

明 細 書

発明の名称：血液細胞を用いた組織・臓器の作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、血液細胞を用いた組織・臓器の作製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、様々な機能細胞へ分化する能力を有するiPS細胞などの多能性幹細胞を利用して、創薬スクリーニングや再生医療に有益なヒト機能細胞を分化誘導により創出する方法が注目されている。これまでに、本発明者らは、成体組織で見られる血管内皮細胞、間葉系細胞をからなる秩序だった立体構造を有するヒト組織・臓器の再構築法を確立した(非特許文献1：Takebe T. et al., Nature (2013)、特許文献1：ヒト組織・臓器の作製方法 WO 2013/047639 A1)。

[0003] 一方、これまでの造血細胞と肝細胞の成熟に関する知見としてマウスの発生過程において造血細胞から産生されるサイトカインが肝細胞の成熟を促すという報告がなされている(非特許文献2：Kamiya A., et al., EMBO J. 1999 18:2127-3、非特許文献3：Kinoshita T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96:7265-70(1999))。また、造血系細胞と未成熟肝細胞を混ぜて免疫不全動物に移植しヒト肝細胞とヒト造血細胞を同時に生着する事を示した研究は報告されているが、造血細胞との同時移植による肝細胞の成熟度に関する知見は報告されていない(非特許文献4：Bility MT., et al., Nat Protoc. 7:1608-17(2012)、非特許文献5：Washburn ML., et al., Gastroenterology. 140:1334-44.(2011))。更に、これまでin vitroで再構築された立体組織中に造血細胞を導入することにより、目的とする機能細胞の成熟における重要性を示した知見は無い。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Takebe T. et al., Nature (2013)

非特許文献2: Kamiya A., et al., EMB J. 1999 18:2127-3

非特許文献3: Kinoshita T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96: 7265-70(1999)

非特許文献4: Bility MT., et al., Nat Protoc. 7:1608-17(2012)

非特許文献5: Washburn ML., et al., Gastroenterology. 140:1334-44. (2011)

特許文献

[0005] 特許文献1: WO 2013/047639 A1

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 従来のヒト組織・臓器作製法で医療応用を目指す場合には、成人1人あたりを対象とした場合の製造コストが約1,000万円程度と極めて高額であることが技術の普及障壁となっていた。現段階で少なく見積もっても2万人以上の絶対適応患者（肝不全待機中の適応除外・死亡例の国際試算）が存在する現状を鑑みると、汎用技術としてこのような治療技術を広く患者に適応してゆくためには、1細胞あたりの機能を大幅に改善し、コストの大規模削減を実現する改良手法の開発が待望されている状況であった。

[0007] 本発明は、そのような改良手法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、肝内胚葉細胞、血管内皮細胞及び間葉系細胞を共培養する培養系に造血細胞を加えることにより、形成される器官芽のさらなる機能向上に成功した。これまで、ヒト組織・臓器の3次元的な再構築における造血細胞の効果を示した技術はなく、新規性/進歩性の極めて高い方法であると考えられる。

[0009] 本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 血液細胞の存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞、及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養することを含む、器官芽の作製方法。

(2) 器官芽は、成熟することで器官に分化することができる構造体である

(1) 記載の方法。

(3) 血液細胞の非存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞、及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養して作製した器官芽と比較して、機能が向上した器官芽が作製される(1)又は(2)記載の方法。

(4) 足場材料を用いることなく、細胞が培養される(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 血液細胞が、未分化造血細胞を含む(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 未分化造血細胞が、造血前駆細胞及び／又は造血幹細胞である(5)記載の方法。

(7) 血液細胞が、臍帯血に由来する(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 血液細胞が、臍帯血の単核球画分の細胞である(7)記載の方法。

(9) 組織又は臓器細胞が、多能性幹細胞から誘導された未分化細胞である(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である(9)記載の方法。

(11) 多能性幹細胞がヒト由来である(9)又は(10)記載の方法。

(12) 器官芽が肝芽である(1)～(11)のいずれかに記載の方法。

(13) 血液細胞の非存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養して作製した肝芽と比較して、アルブミンの分泌能が向上した肝芽が作製される(12)記載の方法。

(14) 血液細胞の非存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養して作製した肝芽と比較して、肝細胞分化マーカー遺伝子の発現が上昇した肝芽が作製される(12)又は(13)記載の方法。

(15) 肝細胞分化マーカー遺伝子が、 α フェトプロテイン、アルブミン、CYP3A7、トリプトファン代謝酵素TD02、及びナトリウム・タウロコール酸共輸

送体からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーである(14)記載の方法。

(16)(1)～(15)のいずれかに記載の方法によって作製された器官芽。

(17)(16)記載の器官芽を非ヒト動物に移植し、組織又は臓器に分化させることを含む、組織又は臓器の作製方法。

(18)(16)記載の器官芽をヒト又は非ヒト動物に移植することを含む、器官芽の移植方法。

(19)(16)記載の器官芽をヒト又は非ヒト動物に移植し、組織又は臓器に分化させることを含む、組織又は臓器の再生又は機能回復方法。

(20)(16)記載の器官芽を非ヒト動物に移植し、組織又は臓器に分化させることを含む、非ヒトキメラ動物の作製方法。

(21)(16)記載の器官芽、(17)記載の方法によって作製された組織及び臓器、並びに(20)記載の方法によって作製された非ヒトキメラ動物からなる群より選択される少なくとも一つを用いて、薬剤を評価する方法。

[0010] これまでの造血細胞と肝細胞の成熟に関する知見として、マウスの発生過程において造血細胞から産生されるサイトカイン(OSM)が肝細胞の成熟を促すという報告がなされている(非特許文献2: Kamiya A., et al., EMBO J. 1999 18:2127-3、非特許文献3: Kinoshita T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 96:7265-70(1999))。しかしながら、従来の平面培養においては、すでにOSMを添加しているにも関わらず全く分化誘導が不十分であった。一方、本発明者らの特許(特許文献1: ヒト組織・臓器の作製方法 WO 2013/047639 A1)は3種の細胞から器官芽を作製するものであるが、造血細胞を含む4種類以上の細胞から器官芽が形成でき、さらにその成熟を促進するという方法論については、全く記載も示唆もない。よって、これまでin vitroで再構築された器官芽中に第4の細胞(造血細胞)を導入すること、さらには、目的とする機能細胞の成熟における重要性を示した知見には大

きな新規性・進歩性がある。

発明の効果

[0011] これまでに、本発明者らは、従来の技術では全く達成されていなかった、血管系が適切に配置されたヒト組織・臓器を作成するための基盤技術の構築に成功している(ヒト組織・臓器の作発明は、上記技術を飛躍的に発展させるため、新たに造血系細胞というプレイヤーを加えることにより、直接的ないし間接的な細胞作用を通じて、目的とする機能細胞の成熟をはるかに促進する手法を実現した。これまで充分ではなかった代謝機能など、*in vitro*での機能成熟を達成する全く新しい技術である。具体的には、本技術により、肝細胞について、約3-4倍(アルブミン分泌を指標)の機能向上が見られた。これにより、従来必要な細胞数の1/3~4量で同等の機能を発揮すると期待され、その結果、製造コストを1/3-4に抑えることが可能となる。現段階における成人末期肝不全患者1人当たりの治療コストから換算すると、およそ600万円程度の低減が達成されることが期待される。

[0012] 更に、本発明による機能向上の結果として、従来評価が困難であった薬物代謝機能などの検出が期待されることから、*in vitro*での創薬スクリーニングへの応用も可能となる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2015 - 251140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

- [0013] [図1]臍帯血よりセルソーターを用いて造血幹細胞を含む細胞分画の分離。
[図2]血液細胞を含む肝芽作製(左)、血液細胞を含む肝芽での培地中へのアルブミン分泌のELISAによる測定(右)。
[図3]血液細胞を含む肝芽作製での肝分化マーカーの遺伝子発現の定量PCR法による検討。
[図4]血液細胞を含む肝芽作製における血液細胞添加量の検討。
[図5]血液細胞添加量依存的なアルブミン分泌。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0015] 本発明は、血液細胞の存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞、及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養することを含む、器官芽の作製方法を提供する。

[0016] 本発明において「器官芽」とは、成熟することで器官に分化することができる構造体であって、組織又は臓器細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞（未分化間葉系細胞若しくはそれから分化した細胞）、及び血液細胞の四種類の細胞を含む構造体をいう。ある構造体が器官芽であるかどうかは、例えば、その構造体を生体へ移植し、目的の器官に分化できるかどうかを調べること（目的の器官へ分化していれば器官芽であると判断できる。）、及び／又はその構造体が上述した四種類の細胞をすべて含んでいるかどうかを調べること（四種類の細胞をすべて含んでいれば器官芽であると判断できる。）により確認できる。器官芽は、例えば、腎臓、心臓、肺臓、脾臓、食道、胃、甲状腺、副甲状腺、胸腺、生殖腺、脳、脊髄などの器官に分化する器官芽などであってもよいが、肝臓に分化する器官芽（肝芽）、膵臓に分化する器官芽（膵芽）、腸管に分化する器官芽など内胚葉性器官に分化する器官芽が好ましい。ある構造体が内胚葉性器官に分化する器官芽であるかどうかは、マーカーとなるタンパク質の発現を調べることにより確認できる（後述するマーカータンパク質のいずれか一つあるいは複数が発現していれば器官芽であると判断できる。）。例えば、肝芽では、HHEX、SOX2、HNF4A、AFP、ALBなどがマーカーになり、膵芽では、PDX1、SOX17、SOX9などがマーカーになり、腸管に分化する器官芽では、CDX2、SOX9などがマーカーになる。当業者間で使用されている用語のうち、liver bud、liver diverticula、liver organoid、pancreatic (dorsal or ventral) buds、pancreatic diverticula、pancreatic organoid、intestinal bud、intestinal diverticula、intestinal organoid (K. Matsumoto, et al. Science.19;294(5542):559-63.(2001))などは本発明における器官芽に含まれる。

[0017] 本発明において、「血液細胞」とは、生体内から分離した細胞あるいはES

細胞やiPS細胞などの幹細胞から分化誘導した細胞、または、分化細胞に遺伝子導入することにより直接リプログラムした細胞で下記の血液細胞の特徴を有する（例えば、CD34、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD41、CD45、CD56、CD66b、又は、CD235a、CD38、CD90、CD49f、VEGFR2、CD43、CD71、GPA（Glycophorin A）、CD42b、c-kit、CD150、Sca-1、Ter119等のいずれかを発現する）細胞をいう。ある細胞が血液細胞であるかどうかは、CD34、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD41、CD45、CD56、CD66b、または、CD235a、CD38、CD90、CD49f、VEGFR2、CD43、CD71、GPA（Glycophorin A）、CD42b、c-kit、CD150、Sca-1、Ter119等の発現を調べることにより確認できる。本発明において用いる血液細胞は、分化したものであっても、未分化なものであってもよいが、造血前駆細胞、造血幹細胞などの未分化な造血細胞を含むことが好ましい。未分化造血細胞としては、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）などの多能性幹細胞に由来するもの、血液（臍帯血、骨髓血、末梢血など）から採取されるもの、他の分化細胞から直接分化転換（ダイレクトリプログラミング）された血液細胞などを例示することができる。後述の実施例では、臍帯血の単核球(monocyte)画分を取ることで、造血前駆細胞、造血幹細胞が濃縮できたと考えられる。当業者間で使用されている用語のうち、造血幹細胞、血液幹細胞、造血前駆細胞、血液前駆細胞、骨髓系前駆細胞、顆粒球・単球系前駆細胞、顆粒球系前駆細胞、顆粒球、骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球、桿状核球、分葉核球(好中球)、単球系前駆細胞、単球、マクロファージ、組織球、クッパー細胞、肺泡マクロファージ、小膠細胞、破骨細胞、類上皮細胞、巨細胞（ランゲルハンス巨細胞、異物巨細胞、トートン型巨細胞）、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、骨髓性単球、骨髓芽球、好塩基性前骨髓球、好塩基性骨髓球、好塩基性後骨髓球、好塩基球、骨髓芽球、好酸性前骨髓球、好酸性骨髓球、好酸性後骨髓球、好酸性桿状核球、好酸性分葉核球（好酸）、巨核芽球、巨核球、赤芽球、網赤血球、肥満細胞前駆体などは本発明における血液細胞に含まれる。血液細胞は、主としてヒト由来のも

のを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、サメ、エイ、ギンザメ、サケ、エビ、カニなど）由来の血液細胞を用いてもよい。

[0018] 本発明において「血管内皮細胞」とは、血管内皮を構成する細胞、又はそのような細胞に分化することのできる細胞をいう。ある細胞が血管内皮細胞であるかどうかは、マーカータンパク質、例えば、TIE2、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、CD41が発現しているかどうかを調べることにより確認できる（前記マーカータンパク質のいずれか一つあるいは複数が発現していれば血管内皮細胞であると判断できる。）。本発明において用いる血管内皮細胞は、分化したものであっても、未分化なものであってもよい。血管内皮細胞が、分化した細胞であるかどうかは、CD31、CD144により、確認することができる。当業者間で使用されている用語のうち、endothelial cells、umbilical vein endothelial cells、endothelial progenitor cells、endothelial precursor cells、vasculogenic progenitors、hemangioblast (HJ. joo, et al. Blood. 25;118(8):2094-104. (2011))などは本発明における血管内皮細胞に含まれる。好ましい血管内皮細胞は、臍帯静脈由来の血管内皮細胞である。血管内皮細胞は、血管から採取したり、あるいは、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）などの多能性幹細胞から公知の方法に従って作製することができる。血管内皮細胞は、主としてヒト由来のものをを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、サメ、エイ、ギンザメ、サケ、エビ、カニなど）由来の血管内皮細胞を用いてもよい。

[0019] 本発明において「間葉系細胞」とは、主として中胚葉に由来する結合織に存在し、組織で機能する細胞の支持構造を形成する結合織細胞であるが、間葉系細胞への分化運命が決定しているが、まだ間葉系細胞へ分化していない細胞も含む概念である。本発明において用いる間葉系細胞は、分化したもの

であっても、未分化なものであってもよい。ある細胞が未分化間葉系細胞であるかどうかは、マーカータンパク質、例えば、Stro-1、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD133、CD271、Nestinが発現しているかどうかを調べることにより確認できる（前記マーカータンパク質のいずれか一つあるいは複数が発現していれば未分化間葉系細胞であると判断できる。）。また、前項のマーカーのいずれも発現していない間葉系細胞は分化間葉系細胞と判断できる。当業者間で使用されている用語のうち、mesenchymal stem cells、mesenchymal progenitor cells、mesenchymal cells (R. Peters, et al. PLoS One. 30;5(12):e15689. (2010)) などは本発明における間葉系細胞に含まれる。好ましい間葉系細胞は、骨髓由来の間葉系細胞（特に、間葉系幹細胞）である。間葉系細胞は、骨髓、脂肪組織、胎盤組織、臍帯組織、歯髓等の組織から採取したり、あるいは、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）などの多能性幹細胞から公知の方法に従って作製することができる。間葉系細胞は、主としてヒト由来のものをを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、サメ、エイ、ギンザメ、サケ、エビ、カニなど）由来の未分化間葉系細胞を用いてもよい。

[0020] 本発明において「組織又は臓器細胞」とは、組織又は臓器を構成する機能細胞、又は機能細胞へと分化する未分化細胞をいう。「未分化な組織又は臓器細胞」としては、例えば、腎臓、心臓、肺臓、脾臓、食道、胃、甲状腺、副甲状腺、胸腺、生殖腺、脳、脊髄などの器官に分化可能な細胞などであってもよく、脳、脊髄、副腎髄質、表皮、毛髪・爪・皮膚腺、感覚器、末梢神経、水晶体などの外胚葉性器官に分化可能な細胞、腎臓、尿管、心臓、血液、生殖腺、副腎皮質、筋肉、骨格、真皮、結合組織、中皮などの中胚葉性器官に分化可能な細胞、肝臓、膵臓、腸管、肺、甲状腺、副甲状腺、尿路などの内胚葉性器官に分化可能な細胞などを挙げることができる。ある細胞が外胚葉性器官、中胚葉性器官又は内胚葉性器官に分化可能な細胞であるかどうか

かは、マーカーとなるタンパク質の発現を調べることにより確認できる（マーカータンパク質のいずれか一つあるいは複数が発現していれば内胚葉性器官に分化可能な細胞であると判断できる。）。例えば、肝臓に分化可能な細胞では、HHEX、SOX2、HNF4A、AFP、ALBなどがマーカーになり、膵臓に分化可能な細胞では、PDX1、SOX17、SOX9などがマーカーになり、腸管に分化可能な細胞では、CDX2、SOX9などがマーカーになり、腎臓に分化可能な細胞では、SIX2、SALL1、心臓に分化可能な細胞では、NKX2-5、MYH6、ACTN2、MYL7、HPPA、血液に分化可能な細胞では、C-KIT、SCA1、TER119、HOXB4、脳や脊髄に分化可能な細胞では、HNK1、AP2、NESTINなどがマーカーになる。当業者間で使用されている用語のうち、hepatoblast、hepatic progenitor cells、pancreatoblast、hepatic precursor cells、pancreatoblast、pancreatic progenitors、pancreatic progenitor cells、pancreatic precursor cells、endocrine precursors、intestinal progenitor cells、intestinal precursor cells、intermediate mesoderm、metanephric mesenchymal precursor cells、multipotent nephron progenitor、renal progenitor cell、cardiac mesoderm、cardiovascular progenitor cells、cardiac progenitor cells、(JR. Spence, et al. Nature.;470(7332):105-9.(2011)、Self, et al. EMBO J.; 25(21): 5214-5228.(2006)、J. Zhang, et al. Circulation Research.; 104: e30-e41(2009)、G. Lee, et al. Nature Biotechnology 25, 1468 - 1475 (2007))などは本発明における未分化な組織又は臓器細胞に含まれる。未分化な組織又は臓器細胞は、組織又は臓器から採取したり、あるいは、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性幹細胞(ES細胞)などの多能性幹細胞から公知の方法に従って作製することができる。また、未分化な組織又は臓器細胞は、iPS細胞などの多能性幹細胞から組織又は臓器への分化が中途段階にある細胞、例えば、原始腸内胚葉細胞(Primitive Gut Endoderm Cells: PGECS)(特許第5777127号)などであってもよい。PGECSは、肝細胞、膵細胞及び腸細胞への分化が可能であり(分化機能が高い)、癌の悪性度に関係するマーカーを発現せず(安全性が高い)、iPS細胞から非フィーダー環境下で分化誘

導して調製することができるので、臨床応用も可能とするという利点を持つ。しかも、PGECSは、大量調製が可能である。PGECSは、特許第5777127号に記載の方法で調製することができる。あるいは、無血清培地にアクチビンを添加してiPS細胞などの多能性幹細胞を培養することで、CXCR4及びE-cadherin 両陽性の内胚葉系細胞に誘導したものや、さらに、得られた内胚葉系細胞をBMP4、FGF2を添加して2日間培養することで得られる、CXCR4陰性 HNF4 α 陽性の肝臓内胚葉集団であってもよい。その他、例えば、肝臓に分化可能な臓器細胞は、K.Si-Taiyeb, et al. Hepatology, 51 (1): 297- 305(2010)、T. Touboul, et al. Hepatology. 51(5):1754-65. (2010)に従って作製することができ、膵臓に分化可能な臓器細胞は、D. Zhang, et al. Cell Res.;19(4): 429-38. (2009)に従って作製することができ、腸管に分化可能な臓器細胞は、J. Cai, et al. J Mol Cell Biol.;2(1):50-60(2010)、R. Spence, et al. Nature.;470(7332):105-9. (2011)に従って作製することができ、心臓に分化可能な臓器細胞は、J. Zhang, et al. Circulation Research.; 104: e30-e41(2009)に従って作製することができ、脳や脊髄に分化可能な細胞では、G. Lee, et al. Nature Biotechnology 25, 1468 - 1475 (2007)に従って作製することができる。「分化した組織又は臓器細胞」としては、膵臓の内分泌細胞、膵臓の膵管上皮細胞、肝臓の肝細胞、腸管の上皮細胞、腎臓の尿細管上皮細胞、腎臓の糸球体上皮細胞、心臓の心筋細胞、血液のリンパ球や顆粒球、赤血球、脳の神経細胞やグリア細胞、脊髄の神経細胞やシュワン細胞などを例示できる。組織又は臓器細胞は、主としてヒト由来のものを用いるが、ヒト以外の動物（例えば、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、サメ、エイ、ギンザメ、サケ、エビ、カニなど）由来の組織又は臓器細胞を用いてもよい。

[0021] 共培養における四種類の細胞の培養比は器官芽が形成できる範囲内であれば特に限定されないが、好適な細胞の数比は、組織又は臓器細胞：血管内皮細胞：間葉系細胞：血液細胞＝10：10～5：2～0.1：2～50である。組

組織又は臓器細胞25万個程度、血管内皮細胞17万個程度、間葉系細胞2.5万個程度、血液細胞10万個程度を共培養して、大きさが50～250マイクロメートル程度の器官芽を形成させることができる。

[0022] 培養の際に使用する培地は、器官芽が形成されるものであればどのようなものでもよいが、血管内皮細胞培養用の培地、組織又は臓器細胞培養用の培地、前記2つの培地を混合したものなどを使用することが好ましい。血管内皮細胞培養用の培地はどのようなものを使用してもよいが、hEGF（組換えヒト上皮細胞成長因子）、VEGF（血管内皮細胞成長因子）、ヒドロコルチゾン、bFGF、アスコルビン酸、IGF1、FBS、Antibiotics（例えば、ゲンタマイシン、アンフォテリシンBなど）、Heparin、L-Glutamine、Phenolred、BBEの少なくとも1種を含むものを使用するのが好ましい。血管内皮細胞培養用の培地としては、EGM-2 BulletKit（Lonza社製）、EGM BulletKit（Lonza社製）、VascuLife EnGS Comp Kit（LCT社製）、Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium（Invitrogen社製）、ヒト微小血管内皮細胞増殖培地（TOYOBO社製）などを用いることができる。組織又は臓器細胞培養用の培地はどのようなものを使用してもよいが、臓器細胞が肝細胞である場合、ascorbic acid、BSA-FAF、insulin、hydrocortisone、GA-1000の少なくとも1種を含むものを使用するのが好ましい。肝細胞培養用の培地としては、HCM BulletKit（Lonza社製）よりhEGF（組換えヒト上皮細胞成長因子）を除いたもの、RPMI1640（Sigma-Aldrich社製）に1% B27 Supplements（GIBCO社製）と10ng/mL hHGF（Sigma-Aldrich社製）などを用いることができる。ヒト肝芽の形成に関しては、GM BulletKit（Lonza社製）とHCM BulletKit（Lonza社製）よりhEGF（組換えヒト上皮細胞成長因子）を除いたものを1：1で混ぜたものに、Dexamethasone、Oncostatin M、HGFを添加すると、肝芽の成熟に効果があることが判明している。

[0023] 細胞の培養にあたっては、足場材料を用いる必要はないが、四種類の細胞の混合物を間葉系細胞が収縮可能なゲル状支持体上で培養するとよい。

[0024] 間葉系細胞の収縮は、（顕微鏡、ないし肉眼で）形態学的に立体組織形成

を認めることや、葉さじなどによる回収に伴い組織の形状が保たれる強度を有することを示すなど (Takebe et al., Nature 499 (7459), 481-484, 2013)) のようにして確認することができる。

[0025] 支持体は、適正な硬さ (例えば、ヤング率 200 kPa 以下 (マトリゲルをコートした形状が平坦なゲルの場合など) であるが、支持体の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。) を有するゲル状基材であるとよく、そのような基材としては、ハイドロゲル (例えば、アクリルアミドゲル、ゼラチン、マトリゲルなど) などを例示することができるが、それらに限定されることはない。なお、目的とする集合体の形・サイズ・量に応じて、支持体の硬さは均一である必然性はなく、硬さに空間的・時間的な勾配を設定することやパターン化することが可能である。支持体の硬さが均一である場合には、支持体の硬さは、好ましくは、100 kPa 以下、より好ましくは 1~50 kPa である。ゲル状支持体は、平面であってもよいし、あるいは、ゲル状支持体の培養する側の断面が U 又は V 字の形状であるとよい。ゲル状支持体の培養する側の断面が U 又は V 字の形状であることにより、支持体の培養面に細胞が集まるようになり、より少ない数の細胞及び／又は組織で細胞集合体が形成されるので有利である。また、支持体に、化学的・物理的な修飾を施してもよい。修飾物質としては、マトリゲル、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどを例示することができる。

[0026] ゲル状培養支持体の硬さに空間的な勾配を設定した一例は、中心部の硬さが周辺部の硬さより固いゲル状培養支持体である。中心部の硬さは、200 kPa 以下が適正であり、周辺部の硬さは、中心部より柔らかければよいが、支持体の中心部と周辺部の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。ゲル状培養支持体の硬さに空間的な勾配を設定した別の一例は、周辺部の硬さが中心部の硬さより固いゲル状培養支持体である。

[0027] パターン化したゲル状培養支持体の一例は、中心部の硬さが周辺部の硬さ

より固いというパターンを1個以上有するゲル状培養支持体である。中心部の硬さは、200 kPa以下が適正であり、周辺部の硬さは、中心部より柔らかければよいが、支持体の中心部と周辺部の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。パターン化したゲル状培養支持体の別の一例は、周辺部の硬さが中心部の硬さより固いというパターンを1個以上有するゲル状培養支持体である。周辺部の硬さは、200 kPa以下が適正であり、中心部の硬さは、周辺部より柔らかければよいが、支持体の中心部と周辺部の適正な硬さはコーティングと形状によって変化する。

- [0028] 培養時の温度は特に限定されないが、30～40℃とするのが好ましく、37℃とするのが更に好ましい。
- [0029] 培養期間は特に限定されないが、3～10日とするのが好ましく、6日とするのが更に好ましい。
- [0030] 本発明の方法で作製した器官芽は、血液細胞の非存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞、及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養して作製した器官芽と比較して、機能が向上する。
- [0031] 例えば、器官芽が肝芽である場合、本発明の方法で作製した肝芽は、血液細胞の非存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養して作製した肝芽と比較して、アルブミンの分泌能が向上する。また、本発明の方法で作製した肝芽は、血液細胞の非存在下で、血管内皮細胞、間葉系細胞及び組織又は臓器細胞をin vitroで培養して作製した肝芽と比較して、肝細胞分化マーカー遺伝子の発現が上昇する。肝細胞分化マーカー遺伝子としては、 α フェトプロテイン、アルブミン、CYP3A7、トリプトファン代謝酵素TD02、ナトリウム・タウロコール酸共輸送体などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。
- [0032] 本発明は、上記の方法により作製した器官芽も提供する。
- [0033] 上記の方法により作製した器官芽を非ヒト動物に移植し、その非ヒト動物内で成熟させることにより、組織又は臓器を作製することができる。すなわち、本発明は、上記の方法により作製した器官芽を非ヒト動物に移植し、組

組織又は臓器に分化させることを含む、組織又は臓器の作製方法も提供する。使用する非ヒト動物としては、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、サメ、エイ、ギンザメ、サケ、エビ、カニなどを挙げることができる。また、使用する非ヒト動物は、免疫拒絶反応を回避するために、免疫不全動物であることが好ましい。

[0034] 従って、本発明は、上記の方法によって作製された器官芽をヒト又は非ヒト動物に移植することを含む、器官芽の移植方法も提供する。器官芽の移植部位は、移植可能であればどの部位であってもよいが、頭蓋内、腸間膜、肝臓、脾臓、腎臓、腎被膜下、門脈上などを例示することができる。頭蓋内に移植する場合には、*in vitro*で作製した1〜3個程度の5mm大の器官芽を移植するとよく、腸間膜に移植する場合には、*in vitro*で作製した1〜6個程度の5mm大の器官芽を移植するとよく、門脈上に移植する場合には、*in vitro*で作製した1〜20個程度の5mm大の器官芽を移植するとよい。腎皮膜に移植する場合には、*in vitro*で作製した1〜5個程度の5mm大の器官芽を移植するとよく、肝臓・脾臓・腎臓・に移植する場合には、*in vitro*で作製した100〜200個程度の100 μ m大の器官芽を移植するとよい。

[0035] 以上のようにして作製した組織及び臓器は、創薬スクリーニングや再生医療などに使用することができる。

[0036] 従って、本発明は、上記の方法によって作製された器官芽をヒト又は非ヒト動物に移植し、組織又は臓器に分化させることを含む、組織又は臓器の再生又は機能回復方法を提供する。非ヒト動物としては、実験動物、愛玩動物、使役動物、競走馬、闘犬などに利用される動物、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、サメ、エイ、ギンザメ、サケ、エビ、カニなどを挙げることができる。

[0037] 本発明の方法によって作製された器官芽は、製剤化され、再生医療用組成物という形態で使用されうる。本発明の組成物を生体内に移植し、組織又は臓器を作製することができる。また、本発明の組成物を生体内に移植し、組

織又は臓器の再生又は機能回復を行うことができる。

[0038] 本発明の組成物が生体に移植された後、器官芽は血管網を有する組織又は臓器に分化しうる。その血管網には血管灌流が生じうる。血管網に血管灌流が生じることにより、成体組織と同等若しくはそれに近い高度に秩序だった組織構造を有する組織・臓器を創出することが可能となると考えられる。

[0039] 本発明の組成物には、FGF2、HGF、VEGFなどの組織血管化促進剤、移植に伴う止血用ゼラチンスポンジ（商品名：スポンゼル、アステラス株式会社）、および、移植組織の固定に用いるボルヒール（帝人ファーマ株式会社）・ペリプラス（CSLベーリング株式会社）・タココンブ（CSLベーリング株式会社）などの組織接着剤などを添加してもよい。

[0040] また、本発明は、上記の方法によって作製された器官芽を非ヒト動物に移植し、組織又は臓器に分化させることを含む、非ヒトキメラ動物の作製方法も提供する。器官芽を移植した非ヒト動物（例えば、マウス）は、器官芽の作製に用いた組織又は臓器細胞の由来生物種（例えば、ヒト）の生理機能を模倣しうる。

[0041] さらに、本発明は、上記の方法によって作製された器官芽、組織及び臓器、及び非ヒトキメラ動物からなる群より選択される少なくとも一つを用いて、薬剤を評価する方法も提供する。薬剤の評価としては、例えば、薬物代謝の評価（例えば、薬物代謝プロファイルの予測）、薬効評価（例えば、医薬品として有効な薬剤をスクリーニングすることなど）、毒性評価、薬物相互作用評価などを挙げることができる。

[0042] 薬物代謝の評価は、上記の方法によって作製された器官芽、組織及び臓器、及び非ヒトキメラ動物からなる群より選択される少なくとも一つにおいて、医薬品の候補化合物を投与したのちの生物試料を採取・解析することにより、ヒト型の薬物代謝プロファイルを取得することができる。これにより従来技術では達成が極めて難しかったヒトでの医薬品の分布・代謝・排泄過程を予測することが可能となり、安全で効果のある医薬品の開発を飛躍的に加速できるものと期待される。

- [0043] 医薬品として有効な薬剤のスクリーニングは、疾病患者より樹立した細胞から、上記の方法によって作製した器官芽、組織及び臓器、及び非ヒトキメラ動物からなる群より選択される少なくとも一つに、新規の医薬品候補化合物を投与することにより解析することが可能となる。これにより、従来の *in vitro* 試験で不十分であった、実際ヒトに投与した際の薬効の予測精度を大幅に改善できる可能性が期待される。
- [0044] 毒性評価は、上記の方法によって作製された器官芽、組織及び臓器、及び非ヒトキメラ動物からなる群より選択される少なくとも一つに、被験物質を投与したのちに、組織障害マーカーなどを測定することにより、障害予測の精度向上が可能となる。
- [0045] 薬物相互作用評価は、上記の方法によって作製された器官芽、組織及び臓器、及び非ヒトキメラ動物からなる群より選択される少なくとも一つを用いて、複数の薬剤を投与したのちに、その後の各薬剤の分布・代謝・排泄過程などの薬物動態や毒性評価、薬効評価を行うことにより行うことができる。
- [0046] また、本発明の方法により作製した組織及び臓器から組織幹細胞を創出することも可能であり、本発明はヒト組織細胞や臓器細胞の大量創出の細胞操作技術への応用が可能である。

実施例

- [0047] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

〔実施例 1〕

〔方法〕

1、血液細胞の調製

〈臍帯血の取得〉

臍帯（横浜市立大学附属病院にて帝王切開により出産された患者様より提供）より50mLシリンジ、18G針を用いて採血を行った。血液はおおよそ40mL-50mL採取した。

〈溶血処理〉

50mLチューブに40mLのLysis バッファーを入れ、10mLの臍帯血を加えた。

攪拌し室温で10分間静置した。

200Gで10分遠心分離した。

もう一度、Lysis バッファー10mLに懸濁し、5本分まとめ50mLとした。

再び200Gで10分遠心分離した。

沈殿を10mL DMEM+10%FBSで懸濁し、200Gで5分遠心分離した。

再度10mL DMEM+10%FBSし細胞数を計測した。

材料

1) 10 x Lysis バッファーの作製 (x10 液; 1/10希釈して使用した。)

・ NH_4Cl 82.6g

・ NaHCO_3 11.9g

・ EDTA_2Na 0.378g

/ 1L milliQ adjust to pH7.3

2) 1 x Lysis バッファーの作製

PBS(4℃に冷えている方が良い。2mM EDTAを入れても良い)でx1に希釈して使用した。

<PI-/CD235-細胞の分離>

血液細胞に対しPropidium Iodide (PI)を用いて死細胞を染色し、蛍光標識CD 235抗体を用いて赤血球/赤芽球を染色し、セルソーターを用いてそれぞれで染色されない細胞(生細胞で有り、赤血球/赤芽球でない細胞)を分離した。

<monocyte画分(MNC)細胞の分離>

セルソーターを用い、PI-/CD235-細胞をFSC (forward scatter : 前方散乱光)、およびSSC (side scatter : 側方散乱光)で展開しmonocyte画分(MNC)細胞に該当する細胞集団を分離した。

2、肝内胚葉細胞の作製

方法：

未分化iPS細胞 (TkDA3 (東京大学より提供)、および、臍帯より独自に樹立したiPS細胞)を剥離し単細胞化した後、プラスチックディッシュに 5×10^4 cells/cm²の細胞密度で、RPMI+1%B27+10uM Rockinhibitor+50ng/mL Wnt3a+100ng/m

L ActivinA存在下で1日間培養した。続いて、RPMI+1%B27+50ng/mL Wnt3a+ 10 0ng/mL ActivinA存在下で6日間培養し肝内胚葉細胞を得た。

[0048] [結果]

1(図1、2、3)

肝内胚葉細胞(2.5×10^5 細胞)と臍帯由来血管内皮細胞(1.7×10^5 細胞) (Lonza、Basel、Switzerland) および間葉系細胞(2.5×10^4 細胞) (Lonza、Basel、Switzerland) (10:7:1)に対し、セルソーターを用いて分離したPI-細胞および造血幹細胞/造血前駆細胞が濃縮されている、monocyte画分(MNC)細胞(図1)を 1×10^5 細胞懸濁し、クラレマイクロウェルプレート上で肝芽(liver bud)を作製した(大きさ: 50 ~ 250マイクロメートル)。15日間培養後、それぞれの条件で培養した肝芽の培養上清中に24時間で分泌されたヒトアルブミンタンパク質量をELISA法により分析した。その結果PI-細胞あるいは造血幹細胞/造血前駆細胞が濃縮されているmonocyte画分(MNC)細胞を添加した群では、従来法である血液細胞非添加群に較べアルブミン分泌量が増加していた(図2)。次に上記の条件で培養した培養15日目の肝芽を回収しqPCRにより肝細胞分化マーカー(α フェトプロテイン(AFP)、アルブミン(ALB)、CYP3A7、トリプトファン代謝酵素(TD02)、ナトリウム・タウロコール酸共輸送体(NTCP))の発現を検討したところ、PI-細胞あるいはmonocyte画分(MNC)細胞を添加した群では、従来法である血液細胞非添加群に較べ遺伝子発現量が増加していた(図3)。

2(図4、5)

次に添加する血液細胞の用量依存性を検討するため、肝内胚葉細胞(2.5×10^5 細胞)と臍帯由来血管内皮細胞(1.7×10^5 細胞)および間葉系細胞(2.5×10^4 細胞) (10:7:1)に対し、血液細胞添加ゼロ、血液細胞(PI-細胞)添加 1×10^5 細胞、 2.5×10^5 細胞、 5×10^5 細胞添加群で肝芽作製15日目での培養液(図4)中の24時間ヒトアルブミンタンパク質分泌量を検討した。その結果、従来法に較べ血液細胞の細胞数依存的にヒトアルブミン分泌量が増強されることが明らかとなった(図5)。

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。

産業上の利用可能性

- [0049] 本発明は、ヒト機能細胞の工業的製造に向けた重要な基盤技術となる。これにより、難治性疾患を対象とした再生医療技術として、移植用のヒト組織・臓器の製造に応用することが出来る。従来法から大幅にコスト削減を実現できることが期待されるのみならず、本技術によりin vitroでの機能成熟を向上することも可能であると考えられるために、従来技術では治療が困難であった急性・亜急性の肝不全症に対しても適応可能になると期待される。
- [0050] さらに、本発明により人為的に作製されたヒト肝臓組織を用いた薬剤評価系を確立すれば、創薬開発において必要なヒト成熟肝細胞を大量に製造することが可能となる。