(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7610533号
(P7610533)

(45)発行日　令和7年1月8日(2025.1.8)

(24)登録日　令和6年12月24日(2024.12.24)

(51)国際特許分類

		FI		
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	5/071	ZNA
C12N	*5/0789(2010.01)*	C12N	5/0789	
C12N	*5/0781(2010.01)*	C12N	5/0781	
C12N	*5/0783(2010.01)*	C12N	5/0783	

請求項の数　13　（全57頁）

(21)出願番号　特願2021-570130(P2021-570130)
(86)(22)出願日　令和2年5月29日(2020.5.29)
(65)公表番号　特表2022-534397(P2022-534397A)
(43)公表日　令和4年7月29日(2022.7.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/035385
(87)国際公開番号　WO2020/243613
(87)国際公開日　令和2年12月3日(2020.12.3)
審査請求日　令和5年5月29日(2023.5.29)
(31)優先権主張番号　62/855,524
(32)優先日　令和1年5月31日(2019.5.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/855,536
(32)優先日　令和1年5月31日(2019.5.31)
最終頁に続く

(73)特許権者　500469235
チルドレンズ ホスピタル メディカル センター
アメリカ合衆国４５２２９－３０３９ オハイオ州，シンシナティ，バーネット アベニュー ３３３３
(74)代理人　100104411
弁理士　矢口 太郎
(72)発明者　武部 貴則
アメリカ合衆国、４５２２９－３０３９ オハイオ州、シンシナティ、３３３３ バーネット アベニュー、エムエルシー ７０３２、シー／オー チルドレンズ ホスピタル メディカル センター
(72)発明者　ルイス、カイル
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　造血幹細胞の生成および拡大方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

造血幹細胞（ＨＳＣ）を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法であって、

前腸スフェロイドを、前記前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することであって、前記前腸スフェロイドを培養することは、ノッチ活性化因子またはノッチリガンドと接触させることを含む、培養することを含み、

前記肝臓オルガノイドが、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含み、

前記前腸スフェロイドが、間葉を含む、方法。

【請求項２】

前記ノッチ活性化因子またはノッチリガンドが、

ａ）ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせ、および／または、

ｂ）ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２の１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを発現する細胞

を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記前腸スフェロイドが、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上のノッチ活性化因子またはノッチリガンドを発現する細胞をさらに含む、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

前記前腸スフェロイドを培養することは、前記前腸スフェロイドを、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることをさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記前腸スフェロイドを培養することは、前記前腸スフェロイドを、幹細胞因子（ＳＣＦ）もしくはトロンボポエチン（ＴＰＯ）、またはその両方と接触させることをさらに含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記肝臓オルガノイドから、前記造血性内皮集団もしくは前記造血幹細胞、またはその両方を単離することをさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記造血性内皮集団もしくは前記造血幹細胞、またはその両方を単離することは、ＣＤ３４$^+$、ＣＤ４５$^+$、またはその両方である前記肝臓オルガノイドから細胞集団を選別することによって実施される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記肝臓オルガノイドからリンパ球細胞を単離することをさらに含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記リンパ球細胞が、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、または一般的なリンパ球前駆細胞のうちの１つ以上を含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記Ｂ細胞が、Ｂ１細胞もしくはＢ２細胞、またはその両方である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記肝臓オルガノイドから単一細胞懸濁液を作製し、間質細胞上で前記単一細胞懸濁液を培養した後に前記リンパ球細胞を単離することをさらに含み、間質細胞上で前記単一細胞懸濁液を培養することは、前記単一細胞懸濁液においてリンパ球細胞を拡大する、請求項８～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記単一細胞懸濁液を、ＦＬＴ３リガンド、ＳＣＦ、もしくはＩＬ－７のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記肝臓オルガノイドから単一細胞懸濁液を作製し、間質細胞上で前記単一細胞懸濁液を培養した後に前記リンパ球細胞を単離することをさらに含み、間質細胞上で前記単一細胞懸濁液を培養することは、前記単一細胞懸濁液においてリンパ球細胞を拡大し、前記Ｂ１細胞が、ＣＤ２０$^+$ＣＤ４３$^+$ＣＤ２７$^+$であり、前記Ｂ１細胞を単離することは、ＣＤ２０$^+$、ＣＤ４３$^+$、ＣＤ２７$^+$のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせである前記単一細胞懸濁液から細胞集団を選別することによって実施される、請求項１０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
この出願は、２０１９年５月３１日に出願された米国仮特許出願第６２／８５５，５２４号および２０１９年５月３１日に出願された米国仮特許出願第６２／８５５，５３６号の優先権の利益を主張し、これらのそれぞれは、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表の参照
本出願は、電子形式の配列表とともに提出されている。配列表は、ＣＨＭＣ６３＿０１

９ＷＯＳｅｑＬｉｓｔｉｎｇ．ＴＸＴという名称のファイルとして提供され、２０２０年５月１８日に作成され、最終更新され、サイズは２，０７７バイトである。電子配列表の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００３】

本開示の態様は、一般に、造血幹細胞組成物およびそれらの製造方法に関する。

【背景技術】

【０００４】

臨床的には、骨髄由来の造血幹細胞（ＨＳＣ）移植は、世界中で１年に４０，０００回超実施されている一般的な手順である。これらの移植は、様々な種類の血液がん、免疫障害、および血液細胞の遺伝子欠損を治療するために行われ得る。ＨＳＣ移植は、自己（患者自身の細胞を使用する）または同種異系（ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）適合ドナーを使用する）のいずれかで実施され得る。しかしながら、自家移植は、患者自身の健康な細胞の利用可能性が限られているため、多くの場合選択肢ではなく、同種異系移植は、慢性であり得る移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）をもたらし、患者を感染のリスクにさらす免疫抑制剤を必要とし得る。このため、同種異系移植は生存率が低い。

【０００５】

臍帯血（ＵＣＢ）からＨＳＣを収集して患者に使用することができるが、この方法で得ることができる細胞の数は限られており、現在、インビトロでそれらの数を大幅に拡大する培養方法はない。さらに、ｉＰＳＣからＨＳＣを産生する以前の試みでは、未知のリスクをもたらす外来導入遺伝子の導入が必要であるため、潜在的な臨床応用が阻まれている。例えば、自家または同種異系移植で使用するために、ＨＳＣの強力な産生および拡大に対する必要性が現在および永続的に存在する。

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２０１６／０００２６０２号明細書

（特許文献２）　国際公開第２０１８／０８５６１５号

（非特許文献）

（非特許文献１）　ＺＨＡＮＧ ｅｔ ａｌ．"Ｔｈｅ ｅｘｉｓｔｅｎｃｅ ｏｆ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ－ｔｏ－ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ａｂｉｌｉｔｙ ｔｏ ｓｕｐｐｏｒｔ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｓｉｓ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｆｅｔａｌ ｌｉｖｅｒ" Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｍａｒｃｈ ２００５，Ｖｏｌ ２９，Ｎｏ ３，ｐｐ ２１３－２１９；ｐｇ ２１４，ｃｏｌ １，ｐａｒａ ２，ｐｇ ２１５，ｃｏｌ １，ｐａｒａ ２，ｐｇ ２１６，ｃｏｌ ２，ｐａｒａ ２，ｐｇ ２１７，ｃｏｌ １，ｐａｒａ １，ｐｇ ２１８，Ｔａｂｌｅ ２

（非特許文献２）　ＪＯＮＥＳ ｅｔ ａｌ．"Ｓｔｒｏｍａｌ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｊａｇｇｅｄ １ Ｐｒｏｍｏｔｅｓ Ｃｏｌｏｎｙ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｂｙ Ｆｅｔａｌ Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ" Ｂｌｏｏｄ，１ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ １９９８，Ｖｏｌ ９２，Ｎｏ ５，ｐｐ １５０５－１５１１；ａｂｔｒａｃｔ

【発明の概要】

【０００６】

本開示のいくつかの態様は、造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することは、前腸スフェロイドを、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子、Ｗｎｔシグナル伝達経路活性化因子、もしくはＢＭＰ阻害剤のうちの

１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することは、前腸スフェロイドを、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子もしくはＷｎｔシグナル伝達経路活性化因子、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子は、ＦＧＦ４である。いくつかの実施形態では、Ｗｎｔシグナル伝達経路活性化因子は、ＣＨＩＲ９９０２１である。いくつかの実施形態では、ＢＭＰ阻害剤はノギンである。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをノッチ活性化因子またはリガンドと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせであるか、それらを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを発現する細胞であるか、それを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上のノッチ活性化因子またはリガンドを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、幹細胞因子（ＳＣＦ）もしくはトロンボポエチン（ＴＰＯ）、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをレチノイン酸（ＲＡ）と接触させることを含まない。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、デキサメタゾン、オンコスタチンＭ、もしくは肝細胞成長因子のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含まない。いくつかの実施形態では、造血幹細胞は、ＥＲＧ、ＨＯＸＡ５、ＨＯＸＡ９、ＨＯＸＡ１０、ＬＣＯＲ、ＲＵＮＸ１、ＳＰＩ１、ＦＯＳＢ、もしくはＧＦＩ１のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを外因的に発現していない。いくつかの実施形態では、方法は、肝臓オルガノイドから、造血性内皮集団もしくは造血幹細胞、またはその両方を単離することを含む。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団もしくは造血幹細胞、またはその両方を単離することは、ＣＤ３４＋、ＣＤ４５＋、またはその両方である肝臓オルガノイドから細胞集団を選別することによって実施される。いくつかの実施形態では、方法は、人工多能性幹細胞を、人工多能性幹細胞を胚体内胚葉に分化させるのに十分な条件下で培養することと、胚体内胚葉を、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件下で培養した後に、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、胚体内胚葉を、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件下で培養した後に、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。

【０００７】

本開示のいくつかの態様は、肝臓オルガノイドに関する。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される方法のうちのいずれか１つによって産生された肝臓オルガノイドである。

【０００８】

本開示のいくつかの態様は、造血性内皮集団に関する。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、本明細書に開示される方法のうちのいずれか１つによって産生される。

【０００９】

本開示のいくつかの態様は、造血幹細胞に関する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞は、本明細書に開示される方法のうちのいずれか１つによって産生される。

【００１０】
本開示のいくつかの態様は、肝臓オルガノイドからリンパ球細胞を単離するための方法に関する。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される方法のうちのいずれか１つによって産生された肝臓オルガノイドのうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された肝臓オルガノイドのうちのいずれか１つから単離される。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、または一般的なリンパ球前駆細胞のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ１細胞である。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ２細胞である。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ１細胞およびＢ２細胞の両方である。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞を単離する前に、方法は、肝臓オルガノイドから単一細胞懸濁液を作製し、間質細胞上で単一細胞懸濁液を培養することを含む。いくつかの実施形態では、間質細胞上で単一細胞懸濁液を培養することは、単一細胞懸濁液においてリンパ球細胞を拡大する。いくつかの実施形態では、間質細胞は、ＭＳ－５細胞である。いくつかの実施形態では、単一細胞懸濁液を、ＦＬＴ３リガンド、ＳＣＦ、もしくはＩＬ－７のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、$CD20^+CD43^+CD27^+$である。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞を単離することは、$CD20^+$、$CD43^+$、$CD27^+$のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせである単一細胞懸濁液から細胞集団を選別することによって実施される。
【００１１】
本開示のいくつかの態様は、リンパ球細胞に関する。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生されたリンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞はＢ１細胞であり、Ｂ１細胞は本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生されたＢ１細胞である。
【００１２】
本開示のいくつかの態様は、造血幹細胞の集団を拡大する方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、肝臓オルガノイドと接触して造血幹細胞の集団を培養することを含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血ニッチ環境を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生される肝臓オルガノイドである。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団を培養することは、造血幹細胞の集団を、ＳＣＦもしくはＴＰＯ、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の拡大された集団は、多能性を維持する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、臍帯血、動員された末梢血、骨髄、多能性幹細胞、胚性幹細胞、胎児肝臓、もしくは胎児脾臓、またはそれらの任意の組み合わせから得られる。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、肝臓オルガノイドに対して自家または同種異系である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、個体から得られる。いくつかの実施形態では、個体は、造血幹細胞を必要とする個体である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、個体に由来する人工多能性幹細胞から産生される。
【００１３】
本開示のいくつかの態様は、造血幹細胞の集団を必要とする個体に投与する方法に関する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された造血幹細胞の集団である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、必要とする個体に対して自家または同種異系である。
【００１４】
本開示のいくつかの態様は、細胞組成物に関する。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、造血幹細胞の集団と、肝臓オルガノイドと、を含む。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された造血幹細胞の集団である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生される肝臓オルガノイドである。いくつかの実施

形態では、造血幹細胞の集団および肝臓オルガノイドは、同じ個体に由来する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団および肝臓オルガノイドは、異なる個体に由来する。

【００１５】

本開示のいくつかの態様は、必要とする個体を治療する方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、単離された造血性内皮集団を必要とする個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、単離された造血性内皮集団は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された、単離された造血性内皮集団である。いくつかの実施形態では、方法は、単離された造血幹細胞を必要とする個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、単離された造血幹細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された、単離された造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、単離されたリンパ球細胞を必要とする個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、単離されたリンパ球細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生される単離されたリンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、単離されたＢ１細胞を必要とする個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、単離されたＢ１細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された、単離されたＢ１細胞である。

【００１６】

本明細書で提供される本開示の実施形態は、以下の番号が付けられた代替案によって説明される。

１．肝臓オルガノイドにおいて造血細胞を生成する方法であって、前腸スフェロイドを、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子、Ｗｎｔシグナル伝達経路活性化因子、およびＢＭＰ阻害剤と接触させて、中胚葉細胞集団を有する肝臓オルガノイドを形成することを含み、該肝臓オルガノイドが、造血幹細胞（ＨＳＣ）を産生する、方法。

２．該前腸スフェロイドが間葉を含む、代替案１に記載の方法。

３．該前腸スフェロイドをノッチ活性化因子と接触させることを含む、代替案１または２に記載の方法。

４．該ノッチ活性化因子が、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２、およびそれらの組み合わせから選択される１つ以上のタンパク質から選択される、代替案３に記載の方法。

５．該ノッチ活性化因子が、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２、およびそれらの組み合わせを発現する１つ以上の細胞から選択される、代替案３に記載の方法。

６．該ノッチ活性化因子が、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２のうちの１つ以上、およびそれらの組み合わせを発現する骨髄細胞株である、先行代替案のいずれかに記載の方法。

７．該肝臓オルガノイドをサイトカインと接触させるステップを含む、先行代替案のいずれかに記載の方法。

８．該サイトカインが、約１～約１０ｎｇ／ｍＬ、約２～約１５ｎｇ／ｍＬ、約３～約２０ｎｇ／ｍＬ、約４～約２５ｎｇ／ｍＬ、または約５～約３０ｎｇ／ｍＬの濃度で添加される、代替案７に記載の方法。

９．該ＨＬＯが、アルブミン（遺伝子受入番号ＨＧＮＣ：３９９）、アルファ－フェトプロテイン（ＨＧＮＣ：３１７）、およびエリスロポエチン（ＨＧＮＣ：３４１５）のうちの１つ以上を発現する、代替案１に記載の方法。

１０．該造血幹細胞（ＨＳＣ）が、フローサイトメトリーによって、ｌｉｎ－、ＣＤ３４＋、ＣＤ３８－、ＣＤ９０＋、ＣＤ４５ＲＡ－、ＣＤ４９ｆ＋のうちの１つ以上として特定される、先行代替案のいずれかに記載の方法。

１１．該造血幹細胞が、ＨＬＯ培養において約１／１０，０００個の細胞の濃度である、先行代替案のいずれかに記載の方法。

１２．該ノッチ活性化因子が、ノッチ４（ＨＧＮＣ：７８８４）を活性化する、代替案３に記載の方法。

１３．幹細胞の集団を拡大するための方法であって、肝臓オルガノイドの存在下で該幹細胞を培養することを含む、方法。
１４．該幹細胞が、臍帯血、末梢血、胎児肝臓、胎児脾臓、骨髄、腸、卵黄嚢、またはそれらの組み合わせから得られる、代替案１３に記載の方法。
１５．該拡大された幹細胞が、多能性を維持する、代替案１３または１４に記載の方法。
１６．該幹細胞が、幹細胞による治療を必要とする個体から得られる、先行代替案のいずれかに記載の方法。
１７．該拡大された幹細胞を、それを必要とする個体に投与することを含む、先行代替案のいずれかに記載の方法。
１８．拡大前、拡大中、および拡大後から選択される１つ以上の期間で該幹細胞を遺伝子修飾することを含む、先行代替案のいずれかに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【００１７】
上記の特徴に加えて、追加の特徴および変形例は、以下の図面および例示的な実施形態の説明から容易に明らかになるであろう。これらの図面は実施形態を示しており、範囲を限定することを意図するものではないことを理解されたい。

【００１８】
【図１Ａ】肝臓オルガノイド分化方法の概略図の実施形態を示す。
【図１Ｂ】ヘマトキシリン／エオシンを含むマトリゲル液滴における１８日目の肝臓オルガノイド培養物の組織学、ならびにアルブミン、アルファ－フェトプロテイン、ＣＤ３４、およびＣＤ４５の免疫組織化学（ＩＨＣ）の実施形態を示す。ボックス領域は、右下の挿入図に拡大画像として示される。
【図１Ｃ】ｒｔ－ＰＣＲによって測定された、異なる日の肝臓オルガノイド培養物におけるＣＤ３４、ＡＦＰ、ＨＢＧ１、およびＡＬＢの発現の実施形態を示す。
【図１Ｄ】ＥＬＩＳＡで測定された、肝臓分化培地（ＲＡ／ＨＣＭ）で培養された肝臓オルガノイド培養物または異なるｉＰＳＣ株（７２＿３、１３８３Ｄ６、４４９）からの未分化肝臓オルガノイド（＋ＦＧＦ＋ＢＭＰ／ＨＣＭおよび＋ＦＧＦ＋ＢＭＰ）培養物によるアルブミン発現の実施形態を示す。
【図２】標識された目的の異なる集団を含む１４日目のオルガノイド培養物からのｓｃＲＮＡ－ｓｅｑデータのｔ－ＳＮＥプロットの実施形態を示す。
【図３】標識された肝臓、内皮／ＨＳＣ、および赤血球集団を含む１４日目のオルガノイド培養物からのｓｃＲＮＡ－ｓｅｑデータのｔ－ＳＮＥプロットの実施形態を示す。
【図４Ａ－Ｃ】（Ａ）肝集団、（Ｂ）造血性内皮集団、および（Ｃ）赤血球集団を示す関連遺伝子のｔ－ＳＮＥプロットの実施形態を示す。
【図５Ａ】１４日目のオルガノイド培養物の細胞から実施されたＣＦＣアッセイ後のギムザ染色からの代表的な画像の実施形態を示す。
【図５Ｂ】ＣＤ３４$^{+}$ＵＣＢ細胞、１８日目の肝臓オルガノイド細胞、および未分化ｉＰＳＣからのコロニー形成単位のアッセイの実施形態を示す。
【図６Ａ】ＥｐＣＡＭ染色された肝臓オルガノイド細胞、ＣＤ３４染色された内皮細胞、およびＧＹＰＡ染色された赤血球の隣接するクラスターの存在を示す免疫蛍光画像の実施形態を示す。
【図６Ｂ】１８日目のオルガノイド培養物におけるＣＤ３４およびＣＤ４５のＩＨＣ染色の実施形態を示す。
【図６Ｃ】１１、１３、および１５日目の時点でのオルガノイド培養物においてＣＤ３４を検出するフローサイトメトリープロットの実施形態を示す。
【図６Ｄ】ＵＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$対照と比較した、分化の異なる日のオルガノイド培養物の細胞から形成されたコロニーの数を示すグラフの実施形態を示す。
【図６Ｅ】異なる日のオルガノイド培養物におけるＨＥＳ１の発現レベルを示すｑＰＣＲの結果を示すグラフの実施形態を示す。
【図７Ａ】ＣＤ３４およびノッチシグナル伝達に関連するいくつかの遺伝子を共発現する

細胞の集団を示すｓｃＲＮＡ－ｓｅｑデータのｔ－ＳＮＥプロットの実施形態を示す。
【図７Ｂ】肝臓オルガノイドを調製し、培養６日目にＤＬＬ４を添加する概略図の実施形態を示す。
【図８】ＤＬＬ４およびサイトカイン（ＩＬ－３、ＩＬ－３４、ＧＭ－ＣＳＦ）を添加した後の肝臓オルガノイド培養物におけるＣＤ４５発現の実施形態を示す。
【図９Ａ】１８日目のオルガノイドにおけるＩＬ－６発現のｑＰＣＲの結果を示すグラフの実施形態を示す（Ｎ＝陰性対照、Ｄ＝ＤＬＬ４添加、Ｃ＝サイトカイン添加、ＤＣ＝ＤＬＬ４およびサイトカイン添加）。
【図９Ｂ】１８日目のオルガノイドにおけるアルブミン発現のｑＰＣＲの結果を示すグラフの実施形態を示す（Ｎ＝陰性対照、Ｄ＝ＤＬＬ４添加、Ｃ＝サイトカイン添加、ＤＣ＝ＤＬＬ４およびサイトカイン添加）。
【図１０Ａ】１２日間の処理後のＤＭＳＯ対照または１００μＭのＤＡＰＴのいずれかを含むオルガノイド培養物の光学顕微鏡画像の実施形態を示す。
【図１０Ｂ】培養６日目にＤＡＰＴを４日間添加する（培養１０日目にＤＡＰＴを除去する）概略図の実施形態を示す。
【図１０Ｃ】４日間の処理後の異なる濃度のＤＡＰＴでのＨＥＳ１発現の実施形態を示す。
【図１０Ｄ】４日間の処理後の異なる濃度のＤＡＰＴでのＡＬＢ発現の実施形態を示す。
【図１１Ａ】共培養系のレイアウトを示す概略図の実施形態を示す。ＭＳ－５細胞は、ＦＬＴ３Ｌ、ＳＣＦ、およびＩＬ－７とともに培養される。
【図１１Ｂ】ＵＣＢ細胞またはオルガノイド培養細胞のいずれかとの２０日目のＭＳ－５共培養物を示す明視野画像の実施形態を示す。
【図１１Ｃ】２６日目のオルガノイド／ＭＳ－５共培養物のフローサイトメトリープロットの実施形態を示す。左端のパネルは、次のパネルでＣＤ４３およびＣＤ２７にさらにゲートされるＣＤ４５およびＣＤ２０サブセットを示す。
【図１２Ａ】ＣＤ３４およびネスチンのＩＨＣを示す１８日目のオルガノイド培養物の組織学の実施形態を示す。
【図１２Ｂ】１８日目のオルガノイド培養物におけるＤＡＰＩ、ＣＤ３４、およびネスチンを示す免疫蛍光画像の実施形態を示す。
【図１２Ｃ】ＴＰＯおよびＳＣＦの発現を示すｓｃＲＮＡ－ｓｅｑデータのｔ－ＳＮＥプロットの実施形態を示す。
【図１２Ｄ】ＳＣＦおよびＴＰＯを添加した場合と添加しない場合の１８日目のオルガノイド培養物におけるＣＤ３４およびＣＤ４５のフローサイトメトリープロットの実施形態を示す。
【図１２Ｅ】オルガノイド培養６日目にＵＣＢ細胞、ＳＣＦ、およびＴＰＯを添加した後、オルガノイド培養１８日目にマトリゲル液滴あたり産生されたＣＦＣコロニーの数を示すグラフの実施形態を示す。「Ｈ＋Ｕ」は、マトリゲル液滴において組み合わされたＨＬＯおよびＵＣＢ細胞を示す。
【図１２Ｆ】１０００個のＵＣＢ細胞あたり形成されたＣＦＣコロニーの数を示すグラフの実施形態を示す。Ｘ軸はオルガノイド培養日数を示す。オルガノイド培養６日目にＵＣＢ細胞をＨＬＯと組み合わせた。「ＵＣＢ」は、ＨＬＯと共培養されていない新鮮なＵＣＢ細胞対照を示す。「ＤＭＥＭ－ＲＡ」は、ａｄｖａｎｃｅｄ　ＤＭＥＭのみ（レチノイン酸なし）で共培養されたＵＣＢ細胞およびＨＬＯを示す。「ＨＣＭ」は、４日間のＤＭＥＭ＋ＲＡ（オルガノイド培養６～１０日目）、続いてＨＣＭ肝臓分化培地で共培養されたＵＣＢ細胞およびＨＬＯを示す。
【図１２Ｇ】図１２Ｆに示される異なる条件でのＣＦＣアッセイにおける異なるコロニー型の相対量を示すグラフの実施形態を示す。
【図１３Ａ】マウス生着実験のレイアウトを示す概略図の実施形態を示す。
【図１３Ｂ】細胞を注射した７週間後のマウスからの単離されたＰＭＢＣにおいてＣＤ４５を検出するフローサイトメトリーブロットの実施形態を示す。
【発明を実施するための形態】

【００１９】
人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）からの造血幹細胞（ＨＳＣ）の作製は、臨床使用の大きな可能性を秘めているが、これまでのところ達成しがたかった。最近の成功は、直接変換のために外因性遺伝子（例えば、ＥＲＧ、ＨＯＸＡ５、ＨＯＸＡ９、ＨＯＸＡ１０、ＬＣＯＲ、ＲＵＮＸ１、ＳＰＩ１、ＦＯＳＢ、またはＧＦＩ１）をｉＰＳ細胞または内皮細胞のいずれかに追加することで見られた。しかしながら、この偉業に必要なゲノム操作は、任意の潜在的な臨床翻訳を制限する。同時に、オルガノイド培養系の出現により、最近、複数の細胞型からなる複雑な系を模倣し、制御された環境でそれらを経時的に研究するための強力なツールが研究者に提供された。本明細書に開示されるオルガノイド系は、胎児肝臓微小環境の複雑なニッチを再作製し、クリニックで使用するための細胞を作製することを目的として、インビトロで造血を研究するより効率的な方法を提供する。オルガノイド系における造血細胞の産生は、ＰＣＴ公開第２０２０／０５６１５８号で検討されている。

【００２０】
胎児肝臓における造血は、ＨＳＣが大規模に拡大する独特の時間枠である。このため、ＨＳＣニッチとしてモデル化するのに特に魅力的である。ＨＳＣは培養物中で維持することができないため、これまでのところインビトロでの拡大は限られているが、成長因子のカクテルを使用したマウスＨＳＣで、最近、ある程度の成功が見られた。インビトロＨＳＣ拡大のための現在の最先端技術は、細胞を維持および拡大するために造血サイトカインを含む培地の系を実現する。しかしながら、これは、直接および一時的なシグナル伝達を介して相互作用する複数の細胞型を含む複雑な微小環境を完全には再現しない。本明細書に記載のオルガノイド系は、治療用途のＨＳＣの拡大を可能にする方法でこのニッチをモデル化する独特な機会を提供する。

【００２１】
胎児肝臓の微小環境をモデル化することにより、胎児発生中に分化する造血細胞の独特の型であるＢ１細胞の作製が可能になる。これらの細胞は、特に胎児肝臓で作られ、脾臓および腹膜において出生後非常に低いレベルでしか存在しない。成体では非常に少量であるため、ほとんどのＢ１細胞研究ではマウス細胞を使用するが、ヒトのＢ１細胞はまだ完全には説明されておらず、潜在的な前駆細胞集団はまだ不明である。Ｂ１細胞のもう１つの態様は、刺激を受けることなくＩｇＭを分泌する能力である。このため、それらはワクチン接種中の初期応答に関与する。それらの分化および発生に関する追加の分析は、インビトロでのそれらの作製を可能にし、抗体の有用な供給源を提供し、潜在的なワクチン開発を支援する可能性がある。

【００２２】
本明細書に記載のオルガノイド系は、大きな臨床的影響を与えるために配置される。ＨＳＣ移植を必要とする患者からの細胞は、生成されたｉＰＳＣを有し、それを使用して、拒絶反応およびＧＶＨＤのリスクなしに再移植することができるカスタマイズされたＨＳＣを作製することができるため、自家または同種異系移植で使用するためのＨＳＣの大量供給の必要性を満たす。

【００２３】
以下の発明を実施するための形態では、その一部を形成する添付の図面を参照する。図面では、文脈上別段の指示がない限り、典型的には、類似の記号は類似の構成要素を特定する。発明を実施するための形態、図面、および特許請求の範囲に記載の例示的な実施形態は、限定することを意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨または範囲から逸脱することなく、他の実施形態を利用することができ、他の変更を行うことができる。本明細書に一般的に記載され、図に例示される本開示の態様は、多種多様の異なる構成で配置する、置換する、組み合わせる、分離する、および設計することができ、それらはすべて明示的に企図されることが容易に理解されよう。

【００２４】
別段の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本開示が属

する当業者が本開示に照らして読んだときに一般に理解されるのと同じ意味を有する。本開示の目的のために、以下の用語を以下に説明する。

【００２５】

本明細書の実施形態は、一般に、多数の実施形態を説明するために肯定的な言葉を使用して開示される。実施形態はまた、物質または材料、方法のステップおよび条件、プロトコル、または手順などの主題が全体的または部分的に除外されるものを含む。

【００２６】

冠詞「ａ」および「ａｎ」は、本明細書では、冠詞の文法的目的語の１つまたは２つ以上（例えば、少なくとも１つ）を指すために使用される。例として、「要素」は、１つの要素または２つ以上の要素を意味する。

【００２７】

「約」とは、参照数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して１０％程度変動する数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【００２８】

本明細書全体を通して、文脈上別段の必要がない限り、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、および「含むこと」という語は、記載されたステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を含むことを意味するが、任意の他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を除外することを意味するものではないと理解される。「からなる」とは、「からなる」という句に続くものを含み、これに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という句は、列記された要素が必要または必須であり、他の要素が存在しない可能性があることを示す。「本質的にからなる」とは、句の後に列記された任意の要素を含むことを意味し、列記された要素の開示において指定された活動または行動を妨害しないか、またはそれに寄与しない他の要素に限定される。したがって、「本質的にからなる」という句は、列記された要素が必要または必須であることを示すが、他の要素は任意選択であり、列記された要素の活動または行動に重大な影響を与えるかどうかに応じて存在してもしなくてもよい。

【００２９】

本明細書で使用される場合、「個体」、「対象」、または「患者」という用語は、本明細書に照らして理解されるそれらの明白な通常の意味を有し、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、非ヒト霊長類、または鳥、例えば、ニワトリ、ならびに任意の他の脊椎動物または無脊椎動物を意味する。「哺乳動物」という用語は、通常の生物学的意味で使用される。したがって、これには、サル（ｓｉｍｉａｎ）（チンパンジー、類人猿、サル（ｍｏｎｋｅｙ））、およびヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、げっ歯類、ラット、マウス、モルモットなどを含む霊長類が具体的に含まれるが、これらに限定されない。

【００３０】

本明細書で使用される場合、「有効量」または「有効用量」という用語は、本明細書に照らして理解されるそれらの明白な通常の意味を有し、観察可能な効果をもたらす列挙された組成物または化合物のその量を指す。現在開示されている主題の活性組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、特定の主題および／または用途に対して所望の応答を達成するのに有効な活性組成物または化合物の量を投与するように変えることができる。選択される投与量レベルは、組成物の活性、製剤、投与経路、他の薬物または治療との組み合わせ、治療される状態の重症度、ならびに治療される対象の身体的状態および以前の病歴を含むが、これらに限定されない様々な要因に依存する。いくつかの実施形態では、最小用量が投与され、用量制限毒性がない場合、用量は最小有効量に増量される。本明細書では、有効用量の決定および調整、ならびにそのような調整をいつどのように行うかの評価が企図される。

【００３１】

本明細書で使用される場合、「機能」および「機能的」という用語は、本明細書に照ら

して理解されるそれらの明白な通常の意味を有し、生物学的、酵素的、または治療的機能を指す。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「阻害する」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、生物学的活性の低減または防止を指す場合がある。低減は、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは１００％のパーセンテージ、約それらのパーセンテージ、少なくともそれらのパーセンテージ、少なくとも約それらのパーセンテージ、それらのパーセンテージ以下、または約それらのパーセンテージ以下で、あるいは前述の値のうちの任意の２つで定義された範囲内の量であり得る。本明細書で使用される場合、「遅延」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、生物学的事象の、そうでない場合に予想されるよりも遅い時間への遅れ、延長、または延期を指す。遅延は、０％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％のパーセンテージ、約それらのパーセンテージ、少なくともそれらのパーセンテージ、少なくとも約それらのパーセンテージ、それらのパーセンテージ以下、もしくは約それらのパーセンテージ以下の遅延であるか、または前述の値のうちの任意の２つで定義された範囲内の量の遅延であり得る。阻害および遅延という用語は、必ずしも１００％の阻害または遅延を示すとは限らない。部分的な阻害または遅延が実現され得る。

【００３３】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、（１）最初に産生されたとき（自然界および／または実験環境であるかにかかわらず）、それが関連する構成要素のうちの少なくとも一部から分離された物質および／もしくは実体、ならびに／または（２）人の手によって産生、調製、および／もしくは製造された物質および／もしくは実体を指す。単離された物質および／または実体は、１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、約９８％、約９９％、実質的に１００％、または１００％と等しい、約それらの％、少なくともそれらの％、少なくとも約それらの％、それらの％以下、または約それらの％以下（または前述の値を含む、および／またはそれらにわたる範囲）の、それらが最初に関連する他の構成要素から分離され得る。いくつかの実施形態では、単離された化学物質は、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、実質的に１００％、または１００％純粋、約それらの％純粋、少なくともそれらの％純粋、少なくとも約それらの％純粋、それらの％以下純粋、または約それらの％以下純粋（または前述の値を含む、および／またはそれらにわたる範囲）である。本明細書で使用される場合、「単離される」物質は、「純粋」であり得る（例えば、他の構成要素を実質的に含まない）。本明細書で使用される場合、「単離された細胞」という用語は、多細胞生物または組織に含まれない細胞を指す場合がある。

【００３４】

本明細書で使用される場合、「インビボ」は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、組織抽出物または死んだ生物とは対照的に、生体、通常は動物、ヒトを含む哺乳動物、および植物内での方法の実施を指す。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「エクスビボ」は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、自然条件の変化がほとんどない生体外での方法の実施を指す。

【００３６】

本明細書で使用される場合、「インビトロ」は、明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、生物学的条件の外、例えばペトリ皿または試験管内での方法の実施を指す。

【００３７】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸分子」という用語は、本明細書に照

らして理解されるそれらの明白な通常の意味を有し、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）などのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、自然に細胞に現れるもの、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって生成された断片、ならびにライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生成された断片を指す。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド（ＤＮＡおよびＲＮＡなど）である単量体、もしくは天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドのエナンチオマー型）、またはその両方の組み合わせから構成され得る。修飾されたヌクレオチドは、糖部分および／またはピリミジンもしくはプリン塩基部分に変化を有し得る。糖修飾には、例えば、１つ以上のヒドロキシル基を、ハロゲン、アルキル基、アミン、およびアジド基に置き換えることが含まれるか、または糖をエーテルもしくはエステルとして官能化することができる。さらに、糖部分全体を、アザ糖および炭素環式糖類似体などの立体的および電子的に類似した構造に置き換えることができる。塩基部分の修飾の例としては、アルキル化プリンおよびピリミジン、アシル化プリンもしくはピリミジン、または他の周知の複素環式置換基が挙げられる。核酸単量体は、ホスホジエステル結合またはそのような連結の類似体によって連結され得る。ホスホジエステル連結の類似体には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、またはホスホルアミデートが含まれる。「核酸分子」という用語はまた、いわゆる「ペプチド核酸」を含み、これは、ポリアミド骨格に結合した天然に存在するまたは修飾された核酸塩基を含む。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。「オリゴヌクレオチド」は、核酸と交換可能に使用することができ、二本鎖または一本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡのいずれかを指し得る。核酸（複数可）は、核酸ベクターまたは核酸構築物（例えば、プラスミド、ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、バクテリオファージ、コスミド、フォスミド、ファージミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、または様々な生物学系における核酸（複数可）の増幅および／または発現に使用され得るヒト人工染色体（ＨＡＣ））に含まれ得る。典型的には、ベクターまたは構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、インデューサー、リボソーム結合部位、翻訳開始部位、開始コドン、停止コドン、ポリアデニル化シグナル、複製起点、クローニング部位、複数のクローニング部位、制限酵素部位、エピトープ、レポーター遺伝子、選択マーカー、抗生物質選択マーカー、標的配列、ペプチド精製タグ、もしくはアクセサリー遺伝子、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない要素を含む。

【００３８】

核酸または核酸分子は、異なるペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする１つ以上の配列を含み得る。これらの１つ以上の配列は、同じ核酸もしくは核酸分子において隣接して、または間に余分な核酸、例えば、リンカー、リピート、もしくは制限酵素部位を入れて、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、もしくは３００塩基長、約それらの塩基長、少なくともそれらの塩基長、少なくとも約それらの塩基長、それらの塩基長以下、もしくは約それらの塩基長以下、または前述の長さのうちの任意の２つで定義される範囲の任意の長さである任意の他の配列により結合され得る。本明細書で使用される場合、核酸の「下流」という用語は、明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、核酸が二本鎖の場合、コード配列（センス鎖）を含む鎖上の前の配列の３'端の後にある配列を指す。本明細書で使用される場合、核酸の「上流」という用語は、明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、核酸が二本鎖の場合、コード配列（センス鎖）を含む鎖上の後続の配列の５'端の前にある配列を指す。本明細書で使用される場合、核酸上の「群化された」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、直接、または間に余分な核酸、例えば、リンカー、リピート、もしくは制限酵素部位を入れて、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、

３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、もしくは３００塩基長、約それらの塩基長、少なくともそれらの塩基長、少なくとも約それらの塩基長、それらの塩基長以下、もしくは約それらの塩基長以下、または前述の長さのうちの任意の２つで定義される範囲の任意の長さである任意の他の配列による（但し、一般に、間に機能または触媒ポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質ドメインをコードする配列は入れない）いずれかで、近接して生じる２つ以上の配列を指す。

【００３９】

本明細書に記載の核酸は、核酸塩基を含む。一次、標準、天然、または未修飾の塩基は、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウラシルである。他の核酸塩基には、プリン、ピリミジン、修飾された核酸塩基、５－メチルシトシン、シュードウリジン、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、ヒポキサンチン、キサンチン、５，６－ジヒドロウラシル、５－ヒドロキシメチルシトシン、５－ブロモウラシル、イソグアニン、イソシトシン、アミノアリル塩基、色素標識塩基、蛍光塩基、またはビオチン標識塩基が含まれるが、これらに限定されない。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書に照らして理解されるそれらの明白な通常の意味を有し、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸から構成される高分子を指す。ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の多くの機能は、当技術分野で知られており、酵素、構造、輸送、防御、ホルモン、またはシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質は、必ずではないが、多くの場合、核酸テンプレートを使用してリボソーム複合体によって生物学的に産生されるが、化学合成も利用することができる。核酸テンプレートを操作することにより、２つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の置換、欠失、短縮、付加、複製、または融合などのペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の変異を実施することができる。２つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質のこれらの融合物は、同じ分子において隣接して、または間に余分なアミノ酸、例えば、リンカー、リピート、エピトープ、もしくはタグを入れて、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、もしくは３００塩基長、約それらの塩基長、少なくともそれらの塩基長、少なくとも約それらの塩基長、それらの塩基長以下、もしくは約それらの塩基長以下、または前述の長さのうちの任意の２つで定義される範囲の任意の長さである任意の他の配列により結合され得る。本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「下流」という用語は、明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、前の配列のＣ末端の後にある配列を指す。本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「上流」という用語は、明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、後続の配列のＮ末端の前にある配列を指す。

【００４１】

本明細書で使用される場合、任意の所与の物質、化合物、または材料の「純度」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、予想される存在量に対する物質、化合物、または材料の実際の存在量を指す。例えば、物質、化合物、または材料は、少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％純粋（その間のすべての小数を含む）であり得る。純度は、核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、脂質、細胞膜、細胞片、小分子、分解産物、溶媒、担体、ビヒクル、もしくは汚染物質、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない望ましくない不純物の影響を受ける可能性がある。いくつかの実施形態では、物質、化合物、または材料は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞核酸、プラスミドＤＮＡ、汚染ウイルス、プロテアソーム、宿主細胞培養構成要素、プロセス関連構成要素、マイコプラズマ、パイロジェン、細菌

内毒素、および外来物質を実質的に含まない。純度は、電気泳動、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、キャピラリー電気泳動、ＰＣＲ、ｒｔＰＣＲ、ｑＰＣＲ、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、分光法、ＵＶ可視分光法、赤外分光法、質量分析法、核磁気共鳴、重量測定、もしくは滴定、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない技術を使用して測定され得る。

【００４２】

本明細書で使用される場合、任意の所与の物質、化合物、または材料の「収率」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、予想される全体量に対する物質、化合物、または材料の実際の全体量を指す。例えば、物質、化合物、または材料の収率は、予想される全体量の８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、もしくは１００％、約それらの％、少なくともそれらの％、少なくとも約それらの％、それらの％以下、または約それらの％以下（その間のすべての小数を含む）である。収率は、反応またはプロセスの効率、望ましくない副反応、分解、投入物質、化合物、もしくは材料の品質、または産生の任意のステップ中の所望の物質、化合物、もしくは材料の損失によって影響を受ける可能性がある。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「ｗ／ｗ％」または「重量／重量％」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、組成物の総重量に対する成分または薬剤の重量に１００を掛けたものに関して表されるパーセンテージを指す。本明細書で使用される場合、「ｖ／ｖ％」または「体積／体積％」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、組成物の総液体体積に対する化合物、物質、成分、または薬剤の液体体積に１００を掛けたものに関して表されるパーセンテージを指す。

【００４４】

本明細書に記載のいくつかの実施形態は、有効量の本明細書に記載の細胞組成物と、薬学的に許容される担体、賦形剤、またはそれらの組み合わせとを含む、本質的にそれらからなる、またはそれらからなる医薬組成物に関する。本明細書に記載の医薬組成物は、ヒトおよび／または獣医の用途に好適である。

【００４５】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、用いられる投与量および濃度でそれに曝露される細胞もしくは哺乳動物に対して無毒であるか、または許容レベルの毒性を有する担体、賦形剤、および／または安定剤を指す。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」「希釈剤」、「賦形剤」、および／または「担体」は、本明細書に照らして理解されるそれらの明白な通常の意味を有し、ヒト、ネコ、イヌ、または他の脊椎動物宿主への投与と適合性のあるありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。典型的には、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、ヒトならびにネコおよびイヌなどの非ヒト哺乳動物を含む動物で使用するために、連邦政府、州政府、もしくは他の規制機関によって承認された、または米国薬局方もしくは他の一般的に認められた薬局方に列記される希釈剤、賦形剤、および／または担体である。希釈剤、賦形剤、および／または「担体」という用語は、医薬組成物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指し得る。そのような医薬希釈剤、賦形剤、および／または担体は、石油、動物、植物または合成由来のものを含む、水および油などの滅菌液体であり得る。水、生理食塩水、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液は、特に注射溶液のための、液体希釈剤、賦形剤、および／または担体として用いることができる。好適な医薬希釈剤および／または賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコー

ル、水、エタノールなどが挙げられる。生理学的に許容される担体の非限定的な例は、ｐＨ緩衝水溶液である。生理学的に許容される担体はまた、以下のうちの１つ以上を含み得る：アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、アミノ酸、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンなどの炭水化物、ＥＤＴＡなどのキレート剤、マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオン、ならびにＴＷＥＥＮ（登録商標）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、およびＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）などの非イオン性界面活性剤。組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤、増量剤、乳化剤、またはｐＨ緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、徐放性製剤などの形態をとることができる。製剤は、投与方法に適合している必要がある。

【００４６】

凍結保護剤は、大きな氷の結晶の形成を防止することにより、低温凍結保存の効率および収率を改善するための細胞組成物添加剤である。凍結保護剤としては、ＤＭＳＯ、エチレングリコール、グリセロール、プロピレングリコール、トレハロース、ホルムアミド、メチル－ホルムアミド、ジメチル－ホルムアミド、グリセロール３－リン酸、プロリン、ソルビトール、ジエチルグリコール、スクロース、トリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、またはヒドロキシエチルデンプンが挙げられるが、これらに限定されない。凍結保護剤は、細胞の解凍後の生存率を向上させるための栄養素（例えば、アルブミン、血清、ウシ血清、ウシ胎仔血清［ＦＣＳ］）などの他の構成要素を含む凍結保存培地の一部として使用され得る。これらの凍結保存培地において、少なくとも１つの凍結保護剤は、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％の濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、または約それらの濃度以下で、または前述の数値のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意のパーセンテージの濃度で見出され得る。

【００４７】

望ましい特性を有する追加の賦形剤としては、防腐剤、アジュバント、安定剤、溶媒、緩衝液、希釈剤、可溶化剤、洗剤、界面活性剤、キレート剤、抗酸化剤、アルコール、ケトン、アルデヒド、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、クエン酸、塩、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化カリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム糖、デキストロース、フルクトース、マンノース、ラクトース、ガラクトース、スクロース、ソルビトール、セルロース、血清、アミノ酸、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、オクチルフェノールエトキシレート、塩化ベンゼトニウム、チメロサール、ゼラチン、エステル、エーテル、２－フェノキシエタノール、尿素、もしくはビタミン、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。一部の賦形剤は、血清、アルブミン、オボアルブミン、抗生物質、不活性化剤、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、β－プロピオラクトン、ゼラチン、細胞片、核酸、ペプチド、アミノ酸、もしくは成長培地構成要素またはそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、製造プロセスからの残留量または汚染物質であり得る。賦形剤の量は、０ｗ／ｗ％、０．１ｗ／ｗ％、０．２ｗ／ｗ％、０．３ｗ／ｗ％、０．４ｗ／ｗ％、０．５ｗ／ｗ％、０．６ｗ／ｗ％、０．７ｗ／ｗ％、０．８ｗ／ｗ％、０．９ｗ／ｗ％、１ｗ／ｗ％、２ｗ／ｗ％、３ｗ／ｗ％、４ｗ／ｗ％、５ｗ／ｗ％、６ｗ／ｗ％、７ｗ／ｗ％、８ｗ／ｗ％、９ｗ／ｗ％、１０ｗ／ｗ％、２０ｗ／ｗ％、３０ｗ／ｗ％、４０ｗ／ｗ％、５０ｗ／ｗ％、６０ｗ／ｗ％、７０ｗ／ｗ％、８０ｗ／ｗ％、９０ｗ／ｗ％、９５ｗ／ｗ％、１００ｗ／ｗ％のパーセンテージ、約それらのパーセンテージ、少なくともそれらのパーセンテージ、少なくとも約それらのパーセ

ンテージ、それらのパーセンテージ以下、もしくは約それらのパーセンテージ以下で、または前述の数値のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の重量パーセンテージで組成物中に見出され得る。

【００４８】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、鎮痛剤、治療薬、他の材料などを含むがこれらに限定されない、組成物または賦形剤の比較的非毒性の無機酸および有機酸または塩基付加塩を含む。薬学的に許容される塩の例としては、塩酸および硫酸などの鉱酸に由来するもの、およびエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸などの有機酸に由来するものが挙げられる。塩の形成に適した無機塩基の例としては、アンモニア、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、亜鉛などの水酸化物、炭酸塩、および重炭酸塩が挙げられる。塩はまた、非毒性であり、そのような塩を形成するのに十分に強いものを含む、好適な有機塩基で形成され得る。例えば、そのような有機塩基のクラスは、メチルアミン、ジメチルアミン、およびトリエチルアミンを含む、モノ－、ジ－、およびトリアルキルアミン；モノ－、ジ－、およびトリエタノールアミンを含む、モノ－、ジ－、またはトリヒドロキシアルキルアミン；グリシン、アルギニン、およびリジンを含む、アミノ酸；グアニジン；Ｎ－メチルグルコサミン；Ｎ－メチルグルカミン；Ｌ－グルタミン；Ｎ－メチルピペラジン；モルホリン；エチレンジアミン；Ｎ－ベンジルフェネチルアミン；トリヒドロキシメチルアミノエタンを含み得るが、これらに限定されない。

【００４９】

適切な製剤は、選択した投与経路に依存する。本明細書に記載の化合物の製剤化および投与のための技術は、当業者に知られている。化合物を投与する複数の技術が当技術分野に存在し、これらに限定されないが、経腸、経口、直腸、局所、舌下、頬、耳内、硬膜外、皮膚上、エアロゾル、非経口送達（筋肉内、皮下、動脈内、静脈内、門脈内、関節内、皮内、腹膜、髄内注射、髄腔内、直接脳室内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射を含む）を含む。医薬組成物は、一般に、特定の意図された投与経路に合わせる。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「担体」は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、細胞、組織、および／または身体器官への化合物の通過、送達、および／または組み込みを容易にする化合物、粒子、固体、半固体、液体、または希釈剤を指す。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「希釈剤」は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、薬理学的活性を欠くが薬学的に必要または望ましい可能性がある医薬組成物中の成分を指す。例えば、希釈剤を使用して、その質量が製造および／または投与するには小さすぎる強力な薬物のかさを増加させることができる。それはまた、注射、摂取、または吸入によって投与される薬物の溶解のための液体であり得る。当技術分野における希釈剤の一般的な形態は、ヒトの血液の組成を模倣するリン酸緩衝生理食塩水などであるがこれに限定されない緩衝水溶液である。

【００５２】

幹細胞

本明細書で使用される場合、「全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞」（全能性（ｏｍｎｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞としても知られる）という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、胚性および胚外細胞型に分化することができる幹細胞である。そのような細胞は、完全で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、卵子および精子細胞の融合から産生される。受精卵の最初の数分割によって産生される細胞も全能性である。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞（ＥＳＣ）」という用語は、一般にＥＳ細胞とも略され、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、多能性であり、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。本開示の目的のために、「Ｅ

ＳＣ」という用語は、胚性生殖細胞を包含するために広義で使用される場合がある。

【００５４】

本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞（ＰＳＣ）」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、体のほぼ全ての細胞型、すなわち、内胚葉（胃内壁、消化管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、および外胚葉（表皮組織および神経系）を含む３つの胚葉（胚上皮）のいずれかに由来する細胞に分化することができる任意の細胞を包含する。ＰＳＣは、着床前胚盤胞の内部細胞塊細胞の子孫であり得るか、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、非多能性細胞、例えば成体体細胞の誘導によって得られてもよい。多能性幹細胞は、任意の好適な供給源に由来し得る。多能性幹細胞の供給源の例は、ヒト、げっ歯類、ブタ、およびウシを含む哺乳動物の供給源を含む。

【００５５】

本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）」という用語は、一般にｉＰＳ細胞とも省略され、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、ある特定の遺伝子の「強制」発現を誘導することによって、通常、非多能性細胞、例えば成体体細胞から人工的に得られた一種の多能性幹細胞を指す。ｈｉＰＳＣは、ヒトｉＰＳＣを指す。当技術分野で知られるいくつかの方法では、ｉＰＳＣは、ある特定の幹細胞関連遺伝子の成体線維芽細胞などの非多能性細胞へのトランスフェクションによって得ることができる。トランスフェクションは、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどのウイルスを使用したウイルス形質導入によって達成され得る。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を含み得るが、他の遺伝子も誘導の効率を向上させ得る。３～４週間後、少数のトランスフェクトされた細胞は、形態学的および生化学的に多能性幹細胞と同様になり始め、通常、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性選択によって単離される。本明細書で使用される場合、ｉＰＳＣは、第一世代ｉＰＳＣ、マウスにおける第二世代ｉＰＳＣ、およびヒト誘導多能性幹細胞を含む。いくつかの方法において、４つの極めて重要な遺伝子であるＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃを使用して多能性幹細胞にヒト線維芽細胞を形質転換するためにレトロウイルス系が使用される。他の方法において、体細胞をＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＮＡＮＯＧ、およびＬＩＮ２８で形質転換するためにレンチウイルス系が使用される。ｉＰＳＣで発現が誘導される遺伝子には、Ｏｃｔ－３／４（ＰＯＵ５Ｆ１）、Ｓｏｘ遺伝子ファミリーのある特定のメンバー（例えば、Ｓｏｘｌ、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ３、およびＳｏｘ１５）、Ｋｌｆファミリーのある特定のメンバー（例えば、Ｋｌｆｌ、Ｋｌｆ２、Ｋｌｆ４、およびＫｌｆ５）、Ｍｙｃファミリーのある特定のメンバー（例えば、Ｃ－ｍｙｃ、Ｌ－ｍｙｃ、およびＮ－ｍｙｃ）、Ｎａｎｏｇ、ＬＩＮ２８、Ｔｅｒｔ、Ｆｂｘ１５、ＥＲａｓ、ＥＣＡＴ１５－１、ＥＣＡＴ１５－２、Ｔｃｌ１、β－カテニン、ＥＣＡＴ１、Ｅｓｇ１、Ｄｎｍｔ３Ｌ、ＥＣＡＴ８、Ｇｄｆ３、Ｆｔｈ１１７、Ｓａｌ１４、Ｒｅｘ１、ＵＴＦ１、Ｓｔｅｌｌａ、Ｓｔａｔ３、Ｇｒｂ２、Ｐｒｄｍ１４、Ｎｒ５ａ１、Ｎｒ５ａ２、もしくはＥ－カドヘリン、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「前駆細胞」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、本明細書に記載の方法で使用することができる任意の細胞を包含し、それを通じて、１つ以上の前駆細胞は、それ自体を再生するか、または１つ以上の特殊化した細胞型に分化する能力を獲得する。いくつかの実施形態では、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。いくつかの実施形態では、前駆細胞は、多能性を獲得するために外部因子（例えば、成長因子）の処理に供される。いくつかの実施形態では、前駆細胞は、全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｔ）（または全能性（ｏｍｎｉｐｏｔｅｎｔ））幹細胞、多能性幹細胞（誘導性または非誘導性）、複能性幹細胞、寡能性幹細胞、および単能性幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、前駆細胞は、胚、乳児、小児、または成人由来であり得る。いくつかの実施形態では、前駆細胞は、

遺伝子操作またはタンパク質／ペプチド処理を介して多能性が付与されるような処理に供される体細胞であり得る。前駆細胞には、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、胚性がん腫細胞（ＥＣ）、および胚盤葉上層幹細胞（ＥｐｉＳＣ）が含まれる。

【００５７】

いくつかの実施形態では、１つのステップは、多能性であるかまたは多能性になるように誘導され得る幹細胞を得ることである。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は胚性幹細胞に由来し、また、この胚性幹細胞は哺乳動物初期胚の全能性細胞に由来し、インビトロで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、当技術分野でよく知られている。ヒト胚性幹細胞Ｈ９（Ｈ９－ｈＥＳＣ）は、本出願に記載の例示的な実施形態で使用されるが、本明細書に記載の方法および系は、任意の幹細胞に適用可能であることが当業者によって理解される。

【００５８】

本開示による実施形態で使用することができる追加の幹細胞には、ＮａｔｉｏｎａｌＳｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｂａｎｋ（ＮＳＣＢ）、Ｓａｎ ＦｒａｎｃｉｓｃｏのＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（ＵＣＳＦ）の、Ｈｕｍａｎ ＥｍｂｒｙｏｎｉｃＳｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ、Ｗｉ Ｃｅｌｌ ＲｅｓｅａｒｃｈＩｎｓｔｉｔｕｔｅのＷＩＳＣ ｃｅｌｌ Ｂａｎｋ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｃｅｎｔｅｒ（ＵＷ－ＳＣＲＭＣ）、Ｎｏｖｏｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、Ｃｅｌｌａｒｔｉｓ ＡＢ（Ｇｏｔｅｂｏｒｇ，Ｓｗｅｄｅｎ）、ＥＳ Ｃｅｌｌ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｐｔｅ Ｌｔｄ（Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ）、Ｉｓｒａｅｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｈａｉｆａ，Ｉｓｒａｅｌ）のＴｅｃｈｎｉｏｎ、およびＰｒｉｎｃｅｔｏｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙおよび Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａによって主宰されるＳｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｄａｔａｂａｓｅによってホストされるデータベースによって提供されるか、または記載されるものが含まれるが、これらに限定されない。本開示による実施形態で使用することができる例示的な胚性幹細胞には、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（１３）、ＴＥ０４（１４）、ＴＥ０６（１６）、ＵＣＯ１（ＨＳＦ１）、ＵＣ０６（ＨＳＦ６）、ＷＡ０１（ＨＩ）、ＷＡ０７（Ｈ７）、ＷＡ０９（Ｈ９）、ＷＡ１３（Ｈ１３）、ＷＡ１４（Ｈ１４）が含まれるが、これらに限定されない。例示的なヒト多能性細胞株には、ＴｋＤＡ３－４、１２３１Ａ３、３１７－Ｄ６、３１７－Ａ４、ＣＤＨ１、５－Ｔ－３、３－３４－１、ＮＡＦＬＤ２７、ＮＡＦＬＤ７７、ＮＡＦＬＤ１５０、ＷＤ９０、ＷＤ９１、ＷＤ９２、Ｌ２００１２、Ｃ２１３、１３８３Ｄ６、ＦＦ、または３１７－１２細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【００５９】

発生生物学では、細胞分化は、より専門化されていない細胞がより専門化された細胞型になるプロセスである。本明細書で使用される場合、「有向分化」という用語は、より専門化されていない細胞が特定の専門化された標的細胞型になるプロセスを記載する。専門化された標的細胞型の特殊性を、最初の細胞の運命を定義または変更するために使用することが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。例示的な方法には、遺伝子操作、化学処理、タンパク質処理、および核酸処理が含まれるが、これらに限定されない。

【００６０】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスを使用して、必要な４つの遺伝子を輸送し、胚性幹細胞と実質的に同一のｉＰＳＣをもたらすことができる。アデノウイルスは、それ自身の遺伝子を標的の宿主と組み合わせないため、腫瘍を創出する危険性が排除される。

いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣを生成するために非ウイルスベースの技術が用いられる。いくつかの実施形態では、非常に低い効率ではあるが、いずれのウイルストランスフェクション系も全く使用せずに、プラスミドを介して再プログラミングを達成することができる。他の実施形態では、タンパク質の直接送達を使用してｉＰＳＣを生成し、そのようにしてウイルスまたは遺伝子修飾の必要性を排除する。いくつかの実施形態では、マウスｉＰＳＣの生成は、同様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に運ばれるある特定のタンパク質による細胞の反復処理は、多能性を誘導するのに十分であった。いくつかの実施形態では、低酸素条件下で体細胞をＦＧＦ２で処理することによって多能性誘導遺伝子の発現を増加させることもできる。

【００６１】

本明細書で使用される場合、「フィーダー細胞」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白な通常の意味を有し、成長因子を培地に分泌するか、または細胞表面に表示することなどによって、多能性幹細胞の成長を支持する細胞を指す。フィーダー細胞は一般に付着細胞であり、成長を停止させてもよい。例えば、フィーダー細胞は、照射（例えば、ガンマ線）、マイトマイシン－Ｃ処理、電気パルス、または穏やかな化学固定（例えば、ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド）によって成長が停止される。しかしながら、フィーダー細胞は必ずしも成長を停止させる必要はない。フィーダー細胞は、成長因子の分泌、細胞表面への成長因子の表示、培養培地の無毒化、または細胞外マトリックスタンパク質の合成などの目的に役立ち得る。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞は、支持された標的幹細胞に対して同種または異種であり、これは、下流の用途に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞は、マウス細胞である。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞は、マウス線維芽細胞、マウス胚性線維芽細胞、マウスＳＴＯ細胞、マウス３Ｔ３細胞、マウスＳＮＬ　７６／７細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト脂肪間葉細胞、ヒト骨髄間葉系細胞、ヒト羊膜間葉系細胞、ヒト羊膜上皮細胞、ヒト臍帯間葉系細胞、ヒト胎児筋細胞、ヒト胎児線維芽細胞、またはヒト成人ファロピウス管上皮細胞である。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞から調製された馴化培地は、フィーダー細胞共培養の代わりに、またはフィーダー細胞共培養と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞は、標的幹細胞の増殖中に使用されない。

【００６２】

血球産生は、単一の細胞型である造血幹細胞から派生し、増殖および分化を通して、全体的な造血系までに至る。造血幹細胞は、自己複製で、幹細胞のそれら自体の集団を拡大することができると考えられ、それらは多能性である（造血系における任意の細胞に分化することができる）。このまれな細胞集団から、リンパ球（免疫系のＢ細胞とＴ細胞）および骨髄細胞（赤血球、巨核球、顆粒球、およびマクロファージ）を含む成熟した造血系全体が形成される。Ｂ細胞およびＴ細胞を含むリンパ系統は、抗体の生成、細胞免疫系の調節、血液中の外来物質の検出、宿主にとって異質である細胞の検出などをもたらす。単球、顆粒球、巨核球、ならびに他の細胞を含む骨髄系統は、異物の存在を監視し、新生物細胞に対する防護をもたらし、異物を除去し、血小板を産生する、などを行う。赤血球系統は、酸素運搬体として機能する赤血球をもたらす。

【００６３】

肝臓は、外因性化合物の解毒および凝固、ならびに脂質、タンパク質、アンモニウム、および胆汁の産生など、生命に不可欠な多くの代謝機能を提供する重要な器官である。初代肝細胞は、高度に極性の代謝細胞型であり、微絨毛で覆われたチャネルを有する毛細胆管構造を形成し、末梢循環を胆汁酸分泌経路から分離する。患者の肝臓のインビトロ再構成は、再生療法、創薬、および薬物毒性研究を含む用途を提供し得る。初代肝細胞を使用した既存の方法論は、必須の解剖学的構造の欠如に主に起因して、非常に貧弱な機能性を示し、製薬産業におけるそれらの実際的使用を制限している。内在化された微絨毛および間葉系細胞を有する管腔構造を含み、肝細胞、星状細胞、クッパー細胞、および肝臓内皮

細胞などの肝臓細胞型を示す肝臓オルガノイドの形成、ならびにそれらの作製および使用の方法は、以前に、ＰＣＴ公開第２０１８／０８５６１５号、同第２０１８／０８５６２２号、同第２０１８／０８５６２３号、および同第２０１８／２２６２６７号に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。

【００６４】

いくつかの実施形態では、ＥＳＣ、生殖細胞、またはｉＰＳＣは、幹細胞の成長を支持する成長培地で培養される。いくつかの実施形態では、ＥＳＣ、生殖細胞、またはｉＰＳＣは、幹細胞成長培地で培養される。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、ＲＰＭＩ １６４０、ＤＭＥＭ、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、Ａｄｖａｎｃｅｄ ＤＭＥＭ、肝細胞培養培地（ＨＣＭ）、ＳｔｅｍＦｉｔ、ｍＴｅＳＲ １、またはｍＴｅＳＲ Ｐｌｕｓ培地である。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、０％、０．１％、０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、０．６％、０．７％、０．８％、０．９％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、もしくは２０％の濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意のパーセンテージ、例えば、０％～２０％、０．２％～１０％、２％～５％、０％～５％、もしくは２％～２０％でＦＢＳを含む。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、異種構成要素を含まない。いくつかの実施形態では、成長培地は、１つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または成長因子を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞を、フィーダー細胞基質上で成長させる。いくつかの実施形態では、幹細胞を、フィーダー細胞基質上で成長させない。いくつかの実施形態では、幹細胞を、ラミニンでコーティングされたプレート上で成長させる。いくつかの実施形態では、幹細胞を、ＦＧＦ２もしくはＲＯＣＫ阻害剤（例えば、Ｙ－２７６３２）、またはその両方を補充して成長させる。いくつかの実施形態では、ＦＧＦ２は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、３００、４００、もしくは５００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１～５００ｎｇ／ｍＬ、１０～２００ｎｇ／ｍＬ、１００～１５０ｎｇ／ｍＬ、１～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～５００ｎｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、ＲＯＣＫ阻害剤は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、もしくは３０ｎＭの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の濃度、例えば、１～３０ｎＭ、５～２５ｎＭ、１０～２０ｎＭ、１～１５ｎＭ、もしくは１０～３０ｎＭである。いくつかの実施形態では、幹細胞を、ラミニンでコーティングされたプレート上で成長させる。

【００６５】

胚体内胚葉分化方法

多能性細胞（例えば、ｉＰＳＣまたはＥＳＣ）から胚体内胚葉（ＤＥ）を産生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。例示的な方法は、例えば、米国特許第９，７１９，０６８号に開示されている。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣを使用して胚体内胚葉を産生する。

【００６６】

いくつかの実施形態では、１つ以上の成長因子が、多能性幹細胞からＤＥ細胞への分化プロセスにおいて使用される。いくつかの実施形態では、分化プロセスで使用される１つ以上の成長因子は、ＴＧＦ－ベータスーパーファミリーからの成長因子を含む。いくつか

の実施形態では、１つ以上の成長因子は、成長因子のＴＧＦ－ベータスーパーファミリーのＮｏｄａｌ／アクチビンおよび／またはＢＭＰサブグループを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の成長因子は、Ｎｏｄａｌ、アクチビンＡ、アクチビンＢ、ＢＭＰ４、またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、もしくは２４０時間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の時間数、例えば、１～２４０時間、２０～１２０時間、３０～５０時間、１～１００時間、もしくは５０～２４０時間、１つ以上の成長因子と接触させる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣを、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、もしくは１０００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１０～１０００ｎｇ／ｍＬ、５０～８００ｎｇ／ｍＬ、１００～５００ｎｇ／ｍＬ、１０～２００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～１０００ｎｇ／ｍＬで、１つ以上の成長因子と接触させる。いくつかの実施形態では、１つ以上の成長因子の濃度は、接触の期間を通して一定のレベルで維持される。いくつかの実施形態では、１つ以上の成長因子の濃度は、接触の期間中に変化する。いくつかの実施形態では、１つ以上の成長因子は、成長培地に溶解される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉細胞が豊富である細胞の集団が使用される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉細胞は、単離されるか、または実質的に精製される。いくつかの実施形態では、単離されたまたは実質的に精製された胚体内胚葉細胞は、ＯＣＴ４、ＡＦＰ、ＴＭ、ＳＰＡＲＣ、またはＳＯＸ７マーカーのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、３、５つ）よりも大きな程度まで、ＳＯＸ１７、ＦＯＸＡ２、またはＣＸＲＣ４マーカーのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、３つ）を発現する。

【００６７】

いくつかの実施形態では、胚体内胚葉細胞を、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と接触させる。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉細胞は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８時間、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下、あるいは前述の日数または時間数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の時間数または日数、例えば、１時間～２０日間、２０時間～１０日間、１時間～４８時間、１日～２０日間、１時間～５日間、または２４時間～２０日間、シグナル伝達経路の１つ以上のモジュレーターで処理される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達経路の１つ以上のモジュレーターの濃度は、接触の期間を通して一定のレベルで維持される。いくつかの実施形態では、シグナル伝達経路の１つ以上のモジュレーターの濃度は、接触の期間中に変化する。

【００６８】

いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるために、胚体内胚葉細胞を、ＦＧＦ経路およびＷｎｔ経路の１つ以上のモジュレーターと接触させる。いくつかの実施形態では、Ｗｎｔおよび／またはＦＧＦシグナル伝達経路に関連する細胞成

分、例えば、経路の天然の阻害剤、アンタゴニスト、活性化因子、またはアゴニストを使用して、Ｗｎｔおよび／またはＦＧＦシグナル伝達経路の阻害または活性化をもたらすことができる。いくつかの実施形態では、Ｗｎｔおよび／またはＦＧＦシグナル伝達経路に関連する細胞成分を標的にするｓｉＲＮＡおよび／またはｓｈＲＮＡを使用して、これらの経路を阻害または活性化する。

【００６９】

線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）は、血管新生、創傷治癒、および胚発生に関与する成長因子のファミリーである。ＦＧＦはヘパリン結合タンパク質であり、細胞表面関連ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用がＦＧＦシグナル伝達に不可欠であることが示されている。ＦＧＦは、多種多様な細胞および組織の増殖および分化のプロセスで重要な役割を果たす。ヒトでは、ＦＧＦファミリーの２２のメンバーが特定されており、そのすべてが構造的に関連するシグナル伝達分子である。メンバーＦＧＦ１～ＦＧＦ１０はすべて、線維芽細胞成長因子受容体（ＦＧＦＲ）に結合する。ＦＧＦ１は酸性としても知られており、ＦＧＦ２は塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）としても知られている。ＦＧＦ相同因子１～４（ＦＨＦ１～ＦＨＦ４）としても知られるメンバーＦＧＦ１１、ＦＧＦ１２、ＦＧＦ１３、およびＦＧＦ１４は、ＦＧＦと比較して明確な機能差を有することが示されている。これらの因子は非常に類似した配列相同性を有するが、それらはＦＧＦＲに結合せず、ＦＧＦとは無関係の細胞内プロセスに関与している。このグループは「ｉＦＧＦ」としても知られている。メンバーＦＧＦ１５～ＦＧＦ２３はより新しく、十分に特徴付けされていない。ＦＧＦ１５は、ヒトＦＧＦ１９のマウスオルソログである（したがって、ヒトＦＧＦ１５はない）。ヒトＦＧＦ２０は、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ＦＧＦ－２０（ＸＦＧＦ－２０）とのその相同性に基づいて特定された。他のＦＧＦの局所活性とは対照的に、ＦＧＦ１５／ＦＧＦ１９、ＦＧＦ２１、およびＦＧＦ２３は、より全身的な効果を有する。いくつかの実施形態では、使用されるＦＧＦは、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦ４、ＦＧＦ４、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６、ＦＧＦ７、ＦＧＦ８、ＦＧＦ８、ＦＧＦ９、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１１、ＦＧＦ１２、ＦＧＦ１３、ＦＧＦ１４、ＦＧＦ１５（ＦＧＦ１９、ＦＧＦ１５／ＦＧＦ１９）、ＦＧＦ１６、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ２０、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２２、ＦＧＦ２３のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、３、５つ）である。いくつかの実施形態では、使用されるＦＧＦは、ＦＧＦ４である。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、もしくは２０００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１０～２０００ｎｇ／ｍＬ、５０～１５００ｎｇ／ｍＬ、５００～１００ｎｇ／ｍＬ、１０～１０００ｎｇ／ｍＬ、もしくは５００～２０００ｎｇ／ｍＬで、ＦＧＦと接触させる。

【００７０】

いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるために、胚体内胚葉を、Ｗｎｔタンパク質または活性化因子と接触させる。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を、グリコーゲンシンターゼキナーゼ３（ＧＳＫ３）阻害剤と接触させる。ＧＳＫ３阻害剤は、Ｗｎｔ経路を活性化するように作用する。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を、ＧＳＫ３阻害剤カイロン（ＣＨＩＲ９９０２１）と接触させる。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０μＭの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下のＣＨＩＲ９９０２１で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０．１～１０μＭ、０．４～６μＭ、１～５μＭ、０．１～１μＭ、または０．５～１０μＭのＣＨＩＲ９９０２１で、ＣＨＩＲ９９０２１と接触させる。

【００７１】
いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉系前駆細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉系細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉系幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉系前駆細胞を含む。いくつかの実施形態では、中胚葉、中胚葉細胞、中胚葉系前駆細胞、間葉、間葉系細胞、間葉系幹細胞、もしくは間葉系前駆細胞のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせが、造血性内皮集団に分化する。いくつかの実施形態では、間葉は、造血性内皮集団に分化する。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団である。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、本明細書に記載の肝臓オルガノイドのうちのいずれか１つの造血性内皮集団である。
【００７２】
前腸スフェロイド分化方法
いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、肝臓オルガノイドに分化される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、前腸スフェロイドをレチノイン酸（ＲＡ）と接触させることによって肝臓オルガノイドに分化される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドとの接触から産生される肝臓オルガノイドは、成熟肝臓組織に似ている。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、胎児肝臓組織により密接に似ている肝臓オルガノイドに分化される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、前腸スフェロイドをＲＡと接触させないことによって、胎児肝臓組織により密接に似ている肝臓オルガノイドに分化される。
【００７３】
いくつかの実施形態では、胎児肝臓オルガノイドは、マトリゲル液滴法によって産生される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、１００％マトリゲルに包埋され、マトリゲルを固化するために３７℃でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、マトリゲルに包埋された前腸スフェロイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の日数の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１～３０日間、１０～２０日間、１２～１８日間、１～２０日間、または１０～３０日間、レチノイン酸（例えば、ＤＭＥＭ／Ｆ１２）を含まない培地で成長させる。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、デキサメタゾン、オンコスタチンＭ、または肝細胞成長因子のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを含まない培地で成長させる。
【００７４】
いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方を、サイトカインと接触させる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、幹細胞因子（ＳＣＦ）、インターロイキン３（ＩＬ－３）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターロイキン３４（ＩＬ－３４）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはそれらの任意の組み合わせを伝達している。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、サイトカインと接触させる前に単一細胞に解離される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０

、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１ｎｇ／ｍＬ～１０００μｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～１０００ｎｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ～１０００μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬ、または１００ｎｇ／ｍＬ～１０００μｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方を、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～５０日間、５～４０日間、１０～３０日間、１～３０日間、もしくは２０～５０日間、サイトカインと接触させる。

【００７５】

いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方を、ノッチ活性化因子またはリガンドと接触させる。ノッチシグナル伝達は、造血性内皮における二次造血（ｄｅｆｉｎｉｔｉｖｅ　ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｓｉｓ）を確立する上で重要であり、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ノッチシグナル伝達経路を活性化する。いくつかの実施形態では、ノッチリガンドは、ノッチ活性化因子である。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドとの接触は、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方における$CD45^+$造血細胞の産生を増加させる。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドとの接触は、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方によって産生される赤血球の数を増加させる。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドとの接触は、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方におけるＩＬ－６の発現を増加させる。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドとの接触は、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方におけるＨＥＳ１の発現を増加させる。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）のノッチ活性化因子またはリガンドを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）のノッチ活性化因子を発現する。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ４である。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、ノッチ活性化因子またはリガンドと接触させる前に単一細胞に解離される。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、

９５、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１ｎｇ／ｍＬ～１０００μｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～１０００ｎｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ～１０００μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬ、または１００ｎｇ／ｍＬ～１０００μｇ／ｍＬである。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方を、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～５０日間、５～４０日間、１０～３０日間、１～３０日間、もしくは２０～５０日間、ノッチ活性化因子またはリガンドと接触させる。

【００７６】

いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方のアルブミン分泌が定量化される。いくつかの実施形態では、アルブミン分泌は、ＥＬＩＳＡによって定量化される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、免疫組織化学によって検査される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、アルブミン、ＣＤ３４、もしくはＣＤ４５発現、またはそれらの任意の組み合わせについて検査される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、フローサイトメトリーによって検査される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、ＣＤ４５、ＣＤ３４、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１９、ＣＤ２７、ＣＤ４３、もしくはＣＤ４５発現、またはそれらの任意の組み合わせについて検査される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、造血コロニー形成細胞アッセイで検査される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、赤血球コロニー、骨髄コロニー、またはリンパ球コロニー、またはそれらの任意の組み合わせを産生する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、ＲＴ－ｑＰＣＲによって検査される。いくつかの実施形態では、ＲＴ－ｑＰＣＲは、配列番号１～１２の配列を使用して実施される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方を、ＲＴ－ｑＰＣＲによって検査して、ＡＦＰ、ＡＬＢ、ＣＤ３４、ＨＢＧ１、ＨＥＳ１、もしくはＨＥＳ５、またはそれらの任意の組み合わせの発現を定量化する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドもしくは肝臓オルガノイド、またはその両方は、単一細胞ＲＮＡ配列決定によって検査される。

【００７７】

いくつかの実施形態では、造血幹細胞（ＨＳＣ）を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、人工多能性幹細胞を、人工多能性幹細胞を胚体内胚葉に分化させるのに十分な条件下で培養することと、胚体内胚葉を、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件下で培養することと、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、人工多能性幹細胞を、人工多能性幹細胞を胚体内胚葉に分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、胚体内胚葉を、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養する

ことを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することは、前腸スフェロイドを、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子、Ｗｎｔシグナル伝達経路活性化因子、もしくはＢＭＰ阻害剤のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することは、前腸スフェロイドを、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子もしくはＷｎｔシグナル伝達経路活性化因子、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ＦＧＦシグナル伝達経路活性化因子は、ＦＧＦ４である。いくつかの実施形態では、Ｗｎｔシグナル伝達経路活性化因子は、ＣＨＩＲ９９０２１である。いくつかの実施形態では、ＢＭＰ阻害剤は、ノギンである。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉系前駆細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉系細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉系幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉系前駆細胞を含む。いくつかの実施形態では、中胚葉、中胚葉細胞、中胚葉系前駆細胞、間葉、間葉系細胞、間葉系幹細胞、間葉系幹細胞、もしくは間葉系前駆細胞のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせが、造血性内皮集団に分化する。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、造血幹細胞に分化する。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドの造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの、中胚葉、中胚葉細胞、中胚葉系前駆細胞、間葉、間葉細胞、間葉系幹細胞、もしくは間葉系前駆細胞のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせから分化される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドの造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉から分化される。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、赤血球に分化する。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、外因性造血サイトカインを添加することなく赤血球に分化する。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、肝集団、赤血球集団、もしくは造血性内皮集団のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、ＥｐＣＡＭを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、ＣＤ３４$^{+}$内皮を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４$^{+}$内皮は、ノッチ１、ノッチ４、ＨＥＹ１、ＨＥＹ２、ＤＬＬ４、もしくはＧＡＴＡ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、３、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせを発現する。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、ＧＹＰＡを発現する赤血球細胞を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、ＣＤ４５を発現する造血細胞を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１～５０日間、５～４０日間、１０～３０日間、１～３０日間、もしくは２０～５０日間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の

日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１～５０日間、５～４０日間、１０～３０日間、１～３０日間、もしくは２０～５０日間培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１～５０日間、５～４０日間、１０～３０日間、１～３０日間、もしくは２０～５０日間培養される。

【００７９】

いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞を培養することは、人工多能性幹細胞をアクチビンＡまたはＢＭＰ４のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１または２つ）と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を培養することは、胚体内胚葉をＣＨＩＲ９９０２１またはＦＧＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１または２つ）と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをＢＭＰ４およびＦＧＦ２のうちの１つ以上と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、細胞外マトリックスにおいて、前腸スフェロイドをＢＭＰ４およびＦＧＦ２のうちの１つ以上と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをノッチ活性化因子またはリガンドと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも、１、３、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、１、３、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）のノッチ活性化因子またはリガンドを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）のノッチ活性化因子またはリガンドを発現する。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ４である。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、幹細胞因子（ＳＣＦ）もしくはトロンボポエチン（ＴＰＯ）、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、もしくはＴＰＯのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをレチノイン酸（ＲＡ）と接触させることを含まない。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、ＲＡ、デキサメタゾン、オンコスタチンＭ、もしくは肝細胞成長因子のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含まない。

【００８０】

造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が本明細書に記載される。本方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、ＰＳＣ、ｉＰＳＣ、または胚体内胚葉を培養することによって得られる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、アクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、または５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、ＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをノッチ活性化因子またはリガンドと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、もしくは５０μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１ｎｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～３０μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、もしくは５μｇ／ｍＬ～２０μｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ノッチ活性化因子またはリガンドと接触させる。

【００８１】

造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が本明細書に記載される。本方法は、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で前腸スフェロイドを培養することを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、ＰＳＣ、ｉＰＳＣ、または胚体内胚葉を培養することによって得られる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数

、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、アクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、または５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、ＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、ノッチ活性化因子もしくはリガンドＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子もしくはリガンドＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、もしくは５０μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１ｎｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～３０μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、もしくは５μｇ／ｍＬ～２０μｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ノッチ活性化因子もしくはリガンドＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）のノッチ活性化因子またはリガンドを発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、ＤＬＬ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、もしくはＪＡＧ２、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）のノッチ活性化因子またはリガンドを発現する。いくつかの実施形態では、ノッチ活性化因子またはリガンドは、ＤＬＬ４である。

【００８２】

造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が本明細書に記載される。本方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、ＰＳＣ、ｉＰＳＣ、または胚体内胚葉を培養することによって得られる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日

数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、アクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、または５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、ＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをＤＬＬ４と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ＤＬＬ４は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、もしくは５０μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、１ｎｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～３０μｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、もしくは５μｇ／ｍＬ～２０μｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ＤＬＬ４と接触させる。

【００８３】

造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が本明細書に記載される。本方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４$^{+}$造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、ＰＳＣ、ｉＰＳＣ、または胚体内胚葉を培養することによって得られる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、アクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、または５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、ＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドをサイトカインと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、０、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下の濃度で、または前

述の濃度のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、８０～１２０ｎｇ／ｍＬ、０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、またはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ノッチ活性化因子またはリガンドと接触させる。

【００８４】

造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が本明細書に記載される。本方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化する$CD34^+$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、$CD34^+$造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、ＰＳＣ、ｉＰＳＣ、または胚体内胚葉を培養することによって得られる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、アクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、または５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、ＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、サイトカインＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５～１０ｎｇ／ｍＬ、２０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、サイトカインＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１

０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～１００μｇ／ｍＬ、１～１０μｇ／ｍＬ、１０～５０μｇ／ｍＬ、２０～１００μｇ／ｍＬ、または５～１５μｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、サイトカインＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。

【００８５】

造血幹細胞を産生する肝臓オルガノイドを産生する方法が本明細書に記載される。本方法は、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血幹細胞に分化するＣＤ３４$^+$造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４$^+$造血性内皮集団は、前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、ＰＳＣ、ｉＰＳＣ、または胚体内胚葉を培養することによって得られる。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、ＰＳＣまたはｉＰＳＣは、胚体内胚葉を得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、アクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、１、２、３、４、または５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間培養される。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉は、前腸スフェロイドを得るために、１、２、３、４、もしくは５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、または約それらの日数以下の間、ＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と培養される。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを培養することは、前腸スフェロイドを、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、０、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５０～１５０ｎｇ／ｍＬ、８０～１２０ｎｇ／ｍＬ、０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、またはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドを、１

、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ＩＬ－３、ＩＬ－３４、もしくはＧＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。

【００８６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つは、人工多能性幹細胞を、人工多能性幹細胞を胚体内胚葉に分化させるのに十分な条件下で培養することと、胚体内胚葉を、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件下で培養した後に、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することと、をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つは、胚体内胚葉を、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件下で培養した後に、前腸スフェロイドを、前腸スフェロイドを肝臓オルガノイドに分化させるのに十分な条件下で培養することをさらに含む。いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞を胚体内胚葉に分化させるのに十分な条件は、胚体内胚葉を得るために、人工多能性幹細胞をアクチビンＡもしくはＢＭＰ４、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、胚体内胚葉を前腸スフェロイドに分化させるのに十分な条件は、前腸スフェロイドを得るために、胚体内胚葉をＦＧＦ４もしくはＣＨＩＲ９９０２１、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、中胚葉、中胚葉細胞、中胚葉系前駆細胞、間葉、間葉系細胞、間葉系幹細胞、もしくは間葉系前駆細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、前腸スフェロイドは、間葉を含む。いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞、胚体内胚葉、前腸スフェロイド、もしくは肝臓オルガノイドのうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせは、本明細書に記載の方法により調製される。いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞、胚体内胚葉、前腸スフェロイド、もしくは肝臓オルガノイドのうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせは、ＰＣＴ公開第２０１８／０８５６１５号、同第２０１８／１９１６７３号、同第２０１８／２２６２６７号、同第２０１９／１２６６２６号、同第２０２０／０２３２４５号、同第２０２０／０５６１５８号、および同第２０２０／０６９２８５号に記載される方法により調製され、これらのそれぞれは、人工多能性幹細胞、胚体内胚葉、前腸スフェロイド、もしくは肝臓オルガノイド、またはそれらの任意の組み合わせを産生する目的のために、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【００８７】

本明細書に記載されるように、肝臓オルガノイドのいくつかの実施形態は、造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせを産生する。いくつかの実施形態では、造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせは、肝臓オルガノイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせは、肝臓オルガノイドに分化する前腸スフェロイドの間葉に由来する。いくつかの実施形態では、造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞、またはそれらの任意の組み合わせは、肝臓オルガノイドから単離される。いくつかの実施形態では、単離される造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞、またはそれらの任意の組み合わせは、必要とする個体に投与される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドから単離される造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞、またはそれらの任意の組み合わせは、個体に対して同種異系である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、個体に対して自家であり、結果として、造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆

細胞、またはそれらの任意の組み合わせもまた、個体に対して自家である。いくつかの実施形態では、造血性内皮細胞、造血細胞、造血幹細胞、もしくは造血前駆細胞、またはそれらの任意の組み合わせは、ＥＲＧ、ＨＯＸＡ５、ＨＯＸＡ９、ＨＯＸＡ１０、ＬＣＯＲ、ＲＵＮＸ１、ＳＰＩ１、ＦＯＳＢ、もしくはＧＦＩ１のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、３、５つ）、またはそれらの任意の組み合わせを外因的に発現していない。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、肝臓オルガノイドから、造血性内皮集団もしくは造血幹細胞、またはその両方を単離することを含む。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団もしくは造血幹細胞、またはその両方を単離することは、ＣＤ３４＋、ＣＤ４５＋、またはその両方である肝臓オルガノイドから細胞集団を選別することによって実施される。

【００８９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、肝臓オルガノイドからリンパ球細胞を単離することを含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された肝臓オルガノイドのうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生された肝臓オルガノイドのうちのいずれか１つから単離される。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、または一般的なリンパ球前駆細胞のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ１細胞である。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ２細胞である。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ１細胞およびＢ２細胞の両方である。いくつかの実施形態では、単離されるリンパ球細胞は、Ｂ１細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、肝臓オルガノイドから単一細胞懸濁液を作製することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、間質細胞上で単一細胞懸濁液を培養することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、リンパ球細胞を単離する前に間質細胞上で単一細胞懸濁液を培養することを含む。いくつかの実施形態では、間質細胞上で単一細胞懸濁液を培養することは、単一細胞懸濁液においてリンパ球細胞を拡大する。いくつかの実施形態では、間質細胞は、ＭＳ－５細胞である。いくつかの実施形態では、単一細胞懸濁液は、間質細胞上で、２、３、４、または５週間の数週、約それらの数週、少なくともそれらの数週、少なくとも約それらの数週、それらの数週以下、または約それらの数週以下の間培養される。いくつかの実施形態では、単一細胞懸濁液を、１つ以上のサイトカインと接触させる。いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインまたはそれらの任意の組み合わせは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５～１０ｎｇ／ｍＬ、２０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、１つ以上のサイトカインと接触させる。いくつかの実施形態では、単一細胞懸濁液を、ＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＦｍｓ様チロシンキナーゼ３リガンド（ＦＬＴ３リガンド、ＦＬＴ３Ｌ）のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。いくつかの実施形態では、ＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ

、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＦＬＴ３リガンドのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５～１０ｎｇ／ｍＬ、２０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、ＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＦＬＴ３リガンドのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００μｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～１００μｇ／ｍＬ、１～１０μｇ／ｍＬ、１０～５０μｇ／ｍＬ、２０～１００μｇ／ｍＬ、または５～１５μｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数の任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－３４、ＥＰＯ、ＴＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＦＬＴ３リガンドのうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。いくつかの実施形態では、単一細胞懸濁液を、ＦＬＴ３リガンド、ＳＣＦ、もしくはＩＬ－７のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３リガンド、ＳＣＦ、もしくはＩＬ－７のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５～１０ｎｇ／ｍＬ、２０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドを、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２０日間、５～１５日間、１０～１４日間、１～１５日間、もしくは５～２０日間、ＦＬＴ３リガンド、ＳＣＦ、もしくはＩＬ－７のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞を単離することは、単一細胞懸濁液から細胞集団を選別することによって実施される。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、そ

れらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１０～５０日間、１５～４０日間、２０～３０日間、１０～３０日間、もしくは２０～５０日間培養した後に、単一細胞懸濁液から単離される。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、ＣＤ２０$^{+}$ＣＤ４３$^{+}$ＣＤ２７$^{+}$ＣＤ７０$^{-}$である。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞を単離することは、ＣＤ２０$^{+}$、ＣＤ４３$^{+}$、もしくはＣＤ２７$^{+}$のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３つ）、またはそれらの任意の組み合わせである単一細胞懸濁液から細胞集団を選別することによって実施される。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、自己免疫特性を有するか、または表面ＩｇＭを生得的に発現するか、あるいはその両方である。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、ＵＣＢ細胞には見られない。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１０～５０日間、１５～４０日間、２０～３０日間、１０～３０日間、もしくは２０～５０日間培養した後に、単一細胞懸濁液から単離される。

【００９０】

いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団を拡大する方法が提供される。いくつかの実施形態では、胎児肝臓もしくは肝臓オルガノイド、またはその両方における造血幹細胞は、ネスチン$^{+}$門脈管に関連している。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、幹細胞因子（ＳＣＦ）もしくはトロンボポエチン（ＴＰＯ）、またはその両方を発現し、これは、ＨＳＣの拡大および維持を誘導する。いくつかの実施形態では、方法は、肝臓オルガノイドと接触して造血幹細胞の集団を培養することを含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、造血ニッチ環境を含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生または単離される肝臓オルガノイドである。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団を培養することは、造血幹細胞の集団を、１つ以上のサイトカインと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団を培養することは、造血幹細胞の集団を、ＳＣＦもしくはＴＰＯ、またはその両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、ＳＣＦもしくはＴＰＯ、またはその両方は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、もしくは２００ｎｇ／ｍＬの濃度、約それらの濃度、少なくともそれらの濃度、少なくとも約それらの濃度、それらの濃度以下、もしくは約それらの濃度以下で、または前述の濃度のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の濃度、例えば、０～２００ｎｇ／ｍＬ、５～１０ｎｇ／ｍＬ、２０～１００ｎｇ／ｍＬ、もしくは１００～２００ｎｇ／ｍＬで提供される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団を、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、もしくは２５日間の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義された範囲内の任意の日数、例えば、１～２５日間、５～２０日間、１０～２０日間、１～２０日間、もしくは１０～２５日間、ＳＣＦもしくはＴＰＯ、またはその両方と接触させる。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の拡大された集団は、多能性を維持する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の拡大された集団は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０日間

の日数、約それらの日数、少なくともそれらの日数、少なくとも約それらの日数、それらの日数以下、もしくは約それらの日数以下の間、または前述の日数のうちの任意の２つで定義される範囲内の任意の日数、例えば、１～５０日間、５～４０日間、１０～３０日間、１～３０日間、もしくは２０～５０日間多能性を維持する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、臍帯血、動員された末梢血、骨髄、多能性幹細胞、胚性幹細胞、胎児肝臓、もしくは胎児脾臓、またはそれらの任意の組み合わせから得られる。いくつかの実施形態では、ＲＡ、デキサメタゾン、オンコスタチンＭ、もしくは肝細胞成長因子のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４つ）、またはそれらの任意の組み合わせで分化される肝臓オルガノイドは、造血細胞ならびに未分化の胎児様肝臓オルガノイドを支持しない。

【００９１】

いくつかの実施形態では、拡大される造血幹細胞の集団は、個体に移植される。いくつかの実施形態では、個体は、マウスである。いくつかの実施形態では、個体は、免疫無防備状態のマウスである。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、免疫無防備状態のヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、造血幹細胞を必要とする個体である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、個体に注射される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、大腿内に注射される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、肝臓オルガノイド細胞を注射される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、肝臓オルガノイド細胞が残っていない造血幹細胞の集団を単離した後に注射される。いくつかの実施形態では、個体は、ＳＣＦもしくはＴＰＯ、またはその両方も投与される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、個体に生着される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞を必要とする個体は、再生不良性貧血、ファンコニ貧血、ダイヤモンド－ブラックファン症候群、鎌状赤血球症、サラセミア、発作性夜間ヘモグロビン尿症、チェディアック・東症候群、慢性肉芽腫性疾患、グランツマン血小板無力症、大理石骨病、ゴーシェ病、ニーマン－ピック病、ムコ多糖症、糖タンパク質症、免疫不全症、ＡＩＤＳ、毛細血管拡張性運動失調症、ディジョージ症候群、重度の複合免疫不全症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、コストマン症候群、シュワックマン・ダイアモンド症候群、白血病、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、有毛細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、骨髄異形成、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、骨髄増殖性腫瘍、骨髄線維症、真性多血症、慢性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、ユーイング肉腫、もしくは絨毛がん、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない状態の治療、阻害、または改善を必要とする。

【００９２】

いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、肝臓オルガノイドに対して自家または同種異系である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、個体から得られる。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、個体から得られた細胞から分化される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、個体に由来する人工多能性幹細胞から産生される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団および肝臓オルガノイドは、同じ個体から得られるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、個体は、造血幹細胞を必要とする個体である。

【００９３】

造血幹細胞の集団を必要とする個体に投与する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、造血幹細胞の単離された集団である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、拡大、産生、もしくは単離されるか、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、必要とする個体に対して自家または同種異系である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、必要とする個体に対して自家である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、必要とする個体に対して同種異系である。

【００９４】
造血性内皮集団を必要とする個体に投与する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、単離された造血性内皮集団である。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、産生もしくは単離されるか、またはその両方である。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、必要とする個体に対して自家である。いくつかの実施形態では、造血性内皮集団は、必要とする個体に対して同種異系である。
【００９５】
リンパ球細胞を必要とする個体に投与する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、単離されたリンパ球細胞である。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、産生もしくは単離されるか、またはその両方である。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、必要とする個体に対して自家である。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、必要とする個体に対して同種異系である。いくつかの実施形態では、リンパ球細胞は、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、もしくは一般的なリンパ球前駆細胞のうちの１つ以上、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、Ｂ細胞は、Ｂ１細胞もしくはＢ２細胞、またはその両方である。
【００９６】
Ｂ１細胞を必要とする個体に投与する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、単離されたＢ１細胞である。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、産生もしくは単離されるか、またはその両方である。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、必要とする個体に対して自家である。いくつかの実施形態では、Ｂ１細胞は、必要とする個体に対して同種異系である。
【００９７】
細胞組成物の実施形態が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生される肝臓オルガノイドを含む。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生または単離された造血性内皮集団を含む。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生または単離された造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生または単離されたＢ１細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、本明細書に記載の他の細胞組成物の任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、本明細書に開示される肝臓オルガノイド、造血性内皮集団、造血幹細胞、もしくはＢ１細胞のうちの１つ以上（例えば、少なくとも１、２、３、４つ）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、細胞組成物は、造血幹細胞の集団と、肝臓オルガノイドと、を含む。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団は、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、調製もしくは単離されるか、またはその両方である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにより、調製もしくは単離されるか、またはその両方である。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団および肝臓オルガノイドは、同じ個体からであるか、それから得られるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、造血幹細胞の集団および肝臓オルガノイドは、異なる個体からであるか、それから得られるか、またはそれに由来する。
【実施例】
【００９８】
上記の実施形態のいくつかの態様は、以下の実施例でさらに詳細に開示されており、これらは、本開示の範囲を限定することを決して意図するものではない。当業者は、本明細書の上記および特許請求の範囲に記載されているように、他の多くの実施形態も本開示の範囲内に含まれることを理解するであろう。
【００９９】

実施例１．材料および方法
ｈＰＳＣの維持
ヒトｉＰＳＣ株を以前に説明されているように維持した（Ｔａｋｅｂｅら、２０１５、Ｔａｋｅｂｅら、２０１４）。未分化のｈｉＰＳＣを、ラミニン（ＰＢＳ中１％のｉＭａｔｒｉｘ－５１１　ｓｉｌｋ）でコーティングされたプレート上のＳｔｅｍＦｉｔ培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において、フィーダーフリー条件で、３７℃で２時間維持した。ｉＰＳＣを、５％CO_2中３７℃で、１００ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ２および１０ｎＭのＲＯＣＫ阻害剤Ｙ－２７６３２を補充したＳｔｅｍＦｉｔ培地において、８×１０^{4}細胞／ウェルの６ウェル細胞培養処理プレート（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ）に播種した。

【０１００】
胚体内胚葉誘導
以前に説明されている方法にわずかに修正を加えて（Ｓｐｅｎｃｅら、２０１１）、ヒトｉＰＳＣの胚体内胚葉への分化を誘導した。簡単に説明すると、ヒトｉＰＳＣのコロニーを、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中のＡｃｃｕｔａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）において単離し、１５０，０００細胞／ｍＬを、１日目に１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（Ｒ&Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）および５０ｎｇ／ｍＬの骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４、Ｒ&Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を補充し、３日目に１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡおよび２％胎仔ウシ血清（ＦＣＳ）を補充したＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において、組織培養プレート上の１／３０希釈のマトリゲルにプレーティングした。４～６日目に、細胞を、Ｂ２７（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）およびＮ２（Ｇｉｂｃｏ）を補充したＡｄｖａｎｃｅｄ　ＤＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）において培養し、さらに５００ｎｇ／ｍＬの線維芽細胞成長因子４（ＦＧＦ４、Ｒ&Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）および３μＭのＣＨＩＲ９９０２１（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ）を補充した。細胞を、５％CO_2中、３７℃で維持し、培地を毎日交換した。分化の７日目にスフェロイドがプレート上に現れた。

【０１０１】
ヒト肝臓オルガノイド（ＨＬＯ）形成
７日目に、スフェロイドを手動ピペッティングで収集し、遠心分離によりペレット化した。培地を吸引し、細胞ペレットを均質化するために穏やかにピペッティングすることにより、細胞を１００％マトリゲルに包埋した。必要に応じて、ノッチ活性化因子またはリガンド（例えば、１０μｇ／ｍＬのＤＬＬ４）をマトリゲルに添加する。あるいは、任意選択で、オルガノイドとの共培養のために、ＵＣＢ細胞（例えば、７５μＬのマトリゲルあたり１，０００個のＵＣＢ細胞）をマトリゲルに添加する。胚体内胚葉培養の２４ウェルプレートのウェルあたり２５０μＬのマトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ）を使用した。新しい２４ウェルプレート（ＶＷＲ）の各ウェルに１滴ずつ、７５μＬのマトリゲル液滴を作製した。プレートを５％CO_2／９５％空気の雰囲気下で３７℃に５～１５分間放置した。マトリゲルが固化した後、１×Ｂ２７、１×Ｎ２、２ｍＭのＬ－グルタミン、１５ｍＭのＨＥＰＥＳ、および１×ペニシリン／ストレプトマイシンを含むＡｄｖａｎｃｅｄ　ＤＭＥＭ／Ｆ１２をウェルに添加した。この培地に、２０ｎｇ／ｍＬのＢＭＰ４および１０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ２を４日間補充した後、ＢＭＰ４およびＦＧＦ２を除去した。

【０１０２】
アルブミンＥＬＩＳＡ
ＨＬＯのアルブミン分泌レベルを測定するために、マトリゲルに包埋したＨＬＯから２００μＬの培養上清を収集した。培地交換の２４時間後に培養上清を収集し、使用するまで－８０℃で保存した。上清は、製造元の指示に従い、Ｈｕｍａｎ　Ａｌｂｕｍｉｎ　ＥＬＩＳＡ　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ　Ｓｅｔキット（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｅ８０－１２９）を用いてアッセイした。

【０１０３】
組織学

マトリゲル液滴中の試料を収集し、４％のパラホルムアルデヒドに固定し、パラフィンに包埋した。切片をヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）、ならびに免疫組織化学的染色に供した。以下の一次抗体を使用した：抗ヒトアルブミン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ａ６６８）、抗ヒトＣＤ３４（Ｒｏｃｈｅ、７６０－２６２０）、抗ヒトＣＤ４５（Ｒｏｃｈｅ、７６０－２５０５）。

【０１０４】

フローサイトメトリー

オルガノイドをマトリゲル液滴から単離し、１×ＰＢＳで洗浄した。ＨＬＯを、トリプシン－ＥＤＴＡ（０．０５％、フェノールレッドを含む、Ｇｉｂｃｏ）で１０分間処理することにより、単一細胞に解離した。細胞を１０％のＦＢＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２において洗浄し、２％のＦＢＳを含むＰＢＳに懸濁した。濾過後（例えば、４０～５０μｍナイロンフィルタを通して）、単一細胞を以下の抗体を用いたフローサイトメトリーに供した：抗ＣＤ４５－ＡＰＣ（Ｍｉｌｔｅｎｙｌ、１３０－０９８－１４３）、抗ＣＤ３４－ＡＰＣ／Ｃｙ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３４３５１３）、抗ＣＤ１１ｂ－ＰＥ／Ｃｙ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３０１３２２）、抗ＣＤ１９－ＢＶ４２１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３０２２３３）、抗ＣＤ２７－ＡＦ７００（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３５６４１５）、抗ＣＤ４３－ＦＩＴＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、３１５２０４）。マウス生着実験には、抗マウスＣＤ４５－ＢＶ４２１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、１０３１３３）を使用した。

【０１０５】

コロニー形成細胞（ＣＦＣ）アッセイ

１５０，０００細胞／ｍＬを、３ｍＬのＭｅｔｈｏＣｕｌｔ　ＳＦ　Ｈ４４３６無血清メチルセルロースベースの培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にプレーティングした。混合物を６０ｍｍの皿に均等に分配し、３７℃の加湿チャンバー内で１４日間維持した後、光学顕微鏡で検査した。使用した培地は、インスリン、トランスフェリン、サイトカインとしてＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＥＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、およびＧＭ－ＣＳＦを含む。ＳＣＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－６、Ｇ－ＣＳＦ、およびＧＭ－ＣＳＦは１００ｎｇ／ｍＬで補充され、ＥＰＯは１～８ＩＵ／ｍＬ（約１０～１００ｎｇ／ｍＬ）で補充される。

【０１０６】

Ｃｙｔｏｓｐｉｎおよびギムザ染色

ＣＦＣアッセイからの細胞を、ＰＢＳで洗浄することによってメチルセルロース培地から収集し、７，０００個の細胞を、Ｃｙｔｏｓｐｉｎ遠心分離機（５００ｒｐｍで１０分間）を使用してガラスのスライド上に薄層として適用した。スライドを風乾し、製造元の指示に従って、Ｗｒｉｇｈｔ－Ｇｉｅｍｓａ染色キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で染色した後、光学顕微鏡で検査した。

【０１０７】

マウス移植

ＮＳＧ－ＳＧＭ３（ＮＳＧＳ、ＮＯＤ－ｓｃｉｄ　ＩＬ２Ｒｇｎｕｌｌ－３／ＧＭ／ＳＦ）マウスを繁殖させ、動物管理施設に収容した。動物実験は、動物管理委員会により承認された施設のガイドラインに従って実施された。細胞注射の２４時間前にＩＰ注射によって投与されたブスルファン（１０μＬ容量中３０μｇ／ｇ体重）でマウスを亜致死的に免疫切除した。細胞を大腿内に注射した。オルガノイド培養物を臍帯血（ＵＣＢ）ＣＤ３４$^{+}$細胞と共培養し、培地に幹細胞因子（ＳＣＦ）およびトロンボポエチン（ＴＰＯ）を１２日間補充した。２×１０^{6}ＨＬＯ＋ＵＣＢ細胞または２×１０^{3}ＵＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞のみを、マウスに注射した。７週間後、大腿骨髄および血液を収集し、フローサイトメトリーにより分析した。

【０１０８】

ＲＮＡ単離およびＲＴ－ｑＰＣＲ

ＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、ＲＮＡを単離した。逆転写を、製造元のプロトコルに従って、Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ逆転写キット（Ｔ

ｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して実行した。ｑＰＣＲを、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ３リアルタイムＰＣＲシステム（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）で、ＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＵｎｉｖｅｒｓａｌ Ｐｒｏｂｅ Ｌｉｂｒａｒｙ（Ｒｏｃｈｅ）のプローブを使用して２つ組で実行した。各標的遺伝子のすべてのプライマーおよびプローブ情報は、Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ Ｐｒｏｂｅ Ｌｉｂｒａｒｙ Ａｓｓａｙ Ｄｅｓｉｇｎ Ｃｅｎｔｅｒ（ワールドワイドウェブのｑｐｃｒ．ｐｒｏｂｅｆｉｎｄｅｒ．ｃｏｍ／ｏｒｇａｎｉｓｍ．ｊｓｐからアクセス可能）から得た。プライマーは以下のとおりである：

アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）フォワード：ｔｇｔａｃｔｇｃａｇａｇａｔａａｇｔｔｔａｇｃｔｇａｃ（配列番号１）

ＡＦＰリバース：ｔｃｃｔｔｇｔａａｇｔｇｇｃｔｔｃｔｔｇａａｃ（配列番号２）

アルブミン（ＡＬＢ）フォワード：ｇｔｇａｇｇｔｔｇｃｔｃａｔｃｇｇｔｔｔ（配列番号３）

ＡＬＢリバース：ｇａｇｃａａａｇｇｃａａｔｃａａｃａｃｃ（配列番号４）

ＣＤ３４フォワード：ｇｇｃａｃａｇｃｔｇｇａｇｇｔｃｔｔａｔ（配列番号５）

ＣＤ３４リバース：ｔｇｔｔｃａｇｇｃａｔｃａｇａｇａａｇｔｇ（配列番号６）

ヘモグロビンサブユニットガンマ－１（ＨＢＧ１）フォワード：ｔｇｇａｔｃｃｔｇａｇａａｃｔｔｃａａｇｃ（配列番号７）

ＨＢＧ１リバース：ｇｃｃａｃｔｇｃａｇｔｃａｃｃａｔｃｔ（配列番号８）

ＨＥＳ１フォワード：ｇａａｇｃａｃｃｔｃｃｇｇａａｃｃｔ（配列番号９）

ＨＥＳ１リバース：ｇｔｃａｃｃｔｃｇｔｔｃａｔｇｃａｃｔｃ（配列番号：１０）

ＨＥＳ５フォワード：ｃｃｃｇｇｇｇｔｔｃｔａｔｇａｔａｔｔｔｇ（配列番号１１）

ＨＥＳ５リバース：ｇｃｃｃｔｇａａｇａａａｇｔｃｃｔｃｔａｃａ（配列番号１２）

【０１０９】

受入番号は、ＨＵＧＯ Ｇｅｎｅ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ＩＤとして入手することができる：ＡＦＰ（ＨＧＮＣ：３１７）、ＡＬＢ（ＨＧＮＣ：３９９）、ＣＤ３４（ＨＧＮＣ：１６６２）、ＨＢＧ１（ＨＧＮＣ：４８３１）、ＨＥＳ１（ＨＧＮＣ：５１９２）、ＨＥＳ５（ＨＧＮＣ：１９７６４）、ＥＰＯ（ＨＧＮＣ：３４１５）、ＴＰＯ（ＴＨＰＯ、ＨＧＮＣ：１１７９５）、ＳＣＦ（ＫＩＴリガンド、ＫＩＴＬＧ、ＨＧＮＣ：６３４３）。

【０１１０】

単一細胞ＲＮＡ配列決定

ＨＬＯをマトリゲル液滴から単離し、１×ＰＢＳで洗浄した。ＨＬＯを、トリプシン－ＥＤＴＡ（０．０５％、フェノールレッドを含む、Ｇｉｂｃｏ）で１０分間処理することにより、単一細胞に解離した。細胞を１０％のＦＢＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２において洗浄し、２％のＦＢＳを含むＰＢＳに懸濁した。次に、細胞は単一細胞ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリ調製を受け、１０Ｘ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｃｈｒｏｍｉｕｍプラットフォームで配列決定され、２８６８個の細胞が分析のために回収された。配列決定されたリードは、バーコードおよびリードデータの逆多重化およびｆａｓｔｑファイルへの変換から開始して、Ｃｅｌｌ Ｒａｎｇｅｒ遺伝子発現パイプラインｍｋｆａｓｔｑおよびｃｏｕｎｔを使用して処理された。生のリードをＨｇ１９ゲノムにアラインメントしてフィルタリングし、遺伝子バーコードマトリックスを作製した。ＡｌｔＡｎａｌｙｚｅで分析を実施し、目的変数なしの分析によって遺伝子および細胞のクラスターが特定され、発現クラスタリングを介して優勢試料群が特定された。外れ値を削除した後、クラスターは、＞５細胞、ピアソン相関の最小値０．５、およびクラスター間の倍率変化＞４を有するように制限された。細胞周期の影響は取り除かれた。クラスターベースのヒートマップおよび対応するｔＳＮＥプロットは、Ｒｖ３．３．３を使用して生成された。細胞クラスターの同一性は、ＴｏｐｐＧｅｎｅ（ワールドワイドウェブのｔｏｐｐｇｅｎｅ．ｃｃｈｍｃ．ｏｒｇで入手可能）の系統相関および存在論分析によって決定された。ｔＳＮＥプロットは、Ｌｏｕｐｅ Ｃｅｌｌ Ｂｒｏｗｓｅｒ ｖ１．０．５によって確立された。

【０１１１】
実施例２．肝内胚葉および造血性内皮の並行分化
胎児肝臓環境を模倣するために、ｉＰＳＣ由来の中腸スフェロイドを、アクチビンＡの存在下で内胚葉誘導により産生し、本明細書に記載されるマトリゲル液滴に包埋した。次に、中腸スフェロイドを、初期の肝臓特定に重要であるＢＭＰ４およびＦＧＦ２の存在下で培養した。得られたオルガノイド培養物は、アルブミン（ＡＬＢ）およびアルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）を含む肝遺伝子、および内皮マーカーＣＤ３４を発現した（図１Ａ～Ｄ）。オルガノイドはまた、胎児ヘモグロビンを発現する造血集団を含んだ（ヘモグロビンガンマサブユニットの存在によって証明される）。追加の分析により、オルガノイド系には、外因性造血サイトカインを添加せずに赤血球を産生することができる造血性内皮集団が含まれていることが明らかになった（図１Ａ）。これは、１４日目のオルガノイド培養物の単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）によってさらに検証された。発現プロファイル分析は、この時点で、中胚葉および外胚葉マーカーを発現する大きな間葉集団に加えて、３つの目的の集団が存在したことを示した（図２、３）。目的のクラスターは、肝集団、赤血球集団、および造血性内皮集団を含んだ（図４Ａ～Ｃ）。これらの造血性内皮細胞は、コロニー形成細胞（ＣＦＣ）アッセイによってさらに分析され、このアッセイでは、オルガノイド培養物からの細胞が単一細胞懸濁液に分散され、サイトカインを含むメチルセルロースベースの培地にプレーティングされた。プレーティングした細胞は赤血球および骨髄コロニーの両方を産生し、オルガノイド培養の１４日目頃にコロニー形成のピークが発生した（図５Ａ～Ｂ）。
【０１１２】
実施例３．ノッチ依存性造血性内皮の出現
肝臓オルガノイド培養物の組織学的検査により、グリコホリンＡ（ＣＤ２３５ａ、ＧＹＰＡ）を発現する隣接する赤血球細胞およびＣＤ４５発現造血細胞を伴ってＣＤ３４$^{+}$内皮とともに上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ）発現細胞が明らかになった（図６Ａ～Ｂ）。ＣＤ３４発現細胞の経時的分析により、ＣＤ３４$^{+}$細胞の数が、ＣＦＣアッセイ活性のピークの前に減少したことが明らかになった（図６Ｃ～Ｄ）。
【０１１３】
ノッチシグナル伝達は、造血性内皮における二次造血を確立する上で重要であることが以前に示された。具体的には、ノッチ受容体ノッチ１およびノッチ４は、ノッチリガンドＪＡＧ１、ＪＡＧ２、およびＤＬＬ４とともに大動脈内皮細胞によって発現され、造血性内皮を介した初期の造血に不可欠である。このプロセス中に、受容体ノッチ１またはノッチ４を発現する内皮細胞は、リガンドＤＬＬ４を発現する隣接する内皮細胞と相互作用して、ＨＥＳ１／５、ＨＥＹ１／２、ＧＡＴＡ２などの下流の標的遺伝子の発現の増加をもたらす。ノッチシグナル伝達の急激な増加は、オルガノイド培養の１０日目頃にピークに達するＨＥＳ１発現レベルの増加によって証明される。このピークは、ＣＦＣアッセイによって示される造血活性のピークの直前であり、１２～１４日目頃にピークに達する（図６Ｄ～Ｅ）。ＣＤ３４を検出するためのオルガノイド細胞のフローサイトメトリーは、オルガノイドが分化するにつれてＣＤ３４$^{+}$細胞数が着実に減少することを示した（図６Ｃ）。本明細書に記載のオルガノイド系の個体群動態をよりよく理解するために、１４日目のオルガノイド培養物をｓｃＲＮＡ－ｓｅｑにより分析した。ＣＤ３４$^{+}$内皮集団のより厳密な分析により、ノッチシグナル伝達遺伝子ノッチ１、ノッチ４、ＨＥＹ１、ＨＥＹ２、ＤＬＬ４、およびＧＡＴＡ２の非常に特異的な発現が明らかになった（図７Ａ、４Ｃ）。
【０１１４】
オルガノイド培養系におけるノッチ依存性を試験するために、オルガノイド播種中にノッチリガンドＤＬＬ４（１～１０μｇ／ｍＬ）をマトリゲル液滴に添加し、オルガノイド成長培地に造血サイトカインＩＬ－３、ＩＬ－３４、およびＧＭ－ＣＳＦ（各１００ｎｇ／ｍＬ）を補充した（図７Ｂ）。ＤＬＬ４を添加すると、ＣＤ４５$^{+}$造血細胞の産生におけるサイトカインの効率が高まった（図８）。これにより、ＩＬ－６の発現が大幅に増加し、アルブミンの発現はわずかに減少したのみであった（図９Ａ～Ｂ）。逆に、ノッチ活

性を阻害するためにγ－セクレターゼ阻害剤ＤＡＰＴで処理されたオルガノイド培養物は、アルブミン発現を維持しながら、目に見える赤血球およびＨＥＳ１発現の減少をもたらした（図１０Ａ～Ｄ）。

【０１１５】

実施例４．オルガノイド培養からのＢ１細胞の作製

二次造血は、骨髄およびリンパ系統両方の産生を特徴とする。本明細書に記載のオルガノイド培養物のリンパ球の可能性を検査するために、細胞をオルガノイド培養の１４日目頃に収集し、コンフルエントなＭＳ－５マウス間質細胞にプレーティングして、Ｂ細胞に分化させた（図１１Ａ～Ｂ）。ＭＳ－５細胞を、５ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、１００ｎｇ／ｍＬのＳＣＦ、および５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－７を補充した培地で培養する。発生中、胎児肝臓は、独特のＢ１細胞集団源である。これらの細胞は、ＨＳＣとは独立して発生するという点で成体（Ｂ２）細胞とは異なる。Ｂ１細胞は、自己免疫特性を有し、本質的に表面ＩｇＭを発現し、ＣＤ２０$^{+}$ＣＤ４３$^{+}$ＣＤ２７$^{+}$ＣＤ７０$^{-}$であることが記載されている。オルガノイドからの細胞を、ＭＳ－５共培養からのＢ細胞のそれらの産生においてＵＣＢ細胞と比較した。興味深いことに、オルガノイドおよびＵＣＢの両方がＢ細胞分化を示すことができた一方で、オルガノイド由来のＢ細胞集団は、ＵＣＢ細胞から再作製することができなかった独特のＢ１細胞表現型を含んだ。ＦＡＣＳ分析により、ＣＤ２０$^{+}$ＣＤ４３$^{+}$ＣＤ２７$^{+}$細胞の集団が明らかになった（図１１Ｃ）。

【０１１６】

実施例５．造血ニッチ環境の作製

造血幹細胞および前駆細胞は、まだ完全には理解されていない、特に胎児肝臓のＨＳＣが大規模に拡大する胎児の発生中の、特定の複雑なニッチ環境内に存在する。本明細書に記載のオルガノイド培養物における造血細胞の起源をよりよく理解するために、造血ニッチマーカーについてオルガノイド細胞を分析した。胎児肝臓におけるＨＳＣは、ネスチン$^{+}$門脈管に関連している。オルガノイド培養物内で、ＣＤ３４$^{+}$細胞のポケットもネスチン染色により密接に関連して見られ、ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑは、ＣＤ３４／ネスチン共発現細胞の集団も示した（図１２Ａ～Ｂ、４Ａ～Ｄ）。興味深いことに、ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑは、肝集団とクラスター化した細胞が、ＨＳＣの拡大および維持に不可欠であり、エクスビボでＨＳＣを拡大する試みでよく使用される幹細胞因子（ＳＣＦ）およびトロンボポエチン（ＴＰＯ）を発現したことも明らかにした（図１２Ｃ）。

【０１１７】

オルガノイド培養物におけるニッチ環境をさらに試験するために、ＣＤ３４$^{+}$ヒトＵＣＢ細胞をオルガノイド播種中にマトリゲル液滴に添加した。外因性組換えＳＣＦおよびＴＰＯを成長培地に添加して、造血細胞の産生および維持の効率を改善した。１００ｎｇ／ｍＬのＳＣＦおよび１０ｎｇ／ｍＬのＴＰＯを添加すると、オルガノイド培養物におけるＣＤ３４$^{+}$およびＣＤ４５$^{+}$細胞の産生が大幅に増加し、形成されるコロニーの数も増加した（図１２Ｄ～Ｅ）。

【０１１８】

これらの結果が造血ニッチの存在に起因するのか、または単なる造血分化をもたらす中胚葉集団の汚染によるものなのかを判断するために、オルガノイド培養物と混合した後にＵＣＢ細胞がコロニーを形成する能力を検査した。レチノイン酸（ＲＡ）、続いて肝細胞培養培地（ＨＣＭ、Ｌｏｎｚａ）を添加し、任意選択で０．１μＭのデキサメタゾン、１０ｎｇ／ｍＬのオンコスタチンＭ、および１０ｎｇ／ｍＬの肝細胞成長因子（ＨＧＦ）を補充したオルガノイドの肝分化の促進は、造血コロニー形成能力の着実な低下をもたらした。逆に、肝分化を制限するために変更された本明細書に記載のプロトコルは、コロニー形成細胞の存在およびそれらの多様な分化能を維持し、胎児肝臓造血の一過性段階をモデル化し、未成熟肝集団の存在に依存する独特のニッチの存在を示す（図１２Ｆ～Ｇ）。

【０１１９】

ＵＣＢ細胞は、免疫不全のレシピエントに生着し、完全な造血系を再構築することができる。しかしながら、これらの細胞の潜在的な治療用途の制限要因は、インビトロで培養

または拡大することができないことである。本明細書に記載のオルガノイド系のニッチ環境をさらに分析するために、オルガノイドと共培養した後のＵＣＢ細胞の生着を試験した。ＵＣＢ細胞をマトリゲル液滴においてオルガノイドと組み合わせ、オルガノイド培養６日目に成長培地にＳＣＦおよびＴＰＯを補充した。１２日後、ＵＣＢおよびオルガノイド細胞を単一細胞懸濁液に収集し、ＮＳＧＳマウスの骨髄に大腿内注射した。７週間後、マウスはヒト特異的ＣＤ４５$^{+}$細胞の生着を示した（図１３Ａ～Ｂ）。得られた生着は、共培養なしの約１６％の生着と比較して、ＵＣＢ細胞をオルガノイドと共培養した後、約３％の生着であった。この生着は新鮮な臍帯血細胞と比較して減少しているが、オルガノイドなしで同じ条件で培養されたＵＣＢは、生着可能性をすぐに失った。したがって、これは、生着能力を維持しながら、ＨＳＣを培養するための新しい系を提供する。

【０１２０】

本明細書に示されるように、ヒトｉＰＳＣに由来する新規の胎児肝臓オルガノイド系は、共生共分化系において肝細胞および造血細胞の両方を生じさせることができる。この系の造血細胞は、造血性内皮集団から生じ、サイトカインの存在下で骨髄系統およびリンパ系統の両方に分化する。オルガノイド細胞をＭＳ－５マウス間質細胞と共培養すると、フローサイトメトリーによって特定されるように、胎児Ｂ１様細胞集団が生じる。ＵＣＢ細胞のオルガノイドとの共培養後の生着は限られたが、この系は、自然環境を模倣することで培養中のＨＳＣを維持する新しい方法の証拠を提供する。

【０１２１】

前述の実施形態の少なくともいくつかでは、実施形態で使用される１つ以上の要素は、そのような置換が技術的に実現可能でない限り、別の実施形態で交換可能に使用することができる。当業者は、特許請求される主題の範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法および構造に対して、他の様々な省略、追加、および修正を行うことができることを理解されたい。そのようなすべての修正および変更は、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、主題の範囲内に入ることが意図されている。

【０１２２】

本明細書における実質的に任意の複数形および／または単数形の用語の使用に関して、当業者は、文脈および／または用途に適切であるように、複数形から単数形へ、および／または単数形から複数形へと翻訳することができる。明確にするために、様々な単数形／複数形の順列が本明細書に明示的に記載され得る。

【０１２３】

一般に、本明細書で、特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）で使用される用語は、一般に「非限定」用語であることが意図される（例えば、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語は、「含むがこれに限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」という用語は「含むがこれに限定されない」と解釈されるべきであるなど）。特定数の導入された請求項の記載が意図されている場合、そのような意図は請求項に明示的に記載され、そのような記載がない場合、そのような意図は存在しないことが当業者によってさらに理解されるであろう。例えば、理解を助けるために、以下の添付の特許請求の範囲は、請求項の記載を導入するための「少なくとも１つ」および「１つ以上」という導入句の使用を含み得る。しかしながら、そのような句の使用は、不定冠詞「ａ」または「ａｎ」による請求項の記載の導入が、同じ請求項が、「１つ以上」または「少なくとも１つ」という導入句、および「ａ」または「ａｎ」などの不定冠詞が含まれる場合でも、そのような導入された請求項の記載を含む任意の特定の請求項を、そのような記載を１つだけ含む実施形態に限定することを意味すると解釈されるべきではなく（例えば、「ａ」および／または「ａｎ」は「少なくとも１つ」または「１つ以上」と解釈されるべきである）、請求項の記載を導入するために使用される定冠詞の使用にも同じことが当てはまる。加えて、特定数の導入された請求項の記載が明示的に記載される場合でも、そのような記載は、少なくとも記載された数を意味するように解釈されるべきであることを当業者は認識するであろう（例えば、他の修飾語のない、単なる「２つの記載」

の記載は、少なくとも２つの記載、または２つ以上の記載を意味する）。さらに、「Ａ、Ｂ、およびＣなどのうちの少なくとも１つ」に類似する表記が使用される場合、一般に、そのような構成は、当業者が慣習を理解するという意味で意図されている（例えば、「Ａ、Ｂ、およびＣのうちの少なくとも１つを有する系」は、Ａのみ、Ｂのみ、Ｃのみ、ＡおよびＢを一緒に、ＡおよびＣを一緒に、ＢおよびＣを一緒に、ならびに／またはＡ、Ｂ、およびＣを一緒に有する系などを含むが、これらに限定されない）。「Ａ、Ｂ、またはＣなどのうちの少なくとも１つ」に類似する表記が使用される場合、一般に、そのような構成は、当業者が慣習を理解するという意味で意図されている（例えば、「Ａ、Ｂ、またはＣのうちの少なくとも１つを有する系」は、Ａのみ、Ｂのみ、Ｃのみ、ＡおよびＢを一緒に、ＡおよびＣを一緒に、ＢおよびＣを一緒に、ならびに／またはＡ、Ｂ、およびＣを一緒に有する系などを含むが、これらに限定されない）。さらに、２つ以上の代替用語を提示するあらゆる離接語および／または離接句は、明細書、特許請求の範囲、または図面のいずれにあろうと、それら用語のうちの１つ、それらの用語のうちのいずれか、またはそれらの用語の両方を含む可能性を企図すると理解されるべきであることが、当業者には理解されるであろう。例えば、「ＡまたはＢ」という句は、「Ａ」または「Ｂ」または「ＡおよびＢ」の可能性を含むことが理解されるであろう。

【０１２４】

加えて、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群に関して記載される場合、当業者は、開示がそれにより、マーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの部分群に関しても記載されていることを認識するであろう。

【０１２５】

当業者によって理解されるように、書面による説明を提供することに関してなど、あらゆる目的のために、本明細書に開示されるすべての範囲は、ありとあらゆる可能な部分的な範囲およびその部分的な範囲の組み合わせも包含する。任意の列記される範囲は、同じ範囲が少なくとも２等分、３分の１、４分の１、５分の１、１０分の１などに分割されることを十分に説明し、それを可能にするものとして容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書で説明される各範囲は、下部３分の１、中部３分の１、および上部３分の１などに容易に分割することができる。また、当業者には理解されるように、「最大」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」などの言葉はすべて、列挙される数を含み、本明細書で記載される、部分的な範囲に後に分割することができる範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は、各個々のメンバーを含む。したがって、例えば、１～３つの項目を有する群は、１、２、または３つの項目を有する群を指す。同様に、１～５つの項目を有する群は、１、２、３、４、または５つの項目を有する群などを指す。

【０１２６】

様々な態様および実施形態が本明細書に開示されているが、他の態様および実施形態は当業者には明らかであろう。本明細書に開示される様々な態様および実施形態は、例示を目的とするものであり、限定することを意図するものではなく、真の範囲および趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示される。

【０１２７】

公開および未公開の出願、特許、ならびに文献の参照を含むが、これらに限定されない本明細書で引用されるすべての参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、これによって本明細書の一部となる。参照により組み込まれる刊行物および特許または特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する範囲で、本明細書は、任意のそのような矛盾する資料に取って代わる、および／または優先することを意図している。

【０１２８】

参考文献

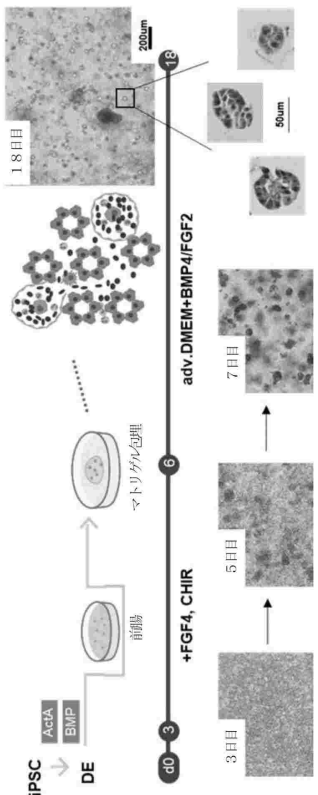
Ｓｕｇｉｍｕｒａ Ｒ，Ｊｈａ ＤＫ，Ｈａｎ Ａ，ｅｔ ａｌ．Ｈａｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｓｔｅｍ ａｎｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１７；５４５（７６

55):432-438.doi:10.1038/nature22370
Lis R, Karrasch CC, Poulos MG, et al. Conversion of adult endothelium to immunocompetent haematopoietic stem cells. Nature. 2017;545(7655):439-445.doi:10.1038/nature22326
Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, et al. Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. Nature. 2019;571(7763):117-121.doi:10.1038/s41586-019-1244-x
Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. Ann N Y Acad Sci. 2013;1285:97-114.doi:10.1111/nyas.12137
Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. Nat Immunol. 2006;7(3):293-301.doi:10.1038/ni1301
McCracken KW, Aihara E, Martin B, et al. Wnt/β-catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. Nature. 2017;541(7636):182-187.doi:10.1038/nature21021
Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature. 2011;470(7332):105-109.doi:10.1038/nature09691
Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatology. 2010;51(1):297-305.doi:10.1002/hep.23354
Uenishi GI, Jung HS, Kumar A, et al. NOTCH signaling specifies arterial-type definitive hemogenic endothelium from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2018;9.doi:10.1038/s41467-018-04134-7
Robert-Moreno A, Espinosa L, Pompa JL de la, Bigas A. RBPjκ-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. Development. 2005;132(5):1117-1126.doi:10.1242/dev.01660
Robert-Moreno A, Guiu J, Ruiz-Herguido C, et al. Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. EMBO J. 2008;27(13):1886-1895.doi:10.1038/emboj.2008.113

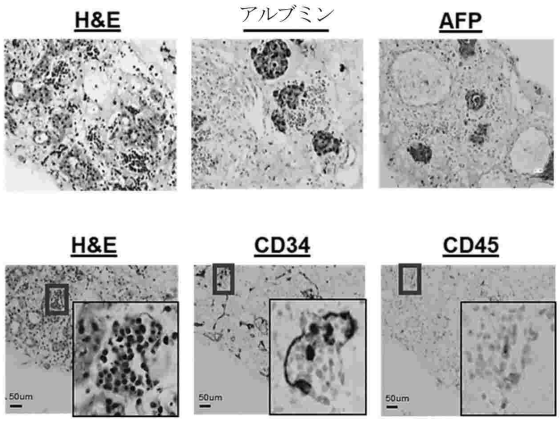
Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. J Exp Med. 2011;208(1):67-80. doi:10.1084/jem.20101499
Khan JA, Mendelson A, Kunisaki Y, et al. Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. Science. 2016;351(6269):176-180. doi:10.1126/science.aad0084
Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. J Clin Invest. 2000;105(7):1013-1021.
Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. Blood. 2008;111(7):3415-3423. doi:10.1182/blood-2007-11-122119

【図面】

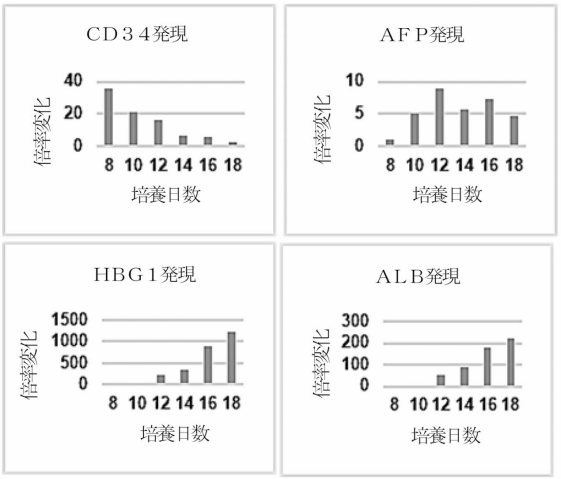
【図１Ａ】



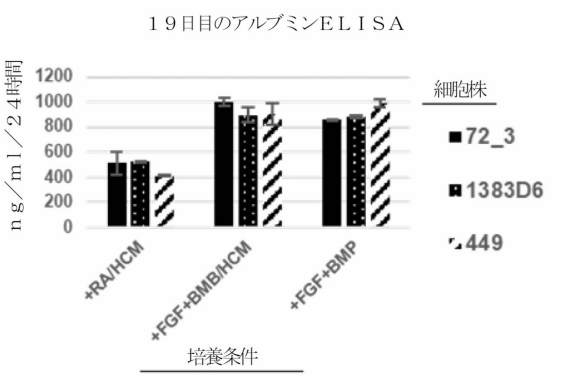
【図１Ｂ】



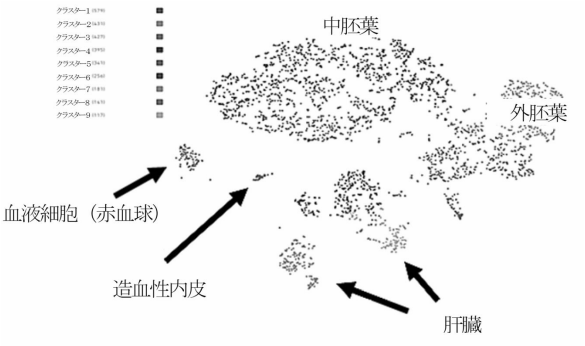
【図１Ｃ】


ＣＤ３４発現
ＡＦＰ発現
ＨＢＧ１発現
ＡＬＢ発現
倍率変化
培養日数
8 10 12 14 16 18
40
20
0
10
5
1500
1000
500
300
200
100

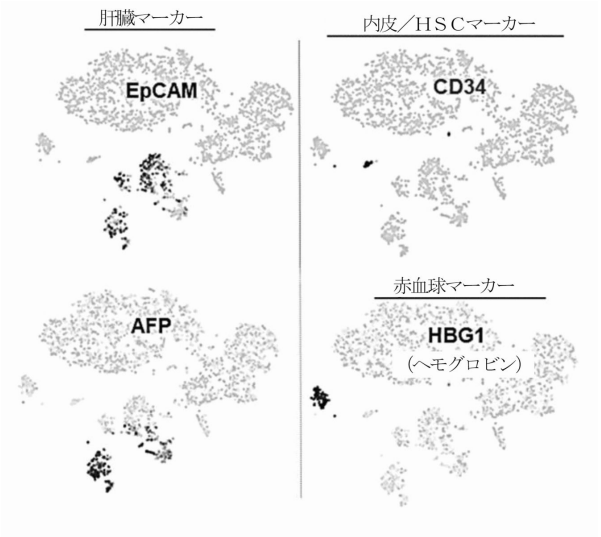
【図１Ｄ】


１９日目のアルブミンＥＬＩＳＡ
ｎｇ／ｍｌ／２４時間
1200
1000
800
600
400
200
0
細胞株
72_3
1383D6
449
+RA/HCM
+FGF+BMB/HCM
+FGF+BMP
培養条件

【図２】


中胚葉
外胚葉
血液細胞（赤血球）
造血性内皮
肝臓

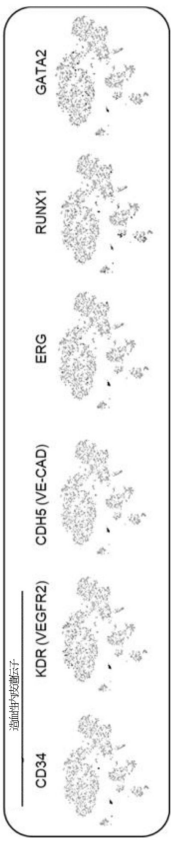
【図３】


肝臓マーカー
内皮／ＨＳＣマーカー
EpCAM
CD34
赤血球マーカー
AFP
HBG1
（ヘモグロビン）

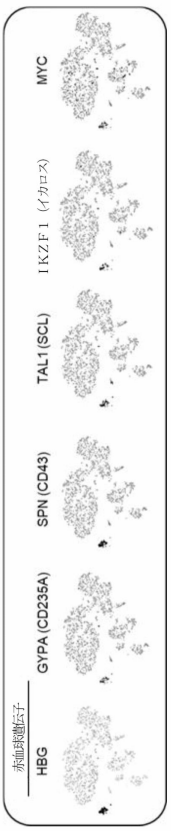
【図４Ａ】



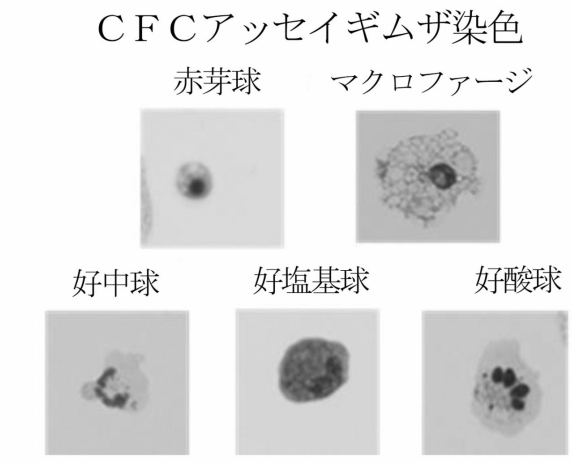
【図４Ｂ】



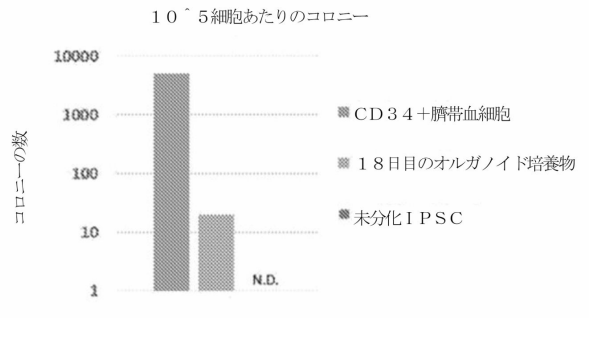
【図４Ｃ】



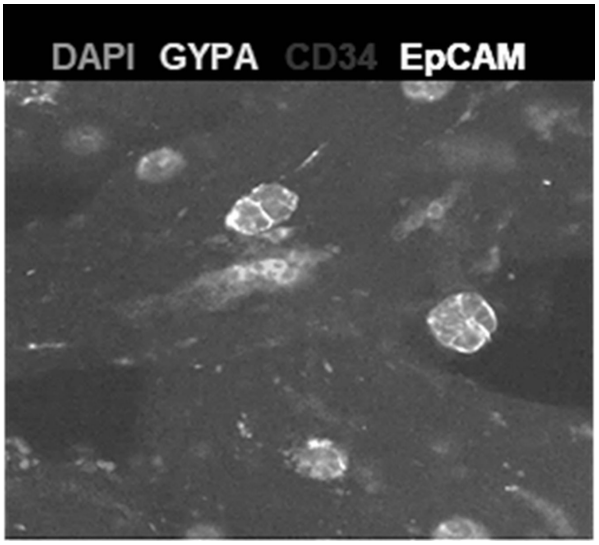
【図５Ａ】



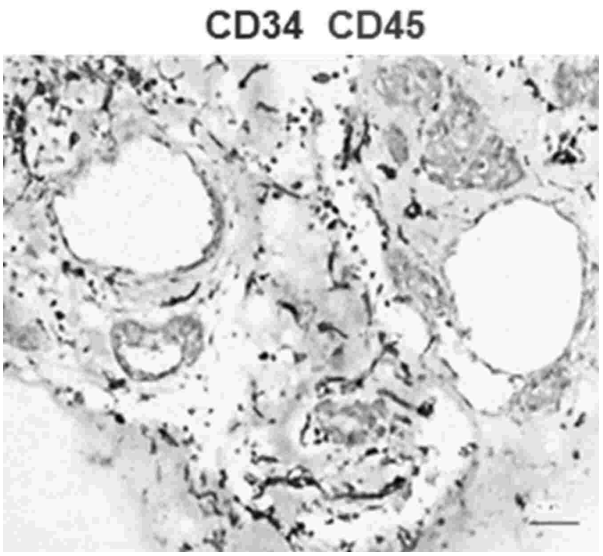
【図５Ｂ】



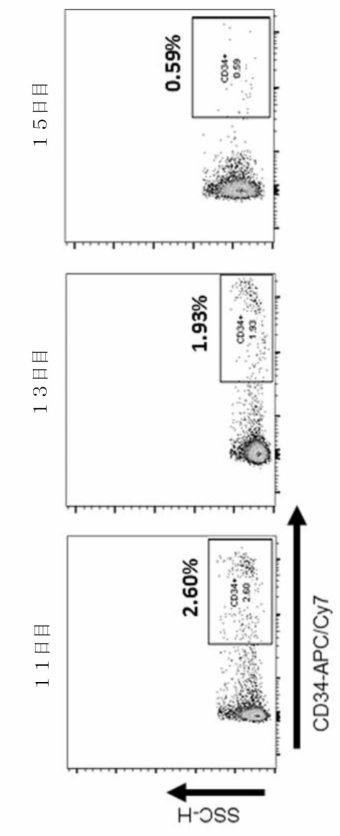
【図６Ａ】



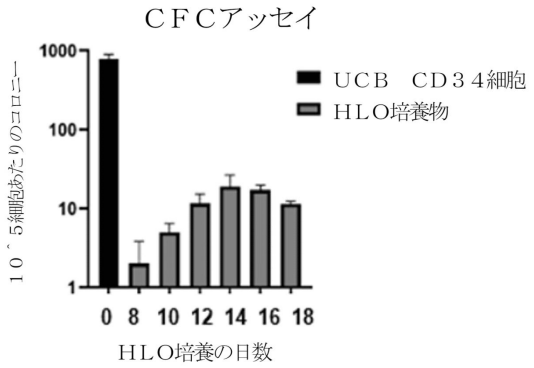
【図６Ｂ】



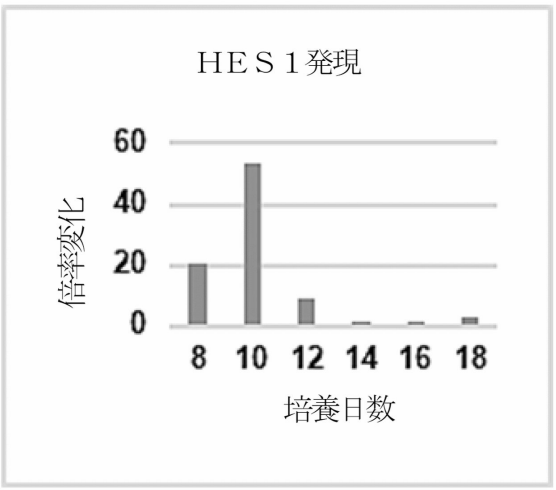
【図６Ｃ】



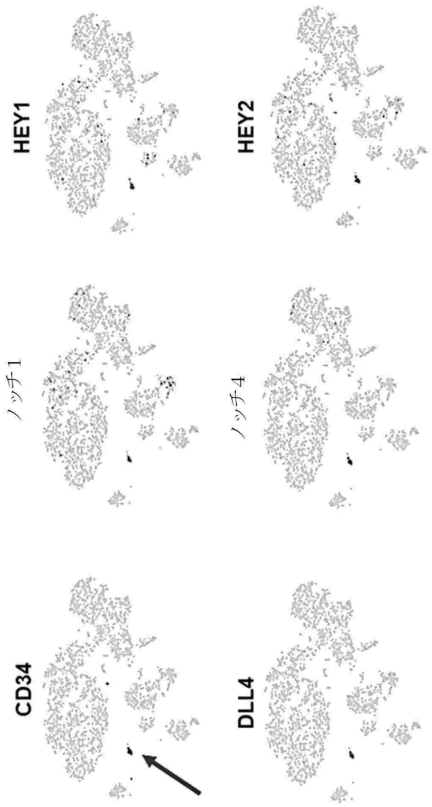
【図６Ｄ】



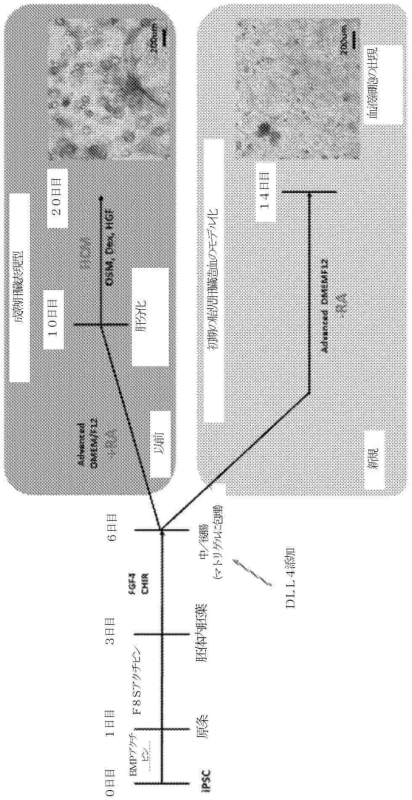
【図６Ｅ】



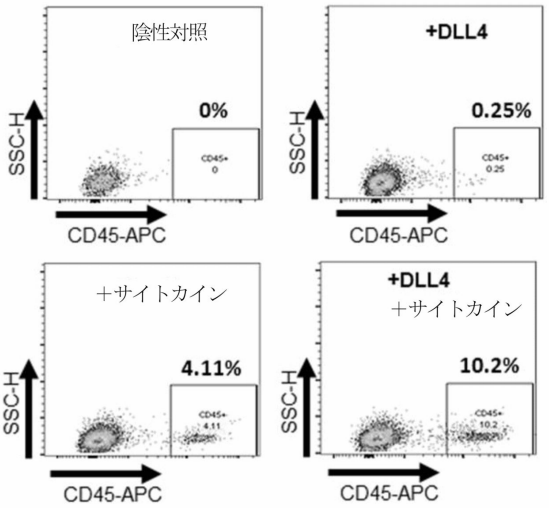
【図７Ａ】



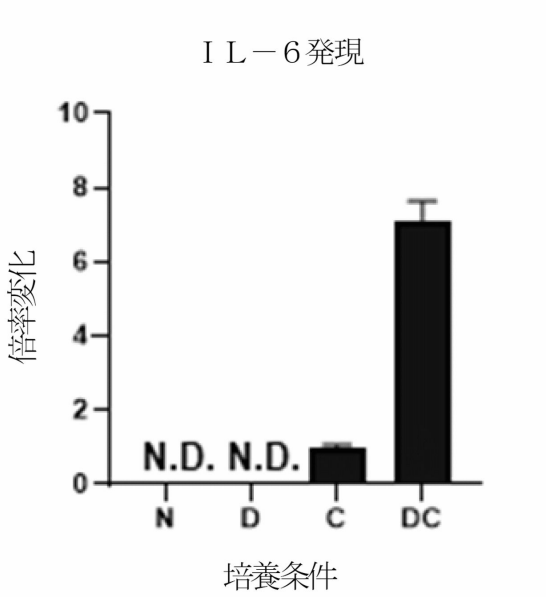
【図７Ｂ】



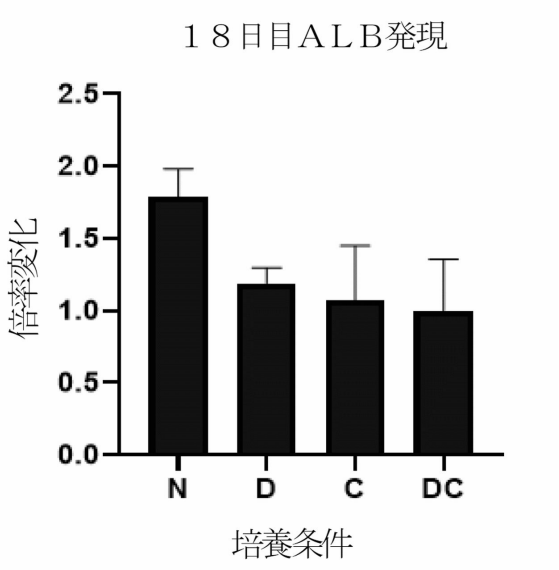
【図８】



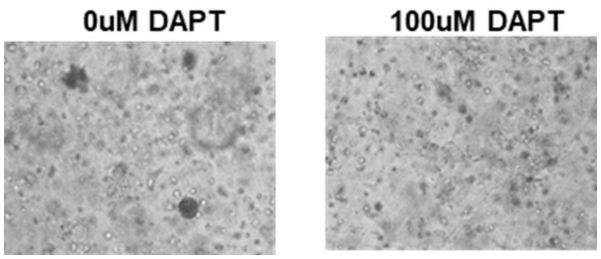
【図９Ａ】



【図９Ｂ】



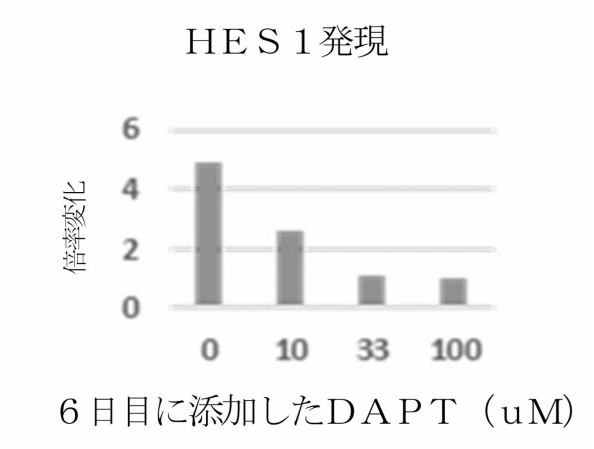
【図１０Ａ】



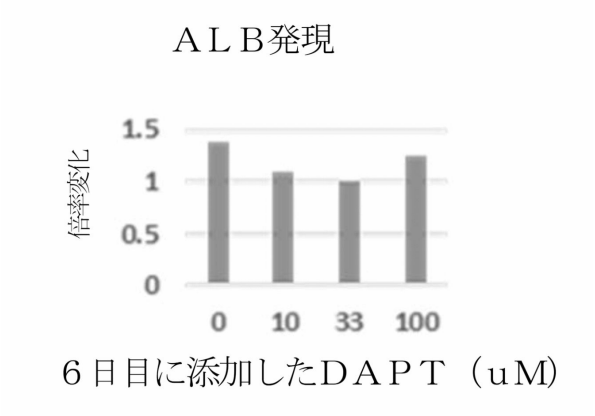
【図１０Ｂ】



【図１０Ｃ】



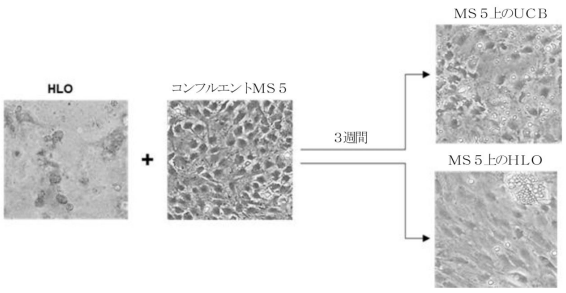
【図１０Ｄ】



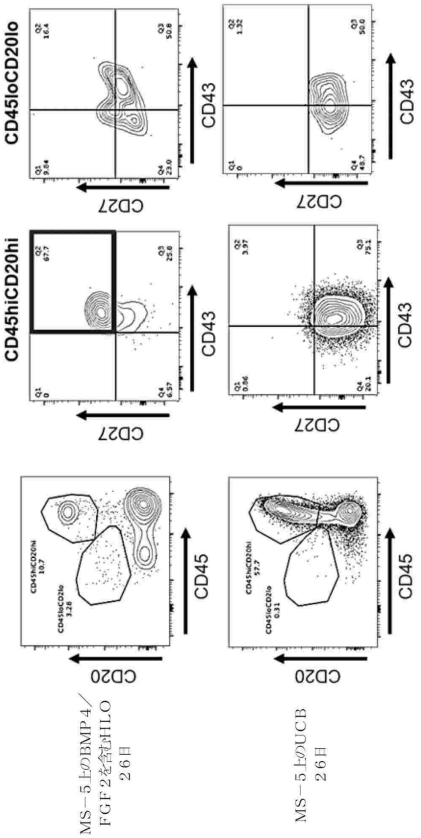
【図１１Ａ】



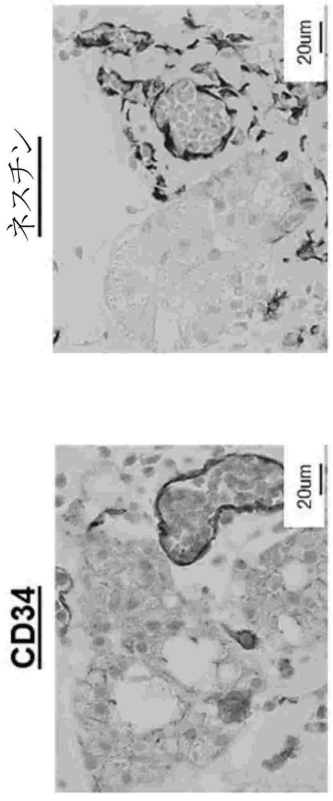
【図１１Ｂ】



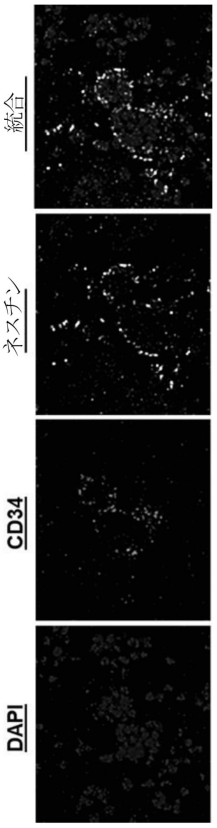
【図１１Ｃ】



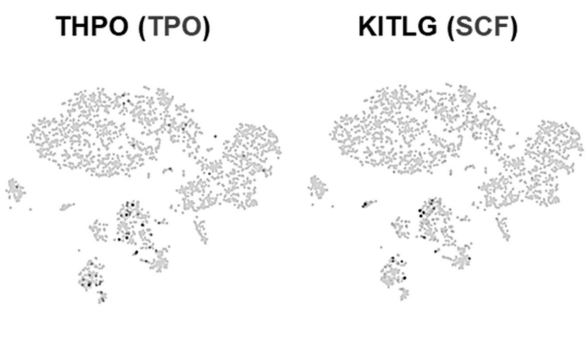
【図１２Ａ】



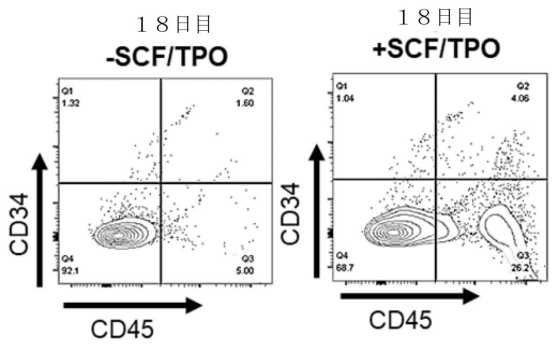
【図１２Ｂ】



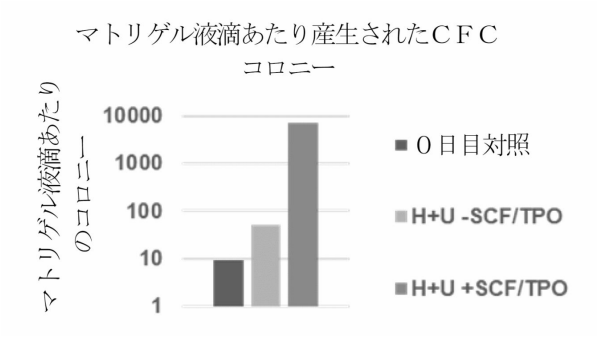
【図１２Ｃ】



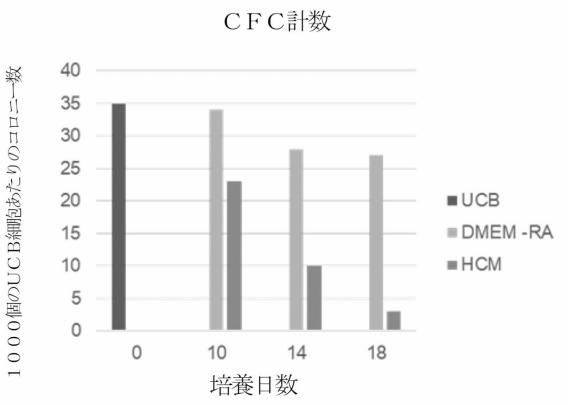
【図１２Ｄ】



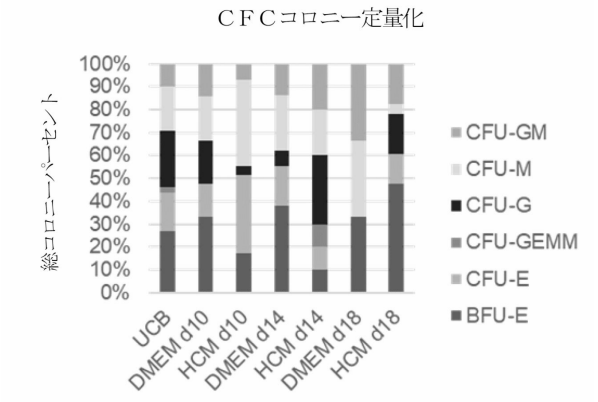
【図１２Ｅ】



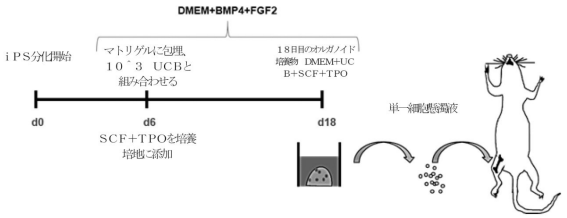
【図１２Ｆ】



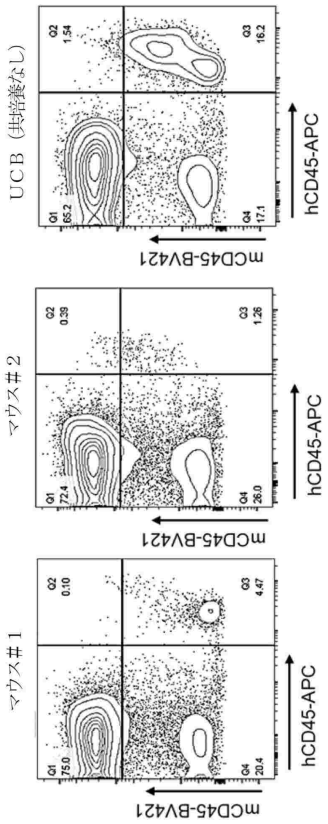
【図１２Ｇ】



【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



【配列表】

0007610533000001.app

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)
アメリカ合衆国、４５２２９－３０３９ オハイオ州、シンシナティ、３３３３ バーネット アベニュー、エムエルシー ７０３２、シー／オー チルドレンズ ホスピタル メディカル センター
審査官 市島 洋介
(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１６／０００２６０２（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１８／２２６２６７（WO，Ａ１）
Nat. Commun.，2016年，7:10243
Blood Res.，2015年，Vol. 50，pp.194-203
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）