(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-552425
(P2023-552425A)
(43)公表日　令和5年12月15日(2023.12.15)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071	4B065
A61K	*35/26 (2015.01)*	A61K	35/26	4C081
A61P	*37/02 (2006.01)*	A61P	37/02	4C087
A61L	*27/38 (2006.01)*	A61L	27/38	
		A61L	27/38　300	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全36頁）

(21)出願番号　特願2023-534187(P2023-534187)
(86)(22)出願日　令和3年12月8日(2021.12.8)
(85)翻訳文提出日　令和5年7月27日(2023.7.27)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/053216
(87)国際公開番号　WO2022/123247
(87)国際公開日　令和4年6月16日(2022.6.16)
(31)優先権主張番号　2019503.8
(32)優先日　令和2年12月10日(2020.12.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518151434
ザ フランシス クリック インスティチュート リミティッド
イギリス国 エヌダブリュ１ １エーティー，グレーター ロンドン，ロンドン，ミッドランド ロード １
(74)代理人　110001519
弁理士法人太陽国際特許事務所
(72)発明者　ボンファンティ、パオラ
イギリス国 エヌダブリュ１ １エーティー，グレーター ロンドン，ロンドン，ミッドランド ロード １ ザ フランシス クリック インスティチュート リミティッド 内

Ｆターム（参考）　4B065　AA93X AC20 BA25 BC50
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　胸腺構築物及びその使用

(57)【要約】
本発明は、対象に移植するために適した胸腺構築物の製造方法であって、前記方法は：（ｉ）無細胞の足場を準備する工程と；（ｉｉ）間葉特性を有する胸腺上皮細胞を、前記無細胞の足場に播種する工程と；（ｉｉｉ）前記播種された足場を培養して前記構築物を製造する工程と、を含む方法を提供する。胸腺上皮細胞は、好ましくはＣＤ４９ｆ＋であり、ＶＩＭ＋、ＴＥ－７＋及び／又はＣＤ９０＋であってもよい。本発明は、間葉特性を有する胸腺上皮細胞を用いた医薬組成物、使用及び治療を更に提供する。
【選択図】図４

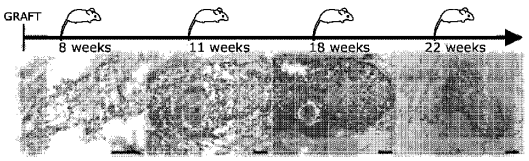


Fig. 4

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象への移植に適した胸腺構築物の製造方法であって、前記方法は：
（ｉ）無細胞の足場を提供する工程と；
（ｉｉ）間葉特性を有する胸腺上皮細胞を、前記無細胞の足場に播種する工程と；
（ｉｉｉ）前記播種された足場を培養して前記構築物を製造する工程と、
を含む方法。
【請求項２】
工程（ｉｉ）は、前記胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）と胸腺間質細胞（ＴＩＣ）との両方を、前記無細胞の足場に播種することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記胸腺上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞（ｍＴＥＣ）、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）、又は、好ましくはｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む、請求項１又は請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、好ましくは４：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～８：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、最も好ましくはおよそ５：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋並びに、好ましくは更にＶＩＭ＋、ＴＥ－７＋及びＣＤ９０＋を含む群の少なくとも１つである、請求項１～請求項４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記無細胞の足場を、胸腺全体又はその部分若しくは葉を脱細胞化することにより製造する、請求項１～請求項６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記胸腺、部分又は葉を、界面活性剤、プロテアーゼ及びヌクレアーゼの群から選択される少なくとも１つの脱細胞化媒体を用いた灌流により脱細胞化する、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
工程（ｉｉｉ）は、前記足場中に及び／又は前記足場上に前記胸腺上皮細胞を注入又は灌流することを含む、請求項１～請求項８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
胸腺の再生において使用するための間葉特性を有する胸腺上皮細胞。
【請求項１１】
胸腺疾患、免疫疾患又は自己免疫疾患の治療において使用するための間葉特性を有する胸腺上皮細胞。
【請求項１２】
間葉特性を有する単離された胸腺上皮細胞、及び薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物。
【請求項１３】
単離された胸腺間質細胞を更に含む、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記胸腺上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞（ｍＴＥＣ）、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）、又は、好ましくはｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む、請求項１２又は請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、

好ましくは４：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～８：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、最も好ましくはおよそ５：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種する、請求項１２～請求項１４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋並びに、好ましくは更にＶＩＭ＋、ＴＥ－７＋及びＣＤ９０＋を含む群の少なくとも１つである、請求項１２～請求項１５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋である、請求項１６に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
請求項１～請求項９のいずれか一項に記載の方法により得られた又は得ることができる胸腺構築物。
【請求項１９】
治療において使用するための請求項１８に記載の胸腺構築物。
【請求項２０】
臓器移植方法であって、前記方法は、請求項１９に記載の胸腺構築物を患者に外科的移植することを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、胸腺構築物、胸腺構築物の製造方法及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
胸腺は、造血前駆細胞が機能性Ｔ細胞になるように指令される一次性リンパ器官である。胸腺は、産後退縮するが、一生を通じてその位置にある。
【０００３】
胸腺ストローマの上皮成分は、内胚葉に由来するが、間葉ストローマは、神経堤及び部分的に輸入血管に由来する。免疫調節におけるこれらの基本的役割を反映して、多くの研究は胸腺上皮細胞（以後「ＴＥＣ」と略す）並びに多種多様な非自己侵襲的な特異性のＴ細胞を選択するために必要であるＡＩＲＥ及びＭＨＣクラスＩＩ（ＭＨＣＩＩ）を含むこれらの活性を媒介する分子の起源及び表現型の複雑さを理解する上での手掛かりとなった。
【０００４】
ＴＥＣの中心的な長年にわたって確立された識別するものは、皮質性（ｃＴＥＣ）または髄質性（ｍＴＥＣ）のいずれかとしてのこれらの割当であり、分化型ＴＥＣが寄与する解剖学的領域を反映する。しかしながら、確定されたＴＥＣ及び他のストローマ細胞型はかなり詳細に研究されたが、ＴＥＣ及び他の細胞が如何にヒト胸腺の複雑な三次元（３Ｄ）組織化に共同で寄与するかについての不完全な分子及び細胞の詳細しかない。
【０００５】
胸腺は、免疫応答能と免疫寛容との両方の発達を制御するので、その機能的解離及び後続する所望の細胞集団との再構築は、原発性又は後天性免疫不全を含む多くの医学的状態に適用可能な強力なツールを提供するかもしれない。事実、満たされていない臨床的ニーズは、多くの有害な合併症を有する無胸腺症患者への移植のために培養された胸腺スライスが現在使用されているほどである。
【０００６】
さらに、胸腺治療ストラテジーは、同様に、寛容性が長期移植組織許容に対する主要な障壁である臓器移植に適用可能であるかもしれない。
【０００７】
完全に機能する胸腺の再構築の企ては、おそらく胸腺の固有の複雑さが原因で、これま

でに限定的な成功しか経験しなかった。さらに、ｅｘ　ｖｉｖｏでの大規模な増殖能を含む生後上皮幹細胞／前駆細胞及び間葉細胞の性質に対して非常に不確実なままである。

【０００８】

したがって、胸腺組織足場を用いて機能性胸腺を構築する手段を提供することは有利であろう。

【０００９】

脱細胞化胸腺からの胸腺組織構築物の製造方法を提供することも有利であろう。

【００１０】

さらに、得られた構築物を、天然ｉｎ　ｖｉｖｏ胸腺に対して表現型的に可能な限りよく適合することを目的に、表現型模写された胸腺細胞を有する胸腺組織デバイスを製造することを可能とするニーズがある。

【００１１】

さらに、無細胞（acellular)の足場の再増殖を可能とする、特に、ＨＳＣの添加を必要としないで使用することができる単一胸腺細胞型を提供することは有利であろう。

【００１２】

したがって、本明細書に開示されているか否かにかかわらず、従来技術の少なくとも１つの問題を克服又は軽減することは、本発明の実施形態の目的である。

【発明の概要】

【００１３】

本発明の第一態様によれば、対象への移植に適した胸腺構築物の製造方法であって、前記方法は：

（ｉ）無細胞の足場を提供する工程と；

（ｉｉ）間葉特性を有する胸腺上皮細胞を、前記無細胞の足場に播種する工程と；

（ｉｉｉ）前記播種された足場を培養して前記構築物を製造する工程と、

を含む方法を提供する。

【００１４】

無細胞の足場は、脱細胞化（decellularized）組織足場又は合成足場であってよい。かかる足場及びこれらの製造方法は、当技術分野において周知である。例えば、国際公開第０２／１４４８０号は、いくつかの足場カテゴリー：（１）非分解性合成高分子；（２）分解性合成高分子；（３）非多孔性である非ヒトコラーゲンゲル；（４）所望の多孔性に加工された非ヒトコラーゲンメッシュ；及び（５）脱細胞化組織を記載している。

【００１５】

無細胞の足場は、通常、細胞も細胞成分も含まない。しかしながら、例えば、足場が生物源、例えば、脱細胞化された足場から使用される場合、下記のように、例えば、脱細胞化後前記足場上にいくつかの細胞が残存するかも知れないことはあり得ると理解されるだろう。

【００１６】

本明細書において１つの実施形態では、前記足場は、人工足場であり、合成高分子であっても天然高分子足場であってもよい。

【００１７】

他の合成足場は、天然、例えば、コラーゲンなどの精製タンパク質から主になるタンパク質性であってよい。非合成足場は、天然のタンパク質性であってもよく、組織由来のコラーゲン細胞外マトリックス（ＥＣＭ）から主になってもよい。

【００１８】

前記足場は、３Ｄ印刷された足場であってよく、前述の物質のいずれかを含んでよい。

【００１９】

好ましくは、前記足場は、脱細胞化（生物）マトリックスであろう。

【００２０】

いくつかの実施形態では、前記足場は、脱細胞胸腺足場を含む。

【００２１】

好ましい実施形態では、前記脱細胞胸腺足場は、脱細胞胸腺足場全体、好ましくは脱細胞化された胸腺全体であり；好ましい実施形態では、得られた構築物は再構築された胸腺である。他の実施形態では、脱細胞胸腺足場は、例えば、葉又は腺などの胸腺の脱細胞部分である。

【００２２】

本発明者らは、驚くべきことに、無細胞の足場に播種及び培養される場合、機能性胸腺を作成するために特定の胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）を使用することが可能であることを見出した。驚くべきことに、ＴＥＣは、胸腺の脱細胞化された細胞外マトリックス（ＥＣＭ）又は他の適切な足場と組み合わせた場合に、長期増殖が可能であり、天然胸腺の解剖学的表現型模写の再構築が可能である上皮－間葉ハイブリッド細胞機能を示す。この解剖学的ヒト胸腺再構築は、ヒト化免疫不全マウスへの移植後、ｉｎ　ｖｉｖｏでの成熟Ｔ細胞の成長を支持するその能力により判断されるように機能的である。

【００２３】

得られた構築物は、人工器官、特に人工胸腺と見做してよい。

【００２４】

無細胞の足場上への播種に適したＴＥＣは、間葉シグネチャー、特性及び／又は機能を示す。「間葉シグネチャー」により、前記ＴＥＣは、間葉細胞、特に胸腺間葉細胞内に存在する１又は複数の発現マーカーを含むと理解され、「間葉特性」及び「間葉機能」により、前記ＴＥＣは、間葉挙動並びに上皮挙動を示し、異なる胸腺細胞型に分化することができるという意味である。

【００２５】

驚くべきことに、上皮機能及び間葉機能の両方を有する、かかる「ハイブリッド」ＴＥＣ集団を、更に他の細胞型を用いた細胞播種を必要としないで、胸腺構築物を作成するために単離及び使用することができる。

【００２６】

いくつかの実施形態では、間葉特性を示すＴＥＣの集団を、工程（ｉｉ）前に単離、精製及び増殖する。単離、精製及び増殖は、当技術分野において通例のいずれかの適切な方法により行ってよい。したがって、前記ＴＥＣは、好ましくはクローン原性ＴＥＣである。

【００２７】

単離及び増殖された細胞集団の使用により、胸腺細胞が単純に消化され、無細胞の足場に適用される、又は胸腺細胞集団の培養前にＴＥＣを単離しない公知の方法と比較して、無細胞の足場のより効果的な再増殖を得る。

【００２８】

いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、髄質性ＴＥＣ（ｍＴＥＣ）、皮質性ＴＥＣ（ｃＴＥＣ）、又は好ましくはｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せ、特にｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの少なくとも１つ、好ましくは両方が間葉発現マーカーを示すｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む。

【００２９】

他の実施形態では、前記ＴＥＣを、ＴＥＣ、特にｍＴＥＣ及びｃＴＥＣに分化するように誘導された人工多能性幹細胞などの前駆細胞又は幹細胞由来であってよい。

【００３０】

いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）を発現する。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ＋並びに、ＣＤ９０＋　ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋からなる群の少なくとも１つである。

【００３１】

好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、実質的に全ＣＤ４９ｆ＋である。特に好ましい実施形態では、ＣＤ４９ｆ＋　ＴＥＣは、ＶＩＭ＋及び任意に（optionally）ＴＥ－７＋でもある。

【００３２】

いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）を発現する。

【００３３】

好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＶＩＭ（ＶＩＭ＋）を発現する。

【００３４】

好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ＋　ＣＤ９０＋　ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋である。

【００３５】

いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、実質的に全ＣＤ９０＋である。いくつかの実施形態では、ＣＤ９０＋　ＴＥＣは、ＶＩＭ及び任意に（optionally）ＴＥ－７も発現する。

【００３６】

予想外に、本発明者らは、間葉マーカーＣＤ４９ｆ及びＣＤ９０（Ｔｈｙ１）も間葉特性を示すｍＴＥＣ及び実質的に全てのｃＴＥＣの大きな集団（＞６０％）により発現され、したがって、かかる選択されたＴＥＣはハイブリッド上皮－間葉表現型を示すことを見出した。

【００３７】

驚くべきことに、ＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）及びＶＩＭ（ＶＩＭ＋）及び／又はＣＤ９０（ＣＤ９０＋）を発現する単離されたｍＴＥＣ及び／又はｃＴＥＣは、継代培養及びｅｘ　ｖｉｖｏで著しく増殖する能力を有することも見出した。したがって、単離された（及び好ましくはクローン原性）ＣＤ４９ｆ＋、ＣＤ９０＋、ＣＤ９０＋　ＣＤ４９ｆ＋、ＣＤ４９ｆ＋　ＶＩＭ＋、及び／又はＣＤ９０＋　ＶＩＭ＋　ＣＤ４９ｆ＋上皮細胞単独をプールし、次いで播種し、脱細胞胸腺足場に再増殖することができ、増殖及び分化して人工胸腺を形成する。多くの他のＴＥＣ集団はかかる特性も機能も示さないので、ＣＤ４９ｆ＋、ＣＤ９０＋、ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋細胞を無細胞の足場に播種し分化して対象への移植用途に適した生存可能な胸腺構築物を作成することができることは特に驚くべきことである。

【００３８】

好ましい実施形態では、工程（ｉｉ）は、胸腺上皮細胞及び胸腺間質細胞（ＴＩＣ）を、無細胞胸腺足場に播種することを含む。胸腺間質細胞（ＴＩＣ）は、間葉細胞、線維芽細胞及び周皮細胞からなる群から選択される１又は複数の細胞型を含んでよく；前述の細胞型のいずれか２つ又は全ての組合せを含んでよい。

【００３９】

無細胞胸腺足場にＴＥＣ及びＴＩＣを一緒に同時播種してよい。

【００４０】

前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、好ましくは４：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～８：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、最も好ましくはおよそ５：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種してよい。

【００４１】

ＴＥＣ単独を無細胞の足場へ播種することは、ＴＥＣが足場の被膜下領域から最内側領域に３Ｄ細胞外マトリックス（ＥＣＭ）構造物に沿って再組織化する構造物を生成する一方、ＴＥＣは足場の３Ｄ（ＥＣＭ）により支持され、胸腺上皮細胞及び胸腺間質細胞の両方を含む再構築された足場は、より機能的微小環境を確立してｉｎ　ｖｉｔｒｏでのリンパ球前駆細胞及びｉｎ　ｖｉｖｏでの造血幹細胞（ＨＳＣ）からヒトＴ細胞の成長を支持する。ＴＥＣ又はＴＥＣ及びＴＩＣの播種により製造された胸腺構築物は、別々の間葉細胞播種も他の幹細胞処理若しくは前駆細胞処理も必要としない。

【００４２】

他の実施形態では、前記ＴＥＣを、非胸腺間葉細胞と共に播種してよい。

【００４３】

前記ＴＥＣ及びＴＩＣは、ヒトＴＥＣ及びＴＩＣであってよい。ヒトＴＥＣ及びＴＩＣを、工程（ｉｉ）前に生ヒトドナーから得てもよく、屍体から得てもよい。

【００４４】

実施形態において、無細胞の足場が脱細胞胸腺又はその一部である場合、前記胸腺又はその一部は、生ヒトドナー又は屍体から得られるヒト胸腺又はその一部であってよい。

【００４５】

したがって、増殖されたストローマ細胞のみを含む機能性胸腺の構築に対する障壁を克服することにより、本発明は、現在の治療が限定的である先天性無胸腺症を含む免疫疾患を治療するための実践的見通しを提供すると考えられる。

【００４６】

本発明の製造方法及びしたがって胸腺構築物の作成を、総じて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行う。しかしながら、更なる細胞増殖及び／又は分化並びに構築物の作成は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの移植後に行うことができると理解されるだろう。したがって、好ましくは、対象に移植を上手く行うために充分に分化されるＴＥＣを用いて充分に増殖される構築物を作成するまで、構築物の製造をｉｎ　ｖｉｔｒｏで行う。

【００４７】

それから、前記足場中及び／又は足場上での更なる細胞増殖を、例えば、移植後に続いて行うことができる。したがって、前記足場が対象への移植に有用である播種された細胞で完全に増殖される必要はない、ということが分かる。例えば、前記足場は、播種された細胞が存在しない領域を有する、例えば、前記足場は、その面の少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％又は少なくとも９９％にわたって播種された細胞を有し得ることは可能である。

【００４８】

本方法で使用される細胞は、通常、自己（autologous）であり、すなわち、本発明の方法により作成された組織又は器官構築物の目的のレシピエントを起源とするか又はこのレシピエント由来であろう。しかしながら、方法において使用するための細胞はまた、同種異形であり、すなわち、作成しようとする組織又は器官構築物のレシピエントでない対象から得る又は由来である可能性がある。更に、異種細胞、すなわち、細胞は、組織／器官構築物のレシピエントと異なる種由来の細胞を使用してもよい。前記細胞を、多能性幹細胞又は人工多能性幹細胞から製造してもよい。

【００４９】

好ましくは、ＴＥＣ（存在する場合、及びＴＩＣ）の播種を、前記足場への注入又は前記足場の脈管構造による灌流により行う。多段階で注入を行ってよい。胸腺足場全体を利用する場合、注入を、胸腺足場の一部（例えば、１又は複数の葉）への注入により行ってもよく、胸腺足場上の複数の部位への注入により行ってもよい。前記細胞を、別々に、同時に又は順次送達し得る。順次送達は、互いに少なくとも１分、２分、５分、１０分、２０分、３０分、４０分、５０分若しくは６０分以内、又は互いに１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１４時間、３６時間若しくは４８時間以内に細胞集団を送達することを含み得る。

【００５０】

ＴＥＣ又はＴＥＣ及びＴＩＣを、葉当たり１μｌ～１０００μｌの媒体当たりおよそ１Ｍ～１０Ｍ、１Ｍ～８Ｍ、２Ｍ～６Ｍ又は２Ｍ～３Ｍ細胞で脱細胞胸腺足場の各葉中及び／又は各葉上に注入してよい。

【００５１】

播種された足場を、前記足場の網状ＥＣＭの至る所の細胞遊走及び少なくとも１日、２日、３日又は少なくとも４日、及び２１日、１４日、１２日、１０日、９日、８日又は７日まで、好ましくはおよそ４日～７日の期間を通して初期分化を可能とするように、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで通常維持する。後で、幹細胞及び／又は造血細胞などのドナー細胞を、好ましくは注入により、前記構築物中又は前記構築物上に送達してよい。

【００５２】

脱細胞ＥＣＭ足場又は播種されたＥＣＭ足場を、前記足場への細胞の接着及び／又は前記足場上の細胞の成育を増強するようにさらに処理してよい。かかる処理としては、例えば、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、又はプロテオグリカンのうち１又は複数を含む増殖因子又は細胞外マトリックスタンパク質などのタンパク質の適用を挙げることができる。

【００５３】

いくつかの実施形態では、工程（ｉｉ）は、ＴＥＣ細胞及び任意に（optional）ＴＩＣ細胞に加えて、他の胸腺細胞の播種を含んでよい。他の適切な胸腺細胞としては、胸腺内皮細胞、線維芽細胞、及び樹状細胞などの造血ストローマ細胞が挙げられる。

【００５４】

「無細胞（acellular）」足場は、通常、細胞も細胞成分も含まない。しかしながら、例えば、足場が生物源、例えば、脱細胞化された足場から使用される場合、下記のように、例えば、脱細胞化後前記足場上にいくつかの細胞が残存するかも知れないことはあり得ると理解されるだろう。

【００５５】

いくつかの実施形態では、無細胞の足場は、脱細胞化された足場、好ましくは脱細胞化された胸腺組織、より好ましくは脱細胞化された胸腺全体又はその葉を含む。

【００５６】

１つの実施形態では、新生児ヒトドナー胸腺足場を使用してよい。別の実施形態では、前記足場は、ヒト屍体由来であってよい。更に別の実施形態では、前記足場は、生患者由来であってよい。

【００５７】

前記足場は異種であってよい、すなわち、レシピエント、例えば、ヒトレシピエントと異なる種のドナーを起源とするか又はこのドナー由来である。

【００５８】

この関連で、脱細胞化に適した足場としては、とりわけ、脱細胞化動物由来足場、例えば、ブタ由来、ラット由来又はウサギ由来足場が挙げられる。例えば、好ましい実施形態では、前記足場は、脱細胞化ラット胸腺、ブタ胸腺、ヒツジ胸腺又はウサギ胸腺であってよく、より好ましくはブタ胸腺である。

【００５９】

いずれかの適切な公知の脱細胞化方法を使用して前記足場を得てもよい。総じて、脱細胞化方法は、通常ＥＣＭ足場を残す細胞及び細胞成分の除去を促進するために、前記細胞成分を崩壊、分解、及び／若しくは破壊する並びに／又は前記細胞が埋め込まれたマトリックスを改質するための様々な化学的手段、生化学的手段、及び／又は物理的手段を使用する。国際公開第０２／１４４８０号は、天然組織の脱細胞化方法を記載している。本発明は、ＥＣＭを実質的にインタクトのままにしながら実質的に全ての細胞を除去するいずれかの脱細胞化技術により製造された脱細胞化された足場の使用を包含する。「ＥＣＭを実質的にインタクトのままにする」と言うのは、マトリックス、例えば、ＥＣＭの少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％、９９％又は実質的に１００％の存在を保持することを表す。

【００６０】

１つの実施形態では、胸腺足場の脱細胞化を、少なくとも１つの脱細胞化媒体を用いて組織を灌流することにより行う。

【００６１】

適切な脱細胞化媒体としては、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、デオキシコール酸ナトリウム（ＳＯＣ）、トリトンＸ－１００（ＲＴＭ）などの親水性ポリオキシエチレンオキシド及び疎水性炭化水素部分を含む界面活性剤などの界面活性剤；タンパク質分解酵素、例えば、トリプシンなどの酵素；並びにヌクレアーゼ、例えば、ＤＮアーゼＩなどのデオキシリボヌクレアーゼ及びＲＮアーゼなどのリボヌクレアーゼ、及びこれらの組合せが挙げられる。トリスブチル－ｎ－ホスフェート（ＴＢｎＰ）を、１又は複数の脱細胞化

媒体に含まれていてもよい。ＴＢｎＰは、タンパク質－タンパク質相互作用を崩壊する溶媒である。

【００６２】

前記方法は、好ましくは、１つより多い脱細胞化媒体を用いて組織を灌流することを含む。適切には、前記方法は、少なくとも１つの界面活性剤及び少なくとも１つのヌクレアーゼを用いて組織を灌流することを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、界面活性剤を用いた組織の灌流及びヌクレアーゼを用いた組織の灌流の別々の工程を含み、前記界面活性剤灌流工程をヌクレアーゼ灌流工程の前に行ってよい。灌流及び脱細胞化後、脱細胞胸腺足場を、ガンマ放射線で放射してよく；及び更に使用するまで１℃～４℃で貯蔵してよい。

【００６３】

各灌流工程を、１５℃～４５℃、又は２０℃～４０℃の温度で行ってよい。灌流工程が酵素灌流工程を含む場合、灌流工程をおよそ３７℃で行ってよく、これは、灌流工程がヌクレアーゼ物質を含む場合に特に有利である。灌流工程が界面活性剤灌流工程である場合、灌流工程を、およそ環境温度又は室温など、１５℃～４０℃の温度で行ってよい。

【００６４】

他の実施形態では、脱細胞化は、胸腺組織又は胸腺を浸透圧ショック処理に付すことを含んでよい。

【００６５】

本発明の第二態様によれば、治療において使用するための単離された胸腺上皮細胞を提供する。

【００６６】

胸腺上皮細胞は、人工胸腺の構築において使用するため又は損傷された胸腺組織の修復において使用するための胸腺足場への播種において使用するためであってよい。

【００６７】

いくつかの実施形態では、胸腺の再生において使用するために組み合わせられた胸腺上皮細胞及び胸腺間質細胞を提供する。

【００６８】

本発明の第三態様によれば、胸腺疾患、免疫疾患若しくは自己免疫疾患又は胸腺の先天性欠損の治療において使用するための単離された胸腺上皮細胞を提供する。

【００６９】

本発明の第四態様によれば、単離された胸腺上皮細胞及び薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【００７０】

本発明の第二、第三及び第四態様の胸腺上皮細胞は、本発明の第一態様について本明細書に記載されている通りであってよく、特に、間葉、並びに上皮シグネチャー、特性及び／又は機能を示すＴＥＣであってよく、並びにＣＤ４９ｆ、若しくはＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋、ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋からなる群の少なくとも１つであってよい。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）を発現する。好ましい実施形態では、ＣＤ４９ｆ＋　ＴＥＣは、ＶＩＭ＋及び任意に（optionally）ＴＥ－７＋でもある。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）を発現する。好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＶＩＭ（ＶＩＭ＋）を発現する。好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ＋　ＣＤ９０＋　ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋である。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、実質的に全ＣＤ９０＋である。いくつかの実施形態では、ＣＤ９０＋　ＴＥＣは、ＶＩＭ及び任意に（optionally）ＴＥ－７も発現する。

【００７１】

いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、髄質性ＴＥＣ（ｍＴＥＣ）、皮質性ＴＥＣ（ｃＴＥＣ）、又は好ましくはｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せ、特にｍＴＥＣ及びｃＴＥＣ

の少なくとも１つ、好ましくは両方が間葉発現マーカーを含むｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む。

【００７２】

他の実施形態では、前記ＴＥＣを、ＴＥＣ、特にｍＴＥＣ及びｃＴＥＣに分化するように誘導された人工多能性幹細胞などの幹細胞由来であってよい。

【００７３】

前記ＴＥＣは、好ましくは、単離されたｍＴＥＣ及び単離されたｃＴＥＣの混合物、好ましくは単離、精製及び増殖されたｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの混合物である。

【００７４】

前記医薬組成物は、単離された胸腺間質細胞（ＴＩＣ）を更に含んでよい。

【００７５】

前記医薬組成物は、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、好ましくは４：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～８：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、最も好ましくはおよそ５：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比でＴＥＣ及びＴＩＣを含んでよい。

【００７６】

いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ＋、又はＣＤ４９ｆ＋並びにＣＤ９０＋、ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋からなる群の少なくとも１つである。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）を発現する。好ましい実施形態では、ＣＤ４９ｆ＋　ＴＥＣは、ＶＩＭ＋及び任意に（optionally）ＴＥ－７＋でもある。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）を発現する。好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ（ＣＤ４９ｆ＋）、ＣＤ９０（ＣＤ９０＋）及びＶＩＭ（ＶＩＭ＋）を発現する。好ましい実施形態では、前記ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ＋、ＣＤ９０＋、ＶＩＭ＋及びＴＥ－７＋である。いくつかの実施形態では、前記ＴＥＣは、実質的に全ＣＤ９０＋である。いくつかの実施形態では、ＣＤ９０＋　ＴＥＣは、ＶＩＭ及び任意に（optionally）ＴＥ－７も発現する。いくつかの実施形態では、医薬組成物中の全てのＴＥＣは、少なくともＣＤ４９ｆ＋を発現し、並びに医薬組成物中の実質的に全てのＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ＋及び／又はＣＤ９０＋胸腺上皮細胞及び薬剤的に許容可能な担体を含んでよい。

【００７７】

本発明の第四態様の医薬組成物は、胸腺の再生において使用するため又は胸腺疾患、免疫疾患若しくは自己免疫疾患の治療において使用するためであってよい。

【００７８】

本発明の第五態様によれば、本発明の第一態様の方法により得られた又は得ることができる胸腺構築物を提供する。前記胸腺構築物は、人工胸腺であってよい。前記胸腺構築物は、治療において使用するためであってよく；及び、例えば、損傷された又は欠損している胸腺患者などの胸腺構築物移植片を必要としている対象の移植において使用するためであってよい。

【００７９】

本発明の第六態様によれば、本発明の第五態様について上記定義されているように前記対象に胸腺構築物を移植することを含むかかる治療を必要としている対象の胸腺、免疫不全又は自己免疫疾患又は欠損の治療方法を提供する。前記疾患は、無胸腺症であり得る。

【００８０】

好ましくは、前記対象は、哺乳類、より好ましくはヒトである。

【００８１】

したがって、本発明の全ての態様では、長期増殖上皮細胞は、今までに前例のハイブリッド上皮－間葉表現型を示す。これらの細胞は、胸腺の固有の３Ｄ上皮ネットワークを表現型模写する器官足場全体を再増殖してよい。かかる再構築された足場は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのリンパ球前駆細胞及びｉｎ　ｖｉｖｏでの造血幹細胞（ＨＳＣ）からヒトＴ細胞の成長を支持する機能的微小環境を確立することが分かった。

【００８２】

単離された細胞、構築物及び人工器官は、治療において使用するためであってよく、及び前記構築物、人工器官又は細胞を患者に移植することを含む外科手術方法において使用してよい。

【００８３】

本発明の第七態様によれば、胸腺の脱細胞化方法であって、前記方法は：

ａ．胸腺又はその部分若しくは葉を提供することと；

ｂ．前記胸腺又はその部分若しくは葉に入る全てだが１つの動脈を塞ぐことと；

ｃ．残りの動脈を通って前記胸腺又は部分若しくは葉へ入る脱細胞化媒体を灌流することと、

を含む方法を提供する。

【００８４】

いくつかの実施形態では、頚動脈を開いたままにする。好ましい実施形態では、左頚動脈を開いたままにする。

【００８５】

好ましい実施形態では、胸腺又はその部分若しくは葉の動脈を次の順：右総頚動脈、右鎖骨下動脈、右内胸動脈、右肋頚動脈、右大動脈弓、左大動脈弓、左肋頚動脈の順で閉じ、左内胸動脈及び左頚動脈を、その後の器官のカニューレ挿入及び灌流のために開いたままにする。

【図面の簡単な説明】

【００８６】

本発明をより明白に理解できるようにする目的で、ほんの一例として、その実施形態を、添付の図を参照して次に説明する。

【００８７】

【図１Ａ】図１Ａ、図１Ｂ及び図１Ｃは、胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）及び間葉細胞（ＴＭＣ）の単離の結果を例示する。（Ａ）それぞれ、濃縮されたＥｐＣＡＭ^{高} ｍＴＥＣ、ＥｐＣＡＭ^{低} ｃＴＥＣ及びＥｐＣＡＭ$^{－}$ ＴＩＣにおけるＣＤ９０発現を示すＦＡＣＳプロット。ゲーティングは、各チャネルについて陰性未染色コントロールで決定した。１ｂと同じ胸腺。

【図１Ｂ】図１Ａ、図１Ｂ及び図１Ｃは、胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）及び間葉細胞（ＴＭＣ）の単離の結果を例示する。（Ｂ）ＣＤ４９ｆ$^{＋}$（タイプ１）及びＣＤ４９ｆ$^{－}$（タイプ２）集団を示すＣＤ４９ｆ及びＣＤ９０についての代表的ＦＡＣＳ分析。１Ａと同じ胸腺。

【図１Ｃ】図１Ａ、図１Ｂ及び図１Ｃは、胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）及び間葉細胞（ＴＭＣ）の単離の結果を例示する。（Ｃ）１２日間培養された、選別されたｃＴＥＣ及びｍＴＥＣサブタイプのローダミン染色指示薬皿（４０００イベント／皿）、コロニー形成効率（ＣＦＥ）。ｍＴＥＣ^{タイプ１}は最大クローン原性集団（２％～４％）であり、ｃＴＥＣ^{タイプ１}（１％～２％）は皮質のクローン原性集団である（ｎ＝４）。

【図２】図２ａ～図２ｉは、器官胸腺全体の灌流及び脱細胞化の結果を例示する。（ａ）脱細胞化前（上側パネル）及び脱細胞化後（下側パネル）のカニューレ挿入されたラット胸腺の肉眼所見。２４Ｇカニューレを、頚動脈に挿入し、界面活性剤及び酵素溶液を用いて器官を灌流するために使用する。アスタリスク（＊）は、大血管による胸腺組織及びカニューレ間の連結を可能とした外部胸腺組織を示す（ｎ＝１２０）。スケールバー、２ｍｍ。（ｂ）動脈に入る外部胸腺組織、大血管及び２４Ｇカニューレを示すカニューレ挿入されたラット胸腺のマイクロＣＴ画像。ヨード造影剤は、皮質（Ｃ、明部）及び髄質性（Ｍ）領域間の明白な分界を示し；血管（＊）は、実質間及び実質内側の非常に明るい領域により表される（ｎ＝３）。スケールバー、１．５ｍｍ。（ｃ）ヨード造影剤が脈管構造の樹を示す、カニューレ挿入されたラット胸腺全体のマイクロＣＴ ３Ｄ画像（赤色部分、ｎ＝２）。スケールバー、１．２ｍｍ。（ｄ）赤ケラチン、青コラーゲン及びピンク色細胞質における新鮮なラット胸腺葉染色のマッソン三色染色。Ｃ、皮質；Ｍ、髄質性（ｎ＝３胸腺）。スケールバー、２５０μｍ。（ｅ）新鮮なラット胸腺のヘマトキシリン＆エ

オシン（Ｈ＆Ｅ）染色。Ｃ、皮質；Ｍ、髄質性（ｎ＝３胸腺）。スケールバー、５００μｍ。（ｆ）全２葉を３Ｄで示すカニューレ挿入されたラット胸腺のマイクロＣＴ画像。スケールバー、１．２ｍｍ。（ｇ）Ｍｉｃｒｏｆｉｌ（登録商標）を注入され、両胸腺葉の灌流を示すために閾値処理されたカニューレ挿入されたラット胸腺のマイクロＣＴ画像。スケールバー、１．２ｍｍ。（ｈ）コラーゲン線維（青色）並びにケラチン、筋肉線維及び細胞質の非存在を示す脱細胞化されたラット胸腺足場のパラフィン切片のマッソン三色染色（ｎ＝３足場）。スケールバー、２５０μｍ。（ｉ）インタクト胸腺小葉ＥＣＭ並びに大脈管構造壁及び小脈管構造壁の両方の保存を示す脱細胞化された胸腺足場のＨ＆Ｅ（ｎ＝４足場）。スケールバー、５００μｍ。

【図３Ａ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ａ）ストローマ細胞の注入前（左パネル）、注入直後（中央パネル）及び培養４日後（右パネル）の胸腺足場を代表する肉眼顕微鏡観察。空からの胸腺葉は、密度を連続的増加し、足場の収縮により示されるように再モデル化し、組織体積を増加する（ｎ＝６０再増殖足場）。スケールバー、４ｍｍ。

【図３Ｂ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｂ）ＣＫ５／１４$^{+}$、ＴＰＲ６３$^{+}$及びＣＤ４９ｆ$^{+}$　ＴＥＣの存在を示す脱細胞化された足場内で増殖された胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）の免疫蛍光標識。核をＤＡＰＩで染色する（ｎ＝４再増殖足場）。スケールバー、３０μｍ。（Ｃ）Ｈ＆Ｅ染色は、ＴＥＣのみを用いた再増殖され、５日間培養された足場の組織像を示す（ｎ＝４再増殖足場）。スケールバー、５０μｍ。

【図３Ｃ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｃ）Ｈ＆Ｅ染色は、ＴＥＣのみを用いた再増殖され、５日間培養された足場の組織像を示す（ｎ＝４再増殖足場）。スケールバー、５０μｍ。

【図３Ｄ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｄ）増殖されたクローン原性ＴＥＣ及び胸腺間質細胞（ＴＩＣ）の両方を用いて再増殖され、固定及び組織分析前に５日間培養された足場のヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色。ストローマ細胞は、早期（妊娠後９週、ｗｐｃ）ヒト胎児胸腺において観察されたもの（Ｅ）と同様なパターンを有する足場に沿って再組織化する（ｎ＝４再増殖足場及びｎ＝２ヒト胎児胸腺）。スケールバー、１００μｍ。

【図３Ｅ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｄ）増殖されたクローン原性ＴＥＣ及び胸腺間質細胞（ＴＩＣ）の両方を用いて再増殖され、固定及び組織分析前に５日間培養された足場のヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色。ストローマ細胞は、早期（妊娠後９週、ｗｐｃ）ヒト胎児胸腺において観察されたもの（Ｅ）と同様なパターンを有する足場に沿って再組織化する（ｎ＝４再増殖足場及びｎ＝２ヒト胎児胸腺）。スケールバー、１００μｍ。

【図３Ｆ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｆ）ＣＫ８$^{+}$細胞は内側領域に優位に局在し；ＴＰＲ６３$^{+}$　ＴＥＣは主にＣＤ４９ｆ$^{+}$であった一方で、ＴＩＣと共に播種され、嚢下領域に局在するＣＫ５／１４$^{+}$細胞を示す脱細胞化された足場内で増殖されたＴＥＣの免疫蛍光標識。核をＤＡＰＩで染色する（ｎ＝４再増殖足場）。スケールバー、１００μｍ。

【図３Ｇ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｇ）培養７日後ＴＥＣ、ＴＩＣ及び造血前駆細胞を用いて再増殖された足場のＨ＆Ｅ染色（ｎ＝４再増殖足場）。スケールバー、１００μｍ。

【図３Ｈ】図３Ａ～図３Ｈは、器官全体の胸腺足場の機能的再増殖の結果を例示する。（Ｈ）三重陰性（ＴＮ、ＣＤ３$^{-}$ＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$）前駆細胞を用いて播種され、８日間同時培養された再増殖された足場から単離されたＣＤ４５陽性集団の代表的ＦＡＣＳ分析（３独立実験におけるｎ＝６再増殖足場）。ＦＳＣ－Ａ、ＳＳＣ－Ａプロットは、細胞並びに造血細胞の遊離のための分離中の足場ＥＣＭ由来のデブリスの存在を示す（左上パネル）。生存可能な細胞は、全細胞の約９０％であった（中央上パネル）。足場内で発達されたＴＮは、二重陽性（ＤＰ）及び一重陽性（ＳＰ）ＣＤ４及びＣＤ８発現細胞を生じた（

右上パネル、５，０００細胞）。生細胞は、ＣＤ１ａに対して陽性であり、ＣＤ３３に対して陰性であった（右下パネル）。ＣＤ４及びＣＤ８は、ＣＤ３に対して陽性であり、ＴＣＲαβを発現する（下中央左パネル）。

【図４】図４は、ｉｎ　ｖｉｖｏで成熟する再増殖胸腺足場を例示し、マウスにおける移植後の異なる時点（８ｗｐｔ、１１ｗｐｔ、１８ｗｐｔ及び２２ｗｐｔ）において回収された胸腺足場の組織切片のＨ＆Ｅ染色の形態で、機能的Ｔ細胞の成長を促進する。（＊）は、ハッサル小体（ＨＢ）を示す；３独立実験においてｎ＝１８足場）。スケールバー、１００μｍ。

【発明を実施するための形態】

【００８８】

方法

動物

全動物手順は、倫理的承認及び英国内務省プロジェクトライセンス（ＰＰＬ）に従った。（ＮＳＧ）及びＮＯＤ．Ｃｇ　Ｆｏｘｎ１^{ｅｍ１Ｄｖｓ}．Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}．Ｉｌ２Ｒγｃ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}（ＮＳＧ－Ｎｕｄｅ、ストックＮｏ：０２６２６３）を、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手した。マウスを、１２時間明暗サイクル、環境温度１９℃／２２℃、及び湿度４５％／６５％で維持した。スプラーグドーリーラットを飼育施設で飼育した。

【００８９】

ヒト組織

生後胸腺は、Ｇｒｅａｔ　Ｏｒｍｏｎｄ　Ｓｔｒｅｅｔ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ（英国ロンドン）において心胸郭手術を経験している患者（年齢範囲３日齢～１１歳）より提供された。

【００９０】

臨床胸腺スライス調製及び培養

嚢除去後、８ｇ～１５ｇの生後胸腺組織を、１ｍｍ厚のスライスを得るために、Ｓｔａｄｉｅ－Ｒｉｇｇｓミクロトーム（Ｔｈｏｍａｓ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて処理した。スライスを個別にニトロセルロースフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に取り付け、その後、Ｓｐｏｎｇｏｓｔａｎ外科スポンジ（Ｆｅｒｒｏｓａｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）上に置き、２１日まで１０ｃｍペトリ皿中の培養培地（Ｆ１２（Ｇｉｂｃｏ）、１０％熱不活性化ウシ胎仔血清（Ｇｉｂｃｏ）及び１％Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ（Ｓｉｇｍａ））中に浸し；培養培地を毎日交換した。

【００９１】

ＣＤ３４$^{＋}$　ＨＳＣ精製及び選別

２～５ＣＢコレクションの単核細胞（ＭＮＣ）をプールし、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ密度遠心分離（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、英国バッキンガムシャー）により精製し、次いで塩化アンモニウム赤血球破壊した。密度分離されたＣＢ　ＭＮＣを、製造者説明書に従ってＥａｓｙＳｅｐヒトＣＤ３４陽性選択キット（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によりＣＤ３４陽性について磁気的に選別し；あるいは、これらを、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）により選別した。胎児肝臓（ＦＬ）ＣＤ３４$^{＋}$を、受胎後１２週～２０週（ｗｐｃ）の範囲のヒト胎児組織から単離した。酵素溶液（ＲＰＭＩ中、０．１Ｕ／ｍＬコラゲナーゼＡ（Ｒｏｃｈｅ）、０．８Ｕ／ｍＬディスパーゼＩＩ（Ｒｏｃｈｅ）及び１００μｇ／ｍｌ　ＤＮアーゼＩ（Ｒｏｃｈｅ）、２％ＦＢＳ及び１％ペニシリン／ストレプトマイシン）を用いて３７℃において組織消化を行った。細胞をペレット化し、塩化アンモニウム赤血球破壊のため処理した。ＦＬ　ＭＮＣを、ＣＤ３４陽性について磁気的に選別した。

【００９２】

胸腺細胞単離及び選別

ヒト胸腺細胞を、生後胸腺の機械的組織分離により得た。三重陰性（ＴＮ、ＣＤ３$^{－}$ＣＤ４$^{－}$ＣＤ８$^{－}$）細胞の濃縮を、ビオチン化抗ＣＤ３、抗ＣＤ４、抗ＣＤ８ａ及び抗ＣＤ

２３５ａｂ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）及びＭａｇｎｉｓｏｒｔ　ＳＡＶ陰性ビーズ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いた磁気選別により行った。陰性選択フラクションを、ＦＡＣＳ純度選別について処理した（ＣＤ１１ｃ－ＣＤ１９－ＣＤ５６－ＣＤ３－ＣＤ４－ＣＤ８－細胞；ＦＡＣＳＡｒｉａ　ＩＩＩ装置、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ；ＦＡＣＳＤｉｖａ　８．０．１ソフトウェア）。

【００９３】

胸腺ストローマ細胞の単離及び培養

ヒト胸腺を、開胸心臓手術を経験した３日齢～１１歳の年齢範囲の３３患者から入手した。ドナーの年齢とは関係なく全胸腺は、毎週の継代により大規模に増殖することができるコロニーを生成するクローン原性ＴＥＣを含んだ。胸腺組織断片を、３７℃において約３０分～４５分間酵素処理（０．４ｍｇ／ｍＬ　コラゲナーゼＤ（Ｒｏｃｈｅ）、０．６ｍｇ／ｍＬ　ディスパーゼＩＩ（Ｒｏｃｈｅ）、４０μｇ／ｍＬ　ＤＮアーゼＩ（Ｒｏｃｈｅ））により単一細胞に分離した。細胞をペレット化し、細胞計数のために再懸濁した。新たに分離された胸腺細胞を、致死的に照射されたマウス線維芽細胞（３Ｔ３－Ｊ２）の層にわたって播種した。あるいは、胸腺単一細胞懸濁液は、免疫磁気分離によりＣＤ４５及びＣＤ２３５ａｂ（赤血球）発現細胞が枯渇した。濃縮された断片を染色し、３Ｔ３－Ｊ２フィーダーにわたった細胞培養前に皮質性（ＥｐＣＡＭ^{低}ＣＤ２０５$^{+}$）及び髄質性（ＥｐＣＡＭ^{高}ＣＤ２０５$^{-}$）胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）についてＦＡＣＳＡｒｉａ　ＩＩＩ装置（ＦＡＣＳＤｉｖａ８．０．１ソフトウェア）を用いて選別した。上皮細胞は、ＤＭＥＭ－１Ｘ（Ｇｉｂｃｏ）及びＦ－１２ナッツミックス（Ｇｉｂｃｏ）の３：１混合物によりなり、１０％ウシ胎仔血清（Ｓｉｇｍａ）、１％ペニシリン及びストレプトマイシン（１００Ｘ、Ｓｉｇｍａ）、ヒドロコルチゾン（０．４μｇ／ｍｌ、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、コレラ毒素（１０$^{-10}$Ｍ、Ｓｉｇｍａ）、トリヨードチロニン（Ｔ３）（２×１０$^{-9}$Ｍ、Ｓｉｇｍａ）及びインスリン（５μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）が補足されたｃＦＡＤ培地中で増殖した。ヒト上皮増殖因子（ｈＥＧＦ、１０ｎｇ／ｍｌ、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）を、各給餌において培養３日後、次いで、隔日に添加した。ＴＥＣを、２０００細胞／ｃｍ^{2}～４０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、３７℃及び６％CO_2でインキュベートし、培養５日～７日にコンフルエンスに達した。ＴＥＣコロニー形成効率（ＣＦＥ）アッセイを、継代１回おきに行った。５００細胞を、段階希釈により得て、６０ｍｍ組織培養皿中、致死的に照射された３Ｔ３－Ｊ２フィーダーにわたって播種した。培養１２日後、増殖コロニーを、４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、ローダミンＢ（１％、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）で１５分間染色した。コロニーを、手術用顕微鏡下選別した。胸腺の間質細胞（ＴＩＣ）を、ＥｐＣＡＭ－ストローマリッチ胸腺集団又はヒト胸腺の外植片の選別のいずれか由来であった。胸腺組織の断片を、Ｍｅｇａｃｅｌｌ培地（Ｓｉｇｍａ）中１：１００希釈されたＭａｔｒｉｇｅｌ（商標）（Ｃｏｒｎｉｎｇ）で予め被覆された６０ｍｍ皿に播種した。断片を３０分間接着させたままにし、次いで、２．５％ＦＢＳ　ＨＩ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｓｉｇｍａ）、１％Ｌ－グルタミン（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１％非必須アミノ酸（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００ｍＭβ－メルカプトエタノール（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び塩基性ＦＧＦ（Ｓｉｇｍａ）が補足されたＭｅｇａｃｅｌｌ培地で優しく覆った。培養７日後、外植片から増殖された細胞を回収し、６％ＣＯ２及び５％Ｏ２雰囲気下３７℃において培養し、ＴＩＣがコンフルエンスに達した場合３日～４日毎に継代した。

【００９４】

リンパ球培養及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激アッセイ

ヒトＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$選別細胞を、９６ウェル、４８ウェル及び２４ウェル（Ｆａｌｃｏｎ）において２８日まで、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含むＧｌｕｔａｍａｘ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）並びにヒト組み換えＩＬ－２（５０Ｕ／ｍＬ、Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍ）及びＩＬ－７（５ｎｇ／ｍＬ、

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を補足してＲＰＭＩ１６４０（Ｇｉｂｃｏ）中で培養した。増殖のため、抗ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）を、１：１の割合で添加した。サイトカイン産生を、ホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）及びイオノマイシン（Ｉｏ）刺激アッセイ：ヒトＣＤ４５$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$選別Ｔ細胞により評価し、新鮮に単離されたヒト胸腺細胞を、２０％熱不活性化ヒト血清（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）、タンパク質輸送阻害剤カクテル（５００Ｘ、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＰＭＡ（４０ｎｇ／ｍＬ、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）、及びＩｏ（４μｇ／ｍＬ、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）を補足されたＲＰＭＩ中、３７℃で６時間インキュベートした。それから、Ｔ細胞をＨＢＳＳ溶液で洗浄し、ＣＤ３、ＣＤ４及びＣＤ８（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、並びにＡＰＣ－Ｃｙ７フィクサブルバイアビリティー染料（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で染色した後、細胞内染色バッファキット（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いた固定及び透過処理並びに抗体抗ＩＦＮγ、抗ＴＮＦアルファ及び抗ＩＬ－２（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いた細胞内染色を行った。増殖され、刺激されなかったＴ細胞を使用してＦＡＣＳゲートを設定した。

【００９５】

内皮細胞（ＨｕＶＥＣ－ＶｅｒａＶｅｃ）培養

ヒト内皮細胞（Ａｎｇｉｏｃｒｉｎｅ、ＣＡＴ：ＨＶＥＲＡ１０１）を、２０％ウシ胎仔血清、ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、１％抗菌剤／抗真菌剤（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ）、１００μｇ／ｍｌヘパリン（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）及び５０μｇ／ｍｌ内皮サプリメントＥＣＧＳ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）が補足された培地１９９（Ｇｉｂｃｏ）中０．１％ゼラチン（Ｍｅｒｃｋ）の層上で培養した。

【００９６】

フローサイトメトリー分析

単一細胞懸濁液を、２％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）が補足されたハンクス平衡塩液（ＨＢＳＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中、アドホック抗体ミックス（補足表１）で氷上３０分間染色した。ＤＡＰＩ（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）又はＺｏｍｂｉｅ　Ｌｉｖｅ－Ｄｅａｄ染料（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して死細胞から生細胞を識別した。ＦＡＣＳ表現型分析を、Ｆｏｒｔｅｓｓａ　Ｘ－２０装置（ＢＤ　ＦＡＣＳＤｉｖａ８．０．１ソフトウェア）及びＦｌｏｗＪｏ（商標）ソフトウェア（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて行った。

【００９７】

ＲＮＡ単離及びＲＴ－ｑＰＣＲ

培養及び新鮮に単離された細胞を、製造者説明書に従って、ＲｅｌｉａＰｒｅｐ（商標）キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）のＢＬ－バッファ又はＴｒｉｚｏｌ　ＴＲＩ試薬（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）のいずれかにおいて遺伝子発現分析のために回収した。沈降及び乾燥されたＲＮＡを、ヌクレアーゼフリー水（Ｑｉａｇｅｎ）中に再懸濁した。ＲＮＡ濃度を、Ｎａｎｏｄｒｏｐ１０００（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて測定し、ＲＮＡ完全性（ＲＩＮ）を、ＢｉｏＡｎａｌｙｚｅｒ２１００（Ａｇｉｌｅｎｔ）を用いて評価した。必要な場合、ＲＮＡを、製造者説明書に従ってＯｖａｔｉｏｎ（登録商標）ＲＮＡ増幅システムＶ２（Ｎｕｇｅｎ）を用いて増幅した。あるいは、ＲＮＡを、製造者説明書に従ってＧｏＳｃｒｉｐｔ（商標）逆転写酵素キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いてＤＮＡに変換した。ｃＤＮＡ濃度を、１０ｎｇ／μｌに調整した。定量（ｑ）ＰＣＲを、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ３リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いたＭｉｃｒｏＡｍｐ　Ｆａｓｔ　Ｏｐｔｉｃａｌ　９６ウェル反応プレート（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）において、低ＲＯＸ及びＴａｑｍａｎ　ｑＰＣＲプローブ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、補足表２）を備えたＰＣＲマスターミックス（ＰｒｅｃｉｓｉｏｎＰＬＵＳ－Ｒ－Ｐｒｉｍｅｒｄｅｓｉｇｎ　Ｌｔｄ）を用いて行った。

【００９８】

単一細胞ＲＮＡシーケンシング－１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ

細胞数を、Ｅｖｅ自動細胞カウンター（ＮａｎｏＥｎＴｅｋ）を用いて確認した。可能な場合、１００００細胞のための適切な体積を、ヌクレアーゼフリー水を用いて４６．６μｌまで補給した。より低い細胞濃度のため、４６．６μｌの細胞懸濁液を、更に希釈しないでロードした。逆転写及びライブラリー構築を、製造者説明書に従ったクロム単一細胞３’試薬ｖ３プロトコール（１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）に従って行った。全相補ＤＮＡ合成を、１２増幅サイクルを用いて行い、最終ｃＤＮＡ収量は約３ｎｇ／μｌ～１５ｎｇ／μｌの範囲であった。１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓシーケンシングライブラリーを記載されているように構築し、２８－８－９８のリード長を用いてＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ４０００でシーケンスした。

【００９９】

単一細胞データのバイオインフォマティクスデータ解析

生シーケンスデータを、ＣｅｌｌＲａｎｇｅｒパイプライン（１０ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）を用いて処理した。カウント表を、Ｒにロードし、Ｓｅｕｒａｔ３Ｒパッケージ[59]を用いて更に処理した。本発明者らは、観察された２００より少ない異なる遺伝子を有する全細胞又はミトコンドリア遺伝子由来の固有分子識別子の２０超（サンプルｍＴＥＣ１、ｍＴＥＣ２）又は３０％（サンプルｃＴＥＣ１、ｃＴＥＣ２）を有する細胞を除去した。それから、主成分分析を、有意に可変な遺伝子で行い、第一２０主成分を、主成分分散プロット（「ＰＣエルボープロット」）の手動検査に基づいてクラスタリング及びＵＭＡＰについてインプットとして選択した。クラスタリングを、Ｓｅｕｒａｔパッケージのデフォルト方法を用いて行い、解像度パラメータを０．５に設定した。曲線下面積（ＡＵＣ）要約強度プロットを、ＲパッケージＡＵＣｅｌｌを用いて作成した。

【０１００】

バルクＲＮＡシーケンシングライブラリー作成及び解析

全ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙミクロキット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて培養された細胞から抽出し、ＲＮＡ総濃度を、Ｎａｎｏｄｒｏｐ分光光度計を用いて測定した。全ＲＮＡは、Ｒｉｂｏ－Ｚｅｒｏを有するｒＲＮＡが枯渇し、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて逆転写し、ＲＮＡクリーンビーズ　ｅ　ｅ　Ａｍｐｕｒｅ　ＸＰビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて精製した。ライブラリーを、サンプル当たり１００ｎｇのＲＮＡから始まるＴｒｕＳｅｑ　Ｓｔｒａｎｄｅｄ　Ｔｏｔａｌ　ＲＮＡサンプル作成キット（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を用いて作成し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｏｖａＳｅｑ６０００装置、ペアエンズ、及び３５百万回リードカバレッジを用いてシーケンスした。ＲＮＡ－Ｓｅｑデータを、Ｓａｌｍｏｎ（ＧＲＣｈ３８）を用いてアラインし、次のように処理した。ＤＥＧリスト生成：ｅｄｇｅＲ（ｖ．３．２４．３）を用いて解析を行った。有意なＤＥＧを、ＦＤＲに対して０．０５のカットオフ及びｌｏｇＦＣに対して１．５の閾値を適用して選択した。異なる細胞型間の遺伝子比較：引数ｌｏｇ＝Ｔと共にｅｄｇｅＲの関数ｃｐｍ（）を用いてカウントを正規化した。それから、関数ｈｅａｔｍａｐ．２（）（ｇｐｌｏｔｓ　ｖ．３．０．１．２）により生成されたｈｅａｔｍａｐでデータを可視化した。

【０１０１】

ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ解析

ｈＣＤ４５$^{+}$ＣＤ３$^{+}$細胞を、１０ｗｐｔ及び１８ｗｐｔ（それぞれ、８０８１及び１８６９選別イベント）において２匹のＮＳＧヌードマウスの脾臓から選別し、溶解し、６５℃で一夜、７８０ヒト遺伝子をプロファイルするためのキメラ抗原受容体－Ｔ細胞パネルにハイブリダイズした（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。ハイブリダイズされたサンプルを、ｎＣｏｕｎｔｅｒ（登録商標）ｐｒｅｐ　ｓｔａｔｉｏｎで処理し、製造者説明書に従って、ｎＣｏｕｎｔｅｒ（登録商標）デジタルアナライザー（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ）でデータを収集した。生セータを、データ品質チェック、バックグラウンドしきい値処理及び正規化のために、ｎＳｏｌｖｅｒ４．０（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ）にインポートした。パネルに存在する６スパイクインＲＮＡ陽性コントロール及び８陰性コントロールを使用して実験品質を確認した。バックグラウンドレベルを、陰性コ

ントロールプローブの平均カウント及び２×標準偏差により決定した。上記バックグラウンドで５０％より少ないプローブを含むサンプル又はイメージング若しくは陽性コントロール直線性フラグを有するサンプルを、更なる解析から除外した。全サンプルにおいてバックグラウンド未満の生カウントを有するプローブを、偽陽性の結果を避けるために差次的発現解析から除外した。ＣＡＲ－Ｔキャラクタリゼーションパネルに存在する１０ハウスキーピング遺伝子の幾何平均により正規化した。

【０１０２】

組織学的検査

ヒト胸腺組織及び足場サンプルを、４％ＰＦＡに固定（２時間～一夜）し、凍結包埋又はパラフィン包埋のいずれかのために処理した。凍結包埋のため、固定された組織を、ショ糖２５％に平衡化し、Ｏ．Ｃ．Ｔ．化合物（ＶＷＲ）に包埋した。凍結切片（厚さ７μｍ）を、Ｌｅｉｃａ　Ｃｒｙｏｓｔａｔ３０５０で切断した。パラフィン包埋のため、Ｌｅｉｃａ　Ｐｅｌｏｒｉｓ　ＩＩ組織処理装置及びＳａｋｕｒａ　Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｃｈ包埋ステーションを使用した。パラフィン切片（厚さ３μｍ～５μｍ）を、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒロータリーミクロトームを用いて作成した。凍結切片又はパラフィン切片を、自動ステーション（Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ　Ｐｒｉｓｍａ）、Ｍａｓｓｏｎの三色キット（Ｌｅｉｃａ、Ｒａｙｍｏｎｄ　Ａ　Ｌａｍｂ、ＢＤＨ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、及びＶａｎ　Ｇｉｅｓｏｎ染色キット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ－Ｍｅｒｃｋ）を用いてヘマトキシリン－エオシンで染色した。

【０１０３】

免疫染色

組織切片又はカバースリップを、４％ＰＦＡに固定し、０．５％のＴｒｉｔｏｎＸ（ＴｒｉｔｏｎＴＭＸ－１００、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）を含むＰＢＳ中の５％正常ロバ血清（ＮＤＳ、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）溶液を用いて同時にブロッキング及び透過処理した。組織切片又は細胞を、一次抗体５％ＮＤＳ、０．０１％ＴｒｉｔｏｎＴＭＸ溶液と共に４℃で一夜インキュベートした。二次抗体を、室温（ＲＴ）で４５分間インキュベートした。Ｈｏｅｃｈｓｔ３３４３２（１０～６Ｍ）又はＦｌｕｏｒｏｓｈｉｅｌｄ（商標）封入剤（Ａｂｃａｍ）中に存在するＤＡＰＩを用いて核を対比染色した。

【０１０４】

イメージング

培養された細胞の位相差像を、Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＣＫ４０倒立顕微鏡及びＯｌｙｍｐｕｓ　ＳＣ５０カメラを用いて得た。培養された細胞のライブ映像を、ＨａｍａｍａｔｓｕＯｒｃａ　Ｒ２カメラを備えたスコープＺｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｖｅｒｔ１３５（対物レンズ　１０×　ＮＡ　０．２５　Ｐｌａｎ　Ｎｅｏｆｌｕａｒ）により得た。組織学的画像のため、Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｃａｍ　ＨＲｃカラーカメラを備えたＺｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｐｌａｎ２顕微鏡を使用した。器官の肉眼顕微鏡観察を、Ｚｅｉｓｓ　ＳｔＲＥＯ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ．Ｖ２０顕微鏡及びＺｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｃａｍ５０６カラーカメラを用いて画像化した。Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ７１０倒立共焦点顕微鏡及びＺｅｎ　Ｂｌａｃｋソフトウェアを使用して、免疫蛍光画像を得た。共焦点画像を、Ｆｉｊｉ及びＩｍｐｒｏｖｉｓｉｏｎ　Ｖｏｌｏｃｉｔｙ　ＬＥソフトウェアを用いて処理した。

【０１０５】

血管マイクロサージェリー、灌流及び脱細胞化

体重１５０ｇ～２２０ｇの範囲の雄ラットを、胸腺器官の供給源として使用した。胸腺は、血液を器官全体に供給するための総頚動脈を欠き、したがって、他の器官のように主要血管に単一カニューレを挿入することにより胸腺を灌流することができない[35]。マイクロサージェリーアプローチを使用して器官全体の胸腺灌流を得た。簡潔に言えば、各葉に血液を供給する血管を、絹縫合糸（サイズ６．０、Ｆ．Ｓ．Ｔ．）を用いて閉じて次の順：右総頚動脈、右鎖骨下動脈、右内胸動脈、右肋頚動脈、右大動脈弓、左大動脈弓、左肋頚動脈、左内胸動脈の順で胸腺を塞いだ。左頚動脈は、その後のカニューレ挿入及び器

官の灌流のため開いたままにした。カニューレ挿入胸腺を、界面活性剤－酵素処理（ＤＥＴ）の灌流により脱細胞化した。器官を、ｉ１５０ｎぜん動ポンプ（ｉポンプ）を用いてｄＨ２Ｏ（１８．２ｍΩ／ｃｍ）で４℃、９６時間灌流した（０．２ｍｌ／分）。室温において４％デオキシコール酸ナトリウム（ＳＤＣ；ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）及び２．５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）中０．１ｍｇ／ｍＬ　ＤＮアーゼ－Ｉ（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）を用いてＤＥＴを行った。脱細胞化ラット胸腺（足場）を、１７８０Ｇｙの線量でγ照射し、数週間４℃においてＰＢＳ中に貯蔵した。

【０１０６】

微小焦点コンピュータ断層撮影（マイクロＣＴ）

ホルマリン溶液を用いて１：１比で三ヨウ化カリウム（Ｉ$_2$ＫＩ）造影剤に浸漬する前に、ラット胸腺を、抽出、カニューレ挿入及びパラホルムアルデヒドに固定し、前記胸腺を、同溶液（約２０ｍｌ体積）を含むＦａｌｃｏｎチューブに浸漬する前にカニューレに、これを注入した。６３．２５ｍｇ／ｍＬの総ヨウ素含有量のＩ$_2$ＫＩ（２．４９×１０$^{-4}$ｍｏｌ／ｍＬのヨウ素質量）を使用した。検体を、スキャニング前、造影剤溶液に４８時間浸漬した。マイクロＣＴ検査直前、検体を蒸留水でリンスして過剰な表面のヨウ素を除去して、ガーゼを用いてパッドで乾かした。これらを、Ｐａｒａｆｉｌｍ（登録商標）Ｍにラップし、低密度プラスチックシリンダーに固定した。等方性ボクセルサイズは、得られた幾何学的拡大率（検体サイズと逆相関）に応じて変わり、５μｍ～９μｍの範囲であった。マルチメタルターゲットを備えたＸＴ　Ｈ３２０マイクロフォーカスＣＴスキャナー（Ｎｉｋｏｎ　Ｍｅｔｒｏｌｏｇｙ、英国トリング）を用いて、Ｘ腺画像を得た。タングステンターゲットを、１００ｋＶの加速電圧及び１００マイクロアンペアの電流で使用した。マイクロＣＴ検査（約９０分の時間）後、組織分解を防止し、顕微鏡検査前にヨウ素の除去を助けるために、検体を１０％ホルマリンに固定した。画像を、ＣＴ　Ｐｒｏ　３Ｄ（Ｎｉｋｏｎ　Ｍｅｔｒｏｌｏｇｙ、英国トリング）を用いて再構築し、ＶＧ　Ｓｔｕｄｉｏ　ＭＡＸ　ｖ３．０（Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ、独国）を用いて後処理した。

【０１０７】

走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）

サンプルを、０．１Ｍリン酸バッファ（ＰＢ）ｐＨ７．４中の４％ホルムアルデヒド／２．５％グルタルアルデヒド（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）に、室温において５時間固定した。それから、サンプルを０．１Ｍ　ＰＢで洗浄し、約５ｍｍに切断し、０．０５Ｍ　ＰＢ中２５％ショ糖、１０％グリセロールに一夜凍結保護した。それから、サンプルを、ステンレス鋼プローブを用いて液体窒素に急速凍結し破砕し、次いで、室温において抗凍結剤に戻して解凍した。サンプルを、１％ＯｓＯ$_4$／１．５％フェリシアン化カリウムで染色し、Ｈ２Ｏで洗浄し、エタノール段階系列で脱水し、Ｌｅｉｃａ　ＥＭ　ＣＰＤ３００を用いてＣＯ$_2$で臨界点乾燥し、粘着カーボンタブを用いてアルミニウムスタブ上に取り付けた。サンプルを、破砕面をビームに提示するように取り付け、Ｑｕｏｒｕｍ　Ｑ１５０Ｒ　Ｓ　スパッタコーターを用いてプラチナ薄層で被覆した。サンプルの肉眼での画像を、Ｌｅｉｃａ　Ｍ２０５Ｃ立体顕微鏡でＳＥＭ画像撮影前に撮影した。ＳＥＭ画像を、ＦＥＩ　Ｑｕａｎｔａ　２５０　ＦＥＧ走査電子顕微鏡を用いて記録した。

【０１０８】

ＤＮＡ定量化

天然ラット胸腺及び脱細胞化された器官のＤＮＡを、製造者説明書に従ってＰｕｒｅＬｉｎｋ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　ＭｉｎｉＫｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて抽出した。ＤＮＡサンプルを、分光光度測定（ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）１０００、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）で測定した。

【０１０９】

胸腺足場の再増殖及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養

培養されたＴＥＣ及びＴＩＣ（比５：１）のｃＦＡＤ培地中の細胞懸濁液を、インスリン注射器（Ｔｅｒｕｍｏ、２９．５Ｇ）を用いて脱細胞化されたラット胸腺に注入（１００μｌ／葉中２Ｍ～３Ｍ細胞）した。足場の再増殖に使用されたストローマ細胞は、４月

齢及び６月齢のドナー由来であった。播種された胸腺足場を、ｃＦＡＤ培地中５日又は６日間培養し、次いで、５０μｌ体積の共培養培地（ＤＭＥＭ　１Ｘ（Ｇｉｂｃｏ）、１０％ＦＢＳ（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）、１％ペニシリン及びストレプトマイシン（１００Ｘ、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）、トリヨードチロニン（Ｔ３）（２×１０$^{-9}$Ｍ、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）、インスリン（５μｇ／ｍｌ、ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ）及びサイトカイン（インターロイキン－７、５ｎｇ／ｍＬ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、幹細胞因子５ｎｇ／ｍＬ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ）及びＦＬＴ３－Ｌ（５ｎｇ／ｍＬ、ＣｅｌｌＧＳ））中ＴＮ（４００，０００）±ＶｅｒａＶｅｃ（２００，０００）細胞を注入した。足場を、ＴＥＣのみ（ｎ＝４）、ＴＩＣのみ（ｎ＝２）又はＴＥＣ及びＴＩＣ（ｎ＝５）を用いて再構築した。完全に再構築された足場（ＴＥＣ、ＴＩＣ及びＴＮを含む）を、共培養培地（サイトカインなし、ｎ＝３）に保持し、ｃＦＡＤ培地中１４日まで培養した。

【０１１０】

骨髄再構築及び皮下移植

ＮＳＧ（８週齢～１２週齢）マウスを、^{137}セシウム源（ＩＢＬ　６３７γ放射線装置）から３．７５Ｇｙで亜致死的に放射線照射した。一次生着のため、精製されたＣＤ３４$^{+}$細胞（１００Ｋ　ＣＢ－ＣＤ３４$^{+}$又は２００Ｋ　ＦＬ－ＣＤ３４$^{+}$／細胞）を、マウス毎に静脈内注入した。マウス骨髄中のヒト細胞の生着を、　殺時に評価した。足場の皮下移植を、ＣＤ３４$^{+}$注入後４週齢～６週齢ＮＳＧマウスにおいて行った。マウスを、導入及び維持のため、５％～２％イソフルラン酸素ガス混合物を用いて麻酔した。ブプレノルフィン０．１ｍｇ　Ｋｇ$^{-1}$を、鎮痛のため導入時投与した。無菌条件下、１～３正中切開（０．４ｃｍ）を、マウスの背中に行い、足場を、側方ポケット^{40}に挿入した。移植後１週間（ｗｐｔ）～２２ｗｐｔの範囲の異なる時点においてマウスを選別した。

【０１１１】

３独立実験における皮下移植を、合計１６ＮＳＧマウスで行い、これらのうちの１４ＮＳＧマウスを、ＣＢ－ＣＤ３４細胞を用いてヒト化し、これらのうちの２ＮＳＧマウスをＦＬ－ＣＤ３４細胞を用いてヒト化した：全マウスは、髄再構築を示した。３７再増殖された足場をマウスに移植し、これらのうちの３４を、回収した。具体的には、８マウスに、ＴＩＣ、ＴＥＣ、ＶｅｒａＶｅｃ細胞及びＣＤ３４$^{+}$細胞（ｎ＝１８）を含む再増殖された足場を移植し；６マウスは、ＣＤ３４$^{+}$細胞（ｎ＝１３）を含まない再増殖された足場を受け、他の２マウスは、ＶｅｒａＶｅｃ細胞（ｎ＝６）を含まない再増殖された足場を受けた。加えて、２マウスは、空の足場（ｎ＝２）を受け、２マウスは、ＴＩＣのみの足場（ｎ＝６）を受けた。足場の内皮細胞の非存在と相関する血管の程度における有意な変化はなかった。

【０１１２】

ＮＳＧヌード雌マウス（８週齢～１２週齢）を、３．２５Ｇｙで亜致死的に放射線照射し、その後、精製されたヒトＣＤ３４$^{+}$細胞を静脈内注入した。ＮＳＧヌードマウスでは、骨髄（ＢＭ）生着により確立された有毛の同腹仔よりヒト化率は低かった（５有毛同腹仔のうちの５有毛同腹仔における５０％～７０％ｈＣＤ４５$^{+}$に対して、１２マウスのうち４マウスは、２７％～５５％ｈＣＤ４５$^{+}$細胞を示した）。ＢＭ再構築を有しないマウスを、更なる分析から除外した。ＢＭ及び脾臓を、ストローマ再増殖足場が生着したヒト化マウス（１０ｗｐｔにおいて１及び１８ｗｐｔにおいて１）を回収した。空の足場が生着した２ヒト化ＮＳＧヌードマウスは、１８ｗｐｔ及び２０ｗｐｔにおいて末梢性再増殖を示さなかった（脾臓内で検出可能なｈＣＤ３$^{+}$細胞はなかった）。

【０１１３】

足場ＦＡＣＳ分析及び選別

再増殖された天然足場を、ＲＰＭＩ１６４０及び２％ＦＢＳ中のコラーゲナーゼＩ（２ｍｇ／ｍＬ、ＳＩＧＭＡ、Ｃ０１３０）、ディスパーゼＩＩ（１Ｕ／ｍＬ、Ｒｏｃｈｅ）及びＤＮアーゼＩ（８０μｇ／ｍＬ、Ｒｏｃｈｅ）を用いて機械的及び酵素的に分離した。消化完了時、細胞懸濁液は、細胞ストレーナー（１００μｍ）を通過し、次いで、ＦＡ

ＣＳ選別又は分析のための抗体で染色した。９足場はＣＤ３４$^{+}$ＨＳＣを用いて再増殖し、７足場はＣＤ３４$^{+}$ＨＳＣなしで再増殖した合計１６足場に対して選別及び／又は分析を行った。再増殖されない４コントロール並びにＴＩＣのみ、ＣＤ３４$^{+}$及びＶｅｒａＶｅｃを含む２足場を、それぞれ、２２ｗｐｔ及び１１ｗｐｔにおいて回収した。足場を分析し、胸腺細胞は検出されなかった。本発明者らは、１４再増殖足場：ＣＤ３４$^{+}$ＨＳＣを用いて再増殖された９足場のうちの７足場及びＣＤ３４$^{+}$ＨＳＣを用いないで再増殖された７足場のうちの７足場においてＣＤ４／ＣＤ８　ＳＰ及びＤＰを見出した。

【０１１４】

統計解析

全実験に対して３回以上の生物学的反復を行い；各実験群／条件に対する正確なサンプルサイズ（ｎ）は離散数として与えられた。特に指定されない限り、ノンパラメトリックな２元配置分散分析を用いて統計解析を行った。プロット及びグラフを、ＧｒａｐｈＰａｄ　ＰＲＩＳＭ８を用いて作成した。

【０１１５】

上記実施形態を、ほんの一例として記載する。付属のクレームに規定されている通り本発明の範囲から逸脱しないで多くの変化形は可能である。

【実施例】

【０１１６】

クローン原性ＴＥＣを識別するための長期ｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖

ヒト胸腺を、開胸心臓手術を経験した３日齢～１１歳の年齢範囲の３３患者から入手した。胸腺組織を、単一細胞懸濁液に酵素的に分離し、胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）の誘導のために致死的に放射線照射されたフィーダー層にわたって播種した。ドナーの年齢とは関係なく全胸腺は、毎週の継代により大規模に増殖することができるコロニーを生成するクローン原性ＴＥＣを含んだ。その後、クローン原性ＴＥＣが皮質及び／又は髄質由来かどうかを決定した。細胞選別ストラテジーを使用して上皮（皮質及び髄質性ＴＥＣ）及び間質（ＴＩＣ）を含む胸腺ストローマコンパートメントを解離及び前向きに単離した。濃縮数サイクル後、ＣＤ４５$^{-}$ストローマ集団は、０．０２％～２％（新鮮に分離された組織）から約４０％～８０％になり、更なる表面マーカーに基づいてその後の選別を可能とした。ＥｐＣＡＭ及びＣＤ２０５発現レベルを使用して、ＥｐＣＡＭ^{低}ＣＤ２０５$^{+}$皮質性ＴＥＣ（ｃＴＥＣ）からＥｐＣＡＭ^{高}ＣＤ２０５髄質性ＴＥＣ（ｍＴＥＣ）を分離した。予想外に、間葉マーカーＣＤ９０（Ｔｈｙ１）は、大きな割合（＞６０％）のｍＴＥＣ及びほぼ全てのｃＴＥＣ、並びにＴＩＣ（図１Ａに示す）によっても発現された。半接着斑に寄与し、重層上皮の基底層における細胞により発現されるＣＤ４９ｆ、π６－インテグリンは、ｍＴＥＣ集団及びｃＴＥＣ集団の両方において差次的に発現され（図１Ｂに示す）、ＣＤ４９ｆ$^{+}$ｍＴＥＣ又はｃＴＥＣ（「タイプ１」）、及びＣＤ４９ｆ$^{-}$ｍＴＥＣ又はｃＴＥＣ（「タイプ２」）サブ集団を選別する基準を提供する。

【０１１７】

ＲＴ－ｑＰＣＲを使用して、それぞれ、新鮮に単離された髄質性（例えば、ＡＩＲＥ１）及び皮質性（例えば、β－５Ｔ、ＣＤ２０５）上皮細胞の確立された機能的マーカーの発現を評価した。これは、ＦＯＸＮ１及びＰＡＸ１などの胸腺形成（ｔｈｙｍｕｓ　ｓｐｅｃｉｆｉｃａｔｉｏｎ）及び／又は胸腺リンパ球新生に対するサイトカイン及び主要転写因子の皮質性細胞対髄質性細胞差次的発現をもたらしたが、ビメンチン（ＶＩＭ）は、全ての選別された検査集団により比較的発現された。

【０１１８】

新鮮に単離されたタイプ１及びタイプ２ヒトｃＴＥＣ及びｍＴＥＣのコロニー形成の可能性を評価するため、上記のように致死的に放射線照射されたフィーダーにわたってこれらを播種した。コロニー形成効率（ＣＦＥ）アッセイは、最も高いクローン原性が、タイプ１　ｍＴＥＣ（ＣＦＥ２％～４％）及びタイプ１　ｃＴＥＣ（１％～２％）に存在する一方、タイプ２　ｍＴＥＣが非常に低いＣＦＥ（０．１％～０．２％）を有し、且つ、タイプ２　ｃＴＥＣがいずれもの増殖するコロニーを生じないことを一貫して明らかにした

（図１Ｃに示す）。これらのより大きなクローン原性と完全に一致して、タイプ１　ｍＴＥＣ及びタイプ１　ｃＴＥＣは、連続する継代にわたって増殖することができる上皮サブ集団のみであった。前記タイプ１　ｃＴＥＣは、これらの髄質性カウンターパートより豊富でないが、前記タイプ１　ｃＴＥＣは、培養液中で顔胸に増強し、前記タイプ１　ｍＴＥＣに匹敵する数に達することができた。胸腺クローン原性細胞の転写プロファイルを定義するため、培養されたタイプ１　ｍＴＥＣ、タイプ１　ｃＴＥＣの全ゲノムでのＲＮＡシーケンシングを行い、選別ストラテジーなしの培養液由来のＴＥＣの全ゲノムでのＲＮＡシーケンシングも行った。培養されたＴＥＣのＲＮＡシーケンシングにより検出されたＳＩＸ１、ＥＹＡ１、ＨＯＸＡ３、ＰＡＸ１、ＰＡＸ９などの遺伝子の発現は、クローン原性ＴＥＣが、これらの起源（皮質性又は髄質性）コンパートメントと無関係の胸腺同一性を維持することを確信させた。皮質性（ＣＳＴＶ、ＫＮＩＣＰ３、ＣＤ２７４）及び髄質性（ＣＨＤ１、ＥｐＣＡＭ、ＣＤ２４）遺伝子両方を、培養細胞により保持した。胸腺上皮細胞のための文書化された重要性を有する転写因子についてＲＴ－ｑＰＣＲにより分析される場合、ｍＴＥＣクローン原性細胞及びｃＴＥＣクローン原性細胞の両方は、ＴＲＰ６３、ＦＯＸＮ１及びＳＣＦなどのシグナル伝達分子をコードするＲＮＡの匹敵するレベルを発現した。前記ｍＴＥＣ及びｃＴＥＣは、１４３４７から１１のみの差次的に発現された遺伝子（０．０８％）を示し、したがって、培養液中、これらは共通の表現型を示すことを確認した。したがって、その後の実験では、本発明者らは、これらが髄質性ゾーン又は皮質性ゾーン由来か否かにかかわらず「クローン原性ＴＥＣ」と表す。

【０１１９】

単一細胞ＲＮＡシーケンシングは、ｉｎ　ｖｉｖｏ髄質性及び皮質性集団と共通の細胞クラスターを明確化する

ｍＴＥＣ及びｃＴＥＣ、タイプ１及びタイプ２の新鮮に単離されたサブ集団を、単一細胞ＲＮＡシーケンシング（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）に付し、他のマウス及びヒトｓｃＲＮＡｓｅｑ研究のより広範な状況に前記集団を置いた。この合わせたアプローチは、クローン原性細胞のために濃縮された新鮮に単離された胸腺上皮細胞の高解像度プロファイリングのための機会を提供した。前記ｍＴＥＣ及びｃＴＥＣサブ集団が単一ＵＭＡＰに存在する場合、主要な細胞サブグループを選別された上皮細胞の中からアノテートし、共有される共通の特徴に基づいて識別可能な１５細胞クラスターを明確化することは可能である：ｃＴＥＣを３主要クラスターにグループ化したが、ｍＴＥＣは５主要クラスターにグループ化し、これに加えて、本発明者らは、皮質及び髄質両方に共通の４ＴＥＣクラスター（「ｃｏｍＴＥＣ」）を特定した。なお、残りの３クラスター（残細胞）は、単一細胞選別から多形核、樹状細胞、及び胸腺細胞コンタミナントであった。これらの主要な細胞サブグループを、ｃＴＥＣ、ｍＴＥＣ又はｃｏｍＴＥＣの特定の遺伝子シグネチャーにより検証した。前記ｃｏｍＴＥＣは、上皮－間葉転換（ＥＭＴ）シグネチャー（クラスター１２）、増殖マーカー（クラスター１３）、及びポリケラチン発現細胞（クラスター１４）を特徴とする細胞を含むが、クラスター１５は、イオン輸送において濃縮された特徴的シグネチャーを示した。ｃｏｍＴＥＣ並びに特定のｍＴＥＣ及びｃＴＥＣクラスターの転写シグネチャーをｉｎ　ｖｉｔｒｏでのクローン原性ＴＥＣの転写プロファイルと比較した場合、後者の発現された転写シグネチャー（増殖、ＥＭＴ及びポリケラチン）は、ｃｏｍＴＥＣにおいて存在するが、新鮮に単離されたｍＴＥＣ又はｃＴＥＣの他のクラスターにおいて存在しないことは明らかだった。

【０１２０】

ＴＥＣは、上皮及び間葉マーカーを同時発現するが、胸腺間質細胞と異なる

ＦＡＣＳ（図１Ａに示す）更に新鮮に単離されたＴＥＣのｃｏｍＴＥＣクラスターにおけるＥＭＴシグネチャーの検出により観察されたＥｐＣＡＭを用いたＣＤ９０（Ｔｈｙ－１）の著しい同時発現に基づいて、これは、ヒト胸腺上皮細胞が特徴的上皮－間葉ハイブリッド表現型を特徴とし得る可能性を示唆した。免疫組織化学分析を、本発明者らのドナーの生後胸腺に対して行い、ＣＤ９０、ビメンチン（ＶＩＭ）及び程度は少ないが中胚葉マーカーＴＥ－７などの間葉マーカーと共にサイトケラチン（ＣＫ）を一貫して同時発現

する細胞を明白に検出し、したがって、タンパク質レベルにおいて、健康な胸腺組織内で発現されたハイブリッド表現型を確認した。培養液中、クローン原性ＴＥＣは、ＣＤ４９ｆ$^{+}$であり、活性細胞サイクル（Ｋｉ６７$^{+}$）では、ＣＫ５／１４及びＣＫ８／１８に対してダブル陽性であった。今までに培養液において記載されているが、上記報告されているものと一致して全上皮と対照的に、クローン原性ＴＥＣは、ＣＤ９０、ＶＩＭ及びＴＥ－７などの間葉マーカーを安定して同時発現した。加えて、ＴＲＰ６３を発現するいくつかのＴＥＣ、重層上皮の基底層の転写因子及び胸腺上皮細胞の主要制御因子は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ及びｉｎ ｖｉｖｏでＶＩＭに対して陽性でもあった。培養されたＴＥＣの全ゲノムトランスクリプトーム解析は、ｓｃＲＮＡシーケンシングにより明確化されたＥＭＴシグネチャーのｉｎ ｖｉｔｒｏ発現を確信させた。際だったことに、間葉マーカーの発現は、培養液中４日にわたってＴＥＣコロニーのライブイメージングにより実証されたように、間葉細胞の特色を示す高い運動性及び遊走とも相関した。したがって、上皮細胞のハイブリッド上皮－間葉表現型は、ｉｎ ｖｉｖｏ及びｅｘ ｖｉｖｏでの胸腺の極めて独特な特徴であるように思われた。ＴＥＣに加えて、ＣＤ９０$^{+}$ ＥｐＣＡＭ$^{-}$間質細胞も増殖した（図１Ａに示す）。これらの細胞は、上皮細胞のために設計された培養条件下増殖しなかったが、中胚葉培養条件下多くの継代のため大規模に増殖し、したがって、本発明者らがほんの数週間で何十億もの細胞を得ることを可能とした。免疫蛍光法は、ＴＥ７、ＶＩＭ、ＰＤＧＦＲβ、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン４（ＮＧ２）及び平滑筋アクチン（αＳＭＡ）などの間葉マーカーの発現を示した（図３ｄ）。ＦＡＣＳ分析は、これらのＴＩＣは、ＰＤＧＦＲα、ＰＤＧＦＲβ、ＣＤ９０、ＣＤ１４６、及び、様々な程度に、ＮＧ２並びに血管周囲表現型と一貫したアルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）を一貫して発現したことを明らかにした。ＴＩＣの増殖のＦＡＣＳ分析は、上皮細胞（ＣＤ４９ｆ$^{+}$）も免疫細胞（ｈＣＤ４５$^{+}$）のいずれの存在も示さなかった。そして、本発明者らは、全ゲノムＲＮＡシーケンシングによる異なる年齢の小児サンプルからの培養された上皮クローン原性細胞及び胸腺間質細胞の転写プロファイルを比較した。予想通り、培養されたＴＥＣは、主成分分析（ＰＣＡ１）により例示されているようにＴＩＣと明白に異なると思われた。それにもかかわらず、前記データは、前記２つの細胞型が、高度に発現されたＣＯＬ１Ａ１、ＭＭＰ２、ＴＧＦＢＲ２及びＦＮ１を含むＥＭＴと関連する遺伝子の発現において絶妙な類似性も共有することを確信させた。

【０１２１】

天然胸腺足場

ＴＥＣ及びＴＩＣの実質的に使用された培養条件下での増殖能を考慮すると、比較的短時間内に何十億ものＴＥＣ及びＴＩＣを得ることは可能となり、臨床適用性を有する仮想の幹細胞／前駆細胞として確立した。機能的に分化するこれらの能力を評価するため、特有のアプローチを使用して胸腺ストローマを播種するための３Ｄ構造物を提供するだろう器官全体の脱細胞化により胸腺細胞外マトリックス（ＥＣＭ）を得て、生理的パターンに従って細胞の再組織化を誘導した。

【０１２２】

簡潔に言えば、その後のカニューレ挿入が器官の灌流を可能とするように、１つの頸動脈を開いたままにする一方、肉眼顕微鏡観察により示され、以下の方法のセクションに詳述されているように（図２ａ、上側パネルに示す）、全ての他の動脈（胸腺に達する血管の出現より下流）を閉じた。

【０１２３】

カニューレ挿入されたラット胸腺全体のＸ腺微小焦点コンピュータ断層撮影（マイクロＣＴ）を適用し、頸動脈中にある２４Ｇカニューレの３Ｄ可視化を可能とした（図２ｂに示す）。マイクロＣＴは、ヨード造影剤により血液を含む脈管構造の可視化（白領域、高密度領域）を可能とする非破壊技術であり；更に、マイクロＣＴは、仮想分割により皮質性領域（明領域、Ｃ）及び髄質性領域（Ｍ）の明白な分界を促進し、それにより、高解像度において胸腺の器官全体３Ｄイメージングを実証した（図２ｂに示す）。実質がより透明にされる場合、３Ｄ器官全体マイクロＣＴ画像は、赤で分割された３Ｄ胸腺脈管構造の

増強を可能とした（図２ｃに示す）。マッソン三色染色（ＭＴ）及びヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色による標準的組織学的検査は、皮質性領域及び髄質性領域の分布並びに血管構造を確信させた（図２ｄ及び図２ｅに示す）。

【０１２４】

このマイクロサージェリーアプローチは、単一カニューレを通してＭｉｃｒｏｆｉｌ（登録商標）化合物を注入することにより両胸腺葉の灌流を可能とし、固化及び固定後、本発明者らは、マイクロＣＴにより器官全体をイメージングした（図２ｆ及び２ｇを示す）。ミリＱ－H_2Oのカニューレ、次いで界面活性剤及びＤＮアーゼ溶液を通した灌流は、６日間にわたって器官全体の脱細胞化を可能とした（図２ａ下側パネルに示す）。ＭＴ及びＨ＆Ｅ染色は、器官の完全な脱細胞性を実証し、前記完全な脱細胞性は、微細な網状のコラーゲン濃縮されたＥＣＭ並びにマクロ及びマイクロ脈管構造の保存を示した（図２ｈ及び図２ｉに示す）。胸腺ＥＣＭは、ケラチンを含む中間径フィラメントの非存在を確認しながら、エラスチンの保存を実証するＥＣＭタンパク質のための比色染色を特徴とした。同様に、脱細胞化後、本質的に残ＤＮＡはなかった。走査電子顕微鏡（ＳＥＭ）は、高解像度においてＥＣＭ線維の分布を示し、これを、γ照射により滅菌し、生理食塩水中に貯蔵することができる器官全体の足場に保存した。

【０１２５】

天然足場は、ｅｘ　ｖｉｖｏで機能的胸腺の形態形成を促進する

４週間～６週間増殖された４百万～６百万クローン原性ＴＥＣを、足場に注入した。それから、再増殖された足場を、上皮培地に１４日までの間性的条件下で維持し、この時間にわたって、これらは、足場リモデリング及び連続的に増加する体積を示した（図３Ａに示す）。ＴＥＣは、嚢下領域（$CD49f^{高}$）から足場の最も内側の領域に３Ｄ　ＥＣＭ構造物に沿って再組織化した。播種されたＴＥＣは、$CK5/14^{+}$及び／又は$CK8^{+}$を発現し；活性細胞サイクル（$Ki67^{+}$）にあり；アポトーシスマーカー、カスパーゼ３に対して陰性であり；ＴＲＰ６３を広範に発現した（図３Ｂに示す）。これらのデータは、ＴＥＣが、３Ｄ　ＥＣＭにより支持されたことを実証している。

【０１２６】

それにもかかわらず、これらのｉｎ　ｖｉｔｒｏ条件下及び他の細胞型の非存在下（図３Ｃに示す）、播種された細胞は、胸腺ストローマ分布が激しく撹乱される原発性免疫不全症に罹った患者において検出されたＴＥＣに似ていた。

【０１２７】

この問題に対処するため、次に、本発明者らは、培養されたＴＩＣと一緒に増殖されたＴＥＣを同時播種した。間質細胞の過剰増殖を避けるために、ＴＥＣ：ＴＩＣ比を、５：１に最適化した。際だったことに、共培養のほんの５日後、ＴＩＣの存在は、早期（受胎後９週、ｗｐｃ）胎児胸腺を大部分表現型模写した封鎖されたストローマ組織化を促進した（図３Ｄ及び図３Ｅに示す）。ＴＩＣは、再構築された足場の３Ｄ　ＥＣＭに沿ったＴＥＣの再組織化のために非常に重要であることが分かった。ＴＩＣの存在下、皮質性$CK8^{+}$　ＴＥＣは、天然胸腺を表現型模写するＣＤ４９ｆ及びＴＲＰ６３を発現する$CK5/14^{+}$　ＴＥＣの嚢下様層により大部分囲まれていた（図３Ｆに示す）。再増殖された足場の走査電子顕微鏡（ＳＥＭ）は、ＴＥＣ、ＴＩＣ及び脱細胞化されたＥＣＭ間の細胞－細胞相互作用及び細胞－マトリックス相互作用並びに血管構造の保存を確信させた。クローン原性細胞からｉｎ　ｖｉｔｒｏで再構築された組織化された胸腺ストローマを、無胸腺症患者に移植する前に、ドナー胸腺細胞を除去するために、２１日まで海綿体上で培養された臨床胸腺スライスと比較した[20、37]。本発明者らの足場内の再構築されたストローマの健康状態は、胸腺スライス調製のための現在の臨床プロトコールが、培養１４日及び２１日後様々な生存率を有する組織破壊されたストローマ、並びに同様に重要なことだが、移植レシピエントのための移植片対宿主病の顕在的リスクを提起する残$CD3^{+}$胸腺細胞を示すことを考慮する場合への特定の関連性がると思われた。

【０１２８】

３Ｄ胸腺微小環境の機能的可能性を評価するため、天然足場を、記載のＴＥＣ及びＴＩ

Ｃを用いて再増殖し、４日～６日間培養し、胸腺細胞前駆細胞を注入した。再増殖された足場のサイズ（０．５ｃｍ^{3}～１ｃｍ^{3}）を考慮すると、本発明者らは、造血幹細胞（ＨＳＣ）系統分化に必要な５週～６週に対して比較的短期（２週以下）の不十分な時間細胞を培養した。これに対応するため、足場を、早期リンパ系マーカーＣＤ１ａ、ＣＤ５、ＣＤ７及びＣＤ３１の発現を特徴とするフローサイトメトリー選別三重陰性胸腺細胞（ＴＮ、ＣＤ３$^{-}$ＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$）を用いて再増殖した（図３Ｇに示す）。再増殖された足場内の免疫細胞は、ＣＤ３３に対して陰性であり、ＣＤ１ａに対して陽性であり、二重陽性（ＤＰ）及び成熟単一陽性（ＳＰ）ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$ステージの両方に分化することができ、天然ヒト胸腺において見られる比を表現型模写するＣＤ４$^{+}$細胞：ＣＤ８$^{+}$細胞の比をもたらした（図３Ｈに示す）。前記足場内のＥｐＣＡＭ$^{+}$　ＴＥＣは、培養液中で増殖するＴＥＣで検出されないＨＬＡ－ＤＲも発現した。対照的に、ＴＩＣのみのストローマを含む足場へ注入されたＴＮは、生存しなかった。結論として、胸腺ストローマ細胞の前記生存及び適切な空間的組織を支持し、次に胸腺細胞の分化を促進する器官サイズ３Ｄ構造物を培養することは可能であった。

【０１２９】

ｉｎ　ｖｉｖｏで再現されたヒト胸腺形態形成

それから、再増殖された胸腺足場が成熟し、ｉｎ　ｖｉｖｏでＨＳＣからヒトＴ細胞再構築を持続し得るかどうかを決定した。５日～６日間ｉｎ　ｖｉｔｒｏで再増殖及び培養された足場を、ヒト化ＮＯＤ．ｓｃｉｄ．Ｉ１２Ｒγｃ^{ヌル}（ＮＳＧ）マウスに皮下移植した。ＮＳＧマウスを亜致死的に放射線照射し、規定された比でストローマ細胞（ＴＥＣ及びＴＩＣ）及びＣＤ３４$^{+}$　ＨＳＣを同時播種された胸腺足場を移植する前４週～６週に、ヒト臍帯血（ＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$）又は胎児肝臓（ＦＬ　ＣＤ３４$^{+}$）のいずれかから高度に精製されたＣＤ３４$^{+}$　ＨＳＣを移植した。ヒト骨髄細胞の供給源として働くＨＳＣを、胸腺発達を加速する移植片に添加するが、必須ではなかった。

【０１３０】

以前に播種され、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養された脱細胞化された天然足場を、ＮＳＧマウスに皮下移植した。少なくとも２足場を、各マウスに移植した。移植片を、移植後１週、２週、８週、１１週、１８週及び２２週（ｗｐｔ）に別々に回収した（図４に示す）。早期時点は、ストローマ細胞生存及び再組織化を確認するために重要であった。８ｗｐｔにおいて、天然足場に播種されたストローマ（ＴＥＣ＋ＴＩＣ）は、特有の３Ｄ胸腺上皮細網と対照的にコルドン様分布又は緻密な上皮構造物を更に示した（図４）。しかしながら、１１ｗｐｔまで、規則的形態形成は更に進行し、より成熟した胸腺構造物は、ストローマ及びＣＤ３４$^{+}$　ＨＳＣを播種された足場の中で一貫して検出された。これらの中に、ハッサル小体（ＨＢ）、マウスにおいてあまり明白でないヒト胸腺の解剖学的特色と非常に類似した構造があった（図４、ＨＢをアスタリスク＊で示す）。

【０１３１】

上皮マーカーＥ－カドヘリン（ＥＣａｄ、赤）及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）（抗ＣＤ３：緑）に関する免疫組織化学（ＩＨＣ）は、ＨＢを形成し、足場からのＣＤ３$^{+}$細胞と相互作用する上皮細胞との胸腺形態形成を確信させた。上皮（ＣＫ５$^{+}$）細胞及び間葉（ビメンチン$^{+}$ＣＫ５$^{-}$）細胞、並びに血管新生（エンドムチン免疫染色により検出）を、足場移植片で検出した（下側パネル）。いくつかの実験では、ＶｅｒａＶｅｃ内皮細胞は、再構築されたＢＭニッチにより迅速な再血管新生を支持すると報告されているので、ＶｅｒａＶｅｃ内皮細胞を、培養されたＴＥＣ及びＴＩＣに加えて播種した。しかしながら、胸腺形態形成及びＴ細胞の成長は、おそらく前記足場のマウス血管新生のために、播種においてヒト内皮細胞の存在に関係なく起こった。

【０１３２】

再構築された足場が循環する造血前駆細胞を引きつけるかどうかを決定するため、形態形成を、移植後１８週～２２週（ｗｐｔ）において調査し、胸腺成熟は、移植前ＨＳＣを注入されなかったものを含む最も再増殖された足場において起こっていた（図４）。更に、ＡＩＲＥ発現は、１１ｗｐｔ～２２ｗｐｔで連続的に増加し、いくつかの領域内では、

ＨＢありなしで、点在するＣＤ１１ｃ$^{+}$樹状細胞（ＤＣ）が存在し、ＨＬＡ－ＤＲ発現を、ＤＣに対してＩＨＣにより及びＴＥＣに対してＩＨＣ及びＦＡＣＳにより検出した。

【０１３３】

移植された足場を機能的に特徴付けするために、移植片を、回収し、単一細胞に分離し、フローサイトメトリーにより分析した。ＣＤ３$^{+}$細胞は、再改変された胸腺移植片内のｈＣＤ４５$^{+}$集団内の優位な表現型であった。ＣＤ３$^{+}$であった各足場内のｈＣＤ４５$^{+}$細胞の高パーセンテージ（３０％～８０％）は、同マウスの骨髄（ＢＭ）が、対照的に、ＣＤ３３$^{+}$骨髄及びＣＤ１９$^{+}$Ｂ分化系列細胞を用いて一次的に再増殖したので、造血前駆細胞を、培養されたヒトストローマ細胞により得られる指令的胸腺微小環境にさらされたことを示している。

【０１３４】

フローサイトメトリーは、足場が、ＴＣＲαβを発現するＳＰ　ＣＤ４$^{+}$細胞及びＣＤ８$^{+}$細胞を用いて胸腺細胞発達（全移植足場の７７．５％）を支持することができることを示した。注目すべきは、足場において成熟する細胞のためのＣＤ４：ＣＤ８比は、ＣＤ４$^{+}$ＳＰ細胞（約３：１）、循環ヒトＢＭ誘導前駆細胞がＮＳＧマウスの内在性胸腺内で分化する場合に見られないヒト胸腺細胞発達の特徴を支持した。未成熟ＳＰ（ＩＳＰ）及びＤＰ胸腺細胞は、前記足場内に異なる割合でも存在し、ＤＰ細胞の一貫した表現を有する進行中の胸腺リンパ球新生を実証した。それにもかかわらず、ｅｘ　ｖｉｖｏで直接検査されたヒト胸腺において報告されたものとの比較によるこれらの存在の減少は、天然器官における分化の正確なスケジュール及び動態を確立するために更なる最適化が必要であろうことを合理的に反映しているかも知れない。対照的に、１１ｗｐｔにおけるＴＩＣ、ＶｅｒａＶｅｃ、ＨＳＣ　ＣＤ３４$^{+}$（ＴＥＣなし）を用いて再増殖された足場又は２２ｗｐｔにおける空足場から回収されるＣＤ３$^{+}$細胞はなかった。

【０１３５】

ｈＣＤ４５$^{+}$ＣＤ３$^{+}$細胞を、胸腺足場及び１８ｗｐｔにおけるＮＳＧマウスの内在性胸腺から選別し、次いで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの細胞の機能的可能性を調べた。ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）を使用して、充分な細胞を機能試験のために得るまで、１２日～２８日間選別された細胞の増殖を誘導した。興味深いことに、それぞれの足場関連細胞又は内在性胸腺関連細胞のＣＤ４／ＣＤ８比は、培養中の増殖において持続し、この特性は、ヒト及びマウス胸腺ストローマにより分化的に「指令」されたことを示した。ホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）及びイオノマイシン（Ｉｏ）を用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏで刺激される場合、前記増殖されたＣＤ４$^{+}$細胞及びＣＤ８$^{+}$細胞は、ＩＦＮγ及びＴＮＦαを産生することができたが、ＩＬ２は、ＮＳＧ胸腺由来のＴ細胞によるよりずっと少ない程度でヒト足場において発達する細胞から産生された（図６ｈ）。注目すべきは、ヒト胸腺から新鮮に単離された胸腺細胞は、低いＩＬ２産生を有するＰＭＡ－イオノマイシンにも応答する。

【０１３６】

そして、再増殖された足場の末梢性Ｔ細胞再構築を支持する能力を、足場が胸腺ストローマのみである無胸腺症ＮＳＧ－Ｆｏｘｎ１^{nu}（ＮＳＧヌード）マウスにおいて決定した。ＮＳＧヌードマウスを、移植前４週～８週にヒト化した。同腹仔ＮＳＧ（有毛）マウスを、骨髄（ＢＭ）及び末梢性再増殖（脾臓）のための陽性コントロールとして使用した。ＢＭ再構築により、空足場を移植された場合、これらのマウスの末梢において検出されたＴ細胞（ｈＣＤ３$^{+}$）はなかった。それどころか、ＮＳＧヌードマウスが、ヒト胸腺ストローマを用いて以前にｉｎ　ｖｉｔｒｏで再増殖された足場を移植された場合、ｈＣＤ３$^{+}$細胞を、末梢で検出した。注目すべきは、ＮＳＧヌードマウスの脾臓からのｈＣＤ４５$^{+}$ＣＤ３$^{+}$を、２時点（１０ｗｐｔ及び１８ｗｐｔ）において精製し、ＴＲＢＣ１／２、ＴＲＡＶ１９、ＮＴ５Ｅ、ＣＤ４５ＲＡ、ＴＲＡＣ、ＣＤ６９、ＰＴＰＮ６（ＳＨＰ－１）、ＰＴＰＲＣ、ＰＰＩＡ、ＣＤ２２、ＬＴＢを含むＴＣＲ活性化を支持する特定の遺伝子の発現について分析した。

【０１３７】

考察

上記結果は、生後ヒト胸腺が、ｉｎ　ｖｉｖｏでヒト機能的胸腺の再構築に寄与するのに適したｉｎ　ｖｉｔｒｏで臨床的に関連する数まで増殖することができる上皮細胞（ＴＥＣ）及び間質細胞（ＴＩＣ）を宿すことを実証している。このことは、ほんの生後の培養細胞を使用するヒト胸腺の長命の表現模写が可能であることを実証している。

【０１３８】

前記結果は、ＣＤ４９ｆを発現するｍＴＥＣ及びｃＴＥＣ両方は、継代培養及びｅｘ　ｖｉｖｏで著しく増殖する能力を有するクローン原性ＴＥＣにとって富化される。興味深いことに、ｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの増殖は、起源のこれらのそれぞれのコンパートメントのシグネチャーをほとんど失い、胸腺組織にわたり存在する共通の前駆細胞が存在することと外見上一貫していた。予想外に、クローン原性ＴＥＣは遺伝子を同時発現し、間葉細胞に特色のいくつかの挙動も示したが、ハイブリッド表現型は、培養における多くの継代にわたって安定に維持される胸腺ストローマの特有の細胞固有の特徴であると考えられる。

【０１３９】

異なる本物の間質細胞集団（ＴＩＣ）を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで大規模に増殖することができ、他の間葉ストローマ細胞及び周皮細胞といくつかの特徴を共有した。これらの細胞は、これらの非存在下、形態形成することができないので、ｅｘ　ｖｉｖｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏでの移植の両方において、形態形成中のＴＥＣの誘導において重要であった。おそらく、これらの役割は、ＴＥＣ発達及び再生の支持を超えて、Ｔ細胞成長の直接的な調節においてＴＥＣと相乗作用するまで及ぶ。

【０１４０】

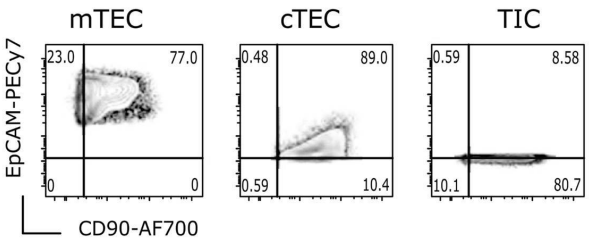
３Ｄ天然ＥＣＭは、培養された細胞からの胸腺形態形成のために非常に重要であることが分かった。器官全体の上記灌流脱細胞化アプローチは、ｅｘ　ｖｉｖｏ形態形成及びｉｎ　ｖｉｖｏ長期再構築両方のために重要である微細３Ｄ　ＥＣＭ網目構造の保存を可能とする。更に、ヒト培養ＴＥＣは、ハッサル小体を生じ、したがって、ｉｎ　ｖｉｖｏでの胸腺前駆細胞分化に関して以前に報告されなかった主要な種特異的特性を維持するこれらの能力を実証した。ＡＩＲＥ及びＨＬＡ－ＤＲなどの機能遺伝子は、ｉｎ　ｖｉｖｏでヒトＳＣＩＤ患者の胸腺ストローマにおいても下方制御され、これらの発現が、ストローマ及び胸腺細胞間にクロストークを含む複雑な微小環境に依存することを示している。したがって、観察されたＡＩＲＥ及びＨＬＡ－ＤＲの顕著な再発現は、本発明の方法において達成された再構築の程度を証明している。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖に対するＴＥＣ及びＴＩＣの機能的コンピテンスが、ヒトＨＳＣの循環を誘引するこれらの能力であり、Ｔ細胞の成長を支持し、無胸腺症ＮＳＧヌードマウスの末梢を再増殖することを実証することは極めて重要である。胸腺などの器官における種特異的ストローマは、その自体の機能にとって極めて重要であり；結果は、ヒトＴ細胞成長のハイブリッドマウス－ヒトｉｎ　ｖｉｔｒｏ系で観察されなかった生理的ヒトＣＤ４$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$比が、一貫して達成されたことを示している。重要なことに、ヒト足場内でｉｎ　ｖｉｖｏで発達したヒトＴ細胞は、マウス胸腺において発達したものからの刺激に対するこれらの応答において機能的に異なった。

【０１４１】

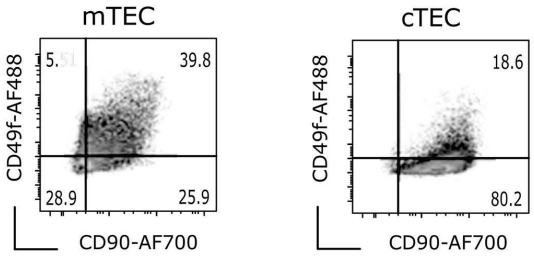
結論では、ｉｎ　ｖｉｖｏで、持続性の胸腺は、造血及びストローマコンパートメント両方がヒト起源である場合に産生された。かかる系は、Ｔ細胞成長、特定のＭＨＣ－Ｉ及びＩＩを用いた陽性及び陰性選択、非定型Ｔ細胞（例えば、γδ）から、耐性の確立及び維持までの範囲の非常に多くの免疫学的問題に対処する可能性を開く。将来の応用としては、無胸腺症ディジョージ症候群及びＦｏｘｎ１^{ヌル}（ヌード）乳児などの原発性免疫不全における胸腺移植；自己免疫性多腺性内分泌不全症－カンジダ症・外胚葉ジストロフィー（ＡＰＥＣＥＤ）患者としての先天的病態、及び免疫抑制のない臓器移植における耐性の制御を挙げることができる。

【図面】

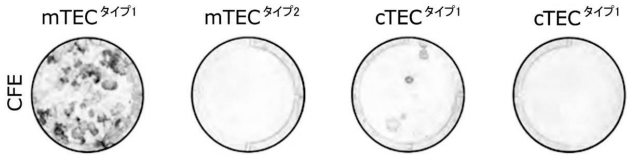
【図１Ａ】



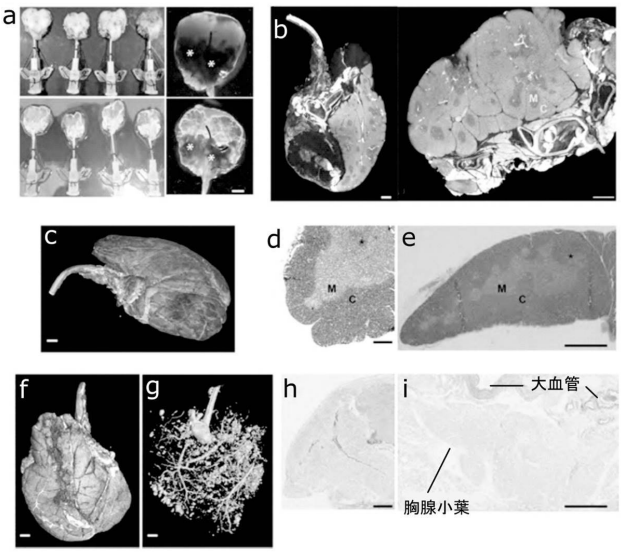
【図１Ｂ】



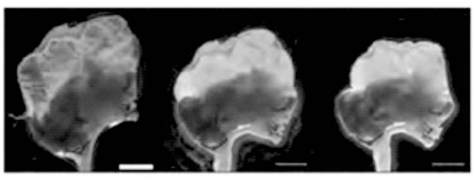
【図１Ｃ】



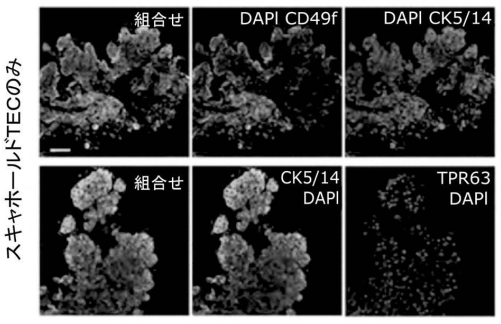
【図２】



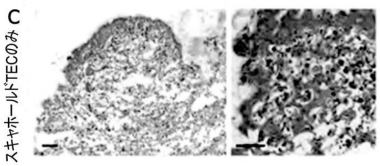
【図３Ａ】



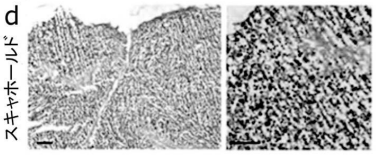
【図３Ｂ】



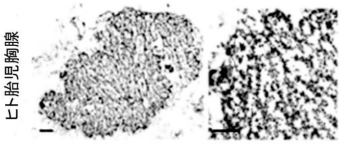
【図３Ｃ】



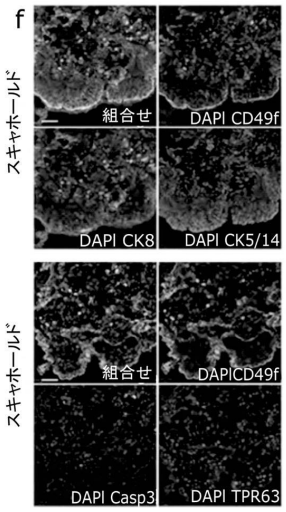
【図３Ｄ】



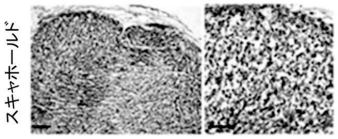
【図３Ｅ】



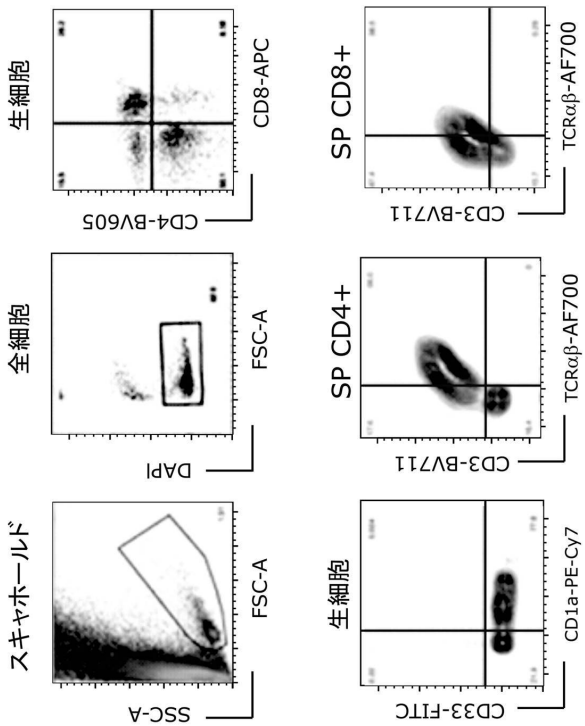
【図３Ｆ】



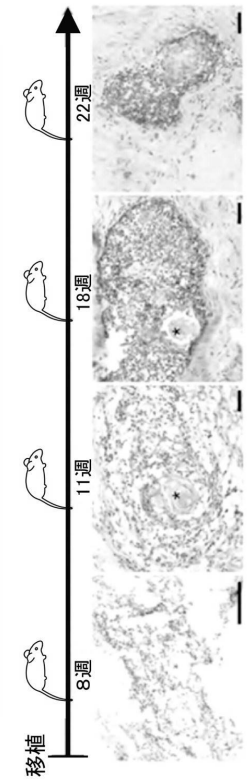
【図３Ｇ】


スキャホールド

【図３Ｈ】


生細胞
CD8-APC
CD4-BV605
SP CD8+
TCRαβ-AF700
CD3-BV711
全細胞
FSC-A
DAPI
SP CD4+
TCRαβ-AF700
CD3-BV711
スキャホールド
FSC-A
SSC-A
生細胞
CD1a-PE-Cy7
CD33-FITC

【図４】


移植
8週
11週
18週
22週

【手続補正書】
【提出日】令和5年8月8日(2023.8.8)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象への移植に適した胸腺構築物の製造方法であって、前記方法は：
（ｉ）無細胞の足場を提供する工程と；
（ｉｉ）間葉特性を有する胸腺上皮細胞を、前記無細胞の足場に播種する工程と；
（ｉｉｉ）前記播種された足場を培養して前記構築物を製造する工程と、
を含む方法。
【請求項２】
前記胸腺上皮細胞が、実質的に全ＣＤ９０＋である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記全ＣＤ９０＋胸腺上皮細胞が、ＶＩＭ及び任意にＴＥ－７も発現する、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
工程（ｉｉ）は、前記胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）と胸腺間質細胞（ＴＩＣ）との両方を、前記無細胞の足場に播種することを含む、請求項１～請求項３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種する、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記胸腺上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞（ｍＴＥＣ）、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）、又は、ｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む、請求項１～請求項５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋並びに、更にＶＩＭ＋、及びＴＥ－７＋からなる群の少なくとも１つである、請求項１～請求項６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記無細胞の足場を、胸腺全体又はその部分若しくは葉を脱細胞化することにより製造し、
前記胸腺、部分又は葉を、界面活性剤、プロテアーゼ及びヌクレアーゼの群から選択される少なくとも１つの脱細胞化媒体を用いた灌流により任意に脱細胞化する、請求項１～請求項８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
工程（ｉｉｉ）は、前記足場中に及び／又は前記足場上に前記胸腺上皮細胞を注入又は灌流することを含む、請求項１～請求項９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
胸腺の再生において使用するための間葉特性を有する胸腺上皮細胞。
【請求項１２】
胸腺疾患、免疫疾患又は自己免疫疾患の治療において使用するための間葉特性を有する胸腺上皮細胞。
【請求項１３】

間葉特性を有する単離された胸腺上皮細胞、及び薬剤的に許容可能な担体を含み、単離された胸腺間質細胞を更に任意に含む、医薬組成物。
【請求項１４】
前記胸腺上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞（ｍＴＥＣ）、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）、又は、ｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種する、請求項１３又は請求項１４に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋並びに、更にＶＩＭ＋、ＴＥ－７＋及びＣＤ９０＋からなる群の少なくとも１つである、請求項１３～請求項１５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋である、請求項１６に記載の医薬組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１４１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１４１】
結論では、ｉｎ　ｖｉｖｏで、持続性の胸腺は、造血及びストローマコンパートメント両方がヒト起源である場合に産生された。かかる系は、Ｔ細胞成長、特定のＭＨＣ－Ｉ及びＩＩを用いた陽性及び陰性選択、非定型Ｔ細胞（例えば、γδ）から、耐性の確立及び維持までの範囲の非常に多くの免疫学的問題に対処する可能性を開く。将来の応用としては、無胸腺症ディジョージ症候群及びＦｏｘｎ１^{ヌル}（ヌード）乳児などの原発性免疫不全における胸腺移植；自己免疫性多腺性内分泌不全症－カンジダ症・外胚葉ジストロフィー（ＡＰＥＣＥＤ）患者としての先天的病態、及び免疫抑制のない臓器移植における耐性の制御を挙げることができる。
＜付記＞
本開示は以下の態様を含む。
＜項１＞
対象への移植に適した胸腺構築物の製造方法であって、前記方法は：
（ｉ）無細胞の足場を提供する工程と；
（ｉｉ）間葉特性を有する胸腺上皮細胞を、前記無細胞の足場に播種する工程と；
（ｉｉｉ）前記播種された足場を培養して前記構築物を製造する工程と、
を含む方法。
＜項２＞
工程（ｉｉ）は、前記胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）と胸腺間質細胞（ＴＩＣ）との両方を、前記無細胞の足場に播種することを含む、＜項１＞に記載の方法。
＜項３＞
前記胸腺上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞（ｍＴＥＣ）、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）、又は、好ましくはｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む、＜項１＞又は＜項２＞に記載の方法。
＜項４＞
前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、好ましくは４：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～８：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、最も好ましくはおよそ５：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種する、＜項３＞に記載の方法。
＜項５＞
前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋並びに、好ましくは更にＶＩＭ＋、ＴＥ－７＋及び

ＣＤ９０＋を含む群の少なくとも１つである、＜項１＞～＜項４＞のいずれか一項に記載の方法。

＜項６＞

前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋である、＜項５＞に記載の方法。

＜項７＞

前記無細胞の足場を、胸腺全体又はその部分若しくは葉を脱細胞化することにより製造する、＜項１＞～＜項６＞のいずれか一項に記載の方法。

＜項８＞

前記胸腺、部分又は葉を、界面活性剤、プロテアーゼ及びヌクレアーゼの群から選択される少なくとも１つの脱細胞化媒体を用いた灌流により脱細胞化する、＜項７＞に記載の方法。

＜項９＞

工程（ｉｉｉ）は、前記足場中に及び／又は前記足場上に前記胸腺上皮細胞を注入又は灌流することを含む、＜項１＞～＜項８＞のいずれか一項に記載の方法。

＜項１０＞

胸腺の再生において使用するための間葉特性を有する胸腺上皮細胞。

＜項１１＞

胸腺疾患、免疫疾患又は自己免疫疾患の治療において使用するための間葉特性を有する胸腺上皮細胞。

＜項１２＞

間葉特性を有する単離された胸腺上皮細胞、及び薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

＜項１３＞

単離された胸腺間質細胞を更に含む、＜項１２＞に記載の医薬組成物。

＜項１４＞

前記胸腺上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞（ｍＴＥＣ）、胸腺皮質上皮細胞（ｃＴＥＣ）、又は、好ましくはｍＴＥＣ及びｃＴＥＣの組合せを含む、＜項１２＞又は＜項１３＞に記載の医薬組成物。

＜項１５＞

前記ＴＥＣ及びＴＩＣを、３：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～１０：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、好ましくは４：１　ＴＥＣ：ＴＩＣ～８：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比、最も好ましくはおよそ５：１　ＴＥＣ：ＴＩＣの比で播種する、＜項１２＞～＜項１４＞のいずれか一項に記載の医薬組成物。

＜項１６＞

前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋並びに、好ましくは更にＶＩＭ＋、ＴＥ－７＋及びＣＤ９０＋を含む群の少なくとも１つである、＜項１２＞～＜項１５＞のいずれか一項に記載の医薬組成物。

＜項１７＞

前記胸腺上皮細胞は、ＣＤ４９ｆ＋及びＣＤ９０＋である、＜項１６＞に記載の医薬組成物。

＜項１８＞

＜項１＞～＜項９＞のいずれか一項に記載の方法により得られた又は得ることができる胸腺構築物。

＜項１９＞

治療において使用するための＜項１８＞に記載の胸腺構築物。

＜項２０＞

臓器移植方法であって、前記方法は、＜項１９＞に記載の胸腺構築物を患者に外科的移植することを含む、方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/053216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61L27/36 A61L27/38
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61L

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tajima Asako ET AL: "Construction of Thymus Organoids from Decellularized Thymus Scaffolds : Stem Cells, Structure, and Function" In: "Plant Transcription Factors :Methods and Protocols Methods in Molecular Biology", 1 January 2016 (2016-01-01), Springer, New York, NY, XP055876903, ISSN: 1064-3745 ISBN: 978-1-4939-3385-3 vol. 1576, pages 33-42, DOI: 10.1007/7651_2016_9, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389928/pdf/nihms829745.pdf> Abstract page 3, paragraph 3.1 page 4, paragraph 3.2 -/--	1,3, 7-12, 18-20

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 February 2022	28/02/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Dudás, Eszter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/053216

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 5, paragraph 3.3 page 6, paragraph 3.4 -----	
X	WO 2019/220091 A1 (UCL BUSINESS LTD [GB]) 21 November 2019 (2019-11-21) page 1, line 5 - line 8 page 2, line 34 - line 36 page 6, line 32 - page 7, line 15 page 4, line 32 - line 33 page 8, line 26 - line 34 page 8, line 35 - page 9, line 2 page 9, line 29 - page 10, line 7 page 11, line 22 - line 26 -----	1-4, 7-15, 18-20
A	HUN MICHAEL ET AL: "Native thymic extracellular matrix improvesin vivothymic organoid T cell output, and drivesin vitrothymic epithelial cell differentiation", BIOMATERIALS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 118, 30 November 2016 (2016-11-30), pages 1-15, XP029860656, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.11.054 abstract -----	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/053216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019220091 A1	21-11-2019	CN 112272517 A	26-01-2021
		EP 3793356 A1	24-03-2021
		JP 2021522831 A	02-09-2021
		US 2021187164 A1	24-06-2021
		WO 2019220091 A1	21-11-2019

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

フロントページの続き

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

Fターム（参考）
CA44
4C081 AB11 CD34 EA01
4C087 AA01 AA02 BB42 BB64 MA66 MA67 NA14 ZB07