

明 細 書

発明の名称

腎前駆細胞の製造方法及び腎前駆細胞を含む医薬

技術分野

本発明は、多能性幹細胞から腎前駆細胞を分化誘導する方法に関する。本発明はまた、そのようにして得られた腎前駆細胞を含む腎疾患の治療剤に関する。

背景技術

腎臓は、生体内における代謝活動により生じる有害物質などの老廃物を血中から濾過することで除去し、身体の健康維持を図るべく機能する重要な臓器の一つである。腎臓の疾患として、腎不全等が挙げられ、治療方法としては人工透析を挙げることができる。しかし、この治療に要する医療費負担が大きいことから、医学的のみならず医療経済面からも依然として世界的な問題である。また、他の治療として腎移植が挙げられるが、深刻なドナー臓器不足の状態である。

一方、胚性幹細胞（ES 細胞）や、体細胞へ未分化細胞特異的遺伝子を導入することで得られる人工多能性幹細胞（iPS 細胞）など多能性を有する細胞がこれまでに報告されている（特許文献 1 および 2）。そこで、腎不全の治療方法として、これらの多能性幹細胞から分化誘導された腎細胞を移植する治療法が検討されている。さらに、これらの多能性幹細胞由来の均一な腎細胞を用いて治療薬の開発を行うことも視野に入れられている。

哺乳類の腎臓は前腎、中腎、後腎の 3 段階を経て形成されており、そのうち後腎は、中間中胚葉の後方領域に生じることが知られている。これまで、腎形成のためにマウス多能性幹細胞から中間中胚葉への分化誘導方法が検討されており（非特許文献 1）、中間中胚葉の特徴的なマーカーとして OSR1 が確認されている。また、細菌人工染色体（BAC）ベクターを使用して緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を内在性の OSR1 対立遺伝子との相同組換えで導入したヒト iPS 細胞（OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞）を作製し、この細胞を用いた検討により、

Activin A、Wnt、BMP および各種低分子化合物を用いてヒト多能性幹細胞から中間中胚葉への分化誘導に成功している（非特許文献 2、特許文献 3）。

腎組織への移植を考慮すると、中間中胚葉よりさらに腎臓への分化が進んだ腎前駆細胞を誘導することが好ましく、腎前駆細胞を特徴付ける因子の 1 つとして SIX2 が知られている（非特許文献 4）。しかし、これまでに中間中胚葉から腎前駆細胞へ人工的に誘導させる方法は確立されていない。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 米国特許第 5,843,780 号

特許文献 2 国際公開第 W02007/069666 号

特許文献 3 国際公開第 W02012/011610 号

非特許文献

非特許文献 1 Mae S, et al. (2010), Biochem Biophys Res Commun. 393:877-82

非特許文献 2 Mae S, et al. (2013), Nat Commun. 4:1367

非特許文献 3 Osafune K, et al. (2006), Development. 133:151-61

非特許文献 4 Kobayashi A, et al. (2008), Cell Stem Cell. 3:169-81

発明の概要

本発明の課題は、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞を分化誘導する方法を提供することにある。より具体的には、多能性幹細胞から誘導した中間中胚葉細胞をさらに腎前駆細胞へ分化誘導する工程を含む、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞を分化誘導する方法を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を含む培地で培養を行うことにより、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞を分化誘導できることを初めて見出した。本発明はそのような知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は以下の特徴を有する：

[1] 中間中胚葉細胞を、TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を含む培地で培養し、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞を誘導する工程を含む、中間中胚葉細胞から

腎前駆細胞の製造方法。

[2]前記腎前駆細胞が SIX2 陽性細胞である、[1]に記載の方法。

[3]前記中間中胚葉細胞が OSR1 陽性細胞である、[1]または[2]に記載の方法。

[4]前記 TGF β シグナル刺激剤が、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、IDE1 および IDE2 からなる群から選択される 1 以上の物質である、[1]から[3]のいずれかに記載の方法。

[5]前記 BMP 阻害剤が、ドルソモルフィン (Dorsomorphin)、ノギン (Noggin)、LDN193189 および DMH1 からなる群から選択される 1 以上の物質である、[1]から[4]のいずれかに記載の方法。

[6]前記 TGF β シグナル刺激剤が TGF β 1 であり、前記 BMP 阻害剤が DMH1 である、[1]から[3]のいずれかに記載の方法。

[7]前記中間中胚葉細胞が、多能性幹細胞から誘導された中間中胚葉細胞である、[1]から[6]のいずれかに記載の方法。

[8]前記中間中胚葉細胞が、以下の工程 (i) および (ii) を含む方法で製造された中間中胚葉細胞である、[7]に記載の方法。

(i) 多能性幹細胞を、アクチビン (Activin) A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(ii) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程。

[9]前記工程 (ii) が以下の工程 (ii-1) および (ii-2) を含む、[8]に記載の方法。

(ii-1) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(ii-2) 工程 (ii-1) で得られた細胞を、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程。

[10]前記工程 (ii-1) が、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤を含む培地で培養する工程であり、前記工程 (ii-2) が、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体を含む培地で培養する工程である、[9]に記載の方法。

[11] 前記 GSK3 β 阻害剤が CHIR99021 である、[8] から [10] のいずれかに記載の方法。

[12] 前記 レチノイン酸誘導体が、AM580 または TTNPB である、[8] から [11] のいずれかに記載の方法。

[13] 前記 多能性幹細胞が人工多能性幹 (iPS) 細胞である、[7] から [12] のいずれかに記載の方法。

[14] 前記 iPS 細胞がヒト iPS 細胞である、[13] に記載の方法。

[15] 多能性幹細胞から腎前駆細胞を製造する方法であって、以下の工程 (i) から (iii) を含む、方法。

(i) 多能性幹細胞を、Activin A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、

(ii) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(iii) 工程 (ii) で得られた細胞を、TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を含む培地で培養する工程。

[16] 前記 腎前駆細胞が SIX2 陽性細胞である、[15] に記載の方法。

[17] 前記 工程 (ii) で得られた細胞が OSR1 陽性細胞である、[15] または [16] に記載の方法。

[18] 前記 TGF β シグナル刺激剤が、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、IDE1 および IDE2 からなる群から選択される 1 以上の物質である、[15] から [17] のいずれかに記載の方法。

[19] 前記 BMP 阻害剤が、Dorsomorphin、Noggin、LDN193189 および DMH1 からなる群から選択される 1 以上の物質である、[15] から [18] のいずれかに記載の方法。

[20] 前記 TGF β シグナル刺激剤が TGF β 1 であり、前記 BMP 阻害剤が DMH1 である、[15] から [17] のいずれかに記載の方法。

[21] 前記 工程 (ii) が以下の工程 (ii-1) および (ii-2) を含む、[15] から [20] のいずれかに記載の方法。

(ii-1) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択され

る1以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(ii-2) 工程 (ii-1) で得られた細胞を、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程。

[22] 前記工程 (ii-1) が、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤を含む培地で培養する工程であり、前記工程 (ii-2) が、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体を含む培地で培養する工程である、[21] に記載の方法。

[23] 前記 GSK3 β 阻害剤が CHIR99021 である、[15] から [22] のいずれかに記載の方法。

[24] 前記レチノイン酸誘導体が、AM580 または TTNPB である、[15] から [23] のいずれかに記載の方法。

[25] 前記多能性幹細胞が人工多能性幹 (iPS) 細胞である、[15] から [24] のいずれかに記載の方法。

[26] 前記 iPS 細胞がヒト iPS 細胞である、[25] に記載の方法。

[27] [1] から [26] のいずれかに記載の方法で製造された、腎前駆細胞。

[28] [1] から [26] のいずれかに記載の方法で製造された腎前駆細胞を含む、医薬組成物。

[29] [1] から [26] のいずれかに記載の方法で製造された腎前駆細胞を含む、腎疾患治療剤。

[30] [1] から [26] のいずれかに記載の方法で製造された腎前駆細胞を、治療を必要とする患者に投与する工程を包含する、腎疾患を治療する方法。

[31] 腎疾患の治療に使用するための、[1] から [22] のいずれかに記載の方法で製造された腎前駆細胞。

[32] 腎疾患の治療用の医薬組成物の製造における、[1] から [26] のいずれかに記載の方法で製造された腎前駆細胞の使用。

本発明によって中間中胚葉から腎前駆細胞へ人工的に誘導することが初めて可能となった。さらに、本発明によって多能性幹細胞 (例えば、iPS 細胞) から腎前駆細胞へ人工的に誘導することが初めて可能となった。また、本発明の方法で製造された腎前駆細胞は、腎疾患モデル動物における治療効果を有することが確認された。本発明の方法で製造された腎前駆細胞は、腎不全等の腎疾患の治療ま

たは再生医療に使用され得る。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2013-123072 号（出願日：2013 年 6 月 11 日）ならびに 2014-92108 号（出願日：2014 年 4 月 25 日）の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 2～4 における分化誘導後の SIX2 陽性細胞の含有率を示す。図 1 A は対照として DMSO を含む培地で培養した結果を示す。図 1 B は、誘導方法 1（実施例 2）による結果を示す。図 1 C は、誘導方法 2（実施例 3）による結果を示す。図 1 D は、誘導方法 3（実施例 4）による結果を示す。図中、tdTomato は、レポーター遺伝子を示す。

図 2 は、実施例 5 における分化誘導後の SIX2 陽性細胞の含有率を示す。図 2 A は対照として DMSO を含む培地で培養した結果を示す。図 2 B、C および D は、誘導方法 1 のステージ 3 においてドルソモルフィン（Dorsomorphin）の代わりに、それぞれノギン（Noggin）、LDN193189 および DMH1 を用いた場合の結果を示す。図 2 E および F は、誘導方法 1 のステージ 3 において TGF β 1 の代わりに、それぞれ IDE1 および IDE2 を用いた場合の結果を示す。図 2 G は、誘導方法 1 のステージ 3 において、TGF β 2 および LDN193189 を用いた場合の結果を示す。図 2 H は、誘導方法 1 のステージ 3 において、TGF β 3 および LDN193189 を用いた場合の結果を示す。

図 3 は、ヒト iPS 細胞から OSR1⁺SIX2⁺腎前駆細胞を作製する方法の一例を示す。図 3 A は、EB（胚様体）三次元培養を使用する OSR1⁺SIX2⁺腎前駆細胞への分化方法を示す。図 3 B は、フローサイトメトリーによる OSR1⁺SIX2⁺細胞の経時的な分化パターン分析を示し、具体的には細胞集団の二次元分布の結果を示す（n=5）。図 3 C は、分化細胞集団中の表示した各遺伝子に対する mRNA 発現のタイムコース分析を示す。グラフは Day1～Day28 における β アクチン発現に対する相対発現量を示す（n=3）。図 3 D は、実施例 7 におけるフローサイトメトリーによる OSR1⁺SIX2⁺細胞の経時的な分化パターン分析を示し、具体的には該細胞集団のタイムコース分析の結果を示す（n=5）。図 3 D 中、d1 は Day1 での iPS 細胞、d3 は

CHIR99021 とアクチビン (Activin) A を含有する培地 (ステージ 1) で作製した EB (Day3) の結果を示す。図 3 D 中、d6~d28 は、Day6~Day28 までの DMSO 群 (DMSO と記す) 及び TGF β 1+TTNPB 処理群 (Tx と記す) の結果を示す。ステージ 2 (Day3~Day6) で CHIR99021 と BMP7 を含む培地で 3 日間培養後、Day6 で DMSO 群と Tx 群に分け、ステージ 3 及びステージ 4 での培養を行った。なお、DMSO 群では、ステージ 3 において TGF β 1 及び TTNPB に代えて DMSO を含む培地で培養し (Day8 で同じ培地に交換した)、ステージ 4 において TGF β 1 及び DMH1 に代えて DMSO を含む培地で培養した (3 日に 1 度同じ培地に交換した)。図 3 E は、培養 28 日目の 4A6C3-10 から分化した OSR1⁺SIX2⁺腎前駆細胞における腎前駆細胞マーカー発現を示す。

図 4 は、ヒト iPS 細胞からの OSR1⁺SIX2⁺細胞誘導に対する TGF β シグナル刺激剤及び BMP 阻害剤の各組み合わせの効果を示す。データは平均 $\pm$ S. E. M で表す (n=5)。

図 5 は、種々のヒト iPS 細胞及びヒト ES 細胞での誘導方法 4 による分化誘導の結果 (OSR1 発現量 (図 5 A) 及び SIX2 発現量 (図 5 B)) を示す。4A6C3-10 での発現量に対する各細胞における OSR1 及び SIX2 の相対発現量を示す。

図 6 は、腎前駆細胞の評価試験の結果を示す。図 6 A は、OSR1⁺SIX2⁺細胞を REGM 培地中で 7 日間培養した後の免疫染色像を示す。図中、NEPHRIN は、糸球体ポドサイトのマーカー、AQP1 および MEGALIN は、近位尿細管のマーカー、および UROMUCOID は、ヘンレのループのマーカーを示す。これらの各マーカーはピンク色で、また核は青色でそれぞれ染色されている。スケールバーは、50 μ m を示す。図 6 B は、OSR1⁺SIX2⁺細胞の細胞塊を Wnt4 を発現する NIH3T3 と 7 日間共培養した後の顕微鏡像 (左図) および免疫染色像 (3 つの右図) を示す。図 6 C は、OSR1⁺SIX2⁺細胞の細胞塊を E11.5 のマウス胚脊髄と 7 日間共培養した後の顕微鏡像 (左図) および免疫染色像 (3 つの右図) を示す。図 6 D は、OSR1⁺SIX2⁺細胞の細胞塊を E11.5 のマウス胚後腎細胞と器官培養した後の免疫染色像を示す。図 6 E は、OSR1⁺SIX2⁺細胞の細胞塊を NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J の副睾丸脂肪組織へ移植した後の組織を免疫染色した像を示す。図中、WT1 および PODOCALYXIN (PODX) は糸球体ポドサイトのマーカー (それぞれ赤色、ピンク色) を、LTL は近位尿細管のマ-

カー（赤色）を、LAMININは極性上皮のマーカー（ピンク色）を、CDH1は遠位尿細管のマーカー（ピンク色）を、およびCDH6は腎小胞のマーカー（ピンク色）を示し、HuNuはヒト核（緑色）を示し、マウス核は青色で染色されており、またスケールバーは、50 μm を示す。図6Fは、iPS細胞由来の各分画（OSR1⁻SIX2⁻、OSR1⁺SIX2⁻、OSR1⁻SIX2⁺、およびOSR1⁺SIX2⁺）の細胞塊をE11.5のマウス尿管芽と7日間器官培養した後の顕微鏡像（左図）およびOSR1⁺SIX2⁺細胞塊と尿管芽の共培養の免疫染色像（右図）を示す。図中、DBAは、尿管芽のマーカー（赤色）を示し、スケールバーは、50 μm を示す。HuNuはヒト核（緑色）、マウス核は青色でそれぞれ染色されている。

図7は、マウス腎疾患モデルへの移植実験の結果を示す。図7AおよびBは、OSR1⁺SIX2⁺細胞の細胞塊を腎実質への移植後2週間でのマウス急性腎障害（AKI）モデル（図7A）及びマウス慢性腎不全モデル（図7B）の腎臓切片の免疫染色像を示す。LTLおよびAQP1は近位尿細管のマーカーを示し、それぞれ緑色、赤色で染色されている。HuNuは、ヒト核（ピンク色）を示し、スケールバーは、50 μm を示す。図7Cは、hiPSC-RP（n=10、iPSC-RPs、三角）、未分化ヒトiPS細胞（n=10、iPSCs、四角）、又は生理食塩水（n=10、Saline、丸）の腎臓被膜下移植を受けたAKIモデルマウスにおける、BUNレベル及び血清Crレベルのタイムコース分析を示す[*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 vs Saline]。図7Dは、hiPSC-RP（iPSC-RPs）又は生理食塩水（Saline）を移植したマウス由来の腎組織の組織学的所見を示す。腎組織を虚血再灌流後（I/R）3日目に過ヨウ素酸-Schiff（PAS、上）又はマッソントリクローム（MT、下）染色で染色した。図7Eは、I/R後3日目の宿主腎臓における円柱を伴う内腔の拡張した尿細管（Dilated tubules with casts）又は線維化（Fibrosis）の面積の測定結果を示す[**P<0.01 vs Saline、一群あたり n=3]。

発明を実施するための形態

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明では、中間中胚葉細胞を、TGF β シグナル刺激剤およびBMP阻害剤を含む培地で培養する工程を含む、腎前駆細胞を製造する方法を提供する。

本発明において、中間中胚葉細胞とは、本発明において TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を含む培地で培養することによって腎前駆細胞へ誘導される任意の細胞を意味する。中間中胚葉細胞を取得する方法としては、例えば、マウスおよびヒトの多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導方法が公知である（非特許文献 1 および 2、特許文献 3）。中間中胚葉細胞を特徴づけるマーカーとして OSR1 が知られており、本発明の方法で使用される中間中胚葉細胞の例として、OSR1 陽性の中間中胚葉細胞が挙げられる。例えば、OSR1 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、GFP）を有する多能性幹細胞（例えば、後記実施例記載の OSR1-GFP 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、OSR1 陽性の中間中胚葉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、中間中胚葉細胞における OSR1 の発現を確認することもできる。本発明において、OSR1 陽性の中間中胚葉細胞には、OSR1 タンパク質を発現している細胞、および OSR1 プロモーター制御下にある遺伝子によってコードされるタンパク質を発現する細胞が包含される。本発明において、OSR1 には、NCBI のアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_145260.2、マウスの場合、NM_011859.3 に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子並びに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。好ましくは、本発明の方法で使用される中間中胚葉細胞は、SIX2 が陰性であり、OSR1 が陽性である細胞である。

本発明において、腎前駆細胞は、ネフロン前駆細胞と同等の細胞として取り扱われ、*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り、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（非特許文献 4）、本発明の方法で誘導される腎前駆細胞の例として、SIX2 陽性の腎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 陽性の腎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、腎前駆細胞における SIX2 の発現を確認することもできる。本発明において、SIX2 陽性の腎前駆細胞には、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包含される。本発明において、SIX2 には、NCBI のアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_016932.4、マウスの場合、NM_011380.2 に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子並びに当該遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらの機能を有する天然に存在する変異体が包含される。好ましくは、本発明の方法で誘導される腎前駆細胞は、OSR1 が陽性であり、かつ SIX2 が陽性である細胞である。

本発明において、中間中胚葉細胞または腎前駆細胞は、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、純化された集団であってもよい。好ましくは、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%、20%、28%または 30%以上当該細胞が含まれた細胞集団である。

本発明の方法において、中間中胚葉細胞を任意の方法で実質的に分離 (または解離) することで単一細胞の状態、または、細胞同士が接着した細胞塊の状態、浮遊培養により培養するか、あるいは、コーティング処理された培養皿を用いて接着培養してもよい。ここで、分離の方法としては、例えば、力学的分離や、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液 (例えば、トリプシンとコラゲナーゼの含有溶液 Accutase(TM) および Accumax(TM) (Innovative Cell Technologies, Inc) が挙げられる) またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離が挙げられる。

本発明の方法において使用される浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態、で培養することであり、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等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) によるコーティング処理) したものを使用し

て行うことができる。

本発明の方法において使用される接着培養とは、コーティング処理された培養皿にて培養することである。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD Biosciences)、Synthemax (Corning)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられ、好ましくは、マトリゲル、Synthemax またはゼラチンである。

本発明の中間中胚葉細胞の培養工程に使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へ TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を添加して調製することができる。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、Fischer' s 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。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し、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、およびこれらの同等物などの 1 つ以上の物質も含有しうる。

1 つの実施形態において、基礎培地は、DMEM と F12 の 1 : 1 の混合培地 (DMEM/F12) に、GlutaMAX、KSR、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノールおよび抗生物質を含む培地である。

本発明において使用される TGF β シグナル刺激剤とは、TGF β シグナル経路を活性化するものである限り特に限定されず、TGF β シグナル刺激剤としては、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 などのタンパク質 (Peprotech、R&D 社等から入手可能)、IDE1 ((Z)-2-((2-(6-carboxyhexanoyl)hydrazono)methyl)benzoic acid) および IDE2 (7-(2-cyclopentylidenehydrazinyl)-7-oxoheptanoic acid) (Borowiak M, et al, Cell Stem Cell. 2009, 4:348-58) などの化合物が例示される。IDE1 および IDE2

は、Stemgent 社、Tocris 社等から入手可能である。好ましい TGF β シグナル刺激剤は、TGF β 1 である。

本発明において、TGF β シグナル刺激剤を用いる場合の濃度は、使用する TGF β シグナル刺激剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、TGF β シグナル刺激剤として TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 などのタンパク質を用いる場合の濃度は、0.1 ng/ml から 100 ng/ml、好ましくは、1 ng/ml から 10 ng/ml、さらに好ましくは、5 ng/ml から 10 ng/ml である。また、IDE1 および IDE2 を用いる場合の濃度は、1 μ M から 100 μ M、好ましくは、25 μ M から 75 μ M、さらに好ましくは、40 μ M から 60 μ M である。

本発明において使用される BMP 阻害剤とは、BMP (Bone Morphogenetic Protein) シグナル経路を抑制するものである限り特に限定されず、BMP 阻害剤としては、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) およびその誘導体 (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)、DMH1 (4-[6-(4-Isopropoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]quinoline, 4-[6-[4-(1-Methylethoxy)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-quinoline)、ならびに LDN193189 (4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline) が例示される。Dorsomorphin および LDN193189 は市販されており、Sigma-Aldrich、Stemgent、Merck、Axon MedChem、Peprotech 社等から入手可能である。好ましい BMP 阻害剤としては、DMH1、Noggin、LDN193189、及び Dorsomorphin が挙げられ、より好ましい BMP 阻害剤は、DMH1 である。

本発明において、BMP 阻害剤を用いる場合の濃度は、使用する BMP 阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、BMP 阻害剤として Chordin、Noggin、Follistatin などのタンパク質性阻害剤を用いる場合の濃度は、0.1 ng/ml から 1000 ng/ml、好ましくは、1 ng/ml から 500 ng/ml、さらに好ましくは、10 ng/ml から 100 ng/ml である。また、Dorsomorphin、DMH1 および LDN193189 を用いる場

合の濃度は、 $0.01\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ 、好ましくは、 $0.1\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $0.5\mu\text{M}$ から $1\mu\text{M}$ である。

本発明の中間中胚葉細胞の培養工程において、基礎培地へ FGF9、FGF20、BMP7、レチノイン酸誘導体、GSK-3 β 阻害剤のいずれかまたは任意の組み合わせをさらに添加しても良い。

本発明の中間中胚葉細胞の培養工程の日数は、長期間培養することで腎前駆細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、例えば、2 日以上、4 日以上、6 日以上、8 日以上、10 日以上、11 日以上、12 日以上、13 日以上、14 日以上、15 日以上、16 日以上、17 日以上、18 日以上、19 日以上、20 日以上が挙げられる。

本発明の中間中胚葉細胞の培養工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 37°C であり、 CO_2 含有空気の雰囲気下で培養が行われ、 CO_2 濃度は、好ましくは約 $2\sim 5\%$ である。

本発明の 1 つの実施形態において、中間中胚葉細胞は、多能性幹細胞から誘導された中間中胚葉細胞である。この場合、誘導された中間中胚葉細胞を一旦単離し、単離された中間中胚葉細胞を本発明の培養工程によって腎前駆細胞へ誘導しても良い。または、多能性幹細胞から中間中胚葉細胞を誘導し、中間中胚葉細胞を単離せずにそのまま本発明の培養工程に供することによって腎前駆細胞へ誘導しても良い。

中間中胚葉細胞を単離する場合、内在性の OSR1 プロモーターによって発現が制御されるレポーター遺伝子を有する多能性幹細胞を使用してもよい。多能性幹細胞の OSR1 プロモーター制御下にレポーター遺伝子を導入する方法としては、例えば、BAC ベクター等を用いた相同組換えが挙げられ、W02012/011610 等に記載されている。また、誘導された腎前駆細胞を単離するために、SIX2 プロモーターによって発現が制御されるレポーター遺伝子を有する多能性幹細胞を使用してもよく、前記と同様の方法を使用して作製することができる。使用されるレポーター遺伝子としては、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、tdTomato、細胞表面タンパク質などの公知のレポータータンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。これらの多能性幹細胞から誘導された中間中胚葉細胞または腎前駆細胞は、当該レポータータンパク質の発現を

指標として細胞ソーターを用いる方法、当該細胞表面タンパク質に対する抗体を使用して、磁気ビーズを用いて磁性により細胞を選別する方法（例えば、MACS）、当該抗体等が固定化された担体（例えば、細胞濃縮カラム）を用いる方法等、当該分野で公知の方法を用いて単離され得る。

本発明において多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、本発明で使用される中間中胚葉細胞に誘導される任意の細胞が包含される。多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（ntES）細胞、精子幹細胞（「GS 細胞」）、胚性生殖細胞（「EG 細胞」）、人工多能性幹（iPS）細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞（Muse 細胞）などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、製造工程において胚、卵子等の破壊をしないで入手可能であるという観点から、iPS 細胞であり、より好ましくはヒト iPS 細胞である。

iPS 細胞の製造方法は当該分野で公知であり、任意の体細胞へ初期化因子を導入することによって製造され得る。ここで、初期化因子とは、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3 または Glis1 等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008),

Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat. Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば

(1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2) 組織前駆細胞、(3) 血液細胞(末梢血細胞、臍帯血細胞等)、リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

また、iPS 細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体の HLA 遺伝子型が同一または実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度に HLA 遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-B および HLA-DR の 3 遺伝子座または HLA-C を加えた 4 遺伝子座が一致する HLA 型を有する体細胞である。

本発明において、多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導に際して、以下の工程を含む方法を用いることができる：

(i) 多能性幹細胞を、Activin A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(ii) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程。

以下に各工程についてさらに説明する。

(i) 多能性幹細胞を、Activin A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される1以上の物質を含む培地で培養する工程：

本工程では、多能性幹細胞を当該分野で公知の任意の方法で分離し、浮遊培養または接着培養により培養してもよい。多能性幹細胞の分離の方法としては、例えば、力学的分離や、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(TM)および Accumax(TM) (Innovative Cell Technologies, Inc) が挙げられる）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液を用いて解離し、力学的に細かく単一細胞へ分散する方法である。本工程で用いるヒト多能性幹細胞としては、使用したディッシュに対して70%~80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーを用いることが好ましい。

本工程 (i) において使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へ Activin A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される1以上の物質を添加して調製することができる。1つの実施形態において、本工程で使用される物質は、Activin A および GSK-3 β 阻害剤の組み合わせ、または、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体の組み合わせである。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、Fischer' s 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清（例えば、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し、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、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。本工程の1つの実施形態において、

基礎培地は、GlutaMAX、血清および抗生物質を含む DMEM/F12 である。

本工程 (i) において、Activin A には、ヒトおよび他の動物由来の Activin A、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、R&D systems 社等の市販されているものを使用することができる。本工程で用いる Activin A の濃度は、1 ng/ml から 1000 ng/ml、好ましくは、10 ng/ml から 500 ng/ml、より好ましくは、50 ng/ml から 200 ng/ml である。

本工程 (i) において、GSK-3 β 阻害剤は、GSK-3 β の機能、例えば、キナーゼ活性を阻害できるものである限り特に限定されず、例えば、インジルビン誘導体である BIO (別名、GSK-3 β 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-インドル-3-イル)-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-3 β 阻害剤 VII (α ,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、GSK-3 β ペプチド阻害剤 ; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂ : 配列番号 1) および高い選択性を有する CHIR99021 (Nature (2008) 453: 519-523) が挙げられる。これらの化合物は、例えば、Stemgent 社、Calbiochem 社、Biomol 社等から入手可能であり、また自ら作製してもよい。本工程で用いる好ましい GSK-3 β 阻害剤としては、CHIR99021 が挙げられる。本工程で用いる GSK-3 β 阻害剤の濃度は、使用する GSK-3 β 阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、GSK-3 β 阻害剤として CHIR99021 を用いる場合、0.01 μ M から 100 μ M、好ましくは、0.1 μ M から 10 μ M、さらに好ましくは、1 μ M から 3 μ M である。

本工程 (i) において、レチノイン酸誘導体は、天然のレチノイン酸が有する機能を保持する人工的に修飾されていてもよいレチノイン酸であり、例えば、レチノイド化合物及びビタミン D3 化合物を包含する。レチノイド化合物の例としては、レチノイン酸、3-デヒドロレチノイン酸、4-[[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl) carbonyl] amino]-Benzoic acid (AM580) (Tamura K, et al., Cell Differ. Dev. 32: 17-26 (1990))、4-[(1E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propen-1-yl]-Benzoic acid (TTNPB) (Strickland S, et al., Cancer Res. 43: 5268-5272

(1983))、および Tanenaga, K. et al., Cancer Res. 40: 914-919 (1980) に記載されている化合物、パルミチン酸レチノール、レチノール、レチナール、3-デヒドロレチノール、3-デヒドロレチナール等が挙げられる。レチノイン酸化合物とは、レチノイド化合物のうち、カルボキシル基を有する化合物であり、例えば、レチノイン酸、3-デヒドロレチノイン酸、AM580、TTNPB 等が挙げられる。ビタミン D3 化合物の例には、Abe, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 4990-4994 (1981)、および Schwartz, E. L. et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24: 18 (1983) に記載されている化合物が挙げられる。本工程の 1 つの実施形態において、レチノイン酸誘導体は、レチノイド化合物又はビタミン D3 化合物である。本工程の別の実施形態において、レチノイン酸誘導体は、レチノイド化合物であり、また別の実施形態において、レチノイン酸誘導体は、レチノイン酸化合物である。本工程で用いる好ましいレチノイン酸誘導体としては、AM580 または TTNPB が挙げられる。本工程で用いるレチノイン酸誘導体の濃度は、使用するレチノイン酸誘導体に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、レチノイン酸誘導体として AM580 または TTNPB を用いる場合、 $0.01 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ 、好ましくは、 $0.1 \mu\text{M}$ から $10 \mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $0.5 \mu\text{M}$ から $2 \mu\text{M}$ である。

本工程 (i) における培地はさらに、ROCK 阻害剤を含んでいてもよい。特に、本工程が多能性幹細胞を単一細胞へ分散させる工程を含む場合には、培地に ROCK 阻害剤が含まれていることが好ましい。

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 (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) 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、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 (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)。本発明では、1 種または 2 種以上の ROCK 阻害剤が使用され得る。本工程で用いる好ましい ROCK 阻害剤としては、Y-27632 が挙げられる。本工程で用いる ROCK 阻害剤の濃度は、使用する ROCK 阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、ROCK 阻害剤として Y-27632 を用いる場合、 $0.1 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ 、好ましくは、 $1 \mu\text{M}$ から $50 \mu\text{M}$ 、さらに好ましくは、 $5 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ である。

本工程 (i) において、培養温度は、以下に限定されないが、約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 37°C であり、 CO_2 含有空気の雰囲気下で培養が行われる。 CO_2 濃度は、約 $2\sim 5\%$ 、好ましくは約 5% である。本工程の培養時間は、例えば 2 日以下の培養であり、好ましくは 2 日である。

(ii) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程：

本工程では、前述の工程 (i) で得られた浮遊培養後の細胞集団をそのままコーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で接着培養してもよく、または、前述の工程 (i) で接着培養により得られた細胞を、培地の交換により培養を続けてもよい。

本工程 (ii) において使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる基礎培地へ BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を添加して調製することができる。1 つの実施形態において、本工程で使用される物質は、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤の組合せ、または、レチノイン酸誘導体である。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、Fischer' s 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清 (例えば、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し、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、およびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。本工程の1つの実施形態において、基礎培地は、DMEM と F12 の 1 : 1 の混合培地 (DMEM/F12) に、GlutaMAX、KSR、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノールおよび抗生物質を含む培地である。

本工程 (ii) において、例えば、工程 (i) で得られた細胞を、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養し、その後に、レチノイン酸誘導体を含む培地でさらに培養しても良い。好ましくは、本工程 (ii) において、工程 (i) で得られた細胞を、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養し、その後に、レチノイン酸誘導体および TGF β シグナル刺激剤を含む培地でさらに培養する。

すなわち、本工程 (ii) は、次の工程 (ii-1) および (ii-2) :

(ii-1) BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択される 1 以上の物質を含む基礎培地で培養する工程、および

(ii-2) TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体から選択される 1 以上の物質を含む基礎培地で培養する工程
の 2 工程に分離して行っても良い。

より好ましくは、本工程 (ii) において、(ii-1) 工程は、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤を含む培地で培養する工程であり、かつ (ii-2) 工程は、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体を含む培地で培養する工程である。

本工程 (ii) において、BMP7 には、ヒト BMP7 (NCBI のアクセッション番号 : NM_001719.2) および他の動物由来の BMP7、ならびにこれらの機能的改変体が包含され、例えば、Invitrogen 社、R&D 社等の市販されているものを使用することができる。本工程で用いる BMP7 の濃度は、1 ng/ml から 1000 ng/ml、好ましくは、10 ng/ml から 500 ng/ml、より好ましくは、50 ng/ml から 200 ng/ml である。

本工程 (ii) において、GSK-3 β 阻害剤は、前述の工程 (i) について例示した

GSK-3 β 阻害剤を使用することができ、好ましい GSK-3 β 阻害剤としては、CHIR99021 が挙げられる。本工程で用いる GSK-3 β 阻害剤の濃度は、使用する GSK-3 β 阻害剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、GSK-3 β 阻害剤として CHIR99021 を用いる場合、0.01 μ M から 100 μ M、好ましくは、0.1 μ M から 10 μ M、さらに好ましくは、1 μ M から 3 μ M である。

本工程 (ii) において、TGF β シグナル刺激剤は、TGF β シグナル経路を活性化するものである限り特に限定されず、TGF β シグナル刺激剤としては、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 あるいは IDE1 および IDE2 を使用することができ、好ましい TGF β シグナル刺激剤としては、TGF β 1 が挙げられる。本工程 (ii) において、TGF β シグナル刺激剤を用いる場合の濃度は、使用する TGF β シグナル刺激剤に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、TGF β シグナル刺激剤として TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 などのタンパク質を用いる場合の濃度は、0.1 ng/ml から 100 ng/ml、好ましくは、1 ng/ml から 10 ng/ml、さらに好ましくは、5 ng/ml から 10 ng/ml である。また、IDE1 および IDE2 を用いる場合の濃度は、1 μ M から 100 μ M、好ましくは、25 μ M から 75 μ M、さらに好ましくは、40 μ M から 60 μ M である。

本工程 (ii) において、レチノイン酸誘導体は、前述の工程 (i) について例示したレチノイン酸誘導体を使用することができ、好ましいレチノイン酸誘導体としては、AM580 または TTNPB が挙げられる。本工程で用いるレチノイン酸誘導体の濃度は、使用するレチノイン酸誘導体に応じて当業者に適宜選択可能であるが、例えば、レチノイン酸誘導体として AM580 または TTNPB を用いる場合、0.01 μ M から 100 μ M、好ましくは、0.1 μ M から 10 μ M、さらに好ましくは、0.5 μ M から 2 μ M である。

本工程 (ii)、(ii-1) 及び (ii-2) において、培養温度は、以下に限定されないが、約 30~40°C、好ましくは約 37°C であり、CO₂ 含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂ 濃度は、約 2~5%、好ましくは約 5% である。培養時間は、長期間培養することで腎前駆細胞の製造効率に特に影響がないため上限はないが、工程 (ii) の培養時間としては、例えば 3 日以上の上から 12 日以下、より好ましくは 3 日以上 9 日以下が挙げられる。工程 (ii) が工程 (ii-1) 及び (ii-2) を含む場合、工程 (ii) の培養時間としては前述のと

おりであるが、工程 (ii-1) の培養時間としては、例えば 1 日以上の培養であり、好ましくは 2 日以上から 11 日以下、より好ましくは 2 日以上 6 日以下が挙げられ、工程 (ii-2) の培養時間としては、例えば 1 日以上の培養であり、好ましくは 2 日以上から 11 日以下、より好ましくは 3 日以上 6 日以下が挙げられる。この時、培地は、3 日ごとに交換することが望ましい。

本発明では、上述した方法により得られた腎前駆細胞、該腎前駆細胞を含む医薬組成物、該腎前駆細胞を含む腎疾患治療剤、該腎前駆細胞の治療有効量を投与する工程を包含する腎疾患を治療する方法、腎疾患の治療に使用するための該腎前駆細胞、及び腎疾患の治療用の医薬組成物の製造における該腎前駆細胞の使用をそれぞれ提供する。治療を必要とする患者への治療剤の投与方法としては、例えば、得られた腎前駆細胞をシート化して、患者の腎臓に貼付する方法、得られた腎前駆細胞を生理食塩水等に懸濁させた細胞懸濁液、あるいは三次元培養（例えば、Dev Cell. Sep 11, 2012; 23(3): 637-651）し、得られた細胞塊を患者の腎臓に直接移植する方法、マトリゲル等から構成されたスキャフォールド上で三次元培養し、得られた腎前駆細胞塊を移植する方法などが挙げられる。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。腎疾患としては、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が例示される。

本発明において、腎疾患治療剤に含まれる腎前駆細胞の細胞数は、移植片が投与後に生着できれば特に限定されなく、患部の大きさや体躯の大きさに合わせて適宜増減して調製されてもよい。

実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれらの実施例によって制限されないものとする。

[実施例 1]

[OSR1-GFP & SIX2-GFP knock-in ヒト iPS 細胞株の樹立]

ヒト iPS 細胞 (201B7) は、京都大学（日本国、京都）の山中伸弥教授より受領し、従来の方法で培養した (Takahashi K, et al. Cell. 131:861-72)。続いて、

Mae S, et al, Nat Commun. 4:1367, 2013 に記載された方法で、内在性の OSR1 の発現と連動して GFP を発現する OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株を作製した。次いで、Mae ら（前出）と同じ方法を用いて、IRES-tdTomato を挿入した BAC クローン（RP11-819H19、Children's Hospital Oakland Research Institute）を使用して、当該 OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株の SIX2 の終止コドンの下流へ IRES-tdTomato を相同組換えにより導入し、内在性の SIX2 の発現と連動して tdTomato を発現する OSR1-GFP & SIX2-tdTomato レポーター iPS ヒト細胞株を作製した。

[実施例 2]

[SIX2 陽性細胞の誘導方法 1]

<ステージ 1>

実施例 1 の方法で得られた OSR1-GFP & SIX2-tdTomato レポーターヒト iPS 細胞株を、5 ng/ml bFGF(Wako) を添加した霊長類 ES/iPS 細胞用培地（リプロセル）を含む 10cm ディッシュ上で、SNL 細胞（McMahon, A.P. and Bradley, A. (1990) Cell 62 ; 1073-1085）（15.5 μ g/ml のマイトマイシン（協和発酵キリン）で 2~3 時間処理し、 3×10^5 細胞/10cm ディッシュで播種）をフィーダー細胞として用いて、37℃、2~5%CO₂ 雰囲気下でコンフルエントになるまで培養した。ここへ CTK 溶液（2.5%Trypsin (Invitrogen)、1 mg/ml Collagenase IV (Invitrogen)、0.1 M CaCl₂、10 mL KnockOut SR (Invitrogen)、29.5 mL H₂O）を加えて解離させ、フィーダー細胞を除去した後、1 μ M CHIR99021 (Stemgent、04-0004)、100 ng/ml Activin A (R&D systems、338-AC)、1%GlutaMAX (100X) (Invitrogen、35050-061)、2%FBS(Hyclone)、および 0.5%PenStrep(Invitrogen、10565)を含有する DMEM/F12 培地に懸濁させ、非接着プレート（LOW CELL BIND 6WELL DISH (Nunc、145383)）へ 1uferu あたり 10cm ディッシュから得られた細胞懸濁液の 1/3~1/6 量を移し浮遊培養にて 37℃、5%CO₂ 雰囲気下で 2 日間培養した。

<ステージ 2>

ステージ 1 で得られた細胞塊を、マトリゲル(BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences、356230) によりコートした 24 ウェルまたは 6 ウェル ディッシュ（DMEM 中 0.2 mg/ml のマトリゲルでコーティングし、37℃で 30 分ま

たは 4℃で一晩処理) または Synthemax (Corning Synthemax II-SC Substrate (Corning, 3535XX1)) によりコートした 24 ウェルまたは 6 ウェルディッシュ (滅菌水で 40 倍希釈した Synthemax でコーティングし、室温で 2 時間処理) へ移し、 $1\mu\text{M}$ CHIR99021、 100 ng/ml BMP7 (Recombinant human BMP7 (R&D systems, 3534-BP))、0.1% 2-メルカプトエタノール (1000X) (Invitrogen, 21985)、1% GlutaMAX (100X)、10% KnockOut SR (Invitrogen)、0.1 mM MEM NEAA (Invitrogen, 11140)、および 0.5% PenStrep を含有する DMEM/F12 を添加した培地へ交換し、37℃、5% CO_2 雰囲気下で接着培養にて 3 日間から 6 日間培養した。3 日間以上培養した場合は、3 日目に同じ条件の培地へ交換した。

<ステージ 3>

ステージ 2 で得られた細胞から培地を除去し、PBS で洗浄後、 5 ng/ml TGF β 1 (Peprotech, 100-21C)、 $0.5\mu\text{M}$ Dorsomorphin (AMPK Inhibitor, Compound C (Merck, 171260))、0.1% 2-メルカプトエタノール (1000X)、1% GlutaMAX (100X)、10% KnockOut SR、0.1 mM MEM NEAA、および 0.5% PenStrep を含有する DMEM/F12 を添加した培地へ交換し、さらに浮遊培養にて 37℃、5% CO_2 雰囲気下で 15 日間から 22 日間培養した。このとき、3 日に 1 度同じ条件の培地へ交換した。得られた細胞の SIX2-tdTomato 陽性細胞率をフローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン) を用いて評価したところ、 $21.5 \pm 2.0\%$ であった (図 1 B)。

[実施例 3]

[SIX2 陽性細胞の誘導方法 2]

<ステージ 1>

実施例 1 の方法で得られた OSR1-GFP & SIX2-tdTomato レポーターヒト iPS 細胞株を、誘導方法 1 のステージ 1 に記載した方法と同じ方法で、SNL 細胞をフィーダー細胞として用いて 10cm ディッシュ上でコンフルエントになるまで培養した。ここへ CTK 溶液を加えて解離させ、フィーダー細胞を除去した後、 $1\mu\text{M}$ TTNPB (Sigma, T3757)、 $1\mu\text{M}$ CHIR99021、1% GlutaMAX (100X)、2% FBS、および 0.5% PenStrep を含有する DMEM/F12 培地に懸濁させ、非接着プレート (LOW CELL BIND 6WELL DISH) へ 1 ウェルあたり 10cm ディッシュから得られた細胞懸濁液の $1/3 \sim 1/6$ 量を移し、浮遊培養にて 37℃、5% CO_2 雰囲気下で 2 日間培養した。

<ステージ 2>

ステージ 1 で得られた細胞塊を、マトリゲルによりコートしたディッシュまたは Synthemax によりコートしたディッシュ（誘導方法 1 のステージ 2 に記載の方法で調製）へ移し、 $1\mu\text{M}$ TTNPB、0.1%2-メルカプトエタノール（1000X）、1% GlutaMAX（100X）、10%KnockOut SR、0.1 mM MEM NEAA、および 0.5%PenStrep を含有する DMEM/F12 を添加した培地へ交換し、接着培養にて 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 3 日間から 9 日間培養した。このとき、3 日に 1 度同じ条件の培地へ交換した。

<ステージ 3>

ステージ 2 で得られた細胞から培地を除去し、PBS で洗浄後、5 ng/ml TGF β 1、 $0.5\mu\text{M}$ Dorsomorphin、0.1%2-メルカプトエタノール（1000X）、1%GlutaMAX（100X）、10%KnockOut SR、0.1 mM MEM NEAA、および 0.5%PenStrep を含有する DMEM/F12 を添加した培地へ交換し、さらに浮遊培養にて 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 12 日間から 22 日間培養した。このとき、3 日に 1 度同じ条件の培地へ交換した。得られた細胞において SIX2-tdTomato 陽性細胞率をフローサイトメーターを用いて評価したところ、 $20.6\pm 5.3\%$ であった（図 1 C）。

[実施例 4]

[SIX2 陽性細胞の誘導方法 3]

<ステージ 1>

実施例 1 の方法で得られた OSR1-GFP & SIX2-tdTomato レポーターヒト iPS 細胞株を、誘導方法 1 のステージ 1 に記載した方法と同じ方法で、SNL 細胞をフィーダー細胞として用いて 10cm ディッシュ上でコンフルエントになるまで培養した。ここへ CTK 溶液を加えて解離させ、フィーダー細胞を除去し、Accutase(TM) (Innovative Cell Technologies、AT-104) を加えて iPS 細胞を単一細胞へ分散させた。次いで、 $10\mu\text{M}$ Y-27632 (Wako、253-00513)、 $1\mu\text{M}$ CHIR99021、 $1\mu\text{M}$ TTNPB、1% GlutaMAX（100X）、2%FBS、および 0.5%PenStrep を含有する DMEM/F12 培地に懸濁させ、0.1%ゼラチン (Gelatin from porcine skin, Type A (Sigma、G1890)) でコーティングしたディッシュに上記細胞懸濁液 (1×10^5 細胞/ウェル (96 ウェルの場合)) を移し、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で接着培養にて 2 日間培養した。

<ステージ 2>

ステージ 1 で得られた細胞を PBS で洗浄し、 $1\mu\text{M}$ TTNPB、0.1%2-メルカプトエタノール (1000X)、1%GlutaMAX (100X)、10%KnockOut SR、0.1mM MEM NEAA、および 0.5%PenStrep を含有する DMEM/F12 を添加した培地へ交換し、接着培養にて 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 3 日間から 9 日間培養した。このとき、3 日に 1 度同じ条件の培地へ交換した。

<ステージ 3>

ステージ 2 で得られた細胞へ Accutase(TM)を加えて解離させ、OSR1 (GFP) を指標として FACS により OSR1 陽性細胞をソーティングした。得られた OSR1 陽性細胞を 5 ng/ml TGF β 1、 $0.5\mu\text{M}$ Dorsomorphin、0.1%2-メルカプトエタノール (1000X)、1%GlutaMAX (100X)、10%KnockOut SR、0.1 mM MEM NEAA、および 0.5%PenStrep を含有する DMEM/F12 を添加した培地中で、非接着プレート (LOW CELL BIND 6WELL DISH) へ 1×10^6 細胞/ウェルを移し、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で浮遊培養にて 2 日間培養した。得られた細胞塊をマトリゲル (BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced) によりコートしたディッシュへ移し、5ng/ml TGF β 1、 $0.5\mu\text{M}$ Dorsomorphin、0.1%2-メルカプトエタノール (1000X)、1%GlutaMAX (100X)、10% KnockOut SR、0.1 mM MEM NEAA、および 0.5%PenStrep を含有する DMEM/F12 中で、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 2 日から 13 日間、接着培養した。このとき、3 日に 1 度同じ条件の培地へ交換した。得られた細胞において SIX2-tdTomato 陽性細胞率をフローサイトメーターを用いて評価したところ、 $31.1\pm 10.0\%$ であった(図 1 D)。

[実施例 5]

[Dorsomorphin の代替物での検討]

SIX2 陽性細胞の誘導方法 1 のステージ 3 において、Dorsomorphin を 100ng/ml Noggin (Peprotech)、 $0.5\mu\text{M}$ LDN193189 (Axon MedChem、1509) または $0.5\mu\text{M}$ DMH1 (Tocris、4126) へ変更して同様に分化誘導したところ、それぞれ、SIX2-tdTomato 陽性細胞率は 7.5%、20.4%または 15.4%であった (それぞれ、図 2 B、C および D)。

[TGF β 1 の代替物での検討]

SIX2 陽性細胞の誘導方法 1 のステージ 3 において、TGF β 1 を $50\mu\text{M}$ IDE1 (Tocris)

または 50 μ M IDE2 (Tocris) へ変更して同様に分化誘導したところ、それぞれ、SIX2-tdTomato 陽性細胞率は 8.4%、39.4%であった (図 2 E および F)。

[組み合わせでの検討]

SIX2 陽性細胞の誘導方法 1 のステージ 3 において、Dorsomorphin を 0.5 μ M LDN193189 へ変更し、TGF β 1 を 10ng/ml TGF β 2 (Peprotech) または 10ng/ml TGF β 3 (R&D) へ変更して同様に分化誘導したところ、それぞれ、SIX2 陽性細胞率は 8.6%、9.3%であった (図 2 G および H)。

[実施例 6]

[OSR1-GFP & SIX2-tdTomato knock-in ヒト iPS 細胞株の樹立]

実施例 1 に記載と同様の方法を用いて、Mae S, et al, Nat Commun. 4:1367, 2013 に記載の OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株 (3D45) から、OSR1-GFP & SIX2-tdTomato レポーターiPS ヒト細胞株 (4A6C3-10) を作製した。

[実施例 7]

[SIX2 陽性細胞の誘導方法 4]

<ステージ 1>

実施例 6 の方法で得られた OSR1-GFP & SIX2-tdTomato レポーターヒト iPS 細胞株

4A6C3-10 を、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) 及び 5ng/ml 組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、Wako) を添加した霊長類 ES 培地 (ReproCELL) を含む 10cm ディッシュ上で、胎生 12.5 日 ICR マウス胚由来マウス胚性線維芽細胞 (MEF) 又は SNL フィーダー細胞 (McMahon, A. P. and Bradley, A. (1990) Cell 62 ; 1073-1085) (15.5 μ g/ml のマイトマイシン (協和発酵キリン) で 2~3 時間処理し、 2×10^5 細胞/6cm ディッシュで播種) をフィーダー細胞として用いて、37°C、2~5%CO₂ 雰囲気下で 70%~80%コンフルエントになるまで培養した。細胞を含む 10cm プレートに PBS でリンスし、CTK 溶液 (PBS 中、0.25% Trypsin (Invitrogen)、0.1% Collagenase IV (Invitrogen)、20% KnockOut SR (KSR、Invitrogen) 及び 1 mM CaCl₂) で 37°C、4 分間処理した。CTK 溶液を PBS でのリンスにより除去した後、0.1 mM MEM NEAA (Invitrogen)、1000 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、0.55 mM 2-メルカプトエタノール (Invitrogen)、

及び 20% KSR を含有する DMEM/F12+Glutamax (Invitrogen) に置き換えた。次いで、細胞をセルスクレーパーで掻きとり、0.2%ゼラチンコートした 6cm プレートに播いて、フィーダー細胞を除去した。1 時間後、細胞を 500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン及び 2%FBS (HyClone) を含有する DMEM/F12+Glutamax [ステージ 1 培地] で洗浄し、100 ng/ml 組換えヒト/マウス/ラット Activin A (R&D systems) 及び 1 μ M CHIR99021 を含有するステージ 1 培地を含む超低接着ディッシュ (Corning 3471) に移し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 2 日間培養した。

<ステージ 2>

細胞を中間中胚葉へ分化させるために、ステージ 1 で得られた細胞塊 (胚様体 (EB)) を、Synthemax II (Corning) によりコートした 24 ウェルプレートへ移し、0.1 mM MEM NEAA、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、0.55 mM 2-メルカプトエタノール、10%KSR、100 ng/ml BMP7 (recombinant human BMP7、R&D systems)、及び 1 μ M CHIR99021 を含有する DMEM/F12+Glutamax へ交換し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下で 3 日間培養した。

<ステージ 3>

ステージ 2 の後、培地を、0.1 mM MEM NEAA、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、0.55 mM 2-メルカプトエタノール、10%KSR、1 μ M TTNPB (Sigma T3757) 及び 5 ng/ml TGF β 1 (Peprotech) を含有する DMEM/F12+Glutamax へ交換し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 5 日間培養した。培養開始後 2 日目 (ステージ 1 開始 (1 日目) から 8 日目) に同じ条件の培地に交換した。

<ステージ 4>

ステージ 3 の後、培地を、0.1 mM MEM NEAA、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、0.55 mM 2-メルカプトエタノール、10%KSR、5 ng/ml TGF β 1 及び 0.5 μ M DMH1 (Tocris) を含有する DMEM/F12+Glutamax へ交換し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 17 日間培養した (ステージ 1 開始 (1 日目) から全 28 日間の培養。図 3A)。このとき、3 日に 1 度同じ条件の培地に交換した。得られた細胞において OSR1 陽性 SIX2 陽性 (OSR1⁺SIX2⁺) 細胞率を、フローサイトメーターを用いて評価したところ、培養 28 日目で 32.8%であった (図 3B)。また、OSR1⁺SIX2⁺細胞率は、培養 25 日目で最大に達し、その後培養 28 日まで維持していることが確認

された (図 3 D)。

[実施例 8]

[種々の TGF β シグナル刺激剤及び BMP 阻害剤の組み合わせでの検討]

種々の TGF β シグナル刺激剤及び BMP 阻害剤の組み合わせについて、前記 iPS 細胞株 4A6C3-10 から OSR1⁺SIX2⁺細胞への誘導を検討した。具体的には、以下に説明する条件 1)~10) の下で 4A6C3-10 から OSR1⁺SIX2⁺細胞への誘導を検討した。

条件 1) ~10) のステージ 1~2 では、それぞれ実施例 7 のステージ 1~2 と同じ方法を用いた。条件 1) ~7) 及び 10) のステージ 3 では、実施例 7 のステージ 3 と同じ方法を用いた。条件 8) のステージ 3 では、実施例 7 のステージ 3 における 5 ng/ml TGF β 1 及び 1 μ M TTNPB を 5 ng/ml TGF β 2 (Peprtech) に置き換えた培地で培養した。条件 9) のステージ 3 では、実施例 7 のステージ 3 における 5 ng/ml TGF β 1 及び 1 μ M TTNPB を 5 ng/ml TGF β 3 (Peprtech) に置き換えた培地で培養した。各条件のステージ 4 では、実施例 7 のステージ 4 と同じ方法、又は実施例 7 のステージ 4 における 5 ng/ml TGF β 1 及び 0.5 μ M DMH1 を以下のいずれかに置き換えた培地で培養した：条件 1) DMSO のみ、条件 2) 5 ng/ml TGF β 1、条件 3) 0.5 μ M DMH1、条件 4) 5 ng/ml TGF β 1 及び 100 ng/ml Noggin (Peprtech)、条件 5) 5 ng/ml TGF β 1 及び 0.5 μ M Dorsomorphin (Merck)、条件 6) 5 ng/ml TGF β 1 及び 0.5 μ M LDN193189 (Axon MedChem)、条件 7) 5 ng/ml TGF β 1 (Peprtech) 及び 0.5 μ M DMH1 (実施例 7 と同じ)、条件 8) 5 ng/ml TGF β 2 (Peprtech) 及び 0.5 μ M DMH1、条件 9) 5 ng/ml TGF β 3 (Peprtech) 及び 0.5 μ M DMH1、条件 10) 50 μ M IDE2 (Tocris) 及び 0.5 μ M DMH1。

その結果 (図 4)、OSR1⁺SIX2⁺細胞への誘導には、TGF β シグナル刺激剤としては TGF β 1 を、BMP 阻害剤としては DMH1 を用いることが効果的であることが確認された。実施例 7 におけるステージ 4 において、5 ng/ml TGF β 1 及び 0.5 μ M DMH1 と共に、TGF β レセプター 1 阻害剤である SB431542 (Tocris) (10 μ M) を含む培地で培養した場合 (条件 11))、OSR1⁺SIX2⁺細胞への分化が抑制された。

[実施例 9]

[種々のヒト iPS 細胞及びヒト ES 細胞での検討]

15 種のヒト iPS 細胞 (末梢血由来 iPS 細胞 585A1、585B1、604A1、604B1、648A1、

648B1、692D2；臍帯血由来 iPS 細胞 606A1、606B1、610B1；成人皮膚線維芽細胞 (aHDF) 由来 iPS 細胞 201B6、201B7、253G1、253G4；及び 4A6C3-10) 及び 3 種の ヒト ES 細胞 (khES1、khES3、H9) (Proc Natl Acad Sci USA 109, 12538-12543 (2012)、Stem Cells 31, 458-466 (2013)、) を実施例 7 に記載の方法と同じ方法で処理し、定量的 RT-PCR (Nat Commun 4, 1367, (2013)) により OSR1 及び SIX2 の遺伝子発現を分析した。実施例 7 に記載の方法により、4A6C3-10 以外の複数の細胞株において OSR1 及び SIX2 の発現が確認され (図 5)、本方法が他の iPS 細胞及び ES 細胞にも適用可能であることが確認された。

[実施例 10]

[発現マーカー分析]

実施例 7 での誘導工程で処理した 4A6C3-10 における各種発現マーカーを RT-PCR または定量 RT-PCR で分析した。結果を図 3 C および E に示す。ステージ 1 後の細胞では初期の後方中胚葉 (posterior nascent mesoderm) のマーカーである BRACHYURY 及び TBX6 の発現が確認され、ステージ 2 後の細胞では中間中胚葉のマーカーである OSR1 の発現が確認された (図 3 C)。その後、後腎間充織 (間葉) マーカーである WT1、PAX2、SIX2、及び後方 (posterior) HOX 遺伝子の発現が活性化された (図 3 C)。培養 28 日目の OSR1⁺SIX2⁺細胞において、腎前駆細胞マーカーである CITED1、EYA1、PAX2、WT1、SALL1、ITGA8、CDH11、GDNF、HOXA11 及び HOXD11 が発現されており、一方、当該細胞において間質マーカーである FOXD1、中腎管マーカー、尿管芽である HOXB7 は検出されなかった (図 3 E)。

[腎前駆細胞の評価]

実施例 7 での誘導工程で処理した培養 28 日目の OSR1⁺SIX2⁺細胞をフローサイトメトリーで単離し、Synthemax II をコートした 96 ウェルプレート上に 3.0×10^4 細胞/ウェルで播種し、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 を添加した REGM 培地 (LONZA) 中で 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 7 日間培養した。得られた細胞を NEPHRIN (糸球体ポドサイトマーカー)、AQP1 および MEGALIN (近位尿細管マーカー) ならびに UROMUCOID (ヘンレのループマーカー) に対する免疫染色によって、各マーカーの陽性細胞を確認した (図 6 A)。

続いて、同 OSR1⁺SIX2⁺細胞を、 50 ng/ml BMP7 (R&D systems) 及び $10 \mu\text{M}$ Y-27632

(Wako) を添加した UBC 培養上清 (以下参照) を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレート (Lipidure Coat、NOF) に 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 24 時間培養した。次いで、培地を 50 ng/ml BMP7、 $0.5 \mu\text{M}$ BIO (Wako)、及び $10 \mu\text{M}$ Y-27632 を添加した UBC 培養上清に置き換え、2 から 3 日間培養した後、細胞を回収し、マイトマイシン処理した Wnt4 を発現する NIH3T3 (Osafune K, et al. (2006), Development 133:151-61) 上に 3.0×10^4 細胞/ウェル (24 ウェルプレート) で播種し、5 から 7 日間培養した。得られた細胞を Lotus Tetragonolobus lectin (LTL) (近位尿細管マーカー)、LAMININ (極性上皮細胞マーカー)、CDH1 (遠位尿細管マーカー) ならびに PODOCALYXIN および WT1 (糸球体ポドサイトマーカー) に対する免疫染色によって、各マーカーの陽性細胞を確認した (図 6 B)。

さらに、OSR1⁺SIX2⁺細胞を E11.5 のマウス胚脊髄と器官培養した。詳細には、OSR1⁺SIX2⁺細胞を、50 ng/ml BMP7 (R&D systems) 及び $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako) を添加した UBC 培養上清 (以下参照) を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレート (Lipidure Coat、NOF) に 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 24 時間培養した。次いで、培地を 50 ng/ml BMP7、 $0.5 \mu\text{M}$ BIO (Wako)、及び $10 \mu\text{M}$ Y-27632 を添加した UBC 培養上清に置き換え、2 から 3 日間培養した後、細胞を回収し、E11.5 のマウス胚脊髄と共に $0.4 \mu\text{m}$ 孔を有するポリカーボネート (polycarbonate) フィルター (Millipore) 上の空気-培養液の境界において 37°C で培養した。培養液側には 500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% FBS を添加した DMEM (Nacalai tesque) を用いた (Osafune K, et al. (2006), Development 133:151-61)。一週間後得られた細胞を LTL、LAMININ、CDH1、PODOCALYXIN および WT1 に対する免疫染色によって、各マーカーの陽性細胞を確認した (図 6 C)。

同様に、OSR1⁺SIX2⁺細胞を E11.5 のマウス胚後腎と器官培養した。詳細には、OSR1⁺SIX2⁺細胞を、50 ng/ml BMP7 (R&D systems) 及び $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (Wako) を添加した UBC 培養上清 (以下参照) を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレート (Lipidure Coat、NOF) に 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で 24 時間培養した。次いで、培地を 50 ng/ml BMP7、 $0.5 \mu\text{M}$ BIO (Wako)、及び

10 μ M Y-27632 を添加した UBC 培養上清に置き換え、2 から 3 日間培養した後、細胞を回収し、Accumax を用いて分離した。ICR マウスから E11.5 のマウス胚後腎を抽出し、DMEM 中で切断し、0.05% Trypsin-EDTA 中で 10 分間放置し、ピペティングにより分離した。分離したマウス胚後腎細胞は、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% FBS を添加した DMEM 中で、37°C、10 分間静置した後、40 μ m セルストレーナー (BD) でろ過した。得られた 5.0×10^5 細胞のマウス胚後腎細胞を 5.0×10^5 細胞の前記 Accumax で分離した OSR1⁺SIX2⁺細胞と混合し、紡錘底低接着 96 ウェルプレート上、10 μ M Y-27632、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% FBS を添加した DMEM 中で一昼夜培養し、凝集塊を形成させた。得られた凝集塊を 0.4 μ m 孔を有するポリカーボネート (polycarbonate) フィルター (Millipore) 上の空気-培養液の境界において 37°C で培養した。培養液側には 500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% FBS を添加した DMEM (Nacalai tesque) を用いた (Uchino, S. et al. JAMA 294, 813-818 (2005))。一週間後得られた細胞を CDH6 (腎小胞マーカー)、LTL、LAMININ、CDH1、PODOCALYXIN および WT1 に対する免疫染色によって、各マーカーの陽性細胞を確認した (図 6 D)。

さらに、OSR1⁺SIX2⁺細胞を、50 ng/ml BMP7 (R&D systems) 及び 10 μ M Y-27632 (Wako) を添加した UBC 培養上清 (以下参照) を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレート (Lipidure Coat、NOF) に 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下で 24 時間培養した。次いで、培地を 50 ng/ml BMP7、0.5 μ M BIO (Wako)、及び 10 μ M Y-27632 を添加した UBC 培養上清に置き換え、2 から 3 日間培養した後、細胞を回収し、免疫不全マウス (NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J (Charles river)) の副睾丸脂肪組織へ移植し、30 日後移植部位を回収したところ、LTL および LAMININ 陽性の近位尿細管様構造を確認した (図 6 E)。

さらに、実施例 7 での誘導工程で処理した培養 28 日目の各分画の細胞 (OSR1⁺SIX2⁻、OSR1⁺SIX2⁻、OSR1⁻SIX2⁺、および OSR1⁺SIX2⁺) を E11.5 のマウス胚尿管芽と器官培養した。詳細には、iPS 細胞由来の細胞を、50 ng/ml BMP7 (R&D systems) 及び 10 μ M Y-27632 (Wako) を添加した UBC 培養上清 (以下参照) を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレート (Lipidure Coat、NOF) に 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下で 24 時間培養した。次いで、培地を 50 ng/ml

BMP7、 $0.5\mu\text{M}$ BIO (Wako)、及び $10\mu\text{M}$ Y-27632 を添加した UBC 培養上清に置き換え、2 から 3 日間培養した後、細胞を回収し、Accumax を用いて分離した。ICR マウスから E11.5 のマウス胚尿管芽を抽出した。得られた 5.0×10^5 細胞のマウス胚尿管芽を 5.0×10^5 細胞の前記 Accumax で分離した $\text{OSR1}^-\text{SIX2}^-$ 、 $\text{OSR1}^+\text{SIX2}^-$ 、 $\text{OSR1}^-\text{SIX2}^+$ 、および $\text{OSR1}^+\text{SIX2}^+$ の各細胞群と混合し、紡錘底低接着 96 ウェルプレート上、 $10\mu\text{M}$ Y-27632、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% FBS を添加した DMEM 中で一昼夜培養し、凝集塊を形成させた。得られた凝集塊を $0.4\mu\text{m}$ 孔を有する polycarbonate フィルター (Millipore) 上の空気-培養液の境界において 37°C で培養した。培養液側には 500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% FBS を添加した DMEM (Nacalai tesque) を用いた (Uchino, S. et al. JAMA 294, 813-818 (2005))。一週間後得られた細胞凝集塊を観察したところ、 $\text{OSR1}^+\text{SIX2}^+$ 細胞との凝集塊においてのみ管構造を確認した (図 6 F 左図)。さらに、 $\text{OSR1}^+\text{SIX2}^+$ 細胞との凝集塊に対して、DBA (尿管芽マーカー) に対する免疫染色を行ったところ、マウス尿管芽由来の分枝が確認された (図 6 F 右図)。

以上より、実施例 7 に記載の方法で分化誘導した $\text{OSR1}^+\text{SIX2}^+$ 細胞は、腎前駆細胞であることが示された。

[UBC 培養上清]

Ureteric Bud 細胞 (UBC) 馴化培地を文献 (Am J Physiol 273, F757-767 (1997)) 記載の方法を改良した方法で作製した。UBC (Dr Sakurai から譲受、Proc Natl Acad Sci USA 94, 6279-6284 (1997)) を、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含有する最小必須培地 (MEM; Invitrogen) で培養した。80% コンフルエントになったところで細胞を PBS でリンスし、培地を 0.1mM MEM NEAA、500 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、及び 0.55mM 2-メルカプトエタノール、10% KSR を含有する DMEM/F12+Glutamax で置き換えた。次いで、細胞を 3 日間培養して培養上清を生成した。培養上清は使用前に $0.22\mu\text{m}$ フィルターでろ過した。

[実施例 1 1]

[ヒト iPS 由来腎前駆細胞の治療効果]

実施例 7 に記載の方法で分化誘導した 25 日～28 日目のヒト iPS 由来腎前駆細胞 ($\text{OSR1}^+\text{SIX2}^+$ 細胞; RP-OS と称する) 又はヒト iPS 由来腎前駆細胞を含む細胞

群 (OSR1⁺SIX2⁻細胞及び OSR1⁺SIX2⁺細胞 ; hiPSC-RP と称する) をフローサイトメトリーで単離し、50 ng/ml BMP7 (R&D systems) 及び 10 μ M Y-27632 (Wako) を添加した UBC 培養上清(上記)を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレート(Lipidure Coat、NOF) に 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 24 時間培養した。次いで、培地を 50 ng/ml BMP7、0.5 μ M BIO (Wako)、及び 10 μ M Y-27632 を添加した UBC 培養上清に置き換え、さらに 24 時間培養した。コントロールとして未分化ヒト iPS 細胞 (4A6C3-10) を、10 μ M Y-27632 を添加した霊長類 ES 細胞培地 (ReproCELL) を含む紡錘底低接着 96 ウェルプレートに 1.0×10^5 細胞/ウェルで播種し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 48 時間培養した。培養後の各細胞を生理食塩水で洗浄し、培地を除去した。その後、以下に記載のように、15 個の hiPSC-RP の細胞塊を急性腎障害 (AKI) モデルマウスの腎臓被膜下に移植した。また、OSR1⁺SIX2⁺細胞の組織分化を確認する実験 (図 7A および B) として、以下に記載のように、5 個の RP-OS の細胞塊を AKI モデルマウス及び慢性腎不全モデルマウスの腎臓実質にピペッティングで注入した。

[マウス急性腎障害 (AKI) モデル試験]

マウス虚血再灌流 AKI モデルを公知の方法 (Aging Cell 8, 192-200 (2009)、J Am Soc Nephrol 20, 1544-1555 (2009)、J Am Soc Nephrol 25, 316-328 (2014)) に従って作製した。6 週齢の雌性免疫不全マウス (NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J (Charles river)) をイソフルラン吸入により麻酔し、37°C で維持した。側腹切開して右腎摘出を行った後、非外傷的微小血管用クランプ (夏目製作所、日本国) を使用して、45 分間左腎動脈を閉塞した。クランプを外したのち、RP-OS、hiPSC-RP、又は 4A6C3-10 を移植した (コントロールマウスには生理食塩水を注入した)。マウスの末梢血中の腎機能マーカーである血中尿素窒素 (BUN) 及び血清クレアチニン (Cr) レベルを DRI-CHEM 7000VZ (富士フイルム、日本国) を使用して測定した。AKI 状態の確立は、虚血再灌流後に腎梗塞を伴うことなく 2 日目に BUN レベルが上昇 (>41 mg/dl) していることにより確認した。腎組織の解析においては虚血再灌流後 (I/R) 3 日目に過ヨウ素酸-Schiff (PAS) 又はマッソントリクローム (MT) 染色で染色した。

[マウス慢性腎不全モデル試験]

マウス慢性腎不全モデル（5/6 腎摘出モデル）を公知の方法（Nephrol Dial Transplant 26, 832-838 (2011)）に従って作製した。6 週齢の雌性免疫不全マウス（NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J）をイソフルラン吸入により麻酔し、37℃で維持した。右腎摘出を行った後、左腎臓の上下両極を切除した。RP-OS の細胞塊を術後 2 週間で移植した。移植 3 日後又は 2 週間後にマウスを屠殺し、腎組織切片を免疫染色で試験した。

[結果]

RP-OS の腎実質移植後 2 週間目の AKI モデル（図 7 A）及び慢性腎不全モデル（図 7 B）の両方において、移植した RP-OS のいくらかが宿主の腎臓に組み込まれ、近位尿細管マーカー LTL 及び AQP1 陽性細胞に分化していた。しかし、RP-OS の腎実質移植は、両モデルにおいて腎機能に対する明確な効果を示さなかった（データは示さず）。静脈内注射と比較して腎臓被膜下へ移植を行うことにより多数の間葉系幹細胞を損傷された腎臓に直接送達することが報告されている（Transplant Proc 41, 947-951 (2009)）ことから、本発明者らは、hiPSC-RP の腎臓被膜下への移植による治療効果を試験した。その結果、虚血再灌流後 2、4、6 日目でコントロール群及び未分化ヒト iPS 細胞移植群と比較して、hiPSC-RP 移植群において BUN レベル及び血清 Cr レベルが有意に低下した（図 7 C）。組織学的分析により、腎実質領域の円柱を伴う拡張尿細管がコントロール群と比較して hiPSC-RP 移植群において有意に小さく、線維化領域も hiPSC-RP 移植群で小さいことが確認された（図 7 D 及び E）。hiPSC-RP は宿主の腎臓に組み込まれなかったことから、本プロトコルで確認された hiPSC-RP の治療効果は主にパラクライン効果に基づくことが示唆された。

産業上の利用可能性

以上詳述したように、本発明は、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞を分化誘導する方法を提供する。これにより、本方法で製造された腎前駆細胞は、腎不全等の腎疾患の再生医療に使用され得る。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として

本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 中間中胚葉細胞を、TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を含む培地で培養し、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞を誘導する工程を含む、中間中胚葉細胞から腎前駆細胞の製造方法。
2. 前記腎前駆細胞が SIX2 陽性細胞である、請求項 1 に記載の方法。
3. 前記中間中胚葉細胞が OSR1 陽性細胞である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. 前記 TGF β シグナル刺激剤が、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、IDE1 および IDE2 からなる群から選択される 1 以上の物質である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
5. 前記 BMP 阻害剤が、Dorsomorphin、Noggin、LDN193189 および DMH1 からなる群から選択される 1 以上の物質である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
6. 前記 TGF β シグナル刺激剤が TGF β 1 であり、前記 BMP 阻害剤が DMH1 である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
7. 前記中間中胚葉細胞が、多能性幹細胞から誘導された中間中胚葉細胞である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
8. 前記中間中胚葉細胞が、以下の工程 (i) および (ii) を含む方法で製造された中間中胚葉細胞である、請求項 7 に記載の方法。
 - (i) 多能性幹細胞を、Activin A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および
 - (ii) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程。
9. 前記工程 (ii) が以下の工程 (ii-1) および (ii-2) を含む、請求項 8 に記載の方法。
 - (ii-1) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および
 - (ii-2) 工程 (ii-1) で得られた細胞を、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン

酸誘導体から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程。

10 前記工程 (ii-1) が、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤を含む培地で培養する工程であり、前記工程 (ii-2) が、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体を含む培地で培養する工程である、請求項 9 に記載の方法。

11 前記 GSK3 β 阻害剤が CHIR99021 である、請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

12 前記レチノイン酸誘導体が、AM580 または TNPB である、請求項 8 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

13 前記多能性幹細胞が人工多能性幹 (iPS) 細胞である、請求項 7 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

14 前記 iPS 細胞がヒト iPS 細胞である、請求項 13 に記載の方法。

15 多能性幹細胞から腎前駆細胞を製造する方法であって、以下の工程 (i) から (iii) を含む、方法：

(i) 多能性幹細胞を、Activin A、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、

(ii) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7、GSK-3 β 阻害剤およびレチノイン酸誘導体からなる群から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(iii) 工程 (ii) で得られた細胞を、TGF β シグナル刺激剤および BMP 阻害剤を含む培地で培養する工程。

16 前記腎前駆細胞が SIX2 陽性細胞である、請求項 15 に記載の方法。

17 前記工程 (ii) で得られた細胞が OSR1 陽性細胞である、請求項 15 または 16 に記載の方法。

18 前記 TGF β シグナル刺激剤が、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、IDE1 および IDE2 からなる群から選択される 1 以上の物質である、請求項 15 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

19 前記 BMP 阻害剤が、Dorsomorphin、Noggin、LDN193189 および DMH1 からなる群から選択される 1 以上の物質である、請求項 15 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

20 前記 TGF β シグナル刺激剤が TGF β 1 であり、前記 BMP 阻害剤が DMH1

である、請求項 15 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

21. 前記工程 (ii) が以下の工程 (ii-1) および (ii-2) を含む、請求項 15 から 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

(ii-1) 工程 (i) で得られた細胞を、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程、および

(ii-2) 工程 (ii-1) で得られた細胞を、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体から選択される 1 以上の物質を含む培地で培養する工程。

22. 前記工程 (ii-1) が、BMP7 および GSK-3 β 阻害剤を含む培地で培養する工程であり、前記工程 (ii-2) が、TGF β シグナル刺激剤およびレチノイン酸誘導体を含む培地で培養する工程である、請求項 21 に記載の方法。

23. 前記 GSK3 β 阻害剤が CHIR99021 である、請求項 15 から 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

24. 前記レチノイン酸誘導体が、AM580 または TTNPB である、請求項 15 から 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

25. 前記多能性幹細胞が人工多能性幹 (iPS) 細胞である、請求項 15 から 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

26. 前記 iPS 細胞がヒト iPS 細胞である、請求項 25 に記載の方法。

27. 請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された、腎前駆細胞。

28. 請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された腎前駆細胞を含む、医薬組成物。

29. 請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された腎前駆細胞を含む、腎疾患治療剤。

30. 請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された腎前駆細胞を、治療を必要とする患者に投与する工程を包含する、腎疾患を治療する方法。

31. 腎疾患の治療に使用するための、請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された腎前駆細胞。

32. 腎疾患の治療用の医薬組成物の製造における、請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された腎前駆細胞の使用。