

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6440711号  
(P6440711)

(45) 発行日 平成30年12月19日 (2018.12.19)

(24) 登録日 平成30年11月30日 (2018.11.30)

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| (51) Int. Cl.            | F I            |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N 5/10   |
| C 1 2 N 5/074 (2010.01)  | C 1 2 N 5/074  |
| C 1 2 N 5/0735 (2010.01) | C 1 2 N 5/0735 |
| A 6 1 K 35/22 (2015.01)  | A 6 1 K 35/22  |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01)  | A 6 1 P 13/12  |

請求項の数 13 (全 28 頁)

|               |                               |           |                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2016-530450 (P2016-530450)  | (73) 特許権者 | 591003013            |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年7月25日 (2014.7.25)        |           | エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー   |
| (65) 公表番号     | 特表2016-529891 (P2016-529891A) |           | F. HOFFMANN-LA ROCH  |
| (43) 公表日      | 平成28年9月29日 (2016.9.29)        |           | E AKTIENGESELLSCHAFT |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2014/065991             |           | スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  |
| (87) 国際公開番号   | W02015/014731                 |           | グレンツァーヘルストラッセ124     |
| (87) 国際公開日    | 平成27年2月5日 (2015.2.5)          | (74) 代理人  | 100102978            |
| 審査請求日         | 平成29年6月14日 (2017.6.14)        |           | 弁理士 清水 初志            |
| (31) 優先権主張番号  | 13178342.5                    | (74) 代理人  | 100102118            |
| (32) 優先日      | 平成25年7月29日 (2013.7.29)        |           | 弁理士 春名 雅夫            |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    | (74) 代理人  | 100160923            |
|               |                               |           | 弁理士 山口 裕孝            |
|               |                               | (74) 代理人  | 100119507            |
|               |                               |           | 弁理士 刑部 俊             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞の複数能力を有する腎前駆細胞への分化のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、多能性幹細胞を、SIX2を発現する腎前駆細胞へ分化させるための方法：

- (a) 多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する段階、  
 (b) グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (Gsk3a-b) の低分子阻害剤および組換え骨形態形成タンパク質-4 (BMP4) を補給した刺激培地中で該細胞をインキュベートする段階であって、Gsk3a-bの低分子阻害剤が、3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである、段階、  
 (c) 誘導培地中で、該刺激された細胞のインキュベートによって分化を誘導する段階であって、該誘導培地が、組換え骨形態形成タンパク質-7 (BMP7) およびレチノイン酸を補給した無血清培地である、段階。

【請求項 2】

腎前駆細胞が、さらなるマーカー遺伝子であるWT1および/またはSALL1を発現する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

段階(a)の多能性培地が、タンパク質キナーゼのRho結合コイルドコイル形成タンパク質セリン/スレオニンキナーゼファミリーの阻害剤 (ROCKキナーゼ阻害剤) を補給した無血清培地である、請求項1または2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4】

ROCKキナーゼ阻害剤が、1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン、N-ベンジル-2-(ピリミジン-4-イルアミノ)チアゾール-4-カルボキサミド、および(+)-(R)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロ-ヘキサカルボキサミドジヒドロクロリドの群から選択される、請求項3記載の方法。

【請求項5】

段階(b)の刺激培地が、インスリン、トランスフェリン、およびプロゲステロンを補給した無血清培地である、請求項1から4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

段階(a)が、18時間～30時間の、多能性培地における細胞のインキュベーションを含む、請求項1から5のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項7】

段階(b)が、2～4日間の、刺激培地における細胞のインキュベーションを含む、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

段階(c)が、18時間～48時間の、誘導培地における細胞のインキュベーションを含む、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

(d)有足細胞の増殖に適する条件下で段階(c)の生成物をインキュベーションする段階をさらに含む、請求項1から8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

20

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項1から9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

人工多能性幹細胞がヒト細胞である、請求項10記載の方法。

【請求項12】

人工多能性幹細胞が、腎疾患を患う対象から得られたものである、請求項10または11記載の方法。

【請求項13】

SIX2を発現する腎前駆細胞または分化した有足細胞のバイオバンクを作製する段階をさらに含む、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本出願は、多能性幹細胞(PSC)を、Six2を発現する定義された複数能力を有する腎前駆細胞へ分化させるための方法に関する。これらの腎前駆細胞は、完全に機能的な、かつ完全に分化した有足細胞へ分化することができる。さらに、本出願は、化学的に定義された培地による誘導の連鎖的な段階に基づいて、ヒト胚性幹細胞(ESC)および人工多能性幹細胞(iPSC)を、Six2を発現する定義された腎前駆細胞および有足細胞へ分化させるための方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

背景

腎細胞は、基礎研究、疾患モデル、組織工学、薬物スクリーニング、およびインビトロ毒性学において使用される。腎臓は、高度に分化して複雑化した構造を有し、体液の重量オスモル濃度、体液と電解質のバランスの調節、酸-塩基のバランスの調節、代謝老廃物および外来化学物質の排出、ならびに、血圧および赤血球生成を制御するホルモンの産生などの、多くの生理学的過程において中心的な役割を有する。腎臓は、ひとたび損傷を受けると、その機能を回復することはめったにない。腎細胞(例えば、有足細胞および尿管細胞)は、急性壊死後にある程度まで再生することができる。しかしながら、腎臓は、一般的に、慢性腎疾患を有する患者において再生せず(Humphreys and Bonventre, 2007

50

）、末期腎不全をもたらす。慢性腎疾患（CKD）は、西洋諸国において成人人口の11%に影響を及ぼす、罹患率および死亡率の大きな原因である。CKDを有する人々は、生活の質の実質的な損失に苦しむ。移植用のドナー腎は永続的に不足しているため、この疾患によって引き起こされる薬剤経済学的負担は、非常に大きい。

#### 【0003】

哺乳動物の腎臓は、腎管（ND）および後腎間充織（MM）を生じる、中間中胚葉（IM）に由来する。NDは、2種の鍵となる細胞タイプである主細胞および介在細胞から構成される、集合管系を生じる。MMは、キャップ間充織（CM）を特定化し、間質も生じる。CMは、ネフロン前駆体集団であり、間充織から上皮への移行を介して腎小胞において分化する。

#### 【0004】

ネフロンは、糸球体房状分岐すなわち糸球体、および腎細管からなる。糸球体は、尿としての排出のために老廃物を分離する、高度に専門化した濾過ユニットである。糸球体における血液と尿との間の濾過障壁は、有足細胞と呼ばれる、高度に専門化し、最終分化した細胞によって提供される。

#### 【0005】

証拠を集めると、有足細胞に対する損傷が、腎機能の喪失を誘発する鍵となる事象の一つであることが示唆される。有足細胞の損傷は、高インスリン血症、血行力学的機構および他の機構のために二次的に生じる。有足細胞の進行性の喪失によって、タンパク尿の増加およびクリアランス機能の低減を伴う、糸球体の広範な硬化症がもたらされる（Wiggins, 2007）。

#### 【0006】

しかしながら、腎臓のネフロンにおいて病態生理学的変化をもたらす、インスリン抵抗性および再生特性の喪失の根底となる機構は、完全には理解されていない。従って、CKDのような腎疾患の生物学を研究するため、および新たな処置の開発を促進するために、インビトロ細胞モデルの必要がある。

#### 【0007】

胚性幹（ES）細胞および患者特異的な人工多能性幹細胞（iPSC）は、再生医療および創薬の疾患モデリングのための大規模な腎前駆細胞および有足細胞の産生のための、可能性のある供給源である。人工多能性幹細胞（iPSC）技術（Takahashi, K. & Yamanaka, S., "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell* 126, 663-676 (2006)）で、4種の定義された因子（Sox2, Oct4, Klf4, c-20 Myc）の導入により、体細胞をリプログラミングしてiPSCにすることができる。iPSC技術によって、患者特異的な腎細胞へ分化させることができる患者特異的なiPSCの生成が可能になる。これらの患者特異的な腎細胞は、例えば、慢性腎疾患（CKD）、巣状分節状糸球体硬化症（FSGS）、膜性増殖性糸球体腎炎、多嚢胞性腎疾患（PKD）、および2型糖尿病と関連する糖尿病性腎症などの腎疾患の病態生理学のインビトロモデリングに、または薬物毒性の評価のために有用である。そのようなインビトロ疾患モデリングを試みるための一つの重要な前提条件は、効率的、堅牢、かつ拡大縮小可能な分化システムの実行である（Tiscornia et al., 2011）。

#### 【0008】

ヒトPSCを腎細胞へ分化させるこれまでの努力は、ヒトにおいても（Batchelder et al., 2009; Lin et al., 2010; Mae et al., 2013; Narayanan et al., 2013; Song et al., 2012）、またはマウスにおいても（Kim and Dressler, 2005; Mae et al., 2010; Morizane et al., 2009; Nishikawa et al., 2012; Ren et al., 2010）、創薬推進事業または再生細胞療法に妥当な規模および有効性に達していない。さらに、大きな懸念は、細胞の望ましくない組織への不良な分化、またはまさに奇形腫の形成である。この危険を回避するために、細胞を、一方では関心対象の成熟腎細胞を再生する潜在性を提供し、他方では不良な分化を阻止すると考えられる分化の状態に方向づけなければならない。これは、腎臓の転写因子の正確なネットワークの制御された活性化によって達成することができる。不幸なことに、インビトロでこの正確な分化の状態に到達するのは、かなり困難であるこ

10

20

30

40

50

とが判明している。増殖因子の組み合わせ〔骨形態形成タンパク質（BMP）/アクチビン/レチノイン酸〕および遺伝学的アプローチの両方を適用して、この様式で多能性細胞を誘導するための多くの試みがなされてきている。しかしながら、ほとんどの分化研究は、腎系列遺伝子を誘導することに成功した後であっても、ESCが腎系列に沿って分化した腎形成における正確な時期（IM、MM、CM）を正しく指摘することはできなかった。

【0009】

従って、ヒト多能性幹細胞の腎臓系列への分化を刺激するための、非常に効率的な、かつ化学的に定義された方法を、相変わらず開発するべきである。

【0010】

Mae et al. 2013には、無血清培地中での定義された誘導段階を用いる、ヒト多能性幹細胞を、Osr1を発現する中間中胚葉細胞へ分化させるためのプロトコルが記載されている。著者らは、未分化細胞をAccutaseで分離して単層の細胞を取得し、第1段階では、アクチビンA、GSK3 阻害剤、およびROCKキナーゼ阻害剤で、第2段階では、BMP7およびGSK3阻害剤で分化を誘導した。著者らは、わずか11日目に、90%のOsr1陽性細胞を取得した。PAX2、LIM1、WT1、CITED2、EYA1、およびSALL1（発生中の腎臓、生殖腺、および副腎皮質についてのマーカー遺伝子）の発現が、18日後に観察され、著者らが、異なる細胞タイプおよび異なる分化段階における細胞の不均質な細胞集団を取得したことが示された。

【0011】

Lin et al., 2010には、血清濃度およびフィーダー層密度を14日間低減させることによる、ヒト胚性幹細胞の中胚葉性腎前駆体系列への分化が記載されている。著者らは、分化したヒト胚細胞の不均質な集団を取得し、フローサイトメトリーによって分画した。

【0012】

Batchelder et al., 2009には、胚性幹細胞を、レチノイン酸、アクチビンA、BMP7、またはBMP4と共にラミニンまたはゼラチン基板上で単層において培養することによる、胚性幹細胞の腎系列に向かう直接分化が記載されている。彼らは、4日目に、中間中胚葉マーカー遺伝子（PAX2、SIX2、WT1、およびOSR1）が上方制御された細胞を取得した。しかしながら、腎臓前駆細胞のマーカーおよび未分化細胞のマーカーもまた、4日目に上昇していた。Batchelderらは、この不均質な集団の定義された細胞タイプへのさらなる分化を少しも示していない。胚性幹細胞の分化は、胚様体を伴う時期を通して達成され、これが一般的に、プロトコルの再現性および標準化を限定する。

【0013】

従って、ヒト多能性幹細胞の腎臓前駆細胞への分化のための先行技術プロトコルは、大きな欠点を有する：第1に、ほとんどのプロトコルは、不均質な細胞の集団を結果としてもたらし、後腎間充織マーカーを安定して発現する定義された腎前駆細胞の絶対収率は、非常に低い。さらに、ほとんどの公知の方法によって多能性幹細胞を腎前駆細胞へ分化させるために必要とされる全体の時間は、非常に長い。多くのプロトコルが、初代細胞によって分泌される因子で調整された培地、フィーダー層との共培養などの定義されない要素を必要とし、これが、これらの方法の標準化を限定する。さらに、多くのプロトコルが、細胞の凝集物または胚様体に依拠し、これが、その不均質な性質のためにこれらの技術の再現性を制約する。

【0014】

Song et al. 2012は、ヒト人工多能性幹細胞を腎臓有足細胞へ分化させるための最初に報告されたプロトコルである。胎児ウシ血清ならびに様々な増殖因子（BMP7、アクチビン-A、およびレチノイン酸）を補給した培地中での10日の分化誘導後に、著者らは、有足細胞表現型を有するiPS細胞を取得した。彼らは、有足細胞特異的遺伝子を発現するが、依然として後腎間充織遺伝子PAX2およびWT1も発現する細胞を取得し、得られた有足細胞が未熟であり、完全には分化していないことを示している。Songらは、中間中胚葉または後腎間充織のような分化の中間段階のいずれも記載していない。

【0015】

公知のプロトコルのいずれも、PAX2の発現の下方制御を伴う、Six2、WT1、およびSALL1

10

20

30

40

50

を発現する定義された腎前駆細胞、すなわち、定義された後腎間充織細胞を提供していない。公知のプロトコルのいずれも、腎前駆細胞の有足細胞への分化を記載していない。

【0016】

要約すると、わずか6日後に非常に高い収率で後腎間充織マーカーを発現する腎前駆細胞の定義された集団を提供する方法は、存在しない。さらに、公知のプロトコルのいずれも、わずか13日後に非常に高い収率で、完全に機能的な、かつ完全に分化した有足細胞を提供していない。

【発明の概要】

【0017】

本発明は、先行技術プロトコルと比較して、より短い量の時間（6日）で、かつ有意に増大した収率（最大95%の収率の、マーカー遺伝子SIX2、SALL1、およびWT1を発現する腎前駆細胞）で、多能性幹細胞を定義された後腎間充織腎前駆段階へ分化させるための改善された方法を提供する。新たな方法は、多能性幹細胞から胚様体または小さな細胞凝集塊を取得する必要性を軽減し、これまで公知である方法の低い再現性および標準化の大きな欠点を除去する。その上、高い効率によって、創薬および安全性評価において、再生医療応用において、ならびに製薬産業におけるインビトロ疾患モデリングにおいて、これらの定義された前駆細胞を大規模で使用することが可能になる。さらに、新たな方法によって、13日後に完全に分化した有足細胞（約99%）へ分化系列決定（lineage commitment）をシフトすることができる、後腎間充織腎前駆細胞の選択的調節が可能になる。

【0018】

発明の概要

以下の段階を含む、多能性幹細胞を、SIX2を発現する腎前駆細胞へ分化させるための方法が、本明細書において提供される：

- (a) 多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する段階、
- (b) グリコゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）の低分子阻害剤を補給した刺激培地中で該細胞をインキュベートする段階、
- (c) 誘導培地中で、該刺激された細胞のインキュベートによって分化を誘導する段階。

【0019】

一つの態様において、腎前駆細胞は、さらなるマーカー遺伝子であるWT1および/またはSALL1を発現する。

【0020】

一つの態様において、グリコゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）の低分子阻害剤は、3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである。

【0021】

一つの態様において、段階（a）の多能性培地は、タンパク質キナーゼのRho結合コイルドコイル形成タンパク質セリン/スレオニンキナーゼファミリーの阻害剤（ROCKキナーゼ阻害剤）を補給した無血清培地である。

【0022】

一つの態様において、ROCKキナーゼ阻害剤は、1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン、N-ベンジル-2-(ピリミジン-4-イルアミノ)チアゾール-4-カルボキサミド、および(+)-(R)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロ-ヘキサカルボキサミドジヒドロクロリドの群から選択される。

【0023】

一つの態様において、段階（b）の刺激培地は、インスリン、トランスフェリン、およびプロゲステロンを補給した無血清培地である。

【0024】

一つの態様において、段階（b）の刺激培地は、組換え骨形態形成タンパク質-4（BMP4）をさらに含む。

【0025】

一つの態様において、段階（a）は、18時間～30時間の、多能性培地における細胞のインキュベートを含む。

【0026】

一つの態様において、段階（b）は、2～4日間の、刺激培地における細胞のインキュベートを含む。

【0027】

一つの態様において、段階（c）は、18時間～48時間の、誘導培地における細胞のインキュベートを含む。

【0028】

一つの態様において、誘導培地は、組換え骨形態形成タンパク質-7（BMP7）を補給した無血清培地である。

10

【0029】

一つの態様において、誘導培地は、レチノイン酸を補給した無血清培地である。

【0030】

一つの態様において、方法は、  
（d）有足細胞の増殖に適する条件下で段階（c）の生成物をインキュベートする段階をさらに含む。

【0031】

一つの態様において、多能性幹細胞は人工多能性幹細胞である。

【0032】

一つの態様において、人工多能性幹細胞はヒト細胞である。

20

【0033】

一つの態様において、人工多能性幹細胞は、腎疾患を患う対象から得られたものである。

【0034】

一つの態様において、本明細書に記載される態様のいずれかに従う方法によって得られた、SIX2を発現する腎前駆細胞または分化した有足細胞が提供される。

【0035】

一つの態様において、本明細書に記載される態様のいずれかに従う方法によって得られた、SIX2を発現する腎前駆細胞または分化した有足細胞のバイオバンクが提供される。

30

【0036】

一つの態様において、腎疾患のインビトロモデルとしての、本明細書に記載される態様のいずれかに従う方法によって得られたSIX2を発現する腎前駆細胞もしくは分化した有足細胞、または本明細書に記載される態様のいずれかに従う方法によって得られたSIX2を発現する腎前駆細胞もしくは分化した有足細胞のバイオバンクの該細胞の使用が提供される。

【0037】

一つの態様において、本明細書に記載される態様のいずれかに従う方法によって得られたSIX2を発現する腎前駆細胞もしくは分化した有足細胞、または該態様のいずれかに従う方法によって得られたSIX2を発現する腎前駆細胞もしくは分化した有足細胞のバイオバンクの該細胞を含む治療用組成物が提供される。

40

【0038】

上記の態様のいずれも、単独でまたは組み合わせで存在し得る。

[本発明1001]

以下の段階を含む、多能性幹細胞を、SIX2を発現する腎前駆細胞へ分化させるための方法：

（a）多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する段階、

（b）グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）の低分子阻害剤を補給した刺激培地中で該細胞をインキュベートする段階、

（c）誘導培地中で、該刺激された細胞のインキュベートによって分化を誘導する段階。

50

[本発明1002]

腎前駆細胞が、さらなるマーカー遺伝子であるWT1および/またはSALL1を発現する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (Gsk3a-b) の低分子阻害剤が、3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

段階(a)の多能性培地が、タンパク質キナーゼのRho結合コイルドコイル形成タンパク質セリン/スレオニンキナーゼファミリーの阻害剤(ROCKキナーゼ阻害剤)を補給した無血清培地である、前記本発明のいずれかの方法。

10

[本発明1005]

ROCKキナーゼ阻害剤が、1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン、N-ベンジル-2-(ピリミジン-4-イルアミノ)チアゾール-4-カルボキサミド、および(+)-(R)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロ-ヘキサンカルボキサミドジヒドロクロリドの群から選択される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

段階(b)の刺激培地が、インスリン、トランスフェリン、およびプロゲステロンを補給した無血清培地である、前記本発明のいずれかの方法。

20

[本発明1007]

段階(b)の刺激培地が、組換え骨形態形成タンパク質-4(BMP4)をさらに含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1008]

段階(a)が、18時間~30時間の、多能性培地における細胞のインキュベートを含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]

段階(b)が、2~4日間の、刺激培地における細胞のインキュベートを含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1010]

段階(c)が、18時間~48時間の、誘導培地における細胞のインキュベートを含む、前記本発明のいずれかの方法。

30

[本発明1011]

誘導培地が、組換え骨形態形成タンパク質-7(BMP7)を補給した無血清培地である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]

誘導培地が、レチノイン酸を補給した無血清培地である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]

(d)有足細胞の増殖に適する条件下で段階(c)の生成物をインキュベートする段階をさらに含む、前記本発明のいずれかの方法。

40

[本発明1014]

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1015]

人工多能性幹細胞がヒト細胞である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

人工多能性幹細胞が、腎疾患を患う対象から得られたものである、本発明1014または1015の方法。

[本発明1017]

前記本発明のいずれかの方法によって得られた、SIX2を発現する腎前駆細胞または分化した有足細胞。

50

[本発明1018]

本発明1001～1016のいずれかの方法によって得られた、SIX2を発現する腎前駆細胞または分化した有足細胞のバイオバンク。

[本発明1019]

腎疾患のためのインビトロモデルとしての、本発明1017の細胞または本発明1018のバイオバンクの細胞の使用。

[本発明1020]

本発明1017の細胞または本発明1018のバイオバンクの細胞を含む、治療用組成物。

[本発明1021]

本質的に本明細書に記載される、方法および使用。

10

**【図面の簡単な説明】****【0039】**

【図1】画像ベースのハイコンテント分析(HCA)によるBRY+、PAX2+、LIM1+であるiPSC細胞の定量化。ヒトiPS細胞を、単層条件において培養した。定量化グラフ：1日目の多能性培地中でのBRY+、PAX2+、およびLIM1+陽性細胞のパーセント。これらの知見を、全ゲノム発現プロファイリング(データは示していない)によって確認した。

【図2】画像ベースのハイコンテント分析(HCA)によるBRY+、PAX2+、LIM1+であるiPSC由来細胞の定量化。ヒトiPS細胞を、単層条件において分化させた。定量化グラフ：4日目の刺激培地中でのBRY+、PAX2+、およびLIM1+陽性細胞のパーセント。これらの知見を、全ゲノム発現プロファイリング(データは示していない)によって確認した。

20

【図3】画像ベースのハイコンテント分析(HCA)によるWT1+、SIX2+、SALL1+、およびPAX2低であるiPSC由来の複数能力を有する腎前駆細胞の定量化。ヒトiPS細胞を、単層条件において分化させた。主となるパネル：定量化グラフ：6日目の誘導培地中でのWT1+、SIX2+、SALL1+、およびPAX2+陽性細胞のパーセント。これらの知見を、全ゲノム発現プロファイリング(データは示していない)によって確認した。

【図4】画像ベースのハイコンテント分析(HCA)によるWT1+、 $\alpha$ -アクチニン4+、ネフリン+、ポドシン+、およびシナプトポジン+であるiPSC由来の機能的な有足細胞の定量化。ヒトiPS細胞を、単層条件において分化させた。主となるパネル：定量化グラフ：13日目の有足細胞増殖培地中でのWT1+、 $\alpha$ -アクチニン4+、ネフリン+、ポドシン+、およびシナプトポジン+陽性細胞のパーセント。これらの知見を、全ゲノム発現プロファイリング(データは示していない)によって確認した。

30

【図5】hESCを出発する際に用いる、有足細胞分化法の再現性。有足細胞分化法中に調節される鍵となるマーカーの、画像ベースのハイコンテント分析(HCA)定量化。ヒト胚性幹細胞株(Cellartis由来のSA001)を、単層条件において分化させた。主となるパネル：定量化グラフ：4日目の刺激培地中でのPAX2+陽性細胞；6日目の誘導培地中でのSIX2+およびSALL1+陽性細胞；13日目の有足細胞増殖培地中でのWT1+および $\alpha$ -アクチニン4+陽性細胞のパーセント。

【図6】13日目の、単層で分化したhPSC由来有足細胞の特徴決定。hiPSCを、単層条件において分化させ、13日目にTGF (10 ng/ml) ストレッサー刺激に対する機能的応答について試験した。タイトジャンクションマーカーZO-1の発現を免疫細胞化学分析によって、その細胞局在を画像ベースのハイコンテント分析(HCA)によって試験した。上のパネル：ZO-1免疫細胞化学の代表的な画像であり、TGF を含まないDMEMF12培地中では1日目に膜で画定されたZO-1局在を示し(CTR D1 - TGFb1)、TGF 刺激時には、既に1日目に、リモデリングおよび膜から核周囲帯域へのZO-1発現の移行が報告され(D1 + TGFb1)、これは、TGF での連続的な刺激によって長時間持続する(D2 + TGFb1およびD5 + TGFb1)。下のパネル：定量化グラフ：様々な日での、有足細胞におけるZO-1発現の核周囲移行についての陽性細胞のパーセント。

40

【図7】13日目の、単層で分化したhPSC由来有足細胞の特徴決定。hiPSCを、単層条件において分化させ、13日目にアンジオテンシンII(AngII)(100 nM) ストレッサー刺激に対する機能的応答について試験した。タイトジャンクションマーカーZO-1の発現を免疫細胞

50



胞化学分析によって、その細胞局在を画像ベースのハイコンテンツ分析（HCA）によって試験した。上のパネル：ZO-1免疫細胞化学の代表的な画像であり、AngIIを含まないDMEMF12培地中では1日目に膜で画定されたZO-1局在を示し（CTR D1 - AngII）、AngII刺激時には、既に1日目に、リモデリングおよび膜から核周囲帯域へのZO-1発現の移行が報告され（D1 + AngII）、これは、AngIIでの連続的な刺激によって長時間持続する（D2 + AngIIおよびD5 + AngII）。下のパネル：定量化グラフ：様々な日での、有足細胞におけるZO-1発現の核周囲移行についての陽性細胞のパーセント。

【図8a】炎症誘発性サイトカイン応答アッセイ。13日目のhPSC由来有足細胞は、TNF（1ng/mlおよび5 ng/ml）での刺激時にDMEMF12培地中で24時間後に、IL-8、RANTES、MIP1b、およびMCP1などの炎症誘発性マーカーの発現を上方制御する。主となるパネル：定量化グラフ：言及したサイトカインの収集した上清中の濃度（pg/ml）。Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth factor assayを用いて、TNF に応答するhPSC由来有足細胞の活性化を測定した。分泌されたサイトカインは、有意に上方制御されていた（定量化グラフ）。

10

【図8b】炎症誘発性サイトカイン応答アッセイ。13日目のhPSC由来有足細胞は、TNF（1ng/mlおよび5 ng/ml）での刺激時にDMEMF12培地中で24時間後に、IL-8、RANTES、MIP1b、およびMCP1などの炎症誘発性マーカーの発現を上方制御する。主となるパネル：定量化グラフ：言及したサイトカインの収集した上清中の濃度（pg/ml）。Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth factor assayを用いて、TNF に応答するhPSC由来有足細胞の活性化を測定した。分泌されたサイトカインは、有意に上方制御されていた（定量化グラフ）。

20

【図8c】炎症誘発性サイトカイン応答アッセイ。13日目のhPSC由来有足細胞は、TNF（1ng/mlおよび5 ng/ml）での刺激時にDMEMF12培地中で24時間後に、IL-8、RANTES、MIP1b、およびMCP1などの炎症誘発性マーカーの発現を上方制御する。主となるパネル：定量化グラフ：言及したサイトカインの収集した上清中の濃度（pg/ml）。Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth factor assayを用いて、TNF に応答するhPSC由来有足細胞の活性化を測定した。分泌されたサイトカインは、有意に上方制御されていた（定量化グラフ）。

【図8d】炎症誘発性サイトカイン応答アッセイ。13日目のhPSC由来有足細胞は、TNF（1ng/mlおよび5 ng/ml）での刺激時にDMEMF12培地中で24時間後に、IL-8、RANTES、MIP1b、およびMCP1などの炎症誘発性マーカーの発現を上方制御する。主となるパネル：定量化グラフ：言及したサイトカインの収集した上清中の濃度（pg/ml）。Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth factor assayを用いて、TNF に応答するhPSC由来有足細胞の活性化を測定した。分泌されたサイトカインは、有意に上方制御されていた（定量化グラフ）。

30

【図9】ヒト多能性幹細胞（PSC）を有足細胞へ分化させるための方法の概略図。0日目：ヒトPSCを酵素により解離させ、多能性培地（Y27631 10  $\mu$ Mを含むmTeSR1）中で37000細胞/cm<sup>2</sup>の濃度を用いて、プレコーティングされたマトリゲルプレート上にプレーティングした。1日目：新鮮な刺激培地（化合物21（CP21R7）1  $\mu$ Mおよび25 ng/ml BMP4を含むN2B27）で培地交換。4日目：新鮮な誘導培地（2.5% FBS、100 nMレチノイン酸、および50 ng/ml BMP7を含むDMEMF12）で培地交換。6日目：細胞をaccutaseで剥がし、遠心分離後、有足細胞増殖培地（10% FBS、0.1 mMレチノイン酸、および100 nMビタミンD3を含むDMEMF12）中で50000細胞/cm<sup>2</sup>の濃度を用いて、コラーゲンIコーティングされたプレートにプレーティングする。13日目に、有足細胞が示される。

40

【発明を実施するための形態】

【0040】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、先行技術プロトコルと比較して、より短い量の時間（6日）で、かつ有意に増大した収率（最大95%の収率の、マーカー遺伝子SIX2、SALL1、およびWT1を発現する腎前駆細胞）で、多能性幹細胞を定義された後腎間充織腎前駆段階へ分化させるための改善

50

された方法を提供する。腎前駆細胞は、SIX2、SALL1、およびWT1を発現し、これらはすべて、後腎間充織の重要なマーカーである。SIXホメオボックス2 (NCBI Gene ID: 10736) としても公知であるSIX2は、ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) の「sineoculis」ホメオボックスタンパク質に相同のタンパク質をコードする脊椎動物遺伝子ファミリーのメンバーである。コードされるタンパク質は、後腎の発生に重要な役割を有する転写因子である。SIX2は、後腎間充織の重要なマーカーである (例えば、Nishinakamura et al, 2011およびChai et al, 2013を参照されたい)。SALL1 (完全な名称: SALL1 sal様1 (ショウジョウバエ属) [ホモ・サピエンス (ヒト)] NCBI Gene ID: 6299) は、TBS; HSAL1; Sal-1; ZNF794としても公知である。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、亜鉛フィンガー転写リプレッサーであり、間充織中の多分化能ネフロン前駆体において高発現している (Nishinakamura et al, 2011)。WT1 (完全な名称: ウィルムス腫瘍1、GUD; AWT1; WAGR; WT33; NPHS4; WIT-2; EWS-WTとしても公知である、NCBI Gene ID: 7490) は、C末端に4個の亜鉛フィンガーモチーフを、およびN末端にプロリン/グルタミンに富むDNA結合ドメインを含有する転写因子をコードする。これは、泌尿生殖器系の正常な発生において不可欠な役割を有し、ウィルムス腫瘍を有する患者の小さなサブセットにおいて変異している。WT1は、後腎間充織の重要なマーカーである (例えば、Chai et al, 2013を参照されたい)。

#### 【0041】

定義された後腎間充織腎前駆細胞を得ることに加えて、新たな方法によって、後腎間充織腎前駆細胞の選択的調節が可能になり、これは、13日後に分化系列決定を完全に分化した有足細胞 (約99%) ヘシフトすることができる。

#### 【0042】

以下の段階を含む、多能性幹細胞をSIX2を発現する腎前駆細胞へ分化させるための方法が、本明細書において提供される:

- (a) 多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する段階、
- (b) グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (Gsk3a-b) の低分子阻害剤を補給した刺激培地中で該細胞をインキュベートする段階、
- (c) 誘導培地中で、該刺激された細胞のインキュベートによって分化を誘導する段階。

#### 【0043】

一つの態様において、腎前駆細胞は後腎間充織細胞である。一つの態様において、腎前駆細胞は、さらなるマーカー遺伝子であるWT1および/またはSALL1を発現する。一つの態様において、腎前駆細胞は、WT1、SALL1、およびSIX2を発現する。別の態様において、腎前駆細胞は、中間中胚葉のマーカー遺伝子を下方制御する。従って、一つの態様において、腎前駆細胞は、PAX2を非常に低いレベルでのみ発現する。PAX2 (完全な名称はペアードボックス2、NCBI Gene ID 5076、PAPRSとしても公知である) は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 遺伝子prdの多くのヒトホモログのうちの一つである、ペアードボックス遺伝子2をコードする。この転写因子遺伝子ファミリーの中心的な特徴は、保存されたDNA結合ペアードボックスドメインである。PAX2は、中間中胚葉の重要なマーカーであり (Chai et al, 2013、Nishikawa et al, 2012)、後腎間充織において下方制御されている。一つの態様において、腎前駆細胞は、LIM1および/またはBRYを発現しない。LIM1 (公式記号はLHX1、完全な名称はLIMホメオボックス1、NCBI Gene ID 3975) は、独特のシステインに富む亜鉛結合ドメインであるLIMドメインを含有する、大きなタンパク質ファミリーのメンバーをコードする。コードされるタンパク質は、腎および泌尿生殖器系の発生に重要な転写因子であり: LIM1は、腎形成性中間中胚葉のマーカーである (Nishikawa et al, 2012)。T遺伝子 (完全な名称: T、ブラキュリ (brachyury) ホモログ (マウス) [ホモ・サピエンス (ヒト)] NCBI Gene ID: 6862、本明細書において「BRY」と呼ばれる) のタンパク質産物であるブラキュリは、胚性核転写因子であり、中胚葉の分化についての決定的なベンチマークとして広く使用される (Nishikawa et al, 2012)。

#### 【0044】

好ましくは、培地を各段階の間に交換し、これは、第2の培地を細胞に添加する前に、例えば吸引によって、第1の培地を廃棄することを意味する。

【0045】

本明細書において使用される「単層の多能性細胞」とは、多層の細胞の固体塊が接着性基板に付着した種々の三次元構成体を形成する細胞凝集塊または胚様体の培養とは対照的に、多能性幹細胞が、1枚の単一薄膜において接着性基板に付着している単一細胞の状態で提供されることを意味する。

【0046】

最初の段階において単層の多能性幹細胞を提供することは、方法の再現性および効率のために重要である。一つの態様において、単層の多能性幹細胞は、細胞を酵素により単一細胞へ解離させ、それらを、プレコーティングされたマトリゲルプレート（例えば、BD BioscienceのBD Matrigel hESC-qualified、InvitrogenのGeltrex hESC-qualified、CorningのSynthemax）などの接着性基板上に持つてくることによって、作製することができる。

【0047】

単一細胞への解離に適する酵素の例は、Accutase（Invitrogen）、トリプシン25（Invitrogen）、TrypLe Express（Invitrogen）を含む。一つの態様において、cm<sup>2</sup>あたり20000～60000個の細胞を、接着性基板上にプレーティングする。本明細書において使用される培地は、単層の単一細胞としての多能性幹細胞の付着および増殖を促進する多能性培地である。

【0048】

本明細書において使用される「多能性培地」とは、多能性幹細胞の多能性を維持しながら単層上に単一細胞として多能性幹細胞を付着させるために有用な、任意の化学的に定義された培地を指し、当技術分野において周知である。一つの態様において、多能性培地は、以下の増殖因子：塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF、繊維芽細胞増殖因子2、FGF2とも示される）およびトランスフォーミング増殖因子（TGF）のうちの少なくとも一つを含む。一つの態様において、多能性培地は、タンパク質キナーゼのRho結合コイルドコイル形成タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ（ROCK）ファミリーの低分子阻害剤（本明細書においてROCKキナーゼ阻害剤と呼ばれる）を補給した無血清培地である。

【0049】

従って、一つの態様において、上記の方法の段階（a）は、ROCKキナーゼ阻害剤を補給した無血清培地である多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する工程を含む。

【0050】

付着に適する無血清多能性培地の例は、Stem Cell TechnologiesのmTeSR1またはTeSR2、ReproCELLの霊長類ES/iPS細胞用培地、およびInvitrogenのStemPro hESC SFM、LonzaのX-VIVO、Sigma AldrichのStemline Pluripotent Stem Cell Culture Medium、StemgentのNutriStem XF/FF Culture Medium、InvitrogenのEssential 8（商標）培地（プロトタイプ）、およびScienCell Research LaboratoriesのSTEMiumである。

【0051】

本明細書において有用なROCKキナーゼ阻害剤の例は、ファスジル（1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン）、チアゾピピン（N-ベンジル-2-(ピリミジン-4-10イルアミノ)チアゾール-4-カルボキサミド）、およびY27632（(+)-(R)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロ-ヘキサカルボキサミドジヒドロクロリド、例えば、Tocris bioscienceのカatalog番号：1254）である。一つの好ましい態様において、ROCKキナーゼ阻害剤はY27632である。一つの態様において、多能性培地は、2～20 μM Y27632、好ましくは5～10 μM Y27632を補給した無血清培地である。別の態様において、多能性培地は、2～20 μMファスジルを補給した無血清培地である。別の態様において、多能性培地は、0.2～10 μMチアゾピピンを補給した無血清培地である。

【0052】

一つの態様において、上記の方法の段階（a）は、多能性培地中に単層の多能性幹細胞

を提供する工程、および、1日間（24時間）、多能性培地中で単層をインキュベートする工程（増殖させる工程）を含む。別の態様において、上記の方法の段階（a）は、多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する工程、および、18時間～30時間、好ましくは23～25時間、多能性培地中で単層をインキュベートする工程を含む。

#### 【0053】

別の態様において、上記の方法の段階（a）は、ROCKキナーゼ阻害剤を補給した無血清培地である多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する工程、および、1日間（24時間）、多能性培地中で単層をインキュベートする工程を含む。別の態様において、上記の方法の段階（a）は、ROCKキナーゼ阻害剤を補給した無血清培地である多能性培地中に単層の多能性幹細胞を提供する工程、および、18時間～30時間、好ましくは23～25時間、多能性培地中で単層をインキュベートする工程を含む。

10

#### 【0054】

本明細書において使用される、「刺激培地」とも示される「刺激に適する培地」とは、腎前駆細胞に向けて多能性幹細胞を刺激するために有用な、任意の化学的に定義された培地を指す。本明細書において使用される際、「刺激培地」とは、 $\gamma$ -カテニン（カドヘリン結合タンパク質、 $\gamma$ 1；ヒト遺伝子名称CTNNB1）経路および/またはWnt受容体シグナル伝達経路および/またはヘッジホッグ（HH）シグナル伝達経路を活性化し、中間中胚葉の誘導活性を促進する低分子などの、少なくとも一つの因子を含む培地を指す。一つの好ましい態様において、刺激培地は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）の低分子阻害剤を含む。一つの態様において、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）の低分子阻害剤は、3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである。

20

#### 【0055】

刺激培地中でのインキュベーション時に、多能性幹細胞は、経時的に細胞形態を変化させ始め、細胞増殖が増加する。「刺激」段階は、中間中胚葉移行に關与する特異的な遺伝子およびマーカーの発現（例えば、BRY、PAX2、LIM1、GATA2、ビメンチン、SMA、HAND1、KDR、およびFOXa2（低発現）の上方制御）、ならびに多能性関連遺伝子およびマーカーの下方制御（例えば、OCT4（POU5F1）、NANOG、SOX2、REX1（ZFP42）、LEFTY1、LEFTY2、TDGF1、DNMT3B、GABRB3、GDF3、TERT、例えば、Tan et al, 2007を参照されたい）によって定義される。

30

#### 【0056】

一つの態様において、 $\gamma$ -カテニン（カドヘリン結合タンパク質、 $\gamma$ 1；ヒト遺伝子名称CTNNB1）経路および/またはWnt受容体シグナル伝達経路および/またはヘッジホッグ（HH）シグナル伝達経路を活性化する低分子は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）の低分子阻害剤、CDC様キナーゼ1（Cik1-2-4）の低分子阻害剤、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ15（Mapk15）の低分子阻害剤、二重特異性チロシン-(Y)-リン酸化調節キナーゼ（Dyrk1a-b 4）の低分子阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ16（Pctk1-3 4）の低分子阻害剤、スムーズンド（Smoothened）（SMO）アクチベーター、ならびに、 $\gamma$ -カテニン（または $\gamma$ -カテニン）15とコアクチベータータンパク質であるCBP（CREB結合タンパク質）およびp300（E1A結合タンパク質p300）との間の相互作用の調節剤からなる群より選択される。

40

#### 【0057】

好ましくは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（Gsk3a-b）阻害剤は、ピロリジンジオンベースのGSK3阻害剤である。本明細書において使用される「ピロリジンジオンベースのGSK3阻害剤」は、低いIC50値を有するGSK3 およびGSK3 の選択的細胞透過性ATP競合的阻害剤に関する。一つの態様において、ピロリジンジオンベースのGSK3阻害剤は、3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン（SB216763）、3-[(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル)アミノ]-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン（SB415286）、N6-{2-[4-(2,4-ジクロロ-フェニル)-5-イミダゾール-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ]}-エチル}-3-ニトロ-ピリジン-2,6-ジアミン 2HCl、3-イミ

50

ダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル-4-[2-(モルホリン-4-カルボニル)-25 1,2,3,4-テトラヒドロ-[1,4]ジアゼピノ[6,7,1-hi]インドール-7-イル]-ピロール-2,5-ジオン、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-インドロ[3,2-d][1]ベンザゼピン-6(5H)-オン(ケンパウロン)、9-プロモ-7,12-ジヒドロ-ピリド[3',2':2,3]アゼピノ[4,5-b]インドール-6(5H)-オン(CHIR99021)、および3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン(CP21R7、本明細書において「化合物21」とも呼ばれる；例えば、L. Gong et al; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20 (2010), 1693-1696を参照されたい)を含む群から選択される。一つの態様において、CDC様キナーゼ1(Clk1-2-4)阻害剤は、ベンゾチアゾールおよび3-フルオロ-N-[1-イソプロピル-6-(1-メチル-ピペリジン-4-イルオキシ)-1,3-ジヒドロ-ベンゾイミダゾール-(2E)-イリデン]-5-(4-メチル-1H-ピラゾール-3-スルホニル)-ベンズアミドを含む群から選択される。一つの態様において、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ15(Mapk15)阻害剤は、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール(SB203580)および5-イソキノリンスルホンアミド(H-89)を含む群から選択される。

#### 【0058】

一つの態様において、二重特異性チロシン-(Y)-リン酸化調節キナーゼ5(Dyrk1a-b 4)阻害剤は、6-[2-アミノ-4-オキソ-4H-チアゾル-(5Z)-イリデンメチル]-4-(テトラヒドロピラン-4-イルオキシ)-キノリン-3-カルボニトリルを含む群から選択される。

#### 【0059】

一つの態様において、スムーズドアクチベーターは、プルモルファミン(2-(1-ナフトキシ)-6-(4-モルホリノアニリノ)-9-シクロヘキシルプリン)である。-カテニン(または-カテニン)とコアクチベータータンパク質であるCBP(CREB結合タンパク質)およびp300(E1A結合タンパク質p300)との間の相互作用の調節剤の例は、IQ-1(2-(4-アセチル-フェニルアゾ)-2-[3,3-ジメチル-3,4-ジヒドロ-2H-イソキノリン-(1E)-イリデン]-アセトアミド)、およびICG-001((6S,9aS)-6-(4-ヒドロキシ-ベンジル)-8-ナフタレン-1-イルメチル-4,7-ジオキソ-ヘキサヒドロ-15 ピラジノ[1,2-a]ピリミジン-1-カルボン酸ベンジルアミド)(国際公開公報第2007056593号)である。

#### 【0060】

一つの態様において、刺激培地は、インスリン、トランスフェリン、およびプロゲステロンを補給した無血清培地である。一つの態様において、無血清培地には、10~50 µg/mlインスリン、10~100 µg/mlトランスフェリン、および10~50 nMプロゲステロン、好ましくは、30~50 µg/mlインスリン、20~50 µg/mlトランスフェリン、および10~30 nMプロゲステロンを補給する。刺激に適する無血清培地の例は、N2B27培地(N2B27は、N2およびB27(両方ともGibco由来)を補給したDMEM/F12(Gibco, Paisley, UK)の1:1混合物である)、N3培地(DMEM/F12(Gibco, Paisley, UK)、25 µg/mlインスリン、50 µg/mlトランスフェリン、30 nM亜セレン酸ナトリウム、20 nMプロゲステロン、100 nMブトレッシン(Sigma)から構成される)、または25 NeuroCult(登録商標)NS-A増殖培地(Stemcell Technologies)である。一つの態様において、刺激培地は、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ3(Gsk3a-b)の低分子阻害剤を補給した無血清培地である。

#### 【0061】

好ましくは、低分子阻害剤は、本明細書においてCP21R7とも呼ばれる、3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである。一つの態様において、刺激培地は、10~50 µg/mlインスリン、10~100 µg/mlトランスフェリン、および10~50 nMプロゲステロン、および0.5~4 µM CP21R7(3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン)を含む無血清培地である。一つのそのような態様において、刺激培地は、1 µM CP21R7を含む。

#### 【0062】

一つの態様において、本明細書に記載される態様のいずれかの刺激培地は、組換え骨形態形成タンパク質-4(BMP4)をさらに含む。一つの好ましい態様において、刺激培地は、10

10

20

30

40

50

~ 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インスリン、10~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トランスフェリン、10~50 nM プロゲステロン、0.5~4  $\mu\text{M}$  CP21R7 (3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン)、および10~50 ng/ml 組換え骨形態形成タンパク質-4 (BMP4) を含む無血清培地である。

【0063】

一つの態様において、上記の方法の段階(b)は、少なくとも3日間(72時間)の、刺激培地における細胞のインキュベートを含む。一つの態様において、上記の方法の段階(b)は、2~4日間(48時間~96時間)の、刺激培地における細胞のインキュベートを含む。別の態様において、上記の方法の段階(b)は、CP21R7 (3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン) を補給した無血清培地である刺激培地における細胞のインキュベートを含む。好ましくは、刺激培地に、0.5~4  $\mu\text{M}$  CP21R7 (3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-30メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン)、最も好ましくは1~2  $\mu\text{M}$  CP21R7 (3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン) を補給する。一つの態様において、刺激培地は、組換え骨形態形成タンパク質-4 (BMP4) をさらに含む。別の態様において、上記の方法の段階(b)は、CP21R7 (3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン) を補給した無血清培地である刺激培地における細胞のインキュベート、かつ3日間(72時間)の該細胞のインキュベートを含む。一つのそのような態様において、刺激培地は、組換え骨形態形成タンパク質-4 (BMP4) をさらに含む。

【0064】

別の態様において、上記の方法の段階(b)は、CP21R7 (3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン) を補給した無血清培地である刺激培地における細胞のインキュベート、かつ2~4日間(48時間~96時間)の該細胞のインキュベートを含む。一つのそのような態様において、刺激培地は、組換え骨形態形成タンパク質-4 (BMP4) をさらに含む。

【0065】

本明細書において使用される「誘導培地」とは、刺激された細胞の、単層上のSIX2および/またはWT1および/またはSALL1陽性腎前駆細胞への誘導のために有用な、任意の化学的に定義された培地を指す。一つの態様において、腎前駆細胞は、3種のマーカー遺伝子SIX2、WT1、およびSALL1をすべて発現し、SWS+腎前駆細胞と呼ばれる。一つの態様において、腎前駆細胞は後腎間充織細胞である。別の態様において、腎前駆細胞は、中間中胚葉のマーカー遺伝子を下方制御する。従って、一つの態様において、腎前駆細胞は、PAX2を非常に低いレベルでのみ発現する。一つの態様において、腎前駆細胞は、LIM1および/またはBRYを発現しない。

【0066】

誘導に適する培地の例は、DEMEM/F12、RPMI 1640 (Invitrogen)、またはウィリアムE培地 (Invitrogen) である。

【0067】

一つの態様において、誘導培地に、骨形態形成タンパク質 (BMP)、例えば、BMP4、BMP7、または、BMP2、BMP3、BMP5、BMP6、BMP8a、BMP8b、もしくはBMP9のような他のBMPを補給する。

【0068】

好ましくは、誘導培地は、BMP7を補給した培地である。一つのそのような態様において、誘導培地に、20~80 ng/ml BMP7、好ましくは50 ng/ml BMP7を補給する。

【0069】

本明細書において提示される新たな方法で、最大95%の収率で多能性幹細胞からSIX2を発現する腎前駆細胞を分化させることが今や可能である。段階(c)の生成物は、細胞培養物においてSIX2およびWT1および/またはSALL1陽性細胞として容易に同定することができる。

【0070】

一つの態様において、誘導培地は、レチノイン酸 (RA)、例えば、オールトランスレチノイン酸または9-シスレチノイン酸をさらに含む。別の態様において、誘導培地は、レチノイン酸阻害剤またはレチノイン酸アゴニストを含む。レチノイン酸阻害剤およびレチノイン酸アゴニストは、当技術分野において周知である。

【0071】

好ましくは、誘導培地は、RAを補給した培地である。一つのそのような態様において、誘導培地に、50~200 nM RA、好ましくは100 nM RAを補給する。

【0072】

一つの態様において、誘導培地に、RAおよびBMP7を補給する。

【0073】

一つの態様において、誘導培地は、1~5%血清、好ましくは2.5%血清をさらに含む。その中で有用な血清は、例えば、当技術分野において公知である胎児ウシ血清である。別の態様において、誘導培地に、アミノ酸、例えば、Sigma- Aldrichの非必須アミノ酸溶液 (カタログ番号M7145) を補給する。

【0074】

別の態様において、誘導培地は、 $\beta$ -メルカプトエタノールをさらに含む。

【0075】

一つの態様において、上記の方法の段階 (c) は、2日間 (48時間) の、誘導培地における細胞のインキュベーションを含む。

【0076】

一つの態様において、上記の方法の段階 (a) ~ (c) は、合わせて6日を必要とする。

【0077】

態様において、上記の態様のいずれかにおいて記載される方法は、多能性幹細胞を有足細胞へ分化させるために有用である。一つの態様において、上記の態様のいずれかにおいて記載される方法は、

(d) 有足細胞の増殖に適する条件下で段階 (c) の生成物をインキュベーションする段階をさらに含む。

【0078】

典型的には、段階 (c) において得られたSWS+細胞を収集し、化学的に定義された増殖培地中で拡大する。一つの態様において、段階 (d) は、24~168時間、好ましくは48~96時間、増殖培地中で、段階 (c) において得られた細胞をインキュベーションする工程を含む。

【0079】

本明細書において使用される増殖培地は、有足細胞の増殖および生存を増強する、増殖因子および/または低分子を補給した培地である。

【0080】

一つの態様段階において、増殖培地は、化学的に補給された培地 (SP培地) である。本明細書において有用なSP培地は、例えば、DMEM/F12培地 (例えば、InvitrogenもしくはGibcoカタログ番号31331-028) またはRPMI 1640 (Gibcoカタログ番号61870-010) またはDME M培地である。一つの態様において、増殖培地に、2~10%血清、例えば、2~10%胎児ウシ血清を補給する。一つの態様において、増殖培地に、Knock-out serum replacement (例えば、Invitrogen、カタログ番号10828028) を補給する。

【0081】

別の態様において、増殖培地に、0.1~0.5 mM RA、好ましくは0.1 mM RAを補給する。別の態様において、増殖培地に、10~200 nMビタミンD3、好ましくは100 nMビタミンD3を補給する。一つの態様において、増殖培地に、RAおよびビタミンD3の両方を補給する。一つの態様において、増殖培地は、安定なグルタミンをさらに含む。好ましい態様において、増殖培地は、10%血清、100 nMビタミンD3、および0.1mMレチノイン酸を補給したDMEM/F12培地である。

【0082】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される方法によって得られた腎前駆細胞および有足細胞は、いくつかの継代にわたって拡大することができる。

【0083】

上記の態様のいずれも、単独でまたは組み合わせで存在し得る。

【0084】

本発明の一つの態様において、患者特異的または健康な個体特異的な腎前駆細胞または有足細胞を生成するための方法が提供される。この目的に向けて、患者または健康な個体から得られたヒト人工多能性幹細胞（iPSC）を、本明細書に記載される方法で、腎前駆細胞または有足細胞へ分化させる。患者特異的ヒトiPSCは、患者または健康な個体から得られた体細胞をリプログラミングして多能性幹細胞にすることによって、当技術分野において公知である方法により得ることができる。例えば、繊維芽細胞、ケラチノサイト、または脂肪細胞を、処置を必要とする個体から、または健康な個体から皮膚生検によって取得し、当技術分野において公知である方法によりリプログラミングして人工多能性幹細胞にしてもよい。人工多能性幹細胞の供給源として適する他の体細胞は、血液試料から得られる白血球細胞、または尿試料から得られる上皮細胞もしくは他の細胞である。患者特異的な人工多能性幹細胞を、次に、本明細書に記載される方法によって、患者特異的または健康な個体特異的な腎前駆細胞または有足細胞へ分化させる。本発明の別の局面において、前述の方法のいずれかにより産生された腎前駆細胞または有足細胞の集団が提供される。好ましくは、腎前駆細胞または有足細胞の集団は、患者特異的、すなわち、罹患個体から得られたiPSCに由来する。別の態様において、腎前駆細胞または有足細胞の集団は、健康な個体から得られる。

【0085】

患者由来の腎前駆細胞または有足細胞は、急性腎不全／急性腎損傷、アルポート症候群、アンジオテンシン抗体および巣状分節状系球体硬化症、APOL1変異、CFHR5腎症、パーター症候群、虚脱系球体症、CMVに関連する糖尿病および糖尿病性腎疾患、ファブリー病、系球体疾患、HIV関連腎症（HIVAN）、リポタンパク質系球体症、ループス腎疾患、ループス腎炎、膜性増殖性系球体腎炎、結節性系球体硬化症、感染後系球体腎炎、溶連菌感染後系球体腎炎などの腎疾患の病態生理学を研究するための疾患関連インビトロモデルを提示する。一つの態様において、本方法により得られた腎前駆細胞または有足細胞を、腎細胞の機能不全によって引き起こされる腎疾患、例えば、慢性腎疾患（CKD）、巣状分節状系球体硬化症（FSGS）、膜性増殖性系球体腎炎、多嚢胞性腎疾患（PKD）、および2型糖尿病と関連する糖尿病性腎症を逆転、阻害、または予防する化合物のスクリーニングのために使用する。好ましくは、本明細書に記載される本発明の方法により得られた腎前駆細胞または有足細胞は、罹患対象に由来する。別の態様において、本方法により得られた腎前駆細胞または有足細胞を、糖尿病および糖尿病性腎疾患の処置のための新たな標的および化合物をスクリーニングおよび評価するために使用する。好ましくは、本明細書に記載される本発明の方法により得られた腎前駆細胞または有足細胞は、例えば、慢性腎疾患（CKD）、巣状分節状系球体硬化症（FSGS）、膜性増殖性系球体腎炎、多嚢胞性腎疾患（PKD）、および2型糖尿病と関連する糖尿病性腎症などの腎疾患によって影響を受けた個体に由来する。罹患対象から腎前駆細胞および／または有足細胞を分化させることは、ヒト背景パラダイムにおいて薬物安全性を早期に評価する無比の機会を提示する。別の態様において、本方法により得られた有足細胞を、ネフロンインビトロモデルとして使用する。

【0086】

本発明は、両方とも異種を含まない条件で得られた、患者特異的な有足細胞、または移植に適する同一のHLA型を有する健康な個体由来の適合細胞を供給するための、高効率の方法を提供する。「異種を含まない培養条件」とは、ヒトおよび組換え起源の成分のみを含む、培地および付着用の基板を指す。従って、異種病原体（xenopathogen）での汚染の危険性が回避され、腎細胞は、再生医療における使用のために安全である。本明細書に記載される方法での、患者特異的な人工多能性幹細胞（iPSC）の患者特異的な有足細胞への分化は、自己供給源の有足細胞を生成するための、容易に利用できかつ再現性を有する技



術を提示する。細胞療法における自己細胞および／または適合細胞の使用は、免疫学的拒絶の対象となる可能性が高い非自己細胞の使用を上回る大きな利点をもたらす。対照的に、自己細胞は、有意な免疫学的応答を誘発する可能性が低い。

#### 【0087】

本発明のさらなる好ましい局面において、患者特異的な腎前駆細胞または有足細胞のバイオバンクの作製が想定される。一つの態様において、健康な個体および／または患者から得られた腎前駆細胞または有足細胞の様々な集団を含むバイオバンクが作製される。本明細書において使用される「バイオバンク」という用語は、様々な個体または種から採取された生物学的試料のライブラリを意味する。検体および関連データの保管された収集物は、血管合併症と関連する疾患に対処することを目指す研究目的が意図される。別の態様において、バイオバンクは、血管再生医療アプローチのために使用される。

10

#### 【0088】

別の局面において、本発明は、前述の方法のいずれかにより産生された腎前駆細胞もしくは有足細胞を含むか、または前述の細胞集団のいずれかを含む治療用組成物を提供する。好ましくは、治療用組成物は、例えば、5%ヒト血清アルブミンを伴うリン酸緩衝生理食塩水を含む、生理学的に適合性の溶液をさらに含む。治療用組成物を、例えば、慢性腎疾患（CKD）、巣状分節状糸球体硬化症（FSGS）、膜性増殖性糸球体腎炎、多嚢胞性腎疾患（PKD）、および2型糖尿病と関連する糖尿病性腎症などの腎疾患を処置、予防、または安定化するために使用することができる。例えば、繊維芽細胞、ケラチノサイト、または脂肪細胞を、処置を必要とする個体から、または健康な個体から皮膚生検によって取得し、当技術分野において公知である方法（"Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Takahashi et al., 2007, Cell 131, 861-72）によりリプログラミングして人工多能性幹細胞にしてもよい。人工多能性幹細胞の供給源として適する他の体細胞は、血液試料から得られる白血球細胞、または尿試料から得られる上皮細胞もしくは他の細胞である。患者特異的な人工多能性幹細胞を、次に、本明細書に記載される方法により有足細胞へ分化させ、収集し、個体に導入して状態を処置する。本発明の方法により産生された腎前駆細胞または有足細胞は、罹患組織または損傷した組織の正常な機能を置換するかまたは補助するために使用されてもよい。

20

#### 【0089】

本発明の別の態様は、腎疾患の治療のための、腎前駆細胞または有足細胞のバイオバンクの使用である。バイオバンクは、好ましくは、患者またはいくつかのHLA型を有する健康な個体から得られた腎前駆細胞または有足細胞を含む。健康なドナーから得られた細胞を、適合性HLA型を有する処置を必要とする個体に移植することは、異種細胞移植に通常付随する拒絶反応の有意な問題を除去する。従来、拒絶は、シクロスポリンなどの免疫抑制剤または抗拒絶薬物の投与によって、予防または低減される。しかしながら、そのような薬物は、有意な有害副作用、例えば、免疫抑制、発癌特性、腎毒性を有し、かつ非常に高価である。本発明は、シクロスポリン、imulan、FK-506、グルココルチコイド、およびラパマイシン、ならびにそれらの誘導体などの抗拒絶薬物の必要性を排除するか、または少なくとも有意に低減させる。

30

#### 【0090】

本発明の治療法に関しては、哺乳動物への腎前駆細胞または有足細胞の投与が、特定の投与の様式、投薬量、または投薬の頻度に限定されることは意図されず；本発明は、筋肉内、静脈内、関節内、病変内、皮下、または疾患を予防もしくは処置するために妥当な用量を提供するのに十分な任意の他の経路を含む、すべての投与の様式を企図する。腎前駆細胞または有足細胞を、単一用量または複数用量で哺乳動物に投与してもよい。複数用量を投与する場合、用量と用量との間を、例えば、1週間、1か月、1年、または10年空けてもよい。細胞を特定の細胞タイプに向けてさらに偏らせるために、一つまたは複数の増殖因子、ホルモン、インターロイキン、サイトカイン、低分子、または他の細胞も、細胞の投与の前、間、または後に投与してもよい。

40

#### 【0091】

50

本明細書において使用される際、「分化させる」、「分化」という用語は、より分化していない細胞を体細胞へ変換するため、例えば、多能性幹細胞を腎前駆細胞または有足細胞へ変換するための、一つまたは複数の段階を指す。多能性幹細胞の腎前駆細胞または有足細胞への分化は、本明細書に記載される方法によって達成される。

#### 【0092】

本明細書において使用される「幹細胞」という用語は、自己複製の能力を有する細胞を指す。本明細書において使用される「未分化幹細胞」とは、多様な範囲の細胞タイプへ分化する能力を有する幹細胞を指す。本明細書において使用される際、本明細書において使用される「多能性幹細胞」とは、複数の細胞タイプの細胞を生じさせ得る幹細胞を指す。多能性幹細胞（PSC）は、ヒト胚性幹細胞（hESC）およびヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）を含む。ヒト人工多能性幹細胞は、当技術分野において公知である方法によって、例えば、4種の定義された因子（Sox2、Oct4、Klf4、c-Myc）の導入により、リプログラミングされた体細胞から生じ得る。ヒト体細胞は、健康な個体から、または患者から取得することができる。これらのドナー細胞は、任意の適する供給源から容易に取得することができる。ヒトの身体に対する侵襲性手順がなくドナー細胞の単離を可能にする供給源、例えば、ヒト皮膚細胞、血液細胞、または尿試料から取得可能な細胞が、本明細書において好ましい。ヒト多能性幹細胞が好ましいが、方法はまた、霊長類、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、ウサギ）、およびイヌの多能性幹細胞などの、非ヒト多能性幹細胞にも応用可能である。

10

#### 【0093】

本明細書において使用される際、「腎前駆細胞」または「後腎間充織腎前駆段階中の細胞」とは、後腎間充織段階へ分化した細胞であり、少なくとも細胞マーカーSIX2を、および好ましい態様においては細胞マーカーSALL1およびWT1も発現する。本明細書において使用される腎前駆細胞は、例えば、PAX2、BRY、および/またはLIM1などの、多能性段階および中間中胚葉段階のマーカー遺伝子の下方制御を特徴とする。これらの細胞は、有足細胞を生じさせる能力を含み、すべての腎細胞へ分化する可能性を有する。

20

#### 【0094】

本明細書において使用される際、「中間中胚葉細胞」とは、細胞マーカーBRY、LIM1、およびPAX2のうちの一つまたは複数を発現し、SIX2、SALL1、およびWT1を発現しないか、または非常に低いレベルでのみ発現する細胞である。

30

#### 【0095】

本明細書において使用される際、「マーカーの下方制御」とは、マーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現レベルの減少を指す。この用語は、一つの分化段階におけるある特定のマーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現レベルが、別の分化段階と比較して減少していることを意味し得る。「マーカーの下方制御」はまた、細胞におけるマーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現の完全な撤廃を指し得、例えば、マーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現が全く検出できない。

#### 【0096】

本明細書において使用される際、「マーカーの上方制御」とは、マーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現レベルの増大を指す。この用語は、一つの分化段階におけるある特定のマーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現レベルが、別の分化段階と比較して増大していることを意味し得る。「マーカーの上方制御」はまた、マーカー遺伝子およびその遺伝子産物の（検出可能な）発現無しから、低、中間、または高発現への、マーカー遺伝子およびその遺伝子産物の発現の増大も指し得る。

40

#### 【0097】

「マーカーの発現」とは、ある特定の遺伝子がmRNAへ転写され、かつ通常、その後、細胞においてある特定の機能を発揮するタンパク質（その遺伝子産物）へ翻訳されることを意味する。マーカーの発現は、当技術分野において公知である方法によって、RNAレベルでまたはタンパク質レベルで、検出および定量化することができる。例えば、ある特定のタンパク質の存在をマーカーに結合する抗体で試験することによる、タンパク質レベルで

50

のマーカの発現の検出が、本明細書において好ましい。

【0098】

「有足細胞」とは、腎臓に位置する細胞のタイプであり、糸球体上皮細胞としても公知である。有足細胞は、特徴的な細胞表現型を有し：本体、およびそれから外に分岐し、長い突起、すなわち「足突出部 (foot projection)」のような特徴を有する細い延長部分からなる。本明細書において使用される際、「有足細胞」とは、特異的な表面マーカであるポドシンを少なくとも発現し、-アクチニン-4、WT1、シナプトボジン、またはネフリンの群から選択される一つまたは複数のさらなる表面マーカ/細胞マーカを発現する細胞である。成熟有足細胞、すなわち、マーカPAX2を発現しない有足細胞が、その中で好ましい。

10

【0099】

ポドシンは、糸球体透過性の調節において役割を果たし、かつ形質膜と細胞骨格との間のリンカーとして作用する、糸球体タンパク質である。これは、NPHS2 (完全な名称はネフローゼ2、突発性、ステロイド耐性 (ポドシン)、NCBI Gene ID 7827、PDCNまたはSRN1としても公知である) によってコードされる。

【0100】

アクチニンは、およびスペクトリンおよびジストロフィンを含む、多様な群の細胞骨格タンパク質に相当する、スペクトリン遺伝子スーパーファミリーに属する。アクチニンは、様々な細胞タイプにおいて複数の役割を有するアクチン結合タンパク質である。非筋肉細胞においては、細胞骨格アイソフォームが、マイクロフィラメントの束および接着型結合部に沿って見出され、そこでアクチンを膜に結合させることに関与する。対照的に、骨格、心臓、および平滑筋アイソフォームは、Z板および相似の濃密体に局在し、そこで筋原線維アクチンフィラメントを固定することを助ける。この遺伝子は、細胞質中に濃縮され、転移プロセスに関与すると考えられている非筋肉アクチニンアイソフォームをコードする。この遺伝子における変異は、巣状分節状糸球体硬化症と関連している。

20

-アクチニン-4は、ACTN4 (完全な名称はアクチニン、4、NCBI Gene ID 81、FSGS; FSGS1; アクチニン-4としても公知である) によってコードされる。

【0101】

シナプトボジンは、アクチンベースの細胞形状および運動性において役割を果たし得る、アクチン結合タンパク質である。シナプトボジンという名称は、シナプス後肥厚および樹状突起棘と、ならびに腎有足細胞との、タンパク質の会合に由来する。タンパク質は、SYNPO (NCBI Gene ID 11346) によってコードされる。

30

【0102】

ネフリンは、腎臓中の糸球体濾過障壁において機能する、細胞接着分子の免疫グロブリンファミリーのメンバーである。遺伝子は、主として腎組織において発現し、タンパク質は、糸球体有足細胞のスリット隔膜で見出される1型膜貫通タンパク質である。スリット隔膜は、尿の形成においてアルブミンおよび他の血漿巨大分子を排除するための限外濾過器として機能すると考えられている。これは、CNF、NPHN、またはネフリンとしても公知であるNphs1 (NCBI Gene ID 4868) によってコードされる。この遺伝子における変異は、重症のタンパク尿、ならびにスリット隔膜および足突起の喪失を特徴とする、フィンランド型先天性ネフローゼ1をもたらす。

40

【0103】

本明細書において使用される際、「腎疾患」とは、腎細胞の損傷、喪失、または機能不全によって引き起こされる任意の疾患に関する。腎疾患の例は、慢性腎疾患 (CKD)、巣状分節状糸球体硬化症 (FSGS)、膜性増殖性糸球体腎炎、多嚢胞性腎疾患 (PKD)、および2型糖尿病と関連する糖尿病性腎症である。さらなる例は、急性腎不全/急性腎損傷、アルポート症候群、アンジオテンシン抗体および巣状分節状糸球体硬化症、APOL1変異、C4G腎症、バーター症候群、虚脱糸球体症、CMVに関連する糖尿病および糖尿病性腎疾患、ファブリー病、糸球体疾患、HIV関連腎症 (HIVAN)、リポタンパク質糸球体症、ループス腎疾患、ループス腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、結節性糸球体硬化症、感染後糸球体腎

50

炎、溶連菌感染後糸球体腎炎である。

【 0 1 0 4 】

参照文献

Batchelder, C.A., Lee, C.C., Matsell, D.G., Yoder, M.C., and Tarantal, A.F. (2009). Renal ontogeny in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and directed differentiation of human embryonic stem cells towards kidney precursors. *Differentiation* 78, 45-56.

Ok-Hee Chai, Chang-Ho Song, Sung-Kwang Park, Won Kim and Eui-Sic Cho (2013). Molecular regulation of kidney development. *Anat Cell Biol.* 2013 March; 46(1): 19-31.

10

Humphreys, B.D., and Bonventre, J.V. (2007). The contribution of adult stem cells to renal repair. *Nephrologie & therapeutique* 3, 3-10.

Kim, D., and Dressler, G.R. (2005). Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 16, 3527-3534.

Lin, S.A., Kolle, G., Grimmond, S.M., Zhou, Q., Doust, E., Little, M.H., Aronow, B., Ricardo, S.D., Pera, M.F., Bertram, J.F., et al. (2010). Subfractionation of differentiating human embryonic stem cell populations allows the isolation of a mesodermal population enriched for intermediate mesoderm and putative renal progenitors. *Stem cells and development* 19, 1637-1648.

20

Mae, S., Shirasawa, S., Yoshie, S., Sato, F., Kanoh, Y., Ichikawa, H., Yokoyama, T., Yue, F., Tomotsune, D., and Sasaki, K. (2010). Combination of small molecules enhances differentiation

of mouse embryonic stem cells into intermediate mesoderm through BMP7-positive cells.

Biochemical and biophysical research communications 393, 877-882.

Mae, S., Shono, A., Shiota, F., Yasuno, T., Kajiware, M., Gotoda-Nishimura, N., Arai, S., Sato-Otubo, A., Toyoda, T., Takahashi, K., et al. (2013). Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. Nat Commun 4, 1367.

Morizane, R., Monkawa, T., and Itoh, H. (2009). Differentiation of murine embryonic stem and induced pluripotent stem cells to renal lineage in vitro. Biochemical and biophysical research communications 390, 1334-1339.

10

Narayanan, K., Schumacher, K.M., Tasnim, F., Kandasamy, K., Schumacher, A., Ni, M., Gao, S., Gopalan, B., Zink, D., and Ying, J.Y. (2013). Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells. Kidney international 83, 593-603.

Ryuichi Nishinakamura, Yukako Uchiyama, Masaji Sakaguchi, Sayoko Fujimura (2011), Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. Pediatric Nephrology, Volume 26, Issue 9, pp 1463-1467

20

Nishikawa, M., Yanagawa, N., Kojima, N., Yuri, S., Hauser, P.V., and Jo, O.D. (2012). Stepwise renal lineage differentiation of mouse embryonic stem cells tracing in vivo development. Biochemical and biophysical research communications 417, 897-902.

Ren, X., Zhang, J., Gong, X., Niu, X., Zhang, X., and Chen, P. (2010). Differentiation of murine embryonic stem cells toward renal lineages by conditioned medium from ureteric bud cells in vitro. Acta biochimica et biophysica Sinica 42, 464-471.

30

Song, B., Smink, A.M., Jones, C.V., Callaghan, J.M., Firth, S.D., Bernard, C.A., Laslett, A.L., Kerr, P.G., and Ricardo, S.D. (2012). The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes. PloS one 7, e46453.

Tan, P.P., and Loebel, D.A. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: gene set for gastrulation. Nat Rev Genet 8, 368-381.

40

Tiscornia, G., Vivas, E.L., and Belmonte, J.C. (2011). Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. Nature Med 17, 1570-1576.

Wiggins, R.C. (2007). The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. Kidney international 71, 1205-1214.

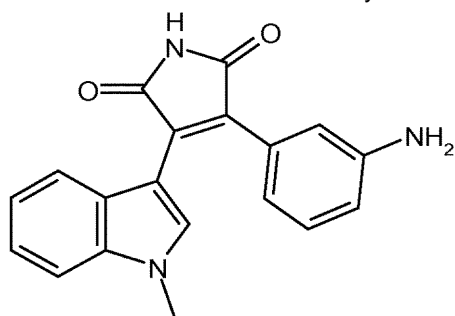
【 実施例 】

【 0 1 0 5 】

材料および方法

50

CP21R7 : 3-(3-アミノ-フェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン (本明細書において「化合物21」とも呼ばれる ; 例えば、L. Gong et al; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20 (2010), 1693-1696を参照されたい)。



10

## CP21R7

### 【 0 1 0 6 】

#### 細胞培養 :

多能性培地 : Y27632 ROCKキナーゼ阻害剤 (市販、例えば、Tocris bioscienceのカタログ番号 : 1254) を補給したTeSR1。

### 【 0 1 0 7 】

刺激培地 : 1  $\mu$ M CP21R7 (Roche) および25 ng/ml BMP4 (Preprotech) を含む、DMEM:F12 (1:1) plus Glutamax (Invitrogen) と、N2およびB27補給物を有するNeurobasal培地 (すべてInvitrogen) の1:1混合物 (N2B27培地)。

20

### 【 0 1 0 8 】

誘導培地 : 2.5% FBS (Life technologies)、0.1 mM非必須アミノ酸ミックス (NEAA)、0.1 mM b- ME、100 nMレチノイン酸 (Sigma)、および50 ng/ml BMP7 (Preprotech) を補給したDMEM:F12 plus Glutamax (Invitrogen) 培地。

### 【 0 1 0 9 】

有足細胞増殖培地 : 10% FBS (Invitrogen)、0.1 mMレチノイン酸 (Sigma)、および100 nMビタミンD3 (Sigma) を補給したDMEM:F12 plus Glutamax (Invitrogen)。

### 【 0 1 1 0 】

ヒトESC : SA001、ロットCA001は、2001年3月20日に、Goteborg UniversityおよびCellartis AB Arvid Wallgrens Backe 20, SE-413 46 Goteborg, SWEDENで単離され、スウェーデンにおけるすべての適用可能な法律に従い、かつGoteborg UniversityおよびUppsala UniversityのLocal Research Ethics Committeeにより承認されている。胚供給源 : IVF由来の凍結余剰分。ドナー機密性 : ドナーのプライバシーおよび機密性を保護するため、胚のドナーと関連するすべての識別名は除去されている。従って、ドナーについての情報は何も利用できない。特に、寄付は、ドナーについていかなる金銭的な利得ももたらさなかった。本発明者らは、hESCを取り扱うこと、および様々な細胞株を誘導することの承認を受けている。担当の倫理委員会 (Ethikkommission beider Basel) およびFederal office of public healthが、本発明者らの研究プロジェクトを承認している。(Ref-No: R-FP-S-1-0002-0000)。

30

40

### 【 0 1 1 1 】

ヒトiPSC : SBI System Biosciencesのカタログ番号 : SC101A-1、ロット番号110218-FF / Life technologies Gibco (登録商標) Episomal hiPSC Lineのカタログ番号 : A13777。

### 【 0 1 1 2 】

ヒト多能性幹細胞は、慣例的に、TeSR1培地 (Stem cell Technologies) 中でhESC-qualified Matrigel (BD Bioscience) 上で培養する。培養物を、StemPro Accutase (Invitrogen) を用いて4~6日毎に継代する。生存率の増大のために、酵素による解離の1時間前に、TeSR1培地に10  $\mu$ M ROCK阻害剤を補給する。

### 【 0 1 1 3 】

#### 1. 多能性幹細胞の有足細胞への分化のための方法

50

(i) StemPro Accutase (Invitrogen) を用いるhPSCコロニーの酵素による解離の前に、細胞を1時間、10  $\mu$ M ROCK阻害剤Y27632と共にブレインキュベートした。cm<sup>2</sup>あたり37.000個の単一hPSCを、10  $\mu$ M ROCK-30阻害剤を補給したTeSR1培地中で、増殖因子を低減させたMatrigel (BD bioscience) コーティングされた細胞培養プレート上にプレーティングした。

【0114】

(ii) 1日目に、付着培地を、1  $\mu$ M化合物21 (CP21R7) および25 ng/ml BMP4 (R&D Systems) を補給したN2B27 (Gibco) 培地に交換した。細胞を、培地交換せずにさらに3日間培養した。

【0115】

(iii) 4日目に、刺激培地を、100 nMレチノイン酸 (Sigma, R2625) および50 ng/ml BMP7 (Peprotech) を補給したDMEMF12 (Gibco) 培地に交換した。細胞を、培地交換せずにさらに2日間培養した。

【0116】

(vi) 6日目に、細胞をaccutase溶液で解離させ、40000 ~ 50000細胞 / cm<sup>2</sup>の密度で、0.1 mMレチノイン酸 (Sigma, R2625) および100 nMビタミンD3 (Sigma) を補給したDMEMF12 (Gibco) 培地中、もう7日間、コラーゲンIコーティングされたプレート上にプレーティングした。増殖培地を、1日おきに交換した。

【0117】

## 2. 定量化のための免疫細胞化学分析および画像ベースのハイコンテンツ分析 (HCA)

細胞を、4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSで20分間、室温で固定化した。PBSで細胞を3回洗浄した後、細胞を次に、5% BSA溶液 (ブロッキング緩衝液) で60分間ブロッキングした。細胞内抗原について探測する場合は、0.5% Triton-Xを、ブロッキング緩衝液中に含めた。試料を、2% BSA溶液中に希釈した一次抗体で一晩、4℃で染色し、続いて、適切な二次抗体と1時間、室温でインキュベートした。核を、DAPIによって5分間、室温で染色した。Operetta High Content Imaging System (Perkielmer) およびそれに続くコンピュータベースの画像分析 (ImageJ、Javaベースの画像加工処理プログラム) によって、蛍光を獲得し、分析した。適切なフィルターを用いて、同一視野から別々の画像を獲得し、jpgファイルとしてエクスポートした。

【0118】

研究において使用した一次抗体の表

10

20

30

| 抗原             | 起源            | カタログ番号      |
|----------------|---------------|-------------|
| <b>Bry</b>     | R&D System    | AF2085      |
| <b>PAX2</b>    | Invitrogen    | 716000      |
| <b>LIM1</b>    | Abcam         | Ab14554     |
| <b>SIX2</b>    | Proteintech   | 11562-1-AP  |
| <b>WT1</b>     | R&D System    | AF5729      |
| <b>SALL1</b>   | R&D System    | PP-K9814-00 |
| <b>アクチニン-4</b> | Origene       | TA307264    |
| <b>ポドシン</b>    | Sigma-aldrich | P0372       |
| <b>シナプトボジン</b> | Abcam         | Ab101883    |
| <b>ZO-1</b>    | Invitrogen    | 61-7300     |
| <b>P-cad</b>   | R&D System    | MAB861      |
| <b>AQP1</b>    | Santa-Cruz    | sc-20810    |

10

20

## 【 0 1 1 9 】

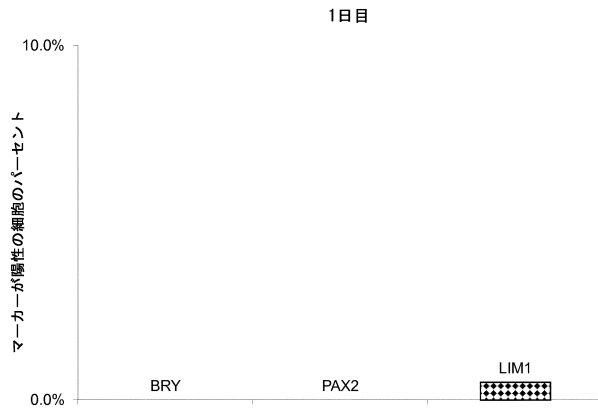
## 3. iPSC由来有足細胞の機能的特徴決定

有足細胞は、炎症誘発性刺激に応答して、IL-8、Rantes、MIP-1b、およびMCP1を含む特定のサイトカインを発現する。Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth factor assay (Biorad, M50-0KCAF0Y)。一晩の血清飢餓後、hiPS由来有足細胞を、2種の異なる濃度のTNFa (1および5 ng/ml) に24時間曝露した。処理後、上清を回収して使用し、Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth factor assay kit (Biorad, M50-0KCAF0Y) を用いてサイトカイン、ケモカイン、および増殖因子の放出を定量化した。アッセイは、製造業者の指示に従って行った。分化システムが真の有足細胞を生成するか否かを判定するために、iPS由来有足細胞を炎症誘発性TNFaでチャレンジし、サイトカインおよびケモカインの放出について解析した。セクレトーム解析により、TNF- 処理時に (図8)、初代ヒト有足細胞 (Saleem et al., JASN, 2002; データは示されていない) に匹敵する、用量依存様式でのIL-8、Rantes、MIP-1b、およびMCP1の上清濃度の増大が、明らかに示された。

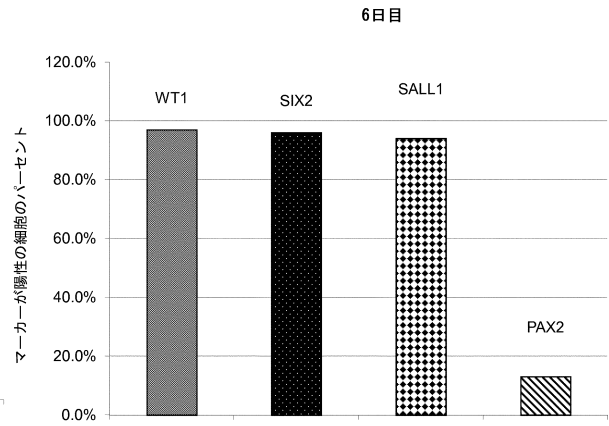
30



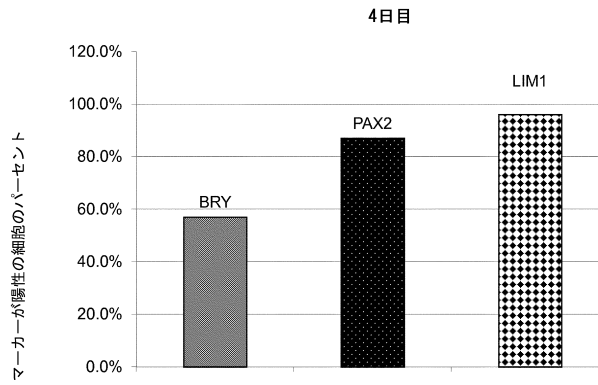
【図 1】



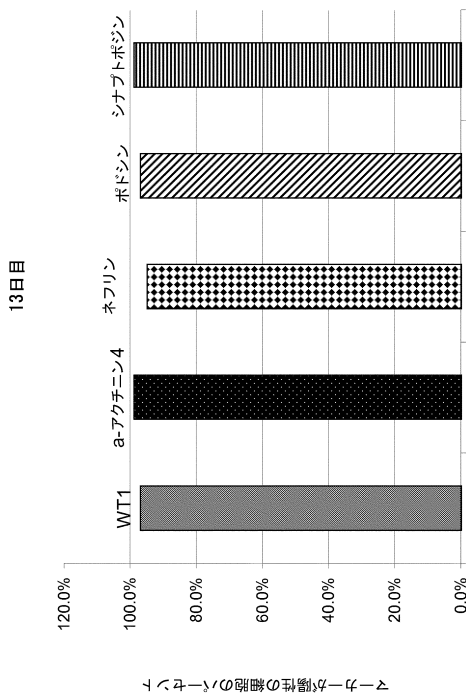
【図 3】



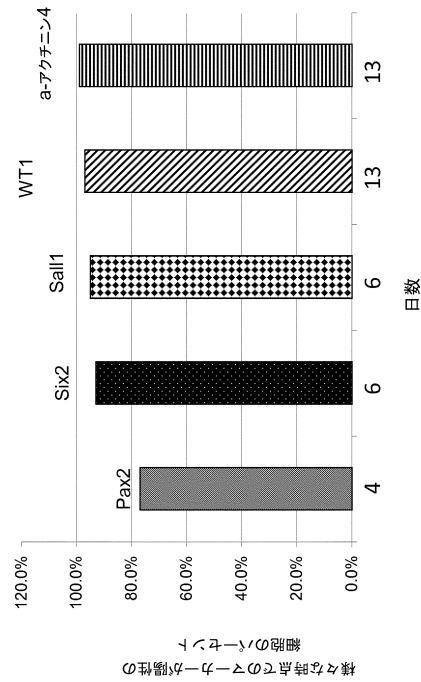
【図 2】



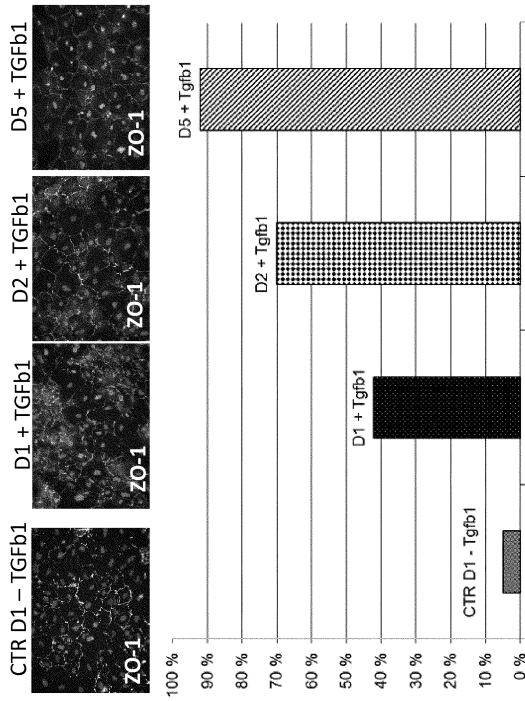
【図 4】



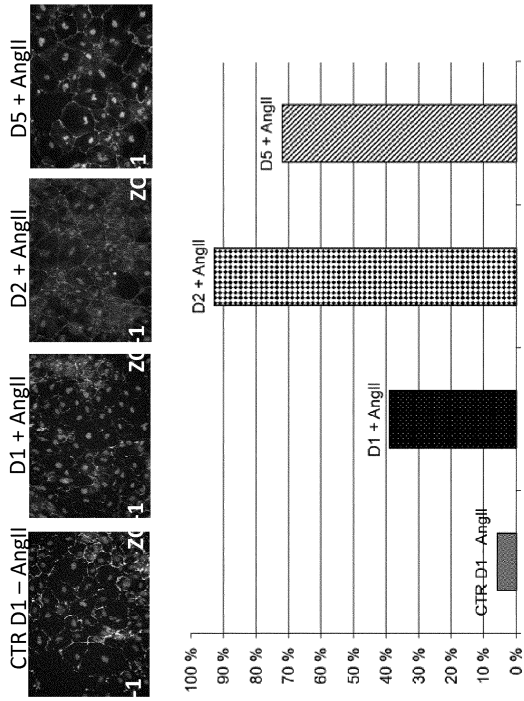
【図 5】



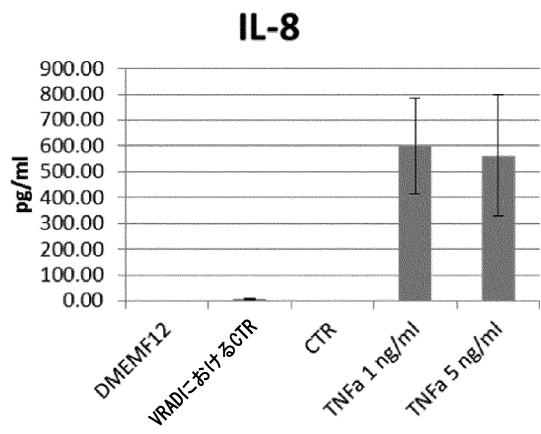
【図 6】



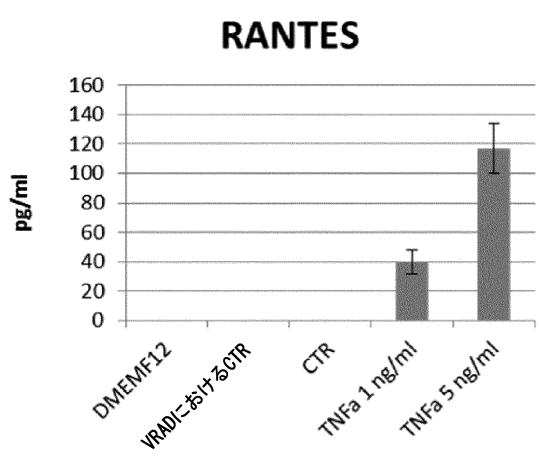
【図 7】



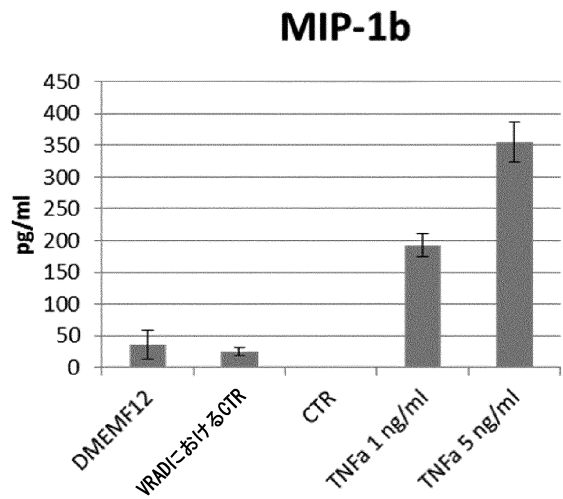
【図 8 a】



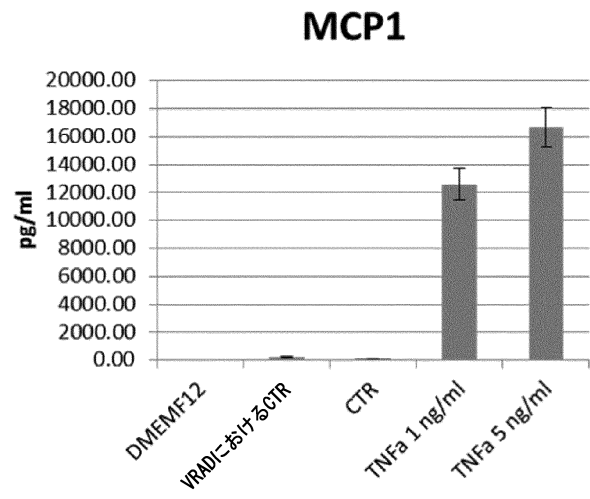
【図 8 b】



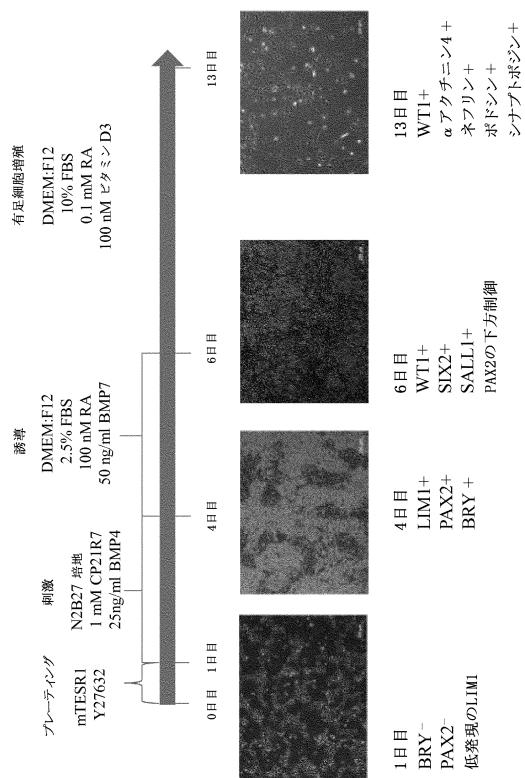
【 図 8 c 】



【 図 8 d 】



【 図 9 】



---

 フロントページの続き

- (74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 バイイ ジャック  
フランス共和国 ツィンマースハイム リュ デ ノワイエ 6
- (72)発明者 シアンピ オゼーレ  
イタリア共和国 ステッツァーノ ヴィア ビアンコニ 31
- (72)発明者 グラフ マーティン  
スイス連邦 ゲルターキンデン ブリュールガッセ 34
- (72)発明者 イアコーネ ロベルト  
スイス連邦 バーゼル ビルジッヒシュトラッセ 45
- (72)発明者 パチ クリストフ  
スイス連邦 バーゼル グレンツァヒャーシュトラッセ 4

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 国際公開第2012/011610(WO, A1)  
国際公開第2013/094771(WO, A1)  
国際公開第2012/168167(WO, A1)  
米国特許出願公開第2009/0130759(US, A1)  
国際公開第2014/200115(WO, A1)  
国際公開第2014/197934(WO, A1)  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009年, Vol. 390, p. 1334-1339  
Differentiation, 2009年, Vol. 78, p. 45-56

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