

明 細 書

発明の名称：膀胱オルガノイド及びその製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、腹側後腸オルガノイド、又は膀胱オルガノイド、若しくはそれらの製造方法に関する。本開示は、また、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドをその腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物、或いはその製造方法に関する。本開示は、さらに、腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド、又は前記非ヒト哺乳動物における、被験物質に対する薬物応答性を評価する方法に関する。本開示は、さらに、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを含む再生医療用組成物に関する。

背景技術

[0002] 膀胱は、胚体内胚葉 (Definitive Endoderm) 由来の臓器であり、初期消化管 (Gut tube) の最後方に位置する後腸 (Hindgut) から腹側総排泄腔 (Ventral cloaca) を経て発生することが知られている。膀胱は、腎臓から尿管を経て送られてきて、尿道を経て排出される尿を一時的にとどめておく袋状の器官である。膀胱の畜尿機能又は排尿機能は、放射線治療、膀胱破裂、及び糖尿病などによって膀胱組織が傷害を受けることで、低下又は消失し得る。

[0003] 機能を失った臓器の再生、難治性疾患の治療、又は臓器移植における慢性的なドナー不足を補うことを目的とした再生医療研究が行われている。再生医療分野では、ES細胞又はiPS細胞などの多能性幹細胞から、試験管内 (in vitro) で創出されたオルガノイドと呼ばれる臓器に類似した細胞集合体を利用することが研究されている。

[0004] 非特許文献1は、試験管内でマウスES細胞を培養することで、膀胱上皮を分化誘導したことを記載する。非特許文献2～4は、試験管内でヒト多能性幹細胞を培養することで、膀胱上皮を分化誘導したことを記載する。非特許文献5は、試験管内でコラーゲンマトリックス中のマウスES細胞を培養

した後、マウス腎皮膜下に移植して、膀胱上皮を分化誘導したことを記載する。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Mauney JR, et. al.,: All-Trans Retinoic Acid Directs Urothelial Specification of Murine Embryonic Stem Cells via GATA4/6 Signaling Mechanisms. PLoS One 2010, 5:e11513.

非特許文献2: Osborn SL, et. al.,: Induction of human embryonic and induced pluripotent stem cells into urothelium. Stem Cells Transl Med 2014, 3:610-9.

非特許文献3: Suzuki K, et. al.,: Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into mature stratified bladder urothelium. Sci Rep 2019, 9:1-13.

非特許文献4: Kang M, et. al.,: Generation of Bladder Urothelium from Human Pluripotent Stem Cells under Chemically Defined Serum- and Feeder-Free System. Int J Mol Sci 2014, 15:7139-7157.

非特許文献5: Ottamasathien S, et. al.,: Directed differentiation of embryonic stem cells into bladder tissue. Dev Biol 2007, 304:556-566.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 非特許文献1～4記載の膀胱上皮への分化誘導は、実際の膀胱発生過程を模倣したものではなく、また、3次元培養系で分化誘導するものでもない。非特許文献1～4にて分化誘導された膀胱上皮オルガノイドは、膀胱のような膀胱上皮細胞種の層構造を有していない。非特許文献5にて分化誘導された膀胱上皮オルガノイドは、膀胱のような3層構造を有するか不明なものである。

[0007] 本発明者らは、多能性幹細胞から膀胱オルガノイドを形成させる条件を種

々検討した。例えば、本発明者らは、実際の膀胱発生過程を模倣した3次元培養系を構築する条件を検討した。本開示は、膀胱のような膀胱上皮細胞種の層構造を有する膀胱オルガノイドを製造するための新規な腹側後腸オルガノイドを提供すること、又はその製造方法を提供することを1つの目的とする。本開示は、膀胱のような膀胱上皮細胞種の層構造を有する新規な膀胱オルガノイドを提供すること、又はその製造方法を提供することを1つの目的とする。本開示は、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドをその腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する新規な非ヒト哺乳動物、又はその製造方法を提供することを1つの目的とする。本開示は、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを含む新規な再生医療用組成物を提供することを1つの目的とする。本開示は、腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド、又は前記非ヒト哺乳動物における被験物質に対する薬物応答性を評価する新規な方法を提供することを1つの目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本開示は、以下の態様を提供する。

[項A1] 腹側後腸オルガノイドを製造する方法であって、多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること；前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Bを用いて培養し、次いで、細胞外マトリクスゲル中で、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Bを用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること；及び前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクスゲル中で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地b2を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む、方法。

[項A2] P63、CDX2、HOXA13、及びKRT8を発現しており、及びSOX2を発現していない、腹側後腸オルガノイド。

[項A2-1] P63、CDX2、HOXA13、及びKRT8を発現し

ており、及びSOX2を実質的に発現していない、腹側後腸オルガノイド。

〔項A3〕 腹側後腸オルガノイドにおけるCDX2の発現量が、後腸オルガノイドにおけるCDX2の発現量よりも少ない、あるいは腹側後腸オルガノイドにおいてCDX2が発現していない、項A2に記載の腹側後腸オルガノイド。

〔項A3-1〕 腹側後腸オルガノイドにおけるCDX2の発現量が、後腸オルガノイドにおけるCDX2の発現量よりも少ない、あるいは腹側後腸オルガノイドにおいてCDX2が実質的に発現していない、項A2に記載の腹側後腸オルガノイド。

〔項A4〕 項A1に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項A2若しくは項A3に記載の腹側後腸オルガノイドを、細胞外マトリクスゲル中で、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地Cを用いて培養することを含む、膀胱オルガノイドを製造する方法。

[0009] 〔項A5〕 膀胱オルガノイドであって、前記膀胱オルガノイドの最外周に沿って局在する、P63及びKRT5を共発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して内側方向に局在する、P63及びUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して内側方向に局在する、P63を発現しないがUPK2を発現する細胞を含む第三の細胞層を含む、膀胱オルガノイド。

〔項A5-1〕 膀胱オルガノイドであって、前記膀胱オルガノイドの最外周に沿って局在する、P63及びKRT5を共発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して内側方向に局在する、P63及びUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して内側方向に局在する、P63を実質的に発現しないがUPK2を発現する細胞を含む第三の細胞層を含む、膀胱オルガノイド。

〔項A6〕 項A1に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項A2若しくは項A3に記載の腹側後腸オルガノイドを、ヒト又は非ヒト哺

乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、膀胱オルガノイドを製造する方法。

〔項 A 7〕 内腔を有する、膀胱オルガノイドであって、前記膀胱オルガノイドの最外周に沿って局在する、P 6 3 及び K R T 5 を共発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して内側方向に局在する、P 6 3 及び U P K 2 を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して内側方向に局在し、前記内腔に面する、P 6 3 を発現しないが U P K 2 を発現する細胞を含む第三の細胞層を含む、膀胱オルガノイド。

〔項 A 7 - 1〕 内腔を有する、膀胱オルガノイドであって、前記膀胱オルガノイドの最外周に沿って局在する、P 6 3 及び K R T 5 を共発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して内側方向に局在する、P 6 3 及び U P K 2 を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して内側方向に局在し、前記内腔に面する、P 6 3 を実質的に発現しないが U P K 2 を発現する細胞を含む第三の細胞層を含む、膀胱オルガノイド。

[0010] 〔項 A 8〕 項 A 1 に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項 A 2、項 A 2 - 1、項 A 3 若しくは項 A 3 - 1 に記載の腹側後腸オルガノイド、或いは項 A 4 若しくは項 A 6 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 A 5、項 A 5 - 1、項 A 7 若しくは項 A 7 - 1 に記載の膀胱オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、膀胱オルガノイドをその腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物を製造する方法。

〔項 A 9〕 項 A 1 に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項 A 2、項 A 2 - 1、項 A 3 若しくは項 A 3 - 1 に記載の腹側後腸オルガノイド、或いは項 A 4 若しくは項 A 6 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 A 5、項 A 5 - 1、項 A 7 若しくは項 A 7 - 1 に記載の膀胱オルガノイドをその腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する、非ヒト哺乳動物。

〔項 A 1 0〕 項 A 1 に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項 A 2、項 A 2－1、項 A 3 若しくは項 A 3－1 に記載の腹側後腸オルガノイド、或いは項 A 4 若しくは項 A 6 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 A 5、項 A 5－1、項 A 7 若しくは項 A 7－1 に記載の膀胱オルガノイドを含む、膀胱の損傷又は疾患を処置するための再生医療用組成物。

〔項 A 1 1〕 被験物質に対する薬物応答性を評価する方法であって、項 A 1 に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項 A 2、項 A 2－1、項 A 3 若しくは項 A 3－1 に記載の腹側後腸オルガノイド、或いは項 A 4 若しくは項 A 6 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 A 5、項 A 5－1、項 A 7 若しくは項 A 7－1 に記載の膀胱オルガノイド、又は項 A 9 に記載の非ヒト哺乳動物と、被験物質とを接触させること；及び前記被験物質に対する前記腹側後腸オルガノイド、前記膀胱オルガノイド、又は前記非ヒト哺乳動物における薬物応答性を測定することを含む、方法。

〔項 A 1 2〕 項 A 1 に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項 A 2、項 A 2－1、項 A 3 若しくは項 A 3－1 に記載の腹側後腸オルガノイド、或いは項 A 4 若しくは項 A 6 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 A 5、項 A 5－1、項 A 7 若しくは項 A 7－1 に記載の膀胱オルガノイドを、その必要のある哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、膀胱の損傷又は疾患を治療する方法。

[0011] 〔項 B 1〕

腹側後腸オルガノイドを製造する方法であって、

多能性幹細胞を、アクチビン A 及び GSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地 A を用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、及び

前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地 B を用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地 B を用いて

培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む、方法。

[項 B 2]

前記腹側後腸オルガノイドを形成させることが、前記胚体内胚葉細胞の前記誘導培地 B での培養後に、細胞外マトリクス存在下で前記誘導培地 B を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で前記誘導培地 B を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含み、

後腸オルガノイドを形成させるための誘導培地 B が、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有し、及び腹側後腸オルガノイドを形成させるための誘導培地 B が、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する、項 B 1 に記載の方法。

[項 B 3]

腹側後腸オルガノイドを形成させるための誘導培地 B が、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する、項 B 1 に記載の方法。

[項 B 4]

項 B 1 ～項 B 3 のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド。

[0012] [項 B 5]

腹側後腸オルガノイドであって、
腹側後腸マーカーである P63 を発現しており、
HOXA13 及び CK8/KRT8 を発現しており、及び
背側後腸マーカーである SOX2 を実質的に発現していない、腹側後腸オルガノイド。

[項 B 5-1]

腹側後腸オルガノイドであって、
腹側後腸マーカーである P63 を発現しており、
HOXA13 及び CK8/KRT8 を発現しており、及び

背側後腸マーカであるSOX2及び／又はCDX2を実質的に発現していないか、若しくはSOX2及び／又はCDX2を発現していても、その発現量が、後腸オルガノイドにおけるSOX2及び／又はCDX2の発現量よりも少ない、腹側後腸オルガノイド。

[項B6]

内腔を有する、腹側後腸オルガノイドであって、

P63、ΔN63、GATA3、ISL1及びSATB2からなる群より選択される少なくとも1種の腹側後腸マーカを発現しており、

Phospho-Smad1/5/8、HOXA13、FOXA2、CK8/KRT8、及びECADからなる群より選択される少なくとも1種のマーカを発現しており、及び

SOX2、T及びCDX2からなる群より選択される少なくとも1種の背側後腸マーカを実質的に発現していない、腹側後腸オルガノイド。

[項B7]

項B1～項B3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、又は項B4～項B6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイドを、

細胞外マトリクス存在下で、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地Cを用いて培養すること、

ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入すること、又は

間葉系幹細胞若しくは間葉系細胞の存在下で培養することを含む、膀胱オルガノイドを製造する方法。

[項B8]

項B7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド。

[0013] [項B9]

膀胱オルガノイドであって、

P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する

細胞を含む第一の細胞層；及び

前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P 6 3 及び U P K 1 B 及び／又は U P K 2 を共発現する細胞を含む第二の細胞層を含み、

前記第二の細胞層に対して外側方向に局在する、P 6 3 及び K R T 5 を共発現する細胞を含む第三の細胞層をさらに含んでいてよい、膀胱オルガノイド。

[項 B 1 0]

前記第一の細胞層に取り囲まれた内腔を含む、項 B 9 に記載の膀胱オルガノイド。

[項 B 1 1]

前記第三の細胞層に対して外側方向に局在する間質様細胞を含む第四の細胞層を含み、前記第四の細胞層に対して外側方向に局在する平滑筋細胞を含む第五の細胞層をさらに含んでいてよい、項 B 9 又は項 B 1 0 に記載の膀胱オルガノイド。

[項 B 1 2]

項 B 1 ～項 B 3 のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、項 B 4 ～項 B 6 のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、項 B 7 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 B 8 ～項 B 1 1 のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを、その腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物を製造する方法。

[0014] [項 B 1 3]

項 B 1 ～項 B 3 のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、項 B 4 ～項 B 6 のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、項 B 7 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項 B 8 ～項 B 1 1 のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを、その腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する、非ヒト哺乳動物。

[項B 1 4]

項B 1～項B 3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、項B 4～項B 6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、項B 7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項B 8～項B 11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを含む、膀胱の損傷又は疾患を処置するための再生医療用組成物。

[項B 1 5]

被験物質に対する薬物応答性を評価する方法であって、

項B 1～項B 3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、項B 4～項B 6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、項B 7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、項B 8～項B 11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイド、項B 12に記載の方法で製造された非ヒト哺乳動物、又は項B 13に記載の非ヒト哺乳動物と、被験物質とを接触させること、及び

前記被験物質に対する前記腹側後腸オルガノイド、前記膀胱オルガノイド、又は前記非ヒト哺乳動物における薬物応答性を測定することを含む、方法。

[項B 1 6] 項B 1～項B 3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、項B 4～項B 6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、項B 7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は項B 8～項B 11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを、その必要のある哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、膀胱の損傷又は疾患を治療する方法。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、1つの実施形態に係る膀胱オルガノイド作製の概要を示すフローチャート図である。

[図2]図2 aは、腸様のオルガノイドにおけるSATB2の分布を示す画像である。図2 bは、腸様のオルガノイドにおけるCDX2の分布を示す画像で

ある。図2cは、腸様のオルガノイドにおけるECADの分布を示す画像である。図2dは、腸様のオルガノイドにおけるDAPⅠ染色の画像である。

[図3]図3aは、膀胱オルガノイドにおけるUPK2の分布を示す画像である。ただし、膀胱オルガノイドの最外周に観察される白色のシグナルは、Matrigel（登録商標）由来の非特異的シグナルである。図3bは、膀胱オルガノイドにおけるP63の分布を示す画像である。図3cは、膀胱オルガノイドにおけるKRT5の分布を示す画像である。図3dは、膀胱オルガノイドにおけるUPK2、P63及びKRT5の分布を示す重ね合わせ画像である。ただし、膀胱オルガノイドの最外周に観察される白色のシグナルは、Matrigel由来の非特異的シグナルである。図3eは、膀胱オルガノイドにおけるECADの分布を示す画像である。図3fは、膀胱オルガノイドにおけるDAPⅠ染色の画像である。

[図4]図4aは、誘導培地B及び誘導培地CからBMP4を除いた培地を用いて誘導された細胞構造体におけるUPK2の分布を示す画像である。ただし、前記細胞構造体の最外周に観察される白色のシグナルは、Matrigel由来の非特異的シグナルである。図4bは、誘導培地B及び誘導培地CからBMP4を除いた培地を用いて誘導された細胞構造体におけるP63の分布を示す画像である。図4cは、誘導培地B及び誘導培地CからBMP4を除いた培地を用いて誘導された細胞構造体におけるECADの分布を示す画像である。図4dは、誘導培地CからBMP4を除いた培地を用いて誘導された細胞構造体におけるDAPⅠ染色の画像である。

[図5]図5aは、非ヒト哺乳動物に導入された膀胱オルガノイドにおけるUPK2の分布を示す画像である。図5bは、非ヒト哺乳動物に導入された膀胱オルガノイドにおけるP63の分布を示す画像である。図5cは、非ヒト哺乳動物に導入された膀胱オルガノイドにおけるKRT5の分布を示す画像である。図5dは、膀胱オルガノイドにおけるDAPⅠ染色の画像である。図5eは、非ヒト哺乳動物に導入された膀胱オルガノイドにおけるP63、KRT5及びDAPⅠ染色の分布を示す重ね合わせ画像である。図5fは、非

ヒト哺乳動物に導入された膀胱オルガノイドにおけるUPK2、P63及びDAPI染色の分布を示す画像である。図5gは、生体の膀胱における細胞種の層構造を示す模式図である。

[図6]図6は、1つの実施形態に係る膀胱オルガノイド作製の概要を示すフローチャート図である。

[図7]図7a1～a11は工程b1の後腸分化誘導後の後腸オルガノイド（分化誘導11日目）の蛍光画像である。図7b1～b11は工程b3の腹側後腸分化誘導中の腹側後腸オルガノイド（分化誘導11日目）の蛍光画像である。図7a1および図7b1は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける上皮マーカーであるKRT8の分布を示す画像である。図7a2および図7b2は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける腹側マーカーであるGATA3の分布を示す画像である。図7a3および図7b3は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける背側後腸マーカーであるSOX2の分布を示す画像である。図7a5および図7b5は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける背側後腸マーカーであるCDX2の分布を示す画像である。図7a6および図7b6は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける背側後腸マーカーであるSOX2の分布を示す画像である。図7a7および図7b7は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける背側後腸マーカーであるTの分布を示す画像である。図7a9および図7b9は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける腸管マーカーであるFOXA2の分布を示す画像である。図7a10および図7b10は、後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドそれぞれにおける上皮マーカーであるECADの分布を示す蛍光画像である。図7a4、図7a8および図7a11は、後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。図7b4、図7b8および図7b11は、腹側後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。

[図8]図8a1および図8a2はそれぞれ腹側後腸分化誘導中の腹側後腸オル

ガノイド（分化誘導14日目）における背側後腸マーカであるCDX2およびSOX2の分布を示す蛍光画像である。図8a3は腹側後腸マーカであるGATA3の分布を示す蛍光画像である。図8a4は腹側後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。図8a5はCDX2、SOX2、GATA3およびDAPI染色の重ね合わせ画像である。図8b1は初期腸管上皮マーカであるFOXA2の分布を示す蛍光画像である。図8b2および図8b3はそれぞれ腹側後腸オルガノイドにおける腹側後腸マーカであるΔNP63およびGATA3の分布を示す蛍光画像である。図8b4は腹側後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。図8b5はFOXA2、ΔNP63、GATA3およびDAPI染色の重ね合わせ画像である。図8c1は腸管上皮マーカであるCK8の分布を示す蛍光画像である。図8c2は腹側後腸マーカであるSATB2の分布を示す蛍光画像である。図8c3はApical tight junctionマーカであるZO1の分布を示す蛍光画像である。図8c4は腹側後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。図8c5はCK8、SATB2、ZO1およびDAPI染色の重ね合わせ画像である。図8d1は腹側後腸マーカであるISL1の分布を示す蛍光画像である。図8d2は腹側後腸及びCloaca領域マーカであるPhospho-Smad1/5/8の分布を示す蛍光画像である。図8d3は上皮細胞マーカであるECADの分布を示す蛍光画像である。図8d4は腹側後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。図8d5はISL1、Phospho-Smad1/5/8、ECADおよびDAPI染色の重ね合わせ画像である。図8e1は腹側後腸マーカであるGATA3の分布を示す蛍光画像である。図8e2は背側後腸マーカであるSOX2の分布を示す蛍光画像である。図8e3は膀胱上皮細胞マーカであるUPK2の分布を示す蛍光画像である。図8e4は腹側後腸オルガノイドにおけるDAPI染色画像である。図8e5はGATA3、SOX2、UPK2およびDAPI染色の重ね合わせ画像である。図8f1は背側後腸マーカであるCDX2の分布を示す蛍光画像である。図8f

2は後方腸管マーカーであるH O X A 1 3の分布を示す蛍光画像である。図8 f 3は膀胱上皮細胞マーカーであるK R T 5の分布を示す蛍光画像である。図8 f 4は腹側後腸オルガノイドにおけるD A P I染色画像である。図8 f 5はC D X 2、H O X A 1 3、K R T 5およびD A P I染色の重ね合わせ画像である。

[図9]図9 a～dは腹側後腸オルガノイドと膀胱間葉系細胞との共培養による膀胱上皮分化誘導中の膀胱オルガノイド（分化誘導20日目）の明視野画像である。

[図10]図10 a 1～a 3はそれぞれ膀胱オルガノイド分化誘導中の膀胱オルガノイド（分化誘導24日目）における膀胱上皮細胞マーカーであるU P K 2、 Δ N P 6 3およびK R T 5の分布を示す蛍光画像である。図10 a 4は前記膀胱オルガノイドにおけるD A P I染色画像である。図10 a 5はU P K 2、 Δ N P 6 3、K R T 5およびD A P I染色の重ね合わせ画像である。図10 b 1は前記膀胱オルガノイドにおける上皮細胞マーカーであるE C A Dの分布を示す蛍光画像である。図10 b 2は前記膀胱オルガノイドにおけるヒト由来細胞を示すh L N B 1の分布を示す蛍光画像である。図10 b 3は前記膀胱オルガノイドにおける間葉系細胞マーカーであるV I Mの分布を示す蛍光画像である。図10 b 4は前記膀胱オルガノイドにおけるD A P I染色画像である。図10 b 5はE C A D、h L N B 1、V I MおよびD A P I染色の重ね合わせ画像である。図10 c 1は前記膀胱オルガノイドにおける上皮細胞マーカーであるE C A Dの分布を示す蛍光画像である。図10 c 2は前記膀胱オルガノイドにおける平滑筋細胞マーカーである α S M Aの分布を示す蛍光画像である。図10 c 3は前記膀胱オルガノイドにおけるD A P I染色画像である。図10 c 4はE C A D、 α S M AおよびD A P I染色の重ね合わせ画像である。図10 d 1は前記膀胱オルガノイドにおける発生途上の膀胱上皮細胞マーカーであるF O X A 2の分布を示す蛍光画像である。図10 d 2は前記膀胱オルガノイドにおける膀胱上皮細胞マーカーであるG A T A 3の分布を示す蛍光画像である。図10 d 3は前記膀胱オルガノイ

ドにおけるD A P I 染色画像である。図10d4はF O X A 2、G A T A 3 およびD A P I 染色の重ね合わせ画像である。

[図11]図11a1および図11b1はそれぞれ膀胱オルガノイド分化誘導中の膀胱オルガノイド（分化誘導42日目）におけるU P K 1 BおよびU P K 2の分布を示す蛍光画像である。図11a2および図11b2は前記膀胱オルガノイドにおけるΔ N P 6 3の分布を示す蛍光画像である。図11a3および図11b3は前記膀胱オルガノイドにおけるK R T 5の分布を示す蛍光画像である。図11a4および図11b4は前記膀胱オルガノイドにおけるD A P I 染色画像である。図11a5はU P K 1 B、Δ N P 6 3、K R T 5 およびD A P I 染色の重ね合わせ画像である。図11b5はU P K 2、Δ N P 6 3、K R T 5 およびD A P I 染色の重ね合わせ画像である。

発明を実施するための形態

[0016] [腹側後腸オルガノイド又はその製造方法]

本開示の1つの態様は、腹側後腸オルガノイドの製造方法を提供する。本開示の他の態様は、腹側後腸オルガノイドを提供する。

[0017] 本明細書における用語「オルガノイド」は、試験管内（*in vitro*）で形成された3次元的な生体組織類似の細胞集合体、又は前記細胞集合体を生体内でさらに培養した細胞集合体を意味する。オルガノイドを構成する細胞は、例えば、そのほとんどが分化能及び増殖能を有する細胞である。本明細書において、特定のマーカーを発現しているオルガノイドは、前記特定のマーカーを発現する細胞を所定の割合で含むオルガノイドを意味する。前記所定の割合は、例えば、オルガノイドを構成する細胞の3%以上、5%以上、10%以上、又は15%以上であってよい。

[0018] 本明細書において、特定のマーカーを「実質的に発現していない」とは、前記特定のマーカーの発現量が少なく、当該マーカーによる特徴づけができないことを意味する。一態様において、特定のマーカーを「実質的に発現していない」オルガノイドは、比較対象とするオルガノイドでの前記特定のマーカーの発現量と比較して、前記オルガノイドでの前記特定のマーカーの発

現量が70%未満、80%未満、90%未満、又は95%未満にまで低下しているオルガノイドであってもよい。マーカーの発現量は、例えば、定量PCR又は免疫染色法により測定することができる。定量PCRによるマーカーの発現量は、例えば、所望のマーカーをコードするmRNAの発現量であってよい。免疫染色法によるマーカーの発現量は、例えば、所望のマーカーに結合する抗体に直接的に結合させた又は間接的に結合させたシグナルを生じ得る物質（例えば蛍光物質）に由来するシグナルの強度（例えば蛍光強度）であってよい。所望のマーカーに結合する抗体（一次抗体）に間接的に結合させたシグナルを生じ得る物質は、例えば、前記一次抗体に結合しうる二次抗体に直接的に結合したシグナルを生じ得る物質であってよい。

[0019] 1つの実施形態において、SOX2を実質的に発現していない腹側後腸オルガノイドは、後腸オルガノイドでのSOX2の発現量と比較して、前記腹側後腸オルガノイドでのSOX2の発現量が70%未満まで低下している。

1つの実施形態において、SOX2、T及びCDX2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種又は3種、好ましくは3種）の背側後腸マーカーのいずれも実質的に発現していない腹側後腸オルガノイドは、後腸オルガノイドでの対応するマーカーの発現量と比較して、前記腹側後腸オルガノイドでの前記背側後腸マーカーの発現量が70%未満まで低下している。前記実施形態において、前記後腸オルガノイドは、腹側後腸オルガノイドを構成する細胞と同じ種の多能性幹細胞を用いて、本開示に係る工程A及び工程b1（例えば実施例に記載の工程A及び工程b1）を実施することで形成される後腸オルガノイドである。

[0020] 本明細書における用語「腹側後腸オルガノイド」は、本開示に係る少なくとも1種の腹側後腸マーカーを発現し、且つ本開示に係る少なくとも1種の背側後腸マーカーを実質的に発現していないか、又は発現していても、その発現量が、後腸オルガノイドにおける発現量よりも少ない、オルガノイドを意味する。腹側後腸オルガノイドは、例えば、本開示に係る腹側後腸オルガノイドの製造方法によって製造することができる。前記腹側後腸オルガノイド

の製造方法において、後腸オルガノイドを形成させ、次いで、前記後腸オルガノイドを腹側化させて腹側後腸オルガノイドを形成させた場合、その腹側後腸オルガノイドを本明細書において「腹側化後腸オルガノイド」と称することがある。腹側後腸オルガノイドは、その長径が $80\mu\text{m}$ 以上、 $100\mu\text{m}$ 以上、又は $120\mu\text{m}$ 以上であってよい。腹側後腸オルガノイドは、例えば、後述する膀胱オルガノイドを製造するために用いることができる。腹側後腸オルガノイドは、例えば、被験物質に対する薬物応答性を評価するために用いることができる。腹側後腸オルガノイドは、例えば、本開示に係る再生医療用組成物の有効成分として用いることができる。

[0021] 1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、腹側後腸マーカーであるP63を発現しており；HOXA13及びCK8/KRT8を発現しており；及び背側後腸マーカーであるSOX2を実質的に発現していない。1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、腹側後腸マーカーであるP63を発現しており；HOXA13及びCK8/KRT8を発現しており；背側後腸マーカーであるSOX2を実質的に発現しておらず；及び背側後腸マーカーであるCDX2が実質的に発現していないか、若しくはCDX2を発現していても、その発現量が、後腸オルガノイドにおけるCDX2の発現量よりも少ないことを特徴とする。1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、腹側後腸マーカーであるP63を発現しており、HOXA13及びCK8/KRT8を発現しており、及び背側後腸マーカーであるSOX2及び／又はCDX2を実質的に発現していないか、若しくはSOX2及び／又はCDX2を発現していても、その発現量が、後腸オルガノイドにおけるSOX2及び／又はCDX2の発現量よりも少ないことを特徴とする。1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、さらに、P63の発現量が、後腸オルガノイドにおけるP63の発現量よりも多いことを特徴とする。1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、さらに、P63の発現量に対するCDX2の発現量の比が、後腸オルガノイドにおけるP63の発現量に対するCDX2の発現量の比よりも小さいことを特徴とする。1つの実施形態に係る腹

側後腸オルガノイドは、さらに、HOXA13が転写されていることを特徴とする。

[0022] 1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、内腔を有し；P63、 Δ N63、GATA3、ISL1及びSATB2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、3種、又は4種以上）の腹側後腸マーカーを発現しており；Phospho-Smad1/5/8、HOXA13、FOXA2、CK8/KRT8、及びECADからなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、3種、4種、又は5種以上）のマーカーを発現しており；及びSOX2、T及びCDX2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば1種、2種又は3種、好ましくは3種）を実質的に発現していないことを特徴とする。1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、さらに、前記内腔に面し、CK8/KRT8およびZO1を共発現する細胞の層を含む。

[0023] 1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、内腔を有し：腹側後腸マーカーであるGATA3を発現しており；FOXA2、CK8/KRT8及びECADからなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種又は3種）のマーカーを発現しており；及びSOX2、T及びCDX2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば1種、2種又は3種、好ましくは3種）を実質的に発現していないことを特徴とする。前記腹側後腸オルガノイドは、例えば、FOXA2、CK8/KRT8及びECADを発現している。

[0024] 1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、内腔を有し；前記内腔に面し、CK8/KRT8およびZO1を共発現する細胞の層を含み； Δ N63、GATA3、ISL1及びSATB2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、又は3種以上）の腹側後腸マーカーを発現しており；Phospho-Smad1/5/8、HOXA13、CK8/KRT8、FOXA2、及びECADからなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、3種、又は4種以上）のマーカーを発現してお

り；及びSOX2、T及びCDX2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種又は3種、好ましくは3種）を実質的に発現していないことを特徴とする。前記腹側後腸オルガノイドは、好ましくは、GATA3を発現している。前記腹側後腸オルガノイドは、例えば、さらにΔN63、ISL1及びSATB2を発現している。前記腹側後腸オルガノイドは、例えば、さらにPhospho-Smad1/5/8、HOXA13、CK8/KRT8、FOXA2、及びECADを発現している。

[0025] 本明細書における用語「内腔」は、管状又は袋状の細胞構造体の内側の空間を意味する。内腔は、例えば液体で満たされていてもよい。1つの実施形態において、膀胱オルガノイドの内腔は、袋状の細胞構造体の内側の空間である。

[0026] 腹側後腸オルガノイドに関する用語「P63」は、がん抑制遺伝子P53のホモログであり、上皮において分化、増殖、維持などの作用を有するタンパク質を意味する。P63は、膀胱上皮細胞マーカー又は腹側後腸/Cloacaマーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するP63は、例えば免疫染色法にて抗P63抗体（例えば、Anti-P63 antibody rabbit monoclonal (EPR5701)）を用いて検出又は測定することができる。

[0027] 本明細書における用語「ΔNP63」は、N末端のトランス活性化ドメイン（TN）を欠くp63のアイソフォームを意味する。ΔNP63は、膀胱上皮細胞マーカー又は腹側後腸マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するΔNP63は、例えば免疫染色法にて抗ΔNP63抗体（例えば、Rabbit Anti-ΔNP63 (Cell signaling, #67825)）を用いて検出又は測定することができる。

[0028] 本明細書における用語「GATA3」は、DNAの「GATA」からなる標的DNA配列に結合し、遺伝子のオン・オフを制御する転写因子を意味する。GATA3は、腹側後腸マーカー又は膀胱上皮細胞マーカーとして利用

することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するGATA3は、例えば免疫染色法にて抗GATA3抗体（例えば、Goat Anti-GATA3（R&D Systems、#AF2605））を用いて検出又は測定することができる。

[0029] 本明細書における用語「UPK1B」は、ウロプラキン1a、11および111と共に尿路系上皮を形成する移行上皮の被覆細胞の形成に関与し、被覆細胞の透過性、バリアー機能を高める作用を有する膜糖タンパク質を意味する。UPK1Bは、膀胱上皮マーカー又は上皮組織マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するUPK1Bは、例えば、免疫染色法にて抗UPK1B抗体（Mouse Anti-UPK1B monoclonal antibody (clone 1E1)（Sigma-aldrich、#WH0007348M2））を用いて検出又は測定することができる。

[0030] 本明細書における用語「ISL1」は、LIMホメオドメインを有する転写因子で、インスリン遺伝子の発現調節領域に作用する因子を意味する。ISL1は、腹側後腸マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するISL1は、例えば、免疫染色法にて抗ISL1抗体（Mouse Anti-ISL1&2（DSHB、#39.4D5））を用いて検出又は測定することができる。

[0031] 本明細書における用語「SATB2」は、ATに富む配列に結合するDNA結合タンパク質を意味する。SATB2は、結腸又は直腸マーカー又は腹側後腸マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するSATB2は、例えば免疫染色法にて抗SATB2抗体（Rabbit Anti-SATB2（CELL MARQUE、#384R-14））を用いて検出又は測定することができる。

[0032] 本明細書における用語「CDX2」は、CDX2遺伝子にコードされたホメオボックスタンパク質を意味する。CDX2は、中腸／後腸マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するCDX2

は、例えば免疫染色法にて抗CDX2抗体（例えば、Anti-CDX2 antibody mouse monoclonal (CX2-88)）を用いて検出又は測定することができる。

[0033] 本明細書における用語「SOX2」は、SRY (sex determining region Y) - box 2) と呼ばれ、未分化状態ES細胞の自己複製維持に必須の転写因子を意味する。SOX2は、背側後腸マーカ－又は肺・胃系譜マーカ－として利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するSOX2は、例えば免疫染色法にて抗SOX2抗体（例えば、Anti-SOX2 antibody goat polyclonal (R&D Systems、#AF2018)）を用いて検出又は測定することができる。

[0034] 本明細書における用語「T」は、TBXT (T-box transcription factor T) と呼ばれ、Tボックスと呼ばれるN末端領域を介して、パリンドロームT部位と呼ばれるDNA配列に結合し、中胚葉の形成と分化に必要な遺伝子の転写に影響を与える転写因子を意味する。Tは、背側後腸マーカ－として利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するTは、例えば免疫染色法にて抗T抗体（例えば、Goat Anti-T/Brachyury antibody (R&D Systems、#AF2085)）を用いて検出又は測定することができる。

[0035] 本明細書における用語「ZO1」は、上皮細胞及び内皮細胞の密着結合 (Tight junction) で発現される、膜リンタンパク質を意味する。ZO1は、密着結合マーカ－として利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するZO1は、例えば、免疫染色法にて抗ZO1抗体 (Goat Anti-ZO1 (ThermoFisher、#PA5-19090)）を用いて検出又は測定することができる。

[0036] 本明細書における用語「サイトケラチン8 (KRT8又はCK8)」は、ケラチンタンパク質の1つのサブタイプであり、筋上皮細胞、膜基底細胞に

において発現する分子量約45 kDのタンパク質を意味する。CK8/KRT8は、腸管上皮マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するCK8/KRT8は、例えば免疫染色法にてAnti-Cytokeratin8 antibody rat monoclonal (TROMA-1))を用いて検出又は測定することができる。

[0037] 本明細書における用語「FOXA2」は、Forkhead box protein A2の略語であり、発生段階で重要な役割を果たす転写因子を意味する。FOXA2は、初期腸管上皮マーカー又は発生途上の膀胱上皮細胞マーカーとして利用することができる。FOXA2は、例えば免疫染色法にて抗FOXA2抗体(Mouse Anti-FOXA2 (Santa Cruz Biotechnology、#sc-101060))を用いて検出又は測定することができる。

[0038] 本明細書における用語「ECAD」は、E-カドヘリン(epithelial cadherin)とも呼ばれ、細胞接着に関する作用を有し、細胞表面に存在する膜貫通型糖タンパク質を意味する。ECADは、上皮組織マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するECADは、例えば免疫染色法にて抗ECAD抗体(例えば、Goat Anti-ECAD (R&D SYSTEMS、#AF648))を用いて検出又は測定することができる。

[0039] 本明細書における用語「HOXA13」は、ヒトではHOXA13遺伝子によってコードされるホメオボックスタンパク質を意味する。細胞又はオルガノイドにおいて発現するHOXA13は、例えば、定量PCRによって検出又は測定することができる。

[0040] 本明細書における用語「Phospho-Smad1/5/8」は、細胞内TGF- β シグナル伝達系において重要な役割を果たす転写因子を意味する。Phospho-Smad1/5/8は、腹側後腸及びCloaca領域マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するPhospho-Smad1/5/8は、例えば免疫染色法にて抗S

mad1/5/8抗体（例えば、Rabbit Anti-pSmad1/5/8（Cell signaling、#13820））を用いて検出又は測定することができる。

[0041] 本開示の1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3β阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、及び工程B：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3β阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地Bを用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で繊維芽細胞増殖因子及びGSK3β阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地Bを用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む方法によって、製造することができる。

[0042] 1つの実施形態において、工程Bは、工程b1：胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3β阻害剤を含有する誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクス存在下で、前記誘導培地B（誘導培地b1）を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び工程b2：前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で繊維芽細胞増殖因子、GSK3β阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b2）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程Bは、工程b3：胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3β阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で繊維芽細胞増殖因子、GSK3β阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0043] 本開示の1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、前記誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程b1：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK

3 β 阻害剤を含有する誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクス存在下で、前記誘導培地B（誘導培地b1）を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び工程b2：前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b2）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む方法によって、製造することができる。

[0044] 本開示の1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、及び工程b3：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む方法によって、製造することができる

[0045] 工程A：胚体内胚葉細胞の分化誘導

工程Aは、多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導することを含む。

[0046] 本明細書における用語「多能性幹細胞」は、試験管内（in vitro）で培養することができ、三胚葉（外胚葉、中胚葉および内胚葉）由来の組織に分化する能力、すなわち多能性(pluripotency)を有する幹細胞を意味する。多能性幹細胞は、例えば、受精卵、クローン胚、生殖幹細胞、又は組織内幹細胞等から樹立することができる。1つの実施形態において、多能性幹細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）、体細胞から誘導された人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性腫瘍細胞（EC細胞）、又は胚性生殖幹細胞（EG細胞）である。多能性幹細胞は、好ましくはES細胞又はiPS細胞である。

- [0047] 本明細書における用語「ES細胞」は、自己複製能を有し、多能性 (pluripotency) を有する幹細胞であり、初期胚に由来する多能性幹細胞を意味する。1つの実施形態において、ES細胞は、ヒトES細胞である。
- [0048] 本明細書における用語「iPS細胞」は、体細胞から誘導された多能性幹細胞であり、体細胞を初期化することにより、胚性幹細胞に似た多能性を人工的に持たせた細胞を意味する。iPS細胞は、例えば、繊維芽細胞等の分化した細胞を、Oct3/4、Sox2、Klf4、Mycなどの遺伝子の発現により初期化して樹立することができる。1つの実施形態において、iPS細胞は、ヒトの繊維芽細胞等の分化した細胞を初期化することによって樹立されたヒトiPS細胞である。
- [0049] 「誘導培地A」は、基本培地と、アクチビンA及びGSK3β阻害剤を含む添加剤とを含む。誘導培地Aは、例えば、基本培地（液体）に、前記添加剤（固体又は液体）を添加することで調製することができる。誘導培地Aに添加される前記添加剤の濃度は、培養に用いられる細胞を与えた動物種を考慮して、当業者により適宜設定される。「基本培地」は、公知のプロトコルに従って調製することができる細胞培養用培地であってよく、又は商業的に入手できる細胞培養用培地であってよい。基本培地は、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、基本培地イーグル (BME)、公知の幹細胞用の培地、又は公知の幹細胞を分化させるための培地であってよい。基本培地は、好ましくは幹細胞を分化させるための培地であり、例えば、STEMdiff APEL2 medium (STEMCELL Technologies) であってよい。幹細胞を分化させるための培地は、例えば、Nature Protocols, vol. 3, No. 5, pp. 768-776, 2008に従って調製することができる。誘導培地Aは、無タンパク質培地（例えば、PFHM-11）、抗生物質（例えばペニシリン／ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）、又は抗生物質－抗真菌剤混合液（例えば、Antibiotic-Antimycotic）、若しくはこれらの組合せをさらに含んでよい。

[0050] 本明細書における用語「アクチビンA」は、TGF β スーパーファミリーに属する因子であり、脳下垂体前葉からのFSH（卵胞刺激ホルモン）分泌を促進するタンパク質である。アクチビンAは、細胞分化、増殖、アポトーシス、及び発癌の調節において様々な機能を示す。誘導培地Aは、アクチビンAを、例えば、10～500 ng/mL、30～250 ng/mL、又は50～150 ng/mL含有してよい。

[0051] 本明細書における用語「GSK3 β 阻害剤」は、wnt/ β -catenin経路を含む様々なシグナリング経路に関係するセリンスレオニンタンパク質キナーゼ3 β の作用を阻害する化合物を意味する。GSK3 β 阻害剤は、例えば、CHIR-99021、SB216763、CHIR-98014、Staurosporine、K252A、WNT（好ましくはWNT3A）又はTWS119、若しくはこれらの組合せであってよい。GSK3 β 阻害剤は、好ましくはCHIR-99021又はWNT（好ましくはWNT3A）である。誘導培地Aは、0.1～5 μ M、0.3～2.5 μ M、又は0.5～1.5 μ MのCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でGSK3 β 阻害剤を含んでよい。「GSK3 β 阻害作用」は、例えば、所定量のGSK3 β 阻害剤の存在下で、 β カテニンの核移行による転写活性に基づいて測定することができる。 β カテニンの核移行による転写活性は、公知の方法（例えばルシフェラーゼ活性測定）に従って測定することができる。 β カテニンの核移行による転写活性は、例えば商業的に入手なキット（例えばLEADING LIGHT（登録商標）Wnt Reporter Assay Starter kit）を用いて測定することができる。本明細書において用語「同程度の作用」は、対照となる作用と比べて、 $\pm 30\%$ 以内、 $\pm 20\%$ 以内、又は $\pm 10\%$ 以内の作用を意味する。1つの実施形態において、同程度の作用は、対照となる作用と比べて $\pm 30\%$ 以内の作用である。

[0052] 誘導培地Aは、GSK3 β 阻害剤（好ましくはCHIR-99021）を0.1～5 μ M、0.3～2.5 μ M、又は0.5～1.5 μ M含有してよ

い。誘導培地Aは、 $0.1 \sim 5 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \sim 2.5 \mu\text{M}$ 、又は $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ のCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でGSK3 β 阻害剤を含んでよい。誘導培地Aは、GSK3 β 阻害剤として $0.2 \sim 200 \text{ ng/ml}$ 、 $10 \sim 100 \text{ ng/ml}$ 、又は $2 \sim 20 \text{ ng/ml}$ のWNT（好ましくはWNT3A）を含有してよい。誘導培地AがGSK3 β 阻害剤としてWNT（好ましくはWNT3A）を含む場合、誘導培地Aは、 $0.1 \sim 5 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \sim 2.5 \mu\text{M}$ 、又は $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ のCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でWNT（好ましくはWNT3A）を含有してよい。

[0053] 後述する誘導培地b2は、 $1 \sim 50 \mu\text{M}$ 、 $3 \sim 25 \mu\text{M}$ 、又は $5 \sim 10 \mu\text{M}$ のCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でGSK3 β 阻害剤を含んでよい。1つの実施形態において、誘導培地b2は、 $2 \sim 2000 \text{ ng/ml}$ 、 $100 \sim 1000 \text{ ng/ml}$ 、又は $20 \sim 200 \text{ ng/ml}$ のWNT（好ましくはWNT3A）を含有してよい。後述する誘導培地b3は、 $0.5 \sim 25 \mu\text{M}$ 、 $1 \sim 15 \mu\text{M}$ 、又は $2 \sim 8 \mu\text{M}$ のCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でGSK3 β 阻害剤を含んでよい。1つの実施形態において、誘導培地b3は、 $1 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $50 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、 $10 \sim 100 \text{ ng/mL}$ のWNT（好ましくはWNT3A）を含有してよい。

[0054] 誘導培地Aを用いた多能性幹細胞の培養は、公知の細胞培養条件下で実施することができる。公知の細胞培養条件は、 37°C で $5\% \text{ CO}_2$ 下にて維持することであってよい。培養する温度は、 37°C に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知の温度を適宜用いることができる。 CO_2 濃度は、 5% に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知の CO_2 濃度を適宜用いることができる。多能性幹細胞の培養は、2日～5日、2日～4日、又は3日実施することができる。

[0055] 「胚体内胚葉細胞」は、多能性幹細胞をアクチビンA及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養することによって、分化誘導すること

ができる。

[0056] 誘導培地A中で培養される多能性幹細胞は、公知の幹細胞用の培地を用いて前培養されていてよい。そのような多能性幹細胞は、例えば、iMatrix-511でコーティングした細胞培養容器にて、StemFit AK02N培地(REPROCELL)を用いて前培養することができる。前培養された多能性幹細胞は、公知の方法又は商業的に入手可能な試薬(例えば、TrypLE Select(Thermo Fisher Scientific))を用いて、細胞培養容器から剥離することができる。剥離した細胞は、培地(例えば、iMatrix-511(nippi))を最終濃度 $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように添加したStemFit AK02N($10\mu\text{M}$ Y-27632))に懸濁してよい。

[0057] 1つの実施形態において、誘導培地Aを用いた多能性幹細胞の培養は、前培養した多能性幹細胞(例えばヒトiPS又はES細胞)の細胞懸濁液を、 $30,000\sim90,000\text{cells}/\text{cm}^2$ となるように6well plateに播種し、 37°C 、 CO_2 5%下で1日間培養することを含む。次に、培地を、誘導培地AであるSTEMdiff APEL2 medium(STEMCELL Technologies)($100\text{ng}/\text{mL}$ ActivinA、 $1\sim1.25\mu\text{M}$ CHIR99021、2% PFHM-11、及びAntibiotic-Antimycotic添加)に交換して、3～5日間培養する。前記培養によって、胚体内胚葉が分化誘導される。培地交換は、例えば、2日目以降は毎日行う。好ましくは、細胞が、胚体内胚葉マーカーであるFOXA2、SOX17を発現していることを確認する。胚体内胚葉誘導期間が長すぎる場合、その後の後腸誘導(後方化)の過程で前腸系譜細胞(ALB+、AFP+、PDX1+)が混入する割合が高まる傾向にある。従って、胚体内胚葉誘導期間は、FOXA2、SOX17の発現と共に、その後の後腸誘導過程で最も前腸系譜細胞の混入が抑制される期間を選択することが好ましい。播種する細胞密度は、分化誘導2日目にコロニー状の細胞群が外へ拡がり、分化誘導3日目にシート状で100%

コンフルエントになる条件を選択することが好ましい。さらに、後腸誘導時に浮遊スフェロイドが最も多く得られる条件を選択することが好ましい。細胞密度が少ない場合、又は多い場合、浮遊するスフェロイドを十分に得ることが困難になる傾向がある。

[0058] 工程 b 1 : 後腸分化誘導

工程 b 1 は、胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地 B（誘導培地 b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクス存在下で、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地 B（誘導培地 b 1）を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0059] 「誘導培地 B」は、基本培地と、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい添加剤とを含む。1つの実施形態に係る誘導培地 B は、胚体内胚葉細胞のスフェロイドを形成させるために用いられ、基本培地と、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有する添加剤とを含む。前記スフェロイドを形成させるために用いられる誘導培地 B は、本明細書において「誘導培地 b」とも称される。1つの実施形態に係る誘導培地 B は、後腸オルガノイドを形成させるために用いられ、基本培地と、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有する添加剤とを含む。前記スフェロイドから後腸オルガノイドを形成させるために用いられる誘導培地 B は、本明細書において「誘導培地 b 1」とも称される。後述する後腸オルガノイドから腹側後腸オルガノイドを形成させるために用いられる誘導培地 B は、本明細書において「誘導培地 b 2」とも称される。後述する胚体内胚葉細胞から腹側後腸オルガノイドを形成させるために用いられる誘導培地 B 又は前記スフェロイドから腹側後腸オルガノイドを形成させるために用いられる誘導培地 B は、本明細書において「誘導培地 b 3」とも称される。

[0060] 誘導培地 B は、例えば、基本培地（液体）に、前記添加剤（固体又は液体）を添加することで調製することができる。誘導培地 B に関する基本培地は

、誘導培地 A に関する基本培地についての説明が適宜適用される。誘導培地 B に添加される前記添加剤の濃度は、培養に用いられる細胞を与えた動物種を考慮して、当業者により適宜設定される。誘導培地 B は、ヘパリン、無タンパク質培地（例えば、PFHM-1）、抗生物質（例えばペニシリン／ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）、又は抗生物質－抗真菌剤混合液（例えば、Antibiotic-Antimycotic）、若しくはこれらの組合せをさらに含んでよい。

[0061] 「誘導培地 b」又は「誘導培地 b1」は、基本培地と、FGF 及び GSK3β 阻害剤を含有する添加剤とを含む。誘導培地 b 及び b1 は、例えば、基本培地（液体）に、前記添加剤（固体又は液体）を添加することで調製することができる。誘導培地 b 及び b1 に関する基本培地は、誘導培地 A に関する基本培地についての説明が適宜適用される。1 つの実施形態において、誘導培地 b 及び b1 は、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3β 阻害剤を含み、骨形成タンパク質を実質的に含まない。1 つの実施形態において、骨形成タンパク質を実質的に含まない誘導培地 b 及び b1 は、骨形成タンパク質を完全に含まない。1 つの実施形態において、骨形成タンパク質を実質的に含まない誘導培地 b は、胚体内胚葉細胞のスフェロイド形成を阻害しない濃度で骨形成タンパク質を含んでよく、例えば、1 ng/ml 未満、0.5 ng/ml 未満、又は 0.1 ng/ml 未満の骨形成タンパク質を含んでよい。1 つの実施形態において、骨形成タンパク質を実質的に含まない誘導培地 b1 は、胚体内胚葉細胞のスフェロイドからの後腸オルガノイド形成を阻害しない濃度で骨形成タンパク質を含んでよく、例えば、1 ng/ml 未満、0.5 ng/ml 未満、又は 0.1 ng/ml 未満の骨形成タンパク質を含んでよい。

[0062] 本明細書における用語「繊維芽細胞増殖因子（FGF）」は、繊維芽細胞又は内皮細胞の増殖を促進する分子量 16,000～20,000 のタンパク質を意味する。FGF（例えば FGF4）は、例えば、誘導培地 B において、前方内胚葉由来の細胞の混入を抑制する目的で添加される。FGF（例

えばFGF4)は、例えば、誘導培地Bにおいて、後腸スフェロイドを形成させる目的で添加される。FGFは、例えば、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、又はFGF23、若しくはこれらの組合せであってよい。FGFは、好ましくはFGF4又はFGF7、若しくはこれらの組合せである。

[0063] 誘導培地b及びb1は、FGF(好ましくはFGF4)を20~1000 ng/mL、60~500 ng/mL、又は100~300 ng/mL含有してよい。誘導培地b及びb1は、FGF7を10~500 ng/mL、30~250 ng/mL、又は50~150 ng/mL、又はFGF4を20~1000 ng/mL、60~500 ng/mL、又は100~300 ng/mL含有してよい。誘導培地b又はb1は、20~1000 ng/mL、60~500 ng/mL、又は100~300 ng/mLのFGF4を含む誘導培地b又はb1で培養した細胞又はオルガノイドにおける前方内胚葉細胞マーカー(例えば、肝臓系譜マーカーであるALB、膵臓系譜マーカーであるPDX1、又は肺・胃系譜マーカーであるSOX2)の発現抑制と、同程度の発現抑制を示す濃度でFGFを含んでよい。この文脈で誘導培地bを用いて培養される細胞は、本開示に係る工程Aで多能性幹細胞から分化誘導された胚体内胚葉細胞であってよい。この文脈で誘導培地b1を用いて培養される細胞は、本開示に係る工程b1で前記胚体内胚葉細胞から形成されたスフェロイドであってよい。前方内胚葉細胞マーカーの発現は、例えば免疫染色法に従って測定することができる。免疫染色法において、前方内胚葉細胞マーカーの発現は、例えば商業的に入手可能な抗体を用いて測定することができる。本明細書において「同程度の発現抑制」は、対照となる発現量と比べて、±30%以内、±20%以内、又は±10%以内の発現量を意味する。1つの実施形態において、同程度の作用は、±30%以内の発現量であ

る。

[0064] 本明細書において用語「ALB」は、約600個のアミノ酸から構成される分子量約66,000のタンパク質であるアルブミンを意味する。ALBは、例えば肝臓系譜マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するALBは、例えば免疫染色法にて抗アルブミン抗体を用いて検出又は測定することができる。

[0065] 本明細書において用語「Pancreatic and duodenal homeobox factor-1 (PDX1)」は、インスリン遺伝子プロモーター領域に結合し、インスリン遺伝子の膵β細胞特異的発現に関与するホメオドメインタンパク質を意味する。PDX1は、例えば膵臓系譜マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するPDX1は、例えば免疫染色法にて抗PDX1抗体を用いて検出又は測定することができる。

[0066] 誘導培地b又はb1は、20~1000 ng/mL、60~500 ng/mL、又は100~300 ng/mLのFGF4が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度でFGFを含んでよい。「繊維芽細胞増殖作用」は、例えば、所定量のFGFの存在下で、繊維芽細胞が³Hチミジンを細胞外から細胞内に取込む量に基づいて測定することができる。繊維芽細胞は、例えば、NR6R-3T3マウス繊維芽細胞を用いることができる。チミジンの細胞外から細胞内への取込み量は、公知の方法（例えば、*Methods in Enzymology*, Volume 109, 1985, Pages 749-773に記載の方法）に従って測定することができる。

[0067] 1つの実施形態において、誘導培地b又はb1は、20~1000 ng/mL、60~500 ng/mL、又は100~300 ng/mLのFGF4が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度でFGFを含む。

[0068] 誘導培地b及びb1は、GSK3β阻害剤（好ましくはCHIR-99021）を1~50 μM、3~25 μM、5~10 μM、0.5~16 μM、3~12 μM、又は6~10 μM含有してよい。誘導培地b及びb1は、W

NT（好ましくはWNT3A）を2～2000 ng/ml、100～1000 ng/ml、又は20～200 ng/ml含有してよい。誘導培地b及びb1は、1～50 μ M、3～25 μ M、5～10 μ M、0.5～16 μ M、3～12 μ M、又は6～10 μ M、或いは0.1～5 μ M、0.3～2.5 μ M、又は0.5～1.5 μ MのCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でGSK3 β 阻害剤を含んでよい。誘導培地b又はb1がGSK3 β 阻害剤としてWNT（好ましくはWNT3A）を含む場合、誘導培地b3は、1～50 μ M、3～25 μ M、5～10 μ M、0.5～16 μ M、3～12 μ M、又は6～10 μ MのCHIR-99021が示すGSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度でWNT（好ましくはWNT3A）を含む。

[0069] 誘導培地bと誘導培地b1とは、それらの組成及び／又は用量が同一であってもよく、異なってもよい。1つの実施形態において、誘導培地bと誘導培地b1は、それらの組成及び／又は用量が同一である。

[0070] 「後腸オルガノイド」は、例えば、本開示に係る誘導培地Bを用いて、胚体内胚葉細胞を培養することに形成させることができる。1つの実施形態において、後腸オルガノイドは、胚体内胚葉細胞を、例えば、FGF及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地bを用いて培養し、次いで、細胞外マトリクスゲル中で、FGF及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地b1を用いて三次元培養することによって、形成させることができる。細胞外マトリクスゲル中の後腸オルガノイドは、公知の方法に従って又は商業的に入手できる試薬を用いて、回収することができる。細胞外マトリクスゲル中の後腸オルガノイドは、例えば、メタロプロテアーゼを用いて、細胞外マトリクスゲルを穏やかに壊すことによって回収することができる。

[0071] 1つの実施形態において、後腸オルガノイドは、胚体内胚葉細胞を、例えば、FGF及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地bを用いて培養し、次いで、細胞外マトリクスゲル上で、FGF及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地b1を用いて培養することによって、形成させることができる。1

つの実施形態において、後腸オルガノイドは、胚体内胚葉細胞を、例えば、FGF及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地bを用いて培養し、次いで、分散成分としての細胞外マトリクス、FGF及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地b1を用いて培養することによって、形成させることができる。

[0072] 本明細書における用語「細胞外マトリクス（ECM）」は、限定するものではないが、水、多糖、エラスチン、インテグリン、及び糖タンパク質を含む。糖タンパク質は、例えば、コラーゲン、エンタクチン（ナイドジェン）、フィブロネクチン、およびラミニンを含む。ECMは、例えば、試験管内でECM産生細胞（例えば、上皮細胞、内皮細胞、壁内胚葉様細胞、又は繊維芽細胞）を培養した後に、前記ECM細胞を除去することによって調製することができる。ECM産生細胞は、例えば、主としてコラーゲン及びプロテオグリカンを生産する軟骨細胞、主としてIⅤ型コラーゲン、ラミニン、間質プロコラーゲン、及びフィブロネクチンを生産する繊維芽細胞、並びに主にコラーゲン（I型、III型、およびV型）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、及びテネイシン-Cを生産する結腸筋繊維芽細胞であってよい。ECMは、商業的に入手可能である。商業的に入手できる細胞外マトリクスは、例えば、細胞外マトリクスタンパク質（Invitrogen）、Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）マウス肉腫細胞からの基底膜調製物（例えば、Cultrex（登録商標）Basement Membrane Extract（Trevigen, Inc.））、またはMatrigel（登録商標）（Corning社）であってよい。ECMは、合成細胞外マトリクス（例えば、ProNectin（Sigma Z378666））であってよい。細胞外マトリクスは、1種であってよく、又は2種以上の混合物であってよい。1つの実施形態において、ECMは、Matrigelである。

[0073] 後腸オルガノイド形成に関する細胞外マトリクスゲルは、タンパク質濃度1~8mg/mL、1.5~6mg/mL、又は2.5mg/mL若しくは

5 mg/mLのMatrigel溶液で形成されるゲルと同程度の弾力のゲルとすることが好ましい。後腸オルガノイド形成に関する細胞外マトリクスゲルは、好ましくは、タンパク質濃度1~8 mg/mL、1.5~6 mg/mL、又は1.5~3.5 mg/mL若しくは4~6 mg/mLのMatrigelで形成される。後述する工程c2を実施して膀胱オルガノイドを形成させる場合、細胞外マトリクスゲルは、タンパク質濃度1~4 mg/mL、2~3 mg/mL、又は2.5 mg/mLのMatrigel溶液で形成されるゲルと同程度の弾力のゲルとすることが好ましい。本明細書において用語「同程度の弾力」は、対象となる弾力と比べて、±30%以内、±20%以内、又は±10%以内の弾力を意味する。1つの実施形態において、同程度の弾力は、対象となる弾力と比べて±30%以内の弾力である。膀胱オルガノイドの形成に関する細胞外マトリクスゲルは、好ましくは、タンパク質濃度1~4 mg/mL、2~3 mg/mL、又は2.5 mg/mLのMatrigelで形成される。

[0074] 「分散成分」としての細胞外マトリクスは、例えば、誘導培地中で分散又は溶解している状態で存在する。分散成分として存在する場合、細胞外マトリクスは、例えば、誘導培地の容積あたり10% v/v以下、7% v/v以下、5% v/v以下、例えば、2.5% v/vの分量で存在する。1つの実施形態において誘導培地は、0.1~10% v/v、0.1~7% v/v、0.1~5% v/v、1~10% v/v、1~7% v/v、1~5% v/v、1~2.5% v/v、2~10% v/v、2~7% v/v、2~5% v/v、又は2~2.5% v/vの分量で細胞外マトリクスを含む。細胞外マトリクスが生体由来の生成物（例えば、マウス肉腫細胞からの基底膜調製物）を含む場合、誘導培地中の細胞外マトリクスの含有濃度は、製造するオルガノイドの汚染防止又は低減の観点から、低濃度であることが好ましい。

[0075] 誘導培地bを用いた胚体内胚葉細胞の培養は、例えば、胚体内胚葉細胞が培養容器の表面上に接着した状態で培養することを含む。このような状態での培養を、本明細書中、二次元培養ともいう。1つの実施形態において、誘

誘導培地 b を用いた胚体内胚葉細胞の二次元培養により、前記細胞のスフェロイドが形成され、一部のスフェロイドが培地中に浮遊し得る。1つの実施形態において、誘導培地 b を用いて低吸着性の培養容器中の胚体内胚葉細胞を静置培養することにより、前記細胞のスフェロイドが形成され、一部のスフェロイドが培地中に浮遊し得る。培地中に浮遊したスフェロイド及び培養容器に付着しているスフェロイドを、ピペティングなどにより回収することができる。誘導培地 b を用いた胚体内胚葉細胞の培養は、例えば、公知の細胞培養条件下で3日～6日、3日～5日、又は4日実施することができる。

[0076] 誘導培地 b 1 を用いた胚体内胚葉細胞の培養は、前記胚体内胚葉細胞のスフェロイドを、細胞外マトリクス存在下で、培養することを含む。細胞外マトリクス存在下での前記スフェロイドの培養は、例えば、前記スフェロイドを、細胞外マトリクスを分散成分として含む誘導培地 b 1 を用いて培養することを含む。前記培養は、例えば、低吸着性の培養容器を用いた静置培養又は回転浮遊培養により実施することができる。分散成分としての細胞外マトリクス存在下での前記スフェロイドの培養により、後腸オルガノイドが形成され得る。細胞外マトリクス存在下での前記スフェロイドの培養は、例えば、前記スフェロイドを細胞外マトリクスゲル上に播種させて培養することを含む。細胞外マトリクスゲル上での前記スフェロイドの培養により、後腸オルガノイドが形成され得る。細胞外マトリクス存在下での前記スフェロイドの培養は、例えば、前記スフェロイドを細胞外マトリクスゲル中に存在させた状態で培養することを含む。このような状態での培養を、本明細書中、三次元培養ともいう。胚体内胚葉細胞スフェロイドの三次元培養により、後腸オルガノイドが形成され得る。細胞外マトリクス存在下での誘導培地 b 1 を用いた胚体内胚葉細胞スフェロイドの培養は、例えば、公知の細胞培養条件下で3日～6日、3日～5日、又は4日実施することができる。

[0077] 1つの実施形態において、工程 b 1 は、胚体内胚葉細胞を、誘導培地 b を用いて培養して胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させ、前記胚体内胚葉細胞スフェロイドを含む細胞外マトリクスゲルを形成させ、次いで、前記細胞

外マトリクスゲル中で、前記スフェロイドを、誘導培地b1を用いて培養した後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程b1は、胚体内胚葉細胞を、誘導培地bを用いて培養して胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させ、次いで、細胞外マトリクスゲル上で前記スフェロイドを、誘導培地b1を用いて培養した後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程b1は、胚体内胚葉細胞を、誘導培地bを用いて培養して胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させ、次いで、分散成分としての細胞外マトリクス存在下で前記スフェロイドを、誘導培地b1を用いて培養した後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0078] 1つの実施形態において、工程b1は、胚体内胚葉細胞のスフェロイドを形成させるために、胚体内胚葉細胞を、誘導培地bであるSTEMdiff APEL2 medium (200 ng/mL FGF4、8 μ M CHIR99021、1 μ g/mL Heparin、2% PFHM-1、Antibiotic-Antimycotic) 中で、1~9日間培養することを含む。このスフェロイド形成の期間中、スフェロイドが最も浮遊する時期に浮遊スフェロイドを回収し、3次元培養を開始する。スフェロイドが最も多く浮遊する前日から100 rpmで振とう培養を開始する。翌日、浮遊したスフェロイドを35 mmディッシュに回収する。次いで、浮遊スフェロイドを回収したwellに残っているスフェロイドにピペッティングにより回収する。回収したスフェロイドは氷上に置いておく。Matrigel Growth Factor Reduced (Corning) を誘導培地b1で希釈 (2.5~10 mg/mL) し、Cell Culture Insert Transparent PET Membrane 24 well 8.0 μ m pore size (Corning) に50 μ L/well 加え、37℃で30 min~60 min インキュベートしゲル化させる。次いで、Matrigel 溶液 50 μ L に回収したスフェロイド30~100個を加えて混合し、ゲル化させたMatrigelの上に全量加える。37℃、CO₂ 5%下で30 min~60 min インキュベート

しゲル化させ、誘導培地b1をCell Culture Insertの上に200 μ L、下に300 μ L加え、37℃、CO₂ 5%下で培養する。培地交換は2次元培養時は毎日、3次元培養時は2日毎に行うことが好ましい。後腸分化誘導時、細胞が、中腸／後腸マーカーであるFOXA2、CDX2が共発現していることを確認することが好ましい。後腸／Cloaca領域で発現されるP63の発現が確認できるまで、誘導培地b1で培養を続けてよい。

[0079] 工程b2： 後腸腹側化

工程b2は、後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b2）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0080] 「誘導培地b2」は、基本培地と、FGF、GSK3 β 阻害剤、及び骨芽形成因子を含有する添加剤とを含む。誘導培地b2は、例えば、基本培地（液体）に、前記添加剤（固体又は液体）を添加することで調製することができる。誘導培地b2に関する基本培地は、誘導培地Aに関する基本培地についての説明が適宜適用される。

[0081] 誘導培地b2は、FGF（好ましくはFGF4）を、20～1000ng/mL、60～500ng/mL、又は100～300ng/mL含有してよい。誘導培地b2は、FGF7を10～500ng/mL、30～250ng/mL、又は50～150ng/mL、或いはFGF4を20～1000ng/mL、60～500ng/mL、又は100～300ng/mL含有してよい。誘導培地b2は、20～1000ng/mL、60～500ng/mL、又は100～300ng/mLのFGF4を含む誘導培地b2で培養したオルガノイドにおける前方内胚葉細胞マーカー（例えば、肝臓系譜マーカーであるALB、膵臓系譜マーカーであるPDX1、又は肺・胃系譜マーカーであるSOX2）の発現抑制と、同程度の発現抑制を示す濃度でFGFを含んでよい。この文脈で誘導培地b2を用いて培養されるオルガノイ

ドは、本開示に係る工程 b 1 で胚体内胚葉細胞から分化誘導された後腸オルガノイドであってよい。誘導培地 b 2 は、 $20 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $60 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、又は $100 \sim 300 \text{ ng/mL}$ の FGF 4 が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度で FGF を含んでよい。1つの実施形態において、誘導培地 b 2 は、 $20 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $60 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、又は $100 \sim 300 \text{ ng/mL}$ の FGF 4 が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度で FGF を含む。

[0082] 誘導培地 b 2 は、GSK3 β 阻害剤（好ましくは CHIR-99021）を $1 \sim 50 \mu\text{M}$ 、 $3 \sim 25 \mu\text{M}$ 、 $5 \sim 10 \mu\text{M}$ 、 $0.5 \sim 16 \mu\text{M}$ 、 $3 \sim 12 \mu\text{M}$ 、又は $6 \sim 10 \mu\text{M}$ 含有してよい。誘導培地 b 2 は、GSK3 β 阻害剤として、 $2 \sim 2000 \text{ ng/mL}$ 、 $100 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、又は $20 \sim 200 \text{ ng/mL}$ の WNT（好ましくは WNT3A）を含有してよい。誘導培地 b 2 は、 $1 \sim 50 \mu\text{M}$ 、 $3 \sim 25 \mu\text{M}$ 、又は $5 \sim 10 \mu\text{M}$ の CHIR-99021 が示す GSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度で GSK3 β 阻害剤を含んでよい。誘導培地 b 2 が GSK3 β 阻害剤として WNT（好ましくは WNT3A）を含む場合、誘導培地 b 2 は、 $1 \sim 50 \mu\text{M}$ 、 $3 \sim 25 \mu\text{M}$ 、又は $5 \sim 10 \mu\text{M}$ の CHIR-99021 が示す GSK3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度で WNT（好ましくは WNT3A）を含有してよい。

[0083] 本明細書における用語「骨形成タンパク質（BMP）」は、トランスフォーミング増殖因子 β スーパーファミリーに属するタンパク質であって、異所性骨形成を誘導するタンパク質を意味する。BMP は、誘導培地 B（例えば誘導培地 b 2 及び b 3）において、腹側後腸オルガノイドを誘導する目的で添加される。BMP は、例えば、BMP 2、BMP 4、又は BMP 7、若しくはこれらの組合せであってよい。BMP は、好ましくは BMP 4 である。誘導培地 b 2 は、BMP（例えば BMP 4）を、 $3 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、 $9 \sim 75 \text{ ng/mL}$ 、又は $15 \sim 45 \text{ ng/mL}$ 含有してよい。

[0084] 誘導培地 b 2 は、 $3 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、 $9 \sim 75 \text{ ng/mL}$ 、又は 15

～45 ng/mLのBMP4が示すアルカリフォスファターゼ産生誘導作用と同程度の作用を示す濃度でBMPを含んでよい。「アルカリフォスファターゼ産生誘導作用」は、例えば、所定量のBMP存在下で、軟骨形成細胞におけるアルカリフォスファターゼの産生量に基づいて測定することができる。軟骨形成細胞は、例えばマウス軟骨形成細胞を用いることができる。アルカリフォスファターゼの産生量は、公知の方法（例えば、*Biochemical and Biophysical Research Communications*、Volume 315、Issue 2、Pages 272–280に記載の方法）に従って測定することができる。

[0085] 誘導培地b2は、3～150 ng/mL、9～75 ng/mL、又は15～45 ng/mLのBMP4を含む誘導培地b2で培養した細胞又はオルガノイドにおける腹側後腸マーカー（例えばGATA3、P63、又はHOXA13）の発現と同程度の発現を示す濃度でBMPを含んでよい。この文脈で、誘導培地b2を用いて培養される細胞は、本開示に係る工程b1で胚体内胚葉細胞から分化誘導された後腸オルガノイドであってよい。前記腹側後腸マーカーの発現は、例えば免疫染色法に従って測定することができる。免疫染色法において、腹側後腸マーカーの発現は、各マーカーに関して本開示で示した抗体を用いて測定することができる。本明細書において用語「同程度の発現」は、対照となる発現量と比べて、±30%以内、±20%以内、又は±10%以内の発現を意味する。1つの実施形態において、同程度の発現は、対照となる発現量と比べて±30%以内の発現である。

[0086] 1つの実施形態において、誘導培地b2は、3～150 ng/mL、9～75 ng/mL、又は15～45 ng/mLのBMP4が示すアルカリフォスファターゼ産生誘導作用と同程度の作用を示す濃度でBMPを含む。

[0087] 誘導培地bと、誘導培地b1と、誘導培地b2からBMPを除いた培地とは、それらの組成及び／又は用量が同一であってもよく、異なってもよい。1つの実施形態において、誘導培地bと、誘導培地b1と、誘導培地b2からBMPを除いた培地とは、それらの組成及び／又は用量が同一である。

。

- [0088] 細胞外マトリクス存在下での誘導培地 b 2 を用いた後腸オルガノイドの培養は、前記した細胞外マトリクス存在下での誘導培地 b 1 を用いた胚体内胚葉細胞スフェロイドの培養に対する説明が適宜適用される。細胞外マトリクス存在下での誘導培地 b 2 を用いた後腸オルガノイドの培養は、例えば、公知の細胞培養条件下で実施することができる。公知の細胞培養条件は、37℃で5%CO₂下にて維持することであってよい。培養する温度は、37℃に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知の温度を適宜用いることができる。CO₂濃度は、5%に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知のCO₂濃度を適宜用いることができる。後腸オルガノイドの培養は、3日～6日、3日～5日、又は4日実施することができる。
- [0089] 工程 b 1 と工程 b 2 との細胞外マトリクスの状態（ゲル状態又は分散成分の状態）は、同一であってもよく、異なってもよい。1つの実施形態において、工程 b 1 と工程 b 2 との細胞外マトリクスの状態は、同一である。1つの実施形態において、後腸オルガノイドを含む細胞外マトリクスゲルは、工程 b 1 で形成された細胞外マトリクスゲルであってよく、又は工程 b 1 の後に、細胞外マトリクスゲルから後腸オルガノイドを回収し、回収した前記後腸オルガノイドを含むように新たに形成した細胞外マトリクスゲルであってもよい。操作の簡潔さの観点から、工程 b 2 における後腸オルガノイドを含む細胞外マトリクスゲルは、工程 b 1 で形成された細胞外マトリクスゲルである。
- [0090] 1つの実施形態において、工程 b 2 は、細胞外マトリクスゲル中の後腸オルガノイドを、誘導培地 b 2 を用いて培養して腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程 b 2 は、細胞外マトリクスゲル上で後腸オルガノイドを、誘導培地 b 2 を用いて培養して腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程 b 2 は、分散成分としての細胞外マトリクスの存在下で後腸オルガノイドを、誘導培地 b 2 を用いて培養して腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0091] 1つの実施形態において、誘導培地b2を用いた後腸オルガノイドの培養は、後腸を腹側化するために、細胞外マトリクスゲル中の後腸オルガノイドを、誘導培地b2であるSTEMdiff APEL2 medium (30 ng/mL BMP4、200 ng/mL FGF4、8 μ M CHIR99021、1 μ g/mL Heparin、2%PFHM-1I、Antibiotic-Antimycotic) 又はSTEMdiff APEL2 medium (30 ng/mL BMP4、100 ng/mL FGF7、200 ng/mL FGF4、8 μ M CHIR99021、1 μ g/mL Heparin、2%PFHM-1I、Antibiotic-Antimycotic) を用いて3~6日間培養することを含む。誘導培地b2は、Cell Culture Insertゲルの上に200 μ L、下に300 μ L加え、2日毎に培地交換する。細胞において、背側後腸マーカーであるSOX2、CDX2の発現が減少し、腹側後腸/CloacaマーカーであるP63が強発現するまで腹側化を継続することが好ましい。後方化及び腹側化が不十分な場合、中腸および背側腸管系譜の細胞が混入する。その場合、後腸誘導期間又は後腸腹側化期間を延長する。

[0092] 工程b3： 腹側後腸オルガノイド形成

工程b3は、胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地Bを用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程b3は、胚体内胚葉細胞を、前記誘導培地Bを用いて培養して胚体内胚葉細胞のスフェロイドを形成させ、次いで、細胞外マトリクスの存在下で前記誘導培地b3を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させるための誘導培地Bは、前記誘導培地b3と組成及び/又は用量が同一であってよい。この文脈において、工程b3は、胚体内胚葉細胞

胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で前記誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0093] 本開示の1つの実施形態に係る腹側後腸オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、及び工程b3：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で前記誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む方法によって、製造することができる。

[0094] 「誘導培地b3」は、基本培地と、FGF、GSK3 β 阻害剤、及び骨芽形成因子を含有する添加剤とを含む。誘導培地b3は、例えば、基本培地（液体）に、前記添加剤（固体又は液体）を添加することで調製することができる。誘導培地b3に関する基本培地は、誘導培地Aに関する基本培地についての説明が適宜適用される。

[0095] 誘導培地b3は、FGF（好ましくはFGF4）を、20～1000 ng/mL、60～500 ng/mL、又は100～300 ng/mL含有してよい。誘導培地b3は、FGF7を10～500 ng/mL、30～250 ng/mL、又は50～150 ng/mL、或いはFGF4を20～1000 ng/mL、60～500 ng/mL、又は100～300 ng/mL含有してよい。誘導培地b3は、GSK3 β 阻害剤（好ましくはCHIR-99021）を0.5～25 μ M、1～15 μ M、2～8 μ M、0.1～10 μ M、0.5～9 μ M、1～8 μ M、2～6 μ M、又は3～5 μ M含有してよい。誘導培地b3は、骨芽形成因子（好ましくはBMP4）を、0.1～100 ng/mL、0.5～80 ng/mL、1～60 ng/mL、2～40 ng/mL、又は5～20 ng/mL含有してよい。

[0096] 誘導培地 b 3 は、 $20 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $60 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、又は $100 \sim 300 \text{ ng/mL}$ の FGF 4 を含む誘導培地 b 3 で培養した細胞又はオルガノイドにおける前方内胚葉細胞マーカー（例えば、肝臓系譜マーカーである ALB、膵臓系譜マーカーである PDX 1、又は肺・胃系譜マーカーである SOX 2）の発現抑制と、同程度の発現抑制を示す濃度で FGF を含有してよい。この文脈で誘導培地 b 3 を用いて培養される細胞は、本開示に係る工程 A で多能性幹細胞から分化誘導された胚体内胚葉細胞であってよい。この文脈で誘導培地 b 3 を用いて培養されるオルガノイドは、本開示に係る工程 b 1 で前記胚体内胚葉細胞から分化誘導された後腸オルガノイドであってよい。誘導培地 b 3 は、 $20 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $60 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、又は $100 \sim 300 \text{ ng/mL}$ の FGF 4 が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度で FGF を含んでよい。1 つの実施形態において、誘導培地 b 3 は、 $20 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $60 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、又は $100 \sim 300 \text{ ng/mL}$ の FGF 4 が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度で FGF を含む。

[0097] 誘導培地 b 3 は、GSK 3 β 阻害剤として WNT（好ましくは WNT 3 A）を $1 \sim 1000 \text{ ng/mL}$ 、 $50 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 、 $10 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 含有してよい。誘導培地 b 3 は、 $0.5 \sim 25 \mu\text{M}$ 、 $1 \sim 15 \mu\text{M}$ 、又は $2 \sim 8 \mu\text{M}$ の CHIR-99021 が示す GSK 3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度で GSK 3 β 阻害剤を含有してよい。誘導培地 b 3 が GSK 3 β 阻害剤として WNT（好ましくは WNT 3 A）を含む場合、誘導培地 b 3 は、 $0.5 \sim 25 \mu\text{M}$ 、 $1 \sim 15 \mu\text{M}$ 、又は $2 \sim 8 \mu\text{M}$ の CHIR-99021 が示す GSK 3 β 阻害作用と同程度の作用を示す濃度で WNT（好ましくは WNT 3 A）を含有してよい。

[0098] 誘導培地 b 3 は、 $0.1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、 $0.5 \sim 80 \text{ ng/mL}$ 、 $1 \sim 60 \text{ ng/mL}$ 、 $2 \sim 40 \text{ ng/mL}$ 、又は $5 \sim 20 \text{ ng/mL}$ の BMP 4 が示すアルカリフォスファターゼ産生誘導作用と同程度の作用を示す濃度で BMP を含んでよい。誘導培地 b 3 は、 $0.1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、 0

、 $5 \sim 80 \text{ ng/mL}$ 、 $1 \sim 60 \text{ ng/mL}$ 、 $2 \sim 40 \text{ ng/mL}$ 、又は $5 \sim 20 \text{ ng/mL}$ のBMP4を含む誘導培地b3で培養した細胞又はオルガノイドにおける腹側後腸マーカー（例えばGATA3、P63、又はHOXA13）の発現と同程度の発現を示す濃度でBMPを含んでよい。1つの実施形態において、誘導培地b3は、 $0.1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 、 $0.5 \sim 80 \text{ ng/mL}$ 、 $1 \sim 60 \text{ ng/mL}$ 、 $2 \sim 40 \text{ ng/mL}$ 、又は $5 \sim 20 \text{ ng/mL}$ のBMP4が示すアルカリフォスファターゼ産生誘導作用と同程度の作用を示す濃度でBMPを含む。

[0099] 1つの実施形態において、工程b3は、胚体内胚葉細胞を、誘導培地B（好ましくは誘導培地b3）を用いて培養して胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させ、前記胚体内胚葉細胞スフェロイドを含む細胞外マトリクスゲルを形成させ、次いで、前記細胞外マトリクスゲル中で、前記スフェロイドを、誘導培地b3を用いて培養して腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程b3は、胚体内胚葉細胞を、誘導培地B（好ましくは誘導培地b3）を用いて培養して胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させ、次いで、細胞外マトリクスゲル上で前記スフェロイドを、誘導培地b3を用いて培養して腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。

1つの実施形態において、工程b3は、胚体内胚葉細胞を、誘導培地B（好ましくは誘導培地b3）を用いて培養して胚体内胚葉細胞スフェロイドを形成させ、次いで、分散成分としての細胞外マトリクス存在下で前記スフェロイドを、誘導培地b3を用いて培養して腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む。

[0100] 1つの実施形態において、工程b3は、胚体内胚葉細胞のスフェロイドを形成させるために、胚体内胚葉細胞を、誘導培地b3であるSTEMdiff APEL2 medium ($10 \sim 30 \text{ ng/mL}$ BMP4、 200 ng/mL FGF4、 $4 \mu\text{M}$ CHIR99021、 $1 \mu\text{g/mL}$ Heparin、2% PFHM-11、Antibiotic-Antimycotic) 中で、8～11日間培養することを含む。このスフェロイド形

成の期間中に、スフェロイドが最も浮遊する時期に浮遊スフェロイドを回収し、3次元培養を開始する。スフェロイドが最も多く浮遊する前日から100rpmで振とう培養を開始する。翌日、浮遊したスフェロイドを35mmディッシュに回収する。次いで、浮遊スフェロイドを回収したwellに残っているスフェロイドにピペティングで培地を吹き付け、スフェロイドを浮遊させて回収する。回収したスフェロイドは氷上に置いておく。Matrigel Growth Factor Reduced (Corning)を誘導培地b3で希釈(25~100%濃度)し、Cell Culture Insert Transparent PET Membrane 24well 8.0μm poresize (corning)に50μL/well加え、37℃で30min~60minインキュベートしゲル化させる。次いで、Matrigel溶液 50μLに回収したスフェロイド30~100個を加えて混合し、ゲル化させたMatrigelの上に全量加える。37℃、CO₂ 5%下で30min~60minインキュベートしゲル化させ、誘導培地b3をCell Culture Insertの上に200μL、下に300μL加え、37℃、CO₂ 5%下で培養する。培地交換は2次元培養時は毎日、3次元培養時は2日毎に行うことが好ましい。腹側後腸分化誘導時、細胞が、背側中腸/後腸マーカーであるCDX2、SOX2、及びTのいずれも発現が減少または発現せず、腹側後腸/CloacaマーカーであるGATA3、及びP63が発現するまで、誘導培地b3での培養を継続する。得られた腹側後腸オルガノイドは、丸みを帯び、管腔構造を有する。後方化および腹側化が不十分なオルガノイドでは、中腸および背側腸管系譜の細胞が観察される。この場合、誘導培地b3での培養を延長する、または誘導培地b3中のBMP4の濃度を高くする。

- [0101] 胚体内胚葉細胞の分化誘導(工程A)、及び腹側後腸オルガノイドの形成(工程B)の各工程における各用語の説明及び培養条件を含む実施形態の説明は、それらの工程に記載の対応する各用語及び実施形態に適宜適用される。

[0102] [膀胱オルガノイド又はその製造方法]

本開示の1つの態様は、膀胱オルガノイドの製造方法を提供する。本開示の他の態様は、膀胱オルガノイドを提供する。

[0103] 本明細書における用語「膀胱オルガノイド」は、少なくとも2つの細胞層を有するオルガノイドを意味する。前記少なくとも2つの細胞層は、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む第一の細胞層；及び前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P63並びにUPK1B及び／又はUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層を含む。1つの実施形態に係る膀胱オルガノイドは、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む第一の細胞層；及び前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P63並びにUPK1B及び／又はUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して外側方向に局在する、P63及びKRT5を共発現する細胞を含む第三の細胞層を含む。表現上、前記膀胱オルガノイドは、例えば、その最外周に沿って局在する、P63及びKRT5を共発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して内側方向に局在する、P63並びにUPK1B及び／又はUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して内側方向に局在する、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む第三の細胞層を含むと特定されてもよい。このように特定された各細胞層は、本明細書において、前記第一の細胞層を基底細胞層 (basal-cell layer)、前記第二の細胞層を中間細胞層 (intermediate-cell layer)、及び前記第三の細胞層を表面細胞層 (superficial-cell layer) とも称する。

[0104] 膀胱オルガノイドは、例えば、本開示に係る膀胱オルガノイドの製造方法によって製造することができる。前記膀胱オルガノイドの製造方法において、腹側後腸オルガノイドを形成させ、次いで、前記腹側後腸オルガノイドから *in vitro* 培養により膀胱オルガノイドを形成させた場合、その膀

膀胱オルガノイドを本明細書において「膀胱様オルガノイド」と称することがある。膀胱オルガノイドは、その長径が $80\mu\text{m}$ 以上、 $100\mu\text{m}$ 以上、 $120\mu\text{m}$ 以上、 $150\mu\text{m}$ 以上、又は $200\mu\text{m}$ 以上であってよい。膀胱オルガノイドは、例えば、被験物質に対する薬物応答性を評価するために用いることができる。膀胱オルガノイドは、例えば、本開示に係る再生医療用組成物の有効成分として用いることができる。

[0105] 1つの実施形態に係る膀胱オルガノイドは、内腔構造を有さず；P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P63並びにUPK1B及び／又はUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び前記第二の細胞層に対して外側方向に局在する、P63及びKRT5を共発現する細胞を含む第三の細胞層を含む。1つの実施形態において、前記膀胱オルガノイドは、前記第三の細胞層に対して外側方向に局在する間質様細胞を含む第四の細胞層を含む。1つの実施形態において、前記膀胱オルガノイドは、前記第四の細胞層に対して外側方向に局在する平滑筋細胞を含む第五の細胞層をさらに含む。

[0106] 1つの実施形態に係る膀胱オルガノイドは、内腔を有し；前記内腔に面する、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む第一の細胞層；及び前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P63並びにUPK1B及び／又はUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層を含む。前記第一の細胞層は、前記内腔を取り囲んでいる、又は前記内腔に面して存在する。1つの実施形態に係る膀胱オルガノイドは、内腔を有し；前記内腔に面する、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む第一の細胞層；前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P63並びにUPK1B及び／又はUPK2を共発現する細胞を含む第二の細胞層；及び、前記第二の細胞層に対して外側方向に局在する、P63及びKRT5を共発現する細胞を含む第三の細胞層を含む。前記第一の細胞層は、前記内腔を取り囲んでいる、又は前記内腔

に面して存在する。1つの実施形態において、前記膀胱オルガノイドは、前記第三の細胞層に対して外側方向に局在する間質様細胞を含む第四の細胞層を含む。1つの実施形態において、前記膀胱オルガノイドは、前記第四の細胞層に対して外側方向に局在する平滑筋細胞を含む第五の細胞層をさらに含む。

[0107] 膀胱オルガノイドは、例えば、 $\Delta N 63$ 、GATA3、ISL1及びSATB2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、又は3種以上）の腹側後腸マーカーを発現しており；Smad1/5/8、HOXA13、FOXA2、CK8/KRT8、ECAD、及びUPK1Bからなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、3種、4種、5種又は6種以上）のマーカーを発現しており；及びSOX2、T及びCDX2からなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種又は3種、好ましくは3種）を実質的に発現していないことをさらに特徴とする。1つの実施形態に係る膀胱オルガノイドは、 $\Delta NP 63$ 及びGATA3のいずれか一方又は両方をさらに発現している。前記膀胱オルガノイドは、Smad1/5/8、FOXA2、ECAD、及びUPK1Bからなる群より選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、又は3種以上）のマーカーを発現している。前記膀胱オルガノイドは、背側後腸マーカーであるSOX2及びCDX2のいずれも実質的に発現していない。

[0108] 本明細書における用語「ウロプラキン2（UPK2）」は、ウロプラキンIa、Ib、IIIと共に尿路系上皮を形成する移行上皮の被覆細胞の形成に関与し、被覆細胞の透過性、バリアー機能を高める作用を有する分子量約15 kDaの膜糖タンパク質を意味する。UPK2は、膀胱上皮マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するUPK2は、例えば免疫染色法にて抗UPK2抗体（例えば、Mouse Anti-Uroplakin III（BIOCARE MEDICAL、#ACR3051C）を用いて検出又は測定することができる。

[0109] 膀胱オルガノイドに関する用語「P63」は、膀胱上皮マーカーとして利

用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するP63は、例えば免疫染色法にて抗P63抗体（例えば、Rabbit Anti-P63 (abcam、#ab124762)）を用いて検出又は測定することができる。

[0110] 本明細書における用語「ケラチン5 (KRT5)」は、ケラチン14と二量体化し、基底上皮細胞の細胞骨格を構成する中間径フィラメントを形成する、KRT5遺伝子にコードされているタンパク質を意味する。KRT5は、膀胱上皮マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するKRT5は、例えば免疫染色法にて抗KRT5抗体（例えば、Chicken Anti-Keratin5 (BioLegend、#905903)）を用いて検出又は測定することができる。

[0111] 本明細書における用語「細胞層」は、特定の細胞種が主として存在する細胞集団の重なりを意味する。細胞層は、例えば、特定の1種の細胞種が70%以上、75%、80%、85%、又は90%以上存在する細胞集団の重なりであってよい。1つの例において、第一、第二、又は第三の細胞層は、他の細胞集団と区別することができる、特定の1種の細胞種が主として存在する1つの細胞集団の領域であってよい。

[0112] 1つの例において、細胞層は、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を70%以上、75%以上、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上含む。1つの例において、細胞層は、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞から本質的になる。1つの例において、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、袋状の構造を有し、内腔を有する。前記例において、前記内腔は、前記細胞層に取り囲まれている。前記例において、前記細胞層は、前記内腔に面している。1つの例において、P63を実質的に発現しないがUPK1B及び／又はUPK2を発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、内腔に面し、後述するP63並びにUPK1B及び／又は

UPK 2を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して内側方向に重なっている。

[0113] 1つの例において、細胞層は、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞を70%以上、75%以上、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上含む。1つの例において、細胞層は、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞から本質的になる。1つの例において、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、袋状の構造を有する。1つの例において、前記細胞層は、P 6 3を実質的に発現しないがUPK 1 B及び／又はUPK 2を発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に重なっている。前記例において、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞は、UPK 1 B及び／又はUPK 2を発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に局在している。1つの例において、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、P 6 3を実質的に発現しないがUPK 1 B及び／又はUPK 2を発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層と、後述するP 6 3及びKRT 5を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層との間に存在する。

[0114] 1つの例において、細胞層は、P 6 3及びKRT 5を共発現する細胞を70%以上、75%以上、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上含む。1つの例において、細胞層は、P 6 3及びKRT 5を共発現する細胞から本質的になる。1つの例において、P 6 3及びKRT 5を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、袋状の構造を有する。1つの例において、前記細胞層は、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に重なっている。前記例において、P 6 3及びKRT 5を共発現する細胞は、P 6 3並びにUPK 1 B及び／又はUPK 2を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に局在している。1つの例にお

いて、P 6 3 及びK R T 5 を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、P 6 3 並びにU P K 1 B 及び／又はU P K 2 を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層と、後述する間質様細胞を含む又はから本質的になる細胞層との間に存在する。

[0115] 1つの例において、細胞層は、間質様細胞を70%以上、75%以上、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上含む。1つの例において、細胞層は、間質様細胞から本質的になる。1つの例において、間質様細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、袋状の構造を有する。1つの例において、前記細胞層は、P 6 3 及びK R T 5 を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に重なっている。前記例において、間質様細胞は、P 6 3 及びK R T 5 を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に局在している。1つの例において、間質様細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、P 6 3 及びK R T 5 を共発現する細胞を含む又はから本質的になる細胞層と、後述する平滑筋細胞を含む又はから本質的になる細胞層との間に存在する。

[0116] 1つの例において、細胞層は、平滑筋細胞を70%以上、75%以上、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上含む。1つの例において、細胞層は、平滑筋細胞から本質的になる。1つの例において、平滑筋細胞を含む又はから本質的になる細胞層は、袋状の構造を有する。1つの例において、前記細胞層は、間質様細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に重なっている。前記例において、平滑筋細胞は、間質様細胞を含む又はから本質的になる細胞層に対して外側方向に局在している。

[0117] 本明細書において用語「間質様細胞」は、上皮細胞の支持組織を構成する細胞を意味する。間質様細胞は、例えば、繊維芽細胞を含む。1つの実施形態において、間質様細胞を含む細胞層は、ビメンチン（V I M）を発現する細胞を主たる細胞として含む。1つの実施形態において、間質様細胞を含む細胞層は、膀胱オルガノイドにおいて、P 6 3 及びK R T 5 を共発現する細胞

胞を含む細胞層と、 α SMAを発現する平滑筋細胞を含む細胞層との間に局在する細胞層であり、前記細胞層に主として含まれる細胞は、VIMを発現する。

[0118] 本明細書において用語「VIM」は、間葉系細胞に特有の中間径フィラメントを意味する。VIMは、間葉系幹細胞マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現するVIMは、例えば免疫染色法にて抗VIM抗体（例えば、Chicken Anti-Vimentin（NOVUS、#NB300-223））を用いて検出又は測定することができる。

[0119] 本明細書において用語「平滑筋細胞」は、細長い紡錘形の単核細胞であり、細胞内に多数のアクチンフィラメント及び少数のミオシンフィラメントが存在する細胞を意味する。1つの実施形態において、平滑筋細胞を含む細胞層は、 α SMAを発現する細胞を主たる細胞として含む。1つの実施形態において、平滑筋細胞を含む細胞層は、 α SMA及びVIMを共発現する細胞を主たる細胞として含む。

[0120] 本明細書において用語「 α -smooth muscle actin（ α SMA）」は、ACTA2とも称さ、アクチンファミリーに属するタンパク質を意味する。 α SMAは、平滑筋細胞マーカーとして利用することができる。細胞又はオルガノイドにおいて発現する α SMAは、例えば免疫染色法にて抗 α SMA抗体（Rabbit Anti- α SMA（Cell signaling、#19245T））を用いて検出又は測定することができる。

[0121] 膀胱オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞を分化誘導すること、工程B：前記胚体内胚葉細胞を、誘導培地Bを用いて培養し、次いで、細胞外マトリクスの存在下で前記誘導培地Bを用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程c1：細胞外マトリクス存在下で、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地Cを用いて培養すること；工程c

2：ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入すること；又は、工程c3：間葉系幹細胞若しくは間葉系細胞の存在下で培養することを含む、方法によって、製造することができる。

[0122] 工程c1：膀胱上皮の分化誘導（in vitro培養）

工程c1は、腹側後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で誘導培地Cを用いて培養することを含む。

[0123] 「誘導培地C」は、基本培地と、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及び骨形成タンパク質を含有する添加剤とを含む。誘導培地Cは、例えば、基本培地（液体）に、前記添加剤（固体又は液体）を添加することで調製することができる。誘導培地Cに添加される前記添加剤の濃度は、培養に用いられる細胞を与えた動物種を考慮して、当業者により適宜設定される。誘導培地Cに関する基本培地は、誘導培地Aに関する基本培地についての説明が適宜適用される。誘導培地Cは、ヘパリン、無タンパク質培地（例えば、PFHM-I）、抗生物質（例えばペニシリン／ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）、又は抗生物質－抗真菌剤混合液（例えば、Antibiotic－Antimycotic）、若しくはこれらの組合せをさらに含んでよい。

[0124] 誘導培地Cは、FGF（好ましくはFGF7）を、10～500 ng/mL、30～250 ng/mL、又は50～150 ng/mL含有してよい。誘導培地Cは、FGF7を10～500 ng/mL、30～250 ng/mL、又は50～150 ng/mL、或いはFGF4を20～1000 ng/mL、60～500 ng/mL、又は100～300 ng/mL含有してよい。誘導培地Cは、10～500 ng/mL、30～250 ng/mL、又は50～150 ng/mLのFGF7が示す繊維芽細胞増殖作用と同程度の作用を示す濃度でFGFを含んでよい。

[0125] 誘導培地Cは、骨形成タンパク質（好ましくはBMP4）を、3～150 ng/mL、9～75 ng/mL、又は15～45 ng/mL含有してよい。誘導培地Cは、3～150 ng/mL、9～75 ng/mL、又は15～

45 ng/mLのBMP4が示すアルカリフォスファターゼ産生誘導作用と同程度の作用を示す濃度でBMPを含んでよい。誘導培地Cは、3~150 ng/mL、9~75 ng/mL、又は15~45 ng/mLのBMP4を含む誘導培地Cで培養したオルガノイドにおける腹側後腸マーカー（例えばGATA3、P63、又はHOXA13）の発現と同程度の発現を示す濃度でBMPを含んでよい。この文脈で、誘導培地Cを用いて培養されるオルガノイドは、本開示に係る工程b2又はb3で形成された膀胱オルガノイドであってよい。前記腹側後腸マーカーの発現は、例えば免疫染色法に従って測定することができる。免疫染色法において、腹側後腸マーカーの発現は、各マーカーに関して本開示で示した抗体を用いて測定することができる。1つの実施形態において、誘導培地Cは、3~150 ng/mL、9~75 ng/mL、又は15~45 ng/mLのBMP4が示すアルカリフォスファターゼ産生誘導作用と同程度の作用を示す濃度でBMPを含む。

[0126] 誘導培地Cは、レチノイン酸（好ましくはAll-trans retinoic acid）を0~1 μ M、10 nM~500 nM、30 nM~300 nM、又は50 nM~150 nM含有してもよい。

[0127] 細胞外マトリクス存在下での誘導培地Cを用いた腹側後腸オルガノイドの培養は、前記した細胞外マトリクス存在下での誘導培地b1を用いた胚体内胚葉細胞スフェロイドの培養に対する説明が適宜適用される。細胞外マトリクス存在下での誘導培地Cを用いた腹側後腸オルガノイドの培養は、例えば、公知の細胞培養条件下で実施することができる。公知の細胞培養条件は、37℃で5%CO₂下にて維持することであってよい。培養する温度は、37℃に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知の温度を適宜用いることができる。CO₂濃度は、5%に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知のCO₂濃度を適宜用いることができる。腹側後腸オルガノイドの培養は、5日~30日、5日~25日、5~20日、5~15日、又は5~10日実施することができる。

[0128] 工程c1の細胞外マトリクスの状態（ゲル状態又は分散成分の状態）は、

工程 b 1 及び工程 b 2 それぞれと、同一であってもよく、異なってもよい。1つの実施形態において、工程 c 1 の細胞マトリクスの状態は、工程 b 1 及び工程 b 2 それぞれの細胞外マトリクス状態と同一である。1つの実施形態において、腹側後腸オルガノイドを含む細胞外マトリクスゲルは、工程 b 1 及び工程 b 2 で形成された細胞外マトリクスゲルであってよく、又は工程 b 2 の後に、細胞外マトリクスゲルから腹側後腸オルガノイドを回収し、回収した前記腹側後腸オルガノイドを含むように新たに形成した細胞外マトリクスゲルであってもよい。操作の簡潔さの観点から、工程 c 1 における腹側後腸オルガノイドを含む細胞外マトリクスゲルは、工程 b 1 及び工程 b 2 で形成された細胞外マトリクスゲルである。

[0129] 1つの実施形態において、工程 c 1 は、細胞外マトリクスゲル中の腹側後腸オルガノイドを、誘導培地 C を用いて培養して膀胱オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程 c 1 は、細胞外マトリクスゲル上で腹側後腸オルガノイドを、誘導培地 C を用いて培養して膀胱オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程 c 1 は、分散成分としての細胞外マトリクスの存在下で腹側後腸オルガノイドを、誘導培地 C を用いて培養して膀胱オルガノイドを形成させることを含む。

[0130] 1つの実施形態において、誘導培地 C を用いた腹側後腸オルガノイドの培養は、膀胱上皮を分化誘導するために、腹側後腸オルガノイドを、誘導培地 C である STEMdiff APEL2 medium (10又は30 ng/mL BMP4、0.1~1 μ M All-trans retinoic acid、100 ng/mL FGF7又はFGF9、1 μ g/mL Heparin、2% PFHM-11、Antibiotic-Antimycotic) を用いて、6日間以上培養することを含む。誘導培地 C は Cell Culture Insert ゲルの上に 200~400 μ L、下に 300~600 μ L 加え、2日毎に培地交換する。膀胱上皮マーカーである UPK2、P63、及びKRT5の発現が確認できるまで培養を継続することが好ましい。次いで、膀胱上皮細胞を成熟化させるために誘導培地 C に

PPAR γ agonist (0.1~10 μ M Rosiglitazone) を添加し培養する。

[0131] 1つの実施形態において、膀胱オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程b1：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクス存在下（好ましくは、細胞外マトリクスゲル中）で、前記誘導培地B（誘導培地b1）を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び工程b2：前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下（好ましくは、細胞外マトリクスゲル中）で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b2）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程c1：前記腹側後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地Cを用いて培養することを含む、方法によって製造することができる。

[0132] 1つの実施形態において、膀胱オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程b3：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで、細胞外マトリクス（好ましくは、分散成分としての細胞外マトリクス）の存在下で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程c1：前記腹側後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地Cを用いて培養することを含む、方法によって製造することができる。

[0133] 工程c2：哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはその周辺部位への導入

工程c2は、腹側後腸オルガノイドを、ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又

は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入して、膀胱オルガノイドを形成させることを含む。1つの実施形態において、工程c2は、腹側後腸オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入して、膀胱オルガノイドを形成させることを含む。腹側後腸オルガノイドが細胞外マトリクスゲル中に存在する場合、工程c2は、ヒト又は非ヒト哺乳動物への導入前に、前記細胞外マトリクスゲルから前記腹側後腸オルガノイドを取り出すことをさらに含んでもよい。

[0134] 本明細書における用語「非ヒト哺乳動物」は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどのげっ歯類；チンパンジーなどの非ヒト霊長類；牛、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目；ウマなどの奇蹄目；ウサギ、イヌ、ネコなどの愛玩動物であってよい。1つの実施形態において、非ヒト哺乳動物は、げっ歯類又は非ヒト霊長類である。

[0135] 本明細書における用語「腎臓」は、血液からの老廃物又は余分な水分の濾過及び排出を行って尿を生成する、泌尿器系の器官を意味する。本明細書において、腎臓は、特定の損傷又は疾患が認められない正常な腎臓であってよく、損傷を受けた腎臓、若しくは腎臓疾患に罹患した腎臓であってもよい。1つの実施形態において、腎臓は、正常な腎臓である。1つの実施形態において、腎臓は、損傷を受けた腎臓又は腎臓疾患に罹患した腎臓である。

[0136] 本明細書における用語「膀胱」は、腎臓から送られてくる尿を一時的に溜める袋状の器官を意味する。本明細書において、膀胱は、特定の損傷又は疾患が認められない正常な膀胱であってよく、損傷を受けた膀胱、若しくは膀胱の疾患に罹患した膀胱であってもよい。1つの実施形態において、膀胱は、正常な膀胱である。1つの実施形態において、膀胱は、損傷を受けた膀胱又は膀胱の疾患に罹患した膀胱である。

[0137] 腎臓又は膀胱の「周辺部位」は、泌尿器系に接する若しくは近傍の組織又は領域を意味する。泌尿器系は、腎臓、尿管、膀胱及び尿道を含む。腎臓又は膀胱の周辺部位は、例えば、腹腔内、又は腸間膜であってよい。

[0138] 腹側後腸オルガノイドの腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位への「導

入」は、腹側後腸オルガノイドを腎臓内又は膀胱内若しくはそれらの周辺部位に配置するための操作を意味する。腹側後腸オルガノイドの腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位への導入は、例えば、細胞外マトリクスゲル中の腹側後腸オルガノイドを、外科的手術により、腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に移植することを含む。腹側後腸オルガノイドの腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位への導入は、例えば、溶液中の腹側後腸オルガノイドを、注射器などの器具を用いて、腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に注入することを含む。

[0139] 腹側後腸オルガノイドは、例えば、その腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入されるヒト又は非ヒト哺乳動物と異なる動物種由来の多能性幹細胞から製造されたものであってよく、又は同一の動物種若しくは同一の個体由来の多能性幹細胞から製造されたものであってよい。1つの実施形態において、膀胱オルガノイドを製造する方法は、ヒトES細胞又はヒトiPS細胞から製造された腹側後腸オルガノイドを、ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む。

[0140] 1つの実施形態において、腹側後腸オルガノイドの腎臓への導入は、腹側後腸スフェロイドをNOD SCIDマウスの腎皮膜下に移植することを含む。移植された前記マウスを4週間飼育することで、移植された腹側後腸オルガノイドは4週間*in vivo*培養される。前記*in vivo*培養により、袋状構造を持つ膀胱オルガノイドが形成され得る。1つの実施形態において、*in vivo*培養は、1週間～6週間、2週間～5週間、又は3週間～5週間実施することができる。

[0141] 1つの実施形態において、膀胱オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程b1：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクス存在下（好ましくは、細胞外マトリクスゲル中）で、前記誘導培地B（誘導培地b1）を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び

工程 b 2 : 前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下（好ましくは、細胞外マトリクスゲル中）で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地 B（誘導培地 b 2）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程 c 2 : ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、方法によって製造することができる。

[0142] 1つの実施形態において、膀胱オルガノイドは、工程 A : 多能性幹細胞を、誘導培地 A を用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程 b 3 : 前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及び GSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地 B（誘導培地 b）を用いて培養し、次いで、細胞外マトリクス（好ましくは、分散成分としての細胞外マトリクス）の存在下で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地 B（誘導培地 b 3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程 c 2 : ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、方法によって製造することができる。

[0143] 工程 c 3 : 間葉系幹細胞又は間葉系細胞の存在下での共培養

工程 c 3 は、腹側後腸オルガノイドを、間葉系幹細胞又は間葉系細胞の存在下で培養して、膀胱オルガノイドを形成させることを含む。腹側後腸オルガノイドが細胞外マトリクスゲル中に存在する場合、工程 c 3 は、共培養前に、前記細胞外マトリクスゲルから前記腹側後腸オルガノイドを取り出すことをさらに含んでもよい。

[0144] 本明細書において用語「間葉系細胞」は、多細胞動物の胎児期の間葉に由来する細胞を意味する。間葉系細胞は、例えば、支持組織、結合組織、骨細胞、軟骨細胞、および脂肪細胞へと分化する能力を有する。1つの実施形態において、間葉系細胞は、膀胱間葉系細胞である。膀胱間葉系細胞は、例えば、非ヒト哺乳動物から公知の方法又は本明細書の実施例に記載の方法に従って調製することができる。非ヒト哺乳動物から調製された間葉系細胞は、

例えば、胚性繊維芽細胞を含む。1つの実施形態において、胚性繊維芽細胞は、マウス胚性繊維芽細胞（MEF）である。間葉系細胞は、例えばES細胞、又はiPS細胞から、公知の方法に従って分化誘導することによって調製することができる。間葉系細胞は、例えば、商業的に入手することができる。

[0145] 本明細書において用語「間葉系幹細胞」は、自己複製能をもち、結合組織、骨細胞、軟骨細胞、および脂肪細胞などの非上皮系の間葉を構成する細胞に分化する能力を有する細胞を意味する。間葉系幹細胞は、例えば、ES細胞又はiPS細胞から、公知の方法に従って、分化誘導することによって調製することができる。間葉系幹細胞は、例えば、商業的に入手することができる。間葉系幹細胞は、例えば、生体から公知の方法に従って回収することができる。間葉系幹細胞は、生体において、例えば歯髄又は骨髓液中に存在することが知られている。

[0146] 1つの実施形態において、工程c3は、腹側後腸オルガノイドを、間葉系幹細胞又は間葉系細胞の存在下で培地を用いて培養して、膀胱オルガノイドを形成させることを含む。工程c3で用いる前記培地は、例えば、基本培地であってよく、本開示に記載の添加剤を含んでいてもよい。1つの実施形態において、前記培地は、細胞外マトリクスが添加されていないことを特徴とする。1つの実施形態において、前記培地は、STEMdiff APEL 2 medium (STEMCELL Technologies) (2% PFHM-I、及びAntibiotic-Antimycoticを添加) または、STEMdiff APEL 2 medium (STEMCELL Technologies) (2% PFHM-I、2% FBS及びAntibiotic-Antimycoticを添加) である。

[0147] 1つの実施形態において、工程c3は、腹側後腸オルガノイドを、間葉系幹細胞又は間葉系細胞の存在下で静置培養し、次いで、前記腹側後腸オルガノイド及び間葉系幹細胞又は間葉系細胞を、回転浮遊培養して、膀胱オルガノイドを形成させることを含む。回転浮遊培養は、例えば、3次元回転浮遊

培養装置CellPet 3D-iP（ジェイテックコーポレーション）にて実施することができる。回転浮遊培養での回転速度は、細胞塊が重力により降下して培養容器に触れないように、当業者により適宜設定される。前記回転速度は、例えば、1～50rpm、1～30rpm、1～15rpm、1～10、2～50rpm、2～30rpm、2～15rpm、2～10、3～50rpm、3～30rpm、3～15rpm又は3～10rpmであってよい。

[0148] 1つの実施形態において、工程c3は、腹側後腸オルガノイドまたは膀胱オルガノイドを、E12.5マウス膀胱間葉系細胞と共に、2週間以上回転浮遊培養して、袋状の構造を示す、膀胱上皮細胞、間質様細胞及び平滑筋細胞を含有する膀胱オルガノイドを形成させる。工程c3での培養は、例えば、1週間～6週間、2週間～5週間、又は3週間～5週間実施することができる。

[0149] 1つの実施形態において、膀胱オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程b1：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3β阻害剤を含有する誘導培地B（誘導培地b）を用いて培養し、次いで細胞外マトリクス存在下（好ましくは、細胞外マトリクスゲル中）で、前記誘導培地B（誘導培地b1）を用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び工程b2：前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下（好ましくは、細胞外マトリクスゲル中）で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3β阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地B（誘導培地b2）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程c3：間葉系幹細胞若しくは間葉系細胞の存在下で培養することを含む、方法によって製造することができる。

[0150] 1つの実施形態において、膀胱オルガノイドは、工程A：多能性幹細胞を、誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、工程b3：前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3β阻害剤を

含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地 B（誘導培地 b）を用いて培養し、次いで、細胞外マトリクス（好ましくは、分散成分としての細胞外マトリクス）の存在下で、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地 B（誘導培地 b3）を用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させること、及び工程 c3：間葉系幹細胞若しくは間葉系細胞の存在下で培養することを含む、方法によって製造することができる。

[0151] 胚体内胚葉細胞の分化誘導（工程 A）、腹側後腸オルガノイドの形成（工程 B）、及び膀胱オルガノイドの形成（工程 C）の各工程における各用語の説明及び培養条件を含む実施形態の説明は、それらの工程に記載の対応する各用語及び実施形態に適宜適用される。

[0152] [腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを有する非ヒト哺乳動物又はその製造方法]

本開示の 1 つの態様は、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物の製造方法を提供する。本開示の他の態様は、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物を提供する。

[0153] 腹側後腸オルガノイドを腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物は、本開示に係る腹側後腸オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む方法によって、製造することができる。膀胱オルガノイドを腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物は、本開示に係る腹側後腸オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入すること、及び本開示に係る腹側後腸オルガノイドが導入された前記非ヒト哺乳動物を飼育することを含む方法によって、製造することができる。非ヒト哺乳動物の飼育は、例えば、非ヒト哺乳動物に対する公知の餌を与えることを含む。

[0154] 一例において、腫瘍細胞又は腫瘍片を本開示に係る腹側後腸オルガノイドに導入した後、腫瘍細胞又は腫瘍片を含む腹側後腸オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することで、腎臓がんモデル又は膀胱がんモデルとしての膀胱オルガノイドをその腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物を製造することができる。腎臓がんモデル又は膀胱がんモデルとしての膀胱オルガノイドをその腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物は、前記非ヒト哺乳動物と、腎臓がんの治療薬候補物質とを接触させること、及び前記治療薬候補物質の効果を評価することを含む、腎臓がん又は膀胱がんの治療薬候補物質の効果を評価する方法に用いることができる。

[0155] [被験物質に対する薬物応答性を評価する方法]

被験物質に対する薬物応答性を評価する方法は、本開示に係る腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド、又は腹側後腸オルガノイド若しくは膀胱オルガノイドを有する非ヒト哺乳動物と、被験物質とを接触させること、及び前記被験物質に対する前記腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド、又は前記非ヒト哺乳動物における薬物応答性を測定することを含む。

[0156] 本明細書における用語「被験物質」は、例えば、低分子化合物、タンパク質（例えば抗体）、DNA、RNA、低分子干渉RNA、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。被験物質は、例えば、腎臓又は膀胱の障害若しくは疾患、又は腎臓がん若しくは膀胱がんを治療するための薬物、或いはそれらの候補物質であってよい。被験物質は、例えば、1種であってもよく、又は2種以上の混合物であってもよい。被験物質は、好ましくは1種類の物質である。

[0157] 腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド又は非ヒト哺乳動物と、被験物質とを「接触させる」は、腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド又は非ヒト哺乳動物と、被験物質とが接触可能な状況下に置くことを意味する。腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドと、被験物質とを接触させることは、例えば、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを含む培養液に、

被験物質を混合することであってよい。腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物と被験物質とを接触させることは、例えば、前記非ヒト哺乳動物に、被験物質を経口投与又は非経口投与することであってよい。

[0158] 薬物応答性は、例えば、被験物質による腹側後腸オルガノイドの構造的又は機能的変化を含む。薬物応答性は、例えば、腹側後腸オルガノイドによる被験物質の濃度変化を含む。

[0159] [再生医療用組成物又はその製造方法]

本開示の1つの態様は、膀胱の損傷又は膀胱の疾患を処置するための再生医療用組成物を提供する。

[0160] 本明細書における用語「再生医療用組成物」は、本開示に係る腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを含む。本開示に係る再生医療用組成物は、哺乳動物における膀胱の損傷又は膀胱の疾患を処置するために用いることができる。再生医療用組成物は、例えば、医薬上許容される担体を適宜含んでよい。本明細書における用語「医薬上許容される担体」は、哺乳動物において安全性が高く、アレルギー反応性が小さい、本開示に係る腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイド以外の任意の成分を意味する。医薬上許容される担体は、例えば、医薬投与に適した水性若しくは非水性溶媒、溶液（例えば生理食塩水、基本培地又は細胞懸濁保存液）、凍結防止剤（例えばグリセロール）、水溶性高分子（例えばデキストラン）、又は緩衝剤（例えばリン酸緩衝液）を含む。再生医療用組成物は、公知の方法に従って適宜製造することができる。一例において、本開示に係る再生医療用組成物は、本開示に係る腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドと、医薬上許容される担体（例えば基本培地）とを配合することで製造することができる。

[0161] 再生医療用組成物は、例えば、外科的手法により膀胱の所定の部位に移植することによって、又は注射器などの器具を用いて膀胱の所定の部位に注入することによって、その必要のある哺乳動物に投与される。再生医療用組成物が投与される哺乳動物と、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを

製造するために用いられた多能性幹細胞の動物種とは、移植片拒絶反応の軽減の観点から、同一種であることが好ましく、同一個体であることがさらに好ましい。

[0162] 再生医療用組成物に関する用語「哺乳動物」は、例えば、ヒト、ヒト以外の哺乳動物である。ヒト以外の哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどのげっ歯類、チンパンジーなどの非ヒト霊長類、牛、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目、ウマなどの奇蹄目、ウサギ、イヌ、ネコなどの愛玩動物であってよい。1つの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

[0163] 本明細書における用語「膀胱の損傷」又は「膀胱の疾患」は、例えば、外傷により損傷を受けた膀胱、放射線性膀胱炎、糖尿病や虚血などによって損傷を受けた膀胱、膀胱組織に有害な薬物によって損傷を受けた膀胱、膀胱炎、又は膀胱がんであってよい。

[0164] 本開示に係る再生医療用組成物は、哺乳動物における膀胱の損傷又は疾患を処置する方法に用いることができる。1つの実施形態は、本開示に係る腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを含む再生医療用組成物を、その必要のある哺乳動物に投与することを含む、膀胱の損傷又は疾患を処置する方法を提供する。

[0165] [膀胱の損傷又は疾患を治療する方法]

本開示の1つの態様は、哺乳動物における膀胱の損傷又は疾患を治療する方法を提供する。哺乳動物における膀胱の損傷又は疾患を治療する方法は、本開示に係る腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド、又は再生医療用組成物を、その必要のある哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む。1つの実施形態において、哺乳動物における膀胱の損傷又は疾患を治療する方法は、本開示に係る再生医療用組成物を、その必要のある哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む。

[0166] 本明細書における用語「その必要のある哺乳動物」は、膀胱の損傷又は疾

患を有する又は有する疑いのある哺乳動物を意味する。膀胱の損傷又は疾患を有する哺乳動物は、医療従事者（例えば医師）が所定の診断基準に従って、膀胱の損傷又は疾患を有すると診断された哺乳動物を意味する。膀胱の損傷又は疾患を有する疑いのある哺乳動物は、例えば、前記哺乳動物の行動歴（例えば、外傷、放射線治療、及び膀胱組織に有害な薬物を受けた又は受けている）又は病歴（例えば糖尿病、虚血、膀胱炎、又は膀胱がんを患っている又は患っていた）に基づいて、膀胱の損傷又は疾患を有することが疑われる哺乳動物であってよい。本態様に係る哺乳動物は、好ましくはヒト又は非ヒト霊長類、より好ましくはヒトである。

[0167] 膀胱の損傷又は疾患の「治療」は、その症状又は病態が維持され、低減し、又は消失することを含む。膀胱の損傷又は疾患の治療は、膀胱の損傷又は疾患を治癒することを含む。

[0168] その必要のある哺乳動物に導入される腹側後腸オルガノイド、膀胱オルガノイド又は再生医療用組成物を製造するために用いられた多能性幹細胞の動物種と、その必要のある哺乳動物とは、移植片拒絶反応の軽減の観点から、同一種または同一個体であることが好ましい。

[0169] 本明細書における用語「含む」は、列挙される要素及び／又はステップが存在し、その他の要素及び／又はステップが追加されてもよいことを意味する。本明細書における用語「からなる」は、列挙される要素及び／又はステップが存在し、その他の要素及び／又はステップを排除することを意味する。本明細書における用語「から本質的になる」は、列挙される要素及び／又はステップが存在し、その他の要素及び／又はステップが、細胞層、オルガノイド、組成物、及び方法の新規な技術的特徴に影響を与えない範囲で追加されていてよいことを意味する。本明細書中における用語「実質的に含まない」は、「完全に含まない」を排除しない。

[0170] 本開示により提供される用語及び実施形態の説明は、特に言及がない限り、本開示により提供する態様及び実施形態の間で適宜適用される。

[0171] 以下、具体的な実施例を記載するが、それらは本発明の好ましい実施形態

を示すものであり、添付する特許請求の範囲に記載の発明をいかようにも限定するものではない。

実施例

[0172] 材料および方法

以下の成長因子・化合物を準備した：

Recombinant Human/Mouse/Rat Activin A (R&D SYSTEMS、#338-AC)、Recombinant Human FGF4 (R&D SYSTEMS、#7460-F4)、Recombinant Human BMP4 (R&D SYSTEMS、#314-BP)、Recombinant Human KGF/FGF7 (R&D SYSTEMS、#251-KG)、CHIR99021 (TOCRIS、#4423)、All-trans retinoic acid (SIGMA、R2625)。

[0173] 免疫蛍光染色法

凍結切片作製のため、膀胱オルガノイドまたは移植片を4% PFA、4℃で振とうしながら一晩インキュベートした。次いで、PBS (-) で3回洗浄し、スクロース溶液で置換した。スクロースはPBS (-) で10%、20%、30%溶液を調製し、各ステップでサンプルが沈むまで4℃でインキュベートした。次に、膀胱オルガノイドに関しては周辺のMatrigelをピンセットで除いた後、OCT Compoundに埋包し凍結ブロックを作製した。10μmで切片を作製し、10%Donkey serum、0.3%Triton-Xを添加したPBS (-) (以下「Blocking Buffer」) で室温、1時間インキュベートを行いブロッキングした。次いで、Blocking Bufferで希釈した一次抗体と4℃で一晩インキュベートした。次に、PBS (-) で3回洗浄し、PBS (-) で希釈した二次抗体と4℃で一晩インキュベートした。核をDAPIで染色した。次いで、PBS (-) で3回洗浄し、FluorSave Reagent (Millipore、#345789) で封入後、共焦点顕微鏡

(ZEISS、LSM800)で観察した。

[0174] [実施例1] 腹側後腸オルガノイドの製造

図1は、1つの実施形態に係る膀胱オルガノイド作製の概要を示すフローチャート図である。図1は、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉細胞へ分化誘導する工程A、胚体内胚葉細胞から後腸オルガノイドへ分化誘導する工程b1、後腸オルガノイドから腹側後腸オルガノイドへ分化誘導する工程b2、及び腹側後腸オルガノイドから膀胱様オルガノイドへ分化誘導する工程c1を示す。工程b1および工程b2を含む工程Bでは、腹側後腸が分化誘導される。実施例1では、工程A、工程b1および工程b2を実施して、腹側後腸オルガノイドを製造する。

[0175] ヒトiPS細胞の前培養

Human iPS細胞(1502, 3株、Dr. Melissa Little、Murdoch Children's Research Instituteより譲受)を、iMatrix-511(nippi)でコーティングした培養プレート表面上でStemFit AK02N培地(REPROCELL)にて維持培養した。前記細胞を、TrypLE Select(Thermo Fisher Scientific)を用いて剥離して、細胞懸濁液を得た。前記細胞懸濁液を200rcf、室温で5分間遠心し、上清を除去した後、沈殿物をStemFit AK02N(10μM Y-27632)中に再懸濁した。前記懸濁液に、iMatrix-511(nippi)を0.25μg/cm²となるように添加し、60,000cells/cm²となるように6well plate(Corning)に播種し、37℃、CO₂ 5%下で1日間培養した。

[0176] 工程A：胚体内胚葉細胞の分化誘導

その培養培地を、誘導培地AであるSTEMdiff APEL2 medium(STEMCELL Technologies)(100ng/mL ActivinA、1μM CHIR99021、2% PFHM-I、及びAntibiotic-Antimycoticを添加)に交換し

、3日間培養することで、胚体内胚葉細胞へ分化誘導した。培地交換は2日目以降は毎日行った。Human iPSC細胞は分化誘導1日目にはコロニー状に細胞が集合したが、分化誘導2日目にはコロニーの外側に細胞が拡がり始めた。分化誘導3日目にはシート状に細胞が増殖し、100%コンフルエントになった。胚体内胚葉に典型的な敷石状の細胞が誘導された。

[0177] 工程b1： 後腸の分化誘導

胚体内胚葉誘導後（分化誘導3日目）、誘導培地Aを、誘導培地b1であるSTEMdiff APEL2 medium (200 ng/mL FGF4、8 μ M CHIR99021、1 μ g/mL Heparin、2% PFHM-11、Antibiotic-Antimycoticを添加)に交換し、分化誘導した胚体内胚葉細胞を4日間培養した。

[0178] 分化誘導7日目に、浮遊したスフェロイドを35 mmディッシュに回収した。次いで、浮遊スフェロイドを回収したwellに残っているスフェロイドにピペティングで培地を吹き付け、スフェロイドを浮遊させ、同じ35 mmディッシュに回収した。回収したスフェロイドは氷上に静置した。

[0179] Matrigel Growth Factor Reduced (Corning) (タンパク質濃度10 mg/mL)を誘導培地b1で50%濃度に希釈し、Cell Culture Insert Transparent PET Membrane 24well 8.0 μ m pore size (Corning)に50 μ L/well加え、37°Cで30 minインキュベートしゲル化させた。次いで、50%Matrigel溶液50 μ Lに回収したスフェロイド40~50個を加えて混合した。前記混合物を、ゲル化させた50%Matrigelの上に全量加え、37°C、CO₂ 5%下で30 minインキュベートしゲル化させ、Cell Culture Insertゲルを得た。誘導培地b1を、前記Cell Culture Insertゲルの上に200 μ L、下に300 μ L加え、37°C、CO₂ 5%下で4日間培養した。培地交換は2次元培養時は毎日、3次元培養時は2日毎に行った。50%Matrigel中のスフェロイドは誘導

培地 b 1 で培養することによって成長し、やや丸みを帯びたチューブ状の細胞構造体（後腸オルガノイド）を形成した。

[0180] 工程 b 2 : 後腸腹側化

後腸誘導後（分化誘導 1 1 日目）、誘導培地 b 1 を、誘導培地 b 2 である STEMdiff APEL2 medium (30 ng/mL BMP4、200 ng/mL FGF4、8 μ M CHIR99021、1 μ g/mL Heparin、2% PFHM-I、及び Antibiotic-Antimycotic を添加) に交換し、前記 Cell Culture Insert ゲル中で誘導した後腸を 3 日間培養して、後腸を腹側化した。誘導培地 b 2 を、前記 Cell Culture Insert ゲルの上に 200 μ L、下に 300 μ L 加え、2 日毎に培地交換した。後腸腹側培地で培養すると、後腸オルガノイドの成長は遅くなり、球状の細胞構造体（腹側後腸オルガノイド）へ変化した。

[0181] 前記腹側後腸オルガノイド（分化誘導 1 4 日目）について、以下の表に記載の抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

[表1]

抗体	カタログ番号	Supplier
Anti-P63 antibody rabbit monoclonal (EPR5701)	ab124762	Abcam
Anti-CDX2 antibody mouse monoclonal (CX2-88)	MU392A-UC	BioGeneX
Anti-SOX2 antibody goat polyclonal	AF2018	R&D systems
Anti-Cytokeratin8 antibody rat monoclonal (TROMA-1)	TROMA-1	Developmental Studies Hybridoma Bank
Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse IgG	A21202	Life Technologies
Alexa Fluor 568 Donkey Anti-Rabbit IgG	A10042	Life Technologies
Alexa Fluor 647 Donkey Anti-Goat IgG	A21447	Life Technologies
Alexa Fluor 488 Donkey Anti-rat IgG	A21208	Life Technologies

[0182] 腹側後腸オルガノイドは、腹側後腸マーカーである P 6 3 を発現し、背側後腸マーカーである C D X 2 及び S O X 2 はそれぞれ弱く発現し及び発現しておらず、腸管上皮マーカーである K R T 8 を発現していた。また、R T - P C R により、後方腸管及び C l o a c a 領域のマーカーである H O X A 1

3の転写が増加されていることを確認した。これらの結果を以下の表にまとめる。

[表2]

	早期後腸オルガノイド	後腸オルガノイド	腹側後腸オルガノイド
分化誘導後の日数	9日	11日	14日
P63	+	++	+++
CDX2	+++	+++	+
SOX2	++	+	—
KRT8	++	+++	++
HOXA13	—	—	++

+++： 強く発現している

++： 発現している又は一部の細胞で強く発現している

+: 弱く発現している又は一部の細胞で発現している

—: 発現上昇なし又は発現していない

[0183] [比較例1]

腸様のオルガノイド (SATB2陽性) の分化誘導

実施例1の工程b2において、工程b1で得られたCell Culture Insertゲル中の後腸オルガノイドを、培地STEMdiff APEL2 medium (100 ng/mL BMP2、100 ng/mL EGF、500 ng/mL RSPO1、及び0.1 μ M レチノイン酸を添加)を用いて、21日間培養して、腸様のオルガノイド (SATB2陽性) を分化誘導した。

[0184] 腸様のオルガノイドは、結腸又は直腸マーカーであるSATB2を発現していた (図2a)。腸のオルガノイドは、Mid/後腸マーカーであるCDX2を一部で発現し、さらに上皮組織マーカーであるECADを発現していた (図2b及び図2c)。SATB2、CDX2、ECAD及び核マーカーであるDAPI (図2d) の蛍光画像は、特定の細胞種が規則的に局在するような細胞層構造を示さなかった。

[0185] 比較例1で得られた腸様のオルガノイドは、腹側後腸/Cloacaマ-

カーであるP63、膀胱上皮マーカーであるUPK2、及び膀胱上皮マーカーであるKRT5も発現していた。P63、UPK2、及びKRT5の結果もまた、比較例1で得られた腸様のオルガノイドが、特定の細胞種が規則的に局在するような細胞層構造を有することを示さなかった。

[0186] 比較例1では、実施例1の工程b2で用いた添加剤の組合せ(BMP4、FGF4、及びCHIR99021)と異なる添加剤の組合せ(BMP2、EGF、RSPO1、及びレチノイン酸)を用いた。比較例1で得られた細胞構造体は、実施例1で得られた腹側後腸オルガノイドのような特定の細胞種が規則的に局在する細胞層構造を有していなかった。

[0187] 実施例1の工程b2で用いた添加剤の組合せ(BMP4、FGF4、及びCHIR99021)と異なる他の添加剤の組合せ(EGF、RSPO1、及びレチノイン酸の組合せ；EGF、RSPO1、レチノイン酸、及びNogginの組合せ；EGF、RSPO1、レチノイン酸、Noggin、及びFGF7の組合せ；並びにEGF、RSPO1、レチノイン酸、BMP2、及びFGF7の組合せ)を用いて得られた細胞構造体も、実施例1で得られた腹側後腸オルガノイドのような特定の細胞種が規則的に局在する細胞層構造を有していなかった。

[0188] [実施例2] 膀胱様オルガノイドの製造

工程c1：膀胱上皮の分化誘導

後腸腹側化後(分化誘導14日目)、誘導培地b2を、誘導培地CであるSTEMdiff APEL2 medium(30ng/mL BMP4、100nM All-trans retinoic acid、100ng/mL FGF7、1μg/mL Heparin、2% PFHML1、及びAntibiotic-Antimycoticを添加)に交換し、球状の細胞構造体を、6日間培養して、膀胱上皮細胞を誘導した。誘導培地Cを、前記Cell Culture Insertゲルの上に200μL、下に300μL加え、2日毎に培地交換した。誘導した膀胱様オルガノイドは球状であった。

[0189] 前記膀胱様オルガノイドについて免疫蛍光染色を行った。実施例2及び下記実施例3における免疫蛍光染色では、以下の抗体を用いた。

免疫蛍光染色法に使用した一次抗体は、Mouse Anti-Urop
lakin II (1:100、BIOCARE MEDICAL、#AC
R3051C)、Rabbit Anti-P63 (1:100、abca
m、#ab124762)、Chicken Anti-Keratin5
(1:300、BioLegend、#905903)、Goat Ant
i-ECAD (1:300、R&D SYSTEMS、#AF648)であ
った。免疫蛍光染色法に使用した二次抗体は、Alexa Fluor 4
88 Donkey Anti-Mouse IgG (1:400、Lif
e Technologies、#A21202)、Alexa Fluor
568 Donkey Anti-Rabbit IgG (1:400
、Life Technologies、#A10042)、Alexa
Fluor 647 Donkey Anti-Goat IgG (1:4
00、Life Technologies、#A21447)、Alex
a Fluor 647 Donkey Anti-Chicken Ig
Y (1:400、Jackson ImmunoResearch、#70
3-606-155)であった。

[0190] 膀胱様オルガノイドは、上皮組織マーカーであるECADを発現していた
(図3e)。膀胱様オルガノイドは、膀胱上皮マーカーであるUPK2 (図
3a)、P63 (図3b)、及びKRT5 (図3c)を発現していた。図3
a及び図3dにおいて、膀胱様オルガノイドの最外周に観察されるシグナル
は、Matrigel由来の非特異的シグナルである。UPK2、P63、
及びKRT5の蛍光画像を重ね合わせた図3dは、膀胱様オルガノイドにお
いて、その最外周に沿ってP63及びKRT5を共発現するbasal c
ell様の細胞が局在し、前記KRT5-basal cell様細胞が局
在する領域の内側方向に、P63及びUPK2を共発現するinterme
diate cell様の細胞が局在し、前記intermediate

cell様細胞が局在する領域の内側方向に、P63を発現しないがUPK2を発現するSuperficial cell様の細胞が局在していることを示す。膀胱様オルガノイドにおけるこれらの細胞種の層構造は、生体での発生途上の膀胱上皮の構造と類似している（図5g）。この膀胱様オルガノイドでは、KRT5を発現する細胞は少なかったが、KRT5を発現するKrt5-basal cellは膀胱発生後期に出現する細胞種であることから、誘導した膀胱様オルガノイドは未熟な段階であることが示唆された。

[0191] [比較例2]

後腸オルガノイドを、誘導培地b2と前記誘導培地CからBMP4を除いた培地を用いたことを除いて、実施例2と同様にして、膀胱上皮の分化誘導を行った。比較例2において形成された細胞構造体について、実施例2と同様に、免疫蛍光染色を行った。比較例2において形成された細胞構造体は、実施例2で形成された膀胱様オルガノイドと同様に、膀胱上皮マーカーであるP63（図4b）、及び上皮組織マーカーであるECAD（図4c）を発現していた。しかしながら、比較例2で形成された細胞構造体は、膀胱上皮マーカーであるUPK2を、実施例2で形成された膀胱様オルガノイドで観られたようには発現してなかった（図3a及び図4a）。図4aにおいて、膀胱様オルガノイドの最外周に観察されるシグナルは、Matrigel由来の非特異的シグナルである。このように、比較例2で形成された細胞構造体は、実施例2で形成された膀胱様オルガノイドで観られたような細胞層構造を有していなかった。

[0192] [実施例3] 生体内（in vivo）での膀胱オルガノイドの製造

ヒトiPS細胞の前培養

6well plateに90,000cells/cm²となるように細胞を播種したことを除いて、実施例1と同様にしてヒトiPS細胞の前培養を行った。

工程A： 胚体内胚葉細胞への分化誘導

実施例1と同様にして、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉細胞へ分化誘導を行った。

工程b1： 後腸分化誘導

Cell Culture Insertゲルを、Matrigel Growth Factor Reduced (Corning) (タンパク質濃度10mg/mL)を誘導培地b1で2.5mg/mL濃度に希釈したものをゲル化させ、その内部に胚体内胚葉細胞の2次元培養で形成されたスフェロイド90~100個を含ませたことを除いて、実質的に実施例1と同様にして、後腸分化誘導を行った。

[0193] 工程b2： 後腸腹側化

後腸誘導後（分化誘導11日目）、誘導培地b1を、誘導培地b2であるSTEMdiff APEL2 medium (30ng/mL BMP4、100ng/mL FGF7、200ng/mL FGF4、8μM CHIR99021、1μg/mL Heparin、2% PFHM-1、及びAntibiotic-Antimycoticを添加)に交換し、前記Cell Culture Insertゲルを3日間培養して、後腸を腹側化した。誘導培地b2は、前記Cell Culture Insertゲルの下に500μL加え、2日毎に培地交換した。

[0194] 工程c2： 免疫不全マウス腎皮膜下への移植

後腸腹側化後（分化誘導14日目）、前記Cell Culture Insertゲルを、Cell Culture Insert Transparent PET Membraneのメンブレンから切り取り、35mm dish上に置いた。次いで、ピンセットを使い、実体顕微鏡下で腹側後腸オルガノイドを2.5mg/mL Matrigelから取り出した。

[0195] イソフルラン吸入麻酔下（イソフルラン1.3~1.4%、190~200mL/min）、4週齢の雄NOD SCID JAXマウス（オリエンタル酵母工業株式会社）の腎皮膜を剃刀で切開し、腎皮膜と腎実質の間に前

記腹側後腸オルガノイドを移植した。移植4週間後に、移植片を含む領域を採取した後、4% PFA、4℃で一晩組織を固定した。固定化した移植片を凍結し、凍結切片を作製した。凍結切片について、蛍光免疫染色及びH&E染色を行った。

[0196] 移植した腹側後腸オルガノイドは、移植4週間後には、生体の膀胱のように、内腔を有する袋状の細胞構造体（膀胱オルガノイド）となっていた。膀胱オルガノイド内には膀胱上皮マーカーであるUPK2（図5a）、P63（図5b）、及びKRT5（図5c）を発現する細胞が存在しており、それらの細胞は、生体での成熟した膀胱の層構造と類似していた（図5g）。具体的には、膀胱オルガノイドでは、袋状の細胞構造体の最外周にはP63及びKRT5を共発現するKrt5-basal cell様の細胞が局在していた（図5e）。また、前記KRT5-basal cell様の細胞が局在する領域の内側方向に、UPK2及びP63を共発現するIntermediate cell様の細胞が少し存在していた（図5f）。さらに、Intermediate cell様の細胞が局在する領域の内側方向であって、膀胱オルガノイドの内腔に面する領域に、UPK2を発現し且つP63もKRT5も発現していないSuperficial cell様細胞が局在していた（図5e及びf）。

[0197] 実施例2及び3は、複数種の膀胱上皮細胞を誘導でき、それら複数種の膀胱上皮細胞で構成される細胞構造体が層構造を有することを示した。実施例2及び3は、複数種の膀胱上皮細胞で構成される、膀胱様の三次元構造体が形成されることを示した。腹側後腸オルガノイドを、実施例2の試験管内（in vitro）での分化誘導系と、実施例3の生体内（in vivo）での分化誘導系とを比較すると、腹側後腸オルガノイドから膀胱様の袋状構造を形成させること及び成熟化させるには、長期培養が可能であるか又はMesenchymeが存在する生体内（in vivo）での分化誘導系を組合せることが好ましいことが示された。

[0198] [実施例4] 腹側後腸オルガノイドの製造

図6は、膀胱オルガノイド作製の培養を示すフローチャート図である。図6は、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉細胞へ分化誘導する工程A、胚体内胚葉細胞から腹側後腸オルガノイドへ分化誘導する工程b3、及び間葉系細胞又は間葉系幹細胞との共培養により腹側後腸オルガノイドから膀胱オルガノイドへ分化誘導する工程c3を示す。図6の上部に記載の日数は、1つの実施形態に係る例示的な分化誘導に要する日数である。実施例4では、工程Aおよび工程b3を実施して、腹側後腸オルガノイドを製造する。

[0199] ヒトiPS細胞の前培養

6well plateに45,000 cells/cm²となるように細胞を播種したことを除いて、実施例1と同様にしてヒトiPS細胞の前培養を行った。

工程A：胚体内胚葉細胞への分化誘導

誘導培地AであるSTEMdiff APEL2 mediumに含めた添加剤CHIR99021の濃度を1 μMから1.25 μMに変更したことを除いて、実施例1と同様にして、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉細胞へ分化誘導を行った。

[0200] 工程b3：腹側後腸の分化誘導

胚体内胚葉誘導後（分化誘導3日目）、誘導培地Aを、誘導培地b3であるSTEMdiff APEL2 medium（10 ng/mL BMP4、200 ng/mL FGF4、4 μM CHIR99021、1 μg/mL Heparin、2% PFHM-1I、Antibiotic-Antimycoticを添加）に交換し、分化誘導した胚体内胚葉細胞を3日間培養した。

[0201] 分化誘導5日目に、100 rpmで振とう培養を開始した。その後、分化誘導6日目に、浮遊したスフェロイドを35 mmディッシュに回収した。次いで、浮遊スフェロイドを回収したwellに残っているスフェロイドにピペティングで培地を吹き付け、スフェロイドを浮遊させ、同じ35 mmディッシュに回収した。回収したスフェロイドは氷上に静置した。

[0202] Matrigel Growth Factor Reduced (Corning) (タンパク質濃度10mg/mL)を誘導培地b3で50%濃度に希釈し、Cell Culture Insert Transparent PET Membrane 24well 8.0 μ m pore size (Corning)に50 μ L/well加え、37℃で30minインキュベートしゲル化させた。次いで、50%Matrigel溶液50 μ Lに回収したスフェロイド60~70個を加えて混合した。前記混合物を、ゲル化させた50%Matrigelの上に全量加え、37℃、CO₂ 5%下で30minインキュベートしゲル化させ、Cell Culture Insertゲルを得た。誘導培地b3を、前記Cell Culture Insertゲルの上に200 μ L、下に300 μ L加え、37℃、CO₂ 5%下でさらに8日間（分化誘導14日目まで）培養した。培地交換は2次元培養時は毎日、3次元培養時は2日毎に行った。50%Matrigel中のスフェロイドは誘導培地b3で培養することによって成長し、管腔構造を有する丸みを帯びた細胞構造体（腹側後腸オルガノイド）を形成した。

[0203] 分化誘導11日目および14日目の腹側後腸オルガノイドについて免疫蛍光染色を行った。実施例4および実施例5における免疫蛍光染色では、以下の抗体を用いた。

免疫蛍光染色法に使用した一次抗体は、Mouse Anti-CDX2 (1:100、BioGenex、#MU392-UC)、Mouse Anti-FOXA2 (1:100、Santa Cruz Biotechnology、#sc-101060)、Rabbit Anti-GATA3 (1:100、Cell Signaling、#5852S)、Goat Anti-GATA3 (1:100、R&D Systems、#AF2605)、Mouse Anti-ISL1&2 (1:100、DSHB、#39.4D5)、Goat Anti-SOX2 (1:100、R&D Systems、#AF2018)、Rabbit Anti-SAT

B2 (1:100、CELL MARQUE、#384R-14)、Rabbit Anti-HOXA13 (1:200、abcam、#ab106503)、Goat Anti-ZO1 (1:100、ThermoFisher、#PA5-19090)、Rabbit Anti-pSmad1/5/8 (1:100、Cell signaling、#13820)、Rat Anti-CK8 (1:200、DSHB、#TROMA-1)、Mouse Anti-Uroplakin II (1:100、BIOCRE MEDICAL、#ACR3051C)、Rabbit Anti- Δ NP63 (1:100、Cell signaling、#67825)、Rabbit Anti-P63 (1:100、abcam、#ab124762)、Chicken Anti-Keratin 5 (1:300、BioLegend、#905903)、Mouse Anti-ECAD (1:200、BD Transduction Laboratories、#610181)、Goat Anti-ECAD (1:300、R&D SYSTEMS、#AF648)、Chicken Anti-Vimentin (1:300、NOVUS、#NB300-223)、Rabbit Anti- α SMA (1:100、Cell signaling、#19245T) であった。

[0204] 免疫蛍光染色法に使用した二次抗体は、Alexa Fluor488 Donkey Anti-Mouse IgG (1:400、Life Technologies、#A21202)、Alexa Fluor568 Donkey Anti-Rabbit IgG (1:400、Life Technologies、#A10042)、Alexa Fluor647 Donkey Anti-Goat IgG (1:400、Life Technologies、#A21447)、Alexa Fluor647 Donkey Anti-Chicken IgY (1:400、Jackson ImmunoResearch、#703-606-155) であった。

[0205] 実施例1での工程b1の後腸分化誘導後の後腸オルガノイド（分化誘導11日目）は、管腔構造を有していなかった（図7a）。実施例4での工程b3の腹側後腸分化誘導5日目の腹側後腸オルガノイド（分化誘導11日目）は、管腔構造を有していた（図7b）。後腸オルガノイドおよび腹側後腸オルガノイドは共に上皮マーカーであるKRT8およびECADを発現していた（図7a1、a10、b1およびb10）。後腸オルガノイドは腹側後腸マーカーであるGATA3を弱く発現していたが（図7a2）、腹側後腸オルガノイドは強く発現していた（図7b2）。後腸オルガノイドは背側後腸マーカーであるSOX2、CDX2およびTを発現していたが（図7a3およびa5～a7）、腹側後腸オルガノイドでは発現していなかった（図7b3およびb5～b7）。後腸オルガノイドは腸管マーカーであるFOXA2を発現していなかったが（図7a9）、腹側後腸オルガノイドは発現していた（図7b9）。このように、実施例1で工程b2の後腸腹側化を行う前の後腸オルガノイドは、管腔構造を有さず、背側後腸マーカー（SOX2、CDX2およびT）を発現する一方で、腹側後腸マーカー（GATA3）および腸管マーカー（FOXA2）は弱くしか発現しない又は発現していなかった（図7a）。これに対して、実施例4で工程b3の腹側後腸分化誘導中の腹側後腸オルガノイドは、管腔構造を有し、前記背側後腸マーカーは発現していなかったが、前記腹側後腸マーカーおよび腸管マーカーを発現していた（図7b）。

[0206] 実施例4での工程b3の腹側後腸分化誘導8日目の腹側後腸オルガノイド（分化誘導14日目）を、免疫蛍光染色法を用いて顕微鏡で観察した（図8）。前記腹側後腸オルガノイドは、上皮組織マーカーであるECAD（図8d3）を発現し、密着結合（Tight junction）マーカーであるZO1（図8c3）を発現していた。また、前記腹側後腸オルガノイドは、初期腸管上皮マーカーであるFOXA2（図8b1）およびCK8（図8c1）を発現し、および腹側後腸マーカーであるGATA3（図8a3、b3およびe1）、ISL1（図8d1）、SATB2（図8c2）およびΔ

NP63 (図8b2)を発現していた。また、前記腹側後腸オルガノイドは、腹側Cloaca領域マーカーであるPhospho-Smad1/5/8 (図8d2)を発現し、および後方腸管及びCloaca領域のマーカーであるHOXA13 (図8f2)を発現していた。他方、前記腹側後腸オルガノイドは、背側後腸マーカーであるCDX2 (図8a1およびf1)もSOX2 (図8a2およびe2)もほぼ発現していなかった。また、前記腹側後腸オルガノイドは、膀胱上皮前駆細胞及び膀胱上皮細胞マーカーであるUPK2 (図8e3)もKRT5 (図8f3)も発現していなかった。これらの結果は、誘導培地b3での8日間の培養(14日間の分化誘導)により、管腔構造を有する腹側後腸オルガノイドが形成されることを示唆した。また、膀胱上皮前駆細胞になる前の腹側後腸/Cloaca様細胞が形成されていることが示唆された。

[0207] [実施例5] 試験管内(in vitro)での膀胱オルガノイドの製造

実施例5では、図6で示した工程A、工程b3および工程c3を実施して、試験管内で膀胱オルガノイドを製造する。実施例5の工程Cでは、工程b3で形成された腹側後腸オルガノイドを、E12.5マウス由来の膀胱間葉系細胞と共に試験管内で培養する(工程c3)。

[0208] ヒトiPS細胞の前培養

実施例4と同様にしてヒトiPS細胞の前培養を行った。

工程A： 胚体内胚葉細胞への分化誘導

実施例4と同様にして、ヒトiPS細胞から胚体内胚葉細胞へ分化誘導を行った。

工程b3： 後腸分化誘導

実施例4と同様にして、胚体内胚葉細胞から腹側後腸オルガノイドへ分化誘導を行った。

[0209] 工程c3： 共培養による膀胱上皮分化誘導

E12.5マウス膀胱間葉系細胞の調製

妊娠12日目のICRマウスを脊椎脱臼によって安楽死させた。前記IC

Rマウスから、胎仔を内包する胎嚢を氷冷10%FBS/PBS(−)に取り出した。前記胎嚢からピンセットを用いて胎仔を取り出し、胎盤を胎仔から切り外した。次に、胎仔の上半身をピンセットで取り除き、膀胱部を露出させ、膀胱から尿道までの領域を採取した。採取した膀胱・尿道領域をDissociation Buffer (Dispase: Corning #354235、1mg/mL DNase I: Sigma-Aldrich #11284932001) 200 μ Lに入れ、37°Cで1分間インキュベートした。次に、氷冷M2培地 3mLで2回希釈し、氷上で10分間静置した。その後、ピンセット及びガラスニードルを使用して、尿管挿入部より上部の膀胱間葉系細胞のみを採取し、1.5mLチューブに集めた。次に、37°Cで温めたTrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) 200 μ Lを前記チューブに加え、37°Cで3分間インキュベートした後、組織がシングルセルになるまでピペティングを行った。DMEM (10%FBS、GulitaMAX-1、Antibiotic-Antimycoticを添加) 1mLを前記チューブに加えて、酵素反応を停止させた。前記チューブを300rcf、3分間遠心にかけて、その上清を除去した。その沈殿物にSTEM-CELLBANKER GMP grade (ZENOC #CB045) 250 μ Lを加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を凍結保存チューブに移し、−80°Cで保存した。

[0210] E12.5マウス膀胱間葉系細胞との共培養

工程b3で得られた細胞外マトリクス(50%Matrigel)ゲル中の腹側後腸オルガノイドを、ピペティングにより前記ゲルから脱離させ、氷上に静置した。

[0211] 凍結保存した前記E12.5マウス膀胱間葉系細胞を、37°Cウォーターバスで融解した後、STEMdiff APEL2 medium 1mLを加えて懸濁した。得られた細胞懸濁液を、300rcfで3分間遠心にかけて、その上清を除去した。その沈殿物に、STEMdiff APEL2

medium 200 μ Lを加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液についてセルカウントを行い、25,000 cells/wellとなるように細胞懸濁液をPrime Surface（登録商標）プレート96V（住友ベークライト #MS-9096V）に加えた。前記プレートを、200 rcfで5分間遠心にかけた。

[0212] Matrigelから脱離させた前記腹側後腸オルガノイドを、前記プレートに1個/ウェルとなるように入れ、沈むまで静置した。その後、各ウェルに、前記細胞懸濁液を25,000 cells/ウェルが追加されるように加え、前記プレートを200 rcfで5分間遠心にかけた後、前記腹側後腸オルガノイドと膀胱間葉系細胞とを37℃、CO₂ 5%下で1日間培養した。次に、前記プレートのウェルから、組み合わせた細胞塊を容器に移し、前記容器を3次元回転浮遊培養装置CellPet 3D-iP（ジェイテックコーポレーション）にセットした。前記組み合わせた細胞塊を、STEMdiff APEL2 medium（STEMCELL Technologies）（2% PFHM-1I、及びAntibiotic-Antimycoticを添加）または、STEMdiff APEL2 medium（STEMCELL Technologies）（2% PFHM-1I、2% FBS及びAntibiotic-Antimycoticを添加）CellPet 3D-iPを用いて37℃、CO₂ 5%下で11日間培養し、膀胱オルガノイドを誘導した（分化誘導24日目）。

[0213] 工程c3での腹側後腸オルガノイドと膀胱間葉系細胞との共培養7日目の膀胱オルガノイド（分化誘導20日目）を明視野で顕微鏡観察した（図9）。前記膀胱オルガノイドでは、上皮構造および管腔構造の二重構造が観察された（図9a～c）。明視野では二重構造が観察されにくい場合であっても（図9d）、蛍光染色法を用いて観察すると、二重構造が観察される。

[0214] 工程c3での共培養11日目の膀胱オルガノイド（分化誘導24日目）は、球状であり、管腔構造を有していた。前記膀胱オルガノイドを、免疫蛍光染色法を用いて顕微鏡で観察した（図10）。前記膀胱オルガノイドは、管

腔を有し、上皮細胞マーカーである E C A D を発現する細胞の層を有し、前記 E C A D 発現細胞層は前記管腔に面し（図 1 0 b 1）、前記 E C A D 発現細胞層の外側に間葉系細胞マーカーである V I M を発現する細胞の層を有した（図 1 0 b 3 および b 5）。前記膀胱オルガノイドは、E C A D 発現細胞層（図 1 0 c 1）の外側に D A P I 染色された細胞層を含み（図 1 0 c 4）、その D A P I 染色された細胞層の外側に平滑筋細胞マーカーである α S M A を発現する細胞の層を有した（図 1 0 c 2 および c 4）。これらの結果は、前記膀胱オルガノイドが、管腔；前記管腔に面する E C A D を発現する上皮細胞層；前記上皮細胞層の外側に V I M を発現する間質様細胞層；および前記間質様細胞層の外側に α S M A を発現する平滑筋細胞層を有することを示す。

[0215] 前記膀胱オルガノイドの E C A D 細胞層の細胞は、ヒト・ラミン B 1（h L N B）を共発現していた（図 1 0 b 2 および b）。この結果は、前記膀胱オルガノイドの上皮細胞が、ヒト i P S 細胞由来であることを示す。したがって、前記膀胱オルガノイドは、管腔；前記管腔に面するヒト i P S 細胞由来の上皮細胞層；前記上皮細胞層の外側にマウス膀胱間葉系細胞由来の間質様細胞層；および前記間質様細胞層の外側にマウス間葉系細胞由来の平滑筋細胞層を有する。

[0216] 前記膀胱オルガノイドにおいて収縮運動が観察された。これは、前記膀胱オルガノイドが有する平滑筋細胞層が機能していることを示唆する。

[0217] 前記膀胱オルガノイドの前記上皮細胞層は、その最も内側に U P K 2 を発現する細胞の層を有し（図 1 0 a 1）、前記 U P K 2 発現細胞層の外側に Δ N P 6 3 を発現する細胞の層を有した（図 1 0 a 2 および a 5）。この結果は、前記膀胱オルガノイドが膀胱の発生途上にある膀胱上皮の構造に類似していることを示す。前記膀胱オルガノイドの前記上皮細胞層は、膀胱上皮マーカーである K R T 5 を発現する細胞は観察されなかった（図 1 0 a 3）。K R T 5 を発現する B a s a l 細胞は、膀胱発生後期に出現することが知られている。これらの結果は、実施例 5 での分化誘導 2 4 日目の膀胱オルガノ

イドが膀胱発生途上の段階にあることを示唆する。前記膀胱オルガノイドの前記上皮細胞層は、膀胱上皮細胞マーカーであるGATA3を発現しているが(図10d2)、発生途上の膀胱上皮細胞マーカーであるFOXA2を発現していた(図10d1)。これらの結果も、実施例5での分化誘導24日目の膀胱オルガノイドが膀胱発生途上の段階にあることを示唆する。

[0218] 工程c3での共培養29日目の膀胱オルガノイド(分化誘導42日目)を、免疫蛍光染色法を用いて顕微鏡で観察した(図11)。前記膀胱オルガノイドは、管腔構造を有していた。前記膀胱オルガノイドの上皮細胞層は、管腔に面し、UPK1B(図11a1)およびUPK2(図11b1)を発現する細胞の層；前記細胞層の外側に、ΔNP63を発現する細胞の層(図11a2およびb2)；および前記細胞層の外側に、KRT5を発現する細胞の層(図11a3およびb3)を有する(図11a5およびb5)。KRT5を発現するBasal細胞が膀胱発生後期に出現することが知られていることから、これらの結果は、実施例5での分化誘導42日目の膀胱オルガノイドは膀胱発生後期の段階にあることを示唆する。

請求の範囲

- [請求項1] 腹側後腸オルガノイドを製造する方法であって、
多能性幹細胞を、アクチビンA及びGSK3 β 阻害剤を含有する誘導培地Aを用いて培養して、胚体内胚葉細胞に分化誘導すること、及び
前記胚体内胚葉細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地Bを用いて培養し、次いで細胞外マトリクスの存在下で繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有し、さらに骨形成タンパク質を含有してもよい誘導培地Bを用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含む、方法。
- [請求項2] 前記腹側後腸オルガノイドを形成させることが、前記胚体内胚葉細胞の前記誘導培地Bでの培養後に、細胞外マトリクス存在下で前記誘導培地Bを用いて培養して、後腸オルガノイドを形成させること、及び前記後腸オルガノイドを、細胞外マトリクス存在下で前記誘導培地Bを用いて培養して、腹側後腸オルガノイドを形成させることを含み、
後腸オルガノイドを形成させるための誘導培地Bが、繊維芽細胞増殖因子及びGSK3 β 阻害剤を含有し、及び腹側後腸オルガノイドを形成させるための誘導培地Bが、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 腹側後腸オルガノイドを形成させるための誘導培地Bが、繊維芽細胞増殖因子、GSK3 β 阻害剤、及び骨形成タンパク質を含有する、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド。
- [請求項5] 腹側後腸オルガノイドであって、
腹側後腸マーカーであるP63を発現しており、

H O X A 1 3 及び C K 8 / K R T 8 を発現しており、及び
背側後腸マーカーである S O X 2 を実質的に発現していない、腹側
後腸オルガノイド。

[請求項6]

内腔を有する、腹側後腸オルガノイドであって、
P 6 3、Δ N 6 3、G A T A 3、I S L 1 及び S A T B 2 からなる
群より選択される少なくとも 1 種の腹側後腸マーカーを発現しており
、
P h o s p h o - S m a d 1 / 5 / 8、H O X A 1 3、F O X A 2
、C K 8 / K R T 8、及び E C A D からなる群より選択される少なく
とも 1 種のマーカーを発現しており、及び
S O X 2、T 及び C D X 2 からなる群より選択される少なくとも 1
種の背側後腸マーカーを実質的に発現していない、腹側後腸オルガノ
イド。

[請求項7]

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オ
ルガノイド、又は請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の腹側後腸オル
ガノイドを、

細胞外マトリクス存在下で、レチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子
及び骨形成タンパク質を含有する誘導培地 C を用いて培養すること、

ヒト又は非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部
位に導入すること、又は

間葉系幹細胞若しくは間葉系細胞の存在下で培養することを含む
、膀胱オルガノイドを製造する方法。

[請求項8]

請求項 7 に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド。

[請求項9]

膀胱オルガノイドであって、
P 6 3 を実質的に発現しないが U P K 1 B 及び／又は U P K 2 を発
現する細胞を含む第一の細胞層；及び
前記第一の細胞層に対して外側方向に局在する、P 6 3 並びに U P
K 1 B 及び／又は U P K 2 を共発現する細胞を含む第二の細胞層を含

み、

前記第二の細胞層に対して外側方向に局在する、P 6 3 及びK R T 5 を共発現する細胞を含む第三の細胞層をさらに含んでいてよい、膀胱オルガノイド。

[請求項10] 前記第一の細胞層に取り囲まれた内腔を含む、請求項9に記載の膀胱オルガノイド。

[請求項11] 前記第三の細胞層に対して外側方向に局在する間質様細胞を含む第四の細胞層を含み、前記第四の細胞層に対して外側方向に局在する平滑筋細胞を含む第五の細胞層をさらに含んでいてよい、請求項9又は10に記載の膀胱オルガノイド。

[請求項12] 請求項1～3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、請求項4～6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、請求項7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は請求項8～11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを、非ヒト哺乳動物の腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に導入することを含む、腹側後腸オルガノイド又は膀胱オルガノイドを、その腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する非ヒト哺乳動物を製造する方法。

[請求項13] 請求項1～3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、請求項4～6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、請求項7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は請求項8～11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを、その腎臓又は膀胱若しくはそれらの周辺部位に有する、非ヒト哺乳動物。

[請求項14] 請求項1～3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、請求項4～6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、請求項7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、又は請求項8～11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイドを含む、膀胱の損傷又は疾患を処置するための再生医療用組成物。

[請求項15]

被験物質に対する薬物応答性を評価する方法であって、

請求項1～3のいずれか一項に記載の方法で製造された腹側後腸オルガノイド、請求項4～6のいずれか一項に記載の腹側後腸オルガノイド、請求項7に記載の方法で製造された膀胱オルガノイド、請求項8～11のいずれか一項に記載の膀胱オルガノイド、請求項12に記載の方法で製造された非ヒト哺乳動物、又は請求項13に記載の非ヒト哺乳動物と、被験物質とを接触させること、及び

前記被験物質に対する前記腹側後腸オルガノイド、前記膀胱オルガノイド、又は前記非ヒト哺乳動物における薬物応答性を測定することを含む、方法。