

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-532760

(P2022-532760A)

(43)公表日 令和4年7月19日(2022.7.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/00 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	Z N A	4 B 0 2 9
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071		4 B 0 6 5
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	A	4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/36 (2015.01)	A 6 1 K	35/36		4 H 0 4 5
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全74頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-568505(P2021-568505)		(71)出願人	513016460	
(86)(22)出願日	令和2年5月18日(2020.5.18)			コーニンクレッカ ネザーランド アカデ	
(85)翻訳文提出日	令和3年12月28日(2021.12.28)			ミー ヴァン ウェテンシャッペン	
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/063855			オランダ王国 ユトレヒト ウプサララー	
(87)国際公開番号	WO2020/234250			ン 8 ヒューブレヒト インスティテュ	
(87)国際公開日	令和2年11月26日(2020.11.26)			ート内	
(31)優先権主張番号	1906978.0		(74)代理人	100102978	
(32)優先日	令和1年5月17日(2019.5.17)			弁理士 清水 初志	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		(74)代理人	100102118	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		(74)代理人	100160923	
				弁理士 山口 裕孝	
			(74)代理人	100119507	
				弁理士 刑部 俊	
			(74)代理人	100142929	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 インテグリンアゴニストを使用する改善された培養法

(57)【要約】

本発明は、上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドを培養するための改善された方法に関する。本発明はまた、上記方法での使用に適した培養液、上記方法及び上記培養法の使用によって採取可能な、または採取されるオルガノイド、創薬及びバリデーション、毒性アッセイ、診断及び治療における培地及びオルガノイドに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドを培養する方法であって、前記方法は、上皮幹細胞に適した培養液中で前記上皮幹細胞を培養することを含み、前記培養法は、前記細胞または前記オルガノイドをインテグリンアゴニストに接触させることをさらに含む、前記方法。

【請求項 2】

前記インテグリンアゴニストは、インテグリンのβサブユニットと相互作用し、任意選択で前記βサブユニットは、β 1、β 2、β 3またはβ 7である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記インテグリンアゴニストは、前記β 1サブユニットと相互作用する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記インテグリンアゴニストは、インテグリンのαサブユニットと相互作用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記インテグリンアゴニストは、抗インテグリン抗体、タリン、キンドリン、ジチオスレイトール及びオキシステロール 25-ヒドロキシコレステロールから選択される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

インテグリンの前記アゴニストは、抗インテグリン抗体であり、任意選択で前記抗インテグリン抗体は、JBS2、HP1/3、SNAKA51、PT25-2、PMI-1、MEM-83、NKI-L16、496B、12G10、8A2、TS2/16、15/7、HUTS-4、8E3、N29、9EG7、mAb 24、MEM-148、KIM127、CBRLFA-1/2、MEM-48、KIM185、AP3、AP5、LIBS6、LIBS2、10F8、2B8、2G3である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗インテグリン抗体は、TS2/16、12G10、8A2、15/7、HUTS-4、8E3、N29または9EG7であり、さらに任意選択で前記抗インテグリン抗体は、TS2/16、12G10、HUTS-4または8A2であり、さらに任意選択で前記抗インテグリン抗体は、TS2/16、12G10、HUTS-4である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体は、ヒト化されている、請求項 6 または請求項 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記インテグリンアゴニストは、

- a. 任意選択でキンドリンと組み合わせて使用される、タリン、
 - b. ジチオスレイトールなどの還元剤、または
 - c. オキシステロール 25-ヒドロキシコレステロールなどの脂質、
- である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法は、

- a. オルガノイドの増殖、及び／または
 - b. 前記インテグリンアゴニストなしで実施される同じ方法と比較して、4日間にわたって少なくとも10%、20%、50%の上皮幹細胞増殖の増加
- をもたらす、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法は、細胞外マトリックスと接触させて前記細胞を培養することをさらに含み、任意選択で前記細胞外マトリックスは、基底膜抽出物またはMatrigelである、先行

10

20

30

40

50

請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記方法は、人工マトリックスと接触させて前記細胞を培養することをさらに含み、任意選択で前記人工マトリックスは、ポリマー、任意選択でポリエステル、ポリエチレングリコールまたはヒドロゲルを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記人工マトリックスは、

a. 架橋ポリエチレングリコール (PEG) ヒドロゲル、及び／または

b. 生体材料、好ましくは細胞外マトリックス成分

を含み、任意選択で前記生体材料は、1 つ以上の糖タンパク質 (任意選択でコラーゲン、ラミニン、パールカン、フィブロネクチン、またはフィブロネクチンの RGD 接着リガンドから選択される)、及び／または 1 つ以上の炭水化物 (任意選択でヒアルロン酸) である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記細胞外マトリックスまたは前記人工マトリックスは、3 次元であり、及び／または懸濁した状態である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記培養法は、前記細胞を外因的な細胞外マトリックスと接触させることを含まない、請求項 1 ～ 1 0 及び 1 2 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記上皮幹細胞は、結腸直腸、小腸、胃、脾臓、肝臓、肺、乳房、前立腺、腎臓、口、鼻咽頭、咽喉、下咽頭、喉頭、気管、皮膚、卵管、卵巣、唾液腺、食道、毛嚢及び／または蝸牛細胞から選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記上皮幹細胞に適した培養液は、Wnt アゴニスト、BMP 阻害剤、分裂促進成長因子、及び TGFβ 阻害剤のうち 1 つ以上を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に規定される培養液であって、請求項 2 ～ 9 に規定されるインテグリンアゴニストをさらに含む、前記培養液。

【請求項 1 9】

請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に規定される細胞外マトリックスまたは人工マトリックスであって、請求項 2 ～ 9 に規定されるインテグリンアゴニストをさらに含む、前記マトリックス。

【請求項 2 0】

請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法によって採取可能な、または採取される、オルガノイド。

【請求項 2 1】

請求項 1 8 に記載の培養液、及び任意選択で請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に規定される細胞外マトリックスまたは人工マトリックスを含む、組成物。

【請求項 2 2】

細胞を培養するためのインテグリンアゴニストの使用。

【請求項 2 3】

患者への移植の前に、細胞を前処理するためのインテグリンアゴニストの使用。

【請求項 2 4】

細胞移植法における、細胞接着増強物質として使用するためのインテグリンアゴニスト。

【請求項 2 5】

治療にて使用するための、または診断にて使用するための、請求項 2 0 に記載のオルガノイド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本発明は、幹細胞またはオルガノイドを培養するための *in vitro* 細胞培養法に関する。本発明は、上記方法での使用に適した培養液、上記方法及び上記培養法の使用によって採取可能な、または採取されるオルガノイド、創薬及びバリデーション、毒性アッセイ、診断及び治療における培地及びオルガノイドに関する。

【背景技術】

【0002】

背景

培養において幹細胞またはオルガノイドを培養するための現在の方法は、一般に、細胞外マトリックスの使用を必要とする。細胞外マトリックスは、全身に分布する繊維状のゲル状物質の多機能性網目構造で構成されており、全ての組織に構造的及び生化学的支持体を提供する。マトリックスタンパク質は、細胞接着、増殖、分化及びアポトーシスなどの多くの細胞プロセスに関与している。細胞外マトリックスタンパク質の例としては、ラミニン、コラーゲン、糖タンパク質、プロテオグリカン、及びグリコサミノグリカンが挙げられ、これらは、細胞間の隙間空間で、または基底膜として自己組織化する。これらの細胞外マトリックスタンパク質は、マトリックス成分の一部に結合する場合がある様々な細胞受容体を介して細胞機能に影響を与えることがある [1]。

10

【0003】

上皮幹細胞を培養するために使用されることがある市販の細胞外マトリックスの例としては、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) 基底膜抽出物 (Trevigen, Inc) またはMatrigel (商標) (BD Biosciences)) が挙げられる。しかし、これらの細胞外マトリックスの正確な組成及びそれらが細胞機能に影響を与えるメカニズムは不明なままである [2]。これらの細胞外マトリックスの正確な成分は明確に定義されていないため、幹細胞を培養する際にばらつきの原因となる可能性がある。

20

【0004】

したがって、マトリックスの成分が制御され、かつ再現可能なこれらの細胞外マトリックスの人工代替物が当技術分野において求められている。人工マトリックスは、化学的に処理された培養皿プラスチック、または細胞外マトリックスタンパク質で任意に補われた沈着したタンパク質の層などの種々の材料から作ることができる。しかし、当技術分野における人工マトリックスは、主要な細胞外マトリックスタンパク質のみを含有し、全ての細胞型に適用できるわけではない [2]。さらに、これらの人工マトリックスは、一部の幹細胞の増殖を支援する可能性があるが、まだ細胞外マトリックスほど効率的ではない。

30

【0005】

したがって、幹細胞を培養する改善された方法が、当技術分野において求められている。特に、人工マトリックスを用いる幹細胞の増殖を改善する培養法が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドを培養するための方法を提供するが、この方法は、上皮幹細胞に適した培養液中で上記上皮幹細胞を培養することを含み、さらに、この培養法は、細胞またはオルガノイドをインテグリンアゴニストと接触させることを含む。本発明者らは、上皮幹細胞またはオルガノイドを培養するための方法における抗体などのインテグリンアゴニストの使用は、細胞外マトリックスの存在下または不存在下にて細胞増殖の改善をもたらすことを有利に特定した。

40

【0007】

本発明は、さらに、上皮幹に適しており、かつ本発明の方法で使用するための、Wntアゴニスト、BMP阻害剤、分裂促進成長因子及びTGFβ阻害剤のうち1つ以上を含む、本発明の方法で使用するための培養液を提供する。本発明はまた、本発明の方法のいずれかによって採取可能な、または採取されるオルガノイドも提供する。

50

【0008】

本発明の他の態様は、本発明で定義するような上皮幹に適した培養液、及び本発明の方法のいずれかによって採取可能な、または採取されるオルガノイドを含む組成物を提供する。本発明はまた、本発明で定義するような上皮幹に適した培養液、及び細胞外マトリックスまたは人工マトリックスを含む組成物も提供する。本発明はまた、本発明で定義するような細胞外マトリックスまたは人工マトリックスも提供するが、このマトリックスは、本発明で定義するようなインテグリンアゴニストをさらに含む。

【0009】

さらなる態様において、本発明は、細胞を培養するための本発明で定義するようなインテグリンアゴニストの使用を提供する。これらは、患者への移植前に細胞を前処理するためのインテグリンアゴニスト及び細胞移植法において細胞接着増強物質として使用するためのインテグリンアゴニストの使用を含む。

10

【0010】

本発明はまた、薬物スクリーニング、標的バリデーション、標的発見または毒性学に向けた本発明のオルガノイドの使用も提供する。さらに、本発明は、治療で使用するための、または診断で使用するための本発明のオルガノイドの使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】インテグリンの活性形態及び不活性形態の構造を示す[3]。

【図2】ヒト化TS2/16抗体のNUPAGE解析を示す。レーン1：事前に染色させたマーカー、レーン2～4は、それぞれ重鎖構築物と軽鎖構築物との比率が1:1、1:1.4及び1:3のものを示している。

20

【図3】K562細胞のヒト化TS2/16との免疫蛍光を示す。

【図4】ヒト化TS2/16抗体の機能的活性の確認を示す。

【図5】細胞外マトリックスの存在なしにヒト化TS2/16を使用した上皮幹細胞の増殖の促進を示す。

【図6】ヒト化TS2/16抗体を含む培養液中で増殖するオルガノイドの例を示す。

【図7】Matrigelと共にTS2/16を使用した上皮幹細胞の増殖の促進を示す。

【図8】ヒト化TS2/16-Dynabeads濃縮Matrigelを使用した上皮幹細胞の増殖の促進を示す。棒1は、ヒト化TS2/16抗体で処理されたものであり、棒2は、処理を伴わないものである。

30

【図9】細胞外マトリックスの存在なしにヒト化TS2/16またはマウスHUTS-4抗体を使用した上皮オルガノイド断片（ヒト結腸）の増殖の促進を示す。棒1は、処理を伴わないもの、棒2は、ヒト化TS2/16抗体で処理されたもの、棒3は、HUTS-4抗体で処理されたものである。

【図10】細胞外マトリックスの存在なしにヒト化TS2/16を使用した上皮オルガノイド断片（ヒト結腸）の増殖の促進を示す。棒1は、処理を伴わないもの、棒2は、ヒト化TS2/16抗体で処理したものである。

【図11】ヒト化TS2/16抗体を含む培養液、HUTS-4抗体を含む培養液、及び抗体を含まない培養液中で増殖するオルガノイドの例を示す。全ての培養条件は、Matrigelを含まないものであった。

40

【図12】ヒト化TS2/16抗体を含む培養液（上）及び抗体を含まない培養液中で、オルガノイドの断片から開始した増殖するオルガノイドの例を示す。

【図13】Aは、AIIIB2抗体の存在下での乏しい上皮幹細胞増殖を示す。Bは、ヒト化AIIIB2抗体を含む培養液（右）及び抗体を含まない培養液（左）中の、オルガノイドの例を示す。

【図14】Aは、AIIIB2抗体の存在下での乏しい上皮幹細胞増殖を示す。Bは、ヒト化AIIIB2抗体を含む培養液（右）及び抗体を含まない培養液（左）での、オルガノイドの例を示す。

50

【図15】Aは、A I I B 2抗体の存在下での乏しい上皮幹細胞増殖を示す。Bは、ヒト化A I I B 2抗体を含む培養液（右）及び抗体を含まない培養液（左）中の、オルガノイドの例を示す。

【図16A】Matrigelと共にヒト化TS2/16抗体を含む培養液中で増殖する膵臓オルガノイドの例を示す。

【図16B】Matrigelと共にヒト化TS2/16を使用した膵臓上皮幹細胞の増殖の促進を示す。

【図17A】Matrigelと共にヒト化TS2/16を使用した肺上皮幹細胞の増殖の促進を示す。

【図17B】Matrigelと共にヒト化TS2/16抗体を含む培養液中で増殖する肺オルガノイドの例を示す。

【図18】Aは、Matrigelと共にヒト化TS2/16抗体を含む培養液中で増殖する頭頸部オルガノイドの例を示す。Bは、Matrigelと共にヒト化TS2/16を使用した頭頸部上皮幹細胞の増殖の促進を示す。

【図19】Asc8抗体の存在下での乏しい上皮幹細胞増殖を示す。

【図20】上皮幹細胞増殖に対する β 1インテグリンアゴニストTS/16と β 4インテグリンアゴニスト3E1との相乗効果を示す。棒1は、対照であり、棒2は、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のTS2/16で処理したものであり、棒3は、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のTS2/16及び $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ の3E1で処理したものであり、棒4は、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のTS2/16及び $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の3E1で処理したものである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

実施例セクションで詳細に説明されているように、本発明者らは、抗インテグリン抗体は、細胞外マトリックスのシグナル伝達及び構造的機能を模倣するために、上皮幹細胞培養の状況において有用である可能性があるとして仮説を立てた。この仮説を検証するために、本発明者らは、インテグリンアゴニストを生成して、これを細胞外マトリックスの不存在下で上皮幹細胞を培養する方法で試験した。驚くべきことに、本発明者らは、これが、細胞外マトリックスの不存在下で上皮幹細胞増殖及びオルガノイド形成を改善し、かつ、増殖効率を高め、したがって、MatrigelまたはBMEなどの細胞外マトリックスを伴う先行技術方法に匹敵することを発見した。さらに、本発明者らは、細胞外マトリックスを伴う培養法の場合であっても、インテグリンアゴニストを添加すると、増殖が改善されることも発見した。したがって、驚くべきことに、本発明者らは、細胞外マトリックスを含む場合と、含まない場合のどちらであっても、インテグリンアゴニストの添加により、上皮幹細胞を培養するための方法が改善されることを証明した。理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、インテグリンアゴニストがシグナル伝達経路を活性化し、及び／または細胞外マトリックスまたは人工マトリックス材料への上皮幹細胞の接着を促進する構造的支持体を提供すると仮定する。加えて、本発明者らは、インテグリンアゴニストの添加により、驚くべきことに、細胞外マトリックスの不存在下で上皮幹細胞増殖を可能にすることができたので、インテグリンアゴニストは、細胞外マトリックスの構造的及びシグナル伝達機能を模倣することができると仮定する。細胞外マトリックスの不存在下で上皮幹細胞増殖を促進するインテグリンアゴニストの能力は、定義され、制御され、かつ再現可能な培養法に向けてのさらなる進歩であるため、特に有利である。

【0013】

また、上皮幹細胞またはオルガノイドの増殖率が増加すると、種々の異なる薬物を試験するために大量の材料が必要とされる種々のアプリケーション、例えば薬物スクリーニング向けに大量の細胞を利用できるようになるので有利である。単一の出発原料から細胞を生成する能力は、実験間の結果を比較する必要があるようなアプリケーションにとって有利である。同様に、それにより、多くの細胞が移植に使用でき、かつ複数の患者が有用なドナーから採取された細胞で移植され得ることを意味する。培養液中で細胞を培養すること

により、それらの幹細胞表現型を維持しながら細胞を増殖させることが可能になる。これらの幹細胞を含むオルガノイドが形成される。したがって、培養液の使用は、これらの有用な幹細胞の数を増やし、これらの細胞を含有するオルガノイドを採取するのに有利である。

【0014】

したがって、本発明は、インテグリンアゴニストを使用して上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドを培養する方法に関する。特に、本発明は、上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドを培養するための方法を提供するが、この方法は、上皮幹細胞に適した培養液中で上記上皮幹細胞またはオルガノイドを培養することを含み、さらに、この培養法は、細胞またはオルガノイドをインテグリンアゴニストと接触させることを含む。

10

【0015】

インテグリンアゴニスト

インテグリンは、ヘテロ二量体の膜貫通接着受容体であり、細胞間の相互作用、及び細胞と細胞外マトリックスの間の相互作用を支持する。それらは、非共有結合的に会合する α サブユニットと β サブユニットで形成され、全ての後生動物に存在する。各サブユニットは、リガンド結合を媒介する比較的大きな細胞外ドメインと、短い細胞質尾部とを有する（ $\beta 4$ サブユニットは除く）I型膜貫通糖タンパク質である。哺乳動物は、18種類の α サブユニットと、8種類の β サブユニットを有し、それらの組み合わせにより、少なくとも24種類のヘテロ二量体を形成し得、それぞれが独自の結合特異性を有する [3] [9]。

20

【0016】

インテグリンの構造を図1に示す。この構造は、2本の棒状の「脚」によって支えられている「頭部」領域（2つのサブユニット間の主要な接触点）を含む。インテグリンは、インテグリンリガンドに対して異なる結合親和性を有する異なるコンフォメーションをとる。インテグリンリガンドの例としては、コラーゲン、ラミニン、トロンボスポンジン及びフィブロネクチンが挙げられる [4]。屈曲閉鎖型コンフォメーション及び伸長閉鎖型コンフォメーションでは、下部の「脚」及び膜貫通領域は会合を維持し、かつリガンド結合は閉じている。高親和性の伸長開放型コンフォメーションをとる場合、受容体の屈曲開放、ならびに様々なモジュール間及びモジュール内運動などの一連の形状変化を伴う。屈曲閉鎖型／伸長閉鎖型コンフォメーションから、伸長開放型コンフォメーションへのシフトは、「インテグリン活性化」と称される。インテグリン活性化は、 α または β サブユニットを介して発生する場合がある。インテグリン活性化及びリガンド結合を刺激する多くの抗インテグリン抗体（TS2/16を含む）は、アロステリックに機能する。抗体結合により、活性インテグリンシグナル伝達コンフォメーション形態が安定することで、インテグリンのコンフォメーション的平衡が不活性形態から活性形態にシフトする。それにより、活性インテグリン分子の割合が増加する [5]。 $\beta 1$ インテグリンサブファミリーを調査した研究では、TS2/16、12G10及びHUTS-4 Fab抗体が、環状RGDペプチドに対してほぼ同一の高親和性を誘導することが示され、これは、それらが $\beta 1$ ドメインのリガンド結合部位の同一のコンフォメーションを安定化することを示唆している [6]。

30

40

【0017】

したがって、インテグリンアゴニストは、インテグリンを活性化する薬剤である。言い換えれば、インテグリンアゴニストは、インテグリンのコンフォメーション変化を誘導し、それにより、インテグリンリガンドへのその結合親和性を増大させる薬剤である。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、コラーゲン、ラミニン、トロンボスポンジンまたはフィブロネクチンではない。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、インテグリンを活性化し、また、インテグリンに結合するインテグリンリガンドの活性を模倣する。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、インテグリンのコンフォメーション状態に依存することなくインテグリンを活性化することができ、また

50

インテグリンに結合するインテグリンリガンドの活性を模倣することができる。

【0018】

これらのインテグリンアゴニストは、本発明の文脈において特に有用であると予想される。インテグリンアゴニストは、実施例3及び参考文献[17]に記載されているような細胞接着アッセイを使用して当業者によって容易に同定され得る。また、インテグリンに結合するリガンドの活性を模倣することができるインテグリンアゴニストは、実施例4に記載されているようなアッセイを使用して当業者によって同定され得る。

【0019】

いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、環状RGDペプチドに対して、インテグリンアゴニストTS2/16と同じまたは類似の親和性を有する。例えば、インテグリンアゴニストは、[7]に記載されているような蛍光偏光アッセイにて、 $F P_{max}$ が0.2~0.3、0.20~0.25もしくは0.21~0.23、またはより好ましくは $F P_{max}$ が0.21~0.22でFITC-cRGDに結合する。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、TS2/16と同じインテグリンの頭部開放コンフォメーションを安定化することができる。

10

【0020】

環状RGDペプチドに対して、インテグリンアゴニストTS2/16と類似または同じ親和性を有するインテグリンアゴニストは、[7]に記載されているようなアッセイを使用して当業者によって同定され得る。TS2/16と同じインテグリンの頭部開放コンフォメーションを安定化することができるインテグリンアゴニストは、参考文献[6]に記載されている電子顕微鏡アッセイを使用して当業者によって同定され得る。抗インテグリン抗体、タリン、キンドリン、ジチオスレイトールなどの還元剤及び25-ヒドロキシコレステロールなどの脂質を含む、多くのインテグリンアゴニストが当技術分野において良く知られている[8]~[11]。好ましい実施形態では、インテグリンアゴニストは、その細胞外ドメインを通してインテグリンを活性化する。そのようなインテグリンアゴニストとしては、抗インテグリン抗体、ジチオスレイトールなどの還元剤及び25-ヒドロキシコレステロールなどの脂質が挙げられる。対照的に、タリン及びキンドリンは、インテグリンの細胞内ドメインとの相互作用を通してインテグリンを活性化する。

20

【0021】

インテグリンに向けられた抗体は、活性化特性または阻害特性を有する場合がある。用語「インテグリンアゴニスト」は、刺激性効果または活性化効果を有する抗インテグリン抗体のみを包含する。全ての刺激性または活性化特異的抗インテグリンモノクローナル抗体は、解離速度を低下させることによってリガンド結合親和性を高めると思われ、かつ2つのクラスに分類することができる。抗 $\beta 1$ モノクローナル抗体HUTS-4などの第1サブクラスは、リガンド及びカチオン結合によって制御されるエピトープ（リガンド誘導結合部位「LIBS」と知られている）を認識し、その一方で、第2サブクラス（抗 $\beta 1$ モノクローナル抗体、TS2/16を含む）は、リガンドまたはカチオン結合による影響を受けない。

30

【0022】

活性化抗インテグリン抗体の例を以下に示す。

40

【0023】

（表1）刺激性抗インテグリン抗体の概要

インテグリンサブユニット	抗体
$\alpha 2$	J B S 2
$\alpha 4$	H P 1 / 3
$\alpha 5$	S N A K A 5 1
$\alpha 1 1 b$	P T S 2 5 - 2、P M I - 1
αL	M E M - 8 3、N K I - L 1 6
αX	4 9 6 B
$\beta 1$	1 2 G 1 0、8 A 2、T S 2 / 1 6、1 5 / 7、H U T S - 4、8 E 3、N 2 9、9 E G 7
$\beta 2$	m A b 2 4、M E M - 1 4 8、K I M 1 2 7、C B R L F A - 1 / 2、M E M - 4 8、K I M 1 8 5
$\beta 4$	3 E 1
$\beta 3$	A P 3、A P 5、L I B S 6、L I B S 2
$\beta 7$	1 0 F 8、2 B 8、2 G 3

10

20

【0024】

本発明者らは、細胞培養液へのインテグリンアゴニストの添加により、細胞外マトリックスを必要とすることなく上皮幹細胞の増殖を改善できることを実証した。実施例にて、細胞培養液へのヒト化 T S 2 / 1 6 抗インテグリン抗体の添加により、細胞外マトリックスを必要とすることなく上皮幹細胞の増殖が改善されたことを示す。さらに、本発明者らは、インテグリンアゴニストの添加により、M a t r i g e l である細胞外マトリックス（基底膜抽出物）との組み合わせで上皮幹細胞の増殖を改善できることを実証した。したがって、本明細書に記載のインテグリンアゴニストは、上皮幹細胞を培養するのに特に有用である。

30

【0025】

いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、抗インテグリン抗体、タリン、キンンドリン、ジチオスレイトール及びオキシステロール 2 5 - ヒドロキシコレステロールから選択される。

【0026】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望まないが、通常はリガンド結合と連携するインテグリンのコンフォメーション状態を、インテグリンアゴニストが誘導することができるので、インテグリンアゴニストにより、細胞外マトリックスを必要とすることなく上皮幹細胞の増殖を有利に改善できる。インテグリンアゴニストは、インテグリンの高親和性コンフォメーションを誘導し、かつ通常は E C M 成分によって活性化されるシグナル伝達経路を活性化することができる。実施例にて、リガンド及びカチオン結合によって制御される抗インテグリン抗体（例えば H U T S - 4）、及びリガンドまたはカチオン結合による影響を受けない抗インテグリン抗体（例えば T S 2 / 1 6）の両方は、上皮幹細胞を培養するのに特に有用となり得ることを示す。インテグリンアゴニストは、例えば、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 1 1 b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ または $\beta 7$ と相互作用することによって、インテグリンの α または β サブユニットを介して相互作用することができる。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、 β のサブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ または $\beta 7$ と相互作用する。好ましい実施形態では、インテグリンアゴニストは、 $\beta 1$ サブユニットと相互作用する。

40

50

【0027】

インテグリンアゴニストは、抗インテグリン抗体であり得る。疑義を回避するために、本発明の抗インテグリン抗体は、刺激性抗インテグリン抗体である。抗インテグリン抗体の例としては、JBS2、HP1／3、SNAKA51、PTS25-2、PMI-1、MEM-83、NKI-L16、496B、12G10、8A2、TS2／16、15／7、HUTS-4、8E3、N29、9EG7、mAb 24、MEM-148、KIM127、CBRLFA-1／2、MEM-48、KIM185、AP3、AP5、LIBS6、LIBS2、10F8、2B8及び2G3抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、TS2／16、12G10、8A2、15／7、HUTS-4、8E3、N29及び9EG7抗体などの抗インテグリン抗体は、 β 1サブユニットと相互作用する。一実施形態では、抗インテグリン抗体は、 β 1サブユニットと相互作用し、かつMAB1778である（ウェブサイトhttps://www.rndsystems.com/products/human-integrin-beta1-cd29-antibody-4b7r_mab1778にて入手可能、カタログ番号：番号MAB1778）。

10

【0028】

TS2／16、12G10または8A2抗体は、 β Aドメインと相互作用することが知られている。実施例にて、上皮幹細胞を培養するためのTS2／16抗インテグリン抗体の有利な性質を示す。したがって、本発明の抗インテグリン抗体は、好ましくは、 β Aドメインと相互作用することができる。好ましい実施形態では、抗インテグリン抗体は、TS2／16、12G10または8A2である。他の好ましい実施形態では、抗インテグリン抗体は、TS2／16、12G10またはHUTS-4である。さらに好ましい実施形態では、抗インテグリン抗体は、TS2／16（もしくはヒト化TS2／16）またはHUTS-4（もしくはヒト化HUTS-4）である。さらに好ましい実施形態では、抗インテグリン抗体は、TS2／16またはヒト化TS2／16である。さらに好ましい実施形態では、抗インテグリン抗体は、HUTS-4またはヒト化HUTS-4である。既知の活性化抗インテグリン β 1鎖抗体のエピトープの概要を表2に示す。これらのエピトープは2つのグループに分類され、1つ目のものは、予測されるリガンド結合ドメインに位置する非常に短い配列の残基（残基207～218）で構成され、その他のものとしては、インテグリンの膜隣接面茎状領域に位置するシステインに富む繰り返し構造（残基442～629）内の、またはその近傍のエピトープがある。一部の活性化抗インテグリン β 1鎖抗体は、インテグリンが特定のコンフォメーションである場合にのみ効果を発揮し、かつこれらの抗体、例えばHUTS-4、HUTS-7及びHUTS-21〔12〕は、特定の生理学的条件下でのみ曝露されるエピトープに結合すると考えられている〔13〕。

20

30

【0029】

（表2）活性化抗インテグリン抗体の概要、〔13〕及び〔12〕

40

50

活性化抗体	エピトープの位置	コンフォメーション依存性
T S 2 / 1 6	2 0 7 ~ 2 1 8	無
8 A 2	2 0 7 ~ 2 1 8	無
A 1 A 5	2 0 7 ~ 2 1 8	無
A G 8 9	4 2 6 ~ 5 8 7	有
1 5 / 7	3 5 5 ~ 4 2 5	有
H U T S - 4	3 5 5 ~ 4 2 5	有
H U T S - 7	3 5 5 ~ 4 2 5	有
H U T S - 2 1	3 5 5 ~ 4 2 5	有
9 E G 7	4 9 5 ~ 6 0 2	有
Q E . 2 E 5	4 2 6 ~ 5 8 7	判定されず
T A S C (ニワトリ β 1)	3 0 4 ~ 6 0 2	判定されず
J B 1 B	6 7 1 ~ 7 0 3	判定されず
B 3 B 1 1	6 5 7 ~ 6 7 0	判定されず

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

したがって、いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニスト（任意選択で抗インテグリン抗体）は、β 1 サブユニットの残基 2 0 7 ~ 2 1 8 の少なくとも一部と相互作用する。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニスト（任意選択で抗インテグリン抗体）は、β 1 サブユニットの残基 4 4 2 ~ 6 2 9 の少なくとも一部と相互作用する。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニスト（任意選択で抗インテグリン抗体）は、β 1 サブユニットの残基 3 3 5 ~ 4 2 5 の少なくとも一部と相互作用する。いくつかの実施形態では、インテグリンを活性化するそれらの能力は、生理学的条件に依存しないので、インテグリンのコンフォメーションに依存することなく結合するインテグリンアゴニストが好ましい。好ましい実施形態では、インテグリン抗体に対するエピトープは、リガンド誘導結合部位ではない。抗インテグリン抗体は、配列番号 1 の重鎖可変領域（V H）と、配列番号 2 の軽鎖可変領域（V L）とを含む場合がある。

【 0 0 3 1 】

抗インテグリン抗体はまた、ヒト化され得、例えば抗インテグリン抗体は、実施例にて示すようにヒト化 T S 2 / 1 6 抗体である場合がある。ヒト化 T S 2 / 1 6 抗体は、配列番号 3 の重鎖可変領域（V H）と、配列番号 4 の軽鎖可変領域（V L）とを含む場合がある。いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、それぞれ配列番号 5、6 及び 7 の重鎖 C D R の、H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 と、それぞれ配列番号 8、9 及び 1 0 の軽鎖 C D R の、L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 とを含む。

【 0 0 3 2 】

実施例にて、上皮幹細胞の培養に対する、アゴニストの抗 β 1 インテグリン抗体（T S 2 / 1 6）とアゴニストの抗 β 4 抗体（3 E 1）との組み合わせの、有利かつ相乗的な特性を示す。したがって、インテグリンアゴニストは、上皮幹細胞を培養するために組み合わせて使用される場合がある。例えば、複数の抗インテグリン抗体が、上皮幹細胞を培養するために使用され得る。いくつかの実施形態では、2 つの抗インテグリン抗体が、インテグリンの同じサブユニットを標的とし、例えば、2 つ以上の β 1 インテグリンアゴニスト抗体が上皮幹細胞を培養するために使用される。いくつかの実施形態では、2 つ以上の β

1 インテグリンアゴニスト抗体は、TS2／16、12G10、8A2、15／7、HUTS-4、8E3、N29及び9EG7から選択されるか、または好ましくはTS2／16、12G10及び8A2から選択される。いくつかの実施形態では、TS2／16は、HUTS-4と組み合わせて使用される。

【0033】

あるいは、2つの抗インテグリン抗体は、インテグリンの異なるサブユニットを標的とする。抗インテグリン抗体の考えられる組み合わせとしては、(1) β 1インテグリンアゴニスト抗体と β 2インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(2) β 1インテグリンアゴニスト抗体と β 3インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(3) β 1インテグリンアゴニスト抗体と β 4インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(4) β 1インテグリンアゴニスト抗体と β 7インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(5) β 1インテグリンアゴニスト抗体と α 2インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(6) β 1インテグリンアゴニスト抗体と α 4インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(7) β 1インテグリンアゴニスト抗体と α 5インテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(8) β 1インテグリンアゴニスト抗体と α 11bインテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(9) β 1インテグリンアゴニスト抗体と α Lインテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、(10) β 1インテグリンアゴニスト抗体と α Xインテグリンアゴニスト抗体との組み合わせ、が挙げられる。

10

【0034】

好ましい実施形態では、 β 1インテグリンアゴニスト抗体は、上皮幹細胞を培養するために、 β 4インテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。好ましい実施形態では、 β 1インテグリンアゴニスト抗体は、TS2／16、12G10または8A2である。好ましい実施形態では、 β 4インテグリンアゴニスト抗体は、3E1である。さらに好ましい実施形態では、TS2／16と3E1は、上皮幹細胞を培養するために組み合わせて使用される。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、 β 1インテグリンアゴニスト抗体は、 β 4インテグリンアゴニスト抗体、ならびに、 α 2、 α 4、 α 5、 α 11b、 α L、 α X、 β 2、 β 3及び β 7のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。

30

【0036】

いくつかの実施形態では、 β 1インテグリンアゴニスト抗体は、(i) β 4インテグリンアゴニスト抗体、ならびに(ii)それぞれが α 2、 α 4、 α 5、 α 11b、 α L、 α X、 β 2、 β 3及び β 7から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上(例えば3、4、5、6、7、8または9つ)のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0037】

いくつかの実施形態では、 β 2インテグリンアゴニスト抗体は、 α 2、 α 4、 α 5、 α 11b、 α L、 α X、 β 1、 β 3、 β 4及び β 7のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 β 2インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが α 2、 α 4、 α 5、 α 11b、 α L、 α X、 β 1、 β 3、 β 4及び β 7から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上(例えば3、4、5、6、7、8、9または10個)のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

40

【0038】

いくつかの実施形態では、 β 3インテグリンアゴニスト抗体は、 α 2、 α 4、 α 5、 α 11b、 α L、 α X、 β 1、 β 2、 β 4及び β 7のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 β 3インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが α 2、 α 4、 α 5、 α 11b、 α L、 α X、 β 1、 β 2、 β 4及び β 7から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上(例えば3、4、5、6、7、8、9または10個)のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて

50

て使用される。

【0039】

いくつかの実施形態では、 $\beta 4$ インテグリンアゴニスト抗体は、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 及び $\beta 7$ のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 $\beta 4$ インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 及び $\beta 7$ から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上（例えば3、4、5、6、7、8、9または10個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0040】

いくつかの実施形態では、 $\beta 7$ インテグリンアゴニスト抗体は、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 及び $\beta 4$ のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 $\beta 7$ インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 及び $\beta 4$ から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上（例えば3、4、5、6、7、8、9または10個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0041】

いくつかの実施形態では、 $\alpha 2$ インテグリンアゴニスト抗体は、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 $\alpha 2$ インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上（例えば3、4、5、6、7、8、9または10個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0042】

いくつかの実施形態では、 $\alpha 4$ インテグリンアゴニスト抗体は、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 $\alpha 4$ インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上（例えば3、4、5、6、7、8、9または10個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0043】

いくつかの実施形態では、 $\alpha 5$ インテグリンアゴニスト抗体は、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 $\alpha 5$ インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上（例えば3、4、5、6、7、8、9または10個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0044】

いくつかの実施形態では、 $\alpha 11b$ インテグリンアゴニスト抗体は、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ のうち1つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 $\alpha 11b$ インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する2つ以上（例えば3、4、5、6、7、8、9または10個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0045】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、 α L インテグリンアゴニスト抗体は、 α 2、 α 4、 α 5、 α 1 1 b、 α X、 β 1、 β 2、 β 3、 β 4 及び β 7 のうち 1 つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 α L インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが α 2、 α 4、 α 5、 α 1 1 b、 α X、 β 1、 β 2、 β 3、 β 4 及び β 7 から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する 2 つ以上（例えば 3、4、5、6、7、8、9 または 10 個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

【0046】

いくつかの実施形態では、 α X インテグリンアゴニスト抗体は、 α 2、 α 4、 α 5、 α 1 1 b、 α L、 β 1、 β 2、 β 3、 β 4 及び β 7 のうち 1 つに結合するアゴニストの抗インテグリン抗体と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、 α X インテグリンアゴニスト抗体は、それぞれが α 2、 α 4、 α 5、 α 1 1 b、 α L、 β 1、 β 2、 β 3、 β 4 及び β 7 から選択される異なるインテグリンサブユニットに結合する 2 つ以上（例えば 3、4、5、6、7、8、9 または 10 個）のインテグリンアゴニスト抗体と組み合わせて使用される。

10

【0047】

他の好ましい実施形態では、インテグリンアゴニストのその結合は、インテグリンのコンフォメーションに依存する。その他の実施形態では、インテグリン抗体に対するエピトープは、リガンド誘導結合部位である。抗インテグリン抗体は、H U T S - 4 である場合がある。いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、T S 2 / 1 6 抗体と同じエピトープに結合する。したがって、いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、配列番号 3 の重鎖可変領域 (V H) と、配列番号 4 の軽鎖可変領域 (V L) とを含む抗体と同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、H U T S - 4 抗体と同じエピトープに結合する。

20

【0048】

いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、 β 1 サブユニットに結合する場合に T S 2 / 1 6 抗体と競合する。したがって、いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、配列番号 3 の重鎖可変領域 (V H) と、配列番号 4 の軽鎖可変領域 (V L) とを含む抗体と同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、 β 1 サブユニットに結合する場合に H U T S - 4 抗体と競合する。いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、 β 4 サブユニットに結合する場合に 3 E 1 抗体と競合する。

30

【0049】

従来の抗体は、ジスルフィド結合によって結合している 2 つの同一の重鎖と 2 つの同一の軽鎖で構成されている。重鎖と軽鎖のそれぞれは、定常領域及び可変領域で構成されている。可変領域のそれぞれは、主に標的抗原のエピトープに結合する役割を担う 3 つの C D R で構成されている。それらは、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 と呼ばれ、N 末端から順番に番号が付けられ、その C D R 3 領域は、最も可変的な領域であり、かつ通常は接触残基の大部分を標的に提供する。可変領域のうち最も一定に保たれる部分は、「フレームワーク領域」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、抗体部分は、少なくとも 1 つの重鎖及び少なくとも 1 つの軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体部分は、1 つの重鎖と 1 つの軽鎖で構成される。

40

【0050】

用語「抗体」は、最も広い意味で本明細書にて使用され、特に、任意のアイソタイプ、例えば、I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E のモノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、組換えポリクローナル抗体を含むポリクローナル抗体、O l i g o c l o n i c s、多重特異性抗体、キメラ抗体、ナノボディ、ダイアボディ、B i T E、T a n d a b s、ミメトボディ (m i m e t o b o d y)、二重特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、脱免疫化 (d e i m m u n i s e d) 抗体、ならびに抗体断片を包含するが、これに限定されない。さらに、この用語に属するものとして、例えば、A n t i c a l i n、A n k a r i n などの足場も包含される。標的分子の特定のエピトープと反応す

50

る抗体は、ファージベクターもしくは類似のベクターの中の組換え抗体のライブラリの選択などの組換え方法によって、または標的エピトープをコードする標的核酸で動物を免疫することによって生成することができる。

【0051】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、インテグリンサブユニットの第1エピトープへの第1結合特異性、及びインテグリンサブユニットの第2エピトープへの第2結合特異性を含む二重特異性であり、ここで、第1及び第2エピトープは、異なるものであり、かつ重複しない。ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、同じインテグリンサブユニット、例えば $\beta 1$ サブユニット上の異なるエピトープに結合する。その他の実施形態では、二重特異性抗体は、異なるインテグリンサブユニット上のエピトープに結合し、例えば、二重特異性抗体は、 $\beta 1$ インテグリンサブユニットの第1エピトープへの第1結合特異性、及び $\beta 3$ インテグリンサブユニットの第2エピトープへの第2結合特異性を有する。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、本発明による抗体は、シングルドメイン抗体（sdAbまたはナノボディとも呼ばれる）、 $F(ab')_2$ 、 Fab 、 Fab' 、 $Facb$ 、または単鎖 Fv （scFv）断片で構成されるか、またはそれらを含む。scFv断片は、エピトープ結合断片であり、抗体軽鎖可変領域（VL）の少なくとも1つの断片と連結した抗体重鎖可変領域（VH）の少なくとも1つの断片で構成されている。リンカーは、単鎖抗体断片が由来する抗体全体の標的分子結合特異性を維持するように、VL及びVH領域が連結される際にそれらの適切な3次元の折り畳みが起こることを確実にするために選択される短く柔軟なペプチドであってよい。VLまたはVH配列のカルボキシル末端は、リンカーによって相補的なVLまたはVH配列のアミノ酸末端に共有結合的に連結されてよい。

20

【0053】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質の抗体部分は、定常領域またはFc領域を含む。Fc領域は、ヒト、及びその他の動物、例えばウシ、ヤギ、ブタ、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット及びモルモットから単離された天然形態から得られるか、または形質転換された動物細胞もしくは微生物から得られるその組換え体もしくは誘導体であってよい。それらは、ヒトまたは動物生物体から全ての免疫グロブリンを単離して、タンパク質分解酵素でそれら进行处理することによって、天然免疫グロブリンから得ることができる。パ

30

【0054】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、改変される。例えば、本発明の免疫グロブリンFc領域は、天然の糖鎖、天然形態と比べて多い糖鎖もしくは天然形態と比べて少ない糖鎖を有する形態であるか、または脱グリコシル化形態であってよい。免疫グロブリンFc糖鎖の増加、減少または除去は、当技術分野において一般的な方法、例えば、化学的方法、酵素的方法、及び微生物を用いる遺伝子工学的的方法によって実現することができる。Fc領域から糖鎖を除去すると、補体（C1q）への結合親和性が急激に低下し、かつ抗体依存細胞媒介細胞障害作用（ADCC）または補体依存性細胞障害作用（CDC）が低下または消失し、それにより、*in vivo*での不必要な免疫応答は誘発されない。この関連で、脱グリコシル化形態またはアグリコシル化形態の免疫グロブリンFc領域（後者は、例えば、原核生物、好ましくは*E. coli*によって作製される）が、本発明に従って使用されてよい。

40

【0055】

さらに、免疫グロブリンFc領域は、IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMに由来するFc領域であるか、またはそのハイブリッド（単鎖免疫グロブリンFc領域に存在する、異なる起源の2つ以上の免疫グロブリンFc領域をコードする配列）によって作製されてよい。本発明において、様々な種類のハイブリッドが考えられる。すなわち、ドメイ

50

ンハイブリッドは、IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc及びIgD FcのCH1、CH2、CH3及びCH4からなる群から選択される1～4つのドメインで構成され得、かつヒンジ領域を含む場合がある。したがって、いくつかの実施形態では、Fc領域は、ハイブリッドである。好ましくは、Fc領域は、ヒト血液中で最も豊富なタンパク質の1つである、IgGまたはIgMに由来し、最も好ましくは、リガンド結合タンパク質の半減期を延長することが知られているIgGに由来する。さらに、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4サブクラスに分けられ、本発明は、それらの組み合わせまたはそれらのハイブリッドを含む。IgG2及びIgG4サブクラスが好ましい。

【0056】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、IgGのアイソタイプ、例えばIgG1、好ましくはヒトIgGまたはヒトIgG1である。

【0057】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、ADCC及び／または補体エフェクター機能を静止または低減するように改変される。いくつかの実施形態では、Fc領域は、FcRn親和性（半減期を延長することができる）を高めるために改変される。好適な改変については、Monnet, Celine, et al. "Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutagenesis: Impact on Effector Functions." *Frontiers in Immunology* 6:39 (2015)に記載されている。いくつかの実施形態では、抗体は、FcRn受容体に結合するFcドメインまたはその一部分で構成されている。非限定的な例として、好適なFcドメインは、IgA、IgE、IgGまたはIgMなどの免疫グロブリンサブクラスに由来してもよい。いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4に由来する。特に好適なFcドメインとしては、ヒト抗体に由来するものが挙げられる。

【0058】

いくつかの実施形態では、改変されたFc領域は、突然変異：E294Del、T307P、及びN434Yのうち1つ以上、または好ましくは全てを含むIgG変異体である（例えば、Monnet et al., のTable 6, entry "C6A-66"を参照されたい）。これらの特定の突然変異は、ADCC及び補体エフェクター機能を静止し、半減期を延長すると予想される。

【0059】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、マウス、ヒト、ヒト化、霊長類化もしくはキメラ抗体または単鎖抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であってよい。好ましい実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。

【0060】

いくつかの実施形態では、抗体は、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、または 10^{-10} M以下の K_D でインテグリンに結合する。例えば、抗体は、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 11b$ 、 αL 、 αX 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 及び $\beta 7$ などのインテグリンの α または β サブユニットに結合し得る。いくつかの実施形態では、抗体は、インテグリンのサブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ または $\beta 7$ に結合し、また、好ましい実施形態では、抗体は、インテグリンの $\beta 1$ サブユニットに結合する。これに応じて、好ましい実施形態では、抗体は、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、または 10^{-10} M以下の K_D でインテグリンの $\beta 1$ サブユニットに結合する。さらなる実施形態では、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、または 10^{-10} M以下の K_D でインテグリンの $\beta 1$ サブユニットに結合する第1抗体は、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、または 10^{-10} M以下の K_D でインテグリンの $\beta 4$ サブユニットに結合する第2抗体と組み合わせられる。例えば、一実施形態では、 10^{-8} M以下の K_D で

インテグリンの β 1サブユニットに結合する第1抗体は、 10^{-8} M以下の K_D でインテグリンの β 4サブユニットに結合する第2抗体と組み合わせられる。

【0061】

いくつかの実施形態では、抗体結合親和性は、Octet（登録商標）RED96 system（ForteBio, Inc.）を使用して判定される。例えば、FLAGタグ付き β 1サブユニット、FLAGタグ付き β 2サブユニット、FLAGタグ付き β 3サブユニットまたはFLAGタグ付き β 7サブユニットが、Anti-FLAGバイオセンサーに固定され、溶液中の様々な濃度の抗体とインキュベートされ、それにより結合データが収集され得る。いくつかの実施形態では、抗体結合親和性は、表面プラズモン共鳴によって判定される。

10

【0062】

いくつかの実施形態では、試験抗体がインテグリンに結合する場合に対照抗体と競合するかどうかは、in vitro結合競合アッセイを使用して判定される。例えば、FLAGタグ付き β 1サブユニット、FLAGタグ付き β 2サブユニット、FLAGタグ付き β 3サブユニットまたはFLAGタグ付き β 7サブユニットがAnti-FLAGバイオセンサーに固定され、次に、固定されたFLAGタグ付き β 1、 β 2、 β 3または β 7サブユニットへの対照抗体の会合が（例えば、Octet（登録商標）RED96 system、ForteBio, Inc.）を使用して）測定され、続いて、対照抗体の存在下で固定されたFLAGタグ付き β 1、 β 2、 β 3または β 7サブユニットを試験抗体に曝露することによって追加の結合の程度が評価される。

20

【0063】

いくつかの実施形態では、抗インテグリン抗体は、重鎖のみの抗体である。用語「抗体」は、四量体抗体全体及びその抗原結合断片を包含する。いくつかの実施形態では、その抗原結合断片は、VHドメイン、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、単鎖Fv（scFv）及びジスルフィド結合Fv（sdFv）から選択される。

【0064】

抗体の抗原結合断片は、典型的には少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成のものであり得、一般に、1つ以上のフレームワーク配列に隣接するかまたはその中にある少なくとも1つのCDRを含む。VLドメインと会合するVHドメインを有する抗原結合断片では、VHドメインとVLドメインは、互いに対して任意の好適な配置で位置している場合がある。例えば、可変領域は、二量体であり得、またVH-VH、VH-VLまたはVL-VL二量体で構成されている。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体のVHまたはVLドメインで構成されている場合がある。

30

【0065】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合的に連結している少なくとも1つの可変ドメインで構成されている場合がある。本発明の抗体の抗原結合断片内で見出される場合がある可変ドメイン及び定常ドメインの非限定的で例示的な構成としては、(i) VH-CH1、(ii) VH-CH2、(iii) VH-CH3、(iv) VH-CH1-CH2、(v) VH-CH1-CH2-CH3、(vi) VH-CH2-CH3、(vii) VH-CL、(viii) VL-CH1、(ix) VL-CH2、(x) VL-CH3、(xi) VL-CH1-CH2、(xii) VL-CH1-CH2-CH3、(xiii) VL-CH2-CH3、及び(xiv) VL-CLが挙げられる。

40

【0066】

上記の例示的な構成のいずれかを含む、可変ドメイン及び定常ドメインの任意の構成では、可変ドメイン及び定常ドメインは、互いに直接連結しているか、または完全もしくは部分的なヒンジもしくはリンカー領域によって連結している場合がある。ヒンジまたはリンカー領域は、少なくとも2つ（例えば、5、10、15、20、40、60個以上）のアミノ酸で構成されてよく、これにより、単一のポリペプチド分子内の隣接する可変ドメイ

50

ン及び／または定常ドメイン間の柔軟なもしくは半柔軟な連結がもたらされる。さらに、本発明の抗体の抗原結合断片は、互いに非共有結合的に会合している、及び／または1つ以上の単量体VHもしくはVLドメインと非共有結合的に会合している（例えばジスルフィド結合（複数可）によって）上記の変動ドメイン及び定常ドメイン構成のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体（または他の多量体）を含んでもよい。

【0067】

完全な抗体分子と同様に、抗原結合断片は、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）であってよい。抗体の多重特異性抗原結合断片は、典型的には少なくとも2つの異なる変動ドメインを含み、ここで、各変動ドメインは、別個の抗原または同じ抗原上の異なるエпитープに特異的に結合する能力がある。本明細書にて開示する例示的な二重特異性抗体形式を含むいずれの多重特異性抗体形式も、当技術分野において利用可能な日常的な技術を使用して、本発明の抗体の抗原結合断片に関連して使用されるように適応させることができる。

10

【0068】

HCV R及びLCV Rアミノ酸配列の中からCDRを同定する方法及び技術は、当技術分野において良く知られており、本明細書にて開示する特定のHCV R及び／またはLCV Rアミノ酸配列の中からCDRを同定するために使用することができる。CDRの境界を識別するために使用されることがある例示的な規則としては、例えば、Kabatt定義、Chothia定義、及びAbM定義が挙げられる。一般に、Kabatt定義は、配列可変性に基づき、Chothia定義は、構造的ループ領域の位置に基づき、かつAbM定義は、Kabatt手法とChothia手法の間をとったものである。例えば、Kabatt, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); 及びMartin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989)を参照されたい。抗体内のCDR配列を同定するために公開データベースも利用可能である。

20

【0069】

その他の実施形態では、インテグリンアゴニストは、抗体ではない。例えば、インテグリンアゴニストは、タリンであるか、またはインテグリンアゴニストは、キンドリンである場合がある。インテグリンアゴニストは、キンドリンと組み合わせて使用されるタリンである場合がある。別の例では、インテグリンアゴニストは、ジチオスレイトールなどの還元剤、またはオキシステロール25-ヒドロキシコレステロールなどの脂質である場合がある。いくつかの実施形態では、本明細書にて説明するインテグリンアゴニストの任意の組み合わせを含む、2つ以上のインテグリンアゴニストが使用される。

30

【0070】

いくつかの実施形態において、インテグリンアゴニストは、実施例のヒト化TS2/16抗体（例えば、実施例4で提示される方法で試験されるような）を用いて実施される同じ方法と比較して、特許請求される培養法で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または100%の細胞増殖をもたらす。いくつかの実施形態において、インテグリンアゴニストは、実施例のマウスHUTS-4抗体（例えば、実施例6で提示される方法で試験されるような）を用いて実施される同じ方法と比較して、特許請求される培養法で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または100%の細胞増殖をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、インテグリンアゴニストなしで実施される同じ方法と比較して、4日間にわたって少なくとも10%、20%、50%の上皮幹細胞増殖の増加をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、インテグリンアゴニストなしで実施される同じ方法と比較して、4日間にわたって少なくとも2倍、3倍、4倍または5倍の上皮幹細胞増殖の増加をもたらす。上皮幹細胞増殖は、オルガノイドの数として定義され得、かつ実施例3、4または5の方法に従って試験され得る。

40

50

【0071】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、新しいオルガノイドの増殖をもたらす。

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、既存のオルガノイドの増殖をもたらす。

【0072】

インテグリンアゴニストは、培養液の一部として、細胞外マトリックスもしくは人工マトリックスの成分として、または培養容器に添加される別個の成分として、上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドと接触させることができる。

【0073】

細胞外マトリックス及び人工マトリックス

上皮幹細胞は、通常、細胞増殖を支援することで知られている外因的な細胞外マトリックスを伴う培養で増殖する（例えば、基底膜抽出物（BME；Amsbio）またはMatrigel（BD Biosciences）での細胞のプレーティング方法を記載している[20]を参照されたい）。基底膜抽出物（Amsbio）及びMatrigel（商標）（BD Biosciences）は、Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）マウス肉腫細胞からの基底膜調製物から誘導される市販の細胞外マトリックスの例である。しかし、これらの細胞外マトリックスの正確な成分は明確に定義されていないため、上皮幹細胞を培養する際に望ましくないばらつきの要因となる可能性がある[14]。

【0074】

細胞外マトリックスの成分部分及びそれらが作用するメカニズムは、完全には確証されていない。ポリマー及びヒドロゲルなどの細胞外マトリックスの人工代替物は、上皮幹細胞培養において細胞外マトリックスによって実現される増殖効率をこれまでに忠実に再現できていない。細胞外マトリックスの代わりにラミニン及びフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質を使用しても、上皮幹細胞培養において細胞外マトリックスで実現される増殖効率の再現も実現できていない。

【0075】

予想外に、各実施例は、インテグリンアゴニストを含む培養液により、細胞外マトリックスの存在下及び不存在下の両方で培養液中の上皮幹細胞の増殖を改善できることを示している。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望まないが、機能的な細胞外マトリックスは、構造的及びシグナル伝達成分を含む。人工マトリックス単独では、構造的成分しか提供しないと考えられている。したがって、欠落し、長い間求められていたシグナル伝達成分として、インテグリンアゴニストが機能し、かつ追加の構造支持体も提供する可能性があることを提起する。

【0076】

実施例にて、インテグリンアゴニストを含む培養液により、驚くべきことに、外因的な細胞外マトリックスなしの培養で上皮幹細胞増殖を改善できることを示す。したがって、いくつかの実施形態では、培養法は、細胞を外因的な細胞外マトリックスと接触させることを含まない。例えば、培養法は、細胞を、糖タンパク質を含む外因的な細胞外マトリックスと接触させることを含まず、例えば、培養法は、細胞を基底膜抽出物またはMatrigelと接触させることを含まない。

【0077】

インテグリンアゴニストは、人工マトリックスを伴う使用に対して特に有用である。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の培養法は、人工マトリックスと接触させて上皮幹細胞を培養することを含む場合がある。人工マトリックスの成分は制御することができ、それにより、上皮幹細胞を培養する際に起こり得るばらつきを低減し、培養中の上皮幹細胞の増殖率、増殖、及び／または分化の改善を助力することができる。人工マトリックスは、任意のポリマー、例えばポリエステル、ポリエチレングリコールまたはヒドロゲルを含み得る。いくつかの実施形態では、人工マトリックスは、ポリエチレングリコール及び／またはヒドロゲルを含む。いくつかの実施形態では、人工マトリックスは、架橋ポリエチレングリコール（PEG）ヒドロゲルを含む。

10

20

30

40

50

【0078】

人工マトリックスは、表面上の、ビーズ上の、または（例えば、培養プレート、培養容器またはビーズの）コーティングとしてなど、任意の好適な形態で提供され得る。ビーズは、好ましくはマイクロビーズである。実施例では、超低接着表面（Sigma Aldrich）が使用されている。この表面は、親水性であり、かつ電荷的に中性である、共有結合したヒドロゲル層である。したがって、いくつかの実施形態では、人工マトリックスは、ヒドロゲル層である。

【0079】

いくつかの実施形態では、人工マトリックスは、生体材料、好ましくは細胞外マトリックス成分を含む。例えば、生体材料は、1つ以上の糖タンパク質（任意選択でコラーゲン、ラミニン、パールカン、フィブロネクチン、またはフィブロネクチンのRGD接着リガンドから選択される）、及び／または1つ以上の炭水化物（任意選択でヒアルロン酸）を含んでもよい。使用可能な人工マトリックスの一例は、Pronectin（例えば、Sigma Z378666）である。Pronectinは、繰り返し構造のペプチドユニット間を占めるヒトフィブロネクチンのRGD接着リガンドの複数のコピーを組み込んだ非動物ソースポリマーを含む。それは、ビーズにPronectin-Fをコーティングした形態で提供され得る。コアビーズは、直径125～212マイクロメートルのサイズの固体共重合体である。したがって、いくつかの実施形態では、人工マトリックスは、フィブロネクチンのRGD接着リガンドを含む。いくつかの実施形態では、PEGゲルは、フィブロネクチン、ラミニン-111、コラーゲンIV、ヒアルロン酸及びパールカンなどの細胞外マトリックス成分で濃縮される場合がある。いくつかの実施形態では、PEGゲル内のフィブロネクチンタンパク質は、RGD（Arg-Gly-Asp）ペプチドと置き換えることができる[15]。

【0080】

人工マトリックスの別の例は、[16]に記載されているような4アーム型のマレイミド末端ポリ（エチレングリコール）マクロマーをベースにした人工ヒドロゲルである。マクロマーを接着ペプチドで機能化し、かつ細胞の存在下で架橋することで、PEG-4MALヒドロゲルが生成される。ヒドロゲルポリマー濃度は、3.5～6.0%重量／体積であり得、好ましくはヒドロゲルポリマー濃度は4%である。ヒドロゲルポリマーは、RGD接着ペプチドまたはGPQ-W架橋ペプチドを含むように調製され得る。

【0081】

ヒドロゲルポリマーは、タンパク質A／Gで調製され得る。タンパク質A／Gは、タンパク質Aとタンパク質Gの両方のIgG結合ドメインを組み合わせた組換え融合タンパク質である。タンパク質A／Gは、リンカーによってヒドロゲルに連結され、抗体を接着できるフレームワークを提供する。次いで、ヒドロゲルに抗インテグリン抗体を十分にしみ込ませることで、抗体を多価的に存在させることができる。この人工ECMの調製物は、ECMの構造的成分とシグナル伝達成分との両方が一緒に提供されるため、細胞内で見られる天然のECM環境を再現することを助力する。ヒドロゲルのゲルは、デキストランポリマーまたはベンゼン-1,3,5-トリカルボキサミドポリマーから作製することができる。好ましい実施形態では、ヒドロゲルは、そのN末端に抗体結合ユニット（Z33ペプチド）を有するエラスチン類似タンパク質（ELP）で作製される。

【0082】

また、実施例にて、インテグリンアゴニストは、外因的な細胞外マトリックスが存在する場合であっても培養中の上皮幹細胞の増殖率の増加をもたらすことを示す。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、細胞外マトリックス（ECM）と接触させて上皮幹細胞を培養することを含む場合がある。ECMは、上皮細胞、内皮細胞、頭頂内胚葉様細胞（例えば、Hayashi et al. (2004) Matrix Biology 23: 4762に記載されているEngelbreth Holm Swarm頭頂内胚葉様細胞）、及び結合組織細胞によって分泌される。それは、ECM分泌細胞を培養し、ECMを単離することによって調製することができる。あるいは、例えばMa

10

20

30

40

50

trigelまたはBMEなど、市販のものが入手可能である。ECMは、種々の多糖類、水、エラスチン及び糖タンパク質で構成され、ここで、この糖タンパク質は、コラーゲン、エンタクチン（ニドゲン）、フィブロネクチン、及びラミニンを含む。本明細書にて言及されるECMは、ECM分泌細胞によって自然に産生される。いくつかの実施形態では、ECMは、Engelbreth Holm Swarm頭頂内胚葉様細胞に由来する基底膜調製物（Hayashi et al. (2004) Matrix Biology 23: 4762に記載されているような）である。

【0083】

本発明の文脈において使用される場合、ECMは、外因的なECMである（これは、本発明の培養液と接触する際に、上皮幹細胞によって自然に分泌される任意の細胞外マトリックスタンパク質だけではなく、言い換えれば、本発明の方法で培養されることになる上皮幹細胞以外の細胞によって産生されるものを意味する）。

10

【0084】

いくつかの実施形態では、ECMは、3次元マトリックスである。いくつかの実施形態では、細胞は、ECMに包埋される。いくつかの実施形態では、細胞は、ECMに接着される。本発明の培養液は、3次元ECMに拡散され得る。その他の実施形態では、ECMは、懸濁液に含まれ、すなわち、細胞は、懸濁液システム内でECMと接触している。いくつかの実施形態では、ECMは、少なくとも1%、少なくとも2%または少なくとも3%の濃度で懸濁液に含まれる。いくつかの実施形態では、ECMは、1%から約10%、または1%から約5%の濃度で懸濁液に含まれる。懸濁法は、改良される方法にとって有利である可能性がある。

20

【0085】

いくつかの実施形態では、本発明の培養法は、細胞外マトリックス及び／または人工マトリックスと接触させて上皮幹細胞を培養することを含む。「接触している」とは、物理的または機械的または化学的接触を意味し、これは、上記の結果として生じるオルガノイドまたは上皮細胞の集団を、上記マトリックスから分離する場合に、力が必要となることを意味する。培養液及び／または細胞は、細胞外マトリックスまたは人工マトリックスに置かれるか、それらに包埋されるか、またはそれらと混合され得る。

【0086】

いくつかの実施形態では、培養液は、細胞外マトリックスまたは人工マトリックスの上部に置かれる。次に、培養液は、必要に応じて、除去及び補充される場合がある。いくつかの実施形態では、培養液は、1、2、3、4、5、6または7日ごとに補充される。成分が、培地に「添加」されるか、または培地から「除去」される場合、これは、いくつかの実施形態では、培地自体が、細胞外マトリックスまたは人工マトリックスから除去され、かつ「添加」された成分を含有するか、または「除去」される成分を含まない新しい培地が、細胞外マトリックスまたは人工マトリックスに置かれることを意味する場合がある。

30

【0087】

3次元マトリックスは、3次元上皮オルガノイドの培養を支援する。したがって、いくつかの実施形態では、細胞外マトリックスまたは人工マトリックスは、3次元マトリックスである。

40

【0088】

細胞外マトリックスまたは人工マトリックスは、前述したようなインテグリンアゴニストをさらに含む場合がある。

【0089】

上皮幹細胞またはオルガノイドの培養

上皮幹細胞が増殖及び／または分化してオルガノイドを産生するときに、それらは、典型的には当技術分野において知られている方法に従って定期的に継代される（すなわち、分割される）。継代は、効率的な増殖または新しいオルガノイドを可能にするために、典型的にはオルガノイドを機械的に解離し、任意選択でそれらを細胞外マトリックスまたは人工マトリックスから除去し、収集し、洗浄し、かつ好適な比率（例えば1:5～1:20

50

）でプレーティングすることを伴う。培養液はまた、典型的には、必要に応じて定期的に補充される。

【0090】

したがって、いくつかの実施形態では、方法は、週に2回、週に1回、10日に1回、2週に1回、5～20日に1回、好ましくは、7～14日に1回、細胞を継代することをさらに含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、方法は、1：5～1：20の間の比率で細胞をプレーティングすることをさらに含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、方法は、1～3日ごと、1～2日ごと、2日ごと、または毎日、培養液を補充することをさらに含む。好ましい実施形態では、方法は、1～3日ごと、1～2日ごと、培養液を補充することをさらに含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも5継代、例えば、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60継代、または、6～40継代、例えば、約8～35継代、10～30継代、もしくは12～25継代にわたって、上皮幹細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、8～50、10～50、15～50、20～50または20～40継代にわたって、上皮幹細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、より好ましくは、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも30ヵ月以上、例えば3年以上、上皮幹細胞を培養することを含む。

【0094】

上皮幹細胞及び培養向けのそれらの調製物

上皮幹細胞は、単一の細胞、または上皮幹細胞の集団の一部であり得る。上皮幹細胞は、オルガノイド及び／または上皮組織外植片に含まれ得る。ある特定の実施形態では、上皮幹細胞は、哺乳類上皮幹細胞であり、任意選択で、ヒトまたはマウス上皮幹細胞である。好ましい実施形態では、上皮幹細胞は、ヒト上皮幹細胞である。いくつかの実施形態では、上皮幹細胞は、Lgr5発現を特徴とする。

【0095】

上皮幹細胞は、成人組織から採取される。すなわち、上皮幹細胞は、成人上皮幹細胞である。この文脈において、「成人」は、成熟した組織を意味し、すなわち、新生児または小児を含むが、胚または胎児は含まれない。あるいは、上皮幹細胞は、例えば*in vitro*で分化された胚幹細胞または胚幹細胞株に由来するものではない。

【0096】

上皮幹細胞は、結腸直腸、小腸、胃、膵臓、肝臓、肺、乳房、前立腺、腎臓、口、鼻咽頭、咽喉、下咽頭、喉頭、気管、皮膚、卵管、卵巣、唾液腺、食道、毛嚢及び／または蝸牛組織に由来する場合がある。いくつかの実施形態では、上皮幹細胞は、結腸直腸細胞である。種々の組織から上皮幹細胞を培養するための方法は、以前に解説されている（例えば、WO2009/022907、WO2010/090513、WO2012/014076、WO2012/168930、WO2015/173425、WO2016/083613及びWO2016/083612、ならびに、Clevvers, Cell 165(7) 1586-1597, (2016)）。

【0097】

組織から直接採取された細胞、すなわち新たに単離された細胞は、初代細胞とも称される

。いくつかの実施形態では、上皮幹細胞は、初代上皮幹細胞である。

【0098】

初代細胞培養物を継代して二次細胞培養物を形成することができる。がん細胞を除いて、従来の二次細胞培養物は、寿命に限りがある。一定数の集団倍加（例えば、50～100世代）の後、細胞は、老化の過程を経て分裂を停止する。二次培養物からの細胞は、連続性細胞株となるように不死化される場合がある。不死化は、自然に発生する場合があるか、またはウイルスで、もしくは化学的に誘導される場合がある。不死化細胞株は、形質転換細胞としても知られている。対照的に、本発明の方法は、不死化または形質転換をすることなく、オルガノイド増殖を通して上皮幹細胞の連続継代を可能にする。したがって、いくつかの実施形態では、上皮幹細胞は、不死化細胞または形質転換細胞ではなく、すなわち不死化細胞株または形質転換細胞株に由来するものではない。本発明の利点は、複数回の増殖及び継代を経る上皮幹細胞が、初代細胞の特性を保持し、かつ遺伝型変化または表現型変化がほとんどまたは全くないことである。したがって、本発明の方法における上皮幹細胞（複数可）の出発集団は、既存のオルガノイドから採取されるか、またはそれから誘導され得、かつ新しい細胞及びオルガノイドを生成するために、さらに培養及び増殖され得る。したがって、いくつかの実施形態では、上皮幹細胞の集団の上皮幹細胞は、オルガノイドの一部もしくはオルガノイドから単離されたものであるか、または、上皮幹細胞の集団は、オルガノイド、オルガノイドの一部もしくはオルガノイドから単離されたものである。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、上皮幹細胞は、正常細胞である。代替実施形態では、上皮幹細胞は、がん幹細胞である。したがって、細胞は、必要に応じて、腫瘍から採取される場合がある。

20

【0100】

いくつかの実施形態では、方法は、上皮を含む組織の断片を培養することを含む。いくつかの実施形態では、上皮幹細胞は、組織断片から単離される。

【0101】

オルガノイドは、好ましくは、成人組織からの上皮細胞、任意選択でLgr5を発現する成人組織からの上皮幹細胞を使用して採取される。

【0102】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、任意選択でLgr5を発現する単一の細胞に由来する。有利には、これにより、細胞の均質な集団を形成することができる。上皮幹細胞を含む単一の細胞の懸濁液は、機械的に生成することができる。いくつかの実施形態では、上皮幹細胞を含む単一の細胞の懸濁液は、機械的処理及び／または酵素消化を使用して生成される。機械的処理としては、解剖、顕微解剖及び濾過が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0103】

いくつかの実施形態では、出発培養物は、細胞の凝集塊または集団であり、例えば、結腸直腸断片に含まれている細胞の集団である。したがって、本発明の方法は、出発点として単一の細胞を使用することに限定されない。

40

【0104】

上皮幹細胞は、当技術分野において知られている任意の好適な単離方法にて採取することができる。いくつかの実施形態では、上皮層は、組織試料、例えば外科試験片または生検材料から組織顕微解剖され、酵素によって消化され、濾過されて、得られた細胞懸濁液がプレーティングされる。いくつかの実施形態では、顕微解剖とは、例えば脂肪及び筋肉などの他の組織型を除去することである。いくつかの実施形態では、酵素は、トリプシン、コラゲナーゼまたはアキュターゼである。いくつかの実施形態では、酵素は、トリプシンであり、任意選択で0.125%のトリプシンである。いくつかの実施形態では、試料は、37℃でインキュベートされ、次いで任意選択で、試料は、例えばピペットを用いて、2、5、10または15分ごとなど繰り返される時間間隔で分解される。いくつかの実施

50

形態では、試料は、0.125%トリプシンで、37℃でインキュベートされ、かつ試料は、ピペットを使用して約10分ごとに剪断される。いくつかの実施形態では、酵素消化は、約10分、約20分、約30分、約40分、約50分、または約60分間実施される。いくつかの実施形態では、酵素消化は、適切な媒体で希釈することによって終了される。いくつかの実施形態では、濾過ステップは、100μmフィルタを使用して実施される。いくつかの実施形態では、機械的処理または酵素消化から得られる細胞懸濁液は、ECM及び培養液と接触させられる。

【0105】

培養向けの上皮幹細胞を採取するための一方法は、上皮幹細胞がその表面でLgr5及び／またはLgr6を発現し、これらのタンパク質が、大きなGタンパク質-共役受容体（GPCR）スーパーファミリーに属する、という事実に基づく（例えば、その内容の全体が本明細書に援用されるWO2009/022907を参照されたい）。Lgrサブファミリーは、リガンド結合に重要な大きなロイシンに富む外部ドメインを持つという点で独特である。したがって、好ましい方法は、前述したように上記上皮組織から細胞懸濁液を調製することと、上記細胞懸濁液をLgr5及び／または6結合化合物（例えば抗体、例えばWO2009/022907に記載されているような抗Lgr5モノクローナル抗体）と接触させることと、Lgr5及び／または6結合化合物を単離することと、上記結合化合物から幹細胞を単離することと、を含む。

【0106】

培養後、方法は、1つ以上の上皮幹細胞またはオルガノイドを採取すること及び／または単離することをさらに含む。例えば、それは、幹細胞の培養後、その後のアプリケーションで使用するために、培養液中で培養された1つ以上の幹細胞及び／または1つ以上のオルガノイドを培養液から除去するのに有用である可能性がある。例えば、それは、その後の分化向けに単一の細胞を単離するのに有用である可能性がある。

【0107】

本発明の方法で採取及び／または単離されるオルガノイドは、出発上皮幹細胞の特性を再現し得る。例えば、培養液中で培養した細胞は、同じ遺伝子型及び表現型を保持し、かつ幹様の特性を有する細胞（例えば、Lgr5発現を特徴とする細胞）を含む。これは、患部組織から（例えばがん性組織から）採取された細胞は、問題の疾患を忠実にモデル化することを意味する。あるいは、分化培地で培養された細胞は、（出発細胞と比べて）より成熟し、分化した細胞型を含むオルガノイドをもたらす可能性がある。

【0108】

上皮幹細胞以外の細胞

本発明の方法は、上皮幹細胞及び上皮オルガノイドだけではなく、全ての細胞型に有利である可能性がある。特に、インテグリンアゴニストは、多くの細胞型の細胞培養を改善する可能性がある。例えば、インテグリンアゴニストは、他の幹細胞、特に、胚幹細胞または誘導多能性幹細胞を含む細胞外マトリックス（MatrigelまたはBMEなど）との培養から利益が得られることが示されている他の幹細胞に有利である可能性がある（例えば、Clevvers, Cell 165 (7) 1586-1597, (2016)を参照されたい）。胚幹細胞及び誘導多能性幹細胞の培養は、多くの場合、幹細胞のより成熟した細胞型への分化を伴う。したがって、インテグリンアゴニストを用いる胚幹細胞及び誘導多能性幹細胞の培養は、分化法に関連して特に有用である可能性がある。インテグリンアゴニストはまた、造血幹細胞培養において特に有用である可能性がある（造血幹細胞は、何十年にもわたって、多くの病院で日常的に使用されてきたが、培養中にこれらの細胞を実用的に増殖させることは未だ実現していない）。インテグリンアゴニストの添加により、造血幹細胞培養を改善することが予想される。

【0109】

したがって、本開示は上皮幹細胞に関する実施形態について説明するが、この実施形態はまた、（一般的な）幹細胞、または胚幹細胞もしくは誘導多能性幹細胞に関して開示される。本開示は上皮幹細胞に関する実施形態について説明するが、同じ実施形態はまた、造

10

20

30

40

50

血幹細胞に関しても開示される。

【0110】

共培養

方法は、非上皮細胞型、任意選択で免疫細胞との共培養をさらに含む場合がある。方法は、本明細書に記載のオルガノイドを *in vitro* 培養で免疫細胞と混合するステップを含む。好ましい実施形態では、オルガノイド共培養物は、本明細書に記載されるような共培養液中に維持される。

【0111】

いくつかの実施形態では、オルガノイド免疫細胞共培養物を調製する方法は、オルガノイド培養液中で上皮細胞を培養することによって少なくとも1つのオルガノイドを調製することと、免疫細胞増殖培地中で免疫細胞を培養することと、のステップのうち1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、方法は、不純な免疫試料から免疫細胞を採取するステップをさらに含む。不純な免疫試料から免疫細胞を単離する方法は、当技術分野において知られている。

10

【0112】

本発明はまた、上記方法によって得られるオルガノイド免疫細胞共培養物も提供する。本発明はまた、薬物スクリーニング、毒性学スクリーニング、研究及び薬物開発における上記オルガノイド免疫細胞共培養物の使用も提供する。

【0113】

培養液

上皮幹細胞に適した培養液は、当技術分野において良く知られており、例えば、WO 2009/022907、WO 2010/090513、WO 2012/014076、WO 2012/168930、WO 2015/173425、WO 2016/083613、WO 2016/083612 及び WO 2017/149025 に記載されている。これらの文書にて説明されている培養液は、参照により本明細書に援用され、かつそれらのいずれかは、本発明の文脈において使用される場合がある。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、上皮幹細胞を培養するのに適した培養液は、Wnt アゴニスト、BMP 阻害剤、分裂促進成長因子及び TGF β 阻害剤のうち1つ以上を含む場合がある。例えば、上皮幹細胞に適した培養液は、Wnt アゴニストを含む。上皮幹細胞に適した培養液は、分裂促進成長因子及び／または BMP 阻害剤をさらに含む場合がある。

30

【0115】

好ましい実施形態では、上皮幹細胞に適した培養液は、Wnt アゴニスト、BMP 阻害剤、分裂促進成長因子及び TGF β 阻害剤を含む。上皮幹細胞に適した培養液は、p38 阻害剤、cAMP アゴニスト、プロスタグランジン経路活性化剤、ニコチンアミド、ガストリン、B27 及び N-アセチルシステインのうち1つ以上をさらに含む場合がある。

【0116】

いくつかの実施形態では、培養液は、ヒトまたは動物細胞の基礎培地（例えば、任意選択で B27 を含む DMEM/F12）、R-スポンジンファミリータンパク質、分裂促進成長因子（例えば、EGF）、BMP 阻害剤（例えば、ノギン）、TGF β 阻害剤（例えば、A83-01）、p38 阻害剤（例えば、SB202190）、ならびに任意選択でニコチンアミド及び N-アセチルシステインを含む。

40

【0117】

いくつかの実施形態では、培養液は、B27、ニコチンアミド、N-アセチルシステイン、ノギン、R-スポンジン1、EGF、WNT 馴化培地（50%、安定にトランスフェクトされた L 細胞を使用して生成される）、TGF β I 型受容体阻害剤 A83-01 及び P38 阻害剤 SB202190 を含む高度 DMEM/F12 培地を含む。

【0118】

いくつかの実施形態では、上皮幹細胞に適した培養液は、上皮幹細胞を増殖するのに適した培養液である。当業者は、上述の培養液が、上皮幹細胞を増殖するのに特に有用である

50

ことを理解されるであろう。

【0119】

その他の実施形態では、上皮幹細胞に適した培養液は、上皮幹細胞を分化するのに適した培養液である。

【0120】

本発明は、本明細書で定義するような上皮幹細胞を培養するのに適した培養液を提供するが、ここで、この培養液は、本明細書で定義するようなインテグリンアゴニストをさらに含む。

【0121】

WNTアゴニスト

上皮幹細胞を培養するのに適した培養液は、1つ以上のWntアゴニストを含む場合がある。Wntアゴニストは、本明細書では、細胞におけるTCF/LEF媒介転写を活性化するかまたは強める薬剤として定義される。

【0122】

正規のWntシグナル伝達経路は、Frizzled (FZD) 受容体及びLRPを含む細胞表面Wnt受容体複合体が、通常、細胞外シグナル伝達分子、例えば、分泌性糖タンパク質のWntファミリーのメンバーによって活性化されるときに起こる一連の事象によって定義される。これにより、細胞内 β -カテニンを分解するアキシン、GSK-3、及びタンパク質APCを含むタンパク質の複合体を阻害するDishevelledファミリータンパク質の活性化をもたらす。得られた濃縮された核 β -カテニンは、TCF/LEFファミリー転写因子による転写を促進する (Driehuis & Clevers, British Journal of Pharmacology (2017) 174 4547-4563)。

【0123】

さらに、R-スポンジン/Rnf43/Lgrモジュールは、正規のWntシグナル伝達を制御する。R-スポンジンの不存在下では、E3リガーゼRNF43/ZNRF3がFZDにユビキチンを付加し、プロテアソームによる分解を標識し、かつWntシグナル伝達を阻害する。細胞外R-スポンジンが存在する場合、Lgr受容体を介して膜貫通E3リガーゼRNF43/ZNRF3と相互作用して、E3リガーゼの作用を妨げる場合がある。Lgr4、Lgr5及びLgr6を含むが、特にLgr5を含むLgr受容体は、上皮幹細胞に発現する。R-スポンジンが、これらの幹細胞マーカーによって動員されて、Wntシグナル伝達が促進され、したがって、R-スポンジンとLgrが相互作用して、増殖を促進させ、かつ幹細胞の多能性を維持する。これらの理由により、R-スポンジンファミリータンパク質は、長寿命のオルガノイド培養物を得るための上皮幹細胞培養において特に有用であることが明らかになっている。

【0124】

したがって、培養液中の1つ以上のWntアゴニストは、分泌性糖タンパク質のWntファミリーからのWntリガンド、細胞内 β -カテニン分解の阻害剤、GSK-3阻害剤、TCF/LEF活性化剤、RNF43またはZNRF3阻害剤、及びR-スポンジンファミリータンパク質から選択され得る。いくつかの実施形態では、培養液中のWntアゴニストは、R-スポンジンファミリータンパク質及びGSK-3阻害剤を含み、さらに任意選択で、分泌性糖タンパク質のWntファミリーからのWntリガンドを含む。

【0125】

R-スポンジンファミリータンパク質 (本明細書においては、「R-スポンジン」とも称される) は、R-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、R-スポンジン4、ならびに、それらの類似体、断片、変異体及び誘導体から選択され得る。これに関連して、上記の断片、変異体または誘導体は、Wnt受容体複合体に対するE3リガーゼRNF43/ZNRF3の作用を妨げる能力がある。R-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3及びR-スポンジン4 (本明細書においては、「R-スポンジン1~4」とも称される) の全ては、2つのアミノ末端フーリン様繰り返し構造を特徴とし、そ

10

20

30

40

50

れらは、Wntシグナル促進に必要十分であり、またトロンスポンジドメインは、よりカルボキシル末端要素の方に位置している(Lau et al. Genome Biol. 2012; 13(3): 242 (2012))。本発明で使用するために適したR-スポンジン断片、変異体、及び誘導体の例は、当業者に知られている(例えば、Wntシグナル伝達を促進する能力があるフリードメイン断片について記載している、参照により本明細書に援用されるWO2012/140274の実施例2を参照されたい)。R-スポンジンファミリータンパク質類似体の例としては、例えば、RNF43/ZNRF3/Lgr4と相互作用する抗体が挙げられる。Wntシグナル伝達を促進することができるアゴニスト抗Lgr5抗体は、当技術分野において知られている(例えば、WO2012/140274の実施例3に記載されている抗体1D9を参照されたい)。

10

【0126】

多くのGSK-3阻害剤が、当技術分野において知られており(例えば、Greengard, P., and Meijer, L. (2004) Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. J Med Chem 47:935-946; 及びThomas Kramer, Boris Schmidt, and Fabio Lo Monte, "Small-Molecule Inhibitors of GSK-3: Structural Insights and Their Application to Alzheimer's Disease Models," International Journal of Alzheimer's Disease, vol. 2012, Article ID 381029, 32 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/381029>を参照されたい)、またそれらは市販されている(例えば、Santa Cruz Biotechnology: https://www.scbt.com/scbt/browse/GSK-3-beta-Inhibitors/_/N-x6oud、から入手可能なリストを参照されたい)。これらのGSK-3阻害剤のいずれも、本発明との関係における使用に適しており、また当業者であれば、IC50値を使用して好適な濃度を決定することができるであろう。

20

【0127】

CHIR-99021 (CAS: 252917-06-9; 6-[2-[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジンル]アミノ]エチル]アミノ]-3-ピリジンカルボニトリル; CT99021) は、GSK-3の強力、かつ選択的阻害剤である。IC50値が0.6 nM~7 nMのその他のアミノピリミジン阻害剤としては、CHIR98014 (Axon, Cat 1126)、CHIR98023、CHIR99021 (上記参照)、TWS119 (Tocris, Cat 3835) が挙げられる。したがって、いくつかの実施形態では、GSK-3阻害剤は、アミノピリミジン阻害剤であり、任意選択で、CHIR98014、CHIR98023、CHIR99021またはTWS119から選択される。いくつかの実施形態では、GSK-3阻害剤は、CHIR-99021である。

30

40

【0128】

GSK-3阻害剤(例えば、CHIR-99021)は、例えば、10 nM~500 µM、10 nM~400 µM、10 nM~300 µM、10 nM~200 µM、10 nM~100 µM、もしくは20 nM~50 µMの任意の好適な濃度で使用されてよく、または、最終濃度は約3 µMである。

【0129】

分泌性糖タンパク質のWntファミリーからのWntリガンドは、Wnt-1/Int-1、Wnt-2/Irp (InM関連タンパク質)、Wnt-2b/13、Wnt-3/Int-4、Wnt-3a (R&D systems)、Wnt-4、Wnt-5a、Wnt-5b、Wnt-6 (Kirikoshi H et al 2001 Bioch

50

em Biophys Res Com 283 798-805)、Wnt-7a (R & D systems)、Wnt-7b、Wnt-8a/8d、Wnt-8b、Wnt-9a/14、Wnt-9b/14b/15、Wnt-10a、Wnt-10b/12、Wnt-11及びWnt-16から選択されてよい。ヒトWntタンパク質の概要は、“THE WNT FAMILY OF SECRETED PROTEINS”, R & D Systems Catalog, 2004にて記載されている。いくつかの実施形態では、Wntリガンドは、Wnt-3a、Wnt-5もしくはWnt-6aであるか、または任意選択でWnt-3aである。可溶性Wntリガンドの添加は、(例えば、WO2012/168930に記載されているように) ヒト上皮幹細胞の増殖にとって特に有利であることが明らかとなっている。

10

【0130】

Wntアゴニストは、好ましくは、同じ細胞型で評価される際に上記分子の不存在下での上記Wnt活性のレベルと比較して、少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも100%、細胞内のWnt活性を刺激するのに有効な量で培地に添加される。当業者に知られているように、Wnt活性は、Wntの転写活性を測定することによって、例えば、pTOPFLASH及びpFOPFLASH Tcfルシフェラーゼレポーター構築物によって判定することができる(Korinek et al., 1997. Science 275:1784-1787)。

20

【0131】

Wnt-3aなどの可溶性Wntアゴニストは、Wnt馴化培地の形態で提供されてよい。例えば、約10%~約30%、例えば、約10ng/ml~約10µg/ml、好ましくは約1µg/mlのWnt馴化培地が使用されてよい。その他の実施形態では、(例えば、[19]及び実施例に記載されているように) 代理Wntアゴニストが使用されてよい。

【0132】

R-スポンジンは、R-スポンジン馴化培地の形態で、または組換えタンパク質の形態で提供されてよい。例えば、約10ng/ml~約500ng/ml、約10ng/ml~約400ng/ml、約10ng/ml~約300ng/ml、約10ng/ml~約250ng/ml、約50ng/ml~約250ng/ml、約100ng/ml~約250ng/mlまたは約150ng/ml~約250ng/ml、好ましくは約150ng/ml~約250ng/ml、R-スポンジンは使用されてよい。例えば、培養液中のR-スポンジンの最終濃度は、約10ng/ml、約25ng/ml、約50ng/ml、約75ng/ml、約100ng/ml、約125ng/ml、約150ng/ml、約175ng/ml、約200ng/ml、約225ng/ml、約250ng/ml、約275ng/ml、約300ng/ml、約325ng/ml、約350ng/ml、約375ng/ml、約400ng/ml、約450ng/ml、または約500ng/mlであってよい。

30

【0133】

1つ以上、例えば、2、3、4つ以上のWntアゴニストが、培養液中で使用されてよい。

40

【0134】

分裂促進成長因子

上皮幹細胞を培養するのに適した培養液は、分裂促進成長因子を含む場合がある。分裂促進成長因子は、典型的には、分裂活性化タンパク質キナーゼシグナル伝達経路を介して細胞分裂を誘発する。多くの受容体チロシンキナーゼリガンドは、分裂促進成長因子である。いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、受容体チロシンキナーゼに結合する場合がある。いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、2つ以上の受容体チロシンキナーゼに結合する場合がある。いくつかの実施形態では、1つ以上の分裂促進成長因子が

50

、EGFR、FGFRまたはHGFなどの受容体チロシンキナーゼに結合し、任意選択で、1つ以上の分裂促進成長因子は、EGF、FGF及びHGFから選択される。

【0135】

ErbbB1またはHER1としても知られている上皮成長因子受容体(EGFR)は、細胞外タンパク質リガンドの上皮成長因子(EGF)ファミリーのメンバーに対する細胞表面受容体である。EGFRは、受容体チロシンキナーゼであり、かつ4つの関連タンパク質(EGFR(HER1/ErbbB1)、ErbbB2(HER2)、ErbbB3(HER3)及びErbbB4(HER4))を含む受容体のHERファミリーに属する。HER受容体は、EGF、TGF α 、ヘパリン結合性EGF様の成長因子、ニューレグリン、アンフィレグリン、ベタセルリン及びエピレグリンを含む異なるリガンドに結合することによって活性化されることが知られている。リガンドが、受容体の細胞外ドメインに結合した後、受容体は、活性二量体(EGFR-EGFR(ホモ二量体)またはEGFR-HER2、EGFR-HER3、EGFR-HER4(ヘテロ二量体))を機能的に形成する。二量体化は、チロシンキナーゼドメインの活性化を含み、これにより、複数のチロシン残基上の受容体の自己リン酸化がもたらされる。これにより、アダプタータンパク質(例えばSHC、GRB2)の部類の動員がもたらされ、遺伝子転写に影響を及ぼす一連の細胞内シグナル伝達カスケードが活性化される。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、EGFR、HER1、HER2、HER3またはHER4に結合する。いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、EGFRに結合する。いくつかの実施形態では、HER2~4リガンドは、EGFRリガンドに加えて培養液に含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、ニューレグリンは、EGFに加えて培養液に含まれる。ニューレグリンは、肺及び乳房組織の培養に有利であることが明らかとなっている(例えば、WO2016/083613、及びWO2016/083612を参照されたい)。いくつかの実施形態では、培養液中の1つ以上の分裂促進成長因子は、EGFである。例えば、Peprrotechから入手されるEGFなど、任意の好適なEGFが使用されてよい。EGFは、好ましくは、0.1ng/ml~500ng/ml、0.1ng/ml~400ng/ml、0.1ng/ml~300ng/ml、0.1ng/ml~200ng/ml、0.1ng/ml~100ng/ml、1ng/ml~100ng/mlの最終濃度で基礎培養液に添加されるか、または、分裂促進成長因子の最終濃度は、およそ1ng/ml、2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、250ng/mlもしくは500ng/ml及び500ng/ml以下である。より好ましい濃度は、少なくとも50ng/mlであり、100ng/ml以下である。さらにより好ましい濃度は、約50ng/mlである。FGFは、細胞表面チロシンキナーゼ受容体(FGFR)と相互作用することによって細胞を刺激する。4つの密接に関係した受容体(FGFR1-FGFR4)が同定されている。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、FGF受容体ファミリーメンバーに結合する。FGF受容体ファミリーメンバーとしては、FGFR1、FGFR2、FGFR3またはFGFR4が挙げられる(しかし、これらに限定されない)。FGFR1~FGFR3遺伝子は、複数のアイソフォームをコードすることが明らかとなっており、かつこれらのアイソフォームは、リガンドの特異性を決定する上で重要な場合がある。FGF受容体ファミリーメンバーに結合するいくつかのFGFが存在し、FGF2、FGF4、FGF7及びFGF10などが挙げられる(しかし、これらに限定されない)。これらは市販されている。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、FGFである。いくつかの実施形態では、FGFは、FGF2、FGF4、FGF7及びFGF10から選択される。好ましい実施形態では、FGFは、FGF2及び/またはFGF10である。最も好ましい実施形態では、FGFは、FGF2及びFGF10である。

【0136】

ほとんどのFGFは、2つ以上の受容体に結合する(Ornitz J Biol Ch

em. 1998 Feb 27; 273 (9): 5349-57)。しかし、FGF10及びFGF7は、上皮細胞でのみ発現するFGFR2bと呼ばれるFGFR2の特定のアイソフォームとのみ相互作用するという点でFGFの中で独特である (Igarashi, J Biol Chem. 1998 273 (21): 13230-5)。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、FGFR2bに結合する。FGF10は、培養液中で特に有用であることが明らかとなっている。FGF10は、FGFR2またはFGFR4に結合することができる。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、FGFR2またはFGFR4に結合する。FGF2は、FGFR1、FGFR2、FGFR3及びFGFR4の全てに結合する。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、FGFR1、FGFR2、FGFR3及びFGFR4の全てに結合する。

10

【0137】

いくつかの実施形態では、FGFの最終濃度は、0.1 ng/ml~500 ng/ml、0.1 ng/ml~400 ng/ml、0.1 ng/ml~300 ng/ml、0.1 ng/ml~200 ng/ml、0.1 ng/ml~100 ng/ml、1 ng/ml~100 ng/mlであるか、または、分裂促進成長因子の最終濃度は、約1 ng/ml、2 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、250 ng/mlもしくは500 ng/mlである。

【0138】

いくつかの実施形態では、培養液中の1つ以上の分裂促進成長因子は、FGF10である。FGF10の好ましい濃度は、およそ0.1 ng/ml~500 ng/ml、0.1 ng/ml~400 ng/ml、0.1 ng/ml~300 ng/ml、0.1 ng/ml~200 ng/ml、0.1 ng/ml~100 ng/ml、1 ng/ml~100 ng/mlであるか、または、分裂促進成長因子の最終濃度は、およそ1 ng/ml、2 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、250 ng/mlもしくは500 ng/ml及び500 ng/ml以下である。FGF10のより好ましい濃度は、約10 ng/mlである。

20

【0139】

いくつかの実施形態では、培養液中の1つ以上の分裂促進成長因子は、FGF2である。FGF2の好ましい濃度は、およそ0.1 ng/ml~500 ng/ml、0.1 ng/ml~400 ng/ml、0.1 ng/ml~300 ng/ml、0.1 ng/ml~200 ng/ml、0.1 ng/ml~100 ng/ml、1 ng/ml~100 ng/mlであるか、または、分裂促進成長因子の最終濃度は、およそ1 ng/ml、2 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、250 ng/mlもしくは500 ng/ml及び500 ng/ml以下である。FGF2のより好ましい濃度は、約5 ng/mlである。

30

【0140】

肝細胞成長因子／散乱因子 (HGF／SF) は、原発性癌性HGF Rへの結合後、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケードを活性化することによって、細胞増殖、細胞運動性、及び形態形成を制御する形態形成因子である。HGF Rは、c-Met受容体としても知られている。HGFは、上皮幹細胞培養において有用であることが明らかとなっている。したがって、いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、HGF Rに結合する。いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子は、HGFである。例えば、Peprotechから入手されるHGFなど、任意の好適なHGFが使用されてよい。HGFの好ましい濃度は、約1、10、20、25、50 ng/ml、50 ng/ml以下である。

40

【0141】

いくつかの実施形態では、2つ以上の分裂促進成長因子、例えば、2つまたは3つの分裂

50

促進成長因子が、培養液に含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、培養液中の1つ以上の分裂促進成長因子は、EGF及びFGFである。いくつかの実施形態では、培養液中の1つ以上の分裂促進成長因子は、EGF、FGF2及びFGF10である。いくつかの実施形態では、培養液中の1つ以上の分裂促進成長因子は、任意選択で最終濃度が約50 ng/mlのEGF、任意選択で最終濃度が約5 ng/mlのFGF2、及び、任意選択で最終濃度が約10 ng/mlのFGF10である。

【0142】

いくつかの実施形態では、肝細胞成長因子（HGF）はまた、EGF及び／またはFGFの存在下または不存在下で存在する。

【0143】

いくつかの実施形態では、分裂促進成長因子のそれぞれの最終濃度は、0.1 ng/ml～500 ng/ml、0.1 ng/ml～400 ng/ml、0.1 ng/ml～300 ng/ml、0.1 ng/ml～200 ng/ml、0.1 ng/ml～100 ng/ml、1 ng/ml～100 ng/mlであるか、または、分裂促進成長因子の最終濃度は、約1 ng/ml、2 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、250 ng/mlもしくは500 ng/mlである。

【0144】

BMP阻害剤

上皮幹細胞を培養するのに適した培養液は、BMP阻害剤を含む場合がある。BMPは、二量体リガンドとして、2つの異なる受容体セリン／スレオニンキナーゼ、I型及びII型受容体で構成される受容体複合体に結合する。II型受容体がI型受容体をリン酸化し、その結果、この受容体キナーゼが活性化される。I型受容体は、その後、特定の受容体基質（SMAD）をリン酸化し、その結果、転写活性を導くシグナル伝達経路をもたらす。

【0145】

BMP阻害剤は、BMP分子に結合して複合体を形成する薬剤として定義され、この際、BMP活性は、例えば、BMP分子のBMP受容体への結合が妨げられるかまたは阻害されることによって中和される。あるいは、上記阻害剤は、アンタゴニストまたはリバースアゴニストとして作用する薬剤である。このタイプの阻害剤は、BMP受容体と結合し、BMPの上記受容体への結合を妨げる。後者の薬剤の例は、BMP受容体に結合して、BMPの抗体結合受容体への結合を妨げる抗体である。

【0146】

BMP阻害剤は、同じ細胞型で評価される際に上記阻害剤の不存在下でのBMP活性のレベルと比較して、最大で90%、より好ましくは最大で80%、より好ましくは最大で70%、より好ましくは最大で50%、より好ましくは最大で30%、より好ましくは最大で10%、より好ましくは0%、細胞内のBMP依存性活性を阻害するのに有効な量で培地に添加されてよい。当業者に知られているように、BMP活性は、例えば、Zilberberg et al., 2007. BMC Cell Biol. 8:41にて例示されているように、BMPの転写活性を測定することによって判定することができる。

【0147】

天然のBMP結合タンパク質のいくつかのクラスが知られており、例えば、ノギン（Noggin）（R&D systems）、コーディンドメインを含むコーディン及びコーディン様タンパク質（R&D systems）、フォリスタチンドメインを含むフォリスタチン及びフォリスタチン関連タンパク質（R&D systems）、DANシステインノットドメインを含むDAN及びDAN様タンパク質（R&D systems）、スクレロスチン／SOST（R&D systems）、デコリン（R&D systems）、及びα-2マクログロブリン（R&D systems）が挙げられる。

【0148】

したがって、いくつかの実施形態では、BMP阻害剤は、ノギン、DAN、ならびに、ケルベロス及びグレムリンを含むDAN様タンパク質（R&D systems）から選択される。これらの拡散性タンパク質は、様々な程度の親和性でBMPリガンドと結合し、シグナル伝達受容体へのそれらの接近手段を阻害することができる。これらのBMP阻害剤のいずれかを基礎培養液に添加することで、幹細胞の減失が阻止される。好ましいBMP阻害剤は、ノギンである。

【0149】

いくつかの実施形態では、BMP阻害剤（例えば、ノギン）の最終濃度は、約10 ng/ml～約500 ng/ml、約10 ng/ml～約400 ng/ml、約10 ng/ml～約300 ng/ml、約10 ng/ml～約250 ng/ml、約50 ng/ml～約250 ng/ml、約50 ng/ml～約150 ng/mlであるか、または最終濃度が、約100 ng/mlである。

10

【0150】

TGFβ阻害剤

上皮幹細胞を培養するのに適した培養液は、TGFβ阻害剤を含む場合がある。増殖培地におけるTGFβ阻害剤の存在は、ヒトオルガノイド形成効率を高めるのに特に有利である。TGFβシグナル伝達は、典型的には、TGFβスーパーファミリーリガンドのII型受容体への結合で開始するが、このII型受容体は、I型受容体を動員し、かつリン酸化する。次に、I型受容体は、SMADをリン酸化し、このSMADは、核内で転写因子として機能し、かつ標的遺伝子発現を制御する。

20

【0151】

TGFβスーパーファミリーリガンドは、骨形成タンパク質（BMP）、増殖及び分化因子（GDF）、抗ミュー管ホルモン（AMH）、アクチビン、結節及びTGFβを含む。一般に、Smad2及びSmad3は、TGFβ/アクチビン経路のALK4、5及び7受容体によってリン酸化される。対照的に、Smad1、Smad5及びSmad8は、骨形成タンパク質（BMP）経路の一部としてリン酸化される。しかし、本発明の文脈において、「TGFβ阻害剤」または「TGFβシグナル伝達の阻害剤」が、ALK4、5及び7を含み、かつSmad2及びSmad3を含むTGFβ経路の阻害剤であることを、当業者であれば理解するであろう。TGFβ阻害剤は、BMP阻害剤ではなく、すなわち、ノギンは本開示の関係においてはTGFβ阻害剤ではないことを当業者であれば理解されるであろう。いくつかの実施形態では、BMP阻害剤は、TGFβ阻害剤に加えて培養液に添加される（以下を参照）。

30

【0152】

したがって、TGFβ阻害剤は、本明細書においてはALK4、ALK5またはALK7シグナル伝達経路とも称される、TGFβシグナル伝達経路の活性を低下させる任意の薬剤である。当技術分野において知られており、かつ本発明と併せて使用することができる、TGFβシグナル伝達経路を阻害する多くの方法が存在する。例えば、TGFβシグナル伝達は、低分子干渉RNA戦略によるTGFβ発現の阻害；フーリン（TGFβ活性化プロテアーゼ）の阻害；生理的阻害剤による経路の阻害；モノクローナル抗体によるTGFβの中和；TGFβ受容体キナーゼ1（アクチビン受容体様キナーゼ、ALK5としても知られている）、ALK4、ALK7の小分子阻害剤による阻害；例えば、それらの生理学的阻害剤、Smad7の過剰発現によるか、またはSmadの活性化を抑止するSmadアンカーとしてチオレドキシンを使用することによるSmad2及びSmad3シグナル伝達の阻害、によって阻害され得る（Fuchs, O. Inhibition of TGF-Signaling for the Treatment of Tumor Metastasis and Fibrotic Diseases. Current Signal Transduction Therapy, Volume 6, Number 1, January 2011, pp. 29-43 (15)）。

40

【0153】

ある物質がTGFβ阻害剤であるかどうかを判定する各種方法が知られており、本発明と

50

併せて使用される場合がある。例えば、ヒトP A I-1促進因子またはS m a d結合部位を含むレポーター構築物で細胞が安定的にトランスフェクトされ、ルシフェラーゼレポーター遺伝子が駆動される細胞アッセイが使用されてよい。対照群と比較したルシフェラーゼ活性の阻害は、化合物活性の程度として使用される場合がある（De G o u v i l l e e t a l . , B r J P h a r m a c o l . 2 0 0 5 M a y ; 1 4 5 (2) : 1 6 6 - 1 7 7) 。

【0154】

本発明によるT G F β阻害剤は、タンパク質、ペプチド、小分子、低分子干渉RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマーまたは抗体であってよい。阻害剤は、天然に存在するものか、人工のものであってもよい。

【0155】

いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤は、A 8 3 - 0 1などの小分子阻害剤である。A 8 3 - 0 1は、A L K 4、A L K 5及びA L K 7の市販の選択的阻害剤である（T o c r i sカタログ番号2939）。その阻害剤は、T G F β I型受容体A L K 5キナーゼ、I型アクチビン／結節受容体A L K 4及びI型結節受容体A L K 7の強力な阻害剤（それぞれ、I C 5 0値が12、45及び7.5 nMである）としてカタログに記載されており、S m a d 2のリン酸化を阻止し、A L K 1、2、3、6及びM A P K活性をわずかに阻害するだけである。類似の特性を有する他の市販の阻害剤としては、A 7 7 - 0 1、L Y 2 1 5 7 2 9 9、L Y 2 1 0 9 7 6 1、L Y 3 2 0 0 8 8 2、G W 7 8 8 3 8 8、ピルフェニドン、R e p S o x、S B 4 3 1 5 4 2、S B 5 0 5 1 2 4、S B 5 2 5 3 3 4、L Y 3 6 4 9 4 7、S D - 2 0 8及びバクトセルチブが挙げられるが、これらに限定されない。これらの阻害剤のI C 5 0値は、当技術分野において知られており、また当業者であれば、本出願の実施例にて提供される教示に基づいて好適な濃度の好適な阻害剤を選択できるであろう。

【0156】

したがって、いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤は、A L K 4、A L K 5及びA L K 7の阻害剤であり、任意選択でA L K 4、A L K 5またはA L K 7の選択的阻害剤である。例えば、T G F β阻害剤は、A L K 4、A L K 5及び／またはA L K 7に結合して、直接阻害し得る。いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤は、S m a d 2のリン酸化を阻止する阻害剤である。いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤は、A 8 3 - 0 1、A 7 7 - 0 1（T o c r i sカタログ番号6712）、L Y 2 1 5 7 2 9 9（S e l l e c k c h e mカタログ番号S 2 2 3 0）、L Y 2 1 0 9 7 6 1（S e l l e c k c h e mカタログ番号S 2 7 0 4）、L Y 3 2 0 0 8 8 2（S e l l e c k c h e mカタログ番号S 8 7 7 2）、G W 7 8 8 3 8 8（T o c r i sカタログ番号3264）、ピルフェニドン、R e p S o x（T o c r i sカタログ番号3742）、S B 4 3 1 5 4 2（T o c r i sカタログ番号1614）、S B 5 0 5 1 2 4（T o c r i sカタログ番号3263）、S B 5 2 5 3 3 4（T o c r i sカタログ番号3211）、L Y 3 6 4 9 4 7（T o c r i sカタログ番号2718）、S D - 2 0 8（T o c r i sカタログ番号3269）及びバクトセルチブ（S e l l e c k c h e mカタログ番号S 7 5 3 0）から選択される。いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤は、A 8 3 - 0 1である。

【0157】

いくつかの実施形態では、1つのT G F β阻害剤だけが、培養液中に存在する。その他の実施形態では、2つ以上、例えば2、3、4つまたはそれ以上のT G F β阻害剤が、培養液中に存在する。

【0158】

いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤の最終濃度は、1 nM～100 μM、10 nM～100 μM、100 nM～10 μM、または約1 μMであり、例えば、1つ以上の阻害剤の最終濃度は、10 nM～100 μM、100 nM～10 μM、または約500 nMである。いくつかの実施形態では、T G F β阻害剤の最終濃度は、少なくとも5 nMであり、例えば、少なくとも50 nM、少なくとも100 nM、少なくとも300 nM、少なく

10

20

30

40

50

とも450 nM、少なくとも475 nM、例えば、5 nM～500 mM、10 nM～100 mM、50 nM～700 μM、50 nM～10 μM、100 nM～1000 nM、350～650 nM以上、より好ましくは約500 nMである。いくつかの実施形態では、TGFβ阻害剤は、最終濃度が約500 nMのA83-01である。

【0159】

TGFβ阻害剤の適切な最終濃度は、問題におけるTGFβ阻害剤に依存することを、当業者であれば理解するであろう。また、本発明での使用のために他のTGFβ阻害剤の濃度を決定する方法を当業者であれば知っているであろう。

【0160】

ニコチンアミド

いくつかの実施形態では、上皮幹細胞に適した培養液は、ニコチンアミドをさらに含む。ニコチンアミドは、ビタミンB3のアミド誘導体、ポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤であり、NAD+の主要な前駆体である。それは市販されている(例えば、Stemcell Technologiesカタログ07154)。いくつかの実施形態では、ニコチンアミドは、7～15 mM、例えば約10 mMで存在する。

【0161】

プロスタグランジン経路活性化剤

プロスタグランジンシグナル伝達経路の活性化剤(プロスタグランジン経路活性化剤とも呼ばれる)は、ホスホリピド、アラキドン酸(AA)、プロスタグランジンE2(PGE2)、プロスタグランジンG2(PGG2)、プロスタグランジンF2(PGF2)、プロスタグランジンH2(PGH2)、プロスタグランジンD2(PGD2)を含むリストから選択される化合物のうち任意の1つ以上であってよい。いくつかの実施形態では、プロスタグランジンシグナル伝達経路の活性化剤は、PGE2及び/またはAAである。いくつかの実施形態では、プロスタグランジンシグナル伝達経路の活性化剤は、PGE2である。

【0162】

いくつかの実施形態では、プロスタグランジンシグナル伝達経路(例えば、PGE2)の活性化剤の最終濃度は、10 nM～500 μM、10 nM～400 μM、10 nM～300 μM、10 nM～200 μM、10 nM～100 μM、もしくは20 nM～50 μMであるか、または、最終濃度は約1 μMである。

【0163】

プロスタグランジンシグナル伝達経路の活性化剤の適切な最終濃度は、問題におけるプロスタグランジンシグナル伝達経路の活性化剤に依存することを、当業者であれば理解するであろう。また本発明での使用のためにプロスタグランジンシグナル伝達経路の他の活性化剤の濃度を決定する方法を当業者であれば知っているであろう。

【0164】

cAMP活性化剤

cAMP経路活性化剤は、細胞内のcAMPのレベルを上昇させる任意の好適な活性化剤であってよい。cAMP経路は、多くの種類のホルモン及び神経伝達物質Gタンパク質結合受容体の活性化に関連する。ホルモンまたは神経伝達物質のその膜結合受容体への結合により、受容体のコンフォメーション変化が誘導され、それにより、Gタンパク質のαサブユニットが活性化される。活性化したGサブユニットは、アデニル酸シクラーゼを刺激するが、活性化していないGサブユニットは、アデニル酸シクラーゼを阻害する。アデニル酸シクラーゼの刺激は、細胞質ATPのcAMPへの変換を触媒し、それにより細胞内のcAMPのレベルが上昇する。

【0165】

したがって、いくつかの実施形態では、cAMP経路活性化剤は、アデニル酸シクラーゼ活性化剤またはcAMP類似体である。好適なアデニル酸シクラーゼ活性化剤の例としては、フォルスコリン、フォルスコリン類似体及びコレラ毒素が挙げられる。フォルスコリン類似体の例は、当技術分野において知られており、NKH477が挙げられる(例えば

10

20

30

40

50

、カタログ番号 T o c r i s 1 6 0 3)。c A M P 類似体の例は、当技術分野において知られており、例えば、8-ブromo-c A M P が挙げられる。8-ブromo-c A M P は、ホスホジエステラーゼによる加水分解に対する耐性が c A M P より高い細胞透過性 c A M P 類似体である。したがって、いくつかの実施形態では、c A M P 経路活性化剤は、フォルスコリン、コレラ毒素、N K H 4 7 7 及び 8-ブromo-c A M P から選択される。いくつかの実施形態では、c A M P 経路活性化剤は、フォルスコリンである。いくつかの実施形態では、c A M P 経路活性化剤は、コレラ毒素ではない。

【0166】

c A M P 経路活性化剤は、当技術分野において知られている方法を使用して、例えば、c A M P レベルを測定する競合イムノアッセイを使用して同定することができる。C a t c h P o i n t (登録商標) サイクリック A M P 蛍光アッセイキット (M o l e c u l a r D e v i c e s L L C) は、このようなイムノアッセイを実行するための市販のキットの例である。試料または標準の c A M P は、抗 c A M P 抗体の結合部位に対して、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 標識 c A M P 複合体と競合する。c A M P の不
存在下では、H R P - c A M P 複合体のほとんどが抗体に結合する。c A M P の濃度が上がると、結合した複合体の量が競合的に減少し、それにより、測定される H R P 活性が低下する。c A M P 経路活性化剤は、対照と比較して、c A M P のレベルを上昇させ、かつ測定される H R P 活性を低下させるであろう。

【0167】

いくつかの実施形態では、c A M P 経路活性化剤 (例えば、フォルスコリン) の最終濃度は、10 nM ~ 500 µM、10 nM ~ 400 µM、10 nM ~ 300 µM、10 nM ~ 200 µM、10 nM ~ 100 µM、もしくは 20 nM ~ 50 µM であるか、または、最終濃度は約 1 µM である。いくつかの実施形態では、c A M P 経路活性化剤は、フォルスコリンである。いくつかの実施形態では、フォルスコリンの最終濃度は、約 1 µM である。

【0168】

選択される濃度は、使用される c A M P 経路活性化剤に依存し得、c A M P 経路活性化剤の効力に応じて当業者によって決定され得る。例えば、N K H 4 7 7 は、一般に 8-ブromo-c A M P 及びフォルスコリンよりも強力である。同じ効果を得るために、より強力な c A M P 経路活性化剤を低濃度で使用することもできる。

【0169】

追加の成分

細胞培養用の基礎培地は、典型的には、培養細胞の維持を支援するのに必要な多数の成分を含有する。成分の好適な組み合わせは、以下の開示を考慮に入れて、当業者によって容易に調製することができる。本発明で使用するための基礎培地は、文献及び下記で詳細に説明されているように、概して、アミノ酸、ビタミン、脂質サプリメント、無機塩、炭素エネルギー源、及び緩衝液などの標準的な細胞培養成分を含む栄養溶液を含む。いくつかの実施形態では、例えば、アミノ酸、ビタミン、脂質サプリメント、無機塩、炭素エネルギー源、及び緩衝液から選択される 1 つ以上の標準的な細胞培養成分が培養液にさらに補充される。好適な基礎培地は、当業者には周知となり、また市販され、例えば、非限定的な例としては、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M)、高度 D M E M、最少必須培地 (M E M)、ノックアウト D M E M (K O - D M E M)、グラスゴー最少必須培地 (G - M E M)、基礎培地イーグル (B M E)、D M E M / H a m ' s F 1 2、高度 D M E M / H a m ' s F 1 2、イスコフ改変ダルベッコ培地及び最少必須培地 (M E M)、H a m ' s F - 1 0、H a m ' s F - 1 2、1 9 9 培地、ならびに R P M I 1 6 4 0 培地、が挙げられる。例えば、基礎培地は、好ましくは、グルタマックス、ペニシリン / ストレプトマイシン及び H E P E S が補充された高度 D M E M であってよい。

【0170】

上皮幹細胞に適した培養液には、ガストリン、B 2 7、N-アセチルシステイン及び N 2 からなる群から選択される化合物のうち 1 つ以上が補充されてよい。したがって、いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、前述した培養液は、ガストリン、B 2 7、N 2 及び N-アセチルシステインからなる群から選択される 1 つ以上の成分をさらに含む。B 2 7 (Invitrogen)、N-アセチルシステイン (Sigma)、及び N 2 (Invitrogen)、ガストリン (Sigma) は、細胞の増殖を制御し、DNA の安定性を助けると考えられている。いくつかの実施形態では、培養液は、B 2 7 及び N-アセチルシステインをさらに含む。

【0171】

いくつかの実施形態では、B 2 7 サプリメントは、「B 2 7 Supplement minus Vitamin A」(Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; currently カタログ番号 12587010、及び PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; カタログ番号 F01-002; Brewer et al., J Neurosci Res., 35 (5): 567-76, 1993 から入手可能) であり、これを使用して、ビオチン、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、ブトレシン、酢酸レチニル、亜セレン酸ナトリウム、トリヨードサイロニン (T3)、DL- α トコフェロール (ビタミン E)、アルブミン、インシュリン及びトランスフェリンを含む培養液を調製することができる。PAA Laboratories GmbH が提供する B 2 7 サプリメントは、50 倍濃縮の液体であり、とりわけ、ビオチン、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、ブトレシン、レチノール、酢酸レチニル、亜セレン酸ナトリウム、トリヨードサイロニン (T3)、DL- α トコフェロール (ビタミン E)、アルブミン、インシュリン及びトランスフェリンの成分を含有する。これらの成分のうち、少なくともリノレン酸、レチノール、酢酸レチニル及びトリヨードサイロニン (T3) は、核内ホルモン受容体アゴニストである。B 2 7 サプリメントは、培養液に濃縮物として添加されるか、または培養液に添加される前に希釈される場合がある。それは、1 倍の最終濃度または他の最終濃度で使用され得る。B 2 7 サプリメントの使用は、ビオチン、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、ブトレシン、レチノール、酢酸レチニル、亜セレン酸ナトリウム、トリヨードサイロニン (T3)、DL- α トコフェロール (ビタミン E)、アルブミン、インシュリン及びトランスフェリンを、本発明の培養液に組み込むために便利な方法である。B 2 7 サプリメントの使用の代わりに、これらの成分の一部または全てが別々に培養液に添加され得ることも想定される。したがって、培養液は、これらの成分の一部または全てを含む場合がある。いくつかの実施形態では、レチノイン酸は、培養液中で使用される B 2 7 サプリメントに存在せず、及び／または培養液中に存在しない。

【0172】

「N 2 サプリメント」が、Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; カタログ番号 17502-048; 及び PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; カタログ番号 F005-004; Bottenstein & Sato, PNAS, 76 (1): 514-517, 1979 から入手可能である。PAA Laboratories GmbH が提供する N 2 サプリメントは、100 倍濃縮の液体であり、500 μ g/ml のヒトトランスフェリン、500 μ g/ml のウシインシュリン、0.63 μ g/ml のプロゲステロン、1611 μ g/ml のブトレシン、及び 0.52 μ g/ml の亜セレン酸ナトリウムを含有する。N 2 サプリメントは、培養液に濃縮物として添加されるか、または培養液に添加される前に希釈される場合がある。それは、1 倍の最終濃度または他の最終濃度で使用され得る。N 2 サプリメントの使用は、トランスフェリン、インシュリン、プロゲステロン、ブトレシン及び亜セレン酸ナトリウムを、本発明の培養液に組み込むために便利な方法である。N 2 サプリメントの使用の代わりに、これらの成分の一部または全てが別々に培養液に添加され得ることも当然想定される。したがって、培養液は、これらの成分の一部または全てを含む場合がある。培地が B 2 7 を含むいくつかの実施形態では、培地は、N 2 を含まない。いくつかの実施形態では、N-アセチル

10

20

30

40

50

システインの最終濃度は、約 1 nM～約 100 nM、約 5 nM～約 50 nM、約 10 nM～約 50 nM、約 10 nM～約 30 nM、または約 25 nM である。

【0173】

いくつかの実施形態では、培養液は、ROCK 阻害剤（Rhoキナーゼ阻害剤）をさらに含む。ROCK 阻害剤は、新しい培養物を構築するとき、及び／または細胞を分割する（「継代する」）ときに、細胞の接着に特に有用である。好適な ROCK 阻害剤が、当技術分野において知られており、また市販されている（限定はされないが、GSK 269962、GSK 429286、H 1152 ジヒドロクロリド、グリシル -H 1152 ジヒドロクロリド、SR 3677 ジヒドロクロリド、SB 772077 B ジヒドロクロリド及び Y-27632 ジヒドロクロリドが挙げられ、これらは全て Tocris から入手可能である）。いくつかの実施形態では、ROCK 阻害剤の最終濃度は、1 μ M～100 μ M、1 μ M～50 μ M、または 5 μ M～20 μ M である。いくつかの実施形態では、ROCK 阻害剤は、Y-27632 であり、任意選択でその最終濃度は約 10 μ M である。

10

【0174】

好ましい実施形態では、培養液は、トロンボポエチン含有していない。

【0175】

培養液は、ウシ胎児血清またはウシ胎児血清などの未定義の成分を含まないことが好ましい。種々の異なる血清代替製剤が、市販されており、また当業者に知られている。血清代替物が使用される場合、その代替物は、従来技術に従って、培地の約 1 体積%～約 30 体積%で使用されてよい。いくつかの実施形態では、培養液は、無血清である。

20

【0176】

本発明の好ましい培養法はまた、フィーダー細胞が必要でないといった点でも有利である。フィーダー細胞層は、多くの場合、幹細胞の培養を支援するため、及びそれらの分化を阻害するために使用される。フィーダー細胞の使用は、細胞の継代が複雑になる（継代のたびに細胞をフィーダー細胞から分離しなければならず、継代のたびに新しいフィーダー細胞が必要となる）ので、望ましくない。フィーダー細胞の使用により、所望の細胞がフィーダー細胞で汚染される可能性もある。このことは、いずれの医療用途にとっても明らかに問題であり、研究段階においても、細胞に対して実施されるあらゆる実験の結果の解析を複雑にする。

30

【0177】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明の方法、培地及び組成物は、フィーダー細胞を含まない。組成物内の細胞が、フィーダー細胞層の存在なしで少なくとも 1 継代で培養される場合、従来通り、組成物はフィーダー細胞を含まないものと見なされる。本発明のフィーダー細胞を含まない組成物は、通常、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、約 1% 未満のフィーダー細胞（組成物内の細胞の総数は、～%として表される）を含有するか、または好ましくはフィーダー細胞を全く含有しない。

【0178】

本発明の培養液は、通常、脱イオン蒸留水で調製される。本発明の培養液は、典型的には、汚染を防ぐために使用前に、例えば、紫外線、加熱、放射線照射または濾過によって滅菌される。培養液は、保管または輸送のために凍結されてよい（例えば -20℃または -80℃で）。培地は、汚染を防ぐために 1 つ以上の抗生物質を含有する場合がある。培地は、1 ml あたり 0.1 エンドトキシン単位未満のエンドトキシン含量を有し得るか、または 1 ml あたり 0.05 エンドトキシン単位未満のエンドトキシン含量を有し得る。培養液のエンドトキシン含量の決定方法は、当技術分野において知られている。

40

【0179】

好ましい細胞培養液は、炭酸塩ベース緩衝液で pH 7.4 で（好ましくは、pH 7.2～7.6、または少なくとも pH 7.2～最大 pH 7.6 で）緩衝される定義された人工培地であり、同時に、細胞は、5%～10%の CO₂、または少なくとも 5%～最大 10%の CO₂、好ましくは 5%の CO₂ を含む雰囲気中で培養される。

50

【0180】

本発明はまた、前述した本発明の態様のうちいずれか1つによる細胞及び／またはオルガノイド、ならびに前述した本発明の態様のうちいずれか1つによる培養液を含む組成物または細胞培養容器を提供する。例えば、そのような組成物または細胞培養容器は、前述のような培養液中で、本発明の方法に従って培養される任意数の細胞またはオルガノイドを含んでいてもよい。

【0181】

本発明のさらに別の態様に従って、本発明の培養液を含有する密閉容器が提供される。いくつかの実施形態では、培養液は、増殖培地である。いくつかの実施形態では、培養液は、分化培地である。汚染を防ぐために、培養液の輸送または保管には、密閉容器が好ましい場合がある。容器は、フラスコ、プレート、ボトル、ジャー、バイアル、またはバッグなどの任意の好適な容器であってよい。

【0182】

本発明で使用するための例示的な培養液

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、インテグリンアゴニスト、1つ以上の受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF及び／またはHGF）、BMP阻害剤（例えば、ノギン）、及びTGFβ阻害剤（例えば、A83-01）を含む。この培養液は、任意選択で、1つ以上のWntアゴニスト（例えばLgr5アゴニスト）をさらに含む。これらの培地は、全ての組織、例えば、腸、胃、脾臓、肝臓、前立腺、乳房及び肺に適している。

【0183】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、(i) FGF7及び／またはFGF10、(ii) ノギン、(iii) Lgr5アゴニスト及び(iv) インテグリンアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、(i) FGF7及び／またはFGF10、(ii) ノギン、(iii) Lgr5アゴニスト、(iv) 1つ以上のさらなる受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF）及び(v) インテグリンアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、培養液は、Erbb3／4リガンド（例えば、ヒトニューレグリンβ-1）をさらに含む。これは、限定はされないが、特に乳房幹細胞を培養するのに適した培養液である。

【0184】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、インテグリンアゴニスト、EGF、FGF（例えば、FGF10）、HGF、TGFβ阻害剤（例えば、A83-01）、ニコチンアミド、1つ以上のWntアゴニスト（例えば、Lgr5アゴニスト）、cAMP経路活性化剤（例えば、フォススコリン）及びガストリンを含む。この培養液は、任意選択で、(i) BMP阻害剤（例えば、ノギン）、Wntアゴニスト（例えば、Wnt馴化培地）、及びROCK阻害剤（例えばY27632）、または(ii) BMP活性化剤（例えば、BMP7）をさらに含む。これらの培養液は、限定はされないが、特に肝臓幹細胞を培養するのに適している。

【0185】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、インテグリンアゴニスト、1つ以上の受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF）、BMP阻害剤（例えば、ノギン）、及び1つ以上のWntアゴニスト（例えば、Lgr5アゴニスト）を含む。この培養液は、任意選択で、テストステロンをさらに含む。これらの培養液は、限定はされないが、特に前立腺幹細胞を培養するのに適している。

【0186】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、p38 MAPキナーゼ阻害剤（例えば、SB202190）、ガストリン及び／またはニコチンアミドから選択される1つ以上の成分をさらに含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、ROCK阻害剤（例えば、Y27632）

をさらに含む。ROCK阻害剤の添加は、培養の開始または分割に有用であることが認められている。

【0188】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、B27及び／またはN-アセチルシステインをさらに含む。これらの追加の成分は、多くの場合、基礎培地の成分として培養液に添加される。

【0189】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、インテグリンアゴニスト、Lgr5アゴニスト、BMP阻害剤（例えば、ノギン）、B27、N-アセチルシステイン、ニコチンアミド、ROCK阻害剤、TGFβ阻害剤（例えば、A83-01）、p38 MAPキナーゼ阻害剤（例えば、SB 202190）、FGF7及びFGF10、ならびに任意選択で、1つ以上のさらなる受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF、アンフィレグリン、TGFα、PDGF）、p53安定化剤及びWntアゴニスト（例えば、Wnt3a）から選択される1つ以上の追加の成分、を含む。

10

【0190】

いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、(i) インテグリンアゴニスト、(ii) 1つ以上の受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF及び／またはHGF）、(iii) BMP阻害剤（例えば、ノギン）及び(iv) TGFβ阻害剤（例えば、A83-01）、p38阻害剤（例えば、SB202190）及び／またはROCK阻害剤（例えば、Y-27632）を含み、かつ任意選択で、1つ以上のWntアゴニスト（例えば、Lgr5アゴニスト）をさらに含む。

20

【0191】

いくつかの実施形態では、培養液は、(i) ガストリン及び／またはニコチンアミド、(ii) Notch阻害剤（例えば、DAPT及び／またはDBZ）、及び／または(iii) プロスタグランジン経路活性化剤（例えば、PGE2及び／またはAA）をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の培養液は、(i) インテグリンアゴニスト、(ii) 1つ以上の受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF及び／またはHGF）、(iii) BMP阻害剤（例えば、ノギン）及び(iv) ガストリン、ニコチンアミド、Notch阻害剤（例えば、DAPT及び／またはDBZ）、及び／またはプロスタグランジン経路活性化剤（例えば、PGE2及び／またはAA）を含む。

30

【0192】

いくつかの実施形態では、培養液は、cAMP経路活性化剤（例えば、フォルスコリン）及び／またはBMP経路活性化剤（例えば、BMP7）をさらに含む。いくつかの実施形態では、培養液は、BMP経路活性化剤（例えば、BMP7）を含むが、BMP経路阻害剤（例えば、ノギン）を含まない。これらの培養液は、限定はされないが、特に肝臓幹細胞または膵臓幹細胞を培養するのに適している。

【0193】

いくつかの実施形態では、1つ以上の受容体チロシンキナーゼリガンドは、EGF及び／または1つ以上（例えば、1、2、3、4つ、または4つ以上）のFGFR2bのリガンド、例えば、FGF7及び／またはFGF10である。

40

【0194】

いくつかの実施形態では、BMP阻害剤は、ノギンである。

【0195】

いくつかの実施形態では、1つ以上のWntアゴニストは、Lgr5アゴニスト、Lgr4アゴニスト、Lgr6アゴニストまたはWnt3aである。いくつかの実施形態では、Lgr5アゴニストは、R-スポンジン、例えば、R-スポンジン1～4のうち任意の1つである。

【0196】

いくつかの実施形態では、培養液は、ErbB3／4リガンド（例えば、ヒトニューレグリンβ-1）をさらに含む。

50

【0197】

ヒト上皮幹細胞が培養されるときに、Wnt3aは培養液に有利に添加される場合がある。

【0198】

いくつかの実施形態では、培養液は、基礎培地を含み、かつインテグリンアゴニスト、1つ以上の受容体チロシンキナーゼリガンド（例えば、EGF、FGF及びHGFから選択される）、Notch阻害剤（例えば、DAPT）、糖質コルチコイド（例えば、デキサメタゾン）、TGFβ阻害剤（例えば、A83-01）、及び1つ以上のWnt阻害剤（例えば、（i）任意選択でIWP2、LGK974及びIWP1から選択されるPorc阻害剤、及び／または（ii）任意選択でiCRT3、CGP049090、PKF118310、PKF115584、ZTM000990、PNU74654、BC21、iCRT5、iCRT14及びFH535から選択されるβ-カテニン標的遺伝子発現の阻害剤）をさらに含む分化培地である。いくつかの実施形態では、分化培地は、GSK-3阻害剤（例えば、CHIR99201）をさらに含む。いくつかの実施形態では、分化培地は、AP-1刺激剤（例えばカルバコール）をさらに含む。したがって、いくつかの実施形態では、培養液は、EGF、FGF19、HGF、DAPT、IWP2、iCRT3、デキサメタゾン、CHIR99021及びカルバコールを含む。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、培養液は、基礎培地を含み、かつインテグリンアゴニスト、1つ以上のEGFR経路阻害剤（例えば、ゲフィチニブ、アファチニブ、MEK阻害剤（例えば、PD0325901）及び／またはERK阻害剤（例えば、SCH772984））、Notch阻害剤（例えば、DAPT）及び1つ以上のWnt阻害剤（例えば、（i）任意選択でIWP2、LGK974及びIWP1から選択されるPorc阻害剤、及び／または（ii）任意選択でiCRT3、CGP049090、PKF118310、PKF115584、ZTM000990、PNU74654、BC21、iCRT5、iCRT14及びFH535から選択されるβ-カテニン標的遺伝子発現の阻害剤）をさらに含む分化培地である。

20

【0200】

本発明の培養液のいずれの場合も、がん細胞向けに特定の成分が省かれる場合がある。

【0201】

オルガノイド

本発明は、本発明の培養法によって採取可能な、または採取されるオルガノイドを提供する。したがって、いくつかの実施形態では、上皮幹細胞を培養する方法は、オルガノイドを採取すること及び／または単離することをさらに含む。前述したように、いくつかの実施形態では、オルガノイドは、腫瘍オルガノイドである。上皮幹細胞を含むオルガノイドはまた、本明細書において「上皮オルガノイド」とも呼ばれる。上皮オルガノイドについては、先行技術で記載されている（例えば、022907、WO2010/090513、WO2012/014076、WO2012/168930、WO2015/173425、WO2016/083613、WO2016/083612及びWO2017/149025を参照されたい）。

40

【0202】

増殖に適した培養液を使用して採取可能もしくは採取される、または培養される上皮オルガノイドは、少なくとも1つの上皮幹細胞を含み、これは、分裂して別の上皮幹細胞を産生するか、または分化した子孫を生成することができる。上皮オルガノイドはまた、いくつかの分化した（またはより成熟した）細胞型を含む。これらの分化した細胞型は、オルガノイドの形成中に自然に発生し、後述のようにオルガノイドに特有の構造的特徴をもたらす。上皮オルガノイドは、オルガノイド内の上皮幹細胞の増殖する集団を維持するという点で有利であり、同時に、起源の上皮組織に特有のより分化した細胞型を含有する。上皮幹細胞のコアの存在を維持しながら、かつ細胞の遺伝型及び表現型の完全性を維持しながら上皮オルガノイドが増殖を継続できる時間の長さは、先行技術における多数のオルガ

50

ノイドと区別される上皮オルガノイドの重要な特徴である。上皮オルガノイドはまた、*in vitro*で細胞が増殖、分化、及び自己組織化するにつれて、急速に発生する特有の構造を有する。これらの特徴について、以下に詳細に記載する。続いて、上皮オルガノイドはまた、本明細書に記載のように分化に適した培養液中で培養することができ、これにより、上皮オルガノイド内の分化する細胞の割合が増加する。

【0203】

細胞形態、細胞構造、アポトーシスまたは細胞溶解の証拠、ならびにオルガノイド組成及び構造など、培養中の細胞の特性を評価するために、画像解析法が使用されてもよい。走査型電子顕微鏡法、透過型電子顕微鏡、共焦点顕微鏡法、立体顕微鏡法、蛍光顕微鏡法を含む電子顕微鏡法などの多くのタイプの画像解析法が当技術分野において良く知られている。組織学的解析により、基本的構造及び細胞型を明らかにすることができる。

10

【0204】

いくつかの実施形態では、上皮オルガノイドは、3次元構造を有し、すなわち、オルガノイドは、3次元オルガノイドである。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、上皮細胞のみを含み、すなわち、非上皮細胞は、オルガノイドに存在しない。これは、上皮幹細胞を増殖するのに適した培養液が上皮幹細胞を増殖するように特別に設計されているためである。したがって、その他の細胞型が培養液、例えば、本発明の出発物質である組織断片に一時的に存在する場合であっても、これらの細胞は生存する可能性が低く、代わりにより長期間、幹細胞が増殖され、それにより、上皮細胞の純粋な集団が生成される。

【0205】

いくつかの実施形態では、オルガノイドの上皮細胞は、内腔を取り囲む。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、内腔を含まない（特に腫瘍オルガノイドは、一般に内腔を有さない）。いくつかの実施形態では、上皮細胞は、分極化している（つまり、タンパク質が上皮細胞の頂端側または基底外側で差次的に発現することを意味する）。いくつかの実施形態では、内腔は、密封した内腔である（つまり、連続的な細胞バリアが、内腔の内容物と、オルガノイドを取り囲む媒質とを分離することを意味する）。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、例えばオルガノイドまたは細胞が分化培地に移されるときに、活発に分裂することができ、好ましくは、対応する *in vivo* 組織に存在する全ての主要な分化細胞系統に分化することができる幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、外側に基底細胞を含み、中央により分化した細胞を含む。

20

30

【0206】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、重層上皮を含む。「重層」とは、細胞の複数の（2つ以上の）層が存在することを意味する。このような細胞は、多くの場合、細胞のより中心にそれらの核を有する傾向があり、すなわち分極化していない。多層セクション内の細胞は、細胞間の間隙または内腔を含むようにそれら自体を組織化することがある。

【0207】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、折り畳まれ（または陥入し）、幹細胞区画及び分化細胞区画を形成する単一の単層を含む。本実施形態では、上皮層によって取り囲まれた中央の密閉した内腔が存在する必要はなく、その代わりに、3次元オルガノイドを取り囲む上皮は、実質上折り畳まれておらず、かつ単層を呈する。折り畳まれた（または陥入している）単層と、重層の細胞の領域とは、時々区別することが困難な場合がある。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、重層の細胞の領域と折り畳まれた単層の領域の両方を含む。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、複数膜から形成されたセクション、及び細胞の単一の単層を含むセクションを有する。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、細胞の単一の単層を含むか、またはそれで構成される。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、単層を含まない。

40

【0208】

本発明によるオルガノイドは、少なくとも1つの芽及び中央内腔を含む細胞の層を有する場合がある。

【0209】

50

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、上皮細胞を含むか、またはそれらで構成される。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、上皮細胞の単層を含むか、またはそれらで構成される。いくつかの実施形態では、非上皮細胞は、オルガノイドに存在しない。

【0210】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、少なくとも2ヵ月、例えば少なくとも10週、少なくとも12週、少なくとも14週、少なくとも16週、少なくとも4ヵ月、少なくとも5ヵ月、少なくとも6ヵ月、少なくとも9ヵ月、少なくとも1年、本発明の増殖培地で培養されているか、または培養することができる。

【0211】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、少なくとも5継代、少なくとも10継代、少なくとも15継代、または少なくとも20継代にわたって、培養されているか、または培養することができる。いくつかの実施形態では、オルガノイドまたは上皮幹細胞の集団は、少なくとも10継代にわたって培養される。

【0212】

いくつかの実施形態では、オルガノイドの細胞数は、5継代、10継代、15継代、または20継代にわたって指数関数的に増加する。好ましい実施形態では、オルガノイドまたは上皮幹細胞の集団の細胞数は、5継代にわたって指数関数的に増加する。

【0213】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、最も広い箇所で直径が、少なくとも50 μm 、少なくとも60 μm 、少なくとも70 μm 、少なくとも80 μm 、少なくとも90 μm 、少なくとも100 μm 、少なくとも125 μm 、少なくとも150 μm 、少なくとも175 μm 、少なくとも200 μm 、少なくとも250 μm またはそれ以上である。

【0214】

本発明の文脈内では、組織断片は、成人組織、好ましくはヒト成人組織の一部である。対照的に、オルガノイドは、*in vitro*増殖を通じて構造的特徴を発達させるため、組織断片と区別される。

【0215】

好ましい実施形態では、オルガノイドは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10週、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10ヵ月以上の間、培養される場合がある。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、少なくとも3ヵ月、好ましくは少なくとも4ヵ月、少なくとも5ヵ月、少なくとも6ヵ月、少なくとも7ヵ月、少なくとも9ヵ月または少なくとも12ヵ月以上にわたる培養中に増殖または維持される。有利には、本発明で提供する培養法に使用により、細胞またはオルガノイドが長期間培養される場合に染色体数が安定して維持されるオルガノイド及び／または細胞集団が形成される。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドまたは上皮幹細胞の集団は、2、4、6、8、10、12もしくは14週、または4、5、6ヵ月以上の本発明の培養液中の培養後でも、安定した染色体数を有する。好ましくは、細胞の少なくとも65%、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%は、2、4、6、8、10、12もしくは14週、または4、5、6ヵ月以上の本発明の培養液中の培養後に、適切な染色体数を有する。ヒト上皮細胞の場合、適切な染色体数は46である。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、正常核型を有する。核型を決定する方法には、中期拡散分析によるものがある。もちろん、例えば、腫瘍幹細胞に由来する腫瘍オルガノイド内の腫瘍細胞は、ゲノムの不安定性が特定のがんの特徴であるため、必ずしも適切な染色体数を有するとは限らないことを理解されたい。

【0216】

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、腫瘍オルガノイドである。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、非がん性上皮幹細胞の培養から結果として生じるオルガノイドと類似する高密度構造体である。その他の実施形態では、腫瘍オルガノイド

10

20

30

40

50

は、嚢胞性構造体である。いくつかの実施形態では、異なる患者に由来する腫瘍オルガノイドは、異なる形態を示す。オルガノイド形態は、明視野顕微鏡法を含む画像解析などの技術を使用して評価され得る。

【0217】

いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドは、腫瘍特異性の組織病理学的変化または特性を保持する。このような変化は、腫瘍組織に由来するオルガノイドと、同じ患者の隣接する上皮とを比較することによって、及び／または腫瘍オルガノイドを初代組織標本と比較することによって同定することができる。

【0218】

いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、高密度構造体または嚢胞性構造体である。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、形質転換された上皮腫瘍細胞を含む。いくつかの実施形態では、複数の腫瘍オルガノイドは、複数の形質転換された上皮腫瘍細胞を主に含む。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、形質転換された上皮腫瘍細胞のみを含有する（すなわち、形質転換されていない上皮細胞は、腫瘍オルガノイドに存在しない）。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、免疫要素、結合組織要素、及び／または血管要素を含まない。当業者であれば、形質転換された上皮腫瘍細胞の存在は、ケラチン（KRT5）免疫染色を含む種々の方法によって評価できることを理解されるであろう。

【0219】

いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドは、Nutlin-3などのMdm2アゴニストをさらに含む本発明の培養液中での培養によって選択される。Mdm2アゴニストは、培養プロセスの全体または一部で存在し得る。いくつかの実施形態では、Nutlin-3は、約10 μ Mの濃度で存在する。Nutlin-3は、p53野生型細胞の増殖を阻止する。P53は、がん抑制遺伝子である。したがって、例えば、p53遺伝子の突然変異またはp53の他の誤調節によって生じるp53の機能の低下は、腫瘍形成の一般的な原因である。したがって、Nutlin-3の存在下でオルガノイドを培養するならば、p53のレベルまたはp53の活性が低下したオルガノイドが選択され、この培養は腫瘍オルガノイドを選択する方法として使用され得る。

【0220】

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイド及び腫瘍オルガノイドは、異なるトランスクリプトーム特性を有する。いくつかの実施形態では、トランスクリプトーム解析の主成分分析に基づいて、本発明の複数のオルガノイドは、一緒にクラスターを形成し、また本発明の複数の腫瘍オルガノイドは、一緒にクラスターを形成する。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイド及び腫瘍オルガノイドは、差次的遺伝子発現を有する。例えば、KLK6及び／またはEHFは、HNSCC腫瘍オルガノイドでダウンレギュレートされる。これに対して、SLCOB1、HOXC13、CALB1、NTS及び／またはBCH Eは、HNSCC腫瘍オルガノイドでアップレギュレートされる。非腫瘍オルガノイドと腫瘍オルガノイドとの間で差次的発現を示すことがあるさらなる遺伝子には、SDC2、HOXA1、NXPE3及び／またはHOXC10が含まれる。いくつかの実施形態では、対応する非腫瘍オルガノイドと腫瘍オルガノイドとが比較される場合、50を超える差次的発現遺伝子、100を超える差次的発現遺伝子、200を超える差次的発現遺伝子または300を超える差次的発現遺伝子が存在する。

【0221】

いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドは、腫瘍に関連して検出される突然変異の可変対立遺伝子頻度が高い。変異体対立遺伝子頻度は、試料内で突然変異が検出される頻度を意味し、例えば、これは、配列決定解析による解読で特定の突然変異が含まれる割合として表される場合がある。

【0222】

いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドの遺伝子改変は、オルガノイドが由来する腫瘍の遺伝子改変を再現する。遺伝子改変には、単一ヌクレオチド変異、ならびに

10

20

30

40

50

小さな挿入及び欠失が含まれる。いくつかの実施形態では、がん細胞由来ではない本発明のオルガノイドは、がん細胞に由来する本発明の腫瘍オルガノイドよりも少ない遺伝子改変を含む。

【0223】

染色体の誤分離は、ヒト腫瘍で頻繁に観察される異数性の原因となる。染色体分離エラーは、後期ブリッジ及び多極分裂を起こしている二核細胞を含む。誤分離の割合の増加は、がんでは一般的に観察される染色体不安定性として知られている表現型をもたらす。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、染色体不安定性を示す。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、がん細胞ではない細胞に由来するオルガノイドと比べて、染色体分離エラーの割合が高い。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、後期ブリッジ及び／または多極分裂を起こしている二核細胞を含む染色体分離エラーの割合が高い。

10

【0224】

いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドは、正常核型を有していない。いくつかの実施形態では、腫瘍オルガノイドは、異数性を示す。オルガノイドの核型、すなわち染色体数は、中期拡散分析によって同定することができる。

【0225】

いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドは、皮下移植されるときに腫瘍形成性である。ヒトオルガノイドの腫瘍形成能は、上記オルガノイドのマウスへの皮下移植によって決定される場合がある。典型的には、非腫瘍オルガノイドを皮下移植しても、腫瘍は形成されず、または少なくともオルガノイドは増殖しない。いくつかの実施形態では、本発明の腫瘍オルガノイドは、培養中にその腫瘍形成能を保持し、皮下移植の後、親腫瘍に類似する特性の腫瘍を形成することができる。このような特性には、がん性、三極有糸分裂像、核多型及び／または筋肉浸潤に関係する異型性のレベルが含まれる場合がある。

20

【0226】

本発明の増殖オルガノイドは、好ましくは、少なくとも50%の生細胞、より好ましくは少なくとも60%の生細胞、より好ましくは少なくとも70%の生細胞、より好ましくは少なくとも80%の生細胞、より好ましくは少なくとも90%の生細胞を含む。細胞の生存率は、FACSにてヘキスト染色またはヨウ化プロピジウム染色を使用して評価することができる。いくつかの実施形態では、本発明の1つ以上の凍結オルガノイドが提供される。凍結向けにオルガノイドを調製する方法もまた提供され、この方法は、オルガノイド培養物を分離することと、それらを再生細胞培養凍結媒体(Gibco)などの凍結媒体と混合することと、標準的な手順に従って凍結することと、を含む。凍結オルガノイドを解凍する方法もまた提供され、この方法は、凍結オルガノイドを解凍することと、細胞外マトリックス(例えば、Matrigel)に解凍したオルガノイドを包埋することと、本発明の培養液中でオルガノイドを培養することと、を含む。有利には、最初の解凍後、培養液に、Y-27632、例えば、約10uMのY-27632が補充されてよい。いくつかの実施形態では、解凍後、最初の1、2、3、4、5日目までに、好ましくは最初の3また4日間に、培養液にY-27632が補充される。いくつかの実施形態では、Y-27632は、最初の3、4、5、6日以上後に、好ましくは、最初の3または4日後に、培養液中に存在しない。この凍結方法は、本発明のオルガノイドの増殖にて使用可能である。

30

40

【0227】

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドまたは腫瘍オルガノイドは、凍結保存される。

【0228】

分化

オルガノイドまたはオルガノイドからの細胞は、分化培地に移され、全ての主要な分化細胞系統への分化が可能になるか、または分化が誘導される場合がある。

【0229】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、上皮幹細胞または幹細胞の集団を増殖培地で

50

培養する第1ステップと、増殖した細胞または増殖オルガノイドを分化培地で培養する第2ステップとを含む。いくつかの実施形態では、インテグリンアゴニストは、これらのステップのうち1つでのみ培養液中に含まれる。その他の実施形態では、インテグリンアゴニストは、これらのステップの両方で培養液中に含まれる。

【0230】

いくつかの実施形態では、分化培地は、分裂促進成長因子、TGF β 阻害剤、プロスタグランジンシグナル伝達経路の活性化剤、Wntアゴニスト、cAMP経路活性化剤、BMP阻害剤及びニコチンアミドのうち1つ以上が含まれない、本明細書にて開示するような培養液を含む（例えば、WO2012/168930に記載されている）。いくつかの実施形態では、分化培地は、動物またはヒト細胞用の基礎培地を含む。いくつかの実施形態では、分化培地は、EGFR経路阻害剤、Notch阻害剤、Wnt阻害剤またはBMP経路活性化剤のうち1つ以上をさらに含む（例えば、WO2017220586に記載されている）。

10

【0231】

いくつかの実施形態では、分化培地で上皮幹細胞の集団を培養することは、成熟上皮細胞マーカーの発現レベルを上昇させる。定量PCRを含む遺伝子またはタンパク質発現を測定する異なる技術を当業者であれば認識しているであろう。

【0232】

オルガノイドの使用

本発明のオルガノイドは、*in vivo*の状況を忠実に表す。これは、正常組織から増殖したオルガノイドと、患部組織から増殖したオルガノイドの両方に当てはまる。したがって、本発明のオルガノイドは、医学及び診断、ならびに研究及び薬物開発において有用である。本発明のオルガノイドは、正常な*ex vivo*細胞／臓器モデルを提供することに加えて、疾患及び／または感染の*ex vivo*モデルとして使用することが可能である。したがって、本発明のオルガノイドは、創薬及びバリデーション、標的発見及びバリデーション、毒性学、感染モデルならびにその他の研究目的を含む、薬物スクリーニングにて使用可能である。本発明のオルガノイドによって研究される可能性がある疾患としては、遺伝性疾患、代謝性疾患、病原性疾患及び炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。オルガノイドはまた、移植に適しており、ゆえに、再生医療向けとなる可能性もある。加えて、オルガノイドは、いずれの個体の細胞からでも早急に増殖させることができるので、例えば個別化医療に関連して、適切な治療法を特定するために使用することができる。オルガノイドのいくつかの使用については、以前の出願にて（例えば、WO2009/022907、WO2010/090513、WO2012/014076、WO2012/168930、WO2015/173425、WO2016/083613及びWO2016/083612にて）記載されており、これらの使用は、本発明のオルガノイドにも適用される。

20

30

【0233】

上記各例は、使用に適したオルガノイドの特性に関する詳細を提示しているが、さらなる特定の例について下記に提示する。

【0234】

薬物スクリーニング

本発明は、薬物スクリーニング、標的バリデーション、標的発見、毒性学または毒性学スクリーンにおけるオルガノイド（または上記オルガノイドから直接採取される細胞）の使用を提供する。

40

【0235】

細胞は、複数の濃度の試験薬剤に一定期間曝露されることが好ましい。曝露期間の最後に、培養物が評価される。オルガノイドは、上皮がん細胞を特異的に標的とする薬物を特定するために使用することもできる。本発明のオルガノイドは、感染性、炎症性及び腫瘍性病状向けの薬物スクリーニングツールとして広範に適用可能であることを、当業者であれば理解されるであろう。いくつかの実施形態において、本発明は、薬物スクリーニング、

50

標的バリデーション、標的発見、毒性学、毒性学スクリーンまたは *ex vivo* 細胞／臓器モデルにおけるオルガノイドの使用を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、臨床結果を予測する *ex vivo* 方法におけるオルガノイドの使用を提供する。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、抗がん剤のスクリーニングに使用することができる。

【0236】

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、薬物、化粧品及び／または予防薬としての使用に対する適合性について、化学物質、抗体、天然物（植物抽出物）などのライブラリを試験するために使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、がん患者からの腫瘍細胞など、目的の患者からの細胞生検材料は、本発明の培養液及び方法を使用して培養し、次いで、化学的化合物または化学的ライブラリを用いて処理することができる。その後、どの化合物が患者の細胞を効果的に改質、殺傷及び／または治療するかを決定することが可能である。これにより、特定の薬物に対する特定の患者の応答性を試験することが可能になるので、特定の患者に合わせて治療を調整することができる。したがって、これにより、個別化医療アプローチが可能になる。いくつかの実施形態では、薬物スクリーニング法は、個別化理論を導き、及び／または臨床結果を予測する *ex vivo* 法である。いくつかの実施形態において、本発明は、個別化療法を導く方法にて使用するオルガノイドを提供する。このような方法で薬物を特定するためにオルガノイドを使用する付加的な利点は、正常なオルガノイド（健康な組織に由来するオルガノイド）をスクリーニングして、どの薬物及び化合物が健康な組織に与える影響が最も少ないかを確認することが可能であるということである。これにより、適切でない活性または望ましくない副作用を最小限に抑えた薬物のスクリーニングが可能になる。

【0237】

いくつかの実施形態において、本発明は、候補化合物の効果を試験する方法を提供するが、この方法は、本発明の方法に従って、任意選択で21日未満、上皮幹細胞または上皮幹細胞の集団を培養することと、得られた細胞の集団または得られたオルガノイドを候補化合物の1つまたはライブラリに曝露することと、任意の効果について上記増殖したオルガノイドを評価することと、上記効果をもたらす候補分子を潜在的な薬物として特定することと、任意選択で、上記候補分子を、例えば薬物として提供することとを含む。

【0238】

いくつかの実施形態では、候補化合物の効果を試験する方法は、候補化合物の存在下または不存在下にてオルガノイドを放射線に曝露することを含む。いくつかの実施形態では、候補化合物の効果を試験する方法で評価される効果は、増殖の減少もしくは喪失、形態学的変化、細胞死、または遺伝子もしくはタンパク質発現の変化、を含むリストから選択される。

【0239】

候補分子のライブラリは、2つ以上の候補分子を含む。

【0240】

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の方法に従って、任意選択で21日未満、上皮幹細胞または上皮幹細胞の集団を培養することと、得られたオルガノイドまたは得られたオルガノイドに由来する細胞の集団を、放射線などの治療に、及び／または候補分子の1つまたはライブラリに曝露することと、候補分子の任意の効果について、上記オルガノイドまたは細胞の集団を評価することと、上記効果を、オルガノイドの特徴、例えば、PIK3CA、KRAS、HRASまたはBRAFを含む、EGFRシグナル伝達経路における突然変異などの1つ以上の遺伝子突然

変異の存在と相関させることと
を含む方法を提供する。

【0241】

いくつかの実施形態において、本発明は、
本発明の方法に従って、任意選択で21日未満、上皮幹細胞または上皮幹細胞の集団を培養することと、
得られたオルガノイドまたは得られたオルガノイドに由来する細胞の集団を、放射線などの治療に、及び／または候補分子の1つまたはライブラリに曝露することと、
候補分子の任意の効果について、上記オルガノイドまたは細胞の集団を評価することと、
上記効果を標準値及び／または過去の観測結果と比較することと、任意選択で、
臨床結果を予測することと、及び／または個別化医療を選択することと
を含む方法を提供する。

10

【0242】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、患者の生検材料に由来する。いくつかの実施形態では、オルガノイドまたは上記オルガノイドに由来する細胞の集団へ所望の効果をもたらす候補分子は、上記患者に投与される。したがって、一態様において、患者を治療する方法が提供されるが、この方法は、

20

- a) 目的の患者の患部組織から生検材料を採取することと、
 - b) 好ましくは本明細書に記載の上皮幹細胞を培養する方法を使用して、オルガノイドから採取した生検材料を培養することと、
 - c) 本発明のスクリーニング法を使用して好適な薬物を特定することと、
 - d) ステップ(c)で得られた薬物を用いて上記患者を治療することと
- を含む。

【0243】

いくつかの実施形態において、本発明は、患者に対する治療法を選択する方法を提供するが、この方法は、
任意選択で患者の組織から生検材料を採取することと、
好ましくは本明細書に記載の上皮幹細胞を培養する方法を使用して、オルガノイドを得るために、生検材料、生検材料の組織断片、生検材料の上皮幹細胞または生検材料の上皮幹細胞の集団を培養することと、
得られたオルガノイドを放射線及び／または1つ以上の候補化合物を含む治療法に曝露することと、
任意の効果について上記オルガノイドを評価することと、
上記効果をもたらす治療法を特定することと、
任意選択で上記治療法を患者に提供することと
のステップを含む。

30

【0244】

移植及び医療

本発明は、再生医療及び／または移植におけるオルガノイドの使用を提供する。本発明はまた、治療法も提供するが、この方法は、オルガノイドを動物またはヒトに移植することを含む。

40

【0245】

いくつかの実施形態において、本発明は、診断または医療にて使用するオルガノイドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、診断または医療にて、任意選択で、個別化医療もしくは診断、または再生医療にて使用するオルガノイドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明のオルガノイドを投与するステップを含む、疾患を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、疾患を治療するための医薬品の製造における本発明のオルガノイドの使用を提供する。

【0246】

インテグリンアゴニストの使用

50

本発明は、任意選択で本明細書に記載のいずれかの培養法及び／または培養液を使用して、細胞を培養するための本明細書で定義するようなインテグリンアゴニストの使用を提供する。

【0247】

細胞を患者に移植する前に、本明細書で定義するようなインテグリンアゴニストに *in vitro* で細胞を接触させることが有用である場合もある。したがって、本発明は、患者への移植の前に、細胞を前処理するためのインテグリンアゴニストの使用を提供する。

【0248】

細胞移植を改善するために患者にインテグリンアゴニストを直接投与することも有用である場合がある。したがって、本発明はまた、細胞移植法における、細胞接着増強物質として使用するための本明細書で定義するようなインテグリンアゴニストも提供する。本発明はまた、細胞を患者に移植する方法も提供するが、この方法は、本明細書で定義するようなインテグリンアゴニストの患者への投与を含む。

【0249】

この文脈におけるインテグリンアゴニストによる前処理またはインテグリンアゴニストの投与により、細胞接着を増強し、移植療法の成功率を高めることが期待される。これは、再生医療において、例えば、細胞移植療法によって利益がもたらされる可能性がある、肝臓疾患、糖尿病または任意の他の疾患の治療に対して、有用である可能性がある。

【0250】

インテグリンアゴニストのこれらの使用は、上皮幹細胞だけではなく、全ての細胞型にとって有益であることが期待される。特に、造血幹細胞、胚幹細胞、または誘導多能性幹細胞を含む幹細胞にとって有益であることが期待される。インテグリンアゴニストの使用は、造血幹細胞培養において特に有用であることが期待される（造血幹細胞は、何十年にもわたって、多くの病院で日常的に使用されてきたが、培養中にこれらの細胞を実用的に増殖させることは未だ実現していない）。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、造血幹細胞である。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞であり、任意選択で、上皮幹細胞、造血幹細胞、胚幹細胞、または誘導多能性幹細胞である。

【0251】

定義

本明細書で使用される場合、動詞「含む」及びその活用形は、非限定的な意味で使用され、その言葉に付随する項目を包含し、かつ特に言及していない項目も包含することを意味する。加えて、動詞「で構成される」は、必要に応じて、「本質的に～で構成される」に置き換え可能であり、これは、本明細書で定義するような生成物が、具体的に特定されたもの以外に追加の成分（複数可）を含み得るが、上記追加の成分（複数可）は、本発明の独特の特徴を変えるものではないことを意味する。さらに、本明細書で定義するような方法は、具体的に特定されたもの以外の追加のステップ（複数可）を含み得るが、上記追加のステップ（複数可）は、本発明の独特の特徴を変えるものではない。さらに、不定冠詞「1つの（a）」または「1つの（an）」による要素への言及は、その要素が1つ及び1つのみ存在すると文脈が明確に定めていない限り、複数の要素が存在する可能性を除外するものではない。したがって、不定冠詞「1つの（a）」または「1つの（an）」は、通常、「少なくとも1つ」を意味する。

【0252】

本明細書で使用される場合、用語「約」または「およそ」は、提示される値が+/- 10%変動し得ることを意味する。値は、正確な値としても読み取れる場合があるため、用語「約」は省略されることもある。例えば、用語「約100」は、90～110、及び100を包含する。

【0253】

本明細書に引用される全ての特許及び文献は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0254】

10

20

30

40

50

薬剤を患者に投与することを含む治療法に対するあらゆる言及は、上記治療法にて使用する薬剤、ならびに、上記治療法における薬剤の使用、及び医薬品の製造における薬剤の使用を包含する。

【0255】

以下の実施例は、例証目的で提示されるにすぎず、決して本発明の範囲を限定するようには意図されていない。

【0256】

実施形態

本発明は、以下の番号付けされた実施形態を含む。

【0257】

1. 上皮幹細胞または上皮幹細胞を含むオルガノイドを培養する方法であって、前記方法は、上皮幹細胞に適した培養液中で前記上皮幹細胞を培養することを含み、前記培養法は、前記細胞または前記オルガノイドをインテグリンアゴニストに接触させることをさらに含む、前記方法。

【0258】

2. 前記インテグリンアゴニストは、インテグリンの β サブユニットと相互作用する、実施形態1に記載の方法。

【0259】

3. 前記 β サブユニットは、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ または $\beta 7$ である、実施形態2に記載の方法。

【0260】

4. 前記インテグリンアゴニストは、前記 $\beta 1$ サブユニットと相互作用する、実施形態3に記載の方法。

【0261】

5. 前記インテグリンアゴニストは、インテグリンの α サブユニットと相互作用する、実施形態1に記載の方法。

【0262】

6. 前記インテグリンアゴニストは、抗インテグリン抗体、タリン、キンドリン、ジチオスレートール及びオキシステロール25-ヒドロキシコレステロールから選択される、実施形態1～5のいずれか1項に記載の方法。

【0263】

7. インテグリンの前記アゴニストは、抗インテグリン抗体である、実施形態1～6のいずれか1項に記載の方法。

【0264】

8. 前記抗インテグリン抗体は、JBS2、HP1/3、SNAKA51、PT25-2、PMI-1、MEM-83、NKI-L16、496B、12G10、8A2、TS2/16、15/7、HUTS-4、8E3、N29、9EG7、mAb 24、MEM-148、KIM127、CBRLFA-1/2、MEM-48、KIM185、AP3、AP5、LIBS6、LIBS2、10F8、2B8、2G3である、実施形態7に記載の方法。

【0265】

9. 前記抗インテグリン抗体は、TS2/16、12G10、8A2、15/7、HUTS-4、8E3、N29または9EG7である、実施形態8に記載の方法。

【0266】

10. 前記抗インテグリン抗体は、TS2/16、12G10または8A2である、実施形態9に記載の方法。

【0267】

11. 前記抗体は、ヒト化されている、実施形態7～10のいずれか1項に記載の方法。

【0268】

12. 前記インテグリンアゴニストは、タリンである、実施形態1～6のいずれか1項に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【0269】

13. 前記タリンは、キンドリンと組み合わせて使用される、実施形態12に記載の方法。

【0270】

14. 前記インテグリンアゴニストは、ジチオスレイトールなどの還元剤である、実施形態1～6のいずれか1項に記載の方法。

【0271】

15. 前記インテグリンアゴニストは、オキシステロール25-ヒドロキシコレステロールなどの脂質である、実施形態1～6のいずれか1項に記載の方法。

【0272】

16. 前記方法は、オルガノイドの増殖をもたらす、実施形態1～15のいずれか1項に記載の方法。

【0273】

17. 前記方法は、前記インテグリンアゴニストなしで実施される同じ方法と比較して、4日間にわたって少なくとも10%、20%、50%の上皮幹細胞増殖の増加をもたらす、実施形態1～16のいずれか1項に記載の方法。

【0274】

18. 前記方法は、細胞外マトリックスと接触させて前記細胞を培養することをさらに含む、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0275】

19. 前記細胞外マトリックスは、基底膜抽出物またはMatrigelである、実施形態18に記載の方法。

【0276】

20. 前記方法は、人工マトリックスと接触させて前記細胞を培養することをさらに含む、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0277】

21. 前記人工マトリックスは、ポリマー、任意選択でポリエステル、ポリエチレングリコールまたはヒドロゲルを含む、実施形態20に記載の方法。

【0278】

22. 前記人工マトリックスは、架橋ポリエチレングリコール(PEG)ヒドロゲルを含む、実施形態20または実施形態21に記載の方法。

【0279】

23. 前記人工マトリックスは、生体材料、好ましくは細胞外マトリックス成分を含む、実施形態20～22に記載の方法。

【0280】

24. 前記生体材料は、1つ以上の糖タンパク質(任意選択でコラーゲン、ラミニン、パールカン、フィブロネクチン、またはフィブロネクチンのRGD接着リガンドから選択される)、及び／または1つ以上の炭水化物(任意選択でヒアルロン酸)である、実施形態23に記載の方法。

【0281】

25. 前記細胞外マトリックスまたは前記人工マトリックスは、3次元である、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0282】

26. 前記細胞外マトリックスまたは前記人工マトリックスは、懸濁した状態である、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0283】

27. 前記培養法は、前記細胞を外因的な細胞外マトリックスと接触させることを含まない、実施形態1～17及び20～26のいずれか1項に記載の方法。

【0284】

10

20

30

40

50

28. 前記上皮幹細胞は、上皮幹細胞の集団の一部であり、任意選択でオルガノイド及び／または上皮組織外植片に含まれる、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0285】

29. 前記方法は、非上皮細胞型、任意選択で免疫細胞との共培養を含む、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0286】

30. 前記上皮幹細胞は、哺乳類細胞である、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0287】

31. 前記上皮幹細胞は、ヒト細胞である、実施形態30に記載の方法。

10

【0288】

32. 前記上皮幹細胞は、結腸直腸、小腸、胃、脾臓、肝臓、肺、乳房、前立腺、腎臓、口、鼻咽頭、咽喉、下咽頭、喉頭、気管、皮膚、卵管、卵巣、唾液腺、食道、毛嚢及び／または蝸牛細胞から選択される、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0289】

33. 前記上皮幹細胞は、結腸直腸細胞である、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0290】

34. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、Wntアゴニスト、BMP阻害剤、分裂促進成長因子、及びTGFβ阻害剤のうち1つ以上を含む、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

20

【0291】

35. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、Wntアゴニストを含む、実施形態34に記載の方法。

【0292】

36. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、分裂促進成長因子及び／またはBMP阻害剤をさらに含む、実施形態35に記載の方法。

【0293】

37. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、Wntアゴニスト、BMP阻害剤、分裂促進成長因子及びTGFβ阻害剤を含む、実施形態34～36に記載の方法。

30

【0294】

38. 前記Wntアゴニストは、R-スポンジンファミリータンパク質、分泌性糖タンパク質のWntファミリーからのWntリガンド、細胞内β-カテニン分解の阻害剤、GSK-3阻害剤、TCF/LEF活性化剤、RNF43またはZNRF3阻害剤のうち1つ以上から選択される、実施形態34～37に記載の方法。

【0295】

39. 前記分裂促進成長因子は、EGFR、FGFRまたはHGFなどの受容体チロシンキナーゼに結合する、実施形態34～38に記載の方法。

【0296】

40. 前記分裂促進成長因子は、EGF、FGF及びHGFのうち1つ以上である、実施形態34～39に記載の方法。

40

【0297】

41. 前記BMP阻害剤は、ノギンである、実施形態34～40に記載の方法。

【0298】

42. 前記TGFβ阻害剤は、ALK4、ALK5またはALK7シグナル伝達経路の阻害剤である、実施形態34～41に記載の方法。

【0299】

43. 前記TGFβ阻害剤は、A83-01などの小分子阻害剤である、実施形態34～42に記載の方法。

【0300】

50

44. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、ニコチンアミド、ガストリン、B27及びN-アセチルシステインのうち1つ以上をさらに含む、実施形態34～43に記載の方法。

【0301】

45. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、上皮幹細胞を増殖するのに適している、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0302】

46. 前記上皮幹細胞に適した培養液は、上皮幹細胞を分化するのに適している、先行実施形態のいずれか1項に記載の方法。

【0303】

47. 実施形態34～46のいずれか1項に規定される培養液であって、実施形態2～15に規定されるインテグリンアゴニストをさらに含む、前記培養液。

10

【0304】

48. 実施形態18～27のいずれか1項に規定される細胞外マトリックスまたは人工マトリックスであって、実施形態2～15に規定されるインテグリンアゴニストをさらに含む、前記マトリックス。

【0305】

49. 実施形態1～46のいずれか1項に記載の方法によって採取可能な、または採取されるオルガノイド。

【0306】

50. 前記オルガノイドは、正常核型を有する、実施形態49に記載のオルガノイド。

20

【0307】

51. 前記オルガノイドは、ロゼット様構造を有する、実施形態49または実施形態50に記載のオルガノイド。

【0308】

52. 前記オルガノイドは、腫瘍オルガノイドである、実施形態49に記載のオルガノイド。

【0309】

53. 実施形態47に記載の培養液、及び実施形態49～52のいずれか1項に記載のオルガノイドを含む組成物。

【0310】

30

54. 実施形態47の培養液、及び任意選択で実施形態18～27のいずれか1項に規定される細胞外マトリックスまたは人工マトリックスを含む、組成物。

【0311】

55. 細胞を培養するためのインテグリンアゴニストの使用。

【0312】

56. 患者への移植の前に、細胞を前処理するためのインテグリンアゴニストの使用。

【0313】

57. 細胞移植法における、細胞接着増強物質として使用するためのインテグリンアゴニスト。

【0314】

40

58. 前記細胞は、幹細胞、任意選択で上皮幹細胞、造血幹細胞、誘導多能性幹細胞または胚幹細胞である、実施形態53もしくは54に記載の使用、または実施形態56に記載の使用のためのインテグリンアゴニスト。

【0315】

59. 薬物スクリーニング、標的バリデーション、標的発見または毒性学のための、実施形態49～52のいずれか1項に記載のオルガノイドの使用。

【0316】

60. 治療にて使用するための、または診断にて使用するための、実施形態49～52のいずれか1項に記載のオルガノイド。

【実施例】

50

【0317】

実施例1－ヒト化TS2／16抗体の作製

ヒト化TS2／16抗体は、U-Protein Express BV, Utrecht, The Netherlandsによって作製された。これには、人工遺伝子設計及びコドン最適化を介した抗体可変ドメインのコード配列の生成も含まれた。重鎖及び軽鎖の定常領域を含むフレームにおいて、5'及び3'末端でBsmBI制限酵素認識部位を使用して、抗体可変ドメインの人工断片を抗体発現ベクターにライゲーションして発現ベクターを生成した。rPEX技術を介してHEK293細胞またはCHO細胞で抗体発現ベクターを一時的に生成し、続いて、アフィニティークロマトグラフィー（タンパク質A）、イオン交換クロマトグラフィー及び／またはゲル濾過クロマトグラフィーを介して組換え抗体を精製した。

10

【0318】

NU-PAGE Tris-Acetate Gel／SDSバッファースystem（Invitrogen）を使用して、非還元条件下でヒト化抗体を解析した。結果のNuPAGEゲルを図2に示す。比率が1：1及び1：1.5の重鎖とL鎖の発現プラスミドのトランスフェクションは、比率が1：3のものに比べて、ゲルでより濃いタンパク質バンドを形成した。ヒト化抗体の重鎖及び軽鎖を配列決定し、それぞれ配列番号3及び4であることが判明した。重鎖及び軽鎖のCDR領域は、それぞれ配列番号5～7及び配列番号8～10であることを同定した。

20

【0319】

実施例2－ヒト化TS2／16抗体によるインテグリンβ1認識の試験

K562細胞（ヒト不死化骨髄性白血病細胞株）を、馴化培地でヒト化TS2／16抗体と共にインキュベートした。ヒト赤血白血病細胞株K562は、β1クラスのインテグリンであるα5β1のみをその表面で発現する[17]。PBS（1%BSA）中、1：250の希釈で、細胞を、Alexa488を結合させたヤギ抗ヒトIgG1（Life Technologies（A11013））と共にインキュベートすることによって、抗体結合を視覚化した（図3）。結果は、抗体が細胞表面のインテグリンに正常に結合したことを示した。

【0320】

実施例3－ヒト化TS2／16抗体の機能的活性の確認

フィブロネクチンへの細胞接着を誘導するヒト化TS2／16抗体の能力を、[17]に記載されているように試験した。簡単に述べると、96ウェルプレートを、BSAまたはフィブロネクチン（PBS中5μg／ml）で一晩コーティングした。続いて、非特異的結合部位を、PBS（1%BSA）で30分間ブロックした。ヒト赤血白血病細胞株K562細胞（10⁵細胞／ウェル）を、ヒト化TS2／16の存在下または不存在下にて37℃で1時間インキュベートした。実験を3回実施した。ウェルをPBSで2回すすぐことによって、非結合細胞を除去した。結合細胞を、細胞ATP駆動型CellTiter Gloアッセイ（Promega）を使用して定量化した。簡単に述べると、CellTiter Glo（登録商標）アッセイにより、代謝活性のある細胞の存在を知らせるATPの存在の定量化に基づいて培養中の生細胞の数を計測した。

30

40

【0321】

図4は、ヒト化TS2／16抗体が、非ヒト化バージョンの抗体で以前に実証されているのと同様にフィブロネクチンへの細胞接着を誘導できるが、対照BSAに対しては誘導しないことを示している。

【0322】

類似の実験を、β1インテグリンサブユニットを標的とする別の抗インテグリンアゴニスト抗体である、MAB1778抗体を用いて実施した。MAB1778は、これらの細胞の接着を誘導することができた。

【0323】

実施例4－細胞外マトリックス成分を含まない培養液中での上皮幹細胞の培養

50

本発明者らは、インテグリンアゴニストの添加により、外因的に添加される細胞外マトリックス成分を含まない培養液中で上皮幹細胞の増殖が可能になるかどうかを試験した。既に言及したように、培養液中の細胞外マトリックスの存在は、効率的な上皮幹細胞増殖に必要な条件であることが知られている。

【0324】

単一のヒト上皮結腸幹細胞を[18]に記載されているように使用した。単一のヒト上皮結腸幹細胞を、後述のように、培養液を含有するCorning超低接着96ウェル平底プレートにプレーティングした。Corning超低接着表面は、親水性で電荷的に中性であり、ポリスチレン容器表面に共有結合したコーティングである。ヒドロゲルは、特異的及び非特異的固定化を抑止し、細胞を浮遊状態とし、3次元ステロイドの形成を可能にする。コーティングは、安定で無細胞毒性であり、生物学的に不活性であり、非分解性である。

10

【0325】

培養液は、B27、ニコチンアミド、N-アセチルシステイン、ノギン、R-スポンジン1、EGF、WNT馴化培地[19]、TGF- β I型受容体阻害剤A83-01及びP38阻害剤SB202190を含む高度DMEM/F12培地を含有していた。特に、培養液は、細胞外マトリックスを含有していなかった。

【0326】

次に、単一のヒト上皮結腸幹細胞を、1:100、1:200及び1:400の希釈で、または抗体なしで、TS2/16馴化培地(UPe)を補充したヒト結腸オルガノイド培地で培養した。処理条件ごとに3回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後4日目及び7日目に、オルガノイドの総数を数えることにより測定した(図5)。

20

【0327】

インテグリンアゴニストの添加により、ヒト化TS2/16抗体を含有していない培養液と比べて、上皮幹細胞増殖が増加した(図5参照)。最も低い希釈率1:400でインテグリンアゴニストの最適な効果が観察されたが、試験した全ての希釈率で、増殖率の増加が見られた。ヒト化TS2/16抗体を含む培養液中で増殖するオルガノイドの例を、図6に示す。

【0328】

本発明者らは、驚くべきことに、細胞外マトリックス成分を含有していない培養液へのインテグリンアゴニストの添加により、効率的な上皮幹細胞増殖を首尾よくもたらし得ることを実証した。陰性対照で観察されたように、細胞外マトリックス成分の不存在下では、上皮幹細胞は有意に増殖しない。したがって、細胞またはオルガノイドをインテグリンアゴニストと接触させることを含む培養法は、上皮幹細胞またはオルガノイドを培養するための改善された方法に使用することができる。

30

【0329】

本発明者らは、インテグリンアゴニストの添加により、驚くべきことに、細胞外マトリックスの不存在下で上皮幹細胞増殖を可能にすることができたので、インテグリンアゴニストは、細胞外マトリックスの構造的及びシグナル伝達機能を模倣することができると仮定する。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望まないが、インテグリンアゴニストは、インテグリンのコンフォメーション状態を変化させることにより、インテグリンリガンドに対してインテグリンを活性化させることができる。次に、インテグリンアゴニストはまた、シグナル伝達経路を活性化し、かつ上皮幹細胞増殖を促進するインテグリンリガンドの作用も模倣する。

40

【0330】

実施例5-細胞外マトリックスを含む培養液へのヒト化TS2/16抗体の添加
結腸上皮幹細胞を実施例4に記載されているように単離した。単一の細胞を、[20]に記載されているように、B27、ニコチンアミド、N-アセチルシステイン、ノギン、R-スポンジン1、EGF、WNT馴化培地(50%、安定にトランスフェクトされたL細胞を使用して生成される)、TGF- β I型受容体阻害剤A83-01及びP38阻害

50

剤 S B 2 0 2 1 9 0 を含む高度 D M E M / F 1 2 培地を含む培地で培養した。丸底 9 6 ウェルプレートにおいて 1 0 μ L 滴下の M a t r i g e l / ウェルで、細胞を懸濁させた。

【 0 3 3 1 】

細胞を、対照として上記の培地で処理するか（図 7 の棒 1）、または 2 倍希釈法でのヒト化 T S 2 / 1 6 抗体を補充した同じヒト結腸オルガノイド培地で処理した（図 7 の棒 2 ~ 4）。上皮幹細胞の増殖を、上述のように C e l l T i t e r - G l o（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（P r o m e g a）を使用して測定した。

【 0 3 3 2 】

結果は、細胞と M a t r i g e l の懸濁液を組み合わせた培養液へのインテグリンアゴニストの添加により、上皮幹細胞増殖が増加することを実証した。したがって、インテグリンアゴニストは、細胞外マトリックスから誘導されるシグナル伝達との組み合わせでも上皮幹細胞の増殖を改善することができる。

【 0 3 3 3 】

D y n a b e a d s で濃縮された M a t r i g e l を使用して、これらの結果を、さらなる実験で確認した。結腸上皮幹細胞を上記のように単離し、培養した。ただし、使用した M a t r i g e l は、プロテイン G でコーティングされた D y n a b e a d s（I n v i t r o g e n / T h e r m o f i s c h e r S c i e n t i f i c R e f 1 0 0 0 3 D）またはヒト化 T S 2 / 1 6 抗体を十分にしみ込ませたプロテイン G でコーティングされた D y n a b e a d s を加えることによって、改質した。図 8 は、ヒト化 T S 2 / 1 6 抗体で処理した結果（棒 2）と、ヒト化 T S 2 / 1 6 抗体で処理していない結果（棒 1）の 2 つを示す。これらのデータはまた、プロテイン G でコーティングされた D y n a b e a d s によって多価的に存在させたインテグリンアゴニストの添加により、古典的な M a t r i g e l 駆動型上皮細胞増殖が促進されることを示している。

【 0 3 3 4 】

結論として、インテグリンアゴニストは、外因的に添加される細胞外マトリックスの有無にかかわらず、可溶性成分としてそれを培養液へ添加することによって、上皮幹細胞またはオルガノイドの増殖を刺激することができる。インテグリンアゴニストは、細胞外マトリックスに組み込まれた場合に、例えば、担体で架橋され、M a t r i g e l と直混合された場合に、増殖を刺激することができる。

【 0 3 3 5 】

実施例 6 - 細胞外マトリックス成分を含まない培養液中での上皮幹細胞の培養に対する H U T S - 4 の影響

上述のように、各研究により、F a b インテグリン活性化抗体 T S 2 / 1 6、1 2 G 1 0 及び H U T S - 4 は、環状 R G D ペプチドに対してほぼ同一の高親和性を誘導できることが判明している。この観察結果は、これらの抗体が β 1 ドメインにおけるリガンド結合部位の同一のコンフォメーションを安定化させることを示唆している。本発明者らは、別のインテグリンアゴニスト、H U T S - 4 の添加により、外因的に添加される細胞外マトリックス成分を含まない培養液中での上皮幹細胞の増殖が可能かどうかを試験した。

【 0 3 3 6 】

ヒト結腸オルガノイドの断片を、実施例 4 に記載されているように、C o r n i n g 超低接着 9 6 ウェル平底プレート中で単離し、培養した。次に、これらのヒト結腸由来オルガノイド断片を、最終濃度が 1 μ g / m l の T S 2 / 1 6 もしくは H U T S - 4 を補充したヒト結腸オルガノイド培地で培養するか、または抗体なしで培養した。処理条件ごとに 3 回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後 7 日目に、C e l l T i t e r G l o A T P ベースアッセイを使用して生細胞を定量化することによって測定した（図 9）。

【 0 3 3 7 】

2 つの異なるインテグリンアゴニストの添加により、インテグリンアゴニスト抗体を含んでいない対照培養液と比べて、上皮幹細胞増殖が増加した（図 9 を参照）。3 つの全ての培養液試験における増殖するオルガノイドの例を、図 1 1 に示す。

【0338】

本発明者らは、驚くべきことに、細胞外マトリックス成分を含有していない培養液への2つの異なるインテグリンアゴニストの添加により、効率的な上皮幹細胞増殖を首尾よくもたらし得ることを実証した。したがって、細胞またはオルガノイドをインテグリンアゴニストと接触させることを含む培養法は、上皮幹細胞またはオルガノイド培養するための方法を改善するために使用することができる。これらのデータにより、本明細書に記載の培養法は、インテグリンアゴニストTS2/16、12G10及びHUTS-4に類似した環状RGDペプチドに対する親和性を有し、及び／またはTS2/16、12G10及びHUTS-4と同じインテグリンの頭部開放コンフォメーションを安定化することができる、インテグリンアゴニストに対して特に効果的である可能性があることが実証された。

10

【0339】

実施例7－切断されたオルガノイドから開始するMatrigelの不在下でのヒト結腸の増殖

本発明者らは、インテグリンアゴニストが、外因的に添加される細胞外マトリックス成分を含まない培養液中で、実施例4で使用したような単一の細胞ではなく、オルガノイドの断片（切断されたオルガノイド）から開始される、上皮幹細胞の増殖を改善させることができるかどうかを試験した。

【0340】

オルガノイド断片は、狭いピペット先端部材を通してオルガノイドを前後に繰り返し動かすことによって、機械的に採取した。断片化の程度を、顕微鏡でモニターした。ヒト上皮結腸オルガノイドの断片を、実施例4に記載されているように、培養液を含有するCorning超低接着96ウェル平底プレートにプレーティングした。

20

【0341】

次に、ヒト上皮結腸オルガノイドの断片を、ヒト化TS2/16を補充したヒト結腸オルガノイド培地、または抗体を含まないヒト結腸オルガノイド培地で培養した。処理条件ごとに5回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後7日目に、オルガノイドの総数を数えることにより測定した。

【0342】

オルガノイドの断片を用いて開始した培養物へのインテグリンアゴニストの添加により、ヒト化TS2/16抗体を含有していない培養液と比べて、上皮幹細胞増殖が増加した（図10参照）。ヒト化TS2/16抗体を含む培養液及び抗体を含まない培養液中で増殖するオルガノイドの例を、図12に示す。単一の上皮幹細胞ではなく、オルガノイドの断片を使用して上皮幹細胞培養を開始することに関連する利点がある。例えば、通常、単一の細胞ではなくオルガノイドの断片を用いて開始した培養物中で、オルガノイド増殖は改善される。さらに、単一の上皮幹細胞は、通常、細胞の表面からインテグリン受容体を切断できるトリプシンでオルガノイドを消化することによって採取される。したがって、細胞は、インテグリンアゴニストによる活性が起こり得る前に、その表面上のインテグリン受容体を置き換えるための時間を必要とする。

30

【0343】

本発明者らは、驚くべきことに、細胞外マトリックス成分を含有していない培養液へのインテグリンアゴニストの添加により、単一の上皮幹細胞とオルガノイドの断片の両方を用いて開始した培養物から効率的な上皮幹細胞増殖を首尾よくもたらし得ることを実証した。

40

【0344】

実施例8－Matrigel及び抗体AII B2の存在下でのヒト結腸増殖

AII B2は、インテグリンのβ1サブユニットに結合することができる既知のインテグリンアンタゴニスト抗体である。実施例3で試験したインテグリンアゴニストとは対照的に、AII B2は、ECM成分であるフィブロネクチン、ラミニン及びコラーゲンIVへの細胞接着を阻害することが明らかとなっている[21]。

【0345】

50

P 2 6 N 及び S T E M 1 5 9 N のヒト結腸由来オルガノイド断片を、実施例 6 に記載されているように単離した。次に、ヒト結腸由来オルガノイド断片を、実施例 5 に記載されているヒト結腸オルガノイド培地で培養した。試験した条件のいくつかでは、10 μ L 滴下の M a t r i g e l / ウェルで、断片を懸濁させた。下記の条件を試験した。

a) A I I B 2 と共に、または抗体を伴わない、M a t r i g e l の存在下の P 2 6 N オルガノイド断片。

b) A I I B 2 と共に、または抗体を伴わずに、M a t r i g e l 不存在下の P 2 6 N オルガノイド断片。

c) A I I B 2 と共に、または抗体を伴わない、M a t r i g e l の存在下の S T E M 1 5 9 N オルガノイド断片。

処理条件ごとに 2 回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後 7 日目に、オルガノイドの総数を数えることにより測定した。

【0346】

図 13 ~ 15 は、培養液中に A I I B 2 が存在すると、上皮幹細胞増殖を妨げることを示している。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望まないが、A I I B 2 の存在による上皮幹細胞増殖の欠如は、M a t r i g e l 中のリガンドによるインテグリンの活性化を阻止する A I I B 2 の能力に起因する。前述の通り E C M 中のリガンドまたはインテグリンアゴニストによるインテグリン活性化がなければ、上皮幹細胞は、培養中に成長及び増殖しない。

【0347】

オルガノイド中の上皮幹細胞は、細胞の頂端膜がオルガノイドの内腔に面している基底外側表現型である。M a t r i g e l の不存在下でのオルガノイドの増殖の場合、インテグリン β 1 受容体に対するリガンドが少ないことが起因して、参考文献 [22] に記載されているように、この分極は、頂端外側に転じる。この頂端外側表現型はまた、インテグリン関連の R O C K シグナル伝達が妨げられている、T T C 7 A 突然変異を有する患者で観察される [23]。この極性の反転はまた、A I I B 2 を含む M a t r i g e l 培養物でも生じる場合があるが、これは、この抗体が、I T G B 1 受容体と M a t r i g e l 中の細胞外マトリックス成分との相互作用を阻止するためである。A I I B 2 によって起こる極性の反転の原理は、M D C K 嚢胞で最初に発見された [24]。

【0348】

要約すると、細胞外マトリックス成分のインテグリン β 1 受容体は、基底外側表現型を有するオルガノイドの増殖を確実にするために不可欠である。本発明者らは、驚くべきことに、細胞外マトリックス成分を含有していない培養液へのインテグリンアゴニストの添加により、基底外側表現型の上皮幹細胞増殖を首尾よくもたらし得ることを実証した。

【0349】

実施例 9 - 細胞外マトリックス成分を含まない培養液中での膵臓上皮幹細胞の培養

本発明者らは、インテグリンアゴニストが、外因的に添加される細胞外マトリックス成分を含まない培養液中で、膵臓上皮幹細胞の増殖を改善させることができるかどうかを試験した。

【0350】

2 つの独立した膵臓オルガノイド株 W 1 5 - 5 0 0 4 0 及び W 1 5 - 5 0 0 2 0 の断片を、実施例 6 に記載の方法を使用して採取した。膵臓細胞を、[25] に記載されているように、H E P E S (1 x)、グルタマックス (1 x)、ペニシリン / ストレプトマイシン (1 x)、B 2 7 (1 x)、プリモシン (1 m g / m l)、N - アセチル - L - シス테인 (1 m M)、W n t 3 a - 馴化培地 (50 % 体積 / 体積)、R S P O 1 - 馴化培地 (10 % 体積 / 体積)、ノギン馴化培地 (10 % 体積 / 体積) または組換えタンパク質 (0.1 μ g / m l) 上皮細胞成長因子 (E G F、50 n g / m l)、ガストリン (10 n M)、線維芽細胞成長因子 10 (F G F 10、100 n g / m l)、ニコチンアミド (10 m M) 及び A 8 3 - 0 1 (0.5 μ M) を補充した A d D M E M / F 1 2 培地で培養した。

【0351】

次に、これらのヒト膵臓由来オルガノイド断片を、最終濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のTS2/16を補充したヒト膵臓オルガノイド培地で培養するか、または抗体なしで培養した。処理条件ごとに3回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後6日目に、Cell Titer Glo ATPベースアッセイを使用して生細胞を定量化することによって測定した(図16B)。増殖する膵臓オルガノイドの例を、図16Aに示す。

【0352】

インテグリンアゴニストの添加により、ヒト化TS2/16抗体を含有していない培養液と比べて、膵臓上皮幹細胞増殖が増加した(図16参照)。

【0353】

実施例10—細胞外マトリックスを含む培養液中での肺上皮幹細胞の培養

本発明者らは、インテグリンアゴニストが、細胞外マトリックスを含む培養液中で、肺上皮幹細胞の増殖を改善させることができるかどうかを試験した。

【0354】

肺オルガノイドの断片を、実施例6に記載の方法を使用して採取した。肺オルガノイド断片を、[26]に記載されているように、高度DMEM/F12、HEPES、プリモシン、ペニシリン/ストレプトマイシン、GlutaMax 100x、R-スポンジン1、FGF7、FGF10、ノギン、A83-01、Y-27632、SB202190、B27サブプリメント、N-アセチルシステイン及びニコチンアミドを含む培地で培養した。丸底96ウェルプレートにおいて $10\mu\text{L}$ 滴下のMatrigel/ウェルで、細胞を懸濁させた。

【0355】

次に、これらのヒト肺由来オルガノイド断片を、最終濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のTS2/16を補充したヒト肺オルガノイド培地で培養するか、または抗体なしで培養した。処理条件ごとに3回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後12日目に、Cell Titer Glo ATPベースアッセイを使用して生細胞を定量化することによって測定した(図17A)。増殖する肺オルガノイドの例を、図17Bに示す。

【0356】

インテグリンアゴニストの添加により、ヒト化TS2/16抗体を含有していない培養液と比べて、肺上皮幹細胞増殖が増加した(図17参照)。

【0357】

実施例11—細胞外マトリックスを含む培養液中での頭頸部上皮幹細胞の培養

本発明者らは、インテグリンアゴニストが、外因的に添加される細胞外マトリックス成分を含まない培養液中で、頭頸部上皮幹細胞の増殖を改善させることができるかどうかを試験した。

【0358】

頭頸部オルガノイドの断片を、実施例6に記載の方法を使用して採取した。頭頸部オルガノイド断片を、 $1\times\text{B}27$ サブプリメントを含む高度DMEM+/+/+、 1mM のN-アセチル-L-システイン、 10mM のニコチンアミド505、 $50\text{ng}/\text{ml}$ のヒトEGF、 500nM のA83-01、 $10\text{ng}/\text{ml}$ のヒトFGF10、 $5\text{ng}/\text{ml}$ のヒトFGF2、 $1\mu\text{M}$ のプロスタグランジンE2、 $3\mu\text{M}$ のCHIR-99021、 $1\mu\text{M}$ のフォルスコリン、4%のR-スポンジン及び4%のノギンを含む培地で培養した。丸底96ウェルプレートにおいて $10\mu\text{L}$ 滴下のMatrigel/ウェルで、細胞を懸濁させた。

【0359】

次に、これらのヒト頭頸部由来オルガノイド断片を、最終濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のTS2/16を補充したヒト頭頸部オルガノイド培地で培養するか、または抗体なしで培養した。処理条件ごとに3回の反復試験を実施した。上皮幹細胞の増殖率を、処理後7日目に、Cell Titer Glo ATPベースアッセイを使用して生細胞を定量化することによって測定した(図18B)。増殖する頭頸部オルガノイドの例を、図18Aに示す。インテグリンアゴニストの添加により、ヒト化TS2/16抗体を含有していない培養液と比

10

20

30

40

50

べて、頭頸部上皮幹細胞増殖が増加した（図18参照）。

【0360】

実施例12－抗体A s c 8の存在下でのヒト結腸増殖

A s c 8は、インテグリンの β 4サブユニットに結合する既知のインテグリンアンタゴニスト抗体である。A s c 8は、細胞接着を阻止し、かつ創傷閉鎖を阻害することが明らかとなっている[27]。

【0361】

結腸上皮幹細胞を、実施例4に記載されているように単離し、実施例5による培地で培養した。丸底96ウェルプレートにおいて10 μ L滴下のMatrigel/ウェルで、細胞を懸濁させた。細胞を、対照として上記の培地で処理するか、または下記のもので処理した。

10

(a) 最終濃度が0.3 μ g/mLのA s c 8。

(b) 最終濃度が1.2 μ g/mLのA s c 8。

(c) 最終濃度が5 μ g/mLのA s c 8。

(d) 最終濃度が1 μ g/mLのTS2/16。

【0362】

上皮幹細胞の増殖を、上述のようにCellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Promega）を使用して測定した。

【0363】

図19は、培養液中にA s c 8が存在すると、上皮幹細胞増殖を妨げることを示している。この観察結果は、実施例8に記載されているA I I B 2で観察されたものと類似する。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望まないが、この場合も、A s c 8の存在による上皮幹細胞増殖の欠如は、Matrigel中のリガンドによるインテグリンの活性化を阻止するこの抗体の能力に起因すると考えられる。

20

【0364】

実施例13－複数のインテグリンアゴニストの相乗効果

3 E 1は、 β 4インテグリンアゴニスト抗体である。インテグリン β 4がその天然のリガンドまたは活性化抗体に関与すると、 β 4細胞質のチロシンリン酸化が起こり、これにより、腫瘍の発生に重要な複数のシグナル伝達経路が制御される[28]。リン酸化したSrcは、Srcキナーゼ活性を上昇させるラミニンまたは3 E 1刺激に応答して、A 4 3 1細胞のインテグリン β 4と会合することが明らかとなっている。

30

【0365】

3 E 1は、Memorial Sloan Kettering Cancer Centre Antibody & Bioresource Core Facilityから入手した。この抗体は、Sigma Aldrichからカタログ番号MAB1964で販売されている。結腸上皮幹細胞を、実施例4に記載されているように単離し、実施例5による培地で培養した。丸底96ウェルプレートにおいて10 μ L滴下のMatrigel/ウェルで、細胞を懸濁させた。細胞を、対照（棒1）として上記の培地で処理するか、または下記のもので処理した。

(a) 最終濃度が0.1 μ g/mLのTS2/16（棒2）。

40

(b) 最終濃度が0.1 μ g/mLのTS2/16及び0.1 μ g/mLの3 E 1（棒3）。

(c) 最終濃度が0.1 μ g/mLのTS2/16及び1 μ g/mLの3 E 1（棒4）。

【0366】

上皮幹細胞の増殖を、上述のようにCellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Promega）を使用して測定した。図20は、上皮幹細胞増殖に対する β 1インテグリンアゴニストTS/16及び β 4インテグリンアゴニスト3 E 1の相乗効果を示す。したがって、複数のインテグリンアゴニストは、細胞外マトリックスから誘導されるシグナル伝達との組み合わせで上皮幹細胞の増殖を改善することができる。

【0367】

50

上記の例にて提示されているデータは、細胞外マトリックス成分の存在下及び不存在下で様々な細胞型で効率的な上皮幹細胞増殖を首尾よく実現するといった、インテグリンアゴニストの意外な能力を実証した。

【0368】

配列

配列番号1-TS2/16 H鎖

MGWSCIIILFLVATATGVHSMDEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRL
EWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDKAKNTLYLQMGSLKSEDTAMYYCTRIGYDEDYAMDH
WGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK*

10

配列番号2-TS2-16 kL鎖

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIVVTQSPPTMAASPGDKITITCSVSSIISNYLHWYSQKPGFSPKLLIY
RTSNLASGVPPRFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSDIPLTFGDGTKLDLKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

配列番号3-ヒト化TS2/16 H鎖

MDVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWWATISSGGSYTYYPDS
VKGRFTISRDKAKNTLYLQMGSLKSEDTAMYYCTRIGYDEDYAMDHWGQGTSTVTVSS

配列番号4-ヒト化TS2/16 L鎖

EIVVTQSPPTMAASPGDKITITCSVSSIISNYLHWYSQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPPRFSGSGS
GTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSDIPLTFGDGTKLDLK

30

配列番号5-ヒト化TS2/16 H鎖 HCDR1:GFTFSSYTMS

配列番号6-ヒト化TS2/16 H鎖 HCDR2:TISSGGSYTYYPDSV
K G

配列番号7-ヒト化TS2/16 H鎖 HCDR3:IGYDEDYAMDH

配列番号8-ヒト化TS2/16 L鎖 LCDR1:SVSSIISNYLH

配列番号9-ヒト化TS2/16 L鎖 LCDR2:RTSNLAS

配列番号10-ヒト化TS2/16 L鎖 LCDR3:QQGSDIPLT

40

【0369】

参考文献

- [1] Ahmed and Constant Curr Stem Cell Rep. 2016; 2(3): 197–206.
- [2] Hughes *et al.* (2010) Proteomics 10(9):1886-90
- [3] Byron *et al.* (2009) Journal of Cell Science 122, 4009-4011
- [4] Humphries *et al.* (2006) Journal of Cell Science 119: 3901-3903
- [5] Humphries (2000) Biochemical Society Transactions vol. 28, part 4
- [6] Su *et al.* (2016) PNAS 113 (27) E3872-E3881
- [7] Li *et al.* (2017) EMBO 36:629-645
- [8] Sun *et al.* (2019) Nature Cell Biology 21, 25–31
- [9] Calderwood (2004) Journal of Cell Science 117 (5)
- [10] Pokharel *et al.* (2019) Nature communications, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09453-x>
- [11] Shattil *et al.* (2010) Nature reviews, 11, 288-300
- [12] Luque *et al.* (1996) J. Bio Chem. 271, 19, 11067-11075
- [13] Tsuchida *et al.* (1997) FEBS Letters 416, 212-21
- [14] Hughes *et al.* (2010) Proteomics 10(9):1886-90
- [15] Gjorevski *et al.* (2016) Nature, 539, 560-564
- [16] Cruz-Acuña *et al.* (2017) Nat Cell Biol.(11): 1326–1335
- [17] Tsuchida *et al.* (1992) FEBS Letters 416 212-216
- [18] M van de Wetering *et al.* (2015) Cell.;161(4):933-45
- [19] Janda *et al.* (2017) Nature, 545(7653):234-237
- [20] Drost *et al.* (2015) Nature 521: 43-47
- [21] Hall *et al.* (1990) The Journal of Cell Biology, 110, 2175-2184
- [22] Co *et al.* (2019) Cell Reports 26, 2509 – 2520
- [23] Bigorgne *et al.* (2014) J Clin Invest.124, 328-337
- [24] Yu *et al.* (2005) Molecular Biology of the cell 16, 433-445
- [25] Boj *et al.* (2015) Cell 160(1-2):324-38
- [26] Sachs *et al.* (2019) EMBO 38(4):e100300. doi:10.15252/embj.2018100300
- [27] Egles *et al.* (2010) PlosOne, 5(5): e10528.
- [28] Dutta *et al.* (2008) Cancer Res.68:8779–8787

10

20

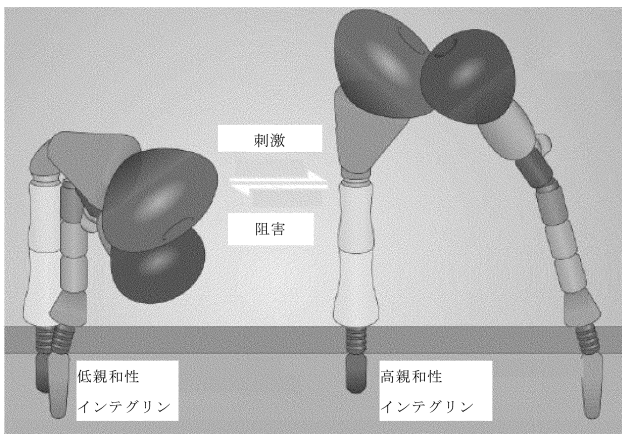
30

40

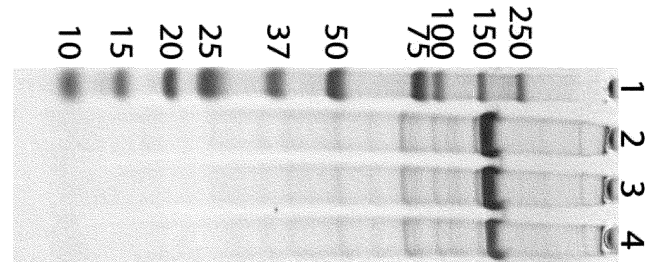
50

【図面】

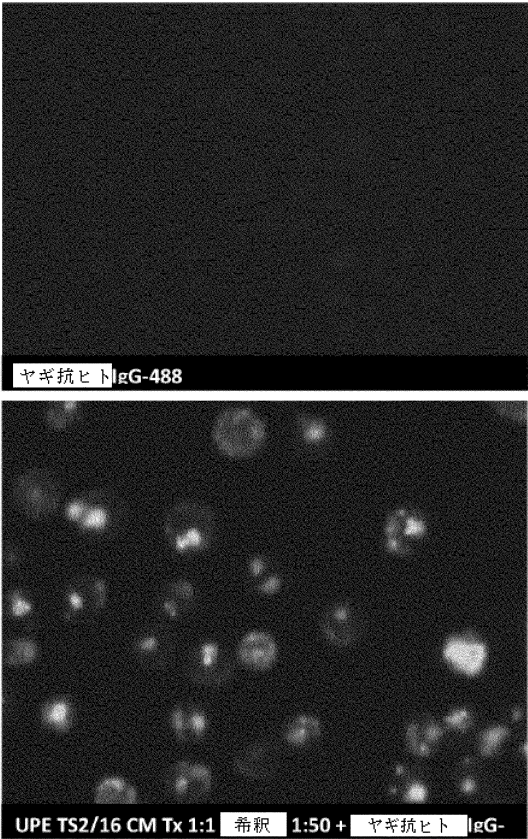
【図 1】



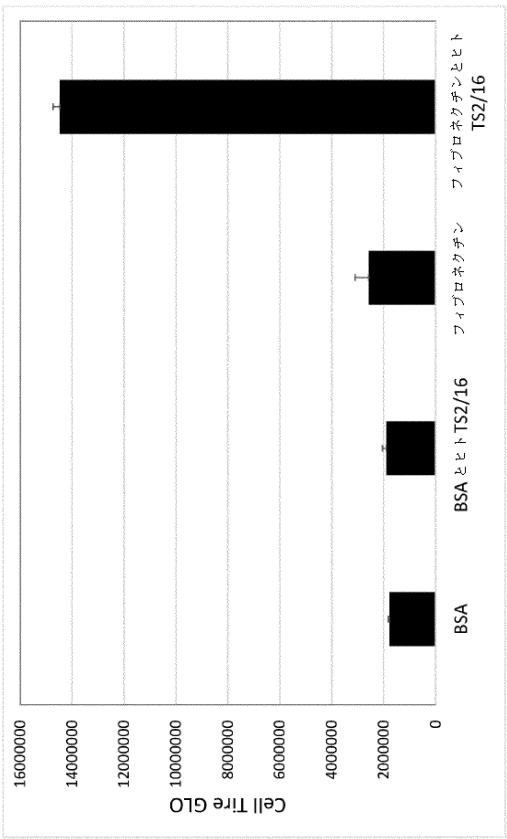
【図 2】



【 図 3 】



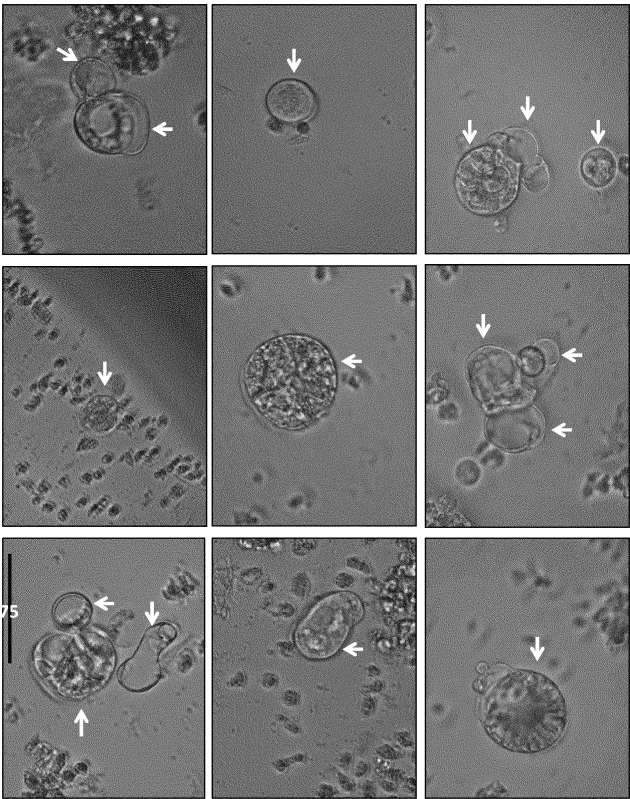
【 図 4 】



【 図 5 】

	3 回の ウェル	オルガノイ ドの数	
		4	7
TS2/16 なし	1	2	12
	2	6	15
	3	3	5
平均		4	10
TS2/16 1:400	1	13	103
	2	27	72
	3	42	114
平均		41	96
TS2/16 1:200	1	29	104
	2	41	83
	3	27	80
平均		32	89
TS2/16 1:100	1	22	75
	2	25	61
	3	25	70
平均		24	69

【 図 6 】



10

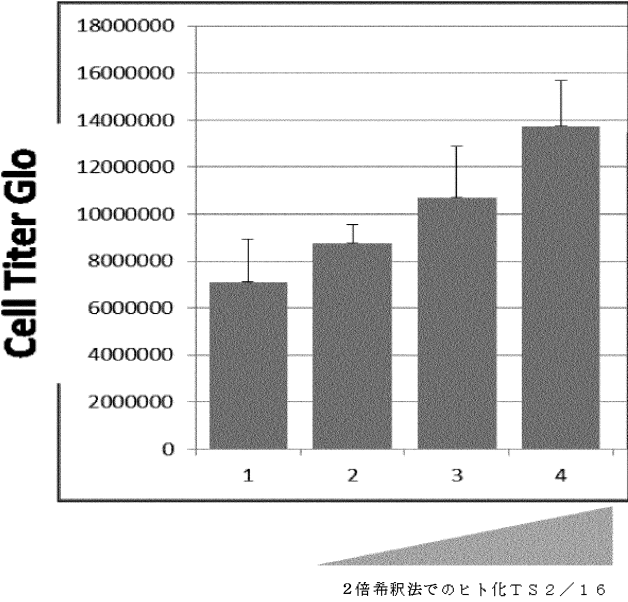
20

30

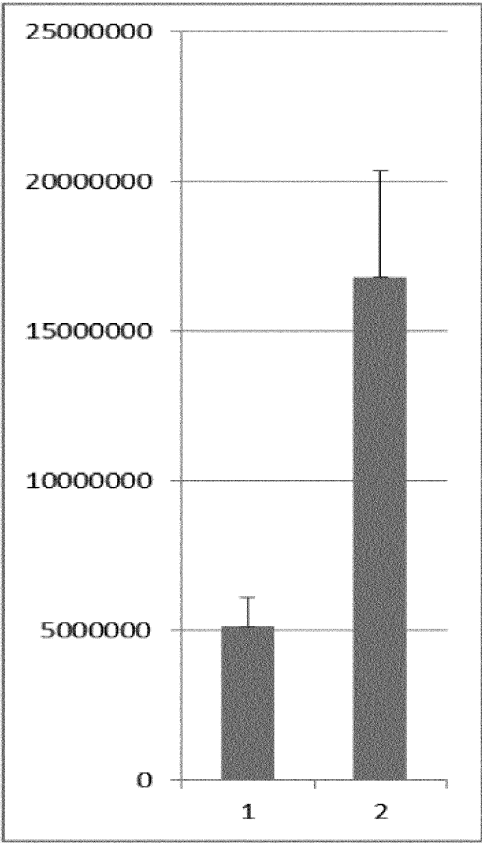
40

50

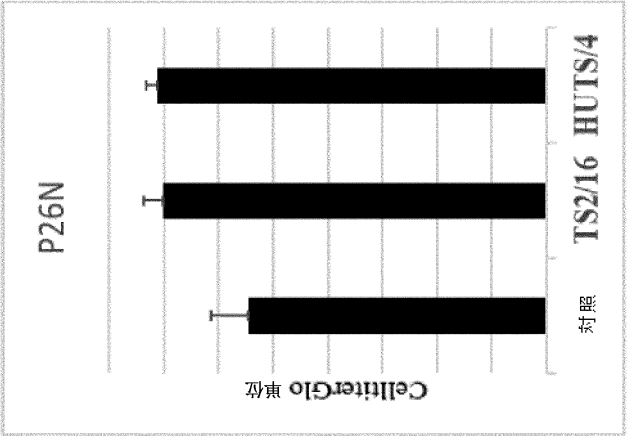
【 図 7 】



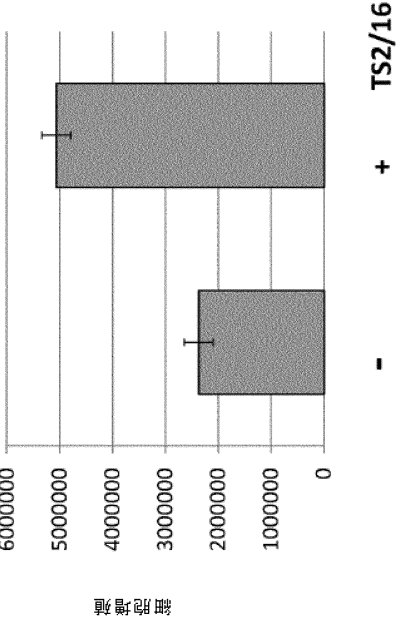
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

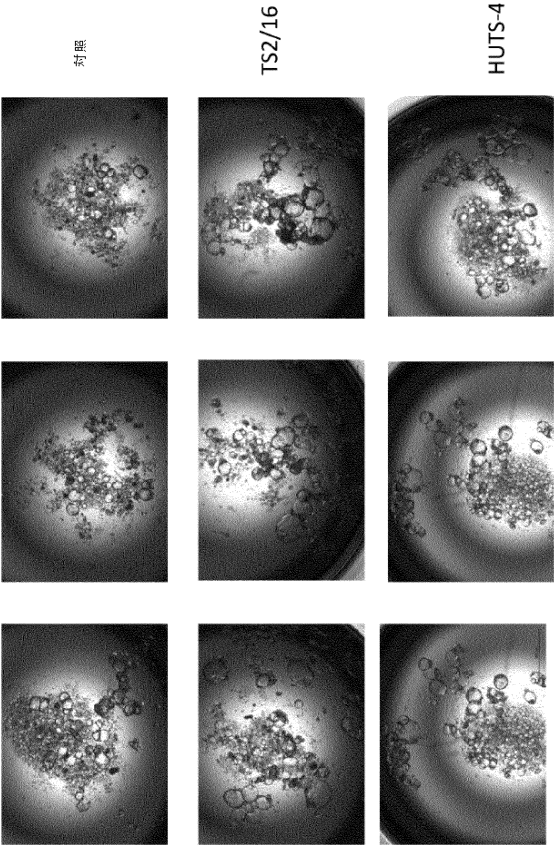
20

30

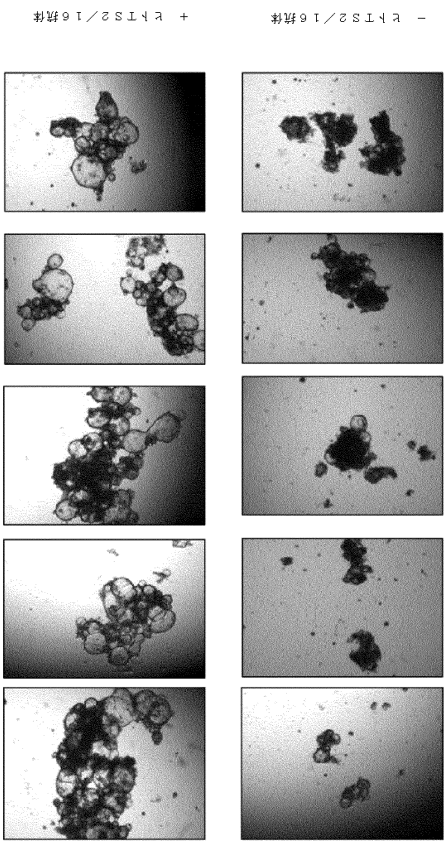
40

50

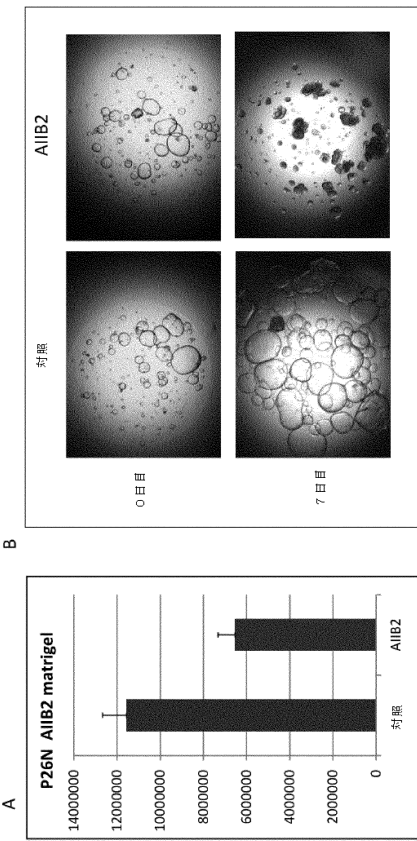
【図 1 1】



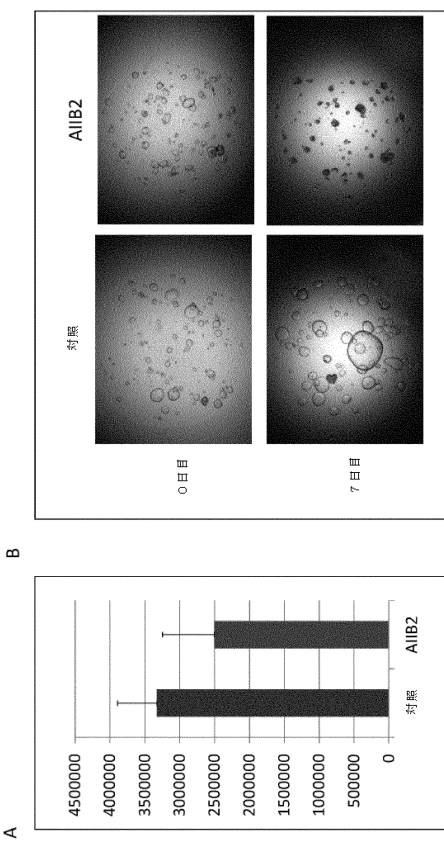
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

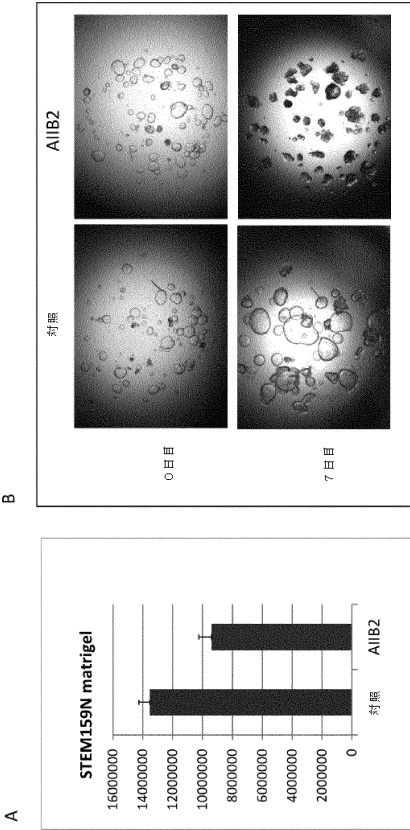
20

30

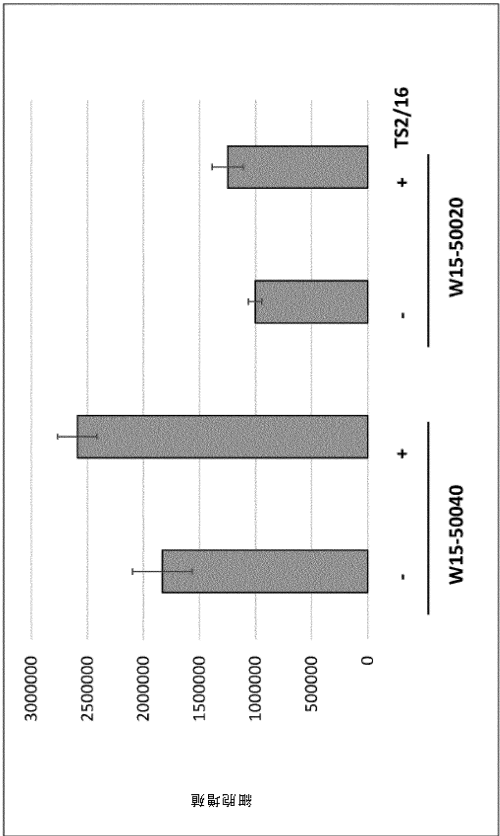
40

50

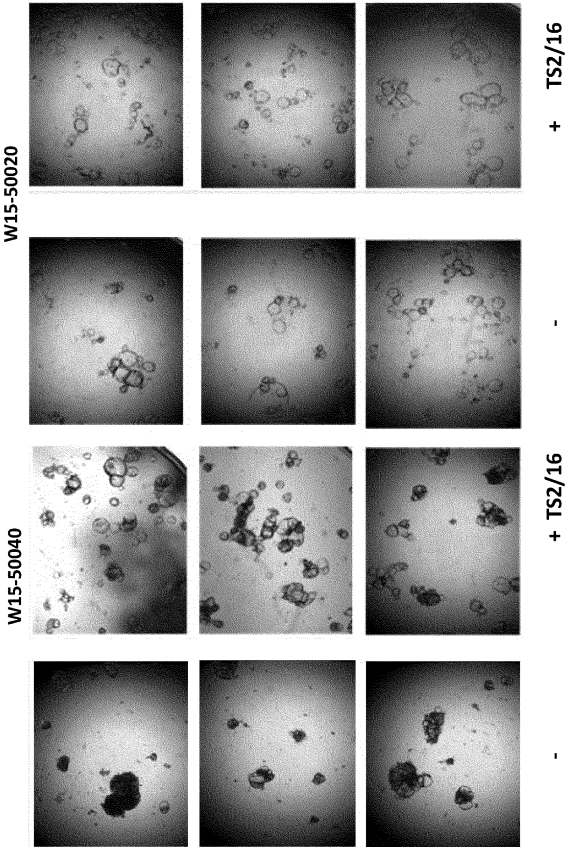
【図 1 5】



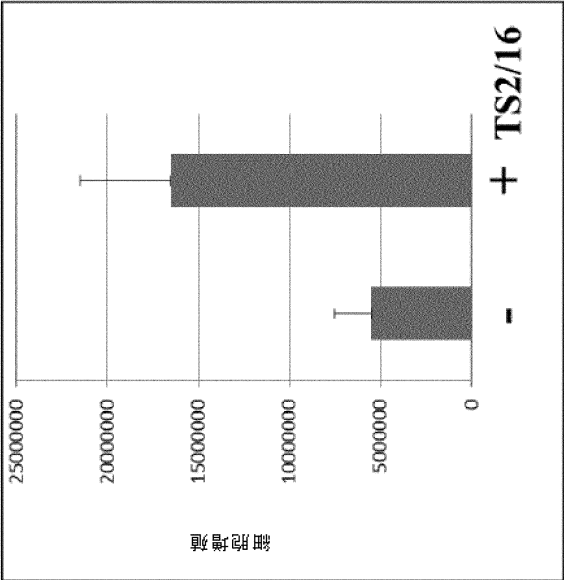
【図 1 6 B】



【図 1 6 A】



【図 1 7 A】



10

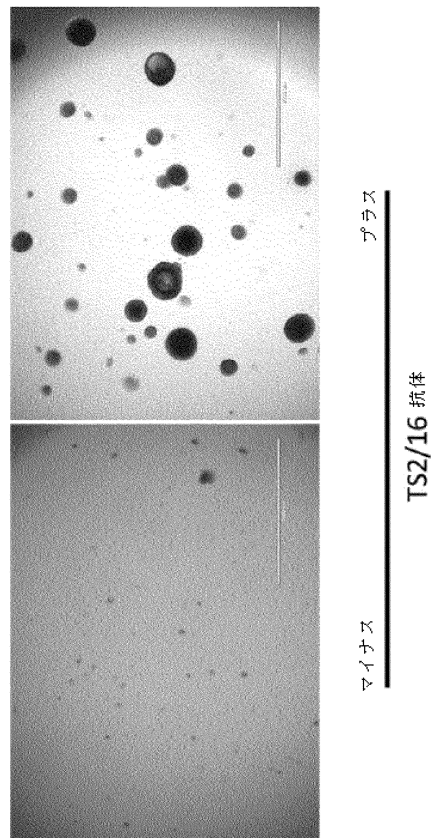
20

30

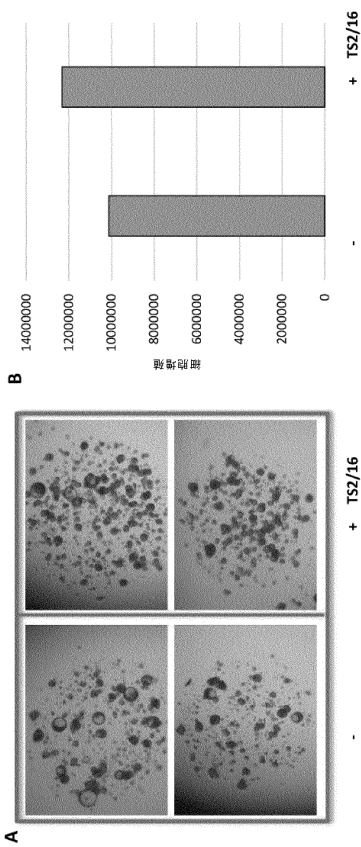
40

50

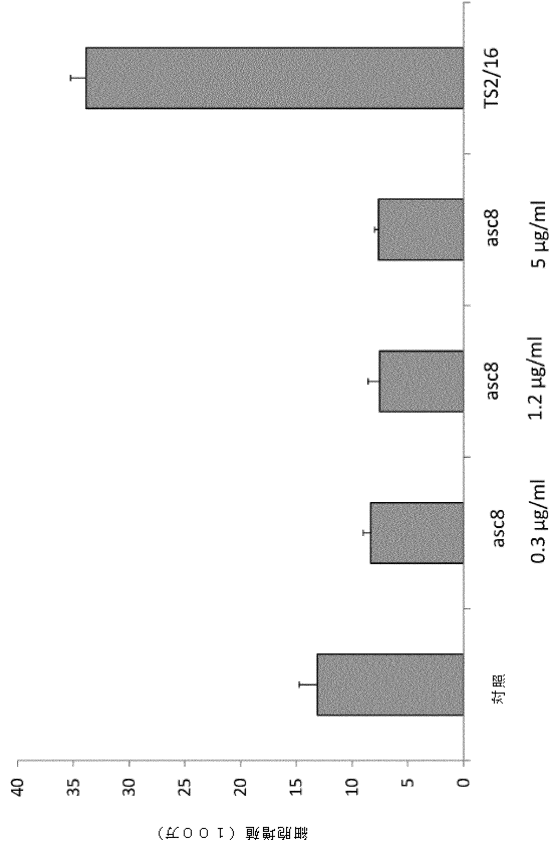
【図 17 B】



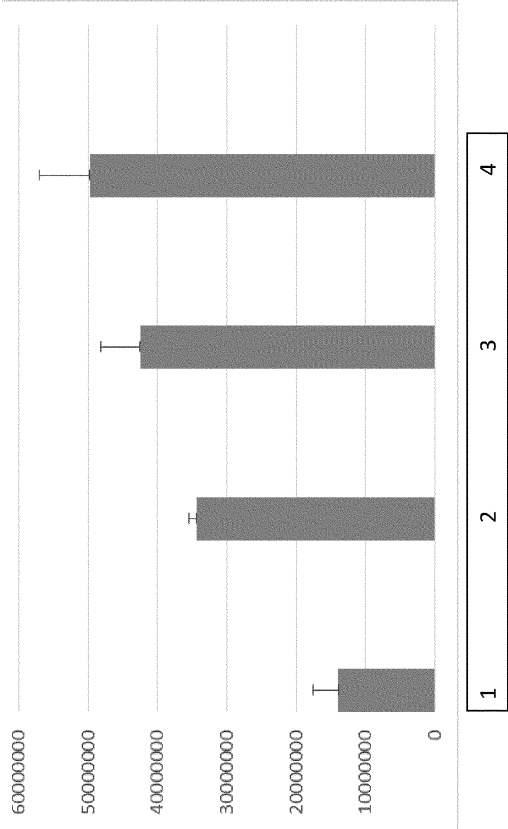
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

20

30

40

50

【配列表】

2022532760000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/063855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/071
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2012 000097 A (TOKYO WOMENS MEDICAL COLLEGE) 5 January 2012 (2012-01-05) abstract; claims 1-4; [0010], [0015]-[0017]	1-17
X	----- EP 3 441 458 A1 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN [NL]) 13 February 2019 (2019-02-13) abstract; p 1, 1st paragraph	20,25
X	----- EP 3 318 627 A1 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN KNAW [NL]) 9 May 2018 (2018-05-09) abstract; p 1, 1 1 ff.	20,25
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 June 2020

Date of mailing of the international search report

27/08/2020

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brero, Alessandro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/063855

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 143 126 A1 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN [NL]) 22 March 2017 (2017-03-22) abstract; claims 11 and 19 -----	20,25
A	US 2015/140013 A1 (RAMASWAMY SRIDHAR [US]) 21 May 2015 (2015-05-21) claim 4; [0071] -----	1-17
A	YING MENG ET AL: "Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture", THE FASEB JOURNAL, vol. 24, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 1056-1065, XP055491983, US ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.08-126821 abstract; p 1057-1058; p 1059 ff. -----	1-17
A	WO 2010/015938 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV PARIS DIDEROT PARIS 7 [FR] ET AL.) 11 February 2010 (2010-02-11) abstract; claims 1 and 3 -----	1-17
A	W. YANG ET AL: "A Small Molecule Agonist of an Integrin, α 2 β 1", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 49, 5 October 2006 (2006-10-05), pages 37904-37912, XP055103271, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M606888200 abstract; p 37906 ff. -----	1-17
A	WO 2012/068251 A2 (TEXAS HEART INST [US]; BIEDIGER RONALD J [US] ET AL.) 24 May 2012 (2012-05-24) abstract; [0018] ff.; claims 13 and 26 -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2020/063855

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

1-16, 20, 25(completely); 17(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2020/ 063855

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16, 20, 25(completely); 17(partially)

A method for culturing an epithelial stem cell or an organoid comprising epithelial stem cells using an integrin agonist; and subject-matter relating thereto.

2. claims: 18, 21(completely); 17(partially)

A culture medium as defined in claim 17, wherein the culture medium further comprises an integrin agonist as defined in claims 2-9.

3. claim: 19

An extracellular matrix or a synthetic matrix as defined in any one of claims 11-15, wherein the matrix further comprises an integrin agonist as defined in claims 2-9.

4. claim: 22

Use of an integrin agonist for culturing a cell.

5. claim: 23

Use of an integrin agonist for pre-treating cells prior to transplantation into a subject.

6. claim: 24

An integrin agonist for use as a cell adhesion-enhancer in a method of cell transplantation.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2020/063855

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2012000097 A	05-01-2012	JP 5777299 B2 JP 2012000097 A	09-09-2015 05-01-2012
EP 3441458 A1	13-02-2019	AU 2010211428 A1 CA 2751332 A1 CN 102439135 A DK 2393917 T3 EP 2393917 A2 EP 3061808 A2 EP 3441458 A1 ES 2579909 T3 HK 1163746 A1 HR P20160791 T1 HU E028647 T2 IL 214381 A JP 5458112 B2 JP 5722835 B2 JP 2012254081 A JP 2012516685 A KR 20120003855 A NZ 594271 A PL 2393917 T3 RU 2011136704 A SG 173492 A1 US 2012028355 A1 US 2014256037 A1 US 2019100728 A1 WO 2010090513 A2	18-08-2011 12-08-2010 02-05-2012 18-04-2016 14-12-2011 31-08-2016 13-02-2019 17-08-2016 05-05-2017 23-09-2016 28-12-2016 29-09-2016 02-04-2014 27-05-2015 27-12-2012 26-07-2012 11-01-2012 28-02-2014 30-12-2016 10-03-2013 29-09-2011 02-02-2012 11-09-2014 04-04-2019 12-08-2010
EP 3318627 A1	09-05-2018	AU 2012265814 A1 AU 2017208270 A1 AU 2020200515 A1 CA 2838492 A1 CN 104024401 A CN 109136163 A DK 2718422 T3 EP 2718422 A2 EP 3318627 A1 ES 2650980 T3 HK 1255258 A1 HR P20171760 T1 HU E037174 T2 IL 229879 A JP 6275035 B2 JP 2014516562 A JP 2018085999 A KR 20140037210 A NZ 619314 A PL 2718422 T3 PT 2718422 T RU 2013158140 A RU 2020105325 A SG 10201607552X A US 2014243227 A1 WO 2012168930 A2	09-01-2014 10-08-2017 13-02-2020 13-12-2012 03-09-2014 04-01-2019 27-11-2017 16-04-2014 09-05-2018 23-01-2018 09-08-2019 09-02-2018 28-08-2018 31-07-2019 07-02-2018 17-07-2014 07-06-2018 26-03-2014 29-01-2016 30-04-2018 27-11-2017 20-07-2015 10-04-2020 28-10-2016 28-08-2014 13-12-2012
EP 3143126 A1	22-03-2017	AU 2015261380 A1 CA 2949171 A1	15-12-2016 19-11-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2020/063855

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 3143126 A1	22-03-2017
		US 2017191030 A1	06-07-2017
		US 2020172861 A1	04-06-2020
		WO 2015173425 A1	19-11-2015
US 2015140013 A1	21-05-2015	US 2015140013 A1	21-05-2015
		US 2019049436 A1	14-02-2019
WO 2010015938 A2	11-02-2010	EP 2328924 A2	08-06-2011
		US 2011182916 A1	28-07-2011
		WO 2010015938 A2	11-02-2010
WO 2012068251 A2	24-05-2012	AU 2011328904 A1	06-06-2013
		AU 2017201804 A1	06-04-2017
		AU 2018236756 A1	18-10-2018
		AU 2018236763 A1	18-10-2018
		CA 2818336 A1	24-05-2012
		CA 2997471 A1	24-05-2012
		CA 2997474 A1	24-05-2012
		DK 2640721 T3	02-07-2018
		DK 2881392 T3	23-07-2018
		DK 2881393 T3	23-07-2018
		EP 2640721 A2	25-09-2013
		EP 2881392 A1	10-06-2015
		EP 2881393 A1	10-06-2015
		EP 3388429 A1	17-10-2018
		ES 2675914 T3	13-07-2018
		ES 2677668 T3	06-08-2018
		ES 2677669 T3	06-08-2018
		HK 1211291 A1	20-05-2016
		HK 1211292 A1	20-05-2016
		IL 226382 A	28-02-2018
		IL 257517 A	31-12-2018
		IL 257518 A	31-12-2018
		NZ 746603 A	29-05-2020
		NZ 746605 A	29-05-2020
		US 2013236434 A1	12-09-2013
		US 2015291571 A1	15-10-2015
		US 2015368234 A1	24-12-2015
		US 2017044130 A1	16-02-2017
		US 2019210992 A1	11-07-2019
		WO 2012068251 A2	24-05-2012

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	14/78 (2006.01)	C 0 7 K	14/78

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ド ラウ ウィリブロールダス バレンド マリア

オランダ王国 3 5 8 4 シーティー ユトレヒト ウブサララン 8 ヒューブレヒト インスティ
テュート

(72)発明者 クレバース ヨハネス カロルス

オランダ王国 3 5 8 4 シーティー ユトレヒト ウブサララン 8 ヒューブレヒト インスティ
テュート

F ターム (参考) 4B029 AA21 BB11 CC02

4B065 AA90X BB40 CA44 CA46

4C087 AA03 BB48 BB64 CA04 MA67 NA04 ZA75 ZC35

4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 DA76 EA20 EA50