

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7464652号
(P7464652)

(45)発行日 令和6年4月9日(2024.4.9)

(24)登録日 令和6年4月1日(2024.4.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/071(2010.01) C 1 2 N 5/071 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 33 外国語出願 (全75頁)

(21)出願番号	特願2022-74275(P2022-74275)	(73)特許権者	500469235
(22)出願日	令和4年4月28日(2022.4.28)		チルドレンズ ホスピタル メディカル
(62)分割の表示	特願2019-527862(P2019-527862)		センター
	)の分割		アメリカ合衆国 4 5 2 2 9 - 3 0 3 9
原出願日	平成29年12月5日(2017.12.5)		オハイオ州、シンシナティ、バーネット
(65)公開番号	特開2022-115925(P2022-115925)		アベニュー 3 3 3 3
	A)	(74)代理人	100104411
(43)公開日	令和4年8月9日(2022.8.9)		弁理士 矢口 太郎
審査請求日	令和4年5月30日(2022.5.30)	(72)発明者	ウェルズ、ジェームズ、エム.
(31)優先権主張番号	62/478,962		アメリカ合衆国、4 5 2 2 4 オハイオ
(32)優先日	平成29年3月30日(2017.3.30)		州、シンシナティ、8 0 4 7 キンビー
(33)優先権主張国・地域又は機関			ドライブ
	米国(US)	(72)発明者	ムネラ、ジョージ、オーランド
(31)優先権主張番号	62/429,948		アメリカ合衆国、4 5 2 0 2 オハイオ
(32)優先日	平成28年12月5日(2016.12.5)		州、シンシナティ、6 3 4 シカモア ス
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 結腸オルガノイドならびにその作製方法および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト結腸オルガノイド（HCO）の形成を誘導する方法であって、

a．胚体内胚葉（DE）をFGFシグナル伝達経路活性化因子およびWNTシグナル伝達経路活性化因子と、前記DEが中後腸スフェロイドを形成するのに十分な期間、接触させるステップと、

b．ステップ（a）の前記中後腸スフェロイドをBMP活性化因子およびEGFシグナル伝達経路活性化因子と、前記ヒト結腸オルガノイドを形成するために約24時間から約10日、接触させるステップとを含み、前記ヒト結腸オルガノイドがSATB2を発現するものであり、

前記FGFシグナル伝達経路活性化因子がFGF4である、前記WNTシグナル伝達経路活性化因子がCHIR99021である、前記BMP活性化因子がBMP2である、または、前記EGFシグナル伝達経路活性化因子がEGFである、

方法。

【請求項 2】

前記DEが、胚性幹細胞、または、人工多能性幹細胞に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記DEが、人工多能性幹細胞に由来する、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記 F G F シグナル伝達経路活性化因子が、小分子 F G F シグナル伝達経路活性化因子、タンパク質ベースの F G F シグナル伝達経路活性化因子、F G F 1、F G F 2、F G F 3、F G F 4、F G F 10、F G F 11、F G F 12、F G F 13、F G F 14、F G F 15、F G F 16、F G F 17、F G F 18、F G F 19、F G F 20、F G F 21、F G F 22、F G F 23、またはこれらの組み合わせから選択される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 F G F シグナル伝達経路活性化因子が F G F 4 である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 F G F 4 が約 200 ～ 1000 ng/mL の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記 F G F 4 が 500 ng/mL、または約 500 ng/mL の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 W N T シグナル伝達経路活性化因子が、タンパク質 W n t シグナル伝達経路活性化因子、小分子 W n t シグナル伝達経路活性化因子、塩化リチウム、2-アミノ-4,6-二置換ピリミジン（ヘテロ）アリアルピリミジン、I Q 1、Q S 11、N S C 668036、D C A ベーターカテニン、2-アミノ-4-[3,4-(メチレンジオキシ)-ベンジルーアミノ]-6-(3-メトキシフェニル)ピリミジン、W n t 1、W n t 2、W n t 2 b、W n t 3、W n t 3 a、W n t 4、W n t 5 a、W n t 5 b、W n t 6、W n t 7 a、W n t 7 b、W n t 8 a、W n t 8 b、W n t 9 a、W n t 9 b、W n t 10 a、W n t 10 b、W n t 11、W n t 16、G S K 3 阻害剤、C H I R O N (C H I R 99021)、またはこれらの組み合わせから選択される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記 W N T シグナル伝達経路活性化因子が C H I R 99021 である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 C H I R 99021 が約 1 ～ 50 μM の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記 C H I R 99021 が 3 μM または約 3 μM の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 B M P 活性化因子が、B M P 2、B M P 4、B M P 7、B M P 9、B M P 経路を活性化する小分子、B M P 経路を活性化するタンパク質、ベントロモルフィン (v e n t r o m o r p h i n)、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 B M P 活性化因子が B M P 2 である、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記 B M P 2 が約 50 ～ 500 ng/mL の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 B M P 2 が 100 ng/mL、または約 100 ng/mL の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 E G F シグナル伝達経路活性化因子が、E G F、T G F アルファ、H B - E G F、アンフィレグリン、エピゲン、ベータセルリンおよび、d b - c A M P のような小分子、お

50

よびこれらの組み合わせから選択される、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 E G F シグナル伝達経路活性化因子が E G F である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 E G F が約 5 0 ～ 5 0 0 n g / m L の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 E G F が 1 0 0 n g / m L、または約 1 0 0 n g / m L の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 F G F シグナル伝達経路活性化因子が F G F 4 であり、前記 W N T シグナル伝達経路活性化因子が C H I R 9 9 0 2 1 であり、前記 B M P 活性化因子が B M P 2 であり、および、前記 E G F シグナル伝達経路活性化因子が E G F である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 F G F 4 が約 2 0 0 ～ 1 0 0 0 n g / m L の濃度で提供され、前記 C H I R 9 9 0 2 1 が約 1 ～ 5 0 μ M の濃度で提供され、前記 B M P 2 が約 5 0 ～ 5 0 0 n g / m L の濃度で提供され、および、前記 E G F が約 5 0 ～ 5 0 0 n g / m L の濃度で提供される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 F G F 4 が約 5 0 0 g / m L の濃度で提供され、前記 C H I R 9 9 0 2 1 が約 3 μ M の濃度で提供され、前記 B M P 2 が約 1 0 0 n g / m L の濃度で提供され、および、前記 E G F が約 1 0 0 n g / m L の濃度で提供される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 D E から中後腸スフェロイドを形成するのに十分な前記期間が、ステップ (a) の前記中後腸スフェロイドの C D X 2 の発現によって決定される、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

ステップ (a) の前記 D E が中後腸スフェロイドを形成するのに十分な前記期間が、約 3 日～約 5 日である、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

ステップ (a) の前記 D E が中後腸スフェロイドを形成するのに十分な前記期間が、4 日または約 4 日である、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

ステップ (b) の前記中後腸スフェロイドは、前記 B M P 活性化因子及び前記 E G F シグナル経路活性化因子と約 3 日間～約 8 日間接触されるものである、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

ステップ (b) の前記中後腸スフェロイドは、前記 B M P 活性化因子及び前記 E G F シグナル経路活性化因子と約 1 日間～約 3 日間接触されるものである、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

ステップ (b) の前記中後腸スフェロイドは、前記 B M P 活性化因子及び前記 E G F シグナル経路活性化因子と約 3 日間接触されるものである、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

ステップ (b) が、

(b) ' ステップ (a) の前記中後腸スフェロイドを、B M P 活性化因子および E G F シグナル伝達経路活性化因子と約 1 日間～約 3 日間接触させるステップと、

10

20

30

40

50

(b) ' ' ステップ (b) ' の前記中後腸スフェロイドを、BMP活性化因子なしで、EGFシグナル伝達経路活性化因子と、SATB2を発現する前記ヒト結腸オルガノイドを形成するのに十分な期間接触させるステップと、
を含む、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記HCOが、

- a) 結腸腸内分泌細胞(EEC)の存在によって特徴付けられ、
- b) 結腸特異的杯細胞を含み、
- c) 実質的に絨毛およびパネート細胞を含まず、および、
- d) 結腸特異的ホルモンINSL5を分泌する、

請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

請求項1～30のいずれか1項に記載の方法によって得られるHCO。

【請求項32】

前記HCOを哺乳類に生着させるステップを含む方法において使用するための請求項31に記載のHCO。

【請求項33】

大腸炎、結腸癌、ポリポシス症候群、および／または過敏性腸症候群から選択される疾患に対して有望な治療薬の有効性および／または毒性を決定する方法であって、前記有望な治療薬を請求項31に記載のHCOと、前記有望な治療薬の有効性および／または毒性を決定するのに十分な期間、接触させることを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる2016年12月5日に提出された米国仮特許出願番号第62/429,948号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

多能性幹細胞(PSC)からの胃および小腸のオルガノイドの作製がヒト消化管(GI)の発生および疾患の研究に革命をもたらしたが、大腸オルガノイドを作製するための尽力は、一部後腸管発生の強固な理解の欠如により、後れを取っている。

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、以下のものがある(国際出願日以降国際段階で引用された文献及び他国に国内移行した際に引用された文献を含む)。

(先行技術文献)

(特許文献)

(特許文献1) 米国特許出願公開第2013/0137130号明細書

(特許文献2) 国際公開第2015/183920号

(特許文献3) 国際公開第20151173425号

(非特許文献)

(非特許文献1) LI et al. "SATB2 is a sensitive marker for lower gastrointestinal well-differentiated neuroendocrine tumors," International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 01 June 2015 (01.06.2015), Vol. 8, No. 6, Pgs. 7072-7082. entire document

(非特許文献2) EBERHARD et al. "A cohort study of the prognostic and treatment predictive value of SATB2 expression in colorectal ca

10

20

30

40

50

ncer, " British Journal of Cancer, 28 February 2012 (26.02.2012), Vol. 106, No. 5, Pgs. 931-938. entire document

(非特許文献3) ZACHOS et al. "Human Enteroids/Colonnoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology," Journal of Biological Chemistry, 16 December 2015 (16.12.2015), Vol. 291, No. 8, Pgs. 3759-3766. entire document

10

【発明の概要】

【0003】

前駆細胞が胚体内胚葉に試験管内分化し、それがシグナル伝達経路の調節を介してヒト結腸オルガノイド（HCO）へとさらに分化し得る方法が、本明細書に開示される。さらに、HCO、およびHCOの使用方法が開示され、例えばHCOについて、大腸炎、結腸癌、ポリポーシス症候群および／または過敏性腸症候群から選択される疾患に対して有望な治療薬の有効性および／または毒性を決定するために使用され得る使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0004】

本出願書類には、カラーで作成された少なくとも1つの図面が含まれている。カラー図面（複数可）を含むこの特許または特許出願公開のコピーは、請求および手数料の支払いにより、官庁により提供されるであろう。

20

【0005】

当業者は、以下に記載される図面が例示目的のみのためであることを理解するだろう。図面は、決して本教示の範囲を限定することを意図しない。

【0006】

【図1】Bmpシグナル伝達は、マウスおよびカエルの胚におけるSatb2の発現を調節する。(A)発生中の後腸の周りの核染色を示す胎生8.5日のマウス胚の全載pSmad1/5/8（赤色）およびFoxa2（緑色）染色（n=6）。(B)後腸中胚葉および内胚葉におけるpSmad1/5/8染色を示す(A)の囲み領域からの光学組織薄片の挿入図（D：背側、V：腹側）。(C)頭褶期に単離され、DMH-1を用いたBmp阻害の有無の下で2日間培養されたマウス胚の概略図。(D、E)培養48時間後のDMSO処置胚（D）およびDMH-1処置胚（E）の全載pSmad1/5/8（赤色）およびFoxa2（緑色）染色。(F)DMSOまたはDMH-1の中で培養した胚（1条件あたりn=3の胚）におけるCdx2に対するpSmad1/5/8およびpSmad2/3染色の定量化（条件あたりn=3胚）。(G~J)DMSO（G、H）またはDMH-1（I、J）の中での2日間培養の後のマウス胚（各条件につきn=6）のCdx2（緑色）、Satb2（赤色）およびFoxa2（白色）の全載免疫染色。H~Jにおける矢印は、卵黄莖のおおよその位置を指し示す（BA1、第1腕弓）。(K)DMSOまたはDMH-1で処置したマウス胚におけるSatb2発現の定量化。(L)Xenopus tropicalis胚におけるBmp阻害の概略図。DMSO（M）またはDMH-1（R）で処置したXenopus tropicalis胚におけるSatb2の原位置ハイブリッド形成。(M)および(R)における白色の点線は、切片の平面がその後の分析を使用したことを描写する。Mxおよびmd=第1腕弓の上顎突起および下顎突起。Cba=尾側腕弓。DMSO（N~Q）またはDMH-1（S~V）で処置したXenopus tropicalis胚からのSatb2（赤色）、pSmad1/5/8（緑色）、DAPI（青色）の免疫蛍光、および色相併合画像。スケールバーはG~Hにおいては=100μm、他のパネルにおいてはすべて50μm。両側t検定について**p<0.01および***p<0.001。

30

40

【図2】BMP2はヒト腸管スフェロイドにおけるSATB2および後側HOXコードを

50

誘導する。(A) 腸管スフェロイドパターン形成プロトコルの概略図。(B~D) ノギン(B)、無処置(C)およびBMP2(D)で12時間処置したスフェロイドのpSMA D1/5/8(赤色)染色によって測定したBMPシグナル伝達レベル。(E) 陰窩の頂部でのBMPシグナル伝達の上昇を示す成体マウス結腸のpSmad1/5/8染色。(F~H) ノギン(F)、無処置(G)およびBMP2(H)で72時間処置したスフェロイドにおけるSATB2発現。(I) パターン形成後のSATB2+CDH1+上皮の百分率の定量化。(J) 新生スフェロイドおよび3日間のパターン形成後のスフェロイドの主成分分析。(K) BMP処置スフェロイドとNOG処置スフェロイドとの間で差次的に発現した遺伝子の遺伝子オントロジー分析。(L) パターン形成前後のスフェロイドのTPM(100万当たりの転写産物)値のグラフ。分析した試料は、パターン形成前のスフェロイド(n=2)、ならびにパターン形成3日後のノギン、対照およびBMP2で処置したスフェロイドとした(各群につきn=4)。Iにおける定量化のために、少なくとも3回の実験由来の20個のオルガノイドを試験した。エラーバーは標準偏差を表す。スケールバー=50ミクロン。***両側t検定によって決定されたp<0.0001。

【図3】部域パターン化形成は、長期間の試験管内培養後にヒト腸管オルガノイドにおいて維持される。(A~D) ノギン、対照、またはBMP2によるスフェロイドの最初の3日間の処置から結果的に生じた28日齢オルガノイドの近位マーカーONECUT1(緑色)を用いた全載免疫蛍光およびQPCR分析。CDX2(赤色)およびDAPI(青色)を用いた染色も使用して、上皮および間充織を検出した。(E~H) IFによっておよびQPCRによって検出された後側マーカーSATB2(赤色)の発現。(I~L) IFによるおよびQPCRによる汎杯細胞マーカーMUC2(赤色)の分析。(M~P) IFによる結腸特異的杯細胞マーカーMUC5B(赤色)の分析。MUC5B+細胞の数を(P)において定量した。(Q~S) オルガノイド全体と比較した、単離された間充織培養物におけるパターン形成マーカーの分析。ノギン、対照、またはBMP2で処置したオルガノイドに由来するオルガノイド全体におけるおよび間充織培養物におけるCDH1(Q)、近位HOX遺伝子HOXD3(R)、および遠位HOX遺伝子HOXA13(S)のQPCR分析。CDH1は上皮細胞を含有するオルガノイド全体においてのみ観察された。エラーバーは平均の標準誤差を表す。IFについては、各条件について少なくとも3回の異なる実験から最低10個のオルガノイドを検討した。QPCRについては、2つの別個の実験からの最低5つの生物学的複製物を検討した。スケールバー=100ミクロン。両側t検定により決定された**p<0.01および****p<0.0001。

【図4】HIOではなくHCOは、プロエンドクリン転写因子ニューロゲニン3の発現に応答して、結腸特異的腸内分泌細胞を生じた。(A~B) IPSC72.3誘導性NEUROG3株を作製するために使用されたドキシサイクリン誘導性NEUROG3レンチウイルスコンストラクトの概略図、およびドキシサイクリン誘導プロトコル。ノギン(C、F)、未処置(D、G)またはBMP(E、H)を用いてパターン形成された35日齢のオルガノイドのクロマグラニンA(緑色)、CDX2(赤色)およびINSL5(白色)による全載染色。(C~E) 未処置オルガノイド(-Dox)および(F~H) 発現したNEUROG3を有するオルガノイド(+Dox)。EおよびHにおける挿入図は、INSL5染色の拡大図を示す。(I、J) CHGAによって測定されるような(I)、およびINSL5(J)発現についての、HIOおよびHCOにおける腸内分泌細胞のNEUROG3誘導のQPCR分析。データは、ノギン(n=3)、対照(n=3)またはBMP(n=6)処置オルガノイドを用いた2つの異なる実験の代表である。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。スケールバー=50ミクロン。*両側t検定により決定されたp<0.05。

【図5】HIOおよびHCOは、生体内移植後の部域同一性を維持した。(A~E) ヒト空腸および結腸からの生検の、ならびにマウス腎被膜の真下に移植され生体内で8~10週間成長したノギン由来HIO、対照HIOおよびBMP2由来HCOのH&E染色。同じ条件の試料を、近位腸管マーカーGATA4(F~J)、遠位腸管マーカーSATB2(K~O)、パネート細胞マーカーDEFA5(P~T)、および結腸特異的杯細胞マ-

10

20

30

40

50

カーMUC5B (U~Y) で染色した。GATA4およびSATB2の二重染色は異なるチャンネルにおいてだがパネルについては同じスライド上で行ったが(F~O)、それらは個々の擬似色(赤色)画像として示されていることに留意されたい。ヒト生検についてはn=2である。移植されたノギン処置オルガノイドについてはn=12、対照オルガノイドについてはn=7、およびBMP2処置オルガノイドについてはn=16である。スケールバー=50µm。

【図6】生体内成長したオルガノイドは、部域特異的ホルモンを発現する。マウス腎被膜の真下で8~10週間成長したHIOおよびHCOにおける部域的に発現したホルモン(A~D)グレリン(GHRL)、モチリン(MLN)、(E~H)GIP、(I~L)GLP-1、(M~P)PYYおよび(Q~T)INSL5の発現分析。近位濃縮ホルモンGHRL、GIPおよびMLNは、ノギンおよび対照HIOにおいて豊富であった(A~H)。遠位に濃縮されたホルモンGLP-1およびPYYは、BMP2由来のHCOにおいて豊富であった(1~O)。結腸特異的ホルモンINSL5はHCO(Q~T)にのみ存在していた。データは、1条件あたり最低5つの移植オルガノイドを代表している。(A)および(B)の挿入図は、GHRLおよびMLN二重陽性細胞を示す。(D、H、L、P、T)GHRL、MLN、GIP、GLP1、PYY、およびINSL5についてのFPKM値は、RNA配列データからである。FPKM値は、1条件あたり3つの生物学的複製物を表す。スケールバー=30ミクロン。

【図7】HIOおよびHCOの全体的な転写分析ならびにヒト小腸および結腸との比較。(A)移植したHIOおよびHCOと比較したヒトの成体および胎児の小腸および結腸の主成分分析。(B)ヒト成体小腸をHIOと、およびヒト成体結腸をHCOと比較する超幾何中項検査。(C)HIOおよびHCOと比較して、ヒト小腸および結腸において差次的に発現した転写物を比較する4方向散布図。

【図8】Gata4およびSatb2は、小腸および大腸の発生中の離散した部域境界を標識する。(A)卵黄莖における発現境界を示す胎生9.5日マウス胚におけるGata4(緑色)およびSatb2(赤色)の全載染色(n=9)。(B)低Gata4発現および低Satb2発現の移行帯を示す、胎生11.5日小腸のGata4およびSatb2の発現ドメインを描写するモデル。(C~E)卵黄莖におけるGata4の後側境界とSatb2の前側境界とを示す胎生11.5日マウス胚におけるGata4およびSatb2の全載染色(n=3)。(F~H)Satb2発現の前側境界が維持されることを示す胎生12.5日マウス胚におけるSatb2およびFoxa2の全載染色(n=3)。(I)胎生16.5日マウス胚から単離した近位腸におけるGata4およびSatb2の全載染色(n=6)。(J)胎生16.5日マウス胚から単離した回腸および大腸におけるGata4およびSatb2の全載染色(n=6)。(K)ヒト空腸(n=2)および(L)結腸(n=2)の切片におけるGATA4およびSATB2の染色。スケールバー=50µm(B~D)および100µm(E~M)。(C)および(F)における点線は、臍のおおよその位置を標識する。略語:ys:卵黄莖、cb:虫垂、tz:移行帯、mx:上顎、md:第1腕弓の下顎部分、ti:回腸末端部、icj:回盲移行部。

【図9】SATB2は、GATA4陰性ヒト小腸および大腸において発現する。SATB2発現が回腸および大腸全体に存在することを示す、ヒト成体十二指腸、小腸、虫垂、結腸および直腸におけるSATB2染色ヒト成体および胎児腸管試料からの公表されたRNA配列データからのGATA4およびSATB2の解析。プロットした試料は、ヒト成体十二指腸(HuSI__Duo__A)、ヒト成体回腸~十二指腸(HuSI__Dist__A)、ヒト成体結腸(HuColon__A)およびヒト胎児小腸(HuSI__F)を含む。

(C)気液界面(ALI)中で成長した十二指腸(Duo)、空腸(Jej)、回腸(Ile)、上行結腸(AC)、横行結腸(TC)および下行結腸由来の胎児腸管幹細胞に対してWangら2015によって作成されたマイクロアレイデータからのGATA4およびSATB2の発現の解析分析)。r2値はExcelのCORREL関数を用いて決定した。

【図10】BMPは、後側HOX遺伝子のSHH活性化を媒介する。(A)後側HOX遺

10

20

30

40

50

伝子のSHH媒介活性化の従来モデル。(B)後側HOX遺伝子のSHH媒介活性化および内胚葉HOX遺伝子のBMP媒介活性化の新たなモデル。(C)ノギン、対照、平滑化アゴニスト(SAG)、またはBMP2を用いた処置後のHOX因子のQPCR分析。(D)SAGにより誘導されたHOX13遺伝子のBMP4依存性活性化のモデル。(E)3日後の対照、5μMのSAG、5μMのSAG+NOGおよびBMP2で処置したオルガノイド中のHOXA13のQPCR分析。(F)外因性組換えヒトBMP2によって誘導されたHOX13遺伝子のSHH非依存的活性化のモデル。(G)3日後の対照、BMP、およびBMP+シクロパミンで処置したオルガノイド中のHOXA13のQPCR分析(1条件あたりn=6)。

【図11】拡張生体内培養は、杯細胞の成熟を可能にする。(A)パターン形成され、次いで再パターン形成されたオルガノイドにおけるCDX2+SATB2+細胞の百分率の定量。28日齢オルガノイドにおけるHOXB13(B)およびHOXD13(C)のQPCR分析。44日齢のノギン、対照、およびBMPで処置オルガノイドからのCDH1(緑色)、CDX2(赤色)、およびMUC2(白色)による全載染色(D~F)および(G~I)横断切片染色。(J~L)44日齢のBMP2処置オルガノイドからの切片の染色。白色の矢印はムチン2を分泌する過程にあった杯細胞を指し示す。QPCRについては、2つの別個の実験からの最低5個の生物学的複製物を検討した。IFについては、1条件につき最低10個のオルガノイドを検討した。スケールバー=50μm。

【図12】オルガノイドのBMPパターン形成は、試験管内および生体内で安定である。(A)ノギン、対照、およびBMPでパターン形成したオルガノイドのオルガノイド生着効率。移植されたパターン形成したオルガノイドにおけるGATA4+CDX2+細胞(B)およびSATB2+CDX2+細胞(C)の百分率の定量。移植されたオルガノイドにおけるGATA4(D)SATB2(E)DEFAS(F)およびMUCSB(G)のRNA配列データからのFPKM値。(H~I)ヒト空腸および結腸の生検(1領域当たりn=2)および(J~L)移植されたオルガノイド(1条件当たりn=5)のMUC2(赤色)染色。スケールバー=50ミクロン。

【図13】試験管内および生体内で成長したオルガノイドは、腸管前駆細胞を含有している。ノギン、対照、またはBMPで処置したH9-LGR5-GFP由来オルガノイドからのCDH1およびGFPの代表的な全載画像(A、F、K)および組織薄片画像(B、G、L)。(C~E)ノギン、(H~J)対照、または(M~O)BMP2で処置したオルガノイドからの切片に関するCDX2染色(赤色)およびSOX9染色(緑色)。CDX2およびLGR5-GFP(P、S、V)、CDX2およびSOX9(Q、T、W)、ならびにCDH1およびKI67(R、U、X)を用いて染色した、ノギン、対照、またはBMPで処置したH9-LGR5-GFPオルガノイド由来の生体内オルガノイドの代表的な画像。(Y~A')それぞれノギン、対照またはBMPの移植片から誘導されたエンテロイドを示す立体顕微鏡写真。(B'~D')対照エンテロイド(2つの移植片からの100個超のプールされたエンテロイド)およびBMP2で処置したコロノイド(1つの移植片からの50個超のコロノイド)における近位および遠位の遺伝子のQPCR分析。スケールバー=50μm。

【図14】リボソームおよび免疫細胞のシグネチャは、移植されたオルガノイドと初代ヒト組織との間に差次的に発現する。(A)パターン形成した移植されたオルガノイドならびにヒト成体および胎児の小腸および結腸の主成分分析。(B)移植片対ヒト初代組織において上方調節された遺伝子の遺伝子オントロロジー分析。(C)ヒト初代組織対移植片において上方調節された遺伝子の遺伝子オントロロジー分析。

【図15】(A)マトリゲル中での15日間の成長後のHCOの全載免疫蛍光染色。HCO培養物を内皮マーカーCD31(緑色)および後腸上皮マーカーCDX2(赤色)について染色した。造血細胞マーカーPU.1についても培養物を染色した(赤色の右側のパネル)。(B)造血前駆細胞アッセイの概略図。細胞をHCOから収集し、遠心分離し、ギムザ・ライト染色を用いて染色するか、またはMethocult培地中に播種して造血細胞の分化についてアッセイした。(C)マクロファージ、好中球、好塩基球および好

10

20

30

40

50

酸球への分化と一致する形態学的特徴を有する、ギムザ・ライト染色した細胞の代表的な画像。(D) Methocul中で14日後に形成されたコロニーの代表的な画像。赤血球、マクロファージおよび顆粒球のコロニーは、HCOで誘導された細胞には存在したが、ノギン処置したHIOで誘導された細胞には存在しなかった。

【図16】(A) ヒト結腸生検またはマトリゲル中で28日間成長させたHCOの免疫蛍光染色。マクロファージのマーカーであるCD68について染色を行った。(B) HIOおよびHCOにおけるCD14およびCD16のCYTOF分析のプロット。わずかな百分率のCD14+/CD16+細胞がHCO中に存在する(青色の正方形)が、HIOには存在しない。さらに、CD16単一陽性細胞がHCO中に存在しており、このことは単球が培養物内で存在することを示唆した。(C) 14日齢および28日齢のHIOおよびHCOから収集した上清のLuminexアレイ分析。IL6およびIL8は、28日齢のHCO(BMP)においては検出されたが、HIOにおいては検出されなかった。(D) 14日齢および28日齢のHIOおよびHCOから収集した上清のLuminexアレイ分析。マクロファージ特異的サイトカインMIP1AおよびMIP1Bは14日齢および28日齢のHCO(BMP)においては検出されたが、14日齢または28日齢のHIOにおいては検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0007】

定義

特に明記しない限り、用語は当業者による従来の使用法に従って理解されるべきである。

【0008】

「約」もしくは「およそ」という用語は、当業者による決定に従って、例えば、測定システムの制限の、その値がどのように測定され、または、決定されるかに依存する、特定の値に対して許容できる誤差範囲内にあることを意味する。例えば、「約」は、当該技術分野における実務に従って、1以上の標準偏差内であることを意味し得る。あるいは、「約」は、与えられた値の20%まで、または10%まで、または5%まで、または1%までの範囲であることを意味し得る。あるいは、特に生物系または生物学的プロセスに関して、この用語は、ある値の10倍以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内であることを意味し得る。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載されている場合、特に明記しない限り、特定の値に対する許容可能な誤差範囲内を意味する「約」という用語を想定すべきである。

【0009】

本明細書中で使用されるとき、用語「全能性(totipotent)幹細胞」(全能性(omnipotent)幹細胞としても知られる)は、胚性細胞型および胚体外細胞型に分化することのできる幹細胞である。このような細胞は完全な生存可能な生物を構築することができる。これらの細胞は卵細胞と精子細胞の融合から産生される。受精卵の最初の数回の分裂によって産生された細胞も全能性である。

【0010】

本明細書で使用されるとき、PS細胞としても一般的に知られている用語「多能性幹細胞(PSC)」は、ほぼすべての細胞、すなわち、内胚葉(胃の内部の裏うち、消化管、肺)、中胚葉(筋肉、骨、血液、腎尿路生殖器)、および外胚葉(表皮組織および神経系)のうちのいずれかから誘導される細胞、へ分化することができるあらゆる細胞を包含する。PSCは、胚性幹細胞(胚性生殖細胞を含む)から誘導されるか、またはある特定の遺伝子の発現を強制することによって成体体細胞のような非多能性細胞の誘導を通じて得られる、全能性細胞の子孫であり得る。

【0011】

本明細書で使用されるとき、用語「人工多能性幹細胞(iPSC)」は、一般にiPSC細胞とも略され、特定の遺伝子の「強制的な」発現を誘導することによって、成体体細胞などの通常は非多能性細胞から人工的に誘導される多能性幹細胞の一種を指す。

【0012】

本明細書中で使用されるとき、用語「胚性幹細胞（ESC）」はまた一般にES細胞とも略され、多能性であり、かつ初期胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞を指す。本発明の目的のために、用語「ESC」は、胚性生殖細胞も場合により包含するように広く使用される。

【0013】

本明細書中で使用されるとき、用語「前駆細胞」は、1つ以上の前駆細胞がそれ自体を再生する能力または1つ以上の特殊化細胞型に分化する能力を獲得することになる、本明細書に記載の方法において使用され得る任意の細胞を包含する。いくつかの態様において、前駆細胞は多能性であるかまたは、多能性になる能力を有する。いくつかの態様において、前駆細胞は、多能性を獲得するために外来因子（例えば、成長因子）の処置に供される。いくつかの態様において、前駆細胞は、全能性（totipotent）（または全能性（omnipotent））幹細胞、多能性（pluripotent）幹細胞（誘導型または非誘導型）、多能性（multipotent）幹細胞、オリゴ能性幹細胞および単能性幹細胞であり得る。いくつかの態様において、前駆細胞は、胚、乳児、子供、または成体由来であり得る。いくつかの態様において、前駆細胞は、多能性が遺伝子操作またはタンパク質／ペプチド処置を介して付与されるような処置を受ける体細胞であり得る。

【0014】

発生生物学において、細胞分化は、それほど特殊化されていない細胞がより特殊化された細胞型になる過程である。本明細書中で使用されるとき、用語「指向性分化」は、それほど特殊化されていない細胞が特定の特殊化された標的細胞型になるプロセスを指す。特殊化された標的細胞型の特異性は、初期細胞の運命を定義または変更するために使用できる任意の適用可能な方法によって決定することができる。例示的な方法としては、遺伝子操作、化学的処置、タンパク質処置、および核酸処置が挙げられるが、これらに限定されない。

【0015】

本明細書中で使用されるとき、用語「細胞構成素」は、個々の遺伝子、タンパク質、mRNA発現遺伝子、および／または何らかの他の種々の細胞成分もしくは、例えば、当業者によって生物学的実験において（例えば、マイクロアレイまたは免疫組織化学的特徴によって）典型的に測定されるタンパク質修飾度（例えば、リン酸化）のようなタンパク質活性である。生体系、一般的なヒトの疾患、ならびに遺伝子の発見および構造決定の基礎となる生化学的過程の複雑なネットワークに関する重要な発見は、現在、研究プロセスの一部としての細胞構成素の発生量のデータの適用に起因し得る。細胞構成素の発生量データは、バイオマーカーを同定し、疾患の亜型を識別し、および毒性の機序を同定するのに役立つことができる。

【0016】

本明細書に記載されるように、方法およびシステムは、培養中の胚性腸管発生を模倣するための成長因子操作の時系列を用いて確立される。特に、ヒト胚性幹細胞（hESC）および人工多能性幹細胞（iPSC）の両方のPSCの腸管組織への試験管内分化を発生させるための方法およびシステムが確立されている。

【0017】

多能性幹細胞（PSC）からの胃および小腸のオルガノイドの作製は、研究であるヒトの消化管（GI）の発生および疾患に革命をもたらした。しかしながら、後腸管発達のしっかりした分子レベルでの理解に一部よるために、大腸オルガノイドを作製するための尽力は後れを取っていた。本明細書で、本発明者らは、臍帯の後側にある腸上皮が発生中および出生後を通じてSatb2を発現することを発見した。本発明者らはさらに、BMPシグナル伝達がカエルおよびマウスの胚においてSatb2+ドメインを確立すること、ならびにBMPシグナル伝達の短時間の活性化が後側のHOXコードを活性化し、ヒトPSC由来腸管培養物を結腸オルガノイド（HCO）へと向かわせるのに十分であることを発見した。試験管内で成長したHCOは、結腸の同一性と一致するマーカー特性および独

10

20

30

40

50

特の細胞型を有した。マウスへの移植後、HCOは、ヒト結腸の分子レベルの、細胞レベルのおよび形態学的な特性を有する組織を形成する形態形成および成熟を経験した。開示された結腸オルガノイドは、大腸炎および結腸癌の将来の研究において使用され得る。

【0018】

一態様において、ヒト結腸オルガノイドの形成を誘導する方法が開示されている。この方法は、(a) 胚体内胚葉 (DE) を FGF シグナル伝達経路活性化因子および WNT シグナル伝達経路活性化因子 (例えば、CHIRON / GSK2 阻害剤) と、該 DE が中後腸スフェロイドを形成するのに十分な期間接触させるステップと、(b) ステップ (a) の中後腸スフェロイドを BMP 活性化因子および EGF シグナル伝達経路活性化因子と、該ヒト結腸オルガノイドを形成するのに十分な期間接触させるステップとを含み得、ここで該ヒト結腸オルガノイドは SATB2 を発現する。

10

【0019】

一態様において、DE は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、人工多能性幹細胞、中胚葉細胞、胚体内胚葉細胞、後部内胚葉細胞、後腸細胞、またはこれらの組み合わせから選択される前駆細胞に由来し得る。

【0020】

一態様において、FGF シグナル伝達経路活性化因子は、小分子またはタンパク質 FGF シグナル伝達経路活性化因子、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、またはこれらの組み合わせから選択され得る。WNT シグナル伝達経路活性化因子は、小分子またはタンパク質 Wnt シグナル伝達経路活性化因子、好ましくは塩化リチウム、2-アミノ-4,6-二置換ピリミジン (ヘテロ) アリールピリミジン、IQ1、QS11、NSC668036、DCA ベーターカテニン、2-アミノ-4-[3,4-(メチレンジオキシ)-ベンジル-アミノ]-6-(3-メトキシフェニル)ピリミジン、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16、GSK3 阻害剤、好ましくは CHIRON、またはこれらの組み合わせから選択され得る。一態様において、BMP 活性化因子は、BMP2、BMP4、BMP7、BMP9、BMP 経路を活性化する小分子、BMP 経路を活性化するタンパク質から選択され得、以下、すなわち、ノギン、ドルソモルフィン、LDN189、DMH-1、ベントロモルフィン (ventromorphin)、およびこれらの組み合わせを含み得る。

20

30

【0021】

一態様において、該 DE が中後腸スフェロイドを形成するのに十分な期間は、ステップ (a) の該中後腸スフェロイドによる CDX2 の発現によって決定され得る。このような測定は、ルーチン方法を用いる当業者の能力の範囲内である。

【0022】

一態様において、中後腸スフェロイドがヒト結腸オルガノイドを形成するのに十分な期間は、該ヒト結腸オルガノイドの細胞による SATB2 および CDX2 の発現によって決定され、SATB2 および CDX2 が発現するとき、中後腸スフェロイドはヒト結腸オルガノイドをすでに形成している。このような測定は、先に列挙した遺伝子の発現が、ステップ (a) およびステップ (b) が十分な期間行われたことを示すという点で、時間的測定の代わりに用いられ得る。

40

【0023】

一態様において、本明細書に記載の方法によって得られる HCO が開示される。本発明の HCO は、様々な異なる方法で特徴付けられ得る。一態様において、HCO は、結腸腸内分泌細胞 (EEC) の存在を特徴とし得る。一態様において、HCO は、陰窩の存在を特徴とし得、絨毛が実質的でない。一態様において、HCO は、結腸特異的杯細胞の存在を特徴とし得る。一態様において、HCO は、パネート細胞を実質的に含まないことを特

50

徴とし得る。一態様において、HCOは、結腸特異的ホルモンINSL5を分泌する能力を特徴とし得る。腸管オルガノイドは、免疫機能、神経支配、血管、絨毛、およびパネート細胞のうちの1つ以上を含まなくてもよい。

【0024】

一態様において、結腸組織を形成する方法が開示され、ここに記載の本発明のHCOは、哺乳類、好ましくはげっ歯類、好ましくは免疫無防備状態のげっ歯類、好ましくは免疫無防備状態のマウスの腎被膜下に生着し得る。

【0025】

一態様において、本明細書に開示されるHCOは、大腸炎、結腸癌、ポリポーシス症候群、および／または過敏性腸症候群から選択される疾患に対して有望な治療薬の有効性および／または毒性を決定するために使用され得る。該方法は、有望な治療薬を本明細書に記載のHCOと、該有望な治療薬の有効性および／または毒性を決定するのに十分な期間、接触させるステップを含み得る。

【0026】

一態様において、いずれかの先行請求項のHCOに由来する腸管コロノイドが企図される。

【0027】

いくつかの態様において、多能性であるかまたは多能性になるように誘導されることができる幹細胞が使用され得る。いくつかの態様において、多能性幹細胞は胚性幹細胞に由来し、それが今度は哺乳類初期胚の全能性細胞に由来し、試験管内での無限の未分化増殖が可能である。胚性幹細胞は、初期段階の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞である。胚盤胞から胚性幹細胞を誘導するための方法は当技術分野において周知である。例えば、3つの細胞株(H1、H13、およびH14)は正常なXY核型を有し、2つの細胞株(H7およびH9)は正常なXX核型を有した。ヒト胚性幹細胞H9(H9-hESC)は、本出願に記載の例示的な態様において使用されるが、本明細書に記載の方法およびシステムがいかなる幹細胞へも適用可能であることは当業者によって理解されるであろう。

【0028】

本発明にしたがった態様において使用することができる追加の幹細胞には、米国国立幹細胞バンク(NSCB)、カリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF)ヒト胚性幹細胞研究センターが主宰するデータベース、Wi細胞研究所WISC細胞バンク、ウィスコンシン大学幹細胞再生医療センター(UW-SCRMC)、Novocell社(カリフォルニア州サンディエゴ市)、Cellartis AB(スウェーデン国イエーテボリ市)、ES Cell International Pte Ltd(シンガポール)、イスラエル工科大学Technion(イスラエル国、ハイファ市)、ならびにプリンストン大学およびペンシルバニア大学が主宰する幹細胞データベース、によって提供されているものか、またはそのデータベースに記載されているものを含むが、これらに限定されない。本発明にしたがった態様において使用することができる例示的な胚性幹細胞は、SA01(SA001)、SA02(SA002)、ES01(HES-1)、ES02(HES-2)、ES03(HES-3)、ES04(HES-4)、ES05(HES-5)、ES06(HES-6)、BG01(BGN-01)、BG02(BGN-02)、BG03(BGN-03)、TE03(I3)、TE04(I4)、TE06(I6)、UC01(HSF1)、UC06(HSF6)、WA01(H1)、WA07(H7)、WA09(H9)、WA13(H13)、WA14(H14)を含むがこれに限定されない。

【0029】

いくつかの態様において、幹細胞は追加的な特性を組み込むためにさらに改変される。例示的な改変細胞株には、H1 OCT4-EGFP、H9 Cre-LoxP、H9 hNanog-pGZ、H9 hOct4-pGZ、H9 inGFP hES、およびH9 Syn-GFPが含まれるが、これらに限定されない。

【0030】

胚性幹細胞についてのさらなる詳細は、例えば、Thomsonら、1998、「Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts」、Science 282 (5391) : 1145-1147 ; Andrewsら、2005、「Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin」、Biochem Soc Trans 33 : 1526-1530 ; Martin 1980、「Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis」、Science 209 (4458) : 768-776 ; Evans and Kaufman、1981、「Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos」、Nature 292 (5819) : 154-156 ; Klimanskayaら、2005、「Human embryonic stem cells derived without feeder cells」、Lancet 365 (9471) : 1636-1641、において見出され得るが、それらの各記載は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0031】

あるいは、多能性幹細胞は、有性生殖する生物の配偶子を生じる細胞である胚性生殖細胞 (EGC) に由来し得る。EGCは、胚性幹細胞の特性のうちの多くを有する後期胚の生殖腺隆起において認められる始原生殖細胞に由来し、胚性幹細胞の特性のうちの多くを有する。胚における始原生殖細胞は、成体において生殖配偶子 (精子または卵子) を作製する幹細胞へと発達する。マウスおよびヒトにおいて、適切な条件下、組織培養中で胚性生殖細胞を成長させることが可能である。EGCおよびESCはいずれも多能性である。本発明の目的のために、用語「ESC」は、時々、EGCを包含するために広範に使用される。

20

【0032】

人工多能性幹細胞 (iPSC)

いくつかの態様において、iPSCは、成体線維芽細胞のような非多能性細胞へのある特定の幹細胞関連遺伝子のトランスフェクションによって誘導される。トランスフェクションは、レトロウイルスのようなウイルスベクターを介して達成され得る。トランスフェクトされた遺伝子はマスター転写調節因子Oct-3/4 (Pou5f1) およびSox2を含むが、他の遺伝子が誘導の効率を高めることが示唆されている。3~4週間後、少数のトランスフェクトされた細胞が多能性幹細胞と形態学および生化学的に類似するようになり、通常は形態学的選択、倍加時間、またはレポーター遺伝子および抗生物質選択を通じて単離される。本明細書中で使用されるとき、iPSCには、第一世代iPSC、マウスにおける第二世代iPSC、およびヒト人工多能性幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0033】

いくつかの態様において、非ウイルス系の技術を採用してiPSCを作製することができる。いくつかの態様において、アデノウイルスを用いて必要な4つの遺伝子をマウスの皮膚細胞および肝細胞のDNAに輸送して、結果的に胚性幹細胞と同一の細胞を生じることができる。アデノウイルスはそれ自身の遺伝子のいずれも標的宿主に組み込まないので、腫瘍を作り出す危険性が排除される。いくつかの態様において、再プログラミングは、非常に低い効率ではあるが、いかなるウイルストランスフェクション系も用いることなくプラスミドを介して達成することができる。他の態様において、タンパク質の直接送達を使用してiPSCを作製し、したがってウイルスまたは遺伝子改変の必要性を排除する。いくつかの実施形態において、マウスiPSC細胞の作製は、類似の方法論を使用して可能である：ポリアルギニンアンカーを介して細胞内に導かれる特定のタンパク質による細胞の反復処置は、多能性を誘導するのに十分であった。いくつかの態様において、多能性誘導遺伝子の発現は、低酸素条件下で体細胞をFGF2で処置することによっても上昇す

40

50

ることができる。

【0034】

胚性幹細胞に関するさらなる詳細は、Kajiら、2009、「Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors」、Nature 458:771-775;Woltjenら、2009、「piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells」、Nature 458:766-770;Okitaら、2008、「Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors」、Science 322 (5903):949-953;Stadteldら、2008、「Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration」、Science 322 (5903):945-949;およびZhouら、2009、「Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins」、Cell Stem Cell 4 (5):381-384;において見出されることができ、それらの各記載は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0035】

いくつかの態様において、例示的なiPS細胞株は、iPS-DF19-9、iPS-DF19-9、iPS-DF4-3、iPS-DF6-9、iPS(包皮)、iPS(IMR90)、およびiPS(IMR90)を含むが、これらに限定されない。

20

【0036】

胚体内胚葉

本開示のHCOは、胚体内胚葉(DE)と呼ばれる単純な細胞シートに由来し得る。前駆細胞から胚体内胚葉を誘導する方法は、D'Armour etら2005およびSpenceらによって教示されているように、当該技術分野において周知である。前側DEは前腸ならびに肝臓および膵臓を含むその関連器官を形成し、後側DEは、小腸および大腸、ならびに腎尿路生殖生殖器の一部を形成する中腸ならびに後腸を形成する。マウス、ニワトリおよびカエルの胚を用いた研究は、原腸胚期のDEにおいて前後パターンを確立することがその後の前腸および後腸の発達の前提条件であることを示唆している。Wntシグナル伝達経路およびFGFシグナル伝達経路は、このプロセスにとって重要であると考えられており、後部内胚葉および後腸運命を促進するように、ならびに前部内胚葉および前腸運命を抑制するように作用する。後腸の単純な立方体上皮は、最初に擬似層状柱状上皮に発達し、次いで、極性のある柱状上皮と増殖性領域とを絨毛の基部に含有する絨毛に発達し、これは推定前駆細胞ドメインに対応する。

30

【0037】

本発明者らは、本明細書において、試験管内でDEの腸管組織、特にヒト結腸組織への分化を定方向にするための頑強かつ効率的な方法を記載する。定方向分化は、iPSCおよび/またはDE細胞においてあり特定のシグナル伝達経路を選択的に活性化することによって達成され得る。

40

【0038】

一般的に腸管発達に関する経路の追加的な詳細は、例えば、Sanchoら、2004、「Signaling Pathways in Intestinal Development and Cancer」、Annual Review of Cell and Developmental Biology 20:695-723、Logan and Nusse、2004、「The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease」、Annual Review of Cell and Developmental Biology 20:781-810、Taipale1 and Beachy1、2001、「The Hedgehog a

50

nd Wnt signalling pathways in cancer, "Nature 411:349-354、Gregorieff and Clevers, 2005, "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer, "Genes & Dev. 19:877-890において認められ、これらの各々はその全体が本明細書によって参照により本明細書に組み込まれる。DEの発達に関するシグナル伝達経路の機能についてのより多くの詳細は、例えば、Zorn and Wells, 2009, "Vertebrate endoderm development and organ formation, "Annu Rev Cell Dev Biol 25:221-251、De ssimoz et al., 2006, "FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo, "Mech Dev 123:42-55、McLin et al., 2007, "Repression of Wnt/ β -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development, "Development 134:2207-2217、Wells and Melton, 2000, Development 127:1563-1572、de Santa Barbara et al., 2003, "Development and differentiation of the intestinal epithelium, "Cell Mol Life Sci 60(7):1322-1332において認めることができ、それらの各々は、本明細書によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0039】

多能性細胞（例えば、iPSCまたはESC）から胚体内胚葉を作製するための任意の方法が、本明細書に記載の方法に適用可能である。いくつかの態様において、多能性細胞は桑実胚から誘導される。いくつかの態様において、多能性幹細胞は幹細胞である。これらの方法で使用される幹細胞は、胚性幹細胞を含み得るが、これに限定されない。胚性幹細胞は、胚の内部細胞塊または胚の生殖巣堤に由来し得る。胚性幹細胞または生殖細胞は、ヒトを含む種々の哺乳動物種を含むがこれらに限定されない種々の動物種に由来し得る。いくつかの態様において、ヒト胚性幹細胞は胚体内胚葉を作出するために使用される。いくつかの態様において、ヒト胚性生殖細胞は胚体内胚葉を作出するために使用される。いくつかの態様において、iPSCは胚体内胚葉を作出するために使用される。

【0040】

いくつかの態様において、多能性幹細胞からDE細胞への分化過程において1つ以上の成長因子が使用される。分化過程において使用される1つ以上の成長因子は、TGF- β スーパーファミリーからの成長因子を含み得る。このような態様において、1つ以上の成長因子は、成長因子のTGF- β スーパーファミリーのノーダル／アクチビンおよび／またはBMP部分群を含み得る。いくつかの態様において、1つ以上の成長因子は、ノーダル、アクチビンA、アクチビンB、BMP4、Wnt3a、またはこれらの成長因子のうちのいずれかの組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、胚性幹細胞または生殖細胞およびiPSCは、1以上の成長因子で6時間以上、12時間以上、18時間以上、24時間以上、36時間以上、48時間以上、60時間以上、72時間以上、84時間以上、96時間以上、120時間以上、150時間以上、180時間以上、または240時間以上処置される。いくつかの態様において、胚性幹細胞または生殖細胞およびiPSCは、10ng/ml以上、20ng/ml以上、50ng/ml以上、75ng/ml以上、100ng/ml以上、120ng/ml以上、150ng/ml以上、200ng/ml以上、500ng/ml以上、1,000ng/ml以上、1,200ng/ml以上、1,500ng/ml以上、2,000ng/ml以上、5,000ng/ml以上、7,000ng/ml以上、10,000ng/ml以上、または15,000ng/ml以上の濃度の1以上の成長因子で処置される。いくつかの

態様において、成長因子の濃度は処置を通して一定レベルで維持される。他の態様において、成長因子の濃度は処置の経過の間に変化する。いくつかの態様において、成長因子は、様々なHyClone濃度のウシ胎仔セリン（FBS）を含む培地中に懸濁される。当業者は、本明細書に記載された投与計画が、単独でまたは組み合わせで、何らかの既知の成長因子に適用可能であることを理解するであろう。2つ以上の成長因子が使用されるとき、各成長因子の濃度は独立して変動し得る。

【0041】

いくつかの態様において、胚体内胚葉細胞に富む細胞集団が使用される。いくつかの態様において、胚体内胚葉細胞は単離されているか、または実質的に精製されている。いくつかの態様において、単離または実質的に精製された胚体内胚葉細胞は、OCT4、AFP、TM、SPARCおよび／またはSOX7マーカーよりも高い程度までSOX17、FOXA2、および／またはCXCR4マーカーを発現する。胚体内胚葉を有する細胞集団を濃縮するための方法も企図される。いくつかの態様において、胚体内胚葉細胞は、混合細胞集団において、胚体内胚葉細胞の表面上には存在するが他の細胞の表面上には存在しない分子に結合する試薬と細胞を接触させること、次いで試薬に結合した細胞を単離することによって、混合細胞集団から単離または実質的に精製することができる。ある特定の態様において、胚体内胚葉細胞の表面上に存在する細胞構成素はCXCR4である。

【0042】

本発明において使用することができるDE細胞を取得または創出するための追加的な方法は、D'Amourらに対する米国特許第7,510,876号、Fiskらに対する米国特許第7,326,572号、Kubo1 et al., 2004, "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture," Development 131:1651-1662、D'Amourら, 2005, "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm," Nature Biotechnology 23:1534-1541、およびAngら, 1993, "The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins," Development 119:1301-1315に記載の方法を含むが、当該方法に限定されず、これらの各々は、本明細書によりその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0043】

胚体内胚葉から中／後腸スフェロイドへの移行

いくつかの態様において、DEの後側化した内胚葉細胞はさらに1つ以上の特化細胞型に発達する。アクチビン誘導胚体内胚葉（DE）はさらに、FGF/Wnt誘導後側内胚葉早口、後腸の規格および形態形成、ならびに最終的には腸管成長、腸細胞、杯細胞、パネート細胞および腸内分泌細胞を含む機能的腸細胞型への細胞分化を促進した前腸培養系を受けることができる。いくつかの態様において、ヒトPSCは、分泌細胞型、内分泌細胞型および吸収性細胞型を含み得る腸管上皮へと試験管内で分化するように効率的に定方向化される。成長因子のような分子は、特定の種類の腸管組織形成を促進するために何らかの発達期に添加され得ることは理解されるであろう。

【0044】

ESCおよびiPSCなどのPSCは、最初に胚体内胚葉（DE）、次に中／後腸上皮および間充織（例えば、後腸スフェロイド）、および次に腸管組織へと段階的または非段階的な様式で定方向分化を受ける。いくつかの態様において、胚体内胚葉細胞およびhESCは、1つ以上の成長因子で処置される。

【0045】

いくつかの態様において、可溶性FGFおよびWntリガンドを用いて、培養中の初期後腸規格を模倣して、定方向分化を通じて、iPSCまたはESCから発達したDEを、

すべての主要腸細胞型を効率的に生じさせる後腸上皮に変換する。ヒトにおいて、DEの定方向分化は、腸管の発達にとって重要である特定のシグナル伝達経路を選択的に活性化することによって達成される。任意のFGFリガンドと組み合わせて任意のWntシグナル伝達タンパク質の発現を変化させることが、本明細書に記載の定方向分化を生じさせることができることを、当業者は理解するであろう。

【0046】

より多数の詳細は、例えば、Liu et al., "A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway," *Angew Chem Int Ed Engl.* 44 (13): 1987-1990 (2005)、Miyabayashi, "Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency," *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (13): 5668-5673 (2007)、Zhang, "Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway," *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (18): 7444-7448 (2007)、Neiendam, "An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons," *J Neurochem.* 91 (4): 920-935 (2004)、Shan et al., "Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain," *Biochemistry* 44 (47): 15495-15503 (2005)、Coghlan, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," *Chem Biol.* 7 (10): 793-803 (2000)、Coghlan, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," *Chemistry & Biology* 7 (10): 793-803、およびPai, "Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness," *Mol Biol Cell.* 15 (5): 2156-2163 (2004) において認められ、これらの各々は、本明細書によりその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0047】

いくつかの態様において、Wntおよび/またはFGFシグナル伝達経路に関連する細胞構成素を標的とするsiRNAおよび/またはshRNAを使用して、これらの経路を活性化する。

【0048】

Wntシグナル伝達経路のモジュレーター/活性化因子には、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、およびWnt16が含まれる。いくつかの態様において、経路の調節は、上述の経路を活性化する小分子モジュレーターもしくはタンパク質モジュレーター、または上述の経路を活性化するタンパク質の使用を通じてであり得る。例えば、Wnt経路の小分子モジュレーターには、塩化リチウム、2-アミノ-4,6-二置換ピリミジン（ヘテロ）アリールピリミジン、IQ1、QS11、NSC668036、DCAベーターカテニン、2-アミノ-4-[3,4-(メチレンジオキシ)-ベンジルー

アミノ] - 6 - (3-メトキシフェニル) ピリミジンが含まれるが、これらに限定されない。Wntシグナル伝達の例示的な天然の阻害剤としては、Dkk1、SFRPタンパク質およびFrzBが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、外因性分子には、WAY-316606、SB-216763、またはBIO（6-ブロモインジルビン-3'-オキシム）のような小分子が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、Wntおよび／またはFGFシグナル伝達経路に関連する細胞構成素を標的とするsiRNAおよび／またはshRNAを使用して、これらの経路を活性化してもよい。標的細胞構成素がSFRPタンパク質、GSK3、Dkk1、およびFrzBを含むがこれらに限定されないことは当業者によって理解されるであろう。追加的なモジュレーターには、Wntシグナル伝達経路を活性化するGSK3を阻害する分子またはタンパク質が含まれる。例示的なGSK3阻害剤としては、限定されないが、例えば、GSK3βを阻害するChiron/CHIR99021が挙げられる。当業者は、開示された方法を実施するのに適したGSK3阻害剤を認識するであろう。GSK3阻害剤は、約1μM～約100μM、または約2μM～約50μM、または約3μM～約25μMの量で投与されてもよい。当業者は、適切な量および期間を容易に認識するであろう。

【0049】

線維芽細胞増殖因子（FGF）は、血管新生、創傷治癒、および胚発生に関する増殖因子のファミリーである。いくつかの態様において、任意のFGFをWntシグナル伝達経路由来のタンパク質とともに使用することができることは、当業者によって理解されるであろう。いくつかの態様において、可溶性FGFには、FGF4、FGF2、およびFGF3が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、FGFシグナル経路は、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、およびFGF23からなる群より選択される1つ以上の分子と前駆細胞を接触させることによって活性化される。いくつかの態様において、FGFシグナル伝達経路に関連する細胞成分を標的とするsiRNAおよび／またはshRNAを用いてこれらの経路を活性化してもよい。WntおよびFGFシグナル伝達経路に関連して本明細書中に記載される方法および組成物が例として提供されることは当業者によって理解されるであろう。同様の方法および組成物は、本明細書に開示されている他のシグナル伝達経路へも適用可能である。

【0050】

いくつかの態様において、DE培養物は、本明細書に記載のシグナル伝達経路の1つ以上のモジュレーターで6時間以上、12時間以上、18時間以上、24時間以上、36時間以上、48時間以上、60時間以上、72時間以上、84時間以上、96時間以上、120時間以上、150時間以上、180時間以上、200時間以上、240時間以上、270時間以上、300時間以上、350時間以上、400時間以上、500時間以上、600時間以上、700時間以上、800時間以上、900時間以上、1,000時間以上、1,200時間以上、または1,500時間以上処置される。

【0051】

いくつかの態様において、DE培養物は、10ng/ml以上、20ng/ml以上、50ng/ml以上、75ng/ml以上、100ng/ml以上、120ng/ml以上、150ng/ml以上、200ng/ml以上、500ng/ml以上、1,000ng/ml以上、1,200ng/ml以上、1,500ng/ml以上、2,000ng/ml以上、5000ng/ml以上、7,000ng/ml以上、10,000ng/ml以上、または15,000ng/ml以上の濃度の本明細書に記載のシグナル伝達経路の1つ以上のモジュレーターで処置される。いくつかの態様において、シグナル伝達分子の濃度は処置を通して一定に維持される。他の態様において、シグナル伝達経路のモジュレーターの濃度は処置の経過の間に変化する。いくつかの態様において、本発明にしたがったシグナル伝達分子は、DMEMおよびウシ胎仔セリン（FBS）を含む培地中に懸濁される。FBSは、2%以上、5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、

30%以上、または50%以上の濃度であり得る。当業者は、本明細書に記載された投与計画が、限定されるものではないがWntシグナル伝達経路およびFGFシグナル伝達経路における任意の分子を含む、本明細書に記載のシグナル伝達経路の任意の既知のモジュレーターに、単独または組み合わせで適用可能であることを理解するであろう。

【0052】

DE培養物を処置するために2つ以上のシグナル伝達分子が使用される態様において、シグナル伝達分子は同時にまたは別個に添加することができる。2つ以上の分子が使用されるとき、各々の濃度は独立して変わり得る。

【0053】

CDX2の発現は、DEがFGFシグナル伝達活性化因子およびWntシグナル伝達活性化因子、例えばFGF4およびWnt3aとともに一定期間、例えば12時間以上、18時間以上、24時間以上、36時間以上、48時間以上、60時間以上、または90時間以上インキュベートされた後に後腸形成の傾向を明らかにするために使用され得る。いくつかの態様において、CDX2の長時間の発現によって測定される場合、安定した後部内胚葉表現型を達成するためには、より長い期間のインキュベーションが必要とされる。このような態様において、インキュベーションの期間は、60時間以上、72時間以上、84時間以上、96時間以上、108時間以上、120時間以上、140時間以上、160時間以上、180時間以上、200時間以上、240時間以上、または300時間以上であり得る。

【0054】

あるいは、いくつかの態様において、前腸マーカーであるSox2、Pdx1、Cldn18、およびアルブミンのような細胞構成素の非存在は、定方向後腸形成を明らかにするために使用することができる。いくつかの態様において、腸管転写因子CDX2、KLF5、およびSOX9を使用して腸管発達を表すことができる。いくつかの態様において、GATA6タンパク質発現を使用して、腸発生を表すことができる。これらの態様において、インキュベーション期間は、12時間以上、18時間以上、24時間以上、36時間以上、48時間以上、60時間以上、または90時間以上であり得る。あるいは、インキュベーション期間は、60時間以上、72時間以上、84時間以上、96時間以上、108時間以上、120時間以上、140時間以上、160時間以上、180時間以上、200時間以上、240時間以上、または300時間以上であり得る。

【0055】

いくつかの態様において、細胞構成素の存在量データ、例えばタンパク質および／または遺伝子発現レベルは、関連シグナル伝達経路における一次抗体および／または二次抗体標的分子を用いた免疫組織化学によって決定される。他の態様において、細胞構成素の存在量データ、例えばタンパク質および／または遺伝子発現レベルは、マイクロアレイ分析によって決定される。

【0056】

さらに代替的には、形態学的変化を用いて定方向分化の進行を表すことができる。いくつかの態様において、後腸スフェロイドは、さらなる成熟のために3次元培養条件にさら供される。他の態様において、間充織細胞に囲まれた非常に複雑な上皮が後腸スフェロイド形成後に観察することができる。加えて、腸管オルガノイド、極性化した柱状上皮、杯細胞、または平滑筋細胞は、6日以上、7日以上、9日以上、10日以上、12日以上、15日以上、20日以上、25日以上、28日以上、32日以上、36日以上、40日以上、45日以上、50日以上、または60日以上観察することができる。

【0057】

中／後腸スフェロイドから結腸オルガノイドへの移行

FGFおよびWNTシグナル伝達に加えて、骨形成タンパク質(BMP)、具体的にはBMP2およびBMP4は、後側／後腸の運命を促進し、前腸の運命を抑制することができることは同定されてきた。加えて、BMPシグナル伝達は、腸管の異なる部域型の形成を調節する。後腸期後のノギンによるBMPの阻害は、近位腸管の運命(十二指腸／空腸

10

20

30

40

50

)を促進する。後腸期後のBMPシグナル伝達の活性化は、より遠位の腸管細胞運命(盲腸/結腸)を促進する。

【0058】

BMPの活性化は、該ヒト結腸オルガノイドを形成するのに十分な時間、中/後腸スフェロイドをBMP活性化因子およびEGFシグナル伝達経路活性化因子と接触させることによって実施することができる。インキュベーション期間の境界は、ヒト結腸オルガノイドがSATB2を発現する時点によって定義され得る。適切なBMP活性化因子およびEGFシグナル伝達経路活性化因子は、当業者によって容易に理解されるであろう。適切なBMP活性化因子としては、例えば、BMP2、BMP4、BMP7、BMP9およびタンパク質もしくはペントロモルフィン(ventromorphin)のような小分子アゴニスト(Genthe et al., 2017)またはアゴニストとして役立つタンパク質が挙げられ得る。BMP活性化因子およびEGFシグナル伝達経路活性化因子は、中/後腸スフェロイドと約1日~約3日間接触させることができる。BMPシグナル伝達は、最初の3日以内に活発になることがある。一態様において、BMP活性化因子とEGFシグナル伝達経路活性化因子との接触ステップは、24時間~約10日、または約48時間~約9日、または約3日~約8日、または約4日~約8日、または約5日~約7日である。適切なEGF活性化因子は、例えば、TGFアルファ、HB-EGF、アンフィレグリン、エピゲン、ベータセルリンおよびdb-cAMPのような小分子を含み得る。EGF活性化因子は、約10ng/mL~10,000ng/mLの濃度で、約24時間~約10日、または約48時間~約9日、または約3日~約8日、または約4日~約8日、または約5日~約7日、中/後腸スフェロイドと接触させることができる。

【0059】

中/後腸スフェロイドは、5ng/mL以上、20ng/mL以上、50ng/mL以上、75ng/mL以上、100ng/mL以上、120ng/mL以上、150ng/mL以上、200ng/mL以上、500ng/mL以上、1,000ng/mL以上、1,200ng/mL以上、1,500ng/mL以上、2,000ng/mL以上、5,000ng/mL以上、7,000ng/mL以上、10,000ng/mL以上、または15,000ng/mL以上の濃度のBMP活性化因子および/またはEGF活性化因子と、単独でまたは組み合わされて接触させることができる。いくつかの実施形態では、シグナル伝達分子の濃度は処置の間、一定に維持される。他の実施形態では、シグナル伝達経路の分子の濃度は、処置の過程で変化する。いくつかの実施形態において、本発明によるシグナル伝達分子は、DMEMおよびウシ胎仔血清(FBS)を含む培地に懸濁される。FBSは、2%以上、5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、30%以上、または50%以上の濃度であり得る。当業者は、本明細書に記載の投与計画が本明細書に記載のシグナル伝達経路の任意の既知の分子に単独でまたは組み合わせで適用可能であることを理解するであろう。

【実施例】

【0060】

以下の非限定的な例は、本明細書に開示された本発明の態様をさらに説明するために提供される。以下の例に開示された技術が、本発明の実施において十分に機能することが見出されたアプローチを表し、したがってその実施のための様式の例を構成するとみなすことができることは、当業者によって認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示に鑑みて、開示された具体的な態様において多くの変更を行うことができ、それでも本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同様のまたは類似の結果を得ることができることを認識している。

【0061】

消化管の上皮は、原腸形成の間に確立される一次胚葉のうちの1つである胚体内胚葉に由来する。腸管形態形成の過程は、胚体内胚葉を、前腸、中腸および後腸を有する原始腸管へと変換する。中腸は小腸および近位大腸を生じ、後腸は遠位大腸および直腸を生じる(Zorn and Wells, 2009)。小腸は3つのセグメントにさらに細分され

10

20

30

40

50

る。栄養素の吸収および鉄の取り込みに関与する十二指腸、栄養素の消化および吸収に関与する空腸、ならびに胆汁酸およびビタミンB12の吸収に関与する回腸である（Jeejeebhoy, 2002）。大腸は盲腸、結腸および直腸に細分され、それらはすべて水および電解質の吸収に関与している（Jeejeebhoy, 2002）。近年の進歩は小腸の発達に焦点を当ててきたが（Finkbeiner et al., 2015、Spence et al., 2011、Watson et al., 2014）、ヒトの大腸／結腸の発達についてはほとんど知られていない。さらに、消化（GI）管のこの領域に影響を及ぼす疾患である大腸炎、結腸癌、ポリポース症候群および過敏性腸症候群が広く認められている（Molodecky et al., 2012、Siegel et al., 2014、ZbukおよびEng, 2007）。ポリープおよび腫瘍は小腸において優先的に形成され、結腸または直腸においてはまれに形成されるので、ポリポース症候群および腸癌の動物モデルは限られている（Haramis et al., 2004、He et al., 2004、Moser et al., 1990）。

【0062】

本発明者らは、小腸の胚発生に近似した定方向分化の段階を通じてヒト多能性幹細胞を腸管組織へと分化させることができる方法をすでに記載した。第一に、多能性幹細胞はアクチビンAによる処置により胚体内胚葉へと分化する。高レベルのWntおよびFGFへの胚体内胚葉の曝露は、中／後腸管スフェロイドへの形態形成を誘導する。一旦形成されると、これらの中腸／後腸スフェロイドは、腸管の成長に好ましい条件下、3次元培養で成長させるとき、生体内での小腸の発達に近い段階を経て移行し、ヒト腸管オルガノイド（HIO）を形成する（Spence et al., 2011）。HIOは小腸の同一性を有し、小腸の生物学的性質をモデル化するために極めて有用であることが証明されている（Bouchi et al., 2014、Finkbeiner et al., 2015、Watson et al., 2014、Xue et al., 2013）。しかしながら、今まで、PSC由来の大腸オルガノイドは開発されておらず、大腸における疾患の有病率を考えると、このようなシステムは、消化管のこの領域における発達および疾患の機序の調査を可能にするであろう。

【0063】

大腸オルガノイドを作製する方法を開発するために、本発明者らは最初に、カエル、マウス、およびヒトにおける推定大腸上皮の明確なマーカーとしてSatb2を同定した。Satb2をマーカーとして使用すると、本発明者らは、後腹側発生におけるBMPの既知の役割と一致する、カエルおよびマウスの後腸内胚葉の特定にBMPシグナル伝達が必要とされることを示した（Kumar et al., 2003、Roberts et al., 1995、Sherwood et al., 2011、Tiso et al., 2002、Wills et al., 2008）。その上、3日間のPSC由来腸管培養におけるBMPシグナル伝達の刺激は、後側HOXコードおよびSATB2発現結腸オルガノイドの形成を誘導するのに十分である。ヒト結腸オルガノイド（HCO）は、大腸と一致するマーカー特性および細胞型を有していた。さらに、HIOではなく、HCOがNEUROG3の発現に応じて結腸腸内分泌細胞（EEC）を形成し、このことはHCOが結腸領域に機能的に関与していることを実証した。加えて、免疫無防備状態のマウスの腎被膜下に生着し、生体内で8～10週間成長したHCOは、それらの部域的な同一性を維持し、結腸の形態学的性質を有する組織を形成し、結腸特異的細胞型を含有し、増殖および分化の領域を有し、平滑筋層を十分に形成した。生体内で成長したオルガノイドから誘導された腸管のエンテロイドおよびコロノイドは、部域的な同一性を維持していた。最後に、RNA配列分析は、HIOおよびHCOが実質的な成熟を経験し、それぞれ小腸および大腸の同一性と一致する部域的なマーカーを発現することを実証した。要約すると、本発明者らは、カエルおよびマウスにおいて進化的に保存されたBMP-HOX経路を同定し、これを使用して後腸パターン形成およびヒト結腸オルガノイドの形成を定方向化した。

【0064】

結果

S A T B 2 発現は、胚および成体の後部の腸の腸内胚葉を標識する。

【0065】

中腸および後腸、推定上の小腸および大腸を確立する分子経路は、十分に定義されたマーカーが少数であることに一部より、ほとんど理解されていない。このことは、ヒト P S C から部域的に異なる腸管オルガノイド、特に大腸オルガノイドへの分化を定方向化する能力を制限してきた。それゆえ、本発明者らは、マウス胚腸管の異なるドメインを区別するマーカーを同定し、これらを使用して初期腸をパターン形成するシグナル伝達経路を調査した。従来の報告と一致して、本発明者らは、胎生 9.5 日マウス胚において、G a t a 4 が後部前腸から卵黄茎までの腸内胚葉を標識することを見出した（図 8 A）（A r o n s o n e t a l . , 2014、B a t t l e e t a l . , 2008、B e u l i n g e t a l . , 2008a、B e u l i n g e t a l . , 2007a、B e u l i n g e t a l . , 2007b、B e u l i n g e t a l . , 2010、B e u l i n g e t a l . , 2008b、B o s s e e t a l . , 2007、K o h l n h o f e r e t a l . , 2016、P a t a n k a r e t a l . , 2012a、P a t a n k a r e t a l . , 2012b、S h e r w o o d e t a l . , 2009、W a l k e r e t a l . , 2014）。発生の後期（胎生 11.5 日胚～胎生 16.5 日胚）において、G a t a 4 は前腸を明確に標識し続けたが後腸は標識しなかった（図 8 B～D、I～J）。この発現ドメインは、マウス（非表示）およびヒト（図 8 K～L）の両方において成体期までそのままである。

【0066】

後部胎児腸のマーカーを同定するために、本発明者らは、結腸に多い遺伝子について G N C P r o（商標）、T i G E R およびヒトタンパク質アトラスのような公共の発現データベースを調べ、有望な大腸マーカーとして S a t b 2 を見出した。S a t b 2 は、C U T クラスのホメオボックス遺伝子のメンバーであり（H o l l a n d e t a l . , 2007）、これは核マトリックス付着領域を結合し、クロマチンリモデリングに関与している（G y o r g y e t a l . , 2008）。免疫染色は、S a t b 2 タンパク質が胎生 9～9.5 日胚でマウス胚の後部内胚葉において最初に検出され、卵黄茎で G a t a 4 との目立たない発現境界を形成し（図 8 A）、このことは S a t b 2 + ドメインが、すでに同定されているよりも幅広い発現ドメインである後部腸を標識することを示唆した（D o b r e v a e t a l . , 2006）。S a t b 2 発現は、発生中（胎生 11.5～16.5 日）（図 8 B、C、E、F、H、J）にマウス（非表示）およびヒト（図 8 L）における出生後結腸の後部腸内胚葉を標識し続けた。公表されたヒトプロテオームおよび R N A 配列のデータを用いて、本発明者らは、G A T A 4 および S A T B 2 がそれぞれヒト胎児および成体の腸管の近位領域および遠位領域を区別して標識することを確認した（B e r n s t e i n e t a l . , 2010、F a g e r b e r g e t a l . , 2014）（W a n g e t a l . , 2015）（図 9 A～C）。これらのデータは、G a t a 4 および S a t b 2 の発現境界がマウスの発生の初期に確立され、マウスおよびヒトにおいて発生中の小腸および大腸の将来の境界を標識することを実証している。

【0067】

胚後腸内胚葉における S a t b 2 発現には B M P シグナル伝達が必要とされる。

【0068】

本発明者らは次に、胚において後部腸の運命を促進する経路を同定するためのマーカーとして S a t b 2 を使用した。ゼブラフィッシュ、ゼノパス（X e n o p u s）、ニワトリおよびマウスの発生のいくつかの段階において内胚葉をパターン形成するうえでのその既知の役割を考慮して、本発明者らは最初に、B M P シグナル伝達が後部腸管において活発であるかどうかを決定した（K u m a r e t a l . , 2003、R o b e r t s e t a l . , 1995、S h e r w o o d e t a l . , 2011、T i s o e t a l . , 2002、W i l l s e t a l . , 2008）。本発明者らは、リン酸化 S m a d 1 / 5 / 8（p S M A D 1 / 5 / 8）によって測定されるように、B M P シグナル伝達

が胎生 8.5 日マウス胚の後部腸管の内胚葉および中胚葉において非常に活発であることを観察した (図 1 A ~ B)。BMP シグナル伝達が後部腸管のパターン形成に必要とされるかどうかを決定するために、本発明者らは、BMP シグナル伝達阻害剤 DMH-1 中で初期の前頭葉期マウス胚 (胎生 7.5 日) を培養した (図 1 C)。DMH-1 処置の 48 時間後、本発明者らは、pSmad1/5/8 レベルの有意な低減および後部腸管における *Satb2* 発現の喪失を観察した (図 2 D ~ K)。加えて、*Satb2* 発現は、ゼブラフィッシュにおける先行研究と一致する DMH-1 処置胚の第 1 腕弓において喪失された (Sheehan-Rooney et al., 2013)。DMH-1 は、pSmad2/3 レベルによって測定されるように TGF β 1/3 シグナル伝達に何ら影響を及ぼさなかった (図 1 F)。脊椎動物種にわたる *Satb2* の進化的保存を考慮して (Liet al., 2006)、本発明者らは、カエル胚の後腸における *Satb2* 発現に BMP が必要とされるかどうかを調べた (図 2 L)。マウスと同様に、DMH-1 によるゼノパス (*Xenopus*) 胚の処置 (図 1 M ~ V)、または BMP アンタゴニストであるノギンのトランスジェニック発現 (非表示) は、後腸および上腕弓における *Satb2* 発現の喪失を結果的にもたらした。BMP シグナル伝達は、保存されたエンハンサーへの Smad1/5 の直接結合を介してマウス胚下顎の *Satb2* 発現を直接調節することが示されており (Bonilla-Claudio et al., 2012)、*Satb2* も腸における直接的な BMP 標的であり得ることを示唆している。まとめると、これらの結果は脊椎動物における保存された経路を明らかにし、それによって遠位回腸および大腸を生じる発達中の腸管の最後部領域を規定するために BMP シグナル伝達が必要とされる。

【0069】

BMP シグナル伝達はヒト腸管培養における後部運命を促進する。

【0070】

本発明者らは次に、BMP シグナル伝達が、すでに記載されたように (Spence et al., 2011) ヒト PSC 由来の新生 CDX2+ 腸管スフェロイドを使用してヒトにおける後部腸管の運命を促進するために使用することができるかどうかを調べた。本発明者らは、BMP 阻害剤ノギンまたは BMP2 をそれぞれ使用して、BMP シグナル伝達を阻害または活性化し (図 2 A)、核 pSMAD1/5/8 の蓄積により BMP シグナル伝達レベルを監視した。対照培養物は低レベルの pSMAD1/5/8 タンパク質を有し、ノギンの添加はこの染色を消失させた (図 2 B ~ D)。対照的に、BMP2 の添加は上皮細胞および中胚葉細胞の両方において pSMAD1/5/8 の迅速な蓄積を引き起こし、両方の細胞型がマウス胚において本発明者らが観察したものと同様の BMP シグナルに応答することを示唆した (図 1 A ~ B)。pSmad1/5/8 染色の特異性は成体マウス結腸を用いて確認され、このことはすでに報告されたように (Hardwick et al., 2004, van Dope et al., 2009, Whissell et al., 2014)、pSmad1/5/8 染色が上部陰窩の分化した区画に限定されることを示した。オルガノイドのさらなる分析は、3 日間の BMP2 処置がノギンおよび対照培養物と比較して、上皮において高レベルの SATB2 タンパク質を誘導するのに十分であることを明らかにした (図 2 F ~ I)。このことは、短いパルスの BMP 活性がスフェロイド内胚葉を後部腸管の運命へとパターン形成するのに十分であることを示唆している。

【0071】

BMP シグナル伝達は内胚葉の前後パターン形成を調節することが知られているが、哺乳類において前後軸に沿った位置的同一性を最終的に与える転写ネットワークについてはあまり知られていない。本発明者らは、BMP シグナル伝達が、発生中のヒト腸において後部ドメインをどのように確立するかを同定するために、ヒト腸管スフェロイドおよび RNA 配列を使用した。主成分分析は、BMP で 3 日間処置した腸管スフェロイドが、ノギンおよび対照で処置したオルガノイドとは別にクラスター化したことが明らかになった (図 2 J)。遺伝子オントロジー期間 (GO 期間) の検討は、BMP シグナル伝達の調節が、器官形態形成、細胞間シグナル伝達、パターン指定および BMP シグナル伝達に対する

細胞応答を含む複数の生物学的過程に影響することを明らかにした（図 2 K）。前後パターン形成の最も決定的な調節因子は H O X 遺伝子であるので、本発明者らは、BMP 活性化が前側 H O X 遺伝子の下方調節および後側 H O X 遺伝子の上方調節を結果的にもたらしつつを見出した（図 2 L）。特に本発明者らは、H O X 1 0、1 1、1 2 および 1 3 群の複数のパラログの BMP 媒介性増加を観察した。これらの結果は、BMP シグナル伝達がヒト腸管のパターン形成中に前後 h o x コードを広く調節することを実証しており、遠位消化管が最初に特異化される機序を示唆している。

【 0 0 7 2 】

BMP シグナル伝達は S H H の下流で作用して後部 H O X コードを誘導する。

【 0 0 7 3 】

先行研究は、S o n i c H e d g e h o g (S h h) がニワトリ胚の後部腸パターン形成中に B m p 4 および H o x 1 3 発現の上流で作用することを示唆している（図 1 0 A）（R o b e r t s e t a l . , 1 9 9 5）。しかしながら、BMP と H o x 1 3 との間の相対的な上位性の関連性（図 1 0 B）は、中腸および後腸における B m p 4 過剰発現によって引き起こされる胚の致死性のために調べられなかった（D e S a n t a B a r b a r a e t a l . , 2 0 0 5、R o b e r t s e t a l . , 1 9 9 5）。本発明者らは、後部腸管パターン形成中の S H H - B M P - H O X 1 3 の上位性の関連性をより良好にモデル化するためにヒト腸管培養物を使用した。平滑化アゴニスト S A G を用いたヘッジホッグシグナル伝達の活性化は、BMP シグナル伝達標的遺伝子である M S X 2 ならびに間充織 H O X 因子である H O X A 1 3 および H O X D 1 3 の濃度依存的活性化をもたらした（図 1 0 C）。しかしながら、これらの因子の S A G 媒介活性化は、BMP 2 によって媒介される活性化のほんの一部でしかなかった（図 1 0 C）。本発明者らはさらに、H H シグナル伝達が H O X A 1 3 を活性化する能力が BMP に完全に依存することを示し（図 1 0 D ~ E）、BMP シグナル伝達がすでに報告されたように S H H の下流で機能することを確認した（S h y e r e t a l . , 2 0 1 5、W a l t o n e t a l . , 2 0 1 2、W a l t o n e t a l . , 2 0 0 9、W a l t o n e t a l . , 2 0 1 6）。BMP シグナル伝達が H H シグナル伝達の下流で後側 H O X プログラムを活性化するのに十分であるかどうかはまだ決定されていない。それゆえ、本発明者らは、S H H 阻害剤であるシクロパミンの存在下で BMP による H O X A 1 3 誘導を検討し、S H H シグナル伝達が阻害されたときに、BMP 2 が H O X A 1 3 を誘導するのに十分であることを見出した（図 1 0 F ~ G）。このことと一致して、BMP パターン形成中の S H H シグナル伝達の活性化は S A T B 2 発現を改善しなかった（図 1 1 A）。ゼノパス（X e n o p u s）における実験は、この機序が進化的に保存されていることを示唆している S H H と BMP との間のこの上位性の関連性を確認した（データ非表示）。まとめると、本発明者らのデータは、BMP シグナル伝達が後部 H O X コードを活性化するのに十分であり、H H シグナル伝達の下流でそのように活性化することを示唆している。

【 0 0 7 4 】

試験管内で培養された BMP 由来オルガノイドは遠位の同一性を維持する。

【 0 0 7 5 】

本発明者らは次に、3 日間の BMP 処置が 2 5 日間のオルガノイドの長期培養後に、安定した部域的同一性を与えるのに十分であるかどうかを調べた（図 3）。O N E C U T 1（近位小腸のマーカー）のレベルは、ノギンおよび対照で処置したオルガノイドにおいて最も高く、BMP 2 で処置したオルガノイドにおいては非存在であった（図 3 A ~ D）。逆に、S A T B 2 は、ノギンおよび対照で処置したオルガノイドの上皮においては非存在であったが、BMP 2 で処置したオルガノイドのほぼすべての C D X 2 + 上皮細胞においては広範に発現していた（図 3 E ~ H、図 1 1 A）。重要なことに、BMP シグナル伝達の調節は、胚性幹細胞株 H 1 および H 9 ならびに人工多能性幹細胞株（I P S C 5 4、1 および I P S C 7 2、3）を含む複数のヒト P S C 株に対して同様の近位 - 遠位パターン形成効果を有した（後述）。本発明者らは、試験管内で H I O に存在することが知られている他の細胞型の存在におそらく起因して、ノギンおよび対照のオルガノイドにおけ

る非上皮SATB2発現を頻繁に観察した（データ非表示）。後部上皮および間充織においてそれぞれ発現するHOXB13およびHOXD13の検討は、BMP処置オルガノイドが試験管内での長期培養後に後部パターン形成を維持することをさらに明らかにした（図11B～C）。

【0076】

杯細胞は、近位小腸から遠位大腸まで低から高への勾配で分布しており（Rodriguez-Pineiro et al., 2013）、本発明者らは、杯細胞数が近位オルガノイドにおいてより低く、遠位オルガノイドにおいてより高いかどうか調べた。28日目のMUC2染色の分析は、BMP2処置オルガノイドが、より近位のノギン処置オルガノイドおよび対照オルガノイドと比較して、細胞内MUC2によって可視化されるように多数の杯細胞を有することを明らかにし（図3I～L）、このことは、まれにしか細胞内MUC2染色を有していなかった。本発明者らはさらに、結腸における杯細胞のサブセットによって発現するが小腸内では発現しないマーカーMUC5Bを使用して、杯細胞の部域的同一性を確認した（van Klinken et al., 1998）。MUC5B染色は、ノギンおよび対照で処置した28日齢オルガノイドにおいては非存在であったが、BMP2処置オルガノイドにおいては存在した（図4M～P）。杯細胞の形態学的性質は、より加齢したオルガノイドにおいてより成熟し（図11D～I）、ここで、44日齢のBMPで処置したオルガノイドにおいて、本発明者らは、粘液をオルガノイドの内腔へと分泌する過程において杯細胞を観察した（図11J～L）。BMP処置オルガノイドにおいて粘液分泌を観察することができることは、このオルガノイドのシステムが、粘液分泌および腸の病態生理学における粘液の役割を研究するのに有用であろうことを示唆している。

【0077】

オルガノイドの部域的パターンは培養28日後に安定しているが、本発明者らは初期のパターン形成が最初の3日間の処置後に完全に確立されたかどうかを調べたいと考えた。そうするために、本発明者らは、3日間のノギン処置をしたスフェロイドを3日間BMP2含有培地に移し、逆に3日間のBMP2処置したスフェロイドを3日間ノギン含有培地に移した。ノギンを用いて作製された近位オルガノイドは、BMP2に応答してSATB2を発現せず、近位の運命が3日間のパターン形成後において安定していることを実証した（図11A）。逆の実験において、3日間のBMP2処置は、安定した遠位運命を誘導するのに十分であったが、オルガノイドのサブセットはノギン処置に応答してSATB2発現を喪失した（図11A）。3日間のBMP2処置は、試験管内および生体内で安定である結腸運命を誘導するのに十分であるが（図12）、初期後部腸管において可塑性が残っている。このことは、妊娠中期ラット胚の結腸内胚葉が小腸内胚葉よりも部域的に可塑性であるという観察と一致する（Rattineau et al., 2003）。

【0078】

BMPシグナル伝達によるオルガノイド間充織のパターン形成。

【0079】

BMPシグナル伝達の刺激はオルガノイド上皮に部域的同一性を与えたが、本発明者らは、パターン形成中のBMP2処置オルガノイドの非上皮区画におけるpSMAD1/5/8、および間充織において発現することが知られている後側HOX因子の上方調節も観察した。間充織のパターン形成が安定しているか、それとも上皮から入力される持続したパターン形成を必要としたかを決定するために、本発明者らは、間葉細胞培養物を2～3週間単離して増殖させ、それらを部域的HOX遺伝子の発現について分析した。間葉系培養物はE-カドヘリン発現細胞を欠失しており、間充織から主として構成されていることを示唆した（図3Q）。近位腸管間充織に多いHOXD3の分析（Yahagi et al., 2004）は、ノギンおよび対照で処置したオルガノイドに由来する間充織が安定した近位同一性を有するのに対し、BMP処置オルガノイドがHOXD3の発現低下（図3R）および高レベルのHOXA13（図3S）を有しており、後者はヒト結腸線維芽細胞において発現し続ける（Higuchi et al., 2015）。まとめると、これ

らのデータは、BMPシグナル伝達の早期調節が上皮および間充織の両方をパターン形成すること、ならびに間充織パターン形成が上皮の非存在下でさえも安定であることを示唆している。

【0080】

結腸腸内分泌細胞の誘導はBMP2処置オルガノイドに限られている。

【0081】

いくつかのECCサブタイプの発生は、小腸および大腸の特定のセグメントに部域的に制限されている。例えば、タンパク質INS L5の発現は結腸ECCに限定されている（Burnicka-Turek et al., 2012、Thanasupawat et al., 2013）。結腸同一性の機能検査として、本発明者らは、結腸ECCマーカであるINS L5の実験的誘導が、BMP2処置遠位オルガノイドに限定されるかどうかを決定した。これを行うために、本発明者らは、すでに記載したように（McCracken et al., 2017、McCracken et al., 2014）、ドキサイクリン（DOX）誘導性NEUROG3発現カセットを有するiPSC株を用いて前内分泌転写因子NEUROG3を誘導発現させた（図4A）。本発明者らは、培養物において6時間のDOXパルスを行い、追加の7日間の後、CHGA陽性細胞によって測定されるようにECCの強い誘導を観察した（図4B～I）。しかしながら、本発明者らは、BMP2処置オルガノイド中のINS L5陽性細胞のみを観察し、これをQPCR分析によって確認した（図4C～H、J）。INS L5発現細胞が結腸内にのみ存在することを考えると、本発明者らのデータは、BMP2処置オルガノイドが結腸運命に機能的に

10

20

【0082】

パターン形成したオルガノイドの部域的同一性は生体内で維持されている。

【0083】

マウスおよびヒト胎児腸管の先行研究は、腸管の異なる部域の部域同一性および組織形態が免疫無防備状態マウスにおける同所性移植および成長の後で維持されていることを実証してきた（Duluc et al., 1994、Savidge et al., 1995）。試験管内でパターン形成されたHIOおよびHCOが部域的同一性を維持し、小腸および大腸の組織へと成長するかどうかを決定するために、本発明者らは、HIOおよびHCOをマウス腎被膜下に6～10週間移植し、本発明者らは、小腸組織へのHIO成熟における結果をすでに実証した（Watson et al., 2014）。本発明者らは、ノギンおよび対照HIOの生着がHCOよりも効率的であることを観察した（図12A）。それらの部域的同一性と一致して、移植したHIOおよびHCOは、それぞれ形態的に小腸または大腸のいずれかに形態学的に似た成熟組織へと発達した（図5A～E）。ノギンおよび対照オルガノイドの上皮は、ヒト小腸に匹敵する、十分に定義された陰窩および長い絨毛を形成した。対照的に、BMP2処置オルガノイドは、陰窩を含有していたが、結腸と同様に絨毛を欠失していた。

30

40

【0084】

小腸または大腸のいずれかに対する形態学的類似性に加えて、移植されたHIOおよびHCOは異なる部域マーカを発現し、部域的に豊富な細胞型を含有した。例えば、ノギンおよび対照HIOの上皮の大部分は、近位マーカであるGATA4を発現し、大腸マーカであるSATB2を発現しなかった（図5F～I、K～N、図12B～E）。逆に、HCO上皮は、一様にSATB2+であったがGATA4を発現しなかった（図5J、O、図12B～E）。加えて、DEFA5を発現するパネート細胞は、ノギンおよび対照HIOの陰窩に存在したが、ヒト結腸と同様に（Wehkampら、2006）、HCOは非存在であった（図5P～T、図12F）。本発明者らはさらに、HCOの杯細胞のサブセットによって発現するがノギンまたは対照HIOにおいては検出できない結腸杯細胞

50

マーカーであるMUC5B (van Klinken et al., 1998) を用いてHCOの結腸同一性を確認した(図5U~Y、図12G)。加えて、MUC2+杯細胞の数は、ヒト結腸において見られる杯細胞の存在量と一致するHIOと比較してHCOにおいて非常に多かった(図12H~L)。パターン形成マーカー、MUC5B発現杯細胞の存在、およびパネート細胞の非存在はすべて、移植されたHCOが結腸上皮を有するという結論を支持する。

【0085】

生体内で成熟したHIOおよびHCOは、部局的腸内分泌ホルモンを発現する。

【0086】

消化管の異なる部域に認められる少なくとも12の主要なEECサブタイプがあり、本発明者らは、部局的EECの存在についてHIOおよびHCOを分析した。グレリンおよびモチリンは主として近位腸において認められ、対応してこれらのホルモンは主としてノギンおよび対照HIOにおいて発現したがHCOでは発現しなかった(図6A~D)。同様に、小腸のK細胞においては認められるが結腸においては非存在であるGIPは、ノギンおよび対照HIOにおいては認められたが、HCOにおいては認められなかった(図6E~H)。次に、本発明者らは、結腸においてより豊富であるGLP-1およびPYYの発現について分析することによって、HCOにおける遠位に濃縮されたEECの存在を検討した。本発明者らは、HIOにおけるよりもHCOにおいてより多数のGLP-1細胞およびPYY細胞ならびに多量のプレプログルカゴンおよびPYYの発現を観察した(図6I~P)。加えて、本発明者らは、HCOにおいてのみ(図6Q~T)、結腸特異的ホルモンであるINSL5の発現を認めた(Burnicka-Turek et al., 2012, Thanasupawat et al., 2013)。

【0087】

試験管内および生体内でのHIOおよびHCOにおける幹細胞および前駆細胞の分析。

【0088】

試験管内由来のHIOおよびHCOが幹細胞および前駆細胞のマーカーを発現するかどうかを決定するために、本発明者らは、すでに記載されているH9-BAC-LGR5-eGFPトランスジェニック株(McCracken et al., 2014, Watson et al., 2014)を使用した。オルガノイドにおけるLGR5-eGFP発現の検討は、胎生13.5日という早い時期にLgr5-eGFPマウスにおける発現パターンと同様の広範な上皮ドメインにおける発現を明らかにした(Shyer et al., 2015)(図13A、B、F、G、K、L)。GFP+ EPCAM-細胞の集団を明らかにした組織学的性質およびFACS分析によって決定されるように、GFP発現はオルガノイドの上皮の外側でも明白であった(データ非表示)。加えて、本発明者らは、胎児および成体の腸における前駆細胞のマーカーであるSOX9の発現を検討し、それがHIOおよびHCOの両方の上皮において発現することを認めた(図13C~E、H~J、M~O)。これらのデータは、LGR5-eGFPおよびSOX9によって標識される胚性/胎児性腸管前駆細胞が試験管内でHIOおよびHCOに存在することを示唆している。

【0089】

腸管発生の後期段階において、前駆細胞は発生中の絨毛の基部に局限されるようになり、そこで当該前駆細胞は最終的にLieberkuhnの陰窩の腸幹細胞(ISC)に寄与するであろう。本発明者らは試験管内で観察した前駆細胞がこのこの発生上の移行を経験するかどうかを決定するために、本発明者らは、HIOおよびHCOを移植し、LGR5-eGFP、SOX9、およびKI67タンパク質を監視した。生体内でのオルガノイドの成熟に続いて、本発明者らは、LGR5-eGFP、SOX9、およびKI67を基部推定陰窩に局限して観察した(図13P~X)。加えて、SOX9は、これらの細胞型におけるSOX9発現と一致して、HIOの絨毛において、および結腸上皮移植HCOのカフにおいて、EECにおいても観察された。Sox9およびLgr5がマウスにおいてエンテロイドおよびコロノイドを形成することができる腸幹細胞および結腸幹細胞を標識

することを考えると (Gracz et al., 2010, Ramalingam et al., 2012)、移植したオルガノイドの上皮を単離して、エンテロイドおよびコロノイドを作製するために使用することができるかどうかを調べた。HIOおよびHCOの両方が、成長し継代することができる上皮オルガノイドの培養物を生じた (図13Y~A')。その上、HCO由来上皮培養物は結腸マーカーであるCKB、FX YD3、SATB2、およびHOXB13を発現したが、近位小腸マーカーであるPDX1またはGATA4を発現せず、部域的同一性が維持されていることを示唆した (図13B'~D')。これらのデータは、生体内で成長したHIOおよびHCOが前駆細胞および幹細胞を含有していることを示唆している。

【0090】

HIOとHCOのグローバルな転写分析

HIOおよびHCOの部域的同一性および成熟を広範に調べるために、本発明者らは、生体内で成長したHIOおよびHCOのRNA配列分析を実施し、それらをヒト胎児および成体の小腸および大腸の公表データセットと比較した。主成分分析は、成体および胎児の腸から単離された初代組織が主成分1 (PC1) 軸に沿ってまとまって密集することを明らかにし、これは試料間の累積的な変動の36.5%を占めた (図14A)。GO分析は、この変動が初代組織においてのみ存在し、PSC由来移植片には存在しない細胞型によるものであることを明らかにした。例えば、ヒトの初代組織には存在し、移植片には非存在である上位10の生物学的過程のうち6つは免疫細胞と関連していた (図14B~C)。第2の主成分 (PC2) は、累積変動の17.7%を占め、成熟により試料を分離する (図7A)。この成分は、移植されたオルガノイドがヒト胎児腸管および胎児結腸よりも成熟しているが、成体の結腸および腸管ほど成熟していないことを明らかにした。第3の主成分 (PC3) は累積変動の6.7%を占め、部域的同一性により試料を分離し、HCOが結腸により類似しているのに対し、HIOは小腸と密集していることを示す (図7A)。興味深いことに、ヒト胎児試料は部域同一性 (小腸対結腸) に基づいて密集しておらず、これらの試料が消化管の指示された領域からはっきりと分離されていなかったかもしれないことを示唆した。

【0091】

本発明者らは次に、HIOおよびHCOが小腸および結腸の部域特異的遺伝子発現の類似パターンを共有する確率を決定するために超幾何平均検定を使用した (図7B)。結腸またはBMP2処置HCOと比較して、合計341個の転写産物が小腸においておよびノギン処置HIOにおいて発現し、その比率は偶然だけでは極めてありそうもない ($P = 1.5 \times 10^{-143}$)。同様に、対照HIOにおいて上方調節されている遺伝子セットは、成体結腸と比較して成体小腸において上方調節されている遺伝子セットと非常に有意な程度の類似性を共有する ($P = 2.5 \times 10^{-203}$)。逆に、HCOにおいて上方調節されている遺伝子セットは、小腸と比較して結腸において上方調節されている遺伝子が非常に豊富である (それぞれ $P = 4.1 \times 10^{-53}$ および $P = 6.0 \times 10^{-73}$)。この分析は、HIOパターン形成がヒト小腸に最も類似しており、HCOパターン形成が結腸であると結論付けた。HIO (NOGおよび対照処置) およびHCOの性質をさらに探究するために、本発明者らは差次的発現分析 (成体小腸対成体結腸、HIO対HCO) を行った。本発明者らは、4方向散布図を作成し、結腸において上方調節された高い比率の遺伝子がHCOにおいても上方調節され、小腸において上方調節された遺伝子の大部分がHIOにおいても上方調節されていることも実証した (図7C、表1)。最後に、豊富な生物学的過程の分析は、成体の結腸および移植されたHCOが非常に活発なWntシグナル伝達および類似のHOXコードを有することを明らかにした (図7D)。まとめると、これらのデータは、本発明者らがPSCをヒト結腸組織に区別するための確固たる方法を開発したことを示唆する。

【0092】

表1 遺伝子は成体小腸および結腸において上方調節され、これらはそれぞれHIOおよびHCOにおいても上方調節されている。第1列、NOG HIO対HCOおよび成体小

10

20

30

40

50

腸対成体結腸において一般に上方調節、第2列、対照HIO対HCOおよび成体小腸対成体結腸において一般に上方調節、第3列、HCO対NOG HIOおよび成体結腸対成体小腸において一般に上方調節、第4列、HCO対対照HIOおよび成体結腸対成体小腸において一般に上方調節

【表1】

ABCA4	AADAC	AAGAB	AAK1
ABCC2	ABCA4	ABCA12	ABHD10
ABCC6	ABCB8	ACTR2	ABHD17C
ABCD1	ABCC10	ADAM10	ABL2
ABCG8	ABCC6	ADAM22	ACTR2
ABHD14A			
ABHD14A-ACY1			
ACY1	ABCD1	AGPS	ACVR2B
ABHD6	ABCG5	AGTPBP1	ACYP1
ACBD4	ABCG8	AKAP13、MIR7706	ADAM10
	ABHD14A、ABHD14A-		
AC02	ACY1、ACY1	ALDH1B1	ADAM17
ACOT11	ABHD16A	ALG5	ADAM22
ACP2	ABHD4	ANKDD1B	ADGRF4
ACSL5	ABHD6	ANKRD30BP2	AEBP2
ACY3	ACACB	ANTXR2	AGPS
ADAMTSL5	ACADS	ANXA3	AHI1

10

20

30

40

50

AGPAT3	ACADVL	ARFGEF3	AIDA
AKR1B10	ACKR4	ARHGAP44	AIFM3
AKR1C1	AC02	ARPC5	AKAP11
AKR1C3	AC0T11	ASCC1	AKAP13、MIR7706
ALDOB	AC0T7	ASIP	AKAP5
ALPI	ACOX2	ATF6	ALG8
ANGPTL4	ACP2	ATOH1	ANKDD1B
ANXA13	ACSL5	ATXN3	ANKFY1
APOA1	ACTN4	B3GALNT2	ANKS1B
APOA1-AS	ACY3	B3GNT6	ANP32B
APOA4	ADAMTSL5	B4GALNT3	ANTXR2
APOBEC1	ADGRG4	BCAS1	AP2B1
APOBEC2	ADGRG5	BCL10	AP3M1
APOC2、APOC4、			
APOC4-APOC2	AGMO	BCLAF1	APH1B
APOC3	AGPAT1、MIR6721	BEND3	APOBR
APOL2	AGPAT2	BEST2	ARFGEF3
AQP3	AGPAT3	BTBD3	ARFIP1
AQP7	AK2	BZW1	ARL14EP
AQP7P1	AKR1A1	C11orf58	ARMC8
ATG4D	AKR1B10	C12orf75	ARPC5
AVIL	AKR1C1	CA12	ARRDC3
BAK1	AKR1C3	CAMSAP1	ASB7
BCRP3	AKR1C4	CAPN2	ASPH
BRE-AS1、RBKS	AKR7A3	CAPRIN1	ATG4C
BTD	ALDH1A3	CASC18	ATL3
BTNL3	ALDH2	CBFB	ATM
		CCPG1、DYX1C1、	
BTNL8	ALDOB	DYX1C1-CCPG1	ATP13A3
C10orf25	ALPI	CD24	ATP2A3
C10orf67	AMBRA1	CD9	ATR
C11orf24	ANAPC2	CDC23	ATRX
C11orf86	ANGPTL4	CEACAM6	ATXN1
C19orf66	ANPEP	CEP290	ATXN3
C1orf115	ANXA13	CFC1、CFC1B	B3GALNT2

10

20

30

40

50

C1orf116	ANXA4	CLIC4	B3GNT6
C5orf56	AP5B1	CLMN	BAG5
C6orf132	APOA1	CLNS1A	BAZ1B
C6orf136	APOA1-AS	CLSTN1	BBIP1
C8G	APOA4	CNTN3	BCAS1
C9orf173	APOBEC1	CSRNP3	BCAT1
CA13	APOBEC2	DAAM1	BCLAF1
	APOC2、APOC4、APOC4-		
CALM3	APOC2	DDX50	BEND3
CAMKK2	APOC3	DGKH	BEST2
CAPN10-AS1	APOL2	DICER1	BIN1
CAPN3	APOM	DIP2B	BMPR2
CASP1	AQP3	DMTN	BNC2
CATSPER2	AQP7	EARS2	BTBD10
CBR1	ARHGEF16	EBPL	BTBD3
CCL11	ASAH2	EEA1	BTBD7
CCL25	ASB13	EHF	BTF3L4
CD82	ASIC2	EPHA10	BTRC
CDCA3	ASPA	EPHB4	BZW1
CDH4	ATG4D	EXOC5	C10orf99
CDIP1	ATP11A	EXOC6	C11orf58
CDR2L	ATP5SL	FAM105A	C18orf54
CERK	ATXN2L	FAM169A	C3orf52
CES2	AZGP1	FAM175A	C7orf60
CGREF1	B3GNT8	FAM218A	CA12
CHRM4	BAG6	FAM60A	CA4
CIB2	BAIAP2L2	FAS	CAMK1D、LOC283070
CIDEB	BAIAP3	FECH	CAMSAP2
CIDEC	BAK1	FERMT1	CAPN8
CLDN15	BET1L	FFAR4	CAPZA1
CMTR1	BLNK	FGF7	CASC4
CNNM3	BRE-AS1、RBKS	FKTN	CASD1
CPS1	BTD	FMN2	CBFB
CRAT	BTNL3	FRMPD3	CBX5、MIR3198-2
CREB3L3	BTNL8	G3BP1	CCDC132

10

20

30

40

50

GRIP3	BUD13	GARS	CCDC88A
CTD-3080P12. 3	C10orf54	GCSH	CCND1
CYP27A1	C11orf24	GGH	CCNJL
CYP2B7P	C11orf86	GJB4	CCNT1
CYP2C9	C15orf62	GLIS3	CD24
CYP2S1	C16orf58	GLUL	CD59
CYP3A5	C17orf78	GMNN	CD9
CYTH2	C18orf8	GNE	CDC42
DBP	C19orf12	GNPTAB	CDHR1
DCAF11	C19orf54	GOT2	CDK19
DECR1	C1orf116	GP9	CEACAM5
DGAT1, MIR6848	C2CD2L	GRSF1	CEACAM6
DGAT2	C5orf56	GSPT1	CEBPZ
DGKA	C6orf132	GYG2	CELF2
DHDH	C6orf136	HDAC1	CENPO
DHRS1	C8G	HIATL1	CEP250
DHRS11	CALGOC01	HK2	CHD9
DHX16	CALM3	HMGA2	CHIC1
DMBT1	CAMK2G	HN1L	CLIC4
DNAJC22	CAMTA2	HNMT	CLMN
DNASE1	CAPN1	HNRNPAB	CLNS1A
DNPEP	CAPNS1	HOXA10-AS	CLTC
		HOXA10	
DOLPP1	CARD10	HOXA10~HOXA9, HOXA9	CMTM6
DOT1L	CARD6	HOXA11	CNEP1R1
DTX1	CASP1	HOXB9	CNTN3
ELMOD3	CASP4	HOXB-AS3	CPM
EMB	CASP9	IARS	CRK
ENKUR	CBLC	IFT74-AS1	CRYM
EPHX2	CBR1	IL1R2	GSNK1A1
ERICH4	CC2D1A	ILDR1	CSRNP3
ESPN	CCL25	IP05P1	CTDSPL
	GD302 、 LY75 、 LY75-		
ETV7	CD302	IQGAP1	CTTNBP2NL
EXOC3L4	CD68	ITM2C	CYLD

10

20

30

40

50

F10	CD74	JAG1	CYP20A1
FAM102A	CD82	JPH1	DAAM1
FAM109A	CDC42BPB	KCNJ2	DCBLD2
FBP1	CDC42EP4	KCNN4	DGP2
FBX07	CDCA3	KCNRG、TRIM13	DDX50
FGHSD1	CDHR5	KCTD1	DDX6
FLJ12825	CDIP1	KCTD20	DGKH
FLJ22763	CDK18	KLK15	DHRS13
FUOM	CDK2	KNOP1	DHRS9
FXR2	CDK20	KPNA4	DHX57
GABRE	CDR2L	LEFTY1	DICER1
GALK1	CEACAM18	LIMK2	DI030S
			DISC1、TSNAX、TSNAX-
GALT	CELA3A	LINC00341	DISC1
GATA4	CENPV	LINC00858	DNAJC3
GATA5	CERS2	LIPH	DNAL1
GATS	CES2	LOC100507346	DPY19L1
GCHFR	CFI	LOC101928233	DSEL
GIGYF1	CFL1	LOC101929395	DSTYK
GNA11	CGREF1	LOC101929524	DTD2
GOLT1A	CHP2	LRRK1	EBPL
GOSR2	CHRM4	MAML2	EED、MIR6755
GPD1	CIAO1	MAPRE2	EFNA5
GPRIN1	CIB2	MARCH3	EHF
GRAMD1B	CIDEB	MARCKSL1	EI24
GRIA1	CIDEC	MBNL3	EID1
GSDMB	CISD1	MCOLN2	EIF4E
GSK3A	CLDN15	MECOM	EIF5B
GSTK1	CLDN18	METTL5	EMC1
HADHA	CLPTM1	MFAP3L	ENAH
HAGH	CMBL	MFHAS1	ENDOD1
HAPLN4	CNNM3	MINA	ENTPD1
HEBP1	CNPY2、PAN2	MLLT3	EPAS1
HOPX	COASY	MPHOSPH6	ERCC6L2
HOXA4	COMMD9	MPLKIP	ERMP1

10

20

30

40

50

HPS1	COMT, MIR4761	MPZL2	ERN2
IDH3A	CPA2	MREG	EXOC2
IFIT3	CPPED1	MRPL1	EXOC4
IGSF23	CRADD	MRPL3	EXOC5
IL2RB	CRAT	MTL5	EXOC6
INTS12	CREB3L3	MYO3A	FAM102B
IRF1	CRELD1	MYO5C	FAM103A1
IRF8	CS	NAA15	FAM105A
ISG20	CSK	NAP1L1	FAM120A
ITPK1	CTS0	NCBP1	FAM13B
KDM2A	CXCR3	NDC1	FAM169A
KDM6B	CYB5A	NEDD4L	FAM178A
KDM8	CYP27A1	NEURL1B	FAM208A
KHK	CYP2C19	NLE1	FAM46A
KIAA2013	CYP2S1	NOLC1	FAM83H-AS1
KIFC3	CYP3A4	NOTCH1	FAM8A1
KLC4	CYSLTR2	NOTCH2	FAM98B
LBX2-AS1	DBP	NRARP	FANCI
LINC00574	DCAF11	NRXN1	FAR2P2
LINC01268	DECR1	NSF, NSFP1	FBX028
LOC100240735	DEDD	NT5DC3	FBX045
LOC284825	DEGS2	NUDT4	FCF1
LOC646471	DERA	NXPE1	FEM1B
LOC728989	DESI1	NXPE2	FEM1C
LPCAT3	DFNA5	NXPE4	FFAR4
LPIN3	DGAT1, MIR6848	ODC1	FKBP5, LOC285847
LRRC75A	DGAT2	ORC5	FKTN
LRRC75B	DGKA	P4HA1	FLOT2
MALL	DGKG	PAPPA2	FNDC3B
MAPKBP1	DGKQ	PARM1	FOCAD
METTL7B	DGKZ	PAWR	FOXD2
MFSD2A	DHDH	PCDHB11	FOXO3
MGAM	DHRS11	PDE3B	FOXO3B, ZNF286B
MICALL2	DHRS7	PDZK1IP1	FRMPD3
MICU1	DHX16	PGBD5	FRYL

10

20

30

40

50

MIR1268A			
SLC27A4	DMBT1	PHF20	FSIP2
MIR22、MIR22HG	DNAJC22	PHF6	FZD4
MIR31HG	DNASE1	PKIB	G3BP1
MIR3615			
SLC9A3R1	DNPEP	PLCD3	GGH
MIR5187、TOMM40L	DOLPP1	PLSCR4	GIN1
MIR5193、UBA7	DPP9	POF1B	GJC1
MIR6073、SOX6	DSCR3	POLR3B	GLB1L2
MIR621、SLC25A15	DTX1	POSTN	GLG1
MIR7703、PSME2	E2F4	PP14571	GLIS3
MISP	EGFR-AS1	PPIC	GLTSCR1L
MME	EIF6	PPP1R8	GLUL
MMEL1	ENPP6	PPP2R3A	GMNN
MOCS1	EPB41L3	PPP3CA	GNAI1
MOGAT3	EPHA1	PREP	GNAQ
MON1A	EPHB1	PRKACB	GNE
MS4A8	EPHX2	PRKAR2A	GOLGA3
MSRA	EPS8L2	PRKRIR	GOPC
MST1	EPSTI1	PRMT5	GP9
MTTP	ERAL1	PSMD6	GPC6
MUS81	ERF	PSME4	GPX8
MYO15B	ESPN	PTAR1	GRM7
MYO1A	ESRRA	PTTG1IP	GRSF1
NAGS	ETV3	PUM1	GTF2F2
NELL2	ETV7	PYGL	GTF3C1
NGEF	EWSR1	QPCT	HABP4
NOP9	EXOC3L4	R3HDM1	HEATR3
NPC1L1	F10	RAB3B	HIATL1
NROB2	FABP2	RABEP1	HMG20A
NR1I3	FAH	RAP1GDS1	HMGA2
	FAM101A、ZNF664、		
NSUN6	ZNF664-FAM101A	RAPGEF2	HN1L
NUB1	FAM102A	RBMS3	HOXA10-AS
OGDH	FAM109A	RCC2	HOXA10

10

20

30

40

50

OTC	FAM32A	REX02	HOXA10~HOXA9, HOXA9
P4HB	FAM83G	RIF1	HOXB5
PARP12	FBLIM1	RIMS3	HOXB6
PARP3	FBP1	RNASEH2B	HOXB7
PATL2	FLJ22763	RPA2	HOXB8
PCK2	FUOM	RSF1	HOXB9
PCSK5	FZR1	RSL24D1	HOXB-AS3
PDLIM2	GABRA4	RXFP4	IFFO2
PDZD7	GAL3ST1	SATB2	IFNAR1
PDZK1	GALK1	SATB2-AS1	IFT74-AS1
PEBP1	GALNT6	SCLT1	IGF1R
PEPD	GALT	SERBP1	IGIP
PEX14	GATA4	SETBP1	IL17RD
PGRMC2	GATA5	SH3PXD2A-AS1	IL1R2
PHEX	GCNT4	SIPA1L2	IL20RB
PKLR	GFI1B	SLC16A9	IL6ST
PLA2G6	GGT1	SLC1A3	ILDRI
PLCB3	GLOD5	SLC39A8	IMPAD1
			INPP5F
			IP011、IP011-LRRC70、
PLEKHS1	GLRX	SLC7A2	LRRC70
PLIN2	GLYCTK	SLC9A2	IP05
PLIN3	GNA11	SLC04A1-AS1	IP05P1
PLLP	GNB1	SMAD5	IP07
PNP	GOLT1A	SMARCA5	IQGAP1
PP7080	GOSR2	SMC6	ITGAV
PQLC2	GPD1	SNRPE	ITGB1
PRAP1	GPR108	SNX13	ITM2A
PRDM7	GPR35	SOGS5	ITPR1PL2
PRODH	GRAMD1B	SORBS2	JAG1
PSMB9	GRIA1	SPAG1	JPH1
PSMD9	GRK5	SRSF12	KBTBD6
PSME1	G RTP1-AS1	SRSF9	KCNJ2
PTPRH	GSDMB	ST6GAL2	KCNN4
PXDC1	GSK3A	STAB2	KCNRG、TRIM13

10

20

30

40

50

RAB11FIP3	GSTA1	STMND1	KCTD10
RAB17	GSTA2	STS	KCTD20
RAB5C	GSTK1	STX19	KDM5B
RAB8A	GSTM4	SUSD1	KIAA0226L
RARRES3	GTF2I	SUV39H2	KIAA0232
RBP2	GTPBP1	TBL2	KIAA0513
REEP6	GUCD1	TCTA	KIAA1143
REG1A	HADHB	TDGF1	KIAA1429
RPS6KA1	HAGH	TFRC	KIAA1715
RTKN	HAPLN4	TMA16	KLHL15
RTP4	HDAC6	TMCC1-AS1	KLK15
SAT1	HDGF	TMED10	KPNA4
SAT2	HDHD3	TMED2	KRR1
SCAMP5	HEBP1	TMEM123	LAPTM4A
SCNN1D	HECTD3	TMEM159	LARS
SCRN2	HIP1R	TMEM200B	LEFTY1
SDHA	HLA-F	TMEM38A	LIFR
SEC14L2	HMGA1	TRABD2A	LIMD1
SERP2	HNF1A	TSN	LIMK2
SFRP5	HNF4A-AS1	TSPAN5	LINC00341
SFXN3	HOPX	TTC3	LINC00482
SH3BP1	HPS1	TTC8	LINC00515
SH3GL1	HRASLS2	TTPA	LINC00657
SHBG	HRH2	UBE2A	LINC01006
SIDT2	HSD3B7	UBE2N	LMAN2L
SLC12A7	HYKK	UGP2	LOC100129550
SLC15A1	IDNK	UNC13B	LOC100507351
SLC1A7	IFIT3	URB1	LOC101929374
SLC22A4	IFNLR1	VWA3B	LOC101929524
SLC23A1	IGSF23	WDHD1	LOC105372441
SLC25A20	IL22RA1	WDR35	LOC731424
SLC25A34	IL2RB	WDR78	LOC93622
SLC25A44	ILVBL	WIP11	LRCH2
SLC25A45	IMMP2L	WNK4	LRRC37A4P
SLC26A11	INPP5J	WWP1	LRRC58

10

20

30

40

50

SLC2A2	INTS12	XP04	LUZP6
SLC35B1	IQSEC2	YWHAE	LYST
SLC37A4	IRF1	ZBTB7C	MAFA
SLC39A5	ISG20	ZBTB8B	MAGEF1
SLC3A2	ITM2B	ZFHX3	MAGT1
SLC52A1	ITPK1	ZNF658	MAL2
SLC5A1	ITPKA	ZNF774	MAP3K7
SLC5A9	KALRN	ZNF780B	MARCKS
SLC6A19	KDF1		MATR3、SNHG4
SLC6A20	KDM6B		MBNL2
SLC7A7	KDM8		MBNL3
SMIM24	KHK		MBOAT2
SMIM5	KIAA0141		MBTPS2
SMLR1	KIAA1551		MDN1
SMPD3	KIAA2013		MECOM
SOWAHA	KLC4		METTL8
SPNS3	KLHDC8B		MFAP3L
ST7、ST7-OT3	LASP1		MFSD4
STRC	LBX2-AS1		MFSD6L
SULT1A1	LEAP2		MIB1
SULT1A2	LHPP		MIER1
SYK	LINC00319		MIOS
SYP	LINC00330		MIR1244-4、PTMA
TAP2	LINC00483		MIR4680、PDCD4
TGF7	LINC00574		MIR6824、SLC26A6
TICAM1	LINC00667		MLF1
TKFC	LINC01137		MLLT3
TM4SF20	LINC01347		MLXIP
TM4SF4	LIPE		MMGT1
TM4SF5	LIPT1		MOB1B
TM6SF2	LMBR1L		MON2
TMEM150B	LOC100093631		MORF4L1
TMEM184A	LOC100506302		MPZL1
TMEM253	LOC100507334		MREG
TMEM37	LOC101927051		MRPL1

10

20

30

40

50

TMEM41A	LOC284825		MRPS6, SLC5A3
TMEM82	LOC90768		MTHFD2
TMEM86B	LPCAT3		MTMR6
TNFRSF14	LRP5		MTSS1
TNFRSF1A	LRRG28		MTURN
TNRC6C-AS1	LRRG41		MUC1
TOM1	LRRG66		MUC12
TREH	LRRG75A		MYO3A
TRIM15	LSMEM2		MYO5C
TRIM50	LYRM5		NAA15
TTC31	LZTS3		NAA50
TTC38	MALL		NAP1L1
			NBPF10 、 NBPF12 、 NBPF20 、 NBPF25P 、 NBPF8, NBPF9
UGT2B7	MAP2K3		NCBP1
UGT3A1	MAP3K11		NCOA3
USH1C	MAPK3		NDC1
WBP2	MAPKAPK2		NEK1
WNT3	MAPKBP1		NEURL1B
XAF1	MARC2		NFIA
XDH	MBD1		NFYB
XPNPEP2	MCRS1		NIFK-AS1
ZMYND15	MCUR1		NKIRAS1
ZNF300	MEP1A		NOL11
ZSWIM8	MEP1B		NOL9
	METTL17		NOTCH1
	METTL7B		NPAS1
	MFSD2A		NRXN1
	MGAM		NSF, NSFP1
	MGAM2		NT5C2
	MGAT3		NT5DC3
	MGST3		NUBPL
	MICAL1, ZBTB24		NUCKS1
	MICU1		NUDT4
	MIR1268A, SLC27A4		

10

20

30

40

50

MIR22, MIR22HG	NUP133
MIR3615, SLC9A3R1	NUP205
MIR5187, TOMM40L	NUS1
MIR5193, UBA7	NXPE1
MIR639, TECR	NXPE4
MIR7109, PISD	OPHN1
MIR7703, PSME2	ORC5
MISP	PARM1
MLF2	PBRM1
MLX	PCM1
MLXIPL	PDE3B
MME	PDE4D
MMEL1	PDS5A
MMP24	PDS5B
MOCOS	PEAK1
MOCS1	PGBD5
MOGAT2	PGGT1B
MOGAT3	PGM2L1
MOGS	PHC3
MON1A	PHF14
MOV10	PHF20
MPP1	PHF6
MS4A8	PHIP
MSRA	PHTF2
MST1	PIAS2
MST1R	PIBF1
MTTP	PIGN
MUC17	PIGX
MYD88	PIK3R3
MYO15B	PIKFYVE
MYO19	PITHD1
MYRF	PJA2
NAALADL1	PKI55
NAGS	PKIB
NAPRT	PKNOX1

10

20

30

40

50

NCK2	PLEKHF2
NCSTN	PLXNA2
NELL2	POF1B
NGEF	POLR1E
NIT1	POT1
NLRP6	POU2F1
NOL4L	PP14571
NOP9	PPIC
NPC1L1	PPIP5K2
NPY6R	PPM1B
NQO2	PPM1K
NROB2	PPP1R3B
NR1H3	PPP2R5C
NR1I3	PPP3CA
NUCB1	PRKACB
NUTM2B-AS1	PRKDC
OC1AD2	PRKG1
OGDH	PRKRIR
OGG1	PRPS2
OTC	PRRT3-AS1
OXNAD1	PSME4
P4HB	PTAR1
PAOX	PTEN
PARP2	PTGDR
PARP3	PTPN14
PBLD	PUM1
PBX2	PURB
PCBP2, PCBP2-OT1	PWWP2A
PCK2	PYGB
PCSK5	PYG01
PCYT1A	PYURF
PDE8B	QPCT
PDLIM2	RAB11FIP2
PDSS1	RAB3B
PDXP	RAB40B

10

20

30

40

50

PDZD7	RABEP1
PEBP1	RABGAP1
PEPD	RALGAPA1、RALGAPA1P
PEX14	RANBP2
PEX16	RAP1GDS1
PFKL	RAP2A
PFKP	RAP2B
PGD	RAPGEF6
PGRMC2	RASA2
PGS1	RASEF
PIM1	RBFOX2
PIP5K1A	RBM7
PKLR	RBMS3
PLCB3	RBPJ
PLEK2	RBPMS-AS1
PLEKHA7	RBSN
PLEKHS1	RBX1
PLIN3	RCC2
PLLP	RDX
PMM1	REX02
PNLIPRP2	RGL3
PNP	RIF1
POLR3H	RIMKLA
POMGNT1	RLIM
POR	RND3
PP7080	RNF139
PPIP5K1	RNF144A
PPP2R5D	RNF145
PPP6R1	RNF223
PQBP1	RNMT
PQLC2	RSL24D1
PRAP1	RXFP4
PRDX2	SAMD13
PRKCD	SAR1A
PRKCZ	SARAF

10

20

30

40

50

	PRKD2		SATB2
	PRODH		SATB2-AS1
	PRR13		SBN01
	PRSS1		SCAI
	PRSS3P2		SCFD1
	PSD4		SDC4
	PSMA1		SEC22A
	PSMB10		SEC23IP
	PSMB8		SEC62
	PSMB9		SECISBP2L
	PSMD9		SEL1L
	PSME1		SEMA3C
	PTK2B		SEMA3D
	PTPRH		SEMA5A
	PVRL2		SEPT11
	PXDC1		SEPT7
	QRICH1		SERBP1
	RAB11FIP3		SERINC5
	RAB17		SERTAD2
	RAB5C		SESN1
	RAB8A		SESN3
	RARA		SETX
	RARRES3		SH3PXD2A-AS1
	RASSF4		SHOG2
	RBP2		SHROOM4
	REEP6		SIPA1L2
	REG1A		SLC10A7
	RFX5		SLC15A2
	RGN		SLC16A9
	RIC3		SLC19A2
	RIPK3		SLC1A3
	RIPK4		SLC22A15
	RMDN3		SLC25A12
	RMND1		SLC25A30
	RNF10		SLC2A10

10

20

30

40

50

RNF123	SLC30A6
RNF167	SLC35A1
RRNAD1	SLC37A3
RTKN	SLC38A2
RTP4	SLC38A6
SAPCD1-AS1, VWA7	SLC39A8
SAT2	SLC44A1
SCAMP5	SLC7A2
SCARB1	SLC9A2
SCML4	SMAD5
SCNN1D	SMARCA5
SCRN2	SMC6
SDHD	SMG1
SEC13	SMIM14
SEC14L2	SNRPE
SEC16B	SNX13
SFRP5	SOC55
SFXN3	SORBS2
SH3BP1	SPAG1
SH3GL1	SPIN2B
SHPK, TRPV1	SPIRE1
SIDT2	SPTAN1
SIGLEC12	SPTSSA
SLC12A7	SRSF12
SLC13A2	SSB
SLC16A13	SSR1
SLC16A5	SSR3
SLC19A1	ST6GAL2
SLC22A18	ST7L
SLC22A4	STAB2
SLC23A1	STAG1
SLC25A20	STMND1
SLC25A44	STRN3
SLC25A45	STS
SLC25A5	STX19

10

20

30

40

50

SLC26A11	STX6
SLC2A12	SUMF1
SLC2A5	SUPT16H
SLC2A9	SUV39H2
SLC35B1	SYT7
SLC37A4	SYTL2
SLC39A5	SYTL4
SLC3A2	TACC1
SLC52A1	TAF9B
SLC5A1	TAOK1
SLC5A6	TBL1X
SLC6A19	TCAM1P
SLC6A20	TDGF1
SLC7A7	TEAD1
SLC7A9	TFCP2L1
SLC9A3	TFRC
SLX4	TGFBR1
SMAD3	THADA
	TICAM2, TMED7, TMED7-
SMARCD1	TICAM2
SMIM24	TINCR
SMLR1	TLK1
SMOX	TLN2
SMPD3	TMCC1-AS1
SOAT2	TMED10
SPANXN3	TMED9
SPHK2	TMEM106B
SPNS3	TMEM123
SRC	TMEM159
SSTR1	TMEM194A
ST7, ST7-OT3	TMEM194B
STAT6	TMEM2
STAU1	TMEM44
STK24	TMEM45A
SUCLG1	TMEM87A

10

20

30

40

50

SULT1A1	TMX1
SULT1A2	TNFRSF10D
SULT2A1	TNKS
SYP	TNRC6C
TAP2	TOP2B
TBK1	TP53BP1
TCF7	TP53INP1
TFG	TRABD2A
THRA	TRIM23
TIAM2	TRIM37
TICAM1	TRIP12
TJAP1	TRMT5
TKFC	TROVE2
TLDC2	TSN
TM4SF4	TSPAN5
TM4SF5	TSPAN6
TM6SF2	TSPYL4
TMED4	TTC28
TMEM116	TTC3
TMEM120A	TTL
TMEM139	TTPA
TMEM150B	TTPAL
TMEM177	TWISTNB
TMEM184A	TWSG1
TMEM229B	TXNDC15
TMEM253	UBE2D1
TMEM25、TTC36	UBE2Q2
TMEM37	UBR5
TMEM51	UGGT1
TMEM51-AS1	UGGT2
TMEM82	UNC5C
TMEM86B	USP13
TMEM92	USP24
TNFRSF14	USP34
TNFRSF1A	USP47

10

20

30

40

50

TNIK	USP53
TOM1	UXS1
TOM1L1	VANGL1
TOX4	VKORC1L1
TPI1	VOPP1
TRAF4	VPS13B
TREH	VPS13C
TRIM14	WAC-AS1
TRIM15	WBP5
TRIM16	WDFY1
TRIM21	WDHD1
TTC38	WDR36
UBXN2A	WDR7
UGT3A1	WDR78
UNC5CL	WDR89
USF1	WNK4
USH1C	XIAP
USP10	XPNPEP3
USP2	XP04
VRK3	YTHDF3
VRTN	ZBTB10
WBP2	ZBTB7C
WDR45	ZDHHC7
WDTC1	ZFHX3
WNT3	ZFP90
WWC1	ZFX
XAF1	ZMAT2
XDH	ZMPSTE24
XPNPEP1	ZMYM4
ZDHHC9	ZNF148
ZER1	ZNF260
ZFAND3	ZNF264
ZFYVE27	ZNF320
ZMYND15	ZNF555
ZNF384	ZNF644

10

20

30

40

50

	ZNF782 ZRANB2-AS1 ZSWIM8		ZNF652 ZNF678 ZNF69 ZNF704 ZNF709 ZNF766 ZNF780B ZNF81 ZYG11B
--	--------------------------------	--	---

10

【0093】

考察

歴史的に、前腸、中腸、および後腸の分類は、前後の腸門脈の発達および腸間膜の血液供給源に基づいている（Uppal et al., 2011）。中腸および後腸の代替的な定義が提案されてきており、中腸は臍よりも前側の部分に由来する腸の部分であり、後腸は臍よりも後側に由来する（Johnston, 1913、Savin et al., 2011）。いずれの場合においても、解剖学的ランドマークへの歴史的な依存、ならびに前部、中部および後腸を区別するためのより精確な分子マーカーの欠如は、PSCからこれらの細胞／組織を試験管内で作製する方法を開発することを困難にしてきた。それゆえ、発達中の中腸部域と後腸部域を明確に区別するマーカーの同定が不可欠である。

20

【0094】

本発明者らは、CDX2、GATA4、ONECUT1およびSATB2の組み合わせを使用して、ゼノパス（Xenopus）、マウスおよびヒトにおける中腸および後腸の発生の初期段階で明確な分子レベルの境界が確立されることを同定した。興味深いことに、GATA4およびSATB2発現ドメインは、マウスの卵黄莖／推定臍帯で境界を形成し、この境界は発生中全体において成体腸において維持される。GATA4発現が臍よりも前側の腸を標識し、SATB2発現が臍よりも後側のドメインを標識するという事実は、臍が中腸と後腸との間の境界であることを示唆している（Johnston, 1913、Savin et al., 2011）。

30

【0095】

HIOにおけるONECUT1発現およびSATB2発現は、HCOが、それぞれ近位および遠位の同一性と一致していることであるが、GATA4は、その胚発現を考慮して予想されるであろうほど試験管内で近位HIOにおいて頑強に発現することはなかった（データ非表示）。対照的に、GATA4は、HIOの生体内成熟後に患者の生検から作製されたエンテロイドにおいて強く発現した（データ非表示）。このことは、GATA4の発現に関与する因子が培養条件において非存在であること、または生体内での成熟がGATA4の上皮発現に必要とされることを示唆し得る。このデータは、正常なワンカット因子発現を保持している腸Gata4ノックアウトマウスと一致して、高レベルのGATA4発現が腸の早期部域化には不要であり得ることも示唆している（Battle et al., 2008）。加えて、BMP処置オルガノイドの小さなサブセットは、CDX2発現を喪失し、膀胱マーカーであるケラチン13およびウロプラキン1aの発現を活性化した（データ非表示）。尿路上皮組織は後腸／クロアカに由来するので、このことは後腸運命を有するBMPオルガノイドと一致する（Georgas et al., 2015）。

40

【0096】

SATB2は遠位回腸および大腸の発生を通して発現するが、SATB2が遠位腸の発生に必要であるかどうかは知られていない。SATB2の突然変異が2q32-q33欠失およびグラス症候群と関係する口蓋裂に関係づけられていることから、マウスノックア

50

ウト研究は頭蓋顔面および皮質ニューロンの発達に焦点を当ててきた (FitzPatrickら, 2003)。しかし、SATB2がヒトの結腸生理学的性質に役割を担っているかもしれないという間接的な証拠がある。SATB2は、ゲノム規模会合試験において潰瘍性大腸炎感受性遺伝子として同定されている (McGovern et al., 2010)。加えて、SATB2発現の喪失は大腸癌患者における予後不良に関連することが示されている (Eberhard et al., 2012)。HCOを用いた将来の研究は、発生中の結腸におけるSATB2標的の同定を可能にし得、このことは潰瘍性大腸炎および大腸癌の病理学への洞察を提供し得る。

【0097】

モデル生物におけるいくつかの研究は、後腸発生間の内胚葉のパターン形成におけるBMPシグナル伝達経路を含意している (Kumar et al., 2003、Roberts et al., 1995、Sherwood et al., 2011、Tiso et al., 2002、Wills et al., 2008)。これと一致して、BMPの阻害はWNTおよびFGFが後部内胚葉の運命を促進する能力を無効にするので、本発明者らは、ヒト胚体内胚葉の後部パターン形成がBMPシグナル伝達に依存することを実証した (McCracken et al., 2014)。しかしながら、BMPシグナル伝達が腸の発生中に他の一時的に異なる役割を担うことは驚くことではない。例えば、近位-遠位部域ドメインの確立後、BMPシグナル伝達は腸および結腸において陰窩-絨毛軸を確立するように機能する (Li, 2005)。したがって、パターン形成のための一時的な必要条件是、ショウジョウバエ (*Drosophila*) 中腸において報告されているように、胚が多目的腸発生のために同じシグナル伝達経路を使用することを可能にする (Driver and Ohlstein, 2014、Guo et al., 2013)。ヒトの疾患の脈絡において、BMPR1Aにおける突然変異は若年性ポリポーシス症候群患者のサブセットと関係している。HCOシステムは、開発初期の間にBMPの下流にあるHOXコードを同定するのに非常に適しており、BMPR1A突然変異を有する過誤腫性ポリープがHOX遺伝子発現を変化させたかどうかを決定することは興味深くあり得る。

【0098】

本発明者らは以前、小腸であるHIOの試験管内定方向分化および生体内移植を報告した (Spence et al., 2011、Watson et al., 2014)。大腸に影響を及ぼす独特の生理学的性質および病理学的条件を考えると、結腸に特異的な病態生理学的問題を調べるために結腸モデル系を開発することが不可欠であった。発生上、この系は部域的同一性がどのように確立されているかについての基本的な質問を調査する機会を提供する。HIOおよびHCOは、HIO内のパネート細胞およびHCO内の結腸特異的杯細胞のような独特の細胞型を発達させる。その上、HIOおよびHCOにはそれぞれ小腸および大腸が通常豊富な異なるセットのEECを有する。部域化したオルガノイドは、腸の異なる部域がどのようにして、部域化した幹細胞を生じるのかについての将来の研究のための基盤を提供するはずである。加えて、HCOの生成は、潰瘍性大腸炎および大腸癌のような結腸に影響を及ぼす疾患のモデル形成を可能にするであろう。

【0099】

材料および方法

動物。8~16週齢の免疫不全NOD-SCID IL-2R γ nu" (NSG) マウスを移植実験に用いた (オハイオ州シンシナティ市のComprehensive Mouse and Cancer Core Facilityから入手)。野生型マウスをマウス胎児腸管に関する研究に使用した。すべてのマウスは、シンシナティ子供病院医療センター (CCHMC) の動物施設において飼育した。すべての実験は、CCHMCの施設内動物管理使用委員会の承認を得て行った。

【0100】

カエルおよびマウスの胚におけるBMP阻害。ゼノパス・トロピカリス (*Xenopus tropicalis*) の胚培養および小分子処置をすでに記載されたように行った

(Rankin et al., 2012, Rankin et al., 2015)。DMH-1 (Sigma D8946) を DMSO 中に溶解し、20 pM の終濃度で使用し、等濃度の DMSO ビヒクルを同胞胚に使用した。分析したマーカーに対して同様の効果で阻害剤処置実験を 2 回繰り返した。ゼノパス (Xenopus) 生体内原位置ハイブリッド形成分析のために、線状化全長 cDNA プラスミドテンプレート (X. tropicalis satb2 は ATCC から購入し、クローン 7720194、HindIII、プローブ用 T7、X. laevis satb2 は、コロラド大学ボルダー校の Tyler Square および Daniel Medeiros のための贈呈品であり、XbaI、Sp6 はプローブ用) を用いて DIG 標識アンチセンス RNA プローブを作製した。プローブ合成および生体内原位置ハイブリッド形成プロトコルを記載した完全な詳細は、Xenbase (<http://wiki.xenbase.org/xenwiki/index.php/Protocols>) で入手可能である。

10

【0101】

マウス全胚培養のために、胎生 7.5 日胚を、Ham の F12 培地と N-2 補充物 (Invitrogen) を含有する全胚培養ラット血清 (Harlan Labs) との 1:1 混合物中で培養した。容器をローラー培養装置 (BTC Engineering、英国ケンブリッジ) 上に置き、37℃で 2 日間維持し、20% の O₂ および 5% CO₂ を通気した。DMSO をビヒクル対照として用いて、5 pM の DMH-1 を用いた処置により BMP シグナル伝達を阻害した。

【0102】

ヒト中腸／後腸スフェロイドの作製ヒト腸オルガノイドは、すでに記載されたように作製および維持した (Watson et al., 2014)。ヒト胚性幹細胞および人工多能性幹細胞を、マトリゲル (基底膜マトリックス (BD Biosciences)) でコーティングした 6 ウェル Nunc lon 表面プレート (Nunc) 中、フィーダー非含有条件下で成長させ、mTESR1 培地 (Stem Cell Technologies) 中で維持した。胚体内胚葉 (DE) の誘導のために、ヒト ES 細胞または iPS 細胞を Accutase (Invitrogen) で継代し、マトリゲルでコーティングした Nunc lon 表面 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 100,000 個の細胞密度で播種した。Accutase 分割細胞については、初日に 10 pM の Y27632 化合物 (Sigma) を培地に添加した。初日の後、培地を mTESR1 に交換し、細胞をさらに 24 時間成長させた。次に、細胞を 100 ng/mL のアクチビン A で 3 日間、すでに記載されたように処置した (Spence et al., 2011)。次に、DE を後腸誘導培地 (RPMI 1640、2 mM の L-グルタミン、2% 脱補完 FBS、ペニシリン-ストレプトマイシンおよび 100 ng/mL のアクチビン A) で、中後腸スフェロイドの形成を誘導するための 500 ng/mL の FGF4 (R&D) および 3 pM の Chiron 99021 (Tocris) とともに 4 日間処置した。

20

30

【0103】

HIO および HCO への中腸／後腸スフェロイドのパターン形成。スフェロイドを 24 ウェルプレートから収集し、そしてマトリゲル (BD) 中に播種した。近位の HIO を作製するために、100 ng/mL の EGF (R&D) のみ、または 100 ng/mL ノギン含有の 100 ng/mL の EGF (R&D) を補充した腸成長培地 (応用 DMEM/F-12、N2、B27、15 mM の HEPES、2 mM の L-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン) でスフェロイドを覆った。HCO を作製するために、スフェロイドを 100 ng/mL の EGF および 100 ng/mL の BMP (R&D) で覆った。SHH 実験のために、1 μM の SAG (Tocris)、5 μM の SAG または 2.5 μM のシクロパミン (Tocris) を、RNA 試料を収集した後の最初の 3 日間、対照培地に添加した。すべてのパターン形成条件について、培地中に EGF のみを維持しながら、培地を 3 日で交換した。次に、培地をその後週 2 回交換した。HIO および HCO を 14 日ごとに新鮮なマトリゲルに再播種した。

40

【0104】

50

ニューロゲニン3誘導株の作製。ドキシサイクリン誘導性NEUROG3株を作製するために、本発明者らは、IPSC72.3細胞にpINCUDER21-NEUROG3レンチウイルスを形質導入し、250 μ g/mLのG418を用いて選択した。IPSC72.3細胞株および誘導性NEUROG3の両方はすでに記載されている(McCracken et al., 2014)。安定して形質導入された細胞を中/後腸スフェロイドに分化させ、次にHIOまたはHCOへとパターン形成した。スフェロイドを28日間成長させ、0.5 μ g/mLのドキシサイクリンで8時間刺激した。35日後に、オルガノイドを収集し、QPCRおよびIFによって分析した。

【0105】

オルガノイド間充織の成長24ウェルプレートの底部に付着するオルガノイドからの間充織細胞は2次元で付着し成長する。間充織細胞をオルガノイドから増殖させるために、DMEM 10% FBS+L-グルタミン+ペニシリン-ストレプトマイシンをウェルに添加し、そこからオルガノイドを14日後に収集した。ほぼ100%のコンフルエンスに達するまで、培地を週2回、合計2~3週間交換した。

【0106】

ヒト腸オルガノイドの移植NSGマウスを抗生物質含有餌(275 ppmのスルファメトキサゾールおよび1,365 ppmのトリメトプリム(試験食))で飼育した。手術の前後で食餌および水は自由に提供した。試験管内で28日間成熟させた単一のHIOをマトリゲルから取り出し、冷リン酸緩衝塩類溶液(DPBS; Gibco)で洗浄し、手術の12時間前に精製I型コラーゲン(ラット尾部コラーゲン(BD Biosciences))に包埋して、凝固したゲルプラグの形成を可能にした。次に、これらのプラグを、100 ng/mLのEGFを補充した腸管成長培地(応用DMEM/F-12、B27、15 mM HEPES、2 mMのL-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン)(R&D)中で一晩、標準成長培地に入れた。次に、以前報告されたように(Watson et al., 2014)、HIOを腎被膜下に移植した。簡単に説明すると、マウスを2%吸入イソフルラン(Butler Schein)で麻酔し、次にマウスの左側をイソプロピルアルコールおよびボビジン-ヨウ素で、無菌様式で準備した。腎臓を露出させるために小さな左後肋骨下切開部を作製した。莢膜下ポケットを作製した後、コラーゲン包埋HIOをポケットに入れた。次に、腎臓を腹腔腔に戻し、マウスにゾシン(100 mg/kg (Pfizer Inc.))の腹腔内洗浄をさっと与えた。皮膚を二重層で閉じ、マウスにBuprenex(0.05 mg/kg (Midwest Veterinary Supply))を皮下注射した。生着後8~10週間で、マウスを次に人道的に安楽死させるか、またはさらなる実験に供した。

【0107】

組織加工、免疫蛍光および顕微鏡検査。組織の大きさに応じて、組織を氷上の4%パラホルムアルデヒド(PFA)中で1~3時間固定した。オルガノイドおよび移植片生着物をOCTで凍結した。ロバ血清(1 $\times$ PBS+0.5% Triton-X中5%血清)を用いてOCT切片を30分間ブロッキングし、1次抗体とともに4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。次にスライドを1 $\times$ PBS+0.5% Triton-Xで3回洗浄し、ブロッキング緩衝液中にDAPIを含有する2次抗体中、室温で2時間インキュベートした。抗体およびそれぞれの希釈物のリストについては表2を参照されたい。次にスライドを1 $\times$ PBS+0.5% Triton-Xで2回洗浄したのに続いて1 $\times$ PBSで最終洗浄を行った。次に、カバーガラスをFluoromount-G(登録商標)(Southern Biotech)を用いてマウントした。画像をNikon A1焦点顕微鏡で捕捉し、Imaris Imaging Software(Bitplane)を用いて解析した。全載染色のために、組織を上述と同様に加工し、次にMurrayの溶液で清澄化した。撮像は、Nikon A1共焦点顕微鏡を用いて行った。

【0108】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 使用した Q P C R プライマー。図 3 および図 4 を参照されたい。

G E N E	配列
CDH1 FWD	GACCGGTGCAATCTTCAA
CDH1 REV	TTGACGCCGAGAGCTACAC
CHGA FWD	TGTGTCGGAGATGACCTCAA

CHGA REV	GTCCTGGCTCTTCTGCTCTG
CKB FWD	CCCACACCAGGAAGGTCTTA
CKB REV	CCTCTTCGACAAGCCGT
FXD3 FWD	AGGGTCACCTTCTGCATGTC
FXD3 REV	CTTCGGATAAACGCAGGACT
GATA4 FWD	TAGCCCCACAGTTGACACAC
GATA4 REV	GTCCTGCACAGCCTGCC
HOXA13 FWD	GCACCTTGGTATAAGGCACG
HOXA13 REV	CCTCTGGAAGTCCACTCTGC
HOXB13 FWD	GCTGTACGGAATGCGTTTCT
HOXB13 REV	AACCCACAGGTCCCTTTT
HOXD13 FWD	CCTCTTCGGTAGACGCACAT
HOXD13 REV	CAGGTGTACTGCACCAAGGA
HOXD3 FWD	CACCTCCAATGTCTGTGAA
HOXD3 REV	CAAAATTCAAGAAAACACACACA
INSL5 FWD	GAAGGTTTTGCGCTGGATT
INSL5 REV	GATCCCTCAAGCTCAGCAAG
MSX2 FWD	GGTCTTGTGTTTCTCAGGG
MSX2 REV	AAATTCAGAAGATGGAGCGG
MUC2 FWD	TGTAGGCATCGCTCTTCTCA
MUC2 REV	GACACCATCTACCTCACCGG
ONECUT1 Fwd	TTTTTGGGTGTGTTGCCTCT
ONECUT1 Rev	AGACCTTCCGAGGATGTG
PDX1 FWD	CGTCCGCTTGTCTCCTC
PDX1 REV	CCTTTCCCATGGATGAAGTC
PPIA (CPHA) FWD	CCCACCGTGTCTTCGACATT
PPIA (CPHA) REV	GGACCCGTATGCTTTAGGATGA
SATB2 FWD	CCACCTTCCAGCTTGATT
SATB2 REV	TTAGCCAGCTGGTGGAGACT

【 0 1 0 9 】

免疫蛍光画像の定量化胚全体の画像定量化は、画像を別々のチャンネルに分割し、次いで Image J (N I H) を用いて画素面積を測定することによって行った。画素面積を各チャンネルについて決定し、チャンネル間の比率を決定し、対照処置胚についての比率を 1 0 0 として表した。試験管内および生体内で成長させたオルガノイドの定量化は、先に説明したように、切片上で行い、そこから画像を捕捉した。 C D X 2 、 G A T A 4 および S A

T B 2 陽性核の数は、ヒト生検試料を用いた較正後の [marls におけるスポット関数を用いて定量化した。

【0110】

RNAの単離およびQPCR製造元のプロトコルにより、Nucleospin（登録商標）RNA抽出キット（Macharey-Nagel）を用いてRNAを抽出し、Superscript VIL0（Invitrogen）を用いてcDNAへと逆転写した。QPCRプライマーは、qPrimerDepotウェブ系ツール（primerdepot.nci.nih.gov）を使用して設計した。プライマー配列を表3に列挙する。QPCRは、Quantitect SYBR（登録商標）Green PCRキット（Qiagen）およびQuantStudio（商標）6 FlexリアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）を使用して実施した。

【0111】

【表3】

表3. 使用した抗体。図1～図6を参照されたい。

抗体	HOST	カタログ番号	希釈
B カテニン	ウサギ	Santa Cruz #sc-7199	1 : 200
CDH17 *	ウサギ	Sigma #HPA023616	1 : 1, 500
Cdx2	マウス	BioGenex cdx2-88	1 : 300
Cdx2	ウサギモノクローナル	Cell Marque EPR2764Y	1 : 100
Chr-A (C20)	ヤギ	Santa Cruz #sc-1488	1 : 100
DEFA5 *	マウスモノクローナル	NovusBiologicalsNB110-60002	1 : 60, 000
E カドヘリン	ヤギ	R&D #AF648	1 : 400
E-カドヘリン(マウス特異的)	ラット	R&D #MAB7481	1 : 500
E カドヘリン	マウス	R&D #AF648	1 : 500
FoxA2	ヤギ	Santa Cruz #sc-6554	1 : 500
GATA4	ヤギ	Santa Cruz #sc-1237	1 : 100
GATA4	ウサギ	Santa Cruz #sc-9053	1 : 100
GFP (緑色蛍光タンパク質)	ウサギ	Invitrogen #A11122	1 : 1, 000
Ghrelin	ヤギ	Santa Cruz #sc-10368	1 : 500
GIP (胃抑制ポリペプチド)	ヤギ	Santa Cruz #sc-23554	1 : 500
GLP-1	マウス	BioVision #3104-100	1 : 200
HNF-6 (ONECUT1)	ウサギ	Santa Cruz #sc-13050	1 : 100
INSL5 (H-110) *	ウサギ	Santa Cruz #sc-67190	1 : 100
KI67	ウサギモノク	Cell Marque SP6	1 : 100

	ローナル		
モチリン	マウスモノク ローナル	Santa Cruz # sc - 376605	1 : 100
ムチン 5B *	ウサギ	Santa Cruz # sc - 20119	1 : 100
Mucin2 (MUC2)	ウサギ	Santa Cruz # sc - 15334	1 : 200
ペプチド YY	ウサギ	Abcam # ab22663	1 : 1000
pSmad 1/5/8 (製造中止とな り、13820S で置き換え)	ウサギ	Cell Signaling 9511S	1 : 100
pSmad 2/3	ウサギ	Cell Signaling 9510S	1 : 100
SATB2	ウサギモノク ローナル	Cell Marque EP281	1 : 100
SATB2 (SATBA4610) *	マウスモノク ローナル	Santa Cruz # sc - 81376	1 : 100
Sox9	ウサギ	Millipore # AB5535	1 : 10, 000
Alexafluor (登録商標) ロバ抗 ヤギ 488	ロバ	Life Technologies A - 11055	1 : 500
Alexafluor (登録商標) ロバ抗 ヤギ 568	ロバ	Life Technologies A - 11057	1 : 500
Alexafluor (登録商標) ロバ抗 マウス 568	ロバ	Life Technologies A - 10037	1 : 500
Alexafluor (登録商標) ロバ抗 ウサギ 647	ロバ	Life Technologies A - 31573	1 : 500
Alexafluor (登録商標) ロバ抗 ラット 488	ロバ	Life Technologies A - 21208	1 : 500

10

20

30

【0112】

大腸マーカーとしての SATB2 の同定

大腸のマーカーを同定するために、本発明者らはまず、GNCPro http://gncpro.sabiosciences.com/gncpro/expression_grapher.php を使用して、東京大学データベースに基づいて（他の組織と比較して）結腸において上方調節された転写因子を同定した。この検索に基づいて、SATB2 は結腸において6番目にランク付けされた遺伝子であった。SATB2 が結腸において実際に上方調節されていることを検証するために、本発明者らはTIGERデータベース (http://bioinfo.wilmer.ihu.edu/tiger/db_gene/SATB2-index.html) を用いて SATB2 発現を検索した。結腸における SATB2 の発現をさらに確認するため、および多数の組織にわたるタンパク質発現を検討するために、本発明者らは Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/search/satb2>) を使用した。同様の手法を用いて大腸／結腸の他のマーカーを同定した。

40

【0113】

公共 RNA 配列受入番号成体の小腸および大腸の RNA 配列データは公共のデータベース E-MTAB-1733 からダウンロードした。これらのデータセットは、上皮層と筋肉層を含む器官組織全体を表す。小腸試料の受入番号：ERR315344、ERR315381、ERR315409、ERR315442、ERR315461。大腸試料の

50

受入番号：ERR315348、ERR315357、ERR315484。図9Bについて、加工されたFPKMデータは、<https://github.com/hilldr/FinkbeinerStemCellReports2015>からダウンロードされた。これらのデータは、成体の十二指腸（ERS326992、ERS326976）およびE-MTAB-1733由来の先に列挙された小腸試料、およびGSE18927由来のヒト胎児腸試料（器官全体も）を含む。ヒト胎児小腸についての受入番号は、GSM1059508、GSM1059521、GSM1059486、GSM1059507、GSM1059517、GSM1220519である。図9Cについては、データはGEO受入GSE66749プラットフォームGLP5175から得た。以下の試料、すなわち、GSM1385160、GSM1385161、GSM1385162、GSM1385163、GSM1385164、GSM1385165、GSM1385166、GSM1385167、GSM1385168、GSM1385169、GSM1385170、GSM1385171、GSM1614646、GSM1614646を使用した。試料の値は、GEO2Rの「特性グラフ」機能を使用し、それらのID番号（それぞれ3086100および2594089）によってGATA4およびSATB2を検索して決定した。

【0114】

RNA配列の配列集合量の推定RNAライブラリー構築およびRNA配列決定は、Illumina HiSeq 2500プラットフォームを使用して、シンシナティ子供病院DNA配列決定コアによって行った。Illumina配列決定実行の品質は、FastQC第0.10.1版<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>を使用して品質問題（低品質のスコア、過剰に表現されたシーケンス、不適切なGCコンテンツなど）を示し得るデータの特色を識別して、各試料のFASTQデータを分析することによって評価した。QC分析では大きな問題は確認されなかった。本発明者らは、アラインメント、差次的発現分析、および分析後診断のためにソフトウェアパッケージTuxedo Suiteを使用した。簡潔には、本発明者らは、TopHat第2.0.13版およびBowtie第2.2.5版を使用して、参照トランスクリプトーム（UCSC hg19）に対する読み取りを整列させた（Langmead et al., 2009）。本発明者らは、読み取り整列の正確さを最大限にするための「-b2-非常に感度が高い」、ならびに「-非網羅検索」および既知の転写産物に対して読み出されたマッピングを限定する「-非新規接合」を除いて、整列に既定値パラメータ設定を用いた。RNA存在量の推定にはCufflinks第2.2.1版（Trapnell et al., 2012）を使用した。UCSC hg19.faを参照ゲノム配列として使用し、UCSC hg19.gtfをトランスクリプトームアノテーションに使用した。本発明者らは、カフスリンクにおいて次のパラメータ、すなわち、1つを超える遺伝子座においてマッピングする読み取りのための発現計算を調整するための「-多重読み取り補正」、ならびに発現値の正規化のための「-比較可能なヒットノルム」および「-上位四分位数ノルム」を適用した。正規化したFPKM表はCuffNorm関数を使用して作成した。RNA配列集合および転写分析は、64ビットのDebian Linux安定バージョン7.10（「Wheezy」）プラットフォームを使用して行った。

【0115】

差次的発現分析

すべてのプロットと統計分析はRバージョン3.3.1（2016-06-21）で行った。プロットはRパッケージ'ggplot2'（Ginestet, 2011）を用いて作成した。Rパッケージ'SeqRetriever'、'SeqRetriever'バージョン0.6 <https://github.com/hilldr/SeqRetriever>を使用して、Cufflinks出力の差次的発現分析および統計的検定を完了した。超幾何平均検定を用いて、Rパッケージ'GeneOverlap' <http://shenlab-sinai.citHub.io/shenlab-sinai/>を使

用して、群間で共有遺伝子発現シグネチャの相対量を評価した。完全なRNA配列FASTQ加工パイプラインおよび解析スクリプトは、<https://github.com/hilldr/Munera2016>で入手可能である。

【0116】

参考文献

Aronson, B. E. , Aronson, S. R. , Berkhout, R. P. , Chavoushi, S. F. , He, A. , Pu, W. T. , Verzi, M. P. , and Krasinski, S. D. (2014). GATA4 represses an ileal program of gene expression in the proximal small intestine by inhibiting the acetylation of histone H3, lysine 27. *Bba-Gene Regul Mech* 1839, 1273–1282.

10

【0117】

Battle, M. A. , Bondow, B. J. , Iverson, M. A. , Adams, S. J. , Jandacek, R. J. , Tso, P. , and Duncan, S. A. (2008). GATA4 is essential for jejunal function in mice. *Gastroenterology* 135, 1676–1686 e1671.

【0118】

Bernstein, B. E. , Stamatoyannopoulos, J. A. , Costello, J. F. , Ren, B. , Milosavljevic, A. , Meissner, A. , Kellis, M. , Marra, M. A. , Beaudet, A. L. , Ecker, J. R. , et al. (2010). The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol* 28, 1045–1048.

20

【0119】

Beuling, E. , Bosse, T. , aan de Kerk, D. J. , Piaseckyj, C. M. , Fujiwara, Y. , Katz, S. G. , Orkin, S. H. , Grand, R. J. , and Krasinski, S. D. (2008a). GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors. *Dev Biol* 322, 179–189.

30

【0120】

Beuling, E. , Bosse, T. , Buckner, M. A. , and Krasinski, S. D. (2007a). Co-localization of Gata4 and Hnfl alpha in the gastrointestinal tract is restricted to the distal stomach and proximal small intestine. *Gastroenterology* 132, A586–A586.

40

【0121】

Beuling, E. , Bosse, T. , de Kerk, D. A. , Piaseckyj, C. M. , Fujiwara, Y. , Orkin, S. H. , and Krasinski, S. D. (2007b). Fog cofactors partially mediate Gata4 function in the adult mouse small intestine. *Gastroenterology* 132, A692–A693.

【0122】

Beuling, E. , Kerkhof, I. M. , Nicksa, G. A. , Giuffrida, M. J. , Haywood, J. , aan de Kerk, D. J. , P

50

piaseckyj, C. M. , Pu, W. T. , Buchmiller, T. L. , Dawson, P. A. , et al. (2010) . Conditional Gata4 deletion in mice induces bile acid absorption in the proximal small intestine. Gut 59 , 888–895.

[0123]

Beuling, E. , Kerkhof, I. M. , Piaseckyj, C. M. , Dawson, P. A. , Pu, W. T. , Grand, R. J. , and Krasinski, S. D. (2008b) . The absence of GATA4 in the distal small intestine defines the ileal phenotype. Gastroenterology 134, A83–A84.

10

[0124]

Bonilla-Claudio, M. , Wang, J. , Bai, Y. , Klysiak, E. , Selever, J. , and Martin, J. F. (2012) . Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. Development 139, 709–719.

[0125]

Bosse, T. , Fialkovich, J. J. , Piaseckyj, C. M. , Beuling, E. , Broekman, H. , Grand, R. J. , Montgomery, R. K. , and Krasinski, S. D. (2007) . Gata4 and Hnf1alpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292, G1302–1314.

20

[0126]

Bouchi, R. , Foo, K. S. , Hua, H. , Tsuchiya, K. , Ohmura, Y. , Sandoval, P. R. , Ratner, L. E. , Egli, D. , Leibell, R. L. , and Accili, D. (2014) . FOXO1 inhibition yields functional insulin-producing cells in human gut organoid cultures . Nat Commun 5, 4242.

30

[0127]

Burnicka-Turek, O. , Mohamed, B. A. , Shirneshan, K. , Thanasupawat, T. , Hombach-Klonisch, S. , Klonisch, T. , and Adham, I. M. (2012) . INSL5-deficient mice display an alteration in glucose homeostasis and an impaired fertility. Endocrinology 153, 4655–4665.

[0128]

40

De Santa Barbara, P. , Williams, J. , Goldstein, A. M. , Doyle, A. M. , Nielsen, C. , Winfield, S. , Faure, S. , and Roberts, D. J. (2005) . Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 234, 312–322.

[0129]

Dobрева, G. , Chahrour, M. , Dautzenberg, M. , C

50

hirivella, L., Kanzler, B., Farinas, I., Karsenty, G., and Grosschedl, R. (2006). SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell* 125, 971–986.

[0130]

Driver, I., and Ohlstein, B. (2014). Specification of regional intestinal stem cell identity during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 141, 1848–1856.

[0131]

Duluc, I., Freund, J. N., Leberquier, C., and Kedinger, M. (1994). Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J Cell Biol* 126, 211–221.

[0132]

Eberhard, J., Gaber, A., Wangefjord, S., Nodin, B., Uhlen, M., Ericson Lindquist, K., and Jirstrom, K. (2012). A cohort study of the prognostic and treatment predictive value of SATB2 expression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 106, 931–938.

[0133]

Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., et al. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* 13, 397–406.

[0134]

Finkbeiner, S. R., Hill, D. R., Altheim, C. H., Dedhia, P. H., Taylor, M. J., Tsai, Y. H., Chin, A. M., Mahe, M. M., Watson, C. L., Freeman, J. J., et al. (2015). Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports*.

[0135]

FitzPatrick, D. R., Carr, I. M., McLaren, L., Leek, J. P., Wightman, P., Williamson, K., Gautier, P., McGill, N., Hayward, C., Firth, H., et al. (2003). Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32–q33. *Hum Mol Genet* 12, 2491–2501.

[0136]

Georgas, K. M., Armstrong, J., Keast, J. R., Larkins, C. E., McHugh, K. M., Southard-Smith, E.

M. , Cohn, M. J. , Batourina, E. , Dan, H. , Schneider, K. , et al. (2015) . An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract. *Development* 142, 1893–1908.

[0137]

Ginestet, C. (2011) . ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *J R Stat Soc a Stat* 174, 245–245.

[0138]

Gracz, A. D. , Ramalingam, S. , and Magness, S. T. (2010) . Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am J Physiol-Gastr L* 298, G590–G600.

[0139]

Guo, Z. , Driver, I. , and Ohlstein, B. (2013) . Injury-induced BMP signaling negatively regulates *Drosophila* midgut homeostasis. *J Cell Biol* 201, 945–961.

[0140]

Gyorgy, A. B. , Szemes, M. , de Juan Romero, C. , Tarabykin, V. , and Agoston, D. V. (2008) . SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons. *Eur J Neurosci* 27, 865–873.

[0141]

Haramis, A. P. G. , Begthel, H. , van den Born, M. , van Es, J. , Jonkheer, S. , Offerhaus, G. J. A. , and Clevers, H. (2004) . De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303, 1684–1686.

[0142]

Hardwick, J. C. , Van Den Brink, G. R. , Bleumin, S. A. , Ballester, I. , Van Den Brande, J. M. , Keller, J. J. , Offerhaus, G. J. , Van Deventer, S. J. , and Peppelenbosch, M. P. (2004) . Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 126, 111–121.

[0143]

He, X. C. , Zhang, J. W. , Tong, W. G. , Tawfik, O. , Ross, J. , Scoville, D. H. , Tian, Q. , Zeng, X. , He, X. , Wiedemann, L. M. , et al. (2004) . BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature Genetics* 36, 1117–1121.

[0144]

Higuchi, Y. , Kojima, M. , Ishii, G. , Aoyagi, K. , Sasaki, H. , and Ochiai, A. (2015) . Gastrointestinal Fibroblasts Have Specialized, Diverse Transcriptional Phenotypes: A Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Fibroblasts. Plos One 10.

[0145]

Holland, P. W. H. , Booth, H. A. F. , and Bruford, E. A. (2007) . Classification and nomenclature of all human homeobox genes. BMC Biol 5.

[0146]

Jeejeebhoy, K. N. (2002) . Short bowel syndrome: a nutritional and medical approach. CM AJ 166, 1297–1302.

[0147]

Johnston, T. B. (1913) . Extroversion of the Bladder, complicated by the Presence of Intestinal Openings on the Surface of the Extroverted Area. J Anat Physiol 48, 89–106.

[0148]

Kohlhofer, B. M. , Thompson, C. A. , Walker, E. M. , and Battle, M. A. (2016) . GATA4 regulates epithelial cell proliferation to control intestinal growth and development in mice . Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2, 189–209.

[0149]

Kumar, M. , Jordan, N. , Melton, D. , and Grapin-Botton, A. (2003) . Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. Dev Biol 259, 109–122.

[0150]

Langmead, B. , Trapnell, C. , Pop, M. , and Salzberg, S. L. (2009) . Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10, R25.

[0151]

Li, H. , Coghlan, A. , Ruan, J. , Coin, L. J. , Heriche, J. K. , Osmotherly, L. , Li, R. , Liu, T. , Zhang, Z. , Bolund, L. , et al. (2006) . TreeFam: a curated database of phylogenetic trees of animal gene families. Nucleic Acids Res 34, D572–580.

[0152]

Li, L. H. (2005) . BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through antagonizing Wnt signaling. Gastroenterology 128, A702–A702.

[0153]

McCracken, K. W. , Aihara, E. , Martin, B. , Crawford, C. M. , Broda, T. , Treguier, J. , Zhang, X. ,

10

20

30

40

50

Shannon, J. M. , Montrose, M. H. , and Wells, J. M . (2017) . Wnt/β-catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. *Nature* 541, 182–187.

[0154]

McCracken, K. W. , Cata, E. M. , Crawford, C. M. , Sinagoga, K. L. , Schumacher, M. , Rockich, B. E. , Tsai, Y. H. , Mayhew, C. N. , Spence, J. R. , Zavros, Y. , et al. (2014) . Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature* 516, 400–404.

10

[0155]

McGovern, D. P. , Gardet, A. , Torkvist, L. , Goyette, P. , Essers, J. , Taylor, K. D. , Neale, B. M. , Ong, R. T. , Lagace, C. , Li, C. , et al. (2010) . Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 42, 332–337.

[0156]

20

Molodecky, N. A. , Soon, I. S. , Rabi, D. M. , Ghali, W. A. , Ferris, M. , Chernoff, G. , Benchimol, E. I. , Panaccione, R. , Ghosh, S. , Barkema, H. W. , et al. (2012) . Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46–54 e42; quiz e30.

[0157]

Moser, A. R. , Pitot, H. C. , and Dove, W. F. (1990) . A Dominant Mutation That Predisposes to Multiple Intestinal Neoplasia in the Mouse. *Science* 247, 322–324.

30

[0158]

Patankar, J. , Obrowsky, S. , Hoefler, G. , Battle, M. , Kratky, D. , and Levak-Frank, S. (2012a) . Intestinal Deficiency of Gata4 Protects from Diet-Induced Hepatic Steatosis by Suppressing De Novo Lipogenesis and Gluconeogenesis in Mice. *J Hepatol* 56, S496–S496.

[0159]

40

Patankar, J. V. , Obrowsky, S. , Doddapattar, P. , Hoefler, G. , Battle, M. , Levak-Frank, S. , and Kratky, D. (2012b) . Intestinal GATA4 deficiency protects from diet-induced hepatic steatosis. *J Hepatol* 57, 1061–1068.

[0160]

Ramalingam, S. , Daughtridge, G. W. , Johnston, M. J. , Gracz, A. D. , and Magness, S. T. (2012) . Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colono

50

ids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G10–20.

[0161]

Rankin, S. A. , Gallas, A. L. , Neto, A. , Gomez-Skarmeta, J. L. , and Zorn, A. M. (2012) . Suppression of Bmp4 signaling by the zinc-finger repressors Osrl and Osr2 is required for Wnt/beta-catenin-mediated lung specification in *Xenopus*. *Development* 139, 3010–3020.

[0162]

Rankin, S. A. , Thi Tran, H. , Wlizla, M. , Mancini, P. , Shifley, E. T. , Bloor, S. D. , Han, L. , Vleminckx, K. , Wert, S. E. , and Zorn, A. M. (2015) . A Molecular atlas of *Xenopus* respiratory system development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 244, 69–85.

[0163]

Ratineau, C. , Duluc, I. , Pourreyron, C. , Kedinger, M. , Freund, J. N. , and Roche, C. (2003) . Endoderm- and mesenchyme-dependent commitment of the differentiated epithelial cell types in the developing intestine of rat. *Differentiation* 71, 163–169.

[0164]

Roberts, D. J. , Johnson, R. L. , Burke, A. C. , Nelson, C. E. , Morgan, B. A. , and Tabin, C. (1995) . Sonic Hedgehog Is an Endodermal Signal Inducing Bmp-4 and Hox Genes during Induction and Regionalization of the Chick Hindgut. *Development* 121, 3163–3174.

[0165]

Rodriguez-Pineiro, A. M. , Bergstrom, J. H. , Ermund, A. , Gustafsson, J. K. , Schutte, A. , Johansson, M. E. , and Hansson, G. C. (2013) . Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G348–356.

[0166]

Savidge, T. C. , Morey, A. L. , Ferguson, D. J. , Fleming, K. A. , Shmakov, A. N. , and Phillips, A. D. (1995) . Human intestinal development in a severe-combined immunodeficient xenograft model. *Differentiation* 58, 361–371.

[0167]

Savin, T. , Kurpios, N. A. , Shyer, A. E. , Florescu, P. , Liang, H. , Mahadevan, L. , and Tabin, C. J. (2011) . On the growth and form of the gut

10

20

30

40

50

. Nature 476, 57–62.

[0168]

Sheehan–Rooney, K., Swartz, M. E., Lovely, C. B., Dixon, M. J., and Eberhart, J. K. (2013). Bmp and Shh signaling mediate the expression of *satb2* in the pharyngeal arches. PLoS One 8, e59533.

[0169]

Sherwood, R. I., Chen, T. Y., and Melton, D. A. (2009). Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists 238, 29–42.

10

[0170]

Sherwood, R. I., Maehr, R., Mazzoni, E. O., and Melton, D. A. (2011). Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. Mech Dev 128, 387–400.

[0171]

Shyer, A. E., Huyck, T. R., Lee, C., Mahadevan, L., and Tabin, C. J. (2015). Bending gradients: how the intestinal stem cell gets its home. Cell 161, 569–580.

20

[0172]

Siegel, R., Desantis, C., and Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin 64, 104–117.

[0173]

Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kumar, M. F., Valiance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S., Zorn, A. M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature 470, 105–109.

30

[0174]

Thanasupawat, T., Hammje, K., Adham, I., Ghia, J. E., Del Bigio, M. R., Krcek, J., Hoang–Vu, C., Klonisch, T., and Hombach–Klonisch, S. (2013). INSL5 is a novel marker for human enteroendocrine cells of the large intestine and neuroendocrine tumours. Oncol Rep 29, 149–154.

40

[0175]

Tiso, N., Filippi, A., Pauls, S., Bortolussi, M., and Argenton, F. (2002). BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. Mech Dev 118, 29–37.

[0176]

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg

50

g, S. L., Rinn, J. L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7, 562–578.

[0177]

Uppal, K., Tubbs, R. S., Matusz, P., Shaffer, K., and Loukas, M. (2011). Meckel's diverticulum: a review. *Clin Anat* 24, 416–422.

[0178]

van Dop, W. A., Uhmman, A., Wijgerde, M., Sledens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., Weerman, M. A. V., Boeckxstaens, G. E., Hommes, D. W., Hardwick, J. C., et al. (2009). Depletion of the Colonic Epithelial Precursor Cell Compartment Upon Conditional Activation of the Hedgehog Pathway. *Gastroenterology* 136, 2195–2203.

[0179]

van Klinken, B. J., Dekker, J., van Gool, S. A., van Marie, J., Buller, H. A., and Einerhand, A. W. (1998). MUCSB is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *The American journal of physiology* 274, G871–878.

[0180]

Walker, E. M., Thompson, C. A., and Battle, M. A. (2014). GATA4 and GATA6 regulate intestinal epithelial cytodifferentiation during development. *Dev Biol* 392, 283–294.

[0181]

Walton, K. D., Kolterud, A., Czerwinski, M. J., Bell, M. J., Prakash, A., Kushwaha, J., Grosse, A. S., Schnell, S., and Gumucio, D. L. (2012). Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15817–15822.

[0182]

Walton, K. D., Kolterud, A., Grosse, A. S., Hu, C. B., Czerwinski, M., Richards, N., and Gumucio, D. L. (2009). Epithelial Hedgehog signals direct mesenchymal villus patterning through BMP. *Dev Biol* 331, 489–489.

[0183]

Walton, K. D., Whidden, M., Kolterud, A., Shofner, S. K., Czerwinski, M. J., Kushwaha, J., Parmar, N., Chandhrasekhar, D., Freddo, A. M., Schnell, S., et al. (2016). Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. *Development* 143, 427–436.

10

20

30

40

50

[0184]

Wang, X. , Yamamoto, Y. , Wilson, L. H. , Zhang, T. , Howitt, B. E. , Farrow, M. A. , Kern, F. , Ning, G. , Hong, Y. , Khor, C. C. , et al. (2015) . Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. *Nature* 522, 173–178.

[0185]

Watson, C. L. , Mahe, M. M. , Munera, J. , Howell, J. C. , Sundaram, N. , Poling, H. M. , Schweitzer, J. l. , Valiance, J. E. , Mayhew, C. N. , Sun, Y. , et al. (2014) . An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* 20, 1310–1314.

10

[0186]

Wehkamp, J. , Chu, H. , Shen, B. , Feathers, R. W. , Kays, R. J. , Lee, S. K. , and Bevins, C. L. (2006) . Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Left* 580, 5344–5350.

20

[0187]

Whissell, G. , Montagni, E. , Martinelli, P. , Hernandez-Momblona, X. , Sevillano, M. , Jung, P. , Cortina, C. , Caton, A. , Abuli, A. , Castells, A. , et al. (2014) . The transcription factor GATA6 enables self-renewal of colon adenoma stem cells by repressing BMP gene expression. *Nat Cell Biol* 16, 695–707.

[0188]

Wills, A. , Dickinson, K. , Khokha, M. , and Baker, J. C. (2008) . Bmp signaling is necessary and sufficient for ventrolateral endoderm specification in *Xenopus*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 2177–2186.

30

[0189]

Xue, X. , Ramakrishnan, S. , Anderson, E. , Taylor, M. , Zimmermann, E. M. , Spence, J. R. , Huang, S. , Greenson, J. K. , and Shah, Y. M. (2013) . Endothelial PAS domain protein 1 activates the inflammatory response in the intestinal epithelium to promote colitis in mice. *Gastroenterology* 145, 831–841.

40

[0190]

Yahagi, N. , Kosaki, R. , Ito, T. , Mitsuhashi, T. , Shimada, H. , Tomita, M. , Takahashi, T. , and Kosaki, K. (2004) . Position-specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract. *Congenit Anom (Kyoto)* 44, 18–26.

50

【0191】

Zbuk, K. M., and Eng, C. (2007). Hamartomatous polyposis syndromes. Nat Clin Pract Gastr 4, 492-502.

【0192】

Zorn, A. M., and Wells, J. M. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. Annu Rev Cell Dev Biol 25, 221-251.

【0193】

他に指示がない限り、パーセンテージおよび割合はすべて重量で計算される。すべてのパーセンテージおよび割合は、特に指示がない限り、組成物全体を基準にして計算される。

10

【0194】

本明細書全体を通じて記載されているあらゆる最大数値限定には、それより小さいあらゆる数値限定が、そのようなより小さい数値限定が本明細書に明確に記載されているかのように含まれることを理解すべきである。本明細書全体を通じて記載されるあらゆる最小数値限定は、それよりも大きいあらゆる数値限定を、あたかもこうしたそれよりも大きい数値限定が本明細書に明確に記載されているかのように含む。本明細書全体を通じて記載されるあらゆる数値範囲は、こうしたより広い数値範囲内に入る、それよりも狭いあらゆる数値範囲を、あたかもこうしたそれよりも狭い数値範囲がすべて本明細書に明確に記載されているかのように含む。

20

【0195】

本明細書に開示した寸法および値は、列挙された正確な数値に厳密に限定されるものと理解されるべきではない。むしろ、特に指定されない限り、そのような各寸法は、列挙された値とその値の周辺の機能的に同等の範囲の両方を意味することが意図されている。例えば、「20 mm」として開示される寸法は、「約20 mm」を意味するものとする。

【0196】

相互参照されるまたは関連特許もしくは出願のいずれも含めた、本明細書に引用されているすべての文書は、明示的に除外される、または特に限定されない限り、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いかなる文献の引用も、本明細書中で開示または特許請求される任意の発明に対する先行技術であるとはみなされず、あるいはそれを単独でまたは他の任意の参考文献（単数または複数）と組み合わせたときに、そのような発明すべてを教示、示唆、または開示するとはみなされない。さらに、本文書における用語の任意の意味または定義が、参照により組み込まれた文書内の同じ用語の意味または定義と矛盾する場合、本文書におけるその用語に割り当てられた意味または定義が適用されるものとする。

30

【0197】

本発明の特定の実施形態を例示し説明してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく他の様々な変更および修正を加えることができることは当業者には明らかであろう。したがって、本発明の範囲内にあるそのようなすべての変更および修正を添付の特許請求の範囲で網羅することを意図している。

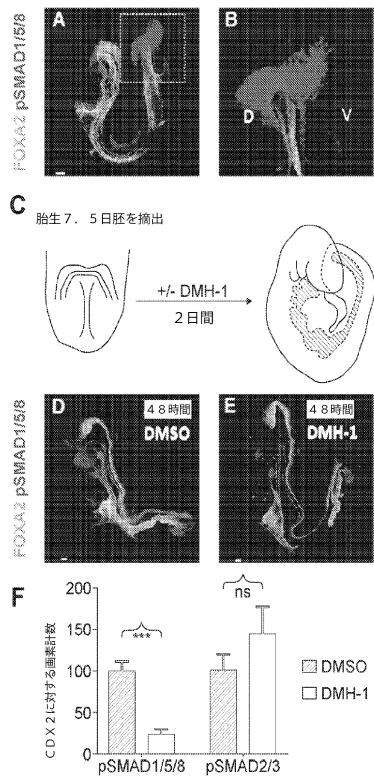
40

【0198】

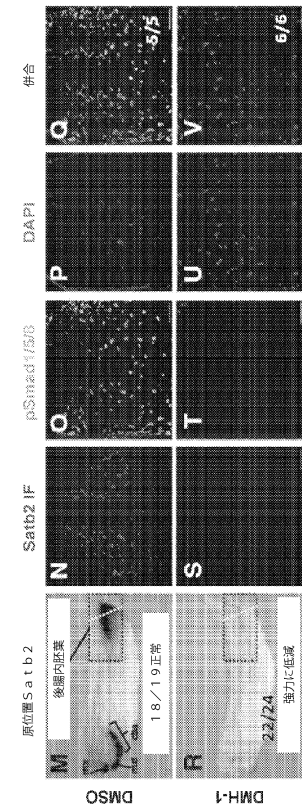
50

【図面】

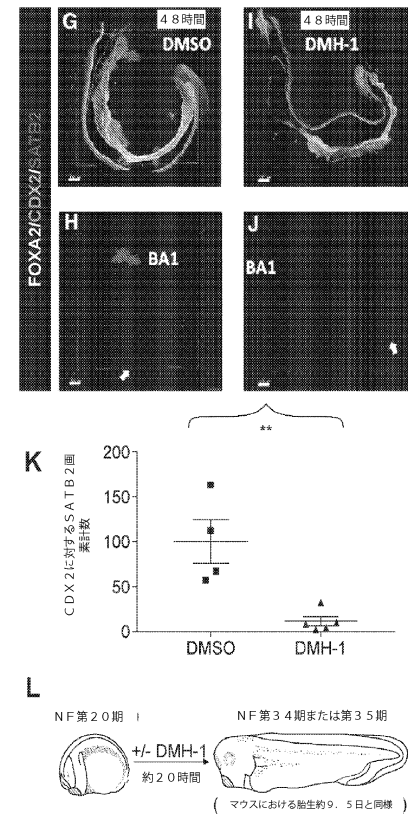
【図 1 A】



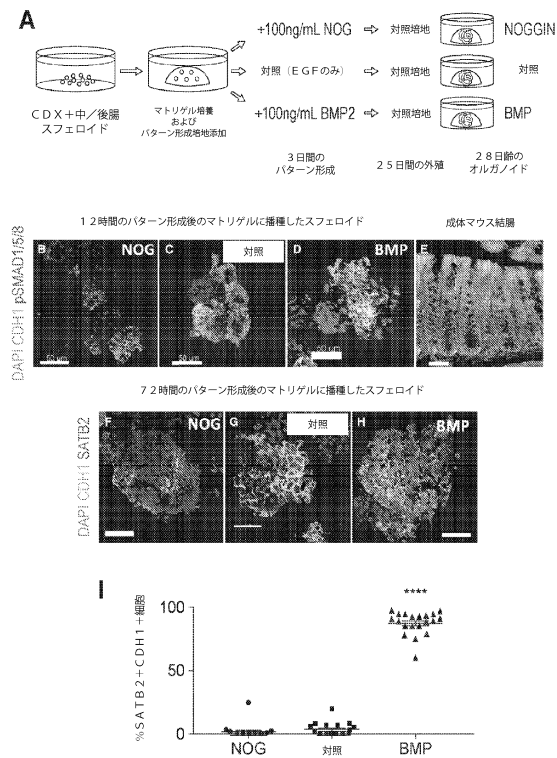
【図 1 C】



【図 1 B】



【図 2 A】



10

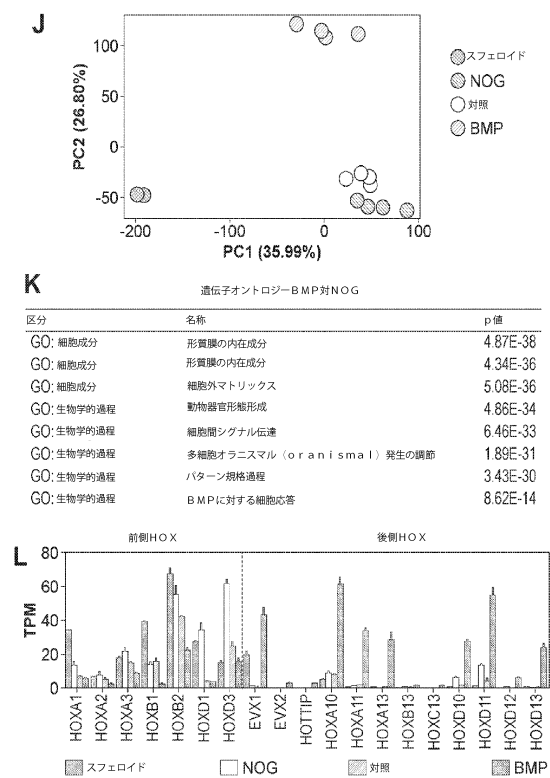
20

30

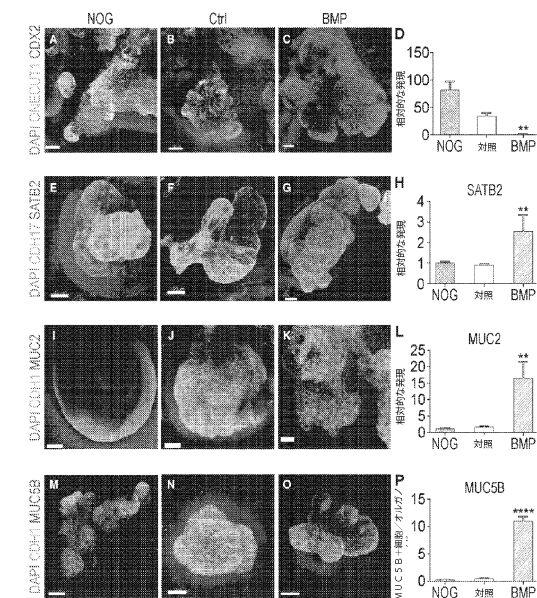
40

50

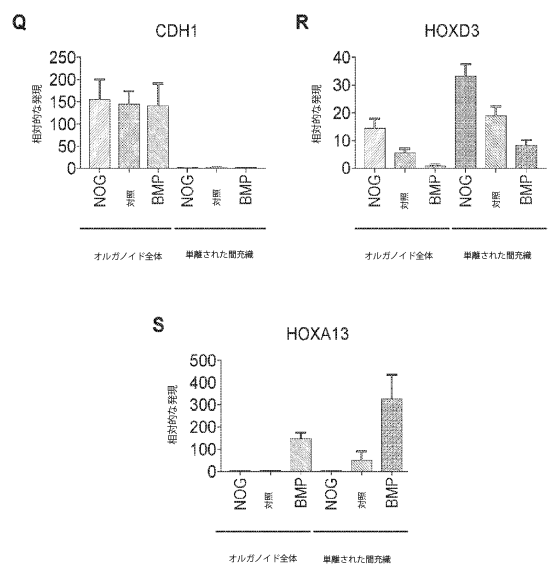
【図 2 B】



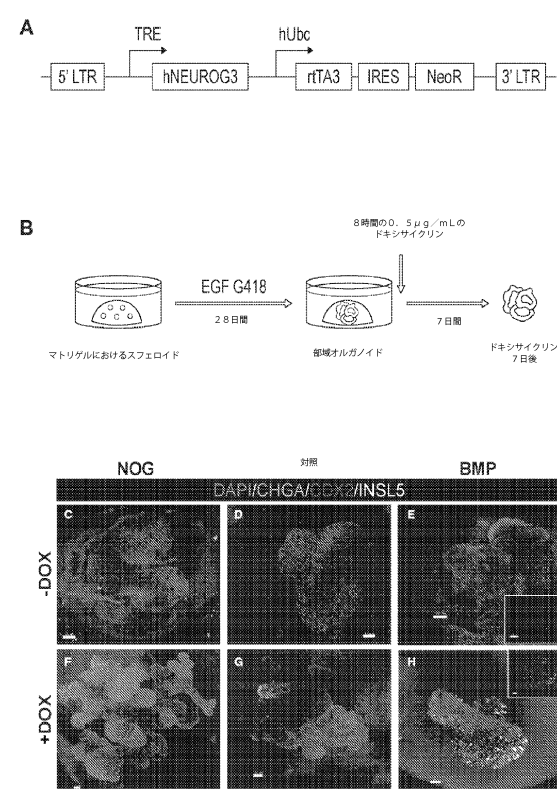
【図 3 A】



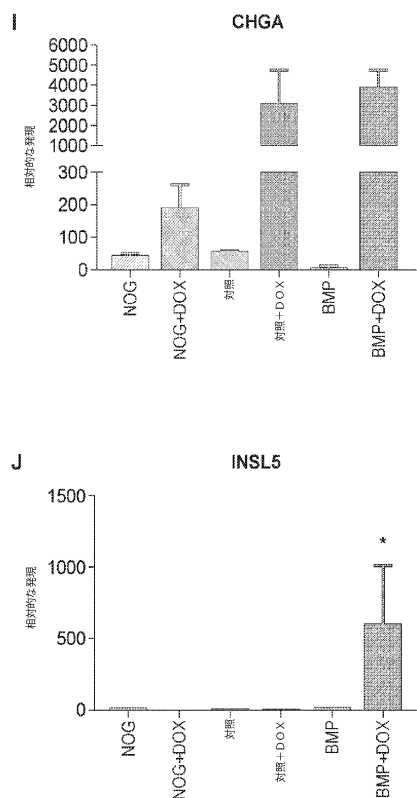
【図 3 B】



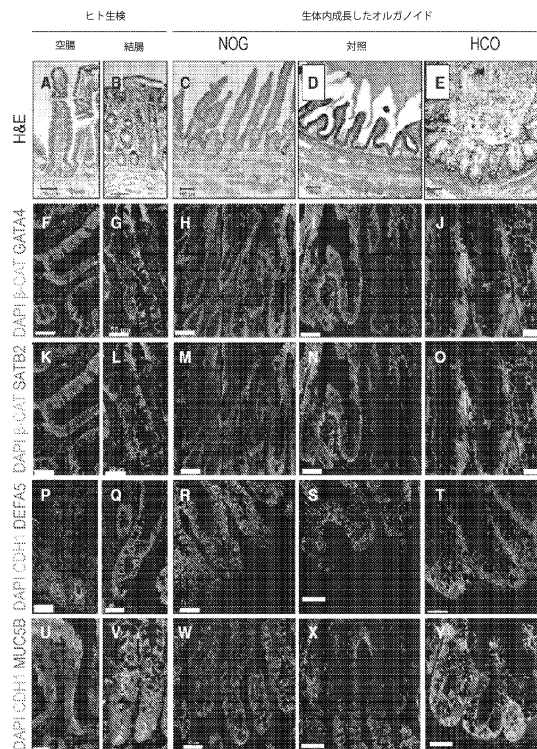
【図 4 A】



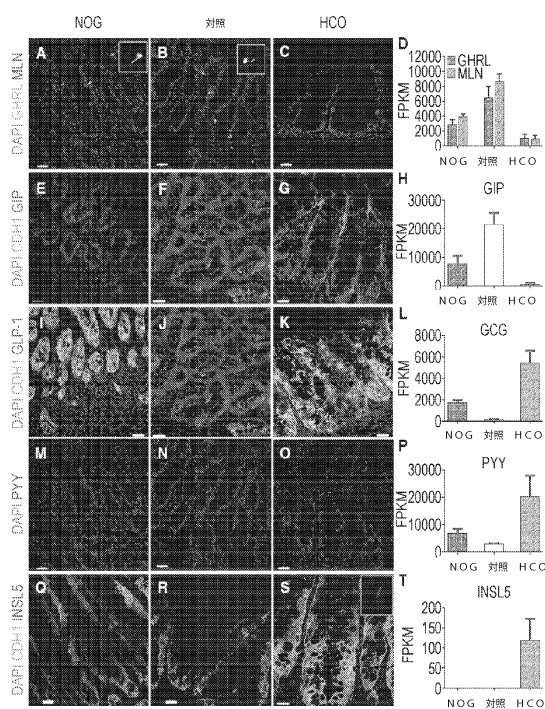
【図 4 B】



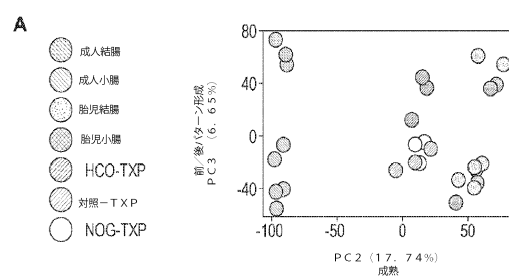
【図 5】



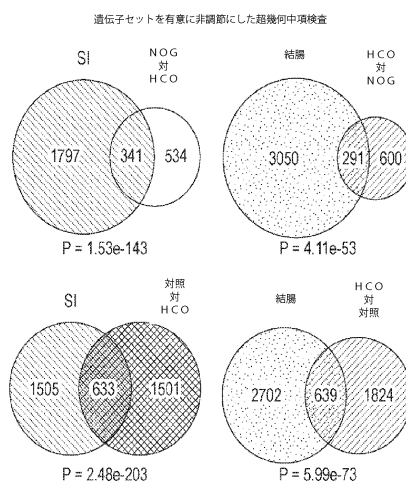
【図 6】



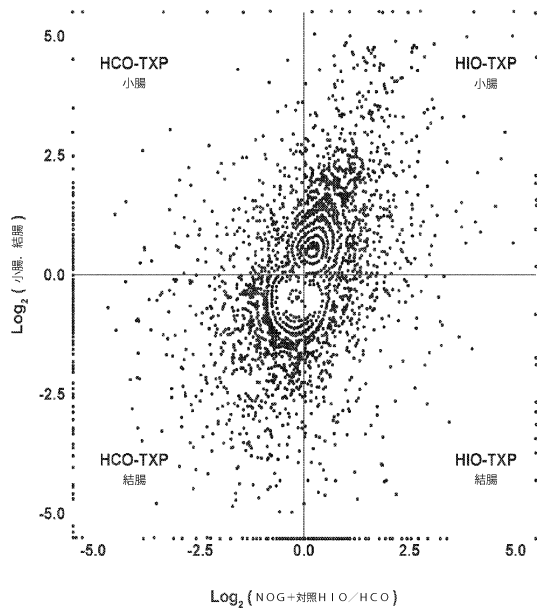
【図 7 A】



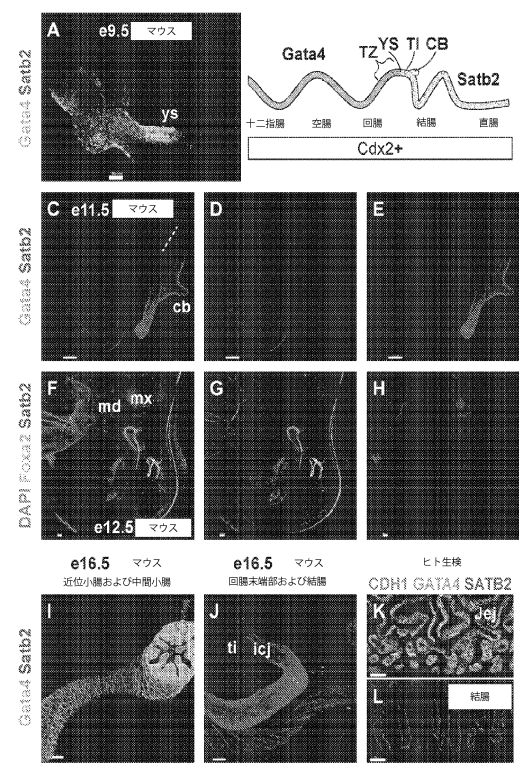
B



【図 7 B】



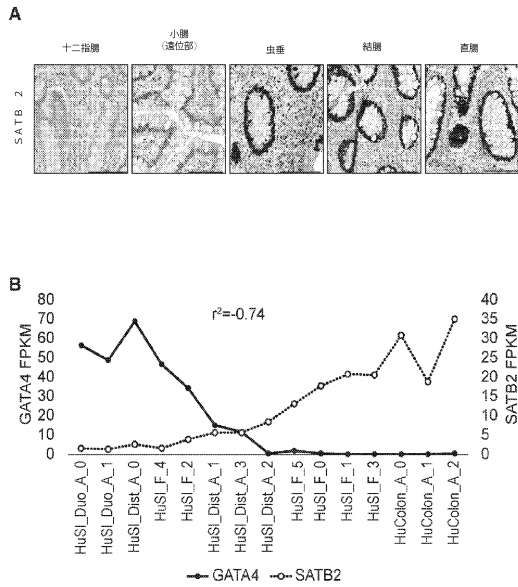
【図 8】



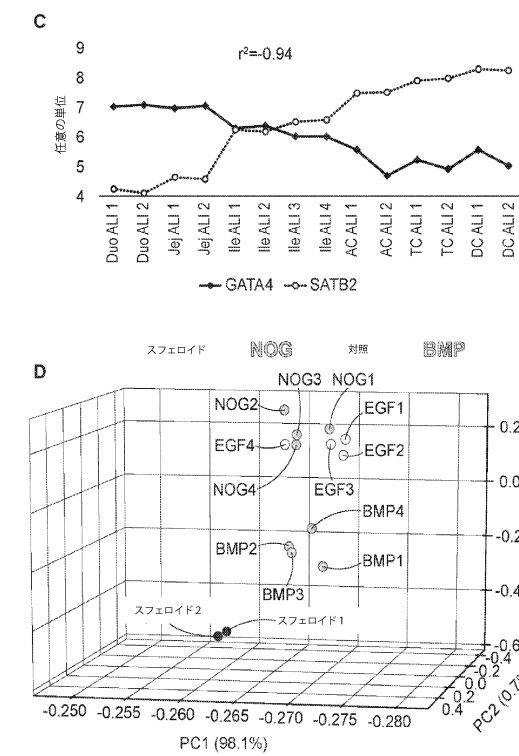
10

20

【図 9 A】



【図 9 B】

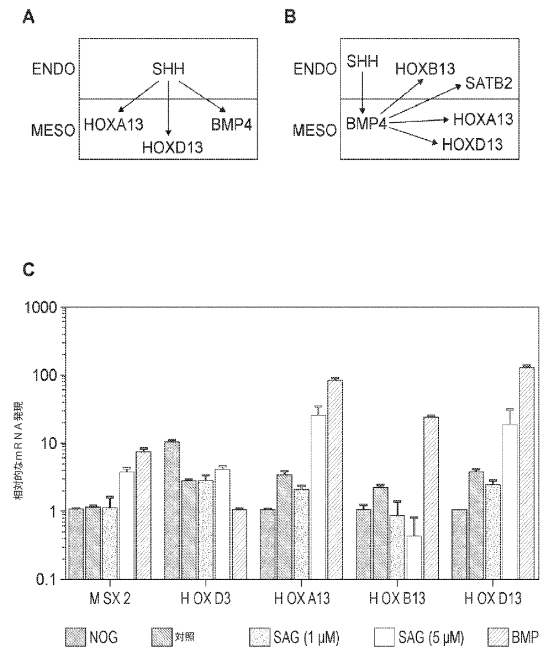


30

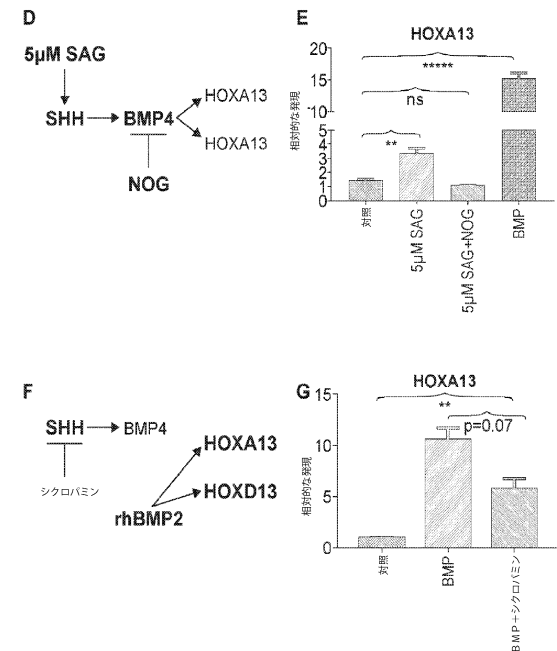
40

50

【図 10 A】



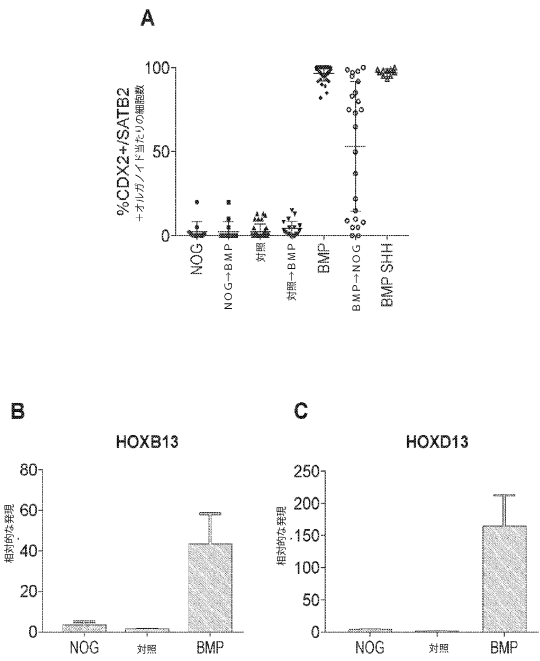
【図 10 B】



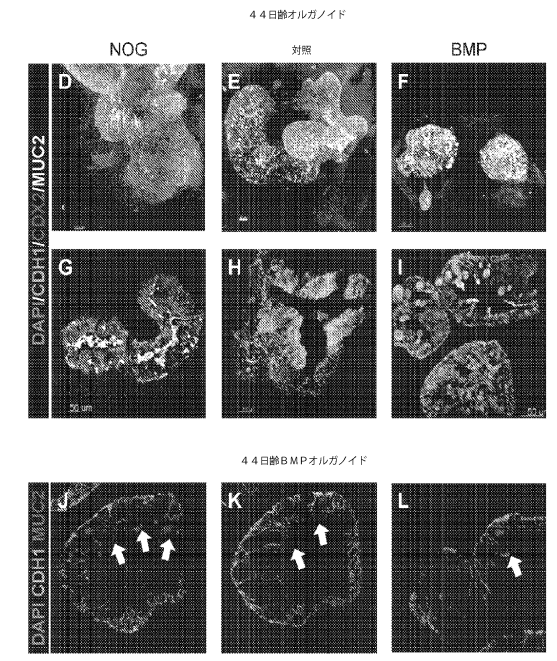
10

20

【図 11 A】



【図 11 B】

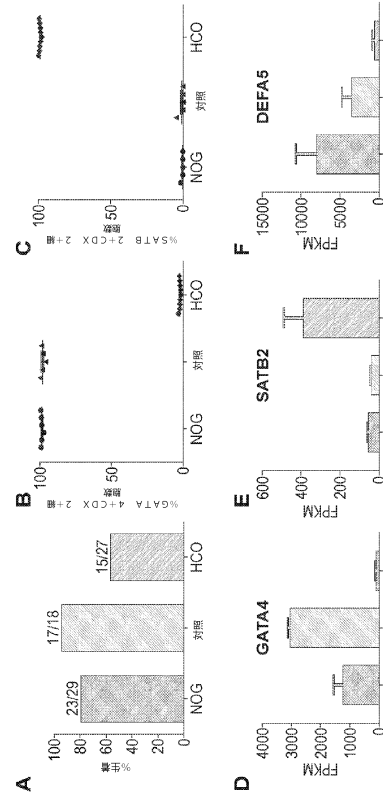


30

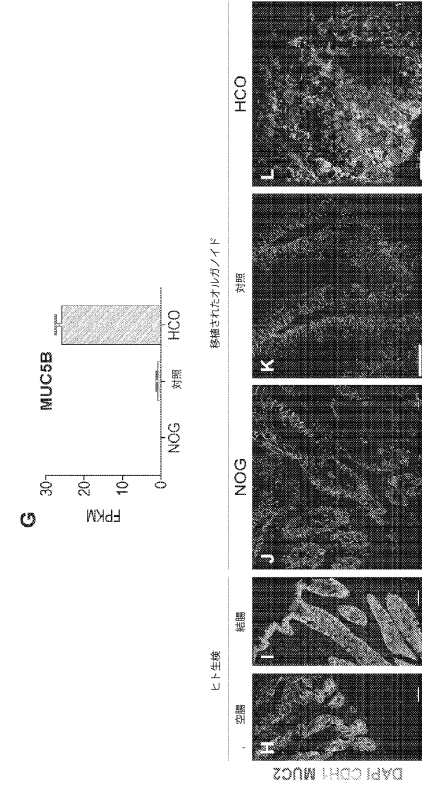
40

50

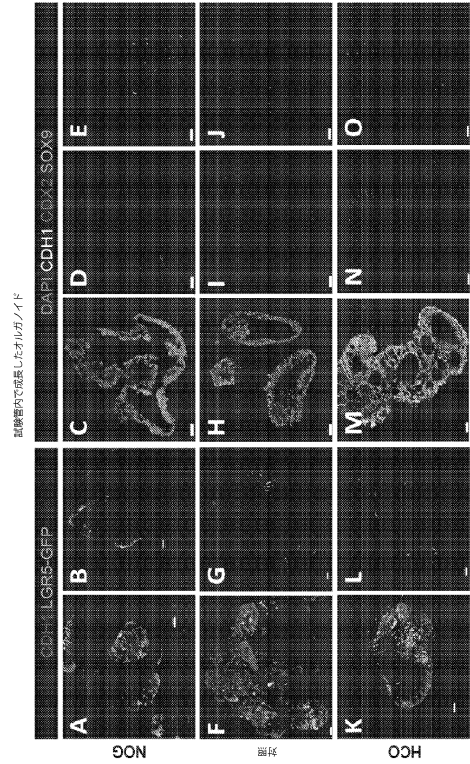
【図 1 2 A】



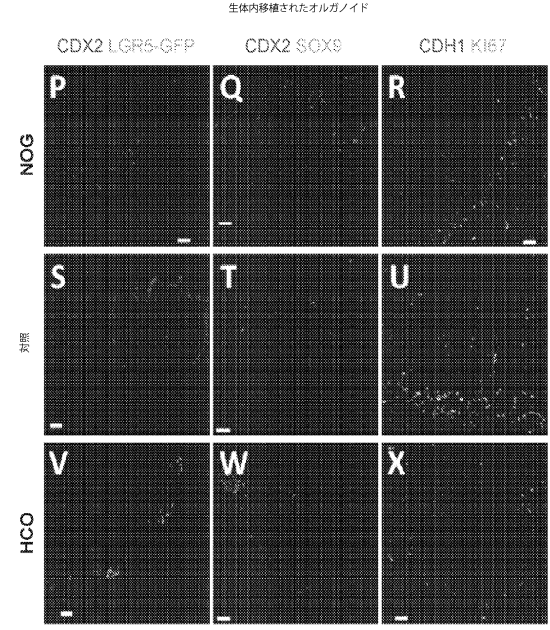
【図 1 2 B】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



10

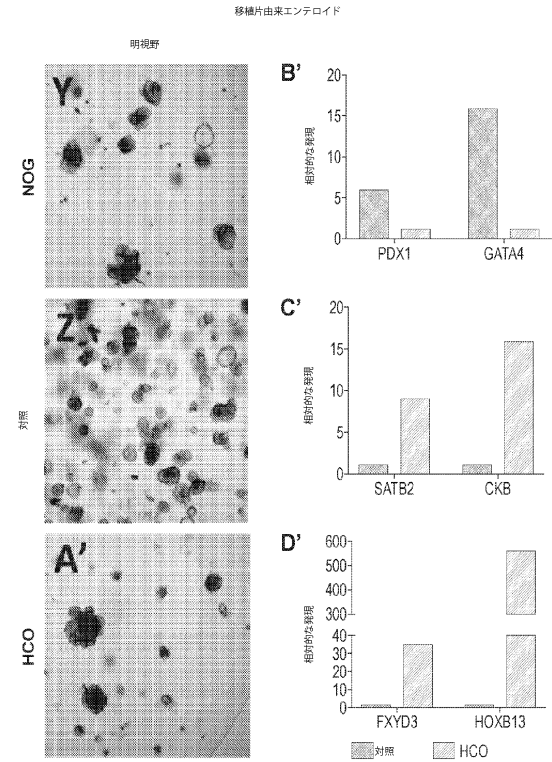
20

30

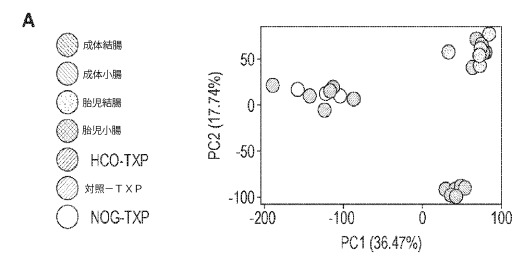
40

50

【図 1 3 C】



【図 1 4 A】



B

TXPのもの対初代組織において上方調節されたもの

カテゴリー	名称	p値
経路	リボソーム	2.20E-57
GO: 細胞成分	リボソームサブユニット	3.20E-55
GO: 細胞成分	リボソーム	2.61E-48
GO: 分子機能	リボソームの構造構成素	5.07E-26
GO: 細胞成分	細胞質リボソーム	1.66E-41
GO: 細胞成分	リボソーム大サブユニット	2.43E-39
GO: 生物学的過程	S R P依存性同時翻訳タンパク質	8.02E-39
	膜へのターゲティング	
GO: 生物学的過程	E Rを標的とするタンパク質	1.14E-36
GO: 細胞成分	ミトコンドリア	7.71E-36
GO: 生物学的過程	膜を標的とする同時翻訳タンパク質	1.57E-35

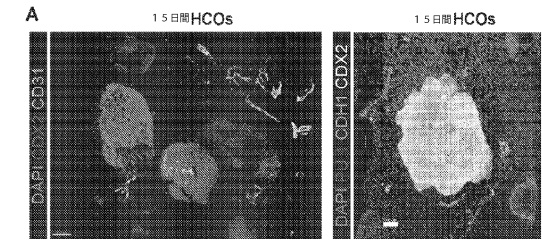
【図 1 4 B】

C

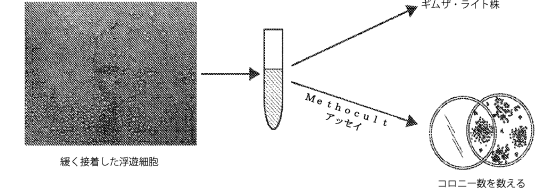
初代組織を上方調節するもの対TXPのものにおけるもの

カテゴリー	名称	p値
GO: 生物学的過程	白血球の活性化	2.26E-22
GO: 生物学的過程	免疫系過程	3.25E-22
GO: 生物学的過程	細胞の活性化	1.46E-21
GO: 生物学的過程	免疫系過程の陽性調節	2.72E-19
GO: 細胞成分	形質膜部分	1.89E-18
GO: 生物学的過程	リンパ球の活性化	3.14E-18
GO: 生物学的過程	白血球の細胞間接着	6.71E-18
GO: 生物学的過程	単一生物の細胞間接着	8.69E-18
GO: 生物学的過程	免疫応答	8.81E-18
GO: 生物学的過程	細胞内シグナル伝達	2.82E-17

【図 1 5 A】



B



10

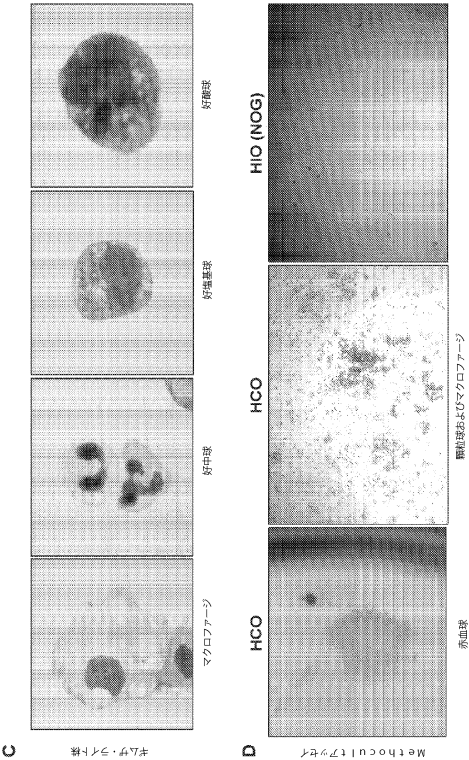
20

30

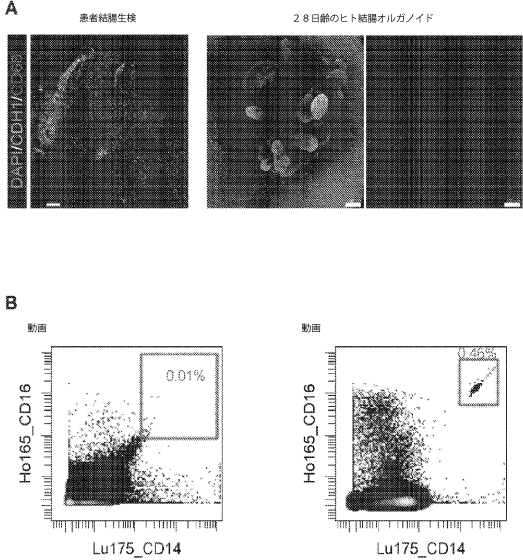
40

50

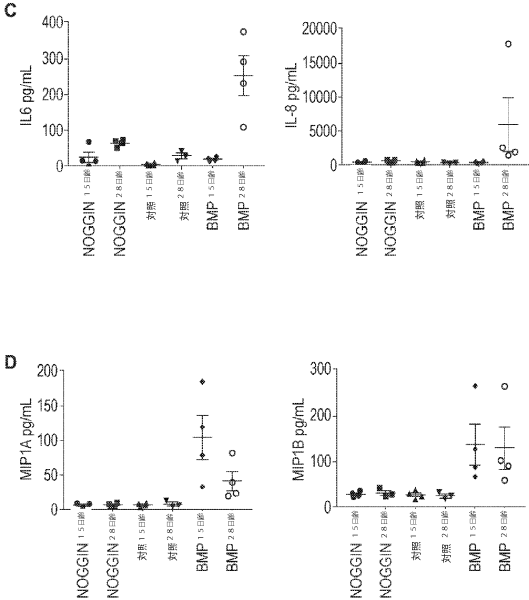
【図 1 5 B】



【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



【配列表】

0007464652000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

トリート、アパートメント 5 ティー

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 特許第 7 0 6 8 3 0 5 (J P , B 2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 2 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)