記ＢＭＰシグナル伝達経路作用物質が、ＢＭＰ４である、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の製造方法。

〔９〕前記工程（２）又は工程（２－１）における浮遊培養が、前記ＢＭＰ４の濃度が１０ｐＭ～５ｎＭである培地でおこなわれることを特徴とする、〔８〕に記載の製造方法。

〔１０〕前記工程（２－２）におけるＢＭＰシグナル伝達経路阻害物質の添加が、前記工程（２－１）におけるＢＭＰシグナル伝達経路作用物質の添加から１２時間以降、２０日以内に実施されることを特徴とする〔３〕～〔９〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１１〕前記Ｗｎｔシグナル伝達経路阻害物質が非古典的Ｗｎｔ経路に対する阻害活性を有することを特徴とする、〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の製造方法。

〔12〕前記Wntシグナル伝達経路阻害物質がPORCN阻害剤であることを特徴とする、〔1〕～〔11〕のいずれかに記載の製造方法。

〔13〕前記PORCN阻害剤がIWP-2、IWP-3、IWP-4、IWP-L6、IWP-12、LGK-974、Wnt-C59、ETC-159及びGNF-6231からなる群から選ばれる少なくとも1種の化合物であることを特徴とする、〔12〕に記載の製造方法。

〔14〕前記Wntシグナル伝達経路阻害物質がKY-02111又はKY-03-1であることを特徴とする〔1〕～〔11〕のいずれかに記載の製造方法。

〔15〕前記Wntシグナル伝達経路阻害物質がTANK阻害剤であることを特徴とする〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の製造方法。

〔16〕前記TANK阻害剤がIWR1-endo、XAV939及びMN-64からなる群から選ばれる少なくとも1種の化合物であることを特徴とする〔15〕に記載の製造方法。

〔17〕前記工程（1）、（2）、（2-1）及び（2-2）における浮遊培養が、さらにTGF β シグナル伝達経路阻害物質の存在下で行われることを特徴とする〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の製造方法。

〔18〕前記TGF β シグナル伝達経路阻害物質がAlk5/TGF β R1阻害剤であることを特徴とする、〔17〕に記載の製造方法。

〔19〕前記Alk5/TGF β R1阻害剤がSB431542、SB505124、SB525334、LY2157299、GW788388、LY364947、SD-208、EW-7197、A83-01及びRepSoxからなる群から選ばれる少なくとも1種の化合物であることを特徴とする、〔18〕に記載の製造方法。

〔20〕前記TGF β シグナル伝達経路阻害物質がSMAD3阻害剤であることを特徴とする、〔17〕に記載の製造方法。

〔21〕前記SMAD3阻害剤がSIS3であることを特徴とする、〔20〕に記載の製造方法。

〔22〕ソニック・ヘッジホッグシグナルシグナル伝達経路作用物質がSAG、Purmorphamine及びGSA-10からなる群から選ばれる少なくとも1種の化合物であることを特徴とする、〔1〕～〔21〕のいずれかに記載の製造方法。

〔23〕前記工程（a）における培地に含まれるソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の濃度が、10nMから700nMのSAGに相当するソニック・ヘッジホッグシグナル伝達促進活性を有する濃度であることを特徴とする、〔22〕に記載の製造方法。

〔24〕前記工程（2）又は工程（2-1）における培地に含まれるソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の濃度が、100nMから3μMのSAGに相当するソニック・ヘッジホッグシグナル伝達促進活性を有する濃度であることを特徴とする、〔22〕又は〔23〕に記載の製造方法。

〔25〕前記BMPシグナル伝達経路阻害物質は、I型BMP受容体阻害剤を含む、〔3〕～〔24〕のいずれかに記載の製造方法。

〔26〕前記I型BMP受容体阻害剤は、KO2288、Dorsomorphin、LDN-193189、LDN-212854、LDN-214117、ML347、DMH1及びDMH2からなる群より選ばれる少なくとも1つを含む、〔25〕に記載の製造方法。

〔27〕前記I型BMP受容体阻害剤はKO2288を含み、前記KO2288の濃度が10nM～50μMである培地中で前記工程（2-2）を開始する、〔25〕又は〔26〕に記載の製造方法。

〔28〕前記工程（1）、（2）、（2-1）及び（2-2）からなる群より選ばれる少なくとも1つの工程がFGFシグナル伝達経路作用物質の存在下で実施されることを特徴とする、〔1〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。

〔29〕前記工程（2-2）がFGFシグナル伝達経路作用物質の存在下で実施されることを特徴とする、〔3〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。

〔30〕前記FGFシグナル伝達経路作用物質は、FGF2及びFGF8、並びに、これらの改変体からなる群より選ばれる少なくとも1つを含む、〔28〕又は〔29〕に記載の製造方法。

〔31〕前記工程（1）、（2）、（2-1）及び（2-2）からなる群より選ばれる少なくとも1つの工程がWntシグナル伝達経路作用物質の存在下で実施されることを特徴とする、〔1〕～〔30〕のいずれかに記載の製造方法。

〔32〕前記Wntシグナル伝達経路作用物質が前記工程（1）において添加されるWntシグナル伝達経路阻害物質の作用点よりも下流のシグナル伝達因子に作用することを特徴とする、〔31〕に記載の製造方法。

〔33〕前記Wntシグナル伝達経路作用物質が古典的Wnt経路を活性化させる物質であることを特徴とする、〔31〕又は〔32〕に記載の製造方法。

〔34〕前記古典的Wnt経路を活性化させる物質が β カテニンの分解の阻害、安定化を促進する作用を有することを特徴とする、〔31〕～〔33〕のいずれかに記載の製造方法。

〔35〕前記Wntシグナル伝達経路作用物質がGSK3阻害剤であることを特徴とする、〔31〕～〔34〕のいずれかに記載の製造方法。

〔36〕前記Wntシグナル伝達経路阻害物質がPORCN阻害剤であり、前記Wntシグナル伝達経路作用物質がGSK3阻害剤であることを特徴とする、〔31〕～〔35〕のいずれかに記載の製造方法。

〔37〕前記GSK3阻害剤がCHIR99021、CHIR98014、TWS119、SB216763、SB415286、BIO、AZD2858、AZD1080、AR-A014418、TDZD-8、LY2090314、IM-12、Indirubin、Bikinin、A1070722、3F8、Kenpaullone、10Z-Hymenialdisine、Indirubin-3'-oxime、NSC693868、TC-G24、TCS2002、TCS21311、CP21R

7 及びこれら化合物の誘導体からなる群より選ばれる少なくとも1つを含む、[31]～[36]のいずれかに記載の製造方法。

[38] 前記GSK3阻害剤はCHIR99021を含み、前記工程(1)、(2)、(2-1)および(2-2)からなる群より選ばれる少なくとも1つの工程に添加される前記CHIR99021の濃度が10nM～50μMである、[31]～[37]のいずれかに記載の製造方法。

[39] 前記Wntシグナル伝達経路作用物質がBML-284、SKL2001からなる群より選ばれる少なくとも1つを含む、[31]～[34]のいずれかに記載の製造方法。

[40] 前記工程(1)で実施される浮遊培養が、無血清培地を用いた浮遊培養であることを特徴とする、[1]～[39]のいずれかに記載の製造方法。

[41] 前記無血清培地が、血清代替物を含有することを特徴とする、[40]に記載の製造方法。

[42] 前記工程(1)で実施される浮遊培養が、分散処理された多能性幹細胞を用いておこなわれることを特徴とする、[1]～[41]のいずれかに記載の製造方法。

[43] 前記工程(1)で実施される浮遊培養が、ROCK阻害剤の存在下で実施されることを特徴とする、[1]～[42]のいずれかに記載の製造方法。

[44] 前記工程(1)で添加されるROCK阻害剤の濃度が、1nMから1mMのY-27632に相当する細胞保護能を有する濃度であることを特徴とする、[43]に記載の製造方法。

[45] 前記工程(1)、(2)、(2-1)及び(2-2)からなる群より選ばれるいずれか一つ以上の工程における浮遊培養が、さらにNotchシグナル阻害剤の存在下でおこなわれることを特徴とする、[1]～[44]のいずれかに記載の製造方法。

[46] 前記Notchシグナル阻害剤がγセクレターゼ阻害剤である、[

４５］に記載の製造方法。

〔４７〕前記 γ セクレターゼ阻害剤がＤＡＰＴである、〔４６］に記載の製造方法。

〔４８〕前記工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）からなる群より選ばれるいずれか一つ以上の工程における浮遊培養が、さらにデキサメタゾンの存在下でおこなわれることを特徴とする、〔１］～〔４７］のいずれかに記載の製造方法。

〔４９〕前記多能性幹細胞が、霊長類多能性幹細胞であることを特徴とする、〔１］～〔４８］のいずれかに記載の製造方法。

〔５０〕前記霊長類多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞であることを特徴とする、〔４９］に記載の製造方法。

〔５１〕〔１］～〔５０］のいずれかに記載の製造方法により得られる下垂体組織を含む細胞塊。

〔５２〕下記工程（１）～（３）を含む、下垂体組織の製造方法；

（１）多能性幹細胞を、W n tシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

（２）第一工程で得られた凝集体を、B M Pシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程、

（３）第二工程で得られた細胞塊から下垂体組織を回収する第三工程。

〔５３〕下記工程（１）、（２－１）、（２－２）及び（３）を含む、下垂体組織の製造方法；

（１）多能性幹細胞を、W n tシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

（２－１）第一工程で得られた凝集体を、B M Pシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程（１）、

（２－２）第二工程（１）で浮遊培養された凝集体を、B M Pシグナル伝達

経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程（２）、

（３）第二工程（２）で得られた細胞塊から下垂体組織を回収する第三工程。

〔５４〕〔５２〕又は〔５３〕に記載の製造方法により得られる下垂体組織。

〔５５〕１）神経系細胞又は神経組織、２）下垂体組織及び３）間葉系細胞を含む細胞塊。

〔５６〕前記３）間葉系細胞が、N e s t i n、V i m e n t i n、C a d h e r i n - 1 1、L a m i n i n、C D 4 4、C D 9 0及びC D 1 0 5からなる群から選ばれる少なくとも１種の間葉系細胞マーカーを発現することを特徴とする、〔５５〕に記載の細胞塊。

〔５７〕１）神経系細胞又は神経組織、２）下垂体組織及び４）神経提細胞又は神経提由来細胞を含む細胞塊。

〔５８〕前記４）神経提細胞が、N e s t i n、S o x 1 0、S l u g、S n a i l、P a x 3、Z i c 1、F o x D 3、p 7 5 N T R、H N K - 1、C H D 7、N u m b、A s c l 1からなる群から選ばれる少なくとも１種の神経提細胞マーカーを発現することを特徴とする、〔５７〕に記載の細胞塊。

〔５９〕表面が非神経上皮組織で覆われ、非神経上皮組織の少なくとも一部に２）下垂体組織が形成されていることを特徴とする〔５５〕～〔５８〕いずれかに記載の細胞塊。

〔６０〕前記非神経上皮組織が、サイトケラチン、E - C a d h e r i n及びE p C A Mからなる群から選ばれる少なくとも１種の非神経上皮組織マーカーを発現することを特徴とする、〔５９〕に記載の細胞塊。

〔６１〕前記非神経上皮組織が、１）神経系細胞又は神経組織及び３）間葉系細胞の少なくとも一方を被覆していることを特徴とする、〔５５〕又は〔５６〕に記載の細胞塊。

〔62〕前記非神経上皮組織が、1) 神経系細胞又は神経組織及び4) 神経提細胞又は神経提由来細胞の少なくとも一方を被覆していることを特徴とする、〔57〕又は〔58〕に記載の細胞塊。

〔63〕前記3) 間葉系細胞が、細胞塊の表面を被覆している非神経上皮組織と、細胞塊の内側に存在する1) 神経系細胞又は神経組織との間に存在することを特徴とする、〔61〕に記載の細胞塊。

〔64〕前記4) 神経提細胞又は神経提由来細胞が、細胞塊の表面を被覆している非神経上皮組織と、細胞塊の内側に存在する1) 神経系細胞又は神経組織との間に存在することを特徴とする、〔62〕に記載の細胞塊。

〔65〕前記非神経上皮組織が、口腔上皮またはその前駆組織であることを特徴とする〔59〕～〔64〕のいずれかに記載の細胞塊。

〔66〕前記2) 下垂体組織が、下垂体ホルモン産生細胞を含むことを特徴とする、〔55〕～〔65〕のいずれかに記載の細胞塊。

〔67〕前記下垂体ホルモン産生細胞が、成長ホルモン（GH）産生細胞、プロラクチン（PRL）産生細胞及び副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生細胞からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、〔66〕に記載の細胞塊。

〔68〕前記下垂体組織が、下垂体組織幹細胞を含むことを特徴とする、〔55〕～〔67〕のいずれか一項に記載の細胞塊。

〔69〕前記下垂体組織幹細胞が、Sox2、Sox9、E-Cadherin、Nestin、S100 β 、GFR α 2、Prop1、CD133、 β -Catenin、Klf4、Oct4、Pax6、コクサッキーウイルス・アデノウイルス共通受容体（CXADR）、PRRX1/2、Ephrin-B2及びACEからなる群から選ばれる少なくとも1種の下垂体組織幹細胞マーカーを発現することを特徴とする、〔68〕に記載の細胞塊。

〔70〕前記下垂体組織幹細胞が下垂体ニッチを形成していることを特徴とする、請求項〔68〕又は〔69〕に記載の細胞塊。

〔71〕前記1) 神経系細胞又は神経組織が、腹側間脳・視床下部の細胞又

は組織であることを特徴とする、[55]～[70]いずれかに記載の細胞塊。

[72] 前記1) 神経系細胞又は神経組織が、N-Cadherin陽性の神経上皮組織であることを特徴とする、[71]に記載の細胞塊。

[73] 前記神経上皮組織の内部に脳室様の空胞が形成され、該空胞に接している神経上皮組織の面がPKC- ζ 陽性の頂端面であることを特徴とする、[72]に記載の細胞塊。

[74] [1]～[50]のいずれか一項に記載の方法により製造される細胞塊又は請求項52に記載の方法により製造される下垂体組織と、被験物質とを接触させる工程と、該被験物質が細胞塊又は下垂体組織に及ぼす影響を検定する工程とを含む、被験物質の毒性・薬効評価方法。

[75] [1]～[50]のいずれか一項に記載の方法により製造される細胞塊又は[52]に記載の方法により製造される下垂体組織を含む、被験物質の毒性・薬効評価用試薬。

[76] [52]に記載の方法により製造される下垂体組織の有効量を、移植を必要とする対象に移植する工程を含む、下垂体の障害に基づく非ヒト動物の疾患の治療方法。

[77] [1]～[50]のいずれか一項に記載の方法により製造される細胞塊又は[52]に記載の方法により製造される下垂体組織を含む、下垂体の障害に基づく疾患の治療薬。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、多能性幹細胞から下垂体組織を含む細胞塊を効率よく製造することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1-1]図1-1上段は、実施例1において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊を作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A及びBは実施例1において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段C～Kは、実施例1において浮遊培養開始28日後の

細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。C～Eは、Lhx3、Nkx2.1とその核染色像をそれぞれ示す。F～Hは、Lhx3、Nkx2.1とその核染色像をそれぞれ示す。I～Kは、aPKC、Lamininとその核染色像をそれぞれ示す。

[図1-2]図1-2のL～Xは、実施例1において浮遊培養開始後28日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。L～Nは、Sox3、EpCAMとその核染色像をそれぞれ示す。O～Qは、Tbx3、 β IIIチューブリン(β III Tub)とその核染色像をそれぞれ示す。S～Uは、Emx2、Nestinとその核染色像をそれぞれ示す。V～Xは、Pitx1、汎サイトケラチン(Pan-CK)とその核染色像をそれぞれ示す。下段Yは培養28日目の下垂体組織を含む細胞塊の構造を模式的に表した図である。

[図2]図2上段は、実施例2において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊を作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A、Bは実施例2において浮遊培養開始70日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段C～Jは、浮遊培養開始70日後あるいは84日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。CとDは、ACTHとその核染色像をそれぞれ示す。E～Gは、プロラクチン(PRL)、汎サイトケラチン(PanCK)とその核染色像をそれぞれ示す。H～Jは、成長ホルモン(GH)、汎サイトケラチン(PanCK)とその核染色像をそれぞれ示す。

[図3]図3上段は、参考例1において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊をBMP4の添加時期を変えて作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A～Dは参考例1において浮遊培養開始10日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。AはBMP4を添加しないコントロールの細胞の、B～Dはそれぞれ浮遊培養を開始して1、2、3日目にBMP4を添加した細胞から形成される浮遊培養開始10日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。

[図4]図4上段は、実施例3において、ヒトES細胞から細胞凝集体を調製する

際の手順を模式的に示した図である。下段A及びBは、それぞれ、実施例3において浮遊培養開始2及び3日後の細胞凝集体の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段C～Hは、浮遊培養開始2日後あるいは3日後の細胞凝集体における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。Cは浮遊培養開始2日後、Fは浮遊培養開始3日後の細胞凝集体のZ0-1の染色像である。Dは浮遊培養開始2日後、Gは浮遊培養開始3日後の細胞凝集体のSox2の染色像である。EはCとDに対する、HはFとGに対する核の対比染色像である。

[図5]図5上段は、実施例4において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊をSAGの添加濃度を変えて作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A～Hは実施例4において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。AはSAGを添加しないコントロールの細胞の、B～Hはそれぞれ浮遊培養開始2日目に100、300、500、700nM、1、2、5 μ MのSAGを添加した細胞から形成される浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。

[図6]図6上段は、実施例5において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊の製造における浮遊培養開始前の化合物による前処理の効果を調べる手順を模式的に示した図である。下段A～Dは実施例5において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。Aは化合物による前処理を実施しなかった細胞塊、Bは300nM SAGで前処理を実施した細胞塊、Cは5 μ M SB431542で前処理を実施した細胞塊、DはSAGとSB431542を同時に添加して前処理を実施した細胞塊である。

[図7]図7上段は、実施例6において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊の製造における各Wntシグナル伝達経路阻害物質の効果を調べる手順を模式的に示した図である。下段A～Hは実施例6において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。AはWntシグナル伝達経路阻害物質とSB431542を添加しないコントロール、BはSB431542を加え、Wntシグナル伝達経路阻害物質を添加しない条件、C～Hはそれぞれ浮遊培養

開始時にWntシグナル伝達経路阻害物質をその種類を変えて添加しさらに浮遊培養を行って浮遊培養開始後28日目の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。

[図8]図8上段は、実施例7において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊をBMP4の添加濃度を変えて作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A～Dは実施例7において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。AはBMP4を添加しないコントロールの、B～Dはそれぞれ浮遊培養開始後2日目に濃度を変えて(0.5nM、1.5nM、5nM) BMP4を添加しさらに浮遊培養を行って浮遊培養開始後28日目の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。

[図9]図9上段は、実施例8において、ヒトES細胞から下垂体組織を含む細胞塊の製造における各TGF β シグナル伝達経路阻害物質の効果を調べる手順を模式的に示した図である。下段A～Gは実施例8において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。AはTGF β シグナル伝達経路阻害物質とIWP-2を添加しないコントロール、BはIWP-2を加え、TGF β シグナル伝達経路阻害物質を添加しない条件、C～Gはそれぞれ浮遊培養開始時にTGF β シグナル伝達経路阻害物質をその種類と濃度を変えて添加しさらに浮遊培養を行って浮遊培養開始後28日目の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。

[図10]図10上段は、実施例9において、ヒトiPS細胞から下垂体組織を含む細胞塊を作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A及びBは実施例9において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段C～Rは、浮遊培養開始28日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。C～Fは、Lhx3、Nkx2.1、EpCAMの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。G～Jは、Six1、Pitx2、汎サイトケラチン(PanCK)の染色像とその核染色像をそれぞれ示す。K～Nは、Bf1、Sox2、E-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。O～Rは、Nestin、 β IIIチューブリン(β III Tub)、Vimen

tinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

[図11]図11上段は、実施例10において、ヒトiPS細胞から神経組織及び非神経上皮組織を含む細胞塊を作成する際の手順を模式的に示した図である。

下段A～Dは実施例10において浮遊培養開始13日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段E～Pは、浮遊培養開始13日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。E～GおよびK～Mは、Dlx5、N-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。H～JおよびN～Pは、Six1、E-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

[図12]図12Q～ABは、図11に引き続き実施例10において、浮遊培養開始13日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。Q～SおよびW～Yは、Dlx5、N-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。T～VおよびZ～ABは、Six1、E-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

[図13]図13上段は、実施例11において、ヒトiPS細胞から下垂体組織を含む細胞塊を作成する際の手順を模式的に示した図である。下段Aは実施例11において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段B～Iは、浮遊培養開始28日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。B～EおよびF～Iは、Lhx3、Nkx2.1、E-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

[図14]図14J～Vは、図13に引き続き実施例11において、浮遊培養開始28日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。J～Mは、Nestin、Pitx2、Sox2の染色像とその核染色像をそれぞれ示す。N～Pは、Six1、Vimentinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。Q～Sは、Rx、N-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。T～Vは、Tbx3、汎サイトケラチンの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

[図15]図15上段は、実施例12において、ヒトiPS細胞から下垂体組織を含む細胞塊を作成する際の手順を模式的に示した図である。下段A～Dは実施例12において浮遊培養開始28日後の細胞塊の倒立顕微鏡の明視野観察像を示す図である。下段E～Lは、浮遊培養開始28日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。E～HおよびI～Lは、Lhx3、Nkx2.1、E-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

[図16]図16M～Yは、図15に引き続き実施例12において、浮遊培養開始28日後の細胞塊における各細胞マーカーの発現状況を蛍光免疫染色により調べた結果を示す図である。M～Pは、Nestin、Pitx2、Sox2の染色像とその核染色像をそれぞれ示す。Q～Sは、Six1、Vimentinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。T～Vは、Rx、N-Cadherinの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。W～Yは、Tbx3、汎サイトケラチンの染色像とその核染色像をそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0010] 1. 定義

本発明において、「幹細胞」とは、分化能及び分化能を維持した増殖能（特に自己複製能）を有する未分化な細胞を意味する。幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（pluripotent stem cell）、複能性幹細胞（multipotent stem cell）、単能性幹細胞（unipotent stem cell）等の亜集団が含まれる。多能性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成するすべての細胞（三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）由来の組織）に分化しうる能力（分化多能性（pluripotency））を有する幹細胞をいう。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する幹細胞を意味する。

[0011] 多能性幹細胞は、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、組織内幹細胞、体細胞等から誘導することができる。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞

胞：Embryonic stem cell）、EG細胞(Embryonic germ cell)、人工多能性幹細胞（iPS細胞：induced pluripotent stem cell）等を挙げることができる。間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell；MSC）から得られるMuse細胞（Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell）や、生殖細胞（例えば精巢）から作製されたGS細胞も多能性幹細胞に包含される。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されている。ES細胞は、内部細胞塊をフィーダー細胞上又はLIFを含む培地中で培養することにより製造することが出来る。ES細胞の製造方法は、例えば、W096/22362、W002/101057、US5,843,780、US6,200,806、US6,280,718等に記載されている。胚性幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるKhES-1、KhES-2及びKhES-3は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。いずれもマウス胚性幹細胞である、EB5細胞は国立研究開発法人理化学研究所より、D3株はATCCより、入手可能である。ES細胞の一つである核移植ES細胞（ntES細胞）は、細胞株を取り除いた卵子に体細胞の細胞核を移植して作ったクローン胚から樹立することができる。

[0012] EG細胞は、始原生殖細胞をmSCF、LIF及びbFGFを含む培地中で培養することにより製造することができる（Cell, 70: 841-847, 1992）。

[0013] 本発明における「人工多能性幹細胞」とは、体細胞を、公知の方法等により初期化（reprogramming）することにより、多能性を誘導した細胞である。具体的には、線維芽細胞や末梢血単核球等分化した体細胞をOct3/4、Sox2、Klf4、Myc（c-Myc、N-Myc、L-Myc）、Glis1、Nanog、Sall4、lin28、Esrrb等を含む初期化遺伝子群から選ばれる複数の遺伝子の組み合わせのいずれかの発現により初期化して多分化能を誘導した細胞が挙げられる。2006年、山中らによりマウス細胞で人工多能性幹細胞が樹立された（Cell, 2006, 126(4) pp. 663-676）。人工多能性幹細胞は、2007年にヒト線維芽細胞でも樹立され、胚性幹細胞と同様に多能性と自己複製能を有する（Cell, 2007, 131(5) pp. 8

61-872 ; Science, 2007, 318(5858) pp.1917-1920 ; Nat. Biotechnol., 2008, 26(1) pp.101-106)。人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加などにより体細胞より人工多能性幹細胞を誘導することもできる (Science, 2013, 341 pp. 651-654)。

[0014] 人工多能性幹細胞を製造する際に用いられる体細胞としては、特に限定は無いが、組織由来の線維芽細胞、血球系細胞（例えば、末梢血単核球やT細胞）、肝細胞、膵臓細胞、腸上皮細胞、平滑筋細胞、等が挙げられる。

[0015] 人工多能性幹細胞を製造する際に、数種類の遺伝子（例、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びMycの4因子）の発現により初期化する場合、遺伝子を発現させるための手段は特に限定されない。前記手段としては、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター）を用いた感染法、プラスミドベクター（例えば、プラスミドベクター、エピソーマルベクター）を用いた遺伝子導入法（例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、レトロネクチン法、エレクトロポレーション法）、RNAベクターを用いた遺伝子導入法（例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法）、タンパク質の直接注入法、等が挙げられる。

[0016] 本発明に用いられる多能性幹細胞は、好ましくはES細胞又は人工多能性幹細胞である。

[0017] 複能性幹細胞としては、造血幹細胞、神経幹細胞、網膜幹細胞、下垂体幹細胞、間葉系幹細胞等の組織幹細胞（組織性幹細胞、組織特異的幹細胞又は体性幹細胞とも呼ばれる）を挙げることができる。

[0018] 遺伝子改変された多能性幹細胞は、例えば、相同組換え技術を用いることにより作製できる。改変される染色体上の遺伝子としては、例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子、神経系細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などがあげられる。染色体上の 標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harb

or Laboratory Press(1994) ; Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press(1993) ; バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社(1995) ; 等に記載の方法を用いて行うことができる。

[0019] 具体的には、例えば、改変する標的遺伝子（例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など）のゲノム遺伝子を単離し、単離されたゲノム遺伝子を用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。作製されたターゲットベクターを幹細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子が改変された幹細胞を作製することができる。

[0020] 標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997)等に記載された公知の方法があげられる。ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム(Genome Systems製)やUniversal GenomeWalker Kits (CLONTECH製)などを用いることにより、標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離することもできる。

[0021] 標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターの作製、及び相同組換え体の効率的な選別は、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press(1993) ; バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社(1995) ; 等に記載の方法にしたがって行うことができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型又はインサクション型のいずれでも用いることができる。選別方法としては、ポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、又はポリA選択などの方法を用いることができる。

選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法やPCR法等があ

げられる。

[0022] 本発明における「哺乳動物」には、げっ歯類、有蹄類、ネコ目、霊長類等が包含される。げっ歯類には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等が包含される。有蹄類には、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等が包含される。ネコ目には、イヌ、ネコ等が包含される。本発明における「霊長類」とは、霊長目に属するほ乳類動物をいい、霊長類としては、キツネザルやロリス、ツバイなどの原猿亜目と、サル、類人猿、ヒトなどの真猿亜目が挙げられる。

[0023] 本発明に用いる多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であり、好ましくはげっ歯類（例、マウス、ラット）又は霊長類（例、ヒト、サル）の多能性幹細胞であり、最も好ましくはヒト多能性幹細胞である。

[0024] 本発明において、「シグナル伝達」とは、細胞膜等に存在する受容体タンパク質が化学物質などと結合して構造変化を起こし、それを刺激として順次細胞内に伝達して、最終的に遺伝子発現やチャネルの開閉などの反応をもたらす過程や機構といった、細胞が有する生化学的刺激に対する、情報の伝達、増幅、処理、応答機構を表す。本発明において、「シグナル伝達の下流」とあるとは、一連のシグナル伝達に関わる因子の中で、ある因子に対して時間的、因果的に後の過程でリン酸化等の生化学的な変化を受ける相対的な関係性を表す。例えば、一連のシグナル伝達のメカニズム中で因子Aが因子Bをリン酸化することにより以降のシグナル伝達が生じるのであれば、因子Bは因子Aの下流のシグナル伝達因子である。

[0025] 本発明において、「細胞接着 (Cell adhesion)」とは、細胞と細胞同士の接着、及び細胞と細胞外マトリックスとの接着を言う。インビトロの人工培養環境下で生じる、細胞の培養器材等への接着も細胞接着に含有される。細胞接着の種類として、固定結合 (anchoring junction)、連絡結合 (communicating junction)、閉鎖結合 (occluding junction) が挙げられる。

[0026] 本発明において、「密着結合 (Tight junction)」とは、細胞間の接着のうち、脊椎動物と脊索動物で見られる閉鎖結合のことを表す。密着結合は上

皮細胞間に形成される。生体由来の組織中並びに本発明の製造方法等で作成された細胞塊中に密着結合が存在しているかどうかは、例えば密着接合の構成成分に対する抗体（抗クローディン抗体、抗ZO-1抗体等）を用いた免疫組織化学等の手法により検出することが出来る。

[0027] 本発明における「浮遊培養」あるいは「浮遊培養法」とは、細胞、細胞凝集体又は細胞塊が培養液に浮遊して存在する状態を維持しつつ培養すること、及び当該培養を行う方法を言う。すなわち浮遊培養は、細胞、細胞凝集体又は細胞塊を培養器材等に接着させない条件で行われ、培養器材等に接着させる条件でおこなわれる培養（接着培養、あるいは、接着培養法）は、浮遊培養の範疇に含まれない。この場合、細胞が接着するとは、細胞、細胞凝集体又は細胞塊と培養器材の間に、細胞接着の一種である強固な細胞－基質間結合（cell-substratum junction）ができることをいう。より詳細には、浮遊培養とは、細胞、細胞凝集体又は細胞塊と培養器材等との間に強固な細胞－基質間結合を作らせない条件での培養をいい、接着培養とは、細胞、細胞凝集体又は細胞塊と培養器材等との間に強固な細胞－基質間結合を作らせる条件での培養をいう。

浮遊培養中の細胞凝集体あるいは細胞塊においては、細胞と細胞が面接着する。浮遊培養中の細胞凝集体あるいは細胞塊では、細胞－基質間結合が培養器材等との間にはほとんど形成されないか、あるいは、形成されていてもその寄与が小さい。一部の態様では、浮遊培養中の細胞凝集体又は細胞塊では、内在の細胞－基質間結合が凝集体あるいは細胞塊の内部に存在するが、細胞－基質間結合が培養器材等との間にはほとんど形成されないか、あるいは、形成されていてもその寄与が小さい。

細胞と細胞が面接着(plane attachment)するとは、細胞と細胞が面で接着することをいう。より詳細には、細胞と細胞が面接着するとは、ある細胞の表面積のうち別の細胞の表面と接着している割合が、例えば、１％以上、好ましくは３％以上、より好ましくは５％以上であることをいう。細胞の表面は、膜を染色する試薬（例えばDiI）による染色や、細胞接着因子（例えば、

E-cadherinやN-cadherin) の免疫組織化学等の手法により検出できる。

[0028] 浮遊培養を行う際に用いられる培養器は、「浮遊培養する」ことが可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このような培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、スピナーフラスコ又はローラーボトルが挙げられる。これらの培養器は、浮遊培養を可能とするために、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、基底膜標品、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、ゼラチン等の細胞外マトリクス等、又は、ポリリジン、ポリオルニチン等の高分子等によるコーティング処理、又は、正電荷処理等の表面加工）されていないものなどを使用できる。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を低下させる目的で人工的に処理（例えば、MPCポリマー等の超親水性処理、タンパク低吸着処理等）されたものなどを使用できる。スピナーフラスコやローラーボトル等を用いて回転培養してもよい。培養器の培養面は、平底でもよいし、凹凸があってもよい。

[0029] 本発明において細胞の培養に用いられる培地は、動物細胞の培養に通常用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、F-12培地、DMEM/F12培地、IMDM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、又はこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地を挙げることができる。

多能性幹細胞の培養には、上記基礎培地をベースとした多能性幹細胞培養用の培地、好ましく公知の胚性幹細胞及び／又は人工多能性幹細胞用の培地や、フィーダーフリーで多能性幹細胞を培養するための培地を用いることができる。例えばEssential 8培地や、TeSR培地、mTeSR培地、mTeSR-E8培地、StemFit培地等のフィーダーフリー培地を挙げることができる。

[0030] 本発明における「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。本発明では、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も、無調整又は未精製の血清を含まない限り無血清培地に含まれる。

[0031] 無血清培地は、血清代替物を含有していてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'-チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものを挙げることができる。かかる血清代替物は、例えば、WO 98/30679に記載の方法により調製することができる。血清代替物としては市販品を利用してもよい。かかる市販の血清代替物としては、例えば、Knockout™ Serum Replacement（Life Technologies社製：以下、KSRと記すこともある。）、Chemically-defined Lipid concentrated（Life Technologies社製）、Glutamax™（Life Technologies社製）、B27（Life Technologies社製）、N2（Life Technologies社製）が挙げられる。

[0032] 浮遊培養で用いる無血清培地は、適宜、脂肪酸又は脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、ビタミン、増殖因子、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、無機塩類等を含有してもよい。

[0033] 調製の煩雑さを回避するために、かかる無血清培地として、市販のKSR（ライフテクノロジー（Life Technologies）社製）を適量（例えば、約0.5%から約30%、好ましくは約1%から約20%）添加した無血清培地（例えば、F-12培地とIMDM培地の1：1混合液に1×chemically-de

fined Lipid concentrated、5% KSR 及び 450 μ M 1-モノチオグリセロールを添加した培地) を使用してもよい。また、KSR 同等品として特表 2001-508302 に開示された培地が挙げられる。

- [0034] 本発明における「血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含む培地を意味する。当該培地は、脂肪酸又は脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、1-モノチオグリセロール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類等を含有してもよい。例えば、マトリゲル等の基底膜標品を使用して多能性幹細胞を網膜組織等に分化誘導する場合には、血清培地を用いることができる (Cell Stem Cell, 10(6), 771-775 (2012))。
- [0035] 本発明における培養は、好ましくはゼノフリー条件でおこなわれる。「ゼノフリー」とは、培養対象の細胞の生物種とは異なる生物種由来の成分が排除された条件を意味する。
- [0036] 本発明に用いる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、含有成分が化学的に決定された培地 (Chemically defined medium; CDM) である。
- [0037] 本発明における「基底膜 (Basement membrane)」様の構造とは、細胞外マトリックスより構成される薄い膜状の構造を意味する。基底膜は生体においては、上皮細胞の基底側 (basal) に形成される。基底膜の成分としては、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (パールカン)、エンタクチン/ニドゲン、サイトカイン、成長因子等が挙げられる。生体由来の組織中並びに本発明の製造方法等で作製された細胞塊中に基底膜が存在しているかどうかは、例えばPAM染色等の組織染色、並びに基底膜の構成成分に対する抗体 (抗ラミニン抗体、抗IV型コラーゲン抗体等) を用いた免疫組織化学等の手法により検出することができる。
- [0038] 本発明における「基底膜標品」とは、その上に基底膜形成能を有する所望の細胞を播種して培養した場合に、上皮細胞様の細胞形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜構成成分を含むものをいう

。例えば、本発明により製造された細胞・組織を分散させ、更に接着培養を行う際には、基底膜標品存在下で培養することができる。ここで、「基底膜構成成分」とは、動物の組織において、上皮細胞層と間質細胞層などとの間に存在する薄い膜状をした細胞外マトリックス分子をいう。基底膜標品は、例えば基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶液やアルカリ溶液などを用いて支持体から除去することで作製することができる。基底膜標品としては、基底膜調製物として市販されている商品（例えば、Matrigel™（ベクトン・ディッキンソン社製：以下、マトリゲルと記すこともある））やGeltrex™（Life Technologies社製）、基底膜成分として公知の細胞外マトリックス分子（例えば、ラミニン、ⅠⅤ型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンなど）を含むものが挙げられる。

[0039] 本発明において、Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）マウス肉腫等の組織乃至細胞から抽出、可溶化されたマトリゲル（Corning社製）等の基底膜標品を細胞並びに組織の培養に用いることができる。同様に細胞培養に用いる基底膜成分として、ヒト可溶化羊膜（生物資源応用研究所社製）、HEK293細胞に産生させたヒト組み換えラミニン（BioLamina社製）、ヒト組み換えラミニン断片（ニッピ社製）、ヒト組み換えビトロネクチン（Thermo Fisher社製）等も用いることができるが、異なる生物種由来の成分混入を回避する観点、及び感染症のリスクを回避する観点から、好ましくは、成分の明らかな組み換えタンパク質である。

[0040] 本発明において、「物質Xを含む培地」及び「物質Xの存在下」とは、それぞれ外来性（exogenous）の物質Xが添加された培地または外来性の物質Xを含む培地及び外来性の物質Xの存在下を意味する。外来性の物質Xは、例えば培地中に存在する細胞または組織が当該物質Xを内在的（endogenous）に発現、分泌もしくは産生する内在的な物質Xと区別される。

例えば、「ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地」とは、外来性のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質が添加

された培地または外来性のソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地を意味する。

[0041] 本発明において、「フィーダー細胞」とは、幹細胞を培養するときに共存させる当該幹細胞以外の細胞のことである。多能性幹細胞の未分化維持培養に用いられるフィーダー細胞としては、例えば、マウス線維芽細胞（MEF）、ヒト線維芽細胞、又は、SNL細胞等が挙げられる。フィーダー細胞としては、増殖抑制処理したフィーダー細胞が好ましい。増殖抑制処理としては、増殖抑制剤（例えば、マイトマイシンC）処理又はUV照射等が挙げられる。多能性幹細胞の未分化維持培養に用いられるフィーダー細胞は、液性因子（好ましくは未分化維持因子）の分泌や、細胞接着用の足場（細胞外基質）の作成により、多能性幹細胞の未分化維持に貢献する。

[0042] 本発明において、細胞の「凝集体」（Aggregate）とは、培地中に分散していた細胞が集合して形成された塊であって、細胞同士が接着している塊をいう。細胞塊、胚様体（Embryoid body）、スフェア（Sphere）、スフェロイド（Spheroid）、オルガノイド（Organoid）も細胞の凝集体に包含される。好ましくは、細胞の凝集体において、細胞同士が面接着している。一部の態様において、凝集体の一部分あるいは全部において、細胞同士が細胞－細胞間結合（cell-cell junction）及び／又は細胞接着（cell adhesion）、例えば接着結合（adherence junction）、を形成している場合がある。本発明における「凝集体」として具体的には、下記「2. 下垂体組織を含む細胞塊の製造方法」における、第一工程で生成する、浮遊培養開始時に分散していた細胞が形成する凝集体が挙げられる。

本発明において、「均一な凝集体」とは、複数の凝集体を培養する際に各凝集体の大きさが一定であることを意味し、凝集体の大きさを最大径の長さで評価する場合、均一な凝集体とは、最大径の長さの分散が小さいことを意味する。より具体的には、凝集体の集団全体のうちの75%以上の凝集体が、当該凝集体の集団における最大径の平均値±100%、好ましくは平均値±50%の範囲内、より好ましくは平均値±20%の範囲内であることを意味する。

[0043] 本発明において、「均一な凝集体を形成させる」とは、細胞を集合させて細胞の凝集体を形成させ浮遊培養する際に、一定数の分散した細胞を迅速に凝集させることで大きさが均一な細胞の凝集体を形成させることをいう。

「分散させる」とは、細胞や組織を酵素処理や物理処理等の分散処理により、小さな細胞片（2細胞以上100細胞以下、好ましくは50細胞以下）又は単一細胞まで分離させることをいう。一定数の分散した細胞とは、細胞片又は単一細胞を一定数集めたもののことをいう。

多能性幹細胞を分散させる方法としては、例えば、機械的分散処理、細胞分散液処理、細胞保護剤添加処理が挙げられる。これらの処理を組み合わせで行ってもよい。好ましくは、細胞分散液処理を行い、次いで機械的分散処理をするとよい。

機械的分散処理の方法としては、ピペッティング処理又はスクレーパーでの掻き取り操作が挙げられる。

細胞分散液処理に用いられる細胞分散液としては、例えば、トリプシン、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、プロナーゼ、DNase又はパイン等の酵素類や、エチレンジアミン四酢酸等のキレート剤のいずれかを含有溶液を挙げることができる。市販の細胞分散液、例えば、Accumax（Innovative cell technologies社製）やTrypLE Select（Life Technologies社製）を用いることもできる。

細胞保護剤添加処理に用いられる細胞保護剤としては、FGFシグナル伝達経路作用物質、ヘパリン、ROCK阻害物質、血清、又は血清代替物を挙げることができる。好ましい細胞保護剤としては、ROCK阻害物質が挙げられる。

例えば、多能性幹細胞を分散させる方法として、多能性幹細胞のコロニーを、細胞保護剤としてROCK阻害物質の存在下、細胞分散液（Accumax）で処理し、さらにピペッティングにより分散させる方法が挙げられる。

[0044] 本発明の製造方法においては、多能性幹細胞を迅速に集合させて多能性幹細胞の凝集体を形成させることが好ましい。このように多能性幹細胞の凝集体を形成させると、形成された凝集体から分化誘導される細胞において上皮

様構造を再現性よく形成させることができる。凝集体を形成させる実験的な操作としては、例えば、ウェルの小さなプレート（例えば、ウェルの底面積が平底換算で0.1～2.0 cm²程度のプレート）やマイクロポアなどを用いて小さいスペースに細胞を閉じ込める方法、小さな遠心チューブを用いて短時間遠心することで細胞を凝集させる方法が挙げられる。ウェルの小さなプレートとして、例えば24ウェルプレート（面積が平底換算で1.88 cm²程度）、48ウェルプレート（面積が平底換算で1.0 cm²程度）、96ウェルプレート（面積が平底換算で0.35 cm²程度、内径6～8mm程度）、384ウェルプレートが挙げられる。好ましくは、96ウェルプレートが挙げられる。ウェルの小さなプレートの形状として、ウェルを上から見たときの底面の形状としては、多角形、長方形、楕円、真円が挙げられ、好ましくは真円が挙げられる。ウェルの小さなプレートの形状として、ウェルを横から見たときの底面の形状としては、外周部が高く内凹部が低くくぼんだ構造が好ましく、例えば、U底、V底、M底が挙げられ、好ましくはU底またはV底、最も好ましくはV底が挙げられる。ウェルの小さなプレートとして、細胞培養皿（例えば、60mm～150mmディッシュ、カルチャーフラスコ）の底面に凹凸、又は、くぼみがあるものを用いてもよい。ウェルの小さなプレートの底面は、細胞非接着性の底面、好ましくは前記細胞非接着性コートした底面を用いるのが好ましい。

多能性幹細胞の凝集体が形成されたことや、凝集体を形成する各細胞において上皮様構造が形成されたことは、凝集体のサイズおよび細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態およびその均一性、分化および未分化マーカーの発現およびその均一性、分化マーカーの発現制御およびその同期性、分化効率の凝集体間の再現性などに基づき判断することが可能である。

[0045] 本発明における「組織」とは、形態や性質が異なる複数種類の細胞が一定のパターンで立体的に配置した構造を有する細胞集団の構造体をさす。

[0046] 本発明において、「神経組織」とは、発生期又は成体期の脳、中脳、間脳、小脳、脊髄、網膜、末梢神経等の、神経系細胞によって構成される組織

を意味する。神経組織は、層構造をもつ上皮構造（神経上皮）を形成することがあり、神経組織中の神経上皮は光学顕微鏡を用いた明視野観察により存在量を評価することができる。

[0047] 本発明において、「間脳」とは、第三脳室に接した中枢神経系の神経組織をさす。間脳には、視床上部、視床、視床下部、下垂体といった組織が含まれる。

[0048] 本発明において、「視床下部」とは、下垂体に接した間脳の一領域を指す。視床下部はさらに背側視床下部及び腹側視床下部に領域化される。視床下部はRx、Vax1、Six3といったマーカーを用いて同定することが出来る。背側視床下部はOtp、Brn2、バゾプレシンといったマーカーを用いて同定することが出来る。腹側視床下部はNkx2.1、SF1といったマーカーを用いて同定することが出来る。

[0049] 本発明において、「脳室」とは、中枢神経組織によって形成された腔所をさす。生体においては通常脳脊髄液等の組織液で満たされている無細胞性の構造であり、神経組織の頂端面側が脳室に面している。脳室を取り巻く脳室周囲層は神経幹細胞が存在し、発生期に細胞の増殖とニューロン産生が生じる領域である。本発明の製造方法で製造される細胞塊並びに組織中に脳室が含まれるかどうかは、例えば中枢神経組織マーカー（Bf1、Pax6等）及び頂端面マーカー（PKC-zeta等）を用いた免疫組織化学等の手法により検出することが出来る。

[0050] 本発明において、「神経系細胞（Neural cell）」とは、外胚葉由来組織のうち表皮系細胞以外の細胞を表す。すなわち、神経系前駆細胞、ニューロン（神経細胞）、グリア細胞、神経幹細胞、ニューロン前駆細胞及びグリア前駆細胞等の細胞を含む。神経系細胞には、下述する網膜組織を構成する細胞（網膜細胞）、網膜前駆細胞、網膜層特異的神経細胞、神経網膜細胞、網膜色素上皮細胞も包含される。神経系細胞は、Nestin、TuJ1、PSA-NCAM、N-cadherin等をマーカーとして同定することができる。

ニューロンは、神経回路を形成し情報伝達に貢献する機能的な細胞であり

、TuJ1、Dcx、HuC/D等の幼若神経細胞マーカー、及び／又は、Map2、NeuN等の成熟神経細胞マーカーの発現を指標に同定することができる。

グリア細胞 (glial cell) としては、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミユラーグリア等が挙げられる。アストロサイトのマーカーとしてはGFAP、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてはO4、ミユラーグリアのマーカーとしてはCRALBP等が挙げられる。

神経幹細胞とは、神経細胞及びグリア細胞への分化能（多分化能）と、多分化能を維持した増殖能（自己複製能ということもある）を持つ細胞である。神経幹細胞のマーカーとしてはNestin、Sox2、Musashi、Hesファミリー、CD133等が挙げられるが、これらのマーカーは前駆細胞全般のマーカーであり神経幹細胞特異的なマーカーとは考えられていない。神経幹細胞の数は、ニューロスフェアアッセイやクローナルアッセイ等により評価することができる。

ニューロン前駆細胞とは、増殖能をもち、神経細胞を産生し、グリア細胞を産生しない細胞である。ニューロン前駆細胞のマーカーとしては、Tbr2、Tα1等が挙げられる。あるいは、幼若神経細胞マーカー（TuJ1, Dcx, HuC/D）陽性かつ増殖マーカー（Ki67, pH3, MCM）陽性の細胞を、ニューロン前駆細胞として同定することもできる。

グリア前駆細胞とは、増殖能をもち、グリア細胞を産生し、神経細胞を産生しない細胞である。

神経系前駆細胞 (Neural Precursor cell) は、神経幹細胞、ニューロン前駆細胞及びグリア前駆細胞を含む前駆細胞の集合体であり、増殖能とニューロン及びグリア細胞産生能をもつ。神経系前駆細胞はNestin, GLAST, Sox2, Sox1, Musashi, Pax6等をマーカーとして同定することができる。あるいは、神経系細胞のマーカー陽性かつ増殖マーカー（Ki67, pH3, MCM）陽性の細胞を、神経系前駆細胞として同定することもできる。

[0051] 本発明において、「非神経上皮組織」とは、上皮構造を有する組織のうち神経上皮組織以外の組織を表す。上皮組織は外胚葉、中胚葉、内胚葉、栄養

外胚葉のいずれの胚葉からも形成される。上皮組織には上皮、中皮、内皮が含まれる。非神経上皮組織に含まれる組織の例としては、表皮、角膜上皮、鼻腔上皮、口腔上皮、気管上皮、気管支上皮、気道上皮、腎上皮、腎皮質上皮、胎盤上皮等が挙げられる。

上皮組織は通常種々の細胞間結合によりつながれており、単層または重層化した層構造を有する組織を形成する。これら上皮組織の有無の確認、存在量の定量は光学顕微鏡による観察か、上皮細胞マーカーに対する抗体（抗E-Cadherin抗体、抗N-Cadherin抗体、抗EpCAM抗体等）を用いた免疫組織化学等の手法により可能である。

[0052] 本発明において、「上皮細胞極性 (Epithelial polarity)」とは上皮細胞内に空間的に形成されている構成成分および細胞機能の分布の偏りを表す。例えば、角膜上皮細胞は眼球の最も外層に局在し、頂端側 (apical) では涙液を保持するための膜結合型ムチン (MUC-1、4、16) 等の頂端側特異的なタンパク質を発現し、基底側 (basal) では基底膜に接着するための $\alpha 6$ インテグリン、 $\beta 1$ インテグリン等の基底側特異的なタンパク質を発現している。

生体由来の組織中並びに本発明の製造方法等で作製された細胞塊中の上皮細胞並びに上皮組織に上皮細胞極性が存在しているかどうかは、Phalloidin、頂端側マーカー（抗MUC-1抗体、抗PKC-zeta抗体等）並びに基底側マーカー（抗 $\alpha 6$ インテグリン抗体、抗 $\beta 1$ インテグリン抗体等）を用いた免疫組織化学等の手法により検出することができる。

[0053] 本発明において、「プラコード (placode)」とは、主に脊椎動物の発生過程において表皮外胚葉の一部が肥厚して形成される器官の原基のことを表す。プラコードに由来する組織としては、水晶体、鼻、内耳、三叉神経、腺性下垂体等が挙げられる。プラコード、またはその前駆組織である前プラコード領域 (preplacode region) のマーカーとしては、Six1、Six4、Dlx5、Eya2、Emx2、Bf1等が挙げられる。

[0054] 本発明において、「下垂体プラコード」とは、胚発生の過程で表皮外胚葉の領域に形成される肥厚した構造であって、下垂体前駆細胞マーカーを発現

するものをいう。下垂体前駆細胞マーカーとしては、Lim3、Pitx1/2、Islet1/2等を挙げることができる。下垂体プラコードは、Lim3、Pitx1及びIslet1/2からなる群から選択される少なくとも1つ、好ましくは全ての下垂体前駆細胞マーカーを発現する。下垂体プラコードが陥入し、発生途中の袋状の構造であるラトケ嚢（Rathke's pouch）を形成し、さらに発生が進むと腺性下垂体を形成する。

[0055] 本発明において、「腺性下垂体」とは、少なくとも1種の前葉又は中葉の下垂体細胞を含む組織をいう。下垂体細胞には、生理機能を調節するホルモンを産生する下垂体ホルモン産生細胞と、非ホルモン産生細胞が含まれる。下垂体ホルモン産生細胞としては、成長ホルモン（GH）産生細胞、プロラクチン（PRL）産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生細胞、甲状腺刺激ホルモン（TSH）産生細胞、卵胞刺激ホルモン（FSH）産生細胞、黄体化ホルモン（LH）産生細胞等の前葉を構成する細胞；メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）産生細胞等の中葉を構成する細胞が挙げられる。非ホルモン産生細胞としては、血管内皮細胞、周皮細胞、濾胞星状細胞、下垂体幹細胞、下垂体前駆細胞が含まれる。

[0056] 一態様において、腺性下垂体は、成長ホルモン（GH）産生細胞、プロラクチン（PRL）産生細胞、及び副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生細胞からなる群から選択される少なくとも1種、好ましくは2種、より好ましくは3種の下垂体ホルモン産生細胞を含む。更なる態様において、腺性下垂体は、成長ホルモン（GH）産生細胞、プロラクチン（PRL）産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生細胞、甲状腺刺激ホルモン（TSH）産生細胞、卵胞刺激ホルモン（FSH）産生細胞、及び黄体化ホルモン（LH）産生細胞からなる群から選択される少なくとも1種、好ましくは2種以上（2、3、4、5又は6種）の下垂体ホルモン産生細胞を含む。生体由来の組織中並びに本発明の製造方法等で作成された細胞塊中に腺性下垂体および下垂体ホルモン産生細胞が含まれているかどうかは、成長ホルモン（GH）産生細胞マーカー（抗Pit1抗体、抗GH抗体等）、プロラクチン（PRL）産生細胞マーカー（抗Pit1抗体、抗PRL抗体等）、

副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生細胞マーカー（抗T-Pit抗体、抗NeuroD1抗体、抗ACTH抗体等）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）産生細胞マーカー（抗GATA2抗体、抗ACTH抗体等）、卵胞刺激ホルモン（FSH）産生細胞、及び黄体化ホルモン（LH）産生細胞マーカー（抗GATA2抗体、抗SF1抗体、抗FSH抗体、抗LH抗体等）を用いた免疫組織化学および分泌されたホルモンに対するELISA等の手法により検出することが出来る。

[0057] 本発明において「下垂体幹細胞」とは、下垂体に存在し、下垂体組織の再生や下垂体ホルモン産生細胞の供給に寄与する未分化な複能性幹細胞、前駆細胞のことをいう。本発明の製造方法で製造される細胞塊並びに組織中に下垂体幹細胞が含まれているかどうかは、例えばSox2、Sox9、E-Cadherin、Nestin、S100 β 、GFR α 2、Prop1、CD133、 β -Catenin、Klf4、Oct4、Pax6、コクサッキーウイルス・アデノウイルス共通受容体（CXADR）、PRRX1/2、Ephrin-B2、ACE、YAP1、TAZといった下垂体幹細胞マーカー及びKi67、リン酸化ヒストンH3、MCMといった細胞増殖マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学、BrdU、EdU、IdU等の核酸アナログを用いた増殖細胞標識アッセイ、蛍光標識ジペプチド（ β -alanyl-lysyl-N-7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid）の取り込みアッセイ、下垂体スフェア（pituosphere）形成アッセイ等の手法により、検出することができる。

[0058] 本発明において、「ニッチ」、もしくは「幹細胞ニッチ」とは幹細胞の増殖、分化、性質の維持等に関わる微小環境をいう。生体におけるニッチの例としては、造血幹細胞ニッチ、毛包幹細胞ニッチ、腸管上皮幹細胞ニッチ、筋幹細胞ニッチ、下垂体ニッチなどが挙げられる。これらのニッチにおいては、それぞれの組織特有の幹細胞とニッチを提供する支持細胞とが存在し、支持細胞が提供するサイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス、細胞接着因子、細胞間シグナル伝達因子等により幹細胞が維持されている。

[0059] 本発明において、「下垂体ニッチ」とは、下垂体幹細胞の増殖、分化、性質の維持等に関わる微小環境をいう。下垂体ニッチとしては、発生期の袋状のラトケ囊の中空部の痕跡として下垂体前葉と中葉の間に残る遺残腔（ラト

ケ裂溝)周辺に存在するMaginal Cell Layer (MCL)ニッチ、および下垂体前葉に散在する実質層(Parenchymal)ニッチが挙げられる。

[0060] 本発明において「神経堤」とは、脊椎動物の初期発生において表皮外胚葉と神経板の間に形成される構造を表し、「神経堤細胞又は神経堤由来細胞」は神経堤に存在する細胞乃至神経堤に由来し遊走、分化した細胞を表す。神経堤由来細胞として例えば、末梢神経系の神経細胞、支持細胞、色素細胞、内分泌細胞、平滑筋、頭部骨格細胞、間葉系細胞等が挙げられる。本発明の製造方法で製造される細胞塊及び組織中に神経堤細胞及び神経堤由来細胞が含まれるかどうかは、Nestin、Sox10、Sox9、Slug、Snail、Twist、FoxD3、TFAP2、Pax3、Pax7、HNK-1、p75NTRといった神経堤細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学等の手法により検出することができる。

[0061] 本発明において「間葉系細胞」とは、主に中胚葉並びに神経堤に由来し、結合組織を形成する非上皮性の細胞である。これらの細胞のうちの一部は、間葉系幹細胞と呼ばれる複能性を有した体性幹細胞である。本発明の製造方法で製造される細胞塊並びに組織中に間葉系細胞が含まれるかどうかは、Nestin、Vimentin、Cadherin-11、Laminin、CD44といった間葉系細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学等の手法により検出することができる。間葉系幹細胞が含まれるかどうかは、CD9、CD13、CD29、CD44、CD55、CD59、CD73、CD105、CD140b、CD166、VCAM-1、STRO-1、c-Kit、Sca-1、Nucleostemin、CDCP1、BMPR2、BMPR1A及びBMPR1Bといった間葉系幹細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学等の手法により検出することができる。

[0062] 2. 下垂体組織を含む細胞塊の製造方法

本発明は、下垂体組織を含む細胞塊及びその製造方法を提供する。以下、本発明の製造方法とも称する。

本発明の製造方法の一態様は、下記工程(1)及び(2)を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法である。

(1) 多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程。

[0063] 本発明の製造方法の好ましい一態様は、下記工程(a)、(1)及び(2)を含む下垂体組織を含む細胞塊の製造方法である。

(a) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1) TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2) 未分化維持因子を含む培地で培養するa工程、

(1) a工程で培養された細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質とソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含有する細胞塊を得る第二工程。

[0064] 本発明の製造方法のより好ましい一態様は、下記工程(1)、(2-1)及び(2-2)を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法である。

(1) 多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2-1) 第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程(1)、

(2-2) 第二工程(1)で浮遊培養された凝集体を、BMPシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程(2)。

[0065] 本発明の製造方法のさらなる一態様は、下記工程(a)、(1)、(2-1)及び(2-2)を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法である。

(a) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1) TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2) 未分化維持因子を含む培地で培養するa工程、

(1) a工程で培養された細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2-1) 第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程(1)、

(2-2) 第二工程で浮遊培養された凝集体を、BMPシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程(2)。

[0066] <工程(a)>

多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、1) TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに2) 未分化維持因子を含む培地で培養するa工程について説明する。

工程(a)において、多能性幹細胞をTGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質で処理してから、第一工程において浮遊培養に付すことにより、多能性幹細胞の状態が変わり、非神経上皮組織の形成効率が改善し、凝集体の質が向上し、分化しやすく、細胞死が生じにくく、凝集体の内部が密な未分化性を維持した細胞凝集体を高効率で製造することができる。

[0067] 工程(a)は、フィーダー細胞非存在下で実施することが好ましい。

本発明におけるフィーダー細胞非存在下(フィーダーフリー)とは、フィーダー細胞を実質的に含まない(例えば、全細胞数に対するフィーダー細胞数の割合が3%以下)条件を意味する。

[0068] 工程(a)において用いられる培地は、フィーダーフリー条件下で、多能性幹細胞の未分化維持培養を可能にする培地(フィーダーフリー培地)であれば、特に限定されない。例えば、未分化維持因子を含み、TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を含む培地が挙げられる。

[0069] 工程（a）において用いられる培地は、未分化維持培養を可能にするため、未分化維持因子を含む。未分化維持因子は、多能性幹細胞の分化を抑制する作用を有する物質であれば特に限定はない。当業者に汎用されている未分化維持因子としては、プライムド多能性幹細胞（Primed pluripotent stem cells）（例えば、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞）の場合、FGFシグナル伝達経路作用物質、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質、insulin等を挙げることができる。FGFシグナル伝達経路作用物質として具体的には、線維芽細胞増殖因子（例えば、bFGF、FGF4やFGF8）が挙げられる。また、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質としては、TGF β シグナル伝達経路作用物質、Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質が挙げられる。TGF β シグナル伝達経路作用物質としては、例えばTGF β 1、TGF β 2が挙げられる。Nodal/Activinシグナル伝達経路作用物質としては、例えばNodal、ActivinA、ActivinBが挙げられる。ヒト多能性幹細胞（ヒトES細胞、ヒトiPS細胞）を培養する場合、工程（a）における培地は、好ましくは未分化維持因子として、bFGFを含む。

[0070] 本発明に用いる未分化維持因子は、通常哺乳動物の未分化維持因子である。哺乳動物としては、上記のものを挙げることができる。未分化維持因子は、哺乳動物の種間で交差反応性を有し得るので、培養対象の多能性幹細胞の未分化状態を維持可能な限り、いずれの哺乳動物の未分化維持因子を用いてもよいが、好適には培養する細胞と同一種の哺乳動物の未分化維持因子が用いられる。例えば、ヒト多能性幹細胞の培養には、ヒト未分化維持因子（例、bFGF、FGF4、FGF8、EGF、Nodal、ActivinA、ActivinB、TGF β 1、TGF β 2等）が用いられる。ここで「ヒトタンパク質X」とは、タンパク質X（未分化維持因子等）が、ヒト生体内で天然に発現するタンパク質Xのアミノ酸配列を有することを意味する。

[0071] 本発明に用いる未分化維持因子は、好ましくは単離されている。

「単離」とは、目的とする成分や細胞以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。従って、「単離されたタンパク質X」には、培養対象の細胞や組織から産生され細胞や組織及び培地

中に含まれている内在性のタンパク質Xは包含されない。「単離されたタンパク質X」の純度（総タンパク質重量に占めるタンパク質Xの重量の百分率）は、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは99%以上、最も好ましくは100%である。

本発明は、一態様において、単離された未分化維持因子を提供する工程を含む。また、一態様において、工程（a）に用いる培地中へ、単離された未分化維持因子を外来的（又は外因的）に添加する工程を含む。あるいは、工程（a）に用いる培地に予め未分化維持因子が添加されていてもよい。

[0072] 工程（a）において用いられる培地中の未分化維持因子濃度は、培養する多能性幹細胞の未分化状態を維持可能な濃度であり、当業者であれば、適宜設定することができる。例えば、未分化維持因子として、フィーダー細胞非存在下でbFGFを用いる場合、その濃度は、通常約4ng/mL～約500ng/mL、好ましくは約10ng/mL～約200ng/mL、より好ましくは約30ng/mL～約150ng/mLである。

[0073] フィーダーフリー培地として、多くの合成培地が開発・市販されており、例えばEssential 8培地が挙げられる。Essential 8培地は、DMEM/F12培地に、添加剤として、L-ascorbic acid-2-phosphate magnesium (64 mg/l), sodium selenium(14 μ g/l), insulin(19.4mg /l), NaHCO₃(543 mg/l), transferrin (10.7 mg/l), bFGF (100 ng/mL)、及び、TGF β ファミリーシグナル伝達経路作用物質（TGF β 1(2 ng/mL)またはNodal (100 ng/mL))を含む(Nature Methods, 8, 424-429 (2011))。市販のフィーダーフリー培地としては、例えば、Essential 8 (Life Technologies社製)、S-medium (DSファーマバイオメディカル社製)、StemPro(Life Technologies社製)、hESF9、mTeSR1 (STEMCELL Technologies社製)、mTeSR2 (STEMCELL Technologies社製)、TeSR-E8 (STEMCELL Technologies社製)が挙げられる。またこの他に、フィーダーフリー培地としては、StemFit (味の素社製)が挙げられる。上記工程（a）ではこれらを用いることにより、簡便に本発明を実施することができる。StemFit培地は、Scientific Reports (2014), 4, 3594.に記載の通り、未分化維持成

分としてbFGFを含有する。

[0074] 工程（a）において用いられる培地は、血清培地であっても無血清培地であってもよいが、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、無血清培地である。

[0075] 工程（a）において用いられる培地は、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、好ましくは、含有成分が化学的に決定された培地である。

[0076] 工程（a）における多能性幹細胞の培養は、浮遊培養及び接着培養のいずれの条件でおこなわれてもよいが、好ましくは、接着培養によりおこなわれる。

[0077] 工程（a）におけるフィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養においては、培地として前記フィーダーフリー培地を用いるとよい。

工程（a）におけるフィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養においては、フィーダー細胞に代わる足場を多能性幹細胞に提供するため、適切なマトリクスを足場として用いてもよい。足場であるマトリクスにより、表面をコーティングした細胞容器中で、多能性幹細胞を接着培養する。

[0078] 足場として用いることのできるマトリクスとしては、ラミニン（Nat Biotechnol 28, 611-615 (2010)）、ラミニン断片（Nat Commun 3, 1236 (2012)）、基底膜標品（Nat Biotechnol 19, 971-974 (2001)）、ゼラチン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、ビトロネクチン（V i t r o n e c t i n）等が挙げられる。

[0079] 「ラミニン」とは、 α 、 β 、 γ 鎖からなるヘテロ三量体分子であり、サブユニット鎖の組成が異なるアイソフォームが存在する細胞外マトリックスタンパク質である。具体的には、ラミニンは、5種の α 鎖、4種の β 鎖および3種の γ 鎖のヘテロ三量体の組合せで約15種類のアイソフォームを有する。 α 鎖（ $\alpha 1 \sim \alpha 5$ ）、 β 鎖（ $\beta 1 \sim \beta 4$ ）および γ 鎖（ $\gamma 1 \sim \gamma 4$ ）のそれぞれの数字を組み合わせて、ラミニンの名称が定められている。例えば $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の組合せによるラミニンをラミニン511という。本発明においては、好ましくはラミニン511が用いられる（Nat Biotechnol

28, 611-615 (2010))。

[0080] 本発明で用いるラミニン断片は、多能性幹細胞への接着性を有しており、フィーダーフリー条件での多能性幹細胞の維持培養を可能とするものであれば特に限定されないが、好ましくは、E 8フラグメントである。ラミニンE 8フラグメントは、ラミニン5 1 1をエラスターゼで消化して得られたフラグメントの中で、強い細胞接着活性をもつフラグメントとして同定されたものである(EMBO J., 3:1463-1468, 1984, J. Cell Biol., 105:589-598, 1987)。本発明においては、好ましくはラミニン5 1 1のE 8フラグメントが用いられる(Nat Commun 3, 1236 (2012)、Scientific Reports 4, 3549 (2014))。本発明に用いられるラミニンE 8フラグメントは、ラミニンのエラスターゼ消化産物であることを要するものではなく、組換え体であってもよい。あるいは、遺伝子組み換え動物(カイコ等)に産生させたものであってもよい。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明においては、好ましくは、組換え体のラミニン断片が用いられる。ラミニン5 1 1のE 8フラグメントは市販されており、例えばニッピ株式会社等から購入可能である。

[0081] 化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明において用いられるラミニン又はラミニン断片は、好ましくは単離されている。

[0082] 好ましくは、工程(a)におけるフィーダーフリー条件での多能性幹細胞の培養においては、単離されたラミニン5 1 1又はラミニン5 1 1のE 8フラグメント(最も好ましくは、ラミニン5 1 1のE 8フラグメント)により、表面をコーティングした細胞容器中で、ヒト多能性幹細胞を接着培養する。

[0083] 工程(a)における多能性幹細胞の培養時間は、続く工程(1)において形成される凝集体の質を向上させる効果が達成可能な範囲で特に限定されないが、通常0.5～144時間、好ましくは2～96時間、より好ましくは6～48時間、更に好ましくは12～48時間、より更に好ましくは18～28時間(例、24時間)である。即ち、工程(1)開始の0.5～144

時間（好ましくは、18～28時間）前に工程（a）を開始し、工程（a）を完了した後引き続き工程（1）がおこなわれる。

[0084] 工程（a）における培養温度、CO₂濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約30℃から約40℃、好ましくは約37℃である。またCO₂濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。

[0085] 好ましい一態様において、ヒト多能性幹細胞（例、ヒトiPS細胞）を、フィーダー細胞非存在下で、bFGFを含有する無血清培地中で、接着培養する。当該接着培養は、好ましくは、ラミニン511、ラミニン511のE8フラグメント又はビトロネクチンで表面をコーティングした細胞容器中で実施される。当該接着培養は、好ましくは、フィーダーフリー培地としてStemFitを用いて実施される。

[0086] 好ましい一態様において、ヒト多能性幹細胞（例、ヒトiPS細胞）を、フィーダー細胞非存在下で、bFGFを含有する無血清培地中で、浮遊培養する。当該浮遊培養では、ヒト多能性幹細胞は、ヒト多能性幹細胞の凝集体を形成してもよい。

[0087] ソニック・ヘッジホッグ（Shh）シグナル伝達経路作用物質とは、Shhにより媒介されるシグナル伝達を増強し得る物質である。Shhシグナル伝達経路作用物質としては、例えば、Hedgehogファミリーに属する蛋白質（例えば、ShhやIhh）、Shh受容体、Shh受容体アゴニスト、Smoアゴニスト、Purmorphamine、GSA-10、Hh-Ag1.5、20(S)-Hydroxycholesterol又はSAG（Smoothened Agonist；N-Methyl-N'-(3-pyridinylbenzyl)-N'-(3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1,4-diaminocyclohexane）等が挙げられる。Shhシグナル伝達経路作用物質は、好ましくはSAGである。培地中のShhシグナル伝達経路作用物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。SAGは、工程（a）においては通常、約1nM～約2000nM、好ましくは約10nM～約1000nM、特に好ましくは約10nMから約700nM、より好ましくは約100nM～約600nM、更に好ましくは約100nM～約500nMの濃度で使用される。また、SAG以外のShhシグナル伝達経路作用物質を使用する場合、前記濃度のSAGと同等

のShhシグナル伝達促進活性を示す濃度で用いられることが望ましい。SAG等のShhシグナル伝達促進活性は、当業者に周知の方法、例えばGli1遺伝子の発現に着目したレポータージーンアッセイにて決定することができる（Oncogene (2007) 26, 5163-5168）。例えば、10nMから700nMのSAGに相当するShhシグナル伝達促進活性を有するShhシグナル伝達経路作用物質としては、20nMから2 μ MのPurmorphamine、20nMから3 μ MのGSA-10、10nMから1 μ MのHh-Ag1.5等が挙げられる。

- [0088] TGF β ファミリーシグナル伝達経路（すなわちTGF β スーパーファミリーシグナル伝達経路）とは、TGF β 、Nodal/Activin、又はBMPをリガンドとし、細胞内でSmadファミリーにより伝達されるシグナル伝達経路である。
- [0089] TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質とは、TGF β ファミリーシグナル伝達経路、すなわちSmadファミリーにより伝達されるシグナル伝達経路を阻害する物質を表し、具体的にはTGF β シグナル伝達経路阻害物質、Nodal/Activinシグナル伝達経路阻害物質及びBMPシグナル伝達経路阻害物質を挙げることができる。TGF β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質としては、TGF β シグナル伝達経路阻害物質が好ましい。
- [0090] TGF β シグナル伝達経路阻害物質としては、TGF β に起因するシグナル伝達経路を阻害する物質であれば特に限定は無く、核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。当該物質として例えば、TGF β に直接作用する物質（例えば、タンパク質、抗体、アプタマー等）、TGF β をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、TGF β 受容体とTGF β の結合を阻害する物質、TGF β 受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質（例えば、TGF β 受容体の阻害剤、Smadの阻害剤等）を挙げることができる。TGF β シグナル伝達経路阻害物質として知られているタンパク質として、Lefty等が挙げられる。
- [0091] TGF β シグナル伝達経路阻害物質として、当業者に周知の化合物を使用することができる。具体的には、SB431542（本明細書中、SB431と略記する場合がある）、SB505124、SB525334、LY2157299、LY2109761、GW788388、LY364947

、SD-208、EW-7197、A 83-01、RepSox等のAlk5/TGF β R1阻害剤、SIS3等のSMA D3阻害剤が挙げられる。ここでSB431542 (4-(5-ベンゾール[1,3]ジオキソール-5-イル-4-ピリジン-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル)-ベンズアミド) 及びA-83-01 (3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド) は、TGF β 受容体(ALK5)及びActivin受容体(ALK4/7)の阻害剤(すなわちTGF β R阻害剤)として公知の化合物である。SIS 3は、TGF β 受容体の制御下にある細胞内シグナル伝達因子であるSMAD3のリン酸化を阻害するTGF β シグナル伝達経路阻害物質である。本発明で用いられるTGF β シグナル伝達経路阻害物質は、好ましくはSB431542又はA-83-01である。

培地中のTGF β シグナル伝達経路阻害物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。工程(a)におけるTGF β シグナル伝達経路阻害物質としてSB431542を用いる場合は、通常、約1nM～約100 μ M、好ましくは約10nM～約50 μ M、より好ましくは約100nM～約50 μ M、更に好ましくは約1 μ M～約10 μ Mの濃度で使用される。また、SB431542以外のTGF β シグナル伝達経路阻害物質を使用する場合、前記濃度のSB431542と同等のTGF β シグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0092] <工程(1)>

未分化条件で維持された多能性幹細胞、好ましくは工程(a)で得られた多能性幹細胞を、Wntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程について説明する。

[0093] Wntシグナル伝達経路とは、Wntファミリー・タンパク質をリガンドとし、主としてFrizzledを受容体とするシグナル伝達経路である。当該シグナル経路としては、 β -Cateninによって伝達される古典的Wnt経路(Canonical Wnt pathway)に加えて、 β -カテニン非依存性の非古典的Wnt経路(Non-Canonical Wnt pathway)等が挙げられる。非古典的Wnt経路としては、Planar Cell Polarity(PCP)経路、Wnt/Ca

c i u m経路、W n t - R A P 1経路、W n t - R o r 2経路、W n t - P K A経路、W n t - G S K 3 M T経路、W n t - a P K C経路、W n t - R Y K経路、W n t - m T O R経路等が挙げられる。非古典的W n t経路では、W n t以外の他のシグナル伝達経路でも活性化される共通のシグナル伝達因子が存在するが、本発明ではそれらの因子もW n tシグナル伝達経路の構成因子とし、それらの因子に対する阻害物質もW n tシグナル伝達経路阻害物質に含まれる。

[0094] 本発明において、Wntシグナル伝達経路阻害物質とはWntファミリー・タンパク質により惹起されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り限定されない。核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。当該物質として例えば、Wntのプロセッシングと細胞外への分泌を阻害する物質、Wntに直接作用する物質（例えば、タンパク質、抗体、アプタマー等）、Wntをコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、Wnt受容体とWntの結合を阻害する物質、Wnt受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質を挙げることができる。Wntシグナル伝達経路阻害物質として知られているタンパク質として、secreted Frizzled Related Protein (sFRP) クラスに属するタンパク質（sFRP1から5、Wnt Inhibitory Factor-1 (WIF-1)、Cerberus）、Dickkopf (Dkk) クラスに属するタンパク質（Dkk1から4、Kremen）等が挙げられる。

[0095] Wntシグナル伝達経路阻害物質として、当業者に周知の化合物を使用することができる。Wntシグナル伝達経路阻害物質として例えば、Porcupine阻害剤（PORCN阻害剤とも称する）、DKK阻害剤、Frizzled阻害剤、Dvl阻害剤、Tankyrase阻害剤（TANK阻害剤とも称する）、カゼインキナーゼ1阻害剤、カテニン応答性転写阻害剤、p300阻害剤、CBP阻害剤、BCL-9阻害剤（Am J Cancer Res. 2015; 5(8): 2344-2360）等が挙げられる。また、作用機序は報告されていないが、Wntシグナル伝達経路阻害物質としてKY-02111、KY-03-Iが挙げられる。PORCN阻害剤として例えば、IWP-2、IWP-3、IWP-4、IWP-L6、IWP-12、LGK-974、ETC-159、GNF-6231、Wnt-C59などが挙げられる。TANK阻害剤として

例えば、IWR1-endo、XAV939、MN-64、WIKI4、TC-E 5001、JW 55、AZ6102などが挙げられる。本発明で用いられるWntシグナル伝達経路阻害物質は、好ましくはPORCN阻害剤、TANK阻害剤またはKY-02111であり、より好ましくはPORCN阻害剤である。本発明で用いられるPORCN阻害剤は、好ましくはIWP-2又はWnt-C59である。本発明で用いられるTANK阻害剤は、好ましくはXAV939である。

本発明で用いられるWntシグナル伝達経路阻害物質は、非古典的Wnt経路(Non-Canonical Wnt pathway)に対する阻害活性を有することもまた好ましい。非古典的Wnt経路に対する阻害活性を有するWntシグナル伝達経路阻害物質としては例えばPORCN阻害剤、抗Frizzled抗体、Box5ペプチド等が挙げられる。Porcupineは古典的Wnt経路のリガンドであるWnt1やWnt3a等に加えて、非古典的Wnt経路のリガンドであるWnt5aやWnt5b、Wnt11の脂質修飾に関わることが知られており(Dev Biol, 2012 Jan 15;361(2):392-402.、Biochem J. 2007 Mar 15; 402(Pt 3): 515-523.)、PORCN阻害剤は古典的Wnt経路と非古典的Wnt経路の双方を阻害する。

培地中のWntシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。例えばWntシグナル伝達経路阻害物質としてPORCN阻害剤の1種であるIWP-2を用いる場合は、その濃度は通常約0.01 μ M～約30 μ M、好ましくは約0.1 μ M～約30 μ M、より好ましくは、約2 μ Mである。PORCN阻害剤の1種であるWnt-C59を用いる場合は、その濃度は通常約1 pM～約30 μ M、好ましくは約100 pM～約30 μ M、より好ましくは、約1 nM～約1 μ Mである。TANK阻害剤の1種であるXAV939を用いる場合は、その濃度は通常約0.01 μ M～約30 μ M、好ましくは約0.1 μ M～約30 μ M、より好ましくは、約1 μ Mである。KY-02111を用いる場合は、その濃度は通常約0.01 μ M～約30 μ M、好ましくは約0.1 μ M～約30 μ M、より好ましくは、約5 μ Mである。

[0096] 工程(1)では、Wntシグナル伝達経路阻害物質及びTGF β シグナル伝達経路阻害物質存在下で浮遊培養することが、間葉系細胞を形成させる観点で好ましい。

工程（１）において用いられるTGF β シグナル伝達経路阻害物質としては工程（a）で例示したものと同様のものが用いられる。工程（a）及び工程（１）のTGF β シグナル伝達経路阻害物質は同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一である。

培地中のTGF β シグナル伝達経路阻害物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。工程（１）においてTGF β シグナル伝達経路阻害物質としてSB431542を用いる場合は、通常、約1nM～約100 μ M、好ましくは約10nM～約50 μ M、より好ましくは約100nM～約50 μ M、更に好ましくは約500nM～約10 μ Mの濃度で使用される。また、SB431542以外のTGF β シグナル伝達経路阻害物質を使用する場合、前記濃度のSB431542と同等のTGF β シグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0097] 工程（１）において用いられる培地は、上記定義の項で記載したようなものである限り特に限定されない。工程（１）において用いられる培地は血清含有培地又は無血清培地であり得る。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明においては、無血清培地が好適に用いられる。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地（例えば、IMDMとF-12の1：1の混合液に5%KSR、450 μ M1-モノチオグリセロール及び1 $\times$ Chemically Defined Lipid Concentrateが添加された培地、又は、GMEMに5%～20%KSR、NEAA、ピルビン酸、2-メルカプトエタノールが添加された培地）を使用することが好ましい。無血清培地へのKSRの添加量としては、例えばヒトES細胞の場合は、通常約1%から約30%であり、好ましくは約2%から約20%である。

[0098] 工程（１）における凝集体の形成に際しては、まず、工程（a）で得られた多能性幹細胞の分散操作を行うことが好ましい。分散操作により得られた「分散された細胞」とは例えば7割以上が単一細胞であり2～50細胞の塊が3割以下存在する状態が挙げられる。

分散された細胞として、好ましくは、8割以上が単一細胞であり、2～50細胞の塊が2割以下存在する状態が挙げられる。分散された細胞とは、細

胞同士の接着（例えば面接着）がほとんどなくなった状態があげられる。一部の態様において、分散された細胞とは、細胞－細胞間結合（例えば、接着結合）がほとんどなかった状態が挙げられる。

工程（a）で得られた多能性幹細胞の分散操作は、前述した、機械的分散処理、細胞分散液処理、細胞保護剤添加処理を含んでよい。これらの処理を組み合わせてもよい。好ましくは、細胞保護剤添加処理と同時に、細胞分散液処理を行い、次いで機械的分散処理をするとよい。

細胞保護剤添加処理に用いられる細胞保護剤としては、FGFシグナル伝達経路作用物質、ヘパリン、ROCK阻害物質、ミオシン阻害物質、血清、又は血清代替物を挙げることができる。好ましい細胞保護剤としては、ROCK阻害物質が挙げられる。分散により誘導される多能性幹細胞（特に、ヒト多能性幹細胞）の細胞死を抑制するために、Rho-associated coiled-coilキナーゼ（ROCK）の阻害物質を第一工程培養開始時から添加してもよい。ROCK阻害物質としては、Y-27632、Fasudil（HA1077）、H-1152、HA-100等を挙げることができる。あるいは、調製済みの細胞保護剤を用いることもできる。調製済みの細胞保護剤としては、例えばRevitaCell Supplement（Thermo Fisher Scientific社製）、CloneR（Stemcell Technologies社製）が挙げられる。

細胞分散液処理に用いられる細胞分散液としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、プロナーゼ、DNase又はパパイン等の酵素類や、エチレンジアミン四酢酸等のキレート剤のいずれかを含む溶液を挙げることができる。市販の細胞分散液、例えば、TrypLE Select（Thermo Fisher Scientific社製）やTrypLE Express（Thermo Fisher Scientific社製）、Accumax（Innovative Cell Technologies社製）を用いることもできる。

機械的分散処理の方法としては、ピペッティング処理又はスクレーパーでの掻き取り操作が挙げられる。

分散された細胞は上記培地中に懸濁される。

[0099] そして、分散された多能性幹細胞の懸濁液を、上記培養器中に播き、分散させた多能性幹細胞を、培養器に対して、非接着性の条件下で培養すること

により、複数の細胞を集合させて凝集体を形成する。

- [0100] この際、分散された多能性幹細胞を、10cmディッシュのような、比較的大きな培養器に播種することにより、1つの培養器中に複数の細胞の凝集体を同時に形成させてもよいが、凝集体ごとの大きさのばらつきを生じにくくする観点で、例えば、96ウェルマイクロプレートのようなマルチウェルプレート（U底、V底）の各ウェルに一定数の分散された多能性幹細胞を入れて、これを静置培養すると、細胞が迅速に凝集することにより、各ウェルにおいて1個の凝集体を形成させることが好ましい。この凝集体を複数のウェルから回収することにより、均一な凝集体の集団を得ることができる。
- [0101] 工程（1）では、凝集体の調製の煩雑さを回避する観点から、各ウェル内に凝集体が入ったままの状態プレート全体の培地を一度に交換することが可能な三次元細胞培養容器を用いてもよい。三次元細胞培養容器としては、例えばPrimeSurface96スリットウェルプレート（住友ベークライト社製）等が挙げられる。
- [0102] 工程（1）における多能性幹細胞の濃度は、細胞の凝集体をより均一に、効率的に形成させるように適宜設定することができる。例えば96ウェルマイクロウェルプレートを用いてヒト多能性幹細胞（例、工程（a）から得られたヒトiPS細胞）を浮遊培養する場合、1ウェルあたり通常約 1×10^3 から約 1×10^5 細胞、好ましくは約 3×10^3 から約 5×10^4 細胞、より好ましくは約 4×10^3 から約 2×10^4 細胞、更に好ましくは約 4×10^3 から約 1.6×10^4 細胞、特に好ましくは約 8×10^3 から約 1.2×10^4 細胞となるように調製した液をウェルに添加し、プレートを静置して凝集体を形成させる。
- [0103] 工程（1）における培養温度、 CO_2 濃度等の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、例えば約 $30^\circ C$ から約 $40^\circ C$ 、好ましくは約 $37^\circ C$ である。 CO_2 濃度は、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。
- [0104] 工程（1）において、培地交換操作を行う場合、例えば、元ある培地を捨てずに新しい培地を加える操作（培地添加操作）、元ある培地を半量程度（

元ある培地の体積量の30～90％程度、例えば40～60％程度）捨てて新しい培地を半量程度（元ある培地の体積量の30～90％、例えば40～60％程度）加える操作（半量培地交換操作）、元ある培地を全量程度（元ある培地の体積量の90％以上）捨てて新しい培地を全量程度（元ある培地の体積量の90％以上）加える操作（全量培地交換操作）が挙げられる。

ある時点で、特定の成分（例えば、分化誘導因子）を添加する場合、例えば、終濃度を計算した上で、元ある培地を半量程度捨てて、特定の成分を終濃度よりも高い濃度で含む新しい培地を半量程度加える操作（半量培地交換操作）を行ってもよい。

ある時点で、元の培地に含まれる成分を希釈して濃度を下げる場合、例えば、培地交換操作を、1日に複数回、好ましくは1時間以内に複数回（例えば2～3回）行ってもよい。また、ある時点で、元の培地に含まれる成分を希釈して濃度を下げる場合、細胞または凝集体を別の培養容器に移してもよい。

培地交換操作に用いる道具は特に限定されないが、例えば、ピペッター、ピペットマン、マルチチャンネルピペットマン、連続分注器、などが挙げられる。例えば、培養容器として96ウェルプレートを用いる場合、マルチチャンネルピペットマンを使ってもよい。

- [0105] 細胞の凝集体を形成させるために必要な浮遊培養の時間は、細胞を均一に凝集させるように、用いる多能性幹細胞によって適宜決定可能であるが、均一な細胞の凝集体を形成するためにはできる限り短時間であることが望ましい。分散された細胞が、細胞凝集体が形成されるに至るまでの工程は、細胞が集合する工程、及び集合した細胞が細胞凝集体を形成する工程にわけられる。分散された細胞を播種する時点（すなわち浮遊培養開始時）から細胞が集合するまでは、例えば、ヒト多能性幹細胞（例、ヒトiPS細胞）の場合には、好ましくは約24時間以内、より好ましくは約12時間以内に集合した細胞を形成させる。分散された細胞を播種する時点（すなわち浮遊培養開始時）から細胞凝集体が形成されるまでの工程では、例えば、ヒト多能性幹細胞

(例、iPS細胞)の場合には、好ましくは約72時間以内、より好ましくは約48時間以内に凝集体が形成される。この凝集体形成までの時間は、細胞を凝集させる用具や、遠心条件などを調整することにより適宜調節することが可能である。

[0106] 細胞の凝集体が形成されたことは、凝集体のサイズおよび細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態およびその均一性、分化および未分化マーカーの発現およびその均一性、分化マーカーの発現制御およびその同期性、分化効率の凝集体間の再現性などにに基づき判断することが可能である。

[0107] 凝集体が形成された後、そのまま、凝集体の培養を継続してもよい。工程(1)における浮遊培養の時間は、通常8時間～6日間程度、好ましくは12時間～48時間程度である。

[0108] <工程(2)>及び<工程(2-1)>

工程(1)で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程、あるいは工程(1)で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養する第二工程(1)について説明する。

[0109] BMPシグナル伝達経路作用物質とは、BMPにより媒介されるシグナル伝達経路を増強し得る物質である。BMPシグナル伝達経路作用物質としては、例えばBMP2、BMP4もしくはBMP7等のBMPタンパク質、GDF7等のGDFタンパク質、抗BMP受容体抗体、又は、BMP部分ペプチドなどが挙げられる。BMP2タンパク質及びBMP4タンパク質は例えばR&D Systemsから、BMP7タンパク質はBiolegend社から、GDF7タンパク質は例えば和光純薬から入手可能である。BMPシグナル伝達経路作用物質は、好ましくはBMP4である。

培地中のBMPシグナル伝達経路作用物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。BMPシグナル伝達経路作用物質としてBMP4を用いる場合は、通常、約1pM～約100nM、好ましくは約10pM～約50nM、

より好ましくは約10pM～約25nM、更に好ましくは約10pM～約5nMの濃度で使用される。また、BMP4以外のBMPシグナル伝達経路作用物質を使用する場合、前記濃度のBMP4と同等のBMPシグナル伝達経路促進活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0110] 工程（2）又は工程（2－1）において用いられるShhシグナル伝達経路作用物質としては工程（a）で例示したものと同様のものが用いられる。工程（a）及び工程（2）又は工程（2－1）のShhシグナル伝達経路作用物質は同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一である。

培地中のShhシグナル伝達経路作用物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。工程（2）又は工程（2－1）においてShhシグナル伝達経路作用物質としてSAGを用いる場合は、通常、約1nM～約5 μ M、好ましくは約10nM～約4.5 μ M、より好ましくは約50nM～約4 μ M、更に好ましくは約100nM～約3 μ Mの濃度で使用される。

[0111] 工程（2）又は工程（2－1）において用いられる培地は、BMPシグナル伝達経路作用物質とShhシグナル伝達経路作用物質を含む限り特に限定されない。工程（2）又は工程（2－1）において用いられる培地は血清含有培地又は無血清培地であり得る。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明においては、無血清培地が好適に用いられる。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地（例えば、IMDMとF-12の1：1の混合液に5%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール及び1 $\times$ Chemically Defined Lipid Concentrateが添加された培地、又は、GMEMに5%～20%KSR、NEAA、ピルビン酸、2-メルカプトエタノールが添加された培地）を使用することが好ましい。無血清培地へのKSRの添加量としては、例えばヒトES細胞の場合は、通常約1%から約30%であり、好ましくは約2%から約20%である。第二工程において、第一工程で得られた多能性幹細胞の凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質とShhシグナル伝達経路作用物質含む培地（好適には無血清培地）中で浮遊培養に付して細胞塊を形成させることにより、細胞塊の質が向上し

、下垂体組織を含む細胞塊を高効率に作成できる。

[0112] 工程（２）又は工程（２－１）において、BMPシグナル伝達経路作用物質とShhシグナル伝達経路作用物質の添加時期は、同一であっても良いし、異なっても良い。好ましくは、同一もしくはBMPシグナル伝達経路作用物質を添加した後に、Shhシグナル伝達経路作用物質を添加する。Shhシグナル伝達経路作用物質の添加時期は、BMPシグナル伝達経路作用物質の添加より１２日以内、好ましくは１０日以内、より好ましくは６日以内である。工程（２－１）に引き続き工程（２－２）を実施する態様の場合には、Shhシグナル伝達経路作用物質の添加は、後述する工程（２－２）の開始と同時に進めても良い。

[0113] <工程（２－２）>

工程（２－１）で得られた細胞凝集体を、さらにBMPシグナル伝達経路阻害物質を含む培地中で浮遊培養して、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程（２）について説明する。

[0114] 本発明において、BMPシグナル伝達経路阻害物質とはBMPファミリー・タンパク質により惹起されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り限定されない。核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。当該物質として例えばBMPのプロセッシングと細胞外への分泌を阻害する物質、BMPに直接作用する物質（例えばタンパク質、抗体、アプタマー等）、BMPをコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA等）、BMP受容体とBMPの結合を阻害する物質、BMP受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質を挙げることができる。BMP受容体にはⅠ型BMP受容体とⅡ型BMP受容体が存在し、Ⅰ型BMP受容体としてはBMPRI A、BMPRI B、ACVR、Ⅱ型BMP受容体としてはTGFBRII、ActRII、ActRIIB、BMPRII、MISRIIが知られている。

[0115] BMPシグナル伝達経路阻害物質として知られているタンパク質として、

例えばNoggin、Chordin、Follistatin、Gremelin、Inhibin、Twisted Gastrulation、Coco、DANファミリーに属する分泌タンパク質等が挙げられる。上記工程（2-1）において培養液中にBMPシグナル伝達経路作用物質を添加していることから、以降のBMPシグナル伝達経路をより効果的に阻害するという観点から、工程（2-2）におけるBMPシグナル伝達経路阻害物質は、細胞外へのBMPの分泌よりも下流のシグナル伝達経路を阻害する物質、例えばBMP受容体とBMPの結合を阻害する物質、BMP受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質等を含むことが好ましく、より好ましくはI型BMP受容体の阻害剤を含む。

[0116] BMPシグナル伝達経路阻害物質として、当業者に周知の化合物を使用することもできる。BMPシグナル伝達経路阻害物質としては、例えばK02288 (3-[(6-Amino-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl))-3-pyridinyl]phenol, 3-[6-Amino-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl))-3-pyridinyl]-phenol)、Dorsomorphin (6-[4-[2-(1-Piperidinyl)ethoxy]phenyl]-3-(4-pyridinyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)、LDN-193189 (4-[6-[4-(1-Piperazinyl)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline dihydrochloride)、LDN-212854 (5-[6-[4-(1-Piperazinyl)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline)、LDN-214117 (1-(4-(6-methyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyridin-3-yl)phenyl)piperazine)、ML347 (5-[6-(4-Methoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinolin

e))、DMH1 (4-(6-(4-isopropoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline)、DMH2 (4-[6-[4-[2-(4-morpholinyl)ethoxy]phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline)等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0117] 本発明で用いられるBMPシグナル伝達経路阻害物質は、好ましくはI型BMP受容体阻害剤であり、より好ましくはK02288、Dorsomorphin、LDN-193189、LDN-212854、LDN-214117、ML347、DMH1及びDMH2からなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、さらに好ましくはK02288を含む。

[0118] 培地中のBMPシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。下垂体組織の形成効率の観点から、工程(2-2)におけるBMPシグナル伝達経路阻害物質としてK02288を用いる場合は、通常約1nM～約100μM、好ましくは約10nM～約50μM、より好ましくは約100nM～約50μM、さらに好ましくは約500nM～約25μMの濃度で使用される。BMPシグナル伝達経路阻害物質としてLDN-193189を用いる場合は、通常約1nM～約100μM、好ましくは約10nM～約10μM、より好ましくは約25nM～約1μM、さらに好ましくは約100nM～約500nMの濃度で使用される。BMPシグナル伝達経路阻害物質としてLDN-212854を用いる場合は、通常約1nM～約100μM、好ましくは約10nM～約10μM、より好ましくは約25nM～約5μM、さらに好ましくは約250nM～約3μMの濃度で使用される。BMPシグナル伝達経路阻害物質としてML-347を用いる場合は、通常約1nM～約100μM、好ましくは約10nM～約50μM、より好ましくは約100nM～約50μM、さらに好ましくは約1μM～約25μMの濃度で使用される。BMPシグナル伝達経路阻害物質としてDMH2を用いる場合は、通常約1nM～約100μM

、好ましくは約10 nM～約10 μM、より好ましくは約25 nM～約5 μM、さらに好ましくは約50 nM～約3 μMの濃度で使用される。また、K02288以外のBMPシグナル伝達経路阻害物質を使用する場合、上記濃度のK02288と同等のBMPシグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0119] 工程(2-2)において用いられる培地は、BMPシグナル伝達経路阻害物質を含む限り特に限定されない。工程(2-2)において用いられる培地は、工程(1)乃至工程(2-1)と共通の培地であることもまた好ましい。工程(2-2)において用いられる培地は血清含有培地又は無血清培地であり得る。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、本発明においては、無血清培地が好適に用いられる。調製の煩雑さを回避するには、例えば、市販のKSR等の血清代替物を適量添加した無血清培地(例えば、1MDMとF-12の1:1の混合液に5%KSR、450 μM1-モノチオグリセロール及び1×Chemically Defined Lipid Concentrateが添加された培地、又は、GMEMに5%～20%KSR、NEAA、ピルビン酸、2-メルカプトエタノールが添加された培地)を使用することが好ましい。無血清培地へのKSRの添加量としては、例えばヒトES細胞の場合は、通常約1%から約30%であり、好ましくは約2%から約20%である。

[0120] 工程(2-2)において、工程(2-1)に引き続きShhシグナル伝達経路作用物質を培地中に添加することもまた好ましい。Shhシグナル伝達経路作用物質としては工程(a)で例示したものと同様のものが用いられる。工程(a)、(2-1)及び(2-2)のShhシグナル伝達経路作用物質は同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一である。

培地中のShhシグナル伝達経路作用物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。工程(2-2)においてShhシグナル伝達経路作用物質としてSAGを用いる場合は、通常、約1 nM～約5 μM、好ましくは約10 nM～約4.5 μM、より好ましくは約50 n

M～約4 μ M、更に好ましくは約100 nM～約3 μ Mの濃度で使用する。工程（2-1）においてBMPシグナル伝達経路作用物質を添加した後に、Shhシグナル伝達経路作用物質を添加する場合、Shhシグナル伝達経路作用物質の添加と工程（2-2）の開始を同時に行っても良い。

[0121] 工程（2）、（2-1）及び（2-2）では、浮遊培養が、さらにTGF β シグナル伝達経路阻害物質の存在下で行われることが好ましい。

工程（2）、（2-1）及び（2-2）において用いられるTGF β シグナル伝達経路阻害物質としては工程（a）で例示したものと同様のものが用いられる。工程（a）、工程（1）、（2）、（2-1）及び（2-2）のTGF β シグナル伝達経路阻害物質は同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一である。

培地中のTGF β シグナル伝達経路阻害物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。工程（2）、（2-1）及び（2-2）においてTGF β シグナル伝達経路阻害物質としてSB431542を用いる場合は、通常、約1nM～約100 μ M、好ましくは約10nM～約50 μ M、より好ましくは約100nM～約50 μ M、更に好ましくは約500nM～約10 μ Mの濃度で使用する。また、SB431542以外のTGF β シグナル伝達経路阻害物質を使用する場合、前記濃度のSB431542と同等のTGF β シグナル伝達経路阻害活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0122] 本発明において、工程（1）、（2）、（2-1）及び（2-2）のいずれか1つ以上の工程を、FGFシグナル伝達経路作用物質の存在下で行うことが好ましい。FGFシグナル伝達経路作用物質とは、FGF（線維芽細胞増殖因子）により媒介されるシグナル伝達経路を増強し得る物質である限り特に限定はされない。FGFシグナル伝達経路作用物質としては、例えばFGF1、FGF2（bFGFと称することもある）、FGF8等のFGFタンパク質、抗FGF受容体抗体、FGF部分ペプチド等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0123] FGF2タンパク質およびFGF8タンパク質は、例えば富士フィルム和

光純薬株式会社から入手可能である。F G F シグナル伝達経路作用物質は、好ましくはF G F 2 及びF G F 8、並びに、これらの改変体からなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、より好ましくはF G F 2 を含み、さらに好ましくは組み換えヒトF G F 2 を含む。

[0124] 培地中のF G F シグナル伝達経路作用物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。神経組織部の上皮構造形成、プラコードへの分化及び細胞の生存と増殖の促進の観点からは、F G F シグナル伝達経路作用物質としてF G F 2 を用いる場合は、通常約1 p g / m l ~ 約1 0 0 μ g / m l、好ましくは約1 0 p g / m l ~ 約5 0 μ g / m l、より好ましくは約1 0 0 p g / m l ~ 約1 0 μ g / m l、さらに好ましくは約5 0 0 p g / m l ~ 約1 μ g / m l、最も好ましくは約1 n g / m l ~ 約2 0 0 n g / m l の濃度で使用される。また、F G F 2 以外のF G F シグナル伝達経路作用物質を使用する場合、上記濃度のF G F 2 と同等のF G F シグナル伝達経路促進活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0125] 培地中でのF G F タンパク質の活性を保持する目的から、F G F タンパク質を含む培地中にヘパリン、ヘパラン硫酸を添加することも好ましい。ヘパリンはナトリウム塩として例えば富士フィルム和光純薬株式会社から入手可能である。培地中のヘパリン又はヘパラン硫酸の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。培地中のヘパリンナトリウムの濃度は、通常約1 n g / m l ~ 約1 0 0 m g / m l、好ましくは約1 0 n g / m l ~ 約5 0 m g / m l、より好ましくは約1 0 0 n g / m l ~ 約1 0 m g / m l、さらに好ましくは約5 0 0 n g / m l ~ 約1 m g / m l、最も好ましくは約1 μ g / m l ~ 約2 0 0 μ g / m l である。ヘパラン硫酸を用いる場合、上記濃度のヘパリンと同様のF G F タンパク質保護の活性をもつ濃度であることが好ましい。3 7 ° C 等での細胞培養環境下でF G F タンパク質の活性を保持する目的から、例えば米国特許U S 8 7 7 2 4 6 0 B 2 号に記載のT h e r m o s t a b l e F G F 2 等のF G F の改変体や生分解性ポリマーにF G F 2 を結合させたS t e m B e a d s F G F 2 等のF G F

2 徐放性ビーズを用いることもまた好ましい。Thermostable FGF2は、例えばHuman Zyme社から入手可能である。StemBeads FGF2は例えばStem Culture社から入手可能である。

[0126] 本発明において、凝集体内部の神経系細胞または組織の生存、増殖を促進する観点から、工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）のいずれか１つ以上の工程を、Wntシグナル伝達経路作用物質の存在下で行うこともできる。前述の通り、Wntシグナル伝達経路として古典的Wnt経路（Canonical Wnt pathway）、非古典的Wnt経路（Non-Canonical Wnt pathway）等が挙げられる。非古典的Wnt経路としては、Planar Cell Polarity（PCP）経路、Wnt／Calcium経路、Wnt－RAP1経路、Wnt－Ror2経路、Wnt－PKA経路、Wnt－GSK3MT経路、Wnt－aPKC経路、Wnt－RYK経路、Wnt－mTOR経路等が挙げられる。

[0127] 本発明において、Wntシグナル伝達経路作用物質とはWntファミリー・タンパク質により惹起されるシグナル伝達を活性化し得るものである限り限定されない。核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。当該物質として例えば、Wntの自己分泌を促進する物質、Wntを安定化させ分解を抑制する物質、Wntの組み換えタンパク質、Wntの部分配列ペプチドおよびその派生物や誘導体、Wnt受容体に作用し活性化させる物質、Wntの細胞内シグナル伝達機構を活性化させる物質、Wntの細胞内シグナル伝達因子およびその改変体（ β Catenin S33Y等）、Wnt応答配列下流の遺伝子発現を活性化させる物質等を挙げることができる。Wntシグナル伝達経路作用物質として知られているタンパク質として、Wnt、R-Spondin等が挙げられる。

[0128] Wntシグナル伝達経路作用物質として、当業者に周知の化合物を使用することもできる。Wntシグナル伝達経路作用物質としての活性を有する化合物として例えば塩化リチウム、AMBMP hydrochloride、SGC AAK1 1、Foxy 5、CHIR99021、CHIR98014、TWS119、SB216763、SB415286、BIO、AZD2858、AZD1080、AR

-A014418、TDZD-8、LY2090314、IM-12、Indirubin、Bikinin、A 1070722、3F8、Kenpaullone、10Z-Hymenialdisine、Indirubin-3'-oxime、NSC 693868、TC-G 24、TCS 2002、TCS 21311、CP21R7、BML-284、SKL2001、WAY 262611、IIIC3a、Methyl Vanillate、IQ-1及びこれら化合物の誘導体等が挙げられる。

[0129] 本発明において、工程（１）にてWntシグナル伝達経路阻害物質を添加しているが、作用点の異なるWntシグナル伝達経路作用物質とWntシグナル伝達経路阻害物質を併用することで、前述の複数あるWntシグナル伝達経路のうち特定の経路のみを活性化、あるいは阻害することができる。本発明において、Wntシグナル伝達経路作用物質が工程（１）にて添加するWntシグナル伝達経路阻害物質の下流の因子に作用する物質であることが好ましい。本発明において、添加するWntシグナル伝達経路作用物質が古典的Wnt経路（Canonical Wnt pathway）を活性化させる物質であることもまた好ましく、細胞内のWntシグナル伝達因子であるβカテニンの分解の阻害、安定化作用によりWntシグナル伝達経路を活性化させる物質であることがさらに好ましい。βカテニンの分解の阻害、安定化作用を有する物質としては、例えばGSK3阻害剤およびBML-284、SKL2001等が挙げられる。添加するWntシグナル伝達経路作用物質がβカテニン応答性転写（β-catenin responsive transcription：CRT）を促進・活性化させる物質であることもまた好ましい。

[0130] 本発明における好ましいWntシグナル伝達経路作用物質とWntシグナル伝達経路阻害物質の組み合わせとして、GSK3阻害剤とPORCN阻害剤が挙げられる。GSK3阻害剤とPORCN阻害剤を併用した場合、古典的Wnt経路は活性化され、非古典的Wnt経路は阻害される。GSK3阻害剤とPORCN阻害剤を併用した場合、本発明において好ましいGSK3阻害剤はCHIR99021、CHIR98014、SB216763、SB415286、BIOからなる群より選ばれる少なくとも１つを含み、さらに好ましくはCHIR99021を含む。GSK3阻害剤とPORCN阻害剤を併用した場合、本発明において好ましいPORCN阻害剤はIWP-2、IWP-3、IWP-4、IWP-L6、IWP-12、LGK-974、ETC-159、GNF-6231、Wnt-C59からなる群より選ばれる少なくとも１つを含み、さらに好ましくはIWP-2を含む。また、GSK3阻害剤とKY02111乃至その

誘導体等を組み合わせて用いても良い。GSK3阻害剤とは作用機序の異なる β カテニンの分解の阻害、安定化作用を有する物質としては例えばBML-284、SKL2001が挙げられ、これら化合物およびその誘導体もPORCN阻害剤、KY02111乃至その誘導体等と組み合わせて用いても良い。

[0131] 培地中のWntシグナル伝達経路作用物質の濃度は、上述の効果を達成可能な範囲で適宜設定することが可能である。凝集体内部の神経系細胞または組織の生存、増殖の促進の観点からは、Wntシグナル伝達経路作用物質としてCHIR99021を用いる場合は、通常約10pM～約10mM、好ましくは約100pM～約1mM、より好ましくは約1nM～約100 μ M、さらに好ましくは約10nM～約30 μ M、最も好ましくは約100nM～約3 μ Mの濃度で使用される。また、CHIR99021以外のWntシグナル伝達経路作用物質を使用する場合、上記濃度のCHIR99021と同等のWntシグナル伝達経路促進活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0132] 本発明において、工程(1)、(2)、(2-1)及び(2-2)のいずれか1つ以上の工程において、細胞死を抑制し、細胞の増殖を促進する観点から、培地中にさらなる増殖因子を添加することもまた好ましい。添加される増殖因子の種類は、上記目的を達成可能な限り特に限定されない。かかる目的で用いられる増殖因子としては、上皮成長因子(Epidermal Growth Factor:EGF)、インスリン様成長因子(Insulin-like growth factor:IGF)、神経成長因子(Nerve growth factor:NGF)、脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor:BDNF)、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4/5、毛様体神経栄養因子(Ciliary neurotrophic factor:CNTF)、血管内皮細胞増殖因子(Vesicular endothelial growth factor:VEGF)、色素上皮由来因子(Pigment epithelium-derived facto

r : P E D F) 、肝細胞増殖因子 (H e p a t o c y t e g r o w t h f a c t o r : H G F) 等が挙げられる。これらの増殖因子は、上記目的を達成可能な濃度で添加すればよい。

[0133] 本発明の工程 (1) 、 (2) 、 (2 - 1) 及び (2 - 2) のいずれか 1 つ以上の工程において、細胞死を抑制し、細胞の増殖を促進する観点から、血小板由来成長因子 (P l a t e l e t - d e r i v e d g r o w t h f a c t o r : P D G F) 等の血小板由来成長因子受容体作用物質を培地中に添加することもまた好ましい。P D G F には A 、 B 、 C 、 D の四種類の遺伝子が存在し、A A 、 A B 、 B B 、 C C 、 D D のホモまたは特定の組み合わせのヘテロの二量体を形成してリガンドとして機能する。P D G F 受容体には α および β の二種類の遺伝子が存在し、 $\alpha \alpha$ 、 $\alpha \beta$ 、 $\beta \beta$ の組み合わせのホモ又はヘテロの二量体を形成して受容体として機能する。このうち、プラコードを含む非神経外胚葉では P D G F R β がよく発現しており、本発明で用いる血小板由来成長因子受容体作用物質は好ましくは P D G F R $\beta \beta$ 又は P D G F R $\alpha \beta$ に対する作用を有しており、より好ましくは P D G F - A B 、 P D G F - B B 、 P D G F - C C 、 P D G F - D D のいずれかを含み、さらに好ましくは P D G F - B B 、 P D G F - C C のいずれかを含む。P D G F - A B 、 P D G F - B B 、 P D G F - C C 、 P D G F - D D は組み換えタンパク質として R & D s y s t e m s 社もしくは G e n S c r i p t 社等から入手可能である。

[0134] 本発明の工程 (1) 、 (2) 、 (2 - 1) 及び (2 - 2) のいずれか 1 つ以上の工程において、下垂体組織の製造効率を向上させる観点から、プラコード領域への分化を促進する化合物を添加することもまた好ましい。上記のような作用を有する化合物として、例えば米国特許 U S 2 0 1 6 0 3 2 6 4 9 1 A 1 号に記載の B R L - 5 4 4 4 3 、 P h e n a n t h r o l i n e 、 P a r t h e n o l i d e 等が挙げられる。プラコード領域への分化を促進する化合物として B R L - 5 4 4 4 3 を用いる場合は通常 1 0 n M ~ 1 0 0 μ M 、 P h e n a n t h r o l i n e を用いる場合は通常 1 0 n M ~ 1 0 0

μM 、Parthenolideを用いる場合は通常 10 nM ～ $100\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で用いられる。

[0135] 本発明の工程（２）及び（２－２）のいずれかの工程において、製造された細胞塊を長期培養することにより、分化の進んだ細胞を含む、より成熟した細胞塊を得ることもできる。このような培養を成熟培養とも称する。工程（２）及び（２－２）の成熟培養過程において、化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、無血清培地が好適に用いられる。工程（２）及び（２－２）の成熟培養において、用いる培地は工程（２）及び（２－２）で用いたものと同様の物を用いることもできる。また、神経細胞等の培養に用いる既知の培地、例えばDMEM／F－１２培地とNeurobasal培地の１：１混合液に０．５％ N2 Supplementと１％ B27 supplementが添加された培地（N2 B27培地）、Knock out DMEM／F－１２培地にStemPro NSC SFM Supplementが添加された培地（StemPro NSC SFM培地）等を用いることもできる。成熟培養を実施する際には、浮遊培養の開始時に用いた培養容器で培養を継続することもできる。また、新しい培養容器、例えば浮遊培養用ディッシュ、浮遊培養用フラスコ等に細胞塊を移し培養を実施することもできる。

[0136] 本発明の工程（２）、工程（２－１）及び（２－２）のいずれかの工程において、細胞死を抑制し、細胞の増殖を促進する観点から、高酸素の雰囲気下で培養することもまた好ましい。培養過程における高酸素条件は、例えば細胞を培養するインキュベーターに酸素ポンペを接続し、人工的に酸素を供給することにより実現できる。かかる目的での酸素濃度は、通常２５％から８０％であり、より好ましくは３０％から６０％である。

[0137] 本発明の工程（２）、工程（２－１）及び（２－２）のいずれかの工程において、細胞塊を培養する培地中への酸素供給量を増やす観点から、ガス交換効率の高い培養器材を用いることもできる。このような培養器材の例として、細胞培養ディッシュ、プレートの底面をガス透過性のフィルムとしたし

umoxディッシュ（ザルスタット株式会社製）、VECELL 96well plate（株式会社ベセル製）等が挙げられる。

- [0138] 本発明の工程（２）、工程（２－１）及び（２－２）のいずれかの工程において、培地に副腎皮質ホルモン類を添加することにより、細胞塊を副腎皮質ホルモン類により処理することもまた好ましい。副腎皮質ホルモン類は工程（１）において添加されてもよい。副腎皮質ホルモン類処理により、下垂体プラコード及び／又はラトケ囊からACTH産生細胞以外の下垂体ホルモン産生細胞（即ち、GH産生細胞、PRL産生細胞、TSH産生細胞、LH産生細胞、FSH産生細胞等）への分化が促進される。副腎皮質ホルモン類としては、ハイドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、酢酸フルドコルチゾン等の天然糖質コルチコイド；デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、トリアムシノン等の人工的に合成された糖質コルチコイド等を挙げることができるが、これらに限定されない。
- [0139] 培地中における、副腎皮質ホルモン類の濃度は、下垂体プラコード及び／又はラトケ囊から、下垂体ホルモン産生細胞（但し、ACTH産生細胞を除く）への分化を促進し得る限り特に限定されず、また、副腎皮質ホルモン類の種類により適宜設定することができる。例えば、ハイドロコルチゾンの場合、通常100 ng/ml以上、好ましくは、1 μ g/ml以上である。下垂体ホルモン産生細胞（但し、ACTH産生細胞を除く）への分化に悪影響がない限りハイドロコルチゾン濃度の上限値は特にないが、培養コストの観点から、通常1000 μ g/ml以下、好ましくは100 μ g/ml以下である。一態様において、培地中のハイドロコルチゾン濃度は、通常100 ng/ml～1000 μ g/ml、好ましくは1～100 μ g/mlである。副腎皮質ホルモン類として、デキサメタゾンを使用する場合、その培地中の濃度は、ハイドロコルチゾンの1/25程度とすることが出来る。
- [0140] 本発明の工程（２）、（２－１）及び（２－２）において、培地に副腎皮質ホルモン類を添加する時期は、下垂体プラコード及び／又はラトケ囊から、下垂体ホルモン産生細胞（但し、ACTH産生細胞を除く）への分化を促進し得る限り特に限定されず、本発明の工程（２）、（２－１）及び（２－２）

の培養工程開始時から培地に副腎皮質ホルモン類を添加してもよいし、培養工程開始後、副腎皮質ホルモン類を添加しない培地中で一定期間培養後、培地に副腎皮質ホルモン類を添加してもよい。好適には、本発明の工程（２）、（２－１）及び（２－２）を開始後、細胞凝集塊中に、ACTH産生細胞の出現が確認された段階で、培地に副腎皮質ホルモン類を添加する。即ち、細胞凝集塊中に、ACTH産生細胞の出現が確認されるまでは、細胞凝集塊を副腎皮質ホルモン類を添加しない培地中で培養し、ACTH産生細胞の出現が確認された後に、副腎皮質ホルモン類を含む培地中で第3の培養工程を継続する。ACTH産生細胞の出現は、ACTHに対する抗体を用いて免疫組織学的染色により確認することが出来る。ヒト多能性幹細胞を用いた場合、一般的に、本発明の工程（２）、（２－１）及び（２－２）の培養工程開始から37日以降であれば、ACTH産生細胞の出現が期待できるので、一態様において、本発明の工程（２）、（２－１）及び（２－２）の培養工程開始から37日以降に、培地に副腎皮質ホルモン類を添加する。

[0141] 細胞凝集塊を副腎皮質ホルモン類で処理する期間は、下垂体プラコード及び／又はラトケ囊から、下垂体ホルモン産生細胞（但し、ACTH産生細胞を除く）への分化を促進し得る限り特に限定されないが、通常、副腎皮質ホルモン類非処理群と比較して、副腎皮質ホルモン類処理群において、下垂体ホルモン産生細胞（但し、ACTH産生細胞を除く）への分化の促進が確認されるまで、細胞凝集塊を副腎皮質ホルモン類で処理する。処理期間は、通常、7日以上、好ましくは12日以上である。処理期間の上限値は、特に限定されないが、副腎皮質ホルモン類非処理群と比較して、副腎皮質ホルモン類処理群において、下垂体ホルモン産生細胞（但し、ACTH産生細胞を除く）への分化の促進が確認された段階で、培地から副腎皮質ホルモン類を除去してもよい。

[0142] 尚、培地への副腎皮質ホルモン類の添加は、ACTH産生細胞の分化誘導に対しては、フィードバック阻害により、抑制的に作用する。

[0143] 本発明において、Notchシグナル伝達経路とは、細胞膜上に発現する受容体

であるNotchタンパク質と隣接細胞の膜上に発現するNotchリガンド（DeltaやJaggedなど）との直接相互作用により活性化されるシグナル伝達経路を表す。Notchシグナルが伝達された細胞においては、Notchタンパク質が段階的にプロセッシングを受け膜上で切り出された細胞内ドメインが核内へと運ばれて下流遺伝子の発現を制御する。

[0144] 本発明の工程（２）、（２－１）及び（２－２）において用いる培地は、好ましくはNotchシグナル伝達経路阻害剤（Notchシグナル阻害剤）を含む。Notchシグナル阻害剤は、下垂体プラコード及び／又はラトケ囊から下垂体ホルモン産生細胞（特に、ACTH産生細胞）への分化を促進する。Notchシグナル阻害剤により、ACTH産生の上流制御をする転写因子Tbx19の発現が上昇する。

Notchシグナル阻害剤は、工程（１）において用いる培地に含まれていても良い。

[0145] Notchシグナル阻害剤は、Notchにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されない。核酸、タンパク質、低分子有機化合物のいずれであってもよい。当該物質として例えば、機能欠失型のNotch受容体及びリガンド、Notchのプロセッシング（S1切断）を阻害する物質、Notch及びNotchリガンドの糖鎖修飾を阻害する物質、細胞膜移行を阻害する物質、Notchの細胞内ドメイン（NICD）のプロセッシング（S2切断、S3切断）を阻害する物質（ γ セクレターゼ阻害剤）、NICDを分解する物質、NICD依存的な転写を阻害する物質等を挙げることができる。

[0146] Notchシグナル阻害剤として、当業者に周知の化合物を使用することもできる。Notchシグナル阻害剤としての活性を有する化合物として例えばDAPT（N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester）、DBZ、MDL28170等、あるいはOnco Targets Ther. 2013; 6: 943-955.に記載の物質等が挙げられる。なかでも、DAPTが好ましい。

[0147] 培地中におけるNotchシグナル阻害剤の濃度は、下垂体プラコード及び／又はラトケ囊から下垂体ホルモン産生細胞（特に、ACTH産生細胞）への分化を促進し得るような濃度である限り特に限定されないが、例えばDAPTの場合、

通常 $0.1\ \mu\text{M}$ 以上、好ましくは、 $1\ \mu\text{M}$ 以上である。下垂体ホルモン産生細胞への分化に悪影響がない限りDAPT濃度の上限値は特にないが、培養コストの観点から、通常 $1000\ \mu\text{M}$ 以下、好ましくは、 $100\ \mu\text{M}$ 以下である。一態様において、培地中のDAPT濃度は、通常 $0.1\sim 1000\ \mu\text{M}$ 、好ましくは $1\sim 100\ \mu\text{M}$ （例、 $10\ \mu\text{M}$ ）である。

[0148] 3. 下垂体組織を含む細胞塊

本発明は、1) 神経系細胞又は神経組織、2) 下垂体組織、及び3) 間葉系細胞を含む細胞塊を提供する。またあるいは、1) 神経系細胞又は神経組織、2) 下垂体組織、及び4) 神経堤細胞又は神経堤由来細胞を含む細胞塊を提供する。以下、本発明の細胞塊とも称する。本発明の細胞塊は、好ましくは上記した本発明の製造方法により製造することができる。

[0149] 本発明の細胞塊における1) 神経系細胞又は神経組織は、好ましくは中枢神経系の細胞若しくは組織、又はその前駆組織であり、中枢神経系の細胞又は組織としては、網膜、大脳皮質、間脳（例、視床下部）及びそれらの組織に由来する細胞が挙げられ、より好ましくは間脳またはその前駆組織であり、さらに好ましくは組織中に脳室様の構造を有している間脳またはその前駆組織である。1) 神経系細胞又は神経組織は、例えばN-Cadherin陽性の神経上皮組織である。

[0150] 本発明の細胞塊における2) 下垂体組織は、好ましくは非神経上皮組織と連続して形成されており、非神経上皮組織及び下垂体組織が1) 神経系細胞又は神経組織及び3) 間葉系細胞の少なくとも一方を被覆していること、あるいは非神経上皮組織及び下垂体組織が1) 神経系細胞又は神経組織及び4) 神経堤細胞又は神経堤由来細胞の少なくとも一方を被覆していること、がさらに好ましい。

前記非神経上皮組織が口腔上皮またはその前駆組織であることもまた好ましい。下垂体組織は下垂体ホルモン産生細胞を含むことが好ましく、下垂体組織幹細胞を含むことが好ましく、濾胞星状細胞を含むことが好ましく、下垂体ホルモン産生細胞、下垂体組織幹細胞、濾胞星状細胞すべてを含むこと

がさらに好ましい。下垂体ホルモン産生細胞としては、例えば成長ホルモン（GH）産生細胞、プロラクチン（PRL）産生細胞及び副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生細胞からなる群から選ばれる少なくとも1種が挙げられる。

下垂体組織中に下垂体ニッチが形成されていることもまた好ましく、下垂体ニッチが下垂体前葉と中葉の間に残る遺残腔周辺のMCLニッチ様の構造であることもまた好ましく、下垂体ニッチが実質層ニッチ様の構造であることもまた好ましく、MCLニッチ様の構造と実質層ニッチ様の構造をともに含むことがさらに好ましい。

[0151] 本発明の細胞塊における3) 間葉系細胞は、好ましくは頭部間葉系細胞である。

3) 間葉系細胞は、細胞塊の表面を被覆している非神経上皮組織と、細胞塊の内側に存在する1) 神経系細胞又は神経組織との間に存在することが好ましい。

[0152] 本発明の細胞塊における4) 神経提細胞又は神経提由来細胞は好ましくは頭部神経提細胞又は頭部神経提由来細胞である。

4) 神経提細胞又は神経提由来細胞は、細胞塊の表面を被覆している非神経上皮組織と、細胞塊の内側に存在する1) 神経系細胞又は神経組織との間に存在することが好ましい。4) 神経提細胞又は神経提由来細胞は、3) 間葉系細胞であることもまた好ましい。

[0153] 本発明の細胞塊は、例えば1) 神経上皮組織の内部に脳室様の空胞が形成され、該空胞に接している1) 神経上皮組織の面がPKC-zeta陽性の頂端面である。

[0154] 本発明の細胞塊に含まれる3) 間葉系細胞は、例えば、Nestin、Vimentin、Cadherin-11、Laminin、CD44、CD90及びCD105からなる群から選ばれる少なくとも1種の間葉系細胞マーカーを発現する。

本発明の細胞塊に含まれる3) 神経提細胞又は神経提由来細胞は、例えば、N e s t i n、S o x 1 0、S l u g、S n a i l、P a x 3、Z i c 1、F o x D 3、p 7 5 N T R、H N K - 1、C H D 7、N u m b、A s c

1 からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の神経提細胞マーカーを発現する。

本発明に含まれる非神経上皮組織は、例えば、サイトケラチン、E-Cadherin 及び EpCAM からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の非神経上皮組織マーカーを発現する。

本発明の細胞塊に含まれる下垂体組織幹細胞は、例えば Sox2、Sox9、E-Cadherin、Nestin、S100 β 、GFR α 2、Prop1、CD133、 β -Catenin、Klf4、Oct4、Pax6、コクサッキーウイルス・アデノウイルス共通受容体 (CXADR)、PRRX1/2、Ephrin-B2 及び ACE からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の下垂体幹細胞マーカーを発現する。

[0155] 4. 下垂体組織の製造方法

本発明は、下垂体組織の製造方法を提供し、該方法は下記工程 (1) ~ (3) を含む。

(1) 多能性幹細胞を、Wnt シグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

(2) 第一工程で得られた凝集体を、BMP シグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程、

(3) 第二工程で得られた細胞塊から下垂体組織を回収する第三工程。

第一工程及び第二工程は、上記、「2. 下垂体組織を含む細胞塊の製造方法」の第一工程及び第二工程と同様にして実施することができる。また、所望により第一工程の前に a 工程を実施してもよい。あるいは、所望により第二工程の代わりに第二工程 (1) 及び第二工程 (2) を実施してもよい。

第二工程又は第二工程 (2) で得られた細胞塊から下垂体組織を回収する第三工程は、通常、顕微鏡観察下でピンセット等を用い、細胞塊の外側 (ラトケ囊部分) に形成される下垂体組織を剥離・回収することによっておこなわれる。下垂体組織は、例えば Nature communications, 2016, 7. に記載されているように、得られた細胞塊の表層にある半透明な薄い上皮として判別す

ることができる。第三工程における下垂体組織の回収方法として、凍結融解、好ましくは緩慢凍結法を用いることもできる。当該方法は、外側に下垂体組織及び内側に間葉系神経や神経上皮組織を有する細胞塊を凍結融解することで物理的処理を施すことなく外側の下垂体組織が細胞塊から剥離されるというものである。

[0156] 5. 毒性・薬効性評価用試薬及び毒性・薬効評価方法

本発明の細胞塊、本発明の製造方法により製造される細胞塊、又は該細胞塊から回収される組織は、下垂体組織であり得る。従って、本発明の細胞塊、本発明の製造方法により製造される細胞塊又は該細胞塊から回収される下垂体組織を含有してなる、被験物質の毒性・薬効性評価用試薬が提供され得る。

また、本発明は、上述の細胞塊又は該細胞塊から回収される下垂体組織を用いて、毒性・薬効評価方法を提供することができる。

例えば、細胞塊又は該細胞塊から回収される下垂体組織と、被験物質とを接触させる工程と、

該被験物質が該細胞塊又は下垂体組織に及ぼす影響を検定する工程とを含む、被験物質の毒性・薬効評価方法が挙げられる。

[0157] 6. 治療薬及び疾患の治療方法

本発明の細胞塊、本発明の製造方法により製造される細胞塊又は該細胞塊から回収される下垂体組織を含有してなる、下垂体の障害に基づく疾患の治療薬が提供され得る。

下垂体の障害に基づく疾患の治療薬としては、例えば本発明の細胞塊もしくは本発明の製造方法により製造される細胞塊を含む懸濁液を含む移植片が挙げられる。

懸濁液としては、例えば細胞塊を人工涙液または生理食塩水に懸濁した液が挙げられる。懸濁液は、細胞塊から単離された非神経上皮細胞を含んでいてもよく、細胞の接着を促進する因子、例えば細胞外基質やヒアルロン酸等を含んでいてもよい。

細胞塊に替えて細胞塊から回収した下垂体組織を用いてもよい。

- [0158] さらに、本発明の細胞塊、本発明の製造方法により製造される細胞塊から、下垂体組織の有効量を、移植を必要とする対象に移植する工程を含む、下垂体の障害に基づく疾患の治療方法が提供され得る。

前記下垂体の障害に基づく疾患は、下垂体の障害に基づく動物の疾患であってよく、下垂体の障害に基づく非ヒト動物の疾患であってよい。下垂体の障害に基づく疾患としては、具体的には、汎下垂体機能低下症、下垂体性小人症、副腎皮質機能低下症、部分的下垂体機能低下症、下垂体前葉ホルモン単独欠損症などが挙げられる。

- [0159] 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。また、使用する試薬及び材料は特に限定されない限り商業的に入手可能である。

実施例

- [0160] 実施例 1 : ヒトES細胞から作製された下垂体組織を含む細胞塊

ヒトES細胞 (KhES-1株、京都大学より入手) を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014) に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、まずサブコンフレントになったヒトES細胞 (KhES-1株) を、PBSにて洗浄後、Accumax (Innovative Cell Technologies社製) を用いて酵素処理を行った後、StemFit培地を添加しセルスクレーパーを用いて培養ディッシュ表面より細胞を剥がし、ピペッティングにより単一細胞へ分散した。その後、前記単一細胞へ分散されたヒトES細胞を、Laminin511-E8にてコートしたプラスチック培養ディッシュに播種し、Y27632 (ROCK阻害物質、和光純薬社製、10 μ M) 存在下、StemFit培地にてフィーダーフリー培養した。前記プラスチック培養ディッシュとして、6 ウェルプレート (Corning社製、細胞培養用、培養面積9.5 cm²) を用いた場合、前記単一細胞へ分散されたヒトES細胞の播種細胞数は 1.2×10^4 とした。播種した1日

後に、Y27632を含まないStemFit培地に全量培地交換した。以降、1日～2日に一回Y27632を含まないStemFit培地にて全量培地交換した。その後、播種した7日後にサブコンフレント（培養面積の6割が細胞に覆われる程度）になるまで培養した。培養した細胞を分化誘導に用いる際には、播種した6日後にStemfit培地の培地交換と同時にSB-431542(TGF β シグナル伝達経路阻害物質、和光純薬社製、5 μ M)とSAG(Shhシグナル伝達経路作用物質、Enzo Life Sciences社製、300nM)を添加した。

[0161] このようにして調製したサブコンフレントのヒトES細胞を、PBSにて洗浄後、Accumaxを用いて酵素処理を行った後、分化誘導用の無血清培地を添加しセルスクレーパーを用いて培養ディッシュ表面より細胞を剥がし、ピペティングにより単一細胞へ分散した。その後、前記単一細胞に分散されたヒトES細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート(PrimeSurface 96V底プレート、住友ベークライト社製)の1ウェルあたり 1×10^4 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ の条件下で浮遊培養した。その際の無血清培地(gfCDM+KSR)には、F-12+Glutamax培地(Thermo Fisher Scientific社製)とIMDM+Glutamax培地(Thermo Fisher Scientific社製)の1:1混合液に5% Knockout Serum Replacement(Thermo Fisher Scientific社製)、450 μ M 1- α -モノチオグリセロール(和光純薬社製)、1 $\times$ Chemically defined lipid concentrate(Thermo Fisher Scientific社製)、50 unit/mlペニシリン-50 μ g/mlストレプトマイシン(ナカライテスク社製)を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時(浮遊培養開始後0日目、工程1開始)に、前記無血清培地にY27632(終濃度20 μ M)、IWP-2(Wntシグナル伝達経路阻害物質、Tocris Bioscience社製、2 μ M)、SB-431542(TGF β シグナル伝達経路阻害物質、和光純薬社製、1 μ M)を添加した。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、IWP-2、SB-431542、BMP4(BMPシグナル伝達経路作用物質)、SAGを含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3nM添加し、ウェル中の終濃度を1.5nMとし、SAGは添加する培地に4 μ M添加し、ウェル中の終濃度を2 μ Mとなるようにした。

その後、浮遊培養開始後6、10、13、17、21及び24日目にY27632とBMP4を含まず、IWP-2、SB-431542とSAGを含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。

浮遊培養開始後28日目に細胞塊をディッシュに回収し、倒立顕微鏡（キーンズ社製、BIOREV0）を用いて、明視野観察を行った（図1A-B）。図1A右下のスケールバーは1000 μ m、図1B右下のスケールバーは200 μ mを示す。その結果、上記分化誘導法によりヒトES細胞から浮遊培養28日目までに神経組織及び非神経上皮組織を含む直径約1mm前後の細胞塊が形成された。細胞塊の表面には厚さ30 μ m前後の上皮様の構造が形成されていた。

[0162] 前記、浮遊培養開始後28日目の細胞塊を、それぞれ4%パラホルムアルデヒドで室温15分固定した後、20%スクロース/PBSに4℃で一晩浸漬し凍結保護処理後、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、下垂体の初期マーカーである抗Lhx3抗体（メルクミリポア社製、ウサギ）、プラコードマーカーである抗Emx2抗体（R&D Systems社製、ヒツジ）、口腔上皮・下垂体プラコードマーカーであるPitx1抗体（Santa Cruz Biotechnology社製、ヤギ）、腹側間脳マーカーである抗Nkx2.1抗体（メルクミリポア社製、マウス）、抗Tbx3抗体（R&D Systems社製、ヤギ）、抗Sox3抗体（R&D Systems社製、ヤギ）、非神経上皮組織マーカーである抗CD326/EpCAM抗体（Acris Antibodies社製、マウス）、抗汎サイトケラチン抗体（Sigma Aldrich社製、マウス）、未分化神経及び神経堤・間葉系細胞マーカーである抗Nestin抗体（Spring Bioscience社製、ウサギ）、基底膜マーカーである抗Laminin抗体（協和ファーマケミカル社製、マウス）、頂端面マーカーである抗aPKC抗体（Santa Cruz Biotechnology社製、ウサギ）、神経細胞マーカーである抗 β IIIチューブリン（Tuj1）抗体（Sigma Aldrich社製、マウス）を用いて蛍光免疫染色を行った。蛍光標識二次抗体としてAlexa488標識ロバ抗ウサギ抗体（Thermo Fisher Scientific社製）、CF555標識ロバ抗マウス抗体（Biotium社製）、CF555標識ロバ抗ヤギ抗体、CF543標識ロバ抗ヒツジ抗体、Alexa647標識ロバ抗マウス抗体を用いて多重染色を行い、核の対比染色にはHoechst33342（Sigma Aldrich社

製)を用いた。図1 Eは図1 CとD、図1 Hは図1 FとG、図1 Kは図1 IとJ、図1 Nは図1 LとM、図1 Qは図1 OとP、図1 Uは図1 SとT、図1 Xは図1 VとWに対する核の対比染色像である。染色した切片の観察および画像の取得には正立蛍光顕微鏡Axio Imager M2 (ツァイス社製) および附属ソフトウェアのAxio Visionを用いた。図1 C～E、図1 F右下のスケールバーは200 μm 、図1 I、図1 L、図1 O、図1 S右下のスケールバーは100 μm 、図1 V右下のスケールバーは50 μm を示す。

[0163] その結果、上記分化誘導法で誘導された浮遊培養開始後28日目の細胞塊の内側はNkx2.1、Tbx3、Sox3、 β IIIチューブリン陽性の腹側間脳・視床下部の神経上皮組織が存在し(図1 D、G、L、O、P)、外側はEpCAM、汎サイトケラチン陽性の非神経上皮組織であることが分かった(図1 M、W)。内側の神経上皮組織のさらに内側はaPKC陽性の頂端面であり、細胞の存在しない空胞である脳室様の組織が形成されていることが分かった(図1 I、*部)。外側の非神経上皮組織の内側にラミニン等から形成される基底膜様の構造が形成されていた(図1 J)。さらに、非神経上皮組織の一部はLhx3、Emx2、Pitx1陽性であり、非神経上皮組織が陥入しているラトケ嚢様の構造と下垂体プラコードが形成されていることが分かった(図1 C、F、S、V)。加えて、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に、Nestin陽性、汎サイトケラチン、ラミニン弱陽性、 β IIIチューブリン陰性の頭部間葉系細胞が存在していた。上記の結果より、本発明の製造法により、非神経上皮と、神経上皮と、間葉系細胞とを含み、外側が非神経上皮に覆われ、内側に脳室様の構造を有する腹側間脳・視床下部様の神経上皮組織が形成され、非神経上皮と神経上皮の間に頭部間葉系細胞が存在し、外側の非神経上皮の一部が下垂体プラコードである細胞塊が製造可能であることが示された。浮遊培養開始後28日目の細胞塊の模式図を図1 Yに示す。

[0164] 実施例2：ヒトES細胞から作製された下垂体組織を含む細胞塊の長期培養による成熟

ヒトES細胞(KhES-1株、京都大学より入手)を、Scientific Reports, 4,

3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例1と同様に行った。

[0165] その後、実施例1と同様の条件で、96ウェルプレートでの浮遊培養を実施した。

浮遊培養開始後28日目に細胞塊を10cm浮遊培養用ディッシュ（住友ベークライト社製）へとディッシュ1枚あたり48個の細胞塊を移し、無血清培地を用いて培養84日目まで浮遊培養を実施した。その際の無血清培地（gfCDM+KSR）には、F-12+Glutamax培地（Thermo Fisher Scientific社製）とIMDM+Glutamax培地（Thermo Fisher Scientific社製）の1：1混合液に10% Knockout Serum Replacement（Thermo Fisher Scientific社製）、450 μ M 1-モノチオグリセロール（和光純薬社製）、1 $\times$ Chemically defined lipid concentration（Thermo Fisher Scientific社製）、50 unit/mlペニシリン-50 μ g/mlストレプトマイシン（ナカライテスク社製）、2 μ M SAGを添加した無血清培地をディッシュ1枚あたり15 ml用い、3日乃至4日に一回半量の培地を交換した。

[0166] 前記、浮遊培養開始後70日目の細胞塊を、倒立顕微鏡（キーエンス社製、BIOREV0）を用いて明視野観察を行った（図2A、B）。図2A右下のスケールバーは1000 μ m、図2B右下のスケールバーは200 μ mを示す。その結果、浮遊培養開始後70日目には、厚さ100 μ m前後の上皮組織に覆われた細胞塊が形成されていることが分かった。上記細胞塊の一部を4%パラホルムアルデヒドで固定し、残りの細胞塊をさらに浮遊培養した。その際の培地には、上記無血清培地にさらに10 μ M Dexamethasone（Sigma Aldrich社製、マウス）を添加したものをを用い、浮遊培養開始後84日目まで培養したのちに4%パラホルムアルデヒドで固定した。上記培養70日目と84日目の細胞塊から実施例1と同様の方法で凍結切片を作成し、下垂体のホルモン産生細胞マーカーである抗副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）抗体（Lab Vision社製、マウス）、抗プロラ

クチン（PRL）抗体（Cell Marque社製、ウサギ）、抗成長ホルモン抗体（R&D Systems社製、ヤギ）および非神経上皮組織マーカーである抗汎サイトケラチン抗体を用いて実施例 1 と同様の方法で蛍光免疫染色と観察を行った。図 2 D は図 2 C の、図 2 G は図 2 E および F の、図 2 J は図 2 H および I の細胞核の対比染色像である。図 2 C、図 2 E 右下のスケールバーは $100\text{ }\mu\text{m}$ 、図 2 H 右下のスケールバーは $50\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

[0167] その結果、浮遊培養開始後 70 日目の細胞塊には下垂体のホルモン産生細胞マーカーである ACTH 陽性の細胞が存在していた（図 2 C）。

さらに、Dexamethasone を添加して 14 日間培養した浮遊培養開始後 84 日目の細胞塊には、下垂体のホルモン産生細胞マーカーである PRL 陽性の細胞と GH 陽性の細胞がそれぞれ存在していた（図 2 E、H）。これらの結果から、上記分化誘導法によりヒト多能性幹細胞から下垂体のホルモン産生細胞が分化誘導されたことが分かった。

[0168] 参考例 1：ヒト ES 細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造における BMP4 添加時期の検討（1）

ヒト ES 細胞（KhES-1 株、京都大学より入手）を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014) に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地、フィーダーフリー足場には Laminin511-E8 を用いた。

具体的な維持培養操作は、実施例 1 と同様に実施した。

[0169] その後、実施例 1 と同様の条件で、96 ウェルプレートでの浮遊培養を開始した。

浮遊培養期間中に BMP シグナル伝達経路作用物質を添加しない条件をコントロールとした（-BMP4 条件、図 3 A）。その後、浮遊培養開始後 1、2 または 3 日目に BMP シグナル伝達経路作用物質を添加する条件（Day1~3+BMP4 条件、図 3 B~D）では、Y27632 を含まず、IWP-2、SB-431542、BMP4 を含む無血清培地を 1 ウェルあたり $100\text{ }\mu\text{l}$ 加えた。BMP4 は添加する培地に 3nM 添加し、ウェル中の終濃度が 1.5nM となるようにした。浮遊培養開始後 6 日目に Y27632

とBMP4を含まず、IWP-2とSB-431542を含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。浮遊培養開始後10日目に、倒立顕微鏡（キーエンス社製、BIOREVO）を用いて、明視野観察を行った（図3A-D）。図3A-D右下のスケールバーは、200 μm を示す。

[0170] その結果、BMP4を添加しない条件では、表面の滑らかな胚様体が形成され、胚様体表面に非神経上皮様の構造は確認できなかった（図3A）。分化誘導開始1日目および2日目にBMP4を添加した条件（Day1、2+BMP4）では、神経上皮様の構造を有する中心部を非神経上皮様の層が覆っている二層構造を有した、神経組織及び非神経上皮組織を含む細胞塊が形成されていた（図3B、C）。両条件を比較すると、2日目にBMP4を添加することにより、1日目にBMP4を添加した条件の胚様体（図3B）よりも大きな胚様体（図3C）が形成された。分化誘導開始3日目にBMP4を添加した条件では、外側の非神経上皮様の組織が形成されず、表面の滑らかな神経上皮様の組織からのみなる胚様体が形成された（図3D）。上記の結果より、ヒト多能性幹細胞から将来の下垂体組織の基となる非神経上皮組織で被覆された細胞塊の形成には、BMPシグナル伝達経路作用物質を浮遊培養開始後72時間以内に添加することが効果的であることが分かった。

[0171] 実施例3：ヒトES細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造におけるBMP4添加時期の検討（2）

ヒトES細胞（KhES-1株、京都大学より入手）を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作は、実施例1と同様に実施した。

[0172] その後、実施例1と同様の条件で、96ウェルプレートでの浮遊培養を開始した。

培地を添加することなく浮遊培養開始後2日目及び3日目に倒立顕微鏡を用いて、凝集体の明視野観察を行った。図4A右下のスケールバーは、200 μm

mを示す。観察の結果、BMP4の添加に好ましい時期である浮遊培養開始後2日目の凝集体は表面に凹凸がみられ、歪な形状であった（図4 A）。一方で、浮遊培養開始後3日目の凝集体は2日目に見られた凹凸が減少し、球体に近い形状を呈していた（図4 B）。

[0173] 前記、浮遊培養開始後2日目及び3日目の凝集体を、実施例1に記載の方法で固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、密着結合マーカーである抗Z0-1抗体（Thermo Fisher Scientific社製、ウサギ）と神経幹細胞及び多能性幹細胞マーカーである抗Sox2抗体（Santa Cruz Biotechnology社製、ヤギ）を用いて蛍光免疫染色を行った。蛍光標識二次抗体及び核の対比染色は実施例1に記載の物を使用した。図4 C右下のスケールバーは、100 μm を示す。その結果、浮遊培養開始後2日目の凝集体では、凝集体の最も表層の細胞の一部がZ0-1陽性であり、密着結合を形成していた（図4 C）。一方で、浮遊培養開始後3日目の凝集体では、Z0-1陽性の細胞は凝集体の内部に取り込まれ、最も表層には局在が見られなかった（図4 F）。加えて、浮遊培養開始後3日目の凝集体では、外層の細胞同士がより密着した領域と、凝集体内部の細胞が疎らでSox2強陽性領域の二層構造が、より明確に確認できるようになっていた（図4 D、G）。上記の結果より、神経組織及び非神経上皮組織を含む細胞塊の製造過程におけるBMP4添加時期を決定するための手法として、凝集体の最も表層の細胞における密着結合の検出が利用可能であることが分かった。

[0174] 実施例4：ヒトES細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造におけるソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質添加条件の検討

ヒトES細胞（KhES-1株、京都大学より入手）を、Scientific Reports, 4, 3594（2014）に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作は、実施例1と同様に実施した。

[0175] その後、実施例1と同様の条件で、96ウェルプレートでの浮遊培養を開始

した。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、IWP-2、SB-431542、BMP4、SAGを含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3nM添加し、ウェル中の終濃度が1.5nMとなるようにし、ソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質としてSAGを終濃度が100、300、500、700nM、1、2、5 μ Mの各濃度条件となるよう添加した。浮遊培養期間中にソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質を添加しない条件をコントロールとした(-SAG条件、図5A)。

浮遊培養開始後6、10、13、17、21、24日目にY27632とBMP4を含まず、IWP-2、SB-431542と各濃度のSAGを含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。

浮遊培養開始後28日目に、倒立顕微鏡(キーエンス社製、BIOREVO)を用いて、明視野観察を行った(図5A-H)。図5A右下のスケールバーは、100 μ mを示す。

[0176] その結果、浮遊培養中にSAGを添加しない条件では、細胞塊の表面に非神経上皮様の構造を有する球形に近い組織が形成されていた(図5A)。一方で、各濃度のSAGを添加した条件では、添加しない条件と比較してより大きく、表面の非神経上皮組織がラトケ嚢様に陥入し、細胞塊内部に神経上皮様の組織と間葉系細胞が存在する細胞塊が形成された(図5B-H)。上記の結果から、下垂体組織を有する細胞塊の製造には浮遊培養中のSAG濃度は100nMから5 μ Mまでが適正であることが分かった。特に、SAGを終濃度が100nM、300nM、500nM、700nM、1 μ M又は2 μ Mとなるように培養2日目に添加した条件(図5B-G)では、5 μ M添加した条件(図5H)と比較して、細胞塊の大きさが大きく、細胞塊表面の下垂体組織の形成が良好であった。

[0177] 実施例5：ヒトES細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造における分化誘導前の化合物処理の効果

ヒトES細胞(KhES-1株)を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地と

してはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。具体的な維持培養操作としては、実施例1と同様に行った。

培養した細胞を分化誘導する前処理として、播種した6日後にStemfit培地の培地交換と同時に何も添加しない条件 (Control)、300nM SAGのみを添加した条件 (+300nM SAG)、5 μ M SB-431542のみを添加した条件 (+5 μ M SB-431542)、SAG とSB431542を同時に添加した条件 (+SAG/SB) の4条件の細胞を維持培養した。

[0178] 上記処理の翌日に、サブコンプレントとなった4条件のヒトES細胞を、それぞれ実施例1に記載の方法で浮遊培養による下垂体組織を含む細胞塊への分化誘導を実施した。

浮遊培養開始後28日目に、倒立顕微鏡を用いて明視野観察を行った (図6 A-D)。図6 A右下のスケールバーは、1000 μ mを示す。その結果、浮遊培養前に化合物 (SAG及び／又はSB431542) を添加しない条件では、形成された細胞塊が小さく、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に間葉系細胞が確認できなかった (図6 A)。300nM SAGのみで処理した条件では、無添加条件と比較して細胞塊が大きくなり、間葉系細胞の存在も確認できた (図6 B)。5 μ M SB-431542のみを添加した条件及びSAG とSB431542を同時に添加した条件ではさらに大きな下垂体組織を含む細胞塊が形成された (図6 C、D)。

上記の結果から、浮遊培養開始前に化合物処理を実施することで下垂体組織を含む細胞塊の形成効率が向上し、さらにその条件として5 μ M SB-431542のみを添加した条件 (+5 μ M SB-431542) およびSAG とSB431542を同時に添加した条件 (+SAG/SB) が好ましいことが分かった。

[0179] 実施例6：ヒトES細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造におけるWntシグナル伝達経路阻害物質添加条件の検討

ヒトES細胞 (KhES-1株) を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例 1 と同様に行った。

[0180] その後、浮遊培養開始時に添加するWntシグナル伝達経路阻害物質の種類又は有無を変更する以外は実施例 1 と同様の条件で、96ウェルプレートでの浮遊培養を実施した。その際のWntシグナル伝達経路阻害物質として、PORCN阻害剤であるIWP-2、C-59 (Cayman Chemicals社製、500nM)、LGK974 (Cayman Chemicals社製、5 μ M)、TANK阻害剤であるXAV939 (Cayman Chemicals社製、1 μ M)、IWR1-endo (メルクミリポア社製、1 μ M) および作用機序が報告されていないKY02111 (Cayman Chemicals社製、5 μ M) を浮遊培養開始時に添加し、Wntシグナル伝達経路阻害物質無添加のコントロールとしてDMSOのみを添加した条件を実施した。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、各Wntシグナル伝達経路阻害物質、SB-431542、BMP4、SAGを含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3nM添加し、ウェル中の終濃度を1.5nMとし、SAGは添加する培地に4 μ M添加し、ウェル中の終濃度を2 μ Mとなるようにした。

浮遊培養開始後6、10、13、17、21、24日目にY27632とBMP4を含まず、各Wntシグナル伝達経路阻害物質、SB-431542およびSAGを含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。上記条件に加えて、浮遊培養中にSB431542とWntシグナル伝達経路阻害物質を両方とも加えない条件も実施した。

浮遊培養開始後28日目に、倒立顕微鏡 (キーエンス社製、BIOREV0) を用いて、明視野観察を行った (図7A~H)。図7A右下のスケールバーは、1000 μ mを示す。

[0181] その結果、SB431542とWntシグナル伝達経路阻害物質を両方とも加えない条件、およびSB431542を添加し、Wntシグナル伝達経路阻害物質を添加しない条件では、細胞塊の表面に非神経上皮組織が形成されなかった (図7A、B)。一方で、Wntシグナル伝達経路阻害物質であるIWP-2、KY02111、C59、LGK974、XAV939、IWR1-endoを添加した条件では、表面に非神経上皮構造を有する細胞塊が形成された (図7C~H)。特に、2 μ M IWP-2、5 μ M KY02111、1 μ M XAV939、1 μ M IWR1eを添加した際に大きく状態の良い細胞塊が形成された (

図7C、D、G、H)。上記の結果より、PORCN阻害剤、TANK阻害剤等を用いてWntシグナル伝達経路を阻害することによりBMPシグナルによる下垂体組織を含む細胞塊表面の非神経上皮組織形成が促進されることが分かった。

[0182] 実施例7：ヒトES細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造におけるBMP4添加濃度の検討

ヒトES細胞 (KhES-1株、京都大学より入手) を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014) に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例1と同様に行った。

その後、実施例1と同様の条件で、96ウェルプレートでの浮遊培養を開始した。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、IWP-2、SB-431542、BMP4、SAGを含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。その際に、BMP4の添加量は0.5nM、1.5nM、5nM及び無添加コントロールの4条件とした。BMP4は添加する培地に設定した条件の2倍の濃度で添加し、ウェル中の終濃度が設定した条件となるようにした。SAGは添加する培地に4 μ M添加し、ウェル中の終濃度を2 μ Mとなるようにした。

浮遊培養開始後6、10、13、17、21及び24日目にY27632とBMP4を含まず、IWP-2、SB-431542およびSAGを含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。

浮遊培養開始後28日目に、倒立顕微鏡を用いて明視野観察を行った (図8A～D)。図8A右下のスケールバーは、1000 μ mを示す。

[0183] その結果、BMP4を添加しない条件では、細胞塊表面に非神経上皮構造が形成されなかった (図8A)。一方で、0.5nM、1.5nM、5nMのBMP4を添加した条件では、いずれも細胞塊表面に非神経上皮構造が形成された (図8B～D)。上記の結果より、浮遊培養2日目にBMP4を単回添加することで、下垂体組織を含む細胞塊表面の非神経上皮組織形成が生じることが分かった。

[0184] 実施例8：ヒトES細胞からの下垂体組織を含む細胞塊の製造におけるTGF β シ

グナル伝達経路阻害条件の検討

ヒトES細胞 (KhES-1株) を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例1と同様に行った。

その後、浮遊培養開始時に添加するTGF β シグナル伝達経路阻害物質の濃度及び種類を変更する以外は実施例1と同様の条件で、96ウェルプレートでの浮遊培養を実施した。その際のTGF β シグナル伝達経路阻害物質として、SB431542 (1 or 10 μ M)、A 83-01 (Cayman Chemicals社製、1 or 10 μ M)、RepS ox (Cayman Chemicals社製、1 μ M) を各濃度条件で添加した。

その後、浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、IWP-2、各TGF β シグナル伝達経路阻害物質、BMP4、SAGを含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3nM添加し、ウェル中の終濃度を1.5nMとし、SAGは添加する培地に4 μ M添加し、ウェル中の終濃度を2 μ Mとなるようにした。

浮遊培養開始後6、10、13、17、21、24日目にY27632とBMP4を含まず、IWP-2、各TGF β シグナル伝達経路阻害物質およびSAGを含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。上記条件に加えて、浮遊培養中にTGF β シグナル伝達経路阻害物質とIWP-2を両方とも加えない条件、及びIWP-2を加え、TGF β シグナル伝達経路阻害物質を加えない条件も実施した。

[0185] その結果、工程(1)においてTGF β シグナル伝達経路阻害物質とIWP-2を両方とも加えない条件では、浮遊培養開始後28日目の細胞塊表面に非神経上皮構造が形成されなかった(図9A)。IWP-2を加え、TGF β シグナル伝達経路阻害物質を加えない条件では、細胞塊表面に非神経上皮構造が形成されたが、形成された細胞塊が小さく、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に間葉系細胞が確認できなかった(図9B)。各TGF β シグナル伝達経路阻害物質を添加した条件では、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に間葉系細胞が存在する大きな下垂体組織を含む細胞塊が形成された(図9C-G)。上記の結果から、浮遊培養中にTGF β シグナル伝達経路阻害

物質を添加することにより、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に間葉系細胞が存在する大きな下垂体組織を含む細胞塊を製造できることが分かった。

[0186] 実施例 9：ヒト iPS 細胞から作製された神経組織及び非神経上皮組織を含む細胞塊

ヒト iPS 細胞（201B7 株、iPS アカデミアジャパンより入手）を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014) に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としては StemFit 培地、フィーダーフリー足場には Laminin511-E8 を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例 1 と同様に実施した。

その後、実施例 1 と同様の条件で、96 ウェルプレートでの浮遊培養を実施した。

浮遊培養開始後 2 日目に Y27632 を含まず、IWP-2、SB-431542、SAG、BMP4 を含む無血清培地を 1 ウェルあたり $100\ \mu\text{l}$ 加えた。BMP4 は添加する培地に 3nM 添加し、ウェル中の終濃度を 1.5nM とし、SAG は添加する培地に $4\ \mu\text{M}$ 添加し、ウェル中の終濃度を $2\ \mu\text{M}$ となるようにした。

浮遊培養開始後 6、10、13、17、21、24 日目に Y27632 と BMP4 を含まず、IWP-2、SB-431542 及び SAG を含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。

浮遊培養開始後 28 日目に倒立顕微鏡を用いて明視野観察を行った（図 10 A、B）。図 10 A 右下のスケールバーは $1000\ \mu\text{m}$ 、図 10 B 右下のスケールバーは $200\ \mu\text{m}$ を示す。その結果、実施例 1 にてヒト ES 細胞株 KhES-1 から作製した際と同様に、ヒト iPS 細胞株 201B7 から中心部の神経組織を非神経上皮組織が取り巻く細胞塊が形成されていることが分かった。

上記培養 28 日目の細胞塊を実施例 1 と同様の方法で固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、下垂体の初期マーカーである抗 Lhx3 抗体、口腔上皮・下垂体プラコードマーカーである抗 Pitx2 抗体（R&D Systems 社製、ヒツジ）、非神経上皮・プラコードマーカーである抗 Six1 抗体（Atlas Antibodies 社製、ウサギ）、腹側間脳マーカーである抗 Nkx2.1 抗体、未分化神

経およびプラコードマーカーであるSox2抗体、終脳およびプラコードマーカーであるBf1抗体（タカラバイオ社製、ウサギ）、非神経上皮組織マーカーである抗CD326/EpCAM抗体（R&D Systems社製、ヤギ）、抗汎サイトケラチン抗体、抗E-Cadherin抗体（Santa Cruz Biotechnology社製、マウス）未分化神経及び神経堤・間葉系細胞マーカーである抗Nestin抗体、神経細胞マーカーである抗 β IIIチューブリン（Tuj1）抗体、間葉系細胞マーカーである抗Vimentin抗体（R&D Systems社製、ヤギ）を用いて蛍光免疫染色を行った。蛍光標識二次抗体として実施例1で用いたものに加えAlexa647標識ロバ抗ヤギ抗体（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて多重染色を行い、核の対比染色にはHoechst33342を用いた。図10Fは図10C、D、E、図10Jは図10G、H、I、図10Nは図10K、L、M、図10Rは図10O、P、Qに対する核の対比染色像である。染色した切片の観察および画像の取得には正立蛍光顕微鏡Axio Imager M2（ツァイス社製）および附属ソフトウェアのAxio Visionを用いた。図10C右下のスケールバーは200 μ m、図10O右下のスケールバーは100 μ mを示す。

- [0187] その結果、ヒトiPS細胞株201B7より上記分化誘導法で誘導された浮遊培養開始後28日目の細胞塊の内側はNkx2.1、Sox2、Bf1、 β IIIチューブリン陽性の腹側間脳・視床下部の神経上皮組織が存在し、外側はEpCAM、汎サイトケラチン、E-Cadherin、Pitx2陽性の口腔の非神経上皮組織であることが分かった。さらに、非神経上皮組織の一部はLhx3、Bf1、Sox2陽性であり、非神経上皮組織が陥入しているラトケ嚢様の構造と下垂体プラコードが形成されていることが分かった。加えて、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に、Nestin、Vimentin陽性、汎サイトケラチン、ラミニン弱陽性、 β IIIチューブリン陰性の頭部間葉系細胞が存在していた。上記の結果より、ヒトES細胞と同様にヒトiPS細胞から本発明の製造法により、非神経上皮と、神経上皮と、間葉系細胞とを含み、外側が非神経上皮に覆われ、内側に脳室様の構造を有する腹側間脳・視床下部様の神経上皮組織が形成され、非神経上皮と神経上皮の間に頭部間葉系細胞が存在し、外側の非神経上皮の一部が下垂体プ

ラコードである細胞塊が製造可能であることが示された。

[0188] 実施例 10 : Wntシグナル伝達経路作用物質と阻害物質を併用してヒトiPS細胞から作製された神経組織及び非神経上皮組織を含む細胞塊

ヒトiPS細胞 (HC-6#10株、理化学研究所より入手) を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例 1 と同様に実施した。

- [0189] このようにして調製したサブコンフレントのヒトiPS細胞を、PBSにて洗浄後、Accumaxを用いて酵素処理を行った後、分化誘導用の無血清培地を添加しセルスクレーパーを用いて培養ディッシュ表面より細胞を剥がし、ピペティングにより単一細胞へ分散した。その後、前記単一細胞に分散されたヒトES細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート (PrimeSurface 96V底プレート, 住友ベークライト社製) の1ウェルあたり 9×10^3 細胞になるように $100 \mu\text{l}$ の無血清培地に浮遊させ、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で浮遊培養した。その際の無血清培地 (gfCDM+KSR) には、F-12+Glutamax培地 (Thermo Fisher Scientific社製) とIMDM+Glutamax培地 (Thermo Fisher Scientific社製) の1:1混合液に5% Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific社製)、 $450 \mu\text{M}$ 1-モノチオグリセロール (和光純薬社製)、 $1 \times$ Chemically defined lipid concentrate (Thermo Fisher Scientific社製)、50 unit/mlペニシリン-50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (ナカライテスク社製) を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時 (浮遊培養開始後0日目、工程1開始) に、前記無血清培地にY27632 (終濃度 $20 \mu\text{M}$)、SB-431542 (TGF β シグナル伝達経路阻害物質、和光純薬社製、 $1 \mu\text{M}$) IWP-2 (Wntシグナル伝達経路阻害物質、Tocris Bioscience社製、 $2 \mu\text{M}$) を添加した。加えて、Wntシグナル伝達経路作用物質としてCHIR99021 (Cayman Chemical社製) を300nM、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 添加した条件、および無添加のコントロールとしてDMSOのみを添加した条件に対する計4条件を設定した。尚、本実施例中、CHIR99021をCHIRと

称する場合もある。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、SB-431542、IWP-2、BMP4（BMPシグナル伝達経路作用物質）及び各設定条件のCHIR99021を含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3nM添加し、ウェル中の終濃度を1.5nMとした。非神経上皮及びプラコードを含む細胞塊を誘導するための手法として、浮遊培養開始後3日目にY27632とBMP4を含まず、IWP-2、SB-431542、K02288（BMPシグナル伝達経路阻害物質、AdooQ Bioscience社製）、FGF2-TS（FGFシグナル伝達経路作用物質、HumanZyme社製）及びHeparin Sodium（富士フィルム和光純薬社製）を含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。K02288、FGF2とHeparin Sodiumは添加する培地にそれぞれ2 μ M、40ng/ml、20 μ g/ml添加し、ウェル中の終濃度が1 μ M、20ng/ml、10 μ g/mlとなるようにした。浮遊培養開始後6日目、10日目に半量培地交換を行った。

浮遊培養開始後13日目に倒立顕微鏡を用いて明視野観察を行った（図11A～D）。図11A右下のスケールバーは1000 μ mを示す。その結果、実施例1にてヒトES細胞株KhES-1から作製した際と同様に、ヒトiPS細胞株HC-6#10株から中心部の神経組織を非神経上皮組織が取り巻く細胞塊が形成されていることが分かった。また、浮遊培養開始後3日目にBMPシグナル伝達経路阻害物質とFGFシグナル伝達経路作用物質を添加しても非神経上皮組織が表面に形成されることが分かった。さらに、Wntシグナル伝達経路阻害物質であるIWP-2存在下でも、Wntシグナル伝達経路作用物質であるCHIR99021は作用し、濃度依存的に細胞塊が大きくなる一方で、3 μ M CHIR99021添加条件では細胞塊表面の非神経上皮組織形成が阻害されていることが分かった。

上記培養13日目の細胞塊を実施例1と同様の方法で固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、非神経上皮・プラコードマーカーである抗Six1抗体、中枢神経系・プラコードマーカーである抗Dlx5抗体（Atlas Antibodies社製、ウサギ）、抗E-Cadherin抗体（R&D Systems社製、ヤギ）、抗N-Cadherin抗体（BD Biosciences社製、マウス）を用いて蛍光免疫染色を

行った（図 1 1 E～P、図 1 2 Q～AB）。染色した切片の観察および画像の取得には正立蛍光顕微鏡Axio Imager M2（ツァイス社製）および附属ソフトウェアのAxio Visionを用いた。図 1 1 E、H、K、N、図 1 2 Q、T、W、Z 右下のスケールバーは100 μ mを示す。

[0190] その結果、ヒトiPS細胞株HC-6#10より上記分化誘導法で誘導された浮遊培養開始後 1 3 日目の細胞塊は、CHIR無添加条件および300nM、1 μ MのCHIRを添加した条件において、Dlx5、Six1、E-Cadherin、N-Cadherin陽性の非神経上皮ないしプラコード前駆組織の形成が見られた（図 1 1 E～P、図 1 2 Q～V）。3 μ MのCHIRを添加した条件では、非神経上皮の形成が見られず、別の組織への分化が生じていることが示唆された（図 1 2 W～AB）。また、CHIR無添加条件および300nM、1 μ MのCHIRを添加した条件を比較したところ、CHIR無添加条件に対して300nM CHIRを添加した条件のほうがより大きな細胞塊が形成され、内部の神経組織の生存と上皮形成が促進されていた。一方で、1 μ MのCHIRを添加した条件では外側の非神経上皮の肥厚化・プラコード形成が抑制されていた。上記の結果から、Wntシグナル伝達経路阻害物質であるIWP-2存在下で一定の程度（3 μ M CHIR99021以下程度）の β カテニン依存的な古典的Wnt経路活性化は細胞塊全体の成長、内部の神経組織の生存と上皮形成の促進に有効であることが示された。

[0191] 実施例 1 1 : Wntシグナル伝達経路作用物質と阻害物質を併用してヒトiPS細胞から作製された神経組織及び下垂体組織を含む細胞塊

ヒトiPS細胞（HC-6#10株、理化学研究所より入手）を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例 1 と同様に実施した。

[0192] このようにして調製したサブコンフレントのヒトiPS細胞を、PBSにて洗浄後、Accumaxを用いて酵素処理を行った後、分化誘導用の無血清培地を添加しセルスクレーパーを用いて培養ディッシュ表面より細胞を剥がし、ピペッテ

ィングにより単一細胞へ分散した。その後、前記単一細胞に分散されたヒトES細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート(PrimeSurface 96V底プレート, 住友ベークライト社製)の1ウェルあたり 9×10^3 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂の条件下で浮遊培養した。その際の無血清培地(gfCDM+KSR)には、F-12+Glutamax培地(Thermo Fisher Scientific社製)とIMDM+Glutamax培地(Thermo Fisher Scientific社製)の1:1混合液に5% Knockout Serum Replacement(Thermo Fisher Scientific社製)、450 μ M 1-モノチオグリセロール(和光純薬社製)、1 $\times$ Chemically defined lipid concentrate(Thermo Fisher Scientific社製)、50 unit/mlペニシリン-50 μ g/mlストレプトマイシン(ナカライテスク社製)を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時(浮遊培養開始後0日目、工程1開始)に、前記無血清培地にY27632(終濃度20 μ M)、SB-431542(TGF β シグナル伝達経路阻害物質、和光純薬社製、1 μ M) IWP-2(Wntシグナル伝達経路阻害物質、Tocris Bioscience社製、2 μ M)を添加した。加えて、Wntシグナル伝達経路作用物質としてCHIR99021(Cayman Chemical社製)を300nM添加した。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、SB-431542、IWP-2、CHIR99021、BMP4(BMPシグナル伝達経路作用物質)、SAG(Shhシグナル伝達経路作用物質)を含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3nM添加し、ウェル中の終濃度を1.5nMとした。SAGは添加する培地に1.4 μ M添加し、ウェル中の終濃度を700nMとなるようにした。

浮遊培養開始後6、10、13日目にY27632、BMP4を含まず、SAG、SB-431542、IWP-2、CHIR99021を同濃度含む無血清培地で半量培地交換を行った。浮遊培養開始後17、21、24日目にSAG、SB-431542、IWP-2、CHIR99021に加えて形成されたプラコード前駆組織をさらに成長させる目的でFGF2-TS(FGFシグナル伝達経路作用物質、HumanZyme社製、20ng/ml)、ヘパリンナトリウム(FGF安定化剤、富士フイルム和光純薬社製、10 μ g/ml)を含む無血清培地で半量培地交換を行った。

浮遊培養開始後28日目に倒立顕微鏡を用いて明視野観察を行った(図13A)。図13A右下のスケールバーは1000 μ mを示す。その結果、実施例1にてヒトES細胞株KhES-1から作製した際と同様に、SAGを添加した条件においてヒトiPS細胞株HC-6#10株から中心部の神経組織を非神経上皮組織が取り巻く細胞塊が形成されていることが分かった。

上記培養28日目の細胞塊を実施例1と同様の方法で固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、Lhx3、Nkx2.1、E-Cadherin、Nestin、Pitx2、Sox2、Six1、Vimentin、Rx、N-Cadherin、Tbx3、汎サイトケラチンに対する抗体を用いて実施例1と同様の方法で蛍光免疫染色を行った(図13B~I、図14J~V)。図13E、I、図14M、P、S、Vは同行の免疫染色像に対する細胞核の対比染色像である。

[0193] その結果、ヒトiPS細胞株HC-6#10株より上記Wntシグナル伝達経路作用物質とFGFシグナル伝達経路作用物質を添加した分化誘導法で誘導された浮遊培養開始後28日目の細胞塊の内側はNkx2.1、Sox2、Tbx3、Rx、N-Cadherin陽性の腹側間脳・視床下部の神経上皮組織が存在し、外側は汎サイトケラチン、E-Cadherin、Pitx2陽性の口腔の非神経上皮組織であることが分かった。さらに、非神経上皮組織の一部はLhx3、Six1、Sox2陽性であり、非神経上皮組織が陥入しているラトケ嚢様の構造と下垂体プラコードが形成されていることが分かった。加えて、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に、Nestin、Vimentin陽性、汎サイトケラチン弱陽性の頭部間葉系細胞が存在していた。上記の結果より、ヒトiPS細胞からWntシグナル伝達経路作用物質とFGFシグナル伝達経路作用物質を添加した分化誘導条件により、非神経上皮と、神経上皮と、間葉系細胞とを含み、外側が非神経上皮に覆われ、内側に脳室様の構造を有する腹側間脳・視床下部様の神経上皮組織が形成され、非神経上皮と神経上皮の間に頭部間葉系細胞が存在し、外側の非神経上皮の一部が下垂体プラコードである細胞塊が製造可能であることが示された。

[0194] 実施例12：BMPシグナル伝達経路作用物質を添加して一定期間後にBMPシグナル伝達経路阻害物質を用いてヒトiPS細胞から作製された神経組織及び非神

経上皮組織を含む細胞塊

ヒトiPS細胞（HC-6#10株、理化学研究所より入手）を、Scientific Reports, 4, 3594 (2014)に記載の方法に準じてフィーダーフリー条件で培養した。フィーダーフリー培地としてはStemFit培地、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8を用いた。

具体的な維持培養操作としては、実施例1と同様に実施した。

[0195] このようにして調製したサブコンプレントのヒトiPS細胞を、PBSにて洗浄後、Accumaxを用いて酵素処理を行った後、分化誘導用の無血清培地を添加しセルスクレーパーを用いて培養ディッシュ表面より細胞を剥がし、ピペッティングにより単一細胞へ分散した。その後、前記単一細胞に分散されたヒトES細胞を非細胞接着性の96ウェル培養プレート（PrimeSurface 96V底プレート、住友ベークライト社製）の1ウェルあたり 9×10^3 細胞になるように100 μ lの無血清培地に浮遊させ、37℃、5%CO₂の条件下で浮遊培養した。その際の無血清培地（gfCDM+KSR）には、F-12+Glutamax培地（Thermo Fisher Scientific社製）とIMDM+Glutamax培地（Thermo Fisher Scientific社製）の1:1混合液に5% Knockout Serum Replacement（Thermo Fisher Scientific社製）、450 μ M 1-モノチオグリセロール（和光純薬社製）、1 $\times$ Chemically defined lipid concentrate（Thermo Fisher Scientific社製）、50 unit/mlペニシリン-50 μ g/mlストレプトマイシン（ナカライテスク社製）を添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時（浮遊培養開始後0日目、工程1開始）に、前記無血清培地にY27632（終濃度20 μ M）、SB-431542（TGF β シグナル伝達経路阻害物質、和光純薬社製、1 μ M）、IWP-2（Wntシグナル伝達経路阻害物質、Tocris Bioscience社製、2 μ M）、CHIR99021（Wntシグナル伝達経路作用物質、Cayman Chemical社製、300nM）を添加した。

浮遊培養開始後2日目にY27632を含まず、SB-431542、IWP-2、CHIR99021、BMP4（BMPシグナル伝達経路作用物質）、SAG（Shhシグナル伝達経路作用物質）を含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ l加えた。BMP4は添加する培地に3 nM添加し、ウェル中の終濃度を1.5nMとした。SAGは添加する培地に1.4 μ M添

加し、ウェル中の終濃度を700nMとなるようにした。浮遊培養開始後3、6、10、13日目にY27632、BMP4を含まず、SAG、SB-431542、IWP-2、CHIR99021を同濃度含む無血清培地で半量培地交換を行った。また、その際に浮遊培養開始後3、6、10日目のいずれかの時点でK02288（BMPシグナル伝達経路阻害物質、Adooq BioScience社製、300nM）を半量培地交換時に添加する条件、およびコントロールとして溶媒のDMSOを添加した4条件を設定した。K02288は添加する培地に600nM添加し、ウェル中の終濃度を300nMとした。浮遊培養開始後17、21、24日目にSAG、SB-431542、IWP-2、CHIR99021、K02288に加えて形成されたプラコード前駆組織をさらに成長させる目的で終濃度が20ng/ml FGF2-TS、10 μ g/mlヘパリンナトリウムとなる無血清培地で半量培地交換を行った。浮遊培養開始後28日目に倒立顕微鏡を用いて明視野観察を行った（図15A～D）。図15A右下のスケールバーは1000 μ mを示す。その結果、K02288無添加のコントロールに加えて、浮遊培養開始後3、6、10日目のいずれかの時点でK02288を添加した条件でも、中心部の神経組織を非神経上皮組織が取り巻く細胞塊が形成されていることが分かった。

さらに、浮遊培養開始後6日目にK02288を添加し分化誘導した上記培養28日目の細胞塊を実施例1と同様の方法で固定し、凍結切片を作成した。これらの凍結切片に関し、Lhx3、Nkx2.1、E-Cadherin、Nestin、Pitx2、Sox2、Six1、Vimentin、Rx、N-Cadherin、Tbx3、汎サイトケラチンに対する抗体を用いて実施例1と同様の方法で蛍光免疫染色を行った（図15E～L、図16M～Y）。図15H、L、図16P、S、V、Yは同行の免疫染色像に対する細胞核の対比染色像である。

その結果、ヒトiPS細胞株HC-6#10株より上記BMPシグナル伝達経路作用物質を添加して一定期間後にBMPシグナル伝達経路阻害物質を添加する分化誘導法で誘導された浮遊培養開始後28日目の細胞塊の内側はNkx2.1、Sox2、Tbx3、Rx、N-Cadherin陽性の腹側間脳・視床下部の神経上皮組織が存在し、外側は汎サイトケラチン、E-Cadherin、Pitx2陽性の口腔の非神経上皮組織であることが分かった。さらに、非神経上皮組織の一部はLhx3、Six1、Sox2陽性であり

、非神経上皮組織が陥入しているラトケ嚢様の構造と下垂体プラコードが形成されていることが分かった。加えて、外側の非神経上皮組織と内側の神経上皮組織の間に、Nestin、Vimentin陽性、汎サイトケラチン弱陽性の頭部間葉系細胞が存在していた。さらに、BMPシグナル伝達経路阻害物質を添加することにより、細胞塊表面における下垂体プラコードマーカーLhx3陽性細胞の割合が極めて高い細胞塊を得ることができた。

上記の結果より、ヒトiPS細胞からBMPシグナル伝達経路作用物質を添加して一定期間後にBMPシグナル伝達経路阻害物質を添加する分化誘導条件により、非神経上皮の一部に形成される下垂体プラコードの割合を高めることができることが示された。

産業上の利用可能性

[0196] 本発明によれば、多能性幹細胞から腹側間脳等の中枢神経系組織、頭部間葉系細胞と下垂体組織をともに含んでなる細胞塊を低コストに効率よく製造することが可能になる。

本出願は、日本で出願された特願2017-226312(出願日:2017年11月24日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 下記工程（１）及び（２）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；
- （１）多能性幹細胞をW n t シグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、
- （２）第一工程で得られた凝集体を、B M P シグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程。
- [請求項2] 下記工程（a）、（１）及び（２）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；
- （a）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、１）T G F β ファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに２）未分化維持因子を含む培地で培養するa工程、
- （１）a工程で培養された多能性幹細胞をW n t シグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、
- （２）第一工程で得られた凝集体を、B M P シグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含有する細胞塊を得る第二工程。
- [請求項3] 下記工程（１）、（２－１）及び（２－２）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；
- （１）多能性幹細胞をW n t シグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、
- （２－１）第一工程で得られた凝集体を、B M P シグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程（１）、
- （２－２）第二工程（１）で浮遊培養された凝集体を、B M P シグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊

を得る第二工程（２）。

[請求項4] 下記工程（a）、（１）、（２－１）及び（２－２）を含む、下垂体組織を含む細胞塊の製造方法；

（a）多能性幹細胞を、フィーダー細胞非存在下で、１）TGFβファミリーシグナル伝達経路阻害物質及び／又はソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質、並びに２）未分化維持因子を含む培地で培養するa工程、

（１）a工程で培養された多能性幹細胞をWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、

（２－１）第一工程で得られた凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程（１）、

（２－２）第二工程（１）で浮遊培養された凝集体を、BMPシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程（２）。

[請求項5] 前記Wntシグナル伝達経路阻害物質がPORCN阻害剤であることを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項6] 前記工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）における浮遊培養が、さらにTGFβシグナル伝達経路阻害物質の存在下で行われることを特徴とする請求項１～５のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項7] 前記工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）からなる群より選ばれる少なくとも１つの工程がFGFシグナル伝達経路作用物質の存在下で実施されることを特徴とする、請求項１～６のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項8] 前記工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）からなる群より選ばれる少なくとも１つの工程がWntシグナル伝達経路作用物質の存在下で実施されることを特徴とする、請求項１～７のいずれか１項に記載の製造方法。

- [請求項9] 前記工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）からなる群より選ばれるいずれか一つ以上の工程における浮遊培養が、さらにN o t c hシグナル阻害剤の存在下でおこなわれることを特徴とする、請求項１～８のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項10] 前記工程（１）、（２）、（２－１）及び（２－２）からなる群より選ばれるいずれか一つ以上の工程における浮遊培養が、さらにデキサメタゾンの存在下でおこなわれることを特徴とする、請求項１～９のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項11] 下記工程（１）～（３）を含む、下垂体組織の製造方法；
（１）多能性幹細胞を、W n tシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、
（２）第一工程で得られた凝集体を、B M Pシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第二工程、
（３）第二工程で得られた細胞塊から下垂体組織を回収する第三工程。
- [請求項12] 下記工程（１）、（２－１）、（２－２）及び（３）を含む、下垂体組織の製造方法；
（１）多能性幹細胞を、W n tシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞の凝集体を形成させる第一工程、
（２－１）第一工程で得られた凝集体を、B M Pシグナル伝達経路作用物質及びソニック・ヘッジホッグシグナル伝達経路作用物質の存在下に浮遊培養する第二工程（１）、
（２－２）第二工程（１）で浮遊培養された凝集体を、B M Pシグナル伝達経路阻害物質の存在下に浮遊培養し、下垂体組織を含む細胞塊を得る第２工程（２）、
（３）第二工程（２）で得られた細胞塊から下垂体組織を回収する第三工程。

- [請求項13] 請求項 1 1 又は 1 2 に記載の製造方法により得られる下垂体組織。
- [請求項14] 1) 神経系細胞又は神経組織、2) 下垂体組織及び3) 間葉系細胞を含む細胞塊。
- [請求項15] 1) 神経系細胞又は神経組織、2) 下垂体組織及び4) 神経提細胞並びに神経提由来細胞を含む細胞塊。
- [請求項16] 請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法により製造される細胞塊又は請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法により製造される下垂体組織を含む、下垂体の障害に基づく疾患の治療薬。