

明 細 書

発明の名称：

下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、インビトロにおいて、多能性幹細胞から分化誘導した下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 下垂体は、間脳の下部に接して存在する小さな内分泌器官であり、多様なホルモンの制御中枢として大きな役割を果たす。例えば、生命維持に必須の副腎皮質ホルモンの産生を促す副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、子どもの成長を促す成長ホルモンなどをはじめとする多様な下垂体ホルモンを産生する。そのため、下垂体の機能不全は全身性の重篤な疾患を引き起こす。

[0003] 近年、ヒトES/iPS細胞から機能的な下垂体ホルモン産生細胞を含む腺性下垂体を分化誘導する方法が開発され、下垂体再生医療への応用が期待されている（特許文献1、非特許文献1及び2）。これらの方法では、三次元培養により視床下部-下垂体の複合組織が1つの細胞塊の中に形成される。当該複合組織において、腺性下垂体及びその前駆組織は、主に細胞塊の表層に位置し、これを剥離して下垂体摘出マウスの腎被膜下に移植することで、活動性・生存・体重減少の改善などの治療効果が確認されている（特許文献1、非特許文献1）。また、ヒトES/iPS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が報告されている（特許文献2）。この方法においても、細胞塊の内側に腹側間脳・視床下部の神経上皮組織が存在し、外側に存在する口腔の非神経上皮組織の一部に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。しかし、ヒトES/iPS細胞を機能的な下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞塊に分化させる方法は知られていても、該細胞塊から

下垂体ホルモン産生細胞だけを効率よく分離するための細胞マーカーとその分離のタイミングは全く知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2016/013669号

特許文献2：国際公開第2019/103129号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Nature Communications, 7:10351, 2016

非特許文献2：Cell Reports, 30, 18-24, January 7, 2020

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明者らは、多能性幹細胞を下垂体組織へ分化させる培養途上の細胞塊から下垂体ホルモン産生細胞およびその前駆細胞である下垂体前駆細胞を分離するために好適なタイミングを探索し、該タイミングで分離された細胞を再凝集し、さらに培養することによって、優れた下垂体ホルモン分泌能を持った下垂体ホルモン産生細胞の凝集体を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意検討の結果、下垂体ホルモン産生細胞および下垂体前駆細胞に特異的な表面抗原としてepithelial cell adhesion molecule（以下、EpCAMと略記する）を同定し、抗EpCAM抗体を用いたソーティングにより、多能性幹細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ分化させる培養途上の細胞塊から下垂体ホルモン産生細胞および下垂体前駆細胞を最も効果的に分離・精製できるタイミングを見出した。また、当該分離・精製した下垂体ホルモン産生細胞および下垂体前駆細胞をさらに分化培養し、再凝集させることによって、該凝集体が優れた下垂体ホルモンの分泌能を示すことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] 即ち、本発明は下記の通りである。

[1] 下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であって、

(1) 該細胞凝集体におけるEpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞の存在割合が80%以上であり、

(2) 該細胞凝集体における神経細胞の存在割合が20%以下であり、

(3) 該細胞凝集体におけるACTH陽性細胞の存在割合が5%以上であり、

(4) 該細胞凝集体の細胞密度が3,000~20,000 cells/mm²であり、

(5) 該細胞凝集体の長径が200~3,000 μmであり、

(6) 該細胞凝集体の表面において、EpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞が互いに面接着し、上皮構造を形成しており、かつ、

(7) 該細胞凝集体が、スポンジ状構造を形成している、
ことを特徴とする、細胞凝集体。

[2] 該細胞凝集体における下垂体幹細胞の存在割合が3%以上である、[1]に記載の細胞凝集体。

[3] 該細胞凝集体のACTH分泌能が200~1,000,000 pg/mLである、[1]に記載の細胞凝集体。

[4] 該細胞凝集体のGH分泌能が0.05~100 ng/mLである、[1]に記載の細胞凝集体。

[5] [1] ~ [4] のいずれか1つに記載の細胞凝集体を全細胞凝集体数の40%以上含む、細胞集団。

[6] [1] ~ [4] のいずれか1つに記載の細胞凝集体を含む、下垂体の障害に基づく疾患の治療薬。

[7] 以下の工程を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法：

(1) 多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程、及び

(2) 分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程。

〔 8 〕 工程（ 1 ） の細胞集団が、下記工程（ A ） 及び（ B ） により得られる、〔 7 〕 に記載の製造方法：

（ A ） 視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導可能な条件下において、多能性幹細胞またはその細胞凝集体を培養する工程、及び、

（ B ） （ A ） で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を細胞集団に分散させる工程。

〔 9 〕 工程（ A ） が、以下の工程を含む、〔 8 〕 に記載の製造方法。

（ 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培養し、細胞凝集体を形成させる第一工程。

（ 2 ） 第一工程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Shhシグナル伝達経路作用物質の存在下に培養し、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得る第二工程。

〔 10 〕 工程（ A ） が、以下の工程を含む、〔 8 〕 に記載の製造方法。

（ 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Shh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、細胞凝集体を形成させる第一工程、

（ 2 ） 第一工程で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質およびShhシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得る第二工程。

。

〔 11 〕 工程（ A ） が、以下の工程を含む、〔 8 〕 に記載の製造方法。

（ 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Shh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工程で得られた多能性幹細胞をJNKシグナル伝達経路阻害物質および

Wntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞凝集体を形成させる第一工程。

(2) 第一工程で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質およびShhシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得る第二工程。

[12] 第一工程における浮遊培養がさらにShhシグナル伝達経路作用物質の存在下であって、第一工程および第二工程におけるShhシグナル伝達経路作用物質の存在下における培養期間が、30日である、[11]に記載の製造方法。

[13] 第二工程で得られた細胞凝集体を、Shhシグナル伝達経路作用物質の非存在下でさらに浮遊培養する、[9]～[12]のいずれか1つに記載の製造方法。

[14] 工程(A)の培養期間が、ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体が得られる期間である、[8]～[13]のいずれか1つに記載の製造方法。

[15] 工程(A)の培養期間が、30日以上かつ100日以下である、[8]～[14]のいずれか1つに記載の製造方法。

[16] 下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体が以下の特徴を含む、[7]～[15]のいずれか1つに記載の製造方法：

(1) 該細胞凝集体におけるEpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞の存在割合が80%以上であり、

(2) 該細胞凝集体における神経細胞の存在割合が20%以下であり、

(3) 該細胞凝集体におけるACTH陽性細胞の存在割合が5%以上であり、

(4) 該細胞凝集体の細胞密度が3,000～20,000 cells/mm²であり、

(5) 該細胞凝集体の長径が200～3,000 μmであり、

(6) 該細胞凝集体の表面において、EpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つ

が陽性の細胞が互いに面接着し、上皮構造を形成しており、かつ、

(7) 該細胞凝集体が、スポンジ状構造を形成している。

[17] 該細胞凝集体における下垂体幹細胞の存在割合が3%以上である、[16] に記載の製造方法。

[18] 該細胞凝集体のACTH分泌能が200~1,000,000 pg/mLである、[16] に記載の製造方法。

[19] 該細胞凝集体のGH分泌能が0.05~100 ng/mLである、[16] に記載の製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、EpCAMを利用し、多能性幹細胞を下垂体組織へ分化させる培養途上の細胞塊から特定のタイミングでEpCAM陽性細胞集団を分離することで、機能的な下垂体ホルモン産生細胞および下垂体前駆細胞を効率的に分離・精製することができる。また、分離・精製した下垂体ホルモン産生細胞および下垂体前駆細胞を、再凝集の後、さらに分化培養することによって得られる下垂体ホルモン産生細胞の凝集体は、生理的な下垂体ホルモン分泌刺激により優れた下垂体ホルモンの分泌能を示すため、該細胞を用いて下垂体に関する疾患の治療等を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 図1は、ヒトES/iPS細胞から下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造するまでの、全体の工程図を示す。製造工程としては(1)ヒトES/iPS細胞を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化させる工程(工程1 分化)、(2)視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体からEpCAM陽性細胞集団を分離する工程(工程2 中間精製)、(3)分離後のEpCAM陽性細胞集団を長期培養することにより下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造する工程(工程3 成熟培養)、の3つの工程である。

[図2] 図2は、ヒトES細胞を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体へ分化させるためのプロトコルを示す。

[図3]図3は、分化誘導開始後29、61、103日目の細胞凝集体における各種細胞マーカーの発現を確認した図である。

[図4]図4は、精製したEpCAM陽性細胞を再凝集させ、長期浮遊培養するためのプロトコルを示す。

[図5]図5は、分化誘導開始後62日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後41日間長期培養させた細胞凝集体（day62 sort + day41）における各種細胞マーカーの発現を確認した図である。

[図6]図6は、分化誘導開始後100日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後31日間長期培養させた細胞凝集体（day100 sort + day31）における各種細胞マーカーの発現を確認した図である。

[図7]図7は、day62 sort + day41の細胞凝集体およびday100 sort + day31の細胞凝集体におけるACTH陽性細胞率、細胞密度および長径を定量した図並びに明視野像である。

[図8]図8は、精製したEpCAM陽性細胞を再凝集させ、Dexamethasone (DX) 添加条件下で長期浮遊培養するためのプロトコルを示す。

[図9]図9は、day62 sort + day41の細胞凝集体およびday100 sort + day31の細胞凝集体における上皮細胞マーカーであるEpCAM、下垂体ホルモン産生細胞マーカーである成長ホルモン（GH）の発現を確認した図である。

[図10]図10A、Bは、分化誘導開始後62日目の細胞凝集体を用いて精製・再凝集させた、EpCAM陽性及びEpCAM陰性それぞれの細胞凝集体の培養上清中のACTH及びGHの量を経時的に測定した結果を示す図である。また図10Cは、分化誘導開始後62日目の細胞凝集体から精製・再凝集させ、41日間浮遊培養した細胞凝集体を用いて、CRHによるACTH刺激試験を行った結果を示す図である。

[図11]図11A、Bは、分化誘導開始後100日目の細胞凝集体を用いて精製・再凝集させた、EpCAM陽性及びEpCAM陰性それぞれの細胞凝集体の培養上清中のACTH及びGHの量を経時的に測定した結果を示す図である。

[図12]図12は、分化誘導開始後3、6、19、30、60、100、201日目の細胞凝

集体における各種細胞マーカーの発現量を測定した結果を示す図である。

[図13]図13は、分化誘導開始後30日目、60日目、100日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、分化誘導開始後131日目まで培養した細胞凝集体における各種細胞マーカーの発現を確認した図である。

[図14]図14は、分化誘導開始後60日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、分化誘導開始103日目まで培養した細胞凝集体における各種細胞マーカーの発現を確認した図である。A～CはEpCAM陽性細胞の再凝集体、D～JはEpCAM陰性細胞の再凝集体である。D、E、Iのスケールバーは200 μm 、A～C、F～H、Jのスケールバーは50 μm を示す。

[図15]図15は、分化誘導開始後60日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、分化誘導開始201日目まで培養した細胞凝集体を、電子顕微鏡にて観察した図である。A、Bのスケールバーは2 μm 、Cのスケールバーは500nmを示す。

[図16]図16は、分化誘導開始後60日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、分化誘導開始103日目まで培養した細胞凝集体を用いて、CRH又はデキサメサゾンによるACTH刺激試験を行った結果示す図である。*: $p<0.01$ 、paired t-test。

[図17]図17は、EpCAM陽性細胞の再凝集体を下垂体機能不全マウス腎被膜に移植し、移植24週後の腎臓における各種細胞マーカーの発現を確認した図である。

[図18]図18は、EpCAM陽性細胞の再凝集体を下垂体機能不全マウス腎被膜に移植し、CRH、Dexamethasone又はLPS刺激がACTH分泌に与える影響を確認した図である。図18Aは、*: $p<0.05$ 、*: $p<0.01$ 、***: $p<0.001$ 、Mann-Whitney test (sham versus grafted)、paired t-test (grafted pre versus post)。図18BおよびCは、*: $p<0.01$ 、***: $p<0.001$ 、paired t-test。

[図19]図19は、ヒトiPS細胞を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体へ分化させるためのプロトコルにおいて、分化誘導開始後30日目までSAGを処理した場合と、その後も継続的にSAGを

処理した場合における、ACTH分泌能を比較した図である。*: $p < 0.05$ 、Student's t-test。

[図20]図20は、精製したEpCAM陽性細胞を再凝集させ、互いに異なる添加期間のDX添加条件下で長期浮遊培養するためのプロトコルを示す。

[図21]図21は、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、3日後から3、7または14日間DXで処理し、分化誘導開始103日目まで培養した細胞凝集体における上皮細胞マーカーであるEpCAM、下垂体ホルモン産生細胞マーカーである成長ホルモン（GH）の発現を確認した図である。

[図22]図22A、Bは、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、3日後から3、7または14日間DXで処理し、分化誘導開始103日目まで培養した細胞凝集体の培養上清中のACTH及びGHの量を経時的に測定した結果を示す図である。図22Cは、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、3日後から14日間DXで処理し、分化誘導開始103日目まで培養した細胞凝集体を用いて、CRFによるGH刺激試験の結果を示す図である。図22Dは、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後、3日後から14日間DXで処理し、分化誘導開始103日目まで培養した細胞凝集体を用いて、somatostatinによるGH抑制試験の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 〔下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法〕

本明細書において、用語の定義は下記のとおりである。「幹細胞」とは、分化能及び増殖能（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、生体を構成する全ての細胞に分化し得る能力（分化多能性：pluripotency）を有する幹細胞をいう。全ての細胞とは、外胚葉、中胚葉及び内胚葉の三胚葉由来の細胞である。「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。

[0012] 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：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）、及び生殖細胞（例えば精巢）から作製されるGS細胞も多能性幹細胞に包含される。なお、ヒト胚性幹細胞は、受精14日以内のヒト胚から樹立されたものである。

[0013] 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つつある。ES細胞は、内部細胞集団をフィーダー細胞上又はleukemia inhibitory factor(LIF)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。ES細胞の製造方法は、例えば国際公開第96/22362号、国際公開第02/101057号、米国特許第5843780号明細書、米国特許第6200806号明細書、米国特許第6280718号明細書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、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。

[0014] EG細胞は、始原生殖細胞をマウス幹細胞因子（mSCF）、LIF及び塩基性線維芽細胞増殖因子(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）。

[0015] 「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。人工多能性幹細胞としては、具体的には線維芽細胞、末梢血単核球等に分化した体細胞を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. 861-872; 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)。

- [0016] 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、T細胞等）、肝細胞、膵臓細胞、腸上皮細胞、平滑筋細胞等が挙げられる。
- [0017] 人工多能性幹細胞を製造する際に、数種類の遺伝子（例えば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。遺伝子を発現させるための手段としては、例えばウイルスベクター（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。
- [0018] また、株化された人工多能性幹細胞を入手する事も可能であり、例えば、京都大学で樹立された201B7細胞、201B7-Ff細胞、253G1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞、1231A3細胞等のヒト人工多能性細胞株が、京都大学及びiPSアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたFf-I01細胞、Ff-I14細胞及びQHJI01s04細胞が、京都大学より入手可能である。

- [0019] 多能性幹細胞は、遺伝子改変されていてもよい。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挙げられる。染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press(1993)、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社（1995）等に記載の方法を用いて行うことができる。
- [0020] 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等）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。
- [0021] 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挙げられる。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)などを用いることができる。
- [0022] 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、ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社(1995)等に記載の方法に従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法等が挙げられる。

[0023] 多能性幹細胞として、ゲノム編集を行った多能性幹細胞を用いることもできる。「ゲノム編集」とは、ヌクレアーゼを用いた部位特異的なゲノムDNA鎖の切断、又は塩基の化学的変換等の原理により標的遺伝子もしくはゲノム領域を意図的に改変する技術である。部位特異的ヌクレアーゼとしては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALEN、CRISPR/Cas9等が挙げられる。ゲノム編集技術を用いることにより、特定の遺伝子を欠失したノックアウト細胞株、特定の遺伝子座に人工的に別の配列を挿入したノックイン細胞株等を作製することができる。

[0024] 多能性幹細胞として、疾患特異的多能性幹細胞を用いてもよい。「疾患特異的多能性幹細胞」とは、疾患の発症に関与する遺伝子の変異又は遺伝的背景を有する多能性幹細胞を表す。疾患特異的多能性幹細胞は、対象となる疾患を発症している患者や近親者から前述の方法等により人工多能性幹細胞を樹立する方法、又は既に樹立済の多能性幹細胞のゲノムをジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALEN、CRISPRといったゲノム編集技術等により改変する方法により作製することができる。

[0025] 「哺乳動物」には、げっ歯類、有蹄類、ネコ目、ウサギ目、霊長類等が含まれる。げっ歯類には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等が含まれる。有蹄類には、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等が含まれる。ネコ目には、イヌ、ネコ等が含まれる。ウサギ目には、ウサギ等が含まれる。「霊長類」とは、霊長目に属する哺乳類動物をいい、霊長類としては、キツネザル、ロリス、ツバイ等の原猿亜目、及びサル、類人猿、ヒト等の真猿亜目が含まれる。

[0026] 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（例えばマウス、ラット）又は霊長類（例えばヒト、サル）の多能性幹細胞であり、最も好ましくはヒトの多能性幹細胞である。

- [0027] 「浮遊培養」とは、細胞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をいう。すなわち浮遊培養は、細胞を培養器材及び培養器材上のフィーダー細胞等（以下、「培養器材等」と記す。）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行われる培養（接着培養）とは区別される。より詳細には、浮遊培養とは、細胞と培養器材等との間に、強固な細胞－基質結合を作らせない条件での培養をいう。培養している細胞が浮遊培養状態であるか接着培養であるかの判別は、例えば顕微鏡観察時の培養器材の揺動等によって当業者であれば容易に可能である。
- [0028] 浮遊培養中の細胞凝集体においては、細胞と細胞とが面接着する。浮遊培養中の細胞凝集体では、細胞と培養器材等との間に、強固な細胞－基質結合は形成されておらず、細胞－基質結合はほとんど形成されないか、形成されていてもその寄与が小さい。浮遊培養中の細胞凝集体の内部には、内在の細胞－基質結合が存在してもよい。「細胞と細胞とが面接着（plane attachment）する」とは、細胞と細胞とが面で接着することをいう。より詳細には、「細胞と細胞とが面接着する」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、細胞接着因子（例えばE-cadherin、N-cadherin等）の免疫染色等により観察できる。
- [0029] 浮遊培養を行う際に用いられる培養器材は、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。このような培養器材としては、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、スピナーフラスコ及びローラーボトルが挙げられる。これ

らの培養器材は、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材としては、培養器材の表面に、細胞との接着性を向上させる目的で行われる上述の人工的な処理がされていないもの等を使用できる。細胞非接着性の培養器材として、細胞との接着性を低下させる目的で培養器材の表面が人工的に処理されたものを使用することもできる。培養器材の培養面は、平底、U底又はV底でもよいし、凹凸があってもよい。細胞との接着性を低下させる処理としては、例えば2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)ポリマー、Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)(Poly-HEMA)、polyethylene glycol(PEG)等のコーティングによる超親水性処理、タンパク低吸着処理等が挙げられる。

[0030] 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Basal Medium Eagle(BME)、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow Minimum Essential Medium(Glasgow MEM)、Improved MEM Zinc Option、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)、Medium 199、Eagle Minimum Essential Medium(Eagle MEM)、Alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium(α MEM)、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)、F-12培地、DMEM/F12、IMDM/F12、ハム培地、RPMI 1640、Fischer's培地、又はこれらの混合培地等が挙げられる。

[0031] 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、好ましくは公知の胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞用の培地、フィーダーフリー下で多能性幹細胞を培養するための培地（フィーダーフリー培地）等を用いることができる。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(64mg/l)、sodium selenium(14 μ g/l)、insulin(19.4mg/l)、NaHCO₃(543mg/l)、transferrin(10.7mg/l)、bFGF(100ng/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(2ng/mL)又はNodal(100ng/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(Thermo Fisher Scientific社製)、S-medium(DSファーマバイオメディカル社製)、StemPro(Thermo Fisher Scientific社製)、hESF9、mTeSR1(STEMCELL Technologies社製)、mTeSR2(STEMCELL Technologies社製)、TeSR-E8(STEMCELL Technologies社製)、mTeSR Plus(STEMCELL Technologies社製)、StemFit(味の素社製)、ReproMed iPSC Medium(リプロセル社製)、NutriStem XF(Biological Industries社製)、NutriStem V9(Biological Industries社製)、Cellartis DEF-CS Xeno-Free Culture Medium(タカラバイオ社製)、Stem-Partner SF(極東製薬社製)、PluriSTEM Human ES/iPS Cell Medium(メルク社製)、StemSure hPSC MediumΔ(富士フイルム和光純薬社製)等が挙げられる。

[0032] 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又はこれらの均等物等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、国際公開第98/30679号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。市販の血清代替物としては、例えばKnockout Serum Replacement(Thermo Fisher Scientific社製)(以下、「KSR」と記すこともある。)、Chemically-defined Lipid concentrated(Thermo Fisher Scientific社製)、Glutamax(Thermo Fisher Scientific社製)、B27 Supplement(Thermo Fisher Scientific社製)、N2 Supplement(Thermo Fisher Scientific社製)等が挙げられる。

[0033] 浮遊培養及び接着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。

[0034] 調製の煩雑さを回避するために、無血清培地として、市販のKSR(Thermo Fisher Scientific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×c

hemically-defined 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。

- [0035] 「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。
- [0036] 本発明における培養は、好ましくはゼノフリー条件で行われる。「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。
- [0037] 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。
- [0038] 本明細書において、「物質Xの非存在下」とは、外来性(exogenous)の物質Xが添加されていない培地もしくは外来性の物質Xを含まない培地、又は外来性の物質Xの存在しない状態を意味する。
- [0039] 本明細書において、「誘導体」とは、特定の化合物に対して、当該化合物の分子内の一部が、他の官能基または他の原子と置換されることにより生じる化合物群を意図する。本明細書において、タンパク質の「改変体」とは、もとのタンパク質の特性を維持できる範囲でアミノ酸残基の欠失、付加、置換等の変異がされているタンパク質をいう。変異のアミノ酸の数としては、特に制限されないが、1~4、1~3、1~2、又は1個が挙げられる。タンパク質の「改変体」は、もとのタンパク質と少なくとも90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、又は99.5%以上の同一性を示すアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。
- [0040] 本明細書において、「A時間(A日)以降」とはA時間(A日)を含み、A時間(A日)から後のことをいう。「B時間(B日)以内」とは、B時間(B日)を含み、B時間(

B日)から前のことをいう。

- [0041] 「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を指す。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、SNL細胞等が挙げられる。フィーダー細胞は、増殖抑制処理されていることが好ましい。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、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、細胞接着用の足場(細胞外基質)の作製により、多能性幹細胞の未分化維持に貢献する。
- [0042] 本明細書において、フィーダー細胞非存在下(フィーダーフリー)とは、フィーダー細胞非存在下にて培養することである。フィーダー細胞非存在下とは、例えばフィーダー細胞を添加していない条件、又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)の条件が挙げられる。
- [0043] 「細胞凝集体」(cell aggregate)とは、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。細胞集団、胚様体(Embryoid body)、スフェア(Sphere)、スフェロイド(Spheroid)、オルガノイド(Organoid)も細胞凝集体に包含される。細胞凝集体は、好ましくは細胞同士が面接着している。一部の態様において、細胞凝集体の一部分あるいは全部において、細胞同士が細胞接着し、例えば接着結合(adherence junction)を形成している。一部の態様において、二つ以上の細胞凝集体同士をさらに人工的に接着又は凝集させることもできる。細胞集団同士をさらに接着又は凝集させた塊、及びアセンブロイド(assembloid)も細胞凝集体に含まれる。
- [0044] 「均一な細胞凝集体」とは、複数の細胞凝集体を培養する際に各細胞凝集体の大きさが一定であることを意味し、細胞凝集体の大きさを最大径の長さで評価する場合、均一な細胞凝集体とは、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、複数の細胞凝集体のうち75%以上の細胞凝集体において、その最大径が複数の細胞凝集体の最大径平均値の±100%以内、

好ましくは最大径平均値の±50%以内、より好ましくは最大径平均値の±20%以内であることを意味する。

[0045] 「細胞集団」とは、2以上の細胞から構成される細胞群をいう。細胞集団は、一種の細胞から構成されていてもよいし、複数種の細胞から構成されていてもよい。細胞集団を構成する細胞は、培地中に浮遊していてもよいし、培養器材等に接着していてもよい。また、細胞集団を構成する細胞は、単一細胞であってもよいし、細胞集団の少なくとも一部において、細胞同士が細胞接着し、細胞集団を形成していてもよい。ここで「単一細胞」とは、例えば細胞同士の接着（例えば面接着）がほとんどなくなった細胞をいう。一部の態様において、単一細胞に分散されるとは、細胞—細胞間結合（例えば接着結合）がほとんどなくなった状態が挙げられる。細胞集団は、細胞凝集体を含んでよい。

[0046] 「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。

[0047] 本明細書において細胞凝集体、細胞集団および組織は、哺乳動物の細胞凝集体、細胞集団および組織であり、好ましくはげっ歯類（例えばマウス、ラット）又は霊長類（例えばヒト、サル）の細胞凝集体、細胞集団および組織であり、最も好ましくはヒトの細胞凝集体、細胞集団および組織である。

[0048] 本発明は、以下の工程を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法（本発明の方法）を提供する。

（１）多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程、及び

（２）分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン分泌細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程。

[0049] 本発明の方法は、多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程（本発明の工程（１））を含む。

[0050] 本発明の工程（１）の多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団は、生体由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団であっても多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団であってもよいが、後者が好ましい。多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団は、例えば、下記工程（Ａ）及び（Ｂ）により得られる。

（Ａ）視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導可能な条件下において、多能性幹細胞またはその細胞凝集体を培養する工程。

（Ｂ）（Ａ）で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を細胞集団に分散させる工程。

[0051] 工程（Ａ）において分化誘導される視床下部細胞、下垂体前駆細胞及び下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体について、例えば、下垂体前駆細胞及び／又は下垂体ホルモン産生細胞が含まれる下垂体組織の分化段階に基づき分類することができる。視床下部細胞が含まれる視床下部組織ならびに下垂体組織はお互いの分化に影響し合うため、下垂体組織の分化段階及び視床下部組織の分化段階は相関する。複数の分類が可能であるが、本願明細書においては、多能性幹細胞から下垂体組織に至る分化段階を、下垂体前駆細胞のみが含まれる下垂体前駆組織、並びに下垂体前駆細胞及び下垂体ホルモン産生細胞が含まれる下垂体組織の２つの分化段階に分類した上で、更に、前者については前期及び後期、後者については前期、中期及び後期に分類する。これらの分化段階について、以下において説明する。

[0052] 本願明細書における「下垂体前駆組織」とは、下垂体前駆細胞が存在するが、下垂体ホルモン産生細胞が存在しない組織を意味する。一方、本願明細書における「下垂体組織」とは、少なくとも１種類の下垂体ホルモン産生細胞（例：ACTH産生細胞）を含む組織であり、下垂体前駆組織を含んでいても良い

。

[0053] 下垂体前駆組織は、さらに前期(前期下垂体前駆組織という)及び後期(後期下垂体前駆組織という)に分類することができる。前期下垂体前駆組織においては、上述した下垂体前駆細胞のマーカー(例：Lhx3又はPitx1)の発現が誘導され始める(検出され始める)段階であり、後期下垂体前駆組織においては、これらの発現の継続的な増加が認められる。一態様において、前期下垂体前駆組織あるいは下垂体前駆細胞マーカー(例：Lhx3又はPitx1)の発現が誘導され始める(検出され始める)段階の組織としては、総細胞数に対するLhx3陽性細胞又はPitx1陽性細胞の割合が3%未満の組織が挙げられる。一方、後期下垂体前駆組織としては、総細胞数に対するLhx3及びPitx1の少なくとも1つが陽性の細胞の割合が3%以上の組織が挙げられる。当業者であれば当該割合を公知の方法で測定することができる。例えば、Lhx3又はPitx1に対する抗体を用い、免疫染色法やフローサイトメトリーなどの手法により測定することが可能である。

[0054] 下垂体前駆組織が誘導される分化段階においては、視床下部組織が誘導されている。この場合において、前期下垂体前駆組織及び視床下部組織を含む細胞凝集体における視床下部組織では、上述した視床下部のマーカー(例：Rx又はNkx2.1)の発現が誘導され始める段階である。一方、後期下垂体前駆組織及び視床下部組織を含む細胞凝集体における視床下部組織では、これらの発現の継続的な増加が認められる。従って、一態様として、同一凝集体内に下垂体前駆組織及び視床下部組織が含まれる細胞凝集体において、前期下垂体前駆組織を含む細胞凝集体としては、Nkx2.1の発現がピークに達していない組織を含む細胞凝集体が挙げられ、後期下垂体前駆組織を含む細胞凝集体としては、Nkx2.1の発現が3%以上、10%以上、好ましくは20%以上を含む細胞凝集体が挙げられる。

[0055] 下垂体組織は、前期、中期及び後期に分類することができる。なお、下垂体組織においては、下垂体前駆細胞マーカーの発現はピークに達し、前期、中期及び後期に関わらず、その発現はおおよそ一定に維持される。

- [0056] 本明細書において、前期下垂体組織は、下垂体ホルモン産生細胞の誘導が認められ始める段階から、下垂体ホルモン産生細胞として、1又は2種類の下垂体ホルモン産生細胞(例：副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)産生細胞及び／又はプロラクチン(PRL)産生細胞)のみが存在する段階の組織と定義する。
- [0057] 本明細書において、中期下垂体組織は、3～4種類の下垂体ホルモン産生細胞(例：ACTH産生細胞及びPRL産生細胞を含み、さらに黄体化ホルモン(LH)産生細胞及び卵胞刺激ホルモン(FSH)産生細胞からなる群から選択される1～2種類の細胞を含む)が存在する段階の組織と定義する。
- [0058] 本明細書において、後期下垂体組織は、5種類以上の下垂体ホルモン産生細胞(例：ACTH産生細胞、PRL産生細胞、LH産生細胞及びFSH産生細胞、並びに、成長ホルモン(GH)産生細胞又は甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞等の細胞)が存在する段階の組織と定義する。
- [0059] 本明細書において、下垂体組織は、前期、中期及び後期にかけて、ACTH分泌能の継続的な増加が認められる。一態様として、下垂体組織を含む細胞凝集体におけるACTH分泌能は、前期下垂体組織では0.5 pg/mL以上、中期下垂体組織では2 pg/mL以上、後期下垂体組織では20 pg/mL以上である。一態様として、下垂体組織を含む細胞凝集体におけるACTH分泌能は、前期下垂体組織では2 pg/mL未満、中期下垂体組織では20 pg/mL未満である。
- [0060] 下垂体組織及び視床下部組織を含む細胞凝集体における視床下部組織において、Rxの発現は、前期下垂体組織を含む細胞凝集体における視床下部組織においてピークに達し、その後減少に向かう。中期下垂体組織以降の組織を含む細胞凝集体における視床下部組織において、Rxの発現はほとんど認められない。一方、下垂体組織を含む細胞凝集体における視床下部組織において、Nkx2.1の発現は減少を続け、一態様として、後期下垂体組織を含む細胞凝集体における視床下部組織においては、Nkx2.1の発現割合は、10%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下である。一態様として、後期下垂体組織を含む細胞凝集体における視床下部組織においては、Nkx2.1の発現割合は、1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上であってもよい。

- [0061] 一態様として、中期下垂体組織及び視床下部組織を含む細胞凝集体は、3～4種類の下垂体ホルモン産生細胞が存在し、かつ、視床下部組織中にNkx2.1発現細胞が存在する細胞凝集体である。細胞凝集体中の総細胞に対するNkx2.1発現細胞の存在割合は、例えば、2%超、5%以上、10%以上、20%以上であってよい。細胞凝集体中の総細胞に対するNkx2.1発現細胞の存在割合は、例えば、30%以下、20%以下、10%以下であってもよい。別の態様として、中期下垂体組織及び視床下部組織を含む細胞凝集体は、3～4種類の下垂体ホルモン産生細胞が存在し、かつ、視床下部組織中にNkx2.1発現細胞が実質的に存在しない細胞凝集体である。
- [0062] 一態様として、後期下垂体組織及び視床下部組織を含む細胞凝集体は、5種類以上の下垂体ホルモン産生細胞が存在し、かつ、Rx発現細胞及びNkx2.1発現細胞が実質的に存在しない細胞凝集体である。
- [0063] 「特定の細胞が実質的に存在しない」とは、細胞凝集体中の総細胞に対する、特定の細胞の割合が、2%以下、1%以下であることを意味する。
- [0064] 当業者であれば、これらのマーカーの発現のタイムコースを確認することにより、これらの段階と、特定の分化誘導方法における具体的な分化日数とをリンクさせることができる。例えば、後述する分化誘導方法において、分化開始12日～30日前後の細胞凝集体が後期下垂体前駆組織を含み、分化開始30日～60日前後の細胞凝集体が前期下垂体組織を含み、分化開始60日～100日前後の細胞凝集体が中期下垂体組織を含む。
- [0065] 工程（A）において得られる、多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の一態様として、視床下部組織(Nkx2.1発現細胞を含んでもよい)及び下垂体ホルモン産生細胞を1種類以上4種類以下含む下垂体組織を含む細胞凝集体(分化開始30日～100日頃の細胞凝集体)が挙げられる。

工程（A）において得られる、多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の一態様として、視床下部組織(Nkx2.1発現細胞を含んでもよい)及び前記下垂体組織を

含む細胞凝集体(分化開始30日～60日頃の細胞凝集体)が挙げられる。

工程（A）において得られる、多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の一態様として、視床下部組織(Nkx2.1発現細胞を含んでもよい)及び中期下垂体組織を含む細胞凝集体(分化開始60日～100日頃の細胞凝集体)が挙げられる。

[0066] 工程（A）において得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体は、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導可能な条件下において、多能性幹細胞を培養することによって得ることができる。

[0067] 多能性幹細胞を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む凝集体に分化する方法としては、例えば、国際公開第2019/103129号公報に記載された方法が挙げられる。また、例えば、以下の工程に従い実施することもできる。

[0068] 多能性幹細胞を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む凝集体に分化する方法の一態様は、下記工程（1'）～（2）を含む、下垂体組織を含む細胞集団の製造方法（本発明の製造方法）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培養し、細胞集団を形成させる第一工程、

（2）第一工程で得られた細胞集団を、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(Shh)シグナル伝達経路作用物質の存在下に培養し、下垂体組織を含む細胞集団を得る第二工程。

好ましくは、第一工程は細胞の凝集体を形成させる工程であり、第二工程に付す第一工程で得られた細胞集団は細胞の凝集体であり得る。

工程（1'）において、好ましくは、Wntシグナル伝達経路阻害物質にJNKシグナル伝達経路阻害物質を併用する。

工程（2）で得られる下垂体組織を含む細胞集団は、培養時間の長さによって、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体になりうる。

[0069] 本発明の製造方法のより好ましい一態様は、下記工程（a）及び下記工程（1'）～（2）を含む下垂体組織を含む細胞集団の製造方法である。

（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Shh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培養（好ましくは浮遊培養）し、細胞集団を形成させる第一工程、

（2）第一工程で得られた細胞集団を、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の存在下で培養（好ましくは浮遊培養）し、下垂体組織を含有する細胞集団を得る第二工程。

好ましくは、第一工程は細胞の凝集体を形成させる工程であり、第二工程に付す第一工程で得られた細胞集団は細胞の凝集体であり得る。

工程（1'）において、好ましくは、Wntシグナル伝達経路阻害物質にJNKシグナル伝達経路阻害物質を併用する。

工程（2）で得られる下垂体組織を含む細胞集団は、培養時間の長さによって、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であり得る。

[0070] 本発明の製造方法の一層好ましい一態様は、下記工程（a）及び下記工程（1）～（2）を含む下垂体組織を含む細胞集団の製造方法である。

（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Shh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工程で得られた多能性幹細胞をJNKシグナル伝達経路阻害物質およびWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で培養（好ましくは浮遊培養）し、細胞集団を形成させる第一工程、

（2）第一工程で得られた細胞集団を、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の存在下で培養（好ましくは浮遊培養）し、下垂体組織を含有する細胞集団を得る第二工程。

好ましくは、第一工程は細胞の凝集体を形成させる工程であり、第二工程に付す第一工程で得られた細胞集団は細胞の凝集体であり得る。

工程（２）で得られる下垂体組織を含む細胞集団は、培養時間の長さによって、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であり得る。

[0071] 上記に記載した製造方法は、下記の第三工程をさらに含んでもよい。

（３）第二工程で得られた細胞集団を、Shhシグナル伝達経路作用物質の非存在下で培養（好ましくは浮遊培養）し、下垂体組織を含む細胞集団を得る第三工程。

[0072] <工程（a）>：a工程

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Shh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Shhシグナル伝達経路作用物質で処理してから、第一工程において培養（好ましくは浮遊培養）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、得られる細胞集団（凝集体）の質が向上し、分化しやすく、細胞死が生じにくく、下垂体細胞の製造効率が向上する。

[0073] 工程（a）は、フィーダー細胞非存在下で実施する。

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。

[0074] 本発明に係る下垂体の製造方法において、多能性幹細胞は、好ましくは胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞である。人工多能性幹細胞は、所定の機関より入手でき、市販品を購入することもできる。例えばヒト人工多能性幹細胞株201B7株、201B7-Ff細胞、253G1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞、1231A3細胞は京都大学及びiPSアカデミアジャパン株式会社よ

り入手できる。株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたFf-I01細胞、Ff-I14細胞及びQHJI01s04細胞が、京都大学より入手可能である。また、HC-6 #10株、1231A3株及び1383D2株は国立研究開発法人理化学研究所より入手できる。

[0075] 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、形質転換増殖因子 β （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。

[0076] 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。

[0077] 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が挙げられる。

[0078] 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（「SB431」と略記する場合がある。）（4-[4-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-5-(2-pyridyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide）、SB505124（2-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-(1,1-dimethylethyl)-1H-imidazol-5-yl]-6-methylpyridine）、SB525334（6-[2-(1,1-Dimethylethyl)-5-

(6-methyl-2-pyridinyl)-1H-imidazol-4-yl]quinoxaline)、LY2157299(4-[5,6-Dihydro-2-(6-methyl-2-pyridinyl)-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazol-3-yl]-6-quinolinecarboxamide)、LY2109761(4-[5,6-dihydro-2-(2-pyridinyl)-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazol-3-yl]-7-[2-(4-morpholinyl)ethoxy]-quinoline)、GW788388(4-{4-[3-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)benzamide)、LY364947(4-[3-(2-Pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]quinoline)、SD-208(2-(5-Chloro-2-fluorophenyl)pteridin-4-yl)pyridin-4-yl amine)、EW-7197(N-(2-fluorophenyl)-5-(6-methyl-2-pyridinyl)-4-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl-1H-Imidazole-2-methanamine)、A83-01(3-(6-Methylpyridin-2-yl)-4-(4-quinolyl)-1-phenylthiocarbamoyl-1H-pyrazole)、RepSox(2-[5-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-1,5-naphthyridine)、SM16(4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(6-methyl-2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]bicyclo[2.2.2]octane-1-carboxamide)、R268712(4-[2-Fluoro-5-[3-(6-methyl-2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]phenyl]-1H-pyrazole-1-ethanol)、IN1130(3-[5-(6-Methyl-2-pyridinyl)-4-(6-quinoxalinyl)-1H-imidazol-2-yl]methyl]benzamide)、Galunisertib(4-[5,6-Dihydro-2-(6-methyl-2-pyridinyl)-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazol-3-yl]-6-quinolinecarboxamide)、AZ12799734(4-({4-[(2,6-dimethylpyridin-3-yl)oxy]pyridin-2-yl}amino)benzenesulfonamide)、A77-01(4-[3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]quinoline)、KRCA 0008(1,1-[(5-Chloro-2,4-pyrimidinediyl)bis[imino(3-methoxy-4,1-phenylene)-4,1-piperazinediyl]]bisethanone)、GSK 1838705(2-[2-[1-[(Dimethylamino)ethanoyl]-5-(methoxy)-2,3-dihydro-1H-indol-6-yl]amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]amino]-6-fluoro-N-methylbenzamide)、Crizotinib(3-[(1R)-1-(2,6-Dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]-5-[1-(piperidin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-aminopyridine)、Ceritinib(5-Chloro-N2-[2-isopropoxy-5-Methyl-4-(4-piperidyl)phenyl]-N4-(2-isopropylsulfonylphenyl)pyrimidine-2,4-diamine)、ASP 3026(N2-[2-Methoxy-4-[4-(4-methyl-1-piperazinyl)-1-piperidinyl]phenyl]-N4-[2-[(1-m

ethylethyl)sulfon)、TAE684(5-Chloro-N2-[2-methoxy-4-[4-(4-methyl-1-piperazinyl)-1-piperidinyl]phenyl]-N4-[2-[(1-methylethyl)sulfonyl]phenyl]-2,4-pyrimidinediamine)、AZD3463(N-[4-(4-Amino-1-piperidinyl)-2-methoxyphenyl]-5-chloro-4-(1H-indol-3-yl)-2-pyrimidinamine)、TP0427736(6-[4-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)-1H-imidazol-5-yl]-1,3-benzothiazole)、TGFBR1-IN-1(5-(1,3-benzothiazol-6-yl)-N-(4-hydroxyphenyl)-1-(6-methylpyridin-2-yl)pyrazole-3-carboxamide)、TEW-7197(2-fluoro-N-[[5-(6-methylpyridin-2-yl)-4-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl)-1H-imidazol-2-yl]methyl]aniline)、LY3200882(2-[4-[[4-[1-cyclopropyl-3-(oxan-4-yl)pyrazol-4-yl]oxypyridin-2-yl]amino]pyridin-2-yl]propan-2-ol)、BIBF-0775((3Z)-N-Ethyl-2,3-dihydro-N-methyl-2-oxo-3-[phenyl[[4-(1-piperidinylmethyl)phenyl]amino]methylene]-1H-indole-6-carboxamide等のAlk5/TGF β R1阻害剤、SIS3(1-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-2(1H)-isoquinolinyl)-3-(1-methyl-2-phenyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)-2-propen-1-one)等のSMAD3阻害剤、ITD-1(4-[1,1'-Biphenyl]-4-yl-1,4,5,6,7,8-hexahydro-2,7,7-trimethyl-5-oxo-3-quinolinecarboxylic acid ethyl ester)等の受容体分解促進剤及びこれら化合物の誘導体等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。SB431542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。SIS3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。ITD-1は、TGF- β type II receptorのプロテアソーム分解促進剤である。

[0079] TGF β シグナル伝達経路阻害物質は、好ましくはAlk5/TGF β R1阻害剤を含む。Alk5/TGF β R1阻害剤は、好ましくはSB431542、SB505124、SB525334、LY2157299、GW788388、LY364947、SD-208、EW-7197、A83-01、RepSox、SM16、R268712、IN1130、Galunisertib、AZ12799734、A77-01、KRCA 0008、GSK 1838705、Crizotinib、Ceritinib、ASP 3026、TAE684、AZD3463、TP0427736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SB431542又はA83-0

1を含む。

[0080] 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用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。工程（a）におけるTGF β 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100 μ M、より好ましくは約10nM～約50 μ M、さらに好ましくは約100nM～約50 μ M、特に好ましくは約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、上記濃度の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。

[0081] Shh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タンパク質（例えばShh、Ihh）、Shh受容体、Shh受容体アゴニスト、Smoアゴニスト、Purmorphamine(9-cyclohexyl-N-[4-(morpholinyl)phenyl]-2-(1-naphthalenyloxy)-9H-purin-6-amine)、GSA-10(Propyl 4-(1-hexyl-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamido)benzoate)、Hh-Ag1.5、20(S)-Hydroxycholesterol、SAG(Smoothened Agonist:N-Methyl-N'-(3-pyridinylbenzyl)-N'-(3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)-1,4-diaminocyclohexane)、20(S)-hydroxy Cholesterol(3S,8S,9S,10R,13S,14S,17S)-17-[(2R)-2-hydroxy-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol)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。

[0082] Shhシグナル伝達経路作用物質は、好ましくはSAG、Purmorphamine、GSA-10からなる群より含まれる少なくとも1つを含み、より好ましくはSAGを含む。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用いる物質に応じて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、より好ましくは約10nM～約700nM、さらに好ましくは約50nM～約700nM、特に好ましくは約100nM～約600nM、最も好ましくは約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、上記濃度の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。Shh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)。

[0083] 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されない。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。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。ヒト多能性幹細胞(例えばヒト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。

[0084] 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。未分化維持因子は、好ましくは培養する細胞と同一種の哺乳動物の未分化維持因子である。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(例えばbFGF、FGF4、FGF8、EGF、Nodal、ActivinA、ActivinB、TGF β 1、TGF β 2等)が用いられる。未分化維持因子は、好ましくは単離されている。

- [0085] 未分化維持因子は、培養対象である多能性幹細胞の未分化維持能を有する限り、いずれの宿主によって生産されたもの又は人工合成されたものを用いることができる。本発明に用いる未分化維持因子は、生体内で生じるものと同様の修飾を受けたものが好ましく、培養対象である多能性幹細胞と同種の細胞において異種成分を含まない条件下で産生されたものがさらに好ましい。
- [0086] 本発明に係る製造方法の一態様は、単離された未分化維持因子を提供する工程を含む。本発明に係る製造方法の一態様は、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。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。
- [0087] 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。例えばフィーダー細胞非存在下で未分化維持因子として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。
- [0088] 工程（a）は、フィーダー細胞非存在下で実施する。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行われてもよいが、好ましくは接着培養により行われる。フィーダー細胞非存在下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培養器材中で、多能性幹細胞を接着培養する。
- [0089] 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(Vitronectin)等が挙げられる。マトリクスは、好ましくはラミニン511が用いられる(Nat Biotech

no1 28, 611-615(2010))。

[0090] 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E8フラグメントである。ラミニンE8フラグメントは、ラミニン511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)。ラミニン断片としては、好ましくはラミニン511のE8フラグメントが用いられる(Nat Commun 3, 1236(2012)、Scientific Reports 4, 3549(2014))。ラミニンE8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。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。未同定成分の混入を回避する観点から、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511のE8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。

[0091] 未同定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、単離されていることが好ましい。工程(a)におけるフィーダー細胞非存在下での多能性幹細胞の培養においては、好ましくは単離されたラミニン511又はラミニン511のE8フラグメントによって、より好ましくはラミニン511のE8フラグメントによって表面をコーティングした培養器材中で、多能性幹細胞を接着培養する。

[0092] 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。

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。化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、工程(a)において用いられる培地は、好ましくは無血清培地である。培地は、血清代替物を含んでいてもよい。

[0093] 工程(a)における多能性幹細胞の培養時間は、続く第一工程において形

成され得る細胞集団（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、さらに好ましくは12～48時間、特に好ましくは18～28時間であり、例えば24時間である。すなわち、第一工程開始の0.5～144時間前、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第一工程が行われる。

- [0094] 工程（a）の好ましい一態様において、ヒト多能性幹細胞を、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培養器材中で実施される。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。StemFit培地は未分化維持成分としてbFGFを含有する(Scientific Reports(2014)4, 3594)。
- [0095] 工程（a）の好ましい一態様において、ヒト多能性幹細胞を、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。
- [0096] 工程（a）及び後述する工程において、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。CO₂濃度は、重炭酸緩衝系の培地を用いる場合、例えば約1%から約10%、好ましくは約5%である。
- [0097] <工程（1）>、<工程（1'）>：第一工程
工程（1'）では、Wntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で多能性幹細胞を培養し、細胞集団を得る。
- [0098] 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、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。古典的Wnt経路は、 β -Cateninに

よって伝達される。非古典的Wnt経路としては、Planar Cell Polarity(PCP)経路、Wnt/JNK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。非古典的Wnt経路では、Wnt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、本発明では前記したJNK経路以外のそれらの因子もWnt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Wntシグナル伝達経路阻害物質に含まれる。

[0099] Wntシグナル伝達経路阻害物質は、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。阻害物質は、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。

[0100] 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(sFRP1~5、Wnt Inhibitory Factor-1(WIF-1)、Cerberus)、Dickkopf(Dkk)クラスに属するタンパク質(Dkk1~4、Kremen)、PCDD1、APCDD1L、Draxinファミリーに属するタンパク質、IGFBP-4、Notum、SOST/Sclerostinファミリーに属するタンパク質等が挙げられる。

[0101] Wntシグナル伝達経路阻害物質としては、当業者に周知の化合物を使用することができる。古典的Wntシグナル伝達経路の阻害物質として例えばFrizzled阻害剤、Dishevelled(Dvl)阻害剤、Tankyrase(TANK)阻害剤、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、CREB-binding protein(CBP)阻害剤、BCL-9阻害剤、TCF分解誘導薬(Am J Cancer Res.2015;5(8):2344-2360)等が挙げられる。非古典的Wnt経路の阻害物質として、例えばPorcupine(PORCN)阻害剤、Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II(CaMKII

I)阻害剤、(TGF- β -activated kinase 1(TAK1)阻害剤、Nemo-Like Kinase(NLK)阻害剤、LIM Kinase阻害剤、mammalian target of rapamycin(mTOR)阻害剤、Rac阻害剤、c-Jun NH 2-terminal kinase(JNK)阻害剤、protein kinase C(PKC)阻害剤、Methionine Aminopeptidase 2(MetAP2)阻害剤、Calcineurin阻害剤、nuclear factor of activated T cells(NFAT)阻害剤、ROCK阻害剤等が挙げられる。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KY02111(N-(6-Chloro-2-benzothiazolyl)-3,4-dimethoxybenzenepropanamide)、KY03-I(2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)butanamide)-6-Iodobenzothiazole)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。

[0102] PORCN阻害剤として例えばIWP-2(N-(6-Methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]-acetamide)、IWP-3(2-[[3-(4-fluorophenyl)-3,4,6,7-tetrahydro-4-oxothieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]thio]-N-(6-methyl-2-benzothiazolyl)-acetamide)、IWP-4(N-(6-methyl-2-benzothiazolyl)-2-[[3,4,6,7-tetrahydro-3-(2-methoxyphenyl)-4-oxothieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]thio]-acetamide)、IWP-L6(N-(5-phenyl-2-pyridinyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]-acetamide)、IWP-12(N-(6-Methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-3,6-dimethyl-4-oxothieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]acetamide)、IWP-01(1H-1,2,3-Triazole-1-acetamide,5-phenyl-N-(5-phenyl-2-pyridinyl)-4-(4-pyridinyl)-)、LGK-974(2-(2',3-Dimethyl-2,4'-bipyridin-5-yl)-N-(5-(pyrazin-2-yl)pyridin-2-yl)acetamide)、Wnt-C59(2-[4-(2-Methylpyridin-4-yl)phenyl]-N-[4-(pyridin-3-yl)phenyl]acetamide)、ETC-131、ETC-159(1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-2,6-dioxo-N-(6-phenyl-3-pyridazinyl)-7H-purine-7-acetamide)、GNF-1331(N-(6-methoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-[(4-propyl-5-pyridin-4-yl-1,2,4-triazol-3-yl)sulfanyl]acetamide)、GNF-6231(N-[5-(4-Acetyl-1-piperazinyl)-2-pyridinyl]-2'-fluoro-3-methyl[2,4'-bipyridine]-5-acetamide)、Porcn-IN-1(

N-[[5-fluoro-6-(2-methylpyridin-4-yl)pyridin-3-yl]methyl]-9H-carbazole-2-carboxamide)、RXC004、CGX1321及びこれらの誘導体等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0103] Wntシグナル伝達経路阻害物質は、好ましくはPORCN阻害剤、KY02111及びKY03-I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PORCN阻害剤を含む。Wntシグナル伝達経路阻害物質は、Wntの非古典的Wnt経路への阻害活性を有する物質を含むこともまた好ましい。Wntシグナル伝達経路阻害物質は、より好ましくはWnt/Planar Cell Polarity(PCP)経路への阻害活性を有する物質を含む。本発明で用いられるPORCN阻害剤は、好ましくはIWP-2、IWP-3、IWP-4、IWP-L6、IWP-12、LGK-974、Wnt-C59、ETC-159及びGNF-6231からなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、より好ましくはIWP-2又はWnt-C59を含み、さらに好ましくはIWP-2を含む。

[0104] 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用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。下垂体を構成する細胞の製造効率向上の観点からは、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10nM～約50 μ Mであり、好ましくは約10nM～約30 μ Mであり、さらに好ましくは約100nM～約10 μ Mであり、最も好ましくは約0.5 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10nM～約30 μ Mであり、好ましくは約20nM～約10 μ Mであり、より好ましくは約500nMである。KY02111を用いる場合は、その濃度は通常約10nM～約50 μ Mであり、好ましくは10nM～約30 μ Mであり、より好ましくは約100nM～約10 μ Mであり、さらに好ましくは約5 μ Mである。

[0105] 工程(1')の培地中には、c-Jun N末キナーゼ(JNK)シグナル伝達経路阻害物質がさらに存在することが好ましい。このような第一工程を工程(1)とする。即ち、工程(1)は、多能性幹細胞をJNKシグナル伝達経路阻害物質およびWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で培養する第一工程である。

JNKはMAPKファミリーに属するキナーゼであり、各種の環境ストレス、炎症

性サイトカイン、成長因子、GPCRアゴニストによる刺激の細胞内シグナル伝達に関与する。

[0106] 本発明においてJNKシグナル伝達経路阻害物質とは、JNKによって伝達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。JNKシグナル伝達経路阻害物質として例えば、JNKシグナル伝達機構の上流ないし下流の因子、もしくはJNKそのものの酵素活性、多量体化、他の因子や核酸との結合を阻害する、分解を促進する等のメカニズムによりシグナル伝達を阻害する活性を有する物質がある。JNKシグナル伝達経路阻害物質としては、例えばJNK阻害剤、Rac阻害剤、MKK阻害剤、MEK阻害剤、Src阻害剤、受容体チロシンキナーゼ(RTK)阻害剤、ASK阻害剤等が挙げられるがこれに限定されない。

[0107] c-Jun N末キナーゼ(JNK)阻害剤としては、例えばJNK-IN-8((E)-3-(4-(dimethylamino)but-2-enamido)-N-(3-methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)benzamide)、SP600125(Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-one)、DB07268(2-[[2-[(3-Hydroxyphenyl)amino]-4-pyrimidinyl]amino]benzamide)、Tanzisertib(trans-4-[[9-[(3S)-Tetrahydro-3-furanyl]-8-[(2,4,6-trifluorophenyl)amino]-9H-purin-2-yl]amino]cyclohexanol)、Bentamapimod(1,3-Benzothiazol-2-yl)[2-[[4-[(morpholin-4-yl)methyl]benzyl]oxy]pyrimidin-4-yl]acetonitrile、TCS JNK 6o(N-(4-Amino-5-cyano-6-ethoxy-2-pyridinyl)-2,5-dimethoxybenzeneacetamide)、SU3327(5-[(5-Nitro-2-thiazolyl)thio]-1,3,4thiadiazol-2-amine)、CEP1347((9S,10R,12R)-5-16-Bis[(ethylthio)methyl]-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid methyl ester)、c-JUN peptide、AEG3482(6-Phenylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide)、TCS JNK 5a(N-(3-Cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thienyl-2-yl)-1-naphthalenecarboxamide)、BI-78D3(4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2,4-dihydro-5-[(5-nitro-2-thiazolyl)thio]-3H-1,2,4-triazol-3-one)、IQ-3(11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one 0-(2-furanylcarbonyl)oxime)、SR 3576(3-[4-[[[(3-Methyl

lphenyl)amino]carbonyl]amino]-1H-pyrazol-1-yl]-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)benzamide)、IQ-1S(11H-Indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one oxime sodium salt)、JIP-1(153-163)、CC-401(3-[3-[2-(1-Piperidinyl)ethoxy]phenyl]-5-(1H-1,2,4-triazol-5-yl)-1H-indazole dihydrochloride)、BI-87G3(2-(5-Nitrothiazol-2-ylthio)benzo[d]thiazole)、AS601245(1,3-Benzothiazol-2-yl-(2-{[2-(3-pyridinyl)ethyl]amino}-4-pyrimidinyl) acetonitrile)、CV-65(3,7-Dimethyl-1,9-dihydropyrido[3,2-g]quinoline-2,5,8,10-tetrone)、D-JNK1(CAS番号 1445179-97-4)、ER-358063、ER-409903、ER-417258、CC-359((4S)-4-(2,4-difluoro-5-pyrimidin-5-ylphenyl)-4-methyl-5,6-dihydro-1,3-thiazin-2-amine)、CC-401(3-[3-(2-piperidin-1-ylethoxy)phenyl]-5-(1H-1,2,4-triazol-5-yl)-1H-indazole)、CC-930(4-[[9-[(3S)-oxolan-3-yl]-8-(2,4,6-trifluoroanilino)purin-2-yl]amino]cyclohexan-1-ol)、SB203580(4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine)及びこれらの誘導体等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0108] Rac阻害剤としては、例えばEHT1864(5-(5-(7-(Trifluoromethyl)quinolin-4-ylthio)pentyloxy)-2-(morpholinomethyl)-4H-pyran-4-one dihydrochloride)、NSC23766(N6-[2-[[4-(Diethylamino)-1-methylbutyl]amino]-6-methyl-4-pyrimidinyl]-2-methyl-4,6-quinolinediamine trihydrochloride)、EHop-016(N4-(9-Ethyl-9H-carbazol-3-yl)-N2-[3-(4-morpholinyl)propyl]-2,4-pyrimidinediamine)、1A-116(N-(3,5-Dimethylphenyl)-N'-[2-(trifluoromethyl)phenyl]guanidine)、ZCL278(2-(4-bromo-2-chlorophenoxy)-N-(4-(N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl)phenylcarbamothioyl)acetamide)、MBQ-167(9-ethyl-3-(5-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-9H-carbazole)、KRpep-2d(actinium;[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(3R,8R,11S,14S,20S,23S,26S,29S,32S,35S,38S)-8-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-amino-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentane-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]]]]]]])

mido-1-oxopentan-2-yl]carbamoyl]-29-[(2R)-butan-2-yl]-20-(carboxymethyl)-26-(hydroxymethyl)-23,32-bis[(4-hydroxyphenyl)methyl]-35-(2-methylpropyl)-2,10,13,19,22,25,28,31,34,37-decaoxo-11-propan-2-yl-5,6-dithia-1,9,12,18,21,24,27,30,33,36-decazatricyclo[36.3.0.0¹⁴,18]hentetracontan-3-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]azanide)、ARS-853(1-[3-[4-[2-[[4-Chloro-2-hydroxy-5-(1-methylcyclopropyl)phenyl]amino]acetyl]-1-piperazinyl]-1-azetidiny]-2-propen-1-one)、Salirasib(2-(((2E,6E)-3,7,11-Trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl)thio)benzoicacid)、ML141(4-(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydropyrazol-1-yl)benzenesulfonamide)及びこれらの誘導体等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

- [0109] 本発明におけるJNKシグナル伝達経路阻害物質の添加時期は、ヒト多能性幹細胞からの下垂体組織の製造の効率改善効果が発揮される限り限定されないが、後述する工程(2)でBMPシグナル伝達経路作用物質を添加する時点で既に添加されていることが好ましく、分化誘導の開始から72時間以内である。より好ましいJNKシグナル伝達経路阻害物質の添加時期は、分化誘導の開始と同時である。
- [0110] 第一工程(工程(1)又は工程(1'))の培地中には、TGF β シグナル伝達経路阻害物質がさらに存在することが好ましい。第一工程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一のものが用いられ得る。工程(a)及び第一工程の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。
- [0111] 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用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。TGF β 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100 μ M、より好ましくは約100nM～約50 μ M、さらに好ましくは約5

00nM～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、上記濃度の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。

[0112] 第一工程及び以降の工程において、中内胚葉への分化を抑制し、外胚葉・プラコード様組織の製造効率を向上させる観点から、Transforming growth factor- β -activated kinase 1(TAK1)に対する阻害物質を添加することもまた好ましい。TAK1はTGF β 、骨形成タンパク質(BMP)、インターロイキン1(IL-1)、TNF- α 等により活性化されるシグナル伝達を媒介する、MAPキナーゼキナーゼ(MAPKKK)ファミリーのセリンスレオニンタンパク質キナーゼである。

[0113] TAK1阻害物質とはTAK1が媒介す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TAK1と基質の結合を阻害する物質、TAK1のリン酸化を阻害する物質、TAK1の脱リン酸化を促進する物質、TAK1の転写や翻訳を阻害する物質、TAK1の分解を促進する物質等が挙げられる。

[0114] TAK1阻害物質として、例えば(5Z)-7-oxozeaenol((3S, 5Z, 8S, 9S, 11E)-3, 4, 9, 10-tetrahydro-8, 9, 16-trihydroxy-14-methoxy-3-methyl-1H-2-benzoxacyclotetradecin-1, 7(8H)-dione)、N-Des(aminocarbonyl)AZ-TAK1 inhibitor(3-Amino-5-[4-(4-morpholinylmethyl)phenyl]-2-thiophenecarboxamide)、Takinib(N1-(1-Propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1, 3-benzenedicarboxamide)、NG25(N-[4-[(4-Ethyl-1-piperazinyl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4-methyl-3-(1H-pyrrolo[2, 3-b]pyridin-4-yloxy)-benzamide trihydrochloride)、Sarsasapogenin及びこれらの誘導体、類縁体が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0115] TAK1阻害物質は、好ましくは(5Z)-7-oxozeaenolである。第一工程におけるTAK1阻害物質として(5Z)-7-oxozeaenol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25 μ M、さらに好ましくは約500nM～約10 μ Mの濃度で使用される。また、(5Z)-7-oxozeaenol

以外のTAK1阻害物質を使用する場合、上記濃度の(5Z)-7-oxozeaenolと同等のTAK1阻害活性を示す濃度で用いられることが好ましい。下垂体組織に含有される細胞の割合の制御の観点から、上記TAK1阻害物質は第一工程及び以降の工程の任意の段階で添加しその後に除去することができる。好ましい一態様としては、上記TAK1阻害物質は後述する工程（b）開始時に添加する。

[0116] 第一工程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。第一工程において用いられる培地は血清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。無血清培地としては、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1xChemically Defined Lipid Concentrateが添加された培地、又はGMEMに5%~20%KSR、NEAA、ピルビン酸及び2-メルカプトエタノールが添加された培地が挙げられる。

[0117] 第一工程の開始時において、細胞は接着状態又は浮遊状態のいずれでもよい。好ましい一態様として、多能性幹細胞を単一細胞に分散させた後に再凝集させ、浮遊状態の細胞凝集体を形成させる。このために、第一工程の開始前に、多能性幹細胞、一例として工程（a）で得られた多能性幹細胞を単一細胞に分散する操作を行うことが好ましい。分散させる操作により得られた「分散された細胞」は、好ましくは単一細胞であるが、例えば2以上100以下の少数の細胞からなる細胞の塊を含んでもよく、2以上50以下の細胞からなる細胞の塊を含んでもよい。「分散された細胞」は、例えば単一細胞を7割以上及び細胞の塊を3割以下含んでいてもよく、好ましくは単一細胞を8割以上及び細胞の塊を2割以下含む。

[0118] 多能性幹細胞を分散させる方法としては、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、これらの処理を組み合わせても

よい。細胞を分散させる方法としては、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。

[0119] 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、Rho-associated protein kinase(ROCK)阻害物質、ミオシン阻害物質、ポリアミン類、統合的ストレス応答(Integrated stress response:ISR)阻害剤、カスパーゼ阻害剤、血清、又は血清代替物等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、ヒトの多能性幹細胞）の細胞死を抑制するために、ROCK阻害物質を第一工程の培養開始時から添加することは好ましい。ROCK阻害物質としては、Y-27632((R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide, dihydrochloride)、Fasudil(HA1077)(1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)homopiperazine, hydrochloride)、H-1152(5-[[[(2S)-hexahydro-2-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl]sulfonyl]-4-methyl-isoquinoline, dihydrochloride)、HA-1100(Hydroxyfasudil)([1-(1-Hydroxy-5-isoquinolinesulfonyl)homopiperazine, hydrochloride)、Chroman 1((3S)-N-[2-[2-(dimethylamino)ethoxy]-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl]-6-methoxy-3,4-dihydro-2H-chromene-3-carboxamide)、Belumosudil(KD025、2-[3-[4-[(1H-Indazol-5-yl)amino]quinazolin-2-yl]phenoxy]-N-isopropylacetamide)、HS D1590([2-Methoxy-3-(4,5,10-triazatetracyclo[7.7.0.02,6.012,16]hexadeca-1(9),2(6),3,7,10,12(16)-hexaen-11-yl)phenyl]boronic acid)、CRT0066854((S)-3-phenyl-N1-(2-pyridin-4-yl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl)propane-1,2-diamine)、RKI1447(1-(3-hydroxybenzyl)-3-(4-(pyridin-4-yl)thiazol-2-yl)urea)、Ripasudil(4-Fluoro-5-[[[(2S)-hexahydro-2-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl]sulfonyl]isoquinoline)、GSK269962A(N-[3-[2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethylimidazo[4,5-c]pyridin-6-yl]oxyphenyl]-4-(2-morpholin-4-ylethoxy)benzamide)、GSK429286A(N-(6-fluoro-1H-indazol-5-yl)-2-methyl-6-oxo-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,4,5,6-tetrahydropyridine-3-carboxamide)、Y-33075((R)-4-(1-Am

inoethyl)-N-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-ylbenzamide)、LX7101(N,N-Dimethylcarbamic acid 3-[[[4-(aminomethyl)-1-(5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-4-piperidinyl]carbonyl]amino]phenyl ester)、AT13148((alphaS)-alpha-(Aminomethyl)-alpha-(4-chlorophenyl)-4-(1H-pyrazol-4-yl)benzenemethanol)、SAR407899(6-(piperidin-4-yloxy)isoquinolin-1(2H)-one hydrochloride)、GSK180736A(4-(4-fluorophenyl)-N-(1H-indazol-5-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxamide)、Hydroxyfasudil(1-(1-hydroxy-5-isoquinolinesulfonyl)homopiperazine,HCl)、bdp5290(4-Chloro-1-(4-piperidinyl)-N-[3-(2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-1H-pyrazole-3-carboxamide)、sr-3677(N-[2-[2-(Dimethylamino)ethoxy]-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl]-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-carboxamidehydrochloride)、CCG-222740(N-(4-Chlorophenyl)-5,5-difluoro-1-(3-(furan-2-yl)benzoyl)piperidine-3-carboxamide)、ROCK inhibitor-2(N-[(1R)-1-(3-methoxyphenyl)ethyl]-4-pyridin-4-ylbenzamide)、Rho-Kinase-IN-1(N-[1-[(4-methylsulfonylphenyl)methyl]piperidin-3-yl]-1H-indazol-5-amine)、ZINC00881524(N-(4,5-dihydronaphtho[1,2-d]thiazol-2-yl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide)、SB772077B((3S)-1-[[2-(4-Amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-7-yl]carbonyl]-3-pyrrolidinamine dihydrochloride)、Verosudil(N-(1,2-Dihydro-1-oxo-6-isoquinolinyl)-alpha-(dimethylamino)-3-thiopheneacetamide)、GSK-25(4-(4-chloro-2-fluorophenyl)-2-(2-chloropyridin-4-yl)-1-(6-fluoro-1H-indazol-5-yl)-6-methyl-4H-pyrimidine-5-carboxamide)及びこれらの誘導体等を挙げることができる。細胞保護剤としては、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。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。第一工程において、細胞保護剤としてROCK阻害物質であるY-27632を添加する場合は、通常約10nM～約10mM、好ましくは約100nM～約1mM、より好ましくは約1μM～約100μMの濃度となるよう

に培養環境中に添加する。第一工程において、細胞保護剤としてROCK阻害物質であるChroman 1を添加する場合は、通常約10pM～約1mM、好ましくは約100pM～約100 μ M、より好ましくは約1nM～約10 μ Mの濃度となるように培養環境中に添加する。

[0120] 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、パパイン等の酵素及びエチレンジアミン四酢酸等のキレート剤の少なくとも1つ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。工程(a)の後に得られた多能性幹細胞の処理における好ましい細胞分散液は、TrypLE Select又は5mMのEDTAを添加したリン酸緩衝液(PBS)であるが、これに限定されない。

[0121] 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。

[0122] 多能性幹細胞を分散させる方法としては、例えば多能性幹細胞のコロニーをROCK阻害物質の存在下で、TrypLE Select、エチレンジアミン四酢酸又は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。

[0123] 第一工程において浮遊培養を実施する場合は、分散された多能性幹細胞の懸濁液を細胞非接着性の培養器材中に播種する。培養器材が非接着性である場合、細胞は浮遊培養され、複数の多能性幹細胞が集合して細胞凝集体を形成する。

[0124] 浮遊培養する際、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材に播種することにより、1つの培養器材中に複数の細胞凝集体を同時に形成させてもよいが、細胞凝集体ごとの大きさのばらつきを生じにくくする観点からは、例えば細胞非接着性の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播種することが好ましい。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1個の細胞凝集体を形成させることができる。例えば培養器材の表面に超親水性のポリマーをコートする等の加工により培養器材を細胞非接着性とすることができる。細胞非接着性のマルチウェルプレートとしては、例えばPrimeSurface 96V底プレート(MS-9096V、住友ベークライト社製)等が挙げられる。より迅速に細胞凝集体を形成させるために遠心操作を行ってもよい。各ウェルで形成された細胞凝集体を複数のウェルから回収することにより、均一な細胞凝集体の集団を得ることができる。細胞凝集体が均一であれば、その後の工程において、ウェルごと及び反復実験ごとの製造効率をより安定させることができ、より再現性よく下垂体を構成する細胞を製造することができる。

[0125] 分散された多能性幹細胞から細胞凝集体を形成させるための別の態様としては、底面に細胞が一ヶ所に沈降して凝集体の形成が促進されるすり鉢、下向きの四角錐、凹状等の加工、グリッド、隆起等が複数形成されている培養器材、ないし凝集体を形成しやすいように底面の一部のみに細胞が接着可能な加工を施されている培養器材等を用いることもできる。上記のような培養器材としては、例えば胚様体形成プレートAggreWell(StemCell Technologies社製)、PAMCELL(ANK社製)、スフェロイドマイクロプレート(Corning社製)、NanoCulture Plate/Dish (Organogenix社製)、Cell-able(東洋合成社製)、EZSPHERE(AGCテクノグラス社製)、SPHERICALPLATE 5D(水戸工業社製)、TASCL(シムスバイオ社製)等が挙げられるが、これに限定されない。

[0126] 培養器材としては、各ウェル内に細胞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ることもまた好ましい。このような三次元細胞培養容器としては、例えばPrimeSurface 96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。このプレートには96ウェルのそれぞれの上部に培地が出入りできる細い開口部(スリット)が設けられている。スリットは細胞凝集体が通過しにくい幅に設定されているため、細胞凝集体同士の癒着を防止しながら、プレート全体の培地を一度に交換することができ、操作の効率性及び細胞凝集体の質

を向上させることができる。

[0127] 第一工程における多能性幹細胞の濃度は、細胞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（例えば工程（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、さらに好ましくは約 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各ウェルに添加し、プレートを静置して細胞凝集体を形成させる。細胞数は、血球計算盤で計数することによって求めることができる。

[0128] 細胞凝集体を形成させるために必要な浮遊培養の時間は、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（ヒトiPS細胞等）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時間以内である。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は、例えばヒト多能性幹細胞（ヒトiPS細胞等）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時間以内である。細胞凝集体を形成するまでの時間は、細胞を凝集させる用具や、遠心条件等を調整することにより適宜調節することが可能である。

[0129] 多能性幹細胞を迅速に集合させて細胞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。細胞の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 $0.1 \sim 2.0 \text{ cm}^2$ 程度のプレート）やマイクロポア等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 1.88cm^2 程度）、48ウェルプレート（面積が平底換算で 1.0cm^2 程度）、96ウェルプレート（面積が平底換算で 0.35cm^2 程度、内径 $6\sim 8\text{mm}$ 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底又は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 $60\text{mm}\sim 150\text{mm}$ 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、好ましくは細胞非接着性コートした底面を用いるのが好ましい。

[0130] 細胞凝集体を形成させる別の手法として、立体印刷機、3Dプリンターを用いることもまた好ましい。分散された単一の細胞、ないし複数の細胞から構成されるスフェロイドを、生体適合性を有するインク（バイオインク）に懸濁し、バイオ3Dプリンター（例えばCellink社製BIO X等）で出力する、あるいは細胞集団をニードルに刺して積み上げる（サイフューズ社製 Spike等）といった手法により、所望の形態の細胞集団を調製することができる。

[0131] 細胞凝集体が形成されたことは、細胞凝集体のサイズ及び細胞数、巨視的形態、組織染色解析による微視的形態及びその均一性、分化及び未分化マーカーの発現及びその均一性、分化マーカーの発現制御及びその同期性、分化効率の凝集体間の再現性等に基づき判断することが可能である。

[0132] 第一工程の開始時において、好ましい一態様として、接着培養を実施する。工程（a）後の培養器材上の多能性幹細胞をそのまま第一工程に用いてもよいし、多能性幹細胞を単一細胞に分散させた後に再度接着性の培養器材に播種してもよい。多能性幹細胞の単一細胞への分散後の再播種を実施する際

に、適切な細胞外マトリクス又は合成細胞接着分子を足場として用いてもよい。足場により、表面をコーティングした培養器材中で、多能性幹細胞を接着培養できる。細胞外マトリクスは、好ましくはマトリゲル又はラミニンである。合成細胞接着分子としては、ポリ-D-リジン、RGD配列等細胞接着性のドメインを含有する合成ペプチド等が挙げられる。細胞の播種数としては下垂体への分化が生じる限り特に限定されないが、細胞間の接着と相互作用を再現する観点から、培養器材への播種後72時間以内に細胞密度が器材の培養スペースの6割以上に相当するセミコンフルエントに到達するような密度であることもまた好ましい。

[0133] 接着性の培養器材として、マイクロパターンが施された培養器材を用いることもまた好ましい。培養器材上のマイクロパターンは、細胞接着性領域と細胞非接着性領域から構成することができ、細胞接着性領域で細胞が接着培養されることが好ましい。細胞接着性領域と細胞非接着性領域の形状は、培養器材上に展開可能である限り限定されない。細胞接着性領域と細胞非接着性領域は、一つの培養器材上に単一の領域が形成されていてもよいし、複数個形成されていてもよい。細胞接着性領域は、接着性を向上させる目的で人工的に処理されていることが好ましい。マイクロパターンが施された培養器材としては、例えばCYT00chip(CYT00社製)、ibidi Micropatterning(ibidi社製)等が挙げられる。PDMS製モールドとマトリクス等を用いて培養器材を調製することもできる。あるいは、細胞外マトリックス、細胞接着を促進する基質等でコートされた培養器材を例えば細胞プロセッシング装置(Model:CPD-017、片岡製作所社製)等を用いてレーザー等で加工し、細胞接着性領域と細胞非接着性領域を任意の形状に作成しても良い。工程(a)で得られた多能性幹細胞をマイクロパターンが施された培養器材上で培養する場合、例えば既報の方法を参照し実施することができる(Nature protocols, 11(11), 2223-2232.)。

[0134] 培養器材が培地の灌流を行なうための流路(マイクロ流路)を有することも好ましく、第一工程及びその後の工程において、灌流環境下で細胞を培養

してもよい。このような培養器材をマイクロ流体チップともいう。培養器材（例えばマイクロ流体チップ）は、本発明の製造方法において培養される細胞以外の細胞又は組織を培養する他の培養器材（例えばマイクロ流体チップ）と流路により接続されていてもよい。これにより、下垂体と他の細胞又は組織との相互作用を再現することができる。下垂体と共培養する他の細胞又は組織としては、下垂体から分泌されるホルモンによる調節を受ける組織、下垂体の成長、分化、成熟、生存を促進する組織、例えば脳、血管、骨、筋肉、脂肪、甲状腺、肝臓、副腎、精巣、卵巣、乳房の細胞又は組織等が挙げられるが、これらに限定されない。培地の灌流の為の方法としては、例えばマグネティックスターラー、ペリスタルティックポンプ等の使用が挙げられるが、これに限定されない。

[0135] 培養器材は、酸素又は培地を透過可能な膜を有してもよい。培養器材は、化合物、増殖因子等の濃度勾配を形成可能であってもよい。膜は、例えば多孔質膜である。このような膜を有する培養器材においては、膜で隔てた一方で本発明の製造方法によって細胞を培養し、他方でそれ以外の細胞又は組織、フィーダー細胞などを培養することができる。これにより、下垂体を構成する細胞又はその前駆細胞及びこれらを含む細胞集団と、他の細胞又は組織とをコンタミネーションさせることなく培養することができる。

[0136] 第一工程及び以降の工程において、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。

[0137] ある時点で、特定の成分を添加する場合、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、細胞又は細胞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（登録商標）、マルチチャンネルピペット、連続分注器等が挙げられる。例えば培養器材として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を使ってもよい。

[0138] 第一工程における培養の時間は、通常8時間～6日間程度、好ましくは12時間～60時間程度である。

[0139] 第一工程及び以降の工程において、下垂体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US20160326491 A1号に記載のBRL-54443、Phenanthroline、Parthenolide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BRL-54443を用いる場合は通常約10nM～約100 μ M、Phenanthrolineを用いる場合は通常約10nM～約100 μ M、Parthenolideを用いる場合は通常約10nM～約100 μ Mの濃度で用いられる。

[0140] 第一工程において、下垂体への分化誘導効率を改善する観点から、Shhシグナル伝達経路作用物質の存在下で培養を実施することもできる。第一工程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得る。工程（a）及び第一工程の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り、また好ましくは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用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。第一工程において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3 μ M、好ましくは約10nM～約2 μ M、より好ましくは約30nM～約1 μ M、更に好ましくは約50nM～約500nMの濃度で使用される。

[0141] <工程（２）>

工程（２）は、BMPシグナル伝達経路作用物質及びShhシグナル伝達経路作用物質の存在下で、第一工程で得られた細胞集団を培養する。第一工程で細胞を浮遊培養している場合は、工程（２）でも引き続き形成された細胞凝集体を浮遊培養すればよい。第一工程で細胞を接着培養している場合は、工程（２）でも引き続き細胞を接着培養すればよい。第一工程で細胞を浮遊培養した後、工程（２）で接着培養してもよい。

[0142] 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により媒介されるシグナル伝達経路を増強し得る物質は、例えば培養環境中のBMPリガンドを安定化し、力価を向上させる物質、I型BMP受容体であるALK-1、ALK-2、ALK-3、ALK-6と結合し、受容体の下流の細胞内シグナル伝達を活性化、惹起する物質、細胞内のBMPシグナル伝達に関与するSmad-1、Smad-5、Smad-8、Smad-9のリン酸化を惹起する物質、Smad-1/5/8/9による遺伝子の転写の活性化や抑制等の機能を誘導・増強する物質等が挙げられる。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、GDF5、6、7等のGDFタンパク質、抗BMP受容体抗体及びBMP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。生物学的活性の見地からのBMPシグナル伝達経路作用物質の定義として、例えばマウス前駆軟骨細胞株ATDC5、マウス頭蓋冠由来細胞株MC3T3-E1、マウス横紋筋由来細胞株C2C12等の細胞に対する骨芽細胞様細胞への分化誘導能、及びアルカリホスファターゼ産生誘導能を有する物質が挙げられる。上記活性を有する物質としては、例えばBMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP9、BMP10、BMP13/GDF6、BMP14/GDF5、GDF7等が挙げられる。

[0143] BMP2タンパク質及びBMP4タンパク質は例えばR&D Systemsから、BMP7タンパク質は例えばBiolegend社から、GDF5タンパク質は例えばペプロテック社から、GDF6タンパク質は例えばプライムジーン社から、GDF7タンパク質は例えば富士フイルム和光純薬社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BMP2、BMP4、BMP7、BMP13及びGDF7からなる群より選ばれる少

なくとも1つのタンパク質を含み、より好ましくはBMP4を含む。

[0144] 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用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。下垂体を構成する細胞の製造効率向上の観点から、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25pM～約25nM、さらに好ましくは約25pM～約5nM、特に好ましくは約100pM～約5nM、最も好ましくは約500pM～約2nM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、上述の濃度の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。当業者であれば、BMPシグナル伝達経路作用物質として例えば市販の組み換えBMPタンパク質等を用いる場合、製品添付書類に記載の活性、例えばマウス前駆軟骨細胞株ATDC5に対するアルカリホスファターゼ産生誘導能のED50等の値と上述のBMP4の濃度と活性を比較することにより、添加するBMPシグナル伝達経路作用物質濃度を容易に決定することができる。

[0145] BMP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。BMPシグナル伝達経路作用物質としては、例えばSmurf1阻害物質、Chk1阻害物質、リン酸化Smad安定化物質等が挙げられる。上記のような活性を有する化合物としては、例えばA-01([4-[[4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]sulfonyl]-1-piperazinyl][4-(5-methyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl]methanone)、PD407824(9-Hydroxy-4-phenyl-pyrrolo[3,4-c]carbazole-1,3(2H,6H)-dione)、SB4(2-[[[(4-Bromophenyl)methyl]thio]benzoxazole)、SJ000291942(2-(4-Ethylphenoxy)-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-acetamide)及びこれらの誘導体等が挙げられる。

[0146] 工程(2)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得る。工程(a)及び工程(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り、また好ましくは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

範囲で用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。工程（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。

[0147] 工程（２）において用いられる培地は、Shhシグナル伝達経路作用物質及びBMP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）において用いられる培地としては、第一工程に挙げた培地が挙げられる。

[0148] 下垂体の製造効率向上の観点から、工程（２）の開始時期は、第一工程における培養開始から好ましくは0.5時間以降6日以内であり、より好ましくは0.5時間以降72時間以内であり、さらに好ましくは24時間以降60時間以内である。浮遊培養を実施する場合、Wntシグナル経路阻害物質存在下で上記期間に工程（２）を開始すると、細胞凝集体の表面に非神経上皮様の組織が形成され、極めて効率よく下垂体が形成される。

[0149] 第一工程で浮遊培養を行なっている場合、下垂体を構成する細胞の製造効率向上の観点から、工程（２）の開始時期は、好ましくは第一工程において形成された細胞凝集体の表層における１割以上、より好ましくは３割以上、さらに好ましくは５割以上の細胞が互いに密着結合を形成している時期である。細胞凝集体において密着結合が形成しているかは、当業者であれば例えば顕微鏡による観察、抗ZO-1抗体を用いた免疫染色等の手法により容易に判別することができる。

[0150] 工程（２）におけるBMPシグナル伝達経路作用物質の存在下での培養開始は、第一工程を行った培養容器を用いて、上述の培地交換操作（例えば培地添加操作、半量培地交換操作、全量培地交換操作等）を行ってもよいし、細胞を別の培養容器に移してもよい。

[0151] 工程（２）におけるBMPシグナル伝達経路作用物質を含む培地での培養の期間は、適宜設定できる。工程（２）における培養の時間は、通常8時間以上、好ましくは10時間以上、より好ましくは12時間以上、さらに好ましくは14時間以上、最も好ましくは16時間以上である。

- [0152] 工程（２）におけるShhシグナル伝達経路作用物質を含む培地での培養の期間は、適宜設定できる。なお、工程（１）における浮遊培養がさらにShhシグナル伝達経路作用物質の存在下で実施される場合、工程（１）および工程（２）におけるShhシグナル伝達経路作用物質の存在下における培養期間は、30日であることが好ましい。
- [0153] 工程（２）および以降の工程において、下垂体プラコードへの分化を促進する観点から、FGFシグナル伝達経路作用物質を培養環境中に添加することもまた好ましい。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(b FGFと称することもある。)、FGF3、FGF8、FGF10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。
- [0154] FGF2タンパク質及びFGF8タンパク質は、例えば富士フイルム和光純薬株式会社から入手可能である。FGFシグナル伝達経路作用物質は、好ましくはFGF2、FGF3、FGF8及びFGF10、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FGF2を含み、さらに好ましくは組換えヒトFGF2を含む。
- [0155] 培地中のFGF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用いる物質に応じて適宜設定することが可能である。鼻腔上皮を構成する細胞への分化及び細胞の生存と増殖の促進の観点からは、FGFシグナル伝達経路作用物質としてFGF2を用いる場合は、通常約1pg/ml～約100 μ g/ml、好ましくは約10pg/ml～約50 μ g/ml、より好ましくは約100pg/ml～約10 μ g/ml、さらに好ましくは約500pg/ml～約1 μ g/ml、最も好ましくは約1ng/ml～約200ng/mlの濃度で使用される。また、FGF2以外のFGFシグナル伝達経路作用物質を使用する場合、上記濃度のFGF2と同等のFGF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。添加する物質のFGFシグナル伝達経路促進活性については、例えば3T3細胞を用いた細胞増殖試験等の手法により測定す

ることができる。

- [0156] 培地中でのFGFタンパク質の活性を保持する目的から、FGF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イ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1ng/ml～約100mg/ml、好ましくは約10ng/ml～約50mg/ml、より好ましくは約100ng/ml～約10mg/ml、さらに好ましくは約500ng/ml～約1mg/ml、最も好ましくは約1 μ g/ml～約200 μ g/ml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FGF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。37℃等での細胞培養環境下でFGFタンパク質の活性を保持する目的から、例えば米国特許US8772460B2号に記載のThermostable FGF2等のFGFの改変体や生分解性ポリマーにFGF2を結合させたStemBeads FGF2等のFGF2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HumanZyme社から入手可能である。StemBeads FGF2は例えばStemCulture社から入手可能である。
- [0157] 工程（2）および以降の工程におけるFGFシグナル伝達経路作用物質の添加時期は適宜設定できる。好ましい一態様としては、工程（2）のBMPシグナル伝達経路作用物質の添加より6時間以降、より好ましくは12時間以降、さらにこのましくは18時間以降にFGFシグナル伝達経路作用物質を添加する。
- [0158] 工程（2）において、工程（a）又は第一工程において用いた添加物、例えばJNKシグナル伝達経路阻害物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質、TGF β シグナル伝達経路阻害物質、TAK1阻害物質等を引き続き添加することもまた好ましい。工程（2）で添加するJNKシグナル伝達経路阻害物質、Wntシグナル伝達経路阻害物質又はTGF β シグナル伝達経路阻害物質は、それ以前の工程に用いられた物質と異なってもよいが、好ましくは同一である。添加物の濃度及び種類については、適宜調整することができる。これらの物質の添加時期は、工程（2）の開始と同時であってもよいし、異なってもよい。

[0159] <工程 (b) >

工程 (2) の後にさらに以下の工程 (b) が含まれてもよい。工程 (b) は、BMPシグナル伝達経路阻害物質の添加条件下で、工程 (2) で得られた細胞集団を培養する。工程 (2) で細胞を浮遊培養している場合は、工程 (b) でも引き続き形成された細胞凝集体を浮遊培養すればよい。工程 (2) で細胞を接着培養している場合は、工程 (b) でも引き続き細胞を接着培養すればよい。

[0160] 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BMPRI1A、BMPRI1B、ACVR、II型BMP受容体としてはTGF-beta R-II、ActR-II、ActR-IIIB、BMPRI2、MISRI-IIが知られている。

[0161] 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、Gremlin、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) 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 (b) におけるBMPシグナル伝達経路阻害物質は、細胞外へのBMPの分泌よりも後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。

[0162] 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I型BMP受容体の阻害物質が挙げられる。上記のような活性を有する化合物としては、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]quinoline)、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)、Compound 1(3-(1,2,3-benzothiadiazol-6-yl)-1-[2-(cyclohex-1-en-1-yl)ethyl]urea)、VU0465350(7-(4-isopropoxyphenyl)-3-(1H-pyrazol-4-yl)imidazo[1,2-a]pyridine)、VU0469381(5-(6-(4-methoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline)、OD36(4-chloro-7,10-dioxo-13,17,18,21-tetrazatetracyclo[12.5.2.12,6.017,20]docosa-1(20),2(22),3,5,14(21),15,18-heptaene)、OD52、E6201((3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(ethylamino)-8,9,16-trihydroxy-3,4-dimethyl-3,4,9,10-tetrahydro-1H-benzo[c][1]oxacyclotetradecine-1,7(8H)-dione)、Saracatinib(N-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(oxan-4-ylloxy)quinazolin-4-amine)、BYL719((2S)-1-N-[4-methyl-5-[2-(1,1,1-trifluoro-2-methylpropan-2-yl)pyridin-4-yl]-1,3-thiazol-2-yl]pyrrolidine-1,2-dicarboxamide)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。

[0163] 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-21411

7、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乃至LDN-193189を含む。

[0164] 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用いる物質に応じて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（b）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、さらに好ましくは約500nM～約25 μ M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100 μ M、好ましくは約10nM～約10 μ M、より好ましくは約25nM～約1 μ M、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100 μ M、好ましくは約10nM～約10 μ M、より好ましくは約25nM～約5 μ M、さらに好ましくは約250nM～約3 μ M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、さらに好ましくは約1 μ M～約25 μ M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100 μ M、好ましくは約10nM～約10 μ M、より好ましくは約25nM～約5 μ M、さらに好ましくは約250nM～約3 μ M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。

[0165] 工程（2）を実施した後に工程（b）を開始する時期に関しては、適宜設定できる。工程（b）を開始する時期は、通常工程（2）を開始してから8時間以上、15日間以内、好ましくは10時間以上、12日以内、より好ましくは12時間以上、9日以内、さらに好ましくは14時間以上、8日間以内、最も好ましくは16時間以上、7日間以内である。

[0166] 工程（2）及び以降の工程において、培地に副腎皮質ホルモン類を添加することにより、細胞集団を副腎皮質ホルモン類により処理してもよい。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；デキサメサゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、トリアムシノロ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。

[0167] 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100ng/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、通常約100ng/ml～約1000 μ g/ml、好ましくは約1～約100 μ g/mlである。副腎皮質ホルモン類として、デキサメサ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。

[0168] 工程（2）及び以降の工程において、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、第二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、第二工程開始後、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、第二工程を開始後、細胞集団中に、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、細胞凝集体中に、ACTH産生細胞の出現が確認

されるまでは、細胞凝集体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二工程乃至以降の工程を継続する。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、第一工程開始から30日以降であれば、ACTH産生細胞の出現が期待できるので、一態様において第一工程開始から30日以降に、培地に副腎皮質ホルモン類を添加する。

[0169] 細胞凝集体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／又はラトケ嚢から、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、細胞凝集体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。

[0170] 工程（2）及び以降の工程において、下垂体への分化及び成長ホルモン産生細胞への分化を促進する観点から、レチノイン酸シグナル伝達経路作用物質の存在下で行うこともまた好ましい。レチノイン酸伝達経路作用物質としては、例えばレチノイン酸受容体(RAR)又はレチノイドX受容体(RXR)に結合し、下流の転写を活性化させる物質等が挙げられる。上記のような作用を有する化合物としては、例えばオールトランスレチノイン酸、イソトレチノイン、9-cisレチノイン酸、TTNPB(4-[(E)-2-[(5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene)-2-yl]-1-propenyl]benzoic acid)、Ch55(4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butylphenyl)-3-oxo-1-propenyl]benzoic acid)、EC19(3-[2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)ethynyl]benzoic acid)、EC23(4-[2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl

)ethynyl)-benzoic acid)、Fenretinide(4-hydroxyphenylretinamide)、Acitretin((all-e)-9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraen)、Trifarotene、Adapalene、AC 261066(4-[4-(2-Butoxyethoxy)-5-methyl-2-thiazolyl]-2-fluorobenzoic acid)、AC 55649(4-N-Octylbiphenyl-4-carboxylic acid)、AM 580(4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)carboxamido]benzoic acid)、AM80(4-[(5,5,8,8-Tetramethyl-6,7-dihydronaphthalen-2-yl)carbamoyl]benzoic acid)、BMS 753(4-[[2,3-Dihydro-1,1,3,3-tetramethyl-2-oxo-1H-inden-5-yl]carbonyl]amino]benzoic acid)、BMS 961(3-Fluoro-4-[(r)-2-hydroxy-2-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-2-yl)-acetyl amino]-benzoic acid)、CD1530(4-(6-Hydroxy-7-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl-2-naphthalenyl)benzoic acid)、CD2314(5-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-anthracenyl)-3-thiophenecarboxylic acid)、CD437(2-naphthalenecarboxylic acid, 6-(4-hydroxy-3-tricyclo(3.3.1.1^{3,7}))dec-1-ylphen)、CD271(6-[3-(1-Adamantyl)-4-methoxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid)及びこれらの誘導体等が挙げられる。これらの物質は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0171] 工程(2)及び以降の工程におけるレチノイン酸伝達経路作用物質は、好ましくはオールトランスレチノイン酸またはEC23を含む。培地中のレチノイン酸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あれば特に限定されないが、レチノイン酸伝達経路作用物質としてEC23を用いる場合は、例えばEC23の濃度が約10pM～約30 μ Mであり、好ましくは約100pM～約20 μ Mであり、より好ましくは約10nM～約10 μ Mであり、さらに好ましくは約100nM～約5 μ Mである。EC23以外のレチノイン酸伝達経路作用物質を使用する場合、上記濃度のEC23と同等のレチノイン酸伝達経路作用活性を示す濃度で用いられることが望ましい。

[0172] 分化傾向の調節の観点からは、工程(2)及び以降の工程をNotchシグナル伝達経路阻害物質の存在下で行うこともまた好ましい。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、Jagged等)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。

[0173] Notchシグナル伝達経路阻害物質は、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。

[0174] Notch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。Notchシグナル伝達経路阻害物質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((2S)-2-[[2-(3,5-difluorophenyl)acetyl]amino]-N-[(7S)-5-methyl-6-oxo-7H-benzo[d][1]benzazepin-7-yl]propanamide)、MDL28170(benzyl N-[(2S)-3-methyl-1-oxo-1-[[2S)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino]butan-2-yl]carbamate)、FLI-06(cyclohexyl 2,7,7-trimethyl-4-(4-nitrophenyl)-5-oxo-1,4,6,8-tetrahydroquinoline-3-carboxylate)、L-685,458(tert-butyl N-[6-[[1-[(1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino]-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-benzyl-3-hydroxy-6-oxo-1-phenylhexan-2-yl]carbamate)、CB-103(6-(4-tert-butylphenoxy)pyridin-3-amine)及びこれらの誘導体等、並びにOnco Targets Ther.2013;6:943-955.に記載の物質等が挙げられる。Notchシグナル伝達経路阻害物質は、好ましくはDAPTを含む。

[0175] 培地中におけるNotchシグナル伝達経路阻害物質の濃度は、上述の効果を達

成可能な範囲であれば特に限定されないが、例えばNotchシグナル伝達経路阻害物質としてDAPTを用いる場合は、例えばDAPTの濃度が約100pM～約50 μ Mであり、好ましくは約1nM～約30 μ Mであり、より好ましくは約100nM～約20 μ Mであり、さらに好ましくは約1 μ M～約10 μ Mである。DAPT以外のNotchシグナル伝達経路阻害物質を使用する場合、上記濃度のDAPTと同等のNotch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。

[0176] <工程（3）>、<工程（3'）>：第三工程

第三工程は、Shhシグナル伝達経路作用物質の非添加条件下で、工程（2）又は工程（b）で培養した細胞集団を培養する。第二工程で得られた細胞集団をShh伝達経路作用物質の非存在下で培養し、下垂体組織を含む細胞集団を得る第三工程を工程（3）、工程（b）で得られた細胞集団をShhシグナル伝達経路作用物質の非存在下で培養し、下垂体組織を含む細胞集団を得る第三工程を工程（3'）とする。工程（2）又は工程（b）で細胞を浮遊培養している場合は、第三工程でも引き続き形成された細胞凝集体を浮遊培養すればよい。工程（2）又は工程（b）で細胞を接着培養している場合は、第三工程でも引き続き細胞を接着培養すればよい。工程（2）又は工程（b）で細胞を浮遊培養した後、第三工程で接着培養してもよい。

[0177] 第三工程において用いられる培地は、Shhシグナル伝達経路作用物質を含有しない限り特に限定されない。本工程におけるShhシグナル伝達経路作用物質の非添加条件とは、意図的にShhシグナル伝達経路作用物質を細胞集団の培養環境に添加しない条件を表し、細胞集団による自己分泌等で意図せずShhシグナル伝達経路作用物質が培養環境中に含まれる場合も、Shhシグナル伝達経路作用物質の非添加条件に含まれる。第三工程において用いられる培地としては、第一工程に挙げた培地や10%乃至20%のKSRを含有するgfCDM培地等が挙げられる。

[0178] 第三工程及び以降の工程において、下垂体を構成する細胞の生存及び分化成熟を促進する観点から、細胞凝集体をゲル中に包埋して培養する工程を含んでもよい。ゲルとしては、例えばアガロース、メチルセルロース、コラー

ゲン、マトリゲル等を用いたゲルが挙げられ、マトリゲルを用いることが好ましい。

- [0179] 第三工程及び以降の工程のゲル中に包埋して細胞を培養する工程において、細胞凝集体をそのまま包埋してもよいし、分散及び単離した後の細胞をゲル中に播種してもよい。セルソーター等を用いて基底細胞等特定の細胞腫を分取した後に播種してもよい。ゲル中に包埋する培養法のさらなる一態様として、線維芽細胞、間葉系細胞、血管系の細胞等の下垂体以外の細胞との共培養を実施することもできる。上記のようなゲル包埋培養は、例えばNature 501, 373-379(2013)、Nature, 499, 481-484(2013)、Nat Protoc 14, 518-540(2019)、Genes 2020, 11, 603等を参照して実施することができる。
- [0180] 第三工程及び以降の工程において、細胞への栄養及び酸素供給を改善し、物質交換を改善する目的から、細胞が物理的に揺動される培養方法を実施することも好ましい。このような培養方法としては、振盪培養、回転培養、攪拌培養等の静置培養以外の方法が挙げられる。振盪培養、回転培養、攪拌培養等を実施するための手段は特に限定されないが、例えば細胞を培養している培養器材をローテーター、シェーカー等に設置する、又は細胞をスターラー等が回転している環境下に置くことにより実施することができる。振盪培養、回転培養、攪拌培養の速度等のパラメーターは当業者であれば細胞への障害を生じない範囲で適宜設定可能である。例えば波動形揺動の3Dシェーカー（例えばMini-Shaker 3D、Biosan社製）を用いて振盪培養を実施する場合は、例えば5～60rpm、好ましくは5～40rpm、より好ましくは5～20rpmの範囲で振盪速度範囲を設定可能である。往復式のシェーカー（例えばNS-LR、アズワン社製）を用いて振盪培養を実施する場合は、例えば15～60rpm、好ましくは15～50rpm、より好ましくは15～45rpmの範囲で振盪速度範囲を設定可能である。シーソー式のシェーカー（例えばNS-S、アズワン社製）を用いて振盪培養を実施する場合は、例えば5～50rpm、好ましくは5～40rpm、より好ましくは5～30rpmの範囲で振盪速度範囲を設定可能である。細胞凝集体を攪拌培養、回転培養で培養する場合は、例えばスピナーフラスコ（例えば3152、コー

ニング社製)をマグネティックスターラー上に設置し、細胞凝集体が目視で沈降しない程度の回転数で培養を実施することもできる。三次元回転浮遊培養装置(例えばCellPet CUBE、ジェイテック社製;Clinostar、Celvivo社製)を用いて培養を実施することもできる。細胞への摩擦等の物理的な障害を抑制する観点から、前記のゲルに包埋した細胞凝集体を振盪培養、回転培養又は攪拌培養することもまた好ましい。

[0181] 第三工程(3)及び以降の工程において、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%~80%であり、より好ましくは30%~60%である。

[0182] 第三工程及び以降の工程において、細胞凝集体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Lumoxディッシュ(ザルスタット社製)、VECELL 96well plate(株式会社ベセル製)等が挙げられる。前述した高酸素濃度条件下での培養と組み合わせて用いることもまた好ましい。

[0183] 第三工程及び以降の工程において、細胞凝集体中の上皮組織の構造を維持する観点から、細胞保護剤を培地に添加することもできる。工程(3)及び以降の工程において用いられる細胞保護剤としては、上述したFGFシグナル伝達経路作用物質、ヘパリン、ROCK阻害物質、基底膜標品、ミオシン阻害物質、ポリアミン類、ISR阻害剤、カスパーゼ阻害剤、血清、又は血清代替物等が挙げられる。ミオシン阻害物質としては例えば非筋型ミオシンII ATPアーゼの阻害物質であるBlebbistatin、ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の阻害物質であるML-7、ML-9、W-7、MLCK inhibitor peptide 18及びこれらの誘導体等が挙げられる。添加する細胞保護剤は第一工程で添加したものと異なっていてよいが、好ましくは同一である。好ましい細胞保護剤としては、ROCK阻害

物質が挙げられる。第三工程及び以降の工程において、細胞保護剤としてROCK阻害物質であるY-27632を添加する場合は、通常約10nM～約10mM、好ましくは約100nM～約1mM、より好ましくは約1 μ M～約100 μ Mの濃度となるように培養環境中に添加する。ROCK阻害物質であるChroman 1を添加する場合は通常約10pM～約1mM、好ましくは約100pM～約100 μ M、より好ましくは約1nM～約10 μ Mの濃度となるように培養環境中に添加する。細胞保護剤として非筋型ミオシンII ATPアーゼの阻害物質であるBlebbistatinを添加する場合は、通常約10nM～約10mM、好ましくは約100nM～約1mM、より好ましくは約1 μ M～約100 μ Mの濃度となるように培養環境中に添加する。

[0184] 第三工程及び以降の工程において、細胞保護剤以外の上皮組織の構造を維持する作用を有する物質を添加することもできる。上記のような物質として例えば細胞接着を促進する物質、基底膜成分の合成を促進する物質、基底膜成分の分解を阻害する物質等が挙げられる。細胞接着を促進する物質は細胞－細胞間の接着、細胞－基底膜間の接着、細胞－培養器材間の接着等いずれを促進するものであってもよいし、細胞接着に関与する因子の産生を促すものであってもよい。細胞接着を促進する物質として例えばアドヘサミン、アドヘサミン－RGDS誘導体、Pyrintegrin、Biotin tripeptide-1、Acetyl Tetrapeptide-3、RGDS Peptide及びこれらの誘導体等が挙げられる。基底膜成分の合成を促進する物質として例えばアスコルビン酸誘導体等が挙げられる。アスコルビン酸誘導体としては、例えばアスコルビン酸リン酸ナトリウム、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸2-グルコシド、3-O-エチルアスコルビン酸、テトラヘキシルデカン酸アスコルビル、パルミチン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、アスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸、グリセリルオクタールアスコルビン酸等が挙げられる。基底膜成分の分解を阻害する物質として、例えばマトリックスメタロプロテアーゼ及びセリンプロテアーゼの阻害剤等が挙げられる。基底膜成分の合成を促進する物質であるアスコルビン酸誘導体の一種であるアスコルビン酸2-リン酸を添加する場合は、通常10 μ g/ml以上、1000 μ g/ml以下、好ましくは30 μ g/ml以

上500 $\mu\text{g/ml}$ 以下、さらに好ましくは50 $\mu\text{g/ml}$ 以上300 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度となるように培養環境中に添加する。他のアスコルビン酸及びアスコルビン酸の誘導体等を添加する際は、上記の濃度とモル当量が同程度となるように添加すればよい。

[0185] 第三工程及び以降の工程において、下垂体細胞の生存を促進する観点から、酸化ストレスを軽減する作用を有する物質を添加することも好ましい。上記のような活性を有する物質として例えば抗酸化物質、フリーラジカルスカベンジャー作用を有する物質、NADPHオキシダーゼ阻害物質、シクロオキシゲナーゼ阻害物質、リポキシゲナーゼ(LOX)阻害物質、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様物質、Nrf2活性化剤等が挙げられる。上記のような活性を有する物質として例えばアスコルビン酸、N-アセチル-L-システイン、酢酸(±)- α -トコフェロール、Apocynin(4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenone)、ニコチンアミド、タウリン(2-アミノエタンスルホン酸)、IM-93(1-Isopropyl-3-(1-methyl-1H-Indole-3-yl)-4-(N,N-dimethyl-1,3-propanediamine)-1H-Pyrrole-2,5H-dione)、Caffeic Acid(3,4-Dihydroxycinnamic Acid)、Celastrol(3-Hydroxy-24-nor-2-oxo-1(10),3,5,7-friedelatetraen-29-oic Acid;Tripterin)、Ebselen(2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one)、(-)-Epigallocatechin Gallate((2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1[2H]-benzopyran-3,5,7-triol-3-(3,4,5-trihydroxybenzoate))、EUK-8(N,N'-Bis(salicylideneamino)ethane-manganese(II))、Edaravone(3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)、MnTBAP(Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin Chloride)、Nordihydroguaiaretic Acid、Resveratrol(trans-3,4,5-Trihydroxystilbene)及びこれらの誘導体等が挙げられるが、これらに限定はされない。細胞培養用に調製済の試薬(例えば抗酸化サプリメント、Sigma Aldrich社製、A1345)を用いることもできる。本発明で用いる酸化ストレスを軽減する作用を有する物質は、好ましくはアスコルビン酸、N-アセチル-L-システイン並びにこれら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。アスコルビン酸は、例えばその誘導体であるアスコルビン酸2リン酸として

、約1nM～約1M、好ましくは約10nM～約100mM、より好ましくは約100nM～約10mM、さらに好ましくは約1 μ M～約3mMの濃度で、N-アセチル-L-システインは、例えば約1nM～約1M、好ましくは約10nM～約100mM、より好ましくは約100nM～約10mM、さらに好ましくは約1 μ M～約5mMの濃度で培地中に添加することができる。

[0186] 第三工程及び以降の工程において、下垂体細胞の生存を促進する観点から、ストレス応答シグナル伝達経路に対する阻害物質（ストレスに対する細胞内シグナル伝達機構を阻害する物質）を添加することもまた好ましい。ストレス応答性MAPキナーゼ経路(stress-activated protein kinase:SAPK)はストレスに対する細胞内シグナル伝達機構の主要なものの一つである。ストレス応答性MAPキナーゼ経路の阻害剤としては例えばMAP3K阻害剤、MAP2K阻害剤、ASK阻害剤、MEK阻害剤、Akt阻害剤、Rhoファミリーキナーゼ阻害剤、JNK阻害剤、p38阻害剤、MSK阻害剤、STAT阻害剤、NF- κ B阻害剤、CAMK阻害剤等が挙げられる。

[0187] MEK阻害剤としては例えばSelumetinib(AZD6244, 6-(4-bromo-2-chloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hydroxyethoxy)-3-methylbenzimidazole-5-carboxamide)、Mirdametinib(PD0325901, N-[(2R)-2,3-dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-iodoanilino)benzamide)、Trametinib(GSK1120212, N-[3-[3-cyclopropyl-5-(2-fluoro-4-iodoanilino)-6,8-dimethyl-2,4,7-trioxopyrido[4,3-d]pyrimidin-1-yl]phenyl]acetamide)、U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene)、PD184352(CI-1040, 2-(2-chloro-4-iodoanilino)-N-(cyclopropylmethoxy)-3,4-difluorobenzamide)、PD98059(2-(2-amino-3-methoxyphenyl)chromen-4-one)、BIX 02189(3-[N-[3-[(dimethylamino)methyl]phenyl]-C-phenylcarbonimidoyl]-2-hydroxy-N,N-dimethyl-1H-indole-6-carboxamide)、Pimasertib(AS-703026, N-[(2S)-2,3-dihydroxypropyl]-3-(2-fluoro-4-iodoanilino)pyridine-4-carboxamide)、Pelitinib(EKB-569, (E)-N-[4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-3-cyano-7-ethoxyquinolin-6-yl]-4-(dimethylamino)but-2-enamide)、BIX 02188(3-[N-[3-[(dimethylami

no)methyl]phenyl]-C-phenylcarbonimidoyl]-2-hydroxy-1H-indole-6-carboxamide)、TAK-733(3-[(2R)-2,3-dihydroxypropyl]-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-iodoanilino)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine-4,7-dione)、AZD8330(2-(2-fluoro-4-iodoanilino)-N-(2-hydroxyethoxy)-1,5-dimethyl-6-oxopyridine-3-carboxamide)、Binimetinib(MEK162,6-(4-bromo-2-fluoroanilino)-7-fluoro-N-(2-hydroxyethoxy)-3-methylbenzimidazole-5-carboxamide)、SL-327((Z)-3-amino-3-(4-aminophenyl)sulfanyl-2-[2-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-enenitrile)、Refametinib(RDEA119,N-[3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-iodoanilino)-6-methoxyphenyl]-1-[(2S)-2,3-dihydroxypropyl]cyclopropane-1-sulfonamide)、GDC-0623(5-(2-fluoro-4-iodoanilino)-N-(2-hydroxyethoxy)imidazo[1,5-a]pyridine-6-carboxamide)、BI-847325(3-[3-[N-[4-[(dimethylamino)methyl]phenyl]-C-phenylcarbonimidoyl]-2-hydroxy-1H-indol-6-yl]-N-ethylprop-2-ynamide)、R05126766(CH5126766,3-[3-fluoro-2-(methylsulfamoylamino)pyridin-4-yl]methyl]-4-methyl-7-pyrimidin-2-yloxychromen-2-one)、Cobimetinib(GDC-0973,[3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-iodoanilino)phenyl]-[3-hydroxy-3-[(2S)-piperidin-2-yl]azetidin-1-yl]methanone)及びこれらの誘導体等が挙げられる。

[0188] p38阻害剤としては例えば、SB203580(4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine)、Doramapimod(BIRB 796,1-[5-tert-butyl-2-(4-methylphenyl)pyrazol-3-yl]-3-[4-(2-morpholin-4-ylethoxy)naphthalen-1-yl]urea)、SB202190(FHPI,4-[4-(4-fluorophenyl)-5-pyridin-4-yl-1H-imidazol-2-yl]phenol)、Ralimetinib dimesylate(5-[2-tert-butyl-4-(4-fluorophenyl)-1H-imidazol-5-yl]-3-(2,2-dimethylpropyl)imidazo[4,5-b]pyridin-2-amine;methanesulfonic acid)、VX-702(6-(N-carbamoyl-2,6-difluoroanilino)-2-(2,4-difluorophenyl)pyridine-3-carboxamide)、PH-797804(3-[3-bromo-4-[(2,4-difluorophenyl)methoxy]-6-methyl-2-oxopyridin-1-yl]-N,4-dimethylbenzamide)、Neflamapimod(VX-745,5-(2,6-dichlorophenyl)-2-(2,4-difluorophenyl)sulfanylpyr imido[1,6-b]pyridazin-6-on

e)、TAK-715(N-[4-[2-ethyl-4-(3-methylphenyl)-1,3-thiazol-5-yl]pyridin-2-yl]benzamide)、PD 169316(4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine)、TA-02(4-[2-(2-fluorophenyl)-4-(4-fluorophenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine)、SD 0006(1-[4-[3-(4-chlorophenyl)-4-pyrimidin-4-yl-1H-pyrazol-5-yl]piperidin-1-yl]-2-hydroxyethanone)、Pamapimod(6-(2,4-difluorophenoxy)-2-(1,5-dihydroxypentan-3-ylamino)-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one)、BMS-582949(4-[5-(cyclopropylcarbonyl)-2-methylanilino]-5-methyl-N-propylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine-6-carboxamide)、SB239063(4-[4-(4-fluorophenyl)-5-(2-methoxypyrimidin-4-yl)imidazol-1-yl]cyclohexan-1-ol)、Skepinone-L(13-(2,4-difluoroanilino)-5-[(2R)-2,3-dihydroxypropoxy]tricyclo[9.4.0.0^{3,8}]pentadeca-1(11),3(8),4,6,12,14-hexaen-2-one)、DBM 1285(N-cyclopropyl-4-[4-(4-fluorophenyl)-2-piperidin-4-yl-1,3-thiazol-5-yl]pyrimidin-2-amine;dihydrochloride)、SB 706504(1-cyano-2-[2-[8-(2,6-difluorophenyl)-4-(4-fluoro-2-methylphenyl)-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidin-2-yl]amino]ethyl]guanidine)、SCIO 469(2-[6-chloro-5-[(2R,5S)-4-[(4-fluorophenyl)methyl]-2,5-dimethylpiperazine-1-carbonyl]-1-methylindol-3-yl]-N,N-dimethyl-2-oxoacetamide)、Pexmetinib(1-[5-tert-butyl-2-(4-methylphenyl)pyrazol-3-yl]-3-[[5-fluoro-2-[1-(2-hydroxyethyl)indazol-5-yl]oxyphenyl]methyl]urea)、UM-164(2-[6-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-yl]amino]-N-[2-methyl-5-[[3-(trifluoromethyl)benzoyl]amino]phenyl]-1,3-thiazole-5-carboxamide)、p38 MAPK Inhibitor(4-(2,4-difluorophenyl)-8-(2-methylphenyl)-7-oxido-1,7-naphthyridin-7-ium)、p38 MAP Kinase Inhibitor III(4-[5-(4-fluorophenyl)-2-methylsulfonyl-1H-imidazol-4-yl]-N-(1-phenylethyl)pyridin-2-amine)、p38 MAP Kinase Inhibitor IV(3,4,6-trichloro-2-(2,3,5-trichloro-6-hydroxyphenyl)sulfonylphenol)、CAY105571(4-[5-(4-fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]-pyridine)及びこれらの誘導体等が挙げられる。

[0189] JNK阻害剤としては例えば第一工程で記載したものと同様の物が挙げられる。本発明で用いるストレスに対する細胞内シグナル伝達機構を阻害する物質は、好ましくはMEK阻害剤、p38阻害剤、JNK阻害剤からなる群から選ばれる一つ以上である。p38阻害剤としてSB203580を用いる場合は、通常約1nM～約1mM、好ましくは約10nM～約100 μ M、より好ましくは約100nM～約10 μ M、さらに好ましくは約500nM～約5 μ Mの濃度で、培地中に添加することができる。MEK阻害剤としてPD0325901を用いる場合は、通常約1nM～約1mM、好ましくは約10nM～約100 μ M、より好ましくは約100nM～約10 μ M、さらに好ましくは約500nM～約5 μ Mの濃度で、培地中に添加することができる。JNK阻害剤としてJNK-IN-8を用いる場合は、第一工程に記載の濃度と同様の濃度で、培地中に添加することができる。他のMEK阻害剤、p38阻害剤、JNK阻害剤を用いる場合は上記阻害剤の添加濃度と同等の阻害活性を有する濃度で添加することが好ましい。

[0190] 工程（A）において、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導可能な条件下において培養される多能性幹細胞は、多能性幹細胞の凝集体であってもよい。多能性幹細胞の凝集体を分化誘導剤の存在下で培養する場合は、例えば、国際公開第2016/013669号公報に記載の方法に従って培養することができる。

[0191] 工程（A）の培養期間は、工程（A）で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体が、ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体が得られる期間である。工程（A）で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体は、ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない限り、さらに別の下垂体ホルモン産生細胞を含んでいてもよく、特に制限されるわけではないが、例えば、PRLを分泌する下垂体ホルモン産生細胞、LHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞及びFSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞からなる群から選択される少

なくとも1種の下垂体ホルモン産生細胞を含んでよい。そのような細胞凝集体としては、例えば、(i) ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞およびPRLを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体、(ii) ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞、PRLを分泌する下垂体ホルモン産生細胞およびLHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体、(iii) ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞、PRLを分泌する下垂体ホルモン産生細胞およびFSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体、あるいは(iv) ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞、PRLを分泌する下垂体ホルモン産生細胞、LHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞およびFSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体などが挙げられる。従って、工程(A)の培養期間は、上記(i)～(iv)の細胞凝集体が得られる期間であってもよい。

[0192] 工程(A)で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体が、下垂体ホルモン産生細胞を含んでいるかどうかは公知の手段によって確認することができ、例えば、GH産生細胞マーカー(抗Pit1抗体、抗GH抗体等)、PRL産生細胞マーカー(抗Pit1抗体、抗PRL抗体等)、ACTH産生細胞マーカー(抗T-Pit抗体、抗NeuroD1抗体、抗ACTH抗体等)、TSH産生細胞マーカー(抗GATA2抗体、抗TSH抗体等)、FSH産生細胞、及び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。

[0193] また、多能性幹細胞またはその細胞凝集体を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導可能な条件下において培養した場合、分化誘導開始から約30日目にACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞が現れ始める。また、分化誘導開始から約100日目にGH又は

TSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞が現れ始める。従って、工程（A）の培養期間としては、約30日以上かつ約100日以下であってよいが、ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞への分化が進んでいるという点から好ましくは、約60日以上かつ約100日以下が挙げられる。工程（A）の培養期間が約60日以上かつ約100日以下の場合、ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体が必ず存在し、ACTH分泌能が、0.5 pg/mL以上であること（前期下垂体組織：0.5 pg/mL以上、中期：2 pg/mL以上）から好ましい。

[0194] 以上の通りにして工程（A）で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体は、工程（B）において細胞集団に分散される（本工程を、「中間精製」と総称することがある）。

[0195] 工程（B）では、まず得られた細胞凝集体のROCK阻害剤による前処理を行い得る。当該前処理は、以降の細胞凝集体の分散により誘導される細胞死を抑制するために、ROCK阻害剤を、当該前処理開始前から添加することが好ましい。ROCK阻害剤は、例えば、当該処理開始の少なくとも24時間前、少なくとも12時間前、少なくとも6時間前、少なくとも3時間前、少なくとも2時間前、少なくとも1時間前に添加する。ROCK阻害剤としては、Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride) 等を挙げることができる。当該処理に際して用いられるROCK阻害剤の濃度は、以降の細胞凝集体の分散により誘導される細胞死を抑制し得る濃度である。例えば、Y-27632について、このような濃度は、通常約0.1~200 μ M、好ましくは約2~50 μ Mである。ROCK阻害剤の濃度を添加する期間内で変動させてもよく、例えば期間の後半で濃度を半減させることができる。

当該前処理を行うための培地は、工程（A）の培養工程において用いる培地を用いることができる。なお、上記培地中に既に所望する濃度でROCK阻害剤が添加されている場合は、当該前処理工程を行う必要はない。

[0196] 次に、上記前処理を行った細胞凝集体を、酵素処理により分散させる。具体的には、まず、上記前処理を行った細胞凝集体を、PBSを含む培養器に移し、同培地で洗浄する。分散のための酵素としては、細胞を分散し得る限り特

に限定されないが、例えば、パパイン、EDTA；トリプシン、コラゲナーゼ（コラゲナーゼ タイプI～VII）、メタロプロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、ディスパーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ等の酵素やこれらの混合物が挙げられる。好ましい酵素としては、パパインが挙げられる。酵素処理の条件（温度、時間等）は、用いる酵素等により適宜設定し得る。また、当該酵素処理を促進させるために、当該処理前に、細胞凝集体を物理的（例：メス、ハサミ等）に細断するか、或いは細胞凝集体に物理的（例：メス、ハサミ等）に切れ込みを入れる工程を行ってもよい。

[0197] 上記酵素処理後、浮遊細胞を回収し、再度、上記酵素処理を行ってもよい。複数回繰り返してもよい。当該酵素処理も、上述の酵素等で行うことができ、好ましい酵素としては、EDTA；トリプシン、コラゲナーゼ（コラゲナーゼ タイプI～VII）、メタロプロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ、ディスパーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ等の酵素やこれらの混合物が挙げられる。好ましい酵素としては、コラゲナーゼが挙げられ、より好ましくはコラゲナーゼ タイプIである。酵素処理の条件（温度、時間等）は、用いる酵素等により適宜設定し得る。

[0198] 上記酵素処理後、浮遊細胞を回収し、再度、上記酵素処理を行う。当該酵素処理も、上述の酵素等で行うことができ、好ましい酵素としては、EDTA；トリプシンが挙げられ、より好ましくは、EDTA；トリプシンとデオキシリボヌクレアーゼである。また、EDTA；トリプシンの代わりに、TrypLE (Invitrogen)等の市販品を用いてもよい。酵素処理の条件（温度、時間等）は、用いる酵素等により適宜設定し得る。上記一連の酵素処理により単細胞懸濁液を調製し得る。また、単細胞懸濁液を調製する際に、自体公知の方法により、死細胞を除去してもよい。

[0199] 本発明の工程（1）では、以上の通りにして得られる多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団から、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞に特異的な細胞表面マーカーであるEpCAMを発現する細胞が分離される。分散され

た細胞集団から、EpCAMを発現する所望の細胞を分離する方法としては、フローサイトメトリーやマスサイトメトリーを用いた方法、磁気細胞分離法などが挙げられ、これらの方法は、自体公知の方法を用いて行うことができる。例えば、EpCAMを発現する細胞は、当該細胞とEpCAM分子に特異的に結合する物質（例：抗体等）とを接触させる工程を含む方法により分離することができる。上記物質には、それ自体に検出可能な標識（例：GFP、PE）が付加されているもの、およびそれ自体には標識が付加されていないものも含まれる。上記物質が、それ自体に標識が付加されていないものである場合、当該物質を直接または間接的に認識する検出可能な標識が付加された物質をさらに使用することで前記分離が可能となる。例えば、前記物質が抗体である場合には、蛍光色素、金属同位体又はビーズ（例：磁気ビーズ）を当該抗体に直接的又は間接的に担持させ、それにより細胞表面のマーカーを標識することが可能であり、当該標識に基づいて細胞を分離することが可能である。この際用いる抗体は、1種類のみ、又は2種類以上の抗体であってもよい。

[0200] 本発明の方法は、分離されたEpCAM発現細胞（該細胞を、「中間精製体」と総称することがある）を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程（本発明の工程（2））を含む。下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件とは、下垂体前駆細胞が下垂体ホルモン産生細胞に分化し、分化した下垂体ホルモン産生細胞のホルモン産生能が維持又は向上する培養条件をいう。下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件としては、一態様として、下垂体ホルモン産生細胞の培養に用いることが可能な培地（約0.18～約20mL）、好ましくはKSRを含む無血清培地（例：IMDM、DMEM、EMEM、 α MEM、GMEM、F-12培地、DMEM/F12、IMDM/F12、上皮細胞用培地（例：CnT-Prime epithelial culture medium）、又はこれらの混合培地等）における培養が挙げられる。培養は接着培養であっても、浮遊培養であってもよいが、浮遊培養が好ましい。

下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で浮遊培養する期間としては、通常、14日以上、好ましくは30日以上が挙げられる。

[0201] 本発明の方法の一態様において、以下の製造方法が挙げられる。

以下の工程：

(1) 多能性幹細胞由来の、下垂体ホルモン産生細胞を1種類以上4種類以下含む分散された細胞集団(例：ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞集団)から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程、及び

(2) 分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程、を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法。

[0202] 本発明の方法の別の一態様において、以下の製造方法が挙げられる。

以下の工程：

(1) 多能性幹細胞由来の、下垂体前期組織又は下垂体中期組織を含む細胞凝集体を分散して得られる細胞集団から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程、及び

(2) 分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程、を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法。

[0203] 本発明の方法のまた別の一態様において、以下の製造方法が挙げられる。

以下の工程：

(1) 多能性幹細胞由来の、下垂体ホルモン産生細胞を1種類以上4種類以下含む細胞凝集体を分散して得られる細胞集団から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程、及び

(2) 分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程、を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法。

[0204] 本発明の方法のさらに別の一態様において、以下の製造方法が挙げられる

。

以下の工程：

(1) 多能性幹細胞由来の、下垂体ホルモン産生細胞を1種類以上4種類以下含み、かつ、視床下部組織においてNkx2.1発現細胞を含む細胞凝集体を分散して得られる細胞集団から、EpCAMを発現する細胞を分離する工程、及び

(2) 分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程、

を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法。

[0205] [下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体]

本発明の方法によって得られる下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体(本発明の細胞凝集体)は、以下の特徴を有する。

- (1) 該細胞凝集体におけるEpCAM陽性細胞及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞の存在割合が80%以上である。
- (2) 該細胞凝集体における神経細胞の存在割合が20%以下である。
- (3) 該細胞凝集体におけるACTH陽性細胞の存在割合が5%以上である。
- (4) 該細胞凝集体の細胞密度が3,000~20,000 cells/mm²である。
- (5) 該細胞凝集体の長径が200~3,000 μ mである。
- (6) 該細胞凝集体の表面において、EpCAM陽性細胞及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞が互いに面接着し、上皮構造を形成している。
- (7) 該細胞凝集体が、スポンジ状構造を形成している。

[0206] 本発明の方法によって得られる細胞凝集体は、EpCAMを発現する細胞を分離する工程を経るため、EpCAM陽性細胞が該細胞凝集体中の多くの細胞を占める。また、本発明の方法によって得られる細胞凝集体は、E-cadherin陽性細胞もまた含まれる。EpCAM陽性細胞の一部または全部は、EpCAM陽性及びE-cadherin陽性細胞であってもよい。該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対するEpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞数の割合は、EpCAMを発現する細胞を分離する工程の分離効率に依存するが、例えば、80%以上であってよく、好ましくは、85%以上、90%以上、95%以上であってよい。

[0207] 視床下部を構成する神経細胞(例えば、ニューロン、グリア細胞など、これらの前駆細胞である視床下部前駆細胞; これらを「視床下部細胞」と呼ぶ

こともある)においてEpCAMおよびE-cadherinは発現していない。従って、EpCAMを発現する細胞を分離する工程を経ることにより、これら細胞が除去される。すなわち、該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対する神経細胞(視床下部細胞)数の割合(神経細胞の存在割合)は、EpCAMを発現する細胞を分離する工程の分離効率に依存するが、例えば、20%以下であってよく、好ましくは、15%以下、10%以下、5%以下であってよい。なお、視床下部を構成する神経細胞に発現するマーカーとして、Rx、NKx2.1、Nestin及びPax6が挙げられる。言い換えると、該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対するRx、NKx2.1、Nestin及び／又はPax6を発現する細胞数の割合は、例えば、20%以下であってよく、好ましくは、15%以下、10%以下、5%以下であってよい。

[0208] 当該細胞凝集体は、下垂体ホルモン産生細胞を含む。該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対するACTH陽性(産生)細胞数の割合(ACTH陽性細胞数の存在割合)が5%以上、好ましくは10%以上であってもよい。ACTH陽性細胞は、NeuroD1及びTbx19を同時に発現する。従って、該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対するNeuroD1陽性及び／又はTbx19陽性細胞数の割合も、ACTH陽性細胞数の存在割合と同等の割合であってもよい。

[0209] 該細胞凝集体のACTH分泌能は、200~1,000,000 pg/mLであってよく、一態様として、1,000~500,000 pg/mL、5,000~300,000 pg/mL、10,000~100,000 pg/mLであってよい。

[0210] ACTH分泌能は、ACTH細胞数及び培養条件などの影響を受ける。本願明細書におけるACTH分泌能は、特定の培養条件における、細胞凝集体1個から培地中に分泌されたACTHの濃度で表される。ここで、特定の培養条件とは、(1)上述した下垂体ホルモン産生細胞の培養に用いることが可能な培地、好ましくはKSRを含む無血清培地(例:IMDM、DMEM、EMEM、 α MEM、GMEM、F-12培地、DMEM/F12、IMDM/F12、上皮細胞用培地(例:CnT-Prime epithelial culture medium)、又はこれらの混合培地等)を用い、(2)外部からACTH産生に影響を与える物質(例:ACTH産生を上昇させるNotchシグナル阻害剤)を添加せず、(3)培地量を0.18~20 mLに設定し、(4)3~4日間培養する条件を意味する。当

該条件における培養後の培地を回収し、当該培地中のACTHの濃度を測定すればよい。当業者であれば、ELISAの様な公知の手法を用いて、ACTHの濃度を測定することが可能である。

[0211] 該細胞凝集体は、ACTH産生細胞以外の下垂体ホルモン産生細胞を含んでもよい。具体的には、PRL産生細胞、FSH産生細胞、LH産生細胞、GH産生細胞、TSH産生細胞などが挙げられる。一態様においては、ACTH産生細胞及びPRL産生細胞の2種類を含み、別の態様においては、ACTH産生細胞及びPRL産生細胞、並びにFSH産生細胞及びLH産生細胞からなる群から選択される1又は2の細胞を含んでもよい(すなわち、3種類又は4種類の下垂体ホルモン産生細胞を含む)。さらに別の態様では、ACTH産生細胞、PRL産生細胞、FSH産生細胞及びLH産生細胞、並びにGH産生細胞及びTSH産生細胞からなる群から選択される1又は2の細胞を含んでもよい(すなわち、5種類又は6種類の下垂体ホルモン産生細胞を含む)。

[0212] 細胞凝集体に含まれる下垂体ホルモン産生細胞は、上述の分化ステージ、すなわちEpCAMを発現する細胞を分離するタイミング及びその後の培養期間に依存する。上述のホルモンの産生状態をELISA又は免疫染色等を用いて確認することにより、各種下垂体ホルモン産生細胞の存在を確認することができる。従って、当業者であれば必要な下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得るために分離タイミングや培養期間を調整することができる。

[0213] 当該細胞凝集体は、さらに下垂体幹細胞を含んでもよい。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。

[0214] 該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対する下垂体幹細胞数の割合(下垂体幹細胞数の存在割合)が1%以上、好ましくは3%以上又は5%以上であってもよい。下垂体幹細胞は、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、ACEといった下垂体幹細胞マーカーを同時に発現する。従って、下垂体幹細胞数の存在

割合は、該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対する上記の下垂体幹細胞マーカー（例えば、CXADR）陽性細胞数の割合を測定することによって決定することができる。

- [0215] 該細胞凝集体の細胞密度は、3,000～20,000 cells/mm²であってよく、好ましくは5,000～10,000 cells/mm²、より好ましくは6,000～9,000 cells/mm²であってよい。
- [0216] 本願明細書における該細胞凝集体の細胞密度は、細胞凝集体の切断面、例えば、中心から200 μm以内の位置における、単位面積当たりの細胞数で表される。当業者であれば、公知の手法を用いて細胞凝集体の細胞密度を測定することができる。具体的には、細胞凝集体を切断した切片を準備し、DAPI、抗E-cadherin抗体などを用いた免疫染色などの手法により細胞数を測定し、当該切片の面積により除せばよい。
- [0217] 一態様において、該細胞凝集体の長径(又は、円相当径)は、例えば200～3,000 μmであってよく、好ましくは300～2,000 μm、より好ましくは400～1,500 μmであってよい。
- [0218] 該細胞凝集体の長径、短径及び高さを測定する方法は、特に限定されず、例えば、顕微鏡下で撮像した画像から測定すればよい。例えば、96ウェル培養プレートで培養時の細胞凝集体を、キーエンス倒立顕微鏡10倍レンズで撮像し、撮像した画像から測定できる。ここで、長径とは、撮像画像において、該細胞凝集体の2つの端点を結ぶ線分のうち、最も長い線分及びその長さを意味する。円相当径とは、二次元面に投影したときに得られる図形(円形または楕円形)の面積に相当する、真円の直径を意味する。後述する通り、当該凝集体はスフェア状の凝集体であり、長径及び円相当径は近似し、真球に近いスフェア状の凝集体に近づくほど、長径及び円相当径の差は小さくなる。
- [0219] 当該凝集体は、スフェア状の凝集体である。本明細書における「スフェア(sphere)状細胞凝集体」は、球状に近い立体的な形を有する細胞凝集体を意味する。球状に近い立体的な形とは、三次元構造を有する形であって、二次元面に投影したときに、例えば、円形又は楕円形を示す球形状が挙げられる。

- [0220] 当該凝集体は、好ましくは真球に近いスフェア状の凝集体である。真球に近いスフェア状の凝集体とは、真球に近い立体的な形を有する細胞凝集体を意味する。真球に近い立体的な形とは、複数の方向から二次元面に投影したときに得られる複数の円形が、当該円形の中心から外周への長さが全て同じ、あるいは、最も長い線分と最も短い線分の差が10%以下、5%以下、3%以下、2%以下又は1%以下である球上形を意味する。
- [0221] 該細胞凝集体は、その表面において、EpCAM陽性細胞及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞が互いに面接着し、上皮構造を形成していてもよい。
- [0222] 「面接着」とは、隣り合う細胞同士が面で接着することを意味する。より詳細には、面接着とは、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、さらに好ましくは10%以上であることをいう。一態様では、細胞の表面とは、細胞膜表面のことをいう。細胞の表面は、細胞接着因子（例えば、E-cadherinやEpCAM）の免疫染色により、観察できる。面接着ではない状態として、点接着が挙げられる。点接着とは、細胞と細胞が点で接着することをいう。
- [0223] 「上皮構造」とは、頂端面又は基底膜などの、上皮組織が特徴的に有する構造を意味する。後述する頂端面及び基底膜のマーカーを用いて免疫染色することにより確認することができる。
- [0224] 上皮組織は極性化して「頂端面（apical surface）」と「基底膜」ができる。「基底膜」とは、基底膜のマーカーであるラミニン及びIV型コラーゲンを多く含む50～100nmの、上皮細胞が産生した基底（basal）側の層（基底膜）が存在する基底膜のことをいう。「頂端面」は、「基底膜」と反対側に形成される表面（表層面）のことをいう。また、このような頂端面は、頂端面のマーカー（例：atypical-PKC（以下、「aPKC」と略す）、E-cadherin、N-cadherin）に対する抗体を用いて、当業者に周知の免疫染色法等で同定することができる。

- [0225] 「上皮組織」とは、体表面、管腔（消化管など）、体腔（心膜腔など）などの表面を細胞が隙間なく覆うことで形成される組織である。上皮組織を形成している細胞を上皮細胞という。上皮細胞は、細胞が頂端（apical）－基底（basal）方向の極性を持つ。上皮細胞は、接着結合（adherence junction）及び／又は密着結合（tight junction）により上皮細胞同士で強固な結合をつくり、細胞の層を形成できる。この細胞層が、1ないし十数層重なってできた組織が上皮組織である。
- [0226] 該細胞凝集体は、EpCAM陽性細胞及び／又はE-cadherin陽性細胞が互いに面接着することで形成される島状構造を複数有する。そして、該細胞凝集体では、複数の島状構造が集まってスポンジ状構造が形成される。
- [0227] 「島状構造（islet-like strucure）」とは、2個～20個程度（例：3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個）のEpCAM陽性細胞及び／又はE-cadherin陽性細胞が互いに面接着することによって形成される構造である。各島状構造に含まれる当該細胞の個数は、それぞれの島状構造ごとに異なってもよい。面接着とは、隣り合う細胞同士が面で接着することを意味する。より詳細には、面接着とは、細胞同士が面で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、さらに好ましくは10%以上であることをいう。島状構造に存在する細胞の長径は、例えば2～50 μm 、好ましくは4～30 μm 、短径は、例えば0.5～20 μm 、好ましくは1～10 μm であってよい。
- [0228] 該島状構造には、下垂体ホルモン産生細胞を含んでいてもよい。具体的には、ACTH陽性細胞、PRL陽性細胞、FSH陽性細胞、LH陽性細胞、GH陽性細胞、TSH陽性細胞などが挙げられる。
- [0229] 「スポンジ状構造」とは、複数の島状構造が集まって形成され、島状構造の間に空隙(voids)が存在する構造である。必ずしもすべての島状構造の間に空隙が存在していなくてもよい。空隙の存在によって培養液の栄養や酸素が該細胞凝集体の内部にまで到達可能であるため、該細胞凝集体の中心部においてもネクロシス細胞の割合は少ない。

- [0230] 「島状構造」及び「スポンジ状構造」は、EpCAMによるソーティング前、すなわち多能性幹細胞を浮遊培養することによって得られる細胞凝集体には認められない。「島状構造」及び「スポンジ状構造」は、EpCAMによるソーティング後の再凝集により初めて確認される構造である。
- [0231] 一態様において、該細胞凝集体のGH分泌能が、0.05～100 ng/mLであってよく、一態様として、0.1～50 ng/mL、0.3～30 ng/mL、0.5～10 ng/mLであってもよい。
- [0232] GH分泌能は、GH細胞数及び培養条件などの影響を受ける。本願明細書におけるGH分泌能は、特定の培養条件における、細胞凝集体1個から培地中に分泌されたGHの濃度で表される。ここで、特定の培養条件とは、(1)上述した下垂体ホルモン産生細胞の培養に用いることが可能な培地、好ましくはKSRを含む無血清培地(例：DMEM、MEM、GMEM、上皮細胞用培地(例：CnT-Prime epithelial culture medium))を用い、(2)外部からGH産生に影響を与える物質(例：GH産生を上昇させる副腎皮質ホルモン類(例：デキサメサゾン))を添加せず、(3)培地量を0.18～20mLに設定し、(4)3～4日間培養する条件を意味する。当該条件における培養後の培地を回収し、当該培地中のGHの濃度を測定すればよい。当業者であれば、ELISAの様な公知の手法を用いて、GHの濃度を測定することが可能である。
- [0233] 当該細胞凝集体の使用目的によって、特定の物質の存在下において培養することにより、特定の下垂体ホルモン産生の分泌量を増加させることができる。
- [0234] 例えば、上記の方法において、(2)の条件を、副腎皮質ホルモン類を含む培地で培養するという条件に変更することにより、GH分泌能は向上する。副腎皮質ホルモン類として、デキサメサゾン、ベタメタゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン等の人工的に合成された糖質コルチコイド；ハイドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、酢酸フルドロコルチゾン等の天然糖質コルチコイド等が挙げられる。当業者であれば副腎皮質ホルモン類の濃度を適宜設定することが可能であるが、一態様として、デキサメ

サゾンの濃度は4 ng/mL～40 μg/mL、好ましくは40 ng/mL～4 μg/mLであってよい。

[0235] 副腎皮質ホルモン類存在下で培養した後の下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体のGH分泌能は、一態様として、0.1～10,000 ng/mL、0.5～5,000 ng/mL、5～1,000 ng/mL、20～500 ng/mLであってよい。この場合、ACTH分泌能は、10～500,000 pg/mL、好ましくは100～100,000 pg/mL、より好ましくは500～30,000 pg/mL、さらに好ましくは1,000～10,000 pg/mLである。

[0236] この様に、副腎皮質ホルモン類存在下で培養した後の下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体は、分化誘導開始前より多くの下垂体ホルモン産生細胞を含む。一態様において、副腎皮質ホルモン類存在下で培養した場合、該細胞凝集体中に存在する総細胞数に対するACTH陽性(産生)細胞数の割合(ACTH陽性細胞数の存在割合)は減ってもよい。その場合のACTH陽性細胞数の存在割合は、2%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上である。

[0237] 本発明はまた、本発明の細胞凝集体を全細胞凝集体数の40%以上含む、細胞集団(本発明の細胞集団)を提供する。本発明の細胞集団は、本発明の細胞凝集体を全細胞凝集体数の通常、40%以上、好ましくは、60%以上、より好ましくは、80%以上含んでもよい。一態様として、全細胞凝集体のうちの本発明の細胞凝集体の割合は、細胞株、分化誘導法、成熟培養によって一定程度変動し得る。

[0238] 本発明の細胞集団は、以下の特徴を含むものであってよい。

- (1) EpCAM陽性細胞及びE-cadherin陽性細胞の存在割合が80%以上であり、
- (2) 神経細胞の存在割合が20%以下であり、かつ
- (3) 該細胞凝集体のACTH分泌能が200～1,000,000 pg/mLである。

[0239] [医薬組成物、治療方法及び治療薬]

本発明の一態様として、本発明の細胞凝集体又はその一部を含む医薬組成物(移植用組成物、移植用組織またはTransplant)が挙げられる。医薬組成物は好ましくは、本発明の細胞凝集体又はその一部の他に、さらに医薬として許容される担体を含む。細胞凝集体の一部とは、医薬組成物に利用できる

細胞凝集体の一部であり、細胞凝集体から、移植に必要な大きさの下垂体組織を切り出すことによって得ることができる。

[0240] 医薬として許容される担体としては、生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）を用いることができる。必要に応じて、医薬組成物には、移植医療において、移植する組織又は細胞を含む医薬に、通常使用される保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を配合させてもよい。

[0241] 本発明はまた、本発明の細胞凝集体又はその一部、若しくは本発明の細胞集団を含む、下垂体の障害に基づく疾患の治療薬（本発明の治療薬）を提供され得る。

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集団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、例えば本発明の細胞集団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、本発明の細胞集団から単離された下垂体ホルモン産生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。

[0242] さらに、本発明の細胞凝集体又はその一部、若しくは細胞集団から、下垂体ホルモン産生細胞の有効量を、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、下垂体腺腫等の手術後の下垂体機能・ホルモン分泌不全、頭蓋咽頭腫などが挙げられる。

[0243] 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

[0244] 実施例 1 : ヒトES細胞から視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を形成する例

図 1 に、ヒトES/iPS細胞から下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造するまでの、全体の工程図（工程 1 分化、工程 2 中間精製、工程 3 成熟培養）を示す。

以下では、ヒトES細胞から視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導し、分化誘導後の各日数における細胞凝集体の組成及び構造に関して検討した。

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（AK03、味の素社製）、フィーダーフリー足場にはLaminin511-E8（ニッピ社製）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、TrypLE Select（Life Technologies社製）を用いて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、 $10\mu\text{M}$ ）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（イワキ社製、細胞培養用、培養面積 9.4cm^2 ）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 2.4×10^4 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。

ヒトES細胞から視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体へ分化誘導するためのプロトコルを図2に示す。分化誘導操作としては、ヒトES細胞（KhES-1株）を、StemFit培地を用いて、播種した6日後にStemFit培地の培地交換と同時にSB431542（ $5\mu\text{M}$ ）とSAG（ 300nM ）を添加して24時間培養した。調整したサブコンフレントのヒトES細胞を、TrypL

E Select(Life Technologies社製)を用いて細胞分散液処理し、さらにピペティング操作により単一細胞に分散した。その後、上記単一細胞に分散されたヒトES細胞を細胞非接着性の96穴培養プレート(PrimeSurface 96V底プレート、MS-9096V、住友ベークライト社製)の1ウェルあたり 1.0×10^4 細胞になるように100 μ Lの無血清培地に浮遊させ、37°C、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培地とIMDM培地の1:1混合液に5%KSR、450 μ M 1-モノチオグリセロール、1xChemically defined lipid concentrateを添加した無血清培地を用いた。浮遊培養開始時(分化誘導開始後0日目)に、前記無血清培地にY27632(終濃度20 μ M)、IWP-2(0.5 μ M)、SB431542(1 μ M)、SAG(100nM)を添加した。

分化誘導開始後2日目にY27632を含まず、IWP-2、SB431542、BMP4(0.5nM)、SAG(700nM)を含む無血清培地を1ウェルあたり100 μ L加えた。その後、分化誘導開始後6、9、12、15、19、22、26日目にY27632とBMP4を含まず、IWP-2、SB431542とSAGを含む無血清培地を用いて半量培地交換を行った。19日目以降は、培養時の酸素分圧を40%とした。

分化誘導開始後29日目に細胞凝集体を10cm浮遊培養用ディッシュへとディッシュ1枚あたり60個の細胞凝集体を移し、無血清培地を用いて40%O₂、5%CO₂の条件下で浮遊培養を継続した。分化誘導開始後29日目から50日目は10%KSRを添加した無血清培地を、分化誘導開始後50日目以降は20%KSRを添加した無血清培地を用いて、培養した。

前記、分化誘導開始後29、61、103日目の細胞凝集体を、それぞれ4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、下垂体の前駆マーカーであるPitx1(抗Pitx1抗体、自家製(非特許文献1および2)、ギニアピッグ)およびLhx3(抗Lhx3抗体、自家製(非特許文献1および2)、ウサギ)、上皮細胞マーカーであるE-cadherin(抗E-cadherin抗体、TAKARA社製、ラット)およびEpCAM(抗EpCAM抗体、R&D社製、ヤギ)、腹側視床下部マーカーであるNkx2.1(抗Nkx2.1抗体、progen社製、マウス)、下垂体ホルモン産生細胞マーカーである副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)(抗ACTH抗体

、Fitzgerald社製、マウス）、神経系細胞マーカーであるNestin（抗Nestin抗体、R&D社製、マウス）を用いて免疫染色を行った。DAPIで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、共焦点レーザー走査型顕微鏡（オリンパス社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した。その結果、上記分化誘導法で誘導された分化誘導開始後29日目の細胞凝集体の内側にNkx2.1陽性の腹側視床下部組織が存在し（図3F）、外側にEpCAM、E-cadherin陽性の肥厚した上皮組織が形成されていた（図3B、D）。さらに、上皮組織の一部はPitx1、Lhx3陽性であり、下垂体前駆組織が形成されていることが分かった（図3C、E）。

さらに、分化誘導開始後61日目、103日目の細胞凝集体には、E-cadherin、EpCAM陽性の上皮組織（図3J、K、P、Q）の一部にACTH陽性の下垂体ホルモン産生細胞が存在していた（図3I、O）。また細胞凝集体の内側にはNestin陽性の神経組織が形成されていることが分かった（図3L）。

[0245] 実施例2：視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体からEpCAM陽性細胞集団を精製し、精製後の長期培養により下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造する例

実施例1の分化誘導法で作製した細胞凝集体は、下垂体前駆組織および下垂体組織だけでなく、視床下部組織および神経組織を含むことが分かった。この細胞凝集体から、下垂体組織だけを含む高純度な細胞凝集体を作製するため、EpCAMを用いた精製及び長期培養を実施し、精製後に得られた細胞凝集体の組成及び構造に関して検討した。

実施例1と同様の分化誘導法で得られた、分化誘導開始後62日目、100日目の細胞凝集体で、抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施した。セルソーティングとしては、（1）前処理、（2）細胞凝集体の分散、（3）EpCAM陽性細胞の分離の3つの工程にわけて実施した。

（1）Y27632による前処理

分散処理による細胞死を抑制するために、作業日の前日にY27632（20 μ M）を培地に添加し、細胞凝集体を前処理した。セルソーティング前までの以降の

操作では、細胞が曝されるすべての溶液に20 μ M Y27632を添加した。

(2) 細胞凝集体の分散

酵素処理による分散を促進するために、細胞凝集体にメスで細断または切込みを入れた。次に細胞凝集体を、PBSにて洗浄後、神経細胞分散キットの分散液(Wako社製)を加えて、37°Cで30分酵素処理を行い、さらにピペッティング操作により細胞凝集体をほぐした。反応終了後、DMEM/F12(Wako社製)にて洗浄し、コラゲナーゼ溶液を加えて、37°Cで30分旋回振盪(140~150 rpm)した。コラゲナーゼ溶液の組成は、上記のDMEM/F12に0.2%コラゲナーゼtype I(Wako社製)および0.1% BSA(Themofisher社製)を添加したものである。コラゲナーゼ処理終了後、PBSにて洗浄し、10 $\times$ TrypLE Select溶液(Themofisher社製)+0.2mg/mL DNaseI(Roche社製)を加えて、37°Cで10分酵素処理後、さらにピペッティング操作により単一細胞に分散した。20%KSRを添加した無血清培地にて懸濁・中和し、遠心後に10 μ g/mL DNaseI、20%KSRを添加した無血清培地で再懸濁した単一細胞を、70 μ mセルストレイナーに通して凝集塊を取り除いた。

(3) FACSによるEpCAM陽性細胞の分離

上記で得られた単一細胞を、遠心後に1mM EDTA、1% FBSを添加したDMEM/F-12溶液に懸濁させた。PE標識抗EpCAM抗体(Miltenyi社製)を添加し、4°Cで10分インキュベートし、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を行い、EpCAM陽性細胞を分離・回収した。FACSのためのセルソーターとして、Stream-In-Air方式の機種であるBD社のFACS Aria Fusionを用いた。

精製したEpCAM陽性細胞を、細胞非接着性96ウェル培養プレートの1ウェルあたり 10×10^4 細胞になるように200 μ Lの20%KSR、20 μ M Y27632を添加した無血清培地で再凝集させ、37°C、40%O₂、5%CO₂の条件下で浮遊培養した。浮遊培養開始後3日目以降は、Y27632を含まず、20%KSRを添加した無血清培地を用いて、3日~4日に一度の半量交換を行い、長期培養した(図4)。

分化誘導開始後62日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後41日間長期培養させた細胞凝集体(day62 sort + day41)および分化誘導開始後100日目の

細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後31日間長期培養させた細胞凝集体(day100 sort + day31)を、それぞれ4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、下垂体の前駆マーカーであるLhx3、上皮細胞マーカーであるEpCAMおよびE-cadherin、下垂体ホルモン産生細胞マーカーである副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、プロラクチン(PRL)(抗PRL抗体、Dako社製、ウサギ)、卵胞刺激ホルモン(FSH)(抗FSH抗体、Dako社製、マウス)、黄体化ホルモン(LH)(抗LH抗体、Dako社製、マウス)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)(抗TSH抗体、Dako社製、マウス)を用いて免疫染色を行った。DAPIで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、共焦点レーザー走査型顕微鏡(オリンパス社製)を用いて観察し、免疫染色像を取得した。その結果、day62 sort + day41の細胞凝集体では、EpCAM、E-cadherin陽性細胞が互いに面接着し、凝集体の全面に上皮構造が形成されていることが分かった(図5 A、C、D、F、H、I)。さらに、細胞凝集体内にACTH陽性および/またはLhx3陽性の下垂体ホルモン産生細胞又は下垂体前駆細胞が多数存在していた(図5 B、E、G、J)。加えて、PRL、FSH陽性細胞が存在していることが分かった(図5 L、N)。

また、day100 sort + day31の細胞凝集体においても、上記同様EpCAM、E-cadherin陽性細胞が互いに面接着し、凝集体の全面に上皮構造が形成されていることが分かった(図6 A、C、D、E、G、H)。さらに、細胞凝集体内にACTH陽性の下垂体ホルモン産生細胞が多数存在していた(図6 B、F)。加えて、PRL、FSH、LH、TSH陽性細胞が存在していることが分かった(図6 J、L、N、P)。すなわち、EpCAM精製後の長期培養によって得られた細胞凝集体は、上皮構造を形成し、少なくとも1種類以上の下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であることが分かった。

さらに、day62 sort + day41の細胞凝集体およびday100 sort + day31の細胞凝集体におけるACTH陽性細胞率、細胞密度および長径を定量した。ACTH陽性細胞率の定量には、各凝集体につきACTH陽性細胞が観察される箇所を共焦点レーザー走査型顕微鏡(オリンパス社製)10倍レンズで撮像した画像から

、凝集体あたりのACTH陽性細胞数およびDAPI陽性細胞数を解析し、割合を算出した。細胞密度の定量には、上記で撮像した画像を用いて、凝集体あたりのDAPI陽性細胞数および凝集体の表面積を解析し、算出した。長径の定量には、倒立顕微鏡(Keyence社製)10倍レンズで撮像した画像を用いて、計測した(図7C、D)。

その結果、day62 sort + day41の細胞凝集体およびday100 sort + day31の細胞凝集体において、ACTH陽性細胞率はそれぞれ11%、18%(図7A)、密度はそれぞれ7880 cells/mm²、7720 cells/mm²(図7B)、長径はそれぞれ633 μm、639 μm(図7E)であった。

[0246] 実施例3：EpCAM精製後の長期培養時にデキサメサゾンを追加することによる、ACTHとGHの下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造する例

実施例2の結果から、精製後の細胞凝集体は主にACTH産生細胞を含んでいることが分かった。そこで、精製後の培養時に、ステロイドとしてDexamethasoneを用いることで、細胞凝集体におけるGH産生細胞を増やすことが可能か、検討した。

実施例1と同様の条件で得られた、分化誘導開始後62日目、100日目の細胞凝集体を用いて、実施例2と同様の条件で精製し、得られたEpCAM陽性細胞を、細胞非接着性96ウェル培養プレートの1ウェルあたり 10×10^4 細胞になるように200 μLの20%KSR、20 μM Y27632を添加した無血清培地で再凝集させ、37℃、40%O₂、5%CO₂の条件下で浮遊培養した。浮遊培養開始後3日目に、Y27632を含まず、Dexamethasone(DX、アスペンジャパン社製、400 ng/mL)、20%KSRを添加した無血清培地を用いて、半量培地交換した。浮遊培養開始後3日目から24日目はDX(400 ng/mL)、20%KSRを添加した無血清培地を、浮遊培養開始後24日目以降は20%KSRを添加した無血清培地を用いて、長期培養した(図8)。

分化誘導開始後62日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後41日間長期培養させた細胞凝集体(day62 sort + day41)および分化誘導開始後100日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後31日間長期培養させた細胞凝集体(day1

00 sort + day31)を、それぞれ4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、上皮細胞マーカーであるEpCAM、下垂体ホルモン産生細胞マーカーである成長ホルモン(GH)(抗GH抗体、Santacruz社製、マウス)を用いて免疫染色を行った。DAPIで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、共焦点レーザー走査型顕微鏡(オリンパス社製)を用いて観察し、免疫染色像を取得した。その結果、day62 sort + day41の細胞凝集体およびday100 sort + day31の細胞凝集体では、DXを添加しない培養条件においても、GH陽性の下垂体ホルモン産生細胞が存在していたが(図9 B、D)、DXを添加する培養条件で、さらにGH陽性細胞数が増加することが分かった(図9 F、H)。すなわち、精製・再凝集後にDX添加することで、GH産生細胞へ分化誘導されることが示された。

[0247] 実施例4：EpCAM精製後の長期培養による、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体のACTH及びGH分泌試験の例

実施例2及び実施例3で、精製後の細胞凝集体はACTHやGH等の下垂体ホルモン産生細胞を含むことが分かった。そこで、精製後の長期培養によるACTH及びGH分泌能への影響について検討した。

実施例1と同様の条件で得られた、分化誘導開始後62日目、100日目の細胞凝集体を用いて、実施例2又は実施例3と同様の条件で精製し、長期浮遊培養を実施した。

分化誘導開始後62日目及び100日目の細胞凝集体を用いて精製・再凝集させた、EpCAM陽性及びEpCAM陰性それぞれの細胞凝集体の培養上清を経時的に回収し、ACTH及びGHの分泌量を測定した。また、精製後の細胞凝集体の培養日数と同時期に相当する、精製前の細胞凝集体(day62 sort + day41=分化誘導開始後103日目)の培養上清も回収・測定し、比較した。回収した培養上清中のACTH及びGH濃度は、臨床検査で使われているELISA法によって測定した(株式会社SRLへ検査委託)。取得したACTH及びGHの濃度(pg/mL、ng/mL)のデータをもとに、サンプリング時の細胞凝集体の総数及び培養培地の総量から1細胞凝集体あたりの分泌量(pg/aggregate、ng/aggregate)を計算し、グラフにし

た。精製前の細胞凝集体は、20～60個/20mL/dishで、精製後の細胞凝集体は、1個/200 μ L/wellで培養していた。

その結果、分化誘導開始後62日目の細胞凝集体から精製・再凝集させ、69日間浮遊培養した細胞凝集体では、ACTHの分泌量が経時的に増加していた（図10A）。さらに、精製後にDXを添加して培養することで、GHの分泌量が増加し、ACTHだけでなくGHも同時に分泌されていることが分かった（図10B）。

また、分化誘導開始後100日目の細胞凝集体から精製・再凝集させ、31日間浮遊培養した細胞凝集体では、ACTHの分泌量は浮遊培養開始後13日目までは増加するが、その後減少していた（図11A）。さらに、精製後にDXを添加して培養することで、GHの分泌量が経時的に増加し、ACTHだけでなくGHも同時に分泌されていることが分かった（図11B）。

これらの結果から、精製・再凝集後に少なくとも13日間長期培養することで、ACTH及びGHの分泌能が向上することが分かった。

分化誘導開始後62日目の細胞凝集体から精製・再凝集させ、41日間浮遊培養した細胞凝集体を用いて、CRH(ニプロESファーマ社製)によるACTH刺激試験を実施した。細胞凝集体20個を、20%KSRを添加した無血清培地 10mLが入った10cm浮遊培養用ディッシュに移し、37°C、40%O₂条件下で24時間培養後、培養上清を回収した。細胞凝集体を、20%KSRを添加した無血清培地で洗浄後、20%KSRを添加した新しい無血清培地 10mLが入った10cm浮遊培養用ディッシュに移し、CRH 5 μ g/mLを添加した。37°C、40%O₂条件下で24時間培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清中のACTH濃度は、臨床検査で使われているELISA法によって測定した（株式会社SRLへ検査委託）。

その結果、CRHの添加によってACTH分泌量が2倍弱に増加していた（図10C）。以上の結果から、精製・再凝集後の長期培養で得られた細胞凝集体は、分泌能だけでなく応答性も有した、機能的な下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であることが分かった。

[0248] 実施例5：ヒトES細胞から視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホル

モン産生細胞を含む細胞凝集体を形成する例

実施例 1 と同様の分化誘導法(抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施しない方法)を用いて、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造した。分化誘導開始後の各培養日数における分化の程度を確認するために、下垂体マーカー(PITX1, LHX3, POMC (ACTH前駆細胞))及び視床下部マーカー(RAX, NKX2.1 (TTF1))の発現変化を、定量PCRにより検討した。具体的には、以下の通り実施した。RNeasy Micro Kit (Qiagen社)を用いて、1サンプル当たり6つの細胞凝集体からRNAを抽出した。定量PCRは、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems)又はBiomark HD (Fluidigm)を用いて実施した。なお、各遺伝子のプローブは、GAPDH (Hs02758991_g1), PITX1 (Hs00267528-m1), LHX3 (Hs01033412_m1), POMC (Hs01596743_m1), RAX (Hs00429459-m1), TTF1 (Hs00968940-m1) (TaqMan Probes; Thermo Fisher Scientific)を用いた。得られたデータは内在性のコントロールとしてGAPDH を用いて規格化(normalize)した上で、比較Ct法 (Δ Ct法)を用いて定量結果を得た。

その結果、LHX3の発現は分化誘導開始6日目から60日目にかけて増加し、LHX3の発現は分化誘導開始19日目から30日目にかけて増加し、POMCの発現は分化誘導開始30日目以降に増加した(図 1 2 A)。これらの結果から、段階的に下垂体への分化が誘導されていることが示された。

一方、RAXの発現は分化誘導開始3日目から6日目頃にはプラトーに達し、その後減少した(図 1 2 B)。また、TTF1の発現は分化誘導開始6日目から19日目にかけて増加し、その後減少した(図 1 2 B)。これらの結果から、分化の初期段階において、下垂体前駆組織への分化と共に、視床下部(腹側視床下部)への分化が進行していることが示唆された。

[0249] 実施例 6 : 視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体からEpCAM陽性細胞集団を精製し、精製後の長期培養により下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造する例

実施例 1 と同様の分化誘導法を用いて、視床下部細胞、下垂体前駆細胞お

よび下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造した。セルソーティングを行わない細胞凝集体については、分化誘導開始後131日目まで培養した。一部の細胞凝集体においては、分化誘導開始後30日目、60日目及び100日目に、抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施した。セルソーティングは、実施例2と同様に実施した。精製したEpCAM陽性細胞又はEpCAM陰性細胞を、細胞非接着性96ウェル培養プレートの1ウェルあたり 10×10^4 細胞になるように200 μ Lの20%KSR、20 μ M Y27632を添加した無血清培地で再凝集させ、37°C、40%O₂、5%CO₂の条件下で浮遊培養した。浮遊培養開始後3日目以降は、Y27632を含まず、20%KSRを添加した無血清培地を用いて、3日～4日に一度の半量交換を行い、分化誘導開始後131日まで培養した（図4）。その後、得られた細胞凝集体におけるPOMC、NESTIN及びSOX11の遺伝子発現を、定量PCRを用いて定量した。定量PCR及びその解析は、実施例5と同様に実施した。なお、各遺伝子のプローブは、GAPDH (Hs02758991_g1), POMC (Hs01596743_m1), NESTIN (Hs04187831-g1), SOX11 (Hs00846583_s1) (TaqMan Probes; Thermo Fisher Scientific)を用いた。

その結果、EpCAM陽性細胞を再凝集させた細胞凝集体ではPOMCの発現量が高く、EpCAM陰性細胞を再凝集させた細胞凝集体ではほとんどPOMCの発現が認められなかった（図13A、C、E）。この結果は、抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングの実施タイミングに関わらず同様であった（図13A、C、E）。

一方、分化誘導開始後60日目、100日目にソーティングした場合には、EpCAM陽性細胞を再凝集させた細胞凝集体において目的外細胞のマーカーであるNESTIN及びSOX11の発現は低く、EpCAM陰性細胞を再凝集させた細胞凝集体において同マーカーの発現量は高かった（図13D、F）。これに対し、分化誘導開始後30日目にソーティングした場合には、EpCAM陰性細胞を再凝集させた細胞凝集体だけでなく、EpCAM陽性細胞を再凝集させた細胞凝集体においても、NESTIN及びSOX11の発現量は高かった（図13B）。

これらの結果から、EpCAM抗体を用いたセルソーティングを行うことにより

、下垂体細胞を精製できることが判明した。また、目的外細胞の混入を減少させるためには、本願の分化誘導方法において、分化誘導開始60日以降にソーティングの方が好ましいことが判明した。

[0250] 実施例 7：視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体からEpCAM陽性細胞集団を精製し、精製後の長期培養により下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造する例

実施例 1 と同様の分化誘導法を用いて、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造した。分化誘導開始後60日目に、抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施し、その後EpCAM陰性細胞及びEpCAM陽性細胞をそれぞれ再凝集させた。セルソーティング及び再凝集は、実施例 6 と同様に実施した。その後、分化誘導開始103日目又は107日目まで培養し、実施例 2 と同様に、それぞれ凍結切片を作製した。これらの凍結切片に対し、実施例 2 に記載している抗体を用いて免疫染色を行い、DAP Iで細胞核を染色した。これらの染色された切片を、共焦点レーザー走査型顕微鏡（オリンパス社製）を用いて観察し、免疫染色像を取得した。

その結果、EpCAM陽性細胞の再凝集体について、実施例 2 と同様の染色像が得られた。すなわち、EpCAM、E-cadherin陽性細胞が互いに面接着し、凝集体の全面に上皮構造が形成され、細胞凝集体内にACTH陽性の下垂体ホルモン産生細胞が多数存在し（ $10.8 \pm 1.3\%$ of total cells）、PRL、FSH、LH、TSH陽性細胞が存在していることが分かった（data not shown）。さらに、抗ACTH抗体（mouse, 1:200; Fitzgerald）及び下垂体幹細胞マーカーCXADRに対する抗CXADR抗体（rabbit; 1:100; Atlas antibodies）を用いて免疫染色をおこなった結果、CXADR陽性及びACTH陰性細胞が存在していることが分かった（図 14 A、B、C）。従って、EpCAM陽性細胞の再凝集体では、下垂体ホルモン産生細胞のみならず、CXADR陽性の下垂体幹細胞も存在すること、及び、CXADR陽性はACTH分泌細胞とは別に存在していることが判明した。

一方、EpCAM陰性細胞の再凝集体において、視床下部細胞（RAX陽性細胞：図 14 E、F、H）、目的外細胞（NESTIN陽性細胞、SOX11細胞：図 14 E、

F、G、I、J)が存在し、非下垂体細胞(ACTH陰性、EpCAM陰性かつE-cadherin陰性：図14D)であることが確認された。

さらに、EpCAM陽性細胞の再凝集後、分化誘導開始201日目まで培養した細胞凝集体を、4%パラホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒド及び2%スクロースを用い、4℃で3日間固定した。常法に従い、アルコール溶液による脱水及びLR-WHITE樹脂(Nissin EM)により重合及び包埋の後、超薄切片を作成し、電子顕微鏡により観察した(Hitachi H-7500)。その結果、細胞凝集体において、複数の島状構造が互いにクラスターを形成していることが分かった(図15A、破線)。島状構造の表面には、線毛細胞(ciliated cells)が多く点在しており、島状構造の間に空隙(voids：図中*)が存在する事が示唆された。すなわち細胞凝集体全体がスポンジ状構造を有していることが分かった。細胞凝集体の中心部の細胞においてもネクロシスは観察されず、この理由として、空隙の存在によって培養液の栄養や酸素が内部にまで到達可能であるからと考察できる。また、ソーティングを行っていない細胞凝集体と比べて、分泌顆粒を含む細胞は内側、外側に対する極性が弱いことが分かり、結果としてヒト生体の下垂体内分泌細胞が作る、前葉の小柱構造(Trabecular structure)により近似していることが示唆された(図15A、B)。なお、下垂体・視床下部オルガノイドと同様、濾胞星状細胞(folliculo-stellate cells：FSCs)の存在も認められた(図15B、C、破線)。

また、EpCAM陽性細胞の再凝集体のホルモンに対する反応を検討した。分化誘導開始後60日目に、抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施し、その後EpCAM陽性細胞を再凝集させ、分化誘導開始103日目まで培養した。その後、CRH(ニプロESファーマ社製)又はDexamethasone(DX、アスペンジャパン社製)によるACTH刺激試験を実施した。具体的には、細胞凝集体20個を、20%KSRを添加した無血清培地10mLが入った10cm浮遊培養用ディッシュに移し、37℃、40%O₂条件下で24時間培養後、培養上清を回収した。細胞凝集体を、20%KSRを添加した無血清培地で洗浄後、20%KSRを添加した新しい無血清培地10mLが入った10cm浮遊培養用ディッシュに移し、CRH 5 µg/mL又はDexamethasone

500ng/mLを添加した。それぞれ、無添加群をコントロールとして設定した。37℃、40%O₂条件下で24時間培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清中のACTH濃度は、臨床検査で使われているELISA法によって測定した（株式会社SRLへ検査委託）。その結果、CRH刺激によりACTH分泌量は約2.2倍に増加し、Dexamethasone刺激によりACTH分泌量は約50%低下した（図16）。これらの結果より、EpCAM陽性細胞の再凝集体において、ホルモンによるホメオスタシスが維持されていることが示された。

[0251] 実施例8：EpCAM陽性細胞の再凝集体を下垂体機能不全マウスに移植し薬効を確認する例

実施例1と同様の分化誘導法を用いて、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造した。分化誘導開始後60日目に、抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施し、その後EpCAM陽性細胞を再凝集させた。セルソーティング及び再凝集は、実施例6と同様に実施した。その後、分化誘導開始107日目まで培養し、外科的に下垂体を切除した下垂体機能不全マウス(10-17週齢)の左腎被膜下に移植した(移植群)。移植手技のみ実施し、EpCAM陽性細胞を移植しない対象群(シャム群)も設定した。なお、外科的に下垂体を切除した下垂体機能不全マウスは、SCIDマウス(7-9週齢、雄)に対し公知の継耳的手術を行うことで作製した。移植24週後、腎臓を摘出し、各種抗体(human nuclei (mouse, 1:1000; Millipore)、ACTH (mouse, 1:200; Fitzgerald)、EpCAM (goat; 1:500; R&D Systems)、CXADR (rabbit; 1:100; Atlas antibodies))を用い、常法により免疫染色を実施した。その結果、ヒト核陽性かつEpCAM陽性移植片は、ACTH陽性細胞を含んでいることが分かった(図17A、B、B'、C)。また、移植片、特に細胞間隙においてCXADRの発現が認められ、移植片において、FSCsの下垂体幹細胞ニッチ様構造の存在が示唆された(図17D、E)。なお、観察期間中において、がんの形成は認められなかった。図17A、図17B、図17B'、図17D、図17Eの右下のスケールバーは50μm、図17Cの右下のスケールバーは10μmを示す。

移植群及びシャム群に対しCRH刺激を加え、ACTH分泌能に与える影響を検討した。具体的には、移植4週、12週又は24週後のマウスにCRH投与(2 μ g/kg、腹腔内投与)を行い、CRH投与前及びCRH投与1時間後の血液を採取した。ACTH ELISA kit (MD Bioproducts)を用い、それぞれの血中ACTH濃度を測定した。

その結果、移植4週後には、シャム群に比べ移植群における血中ACTH濃度が顕著に上昇していた(図18A)。CRH刺激による血中ACTH濃度の更なる上昇も認められた(図18A)。血中ACTH濃度上昇及びCRH刺激による更なるACTH濃度上昇は、移植24週後まで認められた(図18A)。

移植群に対しDexamethasone刺激を加え、ACTH分泌能に与える影響を検討した。具体的には、移植6週後にdexamethasone投与(0.2 mg、筋肉内投与)を行い、dexamethasone投与前及びdexamethasone投与2時間後の血液を採取した。dexamethasone投与2時間後の採血ののち、さらにCRH投与(2 μ g/kg、腹腔内投与)を行い、CRH投与1時間後の血液を採取した。上記同様血中ACTH濃度を測定した。

その結果、移植6週後のマウスにdexamethasone投与した群では、血中ACTH濃度が顕著に減少することが分かった(図18B)。また、dexamethasone投与した上でCRH投与を行っても、血中ACTH濃度はほぼ完全に抑えられたままであった(図18B)。dexamethasoneによるネガティブフィードバックシグナルに反応を示したことは、生体内でACTH分泌が不要となった時に下流のグルココルチコイドからの刺激で分泌が止まることを示唆し、グルココルチコイド過剰を防ぐ観点で重要である。

感染や手術のような強いストレスがかかった場合、健常人では下垂体から大量のACTHが分泌され、コルチコステロイドの分泌を刺激することで、ストレスに対する耐性を示すことが知られている。そこで、移植群及びシャム群に対し、疑似感染ストレスを誘発するために、LPS(InvivoGen, E. coli origin, serotype 0111:B4)刺激を加え、ACTH分泌能に与える影響を検討した。具体的には、移植4週後のマウスにLPS投与(2.2 μ g/kg、腹腔内投与)を行い、LPS投与前及びLPS投与2時間後の血液を採取した。上記同様血中ACTH濃度を測

定した。

その結果、シャム群においてLPS刺激によるACTH分泌促進は認められなかったが、移植群においてLPS刺激による顕著なACTH分泌促進が認められた（図18C）。当該効果は、移植するEpCAM陽性細胞の凝集体の個数を増やすことにより上昇し、用量依存性が認められた（図18C）。従って、移植したEpCAM陽性細胞は、感染ストレスに対する反応を示すことが示唆された。

[0252] 実施例9：ヒトiPS細胞から視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を形成する例

実施例1と同様の分化誘導法（抗EpCAM抗体を用いたセルソーティングを実施しない方法）を用いて、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造した。ただし、SAGの処理期間について、分化誘導開始直後から30日目までSAGを添加する群（図2参照）と、分化誘導開始直後から30日目以降（61日目、103日目及び131日目まで）もSAGを添加する群の2群を設定し、ACTH分泌能を比較した。

その結果、分化誘導開始30日後にSAG処理を止めることにより、ACTH分泌能が向上することが分かった（図19）。

[0253] 実施例10：EpCAM精製後の長期培養時にデキサメタゾン添加期間を変えることによる、比率の異なるACTHとGHの下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を製造する例

実施例3および実施例4の結果から、精製後の細胞凝集体の培養時にDXを用いることで、GH産生細胞に分化誘導できることが分かった。そこで、培養時のDX添加期間を変えることによる、細胞凝集体におけるACTH産生細胞およびGH産生細胞への分化の影響について、検討した。

実施例1と同様の条件で得られた、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて、実施例2と同様の条件で精製し、得られたEpCAM陽性細胞を、細胞非接着性96ウェル培養プレートの1ウェルあたり 10×10^4 細胞になるように200 μ Lの20%KSR、20 μ M Y27632を添加した無血清培地で再凝集させ、37°C、40%O₂、5%CO₂の条件下で浮遊培養した。浮遊培養開始後3日目に、Y27632を含まず、

DX (400 ng/mL)、20%KSRを添加した無血清培地を用いて、半量培地交換した。DX添加期間の条件検討として、DXを3、7、14日間添加した条件と無添加条件を比較した。浮遊培養開始後3日目からDX添加している際はDX (400 ng/mL)、20%KSRを添加した無血清培地を、DX添加していない際は20%KSRを添加した無血清培地用いて、長期培養した(図20)。

分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて精製し、再凝集後40日間長期培養させた細胞凝集体(day63 sort + day40)を、それぞれ4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製した。これらの凍結切片に関し、上皮細胞マーカーであるEpCAM、下垂体ホルモン産生細胞マーカーである副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、成長ホルモン(GH)を用いて免疫染色を行った。その結果、day63 sort + day40の細胞凝集体では、DXの添加期間が長くなるに従って、ACTH陽性細胞数が減少し、GH陽性細胞数が増加することが分かった(図21)。

また、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体を用いて精製・再凝集させた、DX添加したEpCAM陽性及びEpCAM陰性それぞれの細胞凝集体の培養上清を経時的に回収し、ACTH及びGHの分泌量を実施例4と同様の条件で測定した。その結果、分化誘導開始後63日目の細胞凝集体から精製し、再凝集後40日間長期培養させた細胞凝集体(day63 sort + day40)では、DX添加期間依存的にACTHの分泌量が減少し(図22A)、GHの分泌量が増加していた(図22B)。すなわち、精製・再凝集後のDX添加期間を変えることで、ACTH産生細胞及びGH産生細胞への分化誘導の比率を調節できることが示された。

分化誘導開始後63日目の細胞凝集体から精製・再凝集させ、40日間浮遊培養し、そのうち14日間DXを処置した細胞凝集体を用いて、GRFによるGH刺激試験およびsomatostatinによるGH抑制試験を実施した。細胞凝集体15個を、20%KSRを添加した無血清培地2 mLが入った6穴培養プレート(住友ベークライト社製、浮遊細胞培養用、培養面積9.2cm²)に移し、37℃、40%O₂条件下で24時間培養後、培養上清を回収した。細胞凝集体を、20%KSRを添加した無血清培地で洗浄後、20%KSRを添加した新しい無血清培地 2mLが入った6穴培養プレート

に移し、GRF 2 μ g/mLまたはsomatostatin 100 ng/mLを添加した。37°C、40% O_2 条件下で24時間培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清中のACTH濃度は、臨床検査で使われているELISA法によって測定した（株式会社SRLへ検査委託）。その結果、GRFの添加によってGH分泌量が2倍弱に増加し（図22C）、somatostatinの添加によってGH分泌量が2割減少していた（図22D）。以上の結果から、精製・再凝集後の長期培養時にDX処置して得られた細胞凝集体は、GHの分泌能だけでなく応答性も有した、機能的な下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であることが分かった。

産業上の利用可能性

[0254] 本発明の方法は、多能性幹細胞を視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生を含む細胞凝集体まで分化させ、EpCAMをマーカー用いて機能的な下垂体ホルモン産生細胞及び/又はその前駆細胞を効率的に分離し、当該細胞をさらに分化させることによって、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を効率よく取得することが可能である。また、分離・精製した下垂体ホルモン産生細胞等は、生理的な下垂体ホルモン分泌刺激により優れた下垂体ホルモンの分泌能を示すため、該細胞を用いた下垂体に関する疾患の治療等に利用可能である。

本出願は、日本で出願された特願2021-162253（出願日：令和3年9月30日）および特願2022-116715（出願日：令和4年7月21日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体であって、
- (1) 該細胞凝集体におけるEpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞の存在割合が80%以上であり、
 - (2) 該細胞凝集体における神経細胞の存在割合が20%以下であり、
 - (3) 該細胞凝集体におけるACTH陽性細胞の存在割合が5%以上であり、
 - (4) 該細胞凝集体の細胞密度が3,000～20,000 cells/mm²であり、
 - (5) 該細胞凝集体の長径が200～3,000 μmであり、
 - (6) 該細胞凝集体の表面において、EpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞が互いに面接着し、上皮構造を形成しており、かつ、
 - (7) 該細胞凝集体の内部が、スポンジ状構造を形成している、ことを特徴とする、細胞凝集体。
- [請求項2] 該細胞凝集体における下垂体幹細胞の存在割合が3%以上である、請求項1に記載の細胞凝集体。
- [請求項3] 該細胞凝集体のACTH分泌能が200～1,000,000 pg/mLである、請求項1に記載の細胞凝集体。
- [請求項4] 該細胞凝集体のGH分泌能が0.05～100 ng/mLである、請求項1に記載の細胞凝集体。
- [請求項5] 請求項1に記載の細胞凝集体を全細胞凝集体数の40%以上含む、細胞集団。
- [請求項6] 請求項1に記載の細胞凝集体を含む、下垂体の障害に基づく疾患の治療薬。
- [請求項7] 以下の工程を含む、下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体の製造方法：
- (1) 多能性幹細胞由来の、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む、分散された細胞集団から、EpCAMを発

現する細胞を分離する工程、及び

(2) 分離されたEpCAM発現細胞を、下垂体前駆細胞を下垂体ホルモン産生細胞へ成熟し得る条件下で14日以上浮遊培養する工程。

[請求項8]

工程(1)の細胞集団が、下記工程(A)及び(B)により得られる、請求項7に記載の製造方法：

(A) 視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体に分化誘導可能な条件下において、多能性幹細胞またはその細胞凝集体を培養する工程、及び、

(B) (A)で得られる視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を細胞集団に分散させる工程。

[請求項9]

工程(A)が、以下の工程を含む、請求項8に記載の製造方法。

(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培養し、細胞凝集体を形成させる第一工程。

(2) 第一工程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Shhシグナル伝達経路作用物質の存在下に培養し、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得る第二工程。

[請求項10]

工程(A)が、以下の工程を含む、請求項8に記載の製造方法。

(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Shh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、細胞凝集体を形成させる第一工程、

(2) 第一工程で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質およびShhシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得る第二工程。

[請求項11]

工程(A)が、以下の工程を含む、請求項8に記載の製造方法。

(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Shh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工程で得られた多能性幹細胞をJNKシグナル伝達経路阻害物質およびWntシグナル伝達経路阻害物質の存在下で浮遊培養し、細胞凝集体を形成させる第一工程。

(2) 第一工程で得られた細胞凝集体を、BMPシグナル伝達経路作用物質およびShhシグナル伝達経路作用物質の存在下で浮遊培養し、視床下部細胞、下垂体前駆細胞および下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体を得る第二工程。

[請求項12] 第一工程における浮遊培養がさらにShhシグナル伝達経路作用物質の存在下であって、第一工程および第二工程におけるShhシグナル伝達経路作用物質の存在下における培養期間が、30日である、請求項11に記載の製造方法。

[請求項13] 第二工程で得られた細胞凝集体を、Shhシグナル伝達経路作用物質の非存在下でさらに浮遊培養する、請求項9～12のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項14] 工程(A)の培養期間が、ACTHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含み、かつ、GH又はTSHを分泌する下垂体ホルモン産生細胞を含まない細胞凝集体が得られる期間である、請求項8～12のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項15] 工程(A)の培養期間が、30日以上かつ100日以下である、請求項8～12のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項16] 下垂体ホルモン産生細胞を含む細胞凝集体が以下の特徴を含む、請求項7～12のいずれか1項に記載の製造方法：

(1) 該細胞凝集体におけるEpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞の存在割合が80%以上であり、

(2) 該細胞凝集体における神経細胞の存在割合が20%以下であり、

(3) 該細胞凝集体におけるACTH陽性細胞の存在割合が5%以上であり、

(4) 該細胞凝集体の細胞密度が3,000~20,000 cells/mm²であり、

(5) 該細胞凝集体の長径が200~3,000 μmであり、

(6) 該細胞凝集体の表面において、EpCAM及びE-cadherinの少なくとも1つが陽性の細胞が互いに面接着し、上皮構造を形成しており、かつ、

(7) 該細胞凝集体が、スポンジ状構造を形成している。

[請求項17] 該細胞凝集体における下垂体幹細胞の存在割合が3%以上である、請求項16に記載の製造方法。

[請求項18] 該細胞凝集体のACTH分泌能が200~1,000,000 pg/mLである、請求項16に記載の製造方法。

[請求項19] 該細胞凝集体のGH分泌能が0.05~100 ng/mLである、請求項16に記載の製造方法。