

WO 2021/125340 A1

(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

2021年6月24日(24.06.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/125340 A1

(51) 国際特許分類:

CI2N 5/071 (2010.01)

(21) 国際出願番号 : PCT/JP2020/047504

(22) 国際出願日 : 2020年12月18日(18.12.2020)

(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 :
62/950,120 2019年12月19日(19.12.2019) US

(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36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36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 辻本 啓(TSUJIMOTO Hiraku); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 荒岡 利和(ARAOKA Toshikazu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (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, 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, 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))

(54) **Title:** MEDIUM FOR CULTURING AND EXPANDING NEPHRON PROGENITOR CELLS, METHOD FOR CULTURING AND EXPANDING NEPHRON PROGENITOR CELLS, AND METHOD FOR PRODUCING RENAL ORGANOID

(54) 発明の名称: ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法、腎臓オルガノイドの製造方法

(57) **Abstract:** This medium is for culturing and expanding nephron progenitor cells and contains FGF2, heparin, a ROCK inhibitor, a GSK3 β inhibitor, leukemia inhibitory factor (LIF), an ALK inhibitor, a BMP inhibitor, and a JAK inhibitor. This method is for culturing and expanding nephron progenitor cells by using said medium. This method for producing renal organoids comprises: a step for culturing and expanding a nephron progenitor culture by said culturing and expanding method using the medium; and a step for differentiating, into renal organoids, the nephron progenitor cells obtained through the culturing and expanding.

(57) 要約: ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地であって、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、BMP阻害剤、及びJAK阻害剤を含む、培地。また、前記培地を用いて、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法。また、前記培地拡大培養する方法により、ネフロン前駆培養を拡大培養する工程と、前記拡大培養したネフロン前駆細胞を腎臓オルガノイドに分化させる工程と、を含む、腎臓オルガノイドの製造方法。

明 細 書

発明の名称 :

ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法、腎臓オルガノイドの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法、腎臓オルガノイドの製造方法に関する。

本願は、2019年12月19日に、米国に出願された62/950,120号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 現在、本邦において慢性腎臓病（CKD）の患者数は、約1,300万人と推計されており、新たな国民病と呼ばれている。慢性腎臓病に対する根治的治療法は少なく、その進行によって透析療法を必要とする末期慢性腎不全患者は30万人以上であり、医学的のみならず医療経済的にも大きな問題となっている。末期慢性腎不全を含む慢性腎臓病の根治療法として腎移植が挙げられるが、深刻なドナー臓器不足のため需要に対し供給が全く追いついていない状態である。

[0003] 腎臓は、胎生初期の組織である中間中胚葉に由来し、脊椎動物では中間中胚葉から前腎、中腎、後腎の3つの腎臓が形成され、哺乳類では後腎が成体の腎臓となる。後腎は、間葉と呼ばれる成体腎のネフロンと間質に将来分化する組織と尿管芽と呼ばれる成体腎の集合管から下部の腎盂、尿管、膀胱の一部に将来分化する組織の2つの組織の相互作用で発生する。さらに、後腎間葉の中にネフロンを構成する糸球体と数種類の尿細管上皮細胞に分化する多分化能を有するネフロン前駆細胞（Nephron Progenitor Cell : NPC）の存在が示されている（非特許文献1, 2）。

[0004] マウスネフロン前駆細胞（mouse Nephron Progenitor Cell : mNPC）の拡大培養法としては、骨形成因子（Bone

e morphogenetic protein: BMP) 7を用いた方法が報告されている。例えば、非特許文献3には、BMP 7、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) 2、ヘパリン、Y-27632、CHIR99021、白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor: LIF)、A83-01、LDN193189を含む培地 (NPSR培地) を用いて、1年以上にわたってmNPCを増殖させたことが報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Osafune K., et al., Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. Development 2006; 133: 151-61.

非特許文献2 : Kobayashi A., et al., Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. Cell Stem Cell 2008; 3: 169-81.

非特許文献3 : Z. Li, T. Araoka, J.C.I. Belmonte, Gene Editing in 3D Cultured Nephron Progenitor Cell Lines, in: S. Vainio (Ed.), Kidney Organog Methods Protoc, Hummana Press, New York, 2019: pp. 151-159.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] これまでに報告されているネフロン前駆細胞の拡大培養法では、いずれの方法でもBMP 7が用いられている。BMP 7は高価であるため、より安価な低分子化合物に代替することができれば、培養コストを低減することができる。

[0007] また、培養コスト、培養時間の低減のためには、より効率よくネフロン前駆細胞を増殖させることができる拡大培養法の開発が望まれる。

[0008] そこで、本発明は、BMP 7を用いることなく、ネフロン前駆細胞を拡大

培養することが可能なネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地、前記培地を用いたネフロン前駆細胞の拡大培養方法、及び前記拡大培養方法で得られたネフロン前駆細胞から腎臓オルガノイドを製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の態様を含む。

[1] ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地であって、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、BMP阻害剤、及びJAK阻害剤を含む、培地。

[2] 前記JAK阻害剤は、JAK1阻害剤、JAK2阻害剤、及びJAK3阻害剤からなる群より選択される少なくとも1種である、[1]に記載の培地。

[3] 前記JAK3阻害剤は、TCS21311、WHI-P154、PF-06651600、FM-381、CP690550、及び7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボン酸、4-[3-[(2-メチル-1-オキソ-2-プロペン-1-イル)アミノ]フェニル]-、エチルエステルからなる群より選択される少なくとも1種である、[2]に記載の培地。

[4] 前記JAK2阻害剤は、CEP33779、及びTG101348からなる群より選択される少なくとも1種である、[2]に記載の培地。

[5] 前記ROCK阻害剤は、Y-27632である、[1]～[4]のいずれか1つに記載の培地。

[6] 前記GSK3 β 阻害剤は、CHIR99021である、[1]～[5]のいずれか1つに記載の培地。

[7] 前記ALK阻害剤は、A83-01である、[1]～[6]のいずれか1つに記載の培地。

[8] 前記BMP阻害剤は、LDN193189、Dorsomorphin、Noggin、及びDMH1からなる群より選択される少なくとも1種である、[1]～[7]のいずれか1つに記載の培地。

[9] BMP 7をさらに含む、[1]～[8]のいずれか1つに記載の培地。
。

[10] ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地であって、FGF 2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK 3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、BMP阻害剤、及びTCS 21311を含む、培地。

[11] BMP 7をさらに含む、[10]に記載の培地。

[12] JAK阻害剤を含む、ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地。
。

[13] 前記JAK阻害剤は、JAK 1阻害剤、JAK 2阻害剤、及びJAK 3阻害剤からなる群より選択される少なくとも1種である、[12]に記載の培地。

[14] 前記JAK 3阻害剤は、TCS 21311、WHI-P154、PF-06651600、FM-381、CP690550、及び7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボン酸、4-[3-[(2-メチル-1-オキソ-2-プロペン-1-イル)アミノ]フェニル]-,エチルエステルからなる群より選択される少なくとも1種である、[13]に記載の培地。

[15] 前記JAK 2阻害剤は、CEP33779、及びTG101348からなる群より選択される少なくとも1種である、[13]に記載の培地。

[16] FGF 2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK 3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、及びBMP阻害剤からなる群より選択される、少なくとも1種をさらに含む、[12]～[15]のいずれか1つに記載の培地。

[17] BMP 7をさらに含む、[12]～[16]のいずれか1つに記載の培地。

[18] [1]～[17]のいずれか1つに記載の培地を用いて、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法。

[19] [18]に記載のネフロン前駆細胞を拡大培養する方法により、ネ

フロン前駆培養を拡大培養する工程と、前記拡大培養したネフロン前駆細胞を腎臓オルガノイドに分化させる工程と、を含む、腎臓オルガノイドの製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明は、BMP7を用いることなく、ネフロン前駆細胞を拡大培養することが可能なネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地、前記培地を用いたネフロン前駆細胞の拡大培養方法、及び前記拡大培養方法で得られたネフロン前駆細胞から腎臓オルガノイドを製造する方法を提供できるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]NPSR培地 (+BMP7) 又はBMP7を除いたNPSR培地 (-BMP7) で3日間培養したmNPCの明視野画像 (BF) 及び蛍光画像 (Si × 2 - GFP) である。スケールバー：200 μm。

[図2]BMP7代替化合物のスクリーニングストラテジーの概略図である。

[図3]BMP7代替化合物の一次スクリーニングの384ウェルプレートにおける3日目のmNPC細胞塊の代表的な画像を示す。左端の上側8ウェル及び右端の下側8ウェルは陽性対照 (BMP7あり) であり、右端の上側8ウェル及び左端の下側8ウェルは陰性対照 (BMP7なし) である。丸で囲ったウェルは、JAK3阻害剤CP-690550で処理したウェルである。

[図4]NPSR培地、又はBMP7を除いたNPSR培地に様々なJAK阻害剤を添加して培養したmNPCの相対的細胞生存率を示すグラフである。細胞生存率はATPアッセイにより測定した。JAK阻害剤はDMSOに溶解してNPSR培地に添加した。測定結果は、DMSO (100%) を添加したNPSR培地で培養したコントロールにより正規化し、平均±SEMとして示した (TCS21311についてはn=6、その他についてはn=3)。

[図5]BMP7を除いたNPSR培地 (-BMP7) 、BMP7を除いたNPSR培地にTCS21311を添加した培地 (+TCS21311) 、又は

N P S R 培地 (+B M P 7) で、4日間維持されたm N P C 細胞塊の代表的な明視野画像 (B F) および蛍光画像 (S i × 2 - G F P) を示す。スケールバー：300 μm。

[図6] B M P 7 を除いたN P S R 培地 (-B M P 7) 、B M P 7 を除いたN P S R 培地にT C S 2 1 3 1 1 を添加した培地 (+T C S 2 1 3 1 1) 、又はN P S R 培地 (+B M P 7) で維持されたm N P C 細胞塊に由来する培養3日目 (上パネル) 及び7日目 (下パネル) の腎臓オルガノイドの明視野画像である。スケールバー：300 μm。

[図7] B M P 7 を除いたN P S R 培地にT C S 2 1 3 1 1 を添加したN P S R 培地で維持したm N P C 由来の腎臓オルガノイドにおけるW t 1、L o t u s t e t r a g o n o l o b u s l e c t i o n (L T L) 、C d h 1 、P o d x 1 、及びB r n 1 のレクチン染色及び免疫染色分析の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。スケールバー：200 μm。

[図8] B M P 7 を含むN P S R 培地及びB M P を除いたN P S R 培地で培養されたm N P C における差次的発現遺伝子の上位500個の遺伝子オントロジー解析の結果を示す。

[図9] B M P 7 を除いたN P S R 培地で培養したm N P C と比較して、N P S R 培地で培養したm N P C において差次的に発現する遺伝子の古典的経路解析の結果を示す。-I o g (p値) スコアが10以上の場合を示した。棒グラフのパターンは、解析したデータセットから予測される経路の活性を示す。パターンの濃淡は、予測された全体的な活性の低下を表し、白抜きは予測の対象とならない経路を示す。

[図10] N P S R 培地、B M P 7 を除いたN P S R 培地 (n o B M P) 、又はB M P 7 を除いたN P S R 培地にT C S 2 1 3 1 1 を添加した培地 (T C S 2 1 3 1 1) で培養したm N P C のリン酸化S t a t 3 (p S t a t 3) のタンパク質レベルを示す。p S t a t 3 のタンパク質レベルは、キャピラリーウエスタンプロットアッセイにより評価した。グラフ中の値は、総S t a t 3 タンパク質レベルで正規化されたp S t a t 3 シグナルの曲線下面積

の平均±S E M ($n = 4$) を示す。N P S Rで培養したコントロールに対する相対値として示した。

[図11]N P S R培地、B M P 7を除いたN P S R培地 (No B M P 7)、又はB M P 7を除いたN P S R培地にT C S 2 1 3 1 1を添加した培地 (T C S 2 1 3 1 1) で培養したm N P CのS t a t 3及びリン酸化S t a t 3のタンパク質レベルを評価したキャピラリーウエスタンプロットアッセイの代表的な画像である。

[図12]N P S R培地、B M P 7を除いたN P S R培地 (no B M P 7)、又はB M P 7を除いたN P S R培地にT C S 2 1 3 1 1を添加した培地で培養したm N P CにおけるS m a d 7発現及びS o c s 3発現のq R T - P C R解析結果を示す。3つの独立した実験からのデータを、平均±S E M ($n = 3$) として示した。N P S Rで培養したコントロールに対する相対値として示した。

[図13]N P S R培地、B M P 7を除いたN P S R培地 (no B M P)、又はB M P 7を除いたN P S R培地にT C S 2 1 3 1 1を添加した培地 (T C S 2 1 3 1 1) で培養したm N P Cのリン酸化S m a d 1/5 (p S m a d 1/5) 及びリン酸化E r k 1/2 (p E r k 1/2) のタンパク質レベルを示す。p S m a d 1/5及びp E r k 1/2のタンパク質レベルは、キャピラリーウエスタンプロットアッセイにより評価した。グラフ中の値は、S m a d 1/5又はE r k 1/2の総タンパク質レベルで正規化されたp S m a d 1/5又はp E r k 1/2シグナルの曲線下面積の平均±S E M ($n = 4$) を示す。N P S Rで培養したコントロールに対する相対値として示した。

[図14]N P S R培地、B M P 7を除いたN P S R培地 (No B M P 7)、又はB M P 7を除いたN P S R培地にT C S 2 1 3 1 1を添加した培地 (T C S 2 1 3 1 1) で培養したm N P CのE r k 1/2及びリン酸化E r k 1/2のタンパク質レベルを評価したキャピラリーウエスタンプロットアッセイの代表的な画像である。

[図15]N P S R培地、B M P 7を除いたN P S R培地 (No B M P 7)、

又はBMP7を除いたNPSR培地にTCS21311を添加した培地（TCS21311）で培養したmNPCのSmad1/5及びリン酸化Smad1/5のタンパク質レベルを評価したキャピラリーウエスタンプロットアッセイの代表的な画像である。

[図16]NPSR培地、BMP7を除いたNPSR培地（No BMP7）、又はBMP7を除いたNPSR培地にTCS21311を添加した培地（TCS21311）で培養したmNPCのCited1発現及びSinx2発現のqRT-PCR解析の結果を示す。3つの独立した実験からのデータを、平均±SEM（n=3）として示した。NPSRで培養したコントロールに対する相対値として示した。

[図17]BMP7を除いたNPSR培地に様々なJAK阻害剤を添加して培養したmNPCの相対的細胞生存率を示すグラフである。細胞生存率はATPアッセイにより測定した。JAK阻害剤はDMSOに溶解してNPSR培地に添加した。測定結果は、DMSO（100%）を添加したNPSR培地で培養したコントロールにより正規化し、平均±SEM（n=3）として示した。

[図18]NPSR培地（NPSR）又はTCS21311を添加したNPSR培地（TCS+NPSR）で培養したmNPCの培養4日目の細胞塊の細胞数を、平均±SEM（n=3）として示す。Pは継代数を示す。* : Student's t-検定によるp<0.05。

[図19]NPSR培地にTCS21311を添加した培地で2回継代したmNPCに由来する腎臓オルガノイドのProdx1、LTL及びCdh1のレクチン染色及び免疫染色分析の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。スケールバー：200 μm。

[図20]NPSR培地（NPSR medium）又はTCS21311を添加したNPSR培地（NPSR+TCS）で培養したhiPSC由来のNPC細胞塊の培養0日目及び4日目における細胞数を、平均±SEM（n=4）として示した。

[図21] TCS21311を添加したNPSR培地で培養したhiPSC由来NPC細胞塊の培養0日目及び10日目における細胞数を、平均+SEM (n=3) として示した。

[図22] TCS21311を添加したNPSR培地で10日間維持されたhiPSC由来NPC細胞塊におけるDAPI (-) 生細胞中のSIX2 (tdTomato) (+) 細胞の割合を示す。

[図23] TCS21311を添加したNPSR培地で10日間維持したhiPSC由来NPCのSIX2 (tdTomato)、OSR1 (GFP) 及びHOXD11の免疫染色分析の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図24] mNPSR培地に終濃度0～16nMのCEP33779を添加した培地で培養したmNPCの細胞数を示す。

[図25] mNPSR培地に終濃度0～12nMのTG101348を添加した培地で培養したmNPCの細胞数を示す。

[図26] mNPSR培地にDMSO (100%) 又は終濃度2nMのCEP33779を添加した培地で継代培養したmNPCの各継代数における細胞数を示す。CEP33779はDMSOに溶解してNPSR培地に添加した。

[図27] mNPSR培地にDMSO又は終濃度2nMのCEP33779を添加した培地で継代培養したmNPCの各継代数における累積細胞数を示す。CEP33779はDMSOに溶解してNPSR培地に添加した。

[図28] mNPSR培地にDMSO (100%) 又は終濃度3nMのTG101348を添加した培地で継代培養したmNPCの各継代数における細胞数を示す。TG101348はDMSOに溶解してNPSR培地に添加した。

[図29] mNPSR培地にDMSO (100%) 又は終濃度3nMのTG101348を添加した培地で継代培養したmNPCの各継代数における累積細胞数を示す。

[図30] mNPSR培地に終濃度2nMのCEP33779又は終濃度3nMのTG101348を添加した培地で4回継代した後のmNPCから形成した腎臓オルガノイドにおけるLotus tetragonolobus

lectin (LTL) のレクチン染色およびCDH1、Podx1の免疫染色分析の結果を示す蛍光顕微鏡画像である。

[図31]mNPSR培地にDMSO (100%) 又は終濃度3nMのTG101348を添加した培地で、ADPKD (常染色体優性多発性囊胞腎) モデルマウス由来のmNPCを培養したときの細胞数を示す。CEP33779はDMSOに溶解してNPSR培地に添加した。

発明を実施するための形態

[0012] <ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地>

本発明の第1の態様は、ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地である。一実施形態において、本態様の培地は、JAK阻害剤を含む。また、一実施形態において、本態様の培地は、JAK阻害剤に加えて、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、及びBMP阻害剤からなる群より選択される少なくとも1種を含む。また、一実施形態において、本態様の培地は、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、BMP阻害剤、及びTCS21311を含む。また、一実施態様において、本態様の培地は、上記成分に加えて、BMP7をさらに含む。

[0013] (ネフロン前駆細胞：NPC)

NPCは、in vitroで腎臓の糸球体様構造や尿細管様構造などの器官構造へ分化し得る細胞である。ネフロン前駆細胞の器官構造への分化能は、例えば、Osafune K, et al. (2006), Development 133:151–61に記載の方法によって評価し得る。ネフロン前駆細胞としての状態を維持するための特徴的な因子としてSIX2が知られており (Cell Stem Cell 3:169–181 (2008))、本態様の方法で培養されるネフロン前駆細胞の例として、SIX2陽性のネフロン前駆細胞が挙げられる。例えば、SIX2プロモーター制御下に導入されたレポーター遺伝子 (例えば、tdTomato) を有する多能性幹細胞 (例えば、後記実施例記載のOSR1-GFP/SIX2-tdTomatoレポーターヒ

ト iPS細胞)を培養し、当該レポーター遺伝子の発現を指標に当該分野で公知の方法(例えば、細胞ソーターを用いる方法)によって、SIX2陽性のネフロン前駆細胞を単離することができる。また、定量的RT-PCR(Nat Commun 4, 1367, (2013))等の遺伝子発現を分析する方法によって、ネフロン前駆細胞におけるSIX2の発現を確認することもできる。本明細書において、SIX2陽性のネフロン前駆細胞には、SIX2タンパク質を発現している細胞、およびSIX2プロモーター制御下にある遺伝子にコードされるタンパク質を発現する細胞が含まれる。ヒトのSIX2遺伝子(NCBIGene ID: 10736)としては、NCBIAクセッション番号: NM_016932.5で登録されたヌクレオチド配列を有する遺伝子、マウスのSIX2遺伝子(NCBIGene ID: 20472)としては、NCBIAクセッション番号: NM_011380.2で登録されたヌクレオチド配列を有する遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。本態様の培地で培養されるネフロン前駆細胞は、好ましくは、OSR1が陽性であり、かつHOX11、WT1、SIX2及びSALL1が陽性である。

- [0014] ネフロン前駆細胞は、生体の後腎間葉から単離されたものであってもよく、多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞等)から分化誘導したものであってもよい。
- [0015] 多能性幹細胞からのネフロン前駆細胞の分化誘導は、公知の方法により行うことができる。多能性幹細胞からネフロン前駆細胞を誘導する方法としては、例えば、国際公開第2014/200115号、国際公開第2017/043666号、国際公開第2018/216743号等に記載の方法が挙げられる。
- [0016] 後腎間葉から採取された細胞集団又は多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団からのネフロン前駆細胞の単離は、例えば、上記ネフロン前駆細胞のマーカーであるOSR1、HOX11、WT1、SIX2、又はSALL1の発現を指標として行うことができる。あるいは、MET、又はAGTR2

の発現を指標として行うことができる（国際公開第2020/022261号）。

[0017] 本態様の培地で拡大培養されるネフロン前駆細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、純化されたネフロン前駆細胞の細胞集団として提供されてもよい。ネフロン前駆細胞と他の細胞腫とを含む細胞集団である場合、ネフロン前駆細胞数の割合は、全細胞数（100%）に対して、30%、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、又は90%以上であることが好ましい。

[0018] （拡大培養）

「拡大培養」とは、ネフロン前駆細胞の性質を維持させたままネフロン前駆細胞を増殖させる培養を意味する。すなわち、拡大培養したネフロン前駆細胞は、*in vitro*で腎臓の糸球体様構造や尿細管様構造などの器官構造へ分化することができる。本態様の培地は、継代を繰り返しても、ネフロン前駆細胞の性質を維持させたままネフロン前駆細胞を拡大培養することができる。

[0019] （培地）

本態様の培地は、動物培養に用いられる基礎培地に、JAK阻害剤を添加したものであってもよい。また、JAK阻害剤に加えて、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子（LIF）、ALK阻害剤、及びBMP阻害剤からなる群より選択される、少なくとも1種をさらに添加したものであってもよい。

[0020] 《基礎培地》

基礎培地は、特に限定されず、動物培養に通常用いられるものを特に制限なく使用することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 α MEM培地、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12 (F12) 培地、RPMI 1640培地、Fisch

r's 培地、及びこれらの混合培地等が挙げられるが、これらに限定されない。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 Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、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。また、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、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、及びこれらの同等物などの1つ以上の物質を含んでいてもよい。

[0021] 基礎培地は、例えば、D MEM/F 1 2 培地の混合培地（例えば、D MEM : F 1 2 を 1 : 1 で混合した混合培地）に、アミノ酸、非必須アミノ酸、血清代替物等を添加したものであってもよい。

[0022] ≪JAK阻害剤≫

本態様の培地は、JAK阻害剤を含む。JAK阻害剤は、ヤヌスキナーゼ (Janus kinase) ファミリー（例えば、JAK1、JAK2、JAK3、TYK2）の1種類以上の酵素の活性を阻害する物質である。JAK阻害剤は、ヤヌスキナーゼファミリーの酵素活性を阻害することにより、JAK-STAT系のシグナル伝達を阻害する。JAK阻害剤は、ヤヌスキナーゼファミリーの酵素の活性を阻害できるものである限り、特に限定されない。JAK阻害剤は、JAK1、JAK2、及びJAK3からなる群より選択される少なくとも1種の酵素活性を阻害するものが好ましく、JAK3の酵素活性を阻害するものがさらに好ましい。すなわち、JAK阻害剤は、JAK1阻害剤、JAK2阻害剤、及びJAK3阻害剤からなる群より選択される少なくとも1種であることが好ましく、JAK3阻害剤であることより好ましい。

[0023] JAK3阻害剤は、JAK3の活性を阻害できるものであれば特に限定されない。JAK3阻害剤としては、例えば、TCS21311 (CAS番号1260181-14-3)、WHI-P154 (CAS 211555-04-3)、PF-06651600 (CAS番号 1792180-81-4)、FM-381 (CAS番号 2226521-65-7)、CP 690550 (CAS番号 540737-29-9)、7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボン酸, 4-[3-[(2-メチル-1-オキソ-2-プロペニ-1-イル) アミノ] フェニル] -, エチルエステル、JAK3 INHIBITOR IV (CAS番号58753-54-1)、ZM449829 (CAS番号4452-06-6)、AZD1480 (CAS番号935666-88-9)、及びSelective JAK3 inhibitor 1 (CAS番号1443235-95-7)、並びにこれらの誘導体等が挙げられるが、これらに限定されない。中でも、JAK3阻害剤は、TCS21311が好ましい。

[0024] JAK2阻害剤は、JAK2の活性を阻害できるものであれば、特に限定されない。JAK2阻害剤としては、例えば、NVP-BSK805 2HCl (CAS番号1942919-79-0)、TG101209 (CAS番号936091-14-4)、TG101348 (CAS番号936091-26-8)、1, 2, 3, 4, 5, 6-ヘキサブロモシクロヘキサン (CAS番号1837-91-8)、CEP-33779 (CAS番号1257704-57-6)、及びNSC33994 (CAS番号82058-16-0)、並びにこれらの誘導体等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0025] JAK阻害剤は、JAK2／3阻害剤であってもよい。JAK2／3阻害剤は、JAK2及びJAK3を阻害する阻害剤である。JAK2／3阻害剤としては、例えば、AG490 (CAS番号133550-30-8)、AT9283 (CAS番号896466-04-9)、及びLY3009104 (CAS番号1187594-09-7)、並びにこれらの誘導体等が挙

げられるが、これらに限定されない。

[0026] JAK阻害剤は、JAK1／2阻害剤であってもよい。JAK1／2阻害剤は、JAK1及びJAK2を阻害する阻害剤である。JAK1／2阻害剤としては、例えば、CYT387 (CAS番号1056634-68-4)、S-Ruxolitinib (INCBO18424) (CAS番号941685-37-6)、及びLY2784544 (CAS番号1229236-86-5)、並びにこれらの誘導体等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0027] JAK阻害剤は、上記のような低分子化合物に限定されず、ヤヌスキナーゼファミリー (JAK1、JAK2、JAK3、TYK2) に対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸 (例、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクター等であってもよい。

[0028] JAK阻害剤は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。JAK阻害剤は、JAK3阻害剤が好ましく、TCS21311がさらに好ましい。

[0029] 本態様の培地におけるJAK阻害剤の濃度は、JAK阻害剤の種類に応じて適宜選択可能である。JAK阻害剤は、例えば、IC50付近の濃度で用いることが好ましい。JAK阻害剤は、例えば、0.001 μM以上、0.002 μM以上、0.003 μM以上、0.004 μM以上、0.005 μM以上、0.006 μM以上、0.007、0.008 μM以上、0.009 μM以上、0.01 μM以上の濃度で用いることができる。JAK阻害剤の濃度の上限値としては、例えば、100 μM以下、50 μM以下、30 μM以下、20 μM以下、10 μM以下、5 μM以下、3 μM以下等が挙げられる。JAK阻害剤が、TCS21311である場合、TCS21311の培地における濃度は、例えば、0.001～10 μM、0.01～3 μM、0.01～2 μM、又は0.01～1 μM等が挙げられる。JAK阻害剤が、CEP33779である場合、CEP33779の培地における濃度は、例えば、0.5～20 nM、1～8 nM、1～4 nM、又は1～3 nM等が

挙げられる。JAK阻害剤が、TG101348である場合、TG101348の培地における濃度は、例えば、0.5～50nM、1～30nM、1～20nM、1～10nM、又は1～5nM等が挙げられる。

[0030] ≪FGF2≫

本態様の培地は、FGF2を含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、FGF2を含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor: FGF)2は、塩基性FGF(bFGF)とも呼ばれる。FGF2が由来する生物は特に限定されない。FGF2としては、例えば、ヒトFGF2を用いることができる。ヒトFGF2(NCBI Gene ID: 2247)としては、例えば、NCBIアクセスション番号:NP_001348594.1のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。FGF2はネフロン前駆細胞の増殖を促進する活性を有する限りその断片又は機能的改変体であってもよい。FGF2は市販されているものを使用してもよく、細胞から精製されたタンパク質や遺伝子組み換えで生産されたタンパク質を使用してもよい。

[0031] 培地におけるFGF2の濃度は、例えば、1～1000ng/mL、好ましくは、10～500ng/mL、より好ましくは、20～400ng/mL、さらに好ましくは、50～350ng/mLである。

[0032] ≪ヘパリン≫

本態様の培地は、ヘパリンを含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、ヘパリンを含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。ヘパリンは、塩の形態であることが好ましい。ヘパリンの塩としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属との塩；カルシウム、バリウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属との塩；アルミニウム、亜鉛、銅、鉄などの金属との塩；アンモニウム塩；有機塩基との塩；及びアミノ酸との塩等が挙げられる。中でも、ヘパリンは、アルカリ金属塩が好ましく、ナトリウム塩がより好ましい。

[0033] 培地におけるヘパリンの濃度は、例えば、0.01～100 μg/mL、好ましくは、0.05～50 μg/mL、より好ましくは、0.1～10 μg/mLである。

[0034] ≪ROCK阻害剤≫

本態様の培地は、ROCK阻害剤を含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、ROCK阻害剤を含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。ROCK阻害剤は、Rho-キナーゼ(ROCK)の機能を阻害する物質である。ROCK阻害剤としては、例えば、Y-27632(例、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983(2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284 (2000)参照)、Fasudil/HA1077(例、Uenata et al., Nature 389:990-994(1997) 参照)、H-1152(例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232(2002)参照)、Wf-536(例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4):319-324(2003)参照)及びそれらの誘導体、並びにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸(例、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、及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(例えば、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、及び国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照)。

[0035] ROCK阻害剤は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。好ましいROCK阻害剤としてはY-27632が挙げられる。培地におけるROCK阻害剤の濃度は、ROCK阻害剤の種類に応じて適宜選択することができる。ROCK阻害剤は、例えば、IC50付近の濃度で用いることが好ましい。培地におけるROCK阻害剤の濃度は、例えば、0.1～

100 μM、好ましくは、1～75 μM、さらに好ましくは、5～50 μMである。

[0036] ≪GSK3β阻害剤≫

本態様の培地は、GSK3β阻害剤を含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、GSK3β阻害剤を含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。GSK3β阻害剤は、GSK (Glycogen Synthase Kinase) 3βの機能、例えば、キナーゼ活性（例えば、βカテニンに対するリン酸化能）を阻害する物質である。GSK3β阻害剤としては、例えば、インジルビン誘導体であるB1O（別名、GSK-3β阻害剤IX；6-ブロモインジルビン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αブロモメチルケトン化合物であるGSK-3β阻害剤VII（4-ジブロモアセトフェノン）、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts（別名、GSK3βペプチド阻害剤；Myr-N-GKEAPPAPPQSP-PNH2）、及び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)ピリミジン-2-イルアミノ]エチルアミノ]ピリジン-3-カルボニトリル）、並びにこれらの誘導体等が挙げられる。これらの化合物は、例えば、Stemgent社、Calbiochem社、Biomo社等から入手可能であり、また自ら作製してもよい。GSK3β阻害剤は、GSK3βに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸（例、siRNA）、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクター等であってもよい。

[0037] GSK3β阻害剤は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。好ましいGSK3β阻害剤としては、CHIR99021が挙げられ

る。培地におけるGSK3 β 阻害剤の濃度は、GSK3 β 阻害剤の種類に応じて適宜選択することができる。GSK3 β 阻害剤は、例えば、IC50付近の濃度で用いることが好ましい。培地におけるGSK3 β の濃度としては、例えば、0.01～100 μ M、好ましくは、0.1～10 μ M、さらに好ましくは、0.5～3 μ Mであり、特に好ましくは、0.5～1.5 μ Mである。

[0038] ≪LIF≫

本態様の培地は、白血病阻止因子（Leukemia Inhibitory Factor : LIF）を含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、LIFを含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。LIFが由来する生物は、特に限定されない。LIFとしては、例えば、ヒト（特表平1-502985号公報）、マウス（特表平1-502985号公報）、ヒツジ（特表平4-502554号公報）、ブタ（特表平4-502554号公報）、ウシ（特表平8-154681号公報）等のLIFを用いることができる。中でも、ヒト又はマウスのLIFが好ましい。ヒトLIF（NCBI Gene ID : 3976）としては、例えば、NCBIアクセション番号：NP_001244064.1又はNP_002300.1のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。マウスLIF（NCBI Gene ID : 16878）としては、例えば、NCBIアクセション番号：NP_001034626.1又はNP_032527.1のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。LIFは、ネフロン前駆細胞が由来する生物に応じて適宜選択することができる。例えば、ネフロン前駆細胞がマウス由来である場合、マウスLIFを用いることが好ましい。ネフロン前駆細胞がヒト由来である場合、ヒトLIFを用いることが好ましい。LIFはネフロン前駆細胞の増殖を促進する活性を有する限りその断片及び機能的改変体であってもよい。LIFは市販されているものを使用してもよいし、細胞から精製されたタンパク質や遺伝子組み換えで生産されたタンパク質を使用してもよい。

[0039] 培地におけるLIFの濃度は、例えば、1～1000ng/mL、好ましくは、10～500ng/mL、より好ましくは、50～250ng/mLである。また、培地におけるLIFの濃度は、例えば、10～5000units/mL、好ましくは、100～3000units/mL、より好ましくは、500～2000units/mLである。

[0040] ≪ALK阻害剤≫

本態様の培地は、ALK阻害剤を含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、ALK阻害剤を含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。ALK阻害剤は、ALK (Activin receptor-Like Kinase) ファミリーの機能を阻害する物質である。ALK阻害剤としては、例えば、TGF β のALKファミリーへの結合を阻害する物質、又はALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質等が挙げられる。ALK阻害剤としては、例えば、ALK4、ALK5又はALK7の阻害剤が挙げられる。ALK阻害剤としては、例えば、Lefty-1 (NCBI アクセション番号として、マウス：NP_034224.1、ヒト：NP_066277.1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、WO2009146408)、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 β R1キナーゼ阻害剤VIII (6-[2-tert-ブチル-5-[6-メチル-2-ピリジン-2-イル]-1H-イミダゾール-4-イル]-キノキサリン) 並びにこれらの誘導体等が挙げられるが、これらに限

定されない。ALK阻害剤は、ALKファミリーに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸（例、siRNA）、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクター等であってもよい。

[0041] ALK阻害剤は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。好ましいALK阻害剤としては、A83-01が挙げられる。培地におけるALK阻害剤の濃度は、ALK阻害剤の種類に応じて適宜選択することができる。ALK阻害剤は、例えば、IC50付近の濃度で用いることが好ましい。培地におけるALK阻害剤の濃度としては、例えば、0.01～100nM、好ましくは、0.1～500nM、さらに好ましくは、1～100nMであり、特に好ましくは、10～80nMである。

[0042] ≪BMP阻害剤≫

本態様の培地は、BMP阻害剤を含むことが好ましい。JAK阻害剤に加えて、BMP阻害剤を含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。BMP阻害剤は、BMP (Bone Morphogenetic Protein) シグナル伝達を阻害する物質である。BMP阻害剤は、例えば、BMPの受容体であるALK2又はALK3のキナーゼ活性を阻害する物質であってもよい。BMP阻害剤としては、例えば、Chordin、Noggin、Follistatinなどのタンパク質性阻害剤；Dorsomorphin (6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethyl oxy) phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine) (P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116:11_60; P. B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4:33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3(8):e2904)、及びLDN193189 (4-(6-(4-(piperazin-1-yl) phenyl) pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl) quinoline)、DMH1 (dorsomorphin homolog 1

; 4-[6-(4-isopropoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline)、並びにこれらの誘導体等が挙げられるが、これらに限定されない。BMP阻害剤は、BMPに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸（例、siRNA）、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクター等であってもよい。

[0043] BMP阻害剤は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。好ましいBMP阻害剤としては、LDN193189、Dorsomorphin、Noggin、及びDMH1が挙げられ、LDN193189がより好ましい。培地におけるBMP阻害剤の濃度は、ALK阻害剤の種類に応じて適宜選択することができる。ALK阻害剤は、例えば、IC50付近の濃度で用いることが好ましい。培地におけるALK阻害剤の濃度としては、例えば、0.01～1000nM、好ましくは、0.1～500nM、さらに好ましくは、0.5～100nMであり、特に好ましくは、1～50nMである。

[0044] ≪BMP7≫

本態様の培地は、BMP7を含んでいてもよい。JAK阻害剤に加えて、BMP7を含むことで、ネフロン前駆細胞の増殖がより良好となる。BMP7が由来する生物は特に限定されない。BMP7としては、例えば、ヒトBMP7を用いることができる。ヒトBMP7 (NCBI Gene ID: 655)としては、例えば、NCBIアクセスション番号: NP_001710.1のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。BMP7はネフロン前駆細胞の増殖を促進する活性を有する限りその断片又は機能的改変体であってもよい。BMP7は市販されているものを使用してもよく、細胞から精製されたタンパク質や遺伝子組み換えで生産されたタンパク質を使用してもよい。

[0045] 培地におけるBMP7の濃度は、例えば、0.1～500ng/mL、好ましくは、1～300ng/mL、より好ましくは、10～100ng/mL

Lである。

[0046] 本態様の培地は、本発明の効果を損なわない範囲で、上記以外の成分を含むことができる。

[0047] 本態様の培地は、JAK阻害剤、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、及びBMP阻害剤を含むことが好ましい。一例として、本態様の培地は、JAK阻害剤としてTCS21311を含むことができる。一例としては、本態様の培地は、TCS2133、FGF2、ヘパリン、Y-27632、LIF、CHIR99021、ADN193189、及びA83-01を含むことができる。

[0048] 本態様の培地は、JAK阻害剤を含むことで、ネフロン前駆細胞の分化能を維持したまま、良好にネフロン前駆細胞を増殖させることができ、高価なBMP7を用いる必要がない。そのため、BMP7を含む従来のネフロン前駆細胞拡大培養用培地と比較して、コストを低減することができる。

[0049] 本態様の培地は、さらにBMP7を含んでいてもよい。一例として、本態様の培地は、JAK阻害剤、FGF2、ヘパリン、ROCK阻害剤、GSK3 β 阻害剤、白血球阻害因子(LIF)、ALK阻害剤、BMP阻害剤、及びBMP7を含んでいてもよい。一例として、本態様の培地は、JAK阻害剤として、TCS21311、WHI-P154、PF-06651600、FM-381、CP690550、7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-カルボン酸、4-[3-[(2-メチル-1-オキソ-2-プロペニル-1-イル)アミノ]フェニル]-,エチルエステル、CEP33779、及びTG101348からなる群より選択される少なくとも1種を含むことができる。一例としては、本態様の培地は、前記のようなJAK阻害剤、FGF2、ヘパリン、Y-27632、LIF、CHIR99021、ADN193189、A83-01、及びBMP7を含むことができる。

[0050] 本態様の培地は、JAK阻害剤に加えてBMP7を含むことで、ネフロン前駆細胞の分化能を維持したまま、より良好にネフロン前駆細胞を増殖させ

ることができる。

[0051] <ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法>

本発明の第2の態様は、前記第1の態様の培地を用いて、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法である。

[0052] 本態様の方法は、前記第1の態様の培地を用いる限り、培養方法は特に限定されない。ネフロン前駆細胞は、動物細胞の培養に通常用いられる培養条件で培養することができる。培養温度は、ネフロン前駆細胞が増殖できる限り特に限定されないが、通常、25～40℃とすることができます、好ましくは30～40℃である。培養温度の具体例としては、約37℃が挙げられる。ネフロン前駆細胞は、通常CO₂含有空気の雰囲気下で培養することができる。CO₂濃度は、通常、約0.3～5%とすることができます、好ましくは約2～5%である。CO₂濃度の具体例としては約5%が挙げられる。

[0053] 培養期間は、特に限定されず、任意の期間をすることができる。本態様の方法では、第1の態様の培地を用いることにより、ネフロン前駆細胞の性質を維持したまま、長期間培養することができる。長期間培養する場合、適宜、継代することが好ましい。前記第1の態様の培地を用いて継代を繰り返すことで、ネフロン前駆細胞の性質を維持したまま、ネフロン前駆細胞の培養を続けることができる。継代は、培養液からネフロン前駆細胞の細胞塊を採取し、新たな培地に播種することにより、行うことができる。継代の際には、プロテアーゼ、コラゲナーゼ、及びDNAase等の酵素を含む細胞分散液を用いて、細胞塊を分散した後、新たな培地に播種してもよい。継代の間隔は、特に限定されないが、例えば、2～10日程度、又は3～7日程度とすることができる。

[0054] 本態様の方法は、前記第1の態様の培地を用いてネフロン前駆細胞を培養するため、効率よくネフロン前駆細胞を増殖させることができます。本態様の方法で拡大培養されたネフロン前駆細胞は、腎疾患を有する対象に投与して、腎疾患を治療するために使用することができます。また、腎疾患を治療又は予防するための医薬組成物として使用することができます。また、後述の腎臓

オルガノイドの製造のために用いることができる。

[0055] <腎臓オルガノイドの製造方法>

本発明の第3の態様は、腎臓オルガノイドの製造方法である。本態様の腎臓オルガノイドの製造方法は、前記第2の態様の方法により、ネフロン前駆培養を拡大培養する工程（拡大培養工程）と、前記拡大培養したネフロン前駆細胞を腎臓オルガノイドに分化させる工程（分化工程）と、を含む。

[0056] （拡大培養工程）

拡大培養工程は、前記第2の態様の方法により行う。本工程により、ネフロン前駆細胞を所望の数まで効率よく増殖させることができる。

[0057] （分化工程）

ネフロン前駆細胞から腎臓オルガノイドへの分化は、公知の方法により行うことができる。例えば、Nature, 526, 564–568 (2015) で報告されている方法等を用いることができる。例えば、前記拡大培養工程で得られたネフロン前駆細胞の細胞塊を、3T3-Wnt4細胞などのフィーダー細胞、マウス胎仔脊髄細胞、又はマウス胎仔腎細胞と共に培養してもよい。あるいは、ネフロン前駆細胞の細胞塊を、GSK3 β 阻害剤を含む基礎培地を使用した半気相培養（好ましくは、気相一液相培養；Nature, 526, 564–568 (2015) 参照）で培養してもよい。前記半気相培養で使用する培地は、GSK3 β 阻害剤に加えて、FGF9及びFGF2等を含んでいてもよい。基礎培地、GSK3 β 阻害剤、FGF2としては、上記と同様のものが挙げられる。好ましい基礎培地としてはKSRが挙げられる。好ましいGSK3 β 阻害剤としてはCHIR99021が挙げられる。好ましいFGF2としてはヒトFGF2が挙げられる。好ましいFGF9としては、ヒトFGF9が挙げられる。ヒトFGF9としては、例えば、NCBIアクセション番号：NP_002001.1のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。FGF9は腎臓オルガノイドへの分化誘導活性を有する限りその断片及び機能的改変体が含まれる。FGF9は市販されているものを使用してもよいし、細胞から精製されたタンパク質や遺伝

子組み換えて生産されたタンパク質を使用してもよい。

[0058] 分化工程における培養条件は、動物細胞の培養に通常用いられる培養条件を用いることができる。培養温度は、腎オルガノイドに分化誘導できる限り特に限定されないが、通常、25～40°Cとすることができます、好ましくは30～40°Cである。培養温度の具体例としては、約37°Cが挙げられる。CO₂濃度は、通常、約0.3～5%とすることができます、好ましくは約2～5%である。CO₂濃度の具体例としては約5%が挙げられる。

[0059] 本態様の製造方法により得られた腎臓オルガノイドは、腎疾患を有する対象に投与して、腎疾患を治療するために使用することができます。また、腎疾患を治療又は予防するための医薬組成物として使用することができます。

[0060] <他の態様>

本発明は、前記第2の態様の方法で得られたネフロン前駆細胞又は前記第3の態様の製造方法で得られた腎臓オルガノイドを含む医薬組成物もまた提供する。本発明は、前記ネフロン前駆細胞又は前記腎臓オルガノイドを含む腎疾患治療剤もまた提供する。本発明は、前記ネフロン前駆細胞又は前記腎臓オルガノイドの治療有効量を、腎疾患を有する対象又は腎疾患のリスクを有する対象に投与する工程を含む、腎疾患を治療又は予防する方法もまた提供する。

[0061] 腎疾患の治療又は予防を必要とする対象への前記ネフロン前駆細胞の投与方法としては、例えば、前記ネフロン前駆細胞をシート化して、対象の腎臓に貼付する方法；前記ネフロン前駆細胞を生理食塩水等に懸濁させた細胞懸濁液を対象の腎臓に移植する方法；前記ネフロン前駆細胞を三次元培養（例えば、Dev Cell. Sep 11, 2012; 23 (3) : 637–651）し、得られた細胞塊を対象の腎臓に直接移植する方法；前記ネフロン前駆細胞をマトリゲル等から構成されたスキヤフォールド上で三次元培養し、得られた細胞塊を対象の腎臓に移植する方法等が挙げられる。移植部位は、腎臓内であれば特に限定されないが、好ましくは、腎被膜下である。腎疾患の治療又は予防を必要とする対象への前記腎臓オルガノイドの投与方法

としては、対象の体内（例えば、腹腔内）に移植する方法等が挙げられる。

[0062] 治療又は予防対象となる腎疾患は、特に限定されないが、例えば、急性腎障害、慢性腎不全、慢性腎不全にまで至らない慢性腎臓病等が挙げられる。移植する前記ネフロン前駆細胞の細胞数又は前記腎臓オルガノイドの大きさは、移植後に生着できれば特に限定されず、疾患部位の大きさ、投与対象の体躯、年齢、性別等に合わせて、適宜調整することができる。

実施例

[0063] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0064] (実施例 1)

〔材料及び方法〕

〈動物実験〉

全ての動物実験は、京都大学動物実験委員会の承認を得て行った。B6; 129-Sixtm3 (EGFP/cre/ERT2) Amc/Jマウスは、Jackson Laboratory Inc. から購入した (A. Kobayashi, et al., Cell Stem Cell. 3 (2008) 169-181.)。ADPKDモデルマウスであるPkd1-/- (d e l 2 - 6) マウスは、藤田医科大学より提供いただいた (S Muto, et al., Hum Mol Genet. 11 (2002) 1731-1742.)。すべてのマウスは、京都大学iPS細胞研究所の実験動物施設で、特定病原体フリー (SPF) 条件で飼育した。マウスには、餌及び水を自由給餌した。

[0065] 〈細胞培養〉

ヒトiPS細胞 (hiPSCs) を用いた実験は、京都大学医学部大学院医学研究科の倫理委員会の承認を受け、施設審査委員会に従い、iPSCs の提供者のインフォームドコンセントを得た。hiPSCは、Synthetic max (Corning) でコーティングした細胞培養プレート上に、System Fit AKO2N培地 (Takara) を用いたフィーダーフリー培養で維持した。細胞を0.5 mM EDTA/PBS (Thermo Fisher Scientific) を用いて5日毎に継代し、マイコプラ

ズマ汚染の有無を定期的に検査した。マウスネフロン前駆細胞（mNPC）の回収及び維持培養は、既報のように実施した（Z. Li, T. et al., Cell Stem Cell. 19 (2016) 1–14. ; Z. Li, et al., Kidney Organog Methods Protoc, Hummana Press, New York, 2019: pp. 151–159.）。

[0066] mNPCの培養には、表1に示すNPSR培地を用いた。h iPSC由来NPCの培養には、表2に示すhNPSR培地を用いた。

[0067] [表1]

NPSR培地			
試薬名	メーカー名	Cat. No.	最終濃度
Basal medium: DMEM/F12 (1:1) (1X), Invitrogen, Cat. No. 11330–32			
GlutaMAX-I (100X)	Invitrogen	35050–79	1X
MEM NEAA (100X)	Invitrogen	11140–050	1X
2-Mercaptoethanol (55mM)	Invitrogen	21985–023	0.1μM
Pen Strep (100X)	Invitrogen	15140–122	1X
B-27 Supplement (50X), minus vitamin A	Invitrogen	12587–010	1X
ITS Liquid Media Supplement (100X)	Sigma	13146–5ML	1X
BMP-7	R & D	354-BP-010	50ng/mL
FGF-2	Peptech	100–18B	200ng/mL
Heparin	Sigma	H3149–100KU	1μg/mL
Y-27632	Enzo	ALX-270–3333–M025	10μM
Mouse LIF	Millipore	ESG1107	1000 units/mL
CHIR99021	Reagents Direct	27–H76	1μM

[0068] [表2]

hNPSC培地				
Basal medium: DMEM/F12 (1:1) (1X), Invitrogen, Cat. No. 11330-32				
試薬名	メーカー名	Cat. No.		最終濃度
GlutaMAX-I (100X)	Invitrogen	35050-79		1X
MEM NEAA (100X)	Invitrogen	11140-050		1X
2-Mercaptoethanol (55mM)	Invitrogen	21985-023	0.1μM	
Pen Strep (100X)	Invitrogen	15140-122		1X
B-27 Supplement (50X), minus vitamin A	Invitrogen	12587-010		1X
ITS Liquid Media Supplement (100X)	Sigma	13146-5ML		1X
BMP-7	R & D	354-BP-010	50ng/mL	
FGF-2	Peprotech	100-18B	200ng/mL	
Heparin	Sigma	H3149-100KU	1μg/mL	
Y-27632	Enzo	ALX-270-333-M025	10μM	
Human LIF	Millipore	LIF1050	10ng/mL	
CHIR99021	Reagents Direct	27-H76	1μM	
LDN193189	Reagents Direct	36-F52	10nM	
A83-01	STEMGENT	04-0014	50nM	

[0069] <hiPSCsからのNPCの分化誘導>

NPCへの分化誘導は、R. Morizane, et al., Nat Biotechnol. 33 (2015) 1193-1200、又はTsujimoto et al., Cell Report. 31 (2020), 107476に記載の方法（以下、それぞれ「Morizaneの方法」及び「Tsujimotoの方法」という）で実施した。

[0070] <免疫染色>

腎臓オルガノイドを、4% PFA (Nacalai tesque) / PBS (-) を用いて4°Cで一晩固定した。固定したオルガノイドを、PBS (-) で2回洗浄し、30%スクロース (Nacalai tesque) / PBS (-) を用いて4°Cで一晩処理した後、OCT化合物 (Sakura Finetek) で凍結し、凍結切片を作製した。凍結切片を、2%ロバ血清 (Millipore) / 0.25% Triton X-100 (Nacalai tesque) / PBS (-) 溶液を用いて室温で30分間インキュベートした。一次抗体を、2%ロバ血清 / PBS (-) 溶液で希釈し、サンプルと4°Cで一晩インキュベートした。その後、二次抗体を用いて4°Cで2時間インキュベートした。使用した抗体又はレクチンを表3に示す。

[0071]

[表3]

ANTIGEN	SOURCE	IDENTIFIER
Brn1	Novus Biologicals	CAT. # NBP2-57011
Cdh1	BD	CAT. # 610181
Erk1/2	CST	CAT. #4695S
Phospho-Erk1/2	CST	CAT. #4270S
GFP	Nacalai tesque	CAT. # 04404-84
LTL	Vector laboratories	CAT. # B-1325
Six2	Proteintech	CAT. # 11562-1-AP
Podxl	R&D	CAT. # MAB1556
Smad1	CST	CAT. # 6944S
Phospho-Smad1/5	CST	CAT. # 9516S
Stat3	CST	CAT. # 4904
Stat3 (Ty 705 phosphorylated)	CST	CAT. # 9138
Stat3 (Ser 727 phosphorylated)	CST	CAT. # 9134
tTdTTomato	Clontech	CAT. # 632496
Wt1	Abcam	CAT. # Ab89901

[0072] 表3中の略語は、以下の意味を示す。

B r n 1 : B r a i n 1 ; C d h 1 : C a d h e r i n 1 ; L T L : L
o t u s t e t r a g o n o l o b u s l e c t i n ; E r k 1 / 2 :
E x t r a c e l l u l a r s i g n a l - r e g u l a t e d k i n
a s e 1 / 2 ; S i x 2 : S i n e O c u l i s h o m e o b o x
h o m o l o g 2 ; P o d x l : P o d o c a l y x i n 1 ; S m a d 1
: M o t h e r s a g a i n s t d e c a p e n t a p l e g i c h
o m o l o g 1 ; S t a t 3 : S i g n a l t r a n s d u c e r a n

d activator of transcription 3; Wt 1
: Williams tumor 1.

[0073] < BMP 7 代替物のスクリーニング >

スクリーニング用の細胞を調製するために、マウス N P C – 3 D 培養を確立し、 S i × 2 – G F P レポーター マウスから取得した m N P C を既報のように維持した (Z. Li, T. et al., Cell Stem Cell. 19 (2016) 1-14.; Z. L i, et al., Kidney Organog Methods Protoc, Hummana Press, New York, 2019: pp. 151-159.) 。 10 ~ 30 回継代した m N P C を、スクリーニング試験に用いた。低接着 U 底 384 ウエルプレート (S umitomo Bakelite) に、 2. 5 × 10³ c e l l s / w e l l で、 m N P C を解離して播種した。カスタム調製された低分子ライブラリーを、 1 ウエルあたり、ジメチルスルホキシド (D M S O) 中 1 mM のストックをアレイ形式でプレートに供給した。個々の化合物は、 M u l t i d r o p ディスペンサー (T hermo Fisher Scientific) を用いて希釈し、 1 μ M の最終濃度で Bi ome k NX (Beckman Coulter) を用いてアッセイプレートに移した。細胞播種から 72 時間後、細胞を P B S (–) で洗浄し、 A rr a y S can (Thermo Fisher Scientific) を用いて分析した。定量化パラメータとして、 m N P C の細胞塊の真円度、大きさ、及び平均 G F P シグナルを用いた。各アッセイプレートは、それぞれ、 BMP 7 有り又は無しの N P S R 培地を含むポジティブコントロール及びネガティブコントロールを含むように設計された。

[0074] < 細胞生存率アッセイ >

A T P の定量を用いた細胞生存率アッセイのために、低接着 U 底 384 ウエルプレート (S umitomo Bakelite) に、 2. 5 × 10³ c e l l s / w e l l で、 m N P C を解離して播種した。カスタムメイドの J AK 阻害剤ライブラリーを用いた。各化合物を希釈し、 0. 01 μ M 、 0. 03 μ M 、 0. 1 μ M 、 0. 3 μ M 、 1 μ M 又は 3 μ M の最終濃度で、 Bi ome k NX を使用してアッセイプレートに移した。細胞播種から 72 時

間後、細胞を洗浄し、ATP量をCellTiter-GloTM 2.0 Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて分析した。各アッセイプレートは、それぞれ、BMP7有り又は無しのDMSO添加NPSR培地を含むポジティブコントロール及びネガティブコントロールを含むように設計された。

[0075] <イメージング>

オルガノイドの蛍光画像又は明視野画像を、KEYENCE BZ-X700又は共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM710) で撮影した。画像解析は、Image J version 1.51j8 (National Institutes of Health) を用いて行った (C.A. Schneider, et al., Nat Methods. 9 (2012) 671-675.)。

[0076] <フローサイトメトリー及びセルソーティング>

NPCの分化のために、以前に作製したOSR1-GFP/SIX2-tdTOMATOダブルノックインhiPSC株 (T. Toyohara, et al., Stem Cells Transl Med. 4 (2015) 980-992.) を使用した。Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.) で解離した後、FACS Arial IIセルソーター (Becton Dickinson) を使用してSIX2-tdTOMATO発現について、細胞を分析した。4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; 0.1 ng/mL; Thermo Fisher Scientific) で染色された死細胞は、分析から除外した。データは、FACS Diva (BD) ソフトウェアプログラムを用いて解析した。

[0077] <RNAシーケンシング>

既報のRNA-seqデータ (GSE78772) を使用した (Z. Li, et al., Cell Stem Cell. 19 (2016) 1-14.)。BMP7有り又は無しで培養したNPCの細胞塊のmRNA-seqデータを比較した。転写物の定量は、GRCh38. p6 cDNA遺伝子アノテーション (Ensembl) で

Salmon (R. Patro, et al., Nat Methods. 14 (2017) 417-419.) を用いて行った。Salmonからの出力を R/Bioconductor package tximport を用いて処理し、遺伝子発現値を取得した。遺伝子発現量は、 $\log_2 (RPKM + 1)$ で示した。遺伝子発現量が異なる上位 500 の遺伝子について、Metascape (Y. Zhou, et al., Nat Commun. 10 (2019).) を用いて遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。Ingenuity Pathway Analysis (IPA; QIAGEN) を用いて、カットオフ値を $\pm 1.5 \log_2 fold change$ とした古典的経路解析を行い、BMP7 有り培養及び BMP7 無し培養で、それぞれ、2, 647 個及び 1, 293 個の上方制御遺伝子を解析した。

[0078] <タンパク質アッセイ>

mNPC の細胞塊を、氷上で、EDTA-free protease inhibitor cocktail set DMSO solution (Wako) 及び Phosphatase Inhibitor Cocktail Solution (Wako) を添加した RIPA buffer (WAKO) 中でピペッティングすることにより解離させ、遠心分離により細胞残渣を除去した。タンパク質濃度を、XL-Bradford assay (Pro Science) により分析し、Power scan (Bitek Instrument Inc.) を用いて測定した。

[0079] Stat3、Phospho-Stat3 (Tyr705)、Phospho-Stat3 (Ser727)、Erk1/2、Phospho-Erk1/2、Smad1 及び Phospho-Smad1/5 のタンパク質測定は、BMP7 を含む NPSR 培地、BMP7 を含まない NPSR 培地、及び 3 μM TCS21311 を含む NPSR 培地における mNPC の細胞塊の細胞溶解物を用いて行った。タンパク質発現は、キャピラリーウエスタンプロットアッセイ (J.Q. Chen, et al., Anal Biochem. 442 (2013) 97-103.

) (Wes Separation Module for 12–230 kDa, ProteinSimple)により定量した。タンパク質 (0.5 μg／サンプル) をキャピラリー内のサイズ分解マトリックスを介して分離し、内側のキャピラリー壁に固定化し、抗体希釈バッファー (ProteinSimple) 中で 1 : 50 の濃度で一次抗体 (表3参照) とインキュベートし、抗ウサギ又は抗マウス二次抗体とインキュベートした後、化学発光を使用して検出した。標的タンパク質の曲線下面積 (AUC) として反映されたシグナルは、ラン終了時に自動的に生成された。リン酸化タンパク質量は、対応する全標的タンパク質の AUC で標準化された各サンプルからの AUC の比率として定量された。Total Protein Detection Module (ProteinSimple) を使用して、総タンパク質アッセイを実施した。AUC 測定に先立ち、各標的タンパク質の線形回帰分析を用いて、試料濃度の直線的な動的範囲を確認した。

[0080] <RT-PCR 及びリアルタイム定量 RT-PCR (qRT-PCR)>

全 RNA は、製造者の推奨に従い、RNeasy kit (Qiagen) を用いて単離し、その後、RevertTra Ace (TOYOBO) の標準プロトコールを用いて cDNA 合成を行った。qPCR は、Step One Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 及び SYBR Green PCR Master Mix (Takara) を用いて行った。変性を 95 °C、30 秒で行い、次いで 95 °C で 5 秒、60 °C で 34 秒のサイクルを 40 サイクル行った。製造者の推奨に従い、閾値サイクル法を用いて遺伝子発現量のデータ解析を行い、その値をハウスキーピング遺伝子である β-Actin の発現量で標準化した。PCR 反応は、各サンプルについて 3 回行った。プライマー配列を表 4 に示す。

[0081]

[表4]

Gene	Forward	Reverse	配列番号	配列番号
<i>Actb</i>	GGGGTGTGAAAGGTCTCAA	1	AGATCTGGCACCAACCTTC	7
<i>Bmp7</i>	ACCCCTGATAACACCAATGG	2	GCTCCGGATGTAGTCCTT	8
<i>Cited1</i>	TCTTCCAAAACCCCCATCCTT	3	TTTGCATGGGCCTTCCTC	9
<i>Six2</i>	CTCTTCCCTGGACTGTG	4	ATCTCCGGCGAACATTCAAC	10
<i>Smad7</i>	GACAGGCTCAAATCGGAAACA	5	CAGTGTGGCGGACTTGATGA	11
<i>Socs3</i>	ATGGTACCCACAGCAAGTTT	6	TCCAGTAGAATCCGCTCTCT	12

[0082] 表4中の略語は、以下の意味を示す。

Actb : β -Actin ; Bmp7 : Bone morphogenic protein 7 ; Smad7 : Mothers against decapentaplegic homolog 7 ; Socs3 : Suppressor of cytokine signalling 3
。

[0083] <統計解析>

データは平均値±S E Mで表される。実験が2つの独立群で構成されている場合、平均値を比較するためにスチュードントのt検定を行った。多群比較には、One-way ANOVA及びBonferroni post hoc検定を用いた。

[0084] [結果]

< BMP7 代替化合物のスクリーニング>

NPSR培地におけるBMP7の役割を調べるために、まず、BMP7を添加しないNPSR培地でmNPCを培養した。BMP7を添加したNPSR培地で培養したmNPCの細胞塊と比較して、mNPCの細胞塊の生育は良好ではなかった(図1)。次に、Si_x2-GFP発現を測定することにより、BMP7の非存在下で細胞増殖を増加させる化合物を同定するためのスクリーニングを行った(図2)。試験した4,395個の化合物のうち、細胞塊の真円度及び大きさに基づいて、34個を1次ヒット化合物とした(データは示さず)。その後、細胞塊の増殖速度及びGFPシグナルに基づいて、各キャプチャ画像を解析した。最終的に、候補化合物として、選択的JAK3阻害剤であるCP690550を同定した(図3、丸で囲ったウェル)。

[0085] 次に、JAK3阻害がBMP7シグナル伝達を代替するかどうかを確認するため、0.013μM、0.033μM、0.13μM、0.33μM、1.3μM又は3μMの最終濃度で複数のJAK阻害剤でmNPCを処理し、ATP定量アッセイを用いて細胞生存率を解析した(図4)。JAK3阻害剤、JAK2/3阻害剤、JAK1/2阻害剤、又はJAK2阻害剤で処理した細胞は、DMSOで処理した細胞よりも高い生存率を示したが、JAK3阻害剤であるTCS21311の高濃度が、他のJAK阻害剤よりもはるかに強力な効果を示した(図4)。

[0086] 次に、3μMのTCS21311を含み、BMP7を含まない培地でmNPCの細胞塊を4日間維持し、この条件で、細胞塊が、糸球体と腎尿細管を含む腎臓オルガノイドに分化する可能性があることを確認した(図5~7)

。これらの結果は、mNPC維持培養において、TCS21311がBMP7の代替となることを示している。

[0087] < BMP7はNPC拡大培養でJAK3関連シグナルを下方制御する >

次に、NPC拡大培養におけるBMP7及びTCS21311のメカニズムの解明を試みた。まず、BMP7の非存在下での細胞応答を調べるために、既報のmNPCのRNA-seqデータセット (Z. Li, et al., Cell Stem Cell. 19 (2016) 1-14.) を入手し、BMP7を添加したNPSR培地又はBMP7を添加していないNPSR培地で4日間培養し、差次的発現遺伝子(DEG)解析を行った(図8)。DEGのGO解析により、BMP7を添加しないで培養したmNPCでは、BMP7を添加して培養したmNPCに比べて、炎症反応関連シグナルが上方制御されることが明らかになった。IPAを用いた標準経路解析により、Stat3又はJak3関連シグナルの予測された上方制御が確認された(図8)。キャピラリーウエスタンプロットアッセイでは、BMP7を添加しないで培養したNPCにおいてStat3のリン酸化(Ser727ではなく Tyr705)が増加したが、BMP7又はTCS21311を添加することでその効果が逆転した(図9、10)。マウス胚性幹細胞(ESC)では、Stat3シグナル伝達の標的遺伝子として、mothers decapentaplegic homolog 7 (Smad7) 及びsuppressor of cytokine signaling 3 (Socs3) が報告されている(Y. Yu, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 114 (2017) 10113-10118.)。qPCR解析により、BMP7を添加しないで培養した場合、Smad7とSocs3の上方制御が明らかになったが、これもBMP7又はTCS21311の添加によって逆転した(図11)。複数のJAK3阻害剤がBMP7非存在下でmNPCの生存率を向上させた結果(図4)と合わせて、これらのデータは、Bmp7が、NPSR条件下でmNPCにおけるJAK3-STAT3シグナル伝達を下方制御することを示唆している。

[0088] 一方、高濃度のTCS21311が他のJAK阻害剤よりもmNPCの生

存率にはるかに高い活性を及ぼすという知見（図4）は、TCS21311が、JAK3-STATA3シグナル伝達以外の他の標的分子又は標的経路を有していることを示唆している。BMP7を添加しないで細胞を培養した場合、Smad1/5およびErk1/2のリン酸化が減少したのに対し、TCS21311の添加によりSmad1/5のリン酸化のみが可逆的になつたことから、TCS21311の潜在的な下流標的がSmad1/5経路を含むことが示唆された（図12～15）。先行研究では、Stat3がSifx2の上流調節因子であることが示されたが（S. Tanigawa, et al., Stem Cell Reports. 5 (2015) 435-447）、TCS21311処理は、NPSR条件と比較して、NPCの未分化状態のマーカーであるSifx2又はCitied1（S. Tanigawa, et al., Cell Rep. (2016) 1-13.）の発現レベルを有意に変化させなかつたことから、TCS21311は、BMP7を含まないNPSR培地において、NPCの未分化状態を維持できることが示唆された（図16）。

[0089] < NPSR培地へのTCS21311の添加はmNPC増殖を促進する >

TCS21311の高濃度添加は、他のJAK阻害剤よりもはるかに高いmNPC生存率を発揮するという知見（図4）は、NPSR培地へのTCS21311の添加がmNPCの増殖に相加的な効果をもたらす可能性があるという仮説を導く。そこで、TCS21311を含むいくつかのJAK3阻害剤を、0.01 μM、0.03 μM、0.1 μM、0.3 μM、1、3 μM又は10 μMの最終濃度で、NPSR培地に添加して、mNPCを培養した（図17）。0.3 μMのTCS21311は、試験したJAK3阻害剤の中で最も高い細胞生存率をもたらした。0.3 μMのTCS21311を添加したNPSR培地で4日間培養した各mNPCの細胞塊の総細胞数は、NPSR培地のみで培養したmNPCの細胞塊よりも有意に高かった（図18）。

[0090] 次に、0.3 μMのTCS21311を添加したNPSR培地で拡大培養したmNPCが、2回の継代で12日間培養した後、腎臓オルガノイドに分

化する能力があるかを試験した。その結果、糸球体及び腎尿細管を含む腎臓オルガノイドへの分化を確認できた（図19）。これらの結果から、TCS21311は、維持培養において、mNPCに対する増殖効果を有することが示された。

[0091] <NPSR培地へのTCS21311の添加はhiPSC由来NPCの増殖を促進する>

TCS21311の細胞増殖効果が、ヒトNPCにも適用できるかどうかを調べるために、OSR1-GFP/SIX2-tdT TomatoノックインhiPSCs (T. Toyohara, et al., Stem Cells Transl Med. 4 (2015) 980-992.) から、NPCへの分化誘導を行った。NPCへの分化誘導は、Morizaneの方法、又はTsujimotoの方法に記載の方法で実施した。OSR1 (GFP) (+) SIX2 (tdT Tomato) (+) NPCをフローサイトメトリーによるソーティングにより精製し、in vitro拡大培養実験に用いた。次いで、hiPSC由来のOSR1 (+) SIX2 (+) NPCを、NPSR培地又は0.3 μMのTCS21311を添加したNPSR培地で維持した。その結果、Tsujimotoの方法で得られたhiPSC由来NPCに対するTCS21311の増殖効果を確認できた（図20）。さらに、hiPSC由来OSR1 (+) SIX2 (+) NPCを、TCS21311を添加したNPSR培地で10日間維持することに成功した。その結果、hiPSC由来NPCの数は約10倍に増加し（図21）、10日の培養後には90%以上の細胞がSIX2 (+) であった（図22、23）。以上のことから、これらの結果は、TCS21311が、mNPC及びhiPSC由来NPCの両方に増殖効果を発揮することを示している。図21及び22において、Experiment 1及びExperiment 2は、それぞれMorizaneの方法及びTsujimotoの方法で得られたhiPSC由来NPCを用いた結果を示す。

[0092] (実施例2)

[材料と方法]

<細胞増殖>

mNPSR培地で拡大培養したmNPC (Z. Li, et al., Cell Stem Cell . 19 (2016) 1-14. 6) の細胞塊を、1. 5 mLチューブに移し、上清を完全に取り除いた。Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.) 30 μLを添加し、37°C、CO₂ 5% のインキュベーターで10分静置した。10分後に、470 μLの10% FBSで希釈し、TC20 (Bio-Rad) で細胞数を測定した。

[0093] 低接着96ウェルプレート (Nunc) に、各ウェルあたり2. 0 × 10⁴ cellsのmNPCを播種した。50 μLのmNPSRに対して、JAK2阻害剤 (CEP33779, TG101348) を、IC50を中心に下記の濃度勾配を作製して添加した (CEP33779は、0. 5, 1, 2, 4, 8, 16 nM、TG101348は、0. 75, 1. 5, 3, 6, 12 nM) 。mNPSR培地単独とmNPSR培地にJAK2阻害剤を添加した培地で懸濁した細胞を播種した96ウェルプレートを300 gで3分間遠心して、37°C、CO₂ 5%のインキュベーターで静置培養した。静置培養開始6時間後には細胞塊が形成された。

[0094] 静置培養開始48時間後に、細胞を播種した際と同じ濃度のJAK2阻害剤が添加されたmNPSR培地を100 μLずつそれぞれのウェルに追加添加した。培地を追加添加してから48時間後に、各ウェルの細胞塊を1. 5 mLチューブに移し、上清を完全に取り除き、Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.) 30 μLを添加し、37°C、CO₂ 5%のインキュベーターで10分静置した。10分後に、470 μLの10% FBSで懸濁し、TC20 (Bio-Rad) で細胞数を測定した。

[0095] 実験に使用したmNPSR培地の組成を表3に示す。mNPSR培地は、表3に示すBasal mediumに、表5に示す試薬を添加して作製した。

[0096]

[表5]

mNPSR培地				
Basal medium: DMEM/F12 (1:1) (1X), Invitrogen, Cat. No. 11330-32				
試薬名	メーカー名	Cat. No.		最終濃度
GlutaMAX-I (100X)	Invitrogen	35050-79	1X	
MEM NEAA (100X)	Invitrogen	11140-050	1X	
2-Mercaptoethanol (55mM)	Invitrogen	21985-023	0.1μM	
Pen Strep (100X)	Invitrogen	15140-122	1X	
B-27 Supplement (50X), minus vitamin A	Invitrogen	12587-010	1X	
ITS Liquid Media Supplement (100X)	Sigma	13146-5ML	1X	
BMP-7	R & D	354-BP-010	50ng/mL	
FGF-2	Peprotech	100-18B	300ng/mL	
Heparin	Sigma	H3149-100KU	1μg/mL	
Y-27632	Enzo	ALX-270-333-M025	10μM	
Mouse LIF	Millipore	ESG1107	1000 units./mL	
CHIR99021	Reagents Direct	27-H76	1μM	
LDN193189	Reagents Direct	36-F52	10nM	
A83-01	STEMGENT	04-0014	50nM	

[0097] <継代培養>

mNPSR培地にCEP33779（終濃度2nM）、TGF101348（終濃度3nM）、又はDMSOを添加した培地で培養したmNPCの細胞塊を1.5mLチューブに移し、上清を完全に取り除いた。Accumax（Innovative Cell Technologies, Inc

.) 30 μLを添加し、37°C、CO₂ 5%のインキュベーターで10分間静置した。10分後に、470 μLの10% FBSで懸濁し、TC20 (Bio-Rad) で細胞数を測定した。低接着96ウェルプレート (Nunc) に、各ウェルあたり2.0 × 10⁴ cellsのmNPCを、mNPSR培地にCEP33779 (終濃度2 nM)、TG101348 (終濃度3 nM)、又はDMSOを添加した培地で懸濁して播種した。細胞を播種した低接着96ウェルプレートを300gで3分間遠心して、37°C、CO₂ 5%のインキュベーターで静置培養した。静置培養開始から48時間後に、細胞を播種した際と同じ濃度のJAK2阻害剤又はDMSOが添加されたmNPSR培地を100 μLずつそれぞれのウェルに追加添加した。培地を追加添加してから48時間後に、上記と同様の操作を行い、細胞数の測定と継代を行った。

[0098] <腎オルガノイドの作製>

mNPSR培地にCEP33779 (終濃度2 nM) 又はTG101348 (終濃度3 nM) を添加した培地で、継代培養したmNPCの細胞塊を、Transwell (Corning) にのせ、周囲の培地を除去した。次に、あらかじめ、200ng/mLのFGF2及び5 μMのCHIR99021を添加した5%KSR (Knock-out serum replacement) (Thermo Fisher Scientific) で満たした培養皿に、細胞塊がのったTranswellをセットした。48時間後に、成長因子及び低分子化合物の添加されていない5%KSRに培地交換した。以後、48時間毎に、成長因子及び低分子化合物の添加されていない5%KSRで培地交換し、分化培養開始10日目に、Transwellのまま4%PFAを用いて4°Cで3時間固定した。固定後、PBSに置換し、4°Cで一晩静置し、免疫染色を行った。

[0099] [結果]

<JAK2阻害剤のmNPC増殖促進効果>

JAK2阻害剤として、CEP33779及びTG101348を用いて

、mNPCの細胞増殖アッセイを行った。図24は、mNPSR培地にCEP33779を添加した培地における細胞増殖アッセイの結果を示す。文献情報から、CEP33778のIC50は、2nM付近と予測される。CEP33779は、IC50付近の濃度で有意な細胞増殖促進効果が確認された。図25は、mNPSR培地にTG101348を添加した培地における細胞増殖アッセイの結果を示す。文献情報から、TG101348のIC50は、3～6nM付近と予測される。TG101348は、IC50付近の濃度で有意な細胞増殖促進効果が確認された。なお、TG101348では、2つの濃度で増殖促進効果が確認された。3nMにおける増殖促進は、JAK2阻害のIC50付近の濃度であり、JAK2阻害による増殖促進と考えられた。

[0100] <mNPCの継代培養におけるJAK2阻害剤の増殖促進効果>

JAK2阻害剤として、CEP33779及びTG101348を用いて、mNPCの継代培養を行い、継代毎に細胞数を測定した。

[0101] 図26は、mNPSR培地に2nMのCEP33779を添加した培地で継代培養したときの細胞数の変化を示す。mNPSR培地に2nMのCEP33779を添加した培地で継代培養したmNPCは、mNPSR培地にDMSOを添加した培地で継代培養したmNPCと比較して、細胞増殖が促進された。また、mNPSR培地に2nMのCEP33779を添加した培地で継代培養することにより、mNPSR培地にDMSOを添加した培地で継代培養したときと比較して、累積細胞数が増加した（図27）。P1（継代数1）における累積細胞数は、P0（継代数0）で増殖させた細胞数をa、P0の培養液の容量をb、継代に用いたP0の培養液の容量をc、P1で増殖させて得た細胞数をdとした場合、P1の累積細胞数= $a \times [d / (a \times c / b)] \times b / c$ で算出することができる、以降の継代培養における累積細胞数も同様に算出される。

[0102] 図28は、mNPSR培地に3nMのTG101348を添加した培地で継代培養したときの細胞数の変化を示す。mNPSR培地に3nMのTG1

O 1 3 4 8 を添加した培地で継代培養したm N P Cは、m N P S R 培地にD M S Oを添加した培地で継代培養したm N P Cと比較して、細胞増殖が促進された。また、m N P S R 培地に3 n MのT G 1 0 1 3 4 8 を添加した培地で継代培養することにより、m N P S R 培地にD M S Oを添加した培地で継代培養したときと比較して、累積細胞数が増加した（図29）。

[0103] <J A K 2 阻害剤が腎オルガノイド形成に及ぼす影響>

m N P S R 培地に2 n MのC E P 3 3 7 7 9 又は3 n MのT G 1 0 1 3 4 8 を添加した培地で、4 継代したm N P Cから、腎オルガノイドを分化誘導した。その結果、いずれのJ A K 2 阻害剤も腎オルガノイドの形成に影響しないことが確認された（図30）。

[0104] <A D P K D モデルマウス由来m N P C を用いた増殖アッセイ>

m N P Cとして、A D P K D（常染色体優性多発性囊胞腎）モデルマウスの胎仔腎から抽出したm N P Cを用いたこと以外は、上記と同様に細胞増殖アッセイを行った。J A K 2 阻害剤としては、3 n MのT G 1 0 1 3 4 8 を用いた。A D P K D モデルマウス由来m N P Cでも、T G 1 0 1 3 4 8 の添加により増殖が促進されることが確認された（図31）。

産業上の利用可能性

[0105] 本発明によれば、B M P 7 を用いることなく、ネフロン前駆細胞を拡大培養することが可能なネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地、前記培地を用いたN P Cの拡大培養方法、及び前記拡大培養方法で得られたネフロン前駆細胞から腎臓オルガノイドを製造する方法が提供される。本発明の方法で得られたネフロン前駆細胞及び腎臓オルガノイドは、腎疾患の治療又は予防に適用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地であって、
F G F 2、ヘパリン、R O C K 阻害剤、G S K 3 β 阻害剤、白血球
阻害因子（L I F）、A L K 阻害剤、B M P 阻害剤、及びJ A K 阻害
剤を含む、
培地。
- [請求項2] 前記J A K 阻害剤は、J A K 1 阻害剤、J A K 2 阻害剤、及びJ A
K 3 阻害剤からなる群より選択される少なくとも1種である、
請求項1に記載の培地。
- [請求項3] 前記J A K 3 阻害剤は、T C S 2 1 3 1 1、W H I - P 1 5 4、P
F - 0 6 6 5 1 6 0 0、F M - 3 8 1、C P 6 9 0 5 5 0、及び7 H
- ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボン酸、4-[3-[
(2-メチル-1-オキソ-2-プロペニル)-イル]アミノ]フェ
ニル]-, エチルエステルからなる群より選択される少なくとも1種
である、
請求項2に記載の培地。
- [請求項4] 前記J A K 2 阻害剤は、C E P 3 3 7 7 9、及びT G 1 0 1 3 4 8
からなる群より選択される少なくとも1種である、
請求項2に記載の培地。
- [請求項5] 前記R O C K 阻害剤は、Y - 2 7 6 3 2である、請求項1～4のい
ずれか1項に記載の培地。
- [請求項6] 前記G S K 3 β 阻害剤は、C H I R 9 9 0 2 1である、請求項1～
5のいずれか1項に記載の培地。
- [請求項7] 前記A L K 阻害剤は、A 8 3 - 0 1である、請求項1～6のい
ずれか1項に記載の培地。
- [請求項8] 前記B M P 阻害剤は、L D N 1 9 3 1 8 9、D o r s o m o r p h
i n、N o g g i n、及びD M H 1からなる群より選択される少なく
とも1種である、

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の培地。

[請求項9] B M P 7 をさらに含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の培地

。

[請求項10] ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地であって、
F G F 2 、ヘパリン、R O C K 阻害剤、G S K 3 β 阻害剤、白血球
阻害因子 (L I F) 、A L K 阻害剤、B M P 阻害剤、及びT C S 2 1
3 1 1 を含む、
培地。

[請求項11] B M P 7 をさらに含む、請求項 10 に記載の培地。

[請求項12] J A K 阻害剤を含む、ネフロン前駆細胞を拡大培養するための培地

。

[請求項13] 前記 J A K 阻害剤は、J A K 1 阻害剤、J A K 2 阻害剤、及びJ A
K 3 阻害剤からなる群より選択される少なくとも 1 種である、
請求項 1 2 に記載の培地。

[請求項14] 前記 J A K 3 阻害剤は、T C S 2 1 3 1 1 、W H I - P 1 5 4 、P
F - 0 6 6 5 1 6 0 0 、F M - 3 8 1 、C P 6 9 0 5 5 0 、及び7 H
- ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-5-カルボン酸、4-[3-[
(2-メチル-1-オキソ-2-プロペニ-1-イル) アミノ] フエ
ニル] - , エチルエステルからなる群より選択される少なくとも 1 種
である、

請求項 1 3 に記載の培地。

[請求項15] 前記 J A K 2 阻害剤は、C E P 3 3 7 7 9 、及びT G 1 0 1 3 4 8
からなる群より選択される少なくとも 1 種である、

請求項 1 3 に記載の培地。

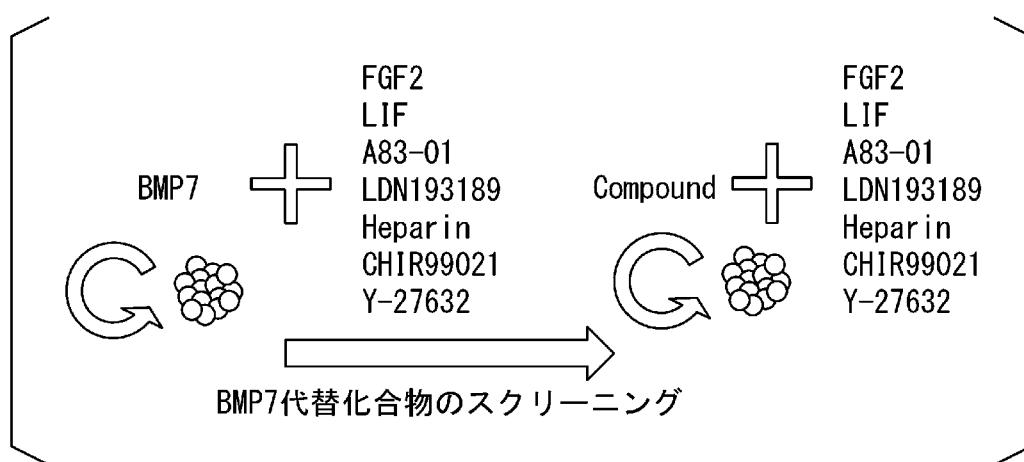
[請求項16] F G F 2 、ヘパリン、R O C K 阻害剤、G S K 3 β 阻害剤、白血球
阻害因子 (L I F) 、A L K 阻害剤、及びB M P 阻害剤からなる群よ
り選択される、少なくとも 1 種をさらに含む、請求項 1 2 ～ 1 5 のい
ずれか 1 項に記載の培地。

- [請求項17] BMP 7をさらに含む、請求項12～16のいずれか1項に記載の培地。
- [請求項18] 請求項1～17のいずれか1項に記載の培地を用いて、ネフロン前駆細胞を拡大培養する方法。
- [請求項19] 請求項18に記載のネフロン前駆細胞を拡大培養する方法により、
ネフロン前駆培養を拡大培養する工程と、
前記拡大培養したネフロン前駆細胞を腎臓オルガノイドに分化させ
る工程と、
を含む、腎臓オルガノイドの製造方法。

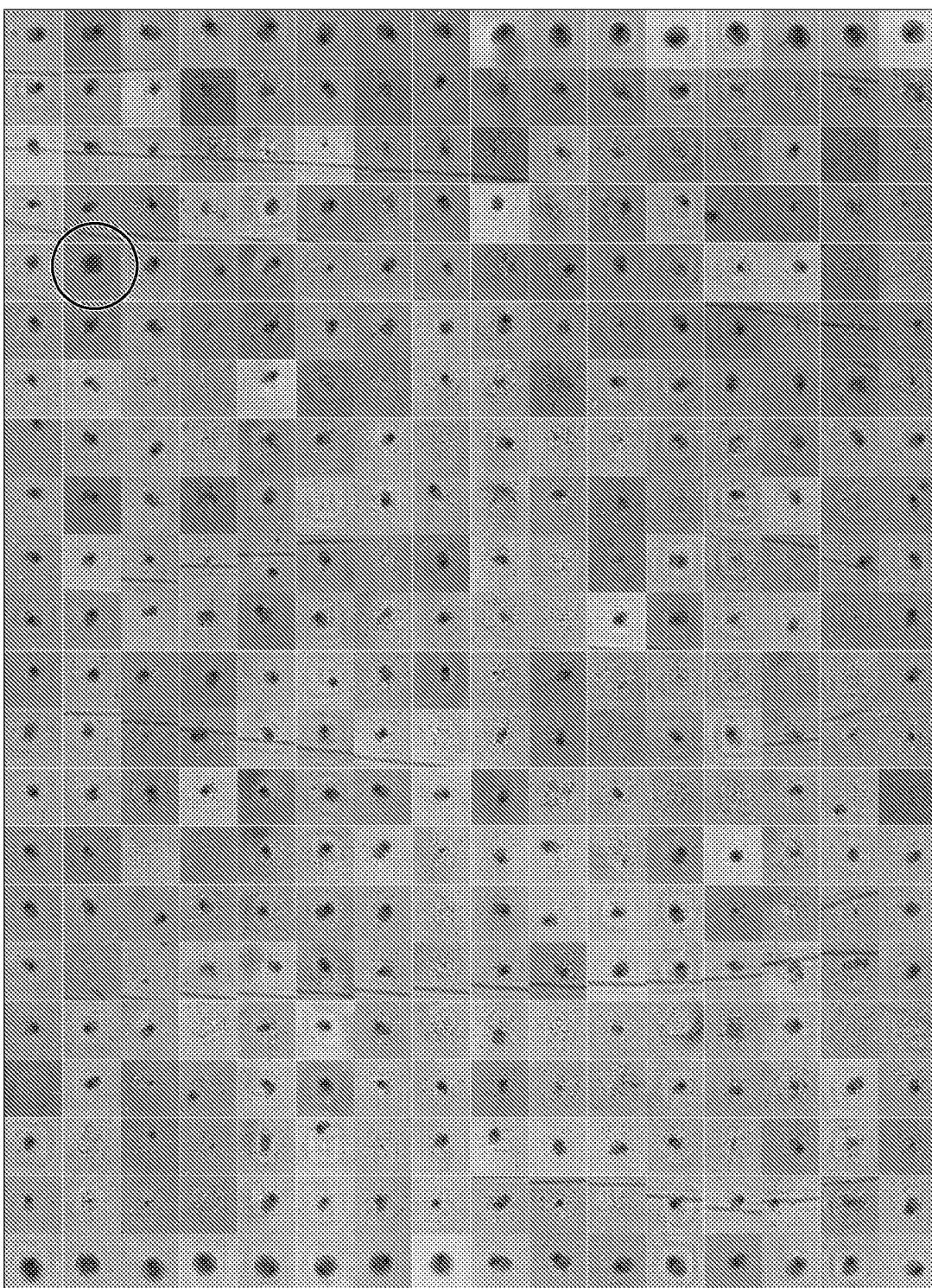
[図1]

	+BMP7	-BMP7
BF		
Six2-GFP		

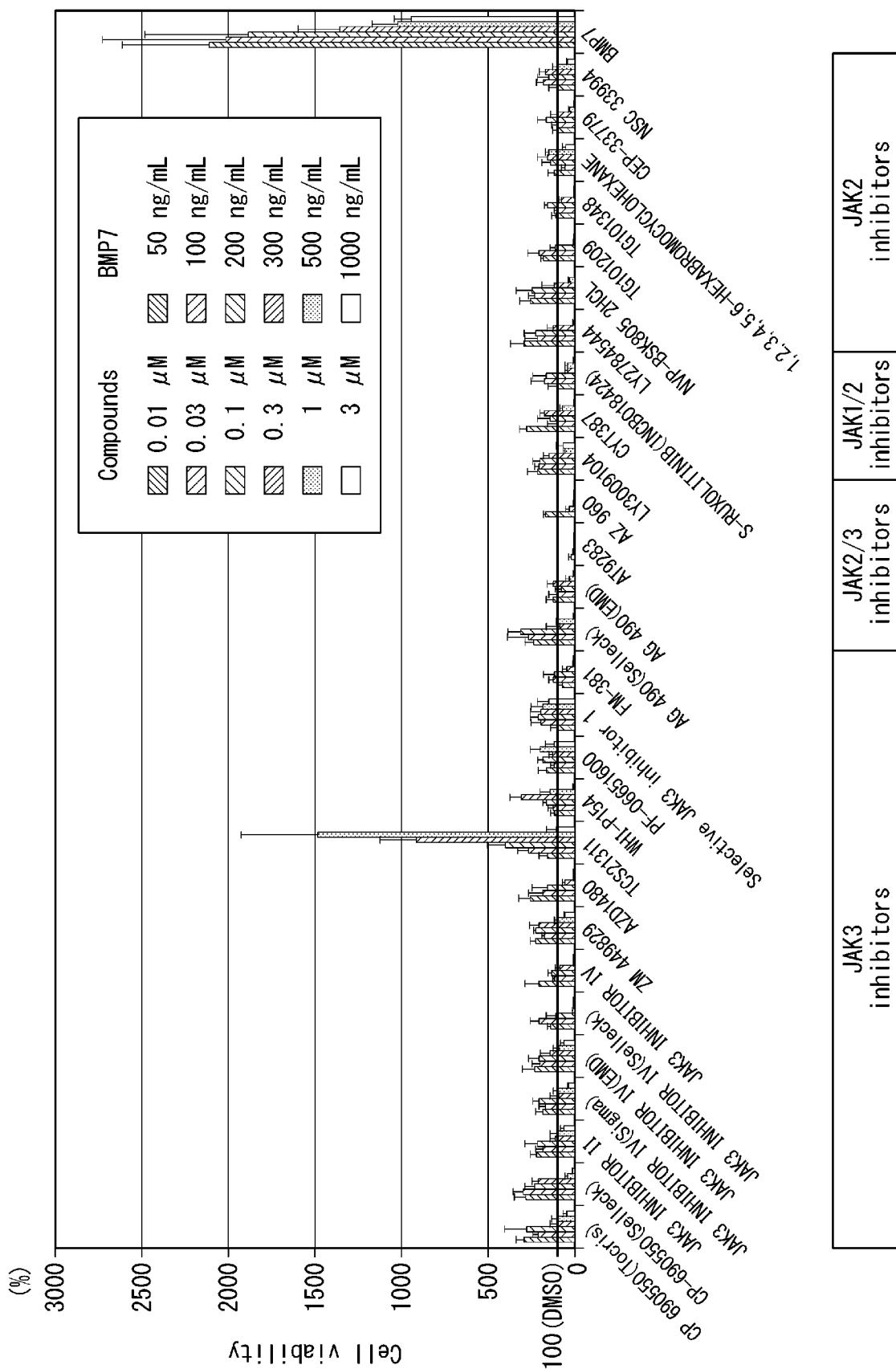
[図2]



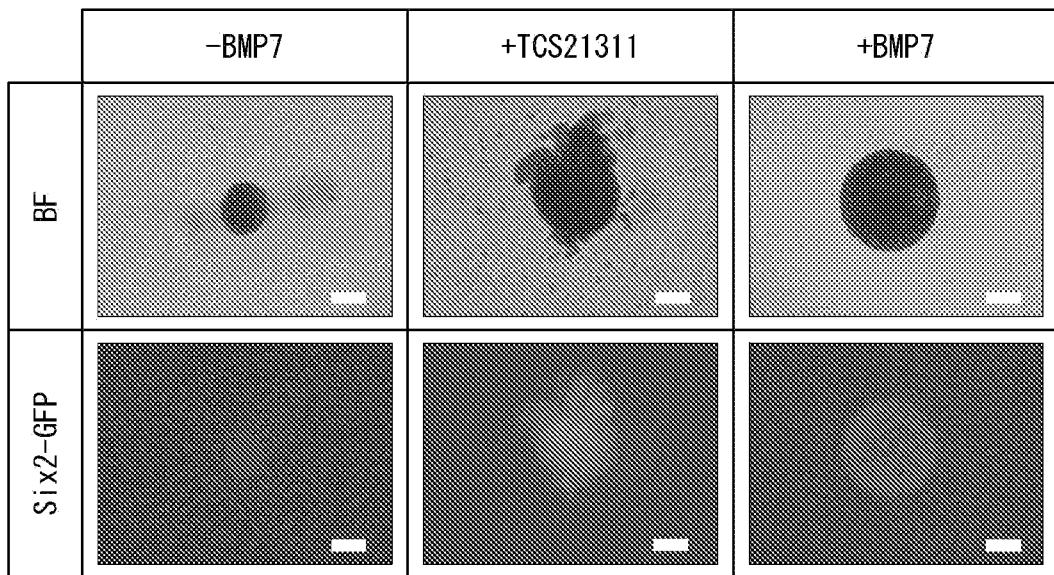
[図3]



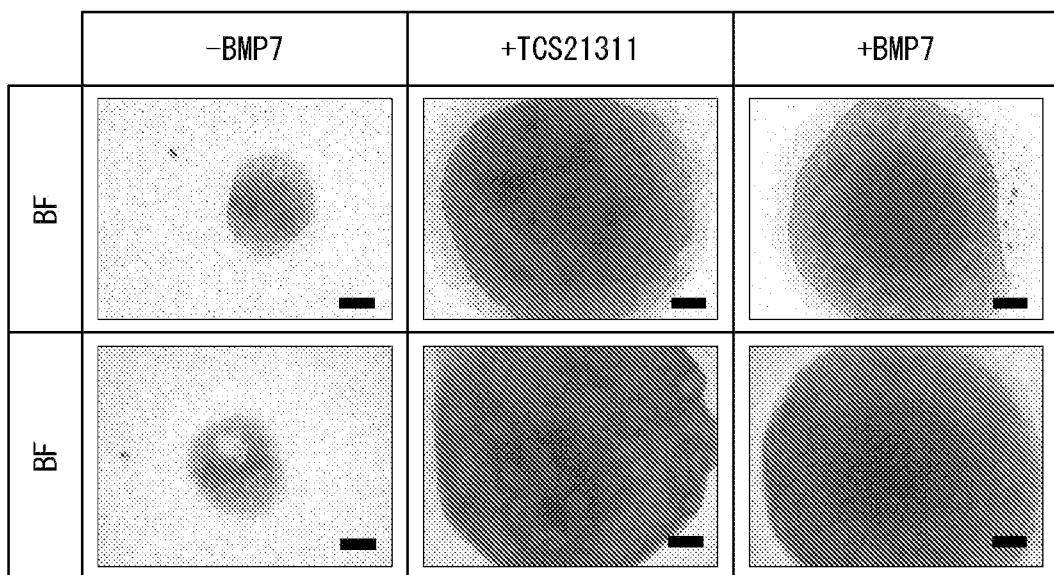
[図4]



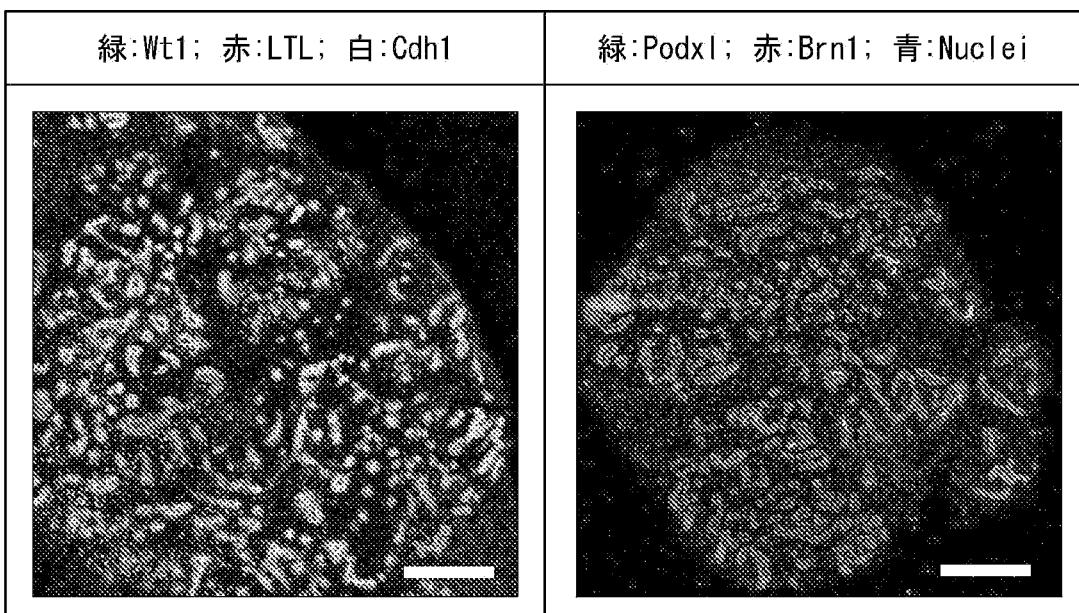
[図5]



[図6]



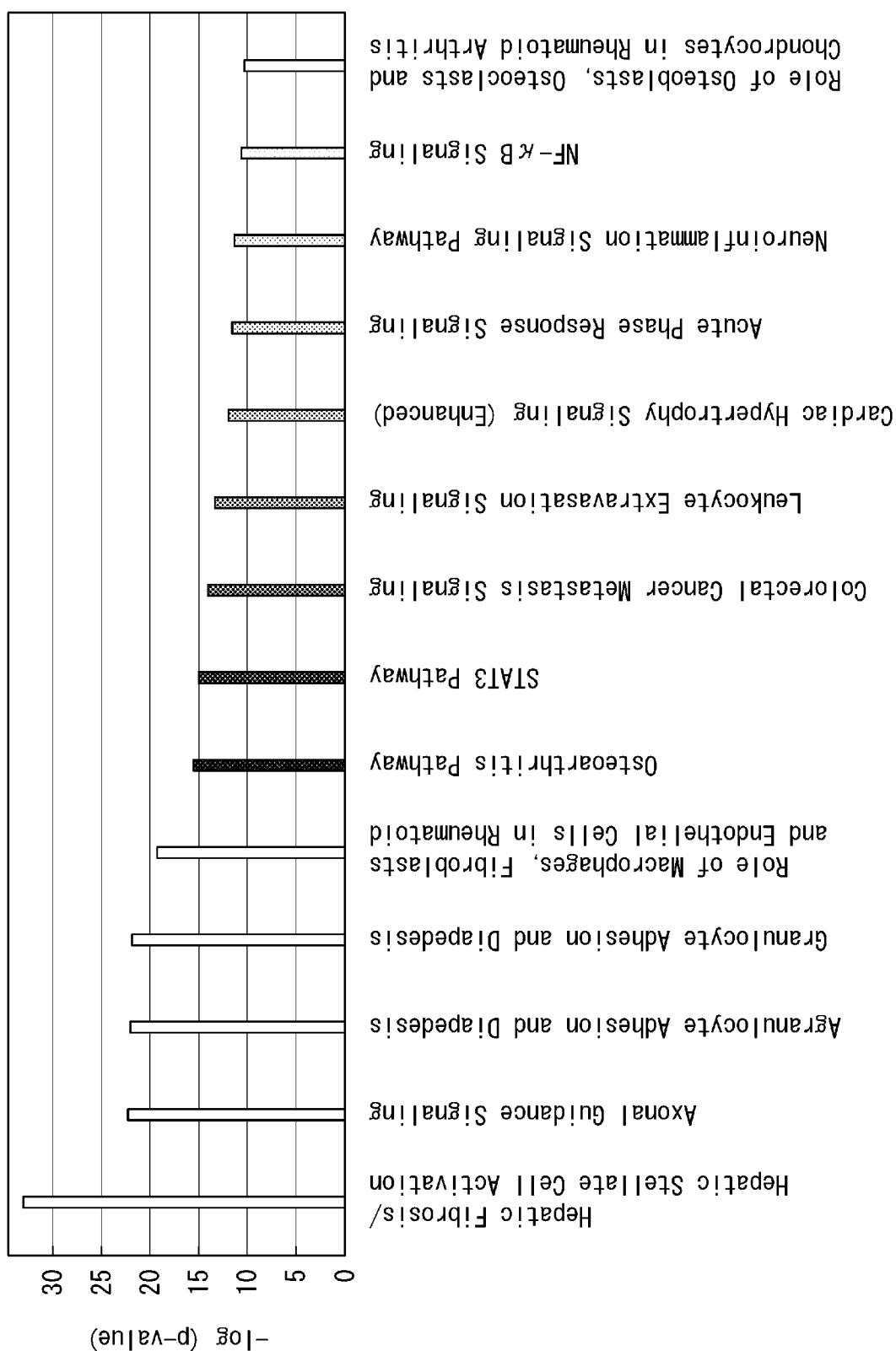
[図7]



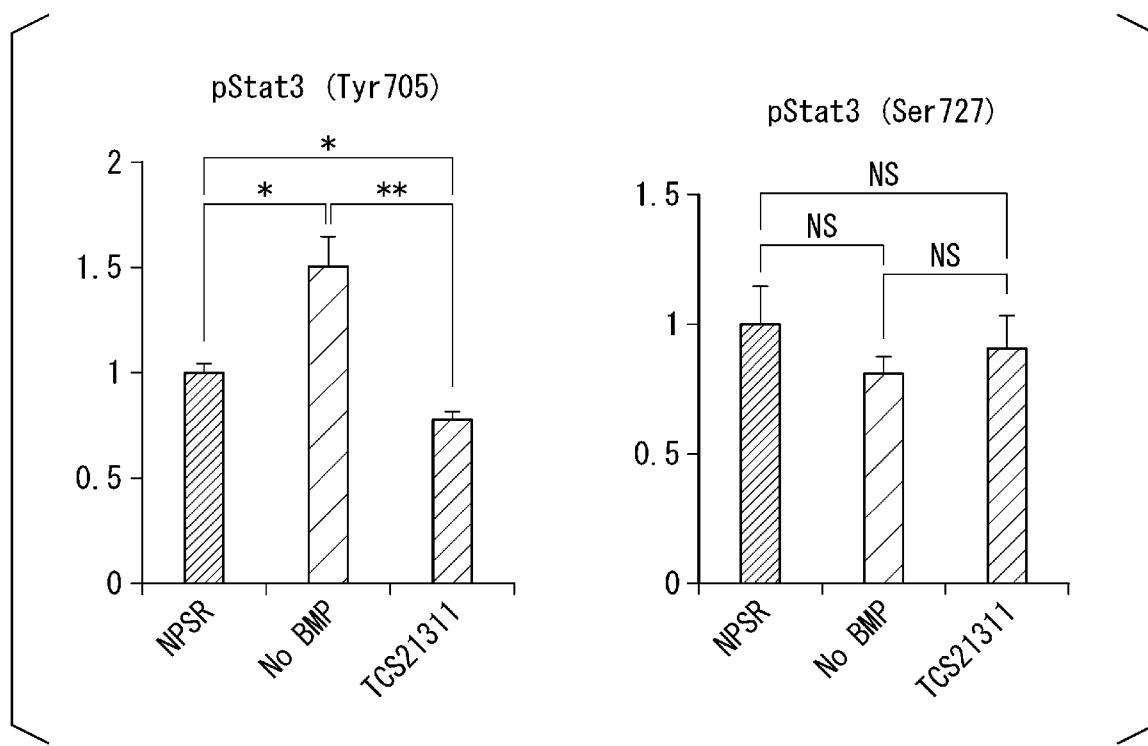
[§8]

GO	Category	Description	Log10(P)
GO:0006954	GO Biological Processes	inflammatory response	-15.56
R-MMU-114608	Reactome Gene Sets	Platelet degranulation	-12.11
R-MMU-1474244	Reactome Gene Sets	Extracellular matrix organization	-12.1
GO:2000147	GO Biological Processes	positive regulation of cell motility	-11.88
GO:0030155	GO Biological Processes	regulation of cell adhesion	-11.11
GO:0060326	GO Biological Processes	cell chemotaxis	-11.06
GO:0043062	GO Biological Processes	extracellular structure organization	-10.58
GO:0001568	GO Biological Processes	blood vessel development	-9.93
GO:0097435	GO Biological Processes	supramolecular fiber organization	-9.42
GO:0009611	GO Biological Processes	response to wounding	-9.37
GO:0001816	GO Biological Processes	cytokine production	-8.75
GO:0014812	GO Biological Processes	muscle cell migration	-8.55
R-MMU-381426	Reactome Gene Sets	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins	-8.03
GO:0043410	GO Biological Processes	positive regulation of MAPK cascade	-7.75
mmu04668	KEGG Pathway	TNF signaling pathway	-7.53
GO:0010035	GO Biological Processes	response to inorganic substance	-7.09
GO:1901699	GO Biological Processes	cellular response to nitrogen compound	-6.98
GO:1904645	GO Biological Processes	response to amyloid-beta	-6.74
GO:0010942	GO Biological Processes	positive regulation of cell death	-6.57
R-MMU-216083	Reactome Gene Sets	Integrin cell surface interactions	-6.54

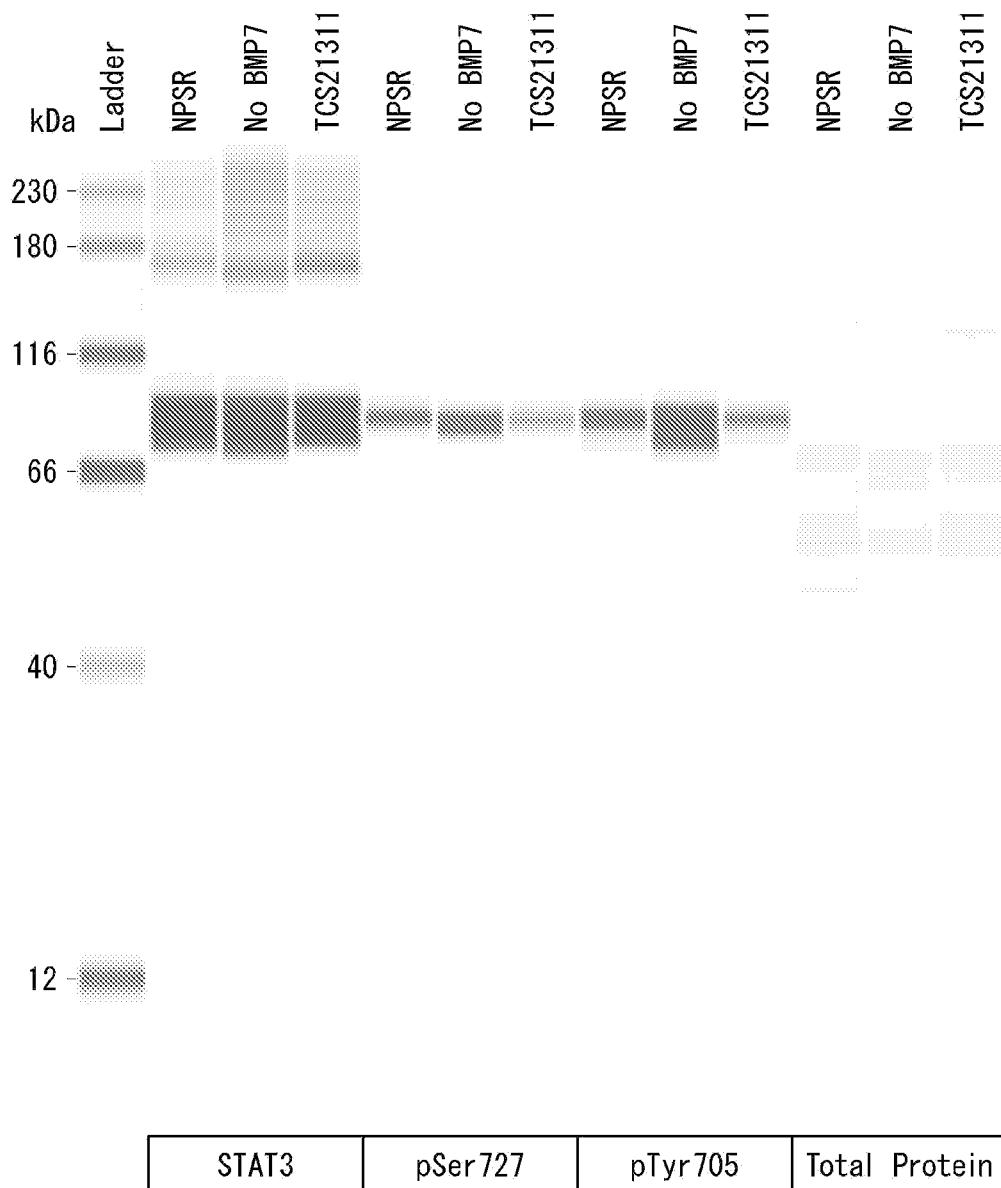
[図6]



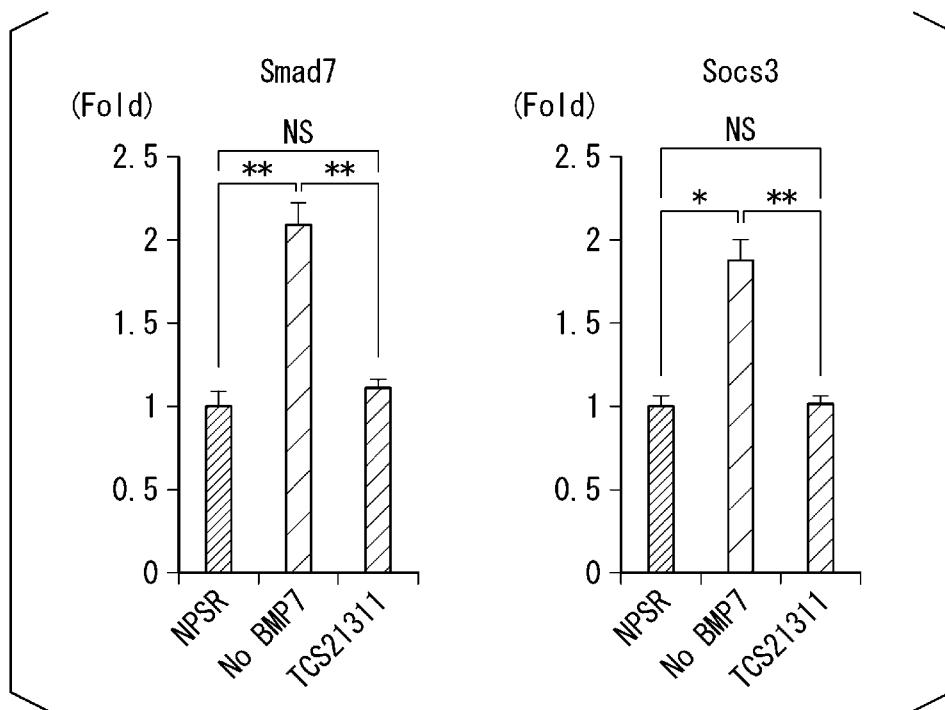
[図10]



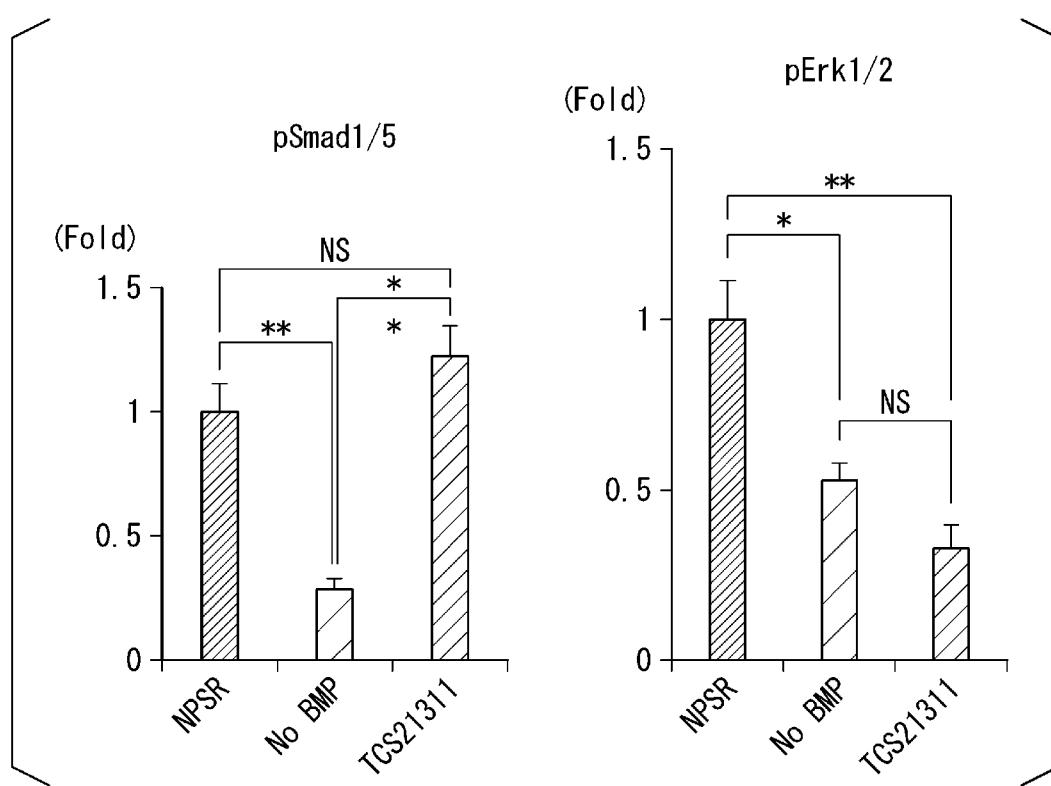
[図11]



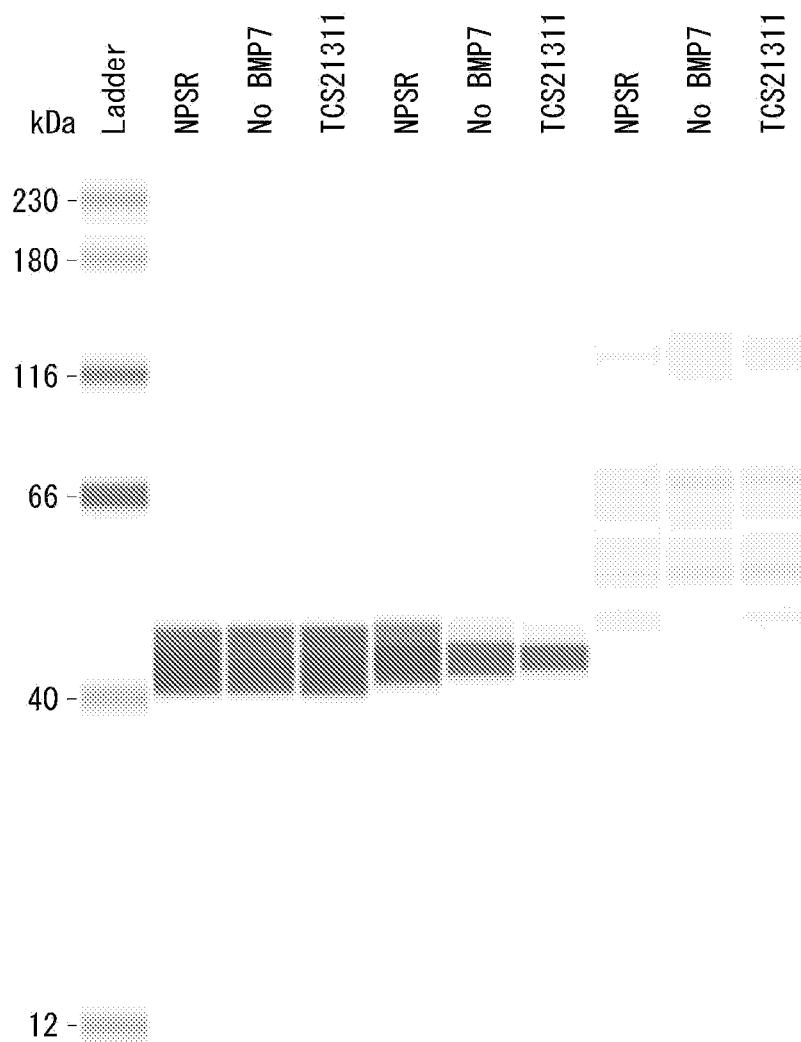
[図12]



[図13]

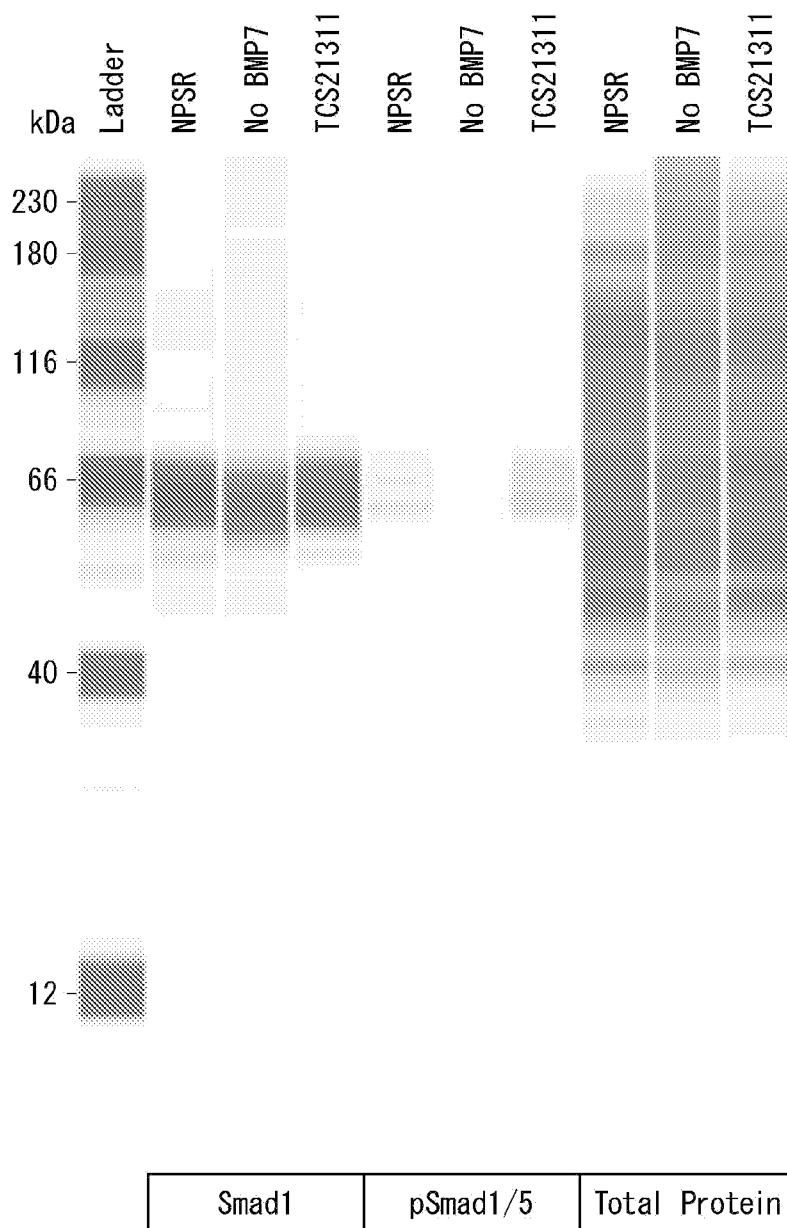


[図14]

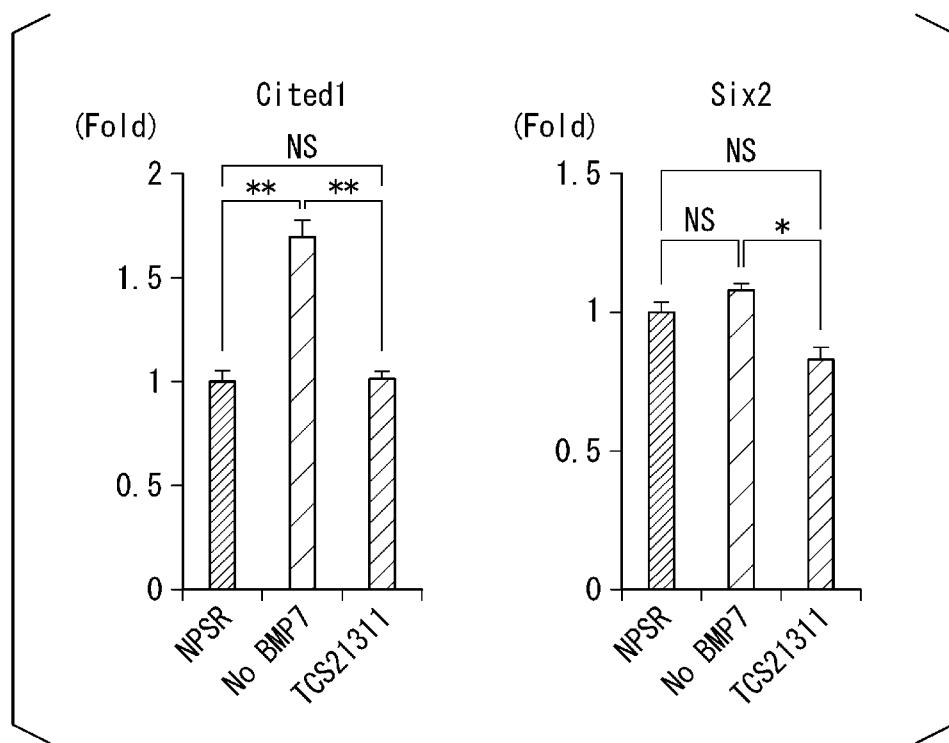


Erk1/2	pERK1/2	Total Protein
--------	---------	---------------

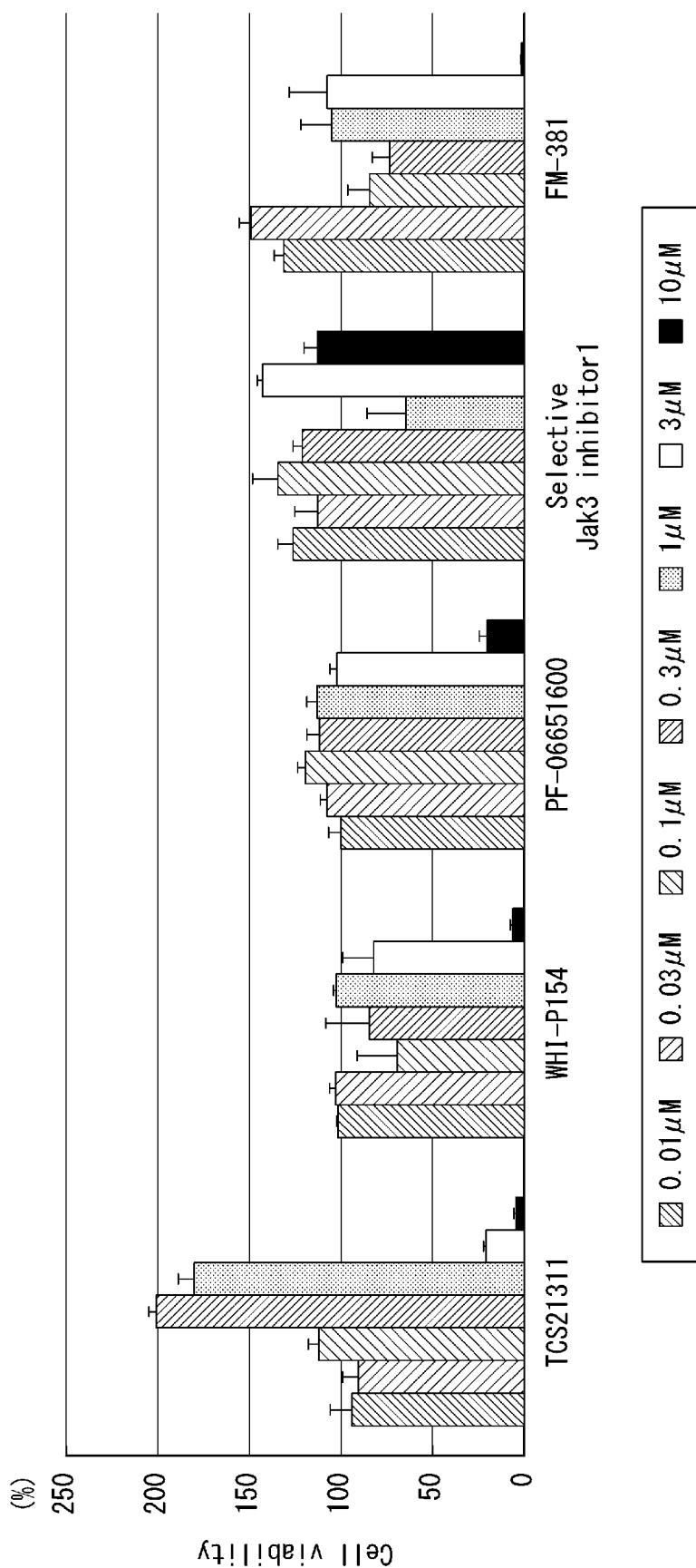
[図15]



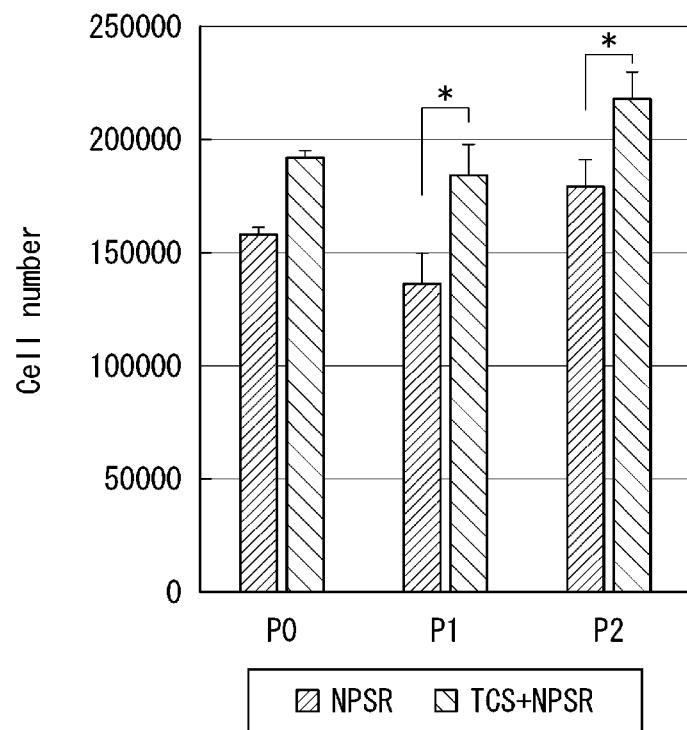
[図16]



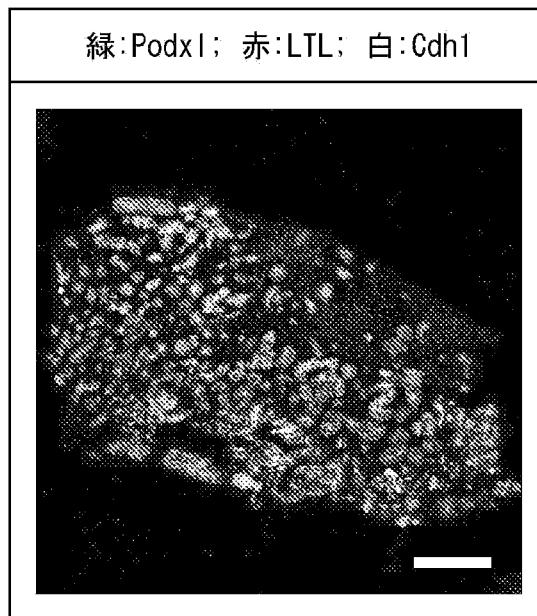
[図17]



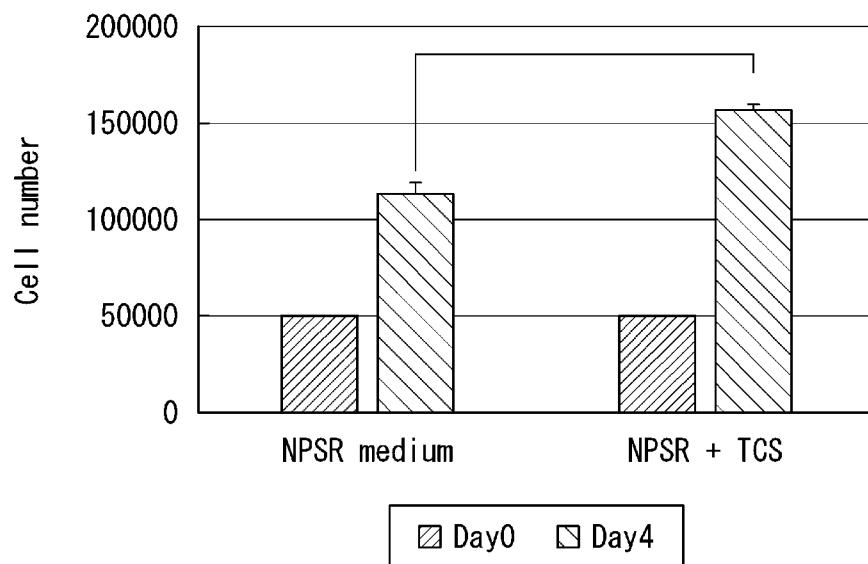
[図18]



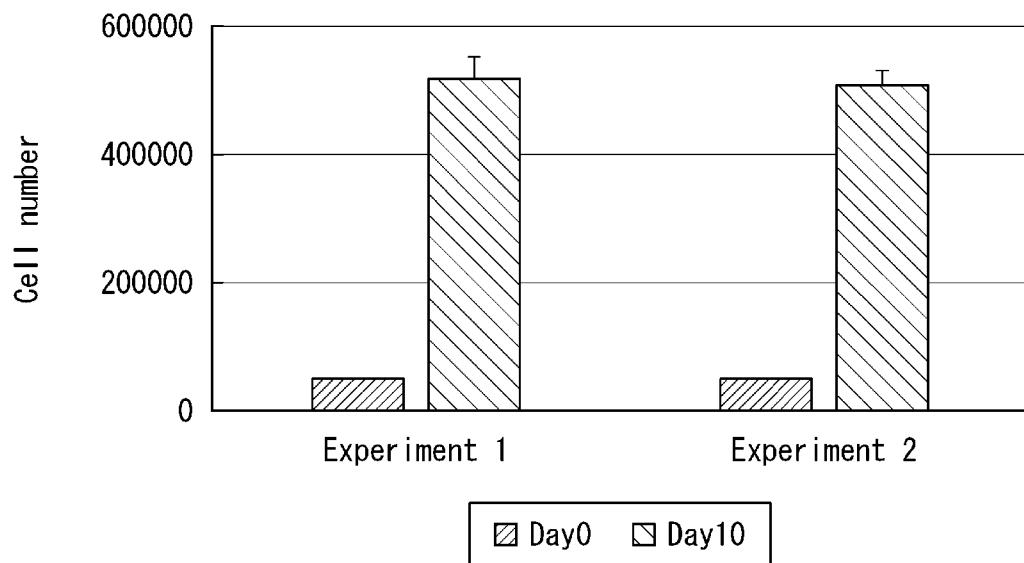
[図19]



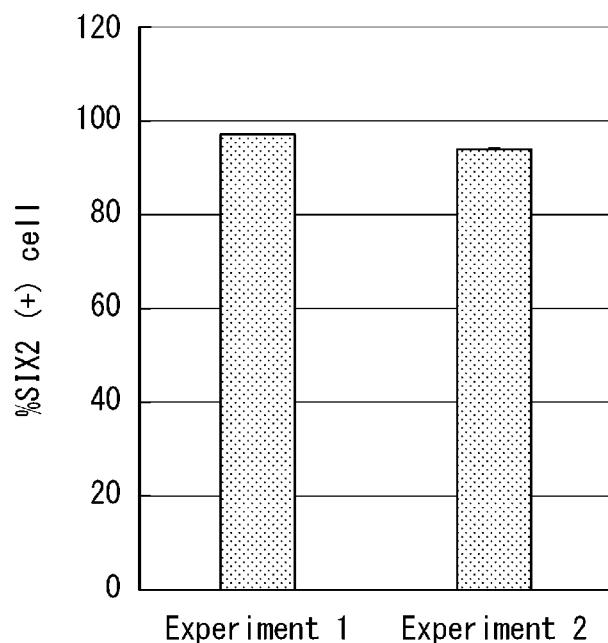
[図20]



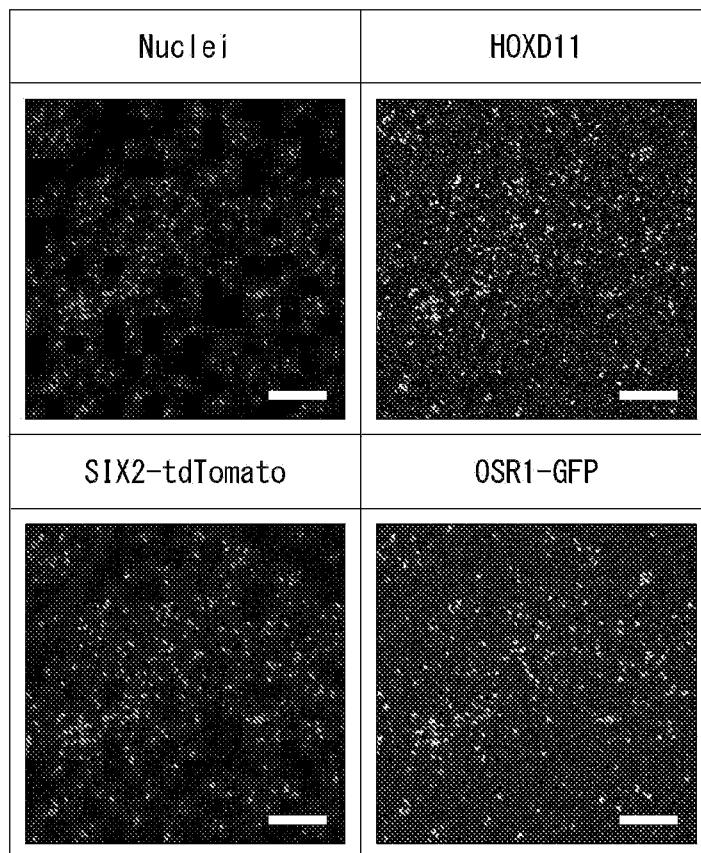
[図21]



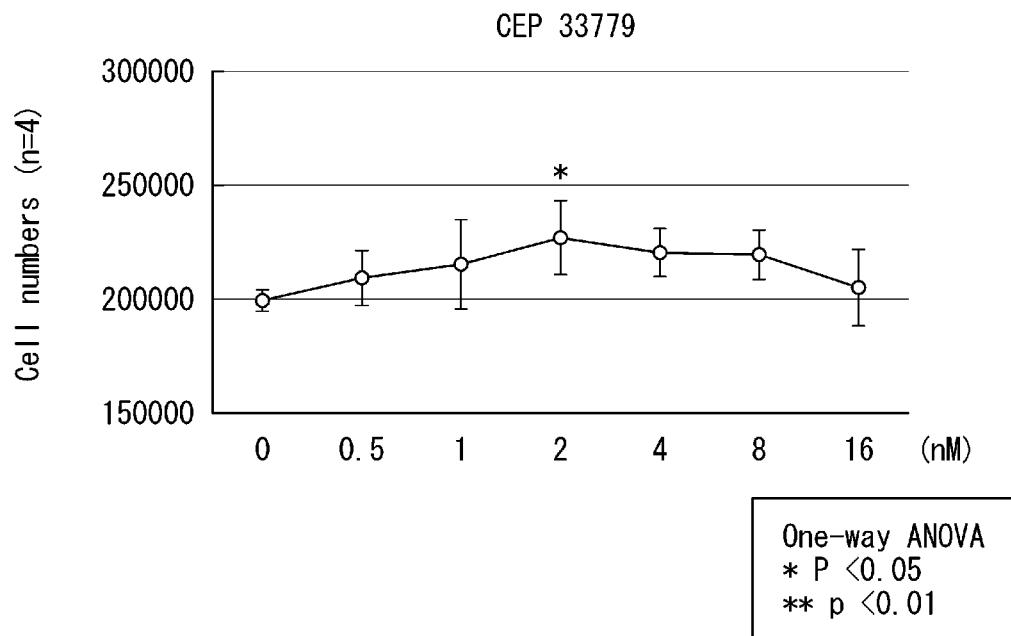
[図22]



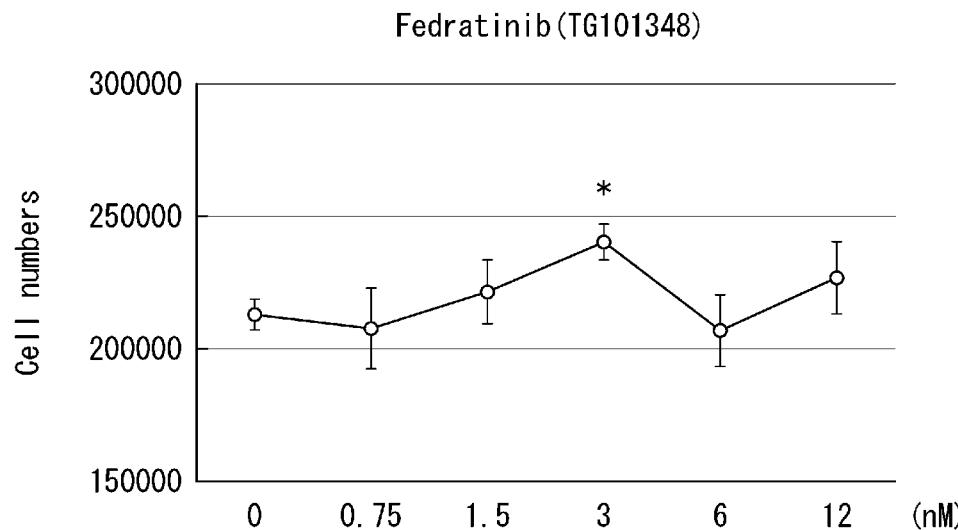
[図23]



[図24]

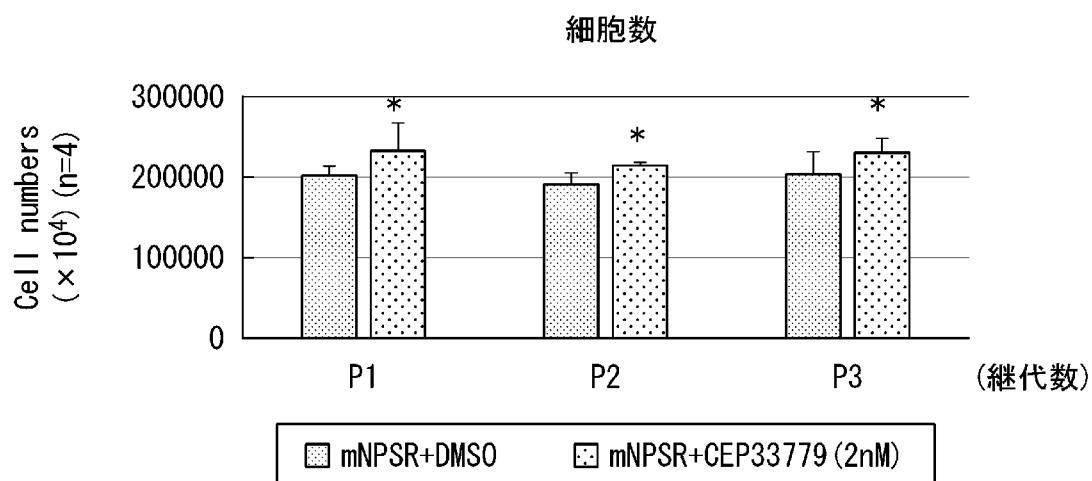


[図25]



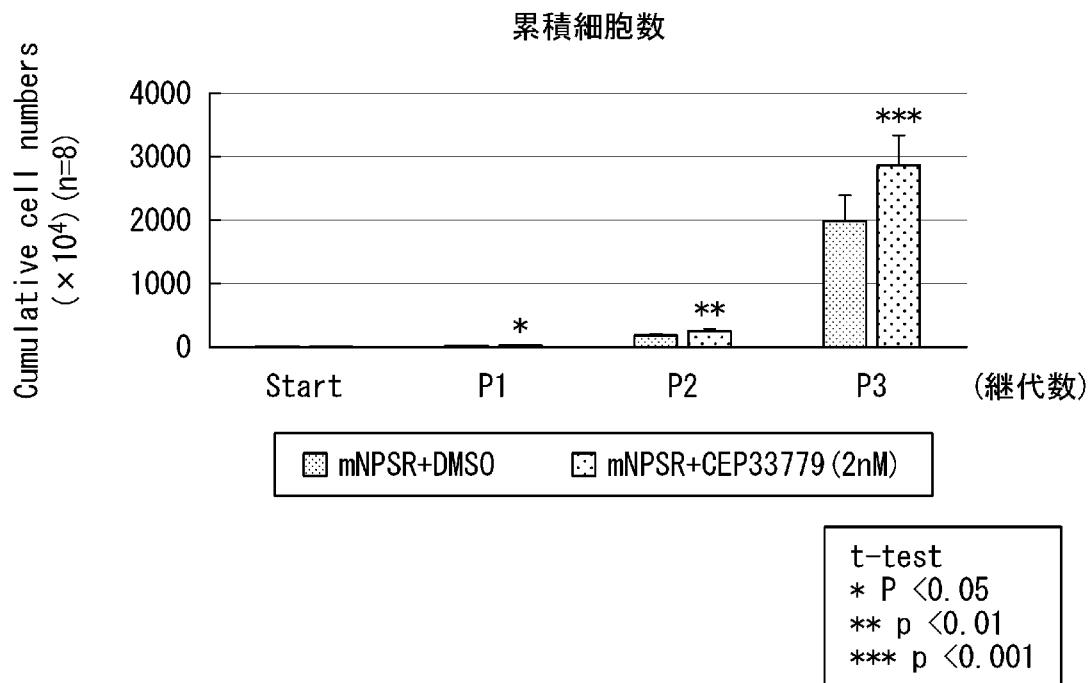
One-way ANOVA
* P < 0.05
** P < 0.01

[図26]

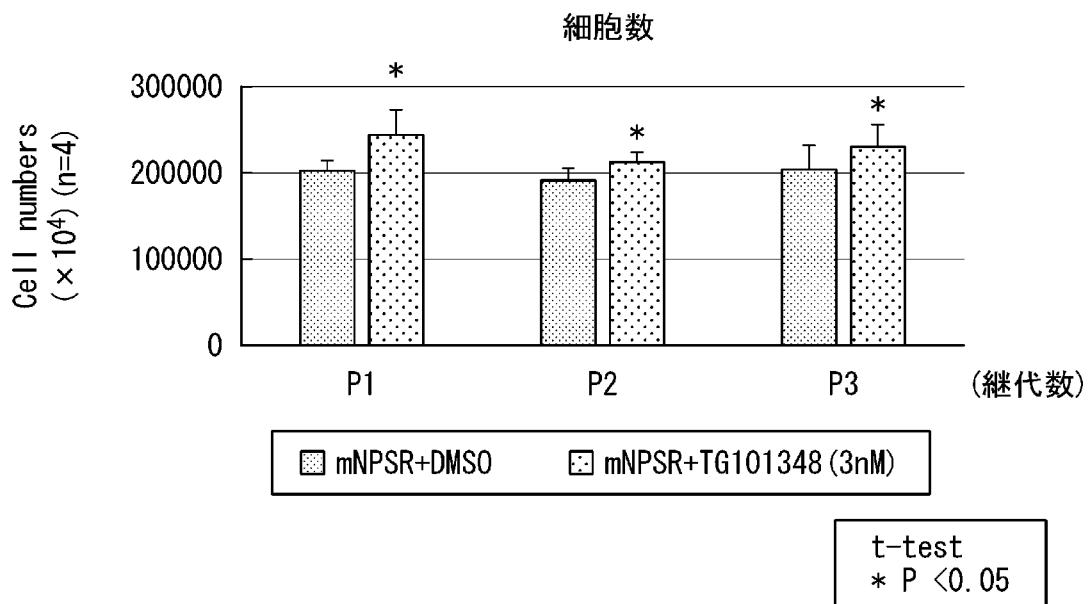


t-test
* P < 0.05
** p < 0.01

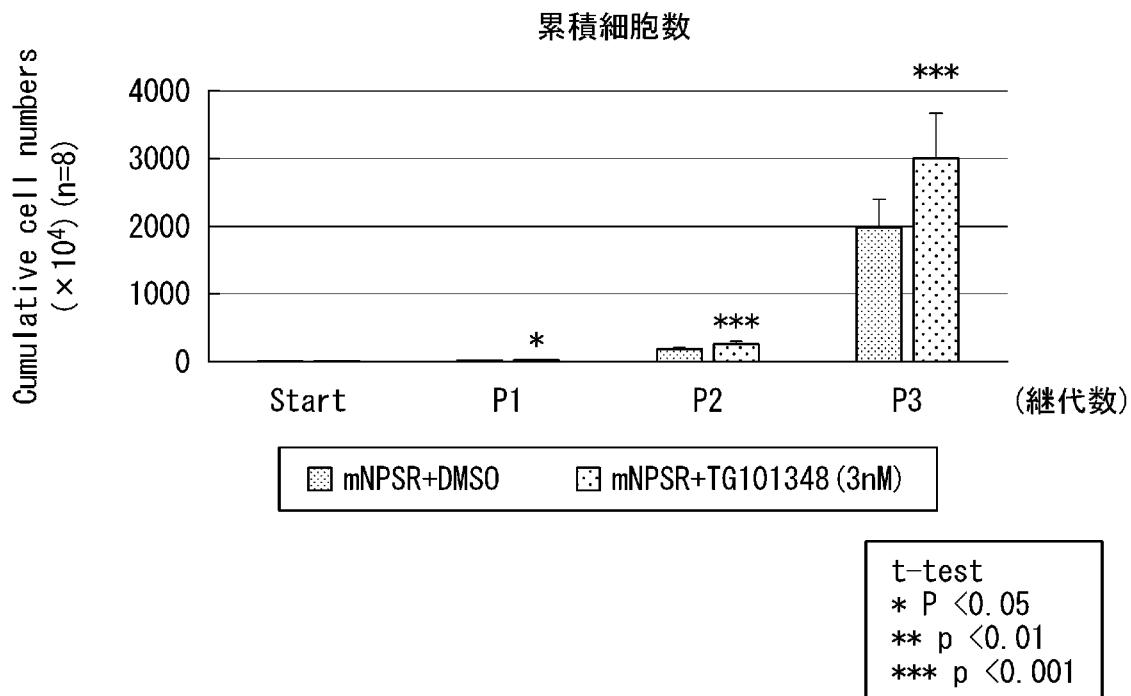
[図27]



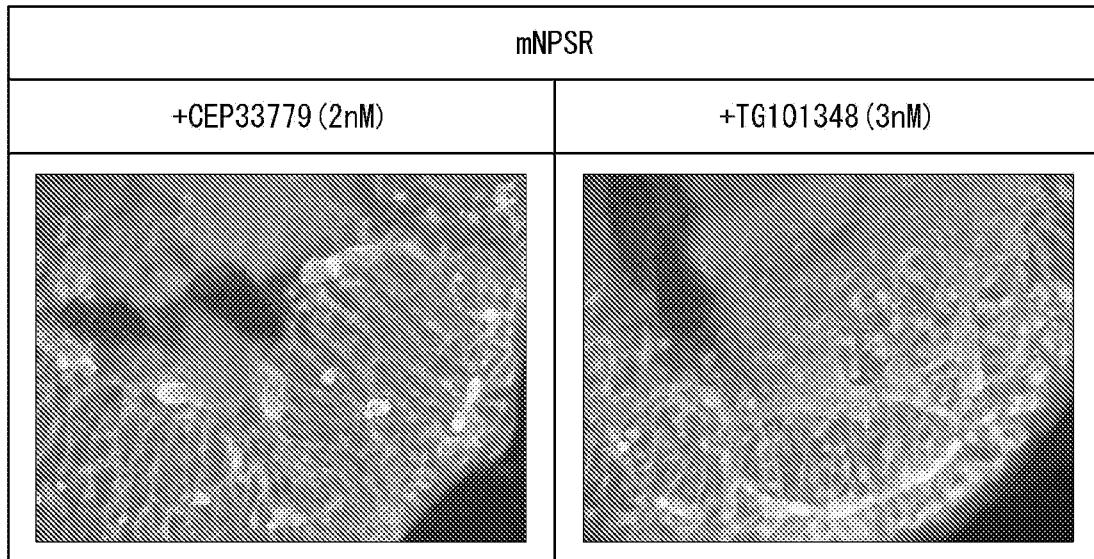
[図28]



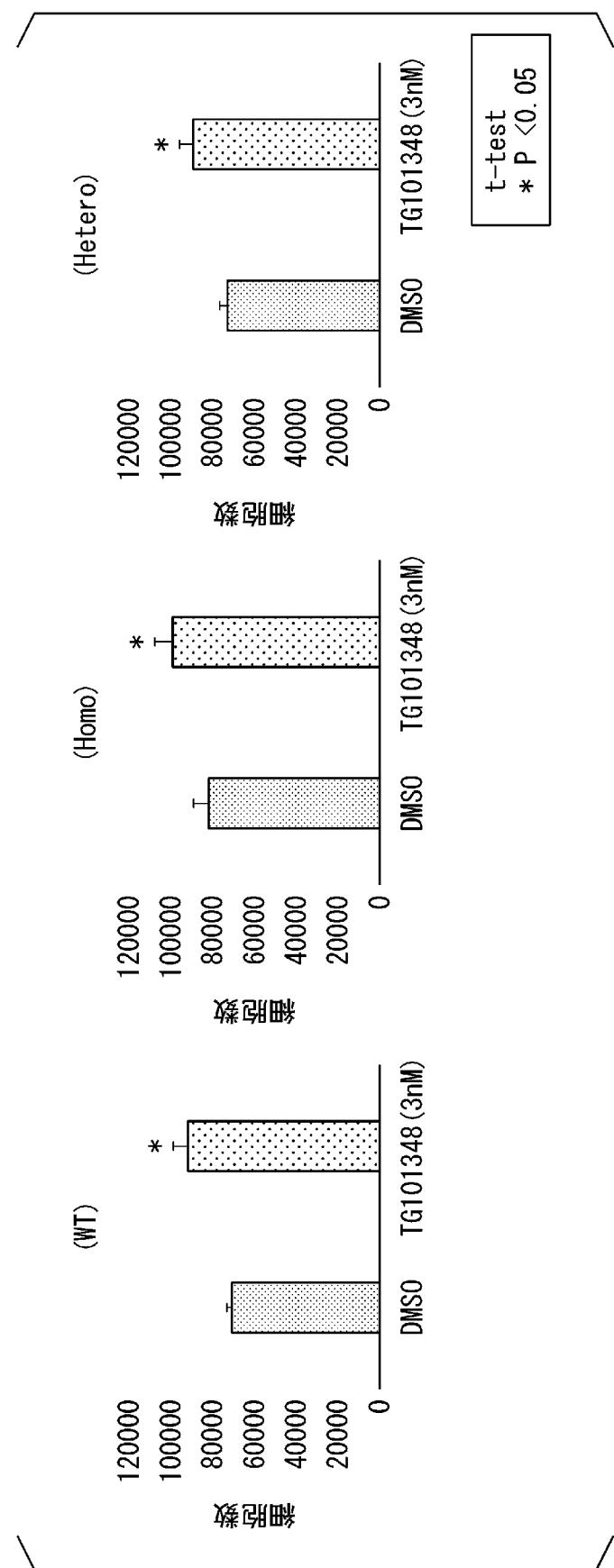
[図29]



[図30]



[図31]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/047504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071 (2010.01) i

FI: C12N5/071

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071

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 1971-2021

Registered utility model specifications of Japan 1996-2021

Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI, Zhongwei, et al., "3D Culture Supports Long-Term Expansion of Mouse and Human Nephrogenic Progenitors", <i>Cell Stem Cell</i> , 2016, vol. 19, pp. 516-529, EXPERIMENTAL PROCEDURES	1-19
A	荒岡利和, ネフロン前駆細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発, <i>Organ Biology</i> , 10 July 2019, vol. 26, no. 2, pp. 73-84, page 78, left column, line 4 to page 79, right column, line 4, (ARAOKA, Toshikazu, "Development of regenerative medicine for kidney diseases using nephron progenitor cells")	1-19
A	WO 2015/130935 A1 (MAINE MEDICAL CENTER RESEARCH INSTITUTE) 03 September 2015 (2015-09-03) claims	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 February 2021 (10.02.2021)

Date of mailing of the international search report
22 February 2021 (22.02.2021)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/047504

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	TSUJIMOTO, Hiraku et al., "Small molecule TCS21311 can replace BMP7 and facilitate cell proliferation in <i>in vitro</i> expansion culture of nephron progenitor cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 26 February 2020, available online 26 February 2020, entire text	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/047504

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2015/130935 A1	03 Sep. 2015	US 2015/0275168 A1	

国際調査報告

国際出願番号

PCT/JP2020/047504

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
FI: C12N5/071

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

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 - 2021年
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021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 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); WPIDS/WPIX (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
A	LI, Zhongwei, et al., 3D Culture Supports Long-Term Expansion of Mouse and Human Nephrogenic Progenitors, Cell Stem Cell, 2016, Vol. 19, p. 516-529 EXPERIMENTAL PROCEDURES	1-19
A	荒岡利和, ネフロン前駆細胞を用いた腎疾患に対する再生医療の開発, Organ Biology, 2019.07.10, Vol. 26, No. 2, p. 73-84 第78頁左欄第4行-第79頁右欄第4行	1-19
A	WO 2015/130935 A1 (MAINE MEDICAL CENTER RESEARCH INSTITUTE) 03.09.2015 (2015 - 09 - 03) Claims	1-19
P, X	TSUJIMOTO, Hiraku et al., Small molecule TCS21311 can replace BMP7 and facilitate cell proliferation in in vitro expansion culture of nephron progenitor cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2020.02.26, Available online 26 February 2020 全文	1-19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 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つて、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つて、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

10.02.2021

国際調査報告の発送日

22.02.2021

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）

小倉 梢 4N 4504

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：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/047504

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2015/130935 A1	03.09.2015	US 2015/0275168 A1	