

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5450072号
(P5450072)

(45) 発行日 平成26年3月26日(2014.3.26)

(24) 登録日 平成26年1月10日(2014.1.10)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/071	(2010.01)	C 12 N 5/00	202 A
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	A
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	102
C 12 Q 1/02	(2006.01)	C 12 Q 1/02	
A 61 K 35/23	(2006.01)	A 61 K 35/23	

請求項の数 16 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-532404 (P2009-532404)
 (86) (22) 出願日 平成19年10月11日 (2007.10.11)
 (65) 公表番号 特表2010-506563 (P2010-506563A)
 (43) 公表日 平成22年3月4日 (2010.3.4)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/021708
 (87) 國際公開番号 WO2008/045498
 (87) 國際公開日 平成20年4月17日 (2008.4.17)
 審査請求日 平成22年10月6日 (2010.10.6)
 (31) 優先権主張番号 60/829,238
 (32) 優先日 平成18年10月12日 (2006.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591286579
 エシコン・インコーポレイテッド
 E T H I C O N, I N C O R P O R A T
 E D
 アメリカ合衆国、ニュージャージイ州、サ
 マービル、ユー・エス・ルート 22
 (74) 代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延
 (74) 代理人 100130384
 弁理士 大島 孝文
 (72) 発明者 コルター・デイビッド・シー
 アメリカ合衆国、08610 ニュージャ
 ージー州、ハミルトン、アービントン・ブ
 レイス 208

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組織修復および再生における腎臓由来細胞およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離または精製されたヒトの腎臓由来細胞集団において、
 前記細胞集団が、培養中で自己複製し増殖する能力があり、
 前記細胞集団が、細胞表面マーカーHLA I およびCD44ならびに、Oct-4、Rex-1、Pax-2、
 Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、
 GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、細胞表面マーカーCD133、E-cad
 herinおよびWnt-4ならびに、Sox2、FGF4、hTert、SIX2、または、GATA-4のうちの少なく
 とも1つの発現について陰性である、細胞集団。

【請求項 2】

10

請求項1に記載の細胞集団において、

細胞表面マーカーCD24、CD29、CD49c、CD73、CD166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD138またはCD141のうちの少なくとも1つについて陰性である、細胞集団。

【請求項 3】

請求項1に記載の細胞集団において、

前記細胞が、腎皮質、腎髓質または腎被膜下部位に由来する、細胞集団。

【請求項 4】

請求項1に記載の細胞集団において、

20

前記細胞集団が、栄養因子FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2、または、VEGFのうちの少なくとも1つを分泌し、栄養因子PDGF-bb、または、IL12p70のうちの少なくとも1つを分泌しない、細胞集団。

【請求項5】

単離されたヒトの腎臓由来細胞集団を調製するための方法において、

メタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、または、粘液溶解酵素のうちの1つ以上の存在下で、ヒトの腎臓の被膜下部位、皮質、または、髓質から得られた組織をインキュベーションして、前記組織の少なくとも一部を個々の細胞に分解することと、

前記細胞を、基質上にまくことと、

前記細胞のうち、細胞表面マーカーHLA IおよびCD44ならびに、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、細胞表面マーカーCD133、E-cadherinおよびWnt-4ならびに、Sox2、FGF4、hTert、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞サブセットを同定することと、

前記ヒトの腎臓由来細胞集団を提供するために、前記細胞サブセットを単離することと、

を含む、方法。

【請求項6】

ヒトの患者における腎臓の細胞に関わる異常を治療するための薬物候補をスクリーニングするための方法において、

(a) ヒトの腎臓の被膜下部位、皮質、または、髓質から得られた、単離または精製されたヒトの腎臓由来細胞集団を提供する工程であって、

前記集団が、培養中で自己複製し増殖する能力があり、

前記細胞集団が、細胞表面マーカーHLA IおよびCD44ならびに、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、細胞表面マーカーCD133、E-cadherinおよびWnt-4ならびに、Sox2、FGF4、hTert、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、

工程と、

(b) 試験管内で自己複製し増殖する能力、または、向上した能力を有する細胞を含む細胞組成物を入手するための増殖条件下で、前記ヒトの腎臓由来細胞集団を培養する工程と、

(c) 工程(a)または(b)から入手された前記培養された細胞を、前記薬物候補に曝露する工程と、

(d) 前記細胞の生存に対する、あるいは、前記細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および/または、分子生物学的特性に対する前記薬物候補の効果の存在または不存在を検出する工程であって、

それにより、細胞生存、前記細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および/または、前記細胞の分子生物学的特徴を変える効果が、腎臓の細胞異常を治療するための前記薬物候補の活性を示す、

工程と、

を含む、方法。

【請求項7】

腎細胞機能に影響する試験物質の毒性を分析するための方法において、

(a) ヒトの腎臓の被膜下部位、皮質、または、髓質から得られた、単離または精製されたヒトの腎臓由来細胞集団を提供する工程であって、

前記細胞集団が、培養中で自己複製し増殖する能力を有し、細胞表面マーカーHLA IおよびCD44ならびに、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、細胞表面マーカーCD133、E-cadherinおよびWnt-4ならびに、Sox2、FGF4、

10

20

30

40

50

hTert、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも 1 つの発現について陰性である、工程と、

(b) 前記細胞集団を、前記試験物質に曝露する工程と、

(c) 前記集団中の前記細胞の生存、あるいは、前記集団中の前記細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および／または、分子生物学的特性に対する前記試験物質の効果の存在または不存在を検出する工程であって、

それにより、前記集団中の前記細胞の細胞生存、形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および／または、前記集団中の前記細胞の分子生物学的特徴を変える効果が、腎細胞機能に対する前記試験物質の前記毒性を示す、

工程と、

を含む、方法。

【請求項 8】

ヒトの患者の疾患を遺伝子治療により治療するための遺伝子改変された細胞において、
単離または精製されたヒトの腎臓由来細胞集団であって、前記細胞集団が、培養中で自己複製し増殖する能力があり、細胞表面マーカーHLA IおよびCD44ならびに、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも 1 つの発現について陽性であり、細胞表面マーカーCD133、E-cadherinおよびWnt-4ならびに、Sox2、FGF4、hTert、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも 1 つの発現について陰性である、腎臓由来細胞集団を提供し

前記単離または精製されたヒトの腎臓由来細胞集団の少なくとも 1 つを、遺伝子改変して、治療用の遺伝子産物を產生し、

前記遺伝子改変された細胞を培養中で増殖する、
工程を含むことにより調製される、遺伝子改変された細胞。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の細胞集団において、細胞表面マーカーHLA II、CD88およびCD86のうちの少なくとも 1 つの発現について陰性である、細胞集団。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の遺伝子改変された細胞において、細胞表面マーカーHLA II、CD88およびCD86のうちの少なくとも 1 つの発現について陰性である、細胞。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の細胞集団において、前記細胞集団が、同種移植によるヒトの患者に対し非免疫原性であり、その治療に使用される、細胞集団。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の遺伝子改変された細胞において、前記細胞が、同種移植によるヒトの患者に対し非免疫原性であり、その治療に使用される、細胞。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 および 11 のいずれか 1 項に記載の細胞集団において、虚血性腎組織疾患を減少させるか、取り除くため、または、ヒトの患者の外傷、年齢、代謝傷害もしくは毒性傷害、疾患、または、突発性損失に起因して損傷した腎臓の組織、器官、成分、または、構造を置換するため、のものである、細胞集団。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の遺伝子改変された細胞において、虚血性腎組織疾患を減少させるか、取り除くため、または、ヒトの患者の外傷、年齢、代謝傷害もしくは毒性傷害、疾患、または、突発性損失に起因して損傷した腎臓の組織、器官、成分、または、構造を置換するため、のものである、細胞。

【請求項 15】

請求項 6 または 7 に記載の方法において、
前記細胞の前記形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴が、尿細管の形成、または、BMPもしくはBMPレセプターの発現である、方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

請求項 7 に記載の方法において、

前記試験物質の毒性上昇が、尿細管の形成低下、または、BMPもしくはBMPレセプターの発現低下として測定される、方法。

【発明の詳細な説明】**【開示の内容】****【0001】****〔関連出願に対する相互参照〕**

本願は、2006年10月12日に出願した米国仮出願第60/829,238号の利益を主張するものであり、参照により全体を本明細書に組み入れる。

【0002】**〔発明の分野〕**

本発明は、概して、哺乳動物の腎組織から単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団に関する。本発明は、更に、哺乳動物腎臓由来細胞集団の単離および精製のための方法に関する。腎疾患を治療するための方法は、単離または精製された腎臓由来細胞集団を、哺乳動物患者に投与することにより、提供される。

【0003】**〔発明の背景〕**

腎臓に対する腎毒性発作および虚血性発作により、急性腎不全がもたらされ、ほとんどの場合、急性尿細管壊死として表れる。急性腎不全後の腎臓機能の回復は、機能的な尿細管上皮による壊死した尿細管細胞の置換に依存する。その上、糸球体毛細血管内皮および管周囲毛細血管内皮の著しい増殖応答が、虚血性傷害後に観察される。上皮の再生および内皮の再生が起こらないか、または、それらが低下しているために、尿細管間質性腎臓瘢痕および慢性腎臓疾患に、患者が罹りやすいのかもしれない。新たに生成された腎臓細胞の起源は一義的には定義されていないのだが、他の器官との相似により、器官特異的な多能性細胞（すなわち、腎臓幹細胞）が、新しい細胞の前駆体として示唆されてきている。しかしながら、成体の腎臓前駆細胞の同定はなされていない。Bussolati et al., American J. of Pathology, 166: 545-555, 2005参照。

【0004】

腎臓前駆細胞の単離および培養を示す、より確定的な証拠はない。にもかかわらず、ほんのわずかな研究室が、このような細胞を同定し単離するためのいくつかの試みを行っている。例えば、げっ歯類の研究により、腎乳頭が成体の腎臓幹細胞の適所であることが示された。更なる実験により、単離された腎乳頭細胞がある程度の多分化能性の分化を有し、腎臓皮質に直接注射された場合に、それらは腎臓実質組織に生着することが示された。これらの結果は、腎乳頭が腎臓の維持および修復に関与する腎臓前駆細胞集団の適所であることを示唆している。しかしながら、ヒト腎臓中の、この前駆体適所の存在は、まだ決定されていない。Oliver et al., J. of Clinical Investigation, 114: 795-804, 2004 参照。国際公開番号第2005/021738号参照。

【0005】

推定されるヒト前駆細胞を、死体の腎臓の腎臓組織から単離した。これらの細胞の単離は、表面マーカーCD133を標的とした磁気ビーズ細胞分離に基づいた。更なる実験により、腎臓由来CD133+細胞が、培養中で増殖し、試験管内で上皮細胞または内皮細胞に分化する能力を有することが示された。SCIDマウスへの移植の際、CD133+細胞は、腎臓上皮マーカーを発現する尿細管構造を形成した。その上、グリセロールにより誘導された尿細管壊死のあるマウスへの静脈注射においては、CD133+細胞は、傷害のある腎組織に遊走し、そこに統合された。Bussolati et al., American J. of Pathology, 166: 545-555, 2005 参照。これらのデータは、前駆細胞がヒト腎組織に存在し、腎臓の修復に役割を果たしているかもしれないことを示している。しかしながら、成体の腎組織に存在するCD133+細胞集団は非常に少なく、したがって、同種を基にした細胞治療のためには非実用的である。器官特異的幹細胞を同定するための近年のアプローチは、前駆細胞がHoechst 33342染料を排出する能力に基づく単離方法を利用している。この能力を示す細胞は、SP [サイドポビ

10

20

30

40

50

ュレーション(side-population)】細胞と呼ばれ、様々な程度の幹細胞の特徴を示している。研究は、げっ歯類腎臓の腎臓間質には、SP細胞が含まれることを示している。その上、腎臓SP細胞が急性腎不全のマウスに注入された。Hishikawa et al., J. of Cell Biology, 169: 921-928, 2005参照。これらの細胞は、間質腔に遊走し、損傷した腎臓組織の修復において役割を果たしているように思われた。しかしながら、ヒト腎組織でのSP細胞の存在は、まだ決定されていない。細胞治療で使用するための哺乳動物またはヒトの腎臓由来細胞の改良された供給源であって、正常な哺乳動物またはヒトの腎組織から単離され、細胞培養中で成長できる、改良された供給源が、本分野では必要とされている。

【0006】

【発明の概要】

本発明は、哺乳動物腎組織から単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供する。哺乳動物腎臓由来細胞集団の単離および精製のための方法を提供する。特有の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、表現型の特徴(例えば、形態、成長能、表面マーカー表現型、初期発生遺伝子発現、および、腎臓発生遺伝子発現)により特徴づけられる。表面マーカーおよび遺伝子発現の表現型は、培養中の哺乳動物腎臓由来細胞集団の複数継代後も保有される。

【0007】

本発明の1つの態様では、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供し、細胞集団は、培養中で自己複製し増殖する能力があり、細胞集団は、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である。1つの実施態様では、細胞は、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である。

【0008】

更なる態様では、単離又は精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団は、細胞表面マーカーHLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である。1つの実施態様では、細胞集団は、表面マーカーHLA I、CD166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、CD86、CD133、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である。更に別の実施態様では、細胞集団は、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、または、CD86のうちの少なくとも1つについて陰性である。細胞集団は、好ましくは、哺乳動物患者における同種移植について非免疫原性である。哺乳動物腎臓由来細胞集団は、栄養因子FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2、または、VEGFのうちの少なくとも1つを分泌してもよい。好ましくは、細胞集団は、栄養因子PDGF-bb、または、IL12p70のうちの少なくとも1つを分泌しない。

【0009】

哺乳動物腎臓由来細胞集団は、腎被膜下部位、腎皮質、または、腎髓質に由来してもよい。哺乳動物腎臓由来細胞集団は、腎臓前駆細胞を含んでもよい。哺乳動物腎臓由来細胞集団は、ヒト、靈長類、または、げっ歯類に由来してもよい。

【0010】

本発明の別の態様は、哺乳動物患者における虚血性腎疾患を治療するための方法に関するものであり、その方法は、哺乳動物患者に、上記の単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団の治療上有効な量を投与し、それにより、哺乳動物患者における虚血性腎疾患を減少させるか、または、取り除くことを含む。

【0011】

また、哺乳動物患者において、外傷、年齢、代謝傷害もしくは毒性傷害、疾患、または

10

20

30

40

50

、突発性損失に起因して損傷した腎臓の組織、器官、成分、または、構造を置換するための方法も提供する。その方法は、哺乳動物患者に、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団の治療上有効な量を投与し、それにより、損傷した組織もしくは器官を減らすか、もしくは、取り除き、哺乳動物患者における腎機能を回復させることを含む。

【 0 0 1 2 】

本発明の更なる態様は、哺乳動物腎臓由来細胞集団を選択的に濃縮または単離するための方法に関する。この方法は、哺乳動物の腎臓の被膜下部位、皮質、または、髓質から組織を入手することと、メタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、または、粘液溶解酵素の存在下で組織をインキュベーションすることと、細胞を組織培養容器にまくことと、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP 2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞集団を同定することと、哺乳動物腎臓由来細胞集団を単離することとを含む。更なる態様では、細胞集団は、細胞表面マーカーHLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD 166、または、SSEA-4の少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である。

【 0 0 1 3 】

また、哺乳動物患者における疾患を遺伝子治療により治療するための方法も提供し、その方法は、上記の哺乳動物の腎組織に由来する哺乳動物腎臓由来細胞集団を単離することと、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を、治療上の遺伝子産物を產生するように遺伝子改変することと、遺伝子改変された細胞を培養中で増殖することと、哺乳動物患者において望ましい遺伝子産物を產生するため、および、哺乳動物患者における疾患を減少させるか、または、取り除くために、遺伝子改変された細胞を投与することと、を含む。

【 0 0 1 4 】

更なる態様では、哺乳動物患者における腎臓の細胞に關わる異常を治療するための潜在的な薬物候補をスクリーニングするための方法を提供し、その方法は、(a)患者由来の哺乳動物の腎細胞または腎組織に由来する、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を準備する工程であって、その細胞は培養中で自己複製し増殖する能力があり、その細胞集団が、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、工程と、(b)試験管内で自己複製し増殖するための能力、または、向上した能力を有する細胞を含む細胞組成物を入手するための増殖条件下で、哺乳動物腎臓由来細胞集団を培養する工程と、(c)工程(a)または工程(b)において培養された細胞を、潜在的な薬物候補に曝露する工程と、(d)細胞の生存に対する、あるいは、細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および/または、分子生物学的な特性に対する、潜在的な薬物候補の効果の存在または不存在を検出する工程であって、それにより、細胞生存、細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的特徴、および/または、分子生物学的特性を変える効果が、潜在的な薬物候補の活性を示す、工程と、を含む。更なる態様では、細胞集団は、細胞表面マーカーHLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD 166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である。

【 0 0 1 5 】

また、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団の培養における自己複製および増殖に影響する試験物質の毒性を解析するための方法も提供する。この方法は、(a)哺乳動物の腎組織に由来する、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を培養する工程であって、細胞は培養中で自己複製し増殖する能力があり、細胞集団が、Oct-4、Rex

10

20

30

40

50

-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、工程と、(b)工程(a)における培養細胞を、試験物質に曝露する工程と、(c)細胞の生存に対する、あるいは、細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的特徴、および/または、分子生物学的特性に対する、試験物質の効果の存在または不存在を検出する工程であって、それにより、細胞生存、細胞の形態的、機能的、もしくは生理的特徴、および/または、分子生物学的特性を変える効果が、試験物質の活性を示す、工程とを含む。更なる態様では、細胞集団は、細胞表面マーカーHLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA I、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である。

【0016】

〔発明の詳細な説明〕

概略

本発明は、哺乳動物の腎組織から単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供する。哺乳動物の腎組織から細胞を単離し精製するための方法を提供する。特有の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、表現型の特徴(例えば、形態、成長能、表面マーカー表現型、腎臓発生遺伝子発現、初期発生遺伝子発現、または、腎保護遺伝子発現)により特徴付けられる。表面マーカーおよび遺伝子発現の表現型は両方とも、培養中の哺乳動物腎臓由来細胞集団の複数継代後も保有される。

【0017】

単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供し、その細胞集団は培養中で自己複製し増殖する能力がある細胞集団であり、細胞集団は、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4の少なくとも1つの発現について陰性である。単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団は安定であり、細胞培養中で自己複製し増殖する能力がある。1つの実施態様では、細胞は、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である。単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団が、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、または、CD86のうちの少なくとも1つについて陰性であるという発見により証明されているように、細胞集団は、哺乳動物患者における同種移植について非免疫原性である。

【0018】

哺乳動物腎臓由来細胞集団は、栄養因子FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2、または、VEGFのうちの少なくとも1つを分泌しうるが、栄養因子PDGF-bb、または、IL12p70のうちの少なくとも1つを分泌しない。細胞集団は、ヒト、靈長類、または、げっ歯類の腎被膜下部位、腎皮質、または、腎髓質に由来することができる。哺乳動物腎臓由来細胞集団には、腎前駆細胞が含まれてもよい。腎前駆細胞は、異なる細胞系統(例えば、脂肪細胞、または、骨芽細胞)に分化する能力がある。

【0019】

本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、虚血性腎疾患における腎臓の再生のための、または、哺乳動物患者における外傷、年齢、代謝傷害もしくは毒性傷害、疾患、または、突発性損失に起因して損傷した腎臓の組織、器官、成分、もしくは、構造を置換するような治療処置のための、細胞治療において有用である。

【0020】

本発明は、当然に変動することができる特定の方法、試薬、化合物、組成物、または、生物システムに限定されないことが理解されるべきである。また、本明細書で用いる用語

10

20

30

40

50

も、特定の実施態様のみを説明するために用いられ、限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。本明細書および添付した特許請求の範囲において用いられるように、単数形 “a”、“an”、“the” には、別に明確に内容を述べない限り、複数の指示対象が含まれる。したがって、例えば、“a cell (細胞)”との言及には、2個以上の細胞の組み合わせおよび同様のものが含まれる。

【0021】

計測可能な値（例えば、量、期間、および、同様のもの）に言及する場合、本明細書で用いる用語「約」は、特定した値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、更に好ましくは $\pm 1\%$ 、更に好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を含むことを意味し、このような変動が、開示した方法を行うために適切である。

10

【0022】

別に定義しない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、発明に関連する分野における通常の技術を有する者のうちの1人により、共通して理解されるものと同じ意味を持つ。本明細書で説明したものと同様または等価な任意の方法および材料を、本発明を試験するための実施で用いることができるが、好ましい材料および方法は、本明細書に記載されている。本発明を説明し、特許請求するに際し、以下の用語が用いられるだろう。

【0023】

「本発明の細胞」とは、哺乳動物腎臓由来細胞集団、および、分化した細胞または脱分化した細胞を含む、それらの細胞集団に由来する細胞を言う。哺乳動物腎臓由来細胞集団は、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox 2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性であることができる。

20

【0024】

「分化」は、非特殊化した（「コミットしていない」）細胞、または、あまり特殊化していない細胞が、例えば、腎細胞のような特殊化した細胞の特色を獲得する過程である。「分化した、または、分化を誘導した細胞」は、細胞系統内でより特殊化した（「コミットした」）地位につく細胞である。用語「コミットした」とは、分化過程に適用する場合、通常環境下で、特定の細胞型もしくは細胞型のサブセットへと分化し続けるだろう時点まで、また、通常環境下で、異なる細胞型へと分化することができないか、または、あまり分化していない細胞に戻ることができない時点まで、分化経路が進行した細胞を言う。「脱分化」とは、細胞が、細胞系統内のあまり特殊化（すなわち、コミット）していない地位に戻る過程を言う。本明細書中で用いるように、細胞の「系統」は、細胞の遺伝形質、すなわち、細胞がどんな細胞から生じたか、また、どんな細胞を生じさせることができるかということを定義する。細胞系統は、発生および分化の遺伝的スキーム内に、細胞を位置付ける。「系統特異的マーカー」とは、目的の系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を言い、コミットしていない細胞が目的の系統まで分化するかどうかを判定するために用いることができる。

30

【0025】

広義には、「前駆細胞」は、それ自身よりも更に分化した子孫細胞を作り出す能力があり、更に、前駆体の集合を補充する能力を保有する細胞である。この定義によると、幹細胞は、最終的に分化した細胞の直前の前駆体であるため、それ自身もまた前駆細胞である。本発明の細胞に言及する場合、以下のとおり詳細に説明するように、広義の「前駆細胞」を用いてもよい。前駆細胞は、狭義には、分化経路における中間体である細胞（すなわち、それは幹細胞から生じ、成熟した細胞型または細胞型のサブセットの產生における中間体である）として、しばしば定義される。このタイプの前駆細胞は、概して、自己複製できない。したがって、本明細書中でこのタイプの細胞について言及する場合、「非複製前駆細胞」または「中間前駆細胞」もしくは「前駆細胞」と呼ばれるだろう。分化した細胞は、それ自身も多分化能性細胞等に由来する多分化能性細胞に由来することができる。

40

50

これらの多分化能性細胞のそれぞれを幹細胞と見なすことができるが、細胞型の範囲にはかなりの変動を生じる可能性がある。また、分化した細胞には、より高い発生能力を有する細胞を生ずる能力があるものもある。このような能力は、生得的なものであることができるし、あるいは、様々な因子による処理により、人工的に誘導することができる。「増殖」は、細胞数の増加を指す。

【0026】

本明細書で用いられるような「腎前駆細胞」は、等しい能力の娘細胞を産生することに加えて、細胞（例えば、脂肪細胞または骨芽細胞）を生ずることができるか、または、1つ以上の組織型（例えば、腎組織）を生ずることができる、哺乳動物腎臓由来細胞である。「腎前駆細胞」または「腎臓前駆細胞」は、成体または胎児の腎組織から実質的に生み出された多分化能性細胞または多能性細胞である。これらの細胞は、多能性幹細胞を特徴付ける特性を有することが知られてきている。その特性には、急速増殖および他の細胞系統へ分化する能力が含まれる。「多分化能性」腎前駆細胞は、複数の細胞系統（例えば、腎臓細胞系統、脂肪細胞系統、または、骨芽細胞系統）を生み出すことができる。腎臓前駆細胞は、初期発生の遺伝子マーカー、腎臓発生の遺伝子マーカー、後腎間葉系遺伝子マーカー、および、後腎間葉の生存を促進する遺伝子についての遺伝子発現プロファイルを示す。例えば、腎前駆細胞は、Oct-4およびRex-1を含むがこれに限定されない遺伝子の発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTERT、および、Wnt-4を含むがこれに限定されない遺伝子の発現について陰性であるような遺伝子発現プロファイルを示す。

【0027】

単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団は、安定であり、細胞培養中で自己複製し増殖する能力がある。哺乳動物腎臓由来細胞集団は、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞として、表現型上同定されている。更なる態様では、哺乳動物腎臓由来細胞集団は、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性であるとして同定されている。

【0028】

「組織」とは、特定の特殊な機能を一緒にに行う、同様に特殊化した細胞の群または層を言う。「器官」とは、組織層が、微細構造を形成するための細胞-細胞相互作用および/または細胞-マトリックス相互作用のいくつかの形式を維持する、2つ以上の隣接した組織層を言う。

【0029】

「腎臓」とは、腹部中の一対の器官のうちの1つを言う。腎臓は、血液から老廃物を（尿として）除去し、赤血球産生を刺激するエリスロポエチンを産生し、血圧調節において役割を果たしている。腎臓は、適正な水と電解質のバランスを維持し、酸-塩基濃度を調節し、代謝老廃物を含む血液をろ過し、その後尿として排泄するために機能する。

【0030】

「初代培養」とは、組織から単離された多くの異なる細胞型の相互作用を可能にする細胞の混合細胞集団を言う。用語「初代」とは、組織培養の分野における通常の意味である。「培養中で自己複製し増殖する能力がある」とは、細胞培養中で成長し分裂し、細胞マーカーにより、また、母細胞から娘細胞への栄養因子の分泌により測定されるような、実質的に同じ表現型を維持する哺乳動物腎臓由来細胞集団を言う。哺乳動物腎臓由来細胞集団の複製中のいくつかの時点で、表現型は、腎臓由来細胞のより特殊化した、または、より分化した状態へと変化することができる。

【0031】

また、本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、細胞増殖および分化を促進する条件下で、患者への投与の前に培養することもできる。これらの条件には、試験管内での増殖およ

10

20

30

40

50

びコンフルエンスを可能にするために細胞を培養することであって、その時点で凝集体またはクラスターを形成し、GDF5、BMPを分泌し、または、BMPもしくはEPOレセプターを発現するように細胞を作ることができる、細胞を培養することが含まれる。

【0032】

培養中の細胞を説明するために、様々な用語が用いられる。「細胞培養」とは、概して、生きた生物から採取され、制御条件下（例えば、「培養中」）で育てた細胞を言う。「初代細胞培養」は、生物から直接採取された細胞、組織、または、器官を、最初の二次培養前に培養することである。細胞成長および／または分裂を容易にする条件下的成長培地に、細胞を置いた場合、細胞は培養中で「増殖」し、その結果、より大きな細胞集団が形成される。細胞が培養中で増殖する場合、細胞増殖速度は、時折、細胞が数において倍加するためには必要な時間の長さによって測定される。これを「倍加時間」と呼ぶ。10

【0033】

「細胞組成物」とは、細胞の調合物を言い、その調合物は、細胞に加えて、細胞培養培地のような非細胞成分（例えば、タンパク質、アミノ酸、核酸、ヌクレオチド、コエンザイム、抗酸化剤、金属、および、同様のもの）を含むことができる。更に、細胞組成物は、細胞成分の成長または生存率に影響しないが、特定の形式で（例えば、カプセル化のためのポリマーマトリックス、または、製薬調合物として）細胞を提供するために用いられる、成分を有する。

【0034】

「培養培地」は、本分野で理解され、「成長培地」としても共通して知られており、概して、生きている細胞の培養のために用いられる任意の物質または調合物を言う。したがって、「組織培養」とは、その構造および機能を保存するための組織（例えば、器官始原の腎被膜下部位、腎皮質、もしくは、腎髄質の外植片、または、試験管内での成体器官の外植片）の維持または成長を言う。「細胞培養」とは、試験管内での細胞の成長を言う。増幅した哺乳動物腎臓由来細胞集団の組織および細胞培養調合物は、様々な形式をとることができる。例えば、「懸濁培養」とは、細胞が適切な培地中に懸濁されると共に増加する培養を言う。同様に、「連続流培養」とは、細胞の成長（例えば、生存率）を維持するための新鮮な培地の連続流中における細胞または外植片の培養を言う。20

【0035】

「細胞株」は、初代細胞培養の1回以上の二次培養により形成された細胞集団である。二次培養の各ラウンドは、継代と呼ばれる。細胞を二次培養するとき、その細胞は「継代された」と言う。特定の細胞集団、すなわち、細胞株は、時折、継代された回数で呼ばれるか、または特徴付けられる。例えば、10回継代した培養細胞集団は、「P10」培養と呼ばれるかもしれない。初代培養、すなわち、細胞の組織からの単離後初めての培養は、P0と表される。最初の二次培養後、細胞は2番目の培養（P1、または、1代継代）と呼ばれる。2番目の二次培養後、細胞は3番目の培養（P2、または、2代継代）となる、等。継代期間中、多くの集団倍加が存在するかもしれないことが、当業者によって理解されるだろう。したがって、培養の集団倍加数は通常、継代数よりも多くなる。継代間の期間中、細胞の増殖（すなわち、集団倍加数）は、多くの因子に依存する。その因子には、播種密度、基質、培地、継代と継代との間の時間が含まれるが、これに限定されない。30

【0036】

「馴化培地」は、特定の細胞、または、細胞集団が培養され、その後、それらが除去された培地である。細胞が培地中で培養される間、これらの細胞は、他の細胞への栄養的な補助を提供しうる細胞因子を分泌する。このような栄養因子には、ホルモン、サイトカイン、細胞外マトリックス（ECM）、タンパク質、抗体、および、顆粒が含まれるが、これに限定されない。細胞因子を含む培地が、馴化培地である。40

【0037】

概して、「栄養因子」は、細胞の生存、成長、増殖、成熟、分化、および／または、維持を促進するか、あるいは細胞活性の向上を刺激する物質として定義される。「栄養的な補助」とは、細胞の生存、成長、増殖、成熟、分化、および／または、維持を促進するか50

、あるいは細胞活性の向上を刺激する能力を言うために、本明細書中で用いられる。本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、栄養因子を產生し、その栄養因子には、増殖因子、サイトカイン、および、分化因子が含まれるが、これに限定されない。栄養因子には、FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、VEGF、MMP-2、または、これらの組み合わせが含まれるが、これに限定されない。

【0038】

「非免疫原性」とは、大部分の処理した哺乳動物患者において、有害な免疫応答（すなわち、哺乳動物患者の健康を損なう免疫反応、または、処理した哺乳動物患者で治療応答を妨げる免疫反応）を誘発しない細胞または細胞集団を言う。

【0039】

「遺伝子」とは、遺伝子産物をコードする核酸配列を言う。遺伝子は、遺伝子の発現のために必要とされる配列情報（例えば、プロモーター、エンハンサー等）を選択的に含む。用語「ゲノムの」は、生物のゲノムに関する。

【0040】

「遺伝子発現」とは、RNA産物への遺伝子の転写を言い、選択的に、1つ以上のポリペプチド配列への翻訳を言う。

【0041】

「遺伝子発現データ」とは、遺伝子発現の異なる態様に関する情報を含む1セット以上のデータを言う。データセットには、細胞または細胞由来サンプル中の標的転写物の存在、標的転写物の相対量および絶対量、特異的遺伝子の発現を誘導するような様々な処置の能力、ならびに、特定の遺伝子の発現を異なるレベルに変化させるような様々な処置の能力に関する情報が、選択的に含まれる。

【0042】

「遺伝子発現プロファイル」とは、選択した発現条件が存在しない場合（すなわち、基準もしくは対照）、または、その条件に応答する場合（例えば、1またはいくつかの時点での、標準化合物もしくは試験化合物の存在下でのインキュベーション）の複数の遺伝子の発現レベルの説明を言う。遺伝子発現を、各遺伝子について転写されたmRNAの絶対量の観点から、対照細胞と比較して試験細胞で転写されたmRNAの割合および同様のものとして、表現することができる。また、それは、患者における個々の遺伝子の発現および個々の遺伝子組の発現を言う。

【0043】

培養した脊椎動物細胞について言及する場合、用語「老化」（「複製老化」または「細胞老化」とも）とは、有限の細胞培養に起因する特性、すなわち、限られた集団倍加数よりも多く成長できること（時折、「ヘイフリック限界」という）を言う。細胞老化は、最初に線維芽様細胞を用いて説明されたが、培養中でうまく成長することができるほとんどの正常ヒト細胞型が、細胞老化を経験する。異なる細胞型の試験管内での寿命は変化するが、最大の寿命は一般的に、100回の集団倍加よりも少ない（これは培養中で、老化し、ゆえに、培養物が分裂できないようになった細胞のすべてについての倍加数である）。老化は経過時間には依存しないが、むしろ、培養物が経験した細胞分裂数または集団倍加数により測定される。したがって、必須増殖因子を除去することにより休眠させられた細胞は、増殖因子を再導入すると成長および分裂を再開することができ、その後、継続的に成長した同等の細胞と同じ倍加数を実行することができる。同様に、様々な数の集団倍加後、細胞を液体窒素中で凍結し、その後解凍し培養する場合、それらは、培養中で未凍結のまま維持した細胞と実質的に同じ倍加数を経験する。老化細胞は死んだ細胞でも、死につつある細胞でもない。それは、実際にプログラム細胞死（アポトーシス）に耐えているし、3年間は分裂しない状態で維持されている。これらの細胞は、生存しているし、代謝的には活性であるが、分裂しない。老化細胞の非分裂状態は、任意の生物学的、科学的、または、ウイルス因子によって元に戻ることはまだわかっていない。

【0044】

「標準成長条件」とは、二酸化炭素約5%、温度約35~39℃、より好ましくは37℃、お

10

20

30

40

50

より、相対湿度約100%を含む標準的な大気条件を言う。

【0045】

「ED₅₀」は、最大応答または最大効果の50%を生じる薬物用量を意味する。

【0046】

「有効量」とは、意図した結果（哺乳動物腎臓由来細胞の増殖を含む）を出すために、すなわち、疾患もしくは状態を、本発明の細胞、調合物、および、組成物により治療するために、または、治療すべき患者内の細胞を移植するのを達成するために有効な増殖因子、サイトカイン、細胞、調合物、または、組成物のような成分の濃度を言う。増殖因子、サイトカイン、細胞、調合物、または、組成物のような成分の有効量は、細胞増殖速度、および/または、細胞の分化状態での変化をもたらす。

10

【0047】

「投与すること」または「投与」とは、治療目的で、本発明の細胞、調合物、または、組成物を患者に送達する過程を言う。細胞、調合物、または、組成物を、非経口（例えば、静脈内および動脈内経路、ならびに、他の適切な非経口経路）、経口、皮下、吸入、または、経皮を含む多くの方法で投与することができる。本発明の細胞、調合物、および、組成物は、患者の臨床状態、投与の部位および方法、用量、患者の年齢、性別、体重、および、医師にとって既知の他の因子に配慮した適正な医療行為にしたがって投与される。

【0048】

「動物」または「哺乳動物患者」とは、哺乳動物、好ましくはヒト、靈長類、ラット、または、マウスのような哺乳動物を言う。同様に本発明の方法により治療されるべき「患者（“subject” or “patient”）」は、本発明の細胞、調合物、組成物による治療（予防的な治療を含む）が提供される、ヒトまたはヒトではない動物のいずれかを意味することができる。特定の動物（例えば、ヒトの患者）に特異的な状態または疾患状態の治療については、その用語はその特定の動物を指す。「ドナー」とは、患者における使用のために腎臓細胞または腎細胞を提供する個体（ヒトを含む動物）を言う。

20

【0049】

「移植する（“transplanting”、“grafting”）」、「植え込む（“implanting”）」、「移植（“transplantation”、“graft”）」は、好ましい効果（例えば、患者の組織への損傷を修復すること、あるいは、例えば、事故または他の活動により引き起こされた、器官もしくは組織への疾患、傷害もしくは外傷、遺伝的損傷、または、環境発作を治療すること）を細胞が示すことが意図される患者の体内の部位に、本発明の細胞、調合物、および、組成物を送達する過程を述べるために用いられる。また、移植に影響を与える体の適切な部位への細胞遊走による任意の投与形式によって、細胞、調合物、および、組成物を体の離れた部位に送達することもできる。

30

【0050】

「外植片」とは、体から採取され、人工培地内で育てられた器官の部分を言う。

【0051】

「生体外で（“ex vivo”）」とは、体から採取され、試験管内で一次的に培養され、体に戻された細胞を言う。

【0052】

40

「本質的に」「本質的に有効」、または、「本質的に純粋」とは、少なくとも20+%、30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80+%、85+%、90+%、または、95+%有効であり、より好ましくは少なくとも98+%有効であり、最も好ましくは99+%有効である細胞集団、または、方法を言う。したがって、所与の細胞集団を濃縮するための方法は、標的細胞集団の少なくとも約20+%、30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80%、85%、90%、または、95%が濃縮され、好ましくは細胞集団の少なくとも約98%が濃縮され、最も好ましくは細胞集団の少なくとも約99%が濃縮される。ある実施態様では、本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団の濃縮された集団における細胞は、本質的に哺乳動物腎臓由来細胞（例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つ

50

の発現について陰性である細胞)から成る。

【0053】

「単離された」または「精製された」とは、天然状態から「人の手により」変化させることを言う。すなわち、天然で生じた任意のものを、それが元の環境から除去された場合、「単離された」または両方として定義する。また、「単離された」は、混入物(すなわち、細胞とは異なる物質)から分離された組成物(例えば、哺乳動物腎臓由来細胞集団)も定義する。ある態様では、細胞集団または組成物は、天然では関係しているかもしれない細胞や材料を実質的に含まない。哺乳動物腎臓由来細胞に関して、「単離された」もしくは「精製された」または「実質的に純粋」とは、全細胞集団を構成する哺乳動物腎臓由来細胞集団に関して、少なくとも約50%、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、および、最も好ましくは少なくとも95%純粋である、哺乳動物腎臓由来細胞集団を言う。言い換えると、用語「実質的に純粋」とは、続いて起こる培養および増幅の前の、元の増幅されていない単離された集団における、系統にコミットした腎細胞を、約50%未満、好ましくは約30%未満、好ましくは約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは5%未満含む、本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団を言う。細胞集団または細胞組成物の純度を、本分野で周知の適切な方法により判定することができる。

10

【0054】

「遺伝子治療」とは、疾患または異常の治療処置のための細胞に、新しい遺伝情報を伝達し、安定に挿入することを言う。本明細書の観点では、哺乳動物患者に遺伝子治療を投与するための様々な方法が、本分野の当業者にとって明らかであるだろう。遺伝子治療技術は、本明細書において説明されている。外来遺伝子を、伝達遺伝子を細胞集団全体に導入するために増殖される細胞へ伝達する。したがって、外来遺伝子を潜在的に発現するだろう様々な系統を產生するだろうから、本発明の細胞および組成物は、遺伝子伝達の標的であることができる。

20

【0055】

本発明の方法にしたがって精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団、または、それらの前駆体は、腎臓の異常(例えば、虚血性腎損傷、腎臓機能不全、腎移植、または、腎臓細胞がん)を治療するために用いることができる。細胞もしくは組織、または、それから再生された機能性腎組織を、腎臓機能における急性または慢性の衰退を治療するために、患者に投与することができる。機能性腎臓細胞または再生した腎臓組織を、腎細胞のドナーまたは別の患者に植え込むことができる。また、腎臓細胞またはその前駆体を、人工腎臓系(例えば、中空で纖維のろ過システムを基にしたシステム)を構築するためにも用いることができる。

30

【0056】

本発明の細胞、細胞調合物、および、細胞組成物を、哺乳動物患者に投与される免疫原として用いることができる。本発明にしたがって得られた哺乳動物腎臓由来細胞集団の投与は、様々な方法により達成することができる。哺乳動物患者へ細胞を免疫源として投与する方法には、免疫化、直接接触による膜への投与(例えば、ふき取りまたはこすりつけ装置による)、粘膜への投与(例えば、エアロゾルによる)、および、経口投与が含まれるが、これに限定しない。免疫化は受動的または能動的であることができるし、腹腔内注射、皮内注射、および、局部注射を含む異なる経路を通じて、免疫化を起こすことができる。免疫化の経路およびスケジュールは、抗体刺激および產生のための一般的に確立された従来方法に従う。哺乳動物患者(特にマウス)、および、それ由来の抗体産生細胞は、哺乳動物ハイブリドーマ細胞株の產生のための基礎として役立つよう、操作することができる。

40

【0057】

本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団組成物は、疾患のモデルシステムを準備するために用いることができる。本発明の哺乳動物腎臓由来細胞組成物は、化合物を產生するためにも用いることができ、この化合物には、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、および、免

50

疫刺激化合物が含まれるが、これに限定されない。本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、VEGF、もしくは、MMP-2、または、それらの組み合わせを含むがこれに限定されない因子を分泌し、栄養因子PDGF-bb、もしくは、IL12p70、または、それらの組み合わせのうちの少なくとも1つを分泌しない。

【0058】

ある態様では、本発明は、哺乳動物腎臓由来細胞集団または哺乳動物の腎前駆細胞の増殖または分化に関する遺伝子、タンパク質、および、他の代謝物を、同定し培養することができる培養系を提供する。本発明の培養系における細胞は、哺乳動物腎臓由来細胞、または、哺乳動物の腎前駆細胞の產生を刺激するメカニズムおよび化合物を決定するために、他の細胞（例えば、分化した細胞）と比較することができる。

10

【0059】

本発明の細胞組成物は、哺乳動物腎臓由来細胞集団の分化で発現するか、または、その分化において重要な遺伝子をスクリーニングするために用いることができる。使用可能なスクリーニング方法は、差異表示分析(Representational Difference Analysis) (RDA)、または、例えばSA-lacZによるジントラップ法を含む。D. P. Hill and W. Wurst, 1993, *Methods in Enzymology*, 225: 664参照。ジントラップ法は、哺乳動物腎臓由来細胞の分化または活性に影響する優性変異を（例えば、遺伝子産物の特定部位を欠失させることにより）誘導するために用いることができ、また、これらの細胞の分化において発現するか、または、重要である遺伝子の同定を可能にするために用いることができる。

【0060】

20

増加した哺乳動物腎臓由来細胞数を含む本発明の増殖した細胞調合物を、患者の免疫系を高めるために用いることができる。細胞調合物は、患者の免疫系および/または腎臓系の強化、または、再構築を容易にするだろう。免疫原性抗原（例えば、ウイルス性、細菌性、寄生虫性、または、がん抗原）を発現するベクターにより、哺乳動物腎臓由来細胞集団を形質移入することができる。この形質移入された哺乳動物腎臓由来細胞集団を、疾患を患う哺乳動物患者を治療し、それにより、ウイルス疾患、細菌疾患、もしくは、寄生虫疾患を減少させるか、もしくは、取り除き、または、がんもしくは悪性新生物疾患を減少させるか、もしくは、取り除くために用いることができる。

【0061】

30

本発明は、更に、生物的な薬剤または薬理的な薬剤に対する細胞応答を特徴付けるために、哺乳動物腎臓由来細胞集団を用いる治療方法を提供する。その方法は、統計的に有意な個体集団から哺乳動物腎臓由来細胞を単離すること、哺乳動物腎臓由来細胞集団の細胞培養を複数確立するために、統計的に有意な個体集団から哺乳動物腎臓由来細胞を培養増殖すること、1つ以上の生物的な薬剤または薬理的な薬剤に、哺乳動物腎臓由来細胞培養物を接触させること、1つ以上の生物的な薬剤または薬理的な薬剤に対する1つ以上の細胞応答を同定すること、および、統計的に有意な集団における個体由来の哺乳動物腎臓由来細胞培養物の1つ以上の細胞応答を比較することを伴う。

【0062】

40

また、本発明は、治療のために、哺乳動物腎臓由来細胞、または、特異的に分化した哺乳動物腎臓由来細胞集団を用いる治療方法も提供し、その方法は、特異的に分化した細胞を患者に投与することを含む。それは更に、内因性遺伝子またはトランスジーンを選択的に発現するように遺伝子操作された哺乳動物腎臓由来細胞の使用、および、疾患を治療する目的で動物に移植/投与するために生体内で成長させた哺乳動物腎臓由来細胞集団の使用を提供する。例えば、哺乳動物腎臓由来細胞集団に由来する分化した細胞は、腎臓の尿細管、血管、間質、または糸球体構造に関する異常を治療するために用いることができる。例えば、糸球体基底膜の疾患（例えば、Alport症候群）、尿細管輸送異常（例えば、Bartter症候群、シスチン尿症、または、腎性尿崩症）、様々な病因の進行性腎疾患（例えば、糖尿病腎症、または、糸球体腎炎）、Fabry病、高シュウ酸尿症を治療するために、また、急性尿細管壞死からの回復を加速するために、その細胞を用いることができる。

【0063】

50

また、哺乳動物腎臓由来細胞集団に由来する分化した細胞は、急性腎不全、急性腎炎症候群、鎮痛薬腎症、アテローム腎疾患、慢性腎不全、慢性腎炎、先天性ネフローゼ症候群、末期腎疾患、Goodpasture症候群、IgM糸球体間質の増殖性糸球体腎炎、間質性腎炎、腎臓がん、腎がん、副腎腫、腎細胞腺がん、腎損傷、腎感染、腎傷害、腎臓結石、ループス腎炎、膜性増殖性GN I、膜性増殖性GN II、膜性腎症、微小変形群、壊死性糸球体腎炎、腎芽細胞腫、腎石灰沈着症、腎性尿崩症、腎症-IgA、ネフローゼ（ネフローゼ症候群）、多発性囊胞腎、連鎖球菌感染後GN、逆流性腎症、腎動脈塞栓症、腎動脈狭窄、腎臓異常、腎乳頭壊死、腎尿細管アシドーシスI型、腎尿細管アシドーシスII型、腎臓下部灌流（renal underperfusion）、または、腎静脈血栓症のような異常を治療するために用いることができる。

10

【0064】

哺乳動物腎臓由来細胞集団は、哺乳動物に細胞を生着するために用いることができ、組織特異的な代謝機能、酵素機能、構造機能、または、他の機能を回復するか、または、修正するために自家細胞、同種細胞、または、異種細胞を哺乳動物に投与することを含む。細胞を、細胞型の生体内での分化を引き起こすように、哺乳動物に生着するために用いることができ、また、哺乳動物腎臓由来細胞を哺乳動物に投与するために用いることができる。細胞、または、試験管内もしくは生体内で分化した子孫細胞は、遺伝的疾患、退行性疾患、または、がん疾患の過程を修正するために用いることができる。

【0065】

哺乳動物腎臓由来細胞集団を、例えば、がんの治療、自己免疫疾患の治療における化学療法もしくは放射線療法からの患者の回復に役立つための治療薬、または、レシピエントにおける耐性を誘導するための治療薬として用いることができる。

20

【0066】

本発明は更に、哺乳動物腎臓由来細胞集団の遺伝子プロファイリングの方法、および、データバンクにおけるこの遺伝子プロファイリングの使用を提供する。また、薬物探索に役立つデータベースで遺伝子プロファイリングした哺乳動物腎臓由来細胞の使用を提供する。

【0067】

本発明は更に、人工腎臓を形成するために、キャリア装置または足場と併用して、哺乳動物腎臓由来細胞から分化した哺乳動物腎臓由来細胞集団または細胞を用いることを提供する。適切なキャリア装置は、本分野で周知である。例えば、キャリア装置は、分化した哺乳動物腎臓由来細胞集団とともに用いる場合、中空で纖維基材の装置ができる。本発明は更に、中空で纖維基材の装置の内側を覆う単離された哺乳動物腎臓由来細胞集団に生体外の血液を接触させることにより、患者の血液から毒素を除去するための方法を提供する。

30

【0068】

その上、上記に説明した方法において、許容可能なマトリックス（例えば、薬学上許容可能なマトリックス）とともに細胞を投与する。マトリックスは生物分解性であることができる。また、マトリックスは、追加的な遺伝物質、サイトカイン、増殖因子、または、細胞の成長および分化を促進するような他の因子も提供する。また、細胞は、投与の前にカプセル化することもできる。カプセル化した細胞を、ポリマーカプセル内に含むことができる。

40

【0069】

本明細書中で説明されるキャリア装置、足場、または、マトリックスを準備するために用いられるポリマーは、生体分解性であり、生体適合性である。生体分解性ポリマーは、湿った体の組織にさらされると小さな断片へと急速に分解する。断片はその後、体内に吸収されるか、体を通過するかのいずれかである。特に、生体分解した断片は、体に吸収されるか、または体を通過し、その結果、断片の永続的な形跡または残渣は全く体に保有されていないため、永続的な慢性異物反応を誘発しない。

【0070】

50

使用可能な適切な生体適合性・生体吸収性ポリマーの例には、脂肪族ポリエステル、ポリ(アミノ酸)、コポリ(エーテル-エステル)、ポリアルキレンオキサレート、ポリアミド、ポリ(イミノカーボネート)、ポリオルトエステル、ポリオキサエステル、ポリアミドエステル、アミン基を持つポリオキサエステル、ポリ(無水物)、ポリホスファゼン、生物分子、および、それらの混合物から成る群から選択されるポリマーが含まれる。本発明ために、脂肪族ポリエステルには、ラクチド(乳酸、D-ラクチド、L-ラクチド、および、メソラクチドを含む)、グリコリド(グリコール酸を含む)、-カプロラクトン、p-ジオキサン(1,4-ジオキサン-2-オン)、トリメチレンカーボネート(1,3-ジオキサン-2-オン)、トリメチレンカーボネートのアルキル誘導体、-バレロラクトン、-ブチロラクトン、-ブチロラクトン、-デカラクトン(epsilon-decalactone)、ヒドロキシ酪酸塩(反復単位)、ヒドロキシ吉草酸塩(反復単位)(hydroxyvalerate(repeating units))、1,4-ジオキセパン-2-オン(1,4-dioxepan-2-one)(その二量体1,5,8,12-tetraoxacyclotetradecane-7,14-dione)を含む)、1,5-ジオキセパン-2-オン、6,6-ジメチル-1,4-ジオキサン-2-オン、2,5-ジケトモルホリン(2,5-diketomorpholine)、ピバロラクトン(pivalolactone)、-ジエチルプロピオラクトン(alpha, alpha-diethylpropiolactone)、エチレンカーボネート、エチレンオキサレート(ethylene oxalate)、3-メチル-1,4-ジオキサン-2,5-ジオン、3,3-ジエチル-1,4-ジオキサン-2,5-ジオン、6,8-ジオキサビシクロオクタン-7-オン(6,8-dioxabicyclooctane-7-one)、および、それらのポリマー混合物のホモポリマーおよびコポリマーが含まれるが、これに限定されない。
10

【0071】

1つの実施態様では、本発明のために有用なポリマーは、脂肪族ポリエステルであって、脂肪族ポリエステルには、ラクチド(乳酸、D-ラクチド、L-ラクチド、および、メソラクチドを含む)、グリコリド(グリコール酸を含む)、-カプロラクトン、p-ジオキサン(1,4-ジオキサン-2-オン)、トリメチレンカーボネート(1,3-ジオキサン-2-オン)、トリメチレンカーボネートのアルキル誘導体、-バレロラクトン、-ブチロラクトン、-ブチロラクトン、-デカラクトン、ヒドロキシ酪酸塩(反復単位)、ヒドロキシ吉草酸塩(反復単位)、1,4-ジオキセパン-2-オン(その二量体1,5,8,12-tetraoxacyclotetradecane-7,14-dione)を含む)、1,5-ジオキセパン-2-オン、6,6-ジメチル-1,4-ジオキサン-2-オン、2,5-ジケトモルホリン(2,5-diketomorpholine)、ピバロラクトン(pivalolactone)、-ジエチルプロピオラクトン(alpha, alpha-diethylpropiolactone)、エチレンカーボネート、エチレンオキサレート(ethylene oxalate)、3-メチル-1,4-ジオキサン-2,5-ジオン、3,3-ジエチル-1,4-ジオキサン-2,5-ジオン、6,8-ジオキサビシクロオクタン-7-オン(6,8-dioxabicyclooctane-7-one)、および、それらのポリマー混合物のホモポリマーおよびコポリマーが含まれるが、これに限定されない。別の実施態様では、天然ポリマーも本発明のために適しており、この天然ポリマーには、コラーゲン、ゼラチン、キチン、ヒアルロン酸、エラスチン、フィブロネクチンおよび同様のものが含まれるが、これに限定されない。合成および天然ポリマーの組み合わせも用いることができる。
20

【0072】

遺伝子治療の別の適用は、細胞中に薬物耐性遺伝子を伝達することにより、正常な哺乳動物腎臓由来細胞に薬剤耐性を提供することによって、通常危険であると見なされる高濃度の薬物の使用を可能にする。特に、抗がん薬に対する薬物耐性を有する遺伝子を伝達することにより(例えば、哺乳動物腎臓由来細胞を含む増殖した細胞調合物へ、複数の薬物耐性遺伝子を伝達すること)、高濃度の抗がん薬を用いた治療を実行することができる。
40

【0073】

腎臓系に関連する以外の疾患は、分泌タンパク(例えば、ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子および同様のもの)の欠乏に関する疾患であれば、哺乳動物腎臓由来細胞集団を含む増殖した細胞調合物を用いることにより治療することができる。不足したタンパク質は、適切なプロモーターの制御下にある哺乳動物腎臓由来細胞集団へ、標的タンパク質をコードした遺伝子を伝達することにより、誘導し、発現することができる。タンパク
50

質の発現を、生体内での天然の発現により得られるのと同じ活性を得るために制御することができる。

【0074】

また、細胞における特定の遺伝子産物の発現を制御するため、または、病気に対する感受性を抑制するために、リボザイム、アンチセンス核酸、もしくは、同様のものをコードする遺伝子、または別の適切な遺伝子を、遺伝子哺乳動物腎臓由来細胞集団へ挿入することも可能である。例えば、哺乳動物腎臓由来細胞集団を、腎臓における病原（HIV、HTLV-I、および、HTLV-IIを含むが、これに限定されない）の成長を妨げることができるアンチセンス核酸またはリボザイムを発現するために、遺伝子改良することができる。

【0075】

哺乳動物腎臓由来細胞集団を含む細胞調合物を、例えば、従来の静脈内投与により、細胞を移植するレシピエントである哺乳動物患者に導入することができる。

【0076】

本発明は、哺乳動物腎臓由来細胞を形成する能力を有する細胞の増殖、分化、または、生存に影響を与える薬剤を同定するための方法を特色とする。このような薬剤の例は、小分子、抗体、および、細胞外タンパク質である。同定された薬剤を、動物における安全性および効率についてプロファイリングし、評価することができる。別の態様では、本発明は、上記の方法により同定された薬剤に細胞を接触させることによって、哺乳動物腎臓由来細胞集団を形成する能力を有する細胞の増殖、分化、または、生存に影響を与える方法を予定する。同定した薬剤を、製薬調合物として処方することができる。

【0077】

哺乳動物腎臓由来細胞集団の遺伝子操作

本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団を、任意の様々なベクターを用いて操作することができる。そのベクターは、組込みウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクターもしくはアデノ随伴ウイルスベクター）、非組込み複製ベクター（例えば、パピローマウイルスベクター、SV40ベクター、アデノウイルスベクター）、または、複製欠損ウイルスベクターを含むが、これに限定されない。DNAを細胞に導入する他の方法には、リポソーム、エレクトロポレーション、パーティクルガンの使用、または、ダイレクトDNAインジェクションによるものが含まれる。

【0078】

好ましくは、プロモーターまたはエンハンサー配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位、および、特に選択マーカーのような、1つ以上の適切な発現調節因子により制御されたDNAにより、または、それらに効果的に関係して制御されたDNAにより、宿主細胞を形質転換または形質移入する。

【0079】

外来DNAの導入後、操作された細胞は、濃縮培地で成長し、その後、選択培地に移すことができる。外来DNA中の選択マーカーは、選択に対して耐性を与え、細胞の染色体に外来DNA（例えば、プラスミド）を安定に組み込み、順にクローン化し、細胞株へと増殖することができる病巣（foci）を形成するように、細胞を育てることを可能にする。この方法は、遺伝子産物を発現する細胞株を操作するために有利に用いることができる。

【0080】

任意のプロモーターは、挿入遺伝子の発現を駆動するために用いることができる。例えば、ウイルスプロモーターには、CMVプロモーター／エンハンサー、SV40、パピローマウイルス、エブスタイン・バーウイルス、または、エラスチン遺伝子プロモーターが含まれるが、これに限定されない。好ましくは、目的の遺伝子の発現を制御するために用いられる制御因子により、遺伝子の調節された発現が可能になるべきであり、その結果、産物は生体内で必要な場合のみ合成される。一過性の発現が望ましい場合、好ましくは、非組込みおよび／または複製欠損ベクター中に構成プロモーターを用いる。あるいは、必要な場合、誘導プロモーターを、挿入遺伝子の発現を推進するために用いることができる。

【0081】

10

20

30

40

50

誘導プロモーターには、メタロチオネインおよび熱ショックタンパク質と関連したものが含まれるが、これに限定されない。組織特異性を示す転写制御部位の例が説明されている。例えば、エリスロポエチンプロモーターは、腎組織に特異的であり、high-capacity (type 2) $\text{Na}^+/\text{glucose}$ cotransporter遺伝子 (Sglt2) は、腎臓の初期近位尿細管においてのみ発現する遺伝子であり、human organic anion transporter 3 (hOAT3/SLC22A8) は、腎臓の近位尿細管において、主に発現する。

【0082】

本発明の細胞を、植え込み部位での炎症または拒絶を促進する因子の発現を「ノックアウト」するように遺伝子操作することができる。標的遺伝子発現レベルまたは標的遺伝子産物の活性レベルを減少させるための負の調節技術を以下に説明する。本明細書で用いる「負の調節」とは、調節処理がない標的遺伝子産物のレベル、および／または、その活性と比較した際の標的遺伝子産物のレベル、および／または、その活性の減少を言う。哺乳動物腎臓由来細胞に存在する遺伝子の発現を、多くの技術 [例えば、相同組換え技術を用いて完全に遺伝子を不活性化することによる発現の抑制 (一般的に「ノックアウト」と呼ばれる) を含む] を用いて減少、または、ノックアウトすることができる。通常、陽性選択マーカー (例えば、neo) により、標的遺伝子に由来する正常なmRNAの産生を阻害し、結果的に遺伝子の不活性化を生じることで、タンパク質の重要な領域をコードするエキソンが阻害される。また、遺伝子の一部を欠失させることにより、または、遺伝子全体を欠失させることにより、遺伝子は不活性化される。ゲノム内で非常に離れた標的遺伝子に対してホモロジーの 2 つの領域を備えたコンストラクトを使用することにより、2 つの領域に介在する配列を欠失させることができる (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084 参照)。

10

20

30

【0083】

また、標的遺伝子活性のレベルを減少させるために、標的遺伝子の発現を抑制するアンチセンス、DNAザイム、および、リボザイム分子を、本発明にしたがって用いることができる。例えば、主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) の発現を抑制するアンチセンスRNA分子は、免疫応答の観点で、最も多用途であることが示されている。アンチセンスRNA分子には、SiRNAオリゴヌクレオチド、または、SiRNAオリゴヌクレオチドを産生するcDNAが含まれるが、これに限定されない。更に、三重らせん分子は、標的遺伝子活性のレベルを減少させる際に利用することができる。

【0084】

これらの技術は、L.G. Davis et al. 編著、1994, *Basic Methods in Molecular Biology*, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. に詳細に説明されており、参照により全体を本明細書に組み入れる。

【0085】

本発明の細胞が遺伝子操作されたならば、抗炎症遺伝子産物 (例えば、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、または、他の炎症サイトカインについての中和抗体のイディオタイプに対応するペプチドまたはポリペプチド) を産生することにより、腎疾患の病徴を改善することを可能にするために、患者にそれらを直接植え込むことができる。

【0086】

40

あるいは、上記のような、患者にその後植え込まれる新しい組織を試験管内で産生するために、遺伝子操作された細胞を用いることができる。

【0087】

移植のための哺乳動物腎臓由来細胞集団の使用

本発明の治療方法は、哺乳動物腎臓由来細胞集団、または、個体へと分化形質転換した細胞の植え込みを伴う。本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団 (例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1 のうちの少なくとも 1 つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4 のうちの少なくとも 1 つの発現について陰性である細胞集団) は、その細胞集団が、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、または、CD86 のうちの少なくとも 1 つについて陰性である

50

という発見により証明されるように、同種または自家のものであり、治療上必要とされる部位またはその部位の「ホーム」へと、その細胞集団を送達することができる。本発明の細胞はその場で分化し、または、内因性細胞へ栄養的な補助を提供することができる。ヒトにおける適切な細胞植え込み用量を、腎疾患または虚血を治療するための細胞の活性（例えば、GDF5産生）または細胞密度のいずれかに関連して存在する情報から決定することができる。試験管内培養および生体内動物実験から、産生されたホルモンの量が定量され、それは植え込まれた材料の適当用量を計算する際に用いることができる。その上、追加的な植え込みがなされるか、または、植え込まれる材料を結果的に減らすかどうかを決定するために、患者をモニターすることができる。

【0088】

10

植え込まれた細胞の分化、生存、または、活性を高めるために、追加の因子を加えることができる。その因子には、増殖因子（例えば、形態形成タンパク質、または、コルチコステロイド）、抗酸化剤もしくは抗炎症剤（例えば、シクロスボリン、スタチン、ラバマイシン、および、p38キナーゼインヒビター）が含まれる。

【0089】

移植した細胞の血管新生および生存を高めるために、血管新生因子（例えば、VEGF、PDGF、または、FGF2）を単独で、または、その因子と、CD34+、CD34+/CD117+細胞を含む内皮細胞もしくはその前駆体、ヒト臍帯組織由来細胞、馴化培地、細胞または細胞可溶化物により生み出された細胞外マトリックスとの組み合わせを加えることができる。

【0090】

20

哺乳動物腎臓由来細胞集団を、疾患、または、結果的に、罹患または低下した平均余命を生ずるような慢性状態を治療するために、用いることができる。これらの状態および疾患には、急性腎不全、急性腎炎症候群、鎮痛薬腎症、アテローム腎疾患、慢性腎疾患、慢性腎炎、先天性ネフローゼ症候群、末期腎疾患、Goodpasture症候群、IgM糸球体間質の増殖性糸球体腎炎、間質性腎炎、腎臓がん、腎がん、副腎腫、腎細胞腺がん、腎損傷、腎感染、腎傷害、腎臓結石、ループス腎炎、膜性増殖性GN I、膜性増殖性GN II、膜性腎症、微小変形群、壊死性糸球体腎炎、腎芽細胞腫、腎石灰沈着症、腎性尿崩症、糖尿病網膜症、腎症 - IgA、ネフローゼ（ネフローゼ症候群）、多発性囊胞腎、連鎖球感染後GN、逆流性腎症、腎動脈塞栓症、腎動脈狭窄、腎臓異常、腎乳頭壊死、腎尿細管アシドーシスI型、腎尿細管アシドーシスII型、腎臓下部灌流、または、腎静脈血栓症が含まれるが、これに限定されない。臨床管理戦略は、しばしば、損傷された組織（例えば、尿細管、糸球体、ニューロン、グリア細胞、心筋）の置換または修復よりもむしろ、更なる損傷または傷害を妨げることに重点を置く。臨床管理戦略は、外因性ステロイド、および、合成非細胞性調合薬により治療することを含み、様々な成功度を有し、この成功度は、ステロイドまたは合成薬の持続的投与次第であることができる。

【0091】

30

1つ以上の他の成分を、移植した細胞に加えることができ、それには、本分野で既知の1つ以上の種類のコラーゲンのような選択された細胞外マトリックス成分、および/または、増殖因子、多血小板血漿、および、薬物が含まれる。細胞处方に通常組み入れることができる増殖因子には、本分野で既知の、あるいは、将来同定されるであろう1つ以上の組織増殖因子が含まれ、それらには、BMPs、GDFs、IGF-I、IGF-II、または、成長ホルモンが含まれるが、これに限定されない。あるいは、本発明の細胞を、栄養因子を発現し產生するために遺伝子操作することができる。本発明の細胞の遺伝子操作の詳細は、開示の中に提供され、本分野の当業者には既知である。細胞处方に有用に組み込まれてもよい薬物には、抗炎症化合物、血管新生促進化合物、抗アポトーシス化合物、ならびに、局部麻酔薬が含まれる。

【0092】

40

移植のための哺乳動物腎臓由来細胞集団のカプセル化
哺乳動物腎臓由来細胞集団、例えば、その細胞集団は、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2

50

、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性であり、また、その細胞集団が、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、または、CD86のうちの少なくとも1つについて陰性であるという発見により証明されているように同種または自家のものであり、混合リンパ球反応において観察されるように免疫系において認識されなくてもよいし、免疫応答を減らすものであってもよい。

【0093】

好ましくは、分化した細胞は、免疫拒絶を避けるよう治療される患者に由来する。しかしながら、自家細胞が利用可能でない場合、細胞が必要とする栄養および酸素、ならびに、細胞が分泌する治療因子（例えば、ホルモンまたはBMP-7、GDF5）を透過するが、免疫体液因子および細胞を透過しないカプセルの中に分化した細胞をカプセル化することが有用であるかもしれない。好ましくは、カプセルの材料は、低刺激性であり、標的組織に簡単に安定に位置付けられ、植え込まれた構造に更なる保護を提供する。

【0094】

免疫拒絶からの保護もまた、本分野で既知の任意の方法にしたがって、分化した細胞の遺伝子改良により提供することができる。自己抗体およびCTL耐性細胞を、米国特許第5,286,632号、同第5,320,962号、同第5,342,761号、国際公開第90/11354号、同92/03917号、同93/04169号、同95/17911号に開示されたような方法を用いて產生することができる。あるいは、分化形質転換された耐性細胞の選択は、自己抗体、または、IDD関連CTLもしくはIDD特異的自己抗原で活性化されたCTLの存在下で、これらの細胞を培養することによって達成される。これらの技術の結果として、抗体またはTリンパ球によるメカニズム依存性の破壊に対して、向上した耐性を有する細胞が生成される。このような細胞は、本明細書で開示したような適切な宿主における適切な組織に植え込まれることができ、自己免疫過程による破壊に対して向上した耐性を有する。

【0095】

同様に、分化した細胞のヒト白血球抗原（HLA）プロファイルを、選択的に反復過程により、改良することができる。その過程において、分化した細胞を正常な同種リンパ球に曝露し、生存細胞を選択する。あるいは、分化した細胞の表面からHLAマーカーを取り除くために、部位特異的な突然変異誘発アプローチが用いられ、それにより生み出された改良された分化細胞は、このような植え込みの必要性に応じて、レシピエント哺乳動物に植え込まれる。

【0096】

具体例では、ネオマイシン耐性遺伝子neoを運ぶアデノ随伴ウイルス（AVV）ベクターシステムを用いる。AAVを、真核細胞に形質移入するために用いることができる（Laface et al. (1988) *Virology* 162:483参照）。その上、フレオマイシン耐性遺伝子を運ぶpBABE-bleoシャトルベクターシステムが用いられる（Morgenstein et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3587参照）。このシャトルベクターを、本明細書で説明するように、ヒト細胞を有用な遺伝子で形質転換するために用いることができる。

【0097】

哺乳動物腎臓由来細胞集団の冷凍保存および預け入れ

本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、冷蔵保存し、「細胞銀行」で維持または保管することができる。本発明の細胞の冷凍保存は、既知の方法にしたがって実行することができる。例えば、限定するものではないが、細胞は、5~10%グリセロールとともに、または、グリセロールを含まないで、0~95%FBS、および、冷凍保護剤の0~10%ジメチルスルホキシド（DMSO）を更に含む培養培地のような「凍結培地」に、例えば、約0.5~10×10⁶細胞 / mLの密度で懸濁することができる。あるいは、炭水化物（グルコース、スクロース、マルトース、および、トレハロースを含むが、これに限定されない）のような他の冷凍保護剤を用いてもよい。細胞をガラスもしくはプラスチック製のアンプル、または、他の容器に分注し、その後封をし、速度制御された冷凍庫の冷凍室に移す。冷凍の最適な速度は、実験的に決定することができる。プログラム可能速度の冷凍庫は、例えば、融解熱を通じて-1~-10 / 分の温度変化を与えることができるものを用いることができる。

10

20

30

40

50

アンプルを-180℃にした後、液体窒素保存場所に移す。冷凍保存された細胞は、何年もの期間保管することができるが、生存率を維持するために少なくとも5年ごとに確認すべきである。

【0098】

本発明の冷凍保存された細胞は、細胞の銀行を構成し、その一部を、解凍することにより「引き出す」ことができ、その後必要とされるように用いられることができる。解凍することは、概して、例えば、アンプルを液体窒素から37℃水浴に移すことにより、迅速に実行されるべきである。解凍されたアンプルの中身は、10%FBSで調整されたDMEMのような適切な培地を含む培養容器に、無菌条件下で即座に移されるべきである。

【0099】

薬物効果または毒性の試験管内スクリーニングのための哺乳動物腎臓由来細胞集団の使用

本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団を、調合薬、増殖/調節因子、および、抗炎症剤の効果および細胞毒性について、非常に様々な化合物をスクリーニングするために、試験管内で用いることができる。この目的のために、本発明の細胞、または、上記の組織培養物は、試験管内で維持され、試験されるべき化合物にさらされる。細胞毒性化合物の活性は、培養中で細胞を損傷または殺す能力により測定することができる。このことは、生体染色技術により簡便に評価することができる。増殖/調整因子の効果は、試験管内の生細胞数を分析することにより（例えば、全細胞計数、および、差異のある細胞計数により）、評価することができる。このことは、標準の細胞学的および/または組織学的な技術（タイプ特異的細胞抗原を規定する抗体を用いる免疫細胞化学技術の使用を含む）を用いて達成することができる。上記の懸濁培養または三次元システムのいずれかにおいて、本発明の細胞に対する様々な薬物の効果を判定することができる。

【0100】

本発明の細胞および組織を、生理的または病理的条件の研究のためのモデルシステムとして用いることができる。例えば、本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、例えば、急性腎不全、慢性腎不全、腎臓がん、腎がん、副腎腫、腎細胞の腺がん、腎臓損傷、腎感染、腎傷害、腎臓結石、ループス腎炎、多発性囊胞腎、または、腎静脈血栓症のような疾患状態を研究するために用いることができる。

【0101】

また、本発明の細胞および組織を、サイトカイン、増殖因子（例えば、EPO）、および、炎症メディエーター（例えば、IL-1、TNFおよびプロスタグランジン）の作用のメカニズムを研究するためにも用いることができる。その上、細胞毒性および/または調合薬は、腎疾患または腎虚血を逆転させるか、減少させるか、または、妨げ、さもなくば、腎組織の調和した成長を高めるもののような、特定の患者に対して最も効果的であるものについてスクリーニングされることができる。試験管内で効果が証明された薬剤は、その後、治療的に患者を治療するために用いることができるだろう。

【0102】

生物分子を産生するための哺乳動物腎臓由来細胞集団の使用

更なる実施態様では、本発明の哺乳動物腎臓由来細胞集団は、高収量で生物産物を産生するために、試験管内で培養することができる。例えば、特定の目的の生物産物（例えば、増殖因子、調節因子、または、ペプチドホルモン）を天然に産生するか、あるいは生物産物を産生するよう遺伝子操作されたかのいずれかのこのようないい細胞は、例えば、三次元細胞培養システムを用いて、クローン的に増殖することができる。細胞が栄養培地に生物産物を排出する場合、標準分離技術（例えば、数例をあげると、ディファレンシャルタンパク質沈降、イオン交換クロマトグラフィ、ゲルろ過クロマトグラフィ、電気泳動、および、HPLC）を用いて、使用済みの培地または馴化培地から、産物を簡単に単離することができる。「バイオリアクター」は、供給のためのフロー法を利用するため用いることができる（例えば、試験管内の三次元培養）。

【0103】

10

20

30

40

50

本質的に、新鮮な培地が三次元培養物中を通っているので、生物産物は、培養物から洗い出され、その後、上記のように外部流から単離することができる。

【0104】

あるいは、目的の生物サンプルは、細胞の中に残ったままであることができ、したがって、その収集のために、細胞を可溶化することが必要である可能性がある。その後、1つ以上の任意の上記に述べた技術を用いて、生物産物を精製することができる。

【0105】

投与方法

本明細書で説明した方法において、哺乳動物腎臓由来細胞集団（例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞）の治療上効果的な量は、患者により安全に受容される細胞の最大数から、虚血性腎組織における新しい血管形成の誘導のため、または、虚血性腎組織への血流量をたかめるためのいいずれかか、腎被膜下部位、腎皮質、または、腎髓質組織を修復または再生するか、のために必要とされる細胞の最小数までの範囲であることができる。概して、哺乳動物腎臓由来細胞集団の治療上有効な量は、患者の体重kg当たり少なくとも 1×10^4 細胞であり、最も一般的には、各細胞型 1×10^7 細胞/kgよりも多い必要はない。好ましくは、哺乳動物腎臓由来細胞集団は、自家であるかまたは患者とHLA適合性であるが、他の個体もしくは種、または、遺伝子操作した近交ドナー系統、または、試験管内での細胞培養から、哺乳動物腎臓由来細胞集団を単離することができる。単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団は、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、または、CD86について陰性である。細胞集団は、哺乳動物患者における同種移植について非免疫原性である。

10

20

30

【0106】

哺乳動物腎臓由来細胞集団の治療上有効な量は、製薬上許容可能なキャリアまたは賦形剤中に懸濁することができる。このようなキャリアには、基本の培養培地に、1%血清アルブミン、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、コラーゲン、アルギン酸、ヒアルロン酸、フィブリリン接着剤、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、および、それらの組み合わせを加えたものを含むが、これに限定されない。処方は投与の形式に適するべきである。したがって、本発明は、ヒトの腎臓由来細胞集団（例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞）を、患者における虚血性腎組織を治療するための医薬の製造のために產生するヒト腎組織の使用を提供する。いくつかの実施態様では、医薬は、更に、増殖因子、ケモカイン、または、サイトカインのような組換えポリペプチドを含む。更なる実施態様では、医薬は、ヒト腎臓由来細胞集団を含む。医薬を製造するために用いられる細胞は、本明細書で説明した方法のために提供される様々なもののうちいいずれかを用いて、単離され、由来し、または、濃縮することができる。

40

【0107】

哺乳動物腎臓由来細胞調合物、または、組成物は、ヒトへの静脈内投与のために適した製薬組成物として、通常の手順にしたがって処方される。一般的に、静脈内投与、動脈内投与、または、腎被膜内への投与のための組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。また、必要ならば、組成物は、注入部位での任意の痛みを寛解させるための局所麻酔剤も含むことができる。概して、成分は、別々に、または、単位用量の形（例えば、活性薬剤の量を示すアンプルのような密閉容器中の冷凍保存された濃縮物として）でともに混ぜてのいいずれかで、供給される。組成物が注入により投与される場合、無菌医薬品グレードの水または生理食塩水を含む注入ボトルで分注することができる。組成物が注射により投与される場合、注射のための無菌水または生理食塩水のアンプルが提供され、それにより投与の前に成分を混ぜることができる。

50

【0108】

製薬上許容可能なキャリアは、組成物を投与するために用いられる特定の方法により決定されるのと同様に、投与される特定の組成物により部分的に決定される。したがって、非常に様々な製薬組成物の適切な処方がある [例えば、Alfonso R Gennaro編著Remington : The Science and Practice of Pharmacy (前著、Remington's Pharmaceutical Sciences 20th ed.) Lippincott, Williams & Wilkins, 2003 を参照のこと。これは、参照により本明細書に全体を組み入れる。] 。製薬組成物は、概して無菌で実質的に等張なものとして処方され、また、米国食品医薬品局の優良製造規範 (GMP) 規則のすべてを完全に遵守して処方される。

【0109】

患者に細胞を投与するための様々な方法は、本明細書の観点では、本分野の当業者に明らかだろう。このような方法には、患者における標的部位への細胞の注入が含まれる。細胞は、患者への注入または植え込みによる導入を容易にする送達装置に挿入することができる。このような送達装置には、レシピエント患者の体に細胞および液体を注入するためのチューブ (例えば、カテーテル) が含まれる。好ましい実施態様では、チューブは、さらに針 (例えば、シリソル) を有し、この針を通じて、本発明の細胞を患者の望ましい部位へ導入することができる。好ましい実施態様では、哺乳動物腎臓由来細胞集団を、カテーテルを通じた血管への投与のために処方してもよい (ここで、用語「カテーテル」とは、血管に物質を送達するための任意の様々なチューブ状システムを含むことを意図する) 。あるいは、細胞を、足場の中またはその上に挿入することができる。足場には、織物、編み物、組み物、メッシュ、不織布のような織物構造、穴の開いたフィルム、スポンジ、フォーム、中空でないまたは多孔質のビーズのようなビーズ、マイクロ粒子、ナノ粒子、ならびに、同様のものが含まれるが、これに限定されない。細胞を、様々な異なった形式で送達するために調製することができる。例えば、細胞は溶液またはゲルの中に懸濁することができる。本発明の細胞が生存したままである製薬上許容可能なキャリアまたは希釈剤とともに、細胞を混ぜることができる。製薬上許容可能なキャリアおよび希釈剤には、生理食塩水、水性緩衝液、溶媒、および / または、分散媒が含まれる。このようなキャリアおよび希釈剤の使用は、本分野では周知である。溶液は、好ましくは、無菌の流体であり、しばしば等張であるだろう。好ましくは、溶液は製造および保管条件下で安定であり、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール、および、同様のものの使用により、細菌や真菌のような微生物の汚染活動から保存される。

【0110】

哺乳動物腎臓由来細胞集団 (例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1 のうちの少なくとも 1 つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4 のうちの少なくとも 1 つの発現について陰性である細胞) の投与方法には、全身注射、腎臓内注射、静脈内注射、または、動脈注射、および、意図された活性部位における組織への直接注射が含まれるが、これに限定されない。調合物を、任意の従来経路、例えば、注入またはボーラス注入により投与することができ、他の生物活性剤とともに投与することができる。投与は好ましくは全身投与である。最も好ましくは、投与部位は、意図された活性部位に近接しているか、またはその活性部位に最も近い。患者が全虚血に侵されている場合、静脈内投与のような全身投与が好ましい。メカニズムに制約されることを意図することなく、哺乳動物腎臓由来細胞集団を含む組成物は、投与されると、傷害により產生された走化性因子に反応して、例えば腎臓の、虚血組織まで遊走するか、または帰る (home) 。本発明の方法により治療することができる虚血組織には、腎臓虚血が含まれるが、これに限定されない。

【0111】

本明細書で説明した方法は、組換えポリペプチドまたは薬剤を提供し、それらは、細胞の投与と組み合わせて、患者に投与される。ポリペプチドまたは薬物は、細胞の投与の前、それと同時に、または、その後に患者に投与することができる。1 つの好ましい実施態

10

20

30

40

50

様では、組換えポリペプチドまたは薬物は、血管新生、脈管形成、またはその両方を促進する。別の実施態様では、組換えポリペプチドまたは薬物は、哺乳動物腎臓由来細胞集団の増殖または分化を促進する。1つの実施態様では、組換えポリペプチドは、VEGF、FGF2、SDF、CXCR-4、もしくは、CXCR-5、または、それらの断片であり、虚血組織に対して治療活性を保有している。

【0112】

特に、本発明の方法は、ヒトにおける腎虚血の治療のための治療上の脈管形成のために有用である。本発明の方法にしたがった哺乳動物腎臓由来細胞（例えば、Eya1、WT1、Fox D1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞）の投与を、単一の治療として、または、外科的な、および／もしくは、内科的な治療モダリティに対する補助として用いることができる。例えば、本明細書で説明した腎虚血の治療のための方法は、腎臓がん、腎感染、腎損傷、腎移植、または、腎臓結石のための治療と組み合わせて用いることができる。本明細書で説明した方法は、外科的な治療後の虚血部位の不完全な血行再建を有する、したがって、虚血部位を有するが生存力のある腎組織を有する、患者のために特に有用である。本発明の方法による治療上の脈管形成から顕著な利益を得ることができる患者は、血行再建技術にはあまり良くない標的であるような血管から供給された正常に機能しない灌流により危険にさらされた、広範囲の生存可能な腎組織を有する者である。

【0113】

哺乳動物腎臓由来細胞集団（例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞）の治療上有効な量は、患者により安全に受容される細胞の最大数である。好ましい注入経路が腎臓内であるため、最大用量は、血管が充満したり、詰まつたりしないように、細胞が注入される血管の大きさを考慮するべきである。虚血性腎組織における新たな血管形成を誘導するために必要な細胞の最小数は、不必要的実験をすることなく、用量漸増研究により、実験的に決定することができる。例えば、このような用量漸増は、体重kg当たりおよそ 10^4 個の哺乳動物腎臓由来細胞集団から開始することができるだろう。

【0114】

本発明の1つの態様は、更に、製薬処方であって、（a）哺乳動物腎臓由来細胞集団（例えば、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞）、および、製薬上許容可能なキャリアを含む、製薬処方を提供する。いくつかの実施態様では、処方は、 10^4 個～ 10^9 個の哺乳動物腎臓由来細胞を含む。更なる実施態様では、処方は、カテーテルによる投与のために調製される。

【0115】

本発明の実施には、適切に、また、別に示されていない限り、本分野の技術内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、形質転換生物学、微生物学、ウイルス学、組換えDNA、および、免疫学の従来技術が用いられるだろう。このような技術は文献に記載されている。例えば、Sambrook・Russell編著、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001)；論文：Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.)；Harlow・Lane著、Using Antibodies, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999；Bonifacino・Dasso・Lippincott-Schwartz・Harford・Yamada編著、Current Protocols in Cell Biology, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999を参照のこと。

【0116】

他の実施態様および使用が、本開示を考慮して、当業者に明らかであるだろう。

【0117】

<典型的な実施態様>

10

20

30

40

50

〔実施例1〕

ヒト腎臓由来細胞の単離

National Disease Research Interchange (NDRI, ペンシルベニア州フィラデルフィア) から、正常なヒト腎臓を入手した。血液と壊死組織片を除去するために、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM-low glucose; Invitrogen, カリフォルニア州カールズバッド) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Invitrogen) で、各々の腎臓を洗浄した。腎臓の外側の皮質部位、内側の髓質部位、および、被膜下部位から、組織を切り出した。その後、組織が細かなパルプ状に刻まれるまで、組織培養プレート中でそれらの組織を機械的に分離した。その後、50mLコニカルチューブに、組織を移した。その後、優良製造規範 (GMP) 酵素混合液 [コラーゲナーゼ (NB6, N0002779; Serva Electrophoresis GmbH, ドイツハイデルベルク) 0.25ユニットPZ活性 / mL、ディスパーゼ (Dispase II 165859; Roche Diagnostics Corporation, インディアナ州インディアナポリス) 2.5ユニット / mL、ヒアルロニダーゼ (Vitrase; ISTA Pharmaceuticals, カリフォルニア州アーバイン) 1ユニット / mLを含む]、または、非GMPグレード酵素混合液 [コラーゲナーゼ (Sigma, ミズーリ州セントルイス) 500ユニット / mL、ディスパーゼ (Invitrogen) 50ユニット / mL、およびヒアルロニダーゼ (Sigma) 5ユニット / mLを含む] のいずれかで、組織を消化した。腎臓由来細胞もディスパーゼ50ユニット / mLで単離した。酵素混合液を、腎臓上皮成長培地 (REGM) (Cambrex, メリーランド州ウォーカーズビル (Walkersville, MD)) または間葉系幹細胞成長培地 (MSCGM) (Cambrex) と組み合わせた。組織を入れたコニカルチューブ、培地、および、消化酵素を、オービタルシェーカーで225rpm、1時間、37℃でインキュベーションした。

【0118】

消化物を150×g、5分間遠心分離し、上澄みを吸引した。結果的な細胞ペレットを、REGMまたはMSCGM 20mLに再懸濁した。細胞懸濁液を、40ミクロンナイロンBD FALCON細胞ろ過器 (BD Biosciences, カリフォルニア州サンノゼ) でろ過した。ろ過物を培地 (全量50mL) に再懸濁し、150×g、5分間遠心分離した。上澄みを吸引し、新しい培養培地50mLに細胞ペレットを再懸濁した。この過程をさらに2回くり返した。

【0119】

最後の遠心分離後、上澄みを吸引し、新しい培養培地5mLに細胞ペレットを再懸濁した。Guava装置 (Guava Technologies, カリフォルニア州ヘーワード) を用いて、生細胞数を決定した。その後、2%ゼラチンまたはラミニンコート組織培養フラスコ上に、5,000細胞 / cm²の播種密度で細胞をまき、低酸素大気 (低酸素圧) または正常な大気 (正常酸素圧) のいずれかで培養した。ドナー情報と、腎臓由来細胞集団を単離するのに用いた成長条件とを、表1に示す。単一の細胞に由来する腎細胞のクローンを入手するために、限界希釈法を行った。全体で、異なる24個の条件を用い、異なる4名の死亡ドナー (年齢39歳、46歳、21歳、10歳) から細胞を単離した。

【0120】

〔実施例2〕

腎臓由来細胞の形態

単離後7日目、光学顕微鏡で腎臓由来細胞集団を判定し、細胞の形態的特徴を観察した。すべての単離条件で、上皮の形態を有する細胞が常に生じている (表1)。

【表1】

表1：腎臓由来細胞の培養を確立するために用いた条件。非GMPグレード酵素(A)・GMPグレード酵素(B)・ディスパーザ(C)、ドナーの年齢(年齢)、培養物を成長させた大気(Atm)・正常酸素圧(N)・低酸素圧(H)。

単離	年齢	ドナーの性別	組織供給源	酵素	培地	基質	Atm	形態
1	39	男性	皮質	A	REGM	ゼラチン	N	上皮
2	39	男性	髓質	A	REGM	ゼラチン	N	上皮
3	39	男性	皮質	A	MSCGM	ゼラチン	N	上皮
4	39	男性	髓質	A	MSCGM	ゼラチン	N	上皮
5	39	男性	皮質	A	REGM	ゼラチン	H	上皮
6	39	男性	髓質	A	REGM	ゼラチン	H	上皮
7	39	男性	皮質	A	MSCGM	ゼラチン	H	上皮
8	39	男性	髓質	A	MSCGM	ゼラチン	H	上皮
9	39	男性	皮質	A	REGM	ラミニン	N	上皮
10	39	男性	髓質	A	REGM	ラミニン	N	上皮
11	39	男性	皮質	A	MSCGM	ラミニン	N	上皮
12	39	男性	髓質	A	MSCGM	ラミニン	N	上皮
13	39	男性	皮質	A	REGM	ラミニン	H	上皮
14	39	男性	髓質	A	REGM	ラミニン	H	上皮
15	39	男性	皮質	A	MSCGM	ラミニン	H	上皮
16	39	男性	髓質	A	MSCGM	ラミニン	H	上皮
17	46	男性	被膜下	B	REGM	ゼラチン	N	上皮
18	46	男性	皮質	B	REGM	ゼラチン	N	上皮
19	46	男性	皮質	A	REGM	ゼラチン	N	上皮
20	46	男性	髓質	B	REGM	ゼラチン	N	上皮
21	46	男性	髓質	A	REGM	ゼラチン	N	上皮
22	21	男性	被膜下	A	REGM	ゼラチン	N	上皮
23	21	男性	皮質	A	REGM	ゼラチン	N	上皮
24	10	女性	皮質	C	REGM	ゼラチン	N	上皮

【0121】

このデータは、腎臓由来細胞を、任意の年齢または性別のドナーから単離することができること、同様に、様々な成長培地組成または培養条件を用いて単離することができる示している。単離手順の簡便さと一貫性は、腎臓由来細胞が、細胞を基にした治療で用いるための有益な細胞供給源であることを示している。

【0122】

〔実施例3〕

腎臓由来細胞の成長能

腎臓由来細胞は、培養中で広範囲に広がることができ、短時間で著しくたくさんの数の細胞を生成することができる。これは同種細胞治療の開発のための基準である。

【0123】

REGMまたはMSCGMを入れたT75フラスコ上に、5,000細胞/cm²で、腎臓由来細胞をまき、5%二酸化炭素、37℃で培養した。細胞を2~5日ごとに継代した。Guava装置(Guava Technologies, カリフォルニア州ヘーワード)を用いて、各継代で、細胞数を計数し、生存率を測定した。老化に達するまで、細胞集団を数週間連続して継代した。その研究時間間隔の間、細胞が1回を超える集団倍加ができなくなった場合、老化と決定した。その後、集団倍加 [$\ln(\text{最終細胞収量} / \text{まいた細胞の初期数}) / \ln 2$] を計算した。

【0124】

10

20

30

40

50

核型分析のために、T25フラスコに、単離22および単離23由来の4代継代および10代継代の腎臓由来細胞をまき、一晩付着させた。その後、フラスコをREGMで満たし、核型分析を行った。

【0125】

表2は、試験した単離についての成長データの概要である。ドナーの年齢、組織供給源、または、細胞を単離するために用いた酵素に関しては、細胞成長特徴に対して顕著な効果はない。

【0126】

単離22および単離23に対して、4代継代および10代継代の両方で、核型分析を行った。両方とも、4代継代および10代継代で、正常な核型を示した。

【表2】

表2：成長能データの概要。集団倍加(PD)。
単離番号の相互参照については、表1を参照のこと

単離	老化までの日数	継代	PD	生存率(%)
1	54	12	31.2	98
2	54	12	26.8	98
17	51	11	30.2	98
18	48	10	26.8	97
19	42	9	24.9	97
20	48	10	31.0	98
21	48	10	29.0	98
22	47	16	28.7	97
23	47	16	27.9	97

【0127】

平均して、老化での集団倍加(PD)は28.5回であり、平均生存率は97.6%であった。

【0128】

要約すると、腎臓由来細胞は、培養中で強い成長能を有している。ヒト全腎臓1つから生じる細胞の全数を推定するために、これらのデータを用いることができる。もし腎組織のすべてを加工し、その結果細胞を、31回の集団倍加まで培養するならば、ヒト全腎臓1つから、全体で推定 1.89×10^{16} 個の細胞が生産されるだろう。したがって、1回の細胞の治療用量が、1人あたり 1×10^8 個であることを考えると、単一の腎臓から単離した腎臓由来細胞は、1億8900万人の患者を治療するのに十分だろう。つまり、これらの細胞は、同種を基にした細胞治療で用いるための非常に増殖可能な細胞供給源である。

【0129】

〔実施例4〕

腎臓由来細胞の表面マーカー表現型

表面マーカー表現型を決定するために、腎臓由来細胞に対して、フローサイトメトリー分析を行った。実施例1の単離のうちの9つに由来する細胞を、T75フラスコ上のREGM中、37%、5%二酸化炭素で、4代継代および10代継代まで増殖した。付着した細胞をPBSで洗浄し、TrypLE Select (Gibco, ニューヨーク州グランドアイランド)で剥がした。細胞を採取し、遠心分離し、3%(v/v)FBSを含むPBSに、 2×10^5 細胞/mLの濃度で再懸濁した。細胞懸濁液100 μ Lに特異的抗体を加え、混合液を、暗所、4°Cで、30~45分間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞をPBSで洗浄し、余分な抗体を除去するために遠心分離した。細胞をPBS 500 μ Lに再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。フローサイトメトリー分析を、Guava装置(Guava Technologies, カリフォルニア州ヘーワード)で行った。表面マーカーの表現型を特徴付けるために用いた抗体を、表3に示す。

【表3】

表3：腎臓由来細胞の細胞表面マーカー表現型を特徴付ける際に用いた抗体

抗体	業者	カタログ番号
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45R	BD Pharmingen	555489
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
CD31	BD Pharmingen	555446
CD49c	BD Pharmingen	556025
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
HLA-I	BD Pharmingen	555553
HLA-II	BD Pharmingen	555558
CD133	Miltenyi Biotech	120-001-243
SSEA4	R&D Systems	FAB1435P
CD105	SantaCruz Biotech	SC-21787
CD104	BD Pharmingen	555720
CD166	BD Pharmingen	559263
CD29	BD Pharmingen	555442
CD24	BD Pharmingen	555428
CD56	AbCAM	MEM188
CD138	BD Pharmingen	550805
CD80	BD Pharmingen	557226
CD86	BD Pharmingen	555659
E-cadherin	BD Pharmingen	612130
IgG-FITC	BD Pharmingen	555748
IgG-PE	BD Pharmingen	555749

10

20

30

【0130】

すべての表面マーカーの表現型データの概要を、表4に示す。試験した単離すべてが、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD90、CD166、SSEA-4、および、HLA Iについて陽性染色を示し、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、E-cadherin、および、HLA IIについて陰性染色を示した。その上、分析した単離すべてが、複数世代（10代継代）増殖し、その表面マーカーの表現型をなお保有していた。

40

【0131】

これらの細胞は、HLA Iを発現するが、HLA II、CD80、または、CD86を発現しない。これらの細胞の発現特徴は、宿主免疫系を回避する細胞能力を反映する。これらのデータは、腎臓由来細胞が非免疫原性であり、組織タイプングまたは免疫抑制を必要することなく、細胞を患者に投与することができる事を示している。

【0132】

要約すると、これらのデータは、複数のドナーに由来する腎臓由来細胞を、様々な条件（表1）で単離することができ、それらの細胞は、その表面マーカーの表現型をなお維持することを示している。その上、CD24およびSSEA-4のような推定される前駆体マーカーが発現するが、E-cadherinのような成熟-系統コミットマーカーは発現しない。つまるところ

50

ろ、腎臓由来細胞は非免疫原性であり、それゆえに同種細胞治療で用いるための細胞の魅力的な供給源である。

【表4】

表4:表面マーカー分析の概要。未決定(ND)、陽性染色(+)、陰性染色(-)。

表面マーカー	別名	単離											
		1	2	17	18	19	20	21	22	23	24		
CD29	B1-integrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD44	HCAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD49C	a3-integrin	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD166	ALCAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD24	Heat shock antigen-1	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD73	SH3	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD90	Thy-1	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+		
SSEA4	なし	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CD31	PECAM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD34	gp105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD45	Ly5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD56	NCAM	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD104	b4-integrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD138	Syndecan-1	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD141	Thrombomodulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
E-CADHERIN	なし	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD105	Endoglin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD117	c-Kit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD133	AC133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CD80	B7-1	ND	-	-									
CD86	B7-2	ND	-	-									
HLA I	MHC-a,b,c	ND	+	+	+								
HLA II	MHC-DP ,DQ, DR	ND	-	-	-								

【0133】

〔実施例5〕

腎臓由来細胞の遺伝子発現

単離1、2、17~23に由来する細胞から、RNA抽出キット(RNeasy Mini Kit; Qiagen, カリフォルニア州バレンシア)を用いて、RNAを抽出した。RNAをDEPC処理水50 μLで溶出し、-80℃で保管した。ランダムヘキサマーをTaqMan逆転写試薬(Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ)とともに用いて、25℃10分間、37℃60分間、95℃10分間で、RNAを逆転写した。サンプルを-20℃で保管した。表5に記載したプライマーを用いて、従来のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)により、選択した遺伝子を調査した。cDNAサンプルに対して、RT² PCRプライマーセット(SuperArray Biosciences Corp, メリーランド州フレデリック)を用いて、PCRを行った。

10

20

30

40

50

【表5】

表5：研究で用いたプライマー

遺伝子	SuperArray カタログ番号
Oct-4	PPH02394A
Rex 1	PPH02395A
Sox2	PPH02471A
Human TERT (hTERT)	PPH00995A
FGF4	PPH00356A
Pax 2	PPH06881A
Cadherin-11	PPH00667A
WT1	PPH00254A
FOXD1	PPH01990A
WNT4	PPH02445A
Epo	PPH01338A
EpoR	PPH02642A
Eya1	PPH10542A
HNF3B	PPH00976A
Sox17	PPH02451A
Gata4	PPH010860A
Six2	PPH10860A
CXCR4	PPH00621A
BMP-2	PPH00549A
BMP-7	PPH00527A
GDF5	PPH01912A

【0134】

プライマーを、cDNA 1 μ Lおよび2 \times ReactionReady (商標) SYBR Green PCRマスター ミックス (SuperArray Biosciences) とともに業者の指示どおり混ぜ、ABI Prism 7000システム (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) を用いて、PCRを行った。サーマルサイクル条件は、まず50 2分間、95 10分間、その後、95 15秒間、60 1分間を34サイクルである。GAPDHについて、Applied Biosystems のGAPDHプライマー (カタログ番号402869) 、cDNA溶液 1 μ L、および、1 \times AmpliTaq GoldユニバーサルミックスPCR反応バッファー (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) を用い、業者の指示にしたがって、PCRを行った。最終PCR反応のプライマー濃度は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの両方について、0.5 μ モルであり、TaqManプローブは加えなかった。サンプルを2 % (w/v) アガロースゲルに泳動し、エチジウムブロマイド (Sigma, ミズーリ州セントルイス) で染色した。667 Universal Twinpackフィルム (VWR International, ニュージャージー州サウスプレーンフィールド) 、および、焦点距離Polaroid (商標) カメラ (VWR International, ニュージャージー州サウスプレーンフィールド) を用いて、画像を取り込んだ。分析した各遺伝子について、最終PCR産物をゲルから切り出し、DNA配列決定により標的配列を確認した。

【0135】

<RT-PCR分析>

分析した細胞単離物はすべて、一貫して安定な遺伝子発現プロファイルを示した。初期発生遺伝子マーカー (Oct-4、Rex-1、Sox2、FGF4、hTert) 、腎臓発生遺伝子マーカー (Pax-2、WT-1、Eya-1、Wnt-4、BMP-7、Cadherin-11、FoxD1) 、後腎間葉遺伝子マーカー (Pax-2、Eya-1、WT-1、Six2、FoxD1) 、および、後腎間葉の生存を促進する遺伝子 (BMP-7) の発現を検出するために、単離1、2、17~23に対して、RT-PCR分析を行った。その上、内胚葉遺伝子 (NF3B、CXC-R4、Sox-17、GATA-4) のような他の発生遺伝子の発現、なら

10

20

30

40

50

びに、腎臓の修復を促進するか、または、腎臓疾患を治療する際に治療価値を有する遺伝子マーカー (Epo、EpoR、BMP-7、BMP-2、GDF5) の発現を分析した。

【0136】

表6に示すように、単離すべてが、Oct-4およびRex-1について陽性発現を示し、Sox2、FGF4、hTERT、および、Wnt-4について陰性発現を示した。単離17～23は、Pax-2、WT1、Caderin-11、および、FoxD1について陽性発現を示した。単離22および23は、Eya-1、Sox-17、および、CXCR-4について陽性発現を示し、GATA-4について陰性発現を示した。単離17～23は、EpoRを発現したが、Epoを発現しなかった。単離17～22は、BMP-2、BMP-7、および、GDF5を発現した。その上、単離すべてが、複数世代（10代継代）増殖することができ、それらの遺伝子発現表現型をなお保有することができる。

10

【0137】

要約すると、腎臓由来細胞は、初期発生および腎臓発生に関与する遺伝子を発現する。それらは、後腎間葉についてのマーカーや、腎臓前駆細胞についてのマーカーを発現する。それらは、内胚葉マーカー、ならびに、腎臓修復および管形成に関与する因子を発現する。

【0138】

全体として、これらのデータは、腎臓由来細胞が、損傷した腎組織を保護するか、または、修復するための、細胞を基にした治療のために用いることができるよう推定される腎臓前駆細胞の供給源であることを示している。

【0139】

20

〔実施例6〕

栄養因子分泌分析

腎臓由来細胞は、腎臓を保護し修復するような栄養因子を絶えず産生することが示された。したがって、これらの細胞は、腎臓疾患を治療するための治療薬として役立つかもしれない。

【0140】

各々にREGM 15mLを入れた、各単離につき1つのT75フラスコ中に、5,000細胞 / cm²で、単離17～21由来の3代継代の細胞をまいた。細胞を、5%二酸化炭素、37℃で培養した。一晩培養後、培地を、血清を含まない培地 [DMEM-low glucose (Gibco)、0.1% (w/v)ウシ血清アルブミン (Sigma)、ペニシリン (50ユニット/mL)、およびストレプトマイシン (50 μg/mL)] に交換し、更に8時間培養した。血清を含まない馴化培地を、インキュベーション終了時に、14,000×g、5分間の遠心分離により収集し、-20℃で保管した。

30

【0141】

細胞をPBSで洗浄し、TrypLE Select (Gibco) 4mLを用いて剥がし、各フラスコ中の細胞数を推定するためにGuava装置 (Guava Technologies, カリフォルニア州ヘーワード) で計数した。その後、Searchlightプロテオームアレイ (Pierce Biotechnology Inc.) を用いて、以下の栄養因子について、サンプルをELISAで解析した。その栄養因子とは、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1 (TIMP-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2 (TIMP-2)、血小板由来上皮増殖因子bb (PDGF-bb)、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、ヘパリン結合上皮増殖因子 (HB-EGF)、単球走化性タンパク質1 (MCP-1)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン8 (IL-8)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ストロマ細胞由来因子1b (SDF1b)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、塩基性神経成長因子 (b-NGF)、ニューロトロフィン3 (NT-3)、成長関連オンコジーン (GRO-)、インターロイキン1b (IL-1b)、インターロイキン12p40 (IL-12p40)、インターロイキン12p70 (IL-12p70)、インターロイキン11 (IL-11)、インターロイキン15 (IL-15)、マトリックスマタロプロテアーゼ2 (MMP-2)、マトリックスマタロプロテアーゼ9 (MMP-9)、アンジオポエチン2 (ANG-2)、および、ヒト成長ホルモン (HGH) である。

40

【0142】

50

<栄養因子産生の分析>

27個の異なる増殖因子およびサイトカインの分泌を、単離17~21において分析した。結果を表7に要約する。すべての単離が、300pg / mL / 1×10^6 細胞 / 8時間よりも多いTIMP-1、TIMP-2、VEGF、および、MMP-2を分泌した。それらは、50~300pg / mL / 1×10^6 細胞 / 8時間のFGF2およびHGFを、また、1~50 pg / mL / 1×10^6 細胞 / 8時間のKGF、PDGF-bb、b-NGF、IL-12p40、および、IL-11を分泌した。SDF-1、ANG-2、HGH、および、IL-12p70は検出されなかった。

【0143】

要約すると、このデータは、腎臓由来細胞が、損傷した腎組織を保護し修復するためのいくつかの栄養因子を分泌することを示している。例えば、FGF2、HGF、および、TGF- β は、腎臓の修復と結びついている。腎臓由来細胞は、増加した濃度および一定の濃度でこれらの因子を分泌する。したがって、これらの細胞は、腎疾患を標的とした治療における使用のための細胞の有益な供給源である。

【表7】

表7：腎臓由来細胞由来の栄養因子産生のSearchLightマルチプレックスELISA解析分析。単離のうち「培地のみ」は、馴化しておらず血清を含まない培地単独における対照サンプルである。示したデータの単位は、pg / mL / 1×10^6 細胞 / 8時間である。示した結果は、重複測定の平均である。

単離	TIMP1	ANG2	KGF	FGF2	PDGF-bb	HGF	VEGF	HB-EGF	TGF α
培地のみ	<9.8	<9.8	<2.0	<10.9	<2	<6.2	<9.8	<3.7	<2.3
17	5699.4	<9.8	20	148.4	<2	91.9	416.3	46.1	67.7
18	6054.8	<9.8	11.1	62.4	5.7	91	329.7	35.1	59.1
19	6710.6	<9.8	35.1	160.1	<2	320.9	580.5	70.2	119
20	9483.7	<9.8	14.1	86.6	5	80.3	294.3	24.6	37.4
21	2705	<9.8	13.8	91.5	<2	162	298.4	32.4	34.6

単離	HGH	SDF1b	BNGF	MMP9	IL1b	MMP2	GRO α	MCP1	IL6
培地のみ	<9.8	<50.0	1.2	<39.1	<0.4	<62.5	<0.8	2.1	<0.8
17	<9.8	<50.0	3	<39.1	<0.4	3240	36.8	29.8	38.7
18	<9.8	<50.0	6.5	145	1.6	3487.6	95	32.7	40.5
19	<9.8	<50.0	20.8	<39.1	3.3	3565.9	37.1	48.8	44.9
20	<9.8	<50.0	6.2	108	1.4	3191.3	499.8	340.9	80
21	<9.8	<50.0	5.8	<39.1	2.2	2814.1	14.2	30.2	19.5

単離	BDNF	NT3	IL15	TIMP2	IL8	IL11	IL12p40	IL12p70	CNTF
培地のみ	<6.2	<1.6	<0.8	10	<0.8	<2	<1.2	<1.2	9
17	<6.2	<1.6	3.4	2266.2	31.6	20.5	14.9	<1.2	30.1
18	<6.2	5.4	2.7	1841.4	115.8	20.8	6.2	<1.2	<7.8
19	<6.2	13	5.2	1376.7	36.4	29.3	21.5	<1.2	93
20	16.2	12.3	2.3	1785	622.2	20.5	8.7	<1.2	21.7
21	<6.2	<1.6	<0.8	1193	12	19.1	9.3	<1.2	<7.8

【0144】

〔実施例7〕

ポリエステル足場上での腎臓由来細胞の成長

器官組織を再建するために利用することができる基礎材料が明らかに必要とされている。合成ポリエステル足場上で、腎組織工学に応用するための基礎ビルディングブロック材料として役立つ組織様構造を生み出すように、腎臓由来細胞を成長させた。

【0145】

いくつかのポリエステルの溶媒キャスト膜上で、腎臓由来細胞を成長させた。100mm直径の35/65ポリ(ε-カプロラクトン-co-グリコリド)(PCL/PGA)フィルムを調製した。無水1,4-ジオキサン(Aldrich, ウィスコンシン州ミルウォーキー)380g中に、35/6

10

20

30

40

50

5 PCL/PGA (Ethicon, ニュージャージー州サマービル) (固有粘度 = 0.45dL/g) 20gを70で溶解することにより、5重量%ポリマー溶液を調製した。100 × 15mm NALGENEポリメチルペンテンペトリ皿 (Fisher Scientific, ペンシルベニア州ピッツバーグ) 上に、ポリマー溶液3.5mLを注ぐことにより、フィルムを成型した。

【0146】

100mm直径の45/55ポリ(-カプロラクトン-co-グリコリド) (PCL/PGA) フィルムを調製した。無水1,4-ジオキサン (Aldrich, ウィスコンシン州ミルウォーキー) 380g中に、45/55 PCL/PGA (Ethicon, ニュージャージー州サマービル) (固有粘度 = 1.88dL/g) 20gを70で溶解することにより、5重量%ポリマー溶液を調製した。100 × 15mm NALGENEポリメチルペンテンペトリ皿 (Fisher Scientific, ペンシルベニア州ピッツバーグ) 上に、ポリマー溶液3.5mLを注ぐことにより、フィルムを成型した。 10

【0147】

55mm直径の45/55ポリ(-カプロラクトン-co-グリコリド) (PCL/PGA) フィルムを調製した。無水1,4-ジオキサン (Aldrich, ウィスコンシン州ミルウォーキー) 360g中に、45/55 PCL/PGA (Ethicon, ニュージャージー州サマービル) (固有粘度 = 1.88dL/g) 40gを70で溶解することにより、10重量%ポリマー溶液を調製した。55 × 15mmポリプロピレンペトリ皿 (Ted Pella Inc., カリフォルニア州レディング) 上に、ポリマー溶液5.0mLまたは2.5mLを注ぐことにより、フィルムを成型した。

【0148】

55mm直径の40/60ポリ(-カプロラクトン-co-L-ラクチド) (PCL/PGA) フィルムを調製した。無水1,4-ジオキサン (Aldrich, ウィスコンシン州ミルウォーキー) 360g中に、40/60 PCL/PLA (Birmingham Polymers, Inc., アラバマ州バーミングハム) (固有粘度 = 1.20dL/g) 40gを溶解することにより、10重量%ポリマー溶液を調製した。55 × 15mmポリプロピレンペトリ皿 (Ted Pella Inc., カリフォルニア州レディング) 上に、ポリマー溶液5.0mLを注ぐことにより、フィルムを成型した。 20

【0149】

すべてのキャスト膜をゆるくふたをして、流速30.48m/分 (100フィート/分) で稼動しているドラフトの中に4日間置いた。70の真空オープン ((13.33 ~ 26.66Pa(0.1 ~ 0.2mmHg)) 中で最低4日間更に乾燥させることにより、フィルムから残った溶媒を除去した。室温まで冷却した後、室温で一晩、100%エタノールでインキュベーションすることによりフィルムを滅菌した。その後、フィルムを風乾し、PBSで洗浄し、単離17または単離18由来の細胞を、REGM中、5,000細胞/cm²でフィルム上にまき、37で4 ~ 9日間培養した。 30

【0150】

<ポリエステル足場上での腎臓由来細胞の成長の分析>

表8に要約するように、様々な溶媒成型ポリエステルフィルム上、REGM中で、単離17または単離18を培養した。各々の場合につき、PCL/PGA基材の足場が、完全な細胞単層の成長を補助した。その上、細胞単層構造を維持したまま、細胞/フィルム組み合わせ構築物は成型皿から持ち上げられた。これらの腎臓由来細胞/フィルム構築物は、組織工学適用における細胞シート材料として用いることができる。 40

【表8】

表8：異なるフィルム上で試験した腎臓由来細胞の概要

単離	足場
単離17	35/65 PCL/PGA
単離18	45/55 PCL/PGA
単離18	60/40 PCL/PLA
単離18	45/55 PCL/PGA
単離18	35/65 PCL/PGA

【0151】

〔実施例8〕

試験管内での腎臓由来細胞細管形成

腎臓由来細胞を4代継代および10代継代で解凍し、その後、66% vitrogen 100 (3 mg/mL) (Cohesion Technologies, カリフォルニア州パロアルト) を含むI型コラーゲン溶液中で、 4×10^4 細胞 / mL の単一細胞懸濁液へと摩碎した。小さな区画に分かれていない網の膜の上に、懸濁液中の細胞をまくことができる。その後、コラーゲンをゲル化させるため、コラーゲン / 細胞混合液を、37 、5 % 二酸化炭素、95% 大気で30分間インキュベーションし、その後、培養培地を加えた。細胞は7日間にわたり3日ごと摂食させる。7日目、培養物を様々な濃度の肝細胞増殖因子で処理し、更に、細管形成が観察されるまで培養した。

10

【0152】

これらの観察は、腎臓由来細胞が試験管内で尿細管構造へと自己組織化することができるることを示している。これらの構造は、薬物スクリーニングおよび毒性解析の開発だけでなく、腎臓再建適用のためのビルディングブロックとして価値がある。

【0153】

〔実施例9〕

薬物スクリーニングおよび毒性解析のための腎臓由来細胞

ヒト腎臓由来細胞は、新規の治療分子の試験管内での探索および安全性評価のための新しい機会を提供する。腎臓由来細胞に由来する細管は、新規な腎臓再生薬または腎保護薬の探索のための腎発生モデルシステムだけでなく、腎毒性モデルシステムの開発を可能にする。この腎臓由来細胞の薬物探索および毒性解析プラットフォームシステムは、腎疾患の治療のための新しい化合物の研究および開発を向上させるだろう。

20

【0154】

腎臓由来細胞は、実施例8で説明した方法を用いて、96穴プレートのウェルに、5,000 細胞 / cm^2 でまくことができる。これらのプレートは、細管形成を高めたり、阻害したりする能力について、様々な化合物および小分子を試験するための解析システムとして役立つ。様々な化合物の効果を決定するために、個々のウェルを、細管形成および細管の枝分かれネットワークの形成について、光学顕微鏡により分析する。その上、実施例5で説明した方法を用いて、各ウェル中の細胞に対して、RT-PCRを実施することができる。

30

【0155】

腎臓由来細胞を、96穴フォーマット中で培養することができ、様々な化合物および小分子薬物を加えることにより、細管形成が調節されうる。異なる増殖因子および薬物が、腎臓由来細胞の細管形成および枝分かれを誘導するかもしれないし、BMP-7、BMP-2、GDF5、BMP receptor-1、および、BMP receptor-2の遺伝子発現を増加させるかもしれない。これらの遺伝子のアップレギュレーションは、細管形成の向上と相關している。また、BMP-7の増加は、損傷した腎臓において、試験薬物がBMP-7を高めることにより、腎臓の修復を促進するだろうということも示唆している。同様に、遺伝子発現のダウンレギュレーションまたは欠如は、腎臓修復を刺激する試験薬物の能力の低下だけでなく、細管形成の抑制または細胞毒性の抑制と相關する。

40

【0156】

要約すると、BMP分子およびそのレセプターの発現に加えて細管を形成する腎臓由来細胞能力の開拓により、新規の薬物探索および毒性解析プラットフォームシステムを開発する機会が与えられる。この解析システムは、腎疾患を治療するための新しい化合物の研究および開発を強化するだろう。

【0157】

〔実施例10〕

腎臓由来細胞の多分化能性

腎臓由来細胞は、脂肪細胞および骨芽細胞へ分化する能力がある前駆細胞の潜在的な供給源である。このデータは、腎臓由来細胞の多分化能性の性質を示し、前駆細胞としての特徴を更に説明する。

50

【0158】

分化解析のために、脂肪形形成分化培地 (DMEM/F12、3%FCS、33 μMビオチン、17 μMパントテン酸、100nMインスリン、1 μMデキサメタゾン、0.25 μg/mLアンフォテリシンB、および、0.25mM IBMX)、または、骨形形成分化培地 (DMEM、10% FCS、0.2mMアスコルビン酸、25mM L-グリセロリン酸、500nMデキサメタゾン、および、20nMグルタミン) に変更する前1週間、腎臓由来細胞を、REGM中、5%CO₂、37 °C の培地で培養することができる。2日ごとに培地を交換しながら、更に3週間、細胞を培養することができ、その後、4 % パラホルムアルデヒドで10分間固定することができる。脂肪細胞を、15分間のナイルレッド染色 (Molecular Probes ; PBS中に1:2000) により同定する。骨芽細胞を、0.1mg/mL Fast Blue BB塩 (Sigma)、0.1mg/mL ナフトールAS-MXリン酸塩 (Sigma)、および、2 mM M gCl₂を含む0.1M Tris-HCl (pH 8.5) を用いたアルカリホスファターゼ解析により同定する。画像をNikon TS 100 ECLIPSE倒立顕微鏡に接続したNikonデジタルカメラで撮影する。10T1/2細胞を、分化解析における陽性対照として用いた。

【0159】

脂肪形形成培地中に入れて3週間後、腎臓由来細胞の細胞質画分内にナイルレッド染色された脂肪滴の蓄積により、脂肪細胞を同定することができる。骨形形成培地中に入れて3週間後、REGMのみにおける腎臓由来細胞成長と比較して、アルカリホスファターゼ活性における増加により、骨芽細胞を同定することができる。

【0160】

要約すると、このデータは、更に、腎臓由来細胞が、少なくとも2つの別々の細胞系統、脂肪細胞および骨芽細胞に分化する能力がある潜在的な前駆細胞であることを示している。したがって、これらの細胞は、腎臓再生および細胞治療適用のための細胞の供給源である。

【0161】

〔実施例11〕

生体内での腎臓由来細胞の細管形成

3枚の35/65 PCL/PGA (10cm直径×2mm厚) フィルムに、ヒト腎臓由来細胞 (10,000細胞/cm²) をまき、REGM (Cambrex) 中、37 °C、5%二酸化炭素で、8日間 (実施例7で説明したとおり) 培養した。35/65 PCL/PGAフォーム足場を、米国特許第6,355,699号 (参照により全体を本明細書に組み入れる) に記載の方法にしたがって準備した。その後、細胞/フィルム構築物をフィルム成型皿から除去し、3層に積み重ね、35/65 PCL/PGAフォーム足場支持体に取り付けた。この構築物を更に24時間培養し、植え込み前に3×3mm²の正方形の細片に切った。その後、インプラントをPBSで洗浄し、輸送のために、PBSを入れた6穴プレートに移した。

【0162】

インプラントをSCIDマウスの背面の外側胸 - 腰部の皮下に、左右対称に植え込んだ。オスのSCIDマウス (Fox Chase SCID CB 17SC系統) を、Taconic Inc. (ニューヨーク州ハドソン) から購入した。それらは5週齢であった。各SCIDマウスに2つのインプラントを入れた。マウスの背に2つの皮膚の切込み (およそ5mm長) を入れた。切込みは、正中線の両側に1つずつ、触診された腸骨稜の頭側約5mmの腰部に横に位置している。その後、小さなポケットを作るために、皮膚を下層結合組織から離し、インプラントを切込みの約10mm頭側に置いた。皮膚の切込みを、Reflex 7金属創傷クリップで閉じた。3週間後、インプラントを皮下のポケットから除去し、10%ホルマリン中で固定し、パラフィンワックス中に包埋し、切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色し、光学顕微鏡技術を用いて病理学者により評価した。

【0163】

腎臓由来細胞は、PCL/PGAフィルムの層内で細管様構造を形成した。これらの細管は、明確な上皮壁および明らかな管腔を示した。腎臓由来細胞は、フォーム足場を浸潤し、細胞外マトリックスを沈着し、密な組織様構造を形成した。その上、フォーム内の腎臓由来細胞は、血管新生および血管ネットワーク形成を刺激した。

10

20

30

40

50

【0164】

要約すると、ヒト腎臓特異的細胞は、生体内の微環境にさらした後に、細管構造を形成した。腎臓由来細胞の微環境シグナルに応答する能力および細管を形成するよう細胞に指令する能力は、更に、これらの細胞の腎臓前駆体の性質を示している。その上、細胞はフォーム足場へと遊走し、血管新生を促進した組織様構造を形成した。このデータは、腎尿細管を再建するための、および、究極的には腎組織工学適用における使用のための細胞ビルディングブロックとしての腎臓由来細胞の有用性を示している。

【0165】

〔実施例12〕

腎臓由来細胞は腎疾患の動物モデルにおいて腎保護的である

10

腎臓由来細胞は、腎臓修復および腎臓再生に関係するいくつかの栄養因子を分泌する（実施例6を参照のこと）。したがって、腎傷害を抱えている動物に、腎臓由来細胞を投与する場合、細胞は、損傷した腎臓を保護し修復する栄養因子を産生するだろう。腎不全の異なる3つの動物モデル、すなわち、薬物により誘導された傷害、虚血・再流傷害、および、尿管閉塞により誘導された傷害における腎保護について、腎臓由来細胞を試験するだろう。

【0166】

<腎不全の誘導>

虚血／再流傷害を、以下のように誘導する。マウスを十分な水とともに清潔なかごに入れる。毛を刈って手術部位を準備する。マウス（メイン州バーハーバーのThe Jackson Laboratory, から購入される6～8週齢のC57BL/6Jマウス）を、ケタミン（100mg/kg）およびキシラジン（mg/kg）を腹腔内に注射して麻酔する。麻酔のレベルは、足指つまみ反射がないことにより判定する。

20

【0167】

麻酔したマウスを、背面を下にして置き、腹部をベタジンで消毒する。小さな正中線上の切込みを、まず皮膚に、その後腹膜筋に入れる。腸をやさしく脇に移動し、腎臓を露出させ、腎臓動脈を同定する。血管クランプを用いて、両方の腎臓動脈を25～30分締め付ける。この間、マウスを、水循環性加熱パッドを用いてあたたかく保つ。また、露出された部位も、無菌の温生理食塩水および温生理食塩水に浸した無菌のガーゼ片であたたかく保つ。30分後、クランプを除去し、腹膜壁を1つまたは2つの不連続な縫合糸で縫合し、皮膚を創傷クリップで閉じる。薬物により誘導した腎不全は、マウスにシスプラチン（5または10mg/kg）を单一皮下注射することにより、行う。

30

【0168】

尿管閉塞により誘導された腎不全を、マウスにおいて、以下のように生じさせる。マウスをイソフルオラン（1～3%）で麻酔し、腹部を剃り、70%アルコールで洗浄後、ベタジンで処理する。正中線上の腹部切込みを2cm入れ、腹壁を開く。左の腎臓および尿管を脂肪がないように解剖する。2つの8-0非吸収性結び目を尿管に作り、その後結紮部間で切除する。腸を腹部にもどし、筋層を4-0Dexonで閉じ、皮膚をステープルで閉じる。

【0169】

<細胞移植>

40

細胞注入の時に、腎臓由来細胞を37（水浴）で解凍し、PBSで2回洗浄し、PBS 1mLに再懸濁する。ヘモサイトメーターを用いて、細胞を計数する。細胞生存率をトリパンブルー染料排出により決定する。注射の時に、細胞は75%以上の生存率を有さなくてはならない。もし生存率が75%未満ならば、細胞を廃棄するだろう。細胞を、 0.5×10^6 細胞 / PBS 300 μ L、または、 0.1×10^6 細胞 / PBS 300 μ Lの濃度で再構成する。PBS（キャリア溶媒）に懸濁した細胞を、26ゲージ針を取り付けた1mLシリンジを用いて、前顎面静脈に注射する。虚血／再流研究、および、尿管閉塞により誘導された傷害研究においては、処理群あたり10匹のマウスに、細胞またはPBSを傷害の2時間後に注射する。薬物により誘導された腎不全研究において、すべての動物が細胞またはPBSを傷害の24時後に受ける。

【0170】

50

腎不全誘導前、2、5、7日目に、血液サンプル(50μL)を尾静脈から収集する。HPLC検出を用いて、血清クレアチニンを分析する。Roche Diagnostics Systems(ニュージャージー州プランチバーグ)の検出キットを用いて、血中尿素窒素(BUN)濃度を測定する。

【0171】

腎保護栄養因子の分泌のために、腎臓由来細胞により、腎不全動物モデルにおける腎臓損傷が妨げられるかもしない。

【0172】

〔実施例13〕

げっ歯類におけるヒト腎臓由来細胞の腎保護効果の評価

10

<閉塞性腎症疾患のモデル>

予備研究の目的は、腎臓傷害の片側尿管閉塞症(UUO)モデルにおけるヒト腎臓由来細胞(hKDC)の腎保護効果を評価することであった。UUOモデルは、短期閉塞性腎症および尿細管間質線維症の有効なモデルである。腎保護効率を評価するために、細胞移植後12日目の傷害のあるマウスにおいて、細胞体内分布、血中尿素窒素(BUN)、血清クレアチニン(SCr)、および、組織傷害を判定した。この報告では、データは、剖検の時点で、傷害のある腎臓と傷害のない腎臓の両方に、hKDCが存在することを示す。組織判定は、0.2 × 10⁶ 個のhKDCの投与が、尿管閉塞により誘導された尿細管傷害の全体の程度を測定可能なほど減少させることを示した。

【0173】

20

慢性腎疾患(CKD)の多くの異なる病因にもかかわらず、線維症をもたらす尿細管間質腔内の炎症は、慢性腎不全の組織学的特徴である。CKDに対するアンジオテンシン変換酵素阻害剤およびアンジオテンシン受容体拮抗剤の広範な使用は、顕著な医療効果を示すけれども、これらの薬物は腎臓の線維症を停止するものではほとんどない。したがって、間質の線維形成を妨げるか、または、線維形成を抑制する新しい戦略を開発することが、近年の治療標準を改善するための重要な目標である。治療薬および小分子に基づいた治療を開発することに焦点をおいた努力にもかかわらず、細胞治療に基づくアプローチに対する調査は限定的である。

【0174】

30

近年の研究により、骨髄に由来する間葉系幹細胞(MSC)が向腎性であり、薬物および虚血-再灌流による傷害後の腎臓の修復を助けることが示されてきている。Morigi et al., Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2004 Jul; 15(7): 1794-804; Klahr and Morrissey. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. Am. J Renal Physiol. 2002 Nov; 283(5): F861-75. 2002参照。また、MSCは、グリセロールにより誘導された急性腎不全を阻害することが可能であることも示された。Herrera et al., Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. Int. J Mol Med. 2004 Dec; 14(6): 1035-41参照。興味深いことに、これらのMSCを介した保護効果は、幹細胞分化メカニズムを通じては機能しないのかもしれない、むしろ、細胞の傷害を妨げ、上皮および内皮の修復を促進する重要な栄養因子の分泌を通じて機能するのかもしれない。

40

【0175】

いくつかの動物モデルにおいて、MSCは実際に急性腎臓傷害の転帰を改善しているが、MSCが慢性腎疾患における腎不全を遅延させることができるかどうかはまだ決定されていない。研究により、移植されたMSCが、Alport疾患のマウスモデルにおける腎臓線維症のマーカーを減少させることに加え、管周囲の毛細血管の損失を妨げることができることが近年示されている。Ninichuk et al., Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. Kidney Int. 2006 Jul; 70(1): 121-9参照。また、不幸なことに、この研究は、移植されたMSCが、動物の生存を促進すること、または腎不全の発症を遅

50

延させることができなかったことも示している。

【0176】

近年の研究では、マウスUUOモデルにおけるhKDCの腎保護および抗線維効果が調査された。閉塞性腎症のUUOモデルは、腎臓の間質内で生じる分子変化および細胞変化を研究するための重要なツールであることが示されてきている。このモデルはまた、線維症、および、究極的には多くの慢性腎疾患の進行を停止し、または、逆転さえすることをねらいとする治療効率を決定することにおいて有用性を示してきている。

【0177】

<方法>

・動物モデル

13匹のメスC57BL/6Jマウス (The Jackson Laboratory, メーン州バー・バー) を、1 ~ 3 %のイソフルオランで麻酔した。各動物の腹部を剃り、70 %アルコールの後、ベタジンで清潔にした。正中線上の腹部の切込みを入れた。腹壁を開き、腸を胸部の上に引き出し、湿ったガーゼで保護した。左の腎臓を位置付け、尿管から脂肪がないように解剖した。2つの8-0非吸収性の結び目を尿管に作った。偽処理群については、結び目を用いなかった。腸を腹部に戻し、温生理食塩水 1 cm³を腹膜腔に入れた。その後、筋層を4-0 Dexonで閉じ、皮膚をステープルで閉じた。イソフルオランを中断し、100 %酸素により、歩行可能になるまで、加熱パッドの上でマウスを回復させた。

10

【0178】

・細胞調合物

hKDC (ロット番号032906; 6代継代) を、実施例1およびCBAT発明報告"Isolation of Human Kidney Derived Cells (Study 2)", March 29, 2006, David Colter, Agnes Seyda, Charito Buensuceso, Walter Laredoで説明されているように単離し、増殖した。HUTC (ロット番号2512380; 6代継代) をStem Cell Internal Venture (ペンシルベニア州ラドナー (Radnor)) から入手した。

20

【0179】

・細胞移植

動物が手術から回復直後に、HUTCおよび10代継代のhKDCを37 °Cで解凍し、Ca⁺⁺/Mg⁺⁺を含まないハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) で2回洗浄し、HBSS 1 mLに再懸濁した。その後、ヘモサイトメーターを用いて細胞を計数し、細胞生存率をトリパンブルー染料排出により決定した。細胞をHBSS中に生きている細胞 1.0×10^6 個 / mLの濃度で再構築した。その後、HBSS 200 μL中に懸濁された細胞を、27ゲージ針を取り付けた 1 mL シリンジを用いた尾静脈注射により移植した。

30

【表9】

表9：実験設計。偽動物は外科的な手順を経験した。
しかしながら、尿管は閉塞されなかった。

処理群	動物数	性別	試験材料	細胞用量
1	3	メス	偽	NA
2	5	メス	HUTC	0.2×10^6
3	5	メス	hKDC	0.2×10^6

40

【0180】

・体内分布

すべての動物を細胞移植後12日目に、二酸化炭素窒息により屠殺した。各動物から腎臓、肺、脳、および、心臓を除去した。その後、各腎臓の半分を組織分析のため10 %中性緩衝ホルマリンで固定した。残りの腎臓の半分および他のすべての器官を液体窒素中で急速冷凍した。その後、7 mm廃棄可能なローターステータージェネレータープローブを取り付けたOmni THホモジエナイザーを用いて冷凍された器官すべてをホモジエナイズした (Omni International, Inc., ジョージア州マリエッタ)。その後、全RNAを、RNeasyプラス

50

ミニキット (Qiagen, カリフォルニア州バレンシア) を用いて抽出した。RNAをDEPC処理水 50 μ Lに溶出し、NanoDrop 100 (NanoDrop Technologies, デラウェア州ウィルミントン) を用いて定量した。その後、ランダムヘキサマーおよびTaqman逆転写試薬 (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) を用いて、RNAを逆転写した。その後、ヒト特異的 2マイクログロブリンプライマープローブ (カタログ番号4310886E, Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) を用いて、PCR反応をcDNAサンプル上で行った。その後、ABI Prism 7900 HT配列検出システム (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティ) を用いて、PCRを行った。

【0181】

・血清化学分析

10

剖検の時点で全血を収集し、凝固させ、微遠心分離チューブの中に入れ、血清を他の血液成分から分離するために、2,500rpmで15分間遠心分離した。その後、血清サンプルをVetAce Chemistry Analyzer (Alpha Wassermann Diagnostic Technologies, LLC, ニュージャージー州ウェストコールドウェル) を用いて分析した。

【0182】

・組織評価

固定した腎組織をパラフィンワックスに包埋し、切片にし (5 μ m厚) 、ヘマトキシリントエオシン (H&E) 、および、マッソン三重染色で染色した。次に、尿細管傷害 (尿細管壊死、拡張、間質細胞湿潤) 、および、間質線維症 (コラーゲン沈着) について、1 ~ 4 の範囲 (1 = 最少量、2 = 軽度、3 = 中程度、4 = 重度) のスコア指数を用いて、切片を採点した。評価者には処理群の割り当てがわからないようにした。

20

【0183】

<結果>

・体内分布

移植された細胞の器官内分布を評価するために、RT-PCRに基づいた方法を利用した。ヒト 2マイクログロブリンRNA転写産物に特異的なリアルタイムPCRプライマー / プローブを利用した。表10および表11に示すように、多くのもので、HUTCおよびhKDCの両方を検出することができたが、すべての動物で検出できるとはかぎらなかった。偽処理は、ヒト細胞がこれらの動物には全く移植されていないという事実のため、効果的な陰性対照として役立った。表10に示すように、動物1由来の心臓は、3回の重複測定すべてにおいてCt値を示した。このサンプルの平均Ct値は、36.5であった。したがって、表10で示される3回の重複測定すべてが正のCt値を示す場合、正のシグナルが決定され、平均Ct値は36.5未満である。動物1がヒト細胞を受容していなかったという事実のために、36.5以上のCt値は、ヒト細胞がまったく検出されないということを示している。表11に示すように、偽処理した動物由来の組織は、ヒト細胞転写物を全く示さなかった。しかしながら、HUTCは、試験された5匹の動物のうちの2匹由来の器官で検出された。動物7由来の肺、傷害のある腎臓、および、傷害のない腎臓において、また、動物8由来の傷害のない腎臓、脳、肺において、細胞が検出された。hKDCは、試験された5匹の動物のうちの3匹で検出された。動物11の傷害のある腎臓、傷害のない腎臓、心臓、脳、および、肺において、細胞が検出された。また、動物12の傷害のある腎臓、傷害のない腎臓、および、心臓においても検出された。動物13の傷害のない腎臓、心臓、および、肺においても、hKDCが検出された。

30

【0184】

・血清化学

腎機能を判定するために、BUNおよびSCrを測定した。片側閉塞症モデルにおいて、2つの腎臓のうちの1つは傷害のないままである。したがって、動物は、傷害のある腎臓により被る腎機能欠失を補償することができる。残っている傷害のない腎臓のおかげで、BUNおよびSCrは、正常の範囲内であることが期待される。表12に示すように、BUNおよびSCr両方の血清レベルは、すべての処理群で変化しないままである。偽処理は、20.7+/-3.2mg/dLの平均BUN測定値、および、0.4+/-0.06 mg/dLのSCr値を示した。HUTC処理は、結果的

40

50

に、 $25.6+/-5.0$ mg/dLの平均BUN測定値、および、 $0.4+/-0.07$ のSCr値をもたらした。hKDC処理は、結果的に、 $26.0+/-4.7$ mg/dLの平均BUN測定値、および、 $0.4+/-0.04$ mg/dLのSCr値をもたらした。

【 0 1 8 5 】

・組織学

尿細管傷害、および間質線維症の程度を、偽処理、HUTC処理、hKDC処理した動物由来の組織切片において、定性的に測定した。表1_3に示すように、偽処理は結果的に、最小の尿細管損傷を生じ、評価した3匹の動物すべてにおいて1.0のスコアであった。HUTC処理は結果的に、最小の尿細管修復を生じ、平均傷害スコアは4.0であった。しかしながら、HUTC処理と比較して、hKDC処理は結果的に、尿細管傷害の全体的な程度を減少させ、5匹すべての動物で3.0の傷害スコアを示した。纖維性の変化に関して、偽処理した動物は、腎臓の間質内に最小程度のコラーゲン沈着を示し、それゆえ最小の線維症（平均スコア=1.0）を示した。しかしながら、HUTCおよびhKDC処理は、軽度の線維症の証拠を示し、それぞれ2.4および2.0の平均スコアを示した。

【 0 1 8 6 】

この報告では、hKDCの腎保護効果および抗纖維性効果が説明される。データは、移植後12日目の傷害のある腎臓および傷害のない腎臓の両方に、移植したヒト細胞が存在することを示している。hKDC処理は、hUTC処理と比較して、尿細管傷害の全体的な程度において、測定可能な減少を引き起こした。したがって、この予備研究は、hKDCが、閉塞性腎症のUUOモデルにおける腎保護効果を誘発することを示している。

10

20

【表10】

表10：体内分布。ヒト β マイクログロブリンRNA転写物の存在について
RT-PCRにより、器官組織を評価した。分析は各組織について3回実行した。処理
群割り当てについては表9を参照のこと。“Ct”：サイクル閾値、“nd”：未検出、
“腎臓(1)”：傷害のある腎臓。ここに示すデータを表1-1にまとめている。

処理群1			処理群2			処理群3		
動物	組織	Ct	動物	組織	Ct	動物	組織	Ct
1	心臓	35.78	4	腎臓(1)	37.86	9	腎臓(1)	nd
1	心臓	37.20	4	腎臓(1)	nd	9	腎臓(1)	nd
1	心臓	36.40	4	腎臓(1)	nd	9	腎臓(1)	nd
1	脳	nd	4	心臓	nd	9	心臓	nd
1	脳	nd	4	心臓	nd	9	心臓	nd
1	脳	39.13	4	心臓	nd	9	心臓	nd
1	肺	nd	4	脳	nd	9	脳	37.37
1	肺	37.76	4	脳	nd	9	脳	nd
1	肺	nd	4	脳	nd	9	脳	nd
2	心臓	nd	4	肺	nd	9	肺	nd
2	心臓	nd	4	肺	35.84	9	肺	nd
2	心臓	nd	4	肺	nd	9	肺	nd
2	脳	nd	5	腎臓(1)	nd	10	腎臓(1)	nd
2	脳	nd	5	腎臓(1)	nd	10	腎臓(1)	37.36
2	脳	nd	5	腎臓(1)	nd	10	腎臓(1)	nd
2	肺	nd	5	心臓	nd	10	心臓	nd
2	肺	nd	5	心臓	nd	10	心臓	nd
2	肺	nd	5	心臓	nd	10	心臓	nd
3	心臓	38.72	5	脳	nd	10	脳	nd
3	心臓	nd	5	脳	32.80	10	脳	nd
3	心臓	nd	5	脳	nd	10	脳	nd
3	脳	nd	5	肺	nd	11	腎臓(1)	36.48
3	脳	nd	5	肺	nd	11	腎臓(1)	38.58
3	脳	nd	5	肺	nd	11	腎臓(1)	35.72
3	肺	nd	6	腎臓(1)	nd	11	腎臓	32.57
3	肺	nd	6	腎臓(1)	nd	11	腎臓	32.22
3	肺	nd	6	腎臓(1)	nd	11	腎臓	31.61
6	心臓	nd	6	心臓	nd	11	心臓	33.55
6	心臓	nd	6	心臓	nd	11	心臓	34.21
6	心臓	nd	6	心臓	nd	11	心臓	32.91
6	脳	nd	6	脳	nd	11	脳	35.33
6	脳	nd	6	脳	nd	11	脳	34.94
6	脳	nd	6	脳	37.62	11	脳	35.28
6	肺	nd	6	肺	nd	11	肺	33.73
6	肺	nd	6	肺	nd	11	肺	34.01
6	肺	nd	6	肺	nd	11	肺	33.99
7	腎臓(1)	nd	7	腎臓(1)	33.41	12	腎臓(1)	34.62
7	腎臓(1)	nd	7	腎臓(1)	33.12	12	腎臓(1)	34.84
7	腎臓(1)	nd	7	腎臓(1)	33.45	12	腎臓(1)	34.51
7	腎臓	nd	7	腎臓	34.07	12	腎臓	34.94
7	腎臓	nd	7	腎臓	33.78	12	腎臓	35.55
7	腎臓	nd	7	腎臓	33.81	12	腎臓	34.32
7	心臓	nd	7	心臓	nd	12	心臓	34.52
7	心臓	nd	7	心臓	38.79	12	心臓	34.71
7	心臓	nd	7	心臓	39.97	12	心臓	34.38

7	脳	nd	12	脳	25.19	
7	脳	nd	12	脳	nd	
7	脳	nd	12	脳	nd	
7	肺	31.69	12	肺	nd	
7	肺	31.84	12	肺	nd	
7	肺	31.92	12	肺	39.21	
8	腎臓(I)	nd	13	腎臓(I)	nd	
8	腎臓(I)	nd	13	腎臓(I)	38.66	
8	腎臓(I)	nd	13	腎臓(I)	nd	
8	腎臓	34.16	13	腎臓	33.52	10
8	腎臓	34.61	13	腎臓	33.36	
8	腎臓	34.08	13	腎臓	32.69	
8	心臓	nd	13	心臓	34.76	
8	心臓	nd	13	心臓	34.55	
8	心臓	nd	13	心臓	34.28	
8	脳	31.59	13	脳	nd	
8	脳	31.73	13	脳	38.78	
8	脳	31.76	13	脳	38.01	
8	肺	32.64	13	肺	33.52	
8	肺	32.96	13	肺	33.79	
8	肺	33.44	13	肺	34.11	

【表11】

20

表11：体内分布の概要。示されたデータは、ヒト細胞について陽性である動物の数／試験した動物の全数を示している。表10で示された3回の重複測定が、正のCt値を有し、平均Ct値が36.5未満の場合、正のシグナルが決定される。処理群割り当てについては表9を参照のこと。"nd"：未決定、"腎臓(I)"：傷害のある腎臓。

	群 1	群 2	群 3
腎臓(I)	nd	1/5	2/5
腎臓	nd	1/5	3/5
心臓	0/3	0/5	3/5
脳	0/3	1/5	1/5
肺	0/3	1/5	2/5

30

【表 1 2】

表 12：血清化学。処理群割り当てについては、表 9 を参照のこと。SEM：平均値の標準誤差。

処理	動物数	BUN (mg/dL)	クレアチニン (mg/dL)
1	1	22	0.4
	2	23	0.4
	3	17	0.3
		平均: 20.7 SEM: 3.2	平均: 0.4 SEM: 0.06
2	4	24	0.4
	5	21	0.5
	6	26	0.4
	7	23	0.4
	8	34	0.3
		平均: 25.6 SEM: 5.0	平均: 0.4 SEM: 0.07
3	9	33	0.5
	10	24	0.4
	11	20	0.4
	12	26	0.4
	13	27	0.4
		平均: 26.0 SEM: 4.7	平均: 0.4 SEM: 0.04

10

20

【表13】

表13：組織学。腎臓尿細管傷害（尿細管壊死、拡張、および、間質細胞浸潤）、および、線維症（コラーゲン沈着）の程度を、盲検により、1～4の範囲のスコア指数（1＝最小、2＝軽度、3＝中程度、4＝重度）を用いて採点した。

動物	処理群 1	
	線維症	尿細管傷害
1	1	1
2	1	1
3	1	1
	平均：1.0	平均：1.0

10

動物	処理群 2	
	線維症	尿細管傷害
4	2	4
5	2	4
6	2	4
7	3	4
8	3	4
	平均：2.4	平均：4.0

20

動物	処理群 3	
	線維症	尿細管傷害
9	2	3
10	2	3
11	2	3
12	2	3
13	2	3
	平均：2.0	平均：3.0

20

【0187】

本明細書中に引用したすべての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願それぞれが、あらゆる目的のために参照により組み入れられることを具体的かつ個別に示されているかのように、あらゆる目的のために参照により全体として本明細書に組み入れられる。

30

【0188】

上記の発明は、理解を明確にするための説明および例として、幾分詳細に説明してきたが、本発明の教示を踏まえると、添付した特許請求の範囲の精神または範囲から離れることなく、特定の変更および修飾がなされてもよいということが、本分野の通常の知識を有する者にとって容易に明らかであるだろう。

なお、本発明の実施態様は、以下のとおりである。

(1) 単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団において、

40

前記細胞集団が、培養中で自己複製し増殖する能力があり、

前記細胞集団が、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、細胞集団。

(2) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、細胞集団。

(3) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

50

細胞表面マーカーHLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である、細胞集団。

(4) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

表面マーカーHLA I、CD166、または、SSEA-4のうちの少なくとも1つについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、CD86、CD133、CD141、または、E-cadherinのうちの少なくとも1つについて陰性である、細胞集団。

(5) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、またはCD86のうちの少なくとも1つについて陰性である、細胞集団。

10

(6) 実施態様(5)に記載の細胞集団において、

前記細胞集団が、哺乳動物患者における同種移植について非免疫原性である、細胞集団。

(7) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

前記細胞が、腎皮質に由来する、細胞集団。

(8) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

前記細胞が、腎髄質に由来する、細胞集団。

(9) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

前記細胞が、腎被膜下部位に由来する、細胞集団。

20

(10) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

前記細胞集団が、栄養因子FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2、または、VEGFのうちの少なくとも1つを分泌し、栄養因子PDGF-bb、または、IL12p70のうちの少なくとも1つを分泌しない、細胞集団。

(11) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

前記細胞集団が、ヒト細胞、靈長類細胞、または、げっ歯類細胞を含む、細胞集団。

(12) 実施態様(1)に記載の細胞集団において、

前記細胞集団が、腎臓前駆細胞を含む、細胞集団。

(13) 実施態様(12)に記載の細胞集団において、

前記腎臓前駆細胞が、脂肪細胞または骨芽細胞に分化する能力がある、細胞集団。

30

(14) 哺乳動物患者における虚血性腎疾患を治療するための方法において、

前記哺乳動物患者に、実施態様(1)～(13)のうちのいずれかに記載の前記細胞集団の治療上有効な量を投与し、それにより、前記哺乳動物患者における虚血性腎組織疾患を減少させるか、または、取り除くこと、

を含む、方法。

(15) 実施態様(14)に記載の方法において、

前記細胞集団の投与が、(a)虚血組織へ血液を供給する血管の形成、(b)前記虚血組織への血流、(c)前記虚血組織への酸素供給、および、(d)それらの組み合わせから選択される効果を誘導する、方法。

(16) 実施態様(14)に記載の方法において、

40

前記細胞の投与が、腎被膜下部位組織、腎皮質組織、または、腎髄質組織の形成を誘導する、方法。

(17) 実施態様(14)に記載の方法において、

前記哺乳動物患者が、ヒト、靈長類、または、げっ歯類である、方法。

(18) 哺乳動物患者において、外傷、年齢、代謝傷害もしくは毒性傷害、疾患、または、突発性損失のために損傷された腎臓の組織、器官、成分、または、構造を置換するための方法において、

前記哺乳動物患者に、実施態様(1)～(13)のうちのいずれかに記載の前記細胞集団の治療上有効な量を投与し、それにより、前記損傷された組織もしくは器官を減少させるか、もしくは、取り除き、前記哺乳動物患者における腎機能を回復させること。

50

を含む、方法。

(19) 実施態様(18)に記載の方法において、

前記細胞集団の投与が、(a)腎組織へ血液を供給する血管の形成、(b)前記腎組織への血流、(c)前記腎組織への酸素供給、および、(d)それらの組み合わせから選択される効果を誘導する、方法。

(20) 実施態様(18)に記載の方法において、

前記細胞集団の投与が、腎被膜下部位組織、腎皮質組織、または、腎髓質組織の形成を誘導する、方法。

(21) 実施態様(18)に記載の方法において、

前記哺乳動物患者が、ヒト、靈長類、または、げっ歯類である、方法。

10

(22) 単離された哺乳動物腎臓由来細胞集団を準備するための方法において、

哺乳動物の腎臓の被膜下部位、皮質、または、髓質から組織を入手することと、

前記組織の少なくとも一部を個々の細胞に分解するために、メタロプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、または、粘液溶解酵素のうちの1つ以上の存在下で、前記組織をインキュベーションすることと、

前記細胞を、基質上にまくことと、

前記細胞のうち、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である細胞サブセットを同定することと、

20

前記哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供するために、前記細胞サブセットを単離することと、

を含む、方法。

(23) 実施態様(22)に記載の方法において、

前記細胞集団が、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、方法。

(24) 実施態様(22)に記載の方法において、

細胞サブセットを同定する工程であって、

前記細胞サブセットが、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA II、CD80、または、CD86のうちの少なくとも1つについて陰性である工程、

30

をさらに含む、方法。

(25) 実施態様(24)に記載の方法において、

前記細胞集団が、哺乳動物患者における同種移植について非免疫原性である、方法。

(26) 実施態様(22)に記載の方法において、

前記組織が、哺乳動物の腎臓の前記皮質に由来する、方法。

(27) 実施態様(22)に記載の方法において、

前記組織が、哺乳動物の腎臓の前記髓質に由来する、方法。

(28) 実施態様(22)に記載の方法において、

前記組織が、哺乳動物の腎臓の前記被膜下部位に由来する、方法。

40

(29) 実施態様(22)に記載の方法において、

前記基質が、組織培養フラスコ、足場、または、中空で纖維基材の装置である、方法。

(30) 実施態様(22)に記載の方法において、

単一の哺乳動物腎臓由来細胞を、限界希釈により単離することと、

前記単一細胞を、細胞培養中で増殖することと、

をさらに含む、方法。

(31) 実施態様(22)に記載の方法において、

前記組織が、ヒトの腎臓に由来する、方法。

(32) 哺乳動物患者における疾患を遺伝子治療により治療するための方法において、

培養中で自己複製し増殖する能力がある、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞

50

集団を入手することであって、

前記細胞集団が、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、

細胞集団を入手することと、

前記単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団のうちの少なくとも1つの細胞を、治療上の遺伝子産物を產生するように遺伝子改変することと、

前記遺伝子改変された細胞を、培養中で増殖することと、

前記哺乳動物患者における前記疾患を減少させるか、または、取り除くために、前記遺伝子改変された細胞を、前記哺乳動物患者に投与することと、

を含む、方法。

(33) 実施態様 (32) に記載の方法において、

前記細胞集団が、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、方法。

(34) 実施態様 (32) に記載の方法において、

前記細胞集団が、細胞表面マーカーHLA Iについて陽性であり、細胞表面マーカーHLA I、CD80、または、CD86のうちの少なくとも1つについて陰性である、方法。

(35) 実施態様 (34) に記載の方法において、

前記細胞集団が、前記哺乳動物患者における同種移植について非免疫原性である、方法。

(36) 実施態様 (32) に記載の方法において、

前記遺伝子改変された細胞が、前記哺乳動物患者における腎疾患、腎傷害、腎虚血、または、遺伝的欠陥を治療するために、前記哺乳動物患者の腎臓に投与される、方法。

(37) 実施態様 (32) に記載の方法において、

前記哺乳動物患者が、ヒト、靈長類、または、げっ歯類である、方法。

(38) 実施態様 (32) に記載の方法において、

前記哺乳動物腎臓由来細胞集団が、ヒト、靈長類、または、げっ歯類の腎臓に由来する、方法。

(39) 実施態様 (38) に記載の方法において、

前記哺乳動物腎臓由来細胞集団が、ヒトの腎臓に由来し、

出産前または出産後のヒト患者において、移植後にヒト腎細胞を產生するために、前記細胞が、子宮内に移植され、

前記細胞が、前記ヒト患者における前記疾患を減少させるか、または、取り除くために、ヒトまたは動物における治療上の産物を產生する、方法。

(40) 哺乳動物患者における腎臓の細胞に関わる異常を治療するための薬物候補をスクリーニングするための方法において、

(a) 単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供する工程であって、

前記集団が、培養中で自己複製し増殖する能力があり、

前記細胞集団が、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、

工程と、

(b) 試験管内で自己複製し増殖する能力、または、向上した能力を有する細胞を含む細胞組成物を入手するための増殖条件下で、前記哺乳動物腎臓由来細胞集団を培養する工程と、

(c) 工程 (a) または (b) から入手された前記培養された細胞を、前記薬物候補に曝露する工程と、

10

20

30

40

50

(d) 前記細胞の生存に対する、あるいは、前記細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および／または、分子生物学的特性に対する前記薬物候補の効果の存在または不存在を検出する工程であって、

それにより、細胞生存、前記細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および／または、前記細胞の分子生物学的特徴を変える効果が、腎臓の細胞異常を治療するための前記薬物候補の活性を示す、

工程と、

を含む、方法。

(41) 実施態様 (40) に記載の方法において、

前記細胞集団が、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、方法。

10

(42) 実施態様 (40) に記載の方法において、

前記細胞の前記形態的、機能的、もしくは、生理的特徴が、尿細管の向上した形成、または、BMPもしくはBMPレセプターの発現である、方法。

(43) 実施態様 (40) に記載の方法において、

前記細胞の前記形態的、機能的、もしくは、生理的特徴が、栄養因子FGF2、HGF、TGF、TIMP-1、TIMP-2、VEGF、または、MMP-2のうちの少なくとも1つ以上の向上した分泌である、方法。

(44) 実施態様 (40) に記載の方法において、

20

前記異常が、虚血性腎疾患、あるいは、哺乳動物患者における外傷、年齢、代謝傷害もしくは毒性傷害、疾患、または、突発性損失に起因する腎臓の組織、器官、成分、もしくは、構造に対する損傷である、方法。

(45) 腎細胞機能に影響する試験物質の毒性を分析するための方法において、

(a) 培養中で自己複製し増殖する能力がある、単離または精製された哺乳動物腎臓由来細胞集団を提供する工程であって、

前記細胞集団が、Oct-4、Rex-1、Pax-2、Cadherin-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXCR4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7、または、GDF5のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2、または、GATA-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、

30

工程と、

(b) 前記細胞集団を、前記試験物質に曝露する工程と、

(c) 前記集団中の前記細胞の生存、あるいは、前記集団中の前記細胞の形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および／または、分子生物学的特性に対する前記試験物質の効果の存在または不存在を検出する工程であって、

それにより、前記集団中の前記細胞の細胞生存、形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴、および／または、前記集団中の前記細胞の分子生物学的特徴を変える効果が、腎細胞機能に対する前記試験物質の前記毒性を示す、

工程と、

を含む、方法。

40

(46) 実施態様 (45) に記載の方法において、

前記細胞集団が、Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR、または、Rex-1のうちの少なくとも1つの発現について陽性であり、Sox2、FGF4、hTert、または、Wnt-4のうちの少なくとも1つの発現について陰性である、方法。

(47) 実施態様 (45) に記載の方法において、

前記細胞の前記形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴が、尿細管の形成、または、BMPもしくはBMPレセプターの発現である、方法。

(48) 実施態様 (47) に記載の方法において、

前記試験物質の毒性上昇が、尿細管の形成低下、または、BMPもしくはBMPレセプターの発現低下として測定される、方法。

50

(49) 実施態様 (45) に記載の方法において、

前記細胞の前記形態的、機能的、もしくは、生理的な特徴が、栄養因子FGF2、HGF、TGF
、TIMP-1、TIMP-2、VEGF、または、MMP-2のうちの少なくとも1つ以上の分泌である、
方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 13/12 (2006.01) A 6 1 P 13/12

(72)発明者 セイダ・アグニースツカ
アメリカ合衆国、0 8 8 2 3 ニュージャージー州、フランクリン・パーク、グレゴリー・レーン
1 4 1
(72)発明者 ブエンスセソ・チャリト・エス
アメリカ合衆国、0 8 9 0 2 ニュージャージー州、ノース・プランズウィック、ペチュニア・ド
ライブ 1 1、アパートメント 1 ジェイ
(72)発明者 ゴシーウスカ・アンナ
アメリカ合衆国、0 8 5 5 8 ニュージャージー州、スキルマン、レッド・フォックス・コート
3 9

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 5 / 0 2 1 7 3 8 (WO , A 1)
国際公開第2 0 0 2 / 0 6 1 0 5 3 (WO , A 1)
J. Am. Soc. Nephrol, (2006), Vol. 17, p. 2443-2456
J. Am. Soc. Nephrol, (2006), Vol. 17, p. 188-198
FASEB J., (2005), Vol. 19, p. 1789-1797
Am. J. Pathol, (2005), Vol. 166, No. 2, p. 545-555
J. Clin. Invest., (2004), Vol. 114, p. 795-804
J. Cell. Biol., (2005), Vol. 169, No. 6, p. 921-928
大和証券ヘルス財団の助成による研究業績集 第2 9 集、平成1 8 年3 月1 日発行、p. 12-16

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 1 2 N 5 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 0 2
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)