

明 細 書

発明の名称： バイオ人工臓器作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、培養細胞を用いた幹細胞の組織細胞への分化誘導方法に関する。また、分化誘導された組織細胞を含むバイオ人工臓器の作製方法に関し、さらには得られたバイオ人工臓器を含む医療用材料に関する。

背景技術

[0002] 近年、疾患や事故等の理由により失われたり機能が低下した臓器や組織について、機能を回復させたり、臓器や組織そのものを再生しようとする組織工学（ティッシュエンジニアリング）が注目されている。この組織工学分野では、幹細胞や未分化な細胞を、目的とする細胞へ増殖、分化させるための培養条件や因子が研究されている。組織工学は、一般的には細胞、成長因子及び細胞が生着しうる足場の三要素を必要とする。足場の上で細胞を培養し、成長因子を付加して再生組織を構築する試みがなされている。

[0003] 組織工学における臓器や組織の形態的再構築のために、細胞の増殖の足場として、ポリマーなどの化学合成品が用いられており、スキャホールドともいう。目的の細胞をこのスキャホールド上に播種し、これを生体外の適当な環境下で培養することにより要求される細胞へ増殖、分化させたりすることや、再生させようとする臓器や組織の欠損部にスキャホールドを移植し、生体内において目的の細胞を要求する細胞へ増殖、分化させることで、細胞を三次元的構造で増殖させ、所望の臓器を再生させる方法が数多く報告されている（特許文献 1、2）。しかしながら、このような足場がなければ、細胞を三次元的構造により増殖させることは極めて困難である。また、化学合成によって作製されたスキャホールドを用いて、生体が本来備えている三次元的構築を模することができても、臓器や組織を再現することができない等の欠点がある。スキャホールドを用いてバイオ人工臓器を構築しても、臓器の機能が十分に発揮しえなかったり、スキャホールドの有無に関わらずバイオ

人工臓器そのものの構築が困難であるのが現状である。

[0004] 胚性幹細胞 (embryonic stem cell、以下単に「ES細胞」ともいう。) は、胚盤胞とよばれる初期胚から誘導される未分化の細胞であり、自己複製能と分化における全能性を有する細胞である。ES細胞は、インビトロにおいて集合塊として培養するだけで生殖細胞を含む全ての細胞に分化することが可能である。ES細胞から細胞療法などの再生医療に必要とされる機能細胞を分化させる場合、まず三次構造を有する胚様体を形成させる必要がある。胚様体形成のためのES細胞培養方法として、ハンギングドロップ方法（非特許文献1）、浮遊培養、メチルセルロースを含む半固形培地による培養、これらを組み合わせた方法、などが挙げられる。

[0005] 近年、慢性腎不全の患者数が増加している。慢性腎不全は、腎臓における疾病又は腎臓以外の器官における疾病が原因で生じた腎臓障害が進行した病態であり、血液中に含有される尿毒素を除去する機能、内分泌機能、調節機能など、正常の腎臓が有する機能が廃絶する。慢性腎不全が進行すると、正常の腎臓が有する機能が廃絶するために、体内の各臓器に影響が及び、尿毒症となる。具体的には、中枢神経障害、末梢神経障害、心・循環器障害、消化器障害、視力・眼障害、血液・凝固障害、免疫障害、内分泌障害、皮膚障害、骨・関節障害、電解質障害、酸塩基平衡障害などになる。慢性腎不全は、進行性であり且つ治癒が不可能である。そのため、治療としては腎臓の機能が廃絶する速度を遅らせる保存的加療に主眼がおかれており、最終的には人工透析や腎臓移植など、腎臓の機能を代替するための治療が必要となる（例えば、特許文献3）。

[0006] しかしながら、腎臓移植は、提供される腎臓の数が絶対的に不足しているために、実施が困難である。人工透析は、主に血液透析と腹膜透析との2つに分類され、血液透析では、血液中の尿毒素は除去されるものの、内分泌機能、調節機能などの代替となる治療を行うことができない。また、血液透析は週に3回程度行う必要など、患者にとって負担が大きい。腹膜透析では自己管理ができるために、患者は通院回数を減らすことができるが、代謝障害

を受け易いことや、腹膜への負担が大きくなることなどの問題が生じる。

[0007] 腎臓に関し、ラットの腎臓から、高い増殖能を有する腎臓幹細胞／前駆細胞を分離し、株化した r K S (Rat Kidney Stem cell line) 5 6 細胞を取得したことが開示されている（特許文献 4）。特許文献 4 では、r K S 5 6 細胞は自己増殖能を有すること、支持細胞（フィーダー細胞）培養液を含む系で培養したときに血管内皮細胞マーカーが検出され、血管内皮細胞に分化する可能性があることが開示されており、ヘンレ係蹄細胞、近位細尿管細胞、集合管（C D）細胞へ分化しうることも開示されている。しかしながら、r K S 5 6 細胞に関し、支持細胞（フィーダー細胞）を含まない系で分化させる方法については報告がない。また、前記分化した細胞を用いて三次元構造からなるバイオ人工臓器を作製したという報告もない。なお、特許文献 4（特開2004-275079号公報）の開示は、参照により本願明細書に組み込まれる。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2008-049146号公報

特許文献2：特開2009-039401号公報

特許文献3：特開平6-142193号公報

特許文献4：特開2004-275079号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：J Cell Biol. 126(3), 701-711 (1994)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、幹細胞から組織細胞への分化誘導方法を提供することを課題とし、得られた組織細胞を含むバイオ人工臓器を提供することを課題とする。さらには、作製されたバイオ人工臓器を含む医療用材料を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0011] 本願発明者等は、上述の課題を達成するために鋭意検討を重ねた結果、幹細胞を、基本培地にウシ胎児血清、肝細胞増殖因子、神経栄養因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、骨形成因子7及び上皮細胞増殖因子を含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で培養することで、組織細胞に分化しうることを見出し、本発明を完成した。
- [0012] 即ち本発明は、幹細胞の組織細胞への分化誘導方法に関するものであり、前記分化誘導方法は、幹細胞を、基本培地に肝細胞増殖因子（HGF）、神経栄養因子（GDNF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）、骨形成因子7（BMP7）及び上皮細胞増殖因子（EGF）を含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養することを特徴とする。
- [0013] ここで、本発明の分化誘導方法の一実施態様においては、三次元培養が、前記幹細胞を、HGF、GDNF及びb-FGFを含む培養液中で培養する第一の工程と、第一の工程の培養開始から0～10日経過後、HGF、GDNF、b-FGF、BMP7、及びEGFを含む培養液中で培養する第二の工程とを含むことが好ましい。
- [0014] また、本発明の分化誘導方法の一実施態様においては、培養液中のHGF、GDNF、b-FGF及びBMP7が、各々独立して100～500 ng/mlより選択される濃度で含まれ、EGFは、300～700 ng/mlより選択される濃度で含まれる条件下で培養することが好ましい。また、本発明の分化誘導方法の一実施態様においては、培養液中にさらに血清を含むことが好ましい。また、本発明の分化誘導方法は、幹細胞が、腎臓の幹細胞であることが好ましい。
- [0015] 本発明の分化誘導方法の一実施態様は、
- 1) 幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程；及び
 - 2) 前記細胞塊をHGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養する工程
- とを含む分化誘導方法である。
- [0016] ここで、上記工程2)は、三次元スキャホールドの存在下、前記細胞塊を

、HGF、GDNF、b-FGFを含む培養液中で三次元培養する第一の工程（工程2A）と、第一の工程の培養開始から0～10日経過後、HGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で三次元培養する第二の工程（工程2B）とを含むことができる。

[0017] また、上記工程1）においては、前記細胞塊がハンギングドロップ法により形成されることが好ましい。

[0018] また、本発明の別の実施態様によれば、本発明は、上記分化誘導方法により誘導されて形成される組織細胞に関するものである。

[0019] ここで、本発明の分化誘導方法により誘導されて形成される組織細胞は、一実施態様において、腎組織細胞とすることができる。

[0020] また、本発明のさらに別の態様によれば、本発明は、上記組織細胞を含むバイオ人工臓器に関するものである。

[0021] また、本発明のさらに別の態様によれば、本発明は、バイオ人工臓器を含む医療用材料に関するものである。

[0022] また、本発明のさらに別の態様によれば、本発明は、バイオ人工臓器の製造方法に関するものであり、前記製造方法は、

- 1) 幹細胞の細胞塊を形成する工程；
- 2) 得られた細胞塊をスキャホールドに播種する工程；および
- 3) スキャホールド上で、前記細胞塊をHGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で培養する工程を含むことを特徴とする。

[0023] ここで、本発明のバイオ人工臓器は、一実施態様において、バイオ人工腎臓とすることができる。

[0024] また、本発明のさらに別の態様によれば、本発明は、幹細胞から多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞への分化誘導方法に関するものであり、前記分化誘導方法は、

- 1) 幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程；及び
- 2) 得られた幹細胞の三次元細胞塊を、BMP7及びEGFを含み、かつ、GDNF、b-FGF、またはHGFの少なくとも一つを含まない培養液中

で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養する工程を含むことを特徴とする。

[0025] また、本発明の多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞への分化誘導方法は、一実施態様において、工程 2) における培養液が、BMP 7 及び EGF を含み、かつ、GDNF、b-FGF、または HGF のいずれも含まないとするのが好ましい。

[0026] また、本発明のさらに別の態様によれば、本発明は、上記多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞への分化誘導方法により誘導されて形成される、多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞に関するものである。

発明の効果

[0027] 本発明の幹細胞の組織細胞への分化誘導方法により、未分化の細胞を組織細胞へ分化誘導させることができ、さらには三次元的な構造を構築することができた。具体的には、本発明の方法により腎臓幹細胞／前駆細胞から腎臓の遠位尿細管細胞、糸球体細胞、近位尿細管細胞などに分化させることができ、さらには *in vitro* で腎臓様構造を再構築することができた。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]腎臓の構造を示す模式図である。

[図2]本発明の分化誘導方法を示す概略図である。（実施例 1）

[図3]三次元培養 2 1 日後の培養形態を示す写真図である。a は、rKS 細胞の細胞塊の三次元培養 2 1 日目の形態を示し、b は、後腎発生間葉系幹細胞（metanephric mesenchymak 細胞）三次元培養 2 1 日目の形態を示し、c は、尿細芽細胞の三次元培養 2 1 日目の形態を示す写真図である。（実施例 1、実施例 2）

[図4] rKS 細胞の三次元培養 2 1 日後の培養形態を示す写真図である。A は、管腔構造が認められない状態を示し、B は、集合する腎杯様構造が認められず、糸球体様構造＋尿管様構造を有する状態を示し、C は、糸球体陽構造、尿管様構造、腎杯様構造の全てが認められる状態を示す。（実施例 3）

[図5] rKS 細胞の三次元培養 2 1 日後の培養形態に関し、rKS 細胞塊を作

製する際の細胞数による各種形態の割合を示す図である。A、B及びCは、図4の説明と同様である。（実施例3）

[図6] r K S細胞塊を作製する際の、各種細胞数を変えたときのr K S細胞の三次元培養1日目、7日目並びに21日目の培養形態を示す写真図である（実施例3）。

[図7]各培養条件における、r K S細胞の三次元培養21日後の培養形態を示す写真図である。なお、mの条件は、三次元培養4日後の培養形態を示す写真図である（実施例4）。

[図8] r K S細胞の三次元培養4日目の培養形態を示す写真図である（実施例5）。

[図9] r K S細胞の三次元培養4日目の培養細胞の表面マーカーを示す写真図である（実施例1）。

[図10] r K S細胞の三次元培養2週間後の形態を示す写真図である（実施例6）。

[図11] r K S細胞の三次元培養3週間後の形態を示す写真図である（実施例6）。

[図12] r K S細胞の三次元培養3週間後の形態を示す写真図である（実施例6）。

[図13] r K S細胞の三次元培養3週間後の遠位尿細管の形態を示す顕微鏡写真図である。図中の矢印は、primary cillaを示す（実施例6）。

[図14] r K S細胞の三次元培養3週間後の糸球体の形態を示す顕微鏡写真図である（実施例2）。

[図15] r K S細胞の三次元培養2週間後の近位尿細管の形態を示す顕微鏡写真図である（実施例6）。

発明を実施するための形態

[0029] 本発明は、幹細胞の臓器細胞への分化誘導方法に関する。本発明において、幹細胞とはある細胞に変化するようにという指示を受けると特定の細胞に分化する能力を有する細胞をいう。幹細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）、成

体幹細胞、胚生殖細胞等に分類されるが、本発明の幹細胞は何れの細胞であっても良い。取り扱いの容易さから考えると、成体幹細胞又は胚生殖細胞を用いるのが好適である。

[0030] 成体幹細胞とは生体内の組織より採り出される分化する前の状態の細胞をいう。組織には、すでに分化した成熟細胞と共に、未分化細胞、すなわち幹細胞も含まれる。成体幹細胞は、自らと同じ細胞を複製し、製造する能力を持つとともに、分化によってそれが存在していた組織内のあらゆる個別細胞を作製することができる。本発明において使用可能な幹細胞としては、生体内の組織より従来周知の方法によって単離される幹細胞または前駆細胞を使用することができ、具体的には、例えば特許文献4に記載の腎臓幹細胞／前駆細胞が挙げられる。本願の明細書及びクレームにおいて、「幹細胞」との記載は、広義に解釈され、幹細胞のみならず前駆細胞をも含む概念である。このような広義の「幹細胞」概念を意味して、適宜、「幹細胞／前駆細胞」との記載が用いられる。

[0031] 本発明の幹細胞の組織細胞への分化誘導方法に用いられる三次元培養用の培養液は、基本培地にウシ胎児血清（以下「FCS」）、肝細胞増殖因子（以下「HGF」）、神経栄養因子（以下「GDNF」、塩基性線維芽細胞増殖因子（以下「b-FGF」）、骨形成因子7（以下「BMP7」）及び上皮細胞増殖因子（以下「EGF」）を含むことを特徴とする。培養液に含まれるFCSは、約10v/v%とすることができる。また、HGFは、100～500ng/ml、好ましくは200～400ng/mlより選択される濃度で含まれ、より好ましくは250ng/ml含まれる。また、GDNFは、100～500ng/ml、好ましくは200～400ng/mlより選択される濃度で含まれ、より好ましくは250ng/ml含まれる。また、b-FGFは、100～500ng/ml、好ましくは200～400ng/mlより選択される濃度で含まれ、より好ましくは250ng/ml含まれる。また、BMP7は、100～500ng/ml、好ましくは200～400ng/mlより選択される濃度で含まれ、より好ましくは250

n g/m¹含まれる。また、EGFは、300~700 n g/m¹、好ましくは400~600 n g/m¹より選択される濃度で含まれ、より好ましくは500 n g/m¹含まれる。

[0032] 上述のとおり、実施態様において、本発明の分化誘導方法を、

1) 幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程；及び

2) 前記細胞塊をHGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で、三次元スキャホールの存在下で三次元培養する工程

とを含む分化誘導方法とする場合において、上記工程2)が、三次元スキャホールの存在下、前記細胞塊を、HGF、GDNF、b-FGFを含む培養液中で三次元培養する第一の工程(工程2A)と、第一の工程の培養開始から0~10日経過後、HGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で三次元培養する第二の工程(工程2B)とを含むものとする場合、例えば、以下のように、第一の工程と第二の工程の培養液中の各成分の好ましい濃度を設定することができる。すなわち、上記各好ましい濃度を実現するようにFGS、HGF、GDNF、b-FGFを配合することにより第一の工程の培養液を調製する。また、第一の工程の培養液にBMP7およびFGFを上記好ましい終濃度となるように添加することで第二の工程の培養液を調製することができる。

[0033] ここで、培養液の基本培地としては、DMEM/F12培地を使用することが好ましい。しかしながら、基本培地はこれに限定されず、当分野に周知の基本培地も使用することができる。培養液には、さらにペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質を必要に応じて適宜添加することができる。

[0034] 本発明の幹細胞の組織細胞への分化誘導は、上記培養液を用いて三次元スキャホールの存在下で三次元培養により達成することができる。三次元培養を行なうに際して、まず幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程を含むものが好適である。

より具体的には、以下の工程を含む方法による。

1) 幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程；及び

2) 得られた細胞塊をFCS、HGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養する工程。

[0035] 上記において、三次元の細胞塊の作製方法は特に限定されないが、例えばハンギングドロップ法により作製することができる。ハンギングドロップ法とは、例えば以下に示す三次元の細胞塊作製溶液を用いて、本発明の幹細胞を含む細胞浮遊液を調製したものを、培養容器の蓋等に載せ、載せた細胞浮遊液がぶら下がるように逆さにして培養することによる方法が挙げられる。具体的には、細胞塊作製溶液50 μ lに対して $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個、好ましくは $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 個、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を含む細胞浮遊液を調製することができる。細胞塊を形成させるための培養時間は、約6～10時間程度が好適である。培養時間が6時間より短い時間では、十分な細胞塊を得ることはできず、10時間より多い場合は、形成した細胞塊が崩れるため、37℃で6～10時間培養することが好ましい。ハンギングドロップ法により作製された細胞塊は、幹細胞がES細胞の場合は胚様体（embryoid body：EB体）となりうる。ここで、胚様体とはES細胞を様々な組織に分化誘導するために形成される胚をいう。EB体の形成はin vitroでのES細胞の分化誘導におけるファーストステップとなる。三次元の細胞塊を形成させることで、細胞分化に関する細胞間のシグナルが働き、より幹細胞がより分化されやすくなるものと考えられる。

[0036] 上記において、三次元の細胞塊を作製する際には、例えば基本培地にFCS、インスリン、トランスフェリン、セレンウム、デキサメタゾン、HGF及びb-FGFを含む溶液を用いることが好ましい。ここで、基本培地は、DMEM/F12培地を使用することが好ましい。しかしながら、基本培地はこれに限定されず、当分野に周知の基本培地も使用することができる。また、インスリン、トランスフェリン、セレンウムを含有する溶液として、市販のITS-mix（Gibco社製）を使用することができる。溶液に含まれる血清（例えばFCS）は、約10v/v%とすることができる。また

、インスリンは、 $1 \sim 10 \text{ g/ml}$ 、より好ましくは約 5 g/ml 含まれる。また、トランスフェリンは、 $1 \sim 5 \text{ g/ml}$ 、より好ましくは約 2.75 g/ml 含まれる。また、セレンウム (Sodium Selenite) は、 $1 \sim 5 \text{ ng/ml}$ 、より好ましくは約 3.35 ng/ml 含まれる。また、デキサメタゾン[®]は、 $1 \sim 10 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、より好ましくは $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 含まれる。また、HGFは、 $1 \sim 100 \text{ ng/ml}$ 、より好ましくは 5 ng/ml 含まれる。また、b-FGFは、 $1 \sim 100 \text{ ng/ml}$ 、より好ましくは 25 ng/ml 含まれる。本溶液にも、さらにペニシリンやステレプトマイシン等の抗生物質を必要に応じて適宜添加することができる。

[0037] 本発明の幹細胞の組織細胞への分化誘導方法では、幹細胞を、上述の三次元培養用の培養液中で、三次元スキャホールドの存在下、培養することができる。より好ましくは、上記の幹細胞から形成させた三次元の細胞塊を上述の三次元培養用の培養液を用いて培養することができる。

[0038] 三次元培養を行なうための培養は、上述の幹細胞の培養液、即ちFCS、HGF、GDNF及びb-FGF、並びにBMP7及びEGFを含む培養液で培養することもできるし、また、三次元培養を二段階に分け、予め上記各濃度のFCS、HGF、GDNF及びb-FGFを含む培養液で培養し、さらに0～10日経過後に、FCS、HGF、GDNF、b-FGFを含む培養液に上記各濃度のBMP7及びEGFを含む条件下で培養することもできる。三次元培養を二段階に分ける場合には、第一の工程（工程2A）であるFCS、HGF、GDNF、b-FGFを含む培養液による培養の開始から、好ましくは1～8日経過後に、より好ましくは4～7日経過後に、第二の工程（工程2B）であるFCS、HGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液で培養することができる。第一の工程から第二の工程への培養液の変更を、上記好ましい期間とすることで分化誘導率を向上させることができる。BMP7及びEGFは、最終的に上記に示す濃度になるように、濃度勾配をかけて徐々に添加濃度を増加させてゆくことも可能である。例えば培養用ダブルチャンバーの下部にHGF、GDNF及びb-FG

Fを含む培養液を加え、上部にBMP7及びEGFを含む培養液を加え、下部の培養液中で上述の幹細胞を培養しつつ、徐々に上部のBMP7及びEGFを含む培養液を下部に移動させることで、BMP7及びEGFの濃度勾配をつくる方法等が挙げられる。

[0039] なお、本明細書中において、幹細胞の組織細胞への分化誘導方法に用いられる培養液に含まれる血清として主に、FCSを記載しているが、基本培地に使用する血清はFCSに限定されず、その他のウシ血清やヒト血清等、所望の役割を果たし得る、当分野で周知の血清を使用することができる。

[0040] 本発明に用いられる三次元スキャホルドの材料としては、当該分野で公知のものであれば特に限定されず、例えばコラーゲンベースの材料やポリカプロラクトンやポリグリコール酸等のポリマー系の材料、又はそれらの複合体を使用することができる。また、その形態についても特に限定されないが、例えばスポンジ状構造物などが挙げられる。また、三次元スキャホルドは、生体由来の試料を材料（例えば細胞外マトリックスや基底膜など）とするものであってもよい。具体的には、マトリゲル™（ベクトン・ディッキンソン社）、type I コラーゲンゲル、type V コラーゲンゲルなどを挙げることもできる。

[0041] 本発明は、幹細胞の組織細胞への分化誘導方法により得られた組織細胞にも及び、当該組織細胞より形成されるバイオ人工臓器にも及び。例えば、用いた幹細胞が腎臓幹細胞／前駆細胞の場合は、得られる組織細胞は腎臓細胞であり、該組織細胞から形成されるバイオ人工臓器は、バイオ人工腎臓である。腎臓幹細胞／前駆細胞の取得方法は、特に限定されないが、例えば特許文献4に記載する方法に従うことができる。本発明は、このようにして作製されたバイオ人工臓器を含む医療用材料にも及び。

実施例

[0042] 以下、本発明の理解を深めるために実施例を示して本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではないことはいふまでもない。

[0043] 腎臓はヒトでは腹腔の背側に2個存在しており、それぞれ膀胱まで伸びた尿管を有しており、ホルモンを生成して分泌したり、尿を生成する臓器であり、主に排泄機能、内分泌機能、調節機能を有する。腎臓には、ネフロンと呼ばれる基本構造が約100万個存在し、血液から老廃物を含む水分を濾過し、原尿を生成する糸球体を備えている。糸球体で生成された原尿は、近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管、集合管を通過して尿管へ運ばれる。近位尿細管（S1：分節1、S2：分節2、S3：分節3）、ヘンレ係蹄、遠位尿細管では、ナトリウムや水分などを再吸収し、エリスロポイエチンや、ビタミンD3を活性化する。また、ネフロンの周囲には間質細胞などがある。原尿は、尿管へ運ばれるまでに約100倍に濃縮された後、尿管を通過して膀胱まで運ばれ、膀胱から体外へ排泄される（図1参照）。

[0044] 腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される。哺乳動物では、前腎及び中腎のほとんどが後に退行変性し、主に後腎から腎臓が生じる。後腎は、中腎の最も尾側に発生する尿管芽と呼ばれる突起の周りに間葉系細胞が集合して生じる。そして、尿管芽と間葉系細胞とが相互作用し、間葉系細胞が上皮化してS字体と呼ばれる状態を経ることによって、糸球体、近位尿細管、ヘンレ係蹄、遠位尿細管が発生する。また、集合管及び尿管上皮細胞などは、尿管芽より分化する。

[0045] （実施例1）腎臓幹細胞／前駆細胞を用いた三次元培養

腎臓幹細胞／前駆細胞をハンギングドロップ法により培養し、得られた細胞塊をマトリゲルからなるスキャホールド内で培養し、三次元培養を行なった（図2参照）。

[0046] 1）腎臓幹細胞／前駆細胞

特許文献4に記載の方法により近位尿細管のS3領域より分離し、得られた高増殖能細胞をリポフェクション法によりSV40遺伝子を組み込み、細胞株化した。得られた株化細胞は、本実施例の腎臓幹細胞／前駆細胞であり、以下rKS56細胞という。

[0047] 2）rKS56細胞の細胞塊の作製

DMEM/F12培地にFCS（終濃度：10 v/v%）、ITS-mix（Gibco社製）（200 μ l）、デキサメタゾン（終濃度： 5×10^{-8} M）、HGF（終濃度：5 ng/ml）、b-FGF（終濃度：25 ng/ml）からなる溶液を調製した。上記溶液50 μ lに、rKS56細胞を約 1×10^5 程度含む細胞浮遊液を調製し、96穴マイクロプレートのふたの内側に前記細胞浮遊液を載せ、元に戻してハンギングドロップを行なった。37°Cで6～10時間培養を行い、rKS56細胞の細胞塊を作製した（図3参照）。

[0048] 3) rKS56細胞の三次元培養

DMEM/F12培地及びマトリゲル™（ベクトン・ディッキンソン社）を1：1で混合した溶液に、FCS（終濃度：10 v/v%）、HGF（終濃度：250 ng/ml）、GDNF（終濃度：250 ng/ml）、b-FGF（終濃度：250 ng/ml）を加えた培養液を調製した。まず、三次元培養工程の第一の工程（工程2A）として、スキャホールドとしてのマトリゲル™を含む前記培養液を用い、上記2)で作製した細胞塊を24穴のトランスウェル（コーニング（Corning）社、Cat#3470）に対して1ウェルあたり1個播種し、5～7日間37°Cで培養した。その後、三次元培養の第二の工程（工程2B）として、FCS、HGF、GDNF、b-FGFを含む前記培養液にBMP7（終濃度：250 ng/ml）及びEGF（終濃度：500 ng/ml）を添加した培養液内で約4週間、37°Cで培養した。一実施例として、第一の工程（工程2A）から第二の工程（工程2B）への培養液の変更は、FCS、HGF、GDNF、b-FGFを含む前記培養液を24穴のトランスウェルの1ウェルごとに400 μ l添加した状態に対し、50 μ g/ml BMP7高濃度溶液を2 μ l、100 μ g/ml EGF高濃度溶液を2 μ l添加することにより行った。三次元培養21日目の培養形態を図3aに示した。

[0049] （実施例2）腎臓幹細胞／前駆細胞を用いた三次元培養

rKS56細胞の代わりに、後腎発生間葉系幹細胞（metanephric mesench

ymak) 又は尿細芽細胞を用いて培養したほかは、実施例 1 と同手法にて培養を行なった。各々についての三次元培養 21 日目の培養形態を図 3 b 及び c に示した。

[0050] (実施例 3) r K S 5 6 細胞の細胞塊作製の細胞数による培養細胞形態について

r K S 5 6 細胞を用いて細胞塊を作製する際に使用する細胞数を、各種変化させた他は、実施例 1 と同手法にて細胞を培養した。そのときの、各種細胞形態の出現頻度を確認した。図 4 において、A は、管腔構造が認められない状態を示し、B は、集合する腎杯様構造が認められず、糸球体様構造+尿管様構造を有する状態を示し、C は、糸球体陽構造、尿管様構造、腎杯様構造の全てが認められる状態を示す。

上記の結果、図 5 に示すように、r K S 5 6 細胞の細胞塊作製の細胞数が低い場合は、腎組織への十分な分化誘導頻度が低いのに対し、細胞数が高くなるにつれて、腎組織への十分な分化誘導能が確認された。

具体的には、図 6 に示す細胞の培養形態が確認された。図 6 において、r K S 5 6 細胞塊を作る際の細胞数は、a) g) 及び m) では 6.25×10^3 個、b) h) 及び n) では 1.25×10^4 個、c) i) 及び o) では 2.5×10^4 個、d) j) 及び p) では 5.0×10^4 個、e) k) 及び q) では 1.0×10^5 個、並びに f) l) 及び r) では 2.0×10^5 個であった。また、培養 1 日目の形態を a) b) c) d) e) 及び f) に示し、培養 7 日目の形態を g) h) i) j) k) 及び l) に示し、並びに培養 21 日目の形態を m) n) o) p) q) 及び r) に示した。

[0051] (実施例 4) 三次元培養における培地の条件を変えたときの培養細胞形態について

実施例 1 に記載の細胞塊の作製法と同手法にて作製した r K S 5 6 細胞の細胞塊を、二次元培養した場合、又は各種培養液の組成を変えて三次元培養したときの各種細胞形態を確認した。

培養は、以下の a) ~ p) の条件で行なった。各培養液には、1%のペニ

シリン及びストレプトマイシンを添加した。また、本実施例では、a)の培養液で培養した際、スキャホールドを用いず、二次元培養を行なった。その他の組成の培養液で培養したときは、三次元培養を行なった。また、細胞塊の二次元培養および三次元培養は、二段階に分けることなく、培養開始時から各種組成を全て含む培養液で培養を行った。

[0052] 1) 各培養液

- a) DMEM/F12+10%FCS+GDNF (250 ng/ml) + b-FGF (250 ng/ml) + HGF (250 ng/ml) + EGF (500 ng/ml) + BMP7 (250 ng/ml)
- b) DMEM/F12+10%FCS
- c) DMEM/F12+10%FCS+GDNF (250 ng/ml)
- d) DMEM/F12+10%FCS+b-FGF (250 ng/ml)
- e) DMEM/F12+10%FCS+HGF (250 ng/ml)
- f) DMEM/F12+10%FCS+GDNF (250 ng/ml) + b-FGF (250 ng/ml) + HGF (250 ng/ml)
- g) DMEM/F12+10%FCS+EGF (500 ng/ml) での変化
- h) DMEM/F12+10%FCS+BMP7 (250 ng/ml)
- i) DMEM/F12+10%FCS+EGF (500 ng/ml) + BMP7 (250 ng/ml)
- j) DMEM/F12+10%FCS+GDNF (250 ng/ml) + b-FGF (250 ng/ml) + HGF (250 ng/ml) + EGF (500 ng/ml) + BMP7 (250 ng/ml)
- k) DMEM/F12+10%FCS+アクチビン (250 ng/ml)
- l) DMEM/F12+10%FCS+フォリスタチン (250 ng/ml)
- m) DMEM/F12+10%FCS+EGF (1000 ng/ml) + BMP7 (250 ng/ml)

n) DMEM/F12 + 10% FCS + HGF (250 ng/ml) + アクチビン (250 ng/ml)

o) DMEM/F12 + 10% FCS + LIFsR α (250 ng/ml)

p) DMEM/F12 + 10% FCS + nephronectin (250 ng/ml)

[0053] 2) 21日培養後の培養形態結果

各条件で、21日培養した後の観察結果を以下に示した（図7参照）。なお、m)の条件については、ロジスティクスの関係上、培養4日目の観察結果を示す。

a)の培養条件では、三次元培養をしないと形態形成をしないことが示された（細胞の形態は変化しており、分化していることが示唆される）。

b)の培養条件では、成長因子をいれないと形態形成しないことが確認された。

c)の培養条件では、GDNFのみでは数個の長い管腔構造ができることが確認された。

d)の培養条件では、b-FGFのみで、太い管腔構造ができることが確認された。

e)の培養条件では、HGFのみでは管腔構造などができるが形態が不十分であることが確認された。

f)の培養条件では、HGF、GDNF及びb-FGFを含む培養液では形態形成が比較的確認された。管腔の構造の太細ははっきりせず、後のEGFやBMP7を含む培養液で培養した方がより正常の腎臓に近いものができやすいことが確認された。

g)の培養条件では、EGFのみでは曲がった管腔構造ができやすいことが確認された。

h)の培養条件では、先端に糸球体様構造が多数できていることが確認された。

i)の培養条件では、塊の中に嚢胞状のものができていることが確認され、

多発性嚢胞腎様形態が確認された。

j) の培養条件では、腎臓形態に近い形態が確認された。

k) の培養条件では、全く変化がないことが確認された。

l) の培養条件では、曲がった太い管腔構造が確認された。(糸球体様構造なし)

m) の培養条件では、塊の中に嚢胞状のものができていることが確認され、

i) の多発性嚢胞腎様形態に比べてよりはっきりした形態形成が確認された。

。

n) の培養条件では、HGF 及びアクチビンを含む培養液で、一部に管腔構造ができることが確認された。

o) の培養条件では、全く変化がないことが確認された。

p) の培養条件では、全く変化がないことが確認された。

以上で、条件により、形態形成が違ってくることが確認された。特に、i) および m) では、多発性嚢胞腎様形態を確認することができた。これらの多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞は、病変モデルとして有用である。このような病変モデルは、新たな薬剤に対する腎障害等のテストを、生体内投与で試す前に、in vitro で障害部位について検討可能なバイオアッセイ系のツールとして応用することができ、例えば、多発性嚢胞腎の治療のための治療薬等に関し、新規薬剤のスクリーニング、アッセイの材料として利用可能である。

[0054] (実施例 5) 培養 4 日目の三次元培養形態の確認及び各種マーカーの確認

実施例 1 と同手法にて培養する際、三次元培養における培養条件を多発性嚢胞腎様条件または腎臓様構造条件とした結果、培養 4 日目に尿管芽様細胞 (UB) とその周囲の後腎間葉様細胞 (MM) を観察することができた (図 8 参照)。なお、MM 条件とは腎臓様構造条件のことを意味し、UB 条件とは多発性嚢胞腎様条件のことを意味する。UB 及び MM の細胞表面の各種マーカーを、RT-PCR の手法にて確認した。各種マーカーについて、RT-PCR を行なうためのプライマーを、表 1 に示した。

[0055] [表1]

遺伝子名	primer F	primer R
aquaporin-1	CCTCCAGGCACAGTCTTCTC (配列番号1)	CAGTGGCCTCCTGACTCTTC (配列番号2)
Na-Ca transporter	TGGAAGCTGGTCTGTCTCCT (配列番号3)	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG (配列番号4)
nephrin	GCTCCCACCATCCGTGC (配列番号5)	GACTATGTCCACACAACCCCA (配列番号6)
pax-2	AGGGCATCTGCGATAATGAC (配列番号7)	CTCGCGTTCTCTTCTCAC (配列番号8)
gdnf	CCCGAAGATTATCCTGACCA (配列番号9)	TAGCCCAAACCCAAGTCAGT (配列番号10)
ret	GCGTCAGGGAGATGGTAAAG (配列番号11)	CATCAGGGAACAGTTGCAG (配列番号12)
ncam	ACGTCCGGTTCATAGTCTTG (配列番号13)	CTATGGGTTCCCATCCITT (配列番号14)
Wt-1	ACCCAGGCTGCAATAAGAGA (配列番号15)	GCTGAAGGGCTTTTCACTTG (配列番号16)
AQP-2	GTGGCTGCCAGCTGCTGGG (配列番号17)	AGCTCCACCGACTGCCGCCG (配列番号18)
bf-2	AGGAGACAGACATCGACGTG (配列番号19)	TGACGAAGCAGTCGTTGAG (配列番号20)
gapdh	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG (配列番号21)	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT (配列番号22)

[0056] アクアポリン (Aquaporin、A Q P) とは細胞膜に存在する細孔を持ったタンパク質であり、哺乳類が持つアクアポリンは13種類が知られているが、その内6種類は腎臓にある。これらのうち、A Q P-1は近位尿細管のマーカであり、A Q P-2は遠位尿細管のマーカである。また、ネフリン(Nephrin)は糸球体上皮細胞に局在するタンパク質である。培養4日目の細胞において上記各マーカが検出されたことから、上記培養により、r K S 5 6細胞は腎臓の各種組織に分化しうることが示唆された(図9)。

[0057] (実施例6) 培養形態の観察

1) 培養2週目の培養細胞

実施例1に記載の培養手順にて三次元培養2週後のバイオ人工腎臓の形態を顕微鏡にて観察した。

培養した細胞塊から尿細管様の管腔構造が多数認められ、その構造は極性を持った細胞で構築されていた。また、管腔の先端には糸球体様の球体構造が認められた(図10)。

[0058] 2) 培養3週目の培養細胞

上記培養手順にて三次元培養3週後のバイオ人工腎臓の形態を顕微鏡にて観察した。管腔構造にも変化が認められ、同じ管腔でも太さや、曲部などを伴う管腔も認められ、腎臓でいう近位尿細管のような太く、曲がった管腔からまっすぐの構造で細い、ヘンレのループや遠位尿細管のような構造が認め

られた（図 1 1）。

[0059] 3) 培養 3 週目の培養細胞（球体様構造の観察）

上記培養手順にて三次元培養 3 週後のバイオ人工腎臓の形態をさらに観察してみると、条件によっては、先端に球体様構造を伴い、それに管腔構造が続き、それらが徐々にあつまり、腎杯様の構造に注ぐ腎臓用の構造が認められた。この構造は、腎臓の基本構造単位であるネフロンに近く、それらが、複数個集まっており、臓器様の構造を呈していると思われた（図 1 2）。

[0060] 4) 培養 3 週目の培養細胞（遠位尿細管構造の観察）

上記培養手順にて三次元培養 3 週後のバイオ人工腎臓の遠位尿細管（管腔構造）の形態を電子顕微鏡にて観察した。primary ciliaをともなった管腔の細胞が認められ、極性をもち、細胞が存在していると思われ、ただ単に、細胞が管腔構造をとっているのではなく、極性をもち、お互いに位置を確認し、存在、機能していると考えられた（図 1 3）。

[0061] 5) 培養 3 週目の培養細胞（ボーマン嚢様の観察）

上記培養手順にて三次元培養 3 週後のバイオ人工腎臓の糸球体の形態を電子顕微鏡にて観察した。管腔の先端の球体構造は、電子顕微鏡にて、外側にボーマン嚢様の細胞構築が認められ、その中に、管腔構造を伴った糸球体様構造が認められた（図 1 4）。

[0062] 6) 培養 3 週目の培養細胞（近位尿細管構造の観察）

上記培養手順にて三次元培養 3 週後のバイオ人工腎臓の近位尿細管（管腔構造）の形態を電子顕微鏡にて観察した。

さらに同じ管腔構造も、絨毛が多数認められる近位尿細管構造と同じ構造が電子顕微鏡レベルでも確認された（図 1 5）。

産業上の利用可能性

[0063] 以上詳述したように、本発明の幹細胞の組織細胞への分化誘導方法により、細胞を分化誘導させることができる。具体的には、腎臓幹細胞／前駆細胞から腎臓の遠位尿細管、糸球体、近位尿細管などに分化させることができ、i n vitroで腎臓様構造の再構築が可能であった。これにより、バイオ人工臓器

を作製することができ、さらにはバイオ人工臓器を含む医療用材料を提供することができる。

- [0064] バイオ人工臓器を用いることで、腎障害治療薬等の薬剤に関し、腎臓障害のどの部位（セグメント）で薬剤が有効に作用するかなどの分析や、新規薬剤のスクリーニング、アッセイを行うことができる。また、成体から幹細胞／前駆細胞を取り出すことで、そのヒト特有の自己由来バイオ人工臓器の作製が可能となる。また、本発明のバイオ人工臓器や医療用材料は、従来臓器移植でしか対応できなかった疾患に対しても、提供することが可能となり、非常に有用である。さらに、自己由来バイオ人工臓器や医療用材料は、拒絶反応の心配もなく、安全性にも優れている。

請求の範囲

- [請求項1] 幹細胞を、基本培地に肝細胞増殖因子（HGF）、神経栄養因子（GDNF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）、骨形成因子7（BMP7）及び上皮細胞増殖因子（EGF）を含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養することを特徴とする、幹細胞の組織細胞への分化誘導方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の分化誘導方法であって、
前記三次元培養が、前記幹細胞を、HGF、GDNF及びb-FGFを含む培養液中で培養する第一の工程と、第一の工程の培養開始から0～10日経過後、HGF、GDNF、b-FGF、BMP7、及びEGFを含む培養液中で培養する第二の工程とを含むことを特徴とする分化誘導方法。
- [請求項3] 培養液中のHGF、GDNF、b-FGF及びBMP7は、各々独立して100～500 ng/mlより選択される濃度で含まれ、EGFは、300～700 ng/mlより選択される濃度で含まれる条件下で培養する請求項1または2に記載の分化誘導方法。
- [請求項4] 前記培養液中にさらに血清を含む請求項1～3のいずれか一項に記載の分化誘導方法。
- [請求項5] 前記血清がFCSである請求項1～4のいずれか一項に記載の分化誘導方法。
- [請求項6] 前記幹細胞が、腎臓の幹細胞であることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の分化誘導方法。
- [請求項7] 以下の工程を含む幹細胞の組織細胞への分化誘導方法：
1）幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程；及び
2）前記細胞塊をHGF、GDNF、b-FGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養する工程。
- [請求項8] 請求項7に記載の分化誘導方法であって、

[請求項9]	前記工程2)が、三次元スキャホールの存在下、前記細胞塊を、 HGF、GDNF、bFGFを含む培養液中で三次元培養する第一 の工程と、第一の工程の培養開始から0～10日経過後、HGF、G DNF、bFGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で三次元培 養する第二の工程とを含む分化誘導方法。 培養液中のHGF、GDNF、bFGF及びBMP7は、各々独 立して100～500ng/mlより選択される濃度で含まれ、EG Fは、300～700ng/mlより選択される濃度で含まれる条件 下で培養する請求項7または8に記載の分化誘導方法。 前記工程2)における培養液中にさらに血清を含む請求項7～9の いずれか一項に記載の分化誘導方法。 前記工程1)において、前記細胞塊がインゲンブロッツ法により 形成される請求項7～10のいずれか一項に記載の分化誘導方法。 請求項1～11のいずれか一項に記載の分化誘導方法により誘導され て形成される組織細胞。 分化誘導方法により誘導されて形成される組織細胞が、腎組織細胞 である請求項12に記載の組織細胞。 請求項12又は13に記載の組織細胞を含むバイオ人工臓器。 請求項14に記載のバイオ人工臓器を含む医療用材料。 請求項15～16以下の工程を含むバイオ人工臓器の製造方法； 1) 幹細胞の細胞塊を形成する工程； 2) 得られた細胞塊をスキャホールに播種する工程；および 3) スキャホール上で、前記細胞塊をHGF、GDNF、bFGF、BMP7及びEGFを含む培養液中で培養する工程。 バイオ人工臓器が、バイオ人工腎臓である請求項16に記載のバイオ 人工臓器の製造方法。 以下の工程を含む幹細胞の多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞へ の分化誘導方法；
[請求項10]	
[請求項11]	
[請求項12]	
[請求項13]	
[請求項14]	
[請求項15]	
[請求項16]	
[請求項17]	
[請求項18]	

- 1) 幹細胞から三次元の細胞塊を形成させる工程；及び
- 2) 得られた幹細胞の三次元細胞塊を、BMP7及びEGFを含み、かつ、GDNF、bFGF、またはHGFの少なくとも一つを含む培養液中で、三次元スキャホールドの存在下で三次元培養する工程。
- [請求項19] 前記工程2)における培養液が、BMP7及びEGFを含み、かつ、GDNF、bFGF、またはHGFのいずれも含まないことを特徴とする請求項18に記載の分化誘導方法。
- [請求項20] 請求項18または19に記載の分化誘導方法により誘導されて形成される、多発性嚢胞腎様形態を有する組織細胞。