

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-527007

(P2018-527007A)

(43) 公表日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 C 0 8 1
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 L 27/36 (2006.01)	A 6 1 L 27/36 3 0 0	
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38 1 0 0	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

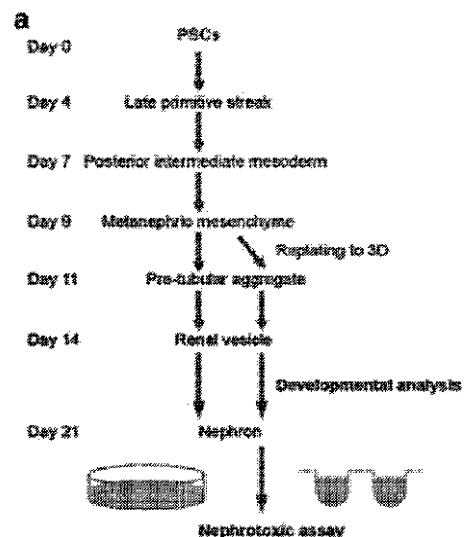
(21) 出願番号	特願2018-514450 (P2018-514450)	(71) 出願人	503146324
(86) (22) 出願日	平成28年9月16日 (2016. 9. 16)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月9日 (2018. 5. 9)		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/052350		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ ート 7 5
(87) 国際公開番号	W02017/049243	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成29年3月23日 (2017. 3. 23)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	62/219, 704	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成27年9月17日 (2015. 9. 17)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒト多能性幹細胞からネフロンを生成する方法

(57) 【要約】

本発明者らは、hPSCを、ネフロン様構造体を形成することができる多分化能ネフロン前駆細胞 (NPC) に分化させるための効率的で化学的に明確なプロトコルを確立した。インビトロで後腎発生を再現することによって、本発明者らは、分化から9日以内に90%の効率でSIX2+SALL1+WT1+PAX2+ NPCを生成する。NPCは、それらのインビボ対応物の発生能を有し、ネフロン構造体へと自己パターン形成するPAX8+LHX1+後腎胞 (renal vesicle) を形成する。2Dおよび3Dの両培養下で、NPCは、インビボのネフロンに類似する組織化された連続的な配置で蛸足細胞、近位尿細管、ヘンレのループおよび遠位尿細管のマーカーを発現する上皮ネフロン様構造体を含む腎臓オルガノイドを形成する。本発明者らはまた、このオルガノイド培養系が、ヒト腎臓の発生および毒性のメカニズムを研究するために使用できることを示す。

Figure 6



【特許請求の範囲】

【請求項1】

一定量のヒト多能性幹細胞（「hPSC」）を提供する工程、
後期原始線条細胞を生成する工程、
後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程、および
後腎間葉細胞に分化させる工程
を含む、後腎間葉を生成するための方法。

【請求項2】

ヒト多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞（「hESC」）である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ヒト多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞（「hiPSC」）である、請求項1記載の方法。

10

【請求項4】

後期原始線条細胞を生成する工程が、CHIR99021中で約3～5日間培養することを含む、
請求項1記載の方法。

【請求項5】

ノギンの添加をさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】

後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程が、アクチビンの存在下で約2～4日間培養することを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項7】

後腎間葉細胞に分化させる工程が、FGF9の添加を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

CHIR99021の添加によって後腎間葉系細胞をネフロン前駆細胞（NPC）にさらに分化させる、請求項7記載の方法。

【請求項9】

後期原始線条細胞が、TおよびTBXのうちの1つまたは複数を発現する、請求項1記載の方法。

【請求項10】

後方中間中胚葉細胞が、WT1およびHOXD11のうちの1つまたは複数を発現する、請求項1記載の方法。

30

【請求項11】

後腎間葉系細胞が、SIX2、SALL1、WT1およびPAX2のうちの1つまたは複数を発現する、
請求項1記載の方法。

【請求項12】

NPCが、SIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1のうちの1つまたは複数を発現する、請求項8記載の方法。

【請求項13】

後腎間葉細胞への分化が、少なくとも50%の効率である、請求項1記載の方法。

【請求項14】

後腎間葉細胞への分化が、少なくとも70%の効率である、請求項1記載の方法。

40

【請求項15】

請求項1記載の方法によって生成される後腎間葉細胞の組成物。

【請求項16】

請求項8記載の方法によって生成されるネフロン前駆細胞の組成物。

【請求項17】

一定量のネフロン前駆細胞（「NPC」）を提供する工程、および
懸濁培養下で約11日間該NPCを培養する工程
を含む、腎臓オルガノイドを生成する方法。

【請求項18】

50

CHIR99021およびFGF9のうちの1つまたは複数の添加をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】

腎臓オルガノイドが、蝟足細胞様細胞、近位尿細管、ヘンレの下行脚、ヘンレの太い上行脚および遠位曲尿細管から選択される1つまたは複数の細胞型を含む、請求項17記載の方法。

【請求項20】

蝟足細胞様細胞が、NPHS1+、PODXL+およびWT1+のうちの1つまたは複数を発現する、請求項19記載の方法。

【請求項21】

近位尿細管が、LTL+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する、請求項19記載の方法。

【請求項22】

ヘンレの下行脚が、CDH1+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する、請求項19記載の方法。

【請求項23】

ヘンレの太い上行脚が、CDH1+およびUMOD+のうちの1つまたは複数を発現する、請求項19記載の方法。

【請求項24】

遠位曲尿細管が、CDH1+ UMOD-のうちの1つまたは複数を発現する、請求項19記載の方法。

【請求項25】

NPCが、ヒト多能性幹細胞（「hPSC」）由来である、請求項17記載の方法。

【請求項26】

hPSCが、疾患変異を有する患者由来である、請求項24記載の方法。

【請求項27】

hPSCが、CRISPRを用いてゲノム編集されたものである、請求項24記載の方法。

【請求項28】

請求項17記載の方法によって作製される、一定量のオルガノイド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

ネフロン前駆細胞および腎臓オルガノイドの生成に関連する方法および組成物が、本明細書に記載される。本明細書に記載される技術は、再生医療において有用である。ヒト幹細胞は、三次元培養下で培養され得、組織特異的な上皮形態形成、生理および疾患を再現する。

【背景技術】

【0002】

背景

慢性腎疾患は、米国の成人人口の9～13%に影響しており、世界中で深刻な公衆衛生問題となっている。疾患の進行は、腎臓の基本機能単位であるネフロンの段階的、不可逆的な喪失によって特徴づけられる。hPSCから機能的な腎臓組織を生成する能力は、腎疾患に対する細胞療法の開発ならびに腎臓の発生および疾患をモデル化する戦略ならびに薬物スクリーニング戦略を実現可能にし得る。ネフロンは、尿を生成するために溶質および水分を再吸収および／または分泌する多成分細管系へと血液血漿をろ過する糸球体から構成される。ネフロンにおける多くの異なる上皮細胞型が、インビトロでそれらを生成するために複雑な役割を果たしている。しかし、研究は、集合管におけるそれらを除くこれらの上皮細胞型のすべてが、腎臓発生期に後腎帽子状間葉に存在する多分化能ネフロン前駆細胞（NPC）集団に由来することを示している。マーカーSIX2、SALL1、WT1およびPAX2を発現

10

20

30

40

50

するNPCは、ヒトにおいて腎臓の器官形成期にのみ見いだされ、これは誕生によって停止し、誕生後は腎損傷後の修復中でさえも再開され得ない。しかし、これらのNPCマーカーは、前方中間中胚葉（IM）由来であり、一過的に機能する中腎を形成するより原始的な中腎間葉においても発現される。このことは、初期の前方 対 後方の中間中胚葉（IM）運命の分離への注目が、後腎NPCの適切な誘導に重要であり得ることを示唆している（図13a）。

【0003】

マウスおよびヒトPSCを腎臓系の細胞に分化させるために様々な研究が試みられている。hPSCからSIX2+ NPCを生成するための公開されているプロトコルは、様々な制限を有する。第1に、NPCの大規模生産には分化効率が低すぎる。これに対する1つの説明は、ほとんどのプロトコルが、誘導分化の早期段階で前方IMと後方IMを区別していないということであり得る。後腎間葉は、後方IMの細胞として存続する原始線条の細胞から生じる。これに対して、成体腎臓集合管系の前駆体である尿管芽は、前方IMから派生し、これは後腎間葉を生成することができない細胞集団である。第2に、既存のプロトコルは、十分に明確でない成分、例えばマウス胚脊髄を使用するものであり、臨床用途に適さないであろう。最後に、以前の研究は、ネフロン原基を生成することができたが、成熟腎臓上皮細胞型を含む成熟ネフロンセグメントまたは複数のネフロンセグメントにより特徴づけられる単一の連続的なネフロン様構造体を生成することができず、それがヒト腎臓の発生、疾患および損傷をモデル化する上でのそれらの使用を不可能にしている。

【0004】

本明細書において、本発明者らは、hPSCを、ネフロン様構造体を形成することができる多分化能NPCに分化させるための、効率的で化学的に明確なシステムを記載する。二次元単層培養下で後腎発生の段階を注意深く再現することによって、本発明者らは、分化開始から9日以内に90%の効率で重要なマーカーであるSIX2、SALL1、WT1およびPAX2を共発現するNPCを生成する - これは以前の方法と比べて相当な改善である（図13b）。このNPCは、それらのインビボ対応物の発生能を示し、上皮ネフロン構造体へと自己パターン形成するPAX8+LHX1+後腎胞（renal vesicle）を自然に形成することができる。このプロセスは、後腎胞形成を誘導するためにNPCをGSK-3 β 阻害剤CHIR99021（CHIR）およびFGF9で一過的に処理することによりインビボネフロン誘導を模倣することによって顕著に改善され得る。これに続いて、2Dおよび3Dの両培養下での蛸足細胞、近位尿細管、ヘンレのループおよび遠位尿細管の逐次的特徴を有する連続構造体への自己編成的分化が行われる。

【発明の概要】

【0005】

一定量のヒト多能性幹細胞（「hPSC」）を提供する工程、後期原始線条細胞を生成する工程、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程、および後腎間葉細胞に分化させる工程を含む、後腎間葉を生成するための方法が、本明細書に記載されている。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞（「hESC」）である。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞（「hiPSC」）である。他の態様において、後期原始線条細胞を生成する工程は、CHIR99021中で約3～5日間培養することを含む。他の態様において、この方法はさらに、ノギンの添加を含む。他の態様において、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程は、アクチビンの存在下で約2～4日間培養することを含む。他の態様において、後腎間葉細胞に分化させる工程は、FGF9の添加を含む。他の態様において、後腎間葉系細胞は、CHIR99021の添加によってネフロン前駆細胞（NPC）にさらに分化させられる。他の態様において、後期原始線条細胞は、TおよびTBXのうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後期中間中胚葉細胞は、WT1およびHOXD11のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉系細胞は、SIX2、SALL1、WT1およびPAX2のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、SIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも50%の効率である。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも70%の効率である。

【0006】

一定量のヒト多能性幹細胞（「hPSC」）を提供する工程、後期原始線条細胞を生成する工程、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程、および後腎間葉細胞に分化させる工程を含む後腎間葉を生成するための方法によって生成される後腎間葉細胞の組成物が、本明細書にさらに記載されている。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞（「hESC」）である。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞（「hiPSC」）である。他の態様において、後期原始線条細胞を生成する工程は、CHIR99021中で約3～5日間培養することを含む。他の態様において、この方法はさらに、ノギンの添加を含む。他の態様において、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程は、アクチビンの存在下で約2～4日間培養することを含む。他の態様において、後腎間葉細胞に分化させる工程は、FGF9の添加を含む。他の態様において、後腎間葉系細胞は、CHIR99021の添加によってネフロン前駆細胞（NPC）にさらに分化させられる。他の態様において、後期原始線条細胞は、TおよびTBXのうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後方中間中胚葉細胞は、WT1およびHOXD11のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉系細胞は、SIX2、SALL1、WT1およびPAX2のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、SIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも50%の効率である。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも70%の効率である。記載される方法によって生成されるネフロン前駆細胞の組成物。

10

【0007】

一定量のネフロン前駆細胞（「NPC」）を提供する工程、および懸濁培養下でNPCを約11日間培養する工程を含む、腎臓オルガノイドを生成する方法が、本明細書に記載されている。他の態様において、この方法は、CHIR99021およびFGF9のうちの1つまたは複数の添加を含む。他の態様において、腎臓オルガノイドは、蛸足細胞様細胞、近位尿細管、ヘンレの下行脚、ヘンレの太い上行脚および遠位曲尿細管から選択される1つまたは複数の細胞型を含む。他の態様において、蛸足細胞様細胞は、NPHS1+、PODXL+およびWT1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、近位尿細管は、LTL+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの下行脚は、CDH1+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの太い上行脚は、CDH1+およびUMOD+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、遠位曲尿細管は、CDH1+ UM 30 OD-のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、ヒト多能性幹細胞（「hPSC」）由来である。他の態様において、hPSCは、疾患変異を有する患者由来である。他の態様において、hPSCは、CRISPRを用いてゲノム編集されたものである。

20

30

【0008】

一定量のネフロン前駆細胞（「NPC」）を提供する工程、および懸濁培養下でNPCを約11日間培養する工程を含む腎臓オルガノイドを生成する方法によって作製される一定量のオルガノイドもまた、本明細書に記載されている。他の態様において、この方法は、CHIR99021およびFGF9のうちの1つまたは複数の添加を含む。他の態様において、腎臓オルガノイドは、蛸足細胞様細胞、近位尿細管、ヘンレの下行脚、ヘンレの太い上行脚および遠位曲尿細管から選択される1つまたは複数の細胞型を含む。他の態様において、蛸足細胞様細胞は、NPHS1+、PODXL+およびWT1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、近位尿細管は、LTL+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの下行脚は、CDH1+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの太い上行脚は、CDH1+およびUMOD+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、遠位曲尿細管は、CDH1+ UMOD-のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、ヒト多能性幹細胞（「hPSC」）由来である。他の態様において、hPSCは、疾患変異を有する患者由来である。他の態様において、hPSCは、CRISPRを用いてゲノム編集されたものである。

40

【図面の簡単な説明】

【0009】

50

【図 1 - 1】hPSCから後方中間中胚葉への分化。(a) 後期原始線条および後方IMの誘導について試験した作用物質。(b) それらの存在または非存在により下記の両方の状態を特定するマーカーを用いた、hPSCから後期原始線条および後方中間中胚葉 (IM)への逐次分化の略図およびプロトコル。後方IMのプロトコルにおいて、hESCおよびhiPSCを、それぞれ、CHIR 8 μ Mおよび10 μ Mを用いて分化させた。hiPSCについては、ノギン 5 ng/mlも必要とした。(c) CHIR 8 μ Mを用いた分化第4日のhESCにおけるTおよびTBX6の免疫細胞化学。(d) 第4日のhESCおよびhiPSCにおけるTまたはTBX6陽性細胞の比率。黒色のバーは平均値を示す。hESCについてはn=3、hiPSCについてはn=3。スケールバー：100 μ m。

【図 1 - 2】hPSCから後方中間中胚葉への分化。(e) 第7日のhESCおよびhiPSCにおける後方IMマーカーWT1およびHOXD11の免疫細胞化学。(f) 第7日のhESCにおける前方IMマーカーPAX2およびLHX1の免疫細胞化学。(g) 第7日のhESCおよびhiPSCにおけるWT1またはHOXD11陽性細胞の比率。黒色のバーは平均値を示す。hESCについてはn=7、hiPSCについてはn=4。スケールバー：100 μ m。

【図 2 - 1】ネフロン前駆細胞への分化および後腎胞の自然形成。(a) ネフロン前駆細胞の誘導のためのプロトコル。(b) (a) に示されるプロトコルを用いてhPSCから分化させた細胞における第9日のネフロン前駆細胞マーカーSIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1の免疫細胞化学。スケールバー：50 μ m。

【図 2 - 2】ネフロン前駆細胞への分化および後腎胞の自然形成。(c) 第9日のhESCおよびhiPSCにおけるSIX2、SALL1、WT1またはPAX2陽性細胞の比率。hESCにおけるSIX2、SALL1、WT1またはPAX2について、それぞれ、n=7、5、4または7。hiPSCにおけるSIX2、SALL1、WT1またはPAX2について、それぞれ、n=6、4、4または3。黒色のバーは、平均値を示す。(d) 第8日のhESCにおけるSIX2、SALL1およびWT1についてのフローサイトメトリー。二次抗体のみで染色したサンプルを対照として使用した (灰色)。

【図 2 - 3】ネフロン前駆細胞への分化および後腎胞の自然形成。(e) hESCにおけるOSR1およびPAX2の遺伝子発現の第0日から第9日までのタイムコース。OSR1は、第7日および第9日に上方調節され、PAX2は第9日に上方調節された。n=2。データは、平均 $\pm$ SEMを表している。(f、g) FGF9 10 ng/mlで処理されたhESCにおける第7日から第14日までのSIX2およびLHX1発現のタイムコース。(g) FGF9を第14日まで継続した場合、SIX2発現は維持されたが、LHX1+細胞の自然誘導は後腎胞への成熟と同じであった。画像は、培養皿内での後腎胞形成の密度を代表するものである。スケールバー：100 μ m (f)、1 mm (g)。

【図 3 - 1】ネフロン前駆細胞からの前尿細管凝集体および後腎胞の誘導。(a) 後腎胞への分化の略図。

【図 3 - 2】ネフロン前駆細胞からの前尿細管凝集体および後腎胞の誘導。(b) 分化第14日の24ウェルにおけるLHX1に関するウェル全体のスキャン。FGF9 10 ng/mlおよび一過的なCHIR 3 μ M処理の組み合わせは、LHX1発現を増強した。n=2。スケールバー：5 mm。(c) 第14日のhESCにおけるPAX8およびLHX1についての明視野および免疫細胞化学の代表画像。スケールバー：100 μ m。(d) 第14日のhESCにおけるPAX8およびLHX1についてのフローサイトメトリー。二次抗体のみで処理したサンプルを対照として使用した (灰色)。(e) 分化第14日におけるBRN1、HNF1 β およびLAM (ラミニン) についての免疫細胞化学。n=6。50 μ m (下パネル)。

【図 3 - 3】ネフロン前駆細胞からの前尿細管凝集体および後腎胞の誘導。(f) 第9日に細胞を再懸濁し、超低接着性96ウェルプレートに移し、第14日に研究した後の、培養下で形成されたオルガノイドの明視野画像。対照は、再懸濁後に基本分化培地 (ARPMI) 中で培養した。FGF9およびCHIRは、オルガノイドのサイズを大きくした。スケールバー：100 μ m。(g) 第11日および第14日におけるオルガノイドのホルマウント染色。ラミニンに囲まれた分極構造体が第14日に見出され、これにより後腎胞への分化が示唆された。n=2。スケールバー：100 μ m。

【図 4 - 1】2D培養下での自己編成的ネフロン形成。(a) ネフロンを誘導するためのプロトコル。(b) 分化第21日の代表的な明視野画像。スケールバー：1 mm。(c) 第21日におけるCDH1、PODXLおよびLTLについての免疫細胞化学。スケールバー：1 mm。(d) 第21

10

20

30

40

50

～28日における蛸足細胞 (PODXL、NPHS1) 近位尿細管 (CDH2、LTL)、ヘンレのループ (CDH1、UMOD) および遠位尿細管 (CDH1、BRN1) マーカーについての免疫細胞化学。n=7。それ以外のこと示されていない限り、スケールバー：50 μm 。CDH1：カドヘリン-1 (E-カドヘリン)。PODXL：ポドカリキシン様 (ポドカリキシン)。LTL：ロータス・テトラゴノロバス (*Lotus tetragonolobus*) レクチン。NPHS1：ネフリン。UMOD：ウロモジュリン。CDH2：カドヘリン-2 (N-カドヘリン)。

【図4-2】2D培養下での自己編成的ネフロン形成。(e) 第21～28日における蛸足細胞 (PODXL、NPHS1) 近位尿細管 (CDH2、LTL)、ヘンレのループ (CDH1、UMOD) および遠位尿細管 (CDH1、BRN1) マーカーについての免疫細胞化学。n=7。それ以外のこと示されていない限り、スケールバー：50 μm 。(f) 第21日のhESCおよびhiPSC由来構造体におけるLTL+尿細管の数；n=2。値は、各サンプルの10個の視野 (1 mm^2 /視野) から計算した。データは、平均 $\pm$ SEMを表す。CDH1：カドヘリン-1 (E-カドヘリン)。PODXL：ポドカリキシン様 (ポドカリキシン)。LTL：ロータス・テトラゴノロバス (*Lotus tetragonolobus*) レクチン。NPHS1：ネフリン。UMOD：ウロモジュリン。CDH2：カドヘリン-2 (N-カドヘリン)。

10

【図5-1】3D培養下での自己編成的ネフロン形成。(a、b) 図4aのプロトコルを用いた第28日 (a) および第35日 (b) におけるCDH1、PODXLおよびLTLについてのホルマウント染色。スケールバー：50 μm 。(c、d) 第21～28日のhESCおよびhiPSC由来構造体における代表的な免疫組織化学。n=5。スケールバー：50 μm 。CDH1：カドヘリン-1 (E-カドヘリン)。PODXL：ポドカリキシン様 (ポドカリキシン)。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。AQP1：アクアポリン1。NPHS1：ネフリン。UMOD：ウロモジュリン。(c) 低倍率。(d) 高倍率。

20

【図5-2】3D培養下での自己編成的ネフロン形成。(e) hESC由来の腎臓オルガノイドの糸球体様および尿細管領域の代表的な電子顕微鏡画像。中央パネルは、左パネルにおいて四角で囲まれた領域のより高倍率の拡大図を表す。n=5。サンプルは、第18日に採取し一過的CHIR処理を行わなかった右上パネルを除いて、第21日に採取した。点線：ボウマン嚢。矢印：足突起。矢じり：密着結合。アスタリスク：ミトコンドリア。ハッシュ：刷子縁様構造体。(f) 足突起 (上パネル) および刷子縁 (下パネル) を示す正常なヒト腎臓の電子顕微鏡画像。

【図6-1】腎臓オルガノイドにおける腎臓発生および損傷のモデル化。(a) 腎臓発生分析および腎毒性アッセイの概要。(b) 第14日から第21日までDAPT 10 μM で処理されたhESC由来の構造体における免疫組織化学の代表画像。n=4。ノッチの阻害は、近位尿細管の形成を抑制した。スケールバー：50 μm 。

30

【図6-2】腎臓オルガノイドにおける腎臓発生および損傷のモデル化。(c) 第21日から第23日までゲンタマイシン (5 mg/ml) でまたは第21日から第22日までシスプラチン (5 μM) で処理された構造体における代表的な免疫組織化学。n=6。スケールバー：50 μm 。ゲンタマイシンおよびシスプラチンは、KIM-1の上方調節を誘導し、シスプラチンは、CDH1の発現を抑制した。(d) ゲンタマイシン処理したオルガノイドの低倍率画像。スケールバー：100 μm 。CDH1：カドヘリン-1 (E-カドヘリン)。PODXL：ポドカリキシン様 (ポドカリキシン)。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。KIM-1：腎臓損傷分子-1。(e) 示された用量のゲンタマイシンで処理された腎臓オルガノイドにおけるKIM-1のリアルタイム定量PCR。データは、平均 $\pm$ SEM (n=10) で表されている。

40

【図6-3】腎臓オルガノイドにおける腎臓発生および損傷のモデル化。(f) 第23日から第24日まで (24時間) シスプラチン (5または50 μM) で処理されたオルガノイドの代表的な免疫組織化学。n=4。スケールバー：50 μm 。

【図7-1】後腎発生および公開されているプロトコル。(a) 中間中胚葉およびその後の中腎および後腎への分化の概要。

【図7-2】後腎発生および公開されているプロトコル。(b) 公開されているプロトコルおよび本発明者らの新しいプロトコルの要約および比較。Takasato et al. *Nat Cell Biol.* 2014. Taguchi et al. *Cell Stem Cell.* 2014. RA：レチノイン酸。

50

【図 8】用量およびCHIR処理時間の調節。(a) 原始線条およびその後の各中胚葉系統への分化の概要。(b) 分化前にOCT4およびSOX2で染色することによって多能性を評価した。CHIR 5 μ Mを用いて分化させたhESCは、分化第1.5日でTおよびTBX6について陽性であったが、細胞はHOXD11について着色しなかった。スケールバー：200 μ m。(c) CHIR (3~10 μ M)を用いた分化の第4日における免疫細胞化学。細胞を高用量のCHIR (7~10 μ M)を用いて分化させたときに、持続的なTBX6発現が観察された。スケールバー：100 μ M。(d) 第0日から第7日までのhESCにおけるMIXL1についてのリアルタイムPCR。hESCを、CHIR 8 μ Mを用いて4日間、およびアクチビン10 ng/mlを用いて3日間分化させた。原始線条の別のマーカーであるMIXL1もまた、少なくとも分化第4日まで持続的発現を示した。発現は、第7日までに非常に低いレベルに戻った。n=2。(e) 分化第7日におけるWT1およびHOXD11による染色。hESCを、CHIR 8 μ Mを用いて4日間、その後に基本培地 (ARPMI) を用いて3日間分化させた。細胞は、WT1を発現したが、HOXD11を発現しなかった。スケールバー：100 μ m。

10

【図 9-1】hiPSCにおけるプロトコルの調節。(a) 第4日のT発現についてのCHIR用量の比較。第4日のhiPSCにおける持続的なT発現には、やや高用量のCHIRが必要とされた。(b) 分化第4日におけるT、TBX6またはFOXF1についての免疫細胞化学。hESCをCHIR 8 μ Mを用いて分化させ、hiPSCをCHIR 10 μ Mを用いて分化させた。特に、FOXF1は、hESCにおいては陰性であったが、hiPSCにおいては陽性であった。スケールバー：100 μ m。

【図 9-2】hiPSCにおけるプロトコルの調節。(c) 試験されたプロトコルおよびhiPSCにおける代表的な免疫細胞化学。>5 ng/mlのノギンは、第4日にFOXF1発現を抑制した。第7日にWT1発現を誘導するために、ノギン 5 ng/mlが最適であった。(d) 分化プロトコルならびにhESCにおける第4日のFOXF1についておよび第7日のWT1についての染色。追加のノギンまたはBMP4のいずれも、第7日にWT1発現を有意に抑制し、BMP4は、第4日にFOXF1発現を誘導し、これによりCHIR処理のみを行うhESCにおいては内因性のBMP4シグナルが最適であることが示唆された。スケールバー：100 μ m。

20

【図 9-3】hiPSCにおけるプロトコルの調節。(e) プロトコルおよびhiPSCにおける第7日のWT1およびHOXD11についての染色。CHIR 10 μ M+ノギン 5 ng/mlおよびその後のアクチビン10 ng/mlは、hiPSCにおいて最も効果的なWT1+HOXD11+細胞への分化を示した。スケールバー：100 μ m。

【図 10-1】SIX2+細胞からネフロンへの自然分化および3D培養下での成長因子のスクリーニング。(a) 分化第10日のhESCにおけるPAX8およびLHX1を用いた染色。hESCを、CHIR 8 μ Mを用いて4日間、アクチビン10 ng/mlを用いて3日間、およびFGF9 10 ng/mlを用いて3日間分化させた。LHX1の散発的発現が、PAX8+細胞において観察された。スケールバー：50 μ m。(b) 分化第10日および第21日のhESCについての明視野画像。FGF9を第10日に取り除き、細胞を第21日まで基本培地中で培養した。スケールバー：50 μ m。(c) 分化第28日のhESCにおけるLTLおよびNPHS1についての明視野および免疫細胞化学。スケールバー：50 μ m。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。NPHS1：ネフリン。

30

【図 10-2】SIX2+細胞からネフロンへの自然分化および3D培養下での成長因子のスクリーニング。(a) 分化第10日のhESCにおけるPAX8およびLHX1を用いた染色。hESCを、CHIR 8 μ Mを用いて4日間、アクチビン10 ng/mlを用いて3日間、およびFGF9 10 ng/mlを用いて3日間分化させた。LHX1の散発的発現が、PAX8+細胞において観察された。スケールバー：50 μ m。(b) 分化第10日および第21日のhESCについての明視野画像。FGF9を第10日に取り除き、細胞を第21日まで基本培地中で培養した。スケールバー：50 μ m。(c) 分化第28日のhESCにおけるLTLおよびNPHS1についての明視野および免疫細胞化学。スケールバー：50 μ m。(d) 成長因子スクリーニングのプロトコル。細胞を、第10日に3D培養物に再プレーティングし、列挙されている成長因子および低分子を試験した。(e) オルガノイドにおけるLTL+尿細管の数。HGFは、LTL+尿細管を増加させる傾向を示した。n=2。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。NPHS1：ネフリン。

40

【図 10-3】SIX2+細胞からネフロンへの自然分化および3D培養下での成長因子のスクリーニング。(d) 成長因子スクリーニングのプロトコル。細胞を、第10日に3D培養物に

50

再プレーティングし、列挙されている成長因子および低分子を試験した。(e) オルガノイドにおけるLTL+尿細管の数。HGFは、LTL+尿細管を増加させる傾向を示した。 $n=2$ 。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。NPHS1：ネフリン。

【図10-4】SIX2+細胞からネフロンへの自然分化および3D培養下での成長因子のスクリーニング。(f) 尿管芽細胞スフェアとの3D共培養の明視野画像。スケールバー：100 μm 。(g) 第16日のオルガノイドにおけるLTLについてのホールマウント染色。スケールバー：100 μm 。(h) 第16日のオルガノイドの免疫組織化学。スケールバー：50 μm 。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。NPHS1：ネフリン。

【図11】後腎胞を誘導する成長因子および低分子のスクリーニング。(a、b) 後腎胞誘導について試験したプロトコル。(c) 分化第14日の構造体におけるSIX2およびLHX1につ

10

いての免疫細胞化学。第9日から第11日までのCHIR 3 μM による一過的処理は、第7日から第14日までのFGF9 10 ng/mlと比較して、LHX1+細胞の数を増加させ、SIX2発現を抑制し、これにより間葉上皮移行が示唆された。スケールバー：50 μm 。REGM：腎臓細胞成長培地 (Lonza、#CC-3190)。

【図12】腎臓の発生分析。(a) DAPTを使用して第14日から第21日までノッチシグナルを抑制した。(b) 2D培養下のhESC由来の細胞における第21日のCDH1、PODXLおよびLTL発現。スケールバー：50 μm 。(c) 第21日の対照およびDAPT処理におけるLTL+ネフロン構造体の比率。ネフロン数を、各サンプル ($n=2$) の10個の視野 (拡大率20倍) におけるCDH1+尿細管として計数した。CDH1：カドヘリン-1 (E-カドヘリン)。PODXL：ポドカリキシン様 (ポドカリキシン)。

20

【図13】腎毒性アッセイ。(A) 腎毒性アッセイのプロトコル。ゲンタマイシン5 mg/mlを第21日から第23日まで添加した。(B) hESC由来の腎臓オルガノイドにおけるCDH1、KIM-1およびLTLについての第23日のホールマウント染色。スケールバー：50 μm 。CDH1：カドヘリン-1 (E-カドヘリン)。PODXL：ポドカリキシン様 (ポドカリキシン)。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン。KIM-1：腎損傷分子-1。

【図14】hPSCから腎臓オルガノイドへの分化プロトコル。図は、分化日を特定する各分化工程のマーカーを逐次的パターンで示している。LAM：ラミニン。プロトコルは、各成長因子および低分子の濃度を示している。

【図15】各分化工程におけるhPSCの形態変化。各分化工程における代表的な明視野画像。第0日、分化が開始した際の未分化であるhPSC。第4日、後期原始線条段階。第9日、ネフロン前駆体段階。第14日、後腎胞段階。第21日、ネフロン段階。第4日のアクチビンA処理に進めるための最適な細胞形態は、緩やかに密集したクラスターの目に見える存在である。第4日の「疎ら過ぎである」または「密集し過ぎている」クラスターの代表的な明視野画像も示されている。スケールバー：100 μm 。スケールバーは、すべてのパネルを代表するものである。

30

【図16】NPCおよびネフロンの免疫染色。(a) NPCを示す分化第9日におけるSIX2についての免疫細胞化学。(b) 分化第21日における2D培養下のネフロンセグメントを特定する免疫細胞化学。スケールバー：50 μm 。(c) 分化第21日の凍結切片を用いた3D培養下のネフロンセグメントを特定する免疫細胞化学。スケールバー：50 μm 。(d) 3D培養下のネフロンについてのホールマウント染色 (左：高倍率、スケールバー：50 μm 、右：低倍率、スケールバー：100 μm)。PODXL：ポドカリキシン (蛸足細胞マーカー)。LTL：ロータス・テトラゴノロバス レクチン (近位尿細管マーカー) CDH1：カドヘリン1 (E-カドヘリンとしても公知) (ヘンレのループおよび遠位尿細管マーカー)。(e) 第21日の3D培養下のオルガノイドの明視野画像。矢印は、糸球体構造体を示す。スケールバー：100 μm 。

40

【図17】腎毒性アッセイ。シスプラチン5 μM を用いた24時間処理後の腎臓オルガノイドにおけるCDH1、KIM1およびLTL (ロータス・テトラゴノロバス レクチン) についての免疫組織化学染色。LTL+尿細管は、同処理後に、近位尿細管損傷のマーカーであるKIM1を発現した。3D培養下で生成された腎臓オルガノイドを、分化第23日から第24日まで、シスプラチン5 μM を用いて24時間処理した。第24日にオルガノイドを固定し、分析した。スケールバー：50 μm 。スケールバーは、対応する右パネルを代表するものである。

50

【図18】間質細胞および連結管／集合管の免疫染色。(a) 3D腎臓オルガノイドにおけるPDGFR β およびエンドムチン (endomucin) についての免疫染色。PDGFR β は、免疫組織化学によって評価した。エンドムチンは、ホルマウント染色によって評価した。矢印は、糸球体構造体におけるエンドムチン+内皮を示す。(b) 3D腎臓オルガノイドにおける α -SMAについての免疫組織化学。腎臓オルガノイドに小さな α -SMA+間質細胞集団が存在した。(c) 3D腎臓オルガノイド内のCDH1+尿細管におけるアクアポリン-2 (AQP2) についての免疫組織化学。AQP2+尿細管は、CDH1+尿細管のみで見いだされ、これにより腎臓オルガノイドにおける連結管／集合管の存在が示された。スケールバー：50 μ m。

【図19】腎臓オルガノイドは、インビボで腎臓のトランスポーターおよび機能的タンパク質を発現する。

【図20】腎臓オルガノイドは、複数の腎臓コンパートメントを含み、腎臓の機能的タンパク質を発現する。

【図21】腎臓オルガノイドは、複数の腎臓コンパートメントを含み、腎臓の機能的タンパク質を発現する。まとめると、このオルガノイドは、ネフロン、集合管ならびに血管および筋線維芽細胞を含む間質細胞を含み、このことは腎臓の細胞型の大部分が含まれていることを意味する。

【図22】嚢胞の自然形成。

【図23】cAMPの増加は、嚢胞形成を促進する。

【図24】ネフロンオルガノイドにおける常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD) のモデル化。

【図25】常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD) の特徴。これは、公開されている研究と同様、嚢胞が遠位ネフロン (KIM1陰性) 由来であることを示している。

【図26】常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD)、3D培養下のオルガノイド。これは、96ウェルプレートにおいて行われた。嚢胞形成は、フォルスコリン処理したARPKD-iPSにおいて100%であった(24個のオルガノイド中24個)。PKHD1変異は、CRISPRを用いて作製した。嚢胞の表現型は、非常に早期の段階(第22日～)から現れ、このことは、培地交換が非常に低い頻度となるため大規模薬物スクリーニングを実施可能であることを意味する。

【図27】脱分化および線維症。腎臓線維症のモデル化。

【図28】ネフロンオルガノイド：線維症のモデル化。

【図29】薬物誘導腎損傷(シスプラチン24時間)。

【図30】ネフロンオルガノイド：線維症のモデル化。

【図31】ネフロンオルガノイド：線維症のモデル化。腎臓線維症は、尿細管細胞と間質細胞の間の相互作用を伴う非常に複雑な病理プロセスである。本発明者らは、オルガノイド内に両方を有していたので、新しいヒト腎臓線維症モデルを作製することができた。現在のマウスモデルは、ヒトと全く異なるものである。線維症は、慢性腎疾患の最も重要な原因である。

【図32】糖尿病モデル。高グルコース処理は、線維症経路を増進した。グルコースチャネルSLC2Aの活性化も確認された。Third rockもまた糖尿病性ネフロパシーモデルに興味を示している。

【図33】糸球体疾患のモデル化。本発明者らは、FSGS(巣状分節状糸球体硬化)を誘導することが公知のピューロマイシンおよびアドリアマイシンを使用した。下の図により示されるように、蛸足細胞の構造が、FSGSにおけるように崩壊した。

【図34】AAは腎臓損傷バイオマーカーを用量依存的に上方調節する。アリストロキニン酸(AA)およびテノホビル(TFV)処理の代表的な免疫組織化学。第32日Kg由来オルガノイド。A1/AA処理は24時間、すべてのTFV処理は48時間。スケールバー、50 μ m。DAP/+細胞の比率として決定された量。n=3。各処理における総DAP/+>1000。(*)は、p値<0.05を示す。

【図35】プロベネシドによるOAT1阻害は近位尿細管をAA毒性から保護する。AA 2.5 gg/mLの下でのプロベネシド処理の代表的な免疫組織化学。第38日Kg由来オルガノイド。すべての処理は48時間。スケールバー、50 μ m。DAPI+細胞の比率として決定された量。n=3、各処理における総DAPI+>1000。(*)は、p値<0.05を示す。プロベネシド単独では、オ

10

20

30

40

50

ルガノイドに対して損傷を与えない。プロベネシド10 LIMは、AAに対する強力な腎臓保護を提供した。

【図36】シロスタミドによるホスホジエステラーゼ3型 (PDE3) 阻害はAA毒性モデルにおけるミトコンドリアの生物発生および保護を向上させる。AA 2.5 gg/mLの下でのシロスタミドおよびシルデナフィル処理の免疫組織化学。第38日H9由来オルガノイド。すべての処理は48時間。スケールバー、50 gm。DAPI+細胞の比率として決定された量。n=3、各処理における総DAPI+ >1000。(*)は、p値<0.05を示す。

【図37】リアルタイム定量PCR mRNAをオルガノイドサンプルから抽出し、Nanodropを用いて確認した。逆転写によりcDNAライブラリを作製した。AQP-Iは、近位尿細管において顕著に発現される。PGC1-aは、ミトコンドリア生物発生のマスターレギュレーターである。シロスタミドは、AAに対する用量依存的な腎臓保護、近位尿細管の有意な保存を示す。PGC-1aは、AAによって下方調節されるが、シロスタミドによって保護される。ネフロン各セグメントは、特定の薬物を取り込む特定のトランスポーターを発現する。まとめると、これらのデータは、オルガノイド内のネフロンが、ヒトにおいて観察されるのと同じ薬物応答をもたらす、特定の機能的なトランスポーターを発現することを示している。

【図38】生物学により作製された腎臓。上記の細胞およびオルガノイドは、かん流RV第15日への移行を含む、生物学設計に適合させることができる。

【図39】かん流下でのRV-HUVEC相互作用。

【図40】かん流下でのRV-HUVEC相互作用。

【図41】CD31+集団を含むRV。

【図42】ゼブラフィッシュ腎臓の解剖およびcdh17:EGFPトランスジェニックゼブラフィッシュ。

【図43】cdh17:EGFPトランスジェニックゼブラフィッシュにおけるゲンタマイシン誘導腎臓損傷およびネフロン再生。

【図44】cdh17:EGFPトランスジェニックゼブラフィッシュにおけるゲンタマイシン誘導腎臓損傷およびヒト腎臓前駆細胞移植。

【図45】ネフロン前駆細胞移植はゲンタマイシン誘導AKI後のゼブラフィッシュの生存性を改善する。NPC移植は、AKI後の生存性を改善した。

【発明を実施するための形態】

【0010】

詳細な説明

本明細書で引用されているすべての参考文献は、それらが完全に示されているものとして、それらの全体が参照により組み入れられる。それ以外の定義がなされていない限り、本明細書で使われる技術および科学用語は、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。Allen et al., Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak et al., Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, Dictionary of DNA and Genome Technology 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); およびGreen and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)は、本願で使われる多くの用語に対する一般の手引きを当業者に提供する。抗体の生成方法に関する参考文献については、Greenfield, Antibodies A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler and Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9; Queen and Selick, Humanized immunoglobulins, 米国特許第5,585,089号 (1996 Dec); およびRiechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, Nature 1988 Ma

10

20

30

40

50

r 24, 332(6162):323-7を参照のこと。

【0011】

当業者は、本発明を実施する上で使用することができる、本明細書に記載されているのと同様または同等の多くの方法および材料を理解するであろう。実際、本発明は、記載されている方法および材料に限定されるものではない。

【0012】

本明細書の説明の中でおよび添付の特許請求の範囲を通じて使用される場合、「a」、「an」および「the」の意味は、文脈がそれ以外のことを明確に示していない限り、複数の参照を包含する。また、本明細書の説明の中で使用される場合、「in」の意味は、文脈がそれ以外のことを明確に示していない限り、「in」および「on」を包含する。

10

【0013】

ヒト多能性幹細胞 (hPSC) は、再生医療およびインビトロでの疾患モデル化の魅力的なソースである。しかし、今日まで、多くの研究者が、十分に定義されていない誘導因子、例えば胚脊髄を必要とせず高い効率でhPSCから特定の腎臓細胞型に分化させるために使用されるプロトコルに到達していない。過去10年の間に、本発明者らの腎臓発生に関する知見に基づきPSCを腎臓系統の細胞に分化させるという大きな前進があった。後腎発生をインビトロで再現することによって、本発明者らは、誘導分化プロトコルの間に部分集団の選択を行うことなく、9日以内に約80~90%の純度でネフロン前駆細胞 (NPC) を作製した。hPSC由来NPCは、ネフロン構造体へと自己パターン形成する後腎胞を形成するそれらのインビボ対応物の発生能を有している。2Dおよび3Dの両培養下で、NPCは、インビボのネフロンと類似する組織化された連続的な構造の中で蛸足細胞、近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管のマーカーを発現する上皮ネフロン様構造体を含む腎臓オルガノイドを形成する。

20

【0014】

最近の研究は、後腎の起源が尿管芽または前/中腎系統と異なっていることを明らかにした。彼らは、後腎が後方中間中胚葉から生じ、尿管芽および前/中腎が前方中間中胚葉に由来することを示した。したがって、本発明者らは、hPSCからの後方中間中胚葉細胞の特異的誘導がNPCの誘導を大きく促進し、前腎または中腎細胞の混入を回避するという仮説をたてた。以前の研究は、原始線条における位置がその後の中胚葉の各セグメント、例えば沿軸、中間または側板中胚葉への分化を定義することを明らかにした。加えて、原始線条からの細胞遊走のタイミングは、中胚葉における前後軸を定義し、このことは原始線条の後期段階が後方中胚葉を誘導することを示唆している。本発明者らは、後期段階の原始線条を誘導するための、原始線条の誘導因子であるGSK-3 β 阻害剤CHIR99201 (CHIR) による処理の時期を最適化した。加えて、本発明者らは、高いBMP4活性が、側板中胚葉に発展する原始線条のより後方の局面を誘導することから、BMP4阻害剤を使用した。このアプローチを用いて、本発明者らは、分化の9日以内に80~90%の効率でヒトESCおよびiPSCの両方からSIX2+SALL1+WT1+PAX2+EYA1+ NPCを誘導する高効率プロトコルを見出した。NPCの誘導後、本発明者らは、CHIR (3 μ M) を用いて細胞を一過的に処理し、正常なネフロン構造を反映する様式で自己集合した尿細管内に並ぶ蛸足細胞、近位尿細管、ヘンレのループおよび遠位尿細管の特徴を有する多セグメントネフロン構造体を生成した。他のオルガノイドコンパートメントのさらなる分析は、この腎臓オルガノイドにおいてCDH1+AQP2+尿細管およびPDGFR β +, エンドムチン+または α -SMA+間質細胞を明らかにした (図7)。まとめると、本発明者らのプロトコルは、ネフロンが腎皮質の約90%を占めるインビボ腎臓のそれと同様の細胞集団を含む複数の腎臓コンパートメントからなる腎臓オルガノイドを生成した。

30

40

【0015】

hPSCをNPCおよび腎臓オルガノイドに分化させるプロトコルは、インビトロでヒト腎臓の発生および発生障害、遺伝性腎疾患、腎損傷、腎毒性試験ならびに腎臓再生を研究するための新しいプラットフォームを提供する。加えて、このオルガノイドは、インビトロで分化した細胞を用いて細胞内および細胞間腎臓コンパートメント相互作用を研究するため

50

のシステムを提供する。このプロトコルは、本発明者らがインビボで知った腎臓発生の工程を追従するよう誘導されるので、本発明者らは、各分化工程の中間細胞集団：後期中間原始線条、後方中間中胚葉、NPC、前尿細管凝集体、後腎胞およびネフロンを誘導することができる（図1）。したがって、このオルガノイドは、各分化工程の細胞を評価することによって、ヒト腎臓の発生および腎臓の先天性異常の研究を可能にし得る。重要な用途は、遺伝性腎疾患を研究することであろう。個々の変異が同定されている遺伝性腎疾患は160種超存在する。遺伝性腎疾患を有する患者からiPSCを作製し、これらの細胞から腎臓オルガノイドを生成することによって、遺伝性腎疾患の病理を調査することができる。さらに、hPSCにおけるCRISPR/Cas9ゲノム編集を用いて特異的に変異を導入し、それ以外では同一の遺伝的背景を有する変異系統と親系統由来のオルガノイドの比較を行うことによって遺伝性腎疾患を研究することも可能である。これらのアプローチは、遺伝性疾患の病態生理の分析を可能にし、かつ新規の治療アプローチを見出すためのインビトロでの薬物スクリーニングを実現するであろう。この腎臓オルガノイドの別の用途は、個体の遺伝子型の特徴に基づく予想毒性の下で薬物の腎毒性を試験することであろう。この腎臓オルガノイドは、蛸足細胞から遠位尿細管までのネフロンの連続するセグメントを反映する複数の細胞型を含んでいるので、薬物毒性を特定のネフロンセグメントに割り当てることが可能であろう。すでに、常染色体劣性多発性嚢胞腎（ARPKD）患者由来のhPSC（図24～26）、線維症オルガノイド（図27～31）、糖尿病のモデル化に関する潜在的用途をさらに含むこと（図32）、および薬物毒性（図33～36）に関する結果。これらの結果は、このプラットフォームの有用性および柔軟性を実証している。

10

20

【0016】

インビトロでの分化表現型の維持もまた、細胞が通常脱分化される典型的な細胞培養研究よりもインビボでのその状態を精密に模倣する様式で、コンパートメント間相互作用の細胞生化学分析および研究を可能にするであろう。CDH1+AQP2+尿細管およびPDGFR β +, エンドムチン+または α -SMA+間質細胞の存在は、ネフロン・間質細胞相互作用の研究を可能にするであろう。究極的に、このプロトコルは、腎臓再生医療のためのオルガノイドを提供する土台としての役割を果たす能力を有する。

【0017】

本発明者らのプロトコルと以前に公開された腎臓系細胞を誘導するプロトコルを比較すると、効率、特異性および単純さの点で多くの違いがある。本発明者らのプロトコルは、本発明者ら自身のものを含む以前の研究と比較して、hESCおよびhiPSCの両方からずっと高い誘導効率でNPCを生成する。各分化工程での高い誘導効率は、同時に、高い腎臓誘導特異性を示す。1つの研究は、胚様体形成を用いた比較的高い効率（約60%）のSIX2+細胞誘導を報告したものの、これは腎臓上皮細胞の生成にマウス胚脊髄との共培養を必要とするのに対して、本発明者らのプロトコルは、単層培養および化学的に明確な成分を使用する。本発明者らは、いかなる非精製非ヒト因子も添加することなく完全に明確な条件を用いてNPCおよびオルガノイドを生成することができ、これはヒトにおける再生用途に望ましい。加えて、本発明者らのプロトコルは、3D腎臓オルガノイドを生成するために96ウェル、丸底、超低接着性プレートを使用し、これにより腎臓オルガノイドの大量生産が可能になるのに対して、他のオルガノイド生成プロトコルは、エッペンドルフチューブ内で細胞をペレット化することまたはマウス胚脊髄との共培養を必要とする。以前の研究は、同じ分化プロトコルの効率が個々のhPSC株で相違することを示しているので、異なる株で同様の結果を達成するために調節が行われなければならない。本発明者らは、hPSCの異なる株ごとにプロトコルを調節する方法を定義し、これが本発明者らの分化プロトコルの適用をさらに容易にしている。成長因子の量は、誘導分化プロトコルの費用に大きく影響し得る。本発明者らは、Takasatoらの素晴らしいプロトコルで使用されたよりも少量のFGF9を使用することができた。これは、現時点で相当な経済的優位性を有する。

30

40

【0018】

他のプロトコルは、表面上本発明者らのプロトコルの至らない点であると考えられ得るCD31+内皮様細胞およびCDH1+GATA3+集合管様細胞を生成する。他方、本発明者らは、ここ

50

で、腎臓オルガノイドにおけるCDH1+AQP2+尿細管およびPDGFR β +、エンドムチン+または α -SMA+間質細胞の存在を実証した(図7)。これらのマーカーを発現する細胞は、さらなる特徴づけを必要とし、本発明者らの目標の1つは、これらの集団が本発明のプロトコルにおいてどのようにして増強され得るのかを理解することである。究極的に、非ネフロン細胞は、潜在的に糸球体および尿細管間質性構造体の血管新生をもたらす多コンパートメント環境を腎臓オルガノイドにおいて構築するのに有用である。高効率でNPCをおよび究極的には多セグメント化ネフロンを生成する能力は、その後の機能的な腎臓組織のバイオエンジニアリングにとって非常に良い出発点となる。

【0019】

一定量のヒト多能性幹細胞(「hPSC」)を提供する工程、後期原始線条細胞を生成する工程、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程、および後腎間葉細胞に分化させる工程を含む、後腎間葉を生成するための方法が、本明細書に記載されている。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞(「hESC」)である。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞(「hiPSC」)である。他の態様において、後期原始線条細胞を生成する工程は、hPSCをCHIR99021中で約3~5日間培養することを含む。他の態様において、これは、約4日間を含む。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 μ Mである。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約8~10 μ Mである。他の態様において、この方法はさらに、ノギンの添加を含む。様々な態様において、ノギンの濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 ng/mlである。様々な態様において、ノギンの濃度は、約5 ng/mlである。他の態様において、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程は、アクチビンの存在下で約2~4日間培養することを含む。他の態様において、これは、約3日間を含む。様々な態様において、アクチビンの濃度は、約5~10、10~20~30 ng/mlである。様々な態様において、アクチビンの濃度は、約10 ng/mlである。他の態様において、後腎間葉細胞に分化させる工程は、FGF9の添加を含む。様々な態様において、FGF9の濃度は、約5~10、10~20~30 ng/mlである。様々な態様において、FGF9の濃度は、約10 ng/mlである。他の態様において、後腎間葉系細胞は、CHIR99021の添加によってネフロン前駆細胞(NPC)にさらに分化させられる。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μ Mである。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約5 μ Mである。他の態様において、後期原始線条細胞は、TおよびTBXのうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後方中間中胚葉細胞は、WT1およびHOXD11のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉系細胞は、SIX2、SALL1、WT1およびPAX2のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、SIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも50、60、70%またはそれ以上の効率である。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも70、80、90%またはそれ以上の効率である。

【0020】

例えば、hPSCは、単一細胞に分離され、ROCK阻害剤Y27632および任意でFGF2(10 ng/ml)を補充された培養培地中で維持され得る。その後、約30、40、50、60または70%コンフルエントである細胞が、後期原始線条細胞を誘導するために、CHIR99021(8~10 μ M)を補充された基本分化培地中で4日間培養される。CHIR(10 μ M)に加えて、ノギン(5 ng/ml)も、hiPSCの分化に使用した。次いで、後方中間中胚葉を誘導するために、細胞を3日間、Advanced RPMI + 1X L-GlutaMAX + アクチビン(10 ng/ml)中で培養した。次いで、ネフロン前駆細胞の誘導のために、培地を7日間、Advanced RPMI + 1X L-GlutaMAX + FGF9(10 ng/ml)に交換した。後腎胞を誘導するために、分化第9日から第11日までCHIR(3 μ M)が培地に添加され得る。第14日に、細胞を基本分化培地に入れ替え、さらに7~14日間培養した(合計21~28日間)。培地は2または3日ごとに交換した。様々な成長因子および低分子を分化について試験した。オルガノイド形成のために、後腎間葉細胞を示す分化第9日のhPSCを、CHIR(3 μ M)およびFGF9(10 ng/ml)を補充した基本分化培地に溶解懸濁し、37℃、5% CO₂下で2日間培養する。次いで培地を、FGF9 10 ng/mLを補充した基

本分化培地に交換し、さらに3日間培養する。その後、オルガノイドを、追加因子なしの基本分化培地中で7~21日間培養した（合計21~35日）。

【0021】

一定量のヒト多能性幹細胞（「hPSC」）を提供する工程、後期原始線条細胞を生成する工程、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程、および後腎間葉細胞に分化させる工程を含む後腎間葉を生成するための方法によって生成される後腎間葉細胞の組成物が、本明細書にさらに記載されている。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞（「hESC」）である。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞（「hiPSC」）である。他の態様において、後期原始線条細胞を生成する工程は、CHIR99021中で約3~5日間培養することを含む。他の態様において、この方法はさらに、ノギンの添加を含む。他の態様において、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程は、アクチビンの存在下で約2~4日間培養することを含む。他の態様において、後腎間葉細胞に分化させる工程は、FGF9の添加を含む。他の態様において、後腎間葉系細胞は、CHIR99021の添加によってネフロン前駆細胞（NPC）にさらに分化させられる。他の態様において、後期原始線条細胞は、TおよびTBXのうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後方中間中胚葉細胞は、WT1およびHOXD11のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉系細胞は、SIX2、SALL1、WT1およびPAX2のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、SIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも50%の効率である。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも70%の効率である。記載される方法によって生成されるネフロン前駆細胞の組成物。

【0022】

一定量のネフロン前駆細胞（「NPC」）を提供する工程、および懸濁培養下でNPCを約11日間培養する工程を含む、腎臓オルガノイドを生成する方法が、本明細書に記載されている。他の態様において、この方法は、CHIR99021およびFGF9のうちの1つまたは複数の添加を含む。他の態様において、腎臓オルガノイドは、蛸足細胞様細胞、近位尿細管、ヘンレの下行脚、ヘンレの太い上行脚および遠位曲尿細管から選択される1つまたは複数の細胞型を含む。他の態様において、蛸足細胞様細胞は、NPHS1+、PODXL+およびWT1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、近位尿細管は、LTL+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの下行脚は、CDH1+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの太い上行脚は、CDH1+およびUMOD+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、遠位曲尿細管は、CDH1+ UMOD-のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、ヒト多能性幹細胞（「hPSC」）由来である。他の態様において、hPSCは、疾患変異を有する患者由来である。他の態様において、hPSCは、CRISPRを用いてゲノム編集されたものである。

【0023】

一定量のネフロン前駆細胞（「NPC」）を提供する工程、および懸濁培養下でNPCを約11日間培養する工程を含む腎臓オルガノイドを生成する方法によって作製される一定量のオルガノイドもまた、本明細書に記載されている。他の態様において、この方法は、CHIR99021およびFGF9のうちの1つまたは複数の添加を含む。他の態様において、腎臓オルガノイドは、蛸足細胞様細胞、近位尿細管、ヘンレの下行脚、ヘンレの太い上行脚および遠位曲尿細管から選択される1つまたは複数の細胞型を含む。他の態様において、蛸足細胞様細胞は、NPHS1+、PODXL+およびWT1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、近位尿細管は、LTL+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの下行脚は、CDH1+およびAQP1+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、ヘンレの太い上行脚は、CDH1+およびUMOD+のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、遠位曲尿細管は、CDH1+ UMOD-のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、ヒト多能性幹細胞（「hPSC」）由来である。他の態様において、hPSCは、疾患変異を有する患者由来である。他の態様において、hPSCは、CRISPRを用いてゲノム編集されたものである。他の態様において、NPCは、一定量のヒト多能性幹細胞

(「hPSC」)を提供する工程、後期原始線条細胞を生成する工程、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程、および後腎間葉細胞に分化させる工程を含む後腎間葉を生成するための方法によってhPSCから得られる。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞(「hESC」)である。他の態様において、ヒト多能性幹細胞は、ヒト人工多能性幹細胞(「hiPSC」)である。他の態様において、後期原始線条細胞を生成する工程は、hPSCをCHIR99021中で約3~5日間培養することを含む。他の態様において、これは、約4日間を含む。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 μM である。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約8~10 μM である。他の態様において、この方法はさらに、ノギンの添加を含む。様々な態様において、ノギンの濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 ng/mlである。様々な態様において、ノギンの濃度は、約5 ng/mlである。他の態様において、後方中間中胚葉細胞の形成を誘導する工程は、アクチビンの存在下で約2~4日間培養することを含む。他の態様において、これは、約3日間を含む。様々な態様において、アクチビンの濃度は、約5~10、10~20~30 ng/mlである。様々な態様において、アクチビンの濃度は、約10 ng/mlである。他の態様において、後腎間葉細胞に分化させる工程は、FGF9の添加を含む。様々な態様において、FGF9の濃度は、約5~10、10~20~30 ng/mlである。様々な態様において、FGF9の濃度は、約10 ng/mlである。他の態様において、後腎間葉系細胞は、CHIR99021の添加によってネフロン前駆細胞(NPC)にさらに分化させられる。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μM である。様々な態様において、CHIR99021の濃度は、約5 μM である。他の態様において、後期原始線条細胞は、TおよびTBXのうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後方中間中胚葉細胞は、WT1およびHOXD11のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉系細胞は、SIX2、SALL1、WT1およびPAX2のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、NPCは、SIX2、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1のうちの1つまたは複数を発現する。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも50、60、70%またはそれ以上の効率である。他の態様において、後腎間葉細胞への分化は、少なくとも70、80、90%またはそれ以上の効率である。

【0024】

一定量の腎臓オルガノイドを提供する工程、1つまたは複数の化合物を腎臓オルガノイドに添加する工程、腎臓オルガノイドの表現型または活性の変化を決定する工程、およびその変化を腎臓オルガノイドに対する化合物の効果と相関づけ、それによって腎臓オルガノイドに対する効果について1つまたは複数の化合物をスクリーニングする工程を含む、腎臓オルガノイドに対する効果について化合物をスクリーニングする方法も、本明細書に記載されている。

【0025】

様々な態様において、表現型または活性の変化を決定する工程は、尿細管オルガノイドにおいて1つまたは複数のマーカーを検出することを含む。

【実施例】

【0026】

実施例1

hPSCの維持

H9ヒトESC(45~65継代)およびHDF- α ヒトiPSC(健常線維芽細胞由来のhiPSC;22~42継代)は、5%CO₂、37℃のインキュベーター内の1% vol/vol LDEVフリーhESC適合Geltrex(Life Technologies、#A1413302)でコーティングされた6ウェル組織培養プレート(Falcon、#353046)において、FGF2(10 ng/mL)(Peprotech、#100-18B)を補充したReproF2(ReproCELL、#RCHEMD006)中で維持した。hPSCを、Dissociation Solution for human ES/iPS cells(ReproCELL、#RCHETP002)を製造元のプロトコルにしたがい用いて7日ごとに1:3の分割比で継代した。H9は、WiCellから購入した。HDF- α ヒトiPSCは、本発明者らの研究所において以前に樹立した。

【0027】

実施例2

hPSCの分化

Geltrex上で成長させたhPSCを、PBS (Life Technologies、#10010-049) で一度洗浄し、Accutase (STEMCELL Technologies、#07920) を用いて単一細胞となるよう分離させた。次いで細胞を、ROCK阻害剤Y27632 (10 μ M) (TOCRIS、#1254) およびFGF2 (10 ng/ml) を補充したReproFF2中1%のGeltrexでコーティングされた24ウェル組織培養プレート (TPP、#92024) 上に、 $2 \sim 2.4 \times 10^4$ (H9) または $1 \sim 1.4 \times 10^4$ (HDF、2C) 細胞/cm²の密度でプレーティングした。72時間後、細胞 (50% コンフルエント) をPBSで軽く洗浄し、次いでCHIR99021 (8~10 μ M) (TOCRIS、#4423) を補充したAdvanced RPMI 1640 (Life Technologies、#12633-020) および1X L-GlutaMAX (Life Technologies、#35050-061) からなる基本分化培地中で4日間培養し、後期原始線条細胞を誘導した。CHIR (10 μ M) に加えて、ノギン (5 ng/ml) もhiPSCの分化に使用した。次いで、後方中間中胚葉を誘導するために、細胞を3日間、Advanced RPMI + 1X L-GlutaMAX + アクチビン (10 ng/mL) (R&D、#338-AC-050) 中で培養した。次いで、ネフロン前駆細胞の誘導のために、培地を7日間、Advanced RPMI + 1X L-GlutaMAX + FGF9 (10 ng/ml) (R&D、#273-F9-025/CF) に交換した。分化第9日から第11日までCHIR (3 μ M) を培地に添加し、後腎胞を誘導した。第14日に、細胞を基本分化培地に入れ替え、さらに7~14日間培養した (合計21~28日間)。培地は2日または3日ごとに交換した。様々な成長因子および低分子を分化について試験した。

【0028】

実施例5

3D腎臓オルガノイド形成

後腎間葉細胞を示す分化第9日のhPSCを、Accutaseを用いて分離させ、CHIR (3 μ M) およびFGF9 (10 ng/mL) を補充した基本分化培地に再懸濁させ、96ウェル、丸底、超低接着性プレート (Corning、#7007) にウェルあたり 1×10^5 細胞となるようプレーティングした。このプレートを1500 rpmで15秒間遠心分離し、次いで細胞を37℃、5% CO₂下で2日間培養した。次いで培地を、FGF9 10 ng/mLを補充した基本分化培地に交換し、さらに3日間培養した。その後、オルガノイドを、追加因子なしの基本分化培地中で7~21日間培養した (合計21~35日)。

【0029】

実施例4

腎毒性アッセイ

3D腎臓オルガノイドを、分化第21日後に、ゲンタマイシン 5×10^{-4} 、 5×10^{-2} 、もしくは5 mg/mL (Sigma、#G1264) を補充した基本分化培地中で48時間またはシスプラチン 5もしくは50 μ M (Sigma、#P4394) を補充した基本分化培地中で2、6、24もしくは48時間培養した。次いでオルガノイドを、ホルマウントおよび凍結切片免疫組織化学の両方のために、4%パラホルムアルデヒド (Electron Microscopy Sciences、#RT15710) を用いて20分間固定した。

【0030】

実施例5

免疫細胞化学

細胞培養物をPBSで一回洗浄し、室温 (RT) で15分間、4%パラホルムアルデヒド中で固定した。固定した細胞を、PBS中で三回洗浄し、RTで1時間、ブロッキング緩衝液 (0.3% Triton X-100および5%正常ロバ血清) 中でインキュベートした。次いで細胞を、4℃で一晩またはRTで2時間、抗体希釈緩衝液 (PBS中0.3% Triton X-100および1% BSA) 中で、一次抗体と共にインキュベートした。次いで細胞をPBS中で3回洗浄し、RTで1時間、抗体希釈緩衝液中Alexa Fluor 488、555または647結合二次抗体 (1:500) (Life Technologies) と共にインキュベートした。ビオチニル化LTL (Vector Labs、#B-1325) による免疫染色のために、Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs、#SP-2002) およびAlexa Fluor 488または647結合ストレプトアビジン (Life Technologies) を製造元の指示にしたがい使用した。核をDAPI (Sigma、#D8417) で対比染色した。免疫蛍光を、倒立蛍

10

20

30

40

50

光顕微鏡 (Nikon Eclipse Ti) を用いて可視化した。定量は、ImageJを用いて、20倍の倍率で、1回の実験あたり3~5つの代表的な視野において計数することによって行った。各実験における生物学的複製物のサンプル数が、図の注釈に示されている。

【0031】

実施例6

3Dオルガノイドのホールマウント免疫組織化学

3D腎臓オルガノイドを、96ウェルプレートにおいて、RTで20分間、PBS中4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、次いでPBS中で3回洗浄した。次いでこのオルガノイドを、RTで1時間、ブロッキング緩衝液 (0.3% Triton X-100および5% 正常ロバ血清) 中でインキュベートし、次いでPBS中で3回洗浄した。このオルガノイドを、4℃で一晩、抗体希釈緩衝液 (PBS中0.3% Triton X-100および1% BSA) 中で、一次抗体と共にインキュベートした。次いでこのオルガノイドを、PBSを用いて3回、各々1時間洗浄し、3回目の洗浄を4℃で一晩行った。ビオチニル化LTL (Vector Labs、#B-1325) による免疫染色のために、Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs、#SP-2002) を製造元のプロトコルにしたがい使用した。オルガノイドを、RTで1時間、抗体希釈緩衝液中の二次抗体と共にインキュベートし、次いでPBSで3回、各々30分間洗浄した。核をDAPIで30分よりも長い間対比染色した。次いでオルガノイドを、Vectashield (Vector Labs、#H-1200) を用いてマウントし、共焦点顕微鏡 (Nikon C1, Tokyo, Japan) によって試験した。

10

【0032】

実施例7

3Dオルガノイドの免疫組織化学

3D腎臓オルガノイドを、96ウェルプレートにおいて、20分間、PBS中4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、PBS中で3回洗浄し、次いで4℃で一晩、30%スクロース (w/w) と共にインキュベートした。このオルガノイドを、O.C.Tコンパウント (Fisher Scientific、#23-730-571) を用いてマウントして凍結ブロックを作製し、10 μm片に切断した。この切片をPBS中で3回、各々5分間洗浄し、次いでブロッキング緩衝液 (0.3% Triton X-100および5% 正常ロバ血清) 中で1時間インキュベートした。この切片を、抗体希釈緩衝液 (PBS中0.3% Triton X-100および1% BSA) 中で2時間、一次抗体と共にインキュベートし、その後にPBSで3回洗浄した。この切片を、抗体希釈緩衝液中の二次抗体と共に1時間インキュベートし、その後にPBSで3回洗浄した。次いでこの切片を、DAPIと共にVectashieldを用いて処理した。画像化は、Nikon C1共焦点顕微鏡を用いて行った。

30

【0033】

実施例8

定量RT-PCR

RNAeasy MiniKit (Qiagen) を用いて細胞から総RNAを精製した。500 ngのRNAを、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies、#4368814) を製造元のプロトコルにしたがい用いる逆転写のために使用した。RT-PCR反応は、cDNA (1:10希釈)、300 nMの順方向および逆方向プライマー、ならびにiTAQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad、#172-5122) を用いて二連で行った。定量RT-PCRを、iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて行った。すべてのサンプルを、2回の技術的複製物を用いて試験した。β-アクチンを、ハウスキーピング遺伝子として使用した。値は、デルタデルタCT法によって計算した。プライマー配列が表1に列挙されている。

40

【0034】

(表1) プライマー配列

遺伝子名	フォワード	リバーズ
ACTB	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT [SEQ ID NO: 1]	AGCACTGTGTTGGCGTACAG [SEQ ID NO: 2]
BMP4	AAGCGTAGCCCTAAGCATCA [SEQ ID NO: 3]	TGGTTGAGTTGAGGTGGTCA [SEQ ID NO: 4]
KIMI	CGACAACGACTGTTCCAATG [SEQ ID NO: 5]	AAAGGCATTGGAGGAACAAA [SEQ ID NO: 6]
MIXLI	ACGTCTTTCAGCGCCGAACAG [SEQ ID NO: 7]	TTGGTTCGGGCAGGCAGTTCA [SEQ ID NO: 8]
OSRI	CCTTCCTTCAGGCAGTGAAC [SEQ ID NO: 9]	CGGCACTTTGGAGAAAGAAG [SEQ ID NO: 10]
PAX2	ACTCCATCAATGGGATCCTG [SEQ ID NO: 11]	CCACACCACTCTGGGAATCT [SEQ ID NO: 12]

10

【0035】

実施例9

フローサイトメトリー

20

細胞を、Accutaseを用いて10分間分離させ、細胞塊を、40 μ m細胞ストレーナー（Corning、#352340）を用いて取り出した。細胞を、氷上で15分間、2%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、次いで氷上で15分間、0.1% Tritonを用いて透過処理した。次いで細胞を、PBS+5% ロバ血清を用いて15分間ブロックし、一次抗体（PAX8 1:2500、LHX1 1:100、SIX2 1:1000、SALL1 1:100、WT1 1:100）と共に30分間インキュベートした。PBS中1% BSAを用いて3回洗浄した後、細胞を二次抗体（Alexa Fluor 488結合ロバ抗ウサギ1:5000 [Life Technologies]、Cy5結合ロバ抗マウス1:2500 [Jackson ImmunoResearch] またはAlexa Fluor 647結合ロバ抗マウス1:5000 [Life Technologies]）と共に氷上で20分間インキュベートした。次いで細胞を、PBS中1%BSAを用いて3回洗浄した。フローサイトメトリーは、MACSQuant（Miltenyi Biotec）を用いて行った。抗体の最適な希釈比は、陰性対照、未分化H9およびPAX8、LHX1、SIX2、SALL1またはWT1を発現しないヒト近位尿細管細胞株（HKC-8）を用いて決定した。HKC-8は、Lorraine Racusen博士（Johns Hopkins Hospital）から好意により提供された。

30

【0036】

実施例10

透過電子顕微鏡法

3D腎臓オルガノイドを、4%PFAを用いて20分間固定し、その後に4℃で一晩、水中1.5%グルタルアルデヒド、1%パラホルムアルデヒド、70 mM NaPO4 pH 7.2および3%スクロースからなる電気顕微鏡（EM）固定緩衝液を用いて固定した。オルガノイドを、0.2Mカコジル酸緩衝液pH 7.4中で3回、各10分間洗浄し、そして氷上で1時間、1% OsO4と共にインキュベートした。次いでこのオルガノイドを、0.2Mカコジル酸緩衝液pH 7.4中で3回、各10分間洗浄し、段階的なエタノール溶液群を通して脱水し、Eponに包埋した。70 nm切片に切断し、JEM-1010（JEOL）で分析した。

40

【0037】

実施例11

細胞培養

HKC-8は、5%CO₂下の37℃インキュベーターにおいて、10%ウシ胎仔血清（FBS）を補充したDMEM/F12（Life Technologies、#11320-033）中で維持し、3または4日ごとに継代した。NIH3T3-Wnt4は、5%CO₂下の37℃インキュベーターにおいて、10% FBSを補充したDMEM（Corning、#10-013-CV）中で維持し、3または4日ごとに継代した。NIH3T3-Wnt4は、An

50

drew P. McMahon博士から好意により提供された。マウス尿管芽細胞株は、5%CO₂下の37℃インキュベーターにおいて、10% FBSを補充したDMEM (Corning、#10-013-CV) 中で維持し、3または4日ごとに継代した。マウス尿管芽細胞株は、Jonathan Barasch博士から好意により提供された。すべての細胞株において、DAPI染色によりマイコプラズマ混入を試験した。

【0038】

PSCから腎臓系統の細胞への分化を誘導する最近の取り組みは、BMP4を含む成長因子の組み合わせを用いた後方原始線条の誘導における分化の第1工程に向けられていた。BMP4を含めることは、Wnt3aおよびBMP4の勾配が、マウス原始線条の前後軸をパターン形成するという証拠によって正当化される。しかし、初期の中胚葉パターン形成に対する最近の発生研究は、我々にこの原理を再検討させた。第1に、後方原始線条を起源とする細胞は、側板中胚葉を生じ、腎臓に派生するIMではない(図8a)。第2に、原始線条からの中胚葉前駆体の遊走のタイミングが、前後軸に沿った中胚葉パターン形成を決定する。したがって、より前方中胚葉側の前駆細胞が、後方中胚葉のそれらよりも早期に原始線条から遊走する。したがって本発明者らは、後方IMの胚起源は後方原始線条の細胞ではなく、後期段階原始線条の細胞であり、原始線条に沿った前後方向の位置および原始線条からの遊走のタイミングの両方を定義する発生経路を正確に再現することがPSCから後方IMへの分化を最適化するであろうという仮説をたてた。

【0039】

この仮説を試験するため、本発明者らは、それ単独でまたは複数の発生成長因子および発生シグナル伝達経路の低分子阻害剤との組み合わせでhPSCをT+原始線条へと効率的に分化させることができることを本発明者らが以前に示したCHIRを様々な用量および期間用いてヒト胚性幹細胞(hESC; H9)を処理した(図1a、b)。4日間にわたる高用量CHIR(8 μM)は、T+TBX6+原始線条細胞の集団を強く誘導し維持した(図1b~d、図8b、c、d)。第4日から第7日の間のアクチビン(10 ng/mL)を用いたその後の処理は、約90%の効率でWT1+HOXD11+細胞を首尾よく誘導し、一方、WT1+HOXD11-細胞は、アクチビンなしで誘導された(図1e~g、図8e)。PAX2およびLHX1は、発現されず(図1f)、これにより、後期原始線条細胞のアクチビン処理が前方ではなく後方IMの細胞を生成することが確認された。さらに、短縮または延長したCHIR処理は、その後のアクチビン処理後にWT1+HOXD11+細胞を効果的に誘導せず、これによりCHIRの4日間の処理が後期原始線条およびその後の後方IMの効果的な誘導に最適であることが示された。

【0040】

実施例12

hPSCから後方中間中胚葉への分化

他のhPSC株における後方IM誘導の再現性を確認するため、本発明者らは次に、HDF-αヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)において高用量CHIRとアクチビン、BMP4、FGF2、FGF8、FGF9、IDE-1、JAG1、ノギンまたはY-27632の4日間の併用およびその後のアクチビン処理を試験した。HDF-α hiPSCとH9 ESCの間の本質的な違いから、後方IM細胞の生成を最適化するためにプロトコルを若干修正する必要があることがあった。HDF-α hiPSCは、H9 hESCのそれと同等の効率でT+TBX6+原始線条を誘導するためにより高用量のCHIR(10 μM)を必要とした(図9a)。HDF-α hiPSCをCHIR 10 μMで4日間処理し、その後にアクチビンで3日間処理したとき、WT1ではなくHOXD11が第7日に発現された(図9e)。WT1の非存在は、これらの因子がhiPSCにおいて後方IMを誘導しなかったことを示唆した。他の後方中胚葉サブタイプが本発明者らの分化プロトコルによって誘導されたかどうかを決定するため、本発明者らは、CHIR処理後の第4日にH9 hESCおよびHDF-α hiPSCを免疫染色した。hiPSCは、後方原始線条および側板中胚葉のマーカーであるFOXF1を発現したが、hESCは発現しなかった(図9b)。

【0041】

後方原始線条はBMP4シグナルの勾配によって誘導されるので、本発明者らは、HDF-α hiPSCのCHIR処理が、後方原始線条およびその後の側板中胚葉への分化を促進する内因性BM

P4の産生を誘導するという仮説をたてた。分化の第1工程においてCHIRと共にBMP4シグナルのアンタゴニストである低用量のノギン（5 ng/mL）を添加すると、第4日にTおよびTBX6を発現するがFOXF1を発現しない細胞を生成する最適レベルまでBMP4を抑制した（図9c）。アクチピンを用いたその後の分化により、80～90%の効率でWT1+HOXD11+後方IM細胞が生成された（図1b～g、図9e）。H9 hESCは、CHIRに応答して第4日にFOXF1を発現しなかったが、低濃度のBMP4（1 ng/mL）の添加は、本発明者らがhiPSC株において観察したのと同様に、第4日のFOXF1発現および第7日のWT1発現の抑制をもたらした（図9d）。まとめると、これらの結果は、後方IM誘導の効果が、hPSCにおける原始線条段階でのBMP4シグナルの存在に対して非常に敏感であることを実証した。それらの内因性BMP4産生に基づく個々の細胞株におけるプロトコルの最適化は、後方IMの生成効率を最大化した。

10

【0042】

実施例13

多分化能ネフロン前駆細胞の誘導

WT1+HOXD11+後方IM細胞を後腎間葉のNPCに分化させるため、本発明者らは、第7日にこれらを、本発明者らが以前にSIX2+細胞を誘導することを示した様々な用量のFGF9（5～200 ng/mL）で処理した。低用量のFGF9（10 ng/mL）は、処理から1～2日以内に90%の効率でSIX2+細胞を誘導するのに十分であった（図2a、b）。これらのSIX2+細胞は、免疫細胞化学およびフローサイトメトリーによって評価されたように、SALL1、WT1、PAX2およびEYA1を含む後腎間葉のNPCの他の重要なマーカーを共発現した（図2b～d）。したがって本発明者らは、これらのSIX2+SALL1+WT1+PAX2+細胞を推定NPCとみなした。本発明者らは高度に特異的な抗体を有していなかったためOSR1発現を免疫染色によりアッセイすることができなかったが、本発明者らは、定量リアルタイムPCRにより第7日（後方IM）という早期から第9日（NPC）まで継続的に高レベルのOSR1転写物を検出することができた（図2e）。これらの細胞におけるSIX2発現は、FGF9に継続的に暴露することにより、少なくとも1週間持続させることができた（図2f、g）。

20

【0043】

実施例14

ネフロン前駆細胞への分化および後腎胞の自然形成

継続的なFGF9処理においても、本発明者らは、分化第10日から第14日の間に、NPCの一部がSIX2発現を自然に下方調節し、後腎胞を連想させるPAX8+LHX1+細胞の円形の分極したクラスターに分化したことを観察した（図2f、g、図10a）。第10日にFGF9を取り除くと、これらの後腎胞様クラスターは、インビボでのネフロン形成のプロセスのように、尿細管構造体へと拡張および伸長し始めた（図10b）。伸長した構造体の免疫細胞化学は、それらが、近位尿細管および蝸足細胞を連想させる、それぞれ、ロータス・テトラゴノロバス レクチン（LTL）+ N-カドヘリン（CDH2）+ およびネフリン（NPHS1）+ ポドカリキシン（PODXL）+ 細胞を含んでいたことを明らかにした（図10c）。したがって、第10日以降の外的刺激の非存在下で、hPSC由来NPCは本質的に、ネフロンの早期段階の上皮構造体に分化するようプログラムされる。

30

【0044】

上皮構造体の形成が3D培養条件によって促進され得るかどうかを試験するため、FGF9を取り除いた第10日に、本発明者らは、NPCを、超低接着性、丸底96ウェルプレートに再プレートティングし、それらを1週間培養した。NPCは、懸濁培養下で、96ウェルプレートあたり1つの3D球状凝集体を形成した。第16日における凝集体のホールマウント染色は、LTL+尿細管およびNPHS1+PODXL+WT1+細胞のクラスターの存在を明らかにした（図10g、h）。以前の報告とは異なり、3D下でNPCをWnt4発現NIH3T3マウス胚性線維芽細胞または尿管芽細胞株と共培養しても、オルガノイド中のLTL+尿細管は有意に増加しなかった（図10d～f）。同様に、6つの成長因子（BMP7、HGF、IGF-1、JAG1、WNT4およびマウスWnt9b）または3つの低分子（CHIR、IWR-1、SB431542）の添加は、LTL+尿細管の数を有意に増加させなかった（図10e）。これらの結果は、一過的なシグナル活性化のより正確な再現の必要性を示唆した。

40

50

【0045】

実施例15

ネフロン構造体への自然形態形成

本発明者らは、2Dおよび3Dの両培養下でSIX2+ NPCからPAX8+LHX1+後腎胞および初期ネフロン上皮への自然分化を観察したが、このプロセスの効率は、比較的低かった。マウス腎臓形成の間に、尿管芽によって分泌されるWnt9bは、ネフロン前駆体におけるWnt4の上方調節を通じて間葉上皮転換を起こす後腎帽子状間葉を誘導し、誘導性のWntシグナルはその後、おそらくDkk1によって、後腎胞形成の間に抑制される。この誘導は、GSK-3 β 阻害剤BI0による単離されたマウス後腎間葉またはFACS選別されたSIX2+細胞の一過的処理によって、エキスビボまたはインビトロで模倣することができる。したがって本発明者らは、NPCにおけるWntシグナルの持続的ではなく一過的な活性化を通じて後腎胞生成の効率を改善することを試みた。2D培養下でのCHIR（図11a、b）を含む成長因子および低分子の体系的スクリーニングを通じて、本発明者らは、第9日から2日間の低用量CHIR（3 μ M）を用いてNPCを処理しつつ、同時に外因性FGF9シグナルを維持する（第7日～第14日）ことが、SIX2を下方調節し、PAX8およびLHX1を共発現する細胞の数を顕著に増加させることを見出した（図3a～c、図11c）。フローサイトメトリーによる定量は、分化した細胞の約75.9%がPAX8+LHX1+であったことを明らかにした（図3d）。PAX8+LHX1+細胞は、形態学的にインビボの後腎胞に類似するラミニンが結合し、分極した円形のクラスターを形成した（図3e）。この細胞はまた、後腎胞の別のマーカーであるHNF1 β およびBRN1を発現しており、これによりそれらが後腎胞であることが示唆された（図3e）。第9日からの3D培養において、CHIRおよびFGF9を用いた同じ処理は、同様の構造体を誘導し、PAX8+LHX1+LAM-前尿細管凝集体およびPAX8+LHX1+LAM+後腎胞が、それぞれ、第11日および第14日に現れ、時間と共に大きく成長した（図3f、g）。

10

20

【0046】

実施例16

ネフロン前駆細胞からの前尿細管凝集体および後腎胞の誘導

分化第21日までに、後腎胞は、追加の因子なしで、伸長した上皮ネフロン構造体を自然に形成した（図4a～c）。これらの構造体は、糸球体蛸足細胞（NPHS1+PODXL+）、近位尿細管（LTL+CDH2+）およびヘンレのループ／遠位尿細管（E-カドヘリン（CDH1）+ウロモジュリン（UMOD）+BRN1+）を含む連続的な配置でネフロンのセグメントマーカーを発現した（図4c～e）。ネフロン様構造体は、本発明者らの以前のプロトコルのそれよりも>20倍高い効率で、分化第21日までに生成し（図4f）²⁰、少なくとも第56日まで維持できた。後腎胞からの、尿管芽由来であり後腎間葉由来でない集合管（CDH1+ドリコス・ビフロラス（*Dolichos biflorus*）凝集素（DBA）+）構造体の伸長は見られず、これにより、本発明者らの分化プロトコルが後腎間葉のNPCの生成に関して特異的であることが確認された。

30

【0047】

実施例17

2D培養下での自己編成的ネフロン形成、3D培養下でのインビトロ腎臓オルガノイドの生成

次に、本発明者らは、3D培養環境が、内腔を有する尿細管を含むより組織化されたネフロン構造体の形成を促進することができるかどうかを調査した。本発明者らは、NPC、前尿細管凝集体および後腎胞に対応するそれぞれ第9、11および14日の2D培養された細胞を、3D懸濁培養物中に再プレーティングし、2D時と同じプロトコルを適用した（図4a）。第9日培養物の再プレーティングは、最大のネフロン様構造体の誘導を示した。分化第21日から第35日までのオルガノイドのホールマウント免疫染色は、糸球体から遠位尿細管までのネフロンセグメントの特徴を示す多数の連続するネフロン様構造体を明らかにした（図5a～c）。蛸足細胞様細胞（NPHS1+PODXL+WT1+）のクラスターは、ボウマン嚢様構造体に囲まれ、近位尿細管（LTL+AQP1+）、ヘンレの下行脚（CDH1+AQP1+）、ヘンレの太い上行脚（CDH1+UMOD+）および遠位曲尿細管（CDH1+UMOD-）のマーカーがインビボのネフロンと同じ順で発現された尿細管構造体に接続されていた（図5d）。SIX2発現は、3D腎臓オルガ

40

50

ノイドで見られず、これによりNPCがネフロン上皮に完全に分化したことが示唆された。さらに、未成熟ネフロン尿細管において一過的に発現される別のNPCマーカであるSALL1の発現も、ネフロン様構造体において検出されず、これによりこれらの構造体が以前の報告におけるそれらよりも成熟したものであることが示された。ネフロン様構造体の間に間質コンパートメントを含むこの非上皮細胞の特徴づけは、これらの細胞が、後腎間質前駆細胞マーカFOXD1、内皮マーカであるエンドムチンおよび線維芽細胞マーカである α -平滑筋アクチンについて陰性であることを明らかにし、これによりこれらの細胞型がこのオルガノイド内の主要な細胞集団を構成していないことが示された（データ示さず）。

【0048】

実施例18

3D培養下での自己編成的ネフロン形成

分化第21日の腎臓オルガノイドの電子顕微鏡は、成熟した腎臓上皮の特徴を示す微細構造的特徴を明らかにした。足突起に類似する構造体が、蛸足細胞様細胞の表面上で確認され、これらはボウマン嚢を連想させる細胞の層によって包まれていた（図5e、f、上パネル）。尿細管構造体は、腎臓の尿細管と同様の個別の内腔および上皮の密着結合を示し、尿細管のサブセットは、近位尿細管細胞を特徴づける特徴である刷子縁様構造を有するミトコンドリアが豊富な細胞を含んでいた（図5e、f、下パネル）。これらの知見は、懸濁培養下でのNPCの分化が3D腎臓オルガノイドの形成およびネフロンを模倣する連続的かつ逐次的な配置の個別の内腔を有する組織化された多コンポーネントのネフロン様構造体を生じることを実証している。

【0049】

実施例19

オルガノイドを用いた腎臓発生および毒性のモデル化

hPSC由来後腎胞がより成熟したネフロン構造体を形成するのに追加の外部化合物を必要としないという観察は、後腎胞が形成された後にネフロン形成のシグナルが内因的に活性化されることを示した。その異なるセグメントへのネフロンのパターン形成は、発生時に後腎胞段階で始まるので、本発明者らは、発生上のパターン形成がこれらの内因性シグナルの化学的調整によって模倣され得るという仮説をたてた。分化第14日から第21日までのノッチシグナル阻害剤DAPTの添加は、ネフロンの近位パターン形成にノッチシグナルが関与するという以前の研究と同様、2Dおよび3Dの両培養下で近位尿細管形成の顕著な抑制をもたらした（図6a、b、図12a～c）。

【0050】

実施例20

腎臓オルガノイドにおける腎臓発生および損傷のモデル化

薬物の腎毒性は、入院患者における急性腎損傷の大きな原因である。現在、インビトロで腎毒性をアッセイするための患者特異的なモデルは存在しない。インビトロで腎損傷および毒性を研究するために本発明者らのオルガノイドを使用することができるかどうかを試験するため、本発明者らは、分化第21日後の3D hESC由来腎臓オルガノイドを、近位尿細管毒性が十分に確認されている広く使用されている抗生物質であるゲンタマイシン（5 mg/mL）で48時間、または近位および遠位尿細管毒性を有する抗癌薬であるシスプラチン（5 μ M）で24時間処理した。次いでオルガノイドを固定し、そして近位および遠位尿細管を同定するためのそれぞれLTLおよびE-カドヘリンと共に、急性腎損傷後に近位尿細管において高度に上方調節されるバイオマーカーである腎損傷分子-1（KIM-1）について免疫染色した。

【0051】

ゲンタマイシン処理オルガノイドのホールマウントおよび凍結切片の両方の染色は、LTL+尿細管の内腔表面における明確なKIM-1発現を示し、しかしE-カドヘリン+尿細管においては示さず、リアルタイムPCRは、ゲンタマイシンによる用量依存的な様式のKIM-1上方調節を示し（図6c、d、e、Fig.13a、b）、これによりゲンタマイシンがオルガノイドの近位

10

20

30

40

50

尿細管に損傷を与えたことが示された。さらに、シスプラチンは、LTL+尿細管においてKIM-1を有意に上方調節し、およびE-カドヘリン発現を抑制し（図6c）、これにより近位および遠位尿細管毒性が示された。未処理オルガノイドにおいてはLTL+またはE-カドヘリン+尿細管のいずれにおいてもKIM-1発現が観察されなかった。全体的な毒性効果とネフロンセグメント特異的な損傷を区別するため、オルガノイドを、DNA損傷のマーカである γ H2AXについて免疫染色した（図6f）。5 μ Mの用量のシスプラチンは、LTL+尿細管において γ H2AX発現を上方調節したが、PODXL+蝸足細胞においてはそうならず、より高用量のシスプラチン（50 μ M）は、より全体的な細胞毒性に相当するより広範な γ H2AX発現をもたらした。これらの知見は、インビトロで薬物および他の化合物の腎毒性を試験するために使用され得る毒物腎損傷の患者特異的なモデルとしての本発明者らの3D腎臓オルガノイドシステムの有用性を示している。

10

【0052】

実施例21

考察

本発明者らは、誘導分化によりhPSCからセグメントパターン形成したネフロン構造体の作製を報告する。本発明者らのプロトコルは、2Dおよび3Dの両方の培養下で後腎胞を自然に形成し、その後、ネフロンのそれと同様の連続的で秩序のある配置で糸球体、近位尿細管、ヘンレのループおよび遠位尿細管を含む自立組織化ネフロン様構造体に分化するNPCを効率的に誘導する。本発明者らの知る限り、以前の研究で、hPSCを成熟した連続的な秩序のあるセグメントを有するネフロン構造体に変換したものはない。参考文献18は、20%の効率で、すべての上皮要素と共に孤立した尿細管構造体を含むが連続的なネフロン構造体を含まない3D凝集体を形成するSIX2+細胞を生成し、そのプロトコルは、後腎間葉および尿管芽の両系統の細胞を生成し、これらは、特異性の欠如を示唆している。比較すると、本発明者らの方法は、90%の効率でSIX2+SALL1+WT1+PAX2+ NPCを生成し、その細胞は、検出可能な尿管芽派生体を含まず後腎間葉のすべての主要な上皮派生体を含むネフロン構造体を自然に生じる。本発明者らのプロトコルにおける後方IMからのSIX2+細胞の誘導は、参考文献18における20倍高い濃度と比較して、ごく低用量のFGF9（10 ng/mL）しか必要とせず、このことは、WT1+HOXD11+後方IM細胞がFGF9に応答するよう刺激され、NPCに分化することを示唆している。Taguchiらは、体軸幹細胞および後方IMの標的化が後腎間葉のNPCの誘導を容易にし得るという考え方を提案した。胚様体培養系に基づく彼らのプロトコルは、各工程でより多くの中間工程および成長因子を必要とし、細管形成を起こすようNPCを誘導するためにマウスの胚脊髄を使用した。加えて、尿細管構造体におけるSALL1の持続的発現は、それらが依然としてネフロン発生の未成熟段階にあることを示した。本発明者らの後方IMおよびNPCを生成するプロトコルは、2D単層培養、少ない工程、少ない化合物を使用し、完全に化学的に定義されており、より高速である。本発明者らのプロトコルと以前のものの間の鍵となる違いは、本発明者らのストラテジーは、後方原始線条がIMではなく側板中胚葉を生じることを示す発生研究に基づき、後方原始線条ではなく後期段階中間原始線条を誘導することである。（CHIRの用量およびBMP4の抑制による）原始線条内の適当な前後方向の位置および（CHIR処理の期間による）原始線条からの細胞遊走のタイミングを正確に定義することによって、本発明者らは、NPCを生じ得る正確な前駆体集団を生成することができた。予想された通り、BMP4の添加による原始線条の後方化（posteriorization）は、hPSCをFOXF1+側板中胚葉に分化させる。最後に、本発明者らは、プロトコルの微調整がhESCおよびhiPSCの両系統における誘導分化の効率を最適化することを示している。内因性BMP4シグナルのレベルのばらつきは、hiPSC系統を後方IMに分化させる本発明者らの能力に大きく影響したが、これは、アンタゴニストであるノギンの添加によりBMP4レベルを調節することによって対処することができた。

20

30

40

【0053】

hPSCから他の系統へと分化させる以前の研究において示されたように、本発明者らは、インビトロでの重要な発生段階の精密な再現が分化効率を向上させ、インビボ対応物に非常に綿密に類似する細胞を生成することを見出している。本発明者らのhPSC由来NPCは、

50

後腎間葉のマーカーのすべてを発現し、後腎胞およびネフロンに自然に分化する固有の能力を有する。本発明者らの系における尿管芽および血管前駆体の非存在は、それぞれ、集合管および糸球体毛細管の生成を回避するが、このNPC由来後腎胞は、2Dおよび3Dの両方の背景の下でこれらの要素を伴わずにネフロンに自立的に組織化する。

【0054】

自立的に組織化したネフロンを含む3D腎臓オルガノイドを生成する能力は、腎臓発生、疾患および損傷の研究ならびに細胞補充療法の研究を促進するであろう。同様のオルガノイド系は、脳および胃の症状のモデル化に関して良好な結果を示している。ノッチ阻害が近位尿細管分化を抑制することを示す本発明者らのデータは、現時点でそのモデルが存在しないヒト腎臓発生のメカニズムの研究における本発明者らの系の有用性を確認するものである。ゲンタマイシンおよびシスプラチンを用いて、本発明者らはまた、オルガノイド内のネフロンの主要な上皮要素の存在が複数のネフロンセグメントに対する毒性薬物効果についてのスクリーニングをいかに実現するかを示した。ヒトにおける薬物感受性には個体ごとのばらつきがあるので、ヒトiPSCからの腎臓オルガノイドの生成は、患者特異的な様式での薬物試験を実現するであろう。

【0055】

実施例22

ReproFF2を用いたフィーダーフリー培養下でのhPSCの維持

本明細書に記載されるすべての維持培養実験は、ReproFF2および1% LDEVフリーhESC適合Geltrexでコーティングされた6ウェルプレートを使用する。

【0056】

1) hPSCを継代する前に、細胞の状態および自然分化の程度をチェックする。健常な未分化のhPSCは、境界が明瞭な円形のコロニー形態を示す。コロニーが約80%コンフルエントである場合に次の工程に進む。フィーダー培養で成長させた場合と異なり、いくつかの結合したコロニーが観察されるのが通常である。

【0057】

分化した細胞が観察されたら、これらの細胞を吸引により取り除く。これらの分化した細胞は通常、各コロニーのサイズが大きくなりすぎた場合にそのコロニーの中心で見られる。しかし、一部の分化した細胞は、ときどき、コロニーの辺縁部で線維芽細胞様の形態を示す。その場合、それらの分化細胞を取り除くことは困難であり、したがって、最初から「オン・フィーダー (on feeder)」から「フィーダーフリー」への移行に再挑戦するのが良い。

【0058】

2) 目視により分化したコロニーを吸引する。小さな分化コロニーは、継代の際に自然に消失するので、大きな分化コロニーを取り除くだけで十分である。ReproFF2を吸引し、ウェルの中心から200 μ lのDissociation Solution for human ES/iPS cells (CTK溶液)を添加して、その溶液を全表面に行き渡らせるようにする。細胞を37°Cのインキュベーター内で2分間、コロニーの縁部が丸くなり始めるまでインキュベートする。CTK溶液を吸引し、残ったCTK溶液を洗い流すために2 mLのPBSを添加する。

【0059】

細胞に長時間暴露するのは有害であり得るCTK溶液を用いた処理は慎重に行うことが重要である。長い待ちすぎると、その後にはPBSで洗浄した際にコロニーが失われるであろう。したがって、CTKへの2分間の暴露後に細胞の剥離に関して顕微鏡を用いてまたは用いずに目視検査を行うことが重要である。コロニーの縁部が丸くなり始めていることを確認したら、次の工程に進むときである。本発明者らは、CTK溶液との2分間のインキュベート以降、15秒ごとに細胞をチェックすることを推奨する。

【0060】

3) PBSを吸引し、1 mLのReproFF2を添加する。細胞スクレーパーを用いてコロニーを剥離させる。大きな凝集体が確認できなくなるまで1 mLピペットを用いてコロニーを解体する。ピペット操作は通常、(コンフルエンス度および細胞株に依存して) 3~10回行う。

【0061】

コロニーの最適サイズは、細胞株、コンフルエンス度およびフィーダーフリー培養下での継代数に依存する。コロニーの最適径は、細胞がフィーダーフリー培養に最適化されている場合、100~200 μm である。

【0062】

4) 新しいプレート室温 (20~25℃) で30分間準備する。新しいウェルからGeltrex溶液を吸引し、継代率に依存して1~1.7 mlのReproFF2を添加する (合計が2 mlとなるであろう)。

【0063】

5) 330 μl ~1 ml (1:1~1:3比) のコロニー片を新しいプレートの1つのウェルに移し、コロニーがウェル内で均等に分配されるようプレートをおだやかに振とうする。

10

【0064】

6) 細胞を、5%CO₂インキュベーターにおいて37℃で維持する。3日後および5日後に培地を交換する。細胞を7日ごとに継代する。

【0065】

実施例23

ReproFF2培地におけるフィーダーフリーhPSC培養 (工程1~6)

本発明者らのプロトコルは、乳酸脱水素酵素上昇ウイルス (LDEV) フリーhESC適合Geltrexコーティングされたプレートを用いるReproFF2培地中でのフィーダーフリーhPSC培養を使用する。本発明者らは、線維芽細胞成長因子2 (FGF2)、10 ng/mlを補充したReproFF2培地を用いて1% LDEVフリーhESC適合Geltrexでコーティングされた6ウェルプレートにおいてhPSCを維持する (工程1~6)。hPSCが最初にマウス胚性線維芽細胞 (MEF) フィーダー上で培養された場合、本発明者らは、その細胞を、ReproFF2を用いたフィーダーフリー条件下で少なくとも5回継代することを推奨する。ReproFF2中でhPSCを維持するのが過度に困難である場合、本発明者らは、1% LDEVフリーhESC適合Geltrexでコーティングされた6ウェルプレートにおいて、FGF2 (10 ng/ml) を補充したStemFit Basicを用いてhPSCを維持することを推奨する (ボックス1)。hPSCは、ReproFF2またはStemFit Basicのどちらが使用される場合も7日ごとに継代する。

20

【0066】

実施例24

分化のためのhPSCの準備 タイミング3d

すべての分化実験は、1% LDEVフリーhESC適合Geltrexでコーティングされた24ウェルプレートを使用する。

30

【0067】

7) 継代日に細胞のコンフルエンス度および自然分化度をチェックする。通常、分化した細胞はごくわずかしかな存在しないので、細胞を分化用に準備する際に分化細胞を取り除く必要はない。分化細胞が観察される場合、分化細胞を吸引し、その後の継代でコロニーを小さくする。

【0068】

コンフルエンス度が十分高くない場合、コンフルエンス度が約80%になるまで1:1比で細胞を継代する。コンフルエンス度が低いと、細胞の生存度が低くなり、開始したとしても分化が非効率的になるであろう。

40

【0069】

8) ReproFF2を吸引し、2 mlのPBSを添加する。プレートをおだやかに旋回させ、残ったReproFF2を洗い流す。PBSを吸引し、500 μl のAccutaseを添加する。細胞を37℃および5%CO₂のインキュベーター内で10分間インキュベートする。細胞の剥離を促進するようプレートをタップする。さらに5分間インキュベートする。

【0070】

9) 合計15分間のインキュベート後、細胞凝集体が確認できなくなるまで1 mlピペットを用いて細胞を慎重に剥離および分離する。500 μl ReproFF2を添加することによって15

50

mlチューブを準備する。

【0071】

10) 分離させた細胞を、500 μ l ReproFF2で満たした15 mlチューブに収集する。細胞の計数のために15 mlチューブから20 μ lをCellometer Counting Chamberに取り出す。

【0072】

11) チューブを室温で4分間、300 x gで遠心分離する。チューブを遠心分離している間に、Cellometerを用いて細胞数を計数する。培地を吸引し、細胞を10,000細胞/ μ lとなるようReproFF2中に再懸濁する。

【0073】

6ウェルプレートの1つのウェルから細胞を収集すると、通常200万~500万個の細胞が得られる。細胞が100万個よりも少ない場合、維持hPSC培養における細胞のコンフルエンス度が低すぎ、分化が開始した際に細胞の生存度が低くなっていたということであろう。

【0074】

12) 上清を吸引し、細胞を10,000細胞/ μ lとなるようReproFF2中に再懸濁する。分化実験のために、10 μ MのROCK阻害剤Y27632 (1:1000希釈)を含む十分量のReproFF2を準備する。細胞懸濁物を、44,000~86,000細胞/ml (12,000~24,000細胞/cm²)となるようY27632を含むReproFF2に移す。24ウェルプレートのウェルあたり500 μ lとなるよう細胞をプレーティングする。

【0075】

プレーティング密度は、高効率の分化を達成するために非常に重要である。異なる細胞株を使用する際には異なるプレーティング密度を試験することが肝要である。H9細胞の場合、本発明者らの実験ではおよそ20,000細胞/cm²が最良であった。HDF- α iPS細胞の場合、およそ14,000細胞/cm²が最適であった。加えて、ウェルのサイズも非常に重要である。サイズを変えたい場合、異なるプレーティング密度を試験する必要がある。

【0076】

13) 細胞を72時間、37℃の5%CO₂インキュベーター内で培養する。培地を交換する必要はない。

【0077】

分化をより早く開始させたい場合、分化を開始させる際にはほぼ50%コンフルエンスの細胞となるよう工程12においてより多くの細胞をプレーティングする必要がある。

【0078】

実施例25

分化用のhPSCの準備 (工程7~13)

細胞を継代する際、細胞を分化用にプレーティングする (工程7~13)。本発明者らは通常、6ウェルプレート中の2つのウェルを準備し、1つのウェルを分化用に、1つのウェルを継続的な継代用に使用する。プレーティング密度は、分化効率に有意に影響し、hPSCの各株は、調整を必要とする。hPSCの多能性は、未分化細胞において十分に維持される必要があり、したがって分化コロニーは、吸引により取り除かれる必要がある。分化のために、細胞を、Accutaseを用いて15分間分離させ、FGF2 10 ng/mlおよびY27632 10 μ Mを補充したReproFF2に再懸濁し、そして1% LDEVフリーhESC適合Geltrexでプレコートされた24ウェルプレートにプレーティングする。細胞がおよそ50%コンフルエンスに達するまで細胞を72時間培養する。

【0079】

実施例26

hPSCから後方中間胚葉細胞への分化 タイミング6~7d

14) 細胞のコンフルエンス度をチェックする。約50%が分化を開始するのに最良である。ReproFF2を吸引し、残ったReproFF2を洗い流すために500 μ l PBSを添加する。

【0080】

分化が開始される際のコンフルエンス度は、細胞生存率および分化効率に影響する。コンフルエンス度が50%未満である場合、さらに数時間待つことにより分化を開始するタイ

10

20

30

40

50

ミングを調節することができる。

【0081】

15) PBSを吸引し、CHIR 3~10 μ M +/- BMP4阻害剤（ノギン5~25 ng/mlまたはドルソモルフィン100~500 nM）を補充した500 μ lの分化基本培地を添加する。

【0082】

CHIRの濃度およびBMP4阻害剤の追加は、細胞株、継代回数および維持培地条件に依存する。H9の場合、ReproFF2培養において8 μ MのCHIRが最良であった。HDFの場合、10 μ MのCHIRおよび5 ng/mlノギンが最良であった。他の細胞株または他の培養培地を使用する場合、プロトコルを以下のように調節する：第1に、分化開始時に50%コンフルエンスとなるようプレーティングする細胞数を調整する。第2に、4日間のCHIR処理の間に細胞の剥離および死滅がおこらない最も高い濃度のCHIR（3~10 μ M）を見出す。第3に、プレーティングする細胞数およびCHIRの調節がSIX2+細胞の誘導に不十分だった場合、BMP4阻害剤（ノギン5~25 ng/mlまたはドルソモルフィン100~500 nM）の添加を試験する。

10

【0083】

16) 37°C、5%CO₂インキュベーター内で細胞を2日間培養する。

【0084】

17) 分化培地を吸引し、（BMP4阻害剤と共にまたはそれなしで）同じ濃度のCHIRを補充した500 μ lの新鮮な分化培地を細胞に供給する。

【0085】

18) 37°C、5%CO₂インキュベーター内で細胞を2日間培養する。

20

【0086】

19) 細胞の形態をチェックする。ゆるやかに形成された密集した細胞クラスターの存在は、次の分化処理に切り替えるのに最適な時期であることを示す（図15）。通常、96時間の分化が、最良のタイミングであるが、そのタイミングを細胞の形態に依存して調節することができる。培地を吸引し、アクチビンA 10 ng/mlを含む750 μ lの分化培地を添加する。

【0087】

この段階は、NPCへの高効率の分化を達成するために重要である。その形態を非常に注意深くチェックする。細胞が依然として均一で平坦な単層を形成している場合（疎ら過ぎである、図15）、（BMP4阻害剤と共にまたはそれなしで）同じ濃度のCHIRを含む分化培地を細胞に供給し、半日から1日待つ。細胞が、未分化のマウス胚性幹細胞に類似するドーム様の円形クラスターを形成したら（密集し過ぎている、図15）、それは多くの場合、次の工程に進むには遅すぎる。CHIRの濃度を下げて分化の最初から再挑戦する。

30

【0088】

20) 37°C、5%CO₂インキュベーター内で細胞を2~3日間培養する。細胞への供給は必要ない。SIX2+細胞の誘導が十分でない場合、3日間に代えて2日間のアクチビンA処理を試験する。

【0089】

実施例27

hPSCからNPCへの分化 タイミング1~2d

40

21) 培地を吸引し、FGF9、10 ng/mlを補充した500 μ lの基本分化培地を添加する。

【0090】

22) 37°C、5%CO₂インキュベーター内で細胞を1~2日間培養する。細胞への供給は通常必要ないが、培地が黄色になった場合は、FGF9、10 ng/mlを補充した基本分化培地を細胞に供給する。

【0091】

実施例28

ネフロン前駆細胞の誘導（工程14~22）

図15は、分化開始時の細胞形態を示している。開始時のコンフルエンス度は、分化効率に有意に影響するので、本発明者らは、最良の条件を見出すまで異なるプレーティング密

50

度を準備することを強く推奨する。第1に、残ったReproFF2（または、これを使用することが選択された場合は、StemFit）を取り除くために、細胞をPBSで1回軽く洗う。次に、CHIR99021（CHIR）3～10 μ M +/- BMP4阻害剤（ノギン5～25 ng/mlまたはドルソモルフィン100～500 nM）を用いて分化を開始させる。hPSCの各株は、CHIRの用量調節を必要とする。4日間のCHIR処理の間に細胞の剥離および死滅をもたらさない最大用量を推奨する。BMP4阻害剤の追加は、使用される細胞株および維持条件に依存する。本発明者らがReproFF2中で維持されたH9細胞を使用する際、本発明者らはCHIR 8 μ MへのBMP4阻害剤の追加を必要としない。この分化の第1工程は、通常4日間かかる。培地は、分化第2日に交換されるべきである。分化第4日に、細胞は、ゆるやかに密集したクラスターを形成する（図15）。これが、10 ng/mlのアクチビンAを用いた細胞の処理を含む分化の次の工程に進む最良の時期を示す。

10

【0092】

3日間のアクチビンA処理の後、後方中間中胚葉のマーカー、すなわちWT1およびHOXD11が陽性になる。その後、NPCを誘導するために、細胞をFGF9、10 ng/mlで2日間処理する。分化第9日に、NPCの重要なマーカーであるSIX2が陽性になる。SIX2染色は、分化が適切に誘導された場合、非常に明るい（図16a）。

【0093】

実施例29

hPSCから腎臓オルガノイドへの分化（二次元）～タイミング12d

23) 培地を吸引し、FGF9 10 ng/mlおよびCHIR 3 μ Mを含む500 μ l～1 mlの分化培地を添加する。

20

【0094】

細胞の形態をチェックする。多くの細胞が、後腎胞に類似する内腔を有する円形の分極構造を形成している場合（図15）、この工程の処理時間を2日から1日に短縮することによって調節すべきである。培地の色がすぐに黄色に変化した場合は、次の実験で培地の量を1 mlまで増やすべきである。

【0095】

24) 細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で2日間培養する。

【0096】

1日の培養後に培地の色が黄色になったら、細胞に、同じ濃度のCHIRおよびFGF9を用いた分化培地を工程23と同じ量供給する。

30

【0097】

25) 培地を吸引し、FGF9、10 ng/mlを含む750 μ l～1 mlの分化培地を添加する。

【0098】

26) 細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で2～3日間培養する。

【0099】

1日または2日の培養後に培地の色が黄色になったら、細胞に、同じ濃度のFGF9を用いた分化培地を工程25と同じ量供給する。後腎胞と類似する内腔を有する円形の分極構造が観察されたら、次の工程に進めることができる。後腎胞構造が3日以内に観察されない場合、免疫染色によってLHX1が発現されているかどうかを確認するべきである。LHX1が大部分の細胞で陽性の場合、次の工程に進めることができる。

40

【0100】

27) 培地を吸引し、いかなる成長因子も含まない500 μ lの基本分化培地を添加する。

【0101】

28) 2～3日ごとに、細胞に500～750 μ lの基本分化培地を供給する。腎臓オルガノイドは、少なくとも分化3か月目まで安定である。ネフロン構造体は、顕微鏡を用いて確認することができる（図15、図16e）。

【0102】

実施例30

hPSCから三次元腎臓オルガノイドへの分化 タイミング12～d

50

29) NPCが誘導される工程22において、三次元培養に切り替える。培地を吸引し、500 μ l PBSを添加する。残った分化培地を洗い流す。

【0103】

30) PBSを吸引し、24ウェルプレートの中の1つのウェルに300 μ l Accutaseを添加する。細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で10～15分間インキュベートする。CHIR 3 μ MおよびFGF9 10 ng/mlを補充した300 μ lの基本分化培地を含む15mlチューブを準備する。

【0104】

31) 1 mlピペットを用いて細胞を分離させ、細胞を工程30で準備した15 mlチューブに移す。Cellometerによる細胞計数のために15mlチューブから20 μ lを取り出す。

【0105】

32) 室温で4分間、300gでチューブを遠心分離する。Cellometerを用いて細胞数を計数する。

【0106】

33) 培地を吸引し、CHIR 3 μ MおよびFGF9 10 ng/mlを補充した基本分化培地に500,000細胞/mlとなるよう細胞を再懸濁する。200 μ lの分化培地中100,000細胞/ウェルを96ウェル、丸底、超低接着性プレートにプレーティングする。

【0107】

34) プレートを300 x gで15秒間遠心分離し、細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で2日間培養する。

【0108】

35) 200 μ lピペットを用いて培地を慎重に吸引し、FGF9 10 ng/mlを補充した200 μ lの基本分化培地を添加する。

【0109】

36) 顕微鏡で後腎胞様の円形構造体を確認できるようになるまで、細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で2～3日間培養する。

【0110】

37) 200 μ lピペットを用いて培地を吸引し、追加の成長因子を含まない基本分化培地を添加する。

【0111】

38) 細胞を37℃の5%CO₂インキュベーター内で少なくとも1週間培養する。2～4日ごとに85 μ lの培地を吸引し、100 μ lの基本分化培地を添加する。

【0112】

39) 培地を吸引し、200 μ lの4% PFAを添加する。プレートを室温で15～30分間インキュベートする。

【0113】

実施例31

腎臓オルガノイドの誘導（工程23～39）

このネフロン前駆細胞段階から、本発明者らは同じ分化処理を2Dまたは3Dのいずれの培養にも適用することができる。本発明者らが3D培養に切り替える場合、本発明者らは、96ウェル、丸底、超低接着性プレートを使用し、100,000細胞/ウェルをプレーティングする。通常、本発明者らは、24ウェルプレートの中の1つのウェルから200万～300万細胞を得、これは多くのオルガノイドを生成するのに十分である。2Dおよび3Dの両培養下で、本発明者らは、前尿細管凝集体（PAX8+LHX1+）を誘導するためにNPCをCHIR 3 μ MおよびFGF9 10 ng/mlで2日間処理する。その後、本発明者らは、FGF9、10 ng/ml単独に戻し、細胞を3日間培養し、それらを後腎胞（PAX8+LHX1+LAM+）に分化させる。その後、本発明者らは、成長因子を含まない基本分化培地のみを使用し、細胞は、1週間以内にセグメント化ネフロン構造体を形成する。本発明者らのプロトコルによって生成される腎臓オルガノイドは、2～3日ごとに供給することで、最大3か月間、基本分化培地中で安定である。

【0114】

40) 4% PFAを吸引し、500 μ l PBSを添加する。ウェルを穏やかに洗浄し、PBSを吸引す

10

20

30

40

50

る。

【0115】

41) 工程41を2回以上繰り返す。

【0116】

42) PBSを吸引し、150~200 μ lのブロッキング緩衝液を添加する。プレートを室温で1時間インキュベートする。

【0117】

43) ブロッキング緩衝液を吸引し、所望の一次抗体を含む150~200 μ lの抗体希釈緩衝液を添加する。プレートを4℃で一晩インキュベートする。

【0118】

ウェルの表面が抗体希釈緩衝液で完全に覆われていない場合、抗体溶液の量を150から200 μ lに増やす。ビオチニル化LTLで染色する場合、ストレプトアビジン/ビオチンブロッキングキットを使用する必要がある。

【0119】

44) プレートを室温下に置き、15分間待つ。抗体溶液を吸引し、500 μ l PBSを添加する。残った抗体を洗い流す。

【0120】

45) 500 μ l PBSによる洗浄を2回以上繰り返す。

【0121】

46) PBSを吸引し、所望の二次抗体を含む150~200 μ lの抗体希釈緩衝液を添加する。プレートを、暗い引き出しの中で、室温で1時間インキュベートする。

【0122】

47) 二次抗体含有緩衝液を吸引し、500 μ l PBSを添加する。残った抗体を洗い流す。

【0123】

48) 500 μ l PBSによる洗浄を2回以上繰り返す。

【0124】

49) PBSを吸引し、DAPI (1:5000) を含むPBSを添加する。

【0125】

50) 免疫蛍光顕微鏡下でサンプルを観察する。DAPIを洗い流す必要はない。免疫細胞化学によるSIX2+細胞の定量が必要な場合、標準的な画像ソフトウェア、例えばImageJを使用する。あるいは、免疫細胞化学の場合と同じ抗体希釈比 (1:500) を用いてSIX2+細胞についてのフローサイトメトリーを使用する。

【0126】

実施例32

エンドポイント分析 (工程40~81)

典型的に、ネフロン構造体は、2D培養下での「後腎胞段階」後の3~5日の培養後に確認できる (図15)。2D培養において、セグメント化ネフロン構造体は、蛸足細胞 (PODXL)、近位尿細管 (ロータス・テトラゴノロバス レクチン (LTL))、ヘンレのループ (カドヘリン1 (CDH1)、ウロモジュリン (UMOD)) および遠位尿細管 (CDH1) のマーカーについての標準的な免疫細胞化学によって分析することができる (工程40~51) (図16b)。3D培養において、凍結切片を標準的なプロトコルによって作製することができ、ネフロン構造体を免疫組織化学によって分析することができる (工程52~67) (図16c)。あるいは、共焦点顕微鏡による3Dネフロン構造体の観察を可能にするホールマウント染色も実施され得る (工程68~81) (図16d)。糸球体および尿細管構造は、時に、オルガノイドの表面付近の明視野画像において確認され得る (図16e)。

【0127】

実施例33

エンドポイント分析 (三次元、凍結切片) タイミング2d

51) 先端が幅広いピペット (単に先端をハサミで切断したもの) を用いて腎臓オルガノイドをエッペンドルフチューブに移す。

10

20

30

40

50

【0128】

52) 200 μ l ピペットを用いて培地を慎重に吸引し、500 μ l 4% PFA を添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0129】

53) 200 μ l ピペットを用いて4% PFA を慎重に吸引し、1 ml PBS を添加する。オルガノイドを洗浄する。

【0130】

54) 1 ml PBS による洗浄を2回以上繰り返す。

【0131】

55) ピペットを用いてPBSを慎重に吸引し、500 μ l 30% (w/w) スクロースを添加する。オルガノイドを4℃で一晩インキュベートする。

10

【0132】

56) 先端が幅広いピペットを用いてオルガノイドをクリオモルドの中心に移し、200 μ l ピペットを用いて30% スクロースを慎重に吸引する。クリオモルドの縁部の周囲をOCTコンパウンドを添加する。

【0133】

57) 液体窒素およびアセトンを用いてサンプルを凍結させる。

【0134】

58) クリオスタットを用いて凍結切片を5~10 μ m 厚に切断し、切片をガラススライド上にマウントする。

20

【0135】

59) PBSで満たした3つのコプリンジャーを用いてOCTコンパウンドを連続的に洗い流す。

【0136】

60) 疎水性ペンを用いて切片を周回させたのちに各切片に約30 μ l のブロッキング洗浄液を上乗せする。スライドを室温で1時間インキュベートする。

【0137】

ビオチニル化LTLで染色する場合、ストレプトアビジン/ビオチンブロッキングキットを使用する必要がある。

【0138】

30

61) ブロッキング緩衝液を吸引し、所望の一次抗体を含む約30 μ l の抗体希釈緩衝液を添加する。スライドを室温で1~2時間インキュベートする。

【0139】

62) 抗体希釈緩衝液を吸引し、PBSで3回洗浄する。

【0140】

63) PBSを吸引し、所望の二次抗体を含む約30 μ l の抗体希釈緩衝液を上乗せする。スライドを、暗い引き出しの中で、室温で1時間インキュベートする。

【0141】

64) 抗体希釈緩衝液を吸引し、PBSで3回洗浄する。

【0142】

40

65) カバーガラススライドおよびDAPIを含むVectashieldマウンティング培地を用いて切片を密封する。

【0143】

66) 免疫蛍光顕微鏡下でまたは共焦点顕微鏡によってサンプルを観察する。

【0144】

実施例34

エンドポイント分析（三次元、ホールマウント染色）タイミング3d

67) 先端が幅広いピペット（単に先端をハサミで切断したもの）を用いて腎臓オルガノイドをエッペンドルフチューブに移す。

【0145】

50

68) ピペットを用いて培地を慎重に吸引し、500 μ l 4%PFAを添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0146】

69) 4% PFAを吸引し、1 ml PBSを添加する。オルガノイドを洗浄する。

【0147】

70) 1 ml PBSを用いた洗浄をさらに2回繰り返す。

【0148】

71) 200 μ lピペットを用いてPBSを慎重に吸引し、200 μ lブロッキング緩衝液を添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0149】

72) 200 μ lピペットを用いてブロッキング緩衝液を慎重に吸引し、所望の一次抗体を含む200 μ lの抗体希釈緩衝液を添加する。オルガノイドを4℃で一晩インキュベートする。

【0150】

73) 200 μ lピペットを用いて抗体含有溶液を慎重に吸引し、1 ml PBSを添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0151】

74) 200 μ lピペットを用いてPBSを慎重に吸引し、1 ml PBSを添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0152】

75) 200 μ lピペットを用いてPBSを慎重に吸引し、1 ml PBSを添加する。オルガノイドを4℃で一晩インキュベートする。

【0153】

76) ピペットを用いてPBSを慎重に吸引し、所望の二次抗体を含む200 μ lの抗体希釈緩衝液を添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0154】

77) 200 μ lピペットを用いて二次抗体含有溶液を慎重に吸引し、1 ml PBSを用いてオルガノイドを3回洗浄する。

【0155】

78) 200 μ lピペットを用いてPBSを慎重に吸引し、200 μ lのDAPI (1:5000) を含むPBSを添加する。オルガノイドを室温で1時間インキュベートする。

【0156】

79) 先端が幅広いピペットを用いてオルガノイドをガラススライド上に移す。DAPI溶液を吸引し、Vectashieldおよびカバーガラススライドを用いて密封する。

【0157】

80) 共焦点顕微鏡下でサンプルを観察する。

【0158】

実施例35

シスプラチンを用いた腎毒性アッセイ タイミング2d

81) 少なくとも分化第21日後の2Dまたは3Dのいずれかの培養下の腎臓オルガノイドを準備する。

【0159】

82) シスプラチン5 μ M (1:1000希釈) または陰性対照としての滅菌水を補充した基本分化培地を準備する。3D培養または2D培養の1つのウェルに対して必要な量は、それぞれ、200 μ lまたは500 μ lである。

【0160】

アリコート中にシスプラチンの沈殿がないことを確認する。冷凍庫からアリコートを取り出した際に沈殿物が確認された場合、シスプラチンが完全に溶解するまでそのアリコートを37℃の水槽内で温める。

【0161】

83) 培地を慎重に吸引し、シスプラチン5 μ Mまたは滅菌水を補充した200 μ l (3D) また

10

20

30

40

50

は500 μ l (2D) の基本分化培地を添加する。

【0162】

腎臓オルガノイドの吸引は、尿細管に損傷を与える可能性があり、これはKIM-1発現を誘導し得る。腎臓オルガノイドを吸引しないように注意する。

【0163】

84) 細胞を37°Cの5%CO₂インキュベーター内で1日培養する。分析のためにサンプルを採取する。

【0164】

実施例36

シスプラチンを用いた腎毒性アッセイ (工程90~91)

NPCおよび腎臓オルガノイドを用いる潜在的用途は様々ある。これらの用途の1つの例として、本発明者らは、公知の腎毒性剤であるシスプラチンを用いる腎毒性アッセイを示す (図17)。腎臓オルガノイドにおいてネフロン構造体が形成されたら (第21日~)、そのオルガノイドを、腎毒性を調査したい薬剤で処理することができる。本発明者らは、公知の腎毒性剤であるシスプラチンに対する応答を実証する。本発明者らは、近位尿細管の損傷を検出するためにKIM-1染色を使用した。

【0165】

実施例37

制限

分化効率は、hPSC株に固有のばらつきによる影響を受ける。本発明者らは、2つの異なる培養培地および複数のhPSC株を用いた本発明者らの実験を反映する、異なる培養条件下で当初生育された異なる細胞株に対してプロトコルを調節する方法を明確にした。本発明者らは、それが高い分化効率を達成する上で最も単純な方法であるという理由で、H9およびReproFF2の使用を推奨する。本発明者らは、本発明者らの調節方法により、異なる環境下にある研究者が、異なる培養系および異なる細胞株を用いてNPCおよび腎臓オルガノイドを作製できるようになると考える。

【0166】

本発明者らのプロトコルの別の制限は、腎臓オルガノイドの間質領域の細胞が、ヒト腎臓サンプルにおいて検証された抗体および明確な形態学的特徴の欠如が理由で、本発明者ら自身の研究において十分に特徴づけられなかったことである。これらの細胞は、NPC段階の細胞の10~20%を占めるSIX2陰性集団由来であると考えられ、公開された研究によれば集合管細胞、周皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞または他の細胞であり得る。本発明者らの最近の結果は、オルガノイドにおいて (接続管/集合管の特徴である) CDH1+AQP2+尿細管および (周皮細胞の特徴である) PDGFR β +、 (内皮細胞の特徴である) エンドムチン+または (筋線維芽細胞の特徴である) α -SMA+間質細胞を示した (図18) が、これらの細胞のさらなる定義づけ分析が進行中である。したがって本発明者らは、我々および他の研究者によるさらなる研究が間質領域における細胞型の特徴および状態を解明することを期待する。本発明者らは、本発明のプロトコルから得られるオルガノイドシステムが、ネフロン上皮細胞と間質細胞の間の相互作用を、インタクトな器官におけるこれらの相互作用の複雑さを再現するヒトインビトロモデルシステムにおいて研究するのに適していると考えられる。そのようなことから、本発明者らは、慢性腎疾患を引き起こす根底にあるプロセスである腎臓線維症等のプロセスに関する新たな知見が見出されることを望む。

【0167】

上記の様々な方法および技術が、本発明を実施するための多く手段を提供する。当然、記載されるすべての目的または利点が、本明細書に記載される任意の特定の態様にしがたい達成され得るとは限らないことを理解されたい。したがって、例えば、当業者は、この方法が、本明細書に教示される1つの利点または複数の利点を達成または最適化する様式で実施され得るが、それによって本明細書に教示または示唆され得る他の目的または利点が達成されるとは限らないことを理解するであろう。様々な有利なおよび有利でない代替態様が、本明細書で言及されている。いくつかの好ましい態様は、1つの、別のまたはい

10

20

30

40

50

くつかの有利な特徴を個別に含み、他は、1つの、別のまたはいくつかの有利でない特徴を個別に排除し、さらに他のものは、1つの、別のまたはいくつかの有利な特徴を含むことによって存在する有利でない特徴を個別に軽減することを理解されたい。

【0168】

さらに、当業者は、異なる態様由来の様々な特徴の応用を理解するであろう。同様に、上で議論されている様々な要素、特徴および工程、ならびに各々のそのような要素、特徴または工程に対する他の既知の等価物は、本明細書に記載される原理にしたがい方法を実施するために当業者によって組み合わせられ結合され得る。様々な態様において、様々な要素、特徴および工程の中のいくつかが個別に含まれ、他が個別に除外される。

【0169】

本発明は、特定の態様および実施例の文脈で開示されているが、本発明の態様は、具体的に開示されている態様を超えて、他の代替の態様および／または使用ならびにそれらの改変物および等価物に及ぶことが当業者によって理解されるであろう。

【0170】

多くの派生物および代替要素が、本発明の態様の中に開示されている。なおさらなる派生物および代替態様も、当業者に明らかであろう。これらの派生物には、非限定的に、中間中胚葉、後腎間葉、ネフロン前駆細胞を生成するためのソース、中間中胚葉、後腎間葉、ネフロン前駆細胞を生成する方法、および本発明の教示を通じて作製される生産物の具体的用途が含まれる。本発明の様々な態様は個別に、任意のこれらの派生物または要素を含み得るまたは除外し得る。

【0171】

いくつかの態様において、本発明の特定の態様を説明するおよび特許請求するために使用される、成分の量、特性、例えば濃度、反応条件等を表す数値は、いくつかの例において、「約」という用語によって修飾されることが理解されるべきである。したがって、いくつかの態様において、詳細な説明および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは近似値であり、それは特定の態様によって得ようとする所望の特性に依存して変化し得る。いくつかの態様において、数値パラメータは、報告されている有効数字に照らしておよび通常の丸め技法を適用することによって解釈されるべきである。本発明のいくつかの態様の広範な範囲を示す数値範囲およびパラメータは近似値であるが、個々の実施例に示される数値は、実用的な程度に正確に報告されている。本発明のいくつかの態様において示される数値は、それらの各々の試験測定で見出される標準偏差から必然的に生じる一定の誤差を含み得る。

【0172】

いくつかの態様において、本発明の特定の態様を表す上で（特に添付の特許請求の範囲において）使用される「a」、「an」および「the」という用語ならびに類語は、単数および複数の両方を包含するものと解釈され得る。本明細書における値の範囲の記載は、その範囲内に含まれる各々の個別の値を個々に参照するのを省略する方法としての役割を果たすことが意図されているにすぎない。それ以外のことが本明細書に示されていない限り、各々個々の値は、それが本明細書で個別に言及されているものとして本明細書に組み入れられる。本明細書に記載されるすべての方法は、それ以外のことが本明細書に示されていない限りまたは文脈と明確に矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。任意かつすべての実施例の使用、または本明細書における特定の態様に関して提供される例示の語（例えば、「例えば（such as）」）は、本発明をより明確にすることが意図されているにすぎず、そうでなければ特許請求される本発明の範囲に対する限定を提示するものではない。本明細書のいかなる文章も、本発明の実施に必須の任意の特許請求されていない要素を示すものと解釈されるべきでない。

【0173】

本明細書に開示される本発明の択一的な要素または態様のグループは、限定を構成するものではない。各グループメンバーは、個別にまたはグループ内の他のメンバーもしくは本明細書で見出される他の要素との任意の組み合わせで参照され特許請求され得る。グ

10

20

30

40

50

【 0 1 7 4 】

10

20

【图 1-1】

a

工程 1

CHIR 3-20 μ M
4+

アクリチン 10-100 ng/ml
BMP4 0.1-100 ng/ml
FGF2 100 ng/ml
FGF8 100 ng/ml
FGF9 100 ng/ml
IDE-1 10-100 nM
JAG-1 10-100 ng/ml
ノギン 1-100 ng/ml
Y-27632 10 μ M

工程 2

アクリチン 1-100 ng/ml
BMP4 0.1-100 ng/ml
BMP7 100 ng/ml
CHIR 0.5-6 μ M
FBS 10 %
FGF2 10-100 ng/ml
FGF8 1-100 ng/ml
FGF9 5-100 ng/ml
NWR-1 10 μ M
JAG-1 10-100 ng/ml
ノギン 1-100 ng/ml
レチノイン酸 0.01-1 μ M
SB431542 10 μ M
TGF β 1-5 ng/ml

b

第0日

PSC

工程 1

OCT4
SOX2

工程 2

T
TBX6

工程 3

WT1
OSR1
HOXD11

中間胚葉

第4日

後方

第7日

段階 2

段階 1

段階 3

段階 4

段階 5

段階 6

段階 7

段階 8

段階 9

段階 10

段階 11

段階 12

段階 13

段階 14

段階 15

段階 16

段階 17

段階 18

段階 19

段階 20

段階 21

段階 22

段階 23

段階 24

段階 25

段階 26

段階 27

段階 28

段階 29

段階 30

段階 31

段階 32

段階 33

段階 34

段階 35

段階 36

段階 37

段階 38

段階 39

段階 40

段階 41

段階 42

段階 43

段階 44

段階 45

段階 46

段階 47

段階 48

段階 49

段階 50

段階 51

段階 52

段階 53

段階 54

段階 55

段階 56

段階 57

段階 58

段階 59

段階 60

段階 61

段階 62

段階 63

段階 64

段階 65

段階 66

段階 67

段階 68

段階 69

段階 70

段階 71

段階 72

段階 73

段階 74

段階 75

段階 76

段階 77

段階 78

段階 79

段階 80

段階 81

段階 82

段階 83

段階 84

段階 85

段階 86

段階 87

段階 88

段階 89

段階 90

段階 91

段階 92

段階 93

段階 94

段階 95

段階 96

段階 97

段階 98

段階 99

段階 100

段階 101

段階 102

段階 103

段階 104

段階 105

段階 106

段階 107

段階 108

段階 109

段階 110

段階 111

段階 112

段階 113

段階 114

段階 115

段階 116

段階 117

段階 118

段階 119

段階 120

段階 121

段階 122

段階 123

段階 124

段階 125

段階 126

段階 127

段階 128

段階 129

段階 130

段階 131

段階 132

段階 133

段階 134

段階 135

段階 136

段階 137

段階 138

段階 139

段階 140

段階 141

段階 142

段階 143

段階 144

段階 145

段階 146

段階 147

段階 148

段階 149

段階 150

段階 151

段階 152

段階 153

段階 154

段階 155

段階 156

段階 157

段階 158

段階 159

段階 160

段階 161

段階 162

段階 163

段階 164

段階 165

段階 166

段階 167

段階 168

段階 169

段階 170

段階 171

段階 172

段階 173

段階 174

段階 175

段階 176

段階 177

段階 178

段階 179

段階 180

段階 181

段階 182

段階 183

段階 184

段階 185

段階 186

段階 187

段階 188

段階 189

段階 190

段階 191

段階 192

段階 193

段階 194

段階 195

段階 196

段階 197

段階 198

段階 199

段階 200

段階 201

段階 202

段階 203

段階 204

段階 205

段階 206

段階 207

段階 208

段階 209

段階 210

段階 211

段階 212

段階 213

段階 214

段階 215

段階 216

段階 217

段階 218

段階 219

段階 220

段階 221

段階 222

段階 223

段階 224

段階 225

段階 226

段階 227

段階 228

段階 229

段階 230

段階 231

段階 232

段階 233

段階 234

段階 235

段階 236

段階 237

段階 238

段階 239

段階 240

段階 241

段階 242

段階 243

段階 244

段階 245

段階 246

段階 247

段階 248

段階 249

段階 250

段階 251

段階 252

段階 253

段階 254

段階 255

段階 256

段階 257

段階 258

段階 259

段階 260

段階 261

段階 262

段階 263

段階 264

段階 265

段階 266

段階 267

段階 268

段階 269

段階 270

段階 271

段階 272

段階 273

段階 274

段階 275

段階 276

段階 277

段階 278

段階 279

段階 280

段階 281

段階 282

段階 283

段階 284

段階 285

段階 286

段階 287

段階 288

段階 289

段階 290

段階 291

段階 292

段階 293

段階 294

段階 295

段階 296

段階 297

段階 298

段階 299

段階 300

段階 301

段階 302

段階 303

段階 304

段階 305

段階 306

段階 307

段階 308

段階 309

段階 310

段階 311

段階 312

段階 313

段階 314

段階 315

段階 316

段階 317

段階 318

段階 319

段階 320

段階 321

段階 322

段階 323

段階 324

段階 325

段階 326

段階 327

段階 328

段階 329

段階 330

段階 331

段階 332

段階 333

段階 334

段階 335

段階 336

段階 337

段階 338

段階 339

段階 340

段階 341

段階 342

段階 343

段階 344

段階 345

段階 346

段階 347

段階 348

段階 349

段階 350

段階 351

段階 352

段階 353

段階 354

段階 355

段階 356

段階 357

段階 358

段階 359

段階 360

段階 361

段階 362

段階 363

段階 364

段階 365

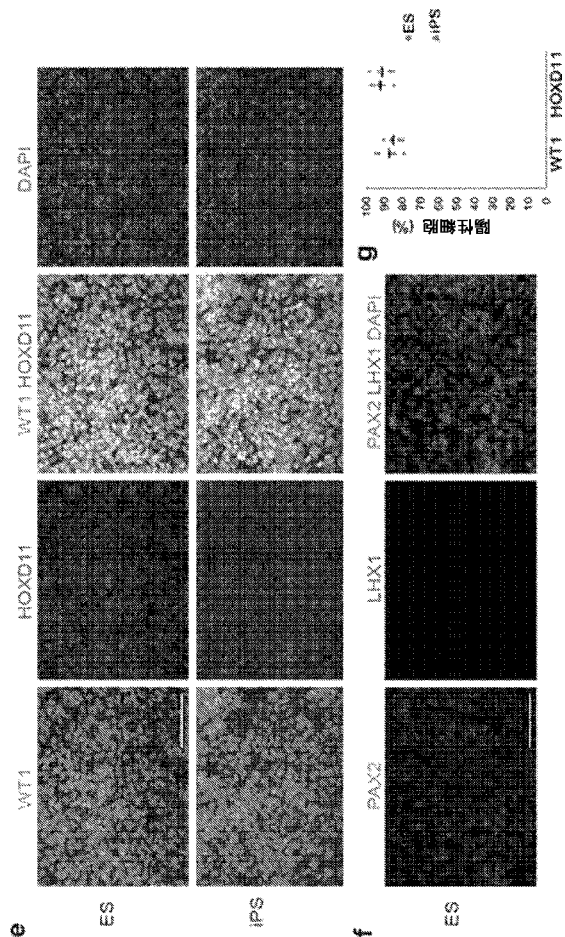
段階 366

段階 367

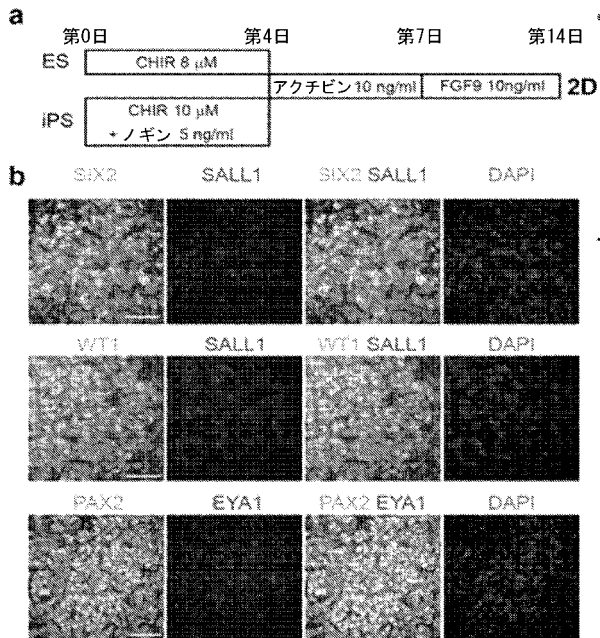
段階 368

段階 369

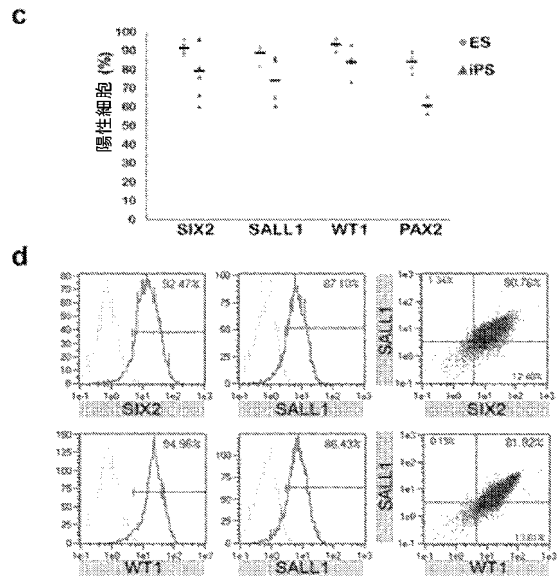
段階 370



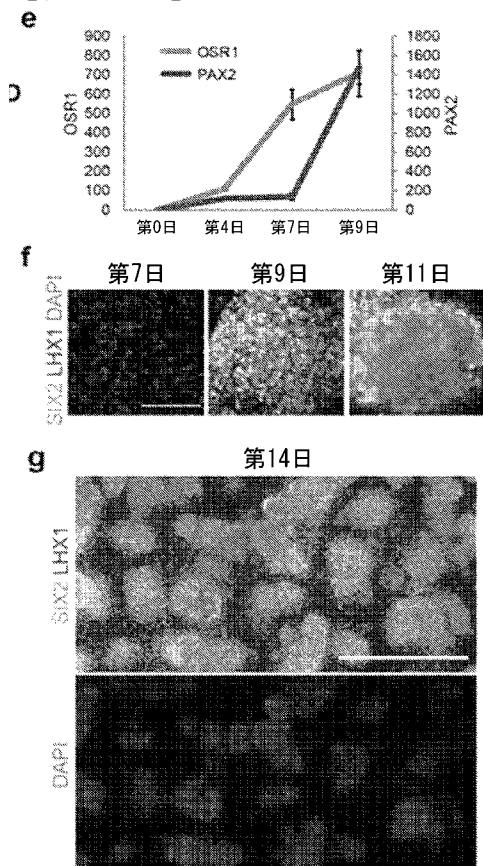
【図 2 - 1】



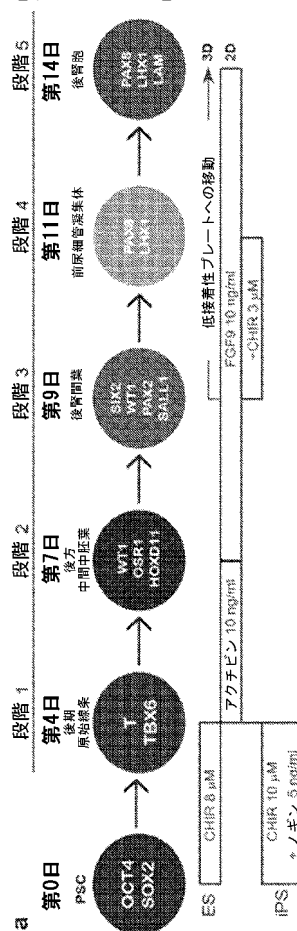
【図 2 - 2】



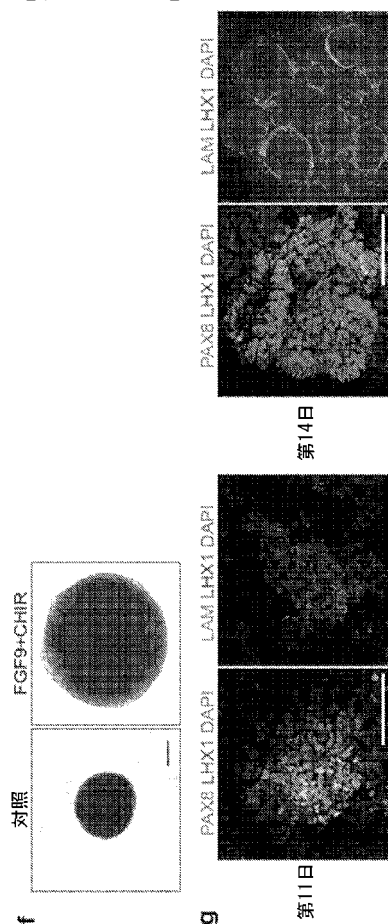
【図 2 - 3】



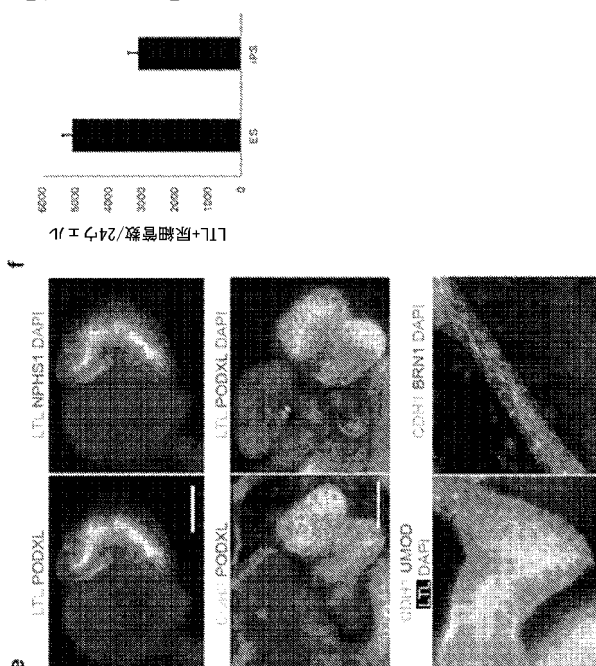
【図 3 - 1】



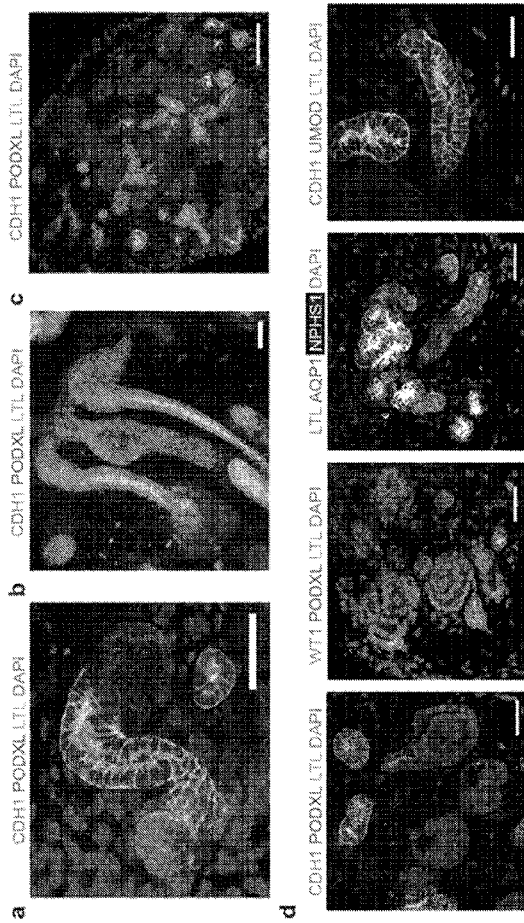
【图 3-3】



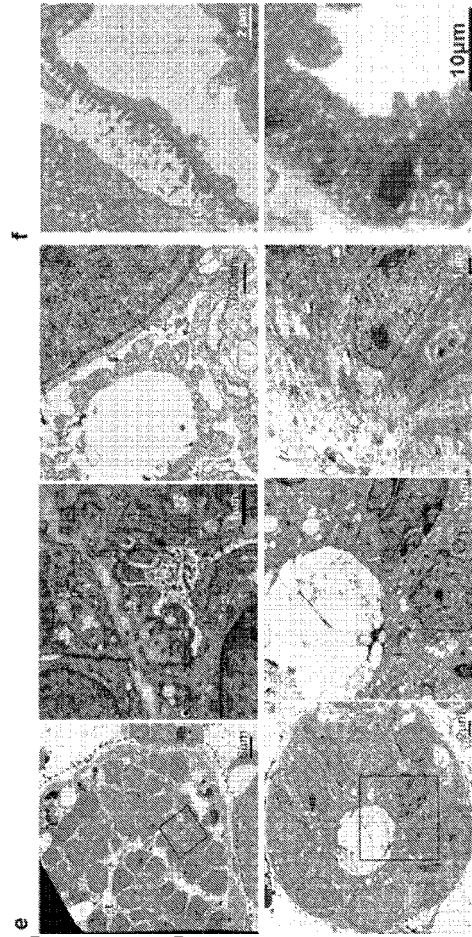
【図 4-2】



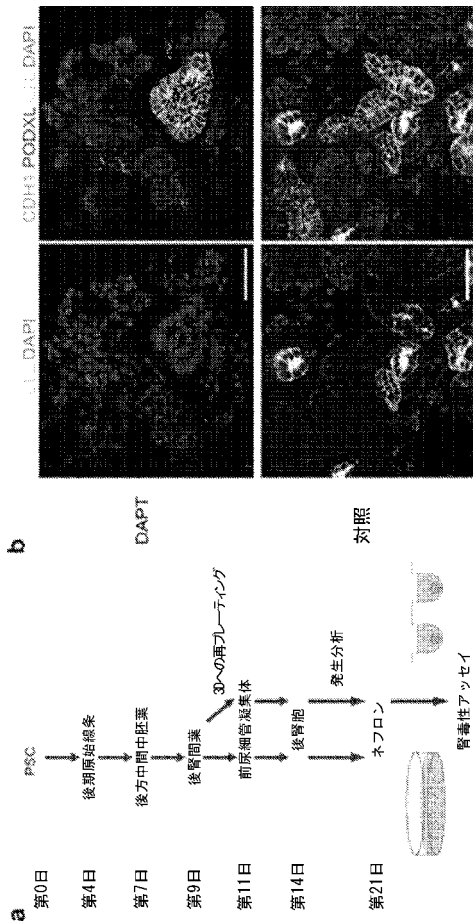
【図 5 - 1】



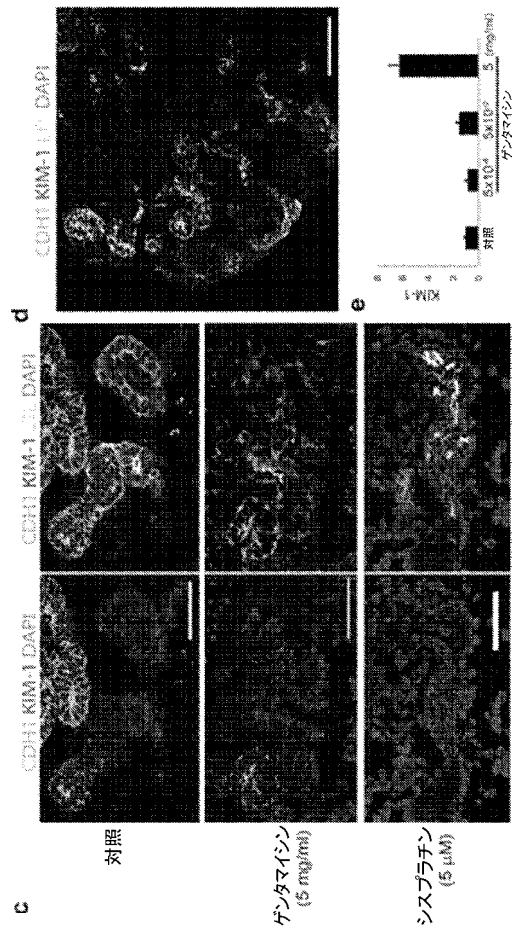
【図 5 - 2】



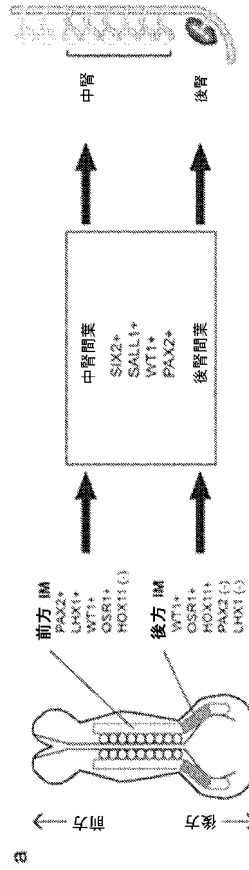
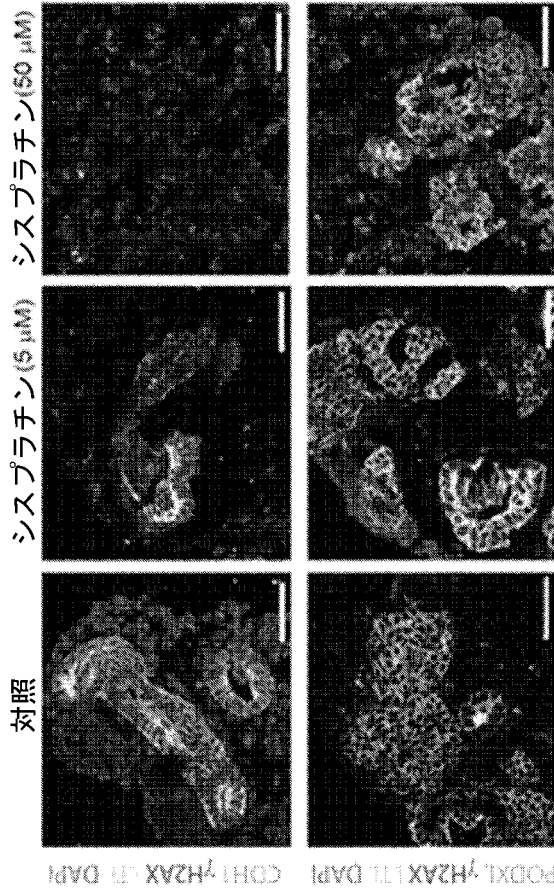
【図 6 - 1】



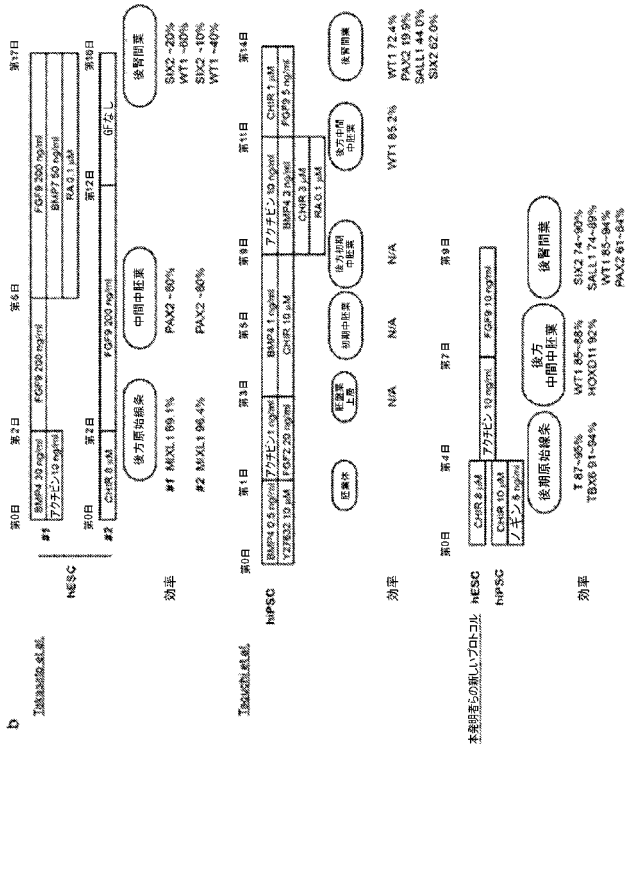
【図 6 - 2】



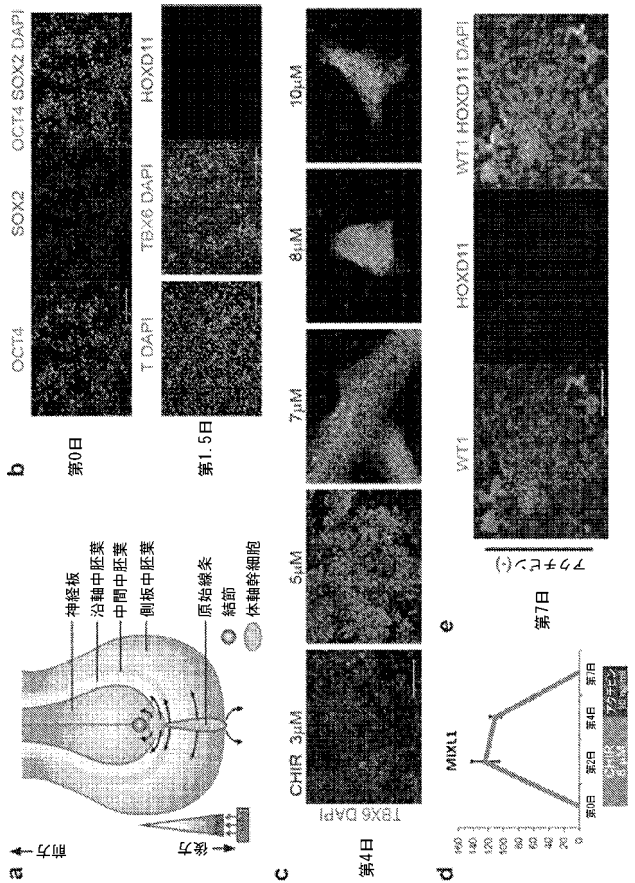
【图 7-1】



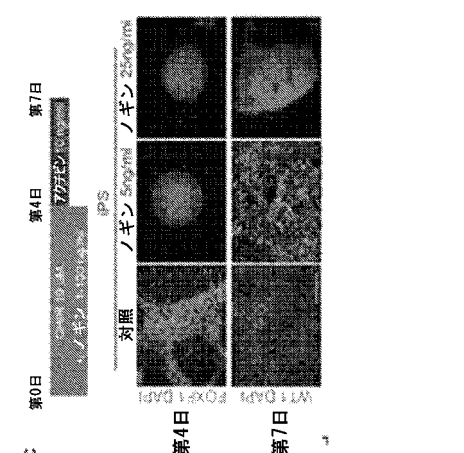
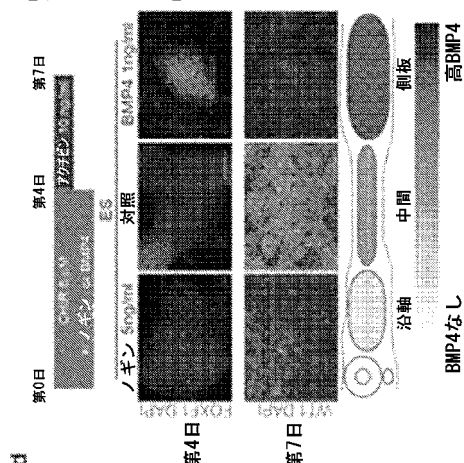
【図 8】



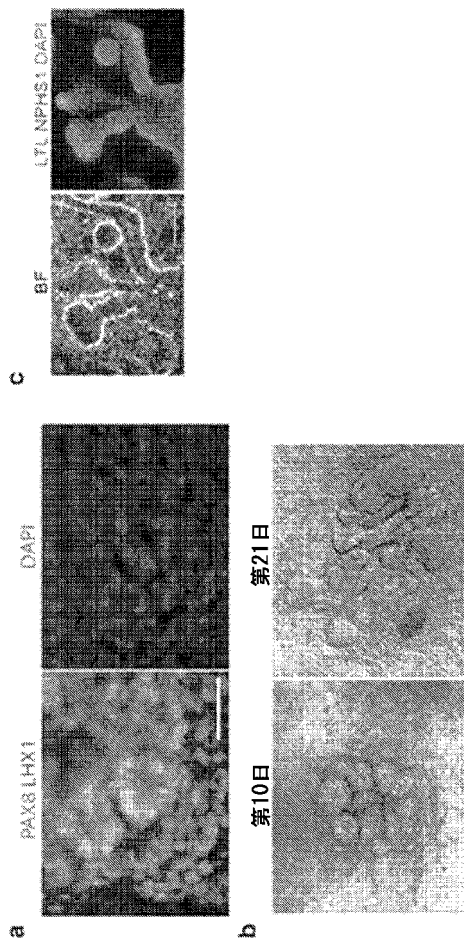
【図 8】



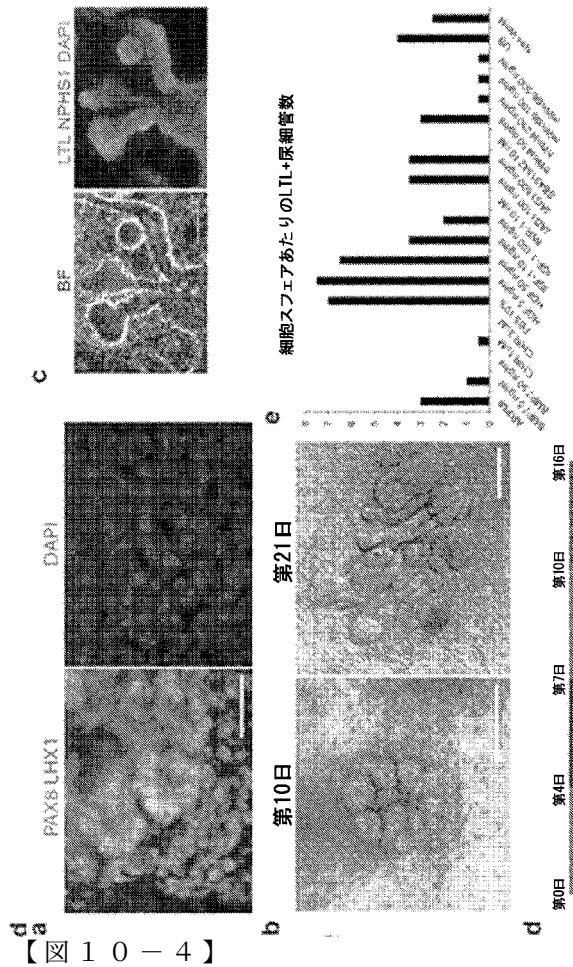
【图 9-2】



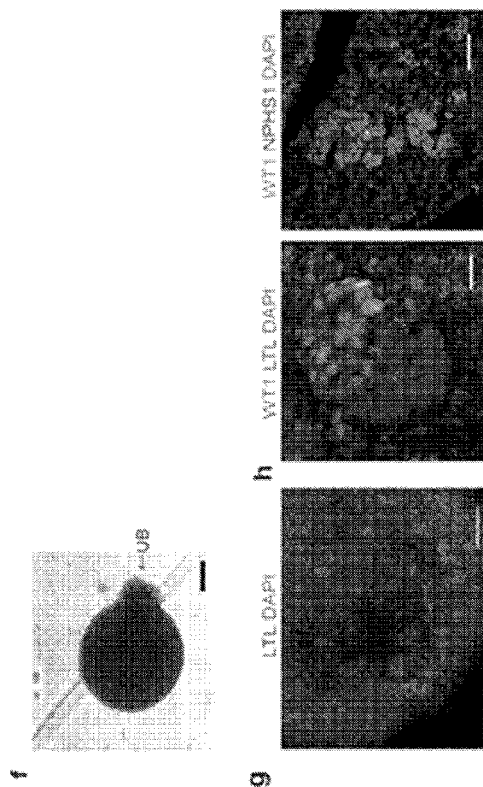
【図 10-1】



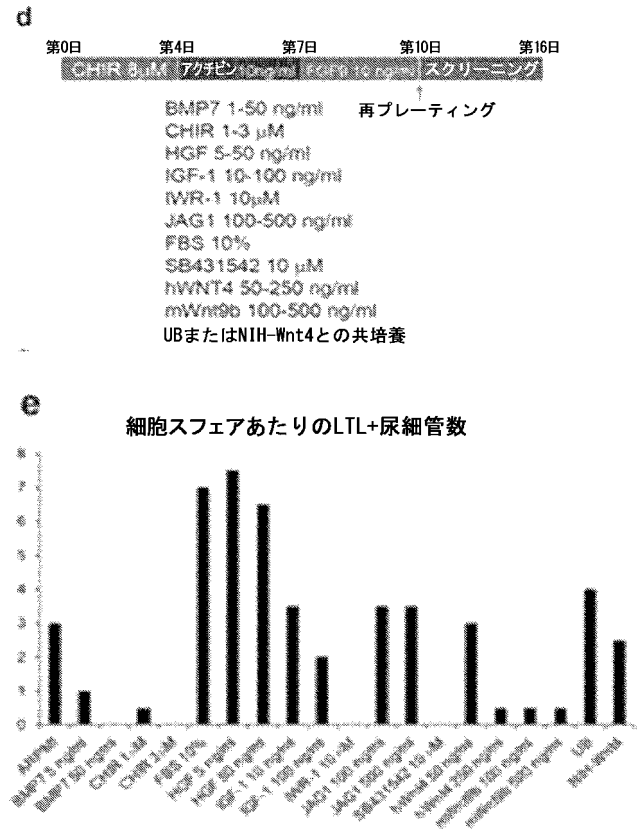
【図10-2】



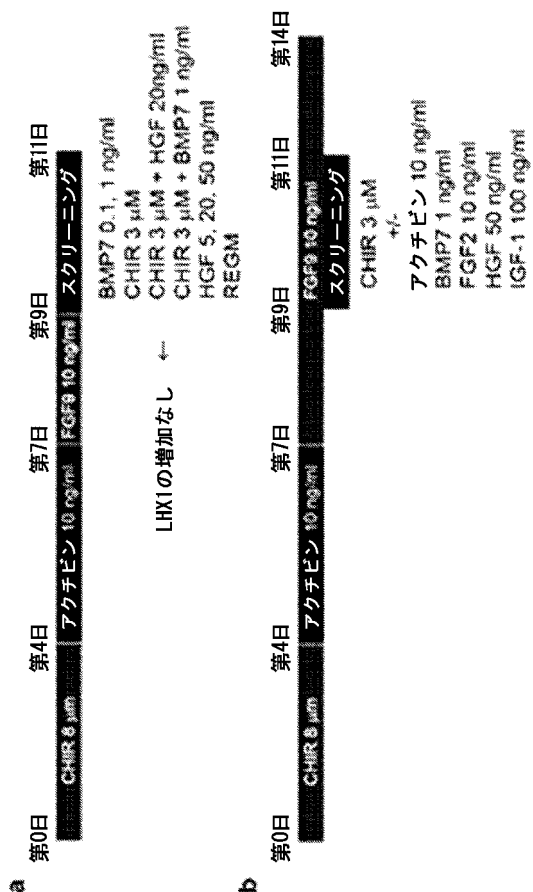
【図10-4】



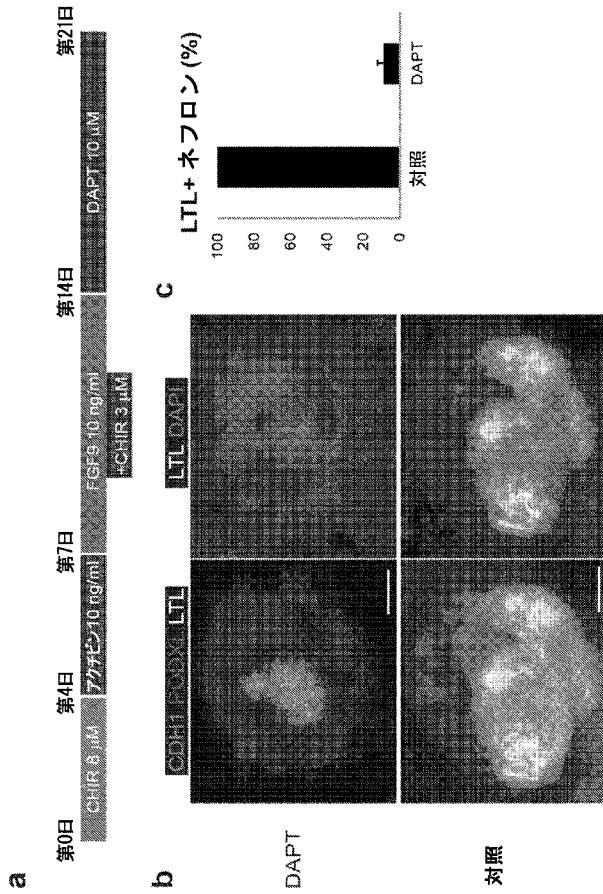
【図10-3】



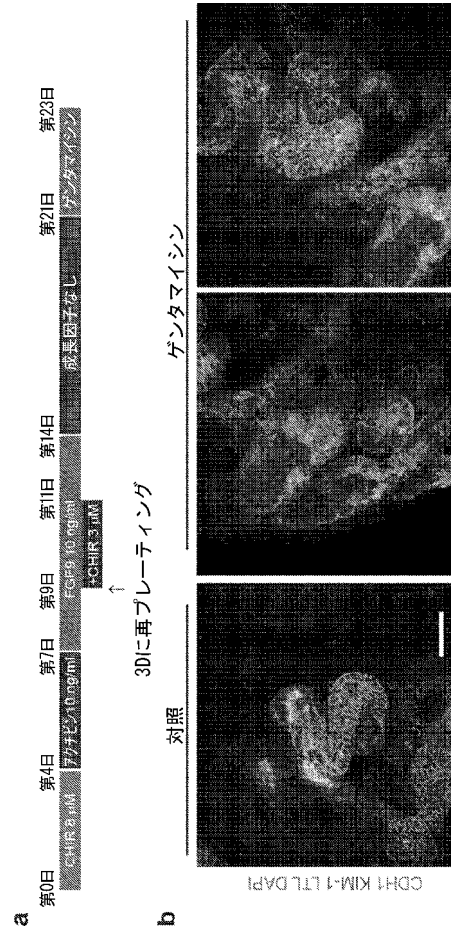
【図11】



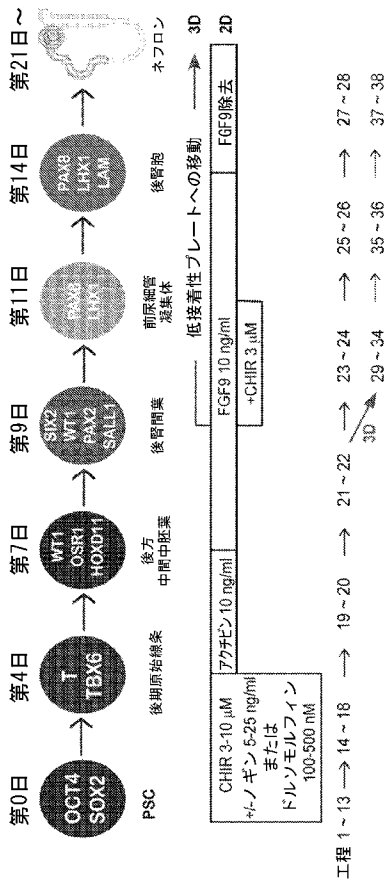
【図 1 2】



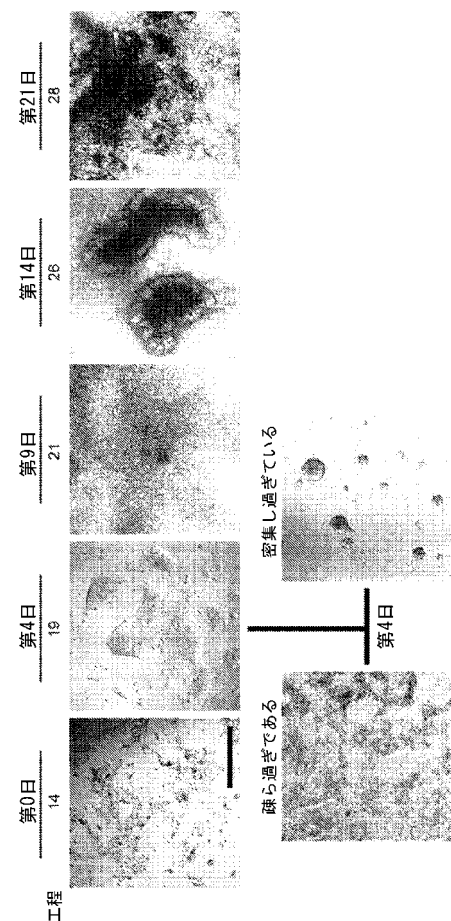
【図 1 3】



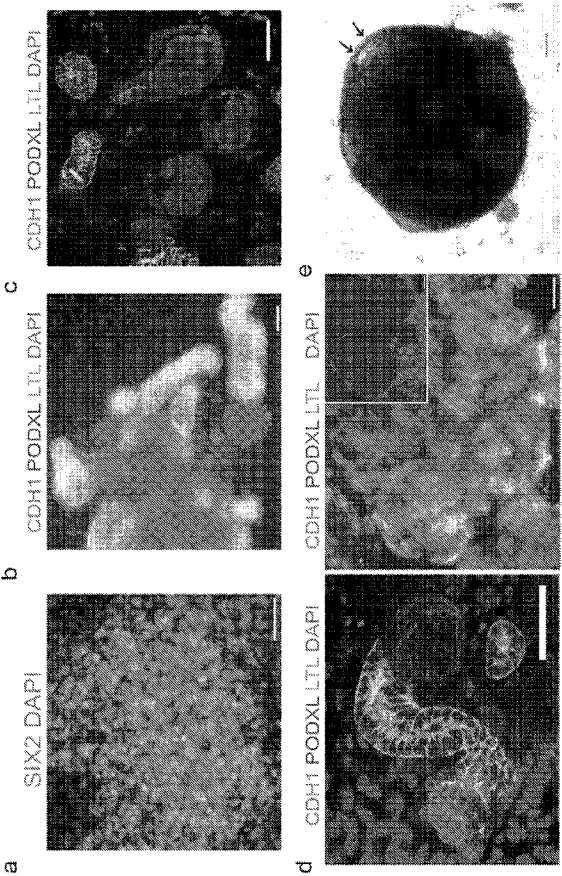
【図 1 4】



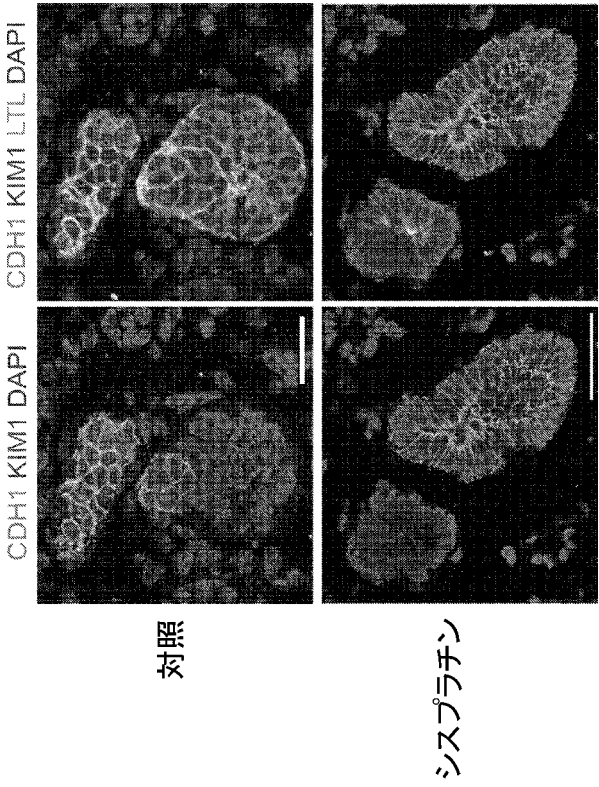
【図 1 5】



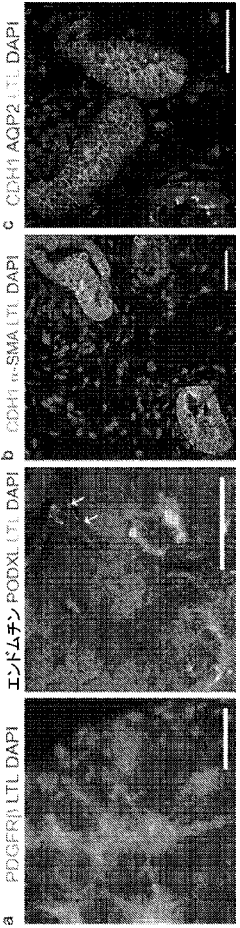
【図 16】



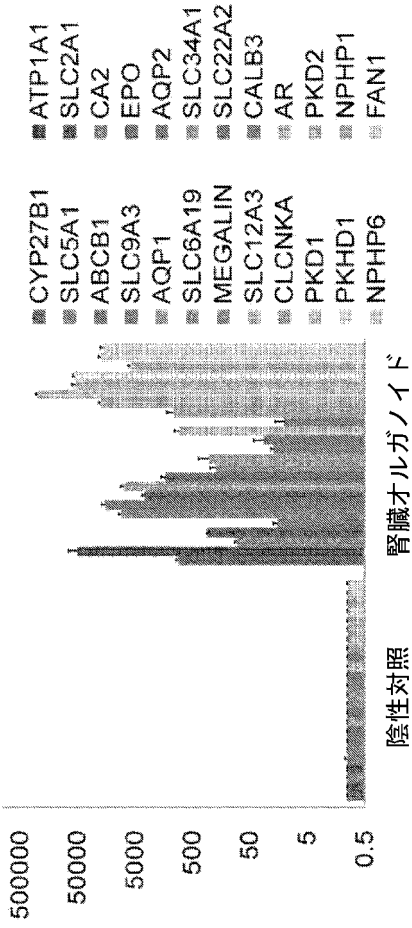
【図 17】



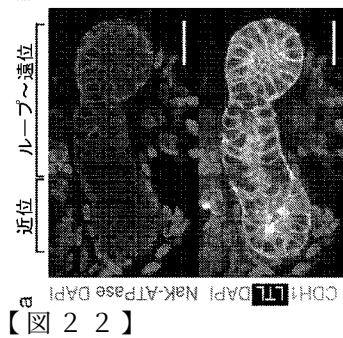
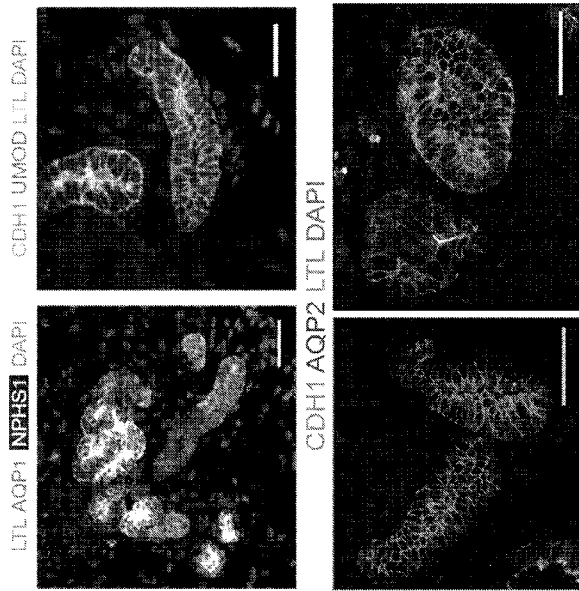
【図 18】



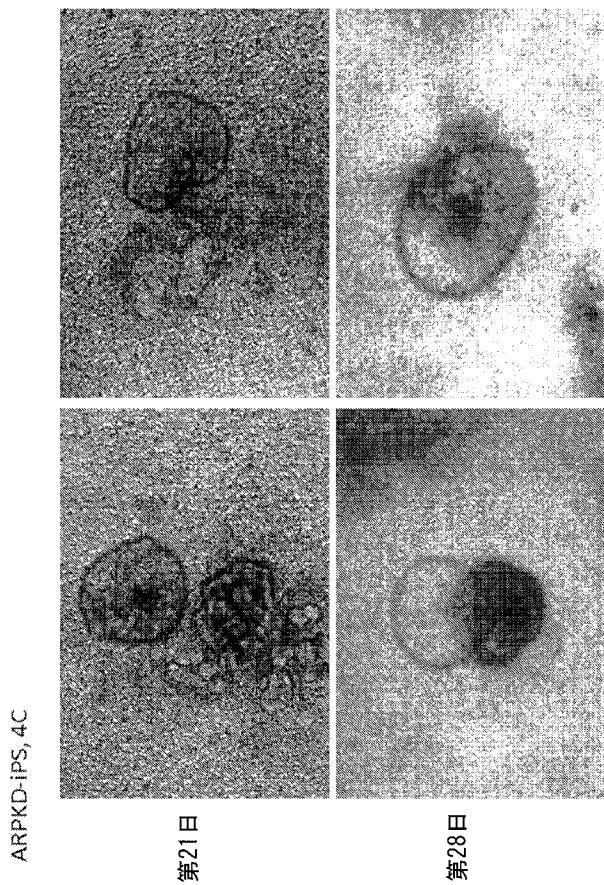
【図 19】



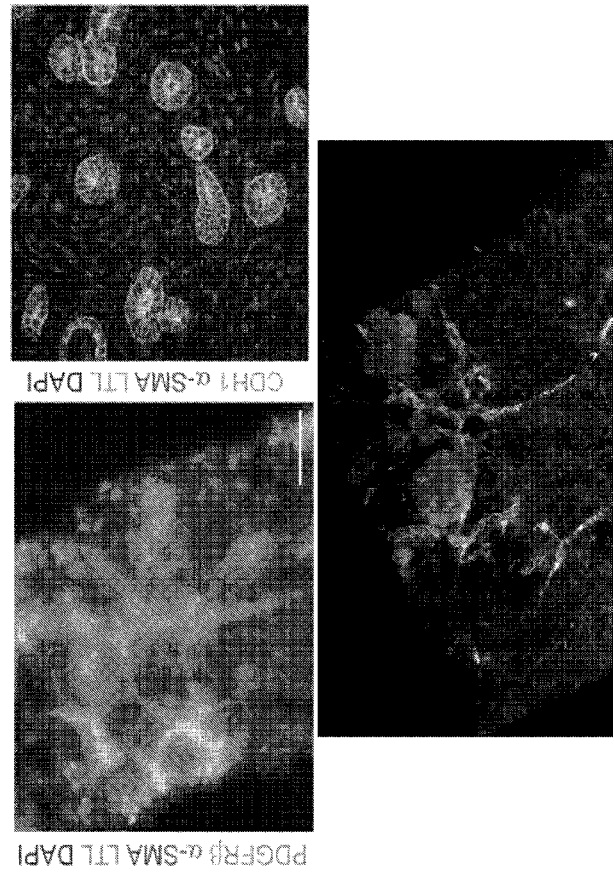
【図20】



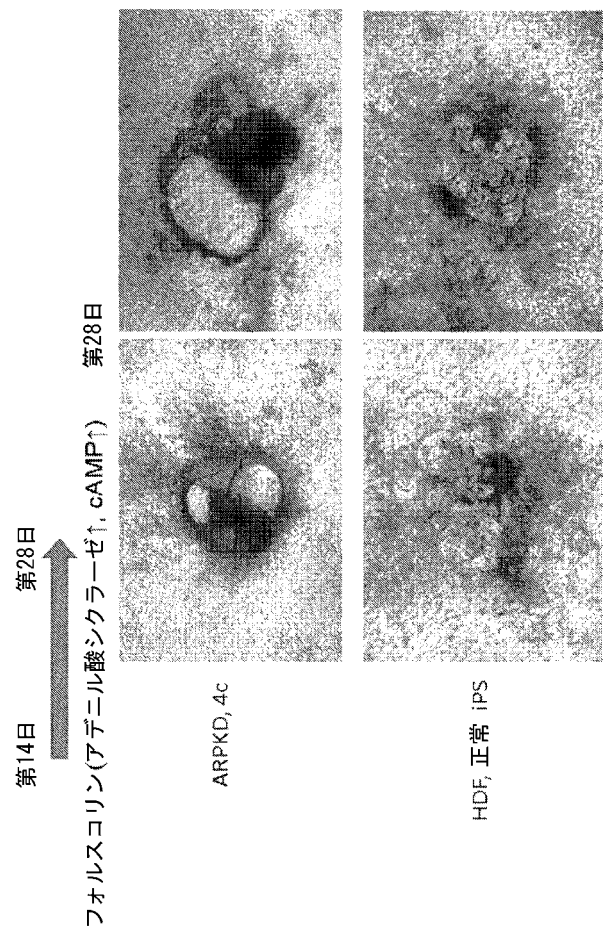
【図22】



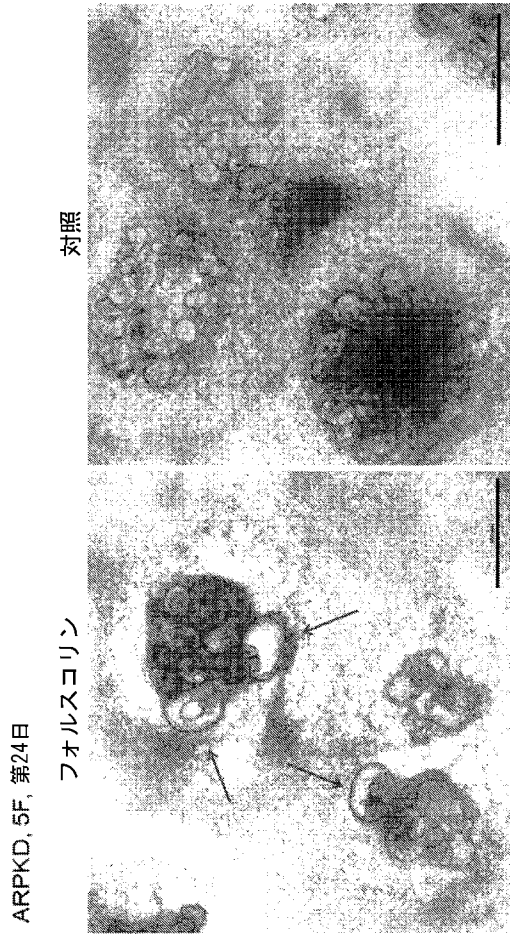
【図21】



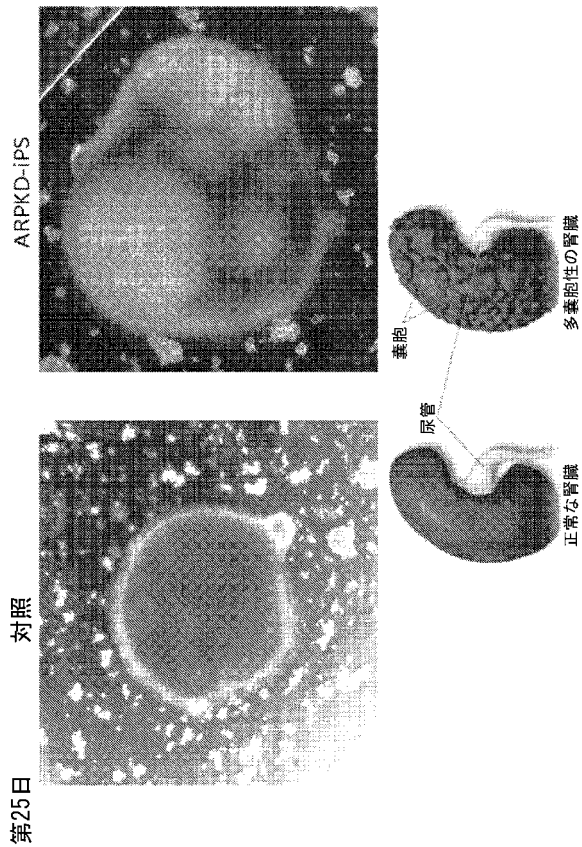
【図23】



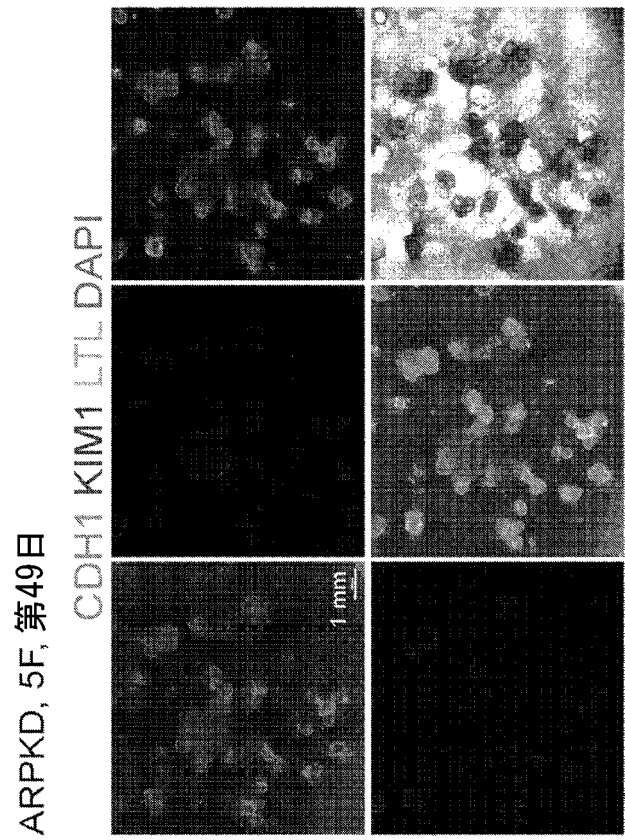
【図 2 4】



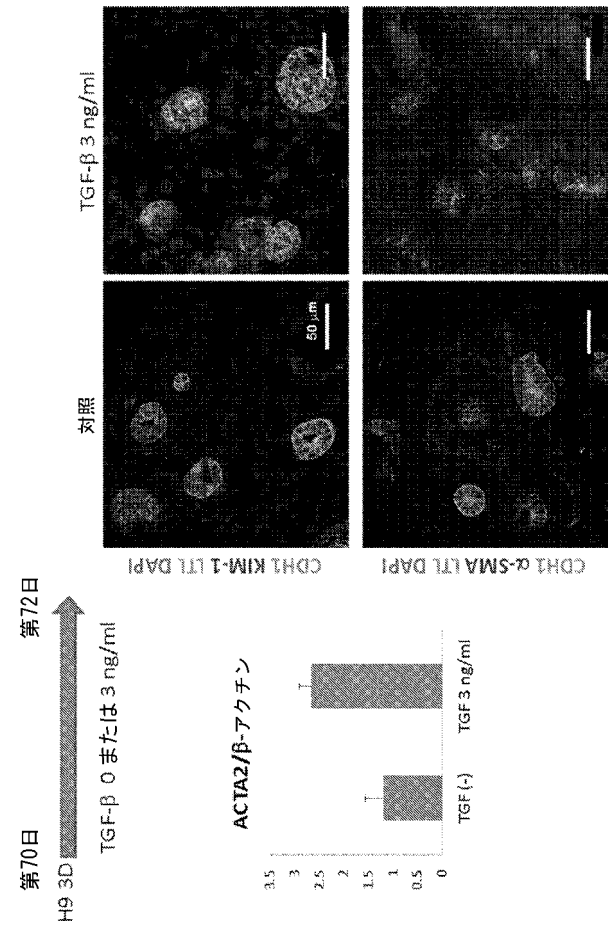
【図 2 6】

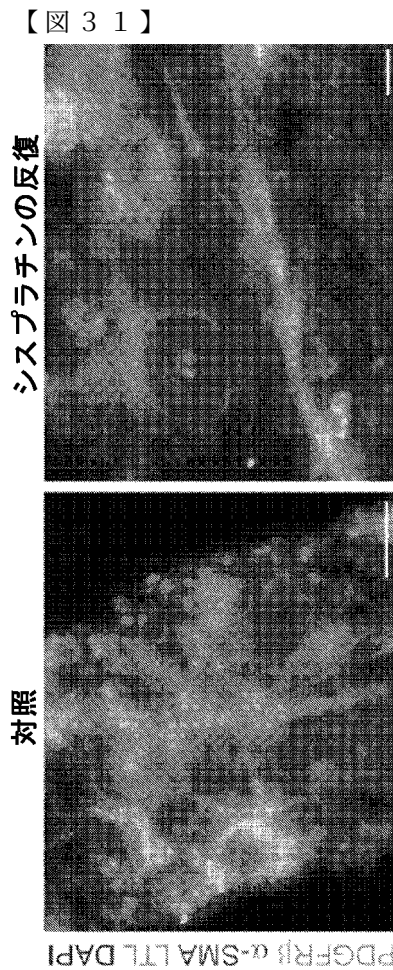
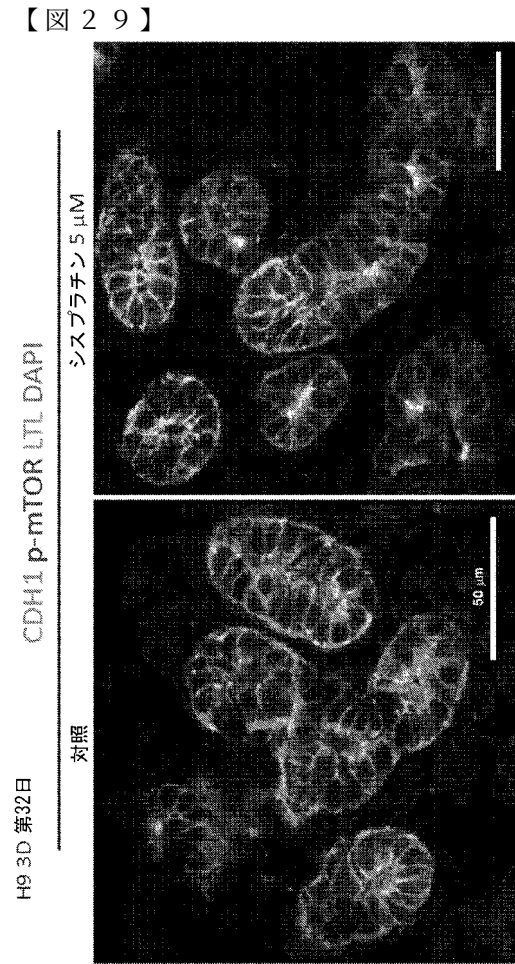
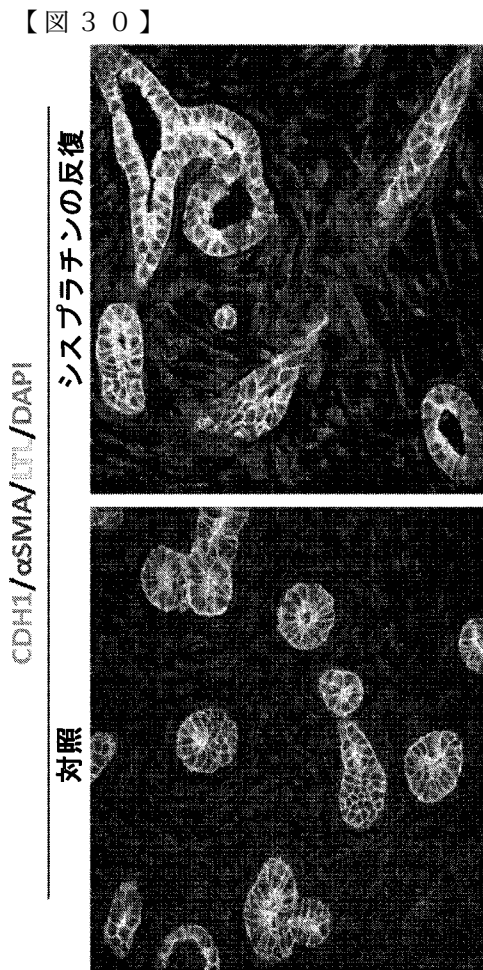
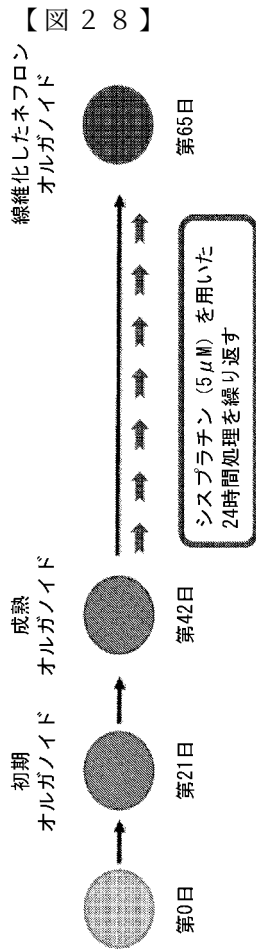


【図 2 5】

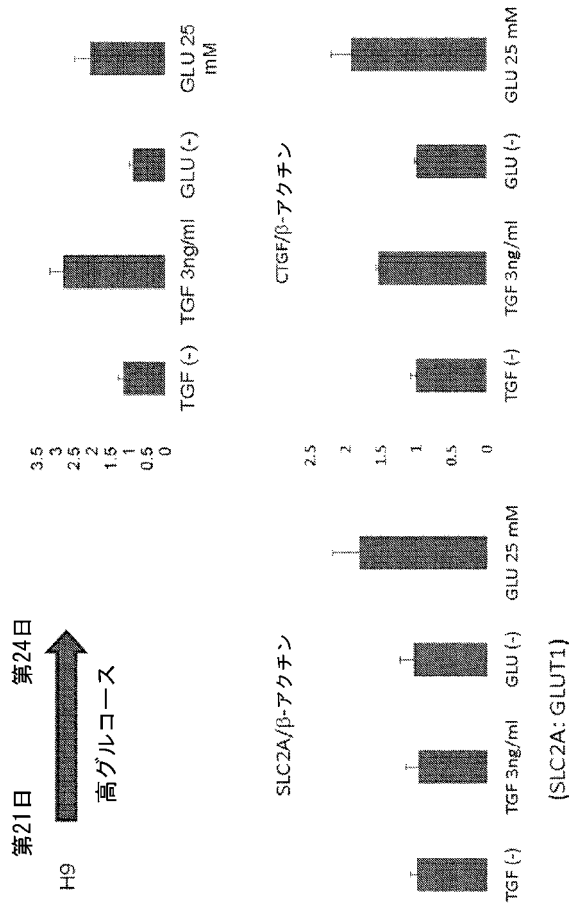


【図 2 7】

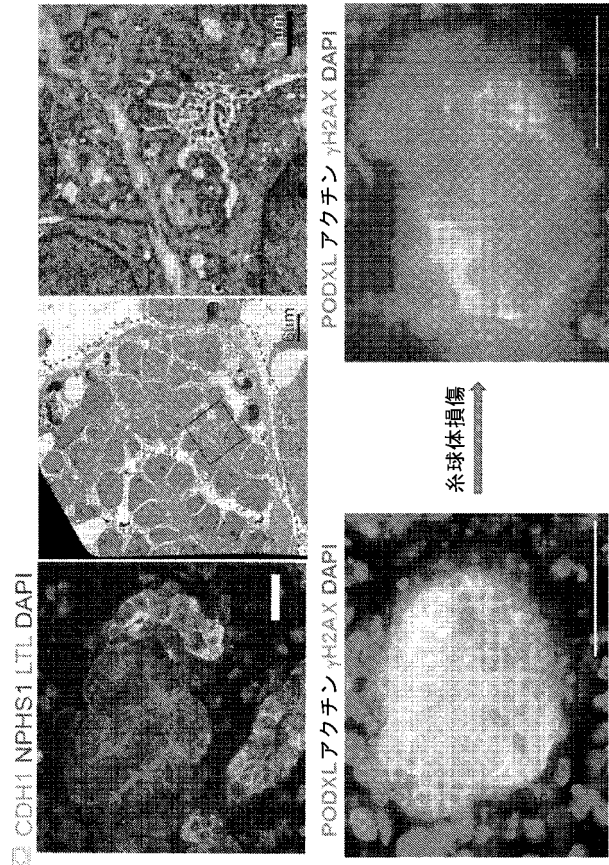




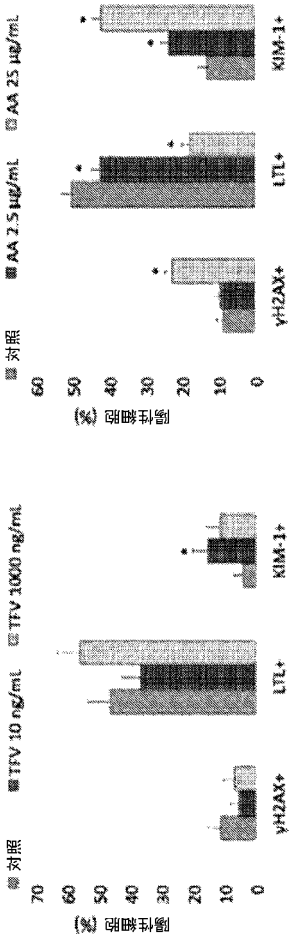
【図 3 2】



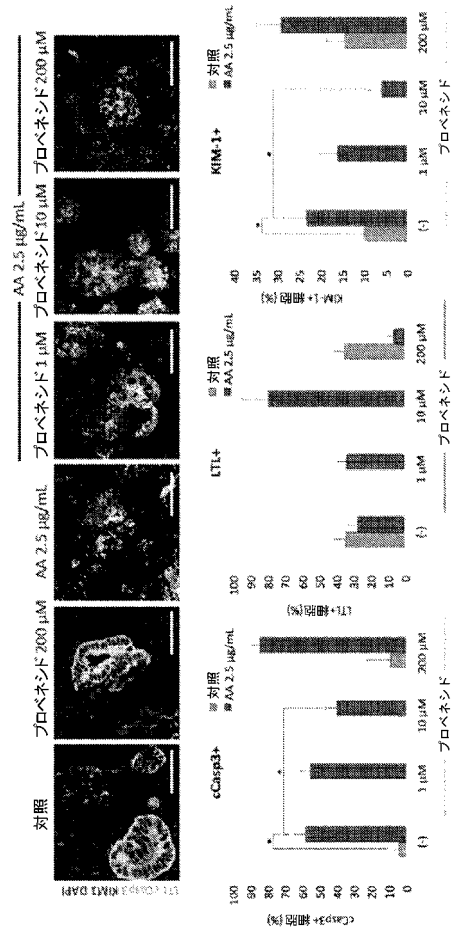
【図 3 3】



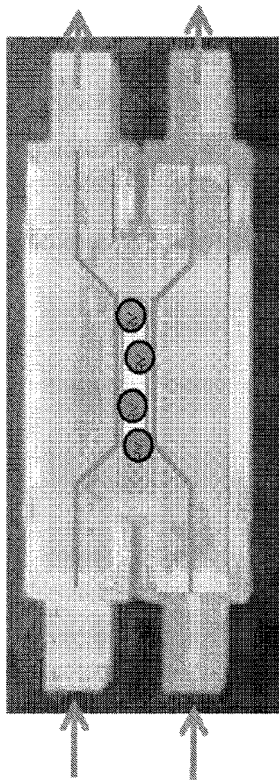
【図 3 4】



【図 3 5】

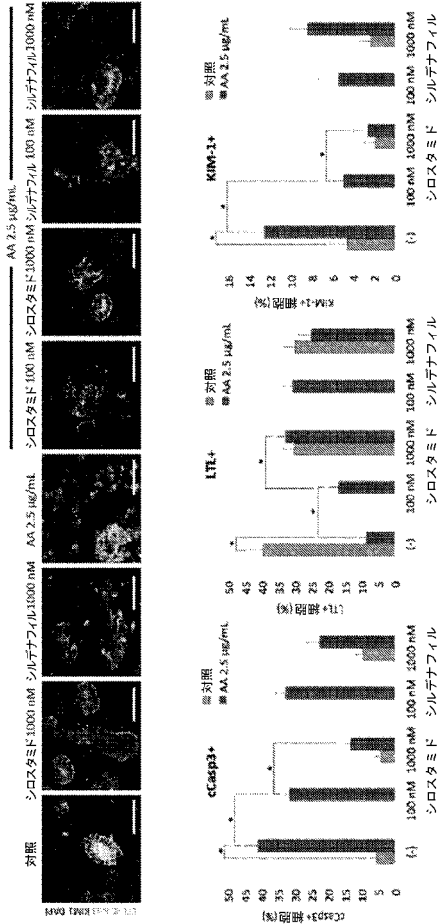


【図 3 8】

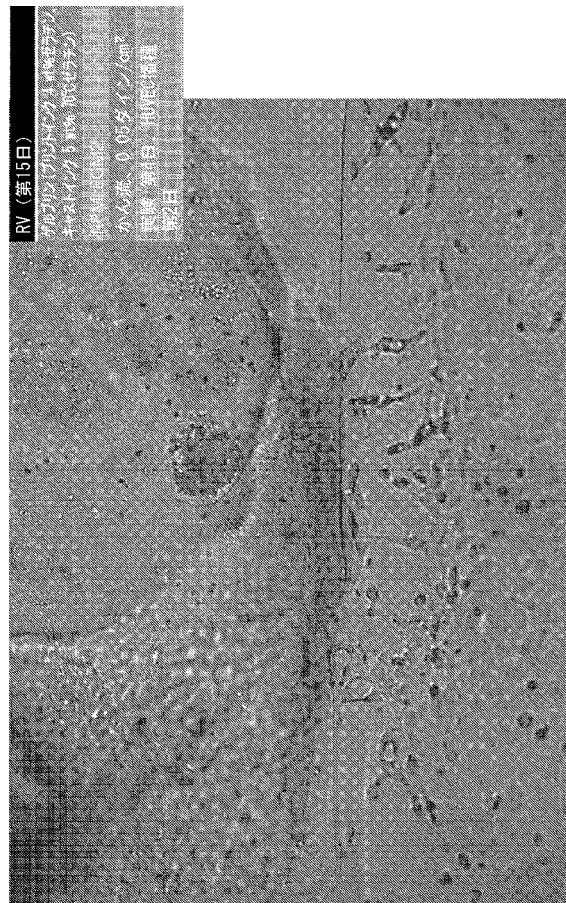


ゲルブリン (Gelbrin) をキャスト (5 wt% 70Cゼラチン、10 mg/mLフィブリン)
ゲルブリンをプリント (4 wt%ゼラチン 低ブルーム、10 mg/mLフィブリン)

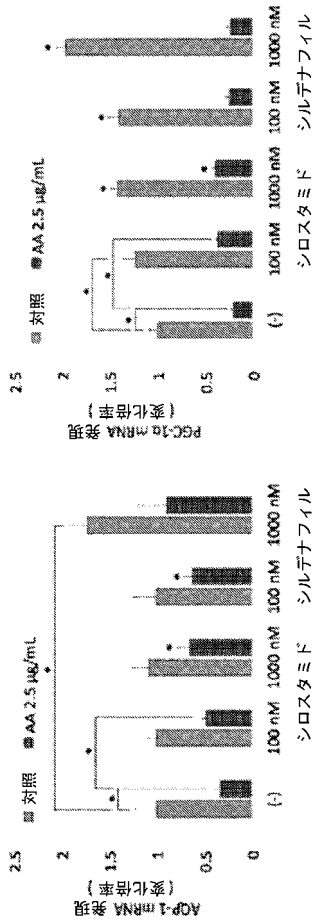
【図 3 6】



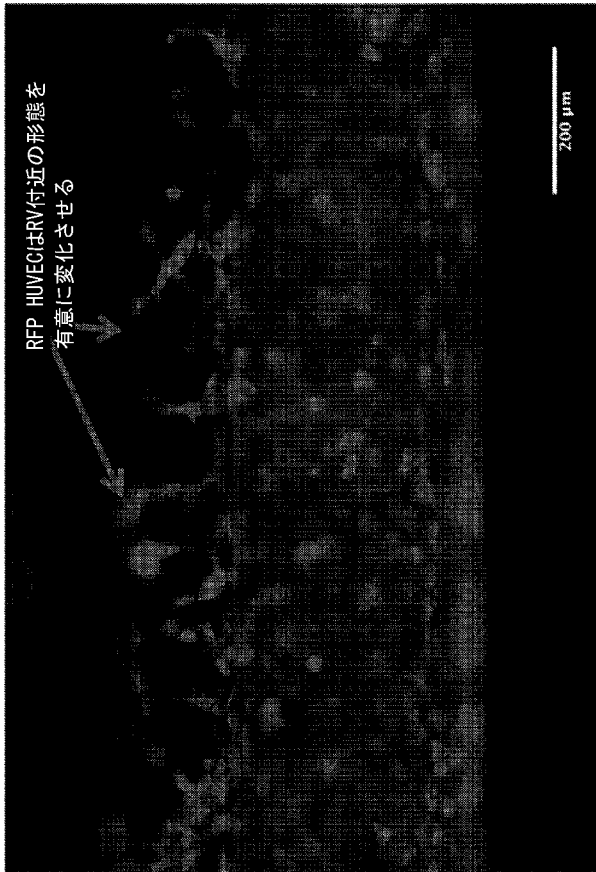
【図 3 9】



【図 3 7】



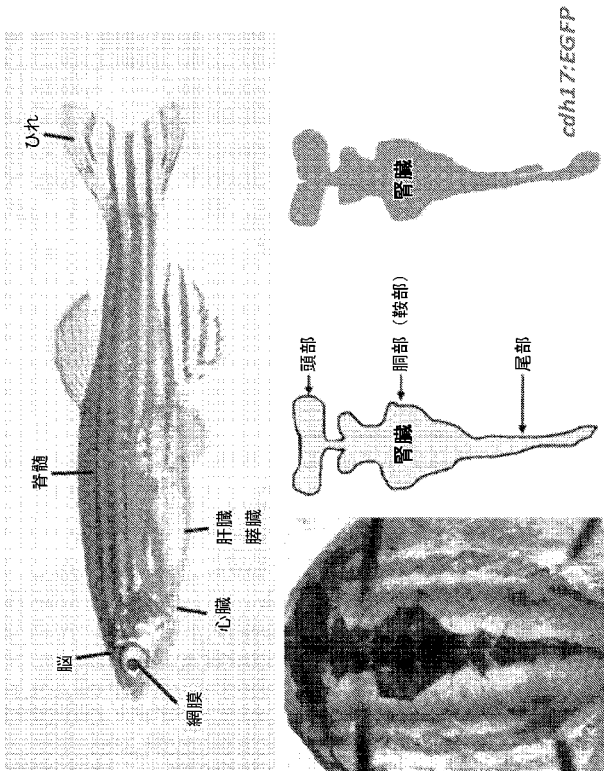
【図 4 0】



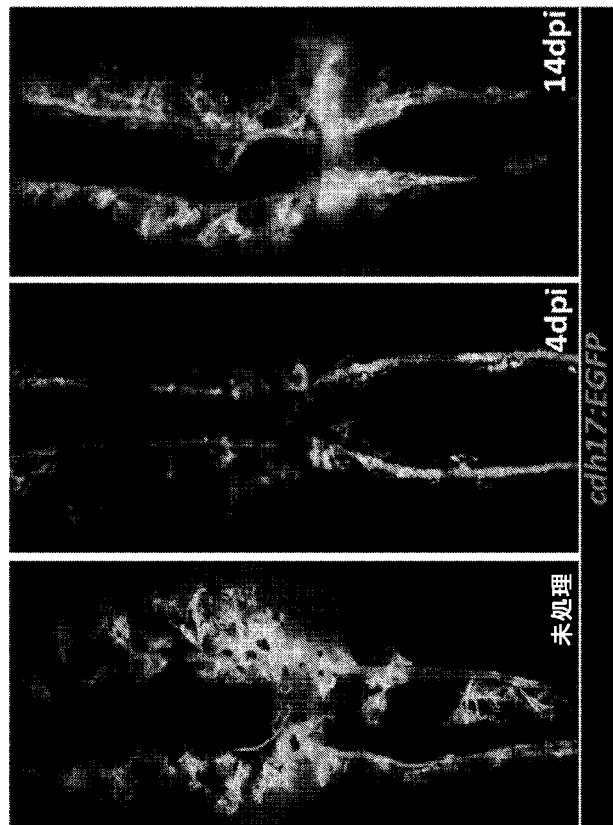
【図 4 1】



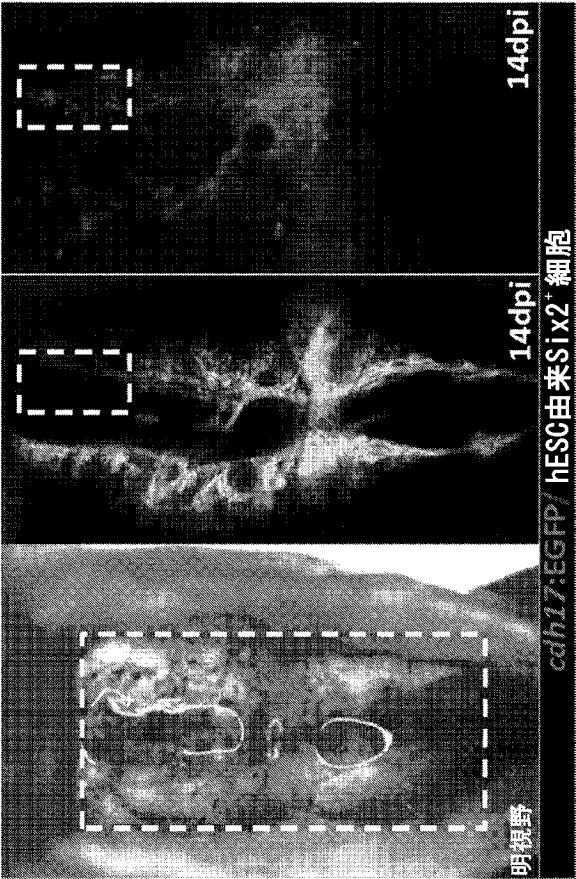
【図 4 2】



【図 4 3】



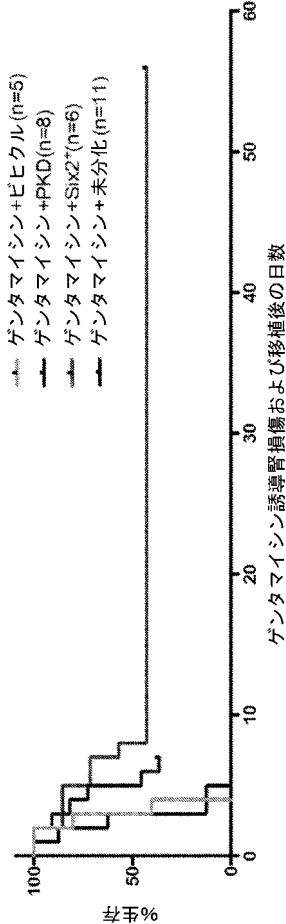
【図 4 4】



【配列表】

2018527007000001.app

【図 4 5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/52350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/0735, 5/074 (2016.01) CPC - C12N 5/0606, 5/0686, 5/0696 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 5/0735, 5/074, 5/095 (2016.01) CPC: C12N 5/0603, 5/0606, 5/0686, 5/0696, 2506/00, 2506/02, 2506/45 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data, RU, AT, CH, TH, BR, PH); Google Patents; Google; Google Scholar; PubMed; EBSO: general; "metanephric mesenchyme," "human pluripotent stem cells," hPSC, "human induced pluripotent stem cells," hiPSC, "human embryonic stem cells," hESC, "primitive streak cells," "late primitive streak cells," "posterior		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(MORIZANE, R et al.) Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Kidney. Biomarker Insights. 13 September 2015, Vol. 10; pages 147-152; abstract; page 1, paragraph 3; page 2, paragraph 3; page 3, paragraphs 2-4; page 4, paragraphs 3-4; page 5, paragraphs 1-2; DOI: 10.4137/BMI.S20055	1-4, 6-16 5
Y	WO 2010/042669 A2 (IPIERIAN, INC.) April 15, 2010; paragraphs [0003], [0062], [0096]	5
Y	(BROWN, AC et al.) A Synthetic Niche for Nephron Progenitor Cells. Developmental Cell, 27 July 2015, Vol. 34, No. 2; pages 229-241; summary; page 231, column 2, paragraph 2; page 234, column 2, paragraph 1; page 238, column 1, paragraph 3; figure 4 description; DOI: 10.1016/j.devcel.2015.06.021	17-23, 24A, 24B, 25-27
Y	(MAE, S et al.) Monitoring and Robust Induction of Nephrogenic Intermediate Mesoderm from Human Pluripotent Stem Cells. Nature Communications. 22 January 2013, Vol. 4, No. 1367; page 3, column 1, paragraph 3; page 3, column 2, paragraph 3; DOI: 10.1038/ncomms2378	17-23, 24A, 24B, 25-27
Y	(SONG, B et al.) The Directed Differentiation of Human IPS Cells Into Kidney Podocytes. PLOS ONE. 28 September 2012, Vol. 7, No. 9; abstract; DOI: 10.1371/journal.pone.0046453	19-20
Y	(WANG, W et al.) Aquaporin-1 Retards Renal Cyst Development in Polycystic Kidney Disease by Inhibition of Wnt Signaling. The FASEB Journal. 8 January 2015, Vol. 29, No. 4; pages 1551-1563; abstract; DOI: 10.1096/fj.14-260826	19, 22
Y	(MOUNT, DB) Thick Ascending Limb of the Loop of Henle. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 15 October 2014, Vol. 9, No. 11; pages 1974-1986; abstract; page 1974, column 1, paragraphs 1-2; page 1981, column 1, paragraph 2; DOI: 10.2215/CJN.04480413	19, 23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 November 2016 (17.11.2016)		Date of mailing of the international search report 07 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/52350

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	✓ (PROZIALECK, WC et al.) Differential Expression of E-cadherin, N-cadherin and Beta-catenin in Proximal and Distal Segments of the Rat Nephron. BMC Physiology. 17 May 2004, Vol. 4, No. 10; abstract; page 12, column 1, paragraph 3; DOI: 10.1186/1472-6793-4-10	19, 24A
Y	✓ (SILLER, R et al.) Modelling Human Disease with Pluripotent Stem Cells. Current Gene Therapy. April 2013. Vol. 12, No. 2; pages 99-100; abstract; page 4, paragraph 2; DOI: 10.2174/1566523211313020004	25
Y	✓ (MUSUNURU, K) Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells to Generate Human Cellular Disease Models. Disease Models & Mechanisms. 10 June 2013, Vol. 6, No. 4; pages 898-904; abstract; page 898, column 1, paragraph 1; page 899, column 2, paragraph 2; page 900, column 1, paragraph 2; DOI: 10.1242/dmm.012054	26
A	WO 2015/130935 A1 (MAINE MEDICAL CENTER RESEARCH INSTITUTE) September 03, 2015; entire document	1-23, 24A, 24B, 25-27

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 L 27/38	3 0 0
			C 1 2 N 15/09	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

(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 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(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 ボンベンター ジョセフ ブイ.
アメリカ合衆国 0 1 7 7 8 マサチューセッツ州 ウェイランド ボストン ポスト ロード
1 0 1

(72)発明者 モリザネ リュウジ
アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州 ブルックライン ロングウッド アベニュー
6 0 # 8 0 1

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC20 BD39 CA44
4C081 AB11 BA12 BC01 CD34 DA16 EA01

【要約の続き】

