

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年10月6日(06.10.2022)



(10) 国際公開番号

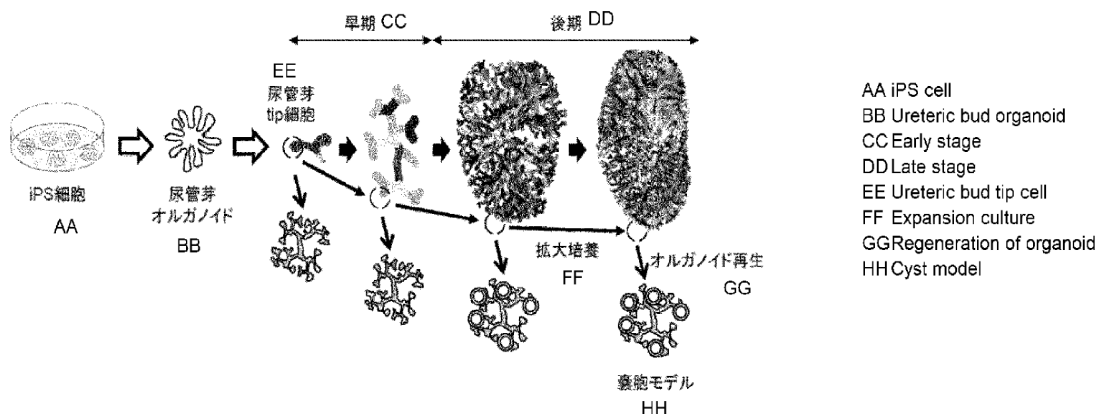
WO 2022/210968 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/016274
- (22) 国際出願日: 2022年3月30日(30.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2021-060242 2021年3月31日(31.03.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 長船 健二 (OSAFUNE, Kenji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 前伸一 (MAE, Shinichi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAOKA, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) Title: ARTIFICIAL COLLECTING DUCT ORGANOID HAVING CYSTIC STRUCTURE

(54) 発明の名称: 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイド

[図1]



(57) Abstract: Provided is a method for producing a collecting duct cyst model, the method comprising the following steps: (1) a step for culturing an autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)-specific ureteric bud tip cell in a culture medium containing a glial cell line-derived neurotrophic factor, a fibroblast growth factor, a retinoic acid receptor agonist, a GSK3β inhibitor and a Yes-associated protein (YAP) activity inhibitor; and (2) a step for culturing a culture product produced in step (1) in a culture medium containing a Wnt signaling activator, a BMP inhibitor, a fibroblast growth factor, a retinoic acid receptor agonist and a glial cell line-derived neurotrophic factor to produce an artificial collecting duct organoid having a cystic structure.

WO 2022/210968 A1

TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
  - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))
- 

(57) 要約：以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルの製造方法を提供する：(1) 常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) 特異的尿管芽先端部細胞を、グリア細胞株由来神経栄養因子、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、GSK3 $\beta$ 阻害剤およびYes-associated protein(YAP)活性阻害剤を含む培地で培養する工程、および(2) 工程(1)で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子、BMP阻害剤、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、およびグリア細胞株由来神経栄養因子を含む培地で培養して、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを得る工程。

## 明 細 書

発明の名称： 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイド

### 技術分野

[0001] 本願は、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドに関する。

### 背景技術

[0002] 難治遺伝性疾患である常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD)は、腎臓に進行性に多数の嚢胞を形成し、中年期以降に末期腎不全に進行する。ADPKDの原因遺伝子は、85%の症例がPKD1、15%の症例がPKD2であり、これらの遺伝子を改変した疾患モデルマウスやラットなどの実験動物を用いた研究が行われてきたが、完全な病態解明には至らず、根治的な治療法も開発されていない。

[0003] 近年、難治性疾患の患者体細胞から樹立したiPS細胞または健常者由来のiPS細胞に原因遺伝子変異を導入した疾患特異的iPS細胞を樹立し、in vitroにおいて罹患細胞種に分化誘導することによって、病態を再現する疾患モデルを作製し、詳しい病態解析や治療薬探索を行う研究が盛んに行われている。しかし、ADPKDの腎嚢胞については、未だ病態解析や治療薬探索に使用可能なiPS細胞を用いた疾患モデルは十分に確立されていない課題が存在する。

[0004] ADPKDでは腎尿細管ではなく、主に腎集合管から嚢胞が発生する。ADPKD特異的多能性幹細胞またはADPKD患者由来多能性幹細胞から腎尿細管組織を分化誘導し、腎嚢胞を再現することは報告されているが(非特許文献1～3)、腎集合管分化系を用いた腎嚢胞モデルの報告はない。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0005] 非特許文献1: Freedman BS. et al., Nat Commun 6, 8715 (2015);  
非特許文献2: Czerniecki SM. et al., Cell Stem Cell 22 929-940 (2018);  
非特許文献3: Shimizu T. et al., Biochem Biophys Res Commun. 529, 1186-1194 (2020);

非特許文献4 : Mae, SI. & Ryosaka, M. et al. Cell Reports 32, 4, 107943

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本願は、集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを提供することを目的とする。本願により提供される嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドは、集合管嚢胞モデルとして用いることができる。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本願は、集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを提供する。本願はまた、集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有するオルガノイドである、集合管嚢胞モデルを提供する。

[0008] 本願はまた、以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルの製造方法を提供する：

(1) 常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) 特異的尿管芽先端部細胞を、グリア細胞株由来神経栄養因子、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、GSK3 $\beta$  阻害剤およびYes-associated protein(YAP)活性阻害剤を含む培地で培養する工程、および

(2) 工程(1)で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子、BMP阻害剤、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、およびグリア細胞株由来神経栄養因子を含む培地で培養して、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを得る工程。

[0009] 本願はまた、以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルを継代培養する方法を提供する：

(a) 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを単一の細胞に解離させる工程、

(b) 該細胞を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養する工程、

および

(c) 工程 (b) で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養して、嚢胞オルガノイドを得る工程。

[0010] 本願はまた、以下の工程を含む、ADPKDを治療する物質をスクリーニングする方法を提供する：

(i) 候補物質を、集合管嚢胞モデルに接触させる工程；

(ii) 該集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が縮小または消失しているか否かを確認する工程。

[0011] 本願はまた、以下の工程を含む、ADPKDを予防する物質をスクリーニングする方法を提供する：

(i') 本願の集合管嚢胞モデルの製造方法を実施して、集合管嚢胞モデルを製造する工程、ここで各工程の少なくとも1つの工程における培地は候補物質をさらに含む；

(ii') 該集合管嚢胞モデルにおいて嚢胞構造が形成されているか否かを確認する工程。

### 発明の効果

[0012] 本願により、集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドが提供される。嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを継代培養して、嚢胞オルガノイドを再生することができる。また本願の方法により得られる嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドおよびこれを継代して得られる嚢胞オルガノイドは、集合管嚢胞モデルとして用いることができる。本願はまた、ADPKDを治療する物質をスクリーニングする方法およびADPKDを予防する物質をスクリーニングする方法を提供する。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]本実施例の内容を示す模式図。早期段階の尿管芽先端部細胞から誘導されたオルガノイドは嚢胞構造を有しないが、後期段階の尿管芽先端部細胞から誘導されたオルガノイドは嚢胞構造を有する。

[図2]PKD1遺伝子座におけるgRNAの標的部位。

[図3]PKD1ノックアウト細胞株におけるPKD1変異DNA。

[図4]PKD1ノックアウト細胞株におけるPKD1変異mRNA。

[図5]PKD1変異mRNAから予測されるアミノ酸配列。アスタリスクは未成熟終止コドンを示す。

[図6]PKD1ノックアウトiPS細胞から誘導された尿管芽オルガノイド。

[図7]6週間維持培養したPKD1ノックアウトiPS細胞由来の尿管芽先端部細胞の形態。

[図8]2週間および6週間維持培養した尿管芽先端部細胞における遺伝子発現量を可視化したMAプロット。2週間ではSALL4, KIT, およびAVPR1Aが高発現しており、6週目ではLCN2発現が亢進していた。

[図9]4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間および10週間継代培養した尿管芽先端部細胞から誘導したオルガノイドの形態。6週間以上継代培養した尿管芽先端部細胞から嚢胞構造を有するオルガノイドが誘導された。

[図10]嚢胞のAQP2（緑色）およびAVPR2（紫色）での免疫染色像。

[図11]585A1株、1231A3株および1383D2株のPKD1ノックアウトiPS細胞から誘導されたオルガノイドの形態。

[図12]Forskolinで処理された（右図）、またはForskolinで処理されていない（左図）嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドの形態。

[図13]嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドから作製された嚢胞細胞スフェロイドの形態。

[図14]図13のスフェロイドから誘導された嚢胞オルガノイドの形態。

[図15]Wnt3a, R-spondin 1, FGF1の組み合わせで作製された嚢胞オルガノイドの形態。

[図16]ADPKD患者由来iPS細胞から作製した尿管芽オルガノイド、尿管芽先端部細胞、および嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドの形態。

[図17]CiRA00007株のPKD1遺伝子座。CiRA00007株は、エクソン41に遺伝子変異があり、polycystin1タンパク質の3818番目のアミノ酸がグリシン（G）か

らアルギニン (R) に変化するミスセンス変異を有している。

[図18]ADPKD患者由来iPS細胞から作製した嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドのAQP2 (緑色) での免疫染色像。

[図19]PKD1遺伝子変異を有さない (PKD1<sup>+/+</sup>) iPS細胞およびPKD1ノックアウト (PKD1<sup>-/-</sup>) iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞における遺伝子リスト (cilium\_GO\_0005929) に含まれる遺伝子の発現パターンを示すヒートマップ。

[図20]PKD1<sup>+/+</sup> iPS細胞およびPKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞における遺伝子リスト (cilium movement\_GO\_0003341) に含まれる遺伝子の発現パターンを示すヒートマップ。

[図21]PKD1<sup>+/+</sup> iPS細胞およびPKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞における細胞周期に関連する遺伝子セット (E2F target, G2M checkpoint) のgene set enrichment解析 (GSEA)。

[図22]PKD1<sup>+/+</sup> iPS細胞およびPKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞におけるエネルギー代謝に関連する遺伝子セット (Oxidative phosphorylation) のgene set enrichment解析 (GSEA)。

[図23]PKD1<sup>+/+</sup> iPS細胞およびPKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞におけるコレステロール代謝に関連する遺伝子セット (Cholesterol homeostasis, Bile acid metabolism) のgene set enrichment解析 (GSEA)。

[図24]PKD1<sup>+/+</sup> iPS細胞およびPKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞における細胞内コレステロール量。

[図25]尿管芽先端部細胞の培養工程に1 $\mu$ M Fluvastatinを追加して、または追加せずに作製した集合管嚢胞モデルの形態の比較。有意差の検定にはカイ二乗検定を用いた。

[図26]2.5 $\mu$ M AVPを含む培地または2.5 $\mu$ M AVPを含まない培地を用いて単一の嚢胞細胞から作製した嚢胞の形態。

[図27]2.5 $\mu$ M AVPを含む培地または2.5 $\mu$ M AVPを含まない培地を用いて作製した嚢胞の撮影画像におけるすべての嚢胞の面積をグラフ化した。有意差の

検定にはMann-Whitney U検定を用いた。

[図28]0.1% DMSOまたは5 $\mu$ M Tolvaptanを添加して作製した囊胞の面積の平均の比較。有意差の検定にはStudent' s t検定を用いた。

[図29]0.1% DMSO、1 $\mu$ M Venglustat、0.1 $\mu$ M Bardoxolone methyl、または1 $\mu$ M Tesevatinibを添加して作製した囊胞の面積の平均の比較。有意差の検定にはOne-way ANOVAおよびTukey' s t検定を用いた。

### 発明を実施するための形態

- [0014] 本開示では、数値が「約」の用語を伴う場合、その値の $\pm 10\%$ の範囲を含むことを意図する。例えば、「約20」は「18~22」を含むものとする。数値の範囲は、両端点の間の全ての数値および両端点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。従って、例えば「約20~30」は「18~33」を含むものとする。
- [0015] 本願明細書および請求の範囲において、「ある特定種類の細胞」の表現は、特に断りがなければ当該種類の細胞が含まれている細胞群を意味し、当該細胞群には特定された種類の細胞以外の種類の細胞が含まれていてもよい。例えば「ある特定種類の細胞の培養物」は、当該種類の細胞が含まれる細胞群の培養物を意味し、特定された種類の細胞以外の細胞が含まれていてもよい。同様に、「ある特定種類の細胞集団」の表現は、特に断りがなければ当該種類の細胞が含まれている細胞集団を意味し、当該細胞集団には特定された種類の細胞以外の細胞が含まれていてもよい。
- [0016] 本願において、培地は動物細胞の培養に用いられる基礎培地に必要な因子を適宜添加して調製され得る。基礎培地としては、例えばMEM Zinc Option培地、IMEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle' s Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$ MEM培地、Dulbecco' s modified Eagle' s Medium (DMEM) 培地、DMEM/F12培地、Ham' s F12培地、RPMI 1640培地、Fischer' s培地、およびこれらの混合培地などが包含される。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清（FBS））が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えばアルブミン、トランスフェリン、KnockOut Se



rum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Thermo Fisher Scientific)、N2サプリメント (Thermo Fisher Scientific)、B27サプリメント (Thermo Fisher Scientific)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glu taMAX (Thermo Fisher Scientific)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類およびこれらの同等物などの1つ以上の物質、あるいはその他の通常動物培養用培地に添加される1つ以上の物質を含有し得る。

[0017] 本願で使用される基礎培地は、例えばDMEM/F12培地、またはDMEM/F12培地にL-ascorbic acid-2-phosphate magnesium, sodium selenium, insulin, Na HCO<sub>3</sub>およびトランスフェリンが添加された無血清培地であるEssential 6<sup>(商標)</sup>培地 (Thermo Fisher Scientific) であり得る。

[0018] 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイド

本願は、集合管主細胞に特異的なマーカー、例えばAQP2および/またはAVPR2などを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを提供する。ある態様では、該嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドにおいて、嚢胞を構成する細胞（以下、「嚢胞構成細胞」という）の20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または99%以上が、集合管主細胞に特異的なマーカー（例えばAQP2およびAVPR2など）を発現している。好ましくは、実質的にすべての嚢胞構成細胞が集合管主細胞に特異的なマーカーを発現している。「嚢胞」とは、液体を内包する、細胞によって覆われた球状の嚢状物を意味する。嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドのサイズは、例えば約100~約5000 μmである。嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドは、複数の嚢胞を含んでもよい。嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の嚢胞を含む。1つの嚢胞のサイズは、例えば約10~約200 μmである。人工集合管オル

ガノイドであることは、公知の集合管マーカーの発現によって確認できる。例えば、ARL13B（繊毛マーカー）、FOXA1、E-CADHERIN（上皮マーカー）、およびCYTOKERATIN19などの発生早期集合管マーカーの発現によって確認してもよい。本発明の嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドでは、嚢胞構成細胞およびそれ以外の細胞において、このような発生早期集合管マーカーの発現が観察され得る。人工集合管オルガノイドの嚢胞構造は例えば顕微鏡下で確認できる。人工集合管オルガノイドの嚢胞構造が集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成されていることは、免疫染色により顕微鏡下において目視で確認してもよく、フローサイトメトリー、例えばFACS(fluorescence-activated cell sorting)を用いて確認してもよい。

#### [0019] 嚢胞オルガノイド

本願はまた、嚢胞オルガノイドを提供する。本願明細書および請求の範囲において「嚢胞オルガノイド」は、集合管主細胞に特異的なマーカー（例えばAQP2およびAVPR2など）を発現する細胞を含む細胞集団により形成され、個別の嚢胞がそれぞれ単独に存在しているオルガノイドを意味する。ある態様では、該嚢胞オルガノイドにおいて、嚢胞構成細胞の20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または99%以上が、集合管主細胞に特異的なマーカー（例えばAQP2およびAVPR2など）を発現している。好ましくは、実質的にすべての嚢胞構成細胞が集合管主細胞に特異的なマーカーを発現している。1つの嚢胞のサイズは、例えば約10～約300 $\mu\text{m}$ である。本発明の嚢胞オルガノイドでは、嚢胞構成細胞およびそれ以外の細胞において、上述した発生早期集合管マーカーの発現が観察され得る。

#### [0020] 集合管嚢胞モデルの製造方法

本願はまた、以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルの製造方法を提供する：

- (1) 常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）特異的尿管芽先端部細胞を、グ

リア細胞株由来神経栄養因子、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、GSK3 $\beta$ 阻害剤およびYes-associated protein(YAP)活性阻害剤を含む培地で培養する工程、および

(2) 工程(1)で得られた培養物をWntシグナル伝達活性化因子、BMP阻害剤、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、およびグリア細胞株由来神経栄養因子を含む培地で培養して、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを得る工程。

[0021] 集合管嚢胞モデルは、集合管主細胞に特異的なマーカー、例えばAQP2および/またはAVPR2などを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有する細胞集団、組織またはオルガノイドである。ある態様では、該集合管嚢胞モデルにおいて、嚢胞構成細胞の20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、または99%以上が、集合管主細胞に特異的なマーカー（例えばAQP2およびAVPR2など）を発現している。好ましくは、実質的にすべての嚢胞構成細胞が集合管主細胞に特異的なマーカーを発現している。集合管嚢胞モデルのサイズは、例えば約10~約5000 $\mu\text{m}$ である。集合管嚢胞モデルは、複数の嚢胞が嚢胞を形成していない細胞と共に三次元立体構造を形成している場合、個別の嚢胞がそれぞれ単独に存在している場合のいずれも含む。1つの嚢胞のサイズは、例えば約10~約300 $\mu\text{m}$ である。集合管嚢胞モデルは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の嚢胞を含む。本発明の集合管嚢胞モデルでは、嚢胞構成細胞およびそれ以外の細胞において、上述した発生早期集合管マーカーの発現が観察され得る。集合管嚢胞モデルの嚢胞構造は例えば顕微鏡下で確認できる。集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成されていることは、免疫染色により顕微鏡下において目視で確認してもよく、フローサイトメトリーまたはFACS (fluorescence-activated cell sorting) を用いて確認してもよい。

[0022] 本明細書および請求の範囲において、複数の嚢胞が嚢胞を形成していない

細胞と共に三次元立体構造を形成している人工集合管オルガノイドを「嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイド」とし、個別の嚢胞がそれぞれ単独に存在しているオルガノイドを「嚢胞オルガノイド」とする。

- [0023] 常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）特異的細胞とは、ADPKDの患者由来の細胞であるか、またはADPKDに関連する遺伝子変異を有する細胞を意味する。ADPKDに関連する遺伝子変異とは、当該変異によってADPKD関連遺伝子が正常に機能しなくなることで、ADPKDを直接的又は間接的に引き起こし得る変異を意味する。ADPKD関連遺伝子としては、ADPKDの原因遺伝子であるPKD1遺伝子およびPKD2遺伝子ならびにそれらに関連する遺伝子が挙げられ、例えばPKD1遺伝子である。
- [0024] ある実施態様において、ADPKDに関連する遺伝子変異を有する細胞は、ADPKD関連遺伝子がノックアウトまたはノックダウンされた細胞である。遺伝子をノックアウトまたはノックダウンする方法は公知であり、特に限定されない。遺伝子をノックアウトする方法としては、相同組換え技術、ならびにCRISPRシステム、TALENおよびZFNなどを用いたゲノム編集技術などが挙げられる。遺伝子をノックダウンする方法としては、mRNAのアンチセンス鎖に相当するRNAを細胞に導入するアンチセンス法、siRNA、shRNA、microRNAなどを用いるRNAi法などが挙げられる。
- [0025] 「尿管芽先端部細胞」とは、尿管芽組織または尿管芽オルガノイドの発芽または枝分かれした領域の先端部の性質を有する細胞を意味する。尿管芽先端部細胞であることは、GATA3、RET、WNT11、LHX1、SOX9および超低密度リポタンパク質受容体（VLDL-R）などのマーカーの発現、または超低密度リポタンパク質（VLDL）の取り込みなどにより確認できる。尿管芽先端部細胞は、哺乳動物由来、例えば霊長類由来であり得、好ましくはヒト由来である。
- [0026] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞は、ADPKDの患者由来の尿管芽先端部細胞であるか、またはADPKDに関連する遺伝子変異を有する尿管芽先端部細胞である。ある実施態様において、ADPKD特異的尿管芽先端部細胞は、PKD1遺伝子がノックアウトされた尿管芽先端部細胞である。ADPKDに関連する遺伝子変異を有

する尿管芽先端部細胞は、尿管芽先端部細胞を遺伝子改変することによって作製されてもよく、ADPKDに関連する遺伝子変異を有する細胞から誘導されてもよい。

[0027] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞は、多能性幹細胞から製造されたものであってもよい。多能性幹細胞から尿管芽先端部細胞を製造する方法は知られており、公知のいずれの方法を用いてもよい。例えばW02019/098349または非特許文献4に記載の方法が使用できる。具体的には、多能性幹細胞から前方中間中胚葉細胞および中腎管細胞を經由して尿管芽オルガノイドを作製し、尿管芽オルガノイドを単一の細胞に解離することによって尿管芽先端部細胞を製造すればよい。

[0028] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞は凍結保存することができる。ADPKD特異的尿管芽先端部細胞を凍結保存することにより、同一ロットの細胞を用いて各実験を実施できる。細胞の凍結および起眠方法は公知の方法を使用できる。例えば細胞を凍結する方法として、ADPKD特異的尿管芽先端部細胞を細胞分離溶液（例えばAccutase）により単一細胞に解離させ、遠心分離により上清を除去した後、凍結保存液（例えばstem cell banker）に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で一晩緩慢凍結後、 $-196^{\circ}\text{C}$ （液体窒素中）で保存すればよい。凍結保存液としてはDMSOを含む凍結液などを利用できる。具体的にはSTEM-CELLBANKERなどのセルバンカー（Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.）、バンバンカー（NIPPON Genetics）、TCプロテクター（DS Pharma Biomedical Co., Ltd.）、CP-1（KYOKUTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIAL CO., LTD.）などの市販の凍結保存液が例示される。凍結細胞を起眠する方法として、凍結したADPKD特異的尿管芽先端部細胞を $37^{\circ}\text{C}$ の水浴などで迅速に融解し、凍結保存液を遠心洗浄後、培地に懸濁させる方法が例示される。凍結保存し、起眠させたADPKD特異的尿管芽先端部細胞は、以下の態様におけるADPKD特異的尿管芽先端部細胞として使用され得る。

[0029] 本願において「多能性幹細胞」とは、生体に存在する全ての細胞に分化可能である多能性と増殖能を併せもつ幹細胞であり、例えば胚性幹（ES）細胞

(J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹 (ntES) 細胞 (T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)、精子幹細胞 (「GS細胞」) (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)、胚性生殖細胞 (「EG細胞」) (Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)、人工多能性幹 (iPS) 細胞 (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M. et al, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008) ; W02007/069666)、および培養線維芽細胞または骨髄幹細胞由来の多能性細胞 (Muse細胞) (W02011/007900) などが含まれる。本願において、多能性幹細胞は、哺乳動物由来、例えば霊長類由来であり得、好ましくはヒト由来である。また、多能性幹細胞は、例えばES細胞またはiPS細胞であり得る。多能性幹細胞はADPKD特異的多能性幹細胞であり得る。

[0030] iPS細胞は、特定の初期化因子をDNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって製造することができる (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M. et al, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008) ; W02007/069666)。iPS細胞を用いる場合、該iPS細胞は、自体公知の方法により体細胞から作製してもよいし、既に樹立され、ストックされているiPS細胞を用いてもよい。本発明に用いるiPS細胞の由来となる体細胞に制限はなく、例えば末梢血由来の細胞または臍帯血由来の細胞が用いられ得る。iPS細胞の由来となる動物に制限はなく

、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、サル、オランウータン、チンパンジー、イヌ、ネコ、トリ、ヒトなどの哺乳動物が挙げられ、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。iPS細胞およびiPS細胞の由来となる体細胞はADPKD特異的細胞であり得る。

[0031] 工程（1）において、常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）特異的尿管芽先端部細胞を、グリア細胞株由来神経栄養因子、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、GSK3 $\beta$ 阻害剤およびYes-associated protein(YAP)活性阻害剤を含む培地で培養する。

[0032] 工程（1）において、グリア細胞株由来神経栄養因子の濃度は、100pg/ml $\sim$ 10 $\mu$ g/ml、1ng/ml $\sim$ 10 $\mu$ g/ml、または10ng/ml $\sim$ 1 $\mu$ g/mlであり得、例えば約100ng/mlである。

[0033] 「線維芽細胞増殖因子」はFGF1からFGF23までが知られており、これら公知のものから適宜選択すればよい。工程（1）において、線維芽細胞増殖因子の濃度は、使用する線維芽細胞増殖因子に応じて当業者が適宜選択可能である。線維芽細胞増殖因子がFGF1である場合、その濃度は、200pg/ml $\sim$ 20 $\mu$ g/ml、2ng/ml $\sim$ 20 $\mu$ g/ml、または20ng/ml $\sim$ 2 $\mu$ g/mlであり得、例えば約200ng/mlである。

[0034] 「レチノイン酸受容体（RAR）アゴニスト」は天然に存在するレチノイド、化学的に合成されたレチノイド、レチノイド骨格を持たないレチノイン酸受容体アゴニスト化合物、またはレチノイン酸受容体アゴニスト活性を有する天然物であってよい。RARアゴニストとしての活性をもつ天然レチノイドの例としては、レチノイン酸（立体異性体の全トランス-レチノイン酸（全トランスRA）と9-シス-レチノイン酸（9-シスRA）が知られている）が挙げられる。化学的に合成されたレチノイドは当技術分野で公知である（米国特許第5,234,926号、米国特許第4,326,055号など）。レチノイド骨格を持たないレチノイン酸受容体アゴニスト化合物の例としては、Am80、AM580（4-[[[5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレニル]カルボキシアミド]ベンゾイックアシッド）、TTNPB（4-[[[E]-2-[5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テ

トラメチル-2-ナフタレニル]-1-プロペニル]ベンゾイックアシッド)、AC55649 (4'-オクチル-[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキシリックアシッド)が挙げられる。レチノイン酸受容体アゴニスト活性を有する天然物の例としては、ホノキオール、マグノロールが挙げられる(生物機能開発研究所紀要9:55-61、2009年)。本願で使用されるRARアゴニストは、レチノイン酸、AM580、TTNPB、AC55649であり得、例えばTTNPBであり得る。工程(1)において、レチノイン酸受容体アゴニストの濃度は、使用するレチノイン酸受容体アゴニストに応じて当業者が適宜選択可能である。レチノイン酸受容体アゴニストがTTNPBである場合、その濃度は、0.1nM~10 $\mu$ M、1nM~10 $\mu$ M、または10nM~1 $\mu$ Mであり得、例えば約0.1 $\mu$ Mである。

[0035] 「GSK3 $\beta$ 阻害剤」とは、GSK3 $\beta$ タンパク質のキナーゼ活性(例えば、 $\beta$ カテニンに対するリン酸化能)を阻害する物質として定義され、既に多数のものが知られているが、例えばインジルピン誘導体であるBIO(別名、GSK3 $\beta$ 阻害剤IX;6-プロモインジルピン3'-オキシム)、マレイミド誘導体であるSB216763(3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、SB415286(3-[(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル)アミノ]-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、フェニル $\alpha$ ブromoメチルケトン化合物であるGSK3 $\beta$ 阻害剤VII(4-ジブromoアセトフェノン)、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts(別名、GSK3 $\beta$ ペプチド阻害剤;Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>)および高い選択性を有するCHIR99021(6-[2-[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)ピリジン-2-イルアミノ]エチルアミノ]ピリジン-3-カルボニトリル)が挙げられる。これらの化合物は、例えばCalbiochem社やBiomol社等から市販されており容易に利用することが可能である。本願で使用されるGSK3 $\beta$ 阻害剤は、例えばCHIR99021であり得る。工程(1)において、GSK3 $\beta$ 阻害剤の濃度は、使用するGSK3 $\beta$ 阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。GSK3 $\beta$ 阻害剤がCHIR99021である場合、その濃度は、3nM~300 $\mu$ M、30nM~300 $\mu$ M、または300nM~30 $\mu$ Mであり得、例えば約3 $\mu$ Mである。



[0036] 工程（１）において、YAP活性阻害剤の濃度は、使用するYAP活性阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。YAP活性阻害剤としては、公知のものを適宜用いればよいが、例えばYAP阻害活性とROCK阻害活性の両方の活性を有するThiazovivinが例示される。YAP活性阻害剤がThiazovivinである場合、その濃度は、10nM～1mM、100nM～1mM、または1 $\mu$ M～100 $\mu$ Mであり得、例えば約10 $\mu$ Mである。

[0037] 工程（１）において、培地にはさらにTGF $\beta$ シグナル阻害剤を含んでいてもよい。「TGF $\beta$ シグナル阻害剤」はTGF $\beta$ の受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質、またはALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質である限り特に限定されず、例えばLefty-1 (NCBI Accession No.として、マウス：NM\_010094、ヒト：NM\_020997が例示される)、SB431542、SB202190(以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A83-01 (3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド、W02009146408)、ALK5阻害剤II (2-[3-[6-メチルピリジン-2-イル]-1H-ピラゾール-4-イル]-1,5-ナフチリジン)、TGF $\beta$ RIキナーゼ阻害剤VIII (6-[2-tert-ブチル-5-[6-メチル-ピリジン-2-イル]-1H-イミダゾール-4-イル]-キノキサリン) およびこれらの誘導体などが例示される。本願で使用されるTGF $\beta$ シグナル阻害剤は、例えばA83-01であり得る。工程（１）において、TGF $\beta$ シグナル阻害剤の濃度は、使用するTGF $\beta$ シグナル阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。TGF $\beta$ シグナル阻害剤がA83-01である場合、その濃度は、1nM～100 $\mu$ M、10nM～100 $\mu$ M、または100nM～10 $\mu$ Mであり得、例えば約1 $\mu$ Mである。

[0038] 工程（１）において、培養期間は、1～5日、または1～3日であり得、例えば約2日である。

[0039] 工程（１）において、常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）特異的尿管芽先端部細胞は、浮遊培養され得る。本願において、「浮遊培養」とは細胞を培

養皿に非接着の状態では培養することである。特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックスなどによるコーティング処理）されていないもの、または人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）または2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの重合体（Lipidure）によるコーティング処理）がされているものを使用して行うことができる。例えば、96ウェル低接着プレート（Sumitomo Bakelite）および35mm低接着ディッシュ（Sumitomo Bakelite）などの市販品を使用してもよい。

- [0040] 培養温度は以下に限定されないが、約30～約40℃、例えば約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は例えば約2～約5%である。
- [0041] ある態様において、本願の方法は、工程（1）の前に常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）特異的尿管芽先端部細胞を維持培養する工程をさらに含む。維持培養の際に培地に添加される物質およびその濃度は、上述したとおりである。一例として、グリア細胞株由来神経栄養因子（例えば、約100ng/ml GDNF）、線維芽細胞増殖因子（例えば、約200ng/ml FGF1）、レチノイン酸受容体アゴニスト（例えば、約0.1 μM TTNPB）、GSK3β阻害剤（例えば、約3 μM CHIR99021）、YAP活性阻害剤（例えば、約10 μM Thiazovivin）、およびTGFβシグナル阻害剤（例えば、約1 μM A83-01）を培地に添加する。
- [0042] 維持培養の期間は、例えば、6週間以上、7週間以上、8週間以上、9週間以上、または10週間以上であり得る。尿管芽先端部細胞は、1～12日毎、5～10日毎、6～8日毎、または約7日ごとに継代培養することによって維持され得る。また、尿管芽先端部細胞のコロニーが、約10～約1000 μm、約15～約500 μm、約20～約150 μm、または約80～約100 μmの大きさまで増殖した時点で継代培養することによっても維持できる。継代の回数は特に限定されず、所望の回数継代培養することができる。
- [0043] 維持培養において、尿管芽先端部細胞は、三次元スキャホールド材を培地で希釈することにより得られたハイドロゲル上に播種して三次元培養され得る。

- [0044] 三次元スキャホールド材としては、培養細胞の三次元立体構造構築用のものが種々知られており、また販売されており、特に限定されない。例えばコラーゲンベースの材料やポリカプロラクトンやポリグリコール酸等のポリマー系の材料、またはそれらの複合体を使用できる。また、その形態も特に限定されず、例えばスポンジ状構造物などが挙げられる。また、三次元スキャホールド材は生体由来の試料を材料（例えば細胞外マトリックスや基底膜など）とするものであってもよい。具体的には、マトリゲル<sup>(商標)</sup>（ベクトン・ディッキンソン社）、typeIコラーゲングル、typeIVコラーゲングルなどが例示される。マトリゲル<sup>(商標)</sup>基底膜マトリックスは、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含むEngelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品であり、主にラミニン、コラーゲンIV、エンタクチンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンから構成される。さらに、TGF- $\beta$ 、線維芽細胞増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、EHSなどの他の増殖因子を含んでもよい。
- [0045] 維持培養において、三次元スキャホールド材としてマトリゲルを用いる場合、ハイドロゲル中のマトリゲルの濃度は、20%~80%、30%~70%、または40~60%であり得、例えば約50%である。
- [0046] 培養温度は以下に限定されないが、約30~約40℃、例えば約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は例えば約2~約5%である。
- [0047] 工程（2）において、工程（1）で得られた培養物をWntシグナル伝達活性化因子、BMP阻害剤、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、およびグリア細胞株由来神経栄養因子を含む培地で培養して、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを得る。ある態様において、工程（1）で得られた培養物は浮遊培養される。
- [0048] 工程（2）において、Wntシグナル伝達活性化因子の濃度は、使用するWntシグナル伝達活性化因子に応じて当業者が適宜選択可能である。本願で使用されるWntシグナル伝達活性化因子は、LiCl、Wnt1、Wnt3a、Wnt7a、R-spondin 1またはそれらの組合せなどであり得、例えばWnt3aおよび／またはR-spondin 1

in 1である。Wntシグナル伝達活性化因子がWnt3aである場合、その濃度は約5～約20%であり得る。Afamin/Wnt3a条件培地などの市販品を使用してもよい。Wntシグナル伝達活性化因子がR-spondin 1である場合、その濃度は、200pg/ml～20 $\mu$ g/ml、2ng/ml～20 $\mu$ g/ml、または20ng/ml～2 $\mu$ g/mlであり得、例えば約200ng/mlである。

[0049] 「BMP阻害剤」は、Chordin、Noggin、Follistatinなどのタンパク質性阻害剤、Dorsomorphin 6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy) phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine、その誘導体 (P. B. Yu et al. (2007), *Circulation*, 116:II\_60; P.B. Yu et al. (2008), *Nat. Chem. Biol.*, 4:33-41; J. Hao et al. (2008), *PLoS ONE*, 3 (8) :e2904) およびLDN193189 (4-(6-(4-(piperazin-1-yl) phenyl) pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl) quinoline) が例示される。本願で使用されるBMP阻害剤は、例えばLDN193189であり得る。工程(2)において、BMP阻害剤の濃度は、使用するBMP阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。BMP阻害剤がLDN193189である場合、その濃度は、0.1nM～10 $\mu$ M、1nM～10 $\mu$ M、または10nM～1 $\mu$ Mであり得、例えば約0.1 $\mu$ Mである。

[0050] 工程(2)において、線維芽細胞増殖因子の濃度は、使用する線維芽細胞増殖因子に応じて当業者が適宜選択可能である。線維芽細胞増殖因子がFGF8である場合、その濃度は、200pg/ml～20 $\mu$ g/ml、2ng/ml～20 $\mu$ g/ml、または20ng/ml～2 $\mu$ g/mlであり得、例えば約200ng/mlである。

[0051] 工程(2)において、レチノイン酸受容体アゴニストの濃度は、使用するレチノイン酸受容体アゴニストに応じて当業者が適宜選択可能である。レチノイン酸受容体アゴニストがTTNPBである場合、その濃度は、0.1nM～10 $\mu$ M、1nM～10 $\mu$ M、または10nM～1 $\mu$ Mであり得、例えば約0.1 $\mu$ Mである。

[0052] 工程(2)において、グリア細胞株由来神経栄養因子の濃度は、100pg/ml～10 $\mu$ g/ml、1ng/ml～10 $\mu$ g/ml、または10ng/ml～1 $\mu$ g/mlであり得、例えば約100ng/mlである。

[0053] 工程(2)において、培地にはさらにTGF $\beta$ シグナル阻害剤を含んでいても

よい。TGF $\beta$ シグナル阻害剤の濃度は、使用するTGF $\beta$ シグナル阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。TGF $\beta$ シグナル阻害剤がA83-01である場合、その濃度は、1nM $\sim$ 100 $\mu$ M、10nM $\sim$ 100 $\mu$ M、または100nM $\sim$ 10 $\mu$ Mであり得、例えば約1 $\mu$ Mである。

[0054] 工程(2)において、培地はさらにEGFおよび/またはFGF1を含んでいてもよい。EGFは、上皮成長因子またはEpidermal Growth Factorと呼ばれるタンパク質である。EGFはR&D systems社などから市販されているものを使用することができる。EGFの濃度は、50pg/ml $\sim$ 5 $\mu$ g/ml、500pg/ml $\sim$ 5 $\mu$ g/ml、または5ng/ml $\sim$ 500ng/mlであり得、例えば約50ng/mlである。FGF1の濃度は、200pg/ml $\sim$ 20 $\mu$ g/ml、2ng/ml $\sim$ 20 $\mu$ g/ml、または20ng/ml $\sim$ 2 $\mu$ g/mlであり得、例えば約200ng/mlである。

[0055] 工程(2)において、培地はさらにフォルスコリンを含んでいてもよい。フォルスコリンの濃度は、10nM $\sim$ 1mM、100nM $\sim$ 1mM、または1 $\mu$ M $\sim$ 100 $\mu$ Mであり得、例えば約10 $\mu$ Mである。ある実施態様において、フォルスコリンは工程(2)の途中で培地に添加される。例えば、フォルスコリンは工程(2)の培養0 $\sim$ 15日目、5 $\sim$ 10日目、または約8日目において培地に添加される。

[0056] 工程(2)において、培地はさらにマトリゲルを含んでいてもよい。マトリゲルの濃度は、1 $\sim$ 40%、2 $\sim$ 30%、または5 $\sim$ 20%であり得、例えば約10%である。

[0057] 工程(2)において、培養期間は、5 $\sim$ 40日、7 $\sim$ 30日、または10 $\sim$ 25日であり得、例えば約14 $\sim$ 21日である。

[0058] 培養温度は以下に限定されないが、約30 $\sim$ 約40 $^{\circ}$ C、例えば約37 $^{\circ}$ Cであり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は例えば約2 $\sim$ 約5%である。

[0059] 集合管嚢胞モデルを継代培養する方法

本願はまた、以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルを継代培養する方法を提供する：

(a) 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを単一の細胞に解離させる工程、

(b) 該細胞を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養する工程、および

(c) 工程 (b) で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養して、嚢胞オルガノイドを得る工程。

[0060] 工程 (a) において、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを単一の細胞に解離させる。ある態様において、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドは本願の方法によって製造されたものである。

[0061] 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを解離する方法としては、従来公知の細胞凝集塊の解離方法を適宜採用すればよく、例えば力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（例えば、AccutaseおよびAccumaxなど）またはコラゲナーゼ活性のみを有する解離溶液を用いた解離方法が挙げられる。例えば、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（例えばAccutase）を用いて細胞凝集塊を解離し、力学的に細かく単一細胞へ分散する方法を使用してもよい。

[0062] なお、本明細書および請求の範囲において、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドもしくは嚢胞オルガノイドから単一細胞とした細胞を「嚢胞細胞」という。

[0063] 工程 (b) において、工程 (a) で解離させた嚢胞細胞を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養する。

[0064] 工程 (b) において、Wntシグナル伝達活性化因子の濃度は、使用するWntシグナル伝達活性化因子に応じて当業者が適宜選択可能である。Wntシグナル伝達活性化因子がWnt3aである場合、その濃度は約5～約20%であり得る。Afamin/Wnt3a条件培地などの市販品を使用してもよい。Wntシグナル伝達活性化因子がR-spondin 1である場合、その濃度は、200pg/ml～20 $\mu$ g/ml、2ng/ml～20 $\mu$ g/ml、または20ng/ml～2 $\mu$ g/mlであり得、例えば約200ng/mlである。

[0065] 工程 (b) において、培地はさらにROCK阻害剤を含んでいてもよい。「ROCK阻害剤」はRho-キナーゼ (ROCK) の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えばY-27632 (Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983

(2000); Narumiya et al., *Methods Enzymol.* 325, 273-284 (2000))、Fasudil/HA1077 (Uenata et al., *Nature* 389: 990-994 (1997))、SR3677 (Feng Y et al., *J Med Chem.* 51: 6642-6645(2008))、GSK269962 (Stavenger RA et al., *J Med Chem.* 50: 2-5 (2007); W02005/037197)、H-1152 (Sasaki et al., *Pharmacol. Ther.* 93: 225-232 (2002))、Wf-536 (Nakajima et al., *Cancer Chemother Pharmacol.* 52(4): 319-324 (2003)) およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸(例えばsiRNA)、ドミナントネガティブ変異体、およびそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の公知の低分子化合物も使用できる(米国特許出願公開第2005/0209261号、同第2005/0192304号、同第2004/0014755号、同第2004/0002508号、同第2004/0002507号、同第2003/0125344号、同第2003/0087919号、および国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号)。本願でROCK阻害剤という場合、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。本願で使用されるROCK阻害剤は、好ましくはY-27632であり得る。

[0066] 工程 (b) において、ROCK阻害剤の濃度は、使用するROCK阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。ROCK阻害剤がY-27632である場合、その濃度は、10nM~1mM、100nM~1mM、または1 $\mu$ M~100 $\mu$ Mであり得、例えば約10 $\mu$ Mである。

[0067] 工程 (b) において、培地はさらに線維芽細胞増殖因子を含んでいてもよい。線維芽細胞増殖因子の濃度は、使用する線維芽細胞増殖因子に応じて当業者が適宜選択可能である。線維芽細胞増殖因子がFGF1である場合、その濃度は、200pg/ml~20 $\mu$ g/ml、2ng/ml~20 $\mu$ g/ml、または20ng/ml~2 $\mu$ g/mlであり得、例えば約200ng/mlである。

[0068] 工程 (b) において、培養期間は、1~10日、2~7日、または3~5日であり得、例えば約4日である。

[0069] 工程 (b) において、工程 (a) で解離させた細胞は三次元培養され得る。三次元スキャホールド材としてマトリゲルを用いる場合、ハイドロゲル中の

マトリゲルの濃度は、20%~80%、30%~70%、または40~60%であり得、例えば約50%である。

- [0070] 培養温度は以下に限定されないが、約30~約40℃、例えば約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は例えば約2~約5%である。
- [0071] 工程 (c) において、工程 (b) で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養する。ある態様において、工程 (b) で得られた培養物は浮遊培養される。
- [0072] 工程 (c) において、Wntシグナル伝達活性化因子の濃度は、使用するWntシグナル伝達活性化因子に応じて当業者が適宜選択可能である。Wntシグナル伝達活性化因子がWnt3aである場合、その濃度は約5~約20%であり得る。Afamin/Wnt3a条件培地などの市販品を使用してもよい。Wntシグナル伝達活性化因子がR-spondin 1である場合、その濃度は、200pg/ml~20 μg/ml、2ng/ml~20 μg/ml、または20ng/ml~2 μg/mlであり得、例えば約200ng/mlである。
- [0073] 工程 (c) において、培地はさらに線維芽細胞増殖因子を含んでもよい。線維芽細胞増殖因子の濃度は、使用する線維芽細胞増殖因子に応じて当業者が適宜選択可能である。線維芽細胞増殖因子がFGF1である場合、その濃度は、200pg/ml~20 μg/ml、2ng/ml~20 μg/ml、または20ng/ml~2 μg/mlであり得、例えば約200ng/mlである。
- [0074] 工程 (c) において、培地はさらにフォルスコリンを含んでもよい。フォルスコリンの濃度は、10nM~1mM、100nM~1mM、または1 μM~100 μMであり得、例えば約10 μMである。
- [0075] 工程 (c) において、培地はさらにマトリゲルを含んでもよい。マトリゲルの濃度は、1~40%、2~30%、または5~20%であり得、例えば約10%である。
- [0076] 工程 (c) において、培養期間は、1~20日、2~15日、または5~10日であり得、例えば約7日である。
- [0077] 培養温度は以下に限定されないが、約30~約40℃、例えば約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は例えば約2~約5%である。



[0078] ADPKD治療物質をスクリーニングする方法

本願はまた、以下の工程を含む、ADPKDを治療する物質をスクリーニングする方法を提供する：

(i) 候補物質を、集合管嚢胞モデルに接触させる工程；

(ii) 該集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が縮小または消失しているか否かを確認する工程。

[0079] 「候補物質」は、ADPKDを治療する物質の候補となり得るものであればよく、その種類については特に限定されない。候補物質は生体由来物質などの天然物質であってもよく、化学的に合成された合成物質であってもよい。具体的には、候補物質としてタンパク質、アミノ酸、核酸、脂質、糖質、低分子化合物、無機化合物などが挙げられる。

[0080] 工程(i)において、候補物質を、集合管嚢胞モデルに接触させる。ある態様において、集合管嚢胞モデルは本願の集合管嚢胞モデルの製造方法によって製造されたものである。候補物質は、例えば集合管嚢胞モデルを含む培養培地に添加され得る。

[0081] 工程(ii)において、該集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が縮小または消失しているか否かを確認する。ある態様において、集合管嚢胞モデルの嚢胞構造を、対照の集合管嚢胞モデルの嚢胞構造と比較する。対照の集合管嚢胞モデルは、例えば候補物質を接触させていない集合管嚢胞モデルまたは候補物質を接触させる前の集合管嚢胞モデルである。集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が対照の集合管嚢胞モデルの嚢胞構造と比較して縮小または消失していた場合、候補物質をADPKDを治療する物質として選択できる。嚢胞構造のサイズは顕微鏡下で確認することができる。

[0082] 本明細書において、「治療」は、疾患の原因を軽減または除去すること、疾患の進行を遅延または停止させること、その症状を軽減、緩和、改善または除去すること、および／またはその症状の悪化を抑制することを意味する。

[0083] ADPKD予防物質をスクリーニングする方法

本願はまた、以下の工程を含む、ADPKDを予防する物質をスクリーニングする方法を提供する：

( i ' ) 本願の集合管嚢胞モデルの製造方法を実施して、集合管嚢胞モデルを製造する工程、ここで各工程の少なくとも1つの工程における培地は候補物質をさらに含む；

( i i ' ) 該集合管嚢胞モデルにおいて嚢胞構造が形成されているか否かを確認する工程。

[0084] 「候補物質」は、ADPKDを予防する物質の候補となり得るものであればよく、その種類については特に限定されない。候補物質は生体由来物質などの天然物質であってもよく、化学的に合成された合成物質であってもよい。具体的には、候補物質としてタンパク質、アミノ酸、核酸、脂質、糖質、低分子化合物、無機化合物などが挙げられる。

[0085] 工程 ( i ' ) において、本願の集合管嚢胞モデルの製造方法を実施して、集合管嚢胞モデル（人工集合管オルガノイドまたは嚢胞オルガノイド）を製造する、ここで各工程の少なくとも1つの工程における培地は候補物質をさらに含む。例えば、工程（1）および工程（2）、ならびに存在する場合には工程（1）の前にADPKD特異的尿管芽先端部細胞を維持培養する工程において、培地は候補物質をさらに含む。候補物質は、各工程の全培養期間において培地に含めてもよく、あるいは培養期間の一部において培地に含めてもよい。

[0086] 工程 ( i i ' ) において、該集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が形成されているか否かを確認する。集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が形成されていない場合、候補物質をADPKDを予防する物質として選択できる。ある態様において、集合管嚢胞モデルの嚢胞構造を、対照の集合管嚢胞モデルの嚢胞構造と比較する。対照の集合管嚢胞モデルは、例えば候補物質を培地に含めずに製造した集合管嚢胞モデルである。集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が対照の集合管嚢胞モデルの嚢胞構造と比較して縮小または消失していた場合、候補物質をADPKDを予防する物質として選択できる。嚢胞構造のサイズは顕微鏡下で確認する

ことができる。

## 実施例

[0087] 以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

[0088] 本実施例で確立した方法をまとめた模式図を図1に示す。本実施例で誘導した細胞およびオルガノイドの明視野画像をCKX41倒立顕微鏡(Olympus)により取得した。

[0089] [材料と方法]

### PKD1ノックアウト人工多能性幹(iPS)細胞の作製

ヒト人工多能性幹細胞を用いた実験は、京都大学医学部および医学研究科の倫理委員会によって承認された。3種のヒトiPS細胞株585A1、1231A3および1383D2を用いた。PKD1ノックアウトiPS細胞を以前に報告されたDNAトランスポゾンに基づくCRISPR-Cas9 regulated transcription and nuclear shuttling (CRONUS)システムを用いて作製した(Ishida K. et al., Sci Rep. 8:310 (2018); Shimizu T. et al., Biochem Biophys Res Commun. 529, 1186-1194 (2020))。CRONUS-Puroベクター(pPV-Tet0-SphcCas9-GR-iC-A-EF1 $\alpha$ -rtTA-iP, Addgene ID 100596)およびsgRNAをクローニングするためのpiggyBacベクター(pPV-H1-ccdB-mEF1 $\alpha$ -RiH, Addgene ID 100598)をpiggyBacトランスポザーゼ発現プラスミド(pHL-EF1 $\alpha$ -hcPBase-A, Addgene ID 100599)とともにFuGENE6(Promega)を用いたリポフェクションによって細胞中に連続的にトランスフェクトした。CRONUS-PuroベクターおよびsgRNAをクローニングするためのpiggyBacベクターは、それぞれピューロマイシン選択およびハイグロマイシン選択に適合していた。PKD1エクソン34スプライシングアクセプター部位を標的とするgRNA配列をpPV-H1-ccdB-mEF1 $\alpha$ -RiHベクターにクローニングするために以下の配列を用いた: 5' -GAGACCACTTGGATCCGGGATCAGGTCTTCA TCTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA-3' (配列番号1、標的部位を下線で示す)。PKD1遺伝子座におけるgRNA標的部位を図2に示す。トランスフェクトした細胞の薬剤選択によりRFP<sup>+</sup>コロニーを手動で採取し、ドキシサイクリンおよびデ

キサメタゾンで処理してゲノム編集を誘導した。個々のコロニーをバルクゲノムDNAのサンガーシーケンシングによりゲノム編集効率についてスクリーニングした。次いで、単一の細胞をフローサイトメトリーによって単離し、iMatrix-511 (Nippi) でコーティングした24ウェル培養プレート (Corning) でクローン的に増殖させ、サンガーシーケンシングにより遺伝子型を決定した。ゲノム編集によりフレームシフトおよび未成熟終止コドンが生じていた (図3~5)。エクソン34内の異なる部位の2塩基 (AG) がスプライシングアクセプター配列として機能したため、2種類のPKD1変異mRNAが生成された。

[0090] PKD1ノックアウトiPS細胞から尿管芽オルガノイドへの分化誘導

PKD1ノックアウトiPS細胞を以前に記述されるように尿管芽オルガノイドに誘導した (Mae, SI. & Ryosaka, M. et al. Cell Reports 32, 4, 107943)。

[0091] 尿管芽先端部細胞の作製

PKD1ノックアウトiPS細胞から誘導した尿管芽オルガノイドを37°CにおいてAccutase (Innovative Cell Technologies) で5分間処理し、その後ピペット操作によって単一細胞に解離させた。細胞をB27サプリメント (ビタミンA不含) (Gibco)、3 $\mu$ M CHIR99021 (StemRD)、0.1 $\mu$ M TNPB (Santa cruz)、200ng/ml FGF1 (R&D systems)、100ng/ml GDNF (R&D systems)、10 $\mu$ M Thiazovivin (Santa Cruz Biotechnology) および1 $\mu$ M A83-01 (Wako) を含むDMEM/F12培地 (Gibco) で懸濁した。単一細胞を150 $\mu$ Lハイドロゲルでコートした48ウェルプレートの1つのウェル上に1.0 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェルで播種した。ハイドロゲルは50%マトリゲル (BD Biosciences) を含むDMEM/F12培地で構成され、使用する前に37°Cで1時間凝固させた。単一細胞は7日後に尿管芽先端部細胞コロニーを構築した。培地を2~3日毎に交換した。

[0092] 尿管芽先端部細胞の継代培養

ハイドロゲルをCell Recovery Solution (Corning) を用いて4°Cで30分間溶解し、尿管芽先端部細胞コロニーを分離した。Cell Recovery Solutionでさらに洗浄した後、尿管芽先端部細胞コロニーを室温において500gで5分間遠

心した。尿管芽先端部細胞コロニーを37°CにおいてAccutaseで5分間処理し、その後ピペット操作によって単一細胞に解離させた。細胞をB27サプリメント（ビタミンA不含）、3 $\mu$ M CHIR99021、0.1 $\mu$ M TTNPB、200ng/ml FGF1、100ng/ml GDNF、10 $\mu$ M Thiazovivinおよび1 $\mu$ M A83-01を含むDMEM/F12培地で懸濁した。細胞を150 $\mu$ Lハイドロゲルでコートした48ウェルプレートの1つのウェル上に1.0 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェルで播種した。ハイドロゲルは50%マトリゲルを含むDMEM/F12培地で構成され、使用する前に37°Cで1時間凝固させた。単一細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>で7日間培養することで、尿管芽先端部細胞コロニーを作製した。培地を2~3日毎に交換した。作製した先端部細胞コロニーを同様に7日毎に継代培養した。

[0093] 尿管芽先端部細胞の凍結保存

上述のように解離させた単一細胞を、STEM-CELLBANKER（登録商標） GMP grade (#CB045、Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) で懸濁した。細胞懸濁液を各凍結保存チューブに分配した。チューブを-80°Cで一晩凍結させ、長期間の凍結保存のために液体窒素細胞貯蔵タンクに移動させた。

[0094] 培養を開始するため、細胞を水浴を用いて37°Cで解凍した。次に、細胞をS T0培地中に添加し、室温において200gで3分間遠心した。上清を除去した後、細胞をB27サプリメント（ビタミンA不含）、3 $\mu$ M CHIR99021、0.1 $\mu$ M TTNPB、200ng/ml FGF1、100ng/ml GDNF、10 $\mu$ M Thiazovivinおよび1 $\mu$ M A83-01を含むDMEM/F12培地で懸濁した。細胞を150 $\mu$ Lハイドロゲルでコートした48ウェルプレートの1つのウェル上に1.0 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェルで播種した。ハイドロゲルは50%マトリゲルを含むDMEM/F12培地で構成され、使用する前に37°Cで1時間凝固させた。単一細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>で7日間培養することで、尿管芽先端部細胞コロニーを作製した。培地を2~3日毎に交換した。

[0095] 尿管芽先端部細胞からの集合管オルガノイドの再構成

ハイドロゲルをCell Recovery Solutionを用いて4°Cで30分間溶解し、尿管芽先端部細胞コロニーを分離した。Cell Recovery Solutionでさらに洗浄した後、尿管芽先端部細胞コロニーを室温において500gで5分間遠心した。尿管

芽先端部細胞コロニーを37°CにおいてAccutaseで5分間処理し、その後ピペット操作によって単一細胞に解離させた。細胞を3 $\mu$ M CHIR99021、0.1 $\mu$ M TTNPB、200ng/ml FGF1、100ng/ml GDNF、10 $\mu$ M Thiazovivinおよび1 $\mu$ M A83-01を含むEssential 6培地 (Gibco) で懸濁した。細胞を96ウェル低接着プレート (Sumitomo Bakelite) に5.0 $\times$ 10<sup>3</sup>細胞/ウェルで播種した。単一細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>で2日間培養することで、スフェロイドを作製した。

[0096] スフェロイドを10% Afamin/Wnt3a条件培地 (MBL)、200ng/ml R-spondin 1 (R&D systems)、0.1 $\mu$ M LDN193189 (Axon medchem)、200ng/ml FGF1、200ng/ml FGF8 (Peprotech)、100ng/ml GDNF、0.1 $\mu$ M TTNPB、50ng/ml EGF (R&D systems)、1 $\mu$ M A83-01および10%マトリゲルを含むEssential 6培地で懸濁し、35mm低接着ディッシュ (Sumitomo Bakelite) に2.5~3mL/ディッシュで分配した。培地を3~4日毎に交換した。スフェロイドを37°C、5%CO<sub>2</sub>で14~21日間培養することで、人工集合管オルガノイドを作製した。

[0097] Forskolin処理による嚢胞の増大

5回以上継代培養を行った尿管芽先端部細胞から上記の方法によりスフェロイドを作製した。スフェロイドを上記の方法により約7日間培養した後、培地に10 $\mu$ Mフォルスコリン (Wako) を添加し、さらに7日間培養した。

[0098] 嚢胞細胞の継代培養

ハイドロゲルをCell Recovery Solutionを用いて4°Cで30分間溶解し、嚢胞構造を有するオルガノイドを分離した。Cell Recovery Solutionでさらに洗浄した後、嚢胞構造を有するオルガノイドを室温において500gで5分間遠心した。嚢胞構造を有するオルガノイドを37°CにおいてAccutaseで5分間処理し、その後ピペット操作によって単一細胞に解離させた。細胞を200ng/ml FGF1の非存在下または存在下において、B27サプリメント (ビタミンA不含)、10% Afamin/Wnt3a条件培地、200ng/ml R-spondin 1および10 $\mu$ M Y-27632 (Wako) を含むDMEM/F12培地で懸濁した。細胞を150 $\mu$ Lハイドロゲルでコートした48ウェルプレートの1つのウェル上に1.0 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェルで播種した。ハイドロゲルは50%マトリゲルを含むDMEM/F12培地で構成され、使用する前に37°Cで1

時間凝固させた。単一細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>で4日間培養することで、嚢胞細胞スフェロイドを作製した。

[0099] ハイドロゲルをCell Recovery Solutionを用いて4°Cで30分間溶解し、嚢胞細胞スフェロイドを分離した。Cell Recovery Solutionでさらに洗浄した後、嚢胞細胞スフェロイドを室温において500gで5分間遠心した。嚢胞細胞スフェロイドを200ng/ml FGF1の非存在下または存在下において、10% Afamin/Wnt3a条件培地、200ng/ml R-spondin 1および10%マトリゲルを含むEssential 6培地で懸濁し、35mm低接着ディッシュに2.5~3mL/ディッシュで分配した。嚢胞細胞スフェロイドを37°C、5%CO<sub>2</sub>で7日間培養することで、嚢胞オルガノイドを作製した。

[0100] 免疫染色

免疫染色をいくつかの改変を伴って以前に記述されるように行った (Mae, SI. & Ryosaka, M. et al. Biochem Biophys Res Commun. 495, 954-61 (2018))。凍結切片の免疫染色のために、試料を4% PFA/PBSを用いて4°Cで1~2時間固定した。固定した試料を30%ショ糖/PBSで処理し、O.C.T化合物 (Sakura Finetek Japan) で凍結し、凍結切片法によって凍結切片を作製した。凍結切片を蒸留水で洗浄し、ブロッキング溶液と共に室温で1時間インキュベートした。一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、試料と共に4°Cで一晩インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、細胞をブロッキング溶液で1:500に希釈した二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。蛍光画像をBZ-X700オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) により取得した。

本実施例で使用した一次抗体および二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) の詳細をそれぞれ表1 および表2に示す。本実施例では表2に記載の二次抗体を適宜組み合わせ使用した。また、核染色剤としてHoechst33342 (Thermo Fisher Scientific, Catalog Number: H1399) を使用した。

[表1]

Antigen	Company	Catalog Number
AQP2	Sigma	A7310
AVPR2	LSBio	LS-A103135

[表2]

Name	Catalog Number
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A-21206
Streptavidin, Alexa Fluor 546 conjugate	S11225

## [0101] [結果]

PKD1ノックアウトiPS細胞の作製

PKD1ノックアウトiPS細胞を以前に報告された方法により作製した (Shimizu T. et al., Biochem Biophys Res Commun, 2020)。親株には585A1株、1231A3株および1383D2株を用いた。

[0102] 嚢胞構造を有する集合管オルガノイドの作製

1231A3株のPKD1ノックアウトiPS細胞から、以前に報告された方法により尿管芽オルガノイドを誘導した (Mae, SI. & Ryosaka, M. et al. Cell Reports 32, 4, 107943)。誘導した尿管芽オルガノイドは嚢胞構造を有していなかった (図6)。

[0103] 誘導した尿管芽オルガノイドをAccutase処理によって単一細胞に解離させ、単一細胞をハイドロゲル上で7日間培養して尿管芽先端部細胞コロニーを作製した。尿管芽先端部細胞コロニーをAccutase処理によって単一細胞に解離させ、単一細胞をハイドロゲル上で再度7日間培養することにより、尿管芽先端部細胞コロニーを作製した。尿管芽先端部細胞コロニーを同様に7日毎に継代培養した。6週間継代培養した尿管芽先端部細胞を図7に示す。2週間継代培養した尿管芽先端部細胞と6週間継代培養した尿管芽先端部細胞の遺伝子発現を比較したところ、6週間継代培養した尿管芽先端部細胞では、尿管芽組織の発生後期段階のマーカ遺伝子の発現が増加し、発生早期段階のマーカ遺伝子の発現が減少していた (図8)。したがって、尿管芽先端部細胞の維持培養は、尿管芽先端部細胞の発生分化段階を進行させることが示唆された。

[0104] ADPKDにおいて、嚢胞構造は尿管芽組織の発生の後期段階において生じるため、長期間維持培養した尿管芽先端部細胞から嚢胞構造を有する集合管オル



ガノイドが誘導されることが予想された。そこで、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間および10週間継代培養した尿管芽先端部細胞から人工集合管オルガノイドを誘導した。具体的には、各尿管芽先端部細胞を低接着プレート上で2日間浮遊培養することによりスフェロイドを作製した。スフェロイドを35mm低接着ディッシュ上でさらに14~21日間浮遊培養することで人工集合管オルガノイドを作製した。ここで、尿管芽先端部細胞は585A1株のPKD1ノックアウトiPS細胞から誘導したものをを用いた。その結果、6週間以上継代培養した尿管芽先端部細胞から嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドが誘導されることがわかった(図9)。免疫染色により、この嚢胞は嚢胞内腔の細胞膜および細胞質内において集合管主細胞マーカーであるAQP2およびAVPR2を発現していたことが示された(図10)。

[0105] 1231A3株および1383D2株のPKD1ノックアウトiPS細胞を用いて、上述の方法により人工集合管オルガノイドを誘導した。1231A3株および1383D2株においても、6週間以上維持培養した尿管芽先端部細胞から嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドが誘導された(図11)。以下の実施例では585A1株のPKD1ノックアウトiPS細胞から各種細胞を誘導した。

[0106] 次に、フォルスコリン処理による嚢胞構造への影響を調べた。6週間継代培養した尿管芽先端部細胞からスフェロイドを作製し、スフェロイドを7日間浮遊培養した後、培地にフォルスコリンを添加し、さらに7日間浮遊培養した。その結果、フォルスコリンで処理していない場合と比較して嚢胞が増大した人工集合管オルガノイドが作製された(図12)。

[0107] 嚢胞細胞の維持培養

嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドをAccutase処理によって単一細胞に解離させ、単一細胞をハイドロゲル上で4日間三次元培養することにより、嚢胞細胞スフェロイドを作製した(図13)。嚢胞細胞スフェロイドを低接着ディッシュ上で7日間浮遊培養することにより、嚢胞オルガノイドが作製された(図14)。

[0108] 次に、200ng/ml FGF1の存在下において、該単一細胞から上記と同様に嚢胞

オルガノイドを作製した（図15）。その結果、200ng/ml FGF1の添加により嚢胞細胞の増殖が促進されることが分かった。

[0109] ADPKD患者由来iPS細胞からの嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドの作製

上述の方法を用いて、ADPKD患者由来iPS細胞（CiRA00007）から尿管芽オルガノイド、尿管芽先端部細胞を経て、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを作製した（図16）。CiRA00007株は、エクソン41に遺伝子変異があり、polycystin1タンパク質の3818番目のアミノ酸がグリシン（G）からアルギニン（R）に変化するミスセンス変異を有している（図17）。免疫染色の結果、作製した嚢胞構造はAQP2陽性であった（図18）。

[0110] PKD1<sup>-/-</sup>尿管芽先端部細胞とPKD1<sup>+/+</sup>尿管芽先端部細胞の遺伝子発現比較

PKD1遺伝子変異を有さない（PKD1<sup>+/+</sup>）iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞と、PKD1ノックアウト（PKD1<sup>-/-</sup>）iPS細胞から分化誘導した尿管芽先端部細胞をRNAシーケンス解析で比較した。尿管芽先端部細胞は6週間培養したものをを用いた。

[0111] 遺伝子リスト（cilium\_GO\_0005929、cilium movement\_GO\_0003341）に含まれる遺伝子の発現パターンをヒートマップで示したところ、PKD1遺伝子変異により繊毛関連遺伝子の発現パターンが変化することが分かった（図19および20）。

[0112] PKD1<sup>+/+</sup>およびPKD1<sup>-/-</sup>iPS細胞由来の尿管芽先端部細胞におけるRNAシーケンス解析結果からgene set enrichment解析（GSEA）を行った。PKD1遺伝子変異を有する尿管芽先端部細胞で発現が亢進する遺伝子は、細胞周期に関連する遺伝子セット（E2F target, G2M checkpoint）、エネルギー代謝に関連する遺伝子セット（Oxidative phosphorylation）、およびコレステロール代謝に関連する遺伝子セット（Cholesterol homeostasis, Bile acid metabolism）に関するものが多いことが分かった（図21～23）。また、PKD1遺伝子変異を有する尿管芽先端部細胞では細胞内コレステロール量が増加する傾向があった（図24）。

[0113] Fluvastatinによる嚢胞形成の抑制

ADPKDにはスタチンが有効であることが知られているため (Xue C. et al., *Kidney Dis.* 6: 407-413 (2020))、各種スタチンの中からFluvastatinの効果を検討した。集合管嚢胞モデルの製造において、尿管芽先端部細胞の培養工程に1  $\mu$ M Fluvastatinを追加した場合、嚢胞形成が起こるオルガノイドの割合が有意に低下した (図25)。有意差の検定にはカイ二乗検定を用いた。

[0114] 本願の集合管嚢胞モデルに対する種々のADPKDの嚢胞増大抑制に有効な化合物の効果

下記のプロトコールにより、嚢胞オルガノイドを作製した。

1. 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドから注射針などを使って嚢胞構造を切離した。
2. 切離した嚢胞構造をAccutaseとTrypLEを1:1で混合した剥離液で37°C、3分処理した。
3. ピペッティングにより単一の嚢胞細胞にまで解離させた。
4. 単一の嚢胞細胞を10% Afamin/Wnt3a条件培地、200ng/ml R-spondin1、200ng/ml FGF1、10  $\mu$ M Y-27632、10  $\mu$ M Forskolin、2.5  $\mu$ M AVPを含む培地に懸濁し、50%マトリゲル上に播いた。
5. 2日間培養した後、200ng/ml FGF1、2.5  $\mu$ M AVPを含む培地に交換し、さらに3日間培養した。

[0115] ステップ4および5において、2.5  $\mu$ M AVPを含む培地または2.5  $\mu$ M AVPを含まない培地を用いて作製した嚢胞の形態写真を図26に示す。2.5  $\mu$ M AVPを含む培地または2.5  $\mu$ M AVPを含まない培地を用いて作製した嚢胞の撮影画像におけるすべての嚢胞の面積をグラフ化した (図27)。Mann-Whitney U検定により、AVP添加によって嚢胞サイズが有意に増大することが示された。

[0116] ADPKDの既存薬であるTolvaptanの効果を確認した。具体的には、ステップ5に0.1% DMSOまたは5  $\mu$ M Tolvaptanを添加した場合の嚢胞面積の平均を比較した (図28)。Student's t検定により、Tolvaptanを加えたことで嚢胞サイズが有意に減少したことが示された (n=3)。

[0117] 次に、ADPKDに対して有効であることが知られているVenglustat、Bardoxolone methylおよびTesevatinibの効果を確認した (Cornec-Le Gall E. et al., Lancet. 393: 919-35 (2019))。具体的には、ステップ5に0.1% DMSO、1 $\mu$ M Venglustat、0.1 $\mu$ M Bardoxolone methyl、または1 $\mu$ M Tesevatinibを添加した場合の嚢胞面積の平均を比較した (図29)。One-way ANOVAおよびTukey's t検定により、Bardoxolone methylまたはTesevatinibを加えたことで嚢胞サイズが有意に減少したことが示された。以上から、ADPKDに対して有効であることが知られている化合物の添加により、本願の集合管嚢胞モデルの嚢胞サイズが減少したことが示された。

## 請求の範囲

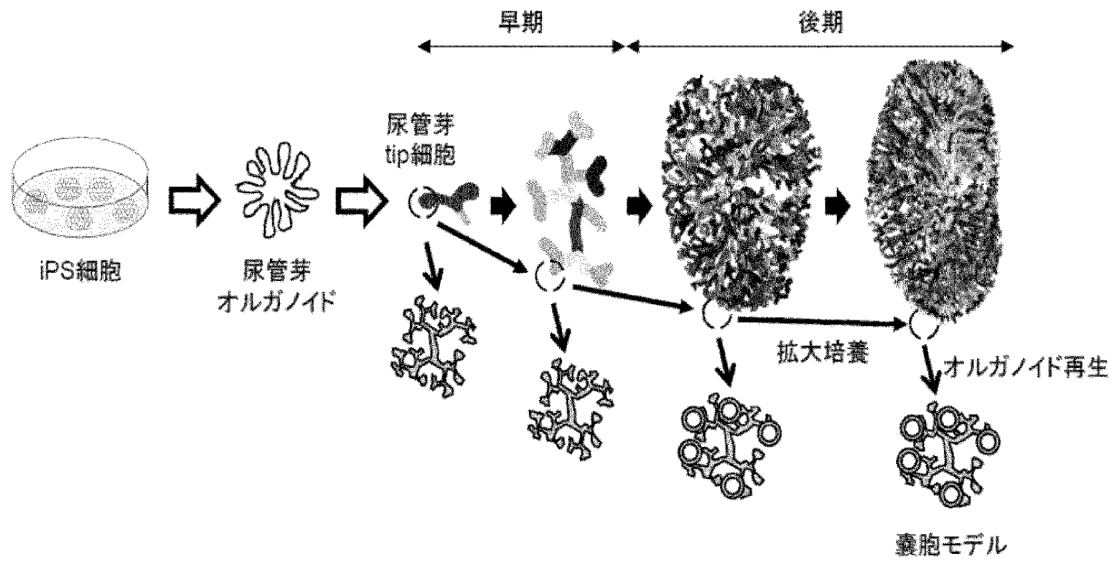
- [請求項1] 集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイド。
- [請求項2] 集合管主細胞に特異的なマーカーが、AQP2および／またはAVPR2である、請求項1に記載の人工集合管オルガノイド。
- [請求項3] 集合管主細胞に特異的なマーカーを発現する細胞を含む細胞集団により形成された嚢胞構造を有するオルガノイドである、集合管嚢胞モデル。
- [請求項4] 集合管主細胞に特異的なマーカーが、AQP2および／またはAVPR2である、請求項3に記載の集合管嚢胞モデル。
- [請求項5] 以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルの製造方法：  
(1) 常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）特異的尿管芽先端部細胞を、グリア細胞株由来神経栄養因子、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、GSK3 $\beta$ 阻害剤およびYes-associated protein(YAP)活性阻害剤を含む培地で培養する工程、および  
(2) 工程（1）で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子、BMP阻害剤、線維芽細胞増殖因子、レチノイン酸受容体アゴニスト、およびグリア細胞株由来神経栄養因子を含む培地で培養して、嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを得る工程。
- [請求項6] 工程（1）において、線維芽細胞増殖因子がFGF1であり、レチノイン酸受容体アゴニストがTTNPBであり、GSK3 $\beta$ 阻害剤がCHIR99021であり、Yes-associated protein(YAP)活性阻害剤がThiazovivinである、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 工程（2）において、Wntシグナル伝達活性化因子がWnt3aおよび／またはR-spondin 1であり、BMP阻害剤がLDN193189であり、線維芽細胞増殖因子がFGF8であり、レチノイン酸受容体アゴニストがTTNPBである、請求項5または6に記載の方法。
- [請求項8] 工程（2）において、培地がフォルスコリンをさらに含む、請求項

5～7のいずれかに記載の方法。

- [請求項9] 工程(1)の前に、ADPKD特異的尿管芽先端部細胞を維持培養する工程をさらに含む、請求項5～8のいずれかに記載の方法。
- [請求項10] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞がADPKD患者由来の細胞であるか、またはADPKDの関連する遺伝子変異を有する細胞である、請求項5～9のいずれかに記載の方法。
- [請求項11] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞が多能性幹細胞から誘導されたものである、請求項5～10のいずれかに記載の方法。
- [請求項12] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞が霊長類由来である、請求項5～12のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] ADPKD特異的尿管芽先端部細胞がヒト由来である、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 以下の工程を含む、集合管嚢胞モデルを継代培養する方法：  
(a) 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドを単一の細胞に分離させる工程、  
(b) 該細胞を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養する工程、および  
(c) 工程(b)で得られた培養物を、Wntシグナル伝達活性化因子を含む培地で培養することにより、嚢胞オルガノイドを得る工程。
- [請求項16] 嚢胞構造を有する人工集合管オルガノイドが請求項5～14のいずれかに記載の方法によって製造されたものである、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] 工程(b)および(c)において、Wntシグナル伝達活性化因子がWnt3aおよび/またはR-spondin1である、請求項15または16に記載の方法。
- [請求項18] 工程(b)および(c)において、培地が線維芽細胞増殖因子をさらに含む、請求項15～17のいずれかに記載の方法。

- [請求項19] 工程 (b) および (c) において、線維芽細胞増殖因子がFGF1である、請求項18に記載の方法。
- [請求項20] 以下の工程を含む、ADPKDを治療する物質をスクリーニングする方法：  
(i) 候補物質を、集合管嚢胞モデルに接触させる工程；  
(ii) 該集合管嚢胞モデルの嚢胞構造が縮小または消失しているか否かを確認する工程。
- [請求項21] 集合管嚢胞モデルが請求項5～14のいずれかに記載の方法によって製造されたものである、請求項20に記載の方法。
- [請求項22] 以下の工程を含む、ADPKDを予防する物質をスクリーニングする方法：  
(i') 請求項5～14のいずれかに記載の方法を実施して、集合管嚢胞モデルを製造する工程、ここで各工程の少なくとも1つの工程における培地は候補物質をさらに含む；  
(ii') 該集合管嚢胞モデルにおいて嚢胞構造が形成されているか否かを確認する工程。

[図1]



[図2]

PKD1 gene locus

GCAAGGACCTGCTGGATCAGGTCTTCATctagaggtacaggaggcatagggt

▲  
gRNA target



[ 3 ]

Genomic DNA

GCAAGGACCTGCTGGATCAGGTCCTTCATctagaggtacaggaggtcataggt Original

GCAAGGACCTGCTGGATCAGGTC-----ggaggtcataggt - 16

PKD1-KO

PKD1 homo knockout line

GCAAGGACCTGCTGGAT-----caggaggtcataggt - 20

[図4]

mRNA

Exon 34

GCCAAATCCTTCTCAGCATCAGATGAAGACCTGATCCAGCAGGTCCTTGCCGAGGGGGTC Original

GCCAAATCCTTCTCAGCATCAG ----- CAGGTCCTTGCCGAGGGGGTC - 17

PKD1-KO

GCCAAATCCTTCTCAGCATCAG ----- GTCCTTGCCGAGGGGGTC - 20

[図5]

Amino acid seq.

Original

AKSFSASDEDLIQQVLAEGVSSPAPTQDTHMETDLLSSLSSTPGEKTETL  
ALQRLGELGPPSPGLNWEQPQAARLSRTGLVEGLRKRLPAWCASLAH  
GLSLLLVAVAVAVSGWVGASFPVSVAVLLSSASFLASFLGWEPLKV  
LLEALYFSLVAKRLHPDEDDTLVESPAVTPVSARVPRVRPPHGFALFLAK  
EEARKVKRLHGMLRSLVYMLFLLVTLASYGDASCHGHAYRLQSAIKQ  
ELHSRAFLAITRSEELWPWMAHVLLPYVHGNQSSPELGPRLRQVRLQ  
EALYPDPPGPRVHTCSAAGGFSTSDYDVGWESPHNGSGTWAYSAPD

PKD1-KO

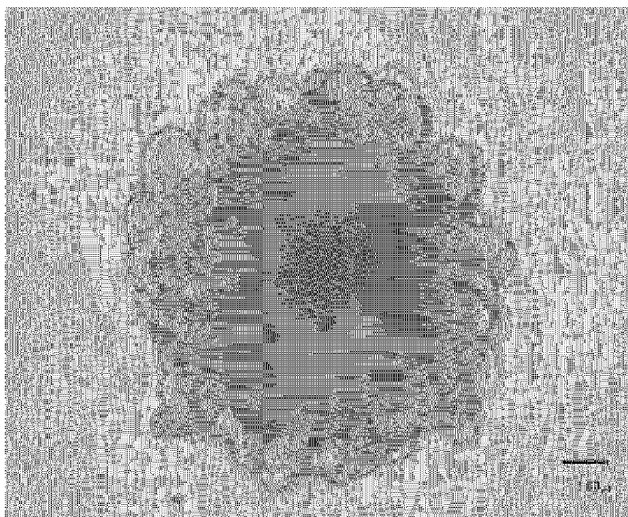
Predicted amino acid seq.

AKSFSASAGPCRGGQQPSYPRHPHGNGPAQQPVQHSWGEDRDAG  
AAEAGGAGATQPRPELGTAPGSEAVQDRTGGGSAEAPAAGLVCLPGP  
RAQPAPGGCGCGCLRVGGCELPPGRECCVAPVQQRQLPGLPRLGAT  
EGLAGSPVLLTGGQAAAPG\*

AKSFSASGPCRGGQQPSYPRHPHGNGPAQQPVQHSWGEDRDAGA  
AEAGGAGATQPRPELGTAPGSEAVQDRTGGGSAEAPAAGLVCLPGPR  
AQPAPGGCGCGCLRVGGCELPPGRECCVAPVQQRQLPGLPRLGATE  
GLAGSPVLLTGGQAAAPG\*

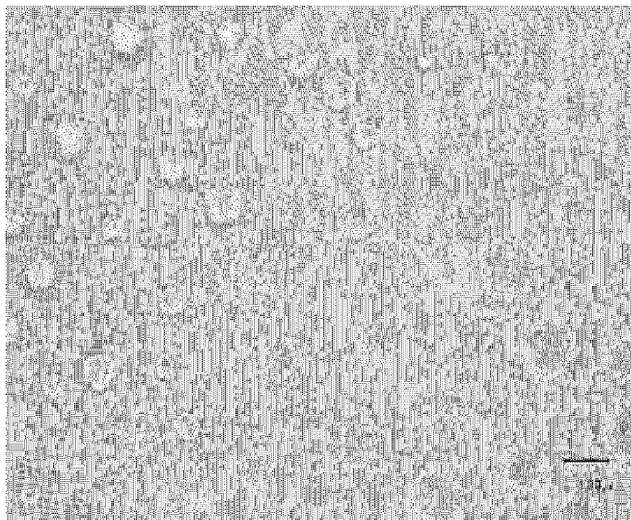
[図6]

## PKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞由来 尿管芽オルガノイド

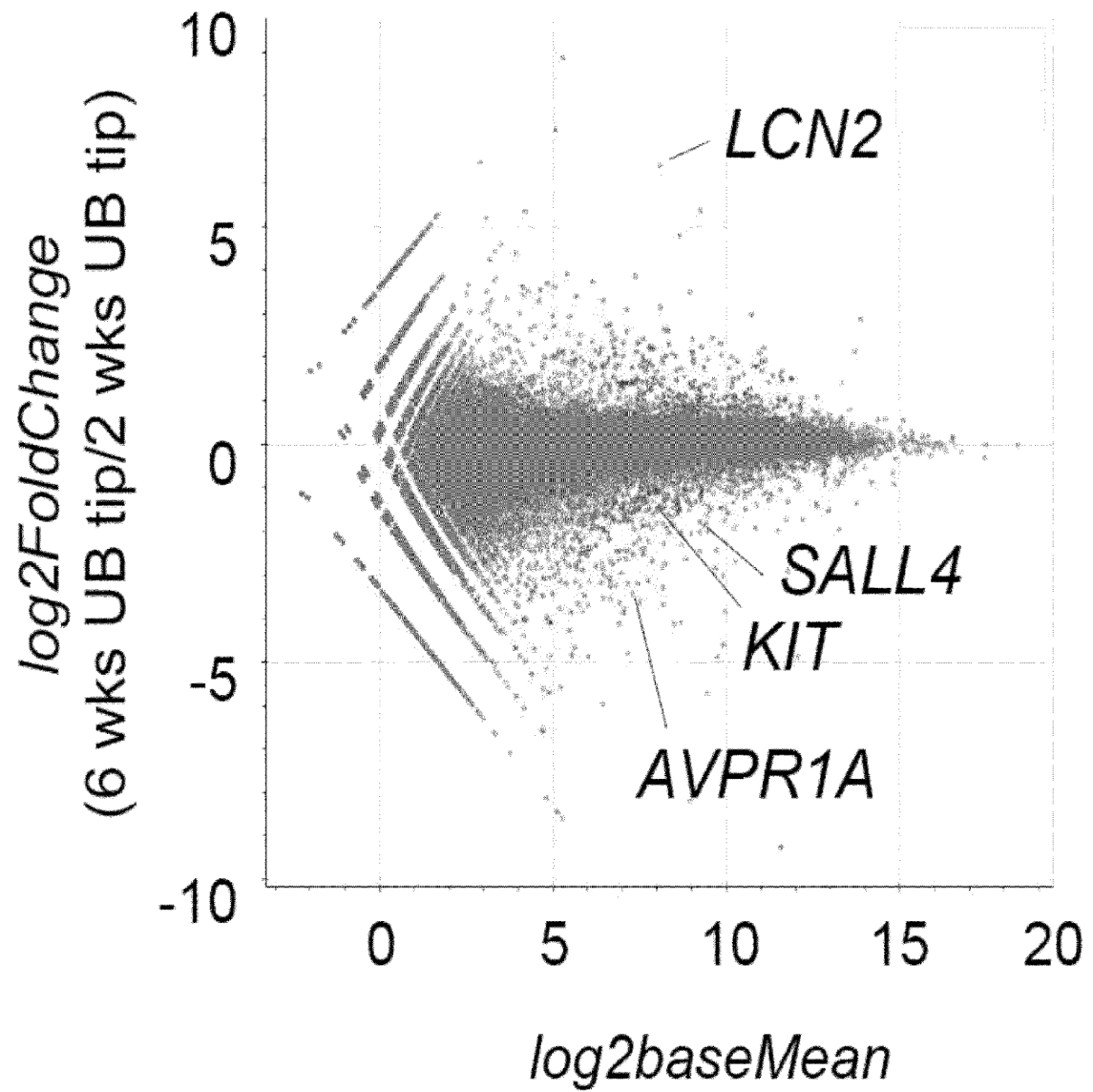


[図7]

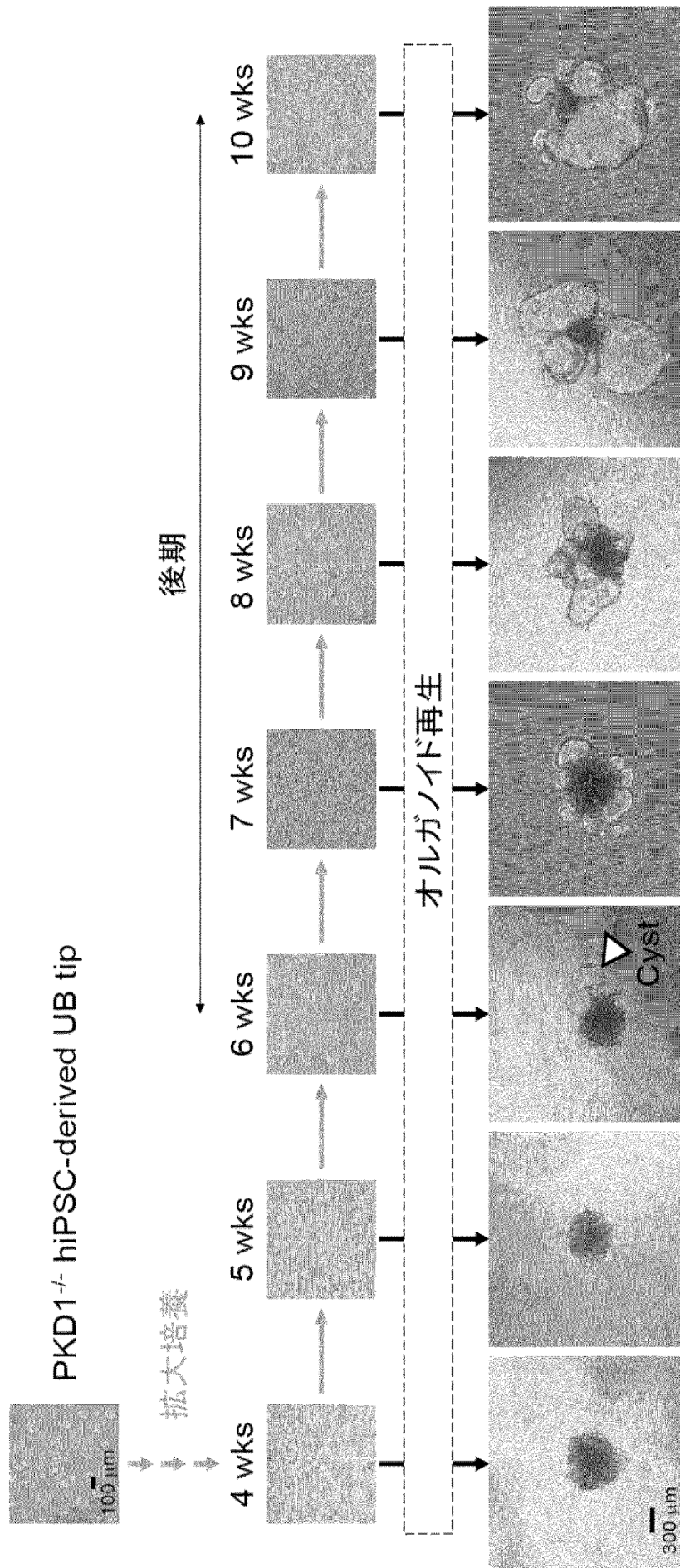
PKD1<sup>-/-</sup> iPS細胞由来  
尿管芽tip細胞  
(維持培養6週間)



[図8]



[図9]

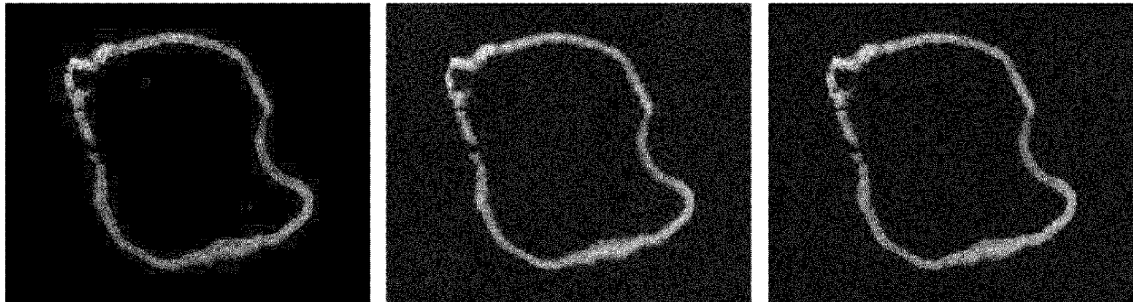


[図10]

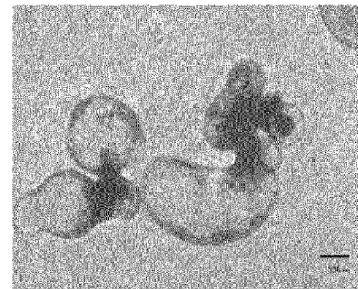
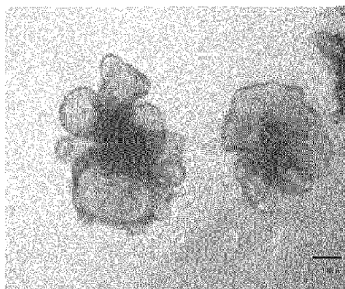
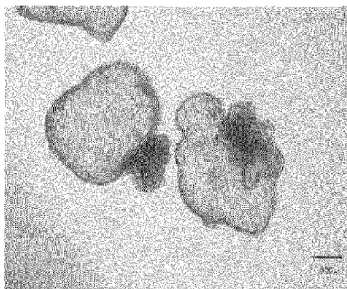
AQP2 Nuclei

AVPR2 Nuclei

AQP2 AVPR2 Nuclei



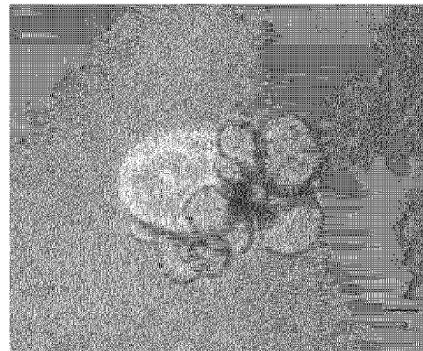
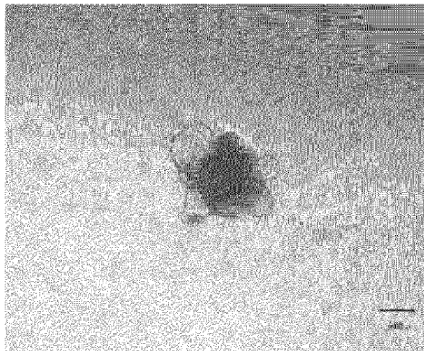
[図11]

585A1-PKD1<sup>-/-</sup>1231A3-PKD1<sup>-/-</sup>1383D2-PKD1<sup>-/-</sup>

[図12]

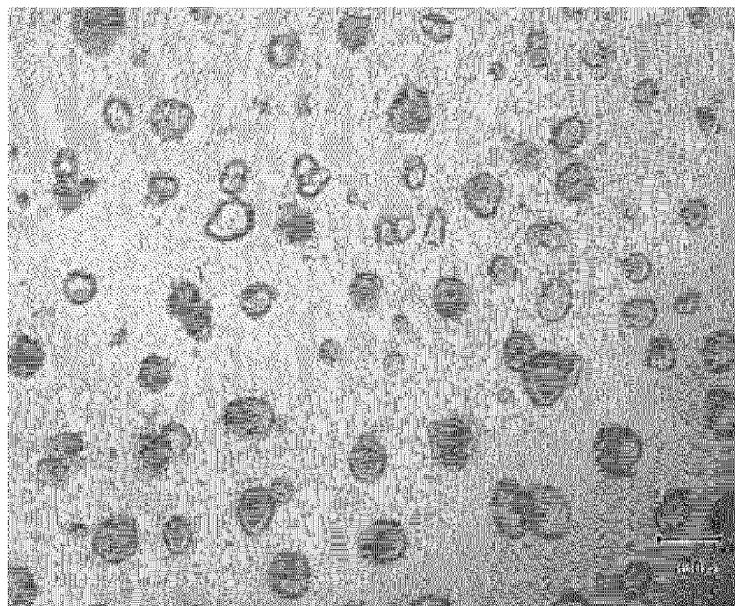
Forskolinなし

Forskolinあり



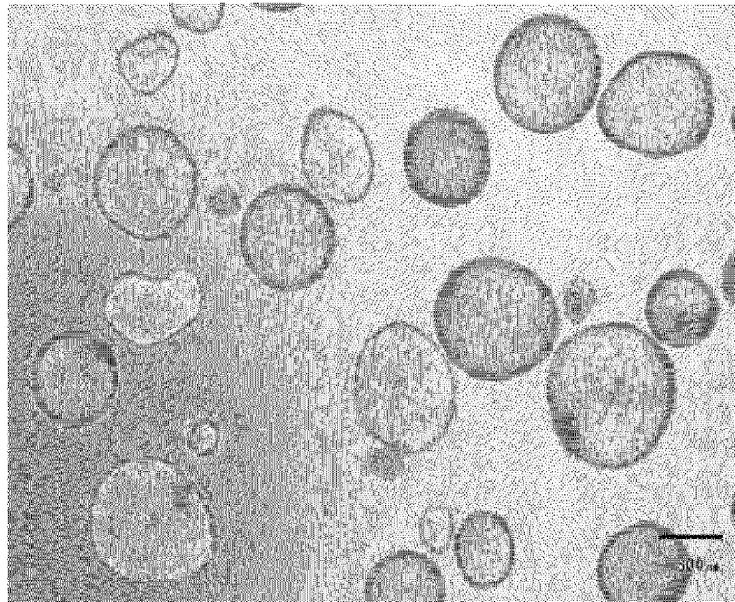
[図13]

## 囊胞細胞スフェロイド

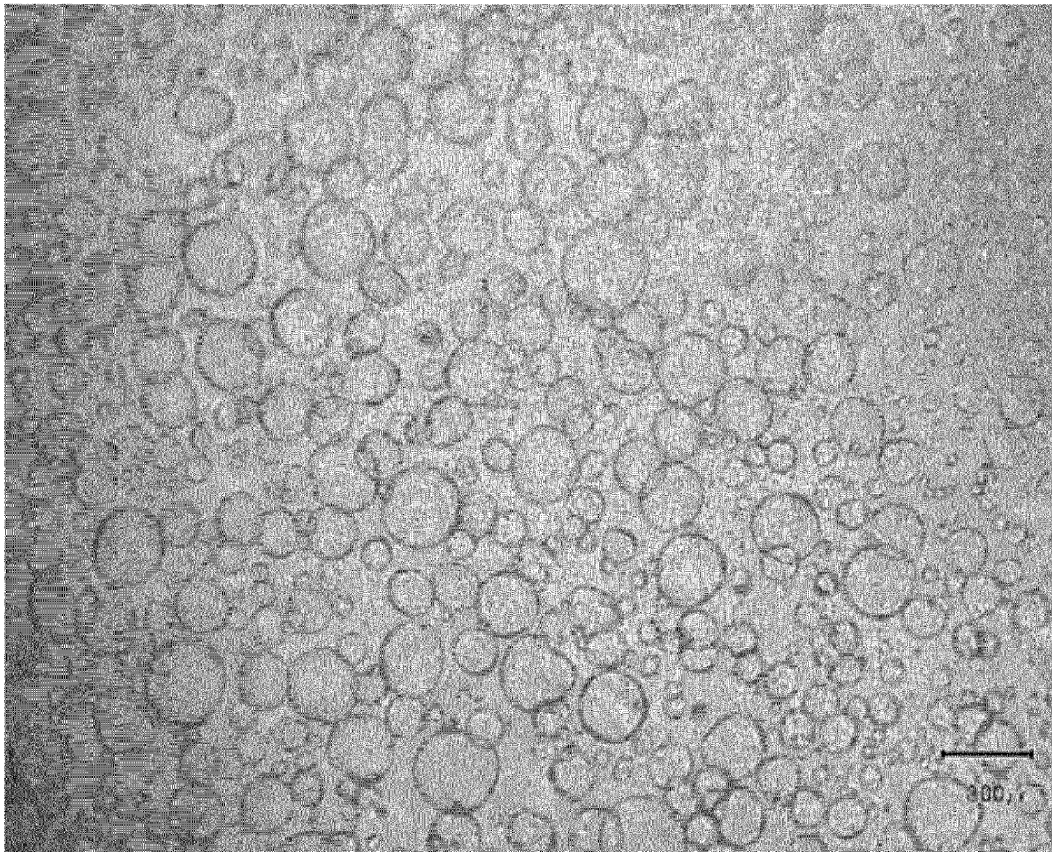


[図14]

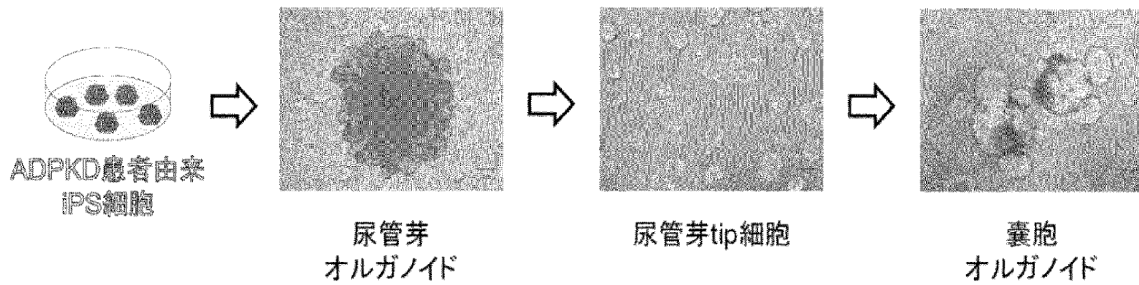
## 継代培養により作製した囊胞



[図15]

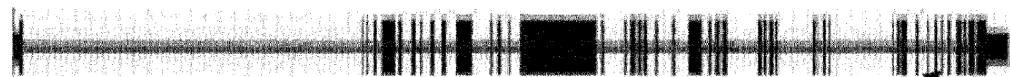


[図16]



[図17]

*PKD1* locus

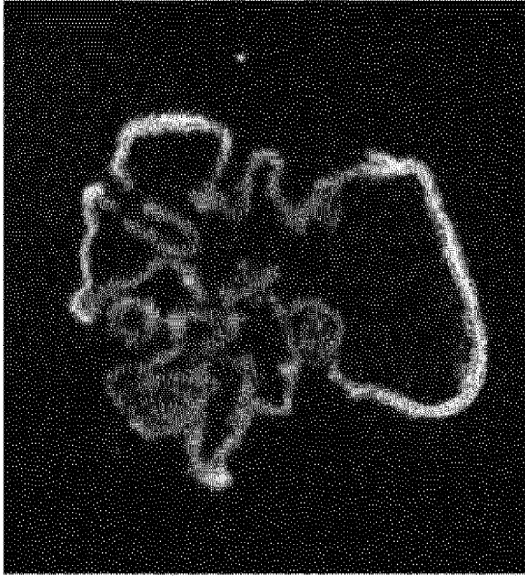


CiRA00007  
G3818R



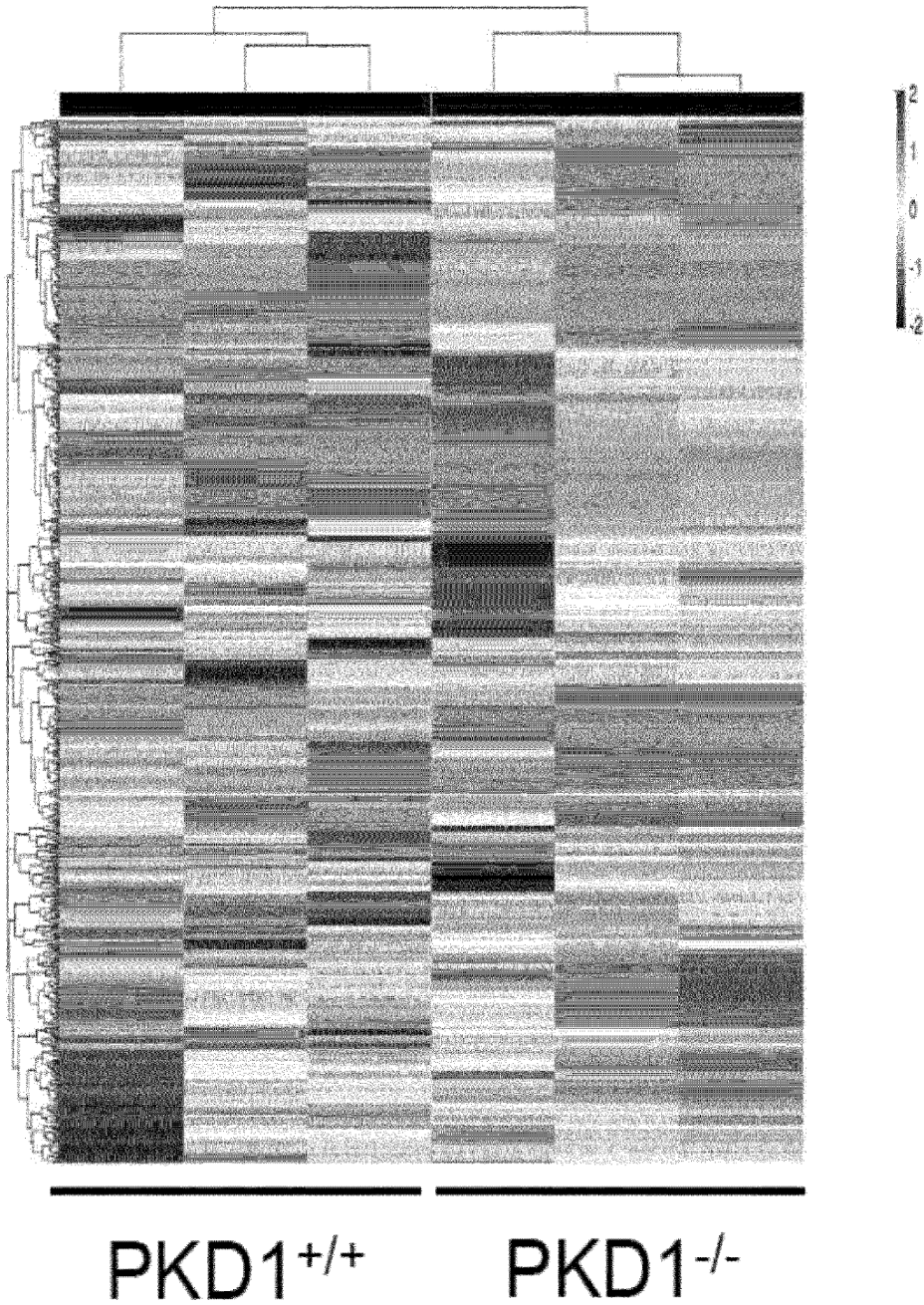
[図18]

AQP2 Nuclei



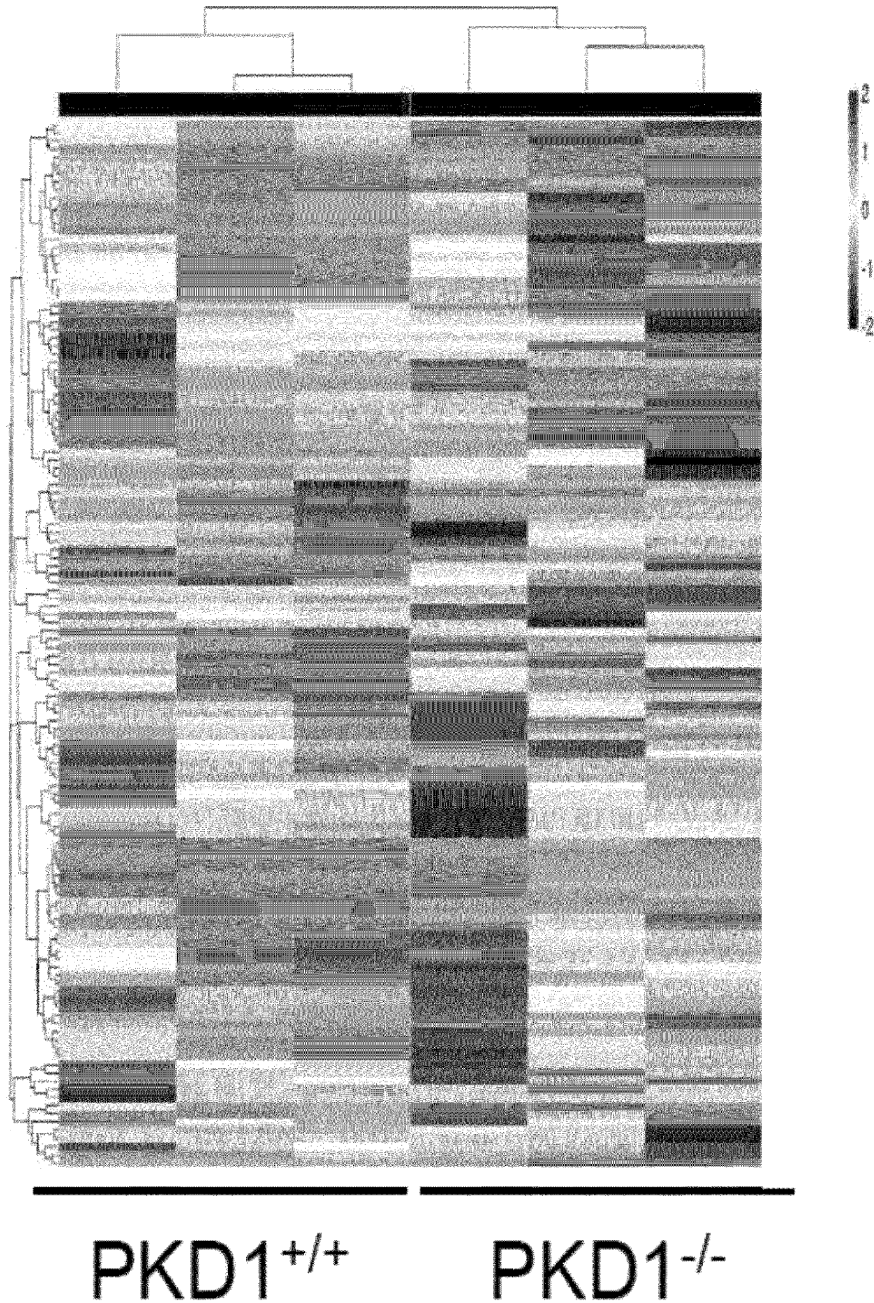
[圖19]

Gene list:  
cilium\_GO\_0005929

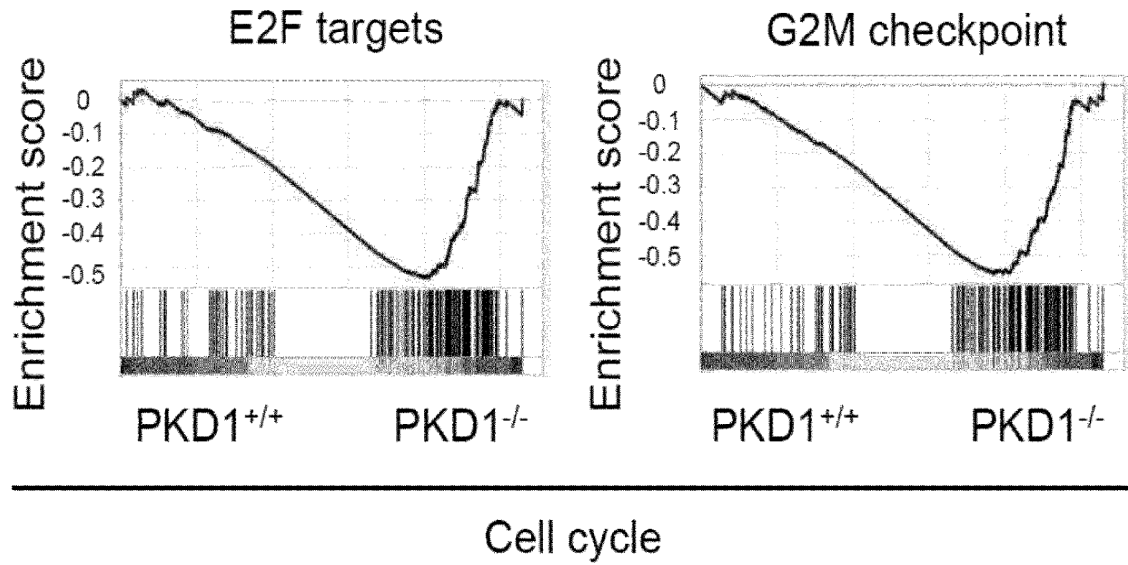


[図20]

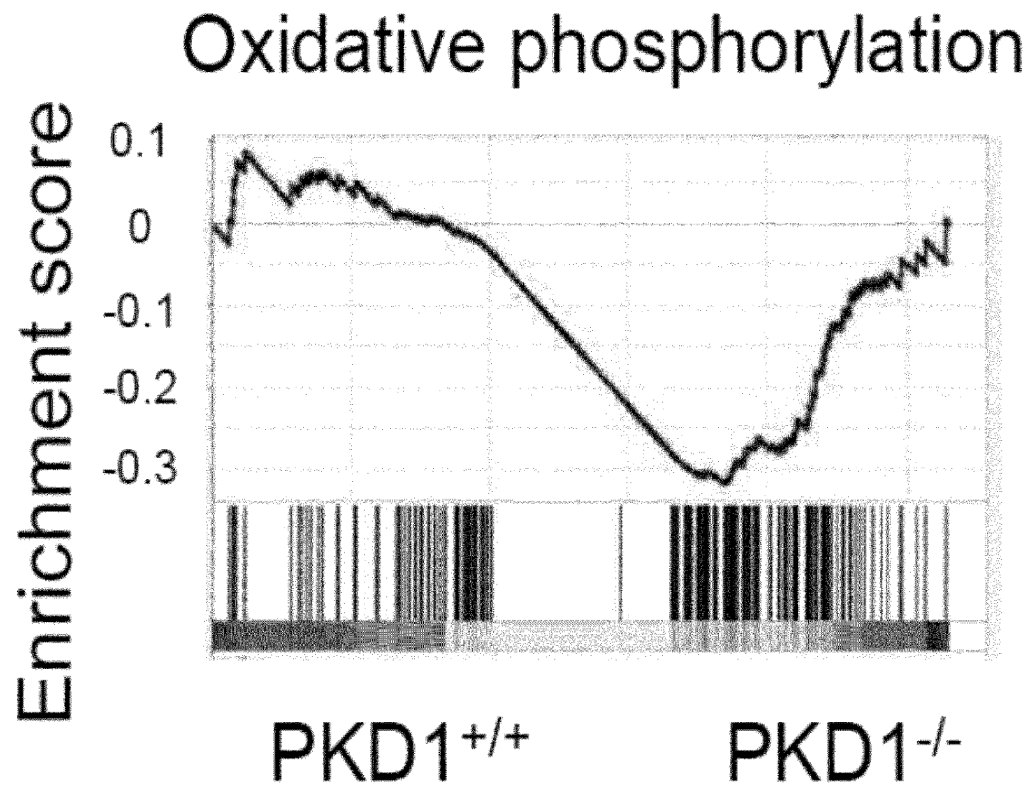
Gene list:  
cilium movement\_GO\_0003341



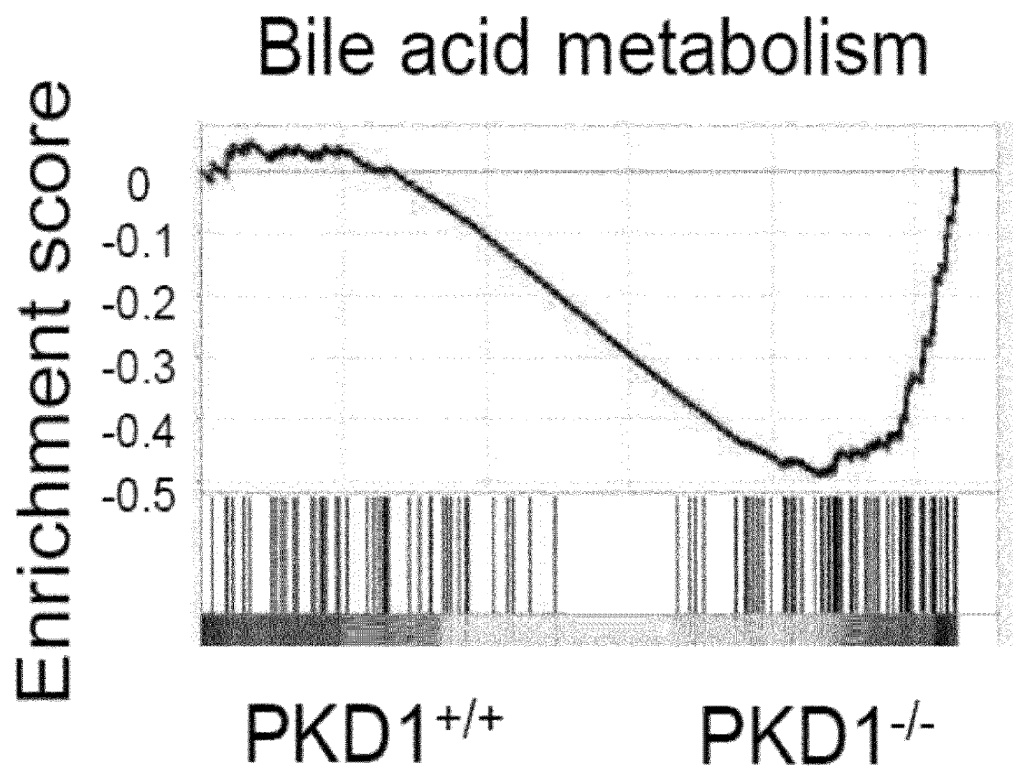
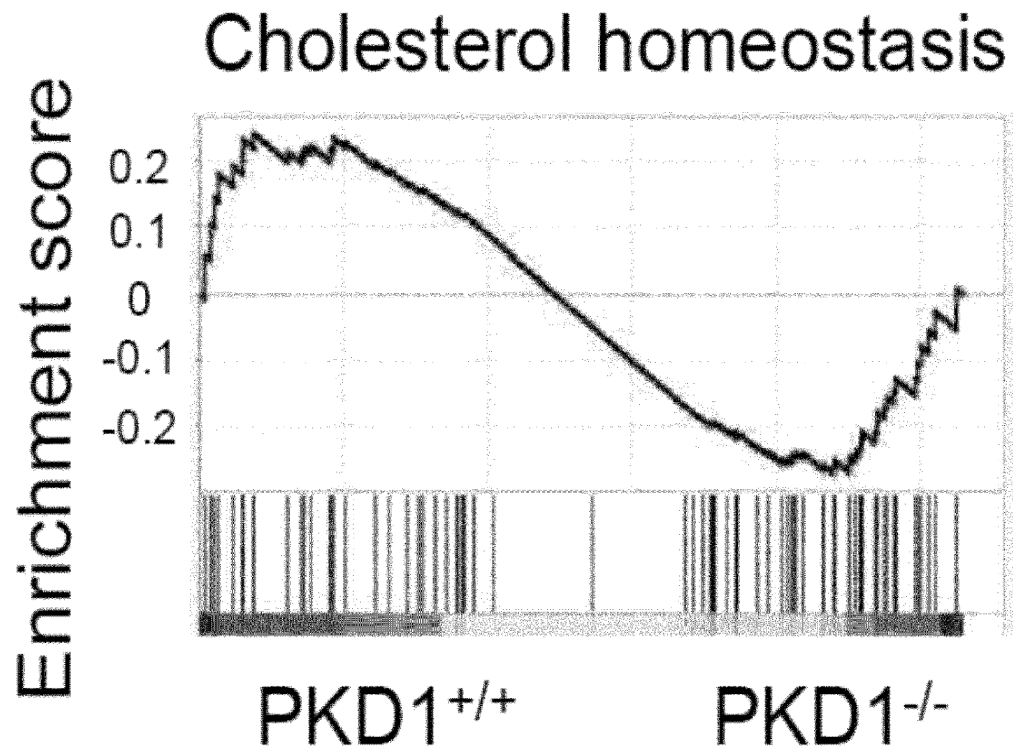
[21]



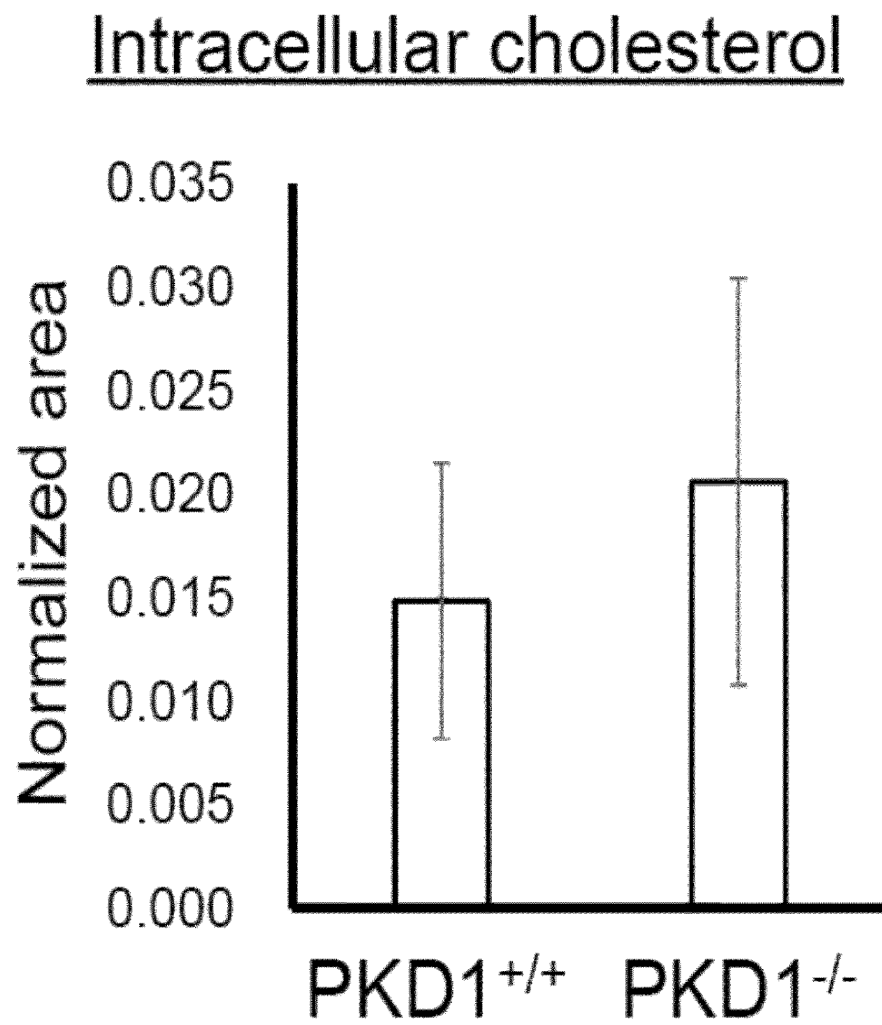
[22]



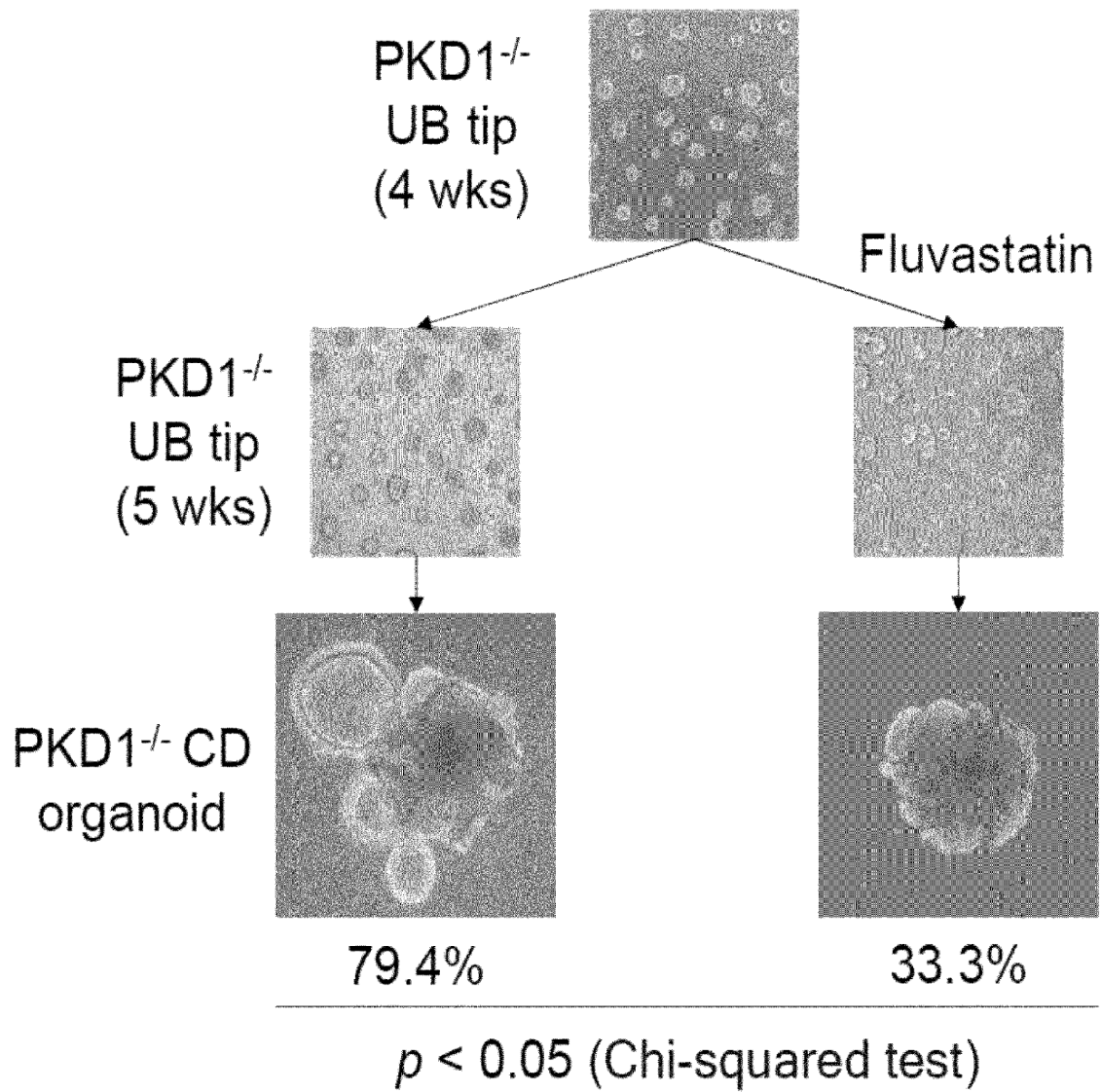
[圖23]



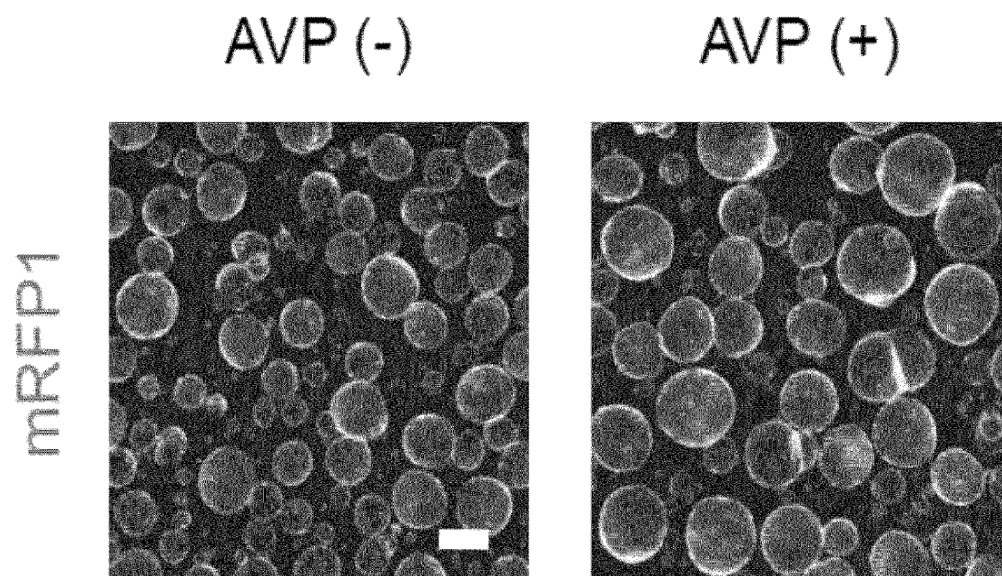
[圖24]



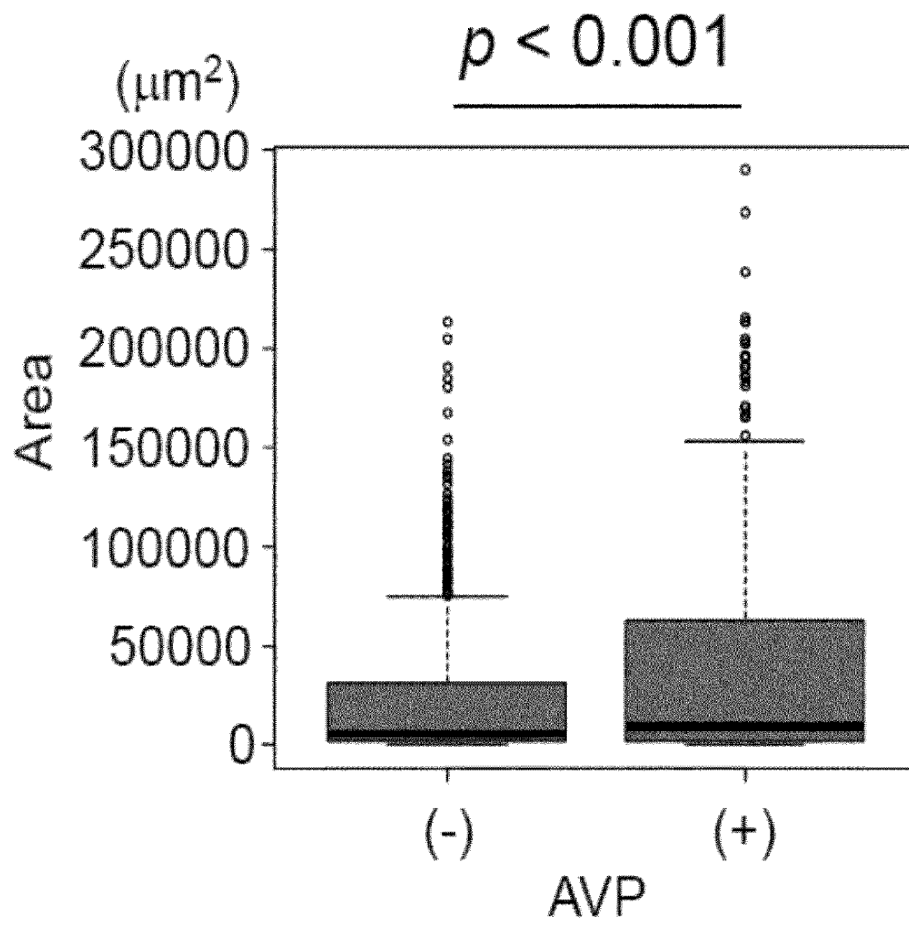
[圖25]



[圖26]

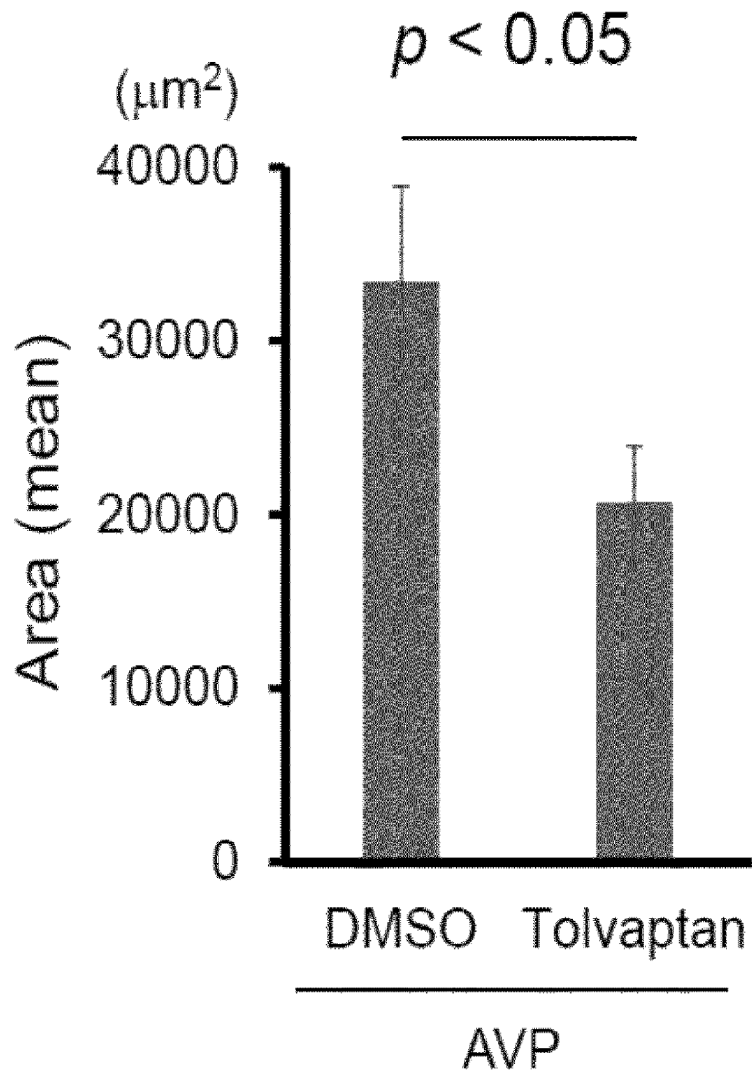


[図27]

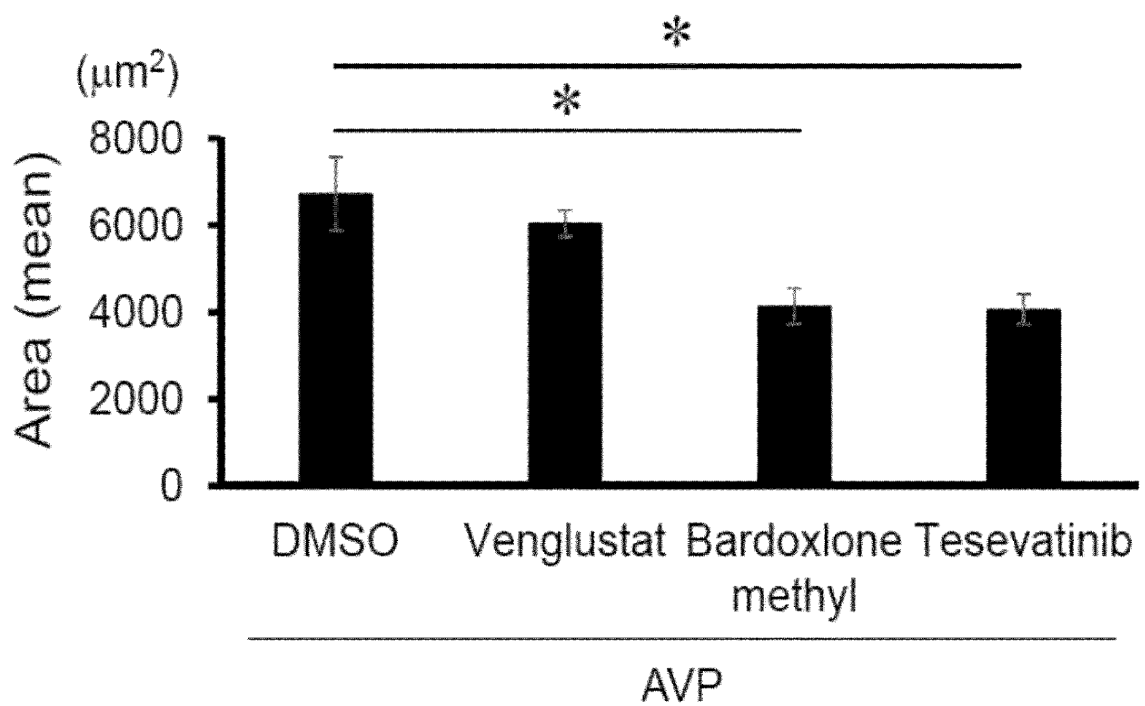




[図28]



[図29]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016274

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/02</i> (2006.01)i FI: C12N5/071 ZNA; C12N5/10; C12Q1/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/071; C12N5/10; C12Q1/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KURAOKA, S. et al. PKD1-Dependent Renal Cystogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ureteric Bud/Collecting Duct Organoids. <i>JASN</i> . 2020, vol. 31, no. 10, pp. 2355-2371 abstract, result, fig. 4-5	1-4, 20
A		5-19, 21-22
X	PKD1変異を有するヒトiPS細胞由来尿管芽/集合管オルガノイドにおける腎嚢胞再現, 熊本大学発生医学研究所 [online], 04 August 2020, [retrieval date: 10 June 2022], Internet: <URL:http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np107/> fig. 3, 4, (PKD1-dependent renal cystogenesis in human induced pluripotent stem cell-derived ureteric bud/collecting duct organoids. Institute of Molecular Embryology and Genetics [online].)	1-4, 20
A		5-19, 21-22
X	KYRYCHENKO, S. et al. PO1546 Generation of Collecting Duct Kidney Organoids from Human Induced Pluripotent Stem Cell. <i>J Am Soc Nephrol</i> . 2020, vol. 31, p. 493 results, conclusions	1-4, 20
A		5-19, 21-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 <b>09 June 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>21 June 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016274

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAE, S. et al. Expansion of Human iPSC-Derived Ureteric Bud Organoids with Repeated Branching Potential. Cell Reports. 2020, vol. 32, article number 107963 entire text	1-22
A	前 伸一, 課題番号: 17K15546, ヒトiPS細胞を用いた難治遺伝性腎疾患に対する新規病態モデルの開発, [online], 30 March 2020, [retrieval date: 10 June 2022], Internet: <URL: <a href="https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-17K15546/17K15546seika/">https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-17K15546/17K15546seika/</a> > entire text, (MAE, Shin-ichi. subject number: 17K15546. Development of a novel pathological model for intractable hereditary kidney disease using human iPS cells.)	1-22
A	TAGUCHI, A. NISHINAKAMURA, R. Higher-Order Kidney Organogenesis from Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell. 2017, vol. 21, pp. 730-746 entire text	1-22

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i FI: C12N5/071 ZNA; C12N5/10; C12Q1/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/071; C12N5/10; C12Q1/02 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KURAOKA, S. et al., PKD1-Dependent Renal Cystogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ureteric Bud/Collecting Duct Organoids, JASN, 2020, Vol.31, No.10, pp.2355-2371 ABSTRACT, RESULT, Figure 4-5	1-4, 20
A		5-19, 21-22
X	PKD1変異を有するヒトiPS細胞由来尿管芽/集合管オルガノイドにおける腎嚢胞再現, 熊本大学発生医学研究所 [online], 2020.08.04, [検索日:2022.06.10], インターネット:<URL: <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np107/">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np107/</a> > 図3, 図4	1-4, 20
A		5-19, 21-22
X	KYRYCHENKO, S. et al., P01546 Generation of Collecting Duct Kidney Organoids from Human Induced Pluripotent Stem Cell, J Am Soc Nephrol, 2020, Vol.31, p.493 Results, Conclusions	1-4, 20
A		5-19, 21-22
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
09.06.2022	21.06.2022	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  山▲崎▼ 真奈 4N 7884  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表

附属書C/ST.25テキストファイル形式

紙形式又はイメージファイル形式

b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MAE, S. et al., Expansion of Human iPSC-Derived Ureteric Bud Organoids with Repeated Branching Potential, Cell Reports, 2020, Vol.32, Article number 107963 全文	1-22
A	前 伸一, 課題番号: 17K15546, ヒト iPSC細胞を用いた難治遺伝性腎疾患に対する新規病態モデルの開発, [online], 2020.03.30, [検索日: 2022.06.10], インターネット: <URL: <a href="https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-17K15546/17K15546seika/">https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-17K15546/17K15546seika/</a> > 全文	1-22
A	TAGUCHI, A. and NISHINAKAMURA, R., Higher-Order Kidney Organogenesis from Pluripotent Stem Cells, Cell Stem Cell, 2017, Vol.21, pp.730-746 全文	1-22