

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7676361号
(P7676361)

(45)発行日 令和7年5月14日(2025.5.14)

(24)登録日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類	F I				
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071		
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	Z	

請求項の数 24 (全65頁)

(21)出願番号	特願2022-507745(P2022-507745)	(73)特許権者	500469235
(86)(22)出願日	令和2年8月11日(2020.8.11)		チルドレンズ ホスピタル メディカル
(65)公表番号	特表2022-544175(P2022-544175		センター
	A)		アメリカ合衆国45229-3039
(43)公表日	令和4年10月17日(2022.10.17)		オハイオ州、シンシナティ、バーネット
(86)国際出願番号	PCT/US2020/045809		アベニュー 3333
(87)国際公開番号	WO2021/030373	(74)代理人	100104411
(87)国際公開日	令和3年2月18日(2021.2.18)		弁理士 矢口 太郎
審査請求日	令和5年8月9日(2023.8.9)	(72)発明者	メイヒュー、クリストファー ノーマン
(31)優先権主張番号	62/885,903		アメリカ合衆国、45229-3039
(32)優先日	令和1年8月13日(2019.8.13)		オハイオ州、シンシナティ、3333
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		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	ウェルズ、ジェームズ マコーマック
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オルガノイド組成物を作製するための改良された方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つ以上の凝集オルガノイドを産生する方法であって、
胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化させることであって、
前記腸内胚葉単層は付着性であり、前記腸スフェロイドは分離され、増殖培地に懸濁されて
いる、分化させることと、
前記腸内胚葉単層を前記腸スフェロイドから分離することと、
前記腸内胚葉単層を腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に解離することと、
前記腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させることと、
前記1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して、前記1つ以上の凝集オルガノイドを産生す
ることと、を含む、方法。

【請求項2】

前記分離工程が、前記腸内胚葉単層から前記増殖培地および懸濁された腸スフェロイド
を吸引することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記解離工程が、前記腸内胚葉単層を酵素的に解離することを含む、請求項1または2
に記載の方法。

【請求項4】

前記凝集工程が、前記単一細胞懸濁液を懸滴で凝集させること、「v」もしくは「u」
底のマイクロウェル培養プレート内の前記単一細胞懸濁液を遠心分離すること、オービタ

ルシェーカーを使用して前記単一細胞懸濁液を凝集させること、または形成プレート内の前記単一細胞懸濁液を遠心分離すること、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記培養工程が、前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体と接触させることを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記腸内胚葉単層が、前腸内胚葉単層であり、前記腸スフェロイドが、前腸スフェロイドである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記胚体内胚葉を前記前腸内胚葉単層および前記前腸スフェロイドに分化させることが、前記胚体内胚葉を 1 つ以上の F G F シグナル伝達経路活性化因子、1 つ以上の W n t シグナル伝達経路活性化因子、もしくは 1 つ以上の B M P シグナル伝達経路阻害剤、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、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つ以上の凝集オルガノイドが、凝集肝臓オルガノイドである、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して前記 1 つ以上の凝集肝臓オルガノイドを形成することが、前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を 1 つ以上の F G F シグナル伝達経路活性化因子、1 つ以上の B M P シグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、もしくはオンコスタチン M、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、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 1 つ以上の凝集オルガノイドが、凝集胃オルガノイドである、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 1 つ以上の凝集胃オルガノイドが、凝集洞胃オルガノイドである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して前記 1 つ以上の凝集洞胃オルガノイドを形成することが、前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を E G F、レチノイン酸、もしくは 1 つ以上の B M P シグナル伝達経路阻害剤、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、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記腸内胚葉単層が、後腸内胚葉単層であり、前記腸スフェロイドが、後腸スフェロイドである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記胚体内胚葉を前記後腸内胚葉単層および前記後腸スフェロイドに分化させることが、前記胚体内胚葉を 1 つ以上の F G F シグナル伝達経路活性化因子、もしくは 1 つ以上の W n t シグナル伝達経路活性化因子、または両方と接触させることを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の凝集オルガノイドが、凝集腸オルガノイドである、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して前記 1 つ以上の凝集腸オルガノイドを形成することが、前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を E G F、1 つ以上の W n t シグナル伝達経路活性化因子、もしくは 1 つ以上の B M P シグナル伝達経路阻害剤、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、請求項 15 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記 1 つ以上の凝集オルガノイドが、凝集結腸オルガノイドである、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して前記 1 つ以上の凝集結腸オルガノイドを形成することが、前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体を EGF、1 つ以上の Wnt シグナル伝達経路活性化因子、もしくは 1 つ以上の BMP シグナル伝達経路活性化因子、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、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体が、少なくとも 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは 10000 個の腸内胚葉凝集体を含み、前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体の各々が、

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体の平均直径から $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、もしくは $\pm 1\%$ 以内の直径、あるいは、

前記 1 つ以上の腸内胚葉凝集体の平均体積から $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、もしくは $\pm 1\%$ 以内の体積、あるいは、

両方を含む、

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 ～ 19 のいずれか一項によって産生される 1 つ以上の凝集オルガノイド。

【請求項 21】

少なくとも 1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは 10000 個の腸内胚葉凝集体を含む、複数の腸内胚葉凝集体であって、前記複数の腸内胚葉凝集体の各々が、

前記複数の腸内胚葉凝集体の平均直径から $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、もしくは $\pm 1\%$ 以内の直径、あるいは

前記複数の腸内胚葉凝集体の平均体積から $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、もしくは $\pm 1\%$ 以内の体積、あるいは

両方を含む、複数の腸内胚葉凝集体。

【請求項 22】

前記複数の腸内胚葉凝集体が、同じ対象に由来する、請求項 21 に記載の複数の腸内胚葉凝集体。

【請求項 23】

複数のマイクロウェルおよび請求項 21 または 22 に記載の複数の腸内胚葉凝集体を含む形成プレートであって、前記複数のマイクロウェルの各々が、前記複数の腸内胚葉凝集体のうちの単一腸内胚葉凝集体を含む、形成プレート。

【請求項 24】

前記複数の腸内胚葉凝集体が、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法に従って産生される、請求項 21 に記載の複数の腸内胚葉凝集体または請求項 23 に記載の形成プレート。

【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 8 月 13 日に提出された米国仮特許出願第 62/885,903 号の優先権の利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0002】

本開示の態様は、概して、オルガノイド組成物、および、例えば、形成プレートにおけ

10

20

30

40

50

る前駆細胞の凝集を伴うそれを作製する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

ヒト多能性幹細胞（hPSC；胚性幹細胞および人工多能性幹細胞の両方を含む）は、個別の上皮層と間葉層とに組織化されたヒト三次元胃腸組織（例えば、ヒト腸オルガノイド；HIO）を生成するための再生可能な資源を表す。例えば、HIOにおいて、上皮はすべての既知の腸上皮細胞型を含み、吸収、腸内ホルモン合成、および粘膜分泌を含む機能的な腸組織のいくつかの特性を示す。実験動物モデルへの移植後、HIOは有意な増殖および成熟を経て、粘膜、粘膜下層、および固有筋層を含む出生後のヒトの腸に似ている。上皮細胞は、陰窩の成体幹細胞活性／前駆体ゾーンを含む陰窩絨毛構造と、栄養吸収および刷子縁酵素活性などの機能が可能な成熟上皮とに配置される。その結果、多能性幹細胞に由来するオルガノイドは、腸の発達および疾患を研究するための生理学的に関連性のある強力なツールであり、薬物開発のための新規プラットフォームも提供する。さらに、人工多能性幹細胞は、腸疾患を抱える個体を含むあらゆる個体に由来する可能性があることを考えると、個別化された医療用途向けのHIOなどの疾患／患者特異的オルガノイドを生成することが可能である。インビボ組織により類似した改良されたオルガノイド組成物、およびより堅牢で、拡張性があり、より速く、また費用効果の高いオルガノイド組成物を作製する方法に対する永続的な必要性が存在する。

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2019／0093076号明細書

（特許文献2） 米国特許出願公開第2018／0258400号明細書

（特許文献3） 米国特許出願公開第2018／0043357号明細書

（特許文献4） 米国特許出願公開第2017／0202885号明細書

（非特許文献）

（非特許文献1） ARORA et al. "A process engineering approach to increase organoid yield," Development, 15 March 2017 (15.03.2017). Vol. 144, No. 6, Pgs. 1128-1136. entire document

（非特許文献2） MILLER et al. "Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro," Nature Protocols. 28 February 2019 (28.02.2019), Vol. 14, No. 2, Pgs. 518-540. entire document

【発明の概要】

【0004】

本明細書に開示されるのは、1つ以上の凝集オルガノイドを産生する方法である。いくつかの実施形態において、方法は、胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化させることと、腸内胚葉単層を腸スフェロイドから分離することと、腸内胚葉単層を腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に解離することと、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させることと、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集オルガノイドを産生することと、を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は付着性であり、腸スフェロイドは分離され、増殖培地に懸濁されている。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、多能性幹細胞から分化されている。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞から分化されている。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、ヒト胚体内胚葉である。いくつかの実施形態において、分離工程は、腸内胚葉単層から増殖培地および懸濁された腸スフェロイドを吸引することを含む。いくつかの実施形態において、解離工程は、腸内胚葉単層を酵素的

に解離することを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、Accutase、Accumax、トリプシン、トリプシン／EDTA、コラゲナーゼ、ディスペーゼ、TrypLE Express、もしくはTrypLE Select、またはそれらの任意の組み合わせを用いて酵素的に解離される。いくつかの実施形態において、凝集工程は、単一細胞懸濁液を懸滴で凝集させること、「v」もしくは「u」底のマイクロウェル培養プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離すること、オービタルシェーカーを使用して単一細胞懸濁液を凝集させること、または形成プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離すること、あるい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において、形成プレートは、Aggrewellプレートである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体の各々は、約250、約500、約1000、約1500、約2000、約2500、約3000、約3500、約4000、約4500、約5000、約5500、約6000、約6500、約7000、約7500、約8000、約8500、約9000、約9500、もしくは約10000個の腸内胚葉細胞、または前述の細胞数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の数の腸内胚葉細胞を含む。いくつかの実施形態において、培養工程は、1つ以上の腸内胚葉凝集体を細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体は、マトリゲルを含む。

【0005】

本明細書に開示される実施形態のうちのいずれかにおいて、腸内胚葉単層は前腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは前腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を前腸内胚葉単層および前腸スフェロイドに分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、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において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子はFGF4を含むか、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はCHIR99021を含むか、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤はNogginを含むか、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において、1つ以上の凝集オルガノイドは、凝集肝臓オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集肝臓オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、もしくはオンコスタチンM、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において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子はFGF2を含むか、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子はBMP4を含むか、または両方である。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、凝集胃オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、凝集胃オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集胃オルガノイドは、凝集洞胃オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集洞胃オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、レチノイン酸、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、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において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、Nogginを含む。

【0006】

本明細書に開示される実施形態のうちのいずれかにおいて、腸内胚葉単層は後腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは後腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を後腸内胚葉単層および後腸スフェロイドに分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子はFGF4を含むか、もしくは1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はCHIR99021を含むか、または両方である。い

くつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、凝集腸オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集腸オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、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において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はR-スポンジンを含むか、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤はNogginを含むか、または両方である。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、凝集結腸オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集結腸オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、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において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はR-スポンジンを含むか、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子はBMP2を含むか、またはそれらの任意の組み合わせである。

10

【0007】

本明細書に開示される実施形態のいずれかにおいて、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、少なくとも1、10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000個の腸内胚葉凝集体、または前述の腸内胚葉凝集体数のうちのいずれか2つによって定義される数内の任意の数の腸内胚葉凝集体を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体の各々は、1つ以上の腸内胚葉凝集体の平均直径から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内の直径、または前述の直径のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の直径、あるいは1つ以上の腸内胚葉凝集体の平均体積から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内の体積、または前述の体積のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の体積、あるいは両方を含む。

20

【0008】

本明細書に開示される実施形態のうちのいずれにおいても、方法は、1つ以上の凝集オルガノイドをレシピエント対象に移植することをさらに含む。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、ヒトである。

30

【0009】

また本明細書に開示されるのは、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1つ以上の凝集オルガノイドのうちのいずれかである。また本明細書に開示されるのは、複数の腸内胚葉凝集体である。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体は、少なくとも1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000個の腸内胚葉凝集体、または前述の腸内胚葉凝集体数のうちのいずれか2つによって定義される数内の任意の数の腸内胚葉凝集体を含み、複数の腸内胚葉凝集体の各々は、複数の腸内胚葉凝集体の平均直径から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内の直径、または前述の直径のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の直径、あるいは複数の腸内胚葉凝集体の平均体積から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内の体積、または前述の体積のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の体積、あるいは両方を含む。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体は、同じ対象に由来する。また本明細書に開示されるのは、形成プレートである。いくつかの実施形態において、形成プレートは、複数のマイクロウェルおよび請求項38または39に記載の複数の腸内胚葉凝集体を含み、複数のマイクロウェルの各々は、複数の腸内胚葉凝集体のうちの単一

40

50

腸内胚葉凝集体を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される複数の腸内胚葉凝集体のうちのいずれか1つ、または本明細書に開示される形成プレートのうちのいずれか1つについて、複数の腸内胚葉凝集体は、本明細書に開示される方法のうちのいずれか1つに従って産生される。

【0010】

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。

【0011】

1. オルガノイド組成物を作製するための方法であって、

【0012】

後腸内胚葉（HGE）を解離させて、HGE由来の単一細胞集団を形成することと、

【0013】

該HGE由来の単一細胞集団を形成プレート内で凝集させることと、

【0014】

該HGE由来の単一細胞集団を該形成プレート内で培養して、凝集体を形成することと、

【0015】

該凝集体を、EGF、BMPシグナル伝達経路活性化因子、およびWntシグナル伝達経路活性化因子を用いて腸オルガノイドが形成されるまで培養することと、を含む、方法。

【0016】

2. 該後腸内胚葉（HGE）が、胚体内胚葉（DE）から得られる、代替案1に記載の方法。

【0017】

3. 該DEが、FGFシグナル伝達経路活性化因子およびWntシグナル伝達経路活性化因子と共に培養されて、該後腸内胚葉（HGE）を形成する、代替案2に記載の方法。

【0018】

4. 該オルガノイドが、前駆細胞から得られる、先行代替案に記載の方法。

【0019】

5. 該前駆細胞が、人工多能性幹細胞である、先行代替案に記載の方法。

【0020】

6. 該HGE由来の単一細胞集団が、後腸内胚葉細胞を含む、代替案1に記載の方法。

【0021】

7. 該凝集体が、約1000個の後腸内胚葉細胞、または約2000個の後腸内胚葉細胞、または約3000個の後腸内胚葉細胞、または約4000個の後腸内胚葉細胞、または約5000個の後腸内胚葉細胞を含む、先行代替案に記載の方法。

【0022】

8. 該凝集体を、付着防止リンス液と接触させる、先行代替案に記載の方法。

【0023】

9. 該凝集体を三次元構造、好ましくはマトリゲル（基底膜マトリックス）と接触させることと、該凝集体をオルガノイドが形成されるまでさらに培養することと、を含む、先行代替案に記載の方法。

【0024】

10. 該形成プレートが、マイクロウェル培養プレート、V底マイクロウェル培養プレート、懸滴培養プレート、または細胞集団を物理的に凝集させることができるプレートから選択される、先行代替案に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0025】

本明細書に記載の特徴に加えて、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描写しており、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。

【0026】

10

20

30

40

50

- 【図 1】 h P S C から H I O への分化および発達のタイムラインの実施形態を示す。
- 【図 2 A - C】 単一細胞の解離および凝集のための腸内胚葉単層の調製の実施形態を示す。
- 【図 3 A - B】 形成プレートおよび凝集体を形成するための細胞の凝集の実施形態を示す。
- 【図 4 - 6】 形成プレートまたはその構成要素の実施形態を示す。
- 【図 7 A】 ヒト腸オルガノイド (H I O) 生成のための既存のスフェロイド産生プロトコルの概略図の実施形態を示す。
- 【図 7 B】 既存のプロトコルの実施形態を使用した、スフェロイド産生の実験間変動の実施形態を示す。
- 【図 7 C】 既存のプロトコルの実施形態を使用した、スフェロイド産生のライン間変動の実施形態を示す。
- 【図 7 D】 図 7 C に対応する例示的な画像の実施形態を示す。
- 【図 8】 既存のプロトコルの実施形態によって産生された均一な C D X 2 + 後腸内胚葉の実施形態を示す。
- 【図 9 A】 H I O 生成のための凝集ベースのスフェロイド産生プロトコルの概略図の実施形態を示す。
- 【図 9 B】 複数の h P S C 株の成功した均一な凝集の実施形態を示す。
- 【図 9 C】 凝集方法によって産生される均一なスフェロイドの収量が大幅に増加したことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 9 D】 H G E 凝集からのウェル当たりのスフェロイドの収量が大幅に増加した実施形態を示す。
- 【図 9 E】 分離した自発的スフェロイドおよび凝集スフェロイドにおける上皮細胞および間葉系細胞の異なる組織化の実施形態を示す。
- 【図 10 A】 マトリゲルでの増殖後、分離した自発的スフェロイドおよび凝集スフェロイドが形態学的に区別できないことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 10 B】 マトリゲルに埋め込んでから 3 日後の分離した自発的スフェロイドおよび凝集スフェロイドにおける上皮細胞および間葉系細胞の区別できない組織を示す画像の実施形態を示す。
- 【図 11 A】 a g g H I O の増殖および形態が自発的 H I O と区別できないことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 11 B】 A g g H I O が、C D X 2 + 腸上皮および E m i l i n 1 + 間葉を含むことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 11 C】 自発的な分離 H I O および A g g H I O の両方が、近位小腸にパターン形成されていることを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 12 A】 A g g H I O が、インビボ移植後に強力な増殖および成熟を遂げることを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 12 B】 成熟した小腸マーカーの免疫蛍光分析の実施形態を示す。
- 【図 13 A】 凝集による洞ヒト胃オルガノイド (a H G O) の生成についての概略図の実施形態を示す。
- 【図 13 B】 凝集前腸内胚葉に由来する a H G O が、自発的 a H G O と形態学的に区別できないことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 13 C】 胃上皮マーカーの発現が、自発的 a H G O と凝集 a H G O とを区別できないことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 14 A】 凝集によるヒト結腸オルガノイド (H C O) の生成についての概略図の実施形態を示す。
- 【図 14 B】 凝集後腸内胚葉スフェロイドに由来する H C O が、自発的スフェロイドに由来する H C O と形態学的に区別できないことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 14 C】 結腸上皮マーカー S A T B 2 の発現が、自発的後腸内胚葉または凝集後腸内胚葉に由来する H C O 間で区別できないことを示す画像の実施形態を示す。
- 【図 15】 凝集によるヒト肝臓オルガノイド (H L O) の生成についての概略図の実施形態を示す。

10

20

30

40

50

【図16A】PSCから分化した胚体内胚葉培養における中胚葉（T発現により検出）および胚体内胚葉（FOX A2発現により検出）の集団密度を示す画像の実施形態を示す。

【図16B】図16Aの培養における中胚葉および胚体内胚葉集団の割合の定量化の実施形態を示す。

【図16C】PSC由来の胚体内胚葉から分化した前腸および後腸内胚葉単層培養における間葉（FOXF1発現により検出）および腸内胚葉（FOX A2発現により検出）の集団密度を示す画像の実施形態を示す。

【図16D】図16Cの培養における間葉および内胚葉集団の割合の定量化の実施形態を示す。

【図16E】3日目の胚体内胚葉と7日目の後腸内胚葉培養とを比較した、増殖中胚葉および増殖内胚葉の定量化の実施形態を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

オルガノイド生成の現在の技術は、hPSCの器官組織系統への段階的なインビトロ分化に依存している。例えば、胃腸オルガノイドの場合、幹細胞は最初に胚体内胚葉（DE）細胞に分化し、続いて前腸内胚葉（FGE）または後腸内胚葉（HGE）中間体に分化され（約7日間の培養）、この間に自発的形態形成が起こり、胚性腸管に似た三次元スフェロイドの形成および分離をもたらす。これらのスフェロイドは、細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体（例えば、マトリゲル）に埋め込まれ、増殖および器官分化を促進する培地で培養される。これらの条件で約28日後（培養合計の35日目）、ヒトオルガノイドを採取し、臓器の機能および形態の研究、薬物スクリーニング、またはさらなる増殖および成熟のための動物モデルへの生着などの目的に使用することができる。

【0028】

しかしながら、現在のオルガノイド生成方法にはいくつかの制限がある。特に、自発的スフェロイドの産生および異なるhPSC株間の分離の効率には大きなばらつきがある。自発的スフェロイドを産生する強力な能力があることが知られている株でも、自発的スフェロイドの産生および分離には実験ごとに大きなばらつきがある。特定のオルガノイド生成実験では、自発的スフェロイドの産生およびウェルからウェルへの分離の効率にも大きなばらつきがある。自発的スフェロイドの形成は、複数の付着したスフェロイドの大きな「鎖」で発生することがよくある。株間で生成される自発的なスフェロイドのサイズは、大きなばらつきがある可能性がある。したがって、自発的な形態形成への依存は、非効率的で一貫性のないスフェロイド生成と関連付けられる。さらに、これらの方法は、バイオ医薬品製造用途に必要なスケーラビリティの向上にはあまり適していない。

【0029】

本明細書で提供されるのは、既存の方法の1つ以上の制限を克服する、オルガノイドまたはその組成物を作製する改良された方法である。いくつかの実施形態において、開示された方法は、株間、実験間、およびウェル間のばらつきと関連付けられた自発的スフェロイド産生の低効率を排除または低減し、さらにスケーラビリティを改善するための方法を提供する。

【0030】

本明細書に開示される方法は、凝集時に自己組織化するhPSC由来細胞の能力を利用する。胃腸オルガノイドの場合、hPSCはDEに分化し、次いでFGEまたはHGEは、標準的な方法および細胞培養プレートに付着したままの細胞を使用して、自発的な形態形成およびスフェロイドの形成および分離が検出されない場合を含め、その後、単一細胞に解離される。いくつかの実施形態において、単一のFGEまたはHGE細胞は、次いで、例えば一晩、形成プレート内で凝集される。いくつかの実施形態において、形成プレートは、Aggrewellプレート（StemCell Technologies）である。いくつかの実施形態において、次いで、凝集体が採取され、オルガノイド（例えば、腸のオルガノイド）への増殖および分化のためにマトリゲルに埋め込まれる。改良された凝集方法によって得られたHIOの分析は、同じ実験で自発的スフェロイド生成によっ

10

20

30

40

50

て得られたH I Oと比較して有意差がないことを示している。さらに、凝集H G Eに由来するH I Oは、マウスモデルへの生着後に成熟したヒト腸組織に増殖する能力を保持する。いくつかの実施形態において、当技術分野で知られている他の種類のオルガノイドを区別するためのプロセスを、本明細書に記載の方法と共に用いることができる。

【0031】

本明細書に開示されるのは、凝集オルガノイドおよびその組成物、ならびに（腸スフェロイドとは対照的に）腸内胚葉単層の単一細胞懸濁液の凝集およびその後の凝集体の培養により凝集オルガノイドを形成することを伴う、それを作製する方法である。本明細書に開示される方法は、当技術分野で知られている従来の方法よりも高い信頼性および再現性を備えたオルガノイドを産生し、オルガノイド製造のスケールアップの実現可能性に影響を与える。これらの凝集オルガノイドは、薬物スクリーニングまたは個別化医療などの目的に使用することができ、例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物などの対象への自家移植もしくは同種異系移植、または免疫不全動物への異種移植に適している。いくつかの実施形態において、凝集オルガノイドは、肝臓、胃、洞胃、胃底、腸、または結腸オルガノイドである。いくつかの実施形態において、凝集オルガノイドは、患者から単離された細胞に由来する。オルガノイドを産生する方法は、米国特許第9,719,068号および同第10,174,289号、ならびにPCT公開第WO2016/061464号、同第WO2017/192997号、同第WO2018/106628号、同第WO2018/200481号、同第WO2018/085615号、同第WO2018/085622号、同第WO2018/085623号、同第WO2018/226267号、同第WO2020/023245号に見出すことができ、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【0032】

以下の詳細な説明では、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、通常、類似の記号は類似の構成要素を特定する。詳細な説明、図面、および特許請求の範囲に記載された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精神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、図に示される本開示の態様は、多種多様な異なる構成で配置、置換、結合、分離、および設計することができ、それらはすべて、本明細書に明示的に企図されることが容易に理解されよう。

【0033】

別段の定めがない限り、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による本開示に照らして読まれた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、次の用語を以下に説明する。

【0034】

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、「an element（要素）」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0035】

「約」は、参照する量（quantity）、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量（amount）、重量または長さに対し10%と同程度に変動する量（quantity）、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量（amount）、重量または長さを意味する。

【0036】

この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（comprising）」という言葉は、記載された工程もしくは要素または工程もしくは要素のグループを包含することを意味するが、いかなる他の工程もしくは要素または工程もしくは要素のグループも排除しないことを意味することが離解されよう。「からなる（consisting of）」

」は、語句「からなる」が続くすべてを含むことを意味する。そのため、語句「からなる」は、列挙された要素が必要であり（required）、または必須（mandatory）であり、その他の要素が存在し得ないことを示す。「本質的にからなる（consisting essentially of）」とは、この語句の前に列挙されたあらゆる要素の包含を意味しており、他の要素は、この列挙された要素に関して本開示で明示される活性もしくは作用を妨げないまたはこの活性もしくは作用に寄与しないものに限定される。したがって、「本質的にからなる」という句は、列挙された要素が必要であり（required）、または必須（mandatory）であるが、その他の要素は任意選択的であり、列挙された要素の活性もしくは作用に実質的な影響を及ぼすか否かに応じて存在してもよいし存在しなくてもよいことを示す。

10

【0037】

開示を明確にするために、「上の」、「下の」、「長手方向の」、「横方向の」、「横断の」、「内向き」、「外向き」などの空間用語が、本明細書または図面を参照して使用され、図面において、そのような用語は、例示的な説明の目的でのみ使用され、限定的または絶対的であることを意図するものではないことが理解されよう。その点に関して、本明細書に開示されるような器具は、本明細書に示され、説明されるものに限定されない様々な方向および位置で使用され得ることが理解されるであろう。

【0038】

本明細書で使用される「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一般的かつ通常の意味を有し、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、具体的には、サル（チンパンジー、類人猿、サル）およびヒトを含む霊長類、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、モルモットなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0039】

本明細書で使用される「有効量」または「有効用量」という用語は、明細書に照らして理解されるそれらの一般的かつ通常の意味を有し、観察可能な効果をもたらす記載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、特定の対象および／または用途に対して所望の応答を達成するのに有効な量の活性組成物または化合物を投与するように変えることができる。選択される投薬量レベルは、組成物の活性、配合物、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、および治療される対象の身体的状態ならびに病歴が挙げられるが、これらに限定されない様々な因子に依存するであろう。いくつかの実施形態において、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ている。

30

【0040】

本明細書で使用される「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ような明白で通常の意味を有し、生物学的、酵素的、または治療的機能を指す。

40

【0041】

本明細書で使用される「阻害する」という用語は、本明細書に照らして理解されるようなその一般的かつ通常の意味を有し、生物学的活性の減少または防止を指すことができる。減少は、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である割合、あるいは前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲内にある量によるものであり得る。本明細書で使用される場合、「遅延」という用語は、明細書に照らして理解されるような一般的かつ通常の意味を有し、生物学的事象の、そうでない場合に予想されるよりも遅

50

い時間への遅れ、延期、または延期を指す。遅延は、約 0 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、もしくは約それら以下である割合、または前述の値のうちのいずれか 2 つによって定義される範囲内にある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。

【0042】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、明細書に照らして理解されるような一般的かつ通常の意味を有し、(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)に、それが関連付けられた構成成分の少なくともいくつかから分離された、および／または(2) 人間の手によって産生、調製、および／または製造されたときにそれが関連付けられた成分の少なくともいくつかから分離された、物質および／または実体を指す。単離された物質および／または実体は、それらが最初に関連していた他の成分の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 %、もしくは100 %と等しい、約それらである、少なくともそれらである、少なくとも約それらである、それら以下である、または約それら以下であるもの(または前述の値を含むおよび／もしくはまたがる範囲)から分離され得る。いくつかの実施形態において、単離された薬剤は、80 %、約85 %、約90 %、約91 %、約92 %、約93 %、約94 %、約95 %、約96 %、約97 %、約98 %、約99 %、実質的に100 %、もしくは100 %純粋と等しい、約それらである、少なくともそれらである、少なくとも約それらである、それら以下である、または約それら以下(または前述の値を含むおよび／もしくはまたがる範囲)である。本明細書で使用される場合、「単離された」物質は、「純粋」であり得る(例えば、他の成分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してもよい。

【0043】

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一般的かつ通常の意味を与えられ、組織抽出物または死んだ生物とは対照的に、生きている生物、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。

【0044】

本明細書で使用される場合、「エクスビボ」は、明細書に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を与えられ、自然条件のほとんど変化のない生体外での方法の実行を指す。

【0045】

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一般的かつ通常の意味を与えられ、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。

【0046】

本明細書で使用される「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一般的かつ通常の意味を有し、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、自然に細胞内に現れるもの、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって生成されたフラグメント、およびライゲーション、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によって生成されたフラグメントを指す。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)であるモノマー、また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形態)、または両方の組み合わせから構成され得る。修飾ヌクレオチドは、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することができる。糖修飾には、例えば、1つ以上のヒドロキシル基のハロゲン、アルキル基、アミン、およびアジド基による置換が含まれるか、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ならびに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。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似体によって結合することができる。ホスホジエステル結合の類似体としては、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挙げられる。「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、核酸と互換的に使用することができ、二本鎖もしくは一本鎖のDNAまたはRNAのいずれかを指すことができる。核酸（単数または複数）は、様々な生物学的システムにおける核酸（単数または複数）の増幅および／もしくは発現に使用することができる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）、またはヒト人工染色体（HAC））中に含まれ得る。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、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、複製起点、クローニング部位、多重クローニング部位、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、標的化配列、ペプチド精製タグ、もしくはアクセサリー遺伝子、またはこ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エレメントも含有するであろう。

【0047】

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つ以上の配列を含むことができる。これらの1つ以上の配列は、同じ核酸もしくは核酸分子内で隣接して、あるいは、例えばリンカー、リピートもしくは制限酵素部位間の余分な核酸、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の塩基長、または前述の長さのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である、任意の他の配列と結合することができる。本明細書で使用する核酸に関する「下流」という用語は、明細書に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、核酸が二本鎖である場合、コード化配列（センス鎖）を含有する鎖上の前の配列の3'末端の後ろにある配列を指す。本明細書で使用する核酸に関する「上流」という用語は、明細書に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、核酸が二本鎖である場合、コード化配列（センス鎖）を含有する鎖上の後続の配列の5'末端の前にある配列を指す。本明細書で使用する核酸に関する「グループ化」という用語は、本明細書に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、直接もしくは、例えばリンカー、リピートもしくは制限酵素部位間の余分な核酸、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の塩基長、または、前述の長さのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である、任意の他の配列と近接して生じるが、一般に、機能的もしくは触媒的ポリペプチド、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間とは生じない2つ以上の配列を指す。

【0048】

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。他の核酸塩基として

は、プリン、ピリミジン、修飾核酸塩基、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、アミノアシル塩基、色素ラベル付け塩基、蛍光塩基、またはビオチンラベル付け塩基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

本明細書で使用される「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一般的かつ通常の意味を有し、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において既知であり、酵素、構造、輸送、防御、ホルモン、またはシグナル伝達が挙げられるが、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、常にではないが、多くの場合、核酸テンプレートを 사용하여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、およびタンパク質の置換、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、およびタンパク質変異を実行することができる。これらの2つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の融合は、同じ分子内で隣接して、あるいは、例えばリンカー、リピート、エピトープ、もしくはタグ間の余分なアミノ酸、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の塩基長、または、前述の長さのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である、任意の他の配列と結合することができる。本明細書で使用されるポリペプチドに関する「下流」という用語は、明細書に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、前の配列のC末端の後ろにある配列を指す。本明細書で使用されるポリペプチドに関する「上流」という用語は、明細書に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、後続の配列のN末端の前にある配列を指す。

【0050】

本明細書で使用される任意の所与の物質、化合物、または材料の「純度」という用語は、仕様に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、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%純粋であり、その間のすべての小数を含む。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、細胞破片、小分子、分解産物、溶媒、担体、ビヒクル、もしくは汚染物質、またはこ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不必要な不純物の影響を受ける場合がある。いくつかの実施形態において、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、宿主細胞培養成分、プロセス関連成分、マイコプラズマ、発熱物質、細菌内毒素、および外来性感感染性因子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、赤外線分光法、質量分析法、核磁気共鳴、重量測定、もしくは滴定、またはこ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技法を使用して測定することができる。

【0051】

本明細書で使用される任意の所与の物質、化合物、または材料の「収率」という用語は、仕様に照らして理解されるその一般的かつ通常の意味を有し、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総量を指す。例えば、物質、化合物、または材料の

収率は、予想される総量の 80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは 100% であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下であり、その間のすべての小数を含む。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、または製造の任意の工程での所望の物質、化合物、もしくは材料の損失によって影響を受ける場合がある。

【0052】

本明細書で使用される「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一般的かつ通常の意味を有し、100を掛けた組成物の全重量に対する成分または薬剤の重量に関して表された割合を指す。本明細書で使用される「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一般的かつ通常の意味を有し、組成物の全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関して表された割合に100を掛けたものを指す。

10

【0053】

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、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生産される。受精卵の最初の数分割によって生産される細胞も全能性である。

20

【0054】

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、本明細書で使用される場合、本明細書に照らして理解されるようなその明白で通常の意味を有し、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、「ESC」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。

【0055】

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ようなその明白で通常の意味を有し、体のほぼすべての細胞型、すなわち、内胚葉 (胃内壁、胃腸管、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、または特定の遺伝子の発現を強制することによって、非多能性幹細胞、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、任意の適切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。

30

【0056】

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、明細書に照らして理解されるようなその明白で通常の意味を有し、一般に iPSC 細胞とも省略され、特定の遺伝子の「強制」発現を誘導することにより、成人の体細胞などの通常は非多能性細胞から人工的に誘導された多能性幹細胞の一種を指し、hiPSC はヒト iPSC を指す。当技術分野で知られているいくつかの方法では、iPSC は、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誘導され得る。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とき、iPSC は、第一世代 iPSC、マウスにおける第二世代 iPSC、お

40

50

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を用い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としては、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、Sox1、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、Klf1、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、E-カドヘリン、またはこ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。

【0057】

本明細書で使用される場合、「前駆細胞」という用語は、明細書に照らして理解されるようなその明白で通常の意味を有し、本明細書に記載の方法で使用す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、1つ以上の専門化され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において、前駆細胞は、多能性であるか、または多能性になる能力を有する。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、多能性を獲得するために外部因子（例えば、増殖因子）の処理に供される。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、全能性 (totipotent)（または全能性 (omnipotent)）幹細胞、多能性幹細胞（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において、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において、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、胚幹細胞 (ESC)、胚性癌腫細胞 (EC)、および胚盤葉上層幹細胞 (EpiSC) が含まれる。

【0058】

いくつかの実施形態において、1つの工程は、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において、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。

【0059】

本開示による実施形態で使用する追加の幹細胞には、限定されないが、National Stem Cell Bank (NSCB)、University of California, San Francisco (UCSF) のHuman Embryonic Stem Cell Research Center、WiCell Research Institute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によって主宰されるデータベースによって得られる、データベースに記載されるものが挙げられるが、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)、UC01 (HSF1)、UC06 (HSF6)、WA01 (H1)、WA07 (H7)、WA09 (H9)、WA13 (H13)、WA14 (H14)が挙げられるが、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。

【0060】

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。

【0061】

いくつかの実施形態において、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において、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において、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。他の実施形態において、タンパク質の直接送達を用いて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において、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において、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。

【0062】

本明細書で使用される「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ようなその一般的かつ通常の意味を有し、増殖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、多能性幹細胞の増殖をサポートする細胞を指す。フィーダー細胞は一般に付着細胞であり、増殖が停止する場合もある。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）によって増殖が停止される。ただし、フィーダー細胞は必ずしも増殖を停止するとは限らない。フィーダー細胞は、増殖因子の分泌、細胞表面への増殖因子の表示、培地の無害化、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において、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において、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において、フィーダー細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態において、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、ヒト前皮線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト脂肪間葉系細胞、ヒト骨髓間葉系細胞、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、またはヒト成人卵管上皮細胞である。いくつかの実施形態において、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において、フィーダー細胞は、標的幹細胞の増殖中には使用されない。

【0063】

本明細書で使用される「細胞外マトリックス」という用語は、本明細書に照らしてその明白かつ通常の意味を有し、細胞接着および／または増殖を増強する任意の生物学的または合成化合物、物質、または組成物を指す。当技術分野で知られている任意の細胞外マトリックス、ならびにその模倣体または誘導体を、本明細書に開示される方法に使用することができる。細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体のいくつかの例としては、細胞ベースのフィーダー層、ポリマー、タンパク質、ポリペプチド、核酸、糖、脂質、ポリリジン、ポリオルニチン、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、エラスチン、テネイシン、硫酸ヘパラン、エンタクチン、ニドゲン、オステオポンチン、基底膜、マトリゲル、ヒドロゲル、P E I、W G A、もしくはヒアルロン酸、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。

【0064】

本明細書に記載のいくつかの実施形態は、本明細書に記載の細胞組成物の有効量と、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を含む、本質的になる、またはそれらからなる薬学的組成物に関する。本明細書に記載の薬学的組成物は、ヒトおよび／または獣医学の用途に適している。

【0065】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」は、明細書に照らして理解されるようなその明白で通常の意味を有し、使用される投与量および濃度で細胞または哺乳動物に曝露されている細胞または哺乳動物に対して無毒であるか、または許容可能な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「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ようなそれらの明白かつ通常の意味を有し、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を意図している。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、ヒトならびにネコや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、または他の規制当局の規制当局によって承認されるか、または米国薬局方または他の一般的に認められた薬局方に記載されている。希釈剤、賦形剤、および／または「担体」という用語は、薬学的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すことができる。そのような薬学的希釈剤、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、水および油などの無菌液体であり得る。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性溶液は、特に注射可能な溶液のために、液体希釈剤、賦形剤、および／または担体として使用することができる。適切な薬学的希釈剤および／または賦形剤には、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、チョコレート、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、エタノールなどを含む。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、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、デキストリンなどの炭水化物、EDTAなどのキレート剤、マンニトールや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抗剤、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤、PLURONICS（登録商標）のうちの1つ以上を含み得る。組成物は、必要に応

10

20

30

40

50

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、乳濁液、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。

【0066】

抗凍結剤は、大きな氷の結晶の形成を防ぐことにより、低温凍結保存の効率と収率を向上させるための細胞組成添加剤である。抗凍結剤には、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スターチが含まれるが、これらに限定されない。抗凍結剤は、細胞の解凍後の生存率を高めるための栄養素（例えば、アルブミン、血清、ウシ血清、ウシ胎児血清〔FCS〕）などの他の成分を含む凍結保存培地の一部として使用できる。これらの凍結保存培地において、少なくとも1つの抗凍結剤は、濃度が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%、もしくは90%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の割合で見出され得る。

【0067】

望ましい特性を有する追加の賦形剤には、保存剤、アジュバント、安定剤、溶媒、緩衝液、希釈剤、可溶化剤、洗浄剤、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シレート、塩化ベンゼトニウム、チメロサル、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、またはビタミン、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。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、細胞破片、核酸、ペプチド、アミノ酸、または増殖培地成分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、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%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%w/wであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、もしくは約それら以下である割合、または前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の割合で、組成物中に見出され得る。

【0068】

「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ように、その平易で通常の意味を有し、鎮痛剤、治療剤、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には、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含まれる。塩の形成のために適した無機塩基の例には、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、および重炭酸塩が含まれる。塩はまた、毒性がなく、そのような塩を形成するのに十分

強いものを含む、適切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；モノー、ジー、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、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。

【0069】

適切な製剤は、選択した投与経路によって異なる。本明細書に記載の化合物の製剤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、経腸、
経口、直腸、局所、舌下、頬、耳内、硬膜外、皮内、エアロゾル、非経口送達（筋肉内、皮下、動脈内、静脈内を含む）、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当技術分野に存在し、これらに限定されない。薬学的組成物は、一般に、特定の意図された投与経路に合わせて調整されるであろう。

【0070】

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ようなその平易で通常の意味を有し、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／または取り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。

【0071】

本明細書で使用される場合、「希釈剤」は、明細書に照らして理解されるようなその明白で通常の意味を有し、薬理学的活性を欠くが薬学的に必要または望ましい場合がある薬学的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バルク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。

【0072】

本明細書の開示は、概して、多くの実施形態を説明するために肯定的な言葉を使用している。本開示はまた、物質または材料、方法の工程および条件、プロトコル、または手順などの主題が完全にもしくは部分的に除外される実施形態を含む。

【0073】

PSCの分化

いくつかの実施形態において、ESCおよびiPSCなどのPSCは、最初に胚体内胚葉（DE）に、次いで前腸または後腸系統に、および胃腸組織に段階的な有向分化を受ける。いくつかの非限定的な実施形態において、PSCは、H1 hESC、iPSC 72 __ 3、iPSC 75 __ 1、もしくはiPSC 285 __ 1、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、PSCは、DE形成を促進するための分子（例えば、増殖因子、リガンド）およびその後の組織形成のための分子が同時に添加される、非段階的な有向分化を受ける。いくつかの実施形態において、有向分化は、iPSC
および／またはDE細胞における特定のシグナル伝達経路を選択的に活性化することによって達成される。いくつかの実施形態において、シグナル伝達経路としては、Wntシグナル伝達経路、Wnt/APCシグナル伝達経路、FGFシグナル伝達経路、TGF-βシグナル伝達経路、BMPシグナル伝達経路、Notchシグナル伝達経路、ヘッジホッグシグナル伝達経路、LKBシグナル伝達経路、およびPar極性シグナル伝達経路が挙げられるが、これに限定されない。列挙されたシグナル伝達経路の各々は、当技術分野で従来から知られているシグナル伝達経路活性化因子およびシグナル伝達経路阻害剤を有する。

【0074】

胚体内胚葉は腸管を生じさせる。前側DEは、前腸とそれに関連する食道、肺、胃、肝

10

20

30

40

50

臓、膵臓を含む臓器を形成し、後側DEは、後腸は中腸と後腸を形成し、小腸と大腸、および泌尿生殖器系の一部を形成する。マウス、ニワトリ、カエルの胚を使用した研究では、原腸胚段階でDEの前側－後側パターンを確立することが、その後の前腸および後腸の発達の前提条件であることが示唆されている。WntおよびFGFシグナル伝達経路は、後側内胚葉／後腸または前側内胚葉／前腸の運命を促進するために重要である。後腸では、単層立方体状の上皮は、最初に偽重層円柱上皮に発達し、次に分極した円柱上皮と、推定前駆領域に対応する絨毛の基部に増殖ゾーンとを含む絨毛に発達する。

【0075】

多能性細胞（例えば、iPSCまたはESC）から胚体内胚葉を産生するためのいずれの方法も、本明細書に記載の方法に適用可能である。いくつかの実施形態において、多能性細胞は桑実胚から派生する。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は幹細胞である。これらの方法で使用される幹細胞には、胚性幹細胞を含むが、これに限定されない。胚性幹細胞を、胚の内部細胞塊または胚の性腺隆起から派生することができる。胚性幹細胞または生殖細胞は、ヒトを含む種々の哺乳動物種を含むがこれらに限定されない種々の動物種から派生することができる。いくつかの実施形態において、ヒト胚性幹細胞を使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、ヒト胚性生殖細胞を使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、iPSC細胞を使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、iPSC細胞（hiPSC）を使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、PSCは、胚体内胚葉に分化する前に、最初に修飾される。いくつかの実施形態において、PSCは、胚体内胚葉に分化する前に、外因性の核酸またはタンパク質を発現するように遺伝子修飾される。

【0076】

いくつかの実施形態において、胚性幹細胞または生殖細胞またはiPSCは、6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、120時間、150時間、180時間、240時間、300時間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、もしくは約それら以下である時間、または前述の時間のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の時間、例えば、6時間～300時間、24時間～120時間、48時間～96時間、6時間～72時間、または24時間～300時間にわたって、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子で処理される。いくつかの実施形態において、複数の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子が添加される。これらの場合、複数の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子を同時にまたは別々に添加することができる。

【0077】

いくつかの実施形態において、胚性幹細胞または生殖細胞またはiPSCは、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子で、濃度が10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、75 ng/mL、100 ng/mL、120 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、1200 ng/mL、1500 ng/mL、2000 ng/mL、5000 ng/mL、7000 ng/mL、10000 ng/mL、もしくは15000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10 ng/mL～15000 ng/mL、100 ng/mL～5000 ng/mL、500 ng/mL～2000 ng/mL、10 ng/mL～2000 ng/mL、または1000 ng/mL～15000 ng/mLで処理される。いくつかの実施形態において、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子の濃度は、治療を通して一定レベルに維持される。いくつかの実施形態において、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子の濃度は、治療の過程で変化する。いくつかの実施形態において、複数の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子が添加される。これらの場合、複数の小分子化合物、活性化因子、阻害

剤、または増殖因子の濃度が異なる可能性がある。

【0078】

いくつかの実施形態において、ESC、生殖細胞、またはiPSCは、幹細胞の増殖をサポートする増殖培地で培養される。いくつかの実施形態において、ESC、生殖細胞、またはiPSCは、幹細胞増殖培地で培養される。いくつかの実施形態において、幹細胞増殖培地は、RPMI 1640、DMEM、DMEM/F12、mTeSR1、mTeSR Plus、DE分化、後腸内胚葉分化、腸ベース、または完全Sato培地である。いくつかの実施形態において、幹細胞増殖培地は、ウシ胎児血清(FBS)を含む。いくつかの実施形態において、幹細胞増殖培地は、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%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の割合、例えば、0%~20%、0.2%~10%、2%~5%、0%~5%、または2%~20%でFBSを含む。いくつかの実施形態において、幹細胞増殖培地は、異種成分を含有しない。いくつかの実施形態において、増殖培地は、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、または増殖因子を含む。

10

【0079】

いくつかの実施形態において、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において、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において、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、1つ以上(例えば、少なくとも1つ、3つ)のSOX17、FOXA2、またはCXRC4マーカーを、1つ以上(例えば、少なくとも1つ、3つ、5つ)のOCT4、AFP、TM、SPARC、またはSOX7マーカーよりも多く発現する。

20

【0080】

いくつかの実施形態において、胚体内胚葉細胞およびhESCは、1つ以上の増殖因子で処理される。そのような増殖因子は、TGF- β スーパーファミリーからの増殖因子を含み得る。いくつかの実施形態において、1つ以上の増殖因子は、増殖因子のTGF- β 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において、1つ以上の増殖因子は、Nodal、アクチビンA、アクチビンB、BMP4、Wntタンパク質、またはこれらの増殖因子のうちのいずれかの組み合わせからなる群から選択される。例えば、ヒトにおけるWntタンパク質としては、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、およびWnt16が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0081】

いくつかの実施形態において、アクチビン誘導性の胚体内胚葉(DE)は、FGFおよび/またはWnt誘導性の前側または後側パターン形成、前腸または後腸の特定および形態形成、ならびに最終的には胃腸増殖、形態形成および機能的な胃腸細胞型への細胞分化をさらに遂げることができる。いくつかの実施形態において、PSCは、分泌細胞型、内分泌細胞型および吸収性細胞型を含む胃腸上皮または間葉へとインビトロで分化するように効率的に定方向化される。増殖因子などの分子は、特定の種類の腸管組織形成を促進するために何らかの発達期に添加され得ることが理解されるであろう。

40

【0082】

インビトロでのヒト胃腸の発達、胎児の腸の発達に近い段階；内胚葉形成、前側または後側内胚葉パターン形成、前腸または後腸形態形成、胎児の腸の発達、上皮形態形成、推定前駆ドメインの形成、および機能的細胞型への分化において起こる。

【0083】

50

1つ以上のFGFタンパク質の濃度、発現、または機能を変更することと組み合わせて、1つ以上のWntシグナル伝達タンパク質の濃度、発現、または機能を変更することは、本開示による有向分化を生じさせることができることが、当業者によって理解されるであろう。いくつかの実施形態において、Wntおよび／またはFGFシグナル伝達経路に関連する細胞成分、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において、Wntおよび／またはFGFシグナル伝達経路に関連する細胞成分を標的にする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。

【0084】

線維芽細胞増殖因子（FGF）は、血管新生、創傷治癒、および胚発生に關与する増殖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、細胞表面関連ヘパリ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ならびに分化の過程で重要な役割を果たす。ヒトでは、FGFファミリーの22のメンバーが同定されており、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、線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）に結合する。FGF1は酸性線維芽細胞増殖因子としても知られており、FGF2は塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）としても知られている。FGF相同因子1～4（FHF1～FHF4）としても既知であるメンバーFGF11、FGF12、FGF13、およびFGF14は、FGFと比較して明確な機能的差異を有することが示されている。これらの因子は著しく類似した配列相同性を有しているが、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關与する。このグループは「iFGF」としても既知である。メンバーFGF15～FGF23はより新しく、あまり特徴付けられていない。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、アフリカツメガエル（*Xenopus*）FGF-20（XFGF-20）との相同性に基づいて同定された。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。

【0085】

いくつかの実施形態において、FGFのいずれかをWntシグナル伝達経路からのタンパク質と組み合わせて使用することができることが、当業者によって理解されるであろう。いくつかの実施形態において、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、またはFGF23のうちの1つ以上である。

【0086】

PSCのDE培養への、およびその後の様々な中間体成熟胃腸細胞型への分化は、段階特異的細胞マーカーの存在によって決定することができる。いくつかの実施形態において、代表的な細胞成分の発現は、DE形成を決定するために使用される。代表的な細胞成分には、CMKOR1、CXCR4、GPR37、RTN4RL1、SLC5A9、SLC40A1、TRPA1、AGPAT3、APOA2、C20orf56、C21orf129、CALCR、CCL2、CER1、CMKOR1、CRIP1、CXCR4、CXorf1、DIO3、DIO3OS、EB-1、EHHADH、ELOVL2、EPSTI1、FGF17、FLJ10970、FLJ21195、FLJ22471、FLJ23514、FOXA2、FOXQ1、GATA4、GPR37、GSC、LOC283537、MYL7、NPPB、NTN4、PRSS2、RTN4RL1、SEMA3E、SIAT8D、SLC5A9、SLC40A1、SOX17、SPOCK3、TMOD1、TRPA1、TTN、AW166727、AI821586、BF941609、AI916532、BC034407、N63706、もしくはAW772192、またはそれ

10

20

30

40

50

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。いくつかの実施形態において、前腸マーカー P d x 1 およびアルブミンなどの細胞成分の不在は、方向づけられた後腸形成を明らかにするために使用され得る。いくつかの実施形態において、1つ以上（例えば、少なくとも1, 3）の腸転写因子 C D X 2、K L F 5 または S O X 9 を使用して、腸の発達を表すことができる。いくつかの実施形態において、G A T A 4 または G A T A 6 タンパク質発現のうちの1つ以上は、腸の発達を表すために使用され得る。

【0087】

いくつかの実施形態において、形態学的変化を使用して、有向分化の進行を表すことができる。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層（例えば、中後腸、後腸、前腸、前側前腸、もしくは後側後腸内胚葉単層）、またはそれらの細胞は、成熟のための三次元培養条件に供される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、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日であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である日数、あるいは前述の日数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の日数、例えば、1～40日、20～30日、30～40日、または1～20日で胃腸オルガノイドに成熟する。いくつかの実施形態において、間葉系細胞によって囲まれた非常に複雑な上皮を観察することができる。いくつかの実施形態において、胃腸オルガノイド、上皮、分極した円柱上皮、間葉、神経細胞、または平滑筋細胞は、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、もしくは40日であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である日数、あるいは前述の日数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の日数、例えば、1～40日、20～30日、30～40日、または1～20日で観察することができる。

【0088】

いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は、「一工程」プロセスによって胃腸細胞型に変換される。例えば、多能性幹細胞を D E 培養に分化させることができる1つ以上の分子（例えば、アクチビン A）を、D E 培養の有向分化を促進できる追加の分子（例えば、C H I R 9 9 0 2 1 および F G F 4）と組み合わせて、多能性幹細胞を直接処理する。

【0089】

いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は、体細胞から調製される。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は、生検から得られた生物学的組織から調製される。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は、P B M C から調製される。いくつかの実施形態において、ヒト P S C は、ヒト P B M C から調製される。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は、凍結保存された P B M C から調製される。いくつかの実施形態において、P B M C は、フィーダー細胞基質上で増殖する。いくつかの実施形態において、P B M C は、マウス胚性線維芽細胞（M E F）フィーダー細胞基質上で増殖する。いくつかの実施形態において、P B M C は、照射された M E F フィーダー細胞基質上で増殖する。いくつかの実施形態において、P B M C は、0.1%ゼラチン上で増殖する。

【0090】

いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は、ウイルス形質導入によって P B M C から調製される。いくつかの実施形態において、P B M C は、センダイウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス、あるいはそれらの任意の組み合わせで形質導入される。いくつかの実施形態において、P B M C は、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、または L - M y c、またはそれらの任意の組み合わせのための発現ベクターを含むセンダイウイルスで形質導入される。いくつかの実施形態において、P B M C は、M O I が、0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、

4.0、4.5、もしくは5.0 MOIであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下であるMOI、あるいは前述のMOIのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意のMOI、例えば、0~5.0、1.0~4.0、2.0~3.0、0~3.0、または1.0~5.0で、1つ以上のウイルスで形質導入される。いくつかの実施形態において、形質導入後、PBMCは、幹細胞再プログラミング因子を発現する。いくつかの実施形態において、形質導入後、PBMCは、iPSCに再プログラムされる。いくつかの実施形態において、iPSCは、フィーダー細胞基質上で増殖する。いくつかの実施形態において、iPSCは、MEFフィーダー細胞基質上で増殖する。いくつかの実施形態において、iPSCは、照射されたMEFフィーダー細胞基質上で増殖する。いくつかの実施形態において、iPSCは、0.1%ゼラチン上で増殖する。いくつかの実施形態において、iPSCは、RPMI 1640、DMEM、DMEM/F12、mTeSR1、mTeSR Plus、DE分化、後腸内胚葉分化、腸ベース、または完全Sato培地中で増殖する。

【0091】

いくつかの実施形態において、PSC（例えば、ESCまたはiPSC）は、当技術分野で知られている方法に従って培養される。いくつかの実施形態において、PSCは、細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体において拡張される。いくつかの実施形態において、PSCは、マトリゲルにおいて拡張される。いくつかの実施形態において、培養中のPSCは解離され（例えば、ディスペーゼを使用する）、拡張のためにマトリゲルでコーティングされたプレート上にプレーティングされる。いくつかの実施形態において、PSCは、ROCK阻害剤（例えば、Y-27632）を含む細胞培養培地中で拡張される。いくつかの実施形態において、PSCは、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%のコンフルエンスまで拡張される。いくつかの実施形態において、PSCは、胚体内胚葉細胞に分化される。いくつかの実施形態において、PSCは、PSCをアクチビンAと接触させることによって、胚体内胚葉細胞に分化される。いくつかの実施形態において、PSCは、BMP4などの1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子とさらに接触する。いくつかの実施形態において、PSCは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、もしくは200 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~200 ng/mL、10~150 ng/mL、1~100 ng/mL、または100~200 ng/mLのアクチビンAまたは1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子の各々と接触する。いくつかの実施形態において、iPSCは、RPMI 1640、DMEM、DMEM/F12、mTeSR1、mTeSR Plus、1日目のDE分化、2日目のDE分化、3日目のDE分化、後腸内胚葉分化、腸ベース、または完全Sato培地中で胚体内胚葉に分化される。いくつかの実施形態において、DE分化培地は、1つ以上（例えば、少なくとも1、2、3、4）のRPMI 1640、非必須アミノ酸（NEAA）、透析ウシ胎児血清（dFCS）、もしくはアクチビンA、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において、1日目のDE分化培地は、0%または約0%のdFCSを含み、2日目のDE分化培地は、0.2%または約0.2%のdFCSを含み、3日目のDE分化培地は、2%または約2%のdFCSを含む。

【0092】

胚体内胚葉の分化

胚体内胚葉は、胃腸管（例えば、食道、肺、甲状腺、肝臓、膵臓、小腸、大腸）を含む、多くの主要臓器の胚性前駆体を表している。多能性幹細胞（PSC）から胚体内胚葉細胞を産生する方法としては、当技術分野で従来から知られている方法が挙げられる。いく

つかの実施形態において、胚体内胚葉は、PSCから分化されるか、または分化されている。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、胚性幹細胞（ESC）または人工多能性幹細胞（iPSC）から分化されるか、または分化されている。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉またはPSCは、ヒトに由来する。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、ヒト胚体内胚葉である。

【0093】

いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドを産生するための本明細書に記載される方法は、胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化させる工程を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、例えば、組織培養プレートまたは本明細書に開示される形成プレートの実施形態に付着し、腸スフェロイドは、胚体内胚葉、腸内胚葉単層、および腸スフェロイドを培養するために使用される増殖培地中で分離および懸濁される。本明細書で使用される場合、腸内胚葉は、胃腸系統へのパターン形成を受けた胚体内胚葉に由来する細胞を指す。いくつかの実施形態において、腸内胚葉は、前腸内胚葉、中腸内胚葉、後腸内胚葉、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書で使用される後腸内胚葉は、中腸および後腸内胚葉の両方を包含し、小腸および大腸器官系統を意味する。胚体内胚葉から腸内胚葉への分化中に、腸スフェロイドが自発的に形成され、浮遊細胞塊として腸内胚葉単層から分離される。これらの腸スフェロイドは、オルガノイドの初期の特徴、特に上皮細胞系統および間葉系細胞系統の両方を含む構成細胞集団の異質性を示す。

【0094】

本明細書に開示されるのは、胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化する方法である。しかしながら、以前から知られている方法を用いて、腸内胚葉単層を産生することもできる。方法は、例えば、米国特許第9,719,068号および同第10,174,289号、ならびにPCT公開第WO2016/061464号、同第WO2017/192997号、同第WO2018/106628号、同第WO2018/200481号、同第WO2018/085615号、同第WO2018/085622号、同第WO2018/085623号、同第WO2018/226267号、同第WO2020/023245号に見出すことができ、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。胚体内胚葉を腸スフェロイドに分化させるために以前に記載された方法は、腸内胚葉単層の産生が通常、腸内胚葉単層の同時産生をもたらすため、胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドの両方に分化させることと同義と見なすことができる。

【0095】

いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、またはそれらの任意の組み合わせ（例えば、少なくとも1、2、もしくは3）と接触させることによって、腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化される。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子は、本明細書に開示されるか、または当技術分野で知られている1つ以上のFGFタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF4を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、本明細書に開示されるか、または当技術分野で知られている1つ以上のWntタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、1つ以上のGSK3阻害剤を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、CHIR99021を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、本明細書に開示されるか、または当技術分野で知られている任意のBMPシグナル伝達経路阻害剤を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、Nogginを含む。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、レチノイン酸とさらに接触させられる。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、EGFとさらに接触させられる。

いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、レチノイン酸、またはEGFの各々は、提供される場合、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、もしくは10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、レチノイン酸、またはEGFの各々は、提供される場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μ Mであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μ M、1~10 μ M、5~15 μ M、または10~20 μ Mで接触させられる。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、胚体内胚葉を1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15日間培養することによって、腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化される。

【0096】

いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、前腸内胚葉単層および前腸スフェロイドに分化される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は前腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは前腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を前腸内胚葉単層および前腸スフェロイドに分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、またはそれらの任意の組み合わせ（例えば、少なくとも1、2、もしくは3）と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子はFGF4を含むか、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はCHIR99021を含むか、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤はNogginを含むか、またはそれらの任意の組み合わせ（例えば、少なくとも1、2、もしくは3）である。

【0097】

いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、後腸内胚葉単層および後腸スフェロイドに分化する。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は後腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは後腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を後腸内胚葉単層および後腸スフェロイドに分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子はFGF4を含むか、もしくは1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はCHIR99021を含むか、または両方である。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、例えば、本明細書に記載されるかまたは当技術分野で知られている1つ以上のBMPタンパク質と接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、後腸内胚葉分化培地中で腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化される。いくつかの実施形態において、後腸内胚葉分化培地は、1つ以上（例えば、少なくとも1、2、3、4、5）のRPMI 1640、NEAA、dFCS、FGF4、もしくはCHIR99021、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において、後腸内胚葉分化培地は、2%もしくは約2%のdFCS、500 ng/mLもしくは

は約500 ng/mLのFGF4、または3 μMもしくは約3 μMのCHIR99021、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0098】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法のうちのいずれかによって産生される腸内胚葉単層は、中胚葉および／または間葉系統の相対的な存在量によって、以前の方法に従って産生される腸スフェロイドと区別される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層を培養することは、中胚葉および／または間葉の増加をもたらす。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、総細胞数の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、もしくは20%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である総細胞数に対する割合、あるいは前述の割合のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の割合、例えば、1%～20%、1%～10%、10%～20%、または5%～15%の中胚葉および／または間葉を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、培養の同じ段階における腸スフェロイドと比較して、より多くの中胚葉および／または間葉を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、いくつかの中胚葉および／または間葉を含み、すなわち、腸スフェロイドに見られる中胚葉および／または間葉の数の1、2、3、4、または5倍であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である数、あるいは前述の倍数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の倍数の中胚葉および／または間葉を含む。

【0099】

腸内胚葉の単離および解離

胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化した後、本明細書に開示される方法のうちのいずれか1つは、両方とも増殖培地中にある腸スフェロイドから腸内胚葉単層を分離することを含む。当技術分野で知られている付着細胞（例えば、腸内胚葉単層）および浮遊細胞（例えば、腸スフェロイド）を分離する任意の方法を用いることができる。例えば、非限定的な実施形態として、増殖培地および懸濁腸スフェロイドを吸引して、腸内胚葉単層を残す。いくつかの実施形態において、1回以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の洗浄工程を行い、腸スフェロイドのすべてまたはほとんどが確実に除去されるようにすることができる。いくつかの実施形態において、増殖培地を穏やかに攪拌して、沈降した腸スフェロイドを再懸濁することができる。別の非限定的な実施形態において、腸内胚葉単層および腸スフェロイドは、付着した腸内胚葉単層を保持しながら、分離および懸濁された腸スフェロイドを連続的に除去するために、新鮮な増殖培地または洗浄溶液の連続流動条件（例えば、フローチャンバーもしくは細胞内）に供される。

【0100】

本明細書に開示される方法のうちのいずれか1つにおいて腸内胚葉単層を腸スフェロイドから分離した後、方法は、腸内胚葉単層を腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に解離することをさらに含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞は、前腸内胚葉細胞もしくは後腸内胚葉細胞、または両方を含む。いくつかの非限定的な実施形態において、腸内胚葉単層を解離することは、腸内胚葉単層を機械的に解離するか、もしくは酵素的に解離すること、または両方を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、タンパク質分解酵素および／またはコラーゲン分解酵素で解離される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、Accutase (StemCell Technologies)、Accumax (StemCell Technologies)、トリプシン、トリプシン／EDTA、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、TrypLE Express (Thermo Fisher)、TrypLE Select (Thermo Fisher)、またはそれらの任意の組み合わせを用いて酵素的に解離される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、例えば、ピペットを用いた粉碎によって機械的に解離される。

いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を濾過して、解離していない細胞塊を除去する。

【0101】

腸内胚葉の凝集

本明細書に開示される方法のうちのいずれか1つにおいて腸内胚葉単層を腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に解離させた後、方法は、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させることをさらに含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、1つ以上の前腸内胚葉凝集体であるか、それを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、腸内胚葉凝集体は、1つ以上の後腸内胚葉凝集体であるか、それを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。いくつかの非限定的な実施形態において、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させることは、単一細胞懸濁液を懸滴で凝集させること、マイクロウェル培養プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離すること、「v」もしくは「u」底のマイクロウェル培養プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離すること、オービタルシェーカーを使用して単一細胞懸濁液を凝集させること、または形成プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離することのうちの1つ以上（例えば、少なくとも1、2、もしくは3）、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において、単一細胞懸濁液を遠心分離することは、単一細胞懸濁液を重力によって凝集体に沈降させることで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、形成プレートは、本明細書に開示される形成プレートのうちの1つである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体の各々は、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、もしくは10000個の腸内胚葉細胞であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である細胞数、あるいは前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の数の腸内胚葉細胞、例えば50～10000細胞、50～4000細胞、1000～10000細胞、または1000～5000個の腸内胚葉細胞を含む。いくつかの実施形態において、凝集後、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、RPMI 1640、DMEM、DMEM/F12、mTeSR1、mTeSR Plus、DE分化、後腸内胚葉分化、腸ベース、または完全Sato培地で培養される。いくつかの実施形態において、腸ベース培地は、1つ以上（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6）の高度なDMEM/F12、B27サプリメント、インスリン、N2サプリメント、HEPES緩衝液、ペニシリン/ストレプトマイシン、もしくはL-グルタミン、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において、完全Sato培地は、1つ以上（例えば、少なくとも1、2、3、4）の腸ベース培地、EGF、Noggin、もしくはR-スポンジン、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において、完全Sato培地は、500 ng/mLもしくは約500 ng/mLの組換えヒトEGF、100 ng/mLもしくは約100 ng/mLの組換えヒトNoggin、または500 ng/mLもしくは約500 ng/mLの組換えヒトR-スポンジン、あるい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において、本明細書に開示される培地のうちのいずれか（例えば、完全Sato培地）は、ROCK阻害剤で補足され得る。いくつかの実施形態において、ROCK阻害剤は、Y-27632である。いくつかの実施形態において、ROCK阻害剤は、10 μMまたは約10 μMで補足される。

【0102】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞は、オービタルシェーカーを使用して凝集される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞の懸濁液は、37℃のインキュベーター内のオービタルシェーカー上に置かれる。シェーカーによって懸濁液に与えられた動きにより、細胞が互いに接触し、凝集体が

10

20

30

40

50

形成される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞の凝集体は、振盪の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、もしくは48時間以内、または前述の時間のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の時間、例えば、1～24時間、24～48時間、もしくは12～36時間以内に形成される。

【0103】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞は、細胞を重力によって懸濁液から沈降させることによって凝集される。

10

【0104】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞は、懸滴法によって凝集される。いくつかの実施形態において、この懸滴法は、表面（例えば、細胞培養プレート）上で逆さまに増殖培地に懸濁する腸内胚葉細胞の液滴をスポッティングすることと、細胞を液滴の底に沈めて凝集させることと、を含む。

【0105】

形成プレート

図2A～Cは、単一細胞の解離および凝集のための例示的な腸内胚葉単層の調製の実施形態を示す。いくつかの実施形態において、凝集は、形成プレート、マイクロウェル培養プレート、「v」底マイクロウェル培養プレート、「u」底のマイクロウェル培養プレートにおいて、もしくはオービタルシェーカーを使用して、またはそれらの任意の組み合わせで行われる。いくつかの実施形態において、形成プレートは、Aggrewellプレート（StemCell Technologies）、または一般に、本明細書に記載される方法に従って細胞を凝集させるための任意の他のプレートである。

20

【0106】

最初に、図2Aおよび2Bに関して、いくつかの実施形態において、複数の人工多能性幹細胞（14）は、本明細書に記載されるかまたは当技術分野で知られている条件下で生体適合性容器（16）内で培養されて、胚体内胚葉（18）を形成する。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉（18）は、生体適合性容器（16）内で腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化するために、本明細書に記載されるかまたは当技術分野で知られている条件下で培養され続ける。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、前腸内胚葉単層または後腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは、前腸スフェロイドまたは後腸スフェロイドであるが、腸内胚葉単層および／または腸スフェロイドの任意の変形が企図される。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、生体適合性容器（16）に付着する一方で、腸スフェロイドは分離され、生体適合性容器（16）内に含まれる増殖培地に懸濁されている。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、生体適合性容器（16）から増殖培地および懸濁腸スフェロイドを吸引することによって腸スフェロイドから分離される。いくつかの実施形態において、単離された腸内胚葉単層は、次いで、本明細書に記載され、図2Cに示されるように、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液（10）に解離される。いくつかの実施形態において、単一細胞懸濁液（10）を収集し、本明細書に開示されるかまたは当技術分野で知られている方法のうちのいずれかに従って凝集に供して、1つ以上の腸内胚葉凝集体（20）を形成する。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体（20）を、同じまたは異なる生体適合性容器（16）に入れて、1つ以上の腸内胚葉凝集体を1つ以上の凝集オルガノイドに培養する。

30

40

【0107】

図3A～6は、形成プレート（12）の実施形態を示す。いくつかの実施形態において、形成プレート（12）は、ベース（22）および複数のウェル（24）を有する。図4に示される例示的なプレートは6つのウェルを有するが、任意の数のウェル（例えば、少なくとも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、2

50

9、30、100、500、1000、2000、5000、またはそれ以上）も同様に使用できることが理解されるであろう。いくつかの実施形態において、形成プレート（12）の各ウェル（24）は、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液（10）を受容し、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液（10）を複数の腸内胚葉凝集体（20）に凝集させるように構成された複数のマイクロウェル（26）をその底部（28）に沿って含む。図6に関して、いくつかの実施形態において、各マイクロウェル（26）は、長さ（30）、幅（32）、および深さ（34）を含む。いくつかの実施形態において、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000 μm であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である長さ（30）、あるいは前述の長さのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さ、例えば、100～1000 μm 、100～500 μm 、500～1000 μm 、または300～600 μm が長手方向に延びる。いくつかの実施形態において、長さは、マイクロウェル（26）の対向する長手方向の側壁（36）の間で定義される。いくつかの実施形態において、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000 μm であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である幅（32）、あるいは前述の幅のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の幅、例えば、100～1000 μm 、100～500 μm 、500～1000 μm 、または300～600 μm が横方向に延びる。いくつかの実施形態において、幅は、マイクロウェル（26）の対向する横方向の側壁（38）の間に定義される。いくつかの実施形態において、50、100、150、200、250、300、350、400、450、もしくは500 μm であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である深さ（34）、あるいは前述の深さのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の深さ、例えば、50～500 μm 、50～300 μm 、300～500 μm 、または100～400 μm が横断方向の長手方向および横方向に垂直に延びる。いくつかの実施形態において、深さ（34）は、底部（28）の上面（42）の開口部（40）と底部（28）の床面（44）との間に定義される。いくつかの実施形態において、各マイクロウェル（26）は、それぞれの長手方向側壁（36）、横方向側壁（38）、開口部（40）、および床面（44）の間に定義される。いくつかの実施形態において、蓋はプレート（12）に含まれ、開いているのではなくカプセル化されるようにウェル（24）を覆うように構成され得る。いくつかの実施形態において、形成プレート（12）は、本明細書で提供される実施例のうちのいずれかで示され、説明されるウェル（24）およびマイクロウェル（26）の特定の数、配置、またはサイズに不必要に限定されることを意図しない。いくつかの実施形態において、形成プレートは、AggreWellプレート（StemCell Technologies）である。いくつかの実施形態において、AggreWellプレートは、AggreWell 400またはAggreWell 800プレートである。

【0108】

いくつかの実施形態において、単一細胞懸濁液（10）を凝集させるために、マイクロウェル（26）は、比較的広い開口部（40）から比較的狭い床面（44）に向かって一緒に先細りになる。いくつかの実施形態において、図6に示されるように、対向する長手方向側壁（36）が、開口部（40）から床面（44）まで互いに向かって先細りになる一方で、対向する横方向側壁（38）が、開口部（40）から床面（44）に向かって互いに向かって同様に先細りになる。いくつかの実施形態において、重力は、懸濁液中の単一細胞を横断方向に下向きに強制する一方で、長手方向および横方向の側壁（36、38）によって細胞に加えられる反動力は、細胞を互いに内側に向けて、単一細胞と一緒に効果的に集めて凝集させる。いくつかの実施形態において、そのような先細りは、三次元凝集体としての細胞の凝集を可能にし、これは遠心分離機でさらに促進され得る。いくつかの実施形態において、各マイクロウェル（26）は、50、100、200、400、60

0、800、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000個の単一細胞であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である単一細胞数、あるいは前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の細胞数、例えば、50～10000細胞、50～4000細胞、1000～10000細胞、または1000～5000細胞を受容する。

【0109】

いくつかの実施形態において、長手方向および横方向の側壁（36、38）は同一の寸法を有し、逆ピラミッドの形状を有するマイクロウェル（26）内の空隙を定義する。いくつかの実施形態において、長手方向側壁（36）および横方向側壁（38）は平面であり、床面（44）に向かって一緒に先細になり、これは本質的にピラミッドの形状の逆先端である。いくつかの実施形態において、長手方向側壁（36）、横方向側壁（38）、および床面（44）のうちの1つ以上は、様々な縁部で交差するのではなく、連続した表面である。いくつかの実施形態において、マイクロウェル（26）の様々な側壁（36、38）および床面（44）は、本明細書の実施例のうちのいくつかに示される非連続の交差する表面に不必要に限定されることを意図しない。いくつかの実施形態において、マイクロウェル（26）内の空隙は、含有細胞の収集および／または合体を可能にする他の形状で成形される。当業者は、例えば、円錐形、ドーム形、凹形、楕円形、放物線形、および／または双曲線形状を含むがこれらに限定されない、マイクロウェル（26）の許容可能な形状を決定することができる。いくつかの実施形態において、マイクロウェルの形状およびサイズは、他の組織と関連付けられる内胚葉または前駆細胞などの単一細胞の特定の集団に対してより効果的な増殖のために特に構成されるように変化する。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、図に示される形成プレート（12）および／またはマイクロウェル（26）の特定の形状および寸法に、または本明細書で論じられる特定の細胞で使用するために不必要に限定されることを意図しない。

【0110】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される形成プレートのうちのいずれか1つの各マイクロウェル（26）は、50、100、200、400、600、800、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000個の単一細胞であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である単一細胞数、あるいは前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の細胞数、例えば、50～10000細胞、50～4000細胞、1000～10000細胞、または1000～5000細胞を受容する。

【0111】

いくつかの実施形態において、形成プレート（12）は、マイクロウェル（26）内の形成プレート（12）への細胞の付着を阻害する生体適合性材料から製造された単一の一体構造を有する一方で、図3A～6の非限定的な実施例に示されているように、集合体（20）への単一細胞（10）の発達を可能にする。いくつかの実施形態において、形成プレート（12）は、複数の構成要素から形成され、少なくともマイクロウェル（26）の表面は、生体適合性材料から製造されている。いくつかの実施形態において、生体適合性材料は、ステンレス鋼、チタン、高分子有機シリコン化合物、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ガラス、プラスチック、PVC、PE、PP、PMMA、PS、PTFE、ナイロン、ポリウレタン、PET、PES、ヒアルロナン、キトサン、糖、セラミック、アルミナ、ジルコニア、バイオガラス、ヒドロキシアパタイト、もしくはそれらの任意の組み合わせ、または当技術分野で知られている他の生体適合性材料を含む、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態において、形成プレート（12）は無菌であり、組織および／または細胞による付着に耐性があり、疎水性表面を含

み、開示された組織の形成ならびにその後の除去および／または使用を改善する特徴を含む、あるい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において、形成プレート（12）は、1つ以上（例えば、少なくとも1、3、5、10）の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、増殖因子、核酸、DNA、RNA、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質、または増殖および／もしくは分化を促進するそれらの任意の組み合わせを含む。

【0112】

凝集オルガノイド

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して、1つ以上の凝集オルガノイドを産生することをさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の1つ以上の凝集オルガノイドは、食道オルガノイド、胃オルガノイド、胃底オルガノイド、洞胃オルガノイド、肝オルガノイド、腸オルガノイド、もしくは結腸オルガノイド、またはそれらの任意の組み合わせであるか、あるいはそれらを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、ヒト食道オルガノイド（HEO）、ヒト胃オルガノイド（HGO）、ヒト胃底オルガノイド（HFGO）、ヒト洞胃オルガノイド（HAGO）、ヒト肝オルガノイド（HHO）、ヒト腸オルガノイド（HIO）、もしくはヒト結腸オルガノイド（HCO）、またはそれらの任意の組み合わせであるか、あるいはそれらを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させた後、1つ以上の腸内胚葉凝集体を、例えば、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、もしくは50時間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である短期間、あるいは前述の時間のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の期間、例えば、1～50時間、10～40時間、20～30時間、1～30時間、または24～50時間にわたって培養して、収集、回復、および／または合体する。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、凝集培地から取り除かれるかまたは再懸濁される。例えば、いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体がマイクロウェル培養プレート、「v」もしくは「u」底マイクロウェル培養プレート、または形成プレート内で凝集される場合、1つ以上の腸内胚葉凝集体が、培養プレートまたは形成プレートのマイクロウェルから取り除かれる（例えば、ピペットを使用して、1つ以上の腸内胚葉凝集体上に増殖培地を穏やかに流し、凝集体をピペットの先端に吸引する）。いくつかの実施形態において、凝集培地は、新鮮な増殖培地、例えば、完全Sato培地、または他の生体適合性水溶液で洗浄されて、すべての凝集体が確実に収集されるようにする。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を容器（例えば、無菌管）に収集し、重力によって沈降させる。いくつかの実施形態において、遠心分離は、凝集体が一緒に融合する原因となる可能性があるため、1つ以上の腸内胚葉凝集体を収集するために使用されるべきではない。いくつかの実施形態において、沈降後、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、1つ以上の腸内胚葉凝集体を1つ以上の凝集オルガノイドに分化するための条件下で培養される。例えば、いくつかの実施形態において、沈降後、残っている増殖培地はすべて除去される。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、基底膜もしくは細胞外マトリックス、またはそれらの模倣体もしくは誘導体と接触させられる。いくつかの実施形態において、基底膜もしくは細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体は、マトリゲルを含む。いくつかの実施形態において、残りの増殖培地は、基底膜もしくは細胞外マトリックス、またはそれらの模倣体もしくは誘導体の重合の効率を低減するために除去される。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を、1つ以上の増殖因子、栄養素、ビタミン、糖、タンパク質、小分子、アゴニスト、アンタゴニスト、サイトカイン、シグナル伝達経路活性化因子またはシグナル伝達経路阻害剤と接触させて、1つ以上の凝集オルガノイドへの1つ以上の腸内胚葉凝集体の増殖および成熟を誘導する。1つ以上の腸内胚葉凝集体を様々な異なる凝集オルガノイドに分化させるための条件が本明

10

20

30

40

50

細書で提供されるが、腸スフェロイド（例えば、前腸スフェロイドおよび／または後腸スフェロイド）をそれぞれのオルガノイドに分化させるための以前から知られている他の方法を使用して、1つ以上の腸内胚葉凝集体を同じまたは同様の様式で分化させることができる。オルガノイド分化のための方法は、例えば、米国特許第9,719,068号および同第10,174,289号、ならびにPCT公開第WO2016/061464号、同第WO2017/192997号、同第WO2018/106628号、同第WO2018/200481号、同第WO2018/085615号、同第WO2018/085622号、同第WO2018/085623号、同第WO2018/226267号、同第WO2020/023245号に見出すことができ、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

10

【0113】

いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞が前腸内胚葉細胞である場合、1つ以上の腸内胚葉凝集体は前腸内胚葉凝集体であり、1つ以上の腸内胚葉凝集体は前腸系統の1つ以上の凝集オルガノイドに分化する。

【0114】

いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集肝臓オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集肝臓オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、もしくはオンコスタチンMのうちの1つ以上（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6）、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において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF2を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子は、BMP4を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集肝臓オルガノイドは、肝臓上皮および肝臓間葉を含む。

20

【0115】

提供される実施形態のうちのいずれかにおいて、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、またはオンコスタチンMの各々は、提供される場合、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、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または1~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、またはオンコスタチンMの各々は、提供される場合、0.01、0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、0.01~20 μM、0.01~10 μM、1~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。

30

40

【0116】

いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集胃オルガノイドは、1つ以上の凝集胃底オルガノイドもしくは1つ以上の凝集洞胃オルガノ

50

イド、または両方であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集洞胃オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体を、EGF、レチノイン酸、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、またはそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上（例えば、少なくとも1、2、もしくは3）と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、Nogginを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集胃オルガノイドは、胃上皮および胃間葉を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集胃オルガノイドの胃上皮は、CDH1+、CLDN18+、もしくはMUC5AC+、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0117】

提供される実施形態のうちのいずれかにおいて、EGF、レチノイン酸、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、提供される場合、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGF、レチノイン酸、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、提供される場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μM、1~10 μM、5~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。

【0118】

いくつかの実施形態において、腸内胚葉細胞が後腸内胚葉細胞である場合、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、1つ以上の後腸内胚葉凝集体であるかまたはそれを含み、1つ以上の腸内胚葉凝集体は、後腸系統の1つ以上の凝集オルガノイドに分化する。

【0119】

いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集腸オルガノイドであるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集腸オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤のうちの1つ以上（例えば、少なくとも1、2、もしくは3）、あるい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において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子はR-スポンジンを含むか、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤はNogginを含むか、または両方である。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集腸オルガノイドは、腸上皮および腸間葉を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集腸オルガノイドの腸上皮は、CDH1+、CDX2+、E-cad+、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において、1つ以上の凝集腸オルガノイドの腸間葉は、FOXF1+、CDX2+、Emilin+、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において、1つ以上の凝集腸オルガノイドの腸上皮は、近位腸マーカーを示す。いくつかの実施形態において、近位腸マーカーは、CDH17もしくはPDX1、または両方を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集腸オルガノイドは、レシピエント対象に移植され、成熟を遂げる。いくつかの実施形態において、成熟した1つ以上の凝集腸オルガノイドは、腸細胞型を含む。いくつかの実施形態において、腸細胞型は、上皮細胞、

10

20

30

40

50

杯細胞、腸内分泌細胞、もしくはパネート細胞、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において、上皮細胞はS I +であるか、杯細胞はM u c 2 +であるか、腸内分泌細胞はクロモグラニンA +であるか、もしくはパネート細胞はリゾチーム+であるか、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0120】

いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集結腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集結腸オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をE G F、1つ以上のW n tシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のB M Pシグナル伝達経路活性化因子のうちの1つ以上（例えば、少なくとも1、2、3）、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において、1つ以上のW n tシグナル伝達経路活性化因子はR - スポンジンを含むか、もしくは1つ以上のB M Pシグナル伝達経路活性化因子はB M P 2を含むか、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において、1つ以上の凝集結腸オルガノイドは、結腸上皮および結腸間葉を含む。いくつかの実施形態において、結腸上皮は、C D H 1 +もしくはS A T B 2 +、または両方である。

【0121】

提供される実施形態のうちのいずれかにおいて、E G F、1つ以上のW n tシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のB M Pシグナル伝達経路阻害剤、または1つ以上のB M Pシグナル伝達経路活性化因子の各々は、提供される場合、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、E G F、1つ以上のW n tシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のB M Pシグナル伝達経路阻害剤、または1つ以上のB M Pシグナル伝達経路活性化因子の各々は、提供される場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μM、1~10 μM、5~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。いくつかの実施形態において、腸内胚葉凝集体は、完全S a t o培地で培養される。いくつかの実施形態において、完全S a t o培地は、R O C K阻害剤で補足される。いくつかの実施形態において、R O C K阻害剤は、Y - 27632である。いくつかの実施形態において、R O C K阻害剤は、10 μMまたは約10 μMで補足される。

【0122】

いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を、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日であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である日数、あるいは前述の日数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の日数、例えば、1~50日、10~30日、20~40日、1~30日、または20~50日間にわたって培養して、1つ以上の凝集オルガノイドを形成する。

【0123】

いくつかの実施形態において、得られた1つ以上の凝集オルガノイドを使用して、食道、胃、腸、または結腸の機能を研究し、薬物スクリーニング、神経学的機能、微生物叢相互作用、もしくは移植、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。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、機能的内腔を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、移植時にさらに分化する能力を有する。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、インビトロで胎生期まで増殖し、移植時に、さらに分化する。

【0124】

腸内胚葉凝集体および凝集オルガノイドの均一性およびスケーラビリティ

いくつかの実施形態において本明細書に開示される方法は、多くの均質またはほぼ均質な腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの形成を可能にする。いくつかの実施形態において、凝集培地（例えば、本明細書に開示される形成プレートのうちのいずれか1つ）の方法および使用は、複数の腸内胚葉凝集体の形成を可能にする。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体は、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、50000、100000、500000、もしくは1000000個の腸内胚葉凝集体であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、約またはそれら以下である数の腸内胚葉凝集体、あるいは前述の腸内胚葉凝集体数のうちのいずれか2つによって定義される数内の任意の数の腸内胚葉凝集体、例えば、1000～1000000個の腸内胚葉凝集体、5000～100000個の腸内胚葉凝集体、1000～10000個の腸内胚葉凝集体、または10000～1000000個の腸内胚葉凝集体を含む。いくつかの実施形態において、均質またはほぼ均質な腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの形成は、腸内胚葉スフェロイドおよび／または凝集することなくスフェロイドから産生されたオルガノイドと比較して、少なくとも1つの空間寸法の変動が低減された複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドによって定義される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの空間寸法は、長さ、幅、深さ、体積、もしくは表面積、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において、腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集有機物は、形状が球形であり、少なくとも1つの空間寸法は、半径、直径、円周、体積、もしくは表面積、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において、少なくとも1つの空間寸法における分散の減少は、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの平均直径から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内である直径、また前述の直径のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の直径を含む。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの各々は、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの平均直径から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内である直径、または前述の直径のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の直径を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの空間寸法における分散の減少は、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの平均体積から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内である体積、または前述の体積のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の体積を含む。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの各々は、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの平均体積から±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、もしくは±1%以内である体積、または前述の体積のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の体積を含む。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集有機体の平均直径から±10%、

10

20

30

40

50

± 9 %、± 8 %、± 7 %、± 6 %、± 5 %、± 4 %、± 3 %、± 2 %、もしくは± 1 %以内である直径、または前述の直径のうちのいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の直径、および複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの平均体積から± 1 0 %、± 9 %、± 8 %、± 7 %、± 6 %、± 5 %、± 4 %、± 3 %、± 2 %、もしくは± 1 %以内である体積、または前述の体積のうちのいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の体積の両方を含む。いくつかの実施形態について、自発的に形成されたスフェロイドと比較した、腸内胚葉凝集体の分散の減少（すなわち均一性）を、図 9 B、9 C、および 9 E に見ることができる。

【 0 1 2 5 】

複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの実施形態のうちのいずれかにおいて、複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドは、同じ対象に由来する。いくつかの実施形態において、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、疾患を有するか、以前に疾患を有していたか、もしくは疾患を有するリスクがあるか、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において、疾患は、胃腸疾患である。いくつかの実施形態において、対象に由来する複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドを、遺伝子検査または薬物スクリーニングの目的で使用する事ができる。いくつかの実施形態において、対象に由来する複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドを、対象の疾患を軽減、改善、または治療するための効果的な治療法を特定するための大規模な薬物スクリーニングに使用することができる。いくつかの実施形態において、大規模な薬物スクリーニングは、各々が複数の腸内胚葉凝集体および／または結果として生じる凝集オルガノイドの亜集団を有する複数の化合物を試験することを含む。

【 0 1 2 6 】

複数のマイクロウェルおよび複数の腸内胚葉凝集体を含む凝集培地の実施形態もまた、本明細書に開示される。いくつかの実施形態において、凝集培地は、マイクロウェル培養プレート、「v」もしくは「u」底マイクロウェル培養プレート、または本明細書に開示される形成プレートのうちのいずれか 1 つである。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体は、本明細書に開示される複数の腸内胚葉凝集体、または本明細書に開示される 1 つ以上の腸内胚葉凝集体のうちのいずれか 1 つである。いくつかの実施形態において、複数の腸内胚葉凝集体は、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複数の腸内胚葉凝集体、また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 1 つ以上の腸内胚葉凝集体のうちのいずれか 1 つである。いくつかの実施形態において、複数のマイクロウェルの各々は、複数の腸内胚葉凝集体の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の腸内胚葉凝集体を含む。いくつかの実施形態において、複数のマイクロウェルの各々は、複数の腸内胚葉凝集体の単一腸内胚葉凝集体を含む。

【 0 1 2 7 】

移植と治療方法

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、本明細書に開示される凝集オルガノイドのうちのいずれか 1 つ以上をレシピエント対象に移植する追加の工程を含む。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、胚体内胚葉、または前駆体多能性幹細胞が由来する対象である。いくつかの実施形態において、1 つ以上の凝集オルガノイドは、レシピエント対象から単離された胚体内胚葉または P S C に由来する。いくつかの実施形態において、レシピエント対象に移植される場合、1 つ以上の凝集オルガノイドは、当技術分野で知られている非凝集オルガノイドと比較して、より優れた生着、成熟、増殖、またはそれらの任意の組み合わせを示す。

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される1つ以上の凝集オルガノイドは、例えば、本明細書に記載される治療または実験モデルとして、レシピエント対象に移植される。いくつかの実施形態において、移植は、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日であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である日数、あるいは前述の日数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の日数、例えば、1～50日、10～40日、20～30日、1～30日、または20～50日間にわたってオルガノイドを培養した後に行われる。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、当技術分野で知られている他の方法によって調製されたオルガノイドが同じまたは同様の成熟状態になる数日前に移植および／または研究するのに十分成熟しており、その日数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20日であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下であるか、あるいは前述の日数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の日数、例えば、1～20日、5～15日、10～15日、1～15日、または10～20日である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫不全哺乳動物である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫不全マウスである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、サル、イヌ、ハムスター、またはラットである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫無防備状態のサル、イヌ、ハムスター、またはラットである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫無防備状態のヒトである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫適格性のヒトである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫抑制剤で治療された免疫適格性のヒトである。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫適格性のヒトであり、凝集オルガノイドは、宿主生物に対して自家性である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、免疫適格性のヒトであり、凝集オルガノイドは、宿主生物に対して同種異系である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、臓器移植を必要としている哺乳動物である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、臓器移植を必要としているヒトである。

【0129】

いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、レシピエント対象の適切な領域に移植される。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、レシピエント対象において、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、もしくは60日であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である日数にわたって増殖する。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、同時に調製されたインビトロ凝集オルガノイドよりも大きく増殖するか、またはより速く成熟する。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、レシピエント対象組織との統合を示す。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、胃腸細胞系統を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、胃腸細胞系統を自発的に発達させる。

【0130】

本明細書に記載されているのは、臓器機能が低下している対象を治療する方法、または

それを必要とする対象における有害な臓器障害を改善もしくは阻害する方法である。いくつかの実施形態において、方法は、1つ以上の凝集オルガノイドを対象に移植または生着させることを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、本明細書に記載される方法のうちのいずれか1つの1つ以上の凝集オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集食道オルガノイド、1つ以上の凝集胃オルガノイド、1つ以上の凝集胃底オルガノイド、1つ以上の凝集洞胃オルガノイド、1つ以上の凝集肝オルガノイド、1つ以上の凝集小腸（腸）オルガノイド、もしくは1つ以上の凝集大腸（結腸）オルガノイド、またはそれらの任意の組み合わせであるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、対象に対して自家性または同種異系である。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、対象から得られた、または対象に由来する人工多能性細胞から調製される。いくつかの実施形態において、対象は、臓器移植を必要としている。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の完全凝集オルガノイドとして移植または生着される。いくつかの実施形態において、移植部位は、臓器組織である。

10

【0131】

また、本明細書に開示される方法のうちのいずれか1つによって產生される凝集オルガノイドのうちのいずれか1つ以上が本明細書に記載される。さらに、いくつかの実施形態において、オルガノイド機能の回復を必要とする対象においてそれを行う際に使用するための1つ以上の凝集オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、本明細書に記載の1つ以上の凝集オルガノイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、本明細書に記載される方法のうちのいずれか1つによって產生される1つ以上の凝集オルガノイドである。

20

【0132】

凝集オルガノイドを產生する非限定的な方法

本明細書に開示されるのは、1つ以上の凝集オルガノイドを產生する方法である。いくつかの実施形態において、方法は、胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化させることと、腸内胚葉単層を腸スフェロイドから分離することと、腸内胚葉単層を腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に解離することと、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させることと、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集オルガノイドを產生することと、を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、付着性である。いくつかの実施形態において、分離工程は、腸内胚葉単層から増殖培地および懸濁された腸スフェロイドを吸引することを含む。いくつかの実施形態において、解離工程は、腸内胚葉単層を酵素的に解離することを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、Accutase、Accumax、トリプシン、トリプシン／EDTA、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、TrypLE Express、もしくはTrypLE Select、またはそれらの任意の組み合わせを用いて酵素的に解離される。いくつかの実施形態において、凝集工程は、単一細胞懸濁液を懸滴で凝集させること、「v」もしくは「u」底のマイクロウェル培養プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離すること、オービタルシェーカーを使用して単一細胞懸濁液を凝集させること、または形成プレート内の単一細胞懸濁液を遠心分離すること、あるい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において、単一細胞懸濁液を遠心分離することは、単一細胞懸濁液を重力によって沈降させることで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、形成プレートは、Aggrewellプレートである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体の各々は、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、もしくは10000個の腸内胚葉細胞であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約

30

40

50

それら以下である細胞数、あるいは前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の数の腸内胚葉細胞、例えば50～10000細胞、50～4000細胞、1000～10000細胞、または1000～5000個の腸内胚葉細胞を含む。いくつかの実施形態において、培養工程は、1つ以上の腸内胚葉凝集体を細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、細胞外マトリックス、またはその模倣体もしくは誘導体は、マトリゲルを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は前腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは前腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集肝臓オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集腸胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は後腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは後腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集結腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。

【0133】

本明細書に開示されるのは、1つ以上の凝集オルガノイドを産生する方法である。いくつかの実施形態において、方法は、胚体内胚葉を腸内胚葉単層および腸スフェロイドに分化させることと、腸内胚葉単層を腸スフェロイドから分離することと、腸内胚葉単層を腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に解離することと、腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液を1つ以上の腸内胚葉凝集体に凝集させることと、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集オルガノイドを産生することと、を含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、付着性である。いくつかの実施形態において、分離工程は、腸内胚葉単層から増殖培地および懸濁された腸スフェロイドを吸引することを含む。いくつかの実施形態において、解離工程は、腸内胚葉単層を酵素的に解離することを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は、Accutaseによって酵素的に解離される。いくつかの実施形態において、凝集工程は、形成プレート内の単一細胞懸濁液、またはそれらの任意の組み合わせを遠心分離することを含む。いくつかの実施形態において、単一細胞懸濁液を遠心分離することは、単一細胞懸濁液を重力によって沈降させることで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、形成プレートは、Aggrewellプレートである。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体の各々は、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、もしくは5000個の腸内胚葉細胞であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である細胞数、あるいは前述の数のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の数の腸内胚葉細胞、例えば、1000～5000細胞、2000～4000細胞、1000～3000細胞、もしくは3000～5000個の腸内胚葉細胞を含む。いくつかの実施形態において、培養工程は、1つ以上の腸内胚葉凝集体をマトリゲルと接触させることを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は前腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは前腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集肝臓オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の胃オルガノイドは、1つ以上の凝集腸胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は後腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは後腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集結腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。

【0134】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は前腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは前腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を前腸内胚葉単層および前腸スフェロイドに分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、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において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μM、1~10 μM、5~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF4を含む。いくつかの実施形態において、FGF4は、500 ng/mLまたは約500 ng/mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、CHIR99021を含む。いくつかの実施形態において、CHIR99021は、3 μMまたは約3 μMの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、Nogginを含む。いくつかの実施形態において、Nogginは、200 ng/mLまたは約200 ng/mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、前腸内胚葉単層は、前腸内胚葉細胞の単細胞懸濁液に解離される。いくつかの実施形態において、前腸内胚葉細胞の単細胞懸濁液は、1つ以上の前腸内胚葉凝集体に凝集される。いくつかの実施形態において、1つ以上の前腸内胚葉凝集体を培養して、1つ以上の凝集肝臓オルガノイド、もしくは1つ以上の凝集胃オルガノイド、または両方を産生する。

【0135】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集肝臓オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の前腸内胚葉凝集体を培養して、1つ以上の凝集肝臓オルガノイドを産生する。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集肝臓オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、もしくはオンコスタチンM、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において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、またはオンコスタチンMの各々は、提供される場合、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、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、9

10

20

30

40

50

50、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または1~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、レチノイン酸、肝細胞増殖因子、デキサメタゾン、またはオンコスタチンMの各々は、提供される場合、0.01、0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、0.01~20 μM、0.01~10 μM、1~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。

【0136】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の前腸内胚葉凝集体を培養して、1つ以上の凝集胃オルガノイドを産生する。いくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集洞胃オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集洞胃オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、レチノイン酸、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、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において、EGF、レチノイン酸、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGF、レチノイン酸、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μM、1~10 μM、5~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGFは、100 ng/mLまたは約100 ng/mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、レチノイン酸は、2 μMまたは約2 μMの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、Nogginを含む。いくつかの実施形態において、Nogginは、200 ng/mLまたは約200 ng/mLの濃度で提供される。

【0137】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、腸内胚葉単層は前腸内胚葉単層であり、腸スフェロイドは前腸スフェロイドである。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉を後腸内胚葉単層および後腸スフェロイドに分化させることは、胚体内胚葉を1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または両方と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のWnt

t シグナル伝達経路活性化因子の各々、または両方は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子の各々、または両方は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μM、1~10 μM、5~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。いくつかの実施形態において、1つ以上のFGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF4を含む。いくつかの実施形態において、FGF4は、500 ng/mLまたは約500 ng/mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、CHIR99021を含む。いくつかの実施形態において、後腸内胚葉単層は、後腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液に分離される。いくつかの実施形態において、後腸内胚葉細胞の単一細胞懸濁液は、1つ以上の後腸内胚葉凝集体に凝集される。いくつかの実施形態において、1つ以上の後腸内胚葉凝集体を培養して、1つ以上の凝集腸オルガノイド、もしくは1つ以上の凝集結腸オルガノイド、または両方を産生する。

【0138】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集腸オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤、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において、EGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~1000 ng/mL、50~500 ng/mL、500~1000 ng/mL、または10~200 ng/mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤の各々は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1~20 μM、1~10 μM、5~15 μM、または10~20 μMで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGFは、500 ng/mLまたは約500 ng/mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、R-スポンジンを含む。いくつかの実施形態において、R-スポンジンは、500 ng

10

20

30

40

50

／mLまたは約500 ng／mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路阻害剤は、Nogginを含む。いくつかの実施形態において、Nogginは、100 ng／mLまたは約100 ng／mLの濃度で提供される。

【0139】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、1つ以上の凝集オルガノイドは、1つ以上の凝集結腸オルガノイドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上の腸内胚葉凝集体を培養して1つ以上の凝集腸オルガノイドを形成することは、1つ以上の腸内胚葉凝集体をEGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、もしくは1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子、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。

【0140】

いくつかの実施形態において、EGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子の各々は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは1000 ng／mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10～1000 ng／mL、50～500 ng／mL、500～1000 ng／mL、または10～200 ng／mLで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGF、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子、または1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子の各々は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20 μMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、または約それら以下である濃度、あるいは前述の濃度のうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、1～20 μM、1～10 μM、5～15 μM、または10～20 μMで接触させられる。いくつかの実施形態において、EGFは、500 ng／mLまたは約500 ng／mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のWntシグナル伝達経路活性化因子は、R-スポンジンを含む。いくつかの実施形態において、R-スポンジンは、500 ng／mLまたは約500 ng／mLの濃度で提供される。いくつかの実施形態において、1つ以上のBMPシグナル伝達経路活性化因子は、BMP2を含む。いくつかの実施形態において、BMP2は、100 ng／mLまたは約100 ng／mLの濃度で提供される。

【0141】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、腸スフェロイドは、分離され、増殖培地に懸濁される。本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、多能性幹細胞から分化されている。本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞から分化されている。本明細書に開示される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、胚体内胚葉は、ヒト胚体内胚葉である。

【0142】

本明細書に開示される方法のうちのいずれかの実施形態において、方法は、1つ以上の凝集オルガノイドをレシピエント対象に移植することをさらに含む。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、レシピエント対象は、ヒトである。

【0143】

また本明細書に記載されるのは、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1つ以上の凝集オルガノイドである。

【実施例】

【0144】

本明細書で論じられる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あることを理解するであろう。

【0145】

実施例1．ヒト多能性幹細胞（hPSC）の培養

凝集ヒト腸オルガノイド（AggHIO）などの凝集オルガノイドの形成についての例示的な概略図を図1に提供する。

【0146】

hPSCを胚体内胚葉に分化させる2日前（-2日目）に、hPSCを培養した。マトリゲルでコーティングされた24ウェル培養皿を調製した。5mLのディスパーゼ溶液（1mg/mL、StemCell Technologies）を37℃に温めた。必要に応じて、いずれの分化領域も未分化のhPSCから除去した。hPSCを含有する各ウェルからの培地を注意深く吸引した。1mLの予熱したディスパーゼ溶液を、hPSCを含有する各ウェルに添加し、コロニーの縁部がわずかに折り返されているように見えるまで細胞を37℃でインキュベートした。ディスパーゼインキュベーションの約4分後、hPSCコロニーの縁部がウェルから浮き上がり始めていることが確認された。コロニーの縁部が浮き上がっていない場合は、浮き上がりが観察されるまで定期的にチェックしながら、細胞をさらに数分間インキュベートした。ディスパーゼインキュベーション中に、マトリゲル溶液を吸引し、0.5mLの新鮮なmTeSR1培地（StemCell Technologies）を各ウェルに添加することによって、マトリゲルでコーティングされた皿を調製した。マトリゲルでコーティングされた皿は、どの時点でも乾燥させなかった。必要に応じて、ウェルを吸引し、一度にすべてではなく、一度に1列ずつmTeSR1を補充した。hPSCプレートをインキュベーターから取り出した。ディスパーゼ溶液を穏やかに吸引し、ウェルを2mLの予熱したDMEM-F12培地で少なくとも3回洗浄した。プレートを乾燥させないようにし、ピペッティング中にコロニーが外れないようにすることが重要であった。培地を各ウェルの縁部に静かに分配した。DMEM-F12洗浄液を各ウェルから吸引し、2mLの温かいmTeSR1培地を各ウェルに添加した。無菌の使い捨てセルスクレーパーを使用して、コロニーを注意深く分離した。細胞凝集体を過度に破壊しないように注意しながら、mTeSR1および細胞凝集体を単一ウェルにまとめた。細胞を、注意深く上下に1回ピペッティングすることによって粉碎した。1回の粉碎後に大きな凝集体が見える場合は、ピペッティングを繰り返し、各粉碎後に凝集体のサイズをチェックした。必要に応じて、大口径のマイクロピペット（例えば、p1000）を使用して、大きな凝集体のみを分解した。hPSC凝集体を穏やかに分散させ、0.5mLの細胞懸濁液をマトリゲルでコーティングされた24ウェルプレートの各ウェルに分配した。新たにプレーティングした細胞を穏やかに前後左右に振って細胞を分散させた後、インキュベーターに移した。

【0147】

実施例2．胚体内胚葉（DE）の分化

培養0日目に、プレーティングされたhPSC（例えば、実施例1に記載）が約60～70%のコンフルエンスで均一に分布し、細胞が分化を開始する前に標準的な未分化形態を示したことを確認した。細胞を乾燥させないように注意しながら、各ウェルのmTeSR1培地を吸引した。ウェル当たり0.5mLの1日目のDE分化培地（表1）を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。

【0148】

培養の1日目に、1日目のDE分化培地を廃棄し、ウェル当たり0.5mLの2日目のDE分化培地（表1）を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。

10

20

30

40

50

【0149】

培養の2日目に、2日目のDE分化培地を廃棄し、ウェル当たり0.5mLの3日目のDE分化培地（表1）を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。

【0150】

表1に提供されるDE分化培地のレシピは、1mLの培地を作製するためのものである。体積は、必要に応じてスケールアップすることができる。各日の最終アクチビンA濃度は、100ng/mLである。これらの培地は、事前に調製して4℃で保存することができるが、使用日に調製することが好ましい。

【表1】

表1：DE分化培地

材料	1日目	2日目	3日目	サプライヤー;カタログ番号
RPMI 1640	988uL	987uL	969uL	Life Technologies;11875
100x NEAA	10uL	10uL	10uL	Life Technologies;11140-050
透析されたウシ胎児血清 (dFCS)	0	2uL(0.2%)	20uL(2%)	Hyclone;SH30070
アクチビン-A (100ng/uL)	1uL	1uL	1uL	セルガイダンスシステム;GFH6

【0151】

実施例3．後腸内胚葉のパターン形成

培養の3日目に、分化した胚体内胚葉の質を、細胞が平坦で均質な単層にあること、および／または胚体内胚葉マーカー（例えば、Sox17、FoxA2、および／またはCXCR4）の発現に基づいて評価した。細胞を乾燥させないように注意しながら、DE分化培地を各ウェルから吸引した。ウェル当たり0.5mLの後腸内胚葉分化培地（表2）を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。

【0152】

培養の4日目に、以前の後腸内胚葉分化培地を廃棄し、ウェル当たり0.5mLの新鮮な後腸内胚葉分化培地を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。

【0153】

培養の5日目に、以前の後腸内胚葉分化培地を廃棄し、ウェル当たり0.5mLの新鮮な後腸内胚葉分化培地を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。この段階で、形態形成の始まりを観察することができる。ウェル内にいくつかの分離したスフェロイドがある可能性がある。吸引しながらプレートを傾け、ウェル内にスフェロイドを含有する少量の培地を残すことによって、これらのスフェロイドを吸引しないように注意した。

【0154】

培養の6日目に、以前の後腸内胚葉分化培地を廃棄し、ウェル当たり0.5mLの新鮮な後腸内胚葉分化培地を添加した。細胞を37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。この段階で、明確な形態形成が観察された。ウェル内にいくつかの分離したスフェロイドがある可能性がある。吸引しながらプレートを傾け、ウェル内にスフェロイドを含有する少量の培地を残すことによって、これらのスフェロイドを吸引しないように注意した。

【0155】

培養の7日目に（4日間のCHIR99021／FGF4への曝露）、広範な形態形成が見られ、多くの分離したスフェロイドが見られた。細胞を、実施例4に記載されるよう

にスフェロイド分析のために、または実施例 5 に記載されるように凝集のために処理した。
【0156】

表 2 に提供される後腸内胚葉分化培地のレシピは、1 mL の培地を作製するためのものである。体積は、必要に応じてスケールアップすることができる。

【表 2】

表 2：後腸内胚葉分化培地レシピ

材料	体積	最終濃度	サプライヤー;カタログ番号
RPMI 1640	964.7uL	-	Life Technologies;11875
100x NEAA	10uL	1x	Life Technologies;11140-050
dFCS	20uL	2%	Hyclone;SH30070
組換えヒト EGF4(rhFGF4;100ng/uL)	5uL	500ng/mL	R&D Systems;235-F4
Chiron99021(CHIR99021)(10mM)	0.3uL	3uL	Stemgent;04-0004-02

【0157】

実施例 4．既存のスフェロイドプロトコルはばらつきをもたらす

図 7 A は、HIO の形成に向けられた既存のスフェロイド産生についての概略図を示しており、一般に実施例 1 ～ 3 で説明されている。要約すると、ヒト多能性幹細胞は、最初に 100 ng/mL のアクチビン A に 3 日間曝露され、胚体内胚葉 (DE) を産生する。次いで、DE を 3 μM の CHIR99021 と 500 ng/mL の FGF4 との組み合わせに 4 日間曝露し、その間に後腸内胚葉へのパターン形成および形態形成、ならびに自発的なスフェロイド産生が起こる。7 日目に、分離したスフェロイドを HGE 単層から収集し、マトリゲルに埋め込み、500 ng/mL の EGF、100 ng/mL の Noggin、および 500 ng/mL の R-スポンジンで 28 日間培養する。35 日目に、HIO を採取し、その後の実験に使用する。

【0158】

H1 ヒト胚性幹細胞を使用した複数の HIO 生成実験 (n = 96) でのスフェロイド産生を、成功 (50 個超の分離スフェロイド/ウェル)、中間 (50 個未満の分離スフェロイド/ウェル)、または失敗 (スフェロイド分離なし) として評価した。スコアリングは、単一の個体によって行った。図 7 B に示されるように、同じプロトコルの別々の複製でのスフェロイドの形成には大きなばらつきがある。

【0159】

H1 hESC および 3 つのヒト iPSC 株 (iPSC72_3、iPSC75_1、および iPSC285_1) からのスフェロイド産生を、既存のプロトコルを使用して評価した。細胞株当たり 8 つのウェルをプレーティングし、同時に分化に供した。7 日目に、ウェル当たりの分離したスフェロイドの数をカウントし、各ウェルの画像をキャプチャした。図 7 C に示されるように、スフェロイド産生は、PSC 細胞株によって異なり、個別化された医療用途に影響を及ぼす。異なる PSC 株を用いたスフェロイド産生の例示的な画像を図 7 D に示す。各ウェルの分離したスフェロイドの数は、各条件の左上隅に示されている。分離したスフェロイド数のライン間のばらつきと共に強力な形態形成が観察されたが、一部のウェルではスフェロイド分離の欠如が観察された。

【0160】

実施例 5．後腸内胚葉の凝集

hPSC および細胞誘導体 (例えば、前腸または後腸内胚葉) を凝集させるために、いくつかのアプローチをとることができる。これらには、懸滴の生成、96 ウェルまたは 384 ウェルの「v」または「u」底のマイクロウェル培養プレートへの遠心分離、およびオービタルシェーカーを使用した細胞の凝集が含まれるが、これらに限定されない。この実施例では、Aggrewell (StemCell Technologies) の使

用について説明する。

【0161】

Aggrewell 400プレートを調製した。24ウェルサイズのAggrewell 400プレートの各ウェルは、最大1200個の凝集体を産生することができる。以下は、Aggrewell 400プレートの単一ウェル用である。十分な数のウェル／凝集体を調製するために、量をスケールアップすることができる。500 μ Lの付着防止リンス液 (StemCell Technologies) をAggrewellプレートのウェルに添加した。プレートを、プレートホルダーアタッチメントを備えたシングルバケットローターにおいて1300 $\times$ gで5分間遠心分離した。プレートを顕微鏡で観察して、マイクロウェルから気泡が除去されていることを確認した。気泡が残っている場合は、遠心分離工程を繰り返した。付着防止リンス液を廃棄した。ウェルを2 mLの予熱した37℃の腸ベース培地ですすいだ (表3)。腸ベース培地を廃棄した。10 μ MのY-27632で補足した1 mLの予熱した37℃の完全Sato培地 (表4) をウェルに添加した。Aggrewellを、後で使用するまで37℃のインキュベーター内に保管した。

10

【0162】

HGE細胞の単一細胞懸濁液を調製した。培地およびHGE内胚葉組織培養から分離したスフェロイドを廃棄した。0.5 mLの予熱した37℃のAccutaseを各ウェルに添加し、プレートを37℃で約5～10分間インキュベートした。プレートを顕微鏡でモニターして、細胞がプレートから分離していることを確認した。必要に応じて、細胞を37℃でさらに一定時間インキュベートすることができる。Accutaseは、トリプシン、EDTA、TrypLE Express (Thermo Fisher) またはTrypLE Select (Thermo Fisher) などの当技術分野で知られている他の酵素的解離試薬で置換して、単一細胞を調製することができる。10 μ MのY-27632で補足した0.5 mLの完全Sato培地を各ウェルに添加した。細胞をピペットで穏やかに分散させ、単一細胞として15 mLの遠心分離管に移した。懸濁液中の細胞の濃度を測定し、使用される細胞の数は、以下の比率に応じて算出した：1,000細胞の凝集体を形成するためにAggrewell 400プレートのウェルあたりに必要な 1.2×10^6 細胞。この望ましい数の細胞を新しい遠心分離管に移し、300 $\times$ gで5分間遠心分離した。上清を排気し、細胞ペレットを10 μ MのY-27632で補足した1 mLの予熱した37℃の完全Sato培地に再懸濁した。以前に調製したAggrewell 400プレートをインキュベーターから取り出した。すでにプレートにある培地を除去せずに、再懸濁した細胞をAggrewellウェルに移した。細胞を直ちにピペットで混合して、細胞をウェル全体に均一に分散させた。Aggrewellプレートを100 $\times$ gで3分間遠心分離し、マイクロウェル内の細胞をキャプチャした。プレートを顕微鏡で調べて、細胞がマイクロウェルに均一に分布していることを確認する。Aggrewellプレートを一晩インキュベーターに戻した。

20

30

【0163】

表3および4に提供される腸ベース培地および完全Sato培地のレシピは、50 mLの培地を作製するためのものである。体積は、必要に応じてスケールアップすることができる。腸ベース培地は、4℃で最長2週間保存することができる。完全Sato培地の場合、EGF、Noggin、およびR-スポンジを使用直前に添加する。

40

【表 3】

表 3：腸ベース培地のレシピ

材料	50mL	最終濃度	サプライヤー;カタログ番号
高度な DMEM/F12	46.75mL	-	Life Technologies;12634028
B27+インスリン(50×)	1mL	1x	Life Technologies;12587-10
N2 サプリメント(100×)	500uL	1x	Life Technologies;17502-048
HEPES 緩衝液(1M)	750uL	15mM	Life Technologies;15630106
Pen/Strep(100×)	500uL	1x	Life Technologies;15140122
L-グルタミン(100×)	500uL	1x	Life Technologies;25030081

10

【表 4】

表 4：完全 S a t o 培地レシピ

材料	50mL	最終濃度	サプライヤー;カタログ番号
腸ベース培地	49.9mL	-	Life Technologies;12634028
組換えヒト EGF(rhEGF;500ug/mL)	50uL	500ng/mL	R&D Systems;236-EG
組換えヒト Noggin(rhNoggin;100ug/mL)	50uL	100ng/mL	R&D Systems;6057-NG
組換えヒト R-Spondin1(rhRSpondin1;500ug/mL)	50uL	500ng/mL	R&D Systems;4645-RS

20

【0164】

実施例 6．凝集体の採取および埋め込み

培養の 8 日目に、凝集体を含有する各ウェルについて、凝集体をピペッティングによってマイクロウェルから穏やかに取り除き、ピペットの先端に吸引した。収集した凝集体を無菌の 15 mL 遠心分離管に移した。ウェルに残っている凝集体を除去するために、1 mL の予熱した 37℃ の完全 S a t o 培地（ROCK 阻害剤を含まない）を添加し、収集プロセスを繰り返した。この体積を、以前に収集した凝集体と合わせた。収集した凝集体（Aggrewell 400 のウェル当たり約 1200）を、重力によって管の底に沈降させた。沈降後、凝集体から可能な限り多くの上清を除去した。液体が残っていると再懸濁時にマトリゲルマトリックスの完全性を損なうため、この除去工程は重要である。200 μL の氷冷マトリゲルを、凝集体を含む管に添加した。気泡の形成を避けながら、溶液をゆっくりと上下にピペッティングして、凝集体を均一に再懸濁し、混合した。50 μL のマトリゲル／凝集体混合物を、24 ウェル組織培養処理プレートのウェルの中央に添加した。マトリゲルがウェルの側面に触れると、マトリゲルが平らになり、スフェロイドがプラスチックに付着する可能性があるため、これが起こらないようにマトリゲルを単一の滴に保つように注意した。このプレーティングプロセスを、すべてのマトリゲル／凝集体体積がプレーティングされるまで繰り返した。スフェロイドが組織培養プレートの表面に沈降するのを防ぐために、プレートを素早く、しかし注意深く上下逆さまにした。マトリゲルの重合を促進するために、プレートを 37℃ のインキュベーターに 20 分間移した。続いて、0.5 mL の予熱した 37℃ の完全 S a t o 培地を各ウェルに添加した。培地を 3～4 日ごとに交換した。pH 指示薬が急速に変化する場合、またはオルガノイドが非常に密に見える場合は、発生中のオルガノイドを継代する必要がある。

30

40

【0165】

50

実施例 7. 凝集腸オルガノイドは再現性の高いインビボ組織に似ている

対照として、H1 hESCおよび4つのヒトiPSC株(iPSC72__3、iPSC75__1、iPSC115__1、およびiPSC285__1)を分化に供した。7日目に、HGEの形成をCDX2(HGEマーカー)およびDAPI(核)について免疫蛍光法によって評価した。各細胞株からランダムに選択された4つのウェル領域のタイル走査を示す。図8に示されるように、CDX2の均一な発現が観察され、試験したすべてのhPSC細胞株で堅牢かつ効率的なHGE産生を示している。

【0166】

図9Aは、腸内胚葉凝集体および凝集オルガノイドの産生についての概略図を示しており、これは実施例5～6に一般に記載されている。要約すると、ヒト多能性幹細胞を最初に100ng/mLのアクチビンAに3日間曝露して、DEを産生させた。次いで、DEを3μMのCHIR99021と500ng/mLのFGF4との組み合わせに4日間曝露し、その間に後腸内胚葉へのパターン形成および自発的なスフェロイド産生が起こる。7日目に、分離した自発的なスフェロイドの存在に関係なく、HGEの単一細胞懸濁液を調製し、Aggrewellプレートを使用して24時間の凝集に供する。次いで、凝集体をマイクロウェルから採取し、マトリゲルに埋め込み、500ng/mLのEGF、100ng/mLのNoggin、および500ng/mLのR-スポンジンで28日間培養する。35日目に、凝集したヒト腸オルガノイド(aggHIO)を採取し、その後の実験に使用する。

【0167】

H1 hESCおよび4つのヒトiPSC株(iPSC72__3、iPSC75__1、iPSC115__1、およびiPSC285__1)を、凝集プロトコルを使用して分化に供した。7日間の分化後、HGEをAccutaseを使用して単一細胞に解離し、500ng/mLのEGF、100ng/mLのNoggin、および500ng/mLのR-スポンジンを含有する培地中で24時間凝集させた。凝集後、各Aggrewell中の細胞の画像をキャプチャし、50倍(左の列、スケールバー=500μm)および200倍(右の列、スケールバー=100μm)で示す。図9Bに見られるように、腸内胚葉細胞の均一な凝集は、Aggrewell形成プレートで達成可能である。

【0168】

H1 hESCを、既存の非凝集プロトコルを使用して分化に供した。7日間の分化後、自発的に産生された分離スフェロイドを採取し、カウントし、Keyence BZX800システムを使用して画像化した。次いで、残りのHGE(すなわち、非分離物質)をAccutaseを使用して単一細胞に解離し、500ng/mLのEGF、100ng/mLのNoggin、および500ng/mLのR-スポンジンを含有する培地中で24時間凝集させた。次いで、Keyence BZX800システムを使用して凝集体もカウントし、画像化した。代表的な画像を図9Cに示す。スフェロイドの数の増加、および凝集方法を使用して非分離単分子層から産生されたスフェロイドのより均一なサイズの両方が観察された。

【0169】

形成プレートで腸内胚葉凝集体を培養した後のスフェロイドの数を定量化し、図9Dに示す。既存の非凝集プロトコルを使用してウェル当たりの産生された分離スフェロイドの数を、H1 hESCおよび4つのヒトiPSC株(iPSC72__3、iPSC75__1、iPSC115__1、およびiPSC285__1)についてスコアリングした。さらに、各実験で非分離HGE材料から得られた解離細胞からウェル当たりの形成された凝集体の平均数を決定した。N=4回の実験。

【0170】

自発的に分離した(7日目)または凝集した(8日目)スフェロイドを固定し、免疫染色に供して腸上皮細胞(CDH1+/CDX2+)および腸間葉系細胞(FoxF1/CDX2+)を同定した。図9Eは、共焦点顕微鏡によってキャプチャされた代表的な画像を示す。腸内胚葉凝集体から培養されたスフェロイドは、より均一な形態を有する腸上皮

10

20

30

40

50

細胞および間葉系細胞の堅牢なパターン形成を示す。

【0171】

H1 hESCおよび4つのヒトiPSC株(iPSC72_3、iPSC75_1、iPSC115_1、およびiPSC285_1)を、HGEへの分化に供した。7日目に、分離した自発的スフェロイドをマトリゲルに直接埋め込み、非分離細胞を24時間凝集させた後、マトリゲルに埋め込んだ。500 ng/mLのEGF、100 ng/mLのNoggin、および500 ng/mLのR-スポンジンを含有する培地中で3日間培養した後、埋め込まれたスフェロイドの全体的な形態を評価した。図10Aに示されるように、両方の条件で、適切に増殖および成熟するオルガノイド前駆体を生成することができた。

10

【0172】

自発的に分離または凝集したスフェロイドをマトリゲルに埋め込んだ。3日間の培養後、スフェロイドを固定し、ホルマウント免疫染色に供して、腸上皮細胞(CDH1+/CDX2+)および腸間葉系細胞(FoxF1/CDX2+)を同定した。図10Bに示されるように、両方の条件で、無傷の腸上皮および間葉を含むオルガノイドがもたらされた。

【0173】

H1 hESCをHGEへの分化に供した。7日目に、分離した自発的スフェロイドをマトリゲルに埋め込み、非分離HGEを24時間解離および凝集させた後、マトリゲルに埋め込んだ。18、25、および35日目に、オルガノイドの形態学的解析により、分離スフェロイドおよび凝集HGEの両方から生じるHIOが同様のオルガノイド増殖を示し、別個の上皮層および間葉層を含むことが示された(図11A)。

20

【0174】

35日目に、H1由来のHIOおよびAggHIOを採取し、腸上皮(CDX2+/E-cad+)および間葉系細胞(Emilin1)の存在について共免疫蛍光分析に供した。図11Bに示されるように、両方の条件で、十分に形成されたCDX2+/E-cad+上皮およびEmilin1+間葉がもたらされた。

【0175】

35日目に、H1由来のHIOおよびAggHIOを採取し、近位腸マーカーCDH17およびPDx1の存在について免疫蛍光分析に供した。すべてのCDX2+上皮細胞は、CDH17およびPDx1の両方に陽性であり、近位小腸のパターン形成を示している。図11Cに示されるように、両方の条件で、CDH17+/PDx1+近位小腸組織へのパターン形成がもたらされた。

30

【0176】

35日目にAggHIOを採取し、免疫不全マウスの腎臓被膜に生着させた。6週間後、マウスを安楽死させ、生着させたAggHIOを切除し、ヘマトキシリン/エオシン(H&E)染色による組織学的分析に供した。図12Aに示されるように、凝集腸オルガノイドは移植に適しており、強力な増殖および成熟を経験する。

【0177】

移植したAggHIOを切片化し、成熟腸マーカーであるスクラーゼーイソマルターゼ(SI、上皮)、Muc2(杯細胞)、クロモグラニンA(腸内分泌細胞)、およびリゾチーム(パネート細胞)の免疫蛍光分析に供した。図12Bに示されるように、移植した凝集腸オルガノイドは、試験されたすべての腸細胞マーカーに対して陽性であった。

40

【0178】

実施例8．凝集胃オルガノイドの形成

図13Aは、凝集洞胃オルガノイドの形成についての概略図を示す。既存の方法と凝集方法との比較が提供される。図13Aの上部：洞オルガノイドの自発的形成に依存する方法(例えば、McCracken et al. Nature. (2014) 516 (7531): 400-4)に見られる)。図13Aの下部：前腸内胚葉の凝集のための工程を組み込んだ改良されたプロトコル。

50

【0179】

洞オルガノイドは、自発的に分離したスフェロイドから、および凝集した前腸内胚葉から生成されたスフェロイドから生成された。a H G O形態の代表的な画像を、35日目に撮影した（図13B）。

【0180】

35日目に、自発的スフェロイドまたは凝集した前腸内胚葉のいずれかから生成されたa H G Oを固定し、切片化し、胃上皮マーカーC L D N 18およびM U C 5 A Cの免疫染色に供した。自発的細胞および凝集細胞の両方に由来するa H G Oの上皮細胞は、均一にC d h 1 / C L D N 18 / M U C 5 A C陽性であった（図13C）。

【0181】

実施例9．凝集結腸オルガノイドの形成

図14Aは、凝集結腸オルガノイドの形成についての概略図を示す。既存の方法と凝集方法との比較が提供される。図14Aの上部：結腸オルガノイドの自発的形成に依存する方法。図14Aの下部：B M P 2で後側化する前にスフェロイドを凝集させるための工程を組み込んだ改良されたプロトコル。

【0182】

H C Oは、自発的な分離スフェロイドから、および凝集後腸内胚葉から生成されたスフェロイドから生成された。次いで、B M P 2に3日間曝露することによって、スフェロイドを後側運命にパターン形成した。32日後、H C O形態の代表的な画像をキャプチャした（図14B）。

【0183】

35日目に、自発的スフェロイドまたは凝集後腸内胚葉のいずれかから生成されたH C Oを固定し、切片化し、結腸上皮マーカーS A T B 2の免疫染色に供した。自発的および凝集後腸内胚葉から生成されたH C OのC D H 1 + 上皮は、同様の数のS A T B 2陽性細胞を示した（図14C）。

【0184】

実施例10．凝集肝臓オルガノイドの形成

図15は、凝集肝臓オルガノイドの形成についての概略図を示す。H L Oは、自発的な分離スフェロイドから、および凝集後腸内胚葉から生成されたスフェロイドから生成される。次いで、F G F 2（10～100 ng / mL）、B M P 4（10～100 ng / mL）、レチノイン酸（2 μM）、肝細胞増殖因子（10～20 ng / mL）、デキサメタゾン（0.1 μM）、およびオンコスタチンM（10～100 ng / mL）への曝露によって、スフェロイドが肝臓オルガノイドにパターン形成される。

【0185】

実施例11．腸内胚葉単層の培養は中胚葉集団を増加させる

腸内胚葉を分化させるための従来のプロトコルは、最小の増殖因子を用いた胚体内胚葉のインビトロ培養を伴うため、結果として生じる腸内胚葉および下流のスフェロイド／オルガノイドは、インビボ組織よりも代表的でない（すなわち、少ない）中胚葉および間葉などの他の重要な細胞型の比率を含む。通常の発達では、中胚葉および関連する間葉は、適切な細胞組織および組織成熟にとって重要である。したがって、オルガノイド組成物の中胚葉／間葉集団を増加させる必要がある。

【0186】

3日目の前腸および後腸内胚葉単層は、実施例1～5および8で検討された手順に従って調製した。単層は、中胚葉マーカーであるB r a c h y u r y（T）および胚体内胚葉マーカーであるF O X A 2の免疫蛍光イメージング染色によって調べた（図16A）。画像は、単層がほとんど中胚葉を伴わず、大部分が胚体内胚葉で構成されていることを示している。これらの腸内胚葉単層の中胚葉および胚体内胚葉集団を定量化した（図16B）。前腸および後腸の両方の内胚葉単層では、平均して、中胚葉細胞がそれぞれ3%および1%しかなく、胚体内胚葉細胞がそれぞれ94%および87%であった。

【0187】

10

20

30

40

50

3日目の単層培養と同様に、7日目の前腸および後腸の内胚葉単層培養を調製した。これらの培養は、分化および腸のパターン形成（自発的スフェロイドの形成を含む）がさらに進んでいたため、中胚葉細胞ではなく間葉系細胞を調べた。単層は、間葉マーカーFOXF1および内胚葉マーカーFOXA2で染色され、間葉画分の一般的な増加が観察された（図16C）。間葉および内胚葉の集団を定量化した（図16D）。前腸内胚葉単層は、3%の間葉および91%の内胚葉を含み、後腸内胚葉単層は、11%の間葉および86%内胚葉を含んでいた。観察されたように、後腸内胚葉単層の培養後、中胚葉／間葉系統が有意に増加している。

【0188】

後腸内胚葉単層の定量化を、独立した実験で繰り返した。図16Eに見られるように、ここでも、親の胚体内胚葉培養と比較して、7日目の後腸内胚葉単層培養では中胚葉／間葉系統が増加している。増殖細胞マーカーKi67と比較して、中胚葉マーカーTおよび内胚葉マーカーFOXA2で細胞を染色することによって定量化を行った。

【0189】

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、そのような置き換えが技術的に実現可能でない場合を除いて、別の実施形態で互換的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、付加、および改変を行うことができることを理解されよう。そのようなすべての改変および変更は、添付の特許請求の範囲によって規定されるように、主題の範囲内に含まれることが意図されている。

【0190】

本明細書における実質的にすべての複数および／または単数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、複数から単数へと、および／または単数から複数へと言い換えることができる。明確にするために、様々な単数／複数の置き換えを本明細書において明確に説明することができる。

【0191】

通常、本明細書および特に添付された特許請求の範囲（例えば、添付された特許請求の範囲の本文）で使用される用語は、通常は「オープンな」用語として意図されている（例えば、用語「含む（including）」は「含むがこれに限定されない」と解釈すべきであり、用語「有する」は「少なくとも有する」と解釈すべきであり、用語「含む（include）」は「含むがこれに限定されない」と解釈すべきである等）ことを当業者は理解するであろう。導入される請求項の詳述の具体的な数が意図されている場合には、そのような意図は、この請求項で明示的に詳述され、そのような詳述が存在しない場合にはそのような意図は存在しないことを当業者はさらに理解するであろう。例えば、理解の補助として、下記の添付された特許請求の範囲は、請求項の詳述を導入するために、導入的語句「少なくとも1つ」および「1つ以上」の使用を含む場合がある。しかしながら、そのような語句の使用は、同じ請求項が導入的語句「1つ以上」または「少なくとも1つ」および「a」または「an」等の不定冠詞を含む場合であっても、不定冠詞「a」または「an」による請求項の詳述の導入が、そのように導入される請求項の詳述を含む任意の特定の請求項を、ただ1つのそのような詳述を含む実施形態に限定することを意味すると解釈すべきではなく（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」を意味すると解釈すべきであり）、同じことが、請求項の詳述を導入するために使用される定冠詞の使用にも当てはまる。加えて、導入される請求項の詳述の具体的な数が明示的に詳述されている場合、そのような詳述は、少なくとも詳述された数を意味する（例えば、その他の修飾語句なしでの「2つの詳述」という単なる詳述は、少なくとも2つの詳述または2つ以上の詳述を意味する）と解釈すべきであることを当業者は認識するであろう。さらに、「A、B、およびCの少なくとも1つ等」に類似する慣習が使用される場合では、通常、そのような構文は、当業者がこの慣習を理解するであろう意味が意図されている（例えば、「A、B、およびCの少なくとも1つを有するシステム」には、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AおよびBと一緒に、AおよびCと一緒に、BおよびC

10

20

30

40

50

を一緒に、ならびに／またはA、B、およびCと一緒に有するシステム等が含まれるがこれらに限定されないであろう)。A、B、またはCの少なくとも1つ等」に類似する慣習が使用されている場合では、通常、そのような構文は、当業者がこの慣習を理解するであろう意味が意図されている(例えば、「A、B、またはCの少なくとも1つを有するシステム」には、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AおよびBと一緒に、AおよびCと一緒に、BおよびCと一緒に、ならびに／またはA、B、およびCと一緒に有するシステム等が含まれるがこれらに限定されないであろう)。明細書、特許請求の範囲または図面のいずれにおいても、2つ以上の代替用語を提示する実質的にいかなる離接語および／または離接語句も、用語のうちの1つ、用語のいずれかまたは両方の用語を含む可能性を意図すると理解すべきであることを当業者はさらに理解するであろう。例えば、語句「AまたはB」は、
「A」または「B」または「AおよびB」の可能性を含むと理解されるであろう。

10

【0192】

加えて、本開示の特徴または態様がマーカッシュグループによって説明されている場合、これにより、本開示は、マーカッシュグループの任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループによっても説明されることを当業者は認識するであろう。

【0193】

当業者に理解され得るように、文書として記述するという観点等のあらゆる目的のために、本明細書で開示されているすべての範囲は、あらゆる可能な部分範囲およびこれらの部分範囲の組み合わせも包含する。列挙されているあらゆる範囲を、少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分等に分解される同じ範囲を十分に説明して可能にする
と容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で論じる各範囲を、下3分の1、中3分の1および上3分の1等に容易に分解することができる。当業者にも理解され得るように、「最大」、「少なくとも」、「超」、「未満」等のすべての言葉は、詳述される数を含み、上記で論じたように後に部分的範囲に分解され得る範囲を指す。最後に、当業者に理解され得るように、範囲は個々の各メンバーを含む。したがって、例えば、1～3個の物品を有する群は、1個、2個、または3個の物品を有する群を指す。同様に、1～5個の物品を有する群は、1個、2個、3個、4個、または5個等の物品を有する群を指し、以下同様である。

20

【0194】

本明細書では様々な態様および実施形態が開示されているが、当業者にはその他の態様および実施形態が明らかであるだろう。本明細書で開示されている様々な態様および実施形態は説明を目的としており、限定していることを意図されておらず、真の範囲および趣旨は下記の特許請求の範囲で示される。

30

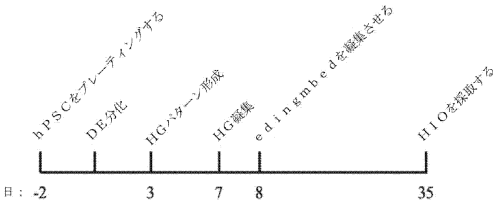
【0195】

公開および未公開の出願、特許、および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、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明細書に含まれる開示と矛盾する範囲で、明細書は、そのような矛盾する資料に優先する、および／または優先することを意図している。

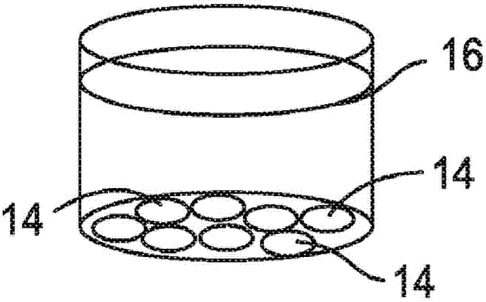
40

【図面】

【図 1】

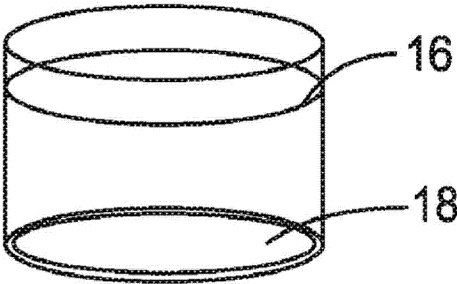


【図 2 A】

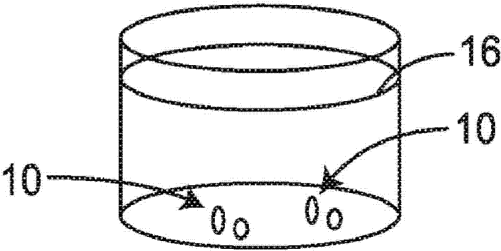


10

【図 2 B】

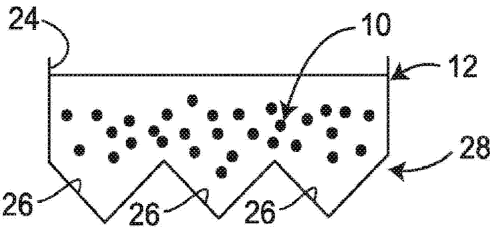


【図 2 C】

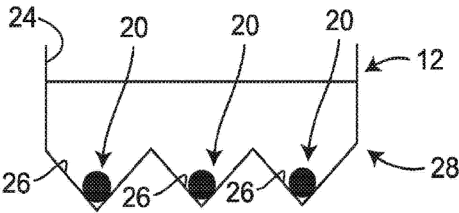


20

【図 3 A】



【図 3 B】

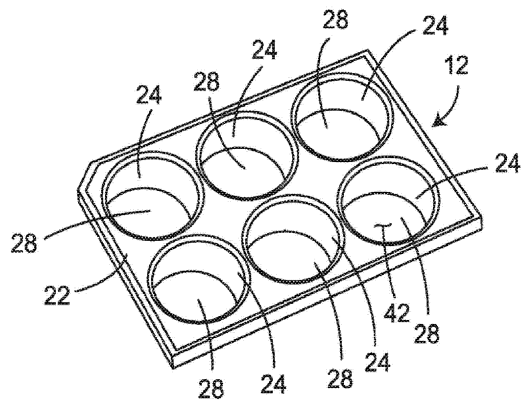


30

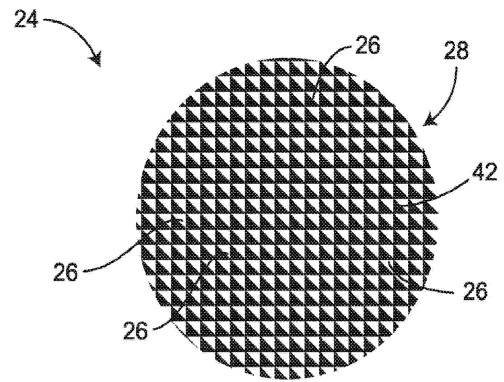
40

50

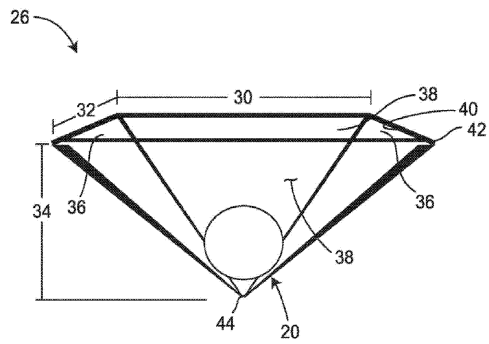
【図 4】



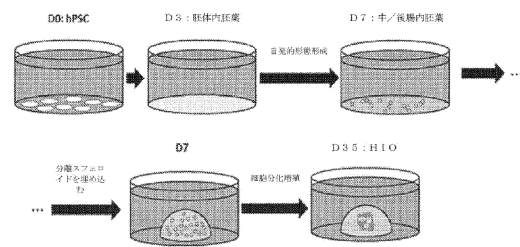
【図 5】



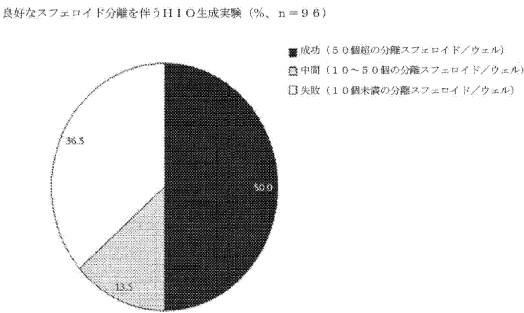
【図 6】



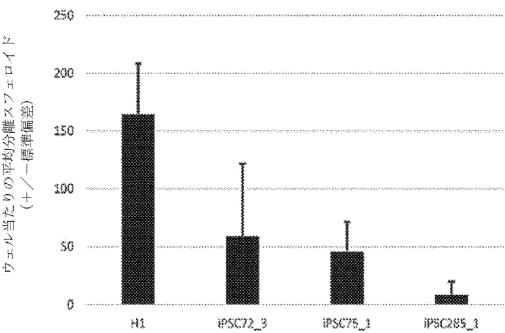
【図 7 A】



【図 7 B】

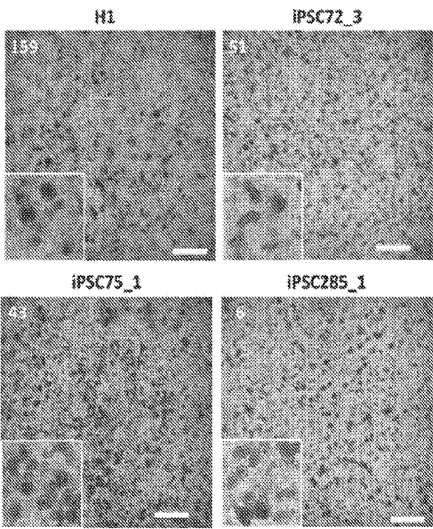


【図 7 C】

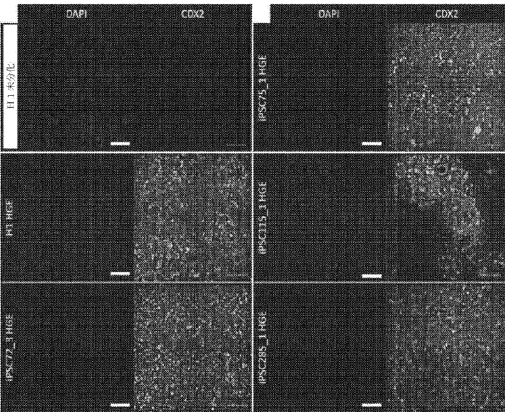


10

【図 7 D】



【図 8】



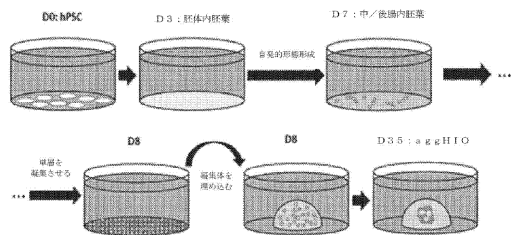
20

30

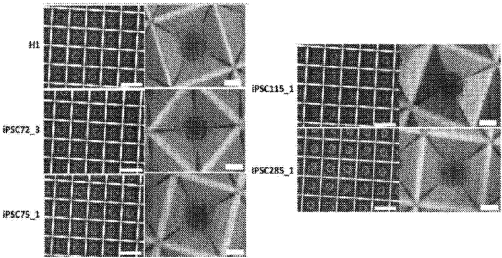
40

50

【図 9 A】

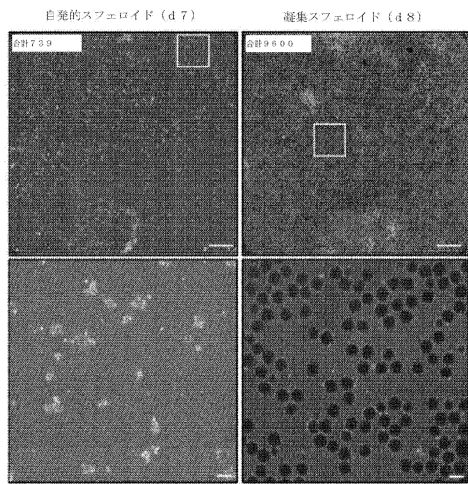


【図 9 B】

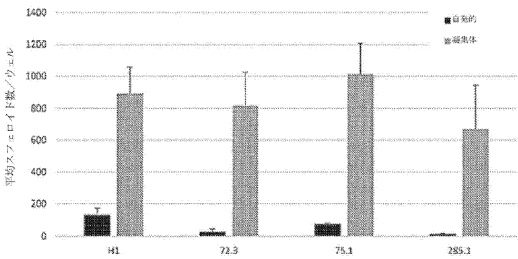


10

【図 9 C】

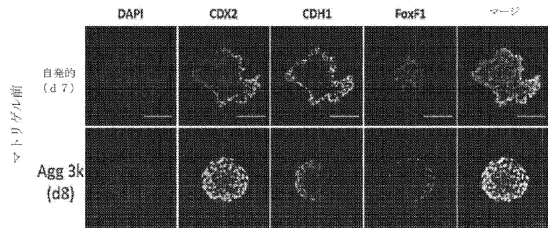


【図 9 D】

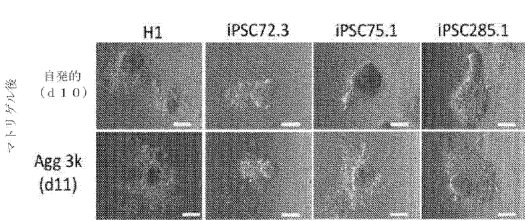


20

【図 9 E】



【図 10 A】

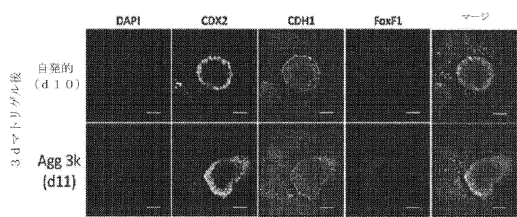


30

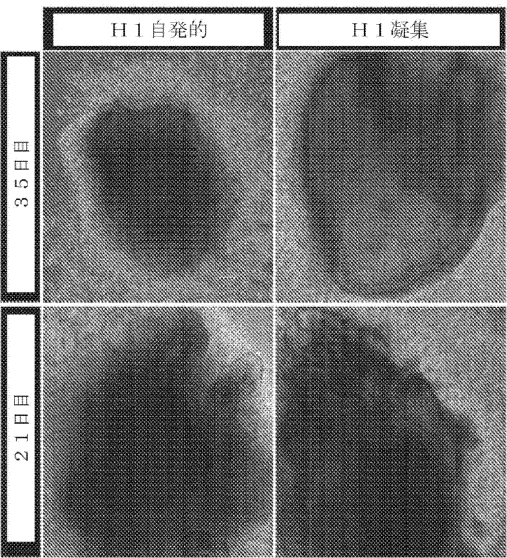
40

50

【図 1 0 B】

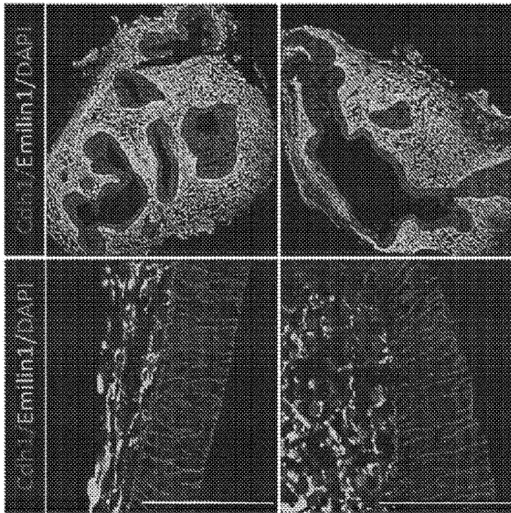


【図 1 1 A】

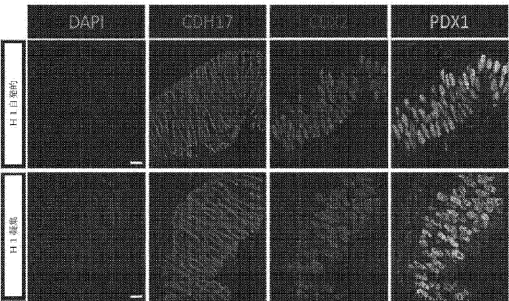


10

【図 1 1 B】



【図 1 1 C】

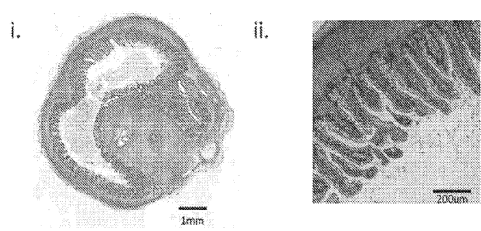


30

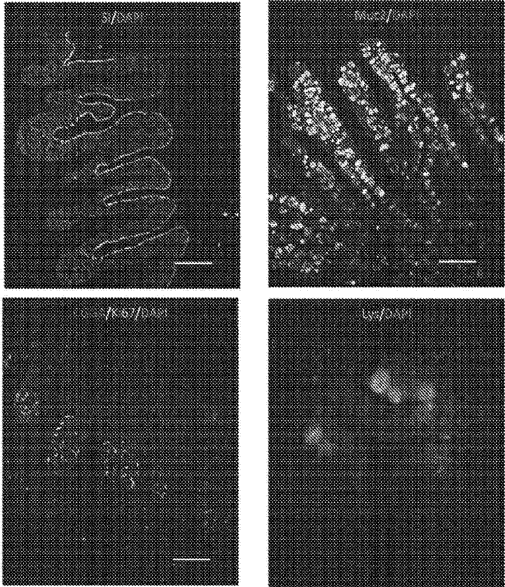
40

50

【図 1 2 A】



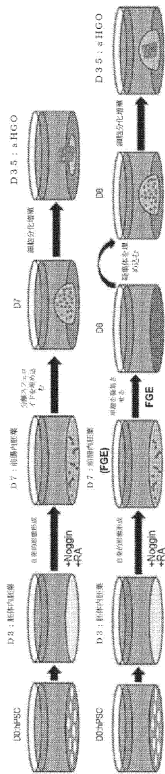
【図 1 2 B】



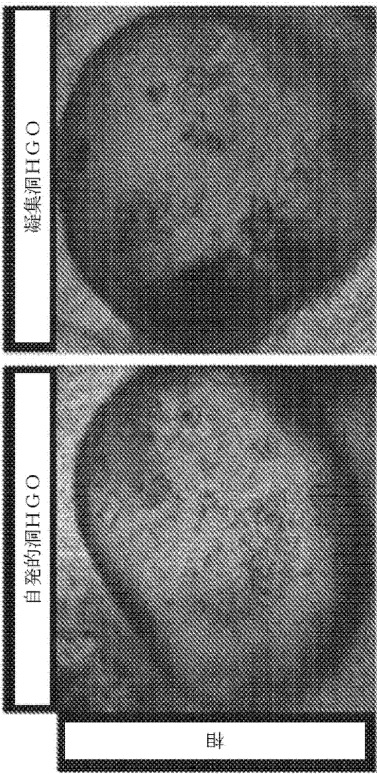
10

20

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

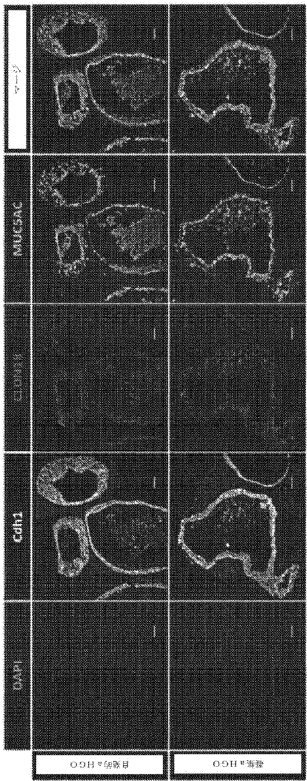


30

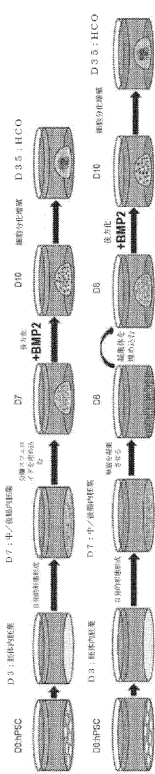
40

50

【図 1 3 C】



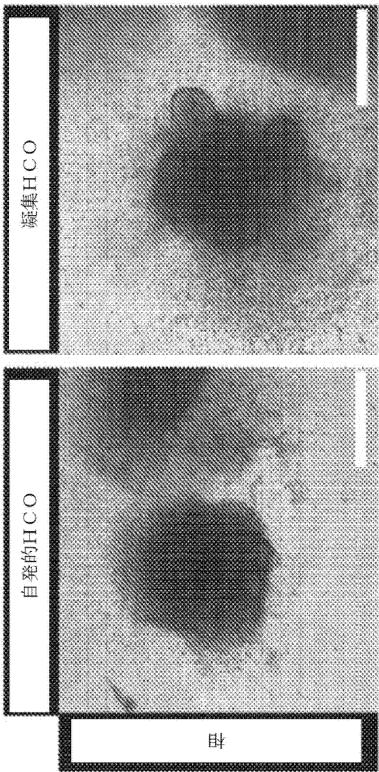
【図 1 4 A】



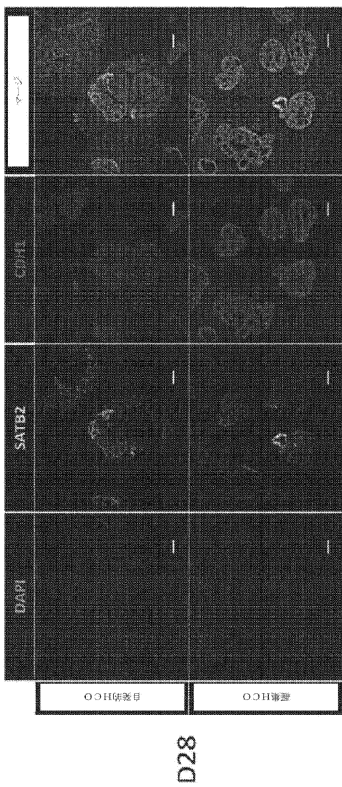
10

20

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】

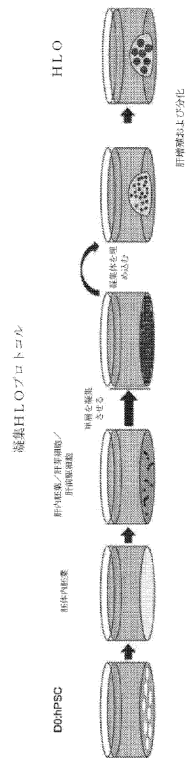


30

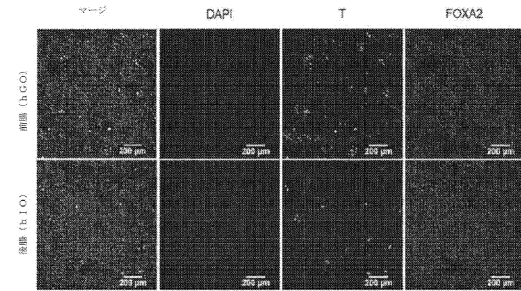
40

50

【図 15】

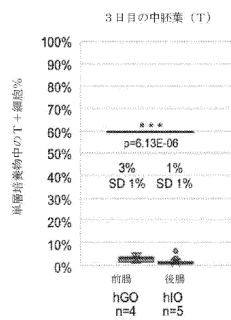


【図 16 A】

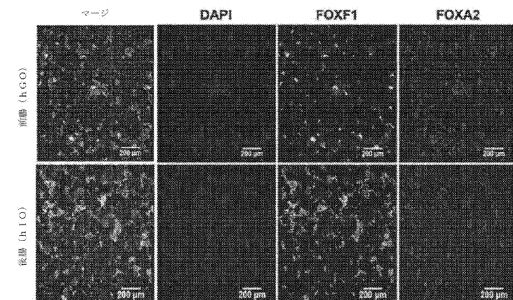
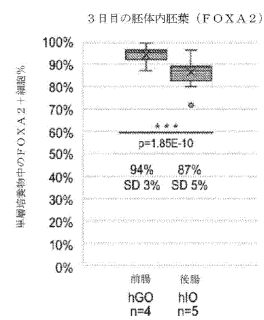


10

【図 16 B】



【図 16 C】

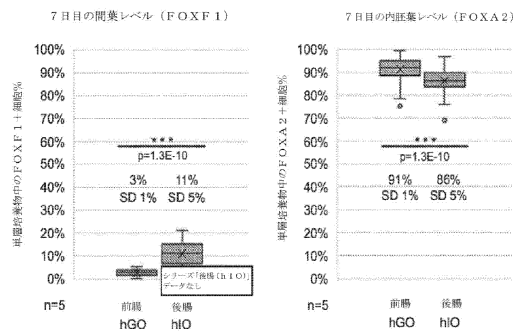


30

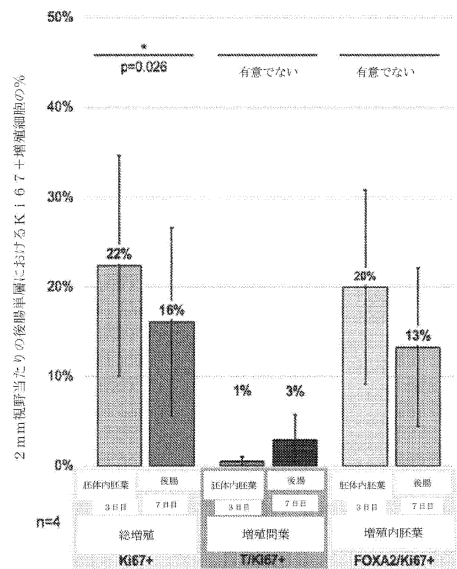
40

50

【図 16 D】



【図 16 E】



10

20

30

40

50

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 ピットスティック、エイミー リー
 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 千葉 直紀
 (56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0070419 (US, A1)
 米国特許出願公開第2018/0258400 (US, A1)
 Nature, 2014年, Vol. 516, pp. 400-404
 (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
 C12N、C12M
 PubMed