

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-550141

(P2022-550141A)

(43)公表日 令和4年11月30日(2022.11.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	2 G 0 4 5	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 B 0 6 3	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	4 B 0 6 5	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	4 C 0 8 4
A 6 1 K	31/5513(2006.01)	A 6 1 K	31/5513	4 C 0 8 5	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-519551(P2022-519551)	(71)出願人	507189666
(86)(22)出願日	令和2年9月28日(2020.9.28)		デューク ユニバーシティ
(85)翻訳文提出日	令和4年5月26日(2022.5.26)		アメリカ合衆国 2 7 7 0 5 ノースカロラ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/053164		イナ州ダーラム、アーウィン・ロード 2
(87)国際公開番号	WO2021/062412		8 1 2、スウィート 4 0 6、ボックス
(87)国際公開日	令和3年4月1日(2021.4.1)		9 0 0 8 3
(31)優先権主張番号	62/975,294	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和2年2月12日(2020.2.12)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	62/906,241		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	令和1年9月26日(2019.9.26)	(72)発明者	タタ, プルショタマ ラオ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		7 0 5, ダーラム, アーウィン ロード
		(72)発明者	2 8 1 2
			タタ, アレクサンドラ

最終頁に続く		最終頁に続く	
--------	--	--------	--

(54)【発明の名称】 肺線維症モデルおよびそれを使用する方法

(57)【要約】

本開示は、疾患モデリングおよび薬物スクリーニングの使用のための、肺胞再生における新たに同定された移行細胞状態、肺線維症および肺気腫をもたらす1型肺胞細胞をアブレートするためのモデル、共培養された肺線維芽細胞およびプレ1型肺胞移行細胞状態(PATS)を使用する拡張可能なex vivo肺線維症モデル、ならびにそれらを使用する方法を提供する。本開示は、肺疾患の理解、薬物発見および／または薬物スクリーニングのための使用のためのモデルに役立つ移行細胞状態が肺胞再生において存在するという、本発明者らによる発見に一部基づく。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺傷害オルガノイドモデルを生成する方法であって、

i) 細胞の共培養物を、前記細胞の培養のために適合させた培養培地中に提供するステップであって、前記共培養物が、プレ 1 型肺胞移行細胞状態 (P A T S) 細胞および肺胞線維芽細胞を含む、ステップ；

i i) 前記培養培地を、1 種または複数の作用物質と接触させるステップ；ならびに

i i i) 前記作用物質と接触されていない対照細胞培養培地と比較した、前記 P A T S 細胞および／または前記肺胞線維芽細胞の少なくとも 1 つの発現マーカーに対する前記作用物質の生物学的影響を分析するステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記 P A T S 細胞が、罹患組織から単離される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記罹患組織が、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) 肺組織、肺線維症肺組織、特発性肺線維症肺組織、肺気腫肺組織、肺がん組織、サルコイドーシス肺組織、間質性肺炎肺組織、敗血症肺組織、ウイルス感染および細菌感染を有する肺組織、急性呼吸促迫症候群肺組織、ならびに気管支肺異形成症肺組織である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 P A T S 細胞が、肺上皮細胞を *i n v i v o* または *i n v i t r o* で傷害を引き起こす作用物質に曝露させることによって生成される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記傷害を引き起こす作用物質が、ブレオマイシン、ジフテリア毒素 (D T)、タモキシフェン、照射、ウイルス、細菌または真菌である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記肺胞線維芽細胞が、リボ線維芽細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記肺胞線維芽細胞が、疾患状態特徴を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記疾患状態特徴が、A C T A 2 を発現するリボ線維芽細胞、筋線維芽細胞の存在、および／または星型形状から帯状形状への細胞変化を含む、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記培養培地が、血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) リガンドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 P D G F R リガンドが、血小板由来増殖因子サブユニット A (P D G F A)、血小板由来増殖因子サブユニット B (P D G F B)、血小板由来増殖因子サブユニット C (P D G F C) および／または血小板由来増殖因子サブユニット D (P D G F D) である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記培養培地が、P D G F R A 発現を維持することが可能な作用物質を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記作用物質が、R o 5 - 3 3 3 5、A I - 1 0 - 4 9、または R U N X もしくはコア結合因子 (C B F) タンパク質を調節する他の分子である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

肺線維症のための *e x v i v o* モデルを生成する方法であって、

i) *i n v i v o* でアブレーションを受けた A E C 1 細胞の培養物を、前記細胞の培養のために適合させた培養培地中に提供するステップ；

i i) 前記培養培地を、1 種または複数の作用物質と接触させるステップ；ならびに

50

i i i) 前記作用物質と接触されていない対照細胞培養培地と比較した、前記 A E C 1 細胞の少なくとも 1 つの発現マーカーに対する前記作用物質の生物学的影響を分析するステップを含む、方法。

【請求項 1 4】

前記 A E C 1 細胞が、少なくとも 1 ラウンドのアブレーションを受けている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 A E C 1 細胞が、単独のまたは他の傷害モデルと組み合わせたアブレーションを受けている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 A E C 1 細胞が、反復アブレーションを受けている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記反復アブレーションが、約 3 日間～約 2 週間の過程にわたって行われる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 A E C 1 細胞が、ブレオマイシン、ジフテリア毒素 (D T)、アスベスト、化学的毒性作用物質、タモキシフェン、ウイルス、細菌または真菌に曝露されることによるアブレーションを受けている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 A E C 1 細胞が、a S M A および／または A C T A 2 を発現する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 A E C 1 細胞が、線維筋細胞の特徴を示す、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

プレ 1 型肺胞移行細胞状態 (P A T S) 細胞または P A T S 様細胞を同定する方法であって、

i) 肺胞細胞を得るステップ；および

i i) 前記細胞を、1 つまたは複数のマーカーについてスクリーニングするステップを含み、前記 1 つまたは複数のマーカーの存在が、P A T S 細胞または P A T S 様細胞の存在を示す、方法。

【請求項 2 2】

前記肺胞細胞が、気管基底細胞、細気管支分泌細胞 (クラブ細胞またはクララ細胞としても公知)、クラブバリエント細胞、肺胞上皮前駆 (A E P) 細胞、クララバリエント細胞、遠位肺前駆体、p 6 3 + K r t 5 - 気道細胞、系列陰性上皮前駆体、気管支肺胞上皮幹細胞 (B A S C)、S o x 9 + p 6 3 + 細胞、神経内分泌前駆細胞、遠位気道幹細胞、粘膜下腺管細胞、誘導多能性幹細胞由来肺幹細胞および 2 型肺胞上皮 (A E C 2) 細胞からなる群より選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記肺胞細胞が、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、肺線維症、特発性肺線維症、肺気腫、肺がん、サルコイドーシス、間質性肺炎、敗血症、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、急性呼吸促迫症候群および／または気管支肺異形成症を患う患者の肺から得られる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記肺胞細胞を作用物質と接触させるステップをさらに含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記作用物質が、ブレオマイシン、ジフテリア毒素 (D T)、タモキシフェン、ウイルス、細菌または真菌である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

前記1つまたは複数のマーカーが、CLDN4、KRT19、SFN、LGALS3、SOX4、S100A2、PTGS2、KRT17、KRT8、CALS1、MMP7、PRSS2、IGFBP7、COL1A1、MDK、TAGLN、GDF15、TM4SF1 TP63および／またはCTSEを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項27】

前記1つまたは複数のマーカーが、CLDN4、LGALS3およびLGALS3である、請求項21に記載の方法。

【請求項28】

前記1つまたは複数のマーカーが、CLDN4、KRT19およびSFNである、請求項21に記載の方法。

【請求項29】

前記1つまたは複数のマーカーが、CALD1、PRSS2、MMP7およびS100A2である、請求項21に記載の方法。

【請求項30】

in vivo組織線維症モデルを生成する方法であって、

i) 被験体においてPDGFリガンドおよび／もしくはPDGF受容体(PDGF R)シグナル伝達の遺伝的喪失を導入するステップ；ならびに／あるいは

ii) PDGF-PDGF Rシグナル伝達をモジュレートすることができる作用物質を被験体に投与するステップ；ならびに

iii) 前記被験体由来の細胞を分析して、対照被験体と比較した、PDGFリガンドおよび／もしくはPDGF受容体(PDGF R)シグナル伝達の遺伝的喪失の生物学的影響ならびに／またはPDGF-PDGF Rシグナル伝達をモジュレートすることができる前記作用物質の生物学的影響を決定するステップ

を含む、方法。

【請求項31】

PDGF-PDGF Rシグナル伝達をモジュレートすることができる前記作用物質が、PDGF R阻害剤、PDGF Rアゴニスト、PDGF阻害剤またはPDGFアゴニストを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

PDGF-PDGF Rシグナル伝達をモジュレートすることができる前記作用物質が、PDGFまたはPDGF Rに対する中和抗体を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

in vivo組織線維症モデルを生成する方法であって、

i) 被験体においてRUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβの遺伝的喪失を導入するステップ；ならびに／あるいは

ii) RUNX1阻害剤、RUNX2阻害剤、RUNX3阻害剤もしくはCBFβ阻害剤を前記被験体に投与するステップ；ならびに

iii) 前記被験体由来の細胞を分析して、対照被験体と比較した、RUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβの前記遺伝的喪失の生物学的影響および／または前記RUNX1阻害剤、前記RUNX2阻害剤、前記RUNX3阻害剤もしくは前記CBFβ阻害剤の生物学的影響を決定するステップ

を含む、方法。

【請求項34】

前記阻害剤が、RO5-3335、AI-10-49、またはRUNX1、RUNX2、RUNX3および／もしくはCBFβに対する中和抗体である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記被験体がマウスである、請求項30または33に記載の方法。

【請求項36】

前記細胞が、前記被験体の肺、心臓、腎臓、肝臓、腸、皮膚または骨髄に由来する、請

10

20

30

40

50

求項 30 または 33 に記載の方法。

【請求項 37】

前記モデルが、肺、肝臓、腎臓、皮膚、腸または骨髄における線維症のための疾患モデルである、請求項 30 または 33 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2020年2月12日出願の米国仮特許出願第62/975,294号および2019年9月26日出願の米国仮特許出願第62/906,241号に対する優先権を主張し、これらの各々の内容は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金供与の説明

本発明は、National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute Grant Nos. R01HL127181; R01HL153375の下で、政府の支援によりなされた。連邦政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

分野

【0004】

本開示は、疾患モデリング、薬物発見および／または薬物スクリーニングの使用のための、肺胞再生における移行細胞状態の同定、肺線維症および肺気腫をもたらす1型肺胞細胞をアブレートするためのモデル、共培養された肺線維芽細胞およびプレ1型肺胞移行細胞状態 (pre-alveolar type-1 transitional cell state) (PATs) 細胞を使用する拡張可能な ex vivo 肺線維症モデル、ならびにそれらを使用する方法を提供する。

【0005】

関連分野の説明

成体幹細胞は、組織損傷に応答して動的な変化を受ける。これらの変化は、静止状態または平衡を保った状態からの復活、増殖の開始、新たな遺伝子発現の活性化、およびホメオスタシスへの復帰を含む。多くの場合、修復には、例えば、損傷または裸出のエリアをカバーする一過的な伸展および拡張を介した、上皮細胞形状における変化もまた関与する。幹細胞再生の研究は、通常、ニッチからのシグナルに応答して新たな分化プログラムを細胞がどのように選択するかを理解することに焦点を当てている。しかし、細胞形状および広がりなどのパラメーターにおける変化の意義、ならびにそれらにDNA修復および老化を含む病理学的状態に通常関連する遺伝子の一過的な緊密に制御された発現が関与するかどうかについては、知られていることははるかに少ない。

【0006】

肺では、ホメオスタシスでの肺胞上皮の維持および傷害後のその再生は、自己更新でき、ガス交換のために特殊化した非常に大きい薄い1型肺胞上皮細胞 (AEC1) へと分化することができる、立方体状のサーファクタント産生2型肺胞上皮細胞 (AEC2) によって支持される。最近の研究は、活性なWntシグナル伝達について富化されており、Wnt不活性なAEC2と比較して高い「幹細胞性」を有するAEC2のサブセットを同定している。肺胞前駆細胞サブセットにおけるかかる差異は、微小環境シグナルにおける差異に帰せられてきた；この場合には、AEC2においてWntシグナル伝達を活性化するリガンドを産生するPDGFR α 発現線維芽細胞の近傍に帰せられる。最近の研究は、定常状態におけるおよび肺胞傷害に応答しての両方でのAEC2の増殖および分化における

10

20

30

40

50

、BMP、Notch、TGF β 、YAPおよびNF- κ Bを含む他のシグナル伝達経路もまた暗示している。しかし、AEC2が薄く平たいAEC1に変換する際に立方体状AEC2が細胞の形状、構造および機械的特性における劇的な変化を調整する正確な機構は、依然として分かりにくい。さらに、ほとんどの進行性肺疾患において一般に観察される特色である細胞老化に関連する遺伝子を発現するようにAEC2を駆動する細胞機構は、依然として未知である。

【0007】

ここで、オルガノイド培養および単一細胞トランスクリプトーム研究を使用して、AEC2とAEC1との間の移行を包含する以前には未知であった別個の細胞状態が発見された。さらに、傷害-修復モデルとカップリングさせたマウス系列追跡は、*in vivo*での類似の移行状態の存在を明らかにしている。この研究は、これらの移行状態を制御するシグナル伝達経路を明らかにする。本明細書で記載されるように、これらの移行状態は、DNA損傷応答を示し、AEC1に向かう途中に老化関連遺伝子を発現する。機構的に、遺伝的機能喪失、薬理的機能獲得およびゲノム結合アッセイの使用は、TP53シグナル伝達によるPATsの直接的な転写制御を明らかにした。重要なことに、これらの移行状態は、進行性肺線維症を有するヒト肺における欠損した線維化病巣に関連する異常な上皮細胞と相関する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示の概要

本開示は、肺疾患の理解、薬物発見および／または薬物スクリーニングのための使用のためのモデルに役立つ移行細胞状態が肺胞再生において存在するという、本発明者らによる発見に一部基づく。

【0009】

本開示の一態様は、肺傷害オルガノイドモデルを生成する方法であって、i)細胞の共培養物を、前記細胞の培養のために適合させた培養培地中に提供するステップであって、共培養物が、プレ1型肺胞移行細胞状態(PATs)細胞および肺胞線維芽細胞を含む、ステップ; ii)培養培地を、1種または複数の作用物質と接触させるステップ;ならびに iii)作用物質と接触されていない対照細胞培養培地と比較した、PATs細胞および／または肺胞線維芽細胞の少なくとも1つの発現マーカーに対する作用物質の生物学的影響を分析するステップ、を含む方法を提供する。

【0010】

本開示の一部の実施形態では、PATs細胞は、罹患組織から単離される。本開示の一部の実施形態では、罹患組織は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)肺組織、肺線維症肺組織、特発性肺線維症肺組織、肺気腫肺組織、肺がん組織、サルコイドーシス肺組織、間質性肺炎肺組織、敗血症肺組織、ウイルス感染および細菌感染を有する肺組織、急性呼吸促迫症候群肺組織、または気管支肺異形成症肺組織である。

【0011】

本開示の一部の実施形態では、PATs細胞は、肺上皮細胞を*in vivo*または*in vitro*で傷害を引き起こす作用物質(例えば、プレオマイシン、ジフテリア毒素(DT)、タモキシフェン、照射、ウイルス、細菌または真菌)に曝露させることによって生成される。

【0012】

本開示の一部の実施形態では、肺胞線維芽細胞は、リポ線維芽細胞(lipofibroblast)である。

【0013】

本開示の他の実施形態では、肺胞線維芽細胞は、疾患状態特徴を有する。本開示の一部の実施形態では、疾患状態特徴は、ACTA2を発現するリポ線維芽細胞、筋線維芽細胞の存在、および／または星状形状から帯状形状への細胞変化を含む。

【0014】

本開示の一部の実施形態では、培養培地は、血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）リガンドを含む。

【0015】

一部の実施形態では、培養培地は、PDGFR発現を維持またはモジュレートすることが可能な作用物質を含む。

【0016】

本開示の別の態様は、肺線維症のための *ex vivo* モデルを生成する方法であって、i) *in vivo* でアブレーションを受けたAEC1細胞の培養物を、前記細胞の培養のために適合させた培養培地中に提供するステップ；ii) 培養培地を、1種または複数の作用物質と接触させるステップ；ならびにiii) 作用物質と接触されていない対照細胞培養培地と比較した、AEC1細胞の少なくとも1つの発現マーカーに対する作用物質の生物学的影響を分析するステップ、を含む方法を提供する。

10

【0017】

一部の実施形態では、AEC1細胞は、少なくとも1ラウンドのアブレーションを受けている。他の実施形態では、AEC1細胞は、単独のまたは他の傷害モデルと組み合わせたアブレーションを受けている。一部の実施形態では、AEC1細胞は、例えば、約3日間～約2週間の過程にわたる反復アブレーションを受けている。

【0018】

本開示の一部の実施形態では、AEC1細胞は、ブレオマイシン、ジフテリア毒素（DT）、アスベスト、化学的毒性作用物質、タモキシフェン、ウイルス、細菌または真菌に曝露されることによるアブレーションを受けている。

20

【0019】

一部の実施形態では、AEC1細胞は、 α SMAおよび／またはACTA2を発現する。一部の実施形態では、AEC1細胞は、線維筋細胞（fibromyocyte cell）の特徴を示す。

【0020】

本開示のさらに別の態様は、プレ1型肺胞移行細胞状態（PATS）細胞またはPATS様細胞を同定する方法であって、i) 肺胞細胞を得るステップ；およびii) 細胞を、1つまたは複数のマーカーについてスクリーニングするステップ、を含み、1つまたは複数のマーカーの存在が、PATS細胞またはPATS様細胞の存在を示す、方法を提供する。

30

【0021】

本開示の一部の実施形態では、肺胞細胞は、気管基底細胞、細気管支分泌細胞（クラブ細胞またはクララ細胞としても公知）、クラブバリアント細胞、肺胞上皮前駆（AEP）細胞、クララバリアント細胞、遠位肺前駆体（distal lung progenitor）、p63+Krt5-気道細胞、系列陰性上皮前駆体、気管支肺胞上皮幹細胞（BASC）、Sox9+p63+細胞、神経内分泌前駆細胞、遠位気道幹細胞、粘膜下腺管細胞（submucosal gland duct cell）、誘導多能性幹細胞由来肺幹細胞および2型肺胞上皮（AEC2）細胞からなる群より選択される。

40

【0022】

本開示の一部の実施形態では、肺胞細胞は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺線維症、特発性肺線維症、肺気腫、肺がん、サルコイドーシス、間質性肺炎、敗血症、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、急性呼吸促迫症候群および／または気管支肺異形成症を患う患者の肺から得られる。

【0023】

本開示の一部の実施形態では、プレ1型肺胞移行細胞状態（PATS）細胞またはPATS様細胞を同定する方法は、肺胞細胞を作用物質（例えば、ブレオマイシン、ジフテリア毒素（DT）、タモキシフェン、ウイルス、細菌または真菌）と接触させるステップをさらに含む。

50

【0024】

本開示のさらに別の態様は、*in vivo*組織線維症モデルを生成する方法であって、*i*)被験体においてPDGFリガンドおよび／もしくはPDGF受容体(PDGF-R)シグナル伝達の遺伝的喪失を導入するステップ；ならびに／あるいは*ii*)PDGF-PDGF-Rシグナル伝達をモジュレートすることができる作用物質を被験体に投与するステップ；ならびに*iii*)被験体由来の細胞を分析して、対照被験体と比較した、PDGFリガンドおよび／もしくはPDGF受容体(PDGF-R)シグナル伝達の遺伝的喪失の生物学的影響ならびに／またはPDGF-PDGF-Rシグナル伝達をモジュレートすることができる作用物質の生物学的影響を決定するステップ、を含む方法を提供する。

【0025】

一部の実施形態では、PDGF-PDGF-Rシグナル伝達をモジュレートすることができる作用物質は、PDGF-R阻害剤、PDGF-Rアゴニスト、PDGF阻害剤またはPDGFアゴニストを含む。

【0026】

本開示のさらに別の態様は、*in vivo*組織線維症モデルを生成する方法であって、*i*)被験体においてRUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβの遺伝的喪失を導入するステップ；ならびに／あるいは*ii*)RUNX1阻害剤、RUNX2阻害剤、RUNX3阻害剤もしくはCBFβ阻害剤を被験体に投与するステップ；ならびに*iii*)被験体由来の細胞を分析して、対照被験体と比較した、RUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβの遺伝的喪失の生物学的影響および／またはRUNX1阻害剤、RUNX2阻害剤、RUNX3阻害剤もしくはCBFβ阻害剤の生物学的影響を決定するステップ、を含む方法を提供する。

【0027】

一部の実施形態では、阻害剤は、Ro5-3335、AI-10-49、またはRUNX1、RUNX2、RUNX3および／もしくはCBFβに対する中和抗体である。

【0028】

一部の実施形態では、*in vivo*モデルは、マウスモデルである。

【0029】

一部の実施形態では、*in vivo*モデルは、肺、肝臓、腎臓、皮膚、腸または骨髄における線維症のための疾患モデルである。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1-1】図1A~1H。*scRNA-seq*によって明らかになった、*ex vivo*オルガノイドにおける以前には未知であった肺胞上皮細胞状態。図1Aは、*scRNA-seq*のために利用した肺胞オルガノイド培養の概略図である。図1Bは、肺胞オルガノイドに由来する総細胞における細胞1つ当たりの遺伝子の数(*nGene*)および独自分子識別子(*unique molecular identifier*)(*nUMI*)を可視化するピアソン相関プロットを示す(左パネル、10,948細胞)。UMAPは、肺胞オルガノイドにおける上皮細胞(5,163細胞)、線維芽細胞(5,686細胞)を含む主要細胞集団、ならびに一部の少数集団、例えば、内皮細胞(66細胞)およびマクロファージ(33細胞)を示す(右パネル)。図1Cは、肺胞オルガノイド(4,787細胞)、*in vivo*ホメオスタシスマウス肺(1,878細胞)およびLPSで処置したマウス肺(14,323細胞)に由来する細胞を示す統合されたUMAPである(左)。統合されたUMAPにおける示された遺伝子の発現(右)。図1Dは、培養された肺胞オルガノイド(*n*=4,573細胞)における上皮集団のUMAP可視化である：AEC2(*n*=3,303細胞)；AEC2増殖性、増殖性AEC2(*n*=696細胞)；AEC1(*n*=262細胞)ならびに新たな細胞状態—Lgals3+(*n*=184細胞)およびCtgf+細胞(*n*=128細胞)。図1Eは、培養された肺胞オルガノイドにおける上皮集団における示された遺伝子の発現を示すUMAPプロットである。図1Fは、肺胞オルガノイド*scRNA-seq*データセット(4,573細胞)およびL

10

20

30

40

50

P Sで処置した肺または対照肺（13, 204細胞）における、AEC2、AEC2増殖性、AEC1、および新規肺胞上皮細胞状態における示された遺伝子の発現を示すUMAPプロットである。図1Gは、Ctgf+（n=128細胞）およびLgals3+（n=184細胞）移行細胞状態において富化された特定の遺伝子を示すボルケーノプロットである。ウィルコクソンの順位和検定を統計分析に使用した。データポイントは、倍数変化（fold change）（Log2）およびP値（Log10）について設定した閾値を下回る転写物を示す。図1Hは、線維芽細胞およびAEC2を使用する肺胞オルガノイド培養の概略図である。Tmx、タモキシフェン。

【図1-2】同上。

【図1-3】同上。

【図1-4】同上。

【0031】

【図2】図2は、Ctgf-GFPマウスにおけるブレオマイシンで誘導された肺傷害の実験的ワークフローを示す概略図である。

【0032】

【図3】図3は、肺胞オルガノイド（上、n=4, 573細胞）およびLPSで傷害された肺scRNA-seqデータセット（下、n=13, 204細胞）に由来する上皮細胞集団におけるKrt8およびSfnの発現を示すバイオリンプロットである。バイオリンプロットは、細胞の分布を示す。

【0033】

【図4】図4A～4Bは、PAT S細胞がin vivoでの肺傷害後に肺胞幹細胞から一過的に出現することを示す。図4Aは、Ager-CreER; R26R-DTRマウスモデルにおいてAEC1をアブレートするための実験的設計を示す概略図である。マウスに、タモキシフェンを投与し、その後DTを投与して、組織を6日目に収集した。図4Bは、対照肺およびAEC1をアブレートされた肺における細長いLGALS3+細胞の割合を示すグラフである。***P<0.0008、対応のない両側スチューデントt検定；n=3匹のマウス。

【0034】

【図5-1】図5A～5Fは、PAT S細胞が、in vivoでの肺傷害後の肺胞幹細胞に起源することを示す。図5Aは、Sftpc-CreER; R26R-tdTomatoマウスを使用する、タモキシフェンの逐次投与とその後のブレオマイシン傷害、および分析のための組織収集についての実験的ワークフローを示す概略図である。図5Bは、ブレオマイシン傷害後のCLDN4、Sftpc-tdtおよびLGALS3についての免疫染色の時間経過を示す。スケールバー、10μm。画像は、3匹のマウスの代表である。図5Cは、傷害後の異なる時点におけるCLDN4+、CLDN4+LGALS3+およびLGALS3+細胞の定量化を示すグラフである。n=3匹のマウス。図5Dは、CLDN4+、CLDN4+LGALS3+およびLGALS3+細胞の細胞の長さを示すグラフである。*P=0.049（CLDN4+ 対 CLDN4+LGALS3+）および0.0235（CLDN4+ 対 LGALS3+）、対応のない両側スチューデントt検定；3匹のマウスからのn=30細胞。図5Eは、肺切除術傷害モデルを示す概略図である。図5Fは、異なるPAT Sサブタイプを介したAEC2からAEC1への移行を示す概略図である。

【図5-2】同上。

【図5-3】同上。

【0035】

【図6-1】図6A～6Hは、系列追跡により、PAT S細胞がAEC1を生成することが明らかになったことを示す。図6Aは、培養された肺胞オルガノイド（n=4, 573細胞）における上皮集団のUMAPである。矢印は、図6Bに示される、楕円中の選択された細胞集団を示す。図6Bは、選択された集団（図6A中の楕円；n=574細胞）における示された遺伝子の発現を示すUMAPプロットである。図6Cは、Krt19-C

10

20

30

40

50

reER; R26R-tdTomatoマウスにおけるブレオマイシン（傷害）またはPBS（対照）とその後のタモキシフェン（Krt19発現細胞を標識するため）の逐次投与についての実験的ワークフローを示す概略図である。図6Dは、SFTPC、Krt19-tdtおよびAGERについての免疫染色を示す画像である。白の矢印は、AGER+Krt19-tdt+細胞を示す。スケールバー、30 μ m。画像は、類似の結果を伴って独立して反復された、3匹のマウスの代表である。図6Eは、SFN、Krt19-tdtおよびAGERについての共染色を示す画像である。白の矢印は、SFN+Krt19-tdt+細胞を示す。スケールバー、50 μ m。画像は、類似の結果を伴って独立して反復された、3匹のマウスの代表である。図6Fは、総Krt19-tdt+細胞中のAGER+Krt19-tdt+細胞の定量化を示すグラフである。 $p=0.0318$ （片側、マン・ホイットニー）。 $n=3$ 匹のマウス。図6Gは、CLDN4、Krt19-tdtおよびLGALS3についての免疫染色を示す画像である。矢印は、CLDN4+Krt19-tdt+細胞を示す。スケールバー、50 μ m。画像は、類似の結果を伴って独立して反復された、3匹のマウスの代表である。矢じりは、LGALS3+Krt19-tdt+細胞を示す。図6Hは、総Krt19-tdt+細胞中のKRT8+Krt19-tdt+細胞の定量化を示すグラフである。 $p=0.0318$ 、（片側、マン・ホイットニー）。 $n=3$ 匹のマウス。

10

【図6-2】同上。

【図6-3】同上。

【図6-4】同上。

20

【0036】

【図7-1】図7A~7Cは、PATsにおいて富化された遺伝子発現シグネチャーおよびシグナル伝達経路を示す。図7Aは、KEGG分析がPATsにおいて富化された経路を明らかにすることを示すグラフである。ウェブベースのツールEnrichrScaleを使用して、log2変形された合わされたスコアの値を決定した。図7Bは、肺泡オルガノイド（ $n=4$ ，573細胞）およびLPSで処置したマウス肺（ $n=13$ ，204細胞）におけるAEC2、増殖性AEC2（AEC2pro）、PATsおよびAEC1における示されたシグナル伝達経路の公知の標的遺伝子の発現を示すヒートマップである。スケールは、zスコアを示す。図7Cは、in vivoのLPS傷害モデル（ $n=13$ ，039細胞）からの示された細胞集団における老化（上）およびDNA損傷応答経路（下）についてのバイオリンプロットである。黒の点は細胞を示す。バイオリン本体は、細胞の分布を示す。

30

【図7-2】同上。

【図7-3】同上。

【0037】

【図8-1】図8A~8Iは、PATs細胞が、in vivoおよびex vivoで伸展により誘導されたDNA損傷および老化を受けることを示す。図8Aは、ブレオマイシンで傷害された（右）肺および対照（左）肺における β -ガラクトシダーゼ活性についての染色を示す画像である。スケールバー、100 μ m。図8Bは、対照（上）肺およびブレオマイシンで傷害された（下）肺におけるCDKN1A、Sftpc-tdtおよびAGERについての免疫染色を示す画像である。矢じりは、CDKN1A+細胞を示す。白の点線はAEC1を示し、点線は、tdt+細胞の輪郭を描く。スケールバー50 μ m。図8Cは、対照（上）肺およびブレオマイシンで傷害された（下）肺における γ H2AX、Sftpc-tdtおよびAGERについての免疫染色を示す画像である。スケールバー50 μ m。図8Dは、対照マウスおよびブレオマイシンで傷害されたマウスにおける、10日目の、LGALS3+である総 γ H2AX+Sftpc-tdt+細胞の割合を示すグラフである。 $*P<0.0318$ 、片側マン・ホイットニー検定； $n=3$ 匹のマウス。図8Eは、DTで処置された肺および対照肺における β -ガラクトシダーゼ活性についての染色を示す画像である。スケールバー、100 μ m。図8Fは、対照肺（上）およびDTで処置された肺（下）におけるCDKN1A、LGALS3およびAGERについ

40

50

ての免疫染色を示す画像である。矢じりは、CDKN1A+細胞を示す。スケールバー20 μm 。図8Gは、対照肺およびDTで処置された肺における、LGALS3+である総 γH2AX +細胞の割合を示すグラフである。 $*P=0.0318$ 、片側マン・ホイットニー検定； $n=3$ 匹のマウス。図8Hは、AEC2の2D培養の概略図である。図8Iは、AEC2の2D培養におけるSftp c-GFP、 γH2AX およびAGERについての免疫染色を示す画像である。白の矢印は、DNA損傷マーカーを有する細胞を示す。スケールバー20 μm 。画像は、類似の結果を伴って独立して反復された、3匹のマウスの代表である。DAPIは、核を染色する。

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

【図8-4】同上。

【図8-5】同上。

【0038】

【図9-1】図9A~9Hは、遺伝学および薬理的モジュレーションならびにゲノム結合アッセイが、TP53シグナル伝達によるPATSの転写制御を明らかにすることを示す。図9Aは、Sftp c-CreER；R26R-tdTomatoマウスを使用する、タモキシフェンの逐次投与とその後のPBSまたはブレオマイシン（0日目）投与、Nutlin-3aまたはDMSO処置（8~18日目）、および分析のための組織収集（20日目）についての実験的ワークフローを示す概略図である。図9Bは、PBS+Nutlin-3a、ブレオマイシン+DMSO、およびブレオマイシン+Nutlin-3aで処置したマウスにおける、AGER+である総Sftp c-tdt+細胞の割合を示すグラフである。 $*P=0.0201$ 、対応のない両側スチューデントt検定； $n=3$ 匹のマウス。図9Cは、Nutlin-3aで処置した肺胞オルガノイド培養の概略図である。図9Dは、対照またはNutlin-3aで処置した肺胞オルガノイドにおけるKi67（緑）およびAGER（灰色）についての免疫染色を示す画像である。スケールバー：30 μm 。図9Eは、Sftp c-CreER；R26R-tdTomato；Trp53 fl/flマウスまたは対照マウス（Sftp c-CreER；R26R-tdTomato；Trp53+/+）における、AEC2においてTP53を欠失させるためのタモキシフェンの逐次投与とその後のブレオマイシン傷害（0日目）についての実験的ワークフローを示す概略図である。図9Fは、対照マウスおよびTrp53-ノックアウトマウスにおける、AGER+である、SFTP C、Sftp c-tdtおよびAGER、ならびにCLDN4、Sftp c-tdtおよびLGALS3についてからの総Sftp c-tdt+細胞の割合を示すグラフである。 $****P<0.0001$ 、対応のない両側スチューデントt検定； $n=3$ 匹のマウス。図9Gは、ブレオマイシンで処置した肺におけるCLDN4+、CLDN4+LGALS3+およびLGALS3+細胞（それぞれ、左から右の棒）の割合を示すグラフである。 $**P=0.048$ （CLDN4）および0.0013（LGALS3）、対応のない両側スチューデントt検定； $n=3$ 匹のマウス。図9Hは、ブレオマイシンで処置した対照マウスおよびTrp53-ノックアウトマウスにおける、p21+であるSftp c-tdtおよびSFNからの総Sftp c-tdt+細胞の割合を示すグラフである。 $***P<0.0001$ 、対応のない両側スチューデントt検定； $n=3$ 匹のマウス。

【図9-2】同上。

【図9-3】同上。

【図9-4】同上。

【図9-5】同上。

【0039】

【図10-1】図10A~10Eは、TP53シグナル伝達によるPATSの転写制御を示す。図10Aは、PATS（上の線）およびホメオスタシスAEC2（下の線）における、PATSマーカー遺伝子座におけるH3K4me3ピークの分布を示すグラフである。図10Bは、Sftp c-CreER；R26R-tdTomato；Ctgf-GF

10

20

30

40

50

Pマウスにおけるブレオマイシンで誘導された肺傷害とその後のPATS選別およびChIP分析についての実験的ワークフローを示す概略図である。図10Cは、IGVにおいて示されたTRP53、H3K4me3（活性なプロモーター）およびH3K27ac（活性なエンハンサー）についてのChIP富化である。図10D IGVトラックは、AEC1遺伝子座の公知の標的に対応するゲノム遺伝子座では、TP53結合についての富化を示さない。図10E IGVトラックは、AEC2遺伝子座の公知の標的に対応するゲノム遺伝子座では、TP53結合についての富化を示さない。

【図10-2】同上。

【図10-3】同上。

【0040】

【図11-1】図11A～11Mは、IPFにおけるPATS様状態の富化が、病理学的環境におけるこの状態の持続を示唆することを示す。図11Aは、健康な肺およびIPF肺におけるAECからのscRNA-seqデータを示すUMAPである（n=11, 725細胞）。図11Bは、健康な肺およびIPF肺についてのscRNA-seqデータにおける遺伝子の発現を示すUMAPプロットである。図11Cは、IPF肺組織切片に対するヘマトキシリンおよびエオシン染色を示す。IPF肺における線維化（右側の四角のボックス）領域および非線維化（左側の四角のボックス）領域を示す代表的な画像。スケールバーは、200 μmを示す。図11Dは、健康なヒト肺（左）、ならびにIPFを有する患者由来の肺の非線維化（中央）領域および重症線維化（右）領域における、ACTA2、SFNおよびSFTPCについての免疫染色を示す画像である。図11Eは、健康な肺、ならびにIPF肺の非線維化領域および線維化領域における、SFTPC+、SFTPC+SFN+およびSFN+細胞の割合を示すグラフである；n=3個のヒト試料。図11Fは、IPF肺の線維化領域におけるSFN、CLDN4およびAGERについての免疫染色を示す画像である。図11Gは、IPF肺の非線維化領域および重症線維化領域における、CLDN4+である総SFN+細胞の割合を示すグラフである。*P=0.0218、片側マン・ホイットニー検定；n=3個のヒト試料。図11Hは、重症線維症を有するIPF肺の領域におけるSFN、KRT17およびTP63についての免疫染色を示す画像である（矢じりはSFN+KRT17+TP63+細胞を示す）。図11Iは、IPF肺における重症線維症の領域と比較した、非線維化領域におけるKRT17+またはKRT17+TP63+である総SFN+細胞の割合を示すグラフである。*P=0.0318、片側マン・ホイットニー検定；n=3個のヒト試料。図11Jは、健康な肺およびIPF肺における候補シグナル伝達経路の富化を示すscRNA-seqデータからのUMAPプロットである（n=11, 725細胞）。図11Kは、対照肺およびIPF肺における、示された細胞型／状態におけるIPF関連遺伝子の発現を示すバイオリンプロットである（n=11, 725細胞）。バイオリンプロットは、健康な肺およびIPF肺における細胞分布を示す。図11Lは、CDKN1A+である総SFN+細胞の割合を示すグラフである。*P=0.0318、片側マン・ホイットニー検定；n=3個のヒト試料。図11Mは、γH2AX+である総SFN+細胞の割合を示すグラフである。*P=0.0218、片側マン・ホイットニー検定；n=3個の健康なヒト試料および4個のIPFヒト試料。差し込み図：白のボックス中の領域の単一チャンネル画像。

【図11-2】同上。

【図11-3】同上。

【図11-4】同上。

【図11-5】同上。

【図11-6】同上。

【図11-7】同上。

【図11-8】同上。

【図11-9】同上。

【0041】

【図12】図12は、肺胞幹細胞媒介性上皮再生における新規移行細胞状態の出現および

疾患病理発生におけるその持続を記載する概略図である。肺胞幹細胞は、損傷に応答して複製し、機能的な1型肺胞上皮細胞へと通常は成熟する新規移行細胞状態を生成する。以前には認識されなかった移行状態は、TP53シグナル伝達によって直接的に調節され、DNA損傷に対して脆弱であり、一過的な老化状態を受ける。この状態は、ヒト線維化肺において富化される。

【0042】

【図13】図13Aは、AEC1特異的アブレーションモデルの概略図である。図13Bは、4ラウンドのAEC1アブレーションを受けた細胞についての、3日目、6日目、10日目および60日目に分析した、SFN、ACTA2、LGALS3およびDAPIについての免疫染色を示す画像である。

10

【0043】

【図14-1】図14Aは、反復AEC1アブレーションの概略図である。図14Bは、22日後のH&Eおよびトリクロームを示す画像である。図14Cは、22日後の、アブレートされた組織のLGALS3、ACTA2およびDAPIについての免疫染色を示す画像である。図14Dは、反復AEC1アブレーションによる形態学的変化を示す概略図である。図14Eは、肺切除術で誘導された傷害と組み合わせたAEC1の単回アブレーションにおける幅広い線維症を示す画像である。

【図14-2】同上。

【図14-3】同上。

【0044】

20

【図15】図15は、PATSまたはAEC2とリポ線維芽細胞との共培養の概略図である。右側のデータは、PATSの共培養がリポ線維芽細胞の筋線維芽細胞への変換を誘導するが、AEC2の共培養は誘導しないことを実証している。

【0045】

【図16】図16は、PDGFAがAEC1において優勢に発現されることを示すバイオリンプロットである。さらに、PDGFA転写物は、AEC1へのAEC2分化の間の移行細胞においても観察される。

【0046】

【図17】図17は、対照マウスおよびPDGFRA-CreER/PDGFR^{fl}マウスにおけるaSMA、PDGFRAおよびDAPIについての免疫染色を示す画像である。これらのデータは、線維芽細胞におけるPDGFRAの喪失が、筋線維芽細胞へのそれらの変換を誘導するのに十分であることを実証している。

30

【0047】

【図18】図18は、AEC1アブレーション後およびブレオマイシン傷害後の線維芽細胞においてRunx1が上方調節されることを示すバイオリンプロットである。

【0048】

【図19】図19は、AEC1アブレーションモデル、反復AEC1アブレーションモデルおよびPDGFRA欠失での、Runx1、aSMA、PdgfaおよびDAPIについての免疫染色を示す画像である。これらのデータは、RUNX1発現が、単回および反復AEC1アブレーションマウスモデルにおいて、ならびに線維芽細胞におけるPDGFRAの標的化された喪失において増加することを実証している。

40

【0049】

【図20】図20Aは、RUNX1欠損細胞におけるGFP、aSMA、PdgfaおよびDAPIについての免疫染色を示す画像である。図20Bは、TGF-βを含むRUNX1欠損細胞におけるGFP、aSMA、PdgfaおよびDAPIについての免疫染色を示す画像である。これらのデータは、RUNX1の喪失が筋線維芽細胞への線維芽細胞変換を遮断することを実証している。

【発明を実施するための形態】

【0050】

詳細な説明

50

本開示の原理の理解を促進することを目的として、ここで、好ましい実施形態に対して参照がなされ、特定の言語がそれを記載するために使用される。それにもかかわらず、本開示の範囲の限定はそれによって意図されないことが理解され、本明細書で示される本開示のかかる変更およびさらなる改変は、本開示が関連する分野の当業者に通常想起されることが企図される。

【0051】

定義

【0052】

冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、冠詞の文法的対象のうち1つまたは1つよりも多く(即ち、少なくとも1つ)を指すために本明細書で使用される。例として、「1つの(an)要素」は、少なくとも1つの要素を意味し、1つよりも多くの要素を含み得る。

【0053】

「約」は、所望の結果に影響を与えることなしに所与の値が端点を「僅かに上回り」得るまたは「僅かに下回り」得ることを定めることによって、数的範囲の端点に柔軟性を提供するために使用される。

【0054】

用語「含む(including)」、「含む(comprising)」または「有する(having)」、およびそれらの変形形態の本明細書での使用は、その後に列挙された要素およびそれらの等価物ならびにさらなる要素を包含する意味である。本明細書で使用される場合、「および／または」は、関連する列挙された項目のうち1つまたは複数の、任意のおよび全ての可能な組合せ、ならびに選択的に解釈される場合(「または」)には組合せの欠如を指し、それを包含する。

【0055】

本明細書で使用される場合、移行句「～から本質的になる」(および文法的異形)は、列挙された材料またはステップ、および特許請求された本発明の「基本的かつ新規な特徴(複数可)に実質的に影響を与えないもの」を包含すると解釈すべきである。したがって、用語「～から本質的になる」は、本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」と等価であると解釈すべきではない。

【0056】

さらに、本開示は、一部の実施形態では、本明細書に示された任意の特色または特色の組合せが排除または除外され得ることもまた企図する。説明のために、本明細書が、複合体が構成要素A、BおよびCを含むと述べる場合、A、BもしくはCのいずれか、またはそれらの組合せが、単独でまたは任意の組合せで除外および権利放棄され得ることが、具体的に意図される。

【0057】

本明細書の値の範囲の列挙は、本明細書で他に示されない限り、その範囲内に入る各別々の値に個々に言及する簡略化された方法として機能することのみを意図し、各別々の値は、それが本明細書で個々に列挙されたかのように、本明細書に組み込まれる。例えば、濃度範囲が1%～50%と述べられる場合、例えば、2%～40%、10%～30%または1%～3%などの値が、本明細書で明示的に列挙されている意図である。これらは、具体的に意図されているものの例に過ぎず、列挙された最低値と最高値との間でありかつそれらの値を含む数値の全ての可能な組合せが、本開示で明示的に述べられているとみなすべきである。

【0058】

用語「疾患」は、本明細書で使用される場合、生物の一部に影響を与える構造または機能の任意の異常な状態および／または障害を含むがこれらに限定されない。これは、外部要因、例えば、感染性疾患によって、または内部機能不全、例えば、がん、がん転移などによって引き起こされ得る。

【0059】

用語「有効量」または「治療有効量」は、有益なまたは望ましい生物学的および／または臨床的結果をもたらすのに十分な量を指す。

【0060】

本明細書で使用される場合、「処置」または「処置する」は、患者によって呈されるまたは患者がそれに対して感受性であり得る疾患、障害または病原体感染に応答して行われる臨床的介入を指す。処置の目的は、症状の軽減もしくは予防、進行の緩徐化もしくは停止、または疾患、障害、疾患の原因となる作用物質（例えば、細菌、ウイルス、化学療法剤、放射線）もしくは状態の悪化、および／あるいは疾患、障害または状態の緩解を含む。

【0061】

他に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

【0062】

P A T S

【0063】

幹細胞は、傷害に応答して動的な変化を受けて、失われた細胞を再生させる。しかし、移行状態の正体、およびそれらのトラジェクトリー (trajectory) を駆動する機構は、依然研究中である。肺オルガノイド、複数の in vivo 修復モデル、単一細胞トランスクリプトミクスおよび系列追跡を使用して、本発明者らは、1型細胞への分化を受けている2型肺胞上皮細胞が、最終的な成熟化に向かう途中にプレ1型肺胞移行細胞状態 (P A T S) を獲得することを見出した。本発明者らは、移行細胞が、分化の間に広範な伸展を受けて、DNA損傷に対して脆弱になることをさらに見出した。本発明者らは、P A T Sにある細胞が、TP53、TGFβ、DNA損傷応答シグナル伝達の富化および細胞老化を示すことを決定した。実施例に記載されるように、機能獲得および機能喪失ならびにゲノム結合アッセイは、TP53シグナル伝達によるP A T Sの直接的な転写制御を明らかにした。本発明者らは、ヒト線維化肺におけるP A T S様細胞の蓄積が観察されたこともまた見出しており、これは、線維症における移行状態の持続を示唆している。したがって、本明細書の実施例のセクションに記載される結果は、正常な上皮組織修復における老化に関連する一過的な状態および疾患状態におけるその異常な持続を暗示している。

【0064】

新規肺胞上皮I型細胞（肺細胞I型としても公知）アブレーションモデルを使用して、本発明者らは、肺線維症を発症する最初の遺伝的モデルを樹立した。さらに、本発明者らは、上記新規移行細胞状態 (P A T S) および肺胞線維芽細胞の共培養を使用する ex vivo 肺線維症モデルを開発した。これらの新規 in vivo および ex vivo 線維症モデルは、拡張可能であり、疾患モデリングおよび薬物スクリーニングを可能にする。これらの特色は、進行性肺疾患において見出される場合が多く、ヒト線維化肺においてP A T S様状態にある細胞の富化が観察され得、これは、線維症における移行状態の持続を示す。したがって、本明細書で提供される研究は、正常な上皮組織修復における老化に関連する一過的な状態および疾患状態におけるその異常な持続を暗示している。

【0065】

本明細書で使用される場合、用語「オルガノイド」は、培養物中で成長させた幹細胞に由来する自己組織化された三次元 (3D) 構造または実体を指す。オルガノイド培養物は、臓器の複雑性を再現でき、または、例えば、ある特定の型の細胞のみを産生することによって、臓器の選択された状況を表現できる。あるいは、分化前のある特定の段階では、これらは、幹細胞のみから構成され得る。

【0066】

幹細胞は、それ自身を複製（自己更新）しかつ他の細胞型を生じる能力を有する細胞である。幹細胞が分裂する場合、娘細胞は、幹細胞のままであり得るか、またはより特殊化した型の細胞になり得、または1つもしくは複数の特殊化した細胞型へと分化する他の娘

10

20

30

40

50

を生じ得る。2つの型の哺乳動物幹細胞は、以下である：胚盤胞または着床前胚中に存在する未分化の細胞に由来する多能性胚性幹細胞、および成体の組織または臓器において見出される成体幹細胞。成体幹細胞は、組織または臓器の正常なターンオーバーまたは再生を維持することができ、損傷後に組織または臓器において細胞を修復および補充することができる。

【0067】

本明細書で使用される場合、用語「幹細胞」は、増殖および自己更新が可能であり、1つもしくは複数の他の細胞型を生成する能力を有する前駆細胞を生じることが可能な未分化の細胞、または分化した細胞を生じ得る先駆体を指す。ある特定の場合には、娘細胞または前駆細胞もしくは先駆細胞は、分化した細胞を生じ得る。ある特定の場合には、娘細胞または前駆細胞もしくは先駆細胞は、それ自身で増殖し自己更新することができるだけでなく、1つまたは複数の成熟細胞型へと引き続いて分化する子孫を生じることができる。

10

【0068】

前駆細胞は、自己更新することができるかまたは分化した細胞型へと分化することができるという点で幹細胞と類似した細胞を指すが、前駆細胞は既に、幹細胞よりも特殊化しているかまたは規定されている。

【0069】

本開示の幹細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギおよび非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない任意の動物に由来し得る。

20

【0070】

本開示の方法およびモデルにおいて使用され得る幹細胞は、正常な細胞（例えば、被験体の健康な組織由来の細胞）または異常な細胞（例えば、形質転換された細胞、樹立された細胞、または罹患組織試料に由来する細胞）であり得る。

【0071】

一部の実施形態では、本開示の方法およびモデルにおいて使用される細胞は、肺幹細胞に由来し得る。肺幹細胞の分裂は、肺の構造の更新を促進し得る。肺幹細胞の例は、気管基底細胞、細気管支分泌細胞（クラブ細胞またはクララ細胞としても公知）、クラブバリアント細胞、肺胞上皮前駆（AEP）細胞、クララバリアント細胞、遠位肺前駆体、p63 + Krt5 - 気道細胞、系列陰性上皮前駆体、気管支肺胞上皮幹細胞（BASC）、Sox9 + p63 + 細胞、神経内分泌前駆細胞、遠位気道幹細胞、粘膜下腺管細胞、誘導多能性幹細胞由来肺幹細胞および2型肺胞上皮（本明細書でAEC2またはAT2と呼ばれる）細胞を含むがこれらに限定されない。

30

【0072】

一部の実施形態では、本開示の方法およびモデルにおいて使用される細胞は、皮膚、乳腺、食道、膀胱、前立腺、卵巣および唾液腺を含む臓器由来の基底幹細胞に由来し得る。

【0073】

方法およびモデル

【0074】

したがって、本開示の一態様は、肺胞再生における新たに同定された移行細胞状態（PATS）の同定を提供する。この移行細胞状態は、病理学的線維芽細胞（筋線維芽細胞）への肺線維芽細胞変換を誘導する。さらに、この移行細胞状態は、ヒト線維化（例えば、特発性肺線維症および間質性肺疾患）肺においても見出される。

40

【0075】

本開示の別の態様は、肺線維症、肺気腫（ヒト気腫合併肺線維症症候群（CPFE）において観察されるものと類似）をもたらす肺胞I型細胞（肺細胞I型としても公知）をアブレートするためのモデル系を提供する。

【0076】

一部の実施形態では、モデル系は、動物モデルを含む。一実施形態では、動物は、マウスを含む。一部の実施形態では、動物は、肺を有する任意の動物を含む。

50

【0077】

本開示の別の態様は、肺傷害オルガノイドモデルを生成する方法であって、i) 細胞の共培養物を、前記細胞の培養のために適合させた培養培地中に提供するステップであって、共培養物が、プレ1型肺移行細胞状態 (PATS) 細胞および肺線維芽細胞を含む、ステップ; ii) 培養培地を、1種または複数の作用物質と接触させるステップ; iii) 作用物質と接触されていない対照細胞培養培地と比較した、PATS細胞および／または肺線維芽細胞の少なくとも1つの発現マーカーに対する作用物質の生物学的影響を分析するステップ、を含む、それからなる、あるいはそれから本質的になる方法を提供する。

【0078】

肺線維芽細胞は、肺における肺修復／線維症プロセスに関与する細胞である。肺線維芽細胞は、細胞外マトリックスおよびコラーゲンを合成することができ、動物組織において間質を産生することができる。肺線維芽細胞の例は、ヒト胎児肺線維芽細胞（例えば、HFL1、MRC-5、2BSおよびWI38）、チャニーズハムスター肺線維芽細胞 (V-97)、C57BL/6マウス初代肺線維芽細胞およびCC-2512細胞を含むがこれらに限定されない。

【0079】

一部の実施形態では、肺線維芽細胞は、リポ線維芽細胞である。一部の実施形態では、肺線維芽細胞は、疾患状態特徴を有する。

【0080】

用語「疾患状態特徴」は、本明細書で使用される場合、その細胞が疾患細胞であることを示す、細胞の表現型特性または遺伝子型特性を指す。これらの特徴は、疾患状態を示す細胞におけるある特定のマーカーの発現または形態学的変化であり得る。一部の実施形態では、肺線維芽細胞の疾患状態特徴は、ACTA2を発現するリポ線維芽細胞、筋線維芽細胞の存在、および／または星状形状から帯状形状への細胞変化を含む。

【0081】

一部の実施形態では、PATS細胞は、罹患組織から単離される。

【0082】

用語「罹患組織」は、健康な組織と比較して異常である、被験体（例えば、ヒトまたは動物モデル）の組織を指す。罹患組織は、生きたまたは死んだ被験体の組織から得ることができる。罹患組織の例は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 肺組織、肺線維症肺組織、特発性肺線維症肺組織、肺気腫肺組織、肺がん組織、サルコイドーシス肺組織、間質性肺炎肺組織、敗血症肺組織、ウイルス感染および細菌感染を有する肺組織、急性呼吸促進症候群肺組織、ならびに気管支肺異形成症肺組織を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、PATS細胞は、肺線維症肺組織または特発性肺線維症肺組織から単離される。

【0083】

肺がん細胞は、肺がんを患う被験体から単離され得る。肺がん細胞は、原発性肺腫瘍または二次肺腫瘍（例えば、別の組織において始まり、肺に転移するがん）から単離され得る。肺がん細胞の例は、小細胞癌、混合型小細胞癌、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、パンコースト腫瘍細胞、神経内分泌腫瘍または肺カルチノイド腫瘍細胞を含むがこれらに限定されない小細胞肺がん細胞または非小細胞肺がん細胞を含むがこれらに限定されない。樹立された肺がん細胞系もまた、本開示の方法およびモデルにおいて使用され得る。本開示の方法およびモデルにおいて使用され得る肺がん細胞系は、ATCCウェブサイト上で見出すことができる。肺がん細胞系の例は、EML4-ALK Fusion-A549同質遺伝子細胞系、NCI-H838 [H838]、HCC827、SK-LU-1、HCC2935、HCC4006、NCI-H1819 [H1819]、NCI-H676B [H676B]、Hs 618.T、HBE4-E6/E7 [NBE4-E6/E7]、NCI-H1666 [H1666、H1666]、NCI-H23 [H23]、NCI-H1435 [H1435]、NCI-H1563 [H1563]、703D4、およびN

10

20

30

40

50

C I-H 1 6 8 8 [H 1 6 8 8]、N C I-H 1 8 7 [H 1 8 7]、N C I-H 6 6 1 [H 6 6 1]、N C I-H 4 6 0 [H 4 6 0]、N C I-H 1 2 9 9、N C I-H 1 1 5 5 [H 1 1 5 5]、D M S 1 1 4、N C I-H 6 9 [H 6 9]、D M S 7 9、D M S 5 3、S W 1 2 7 1 [S W 1 2 7 1、S W 1 2 7 1]、S H P-7 7、N C I-H 2 0 9 [H 2 0 9]、N C I-H 1 4 6 [H 1 4 6]、N C I-H 3 4 5 [H 3 4 5]、N C I-H 1 3 4 1 [H 1 3 4 1]、D M S 1 5 3、N C I-H 8 2 [H 8 2]、N C I-H 1 0 4 8 [H 1 0 4 8]、N C I-H 1 2 8 [H 1 2 8]、N C I-H 4 4 6 [H 4 4 6]、N C I-H 1 2 8 [H 1 2 8]、N C I-H 5 1 0 A [H 5 1 0 A、N C I-H 5 1 0]、H 6 9 A R. H L F-a、H s 9 1 3 T、G C T [巨細胞腫瘍]、S W 9 0 0 [S W-9 0 0、S W 9 0 0]、L L / 2 (L L C 1)、H B E 1 3 5-E 6 E 7、T e r a-2、N C I-H 2 9 2 [H 2 9 2]、s N F 0 2. 2、N C I-H 1 7 0 3 [H 1 7 0 3]、N C I-H 2 1 7 2 [H 2 1 7 2]、N C I-H 2 4 4 4 [H 2 4 4 4]、N C I-H 2 1 1 0 [H 2 1 1 0]、N C I-H 2 1 3 5 [H 2 1 3 5]、N C I-H 2 3 4 7 [H 2 3 4 7]、N C I-H 8 1 0 [H 8 1 0]、N C I-H 1 9 9 3 [H 1 9 9 3]、および N C I-H 1 7 9 2 [H 1 7 9 2] を含むがこれらに限定されない。

【0084】

一部の実施形態では、P A T S 細胞は、健康な組織（例えば、正常な肺組織）から単離される。

【0085】

用語「組織」は、本明細書で使用される場合、組織が得られる被験体の構造材料を形成する、細胞間物質と一緒にあった、特定の種類のものであり得る細胞の凝集体を指す。本開示の一部の実施形態では、P A T S 細胞は、組織から単離および精製され得る。

【0086】

本開示の一部の実施形態では、P A T S 細胞は、肺上皮細胞（例えば、A E C 2 または A E C 1）を *in vivo* または *in vitro* で傷害を引き起こす作用物質に曝露させることによって生成され得る。

【0087】

用語「傷害を引き起こす作用物質」は、本明細書で使用される場合、健康な細胞を罹患細胞状態に変換または移行させることが可能な作用物質を指す。用語「傷害を引き起こす作用物質」は、本明細書で使用される場合、疾患状態細胞が生じるように正常な細胞をアプレートすることが可能な作用物質もまた指す。

【0088】

傷害を引き起こす作用物質は、例えば、化学療法剤（例えば、ブレオマイシン、タモキシフェン、アクチノマイシン-D、マイトマイシン、タキサンおよびゲムシタビン）、外毒素（例えば、ジフテリア毒素（D T））、ウイルス、細菌、真菌、アスベスト、化学的毒性作用物質または照射であり得る。

【0089】

一部の実施形態では、傷害を引き起こす作用物質は、ヒトまたは肺を有する任意の動物の肺組織に感染することが可能な病原体（例えば、細菌、ウイルスまたは真菌）であり得る。

【0090】

肺に感染することができる細菌は、*Bordetella pertussis*、*Streptococcus pneumonia*、*Haemophilus influenza*、*Staphylococcus aureus*、*Moraxella catarrhalis*、*Streptococcus pyogenes*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Neisseria meningitidis*、*Klebsiella pneumoniae* を含むがこれらに限定されない。

【0091】

肺に感染することができるウイルスは、229E（アルファコロナウイルス）、NL63（アルファコロナウイルス）、OC43（ベータコロナウイルス）、HKU1（ベータ

10

20

30

40

50

コロナウイルス)、MERS-CoV(中東呼吸器症候群、即ちMERSを引き起こすベータコロナウイルス)、SARS-CoV(重症急性呼吸器症候群、即ちSARSを引き起こすベータコロナウイルス)もしくはSARS-CoV-2(コロナウイルス疾患2019、即ちCOVID-19を引き起こす新型コロナウイルス)、インフルエンザAウイルス(例えば、H1N1、H7N9、低病原性鳥インフルエンザ、高病原性鳥インフルエンザまたはH5N1)、インフルエンザBウイルス、呼吸器多核体ウイルス(RSV)、またはエンテロウイルス(例えば、エンテロウイルス71)を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、ウイルスは、SARS-CoV-2である。

【0092】

肺に感染することができる真菌は、Aspergilliosisを含むがこれらに限定されない。

【0093】

一部の実施形態では、本開示の方法およびモデルにおいて使用される培養培地および／または被験体(例えば、マウス)は、血小板由来増殖因子受容体(例えば、血小板由来増殖因子受容体-A、血小板由来増殖因子受容体-Bまたは血小板由来増殖因子受容体-AB)を含む。

【0094】

一部の実施形態では、本開示の方法およびモデルにおいて使用される培養培地および／または被験体(例えば、マウス)は、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)リガンドを含む。一部の実施形態では、PDGFRリガンドは、血小板由来増殖因子(PDG F)である。PDG Fは、細胞の成長および分裂を調節することができる増殖因子である。一部の実施形態では、PDGFRリガンドは、血小板由来増殖因子サブユニットA(PDG F-A)、血小板由来増殖因子サブユニットB(PDG F-B)、血小板由来増殖因子サブユニットC(PDG F-C)、血小板由来増殖因子サブユニットD(PDG F-D)および／または血小板由来増殖因子サブユニットAB(PDG F-AB)である。PDG Fファミリーに属するタンパク質をコードするヒト遺伝子は、FIGF、PDGFA、PDGFB、PDGFC、PDGFd、PGF、VEGF、VEGF41、VEGFBおよびVEGFCを含む。

【0095】

一部の実施形態では、本開示の方法およびモデルは、PDG Fシグナル伝達ペプチド、PDG F受容体、PDG Fアゴニスト、PDGFRアゴニスト、PDG Fアンタゴニスト、PDGFRアンタゴニスト、またはPDG F-PDGFRシグナル伝達経路をモジュレートすることが可能な任意の作用物質の使用を含む。他の実施形態では、本開示の方法およびモデルは、PDGFRリガンドおよび／またはPDGFR受容体の薬理的遮断の使用を含む。

【0096】

PDG F-PDGFRシグナル伝達経路のモジュレーターは、基質、阻害剤、活性化因子、神経伝達物質、アゴニスト、アンタゴニスト、インバースアゴニスト、インバースアンタゴニスト、部分アゴニストおよび部分アンタゴニストを含む。PDG F-PDGFRシグナル伝達経路のモジュレーターは、PDG Fアイソフォームアンタゴニスト、PDGFR活性化遮断剤、細胞におけるPDG Fおよび／またはPDGFRの発現を増加または減少させることが可能な作用物質、化学化合物、例えば、内因性代謝物、非内因性代謝物、合成化学化合物、ポリペプチド、アミノ酸残基、核酸、siRNA、ならびに抗体(例えば、中和抗体)を含むがこれらに限定されない。

【0097】

PDG F-PDGFRシグナル伝達経路のモジュレーターの例は、フィブロネクチンペプチド、Ras-GAP、チロシンホスファターゼ(例えば、PTP1B、TC-PTP、PTPRJ/DEP-1)、SHP-2、インテグリン、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質、ヒアルロン酸受容体CD44、ソラフェニブ、ニロチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、AG1295およびAG1296、セレコキシブ、エトリコキシブお

10

20

30

40

50

よびDFU、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 阻害剤 (コキシブ)、パゾパニブ HCl、パゾパニブ、ラドチニブ (radotinib)、AZD2932、トセラニブリン酸塩、TAK-593、クレノラニブ、トセラニブ、SU14813、SU14813 マレイン酸塩、オランチニブ (orantinib)、SU 4312、スニチニブリンゴ酸塩、リニファニブ、KG 5、N-デセチルスニチニブ、CP-673451、VEGFR2 キナーゼ阻害剤 II、VEGFR2 キナーゼ阻害剤 II、AC710 メシル酸塩、AC710、DMPQ 二塩酸塩、リプレチニブ、レンバチニブ、ニンテダニブ、レゴラフェニブ、スニチニブ、ボナチニブ (ponatinib)、スニチニブ (sunitinib) リンゴ酸塩、TG 100572、イロラセルチブ (ilorasertib)、イマチニブ、アキシチニブ、イマチニブメシル酸塩、パゾパニブ、クレノラニブ、SU 5402、アバプリチニブ、リプレチニブ、セジラニブ、CP 673451、ドビチニブ、TAK 593、トセラニブ、PDGFR α キナーゼ阻害剤-1、SU16f、PDGFR α を標的化するアゴニスト性ヒトモノクローナル自己抗体、および PDGFR α を標的化する非アゴニスト性ヒトモノクローナル自己抗体、ならびにまたはそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

10

【0098】

本明細書で使用される場合、用語「アゴニスト」は、受容体 (例えば、PDGFR) またはタンパク質 (例えば、PDGF) に結合し、その受容体またはタンパク質を活性化して生物学的応答を生じさせるモジュレーターを指す。

【0099】

本明細書で使用される場合、用語「アンタゴニスト」は、受容体またはタンパク質に結合し、それを活性化するのではなく遮断することによって、生物学的応答を遮断する、妨げるまたは弱める、モジュレーターまたはリガンドを指す。

20

【0100】

本明細書で使用される場合、用語「インバースアゴニスト」は、アゴニストと同じ受容体に結合するが、そのアゴニストと反対の生物学的応答を誘導する、モジュレーターまたはリガンドを指す。

【0101】

本明細書で使用される場合、用語「部分アンタゴニスト」は、受容体に結合できるがその受容体の効果を完全には遮断せず、むしろ、受容体の最大潜在力を減少させる、モジュレーターまたはリガンドを指す。

30

【0102】

一部の実施形態では、方法およびモデルにおいて使用される培養培地は、細胞における PDGFR (例えば、PDGFR-A、PDGFR-B または PDGFR-AB) 発現を維持することが可能な作用物質を含む。一部の実施形態では、細胞における PDGFR-A 発現を維持することが可能な作用物質は、RO 5-3335 または AI-10-49 である。

【0103】

一部の実施形態では、細胞における PDGFR α 発現を維持することが可能な作用物質は、RUNX (例えば、RUNX1、RUNX2 または RUNX3) またはコア結合因子 (CBF) 関連ファミリーのタンパク質 (例えば、CBF- β) をモジュレートすることができる任意の分子である。

40

【0104】

RUNX または CBF 関連タンパク質を調節する分子の例は、RUNX および／または CBF の基質、阻害剤、活性化因子、神経伝達物質、アゴニスト、アンタゴニスト、インバースアゴニスト、インバースアンタゴニスト、部分アゴニストおよび部分アンタゴニストであり得る。

【0105】

RUNX および／または CBF をモジュレートする分子は、RUNX と CBF との間のタンパク質-タンパク質相互作用を妨害する分子であり得る。これらのモジュレーターは

50

、RUNX（例えば、RUNX1、RUNX2またはRUNX3）の阻害剤またはCBF- β の阻害剤であり得る。RUNXまたはCBFモジュレーターの例は、Ro5-3335、AI-10-49、CADD522、ムラミルジペプチド、レーケブラキトール（quebrachitol）、レーアスコルビン酸2-リン酸、アスコルビン酸2-リン酸マグネシウム、2-ピリジルベンズイミダゾールAI-4-57、RUNX1/MTG8融合タンパク質、ならびにRUNX1、RUNX2、RUNX3および／もしくはCBF β に対する中和抗体、ならびに／またはそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

【0106】

「作用物質」は、本明細書で使用される場合、小分子、タンパク質、ペプチド、遺伝子、化合物、または他の薬学的に活性な成分を指す。一部の実施形態では、作用物質は、疾患（例えば、肺線維症）の処置、予防または緩和のために使用され得る。

【0107】

PATS細胞発現マーカーは、PATS細胞またはPATS様細胞上で発現される遺伝子転写物を指す。一部の実施形態では、PATSマーカーは、PATS細胞状態に独自であり、関連する細胞状態（例えば、AEC2またはAEC1）上では典型的には発現されない。PATS細胞マーカーは、CLDN4、KRT19、SFN、LGALS3、SOX4、S100A2、PTGS2、KRT17、KRT8、CALS1、MMP7、PRSS2、IGFBP7、COL1A1、MDK、TAGLN、GDF15、TM4SF1TP63および／またはCTSEを含み得る。

【0108】

一部の実施形態では、PATSマーカーは、共発現される2つまたはそれよりも多くのマーカーのマーカーシグネチャーを含み得る。一部の実施形態では、PATSマーカーシグネチャーは、CLDN4、LGALS3およびLGALS3である。一部の実施形態では、PATSマーカーシグネチャーは、CLDN4、KRT19およびSFNである。一部の実施形態では、PATSマーカーシグネチャーは、CALD1、PRSS2、MMP7およびS100A2である。

【0109】

一部の実施形態では、PATSマーカーシグネチャーは、TP63、KRT17およびCOL1A1である。

【0110】

一部の実施形態では、PATSマーカーシグネチャーは、AREG、TGFB1、TGFB2およびTIMP1である。

【0111】

肺胞線維芽細胞発現マーカーは、肺胞線維芽細胞上で発現される遺伝子転写物を指す。肺胞線維芽細胞は、Pdgraを含み得る。

【0112】

本開示の別の態様は、肺線維症のためのex vivoモデルを生成する方法であって、i) in vivoでアブレーションを受けた肺胞細胞（例えば、AEC1細胞）の培養物を、前記細胞の培養のために適合させた培養培地中に提供するステップ；ii) 培養培地を、1種または複数の作用物質と接触させるステップ；iii) 作用物質と接触されていない対照細胞培養培地と比較した、肺胞細胞（例えば、AEC1細胞）の少なくとも1つの発現マーカーに対する作用物質の生物学的影響を分析するステップ、を含む方法を提供する。

【0113】

用語「アブレーション」は、本明細書で使用される場合、組織もしくは細胞、またはそれらの機能の除去または破壊を指す。アブレーションは、手術、ホルモン、薬物、高周波、熱、または組織もしくは細胞の破壊を引き起こす他の方法によって引き起こされ得る。

【0114】

一部の実施形態では、肺胞細胞（例えば、AEC1細胞）は、少なくとも1ラウンドの

アブレーション（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10ラウンドのアブレーション）を受けている。一部の実施形態では、肺胞細胞（例えば、AEC1細胞）は、1ラウンドと5ラウンドとの間のアブレーションを受けている。一部の実施形態では、細胞は、単独のまたは本明細書に記載される他の傷害モデルと組み合わせたアブレーションを受けている。

【0115】

一部の実施形態では、肺胞細胞（例えば、AEC1細胞）は、反復アブレーションを受けている。一部の実施形態では、反復アブレーションは、約3日間～約2週間の過程にわたって行われ得る。一部の実施形態では、反復アブレーションは、約3日間～約1年間の過程にわたって行われ得る。

10

【0116】

一部の実施形態では、肺胞細胞（例えば、AEC1細胞）は、傷害を引き起こす作用物質に曝露されることによるアブレーションを受けている。一部の実施形態では、傷害を引き起こす作用物質は、プレオマイシン、ジフテリア毒素（DT）、タモキシフェン、ウイルス、細菌または真菌である。

【0117】

一部の実施形態では、アブレートされた細胞は、aSMAおよび／またはACTA2を発現する。一部の実施形態では、アブレートされた細胞は、線維筋細胞の特徴を示す。

【0118】

本開示のさらに別の態様は、プレ1型肺胞移行細胞状態（PATS）細胞を同定する方法であって、i）肺細胞を得るステップ；およびii）細胞を、1つまたは複数のマーカーについてスクリーニングするステップ、を含み、1つまたは複数のマーカーの存在が、PATS細胞の存在を示す、方法を提供する。

20

【0119】

一部の実施形態では、肺細胞は、気管基底細胞、細気管支分泌細胞（クラブ細胞またはクララ細胞としても公知）、クラブバリエーション細胞、肺胞上皮前駆（AEP）細胞、クララバリエーション細胞、遠位肺前駆体、p63+Krt5-気道細胞、系列陰性上皮前駆体、気管支肺胞上皮幹細胞（BASC）、Sox9+p63+細胞、神経内分泌前駆細胞、遠位気道幹細胞、粘膜下腺管細胞、誘導多能性幹細胞由来肺幹細胞および2型肺胞上皮（AEC2）細胞からなる群より選択され得る。

30

【0120】

一部の実施形態では、肺細胞は、AEC2細胞、AEC1細胞または肺胞マクロファージからなる群より選択され得る。

【0121】

一部の実施形態では、肺細胞は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺線維症、特発性肺線維症、肺気腫、肺がん、サルコイドーシス、間質性肺炎、敗血症、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染、急性呼吸促迫症候群および／または気管支肺異形成症を患う患者の肺から得られる。

【0122】

一部の実施形態では、プレ1型肺胞移行細胞状態（PATS）細胞を同定する方法は、肺胞細胞を傷害を引き起こす作用物質と接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、作用物質は、プレオマイシン、ジフテリア毒素（DT）、タモキシフェン、ウイルス、細菌または真菌である。

40

【0123】

本開示の別の態様は、拡張可能であり、疾患モデリングおよび薬物スクリーニングを可能にする、上記新規移行細胞状態（PATS）および肺胞線維芽細胞の共培養を使用するex vivo肺線維症モデルを提供する。

【0124】

本開示の別の態様は、肺および他の組織において線維症を生成するin vivoモデルを生成する方法を提供する。本開示のin vitroおよびex vivoモデルと

50

同様、*in vivo*モデルは、例えば、治療剤について疾患を処置または予防する能力を試験するために使用され得る。本開示の*in vivo*モデルは、種々の動物被験体（例えば、マウス、ラット、ウサギ、サルもしくはブタ、または線維症をモデリングすることが可能な任意の動物）を利用し得る。

【0125】

*in vivo*モデルは、作用物質の効果を調査するためおよび疾患（例えば、肺線維症）の生物学的プロセスを研究するための、生きた動物全体の使用を指す。

【0126】

本開示の別の態様は、肺および他の組織において線維症を生成する*in vivo*モデルを生成する方法であって、i) 被験体においてPDGFリガンドおよび／もしくはPDGF受容体（PDGFR）シグナル伝達の遺伝的喪失を導入するステップ；ならびに／あるいはii) PDGF-PDGFシグナル伝達をモジュレート（例えば、遮断、増強、増加または減少）することができる作用物質を被験体に投与するステップ；ならびにiii) 被験体由来の細胞を分析して、正常な対照被験体と比較した、PDGFリガンドおよび／もしくはPDGF受容体（PDGFR）シグナル伝達の遺伝的喪失の生物学的影響ならびに／またはPDGF-PDGFシグナル伝達をモジュレート（例えば、遮断、増強、増加または減少）することができる作用物質の生物学的影響を決定するステップ、を含む方法を提供する。

【0127】

一部の実施形態では、PDGF-PDGFシグナル伝達を遮断することができる作用物質は、PDGFR阻害剤、PDGFリガンドおよび／またはPDGF受容体（PDGFR）に対する中和抗体を含む。

【0128】

本開示の別の態様は、肺および他の組織において線維症を生成する*in vivo*モデルを生成する方法であって、i) 被験体においてRUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβの遺伝的喪失を導入するステップ；ならびに／あるいはii) RUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβをモジュレート（例えば、阻害）することができる作用物質を被験体に投与するステップ；ならびにiii) 被験体由来の細胞を分析して、正常な対照被験体と比較した、RUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβの遺伝的喪失の生物学的影響および／またはRUNX1、RUNX2、RUNX3もしくはCBFβをモジュレートすることの生物学的影響を決定するステップ、を含む方法を提供する。

【0129】

一部の実施形態では、RUNX1モジュレーター、RUNX2モジュレーター、RUNX3モジュレーターまたはCBFβモジュレーターは、RUNX1、RUNX2、RUNX3および／またはCBFβに対する中和抗体である小分子阻害剤である。

【0130】

一部の実施形態では、本開示のモデルは、肺線維症、心線維症、肝臓線維症、腎臓線維症、腸線維症、皮膚線維症および／または骨髄線維症の線維症モデルである。一部の実施形態では、本開示のモデルは、身体中の他の組織、例えば、心、肝臓、腎臓、腸、皮膚および／または骨髄組織に対する肺線維症の影響をモデリングすることができる肺線維症モデルである。

【0131】

一部の実施形態では、本開示のモデルの細胞は、肺、心臓、腎臓、肝臓、腸、皮膚または骨髄である。

【0132】

以下の実施例は、限定ではなく例示として提供される。

【実施例】

【0133】

実施例

10

20

30

40

50

材料および方法

【0134】

マウス。

【0135】

8～16週齢の間の雄性および雌性の両方のマウスを実験に使用した。全てのマウスは、他に示されない限り、C57BL/6であった。以下のマウスを実験に使用した：Sftptcm1 (cre/ERT2) Blh (Sftpc-CreER)、Krt19tm1 (cre/ERT) Ggu/J (Krt19-CreER)、Rosa26R-CAG-
ls-ltdTomato (Sftpc-CreERと交雑させた)、B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sortm14 (CAG-tldTomato) Hze/J (R26R-
tldTomato) (Krt19-CreERと交雑させた)、Tg (SFTPC-GFP) #Heat (Sftpc-GFP) 51、B6.Cg-Ager tm2.1 (cre/ERT2) Blh/J (Ager-CreER)、B6-Gt (ROSA) 26Sortm1 (HBEGF) Awai/J (R26R-DTR)、Mki67tm1.1Cle/J (Mki67-RFP)、Tg (Ctgf-EGFP) FX156Gs at (Ctgf-GFP) 15およびTP53fl/fl (混合バックグラウンド)。Sftpc-CreER; R26R-tldTomatoマウスを用いた系列追跡のために、3～5用
量の、体重20g当たり2mgのタモキシフェン (Sigma-Aldrich) を、経口
胃管栄養法または腹腔内注射を介して与えた。Krt19-CreER; R26R-tldTomatoを使用する系列追跡のために、1用
量の、体重20g当たり1mgのタモキシフェンを、ブレオマイシン傷害またはPBS投与の7日後に、腹腔内注射を介して与
えた。動物実験は、US National Institutes of Health
ガイドラインに従って、Duke University Institutional Animal Care and Use Committeeが承認した。

【0136】

ブレオマイシン傷害。

【0137】

ブレオマイシンで誘導された肺傷害のために、2.5U/kgのブレオマイシンを、タモキシフェン注射の2週間後に鼻腔内投与し、マウスを毎日モニタリングした。PBSを投与したマウスは、対照として機能した。マウスを、ブレオマイシン傷害後の異なる時点において 殺した。

【0138】

DTの投与。

【0139】

DT投与の2週間前に、Ager-CreER; R26R-DTRマウスは、腹腔内注射を介してタモキシフェンを受けた。1用量の3μgのDT (Millipore、322326) を腹腔内注射を介して投与し、マウスを、組織の収集および分析のために、6日後に 殺した。

【0140】

マウス肺の解離およびFACS。

【0141】

肺の解離およびFACSを、以前に記載されたように実施した11。簡潔に述べると、肺を、DMEM/F12培地中の酵素溶液 (dispase、5U/ml、Corning、354235; DNase I、0.33U/ml; およびI型コラゲナーゼ、450U/ml、Gibco、17100-017) 1mlで気管内膨張させた。分離した肺葉をさいの目に切り、回転させながら37℃で25分間、3mlの酵素溶液と共にインキュベートした。反応を、10%胎仔ウシ血清 (FBS) を含む等量の培地でクエンチし、100μm濾過器を介して濾過した。細胞ペレットを、赤血球溶解緩衝液 (155mMのNH₄Cl、12mMのNaHCO₃ および0.1mMのEDTA) 中に再懸濁し、2分間インキュベートし、次いで、40μm濾過器を介して濾過した。細胞ペレットを、DM

EM/F12+2%BSA中に再懸濁し、以前に記載された56ように、以下の抗体を用いて染色した：EpCAM (eBioscience、G8.8)、PDGFR α (BioLegend、APA5) およびLysoTracker (Thermo Fisher、L7526)。選別を、BD FACS Vantage SE、SONY SH800SまたはBeckman Coulter MoFlo Astrios EQシステムを使用して実施した。

【0142】

肺胞オルガノイド培養。

【0143】

肺胞オルガノイド培養を、以前に記載されたように実施した (Barkauskas et al., 2013, J. Clin. Invest. 123:1118-1123)。簡潔に述べると、Tmxで処置したSftpc-GFPまたはSftpc-CreER; R26R-tdTomatoマウス由来の系列標識されたAEC2 ($1 \sim 3 \times 10^3$) を、FACSによって選別し、PDGFR α + (5×10^4) 線維芽細胞を、MTEC/Plus中に再懸濁し、等量の増殖因子低減Matrigel (Corning、354230) と混合した。培地を1日おきに交換した。

【0144】

Nutlin-3a 処置。

【0145】

in vivo 研究のために、Sftpc-CreER; R26R-tdTomatoマウスに、1用量のタモキシフェンを注射し、2週間休養させ、その後、プレオマイシンまたはPBSを投与した。Nutlin-3a (Selleckchem、S8059) またはDMSO (対照) を、10日間連日20mg/kg/dの濃度で、傷害の8日後に腹腔内注射によって投与し、試料を、プレオマイシン投与の20日後に収集した。ex vivo 研究のために、肺胞オルガノイドを、7日間培養し、その後、Nutlin-3a (2 μ M) で8日間処置し、その後回収した。

【0146】

液滴ベースのscRNA-seq。

【0147】

Matrigel中に包埋したオルガノイドを、Accutase溶液 (Sigma、A6964) と共に37°Cで20分間インキュベートし、その後、0.25%のトリプシン-EDTAと共に37°Cで10分間インキュベートした。トリプシンを、10%のFBSを追加補充したDMEM/F12 Ham培地を使用して不活性化し、次いで、細胞を、0.01%のBSAを追加補充したPBS中に再懸濁した。40 μ m濾過器を介した濾過の後、細胞を、3,000 μ l/hのmRNA捕捉ビーズおよび13,000 μ l/hの液滴生成オイルと共に、100細胞 μ l/hの濃度で、微少流体チャネルを介して3,000 μ l/hで流した。事前増幅ステップ (95°Cで3分間を1サイクル; 98°Cで15秒間、65°Cで30秒間および68°Cで4分間を15~17サイクル; および72°Cで10分間を1サイクル) のためのDNAポリメラーゼを、Terra PCR directポリメラーゼ (Takara、639271) によって置き換えた。他のプロセスを、元の液滴ベースのscRNA-seqプロトコールに記載されるように実施した。ライブラリーを、150bpペアードエンド配列決定を用いてHiSeq Xシステムを使用して配列決定した。

【0148】

scRNA-seqの計算的分析。

【0149】

肺胞オルガノイドのscRNA-seqの分析を、dropSeqPipe v0.3 (<https://hoozm.github.io/dropSeqPipe>) を使用してFASTQファイルを処理することによって実施し、アノテーションバージョンを用いてGRCm38ゲノム参照上にマッピングした91。次いで、独自分子識別子 (UMI

10

20

30

40

50

) 計数を、Rパッケージ `Seurat v3.1.1` を使用してさらに分析した (参考文献58)。LPSで処置したマウス肺のUMI計数行列 (`GSE130148`) 14を `Gene Expression Omnibus (GEO)` から得た。UMI計数を、`ScTransform` を使用して正規化した。目的のクラスターについての細胞バーコードを抽出し、`velocity.py v0.17.15` における `velocity` 実行命令 (参考文献18) のため、ならびにRパッケージ `SeuratWrappers v0.1.0` (<https://github.com/satijalab/seurat-wrappers>) と組み合わせて `velocity.R v0.6` を使用してRNA速度プロットを生成するために利用した。傾き計算スムージング (`slope calculation smoothing`) における25個の最近傍のものを、`RunVelocity` 命令に使用した。二重項 (`duplet`) を排除した後、特定の細胞クラスターを、UMAPプロットにおける、`Sftpc`、`Sftpa1`、`Sftpa2`、`Sftpb`、`Lamp3`、`Abca3`、`Hopx`、`Ager`、`Akap5`、`Epcam`、`Cdh1`、`Krt7`、`Krt8`、`Krt18`、`Krt19`、`Scgb1a1` および `Scgb3a1` についての富化、ならびに `Vim`、`Acta2`、`Pdgfra` および `Pdgfrb` の陰性発現に基づいて単離した。対照肺および特発性肺線維症 (IPF) 肺についてのRdsファイルを、`GEO` から得た (`GSE135893`) 29。`AEC2`、`AEC1`、移行 `AEC2` および `KRT5-KRT17` + 細胞の細胞クラスターを抽出し、分析した。`Seurat` において `FindAllMarkers` 命令を使用して得た各クラスターについてのマーカーを、`Enrichr` を介して特異的シグナル伝達経路および遺伝子オントロジーを同定するために利用した59。`Z-score` を、`Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)` において、合わされたスコアに基づいて計算して、異なる細胞クラスターにわたってシグナル伝達の富化およびオントロジーを比較した。結果を、Rパッケージ `heatmap v1.0.12` を使用して生成したヒートマップ形式で示した。`Seurat` オブジェクト中の調整されたデータを抽出し、各経路中の遺伝子メンバーの調整されたスコアの平均値を計算し、シグナル伝達経路の富化としてUMAPで示した。利用した経路の遺伝子メンバーリストを、`KEGG pathways 60` および `AmiGO 61` から得た。ウィルコクソンの順位和検定を用いて `Seurat` において `FindMarkers` 命令を使用して抽出した各遺伝子についての $\log_2$ 倍数変化およびP値を、Rパッケージ `EnhancedVolcano v1.3.1` (<https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>) を使用してボルケーノプロットで示して、`Ctgf` + 細胞についての特異的マーカーを示した。

【0150】

`Mint-ChIP-seq`。

【0151】

ヒストンマークのChIP分析のために、`PATS (CD31-CD45-CD140a-CD326+Ctgf-GFP+)` 細胞を、ブレオマイシンで誘導された肺傷害後の12日目に、`Ctgf-GFP` マウスから選別した。`AEC2 (CD31-CD45-CD326+LysoTracker+Mki67-RFP-細胞)` を、`Mki67-RFP` ホメオスタシスマウスから選別した。`Mki67` マウスを使用して、`RFP+細胞` をネガティブ選択として (`negatively`) ゲートで除くことによって、細胞分裂中のあらゆる細胞を除外した。`Mint-ChIP` プロトコルは、以前に記載された通りであった62。`TP53 ChIP` 配列決定 (`ChIP-seq`) のために、`PATS (CD31-CD45-Sftpc-tdTomato+Ctgf-GFP+細胞)` を、ブレオマイシン投与後の8日目に、`Sftpc-CreER; R26R-tdTomato; Ctgf-GFP` マウスから選別した。この場合、本発明者らは、以前に記載された改変型 `Mint-ChIP (バージョン3)` プロトコル (<https://tinyurl.com/udqksct>) を使用した。細胞溶解の後、クロマチンを、300単位の `MNase (New England Biolabs, M0247S)` で37℃で10分

間消化した。T7アダプターライゲーションを2時間実施し、次いで、試料を分けて、ヒストン-改変ChIP-seqのために、抗体1つ当たりおよそ7,000細胞にした。TP53について、本発明者らは、各複製試料のためにおよそ40,000細胞を使用した。試料を、ヒストンH3抗体(H3;1 μ l;Active Motif、39763)、ヒストンH3リシン36トリメチル化抗体(H3K36me3;1 μ l;Active Motif、61101)、ヒストンH3リシン4トリメチル化抗体(H3K4me3;1 μ l;Abcam、ab8580)、ヒストンH3リシン27アセチル化抗体(H3K27ac;1 μ l;Active Motif、39133)またはTP53抗体(5 μ l;Cell Signaling Technology、2524T)と共に4°Cで一晩インキュベートした。DNAを精製し、その後、37°Cで3時間、T7-RNAポリメラーゼ媒介性のin vitro転写を行った。逆転写を、元のプロトコールに記載されたように実施し、その後、Terra direct PCRポリメラーゼ(Takara、639271)を使用してライブラリーを調製した。2つの実験的複製を、各細胞集団について実施した。ライブラリーを、HiSeq XまたはNovaSeq 6000システムを使用して配列決定した(試料1つ当たり少なくとも5 $\times$ 10⁶読み取りの150bpペアードエンド)。

10

【0152】

Mint-ChIPの計算的分析。

【0153】

FASTQファイルを、Bcl2fastqを使用して生成した。Mint-ChIP FASTQファイルについてのさらなる逆多重化を、Jellyfishを使用して実施した63。低品質読み取りを、trimmomatic v0.38を使用して、FASTQファイルからトリミングして除いた。読み取りを、BWAを使用してmm10ゲノム参照上にマッピングした65。パッケージを、MintChIPと呼ばれるパイプライン(<https://github.com/jianhong/MintChIP>)を介して実行した。HOMER66を使用して、bedGraphファイルを生成し、Integrative Genomics Viewer(IGV)においてピークを可視化した。H3K4me3についてのピークコールを、H3による正規化と共に、HOMERの関数getDifferentialPeaksReplicates.pl -region -size 1000 -mindist 2000 -C 0 -L 50を使用して実施した。モチーフ分析を、HOMERのfindMotifsGenome.pl関数を使用して実施した。H3K4me3についてコールされたピークのチャートを、deepToolsを使用して生成した68。異なる細胞集団由来の各ゲノム遺伝子座についてコールされたピークを、Affinity Designerで作成した。

20

30

【0154】

ヒト肺組織。

【0155】

既存の慢性肺疾患および外植された線維化ヒト肺を有さないドナーから切除された移植品質未満のヒト肺組織を、機関の手順(Duke University Pro00082379-「Human Lung Stem Cells」;45CFR164.514に記載されるPrivacy Ruleを満たす、45CFR46.102(f)、21CFR56.102(e)および21CFR812.3(p)に記載される研究は免除する)に従って、BioRepository and Precision Pathology Center at Duke Universityを介して入手した。scRNA-seqに使用したIPF組織の試料は、2か所の肺移植センター(VUMCおよびNTI)において肺移植の時点で取り出された肺から得た。非線維化対照組織試料は、臓器提供を拒否された肺から得た。IPF肺について、診断を、AT/ERSコンセンサス基準に従って決定した。全ての研究は、現地の施設内審査委員会(IRB;Vanderbilt IRB番号060165および171657、ならびにWestern IRB番号20181836)が承認した。IPFの診断を、外科病

40

50

理学チームが評価した。検体を、膨張および4%のパラホルムアルデヒド中での4℃で一晩の浸漬前に、PBS中で完全に洗浄した。検体を、血液の出現が最小限になるまでPBSで引き続いて洗浄し、その後、30%のスクロース中で4℃でインキュベートした。次いで、試料を、1:1の比でOCTコンパウンドと共に4℃で1時間インキュベートし、その後、OCT中に包埋した。7~9 μmの厚さを有する切片を、組織学的分析に使用した。

【0156】

免疫染色。

【0157】

肺および肺泡オルガノイドを、以前に記載されたように調製した。簡潔に述べると、組織を、4%のパラホルムアルデヒドで、4℃で4時間（肺について）または室温で30分間（オルガノイドについて）固定し、次いで、OCTコンパウンドまたはパラフィン中に包埋した。切片化した試料（10 μm）を、10 mMクエン酸ナトリウムを使用する抗原賦活化のための95℃で10~15分間のインキュベーション後に染色のために利用した。一次抗体は、以下の通りであった：プロサーファクタントタンパク質C（Millipore、ab3786、1:500）、AGER（R&D Systems、MAB1179、1:250）、KRT8（DSHB、TROMA-I、1:50）、KRT17（NSJ、V2176、1:250）、KRT19（DSHB、TROMA-III、1:50）、tdTomato（ORIGENE、AB8181-200、1:500）、CLDN4（Invitrogen、36-4800、1:200；Proteintech、16165-1-AR、1:500）、GFP（Novus Biologicals、NB100-1770、1:500）、LGALS3（Cedarlane、CL8942AP、1:500）、SOX4（Invitrogen、MA5-31424、1:250）、SFN（Invitrogen、PA5-95056、1:250；Proteintech、66251-1-Ig、1:500；Abcam、ab77187、1:200）、ACTA2（Sigma、C6198、1:500）、γ-H2AX（R&D、4418-APC、1:500；Novus Biologicals、NB100-74435、1:250）、CDKN1A（Sigma、ZRB1141、1:200；BD Biosciences、556430、1:200）、COL1A1（Proteintech、67288-Ig、1:1,000）、YAP（Cell Signaling Technology、4912S、1:250）。

【0158】

X-galならびにヘマトキシリンおよびエオシン染色。

【0159】

パラホルムアルデヒド固定された凍結切片を、1 mg/mlのX-gal（Thermo、R0941）、5 mMのK₃Fe(CN)₆、5 mMのK₄Fe(CN)₆、2 mMのMgCl₂、0.01%のデオキシコール酸ナトリウムおよび0.02%のNP-40を含むX-gal染色緩衝液と共に、37℃で一晩インキュベートした。切片を、PBS中で3回洗浄し、マウントした。ヘマトキシリンおよびエオシン染色のために、10 μmのパラフィン切片を、Histo-clearおよび一連のエタノール中に浸した。マイヤーヘマトキシリンを使用して核を染色し、その後、1%のエオシンYを使用して染色した。

【0160】

近接ライゲーションin situハイブリダイゼーション。

【0161】

近接ライゲーションin situハイブリダイゼーションを、以前に記載されたように実施した69。簡潔に述べると、凍結マウス肺切片を、4.0%のパラホルムアルデヒドで20分間固定し、20 μg/mlのプロテイナーゼKで37℃で9分間処置し、漸増する一連の（up-series）エタノールで脱水した。切片を、ハイブリダイゼーション緩衝液（1 Mのトリクロロ酢酸ナトリウム、50 mMのTris pH 7.4、5 m

10

20

30

40

50

MのEDTAおよび0.2mg/mlのヘパリン)中で、遺伝子特異的オリゴと共に、37℃で2時間インキュベートした。コモンブリッジ(common-bridge)プローブおよびサークル(circle)プローブを切片に添加し、1時間インキュベートし、その後、2時間のT4 DNAリガーゼ反応を行った。ローリングサークル増幅を、phi29ポリメラーゼ(Lucigen、30221)を使用して、37℃で12時間実施した。フルオロフォアコンジュゲートした検出プローブを適用し、37℃で30分間インキュベートし、その後、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含む媒体中でマウントした。

【0162】

画像の獲得、処理および定量化。

10

【0163】

画像を、×20、×40または×60対物レンズを備えたOlympus FV3000共焦点顕微鏡、Zeiss広視野蛍光顕微鏡(X-gal染色)およびZeiss Axio ImageR広視野蛍光顕微鏡(ヘマトキシリンおよびエオシン)を使用して捕捉した。細胞を、免疫組織化学マーカーおよびDAPIに基づいて手動で計数した。直線距離当たりの平均交差の決定のために、平均線形切片分析を、目的の単一チャネル免疫蛍光染色に対して、以前に記載されたように実施した11。画像を、Olympus CellSensアプリケーションまたはImageJを使用して処理し、図面を、Affinity Designerを使用して作成した。

【0164】

20

統計学および再現性。

【0165】

実験を、少なくとも3つの生物学的複製に対して実施した(オルガノイドscRNA-seqおよびChIP-seqを除く)。試料サイズは事前に決定しなかった。データは、各実験内の変動を示すために、s.e.m.を伴った平均として示される。統計分析を、GraphPad Prismで実施した。対応のない両側学生t検定を、2つの実験的条件間の比較に使用した。マン・ホイットニー片側検定を、非正規分布を示した2つの条件間の比較に使用した。

【0166】

(実施例1)

30

単一細胞トランスクリプトミクスは、ex vivoオルガノイドにおける以前には未知であった肺胞上皮細胞状態を明らかにする

最近の研究は、AEC2が、肺傷害に応答して増殖し、AEC1を生じることを示している。さらに、AEC2は、肺胞オルガノイドにおいてAEC1を自発的に生成する。しかし、AEC2のAEC1への分化の根底にある分子機構および移行細胞状態は、あまり理解されていない。これらの問題に対処するために、本発明者らは、AEC2およびPDGFRα+線維芽細胞を精製して、肺胞オルガノイドを樹立した。単一細胞トランスクリプトーム分析を、10日目のオルガノイド培養物から単離した細胞に対して実施した(図1A)。均一マニホールド近似投影(uniform manifold approximation and projection)(UMAP)は、Epcam+上皮細胞およびVim+Pdgfra+線維芽細胞からなる2つの主要なクラスターを同定した(図1B)。次に、本発明者らは、上皮細胞集団をさらにデコンボリューションおよび可視化し、それらを、リポポリサッカリド(LPS)で傷害された肺胞上皮細胞の公に入手可能な単一細胞RNA配列決定(scRNA-seq)データセットと比較した14。オルガノイド由来上皮細胞は、それらのin vivo対応物と重複し、これは、転写的類似性および細胞状態類似性を明らかにしている(図1C)。本発明者らは、オルガノイド由来上皮細胞において、以下の複数のサブクラスターを観察した:Sftpc(AEC2のマーカー)を発現する細胞、Ager(AEC1のマーカー)を発現する細胞およびSftpc+Mki67+増殖性AEC2(図1D)。

40

【0167】

50

さらに、本発明者らは、C l d n 4、K r t 1 9およびS f nを発現する肺胞上皮細胞の集団を同定した（図1 D、図1 Eおよび図1 F）。このクラスターに独自のマーカー遺伝子は、U M A Pおよびボルケーノプロットで可視化した場合、2つの別個のパターンを示した（図1 b～d）。1つのサブセット（C t g f+細胞）は、C t g f、C l u、S o x 4およびA c t n 1について富化されたが、他（L g a l s 3+細胞）は、L g a l s 3、C s r p 1、S 1 0 0 a 1 4およびC l d n 1 8について富化された。A g e r、E m p 2およびH o p x（A E C 1のマーカー）を含む、L g a l s 3+サブクラスターにおいて富化されたさらなる転写物は、L g a l s 3+細胞とA E C 1との間での類似点および潜在的系列ヒエラルキーを示唆している（図1 G）。これらのデータは、C l d n 4+K r t 1 9+S f n+集団が、A E C 2とA E C 1との間の中間体であることを示唆している。この集団を、「プレ1型肺胞移行細胞状態」（P A T S）と称した。本発明者らは、肺胞オルガノイドに対してP A T Sマーカーについての免疫蛍光を実施して、単一細胞データを検証した（図1 H）。画像は、3匹のマウス由来の30個のオルガノイドの代表であった。これにより、アルベオロスフィア（a l v e o l o s p h e r e）中の、C L D N 4、L G A L S 3およびS O X 4を発現する細胞の存在が確認された。合わせると、これらのデータにより、オルガノイド培養において肺胞上皮幹細胞分化の間の独自の細胞状態が同定された。

10

【0168】

（実施例2）

P A T S細胞は、肺胞傷害後にi n v i v oで出現する。

20

次いで、P A T S細胞が、ホメオスタシスおよび再生中の肺胞組織においてi n v i v oで観察され得るかどうかを調査した。これを試験するために、本発明者らは、L P Sで処置したマウス肺および対照マウス肺からのs c R N A－s e qデータをU M A Pプロットでレンダリングし、L P S傷害に独自の集団を見出した。U M A Pプロットは、肺胞オルガノイドs c R N A－s e qデータセット（4, 573細胞）およびL P Sで処置した肺または対照肺（13, 204細胞）における、A E C 2（L a m pおよびS f t p b）、A E C 2増殖性（M k i 6 7およびT o p 2 a）、A E C 1（A g e rおよびA k a p 5）および新規肺胞上皮細胞状態における遺伝子の発現を示した。重要なことに、この集団は、C l d n 4、S o x 4、L g a l s 3、S 1 0 0 a 1 4およびF n 1を含む、P A T Sにおいて発現される遺伝子について富化されている。

30

【0169】

P A T Sをさらに特徴付けるために、C t g f－緑色蛍光タンパク質（G F P）トランスジェニックマウス系を利用した（H a l l－G l e n n e t a l., 2012, P L o S O N E 7: e30562）。マウスを、一過的な線維症を引き起こす薬物であるブレオマイシンに曝露させ、傷害後の12日目にマウスの肺を収集した（図2）。未傷害のC t g f－G F PマウスにおけるG F Pについての免疫蛍光は、線維芽細胞において特異的に、G F Pシグナルを明らかにしたが、肺胞上皮細胞においては明らかにしなかった。対照的に、ブレオマイシンで傷害された肺では、G F P発現は、C L D N 4、L G A L S 3およびS F Nを含むP A T Sマーカーで共標識された上皮細胞において見出された。低レベルのA E C 2マーカーを共発現する僅かなG F P+細胞が観察され、これは、P A T SへのA E C 2移行の際のS F T P Cタンパク質の永続に恐らくは起因する。

40

【0170】

ブレオマイシンで傷害された肺におけるK R T 8の発現を試験した。K R T 8発現細胞とC t g f－G F P発現細胞との間の重複における有意な増加が、12日目に、対照肺およびブレオマイシンで処置した肺において、C t g f－G F P、K R T 8およびS F T P Cについての免疫染色によって見出された。これらのデータは、オルガノイドおよびL P S傷害からのs c R N A－s e qデータにおけるK r t 8発現の上昇したレベルをさらに裏付ける（図3）。合わせると、これらのデータにより、P A T S細胞が、ブレオマイシン傷害後にi n v i v oで肺胞において出現することが明らかである。

【0171】

50

次いで、P A T S細胞がブレオマイシン傷害に特異的であるのか他の傷害モデルにおいても出現するのかを試験した。これを試験するために、A g e r - C r e E R ; R 2 6 R - D T Rマウスに、タモキシフェンを投与し、その後、A E C 1の選択的アブレーションを生じるジフテリア毒素（D T）を投与した。本発明者らは、D T注射後の6日目および28日目に試料を収集し、免疫染色を実施した（図4 A）。興味深いことに、6日目のA E C 1をアブレートされた肺中に、細長い形態を有する、C L D N 4、S F N、K R T 1 9およびL G A L S 3を発現する細胞が観察されたが、対照中では観察されなかった（図4 B）。P A T Sマーカーを共発現した細長い細胞における低レベルのS F T P C発現もまた、免疫染色によって観察され、これは、P A T SへのA E C 2の移行の間のS F T P Cの永続に恐らくは起因する。28日目には、A E C 1をアブレートされた肺において、免疫染色によってP A T Sマーカーが観察されなかったことに留意されたい。これは、P A T S細胞が、完全に分化したA E C 1へと成熟化したことを示唆している。これらのデータは、P A T Sの出現が、肺胞再生における一般的な機構であることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0172】

（実施例3）

系列追跡は、P A T S細胞がA E C 2に起源することを明らかにする。

オルガノイドおよび傷害モデルから先に提示されたデータは、P A T S細胞がA E C 2に起源することを示唆した。この仮説を実験的に試験するために、本発明者らは、タモキシフェンの投与が、A E C 2およびその子孫において特異的に、t d T o m a t o発現を恒久的に誘導する、S f t p c - C r e E R ; R 2 6 R - t d T o m a t o（本明細書で以後S f t p c - t d T +と呼ぶ）マウスモデルを使用した（図5 A）。ブレオマイシン投与後の10日目に、損傷した肺胞領域において、L G A L S 3、S F NおよびC L D N 4を共発現する系列標識された（t d T o m a t o +、t d t +）細胞が観察されたが、対照肺では観察されなかった。A G E Rを共発現するt d t +細胞は、後の時点では、平たく薄く細長い形態を示し、A E C 1へのA E C 2移行が確認された。興味深いことに、S F N、C L D N 4およびL G A L S 3を含むP A T Sマーカーを共発現する系列標識された細胞は、修復プロセスの間に、別個の形態学的特色（円形の、「伸展した」、および細長い）を有した（図5 B）。これを定量化するために、本発明者らは、C L D N 4 +および／またはL G A L S 3 +発現ならびにそれらの形状に従って、系列陽性細胞をスコア付けした（図5 C）。3つの別個のパターンのマーカー発現、C L D N 4 +、C L D N 4 + L G A L S 3 +およびL G A L S 3 +が観察され、これらがそれぞれ、円形、伸展したおよび細長い形態と相関したことが見出された（図5 Cおよび図5 D）。さらに、本発明者らは、ブレオマイシンで誘導された傷害の後、8日目のC L D N 4 +細胞の、10日目のC L D N 4 + L G A L S 3 +細胞の、および12日目のL G A L S 3 +細胞の、実質的な富化を観察した（図2 l）。s c R N A - s e qデータセットにおけるC L D N 4 +およびC L D N 4 + L G A L S 3 +細胞状態が注目されたが、別個のL G A L S 3 +集団は注目されなかった。類似のP A T Sマーカー発現が、肺切除術で誘導された「生理学的」再生の間に、A E C 2系列標識されたマウスにおいて検出された（図5 E）。s c R N A - s e qにおけるL G A L S 3の発現 対 免疫染色におけるL G A L S 3の発現との間の食い違いは、最終A E C 1におけるL G A L S 3タンパク質の永続に起因し得る。合わせると、この分析により、A E C 2のA E C 1への分化が、2つの別個の状態を通過することが明らかになった（図5 F）。

【0173】

（実施例4）

系列追跡分析は、P A T S細胞がA E C 1を生成することを明らかにする

先に示された実験からの複数ラインのデータは、P A T S細胞がA E C 1に向かう途中であることを示唆している。これを試験するために、スプライシングされたメッセンジャーRNAとスプライシングされていないメッセンジャーRNAとの間の比率に基づいた細胞分化トラジェクトリーの予測を可能にする、V e l o c y t oと呼ばれるアルゴリズムツール18を使用した。P A T S 1 C t g f +集団に起源して、P A T S 2 L g a l

s 3 + 集団を介して A E C 1 への、強い R N A 速度 (トラジェクトリー) が観察された (図 6 A および 図 6 B)。次いで、R 2 6 R - t d T o m a t o と組み合わせた、P A T S において富化される遺伝子である K r t 1 9 の C r e E R 対立遺伝子 (K r t 1 9 - t d t) を使用して、ブレオマイシン傷害後の系列追跡を実施して、同じトラジェクトリーが、再生中の肺胞において i n v i v o で生じるかどうかを試験した。最初に、マウスを、ブレオマイシンで傷害し、タモキシフェンを 7 日後に投与して、K r t 1 9 発現細胞およびそれらの子孫を標識した (図 6 C)。次いで、A E C 2、A E C 1 および P A T S マーカーについての免疫蛍光を実施した。

【0174】

A E C 1 のマーカーである A G E R を共発現する多数の K r t 1 9 - t d t + 細胞が、ブレオマイシン投与後の 1 2 日目に見出された (図 6 D、図 6 E、図 6 F)。未傷害の肺では、本発明者らは、A E C 1 ではまれな、一部の L G A L S 3 + マクロファージにおける t d t 発現を観察した (図 6 G)。本発明者らは、ブレオマイシンで処置したマウスの未傷害の領域において、S F T P C を共発現する K r t 1 9 - t d t + 細胞を見出さず、これは、K r t 1 9 発現が、損傷した領域において傷害に応答して特異的に活性化されること、ならびに本発明者らが試験した条件が P A T S を標識および追跡するために十分に適していることを示している。共免疫染色により、ブレオマイシンで処置した肺における、S F N、C L D N 4 および L G A L S 3 を含む P A T S マーカーを共発現する、伸展した t d T o m a t o 標識された細胞が明らかになったが、対照では明らかにならなかった (図 6 D ~ 6 G および 図 6 H)。したがって、組み合わせられた R N A 速度および系列追跡分析は、新たに同定された P A T S が A E C 2 と A E C 1 との間を横断することを明らかにしている。

【0175】

(実施例 5)

P A T S 中の保存された転写プログラムおよび経路。

A E C 2 の A E C 1 への分化は、立方体状から平たく薄いものへの、細胞の形状および構造における劇的な変化に関連する。かかる移行には、典型的には、シグナル伝達タンパク質および構造タンパク質の発現における多くの変化が伴う。したがって、これらの変化が P A T S 細胞において生じると考えられた。これらの変化が P A T S 細胞において生じるかどうかを決定するために、オルガノイド培養物 (4, 573 細胞) および L P S で誘導された傷害モデル (13, 204 細胞) からの s c R N A - s e q データを分析した。以下を含む多数の遺伝子が、P A T S 細胞間で保存されていた: T G F β シグナル伝達経路中の遺伝子 (C d k n 2 b、M a p k 3、M y c、N b l 1、P p p 2 r 1 a、R b x 1、R h o a、S k p 1 a、T g f b 1、T g i f 1 および T h b s 1)、p 5 3 シグナル伝達経路中の遺伝子 (B a x、C a s p 8、C c n d 1、C c n d 2、C c n g 1、C d k 4、C d k n 1 a、C y c s、E i 2 4、G a d d 4 5 a、G a d d 4 5 b、S e s n 3、S f n、S h i s a 5、T h b s 1 および T r p 5 3)、細胞老化に関与する遺伝子 (C a l m 1、C a l m 2、C a p n 2、C c n d 1、C c n d 2、C d k 4、C d k n 1 a、C d k n 2 b、E i f 4 e b p 1、E t s 1、G a d d 4 5 b、H 2 - D 1、H 2 - K 1、h 2 - Q 4、H 2 - Q 6、H 2 - Q 7、H 2 - T 2 2、H 2 - T 2 3、K r a s、M a p 2 k 2、M a p k 1 3、M a p k 3、M y c、P p i d、P p p 1 c a、P p p 3 c a、R b b p 4、R h e b、R r a s、S q s t m 1、S l c 2 5 a 4、T g f b 2、T r p 5 3、V d a c 1、V d a c 2、V d a c 3 および Z f p 3 6 l 1)、タイトジャンクションシグナル伝達遺伝子 (A c t b、A c t g 1、A c t n 1、A c t n 4、A c t r 3、C c n d 1、C d c 4 2、C d k 4、C l d n 3、C l d n 4、C l d n 7、C l d r n 1 8、c t t n、E z r、F 1 1 r、H s p a 4、I t g b 1、J u n、M s n、M y h 9、M y l 6、M y l 9、M y l 1 2 a、M y l 1 2 b、M y n 1 2 a、N e d d 4、O c l n、P p p 2 r 1 a、R a c 1、R a p 1 a、R h o a、S l c 9 a 3 r 1、T u b a 1 a、T u b a 1 b、T u b a 1 c および V a s p)、および DNA 損傷チェックポイント遺伝子 (C c n d 1、C c n g 1、C d k n 1 a、D d x 3 9 b、l e

r 3、Pr p f 1 9、R p l 2 6、R p s 2 7 l、S o x 4、S y f 2 および T r p 5 3)。

【0176】

経路富化分析により、TP53、TNF-NF-κB、ErbB、HIF1、Hippo-YAP、細胞周期停止、細胞骨格動態、タイトジャンクションおよびTGFβシグナル伝達が、他の集団と比較して、PATS細胞において活性化されることが明らかになった(図7Aおよび図7B)。細胞老化およびDNA損傷応答経路を代表する遺伝子についての実質的な富化が、予想外に見出された(図7Cおよび図7B)。

【0177】

(実施例6)

PATS細胞は、in vivoでの肺胞再生の間に、DNA損傷および老化を天然に示す。

これらのデータは、DNA損傷関連遺伝子および老化関連遺伝子が、PATSにおいて高度に富化されることを示した。これらの知見を検証するために、ブレオマイシンで処置したマウスおよびPBSで処置したマウスの肺を、老化細胞のバイオマーカーとして機能するβ-ガラクトシダーゼ活性およびDNA損傷のマーカーであるγH2AXについて、10日後にアッセイした。興味深いことに、ブレオマイシンで傷害された肺胞において、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド(X-gal)由来の青色の沈着に基づいて、多数のβ-ガラクトシダーゼ活性細胞が検出されたが、対照肺胞では検出されなかった(図8A)。これは、ブレオマイシンで処置した肺において特異的な、老化マーカーCDKN1A(p21)の発現によってさらに支持された(図8B)。CDKN1A発現は、伸展したtdt+細胞において観察されたが、AGER+細胞では観察されず、これは、老化がAEC1において観察されないことを示している(図8B)。同様に、γH2AX斑の蓄積もまた、ブレオマイシンで処置した肺において、伸展したSftpc-tdt+細胞の核において検出されたが、AGER+細胞では検出されなかった(図8C)。さらなる分析により、ブレオマイシンで傷害された肺において、LGALS3を共発現するγH2AX+Sftpc-tdt+細胞の顕著な数が明らかになったが、対照では明らかにならず、これは、PATS細胞が肺胞再生の間にDNA損傷を受けることを示している(図8D)。

【0178】

ブレオマイシンは、細胞においてDNA損傷を誘導することが公知である。しかし、scRNA-seq分析および免疫染色は共に、PATS細胞におけるDNA損傷修復シグナル伝達の強い富化を明らかにした。老化およびDNA損傷に対するブレオマイシンからのあらゆる潜在的な影響を回避するために、マーカー分析を、AEC1特異的アブレーションモデルからの肺に対して実施した(図4A)。AEC1をアブレートされた肺において、多数のX-gal+細胞が検出され、LGALS3+細胞におけるCDKN1AまたはγH2AXの発現が観察されたが、対照肺胞では観察されなかった(図8E、図8Fおよび図8G)。

【0179】

(実施例7)

PATS細胞は、機械的伸展で誘導されたDNA損傷に対して脆弱である

以前の研究は、電離放射線、酸化ストレス、ならびに細胞の遊走および伸展の間に生じる機械的な力が、全てDNA損傷を引き起こし得ることを示している。経路分析により、酸化ストレスではなく細胞骨格変化に関与する遺伝子についての富化が明らかになった。AEC1へのAEC2分化が広範な細胞の広がりおよび細胞骨格動態を要求することを考慮して、PATS細胞が、DNA損傷をもたらし得る機械的伸展を経験すると仮説を立てた。これを試験するために、AEC2を、SFTPC-GFPマウスから精製し、AEC2が広がりAEC1へと分化する条件であるプラスチック表面上でそれらを培養した(二次元(2D)培養)(図8Hb)。プレーティング後5日以内に、AEC2のほとんどは伸展し、GFP発現は喪失した(GFP-)または下方調節された(GFPlo)。これ

10

20

30

40

50

らの細胞は、伸展の間中、その表面積を増加させ、AEC1マーカーを発現し始めた。興味深いことに、AGER+細胞は、DNA損傷マーカーγH2AXについても陽性であった（図8Hおよび図8I）。プレーティング後の2日目には、細胞においてDNA損傷マーカーが観察されなかったことに留意されたい（図8I）。合わせると、これらのデータは、大きく薄いAEC1へと分化する立方体状AEC2が、DNA損傷修復を天然に経験し、一過的老化を受けることを示している。

【0180】

（実施例8）

TP53シグナル伝達の遺伝的機能喪失および薬理的活性化は、肺胞傷害－修復の間のPATsを介したAEC2～AEC1の分化を異常調節する

これらのデータは、TP53シグナル伝達の活性化が、傷害された肺におけるPATsに関連することを示唆している。他の組織における以前の研究は、TP53シグナル伝達が分化を促進し、幹細胞自己更新を抑制することを示唆している。TP53シグナル伝達の増強された活性化が、傷害後のPATsが関与するAEC1へのAEC2分化を増加させるかどうかを決定するために、Sftpc-CreER;R26-tdTomatoマウスにおいてブレオマイシンで誘導された傷害を実施し、その後、傷害後の8日目に開始するNutlin-3a（TP53活性化因子）またはジメチルスルホキシド（DMSO；対照）投与を実施し、20日目に組織収集した（図9A）。AGERについての免疫染色により、Nutlin-3a処置が、DMSO処置と比較して、Sftpc-tdt+細胞のAEC1への有意に高い分化をもたらしたことが明らかになった（図9B）。Nutlin-3aを受けた未傷害の肺では、AGER+Sftpc-tdt+細胞の存在は観察されず、これは、Nutlin-3aで誘導されたTP53活性化単独では、AEC2のAEC1への分化を誘導するのに不十分であることを示唆している（図9B）。さらに、肺胞オルガノイド中のAEC2に対するNutlin-3aの影響を試験した。オルガノイドを、7日目に開始して、15日目の回収まで、Nutlin-3aまたはDMSOで処置した（図9C）。Nutlin-3aで処置したオルガノイドは、対照と比較して、AGER+細胞の数および強度における増加、ならびにKi67+増殖性細胞の数における減少を示した（図9D）。これらのデータは、TP53シグナル伝達の異所的活性化が、AEC2分化をin vivoおよびex vivoで増強することをさらに支持している。

【0181】

データは、TP53シグナル伝達の活性化がAEC2分化を増強することを示した。TP53がAEC2のAEC1への分化に必要なかどうかを試験するために、タモキシフェン投与が、AEC2において特異的に、TP53の欠失およびtdTomatoの発現を可能にする、Sftpc-CreER;R26-tdTomato;Trp53fl/flマウスモデルを利用した。ブレオマイシン傷害を実施し、その後、12日目に組織収集した（図9E）。Sftpc-CreER;R26-tdTomato;Trp53+/+マウスを対照として使用した。免疫染色により、ブレオマイシンで処置した対照マウスにおける、AGERを共発現する多数の伸展した系列標識された細胞が明らかになった（図9F）。対照的に、TP53欠損肺におけるtdt+細胞は、ブレオマイシン処置後にAGER発現を示さず、異常な形態を有した（図9F）。TP53欠損AEC2が、ブレオマイシンで誘導された傷害を有さない領域において正常に見えたことに留意されたい。免疫染色および定量化により、傷害後の対照と比較して、TP53変異体マウスの肺において、CLDN4+Sftpc-tdt+細胞の数における有意な増加およびより少ないLGALS3+Sftpc-tdt+細胞が明らかになった（図9G）。

【0182】

発現分析により、対照と比較して、TP53fl/fl肺において、CDKN1A（TP53の公知の標的）のレベルにおける有意な減少が明らかになった（図9H）。細胞死マーカーについての免疫染色により、TP53変異体と対照との間に差異が存在しないことが明らかになり、これは、TP53の喪失が細胞死に影響を与えなかったことを示して

いる。合わせると、これらのデータは、TP53が、AEC2のAEC1への分化にとって必須であり、TP53欠損AEC2がPATSにはまり込み、AEC1に進行することができないことが明らかになった。

【0183】

(実施例9)

TP53は、PATS関連遺伝子座に結合し、それらの発現を制御する

PATS細胞において潜在的に活性な転写因子モジュールを同定するために、クロマチン免疫沈降(ChIP)分析を、ヒストンH3K4me3、H3K36me3およびH3K27acについて実施して、それぞれ、活性なプロモーター、転写している遺伝子およびエンハンサーを同定した。ブレオマイシンで処置したCtgf-GFPおよび対照マウス由来のPATS細胞およびAEC2をそれぞれ単離し、ヒストンマーク分析に使用した。H3K4me3富化は、細胞型特異的プロモーターに対応する遺伝子(AEC2ではSftpc、PATSではFn1)において見出された。さらなる分析により、対照由来のAEC2と比較して、ブレオマイシン損傷で誘導された肺由来のPATS細胞に特異的な転写物の転写開始部位およびプロモーターと重複する多数のH3K4me3ピークの富化が明らかになった(図10A)。H3K4me3ピークのモチーフ分析は、TP53、ETS1、NF1、ATF3およびSOX4 — これらは全て、PATSで富化された経路に参与している — を含む転写因子についての結合部位の富化を予測した。AEC2と比較したPATSにおける、公知のTP53標的遺伝子座(FasおよびMdm2)におけるH3K4me3、H3K27acおよびH3K36me3についての富化。TP53について、予測された結合部位が、Mdm2エンハンサーおよびFasプロモーター中に見出され、これらは、TP53の2つの周知の直接的標的である。合わせると、これらのデータは、PATS特異的遺伝子の転写制御におけるTP53の直接的な役割を暗示している。

【0184】

ChIP分析を、PATS細胞におけるTP53について実施して、TP53が、PATSに関連する転写プログラムを直接的に調節するかどうかを実験的に試験した。scRNA-seq分析が、TP53シグナル伝達がPATSのCtgf+サブセットにおいて高度に富化されることを明らかにしたことを考慮して、Sftpc-CreER;R26R-tdTomato;Ctgf-GFPマウスモデルを生成して、ChIP分析のためにAEC2系列由来PATS細胞を精製した。PATS細胞(tdt+GFP+)を、ブレオマイシン投与後の8日目に、Sftpc-CreER;R26R-tdTomato;Ctgf-GFPマウスの肺から精製し、TP53について多重インデックス化T7ChIP(Mint-ChIP)分析を実施した(図10B)。Integrative Genome Viewer(IGV)トラック上でのデータ可視化により、Mdm2、Trp53およびBasp1を含む以前に記載された標的上でのTP53の強い富化が明らかになった。より重要なことに、TP53の強い富化は、Fn1、Sfn、Actn1、Nupr1、My12a、Calml1、Ctgf、Cdkn1aおよびKrt19を含む、本発明者らが分析した多く(28のうち22)のPATS標的遺伝子上で観察された(図10C)。TP53富化がAEC1遺伝子座でもAEC2遺伝子座でも観察されなかったことに留意されたい(図10Dおよび図10E)。さらに、PATS関連遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー上でのTP53結合と一致して、TP53富化領域とH3K4me3またはH3K27acマークとの間での重複もまた観察された(図10C)。合わせると、これらのデータにより、TP53が、PATSで富化された遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーに直接的に結合することが明らかになった。

【0185】

(実施例10)

PATS関連遺伝子発現シグネチャーおよびシグナル伝達経路は、ヒト線維化肺において富化される

最近の研究は、特発性肺線維症(IPF)において線維化病巣を裏打ちする肺胞上皮細

胞が、老化、成長停止および分化遮断の特色を示すことを示唆している。肺胞前駆体が、非許容的な病理学的微小環境に应答してその分化プロセスをPATS様状態で留め置くかどうかを試験するために、IPFを有するヒト患者の肺からの、最近報告されたscRNA-seqデータセット29を分析した。最初に、全ての非上皮および気道細胞を、さらなる分析から排除した。健康な肺およびIPF肺の両方において、UMAPプロットにおける見かけの重複を伴って、多数のAEC2およびAEC1が観察された(図11A)。対照的に、IPF試料において高度に富化され、AEC1またはAEC2のいずれとも重複しなかった、別個の細胞クラスターが見出された(図11B)。これらの細胞は、それらのマーカー遺伝子発現によって、KRT5-KRT17+と以前にアノテーションされた。特に、差次的遺伝子発現の分析により、マウスオルガノイドおよび傷害モデル由来のIPFで富化された細胞クラスターとPATS細胞との間で、Sfn、Sox4およびFn1、ならびにまたS100A2、PTGS2、KRT17、KRT8、CALS1、CLDN4、MMP7、PRSS2、IGFBP7、COL1A1、MDK、TAGLN、GDF15、TM4SF1およびCTSEを含む転写物の、著しい類似点が明らかになった。したがって、ヒトIPF特異的クラスターを「PATS様」細胞と命名した(図11Aおよび図11B)。PATS様集団において高度に富化された他の転写物は、CALD1、PRSS2、MMP7およびS100A2である。scRNA-seqデータを検証するために、免疫蛍光分析を、健康なヒト、ならびにIPFを有する肺の線維化領域および非線維化領域に対して実施した(図11C)。PATS様細胞(SFN、CLDN4およびKRT17)、AEC2(SFTPCおよびHTIIE-280)、AEC1(AGER)および筋線維芽細胞(ACTA2)の共免疫蛍光分析により、IPF肺の線維化領域中において特異的な、PATS様マーカーの発現が明らかになったが、健康な対照中および健康な外観を有するIPF肺の領域中では明らかにならなかった(図11D、図11E、図11F、図11G、図11H、図11I)。興味深いことに、KRT17は、正常な肺の基底細胞およびIPF肺中の基底様細胞において発現されることが最近示された(Habermann et al., 2019, doi.org/10.1101/753806; Adams et al., 2019, doi.org/10.1101/759902)。IPF肺の線維化領域において特異的な、基底細胞の別のマーカーであるTP63の類似の発現パターンもまた見出されたが、非線維化領域では見出されなかった(図11H、図11I)。PATS様マーカーは、高レベルのCOL1A1、および筋線維芽細胞の蓄積(図7D)と一致して、重症線維症の領域において高度に富化されることが見出された(図11D~図11I)。PATSマーカー(SFN、CLDN4、KRT17およびTP63)の定量化が、これらの知見をさらに支持した(図11E、図11Gおよび図11I)。さらに、PATS細胞は、健康な肺における立方体状AEC2とは対照的に、IPF肺において細長い形態を獲得したことが観察された(図11D、図11Fおよび図11G)。AGER発現が、多くのPATS様細胞を有するIPF肺中の領域には存在しなかったことに留意されたい(図11F)。遺伝子オントロジーおよび経路分析により、p53シグナル伝達(CDKN1A、CDKN2AおよびMDM2、ならびにCCND1、CCND1、SNF、GADD45A、BID、BAX、PMAIP1、BBC3、BCL2L1、PERP、ZMAT3、IGFBP3、CD82、THBS1、SERPINB5、RRM2B、SESN3、STEAP3、TP73)、DNA損傷チェックポイント(RPS27LおよびPLK3、ならびにBRSK1、HMGA2、PEA15、PLK2、PRKDC、SOX4、TRIAP1)および細胞老化(TGFB2およびHIPK2、ならびにCDKN2B、CXCL8、EIF4EBP1、ES1、NFATC1、SERPINE1、TGFB1、ZFP36L1)の構成要素についての富化が明らかになった(図11J)。さらに、PATS様クラスターは、接着斑、タイトジャンクション、およびアクチン細胞骨格の調節の構成要素について富化され、これは、IPFにおけるPATS様細胞とオルガノイドおよび再生中の肺胞におけるPATS様細胞との間の著しい類似点を示している。線維症の公知の調節因子であるAREG、TGFB1、TGFB2およびTIMP1についての有意な富化が、PATS様細胞において

10

20

30

40

50

見出された（図 11 K）。次に、細胞老化（ β -ガラクトシダーゼ活性および CDKN1A）および DNA 損傷応答（ γ H2AX）のマーカーを、IPF 肺および健康な肺において分析した。このデータにより、IPF 中の PATS 様集団におけるこれらのマーカーの特異的発現が明らかになったが、健康な肺では明らかにならなかった（図 11 L および図 11 M）。合わせると、この分析により、再生中の組織由来の PATS 細胞と病理学的線維化肺に特異的な PATS 様細胞との間での類似性が明らかになった。

【0186】

考察

【0187】

この研究は、AEC2 と AEC1 との間を横断し、特異的遺伝子発現シグネチャーを有する、以前には未知であった移行状態（PATS）を発見した。運命マッピング研究は、AEC2 から PATS から AEC1 への明らかな系列関係を実証している。したがって、これらの移行細胞状態の追加により、本研究は、肺胞上皮細胞のヒエラルキーを訂正する。特異的遺伝子発現シグネチャーは、PATS が、AEC2 特徴の段階的な喪失を受けているだけでなく、独自の移行集団を表すことを示している（図 12）。これらの細胞は、肺再生のために重要であることが以前に示された、TP53、NF- κ B、YAP、TGF β および HIF1 を含む経路について富化される（LaCanna, et al., 2019, J. Clin. Invest. 129, 2107–2122; Riemondy et al., 2019, JCI Insight 5, e123637; Cheng et al., 2007, J. Immunol. 178, 6504–6513; McConnell et al., 2016, Cell Rep. 17, 2173–2182）。上皮-間葉移行および他の組織における細胞接着の公知の調節因子である、細胞周期停止、老化および SOX4 に関連する転写物についての富化が観察された 33。遺伝学および薬理学的モジュレーションを通じて、これらのデータは、TP53 シグナル伝達が、再生中の組織において、PATS が関与する AEC1 への AEC2 分化を促進するのに必要かつ十分であることを実証している。ChIP による分析により、TP53 による PATS 遺伝子の直接的制御が明らかになった。この研究は、多数の細胞骨格遺伝子への TP53 の結合の直接的な証拠を提供する。さらに、TP53 結合は、DNA 損傷経路に関与する遺伝子（Nupr1 および Sox4）上で観察された。

【0188】

ヒト肺の上記分析は、IPF 肺の線維化領域中に特異的に存在する PATS 様細胞を同定した。マウス PATS 細胞と同様に、ヒト肺中の PATS 様細胞は、細胞老化、TP53 シグナル伝達および TGF β による調節される遺伝子に関連する遺伝子 — これらは全て、肺を含む複数の臓器における線維症に関与することが公知である — についての富化によって特徴付けられる（Zhang et al., 2015, Cell Death Dis. 6, e1847; Lipson et al., 2012, Fibrogenesis Tissue Repair 5, S24）。対照的に、一部の差異が、マウス IPF 特異的 PATS 様細胞とヒト IPF 特異的 PATS 様細胞との間で、遺伝子発現シグネチャーにおいて見出された。これらは、ヒト PATS 様細胞においてのみ見出される TP63、KRT17 および COL1A1 を含む。ヒト scRNA-seq データからの RNA 速度投影は、これらの KRT17+TP63+細胞が AEC2 に起源することを示唆している。KRT17 および TP63 についての免疫蛍光は、これらの細胞が同じ肺胞内で PATS 様細胞によって取り囲まれていることをさらに示唆した。

【0189】

これらの知見は、PATS 細胞が、薄く大きい AEC1 への AEC2 分化の間に広範な伸展を受け、ほとんどの変性性肺疾患、特に、肺線維症およびがんに関連する特色である DNA 損傷に対して脆弱になることを示した（Kropski et al., 2013, Dis. Models Mechanisms 6, 9–17; da Sil

va, et al., 2013, BMC Med. Genet. 14, 93)。
。以前の研究により、細胞が遊走するまたは狭い空間を押し分けて進む場合、細胞伸展がDNA損傷を引き起こすことが明らかになっている(McGregor et al., 2016, Curr. Opin. Cell Biol. 40, 32-40)。
傷害モデルおよび2D培養は実際に、AEC2が、AEC1への分化の間に広範な伸展を受けることを示唆している。したがって、移行細胞状態は、特に、DNA損傷に関連する肺疾患において、臨床的関与を有する(dasilva, et al., 2013, BMC Med. Genet. 14, 93; Sauler et al., 2018, Eur. Respir. J. 52, 1701994)。興味深いことに、PAT5集団は、DNA損傷後に誘導され、TP53の安定化および機能において重要なSOX4(細胞骨格遺伝子を調節することが公知)について富化される。合わせると、これらのデータは、細胞が伸展を受ける場合に生じ得るDNA損傷と戦うために細胞が共転写プログラムを進化させたモデルを支持する。さらに、ゲノムワイド研究は、DNA損傷修復構成要素、例えば、XRCCファミリー遺伝子、LIG4、TERC、PARPおよびRTEL1における変異を、肺気腫および肺線維症と共に同定している40。したがって、新たに同定された移行状態は、肺病理発生における肺幹細胞分化に伴う細胞形状変化および関連の脆弱性を暗示する。

10

【0190】

老化は、細胞が異常で不可逆的な状態を獲得する、加齢関連の病理学的状態とみなされる場合が多い。本明細書で記載されるように、肺幹細胞分化には、正常な組織再生における老化の主要な特色を示す移行状態が関与することが見出された。以前の研究は、発生中の胚芽組織において、老化細胞を実際に見出している(Storer et al., 2013, Cell, 115, 1119-1130)。したがって、老化は、加齢組織において排他的に生じるわけでは必ずしもない場合があるが、組織再生に伴う可逆的な一過的状态であり得る。したがって、この研究は、老化を、正常な組織維持プログラムの一部として生じ得、ヒト疾患において進行を阻止され得る状態として再定義する。

20

【0191】

結論として、肺泡オルガノイドおよびin vivo傷害-修復モデルを使用して、肺再生におけるPRE-AEC1移行状態が同定された。この独自の状態は、細胞老化、および欠損した肺泡再生経路についての富化に関連する(図12)。これらの結果は、移行細胞状態における長期老化およびストレス媒介性経路が、線維症などの疾患をもたらし得ることを強く示唆している。

30

【0192】

(実施例11)

新規の調節可能な肺傷害モデルは、一過的な線維症をin vivoで再現する

肺線維症は、劇的な細胞外マトリックス変化および組織リモデリングを全てが次に生じる、上皮、間葉および免疫集団における変更が関与する、複雑な疾患である。これらの複雑な相互作用の結果として、線維症の開始はあまり理解されておらず、これらの個々の因子の全ての組合せの結果であると仮定されている。今のところ、単一の細胞型への損傷が線維化開始を生じ得るかどうかについては、いまだ未知である。

40

【0193】

これに対処するために、細胞型特異的上皮アブレーションモデルを開発し(図13A)、単一の細胞型であるAEC1のアブレーションが、リポ線維芽細胞に特徴的なPdgfraの発現および星型形状を維持しつつ、常在性Pdgfra+リポ線維芽細胞においてアルファ平滑筋アクチン(aSMAまたはACTA2、組織線維症のマーカー)の迅速な活性化を生じることが見出された。これらの細胞は、筋線維芽細胞において通常見られる形態学的変化を示さないで、「線維筋細胞」と称される(図13B)。特に、単一ラウンドのAEC1アブレーションの後、線維筋細胞は一過的であり、上皮ホメオスタシスが回復されるにつれ、ACTA2発現は徐々に減少する。さらに、AEC1細胞の特異的アブレーションは、3日目までの迅速な活性化を伴い、6日目にピークに達する、中間のP

50

A T S 状態を生じた。興味深いことに、P A T S および線維筋細胞は同時に存在し、P A T S は、線維筋細胞が変換した間葉と直接的に重なる。P A T S は、10日目までには顕著な数で存在せず、これは、上皮組織が、この細胞型特異的傷害後に迅速に回復することを示唆している。

【0194】

(実施例12)

P A T S の持続は、リポ線維芽細胞を *in vivo* で筋線維芽細胞へと駆動する

単一ラウンドのAEC1アブレーションが、一過的で可逆的な線維症、線維筋細胞移行のみを生じ、筋線維芽細胞を生じなかったことを考慮すると、反復AEC1アブレーション（反復肺胞傷害の代用物）が、線維症をさらに駆動し得ると考えられた（図14A）。反復AEC1アブレーション後のマウス肺の予備的組織学的分析により、実際に、肺胞における増加したACTA2発現、ならびに星型から「帯状」形態への、ACTA2+細胞における形態学的変化が明らかになった（図14B、図14Cおよび図14D）。さらに、反復アブレーションは、線維化病巣の同定を可能にし、マッソントリクローム分析は、これらの肺におけるECM産生における増加を実証した。

10

【0195】

反復アブレーションは、分化の反復性の必要性、およびしたがって、P A T S 蓄積の結果として、P A T S が存在する時間の量を増加させるが、単一の重度に損傷する傷害が、増加したP A T S および線維症を同様に生じるとも仮説を立てた。これを実証するために、2つの別個の傷害モデル、肺切除術およびAEC1アブレーションを組み合わせた。重要なことに、これら2つの傷害は、P A T S がこれら2つの傷害において同時に蓄積するように、タイミングを合わせた。これらの条件下で、重症線維症および筋線維形成（*myofibrogenesis*）は、aSMA染色によって示されるように、肺の末梢から肺全体に拡大した（図14E）。特に、この二重傷害モデルでは、幅が広い筋線維芽細胞のバンド、線維化病巣、ならびに残留P A T S の存在が、これらの筋線維芽細胞が支配的な領域において観察された。

20

【0196】

(実施例13)

拡張可能な共培養モデルは、肺線維症を *ex vivo* で再現する

集合的に、*in vivo* データは、P A T S が、筋線維芽細胞変換において直接的な役割を果たすことを示唆した。この細胞間コミュニケーションを決定的に実証するために、上皮およびリポ線維芽細胞の両方の成長を支持し、それらの正常な表現型を維持する培養条件を確立した。次いで、リポ線維芽細胞を、AEC2細胞（SFTPC-GFPマウスに由来する）またはP A T S （ブレオマイシン傷害後にCTGF-GFPマウス（GFP⁺/EpCAM⁺）細胞から単離した）と共に7日間共培養し、免疫染色によって分析した。これらの条件下で、リポ線維芽細胞は、P A T S の存在下でのみACTA2を自発的に発現したが、AEC2とでは発現しなかった。これらのデータは、P A T S が、線維化促進性因子を産生し、リポ線維芽細胞の筋線維芽細胞への変換を誘導することをさらに示唆している（図15）。

30

【0197】

(実施例14)

リポ線維芽細胞の正体は、強直性のAEC1由来PDGFAシグナル伝達によって維持される

しかし、これら3つの傷害モデルからのデータは、P A T S の存在がさらなる線維形成を駆動することを示唆しているが、単回AEC1アブレーションでは、ネイティブ間葉におけるaSMA発現がP A T S の出現に先行することが観察された。これは、AEC1の孤立した喪失が、リポ線維芽細胞の筋線維芽細胞への移行を誘導するのに十分であることを示唆しており、したがって、AEC1が、細胞間コミュニケーションを介してリポ線維芽細胞の正体を維持すると仮説を立てた。

40

【0198】

50

AEC1と線維芽細胞との間の相互作用をさらに探索するために、ホメオスタシス単一細胞データからの上皮-間葉リガンド-受容体発現データを、Cellphone DBを使用して試験した。特に、ホメオスタシスで見出される2つの上皮細胞のうち、AEC2と比較してAEC1は、リポ線維芽細胞との、より多数のより強いコミュニケーション相互作用を有すると予測された。興味深いことに、それに対する同族受容体PDGFRAが肺間葉においてリポ線維芽細胞によってもっぱら発現されるPDGFAリガンドをAEC1が直接的に分泌することが見出された。重要なことに、PDGFA発現は、AEC2から、PATS状態を介し、最終的にはAEC1への細胞移行と共に増加し、これは、PDGFAが、上皮-間葉ホメオスタシス維持にとって重要なシグナルであることを示唆している(図16)。したがって、PDGFAは、リポ線維芽細胞の正体を維持し、AEC1の喪失、および結果として生じるPDGFAの喪失が、リポ線維芽細胞から筋線維芽細胞への開始の合図であると仮説を立てた。AEC2がAEC1へと分化するにつれて、PDGFA発現は回復し、これは引き続いて、線維筋細胞をそのネイティブのリポ線維芽細胞状態に戻す。

10

【0199】

(実施例15)

PDGFAシグナル伝達の崩壊は、筋線維形成の開始に十分である

PDGFAシグナル伝達軸の喪失が筋線維芽細胞変換に十分であるかどうかを試験するために、PDGFRA、PDGFRA-CreER/PDGFR^{fl}oxの細胞型特異的条件付きノックアウトモデルを生成した。このマウス系は、PDGFRAの単一の機能的対立遺伝子のみを有し、タモキシフェン投与の際に、PDGFRA+細胞において排他的に、PDGFRA発現の完全な喪失を生じる。特に、PDGFRA欠失のたった2日後に、これらのマウスは、肺間葉においてaSMAを発現し始め、これは、PDGFRAシグナル伝達軸の喪失の際の迅速な筋線維芽細胞変換を示す(図17)。これらのデータに基づいて、PDGFAがリポ線維芽細胞の維持のために必要かつ十分であると仮説を立てた。

20

【0200】

(実施例16)

Runx1は、筋線維形成(myofibrogenic)運命のマスター転写調節因子である

30

リポ線維芽細胞から筋線維芽細胞への移行をもたらすマスター調節因子を決定するために、傷害後条件において優先的に上方調節される転写因子を調べた。複数の臓器における線維化進行に関連付けられることが公知の転写因子であるRunx1は、AEC1アブレーション後およびブレオマイシン傷害後に強く上方調節されることが見出された(図18)。重要なことに、Runx1発現は、AEC1アブレーション、反復AEC1アブレーションおよびPDGFRA欠失を含む、本明細書に記載される線維化傷害モデルの全てのモデルにわたって増加する(図19)。

【0201】

(実施例17)

RUNX1の遺伝学的小および薬理的障害は、TGFbにより誘導される線維形成を遮断する

40

この培養システムを使用して、筋線維形成におけるRunx1の直接的な役割を決定した。培養物中のTGF-Bで処置した野生型リポ線維芽細胞は、aSMAを発現し、PDGFRAを下方調節する。Runx1^{fl}ox/fl^{ox}マウス由来のリポ線維芽細胞を培養し、Adeno-Cre-GFPウイルスを投与したところ、培養物における効率的なRunx1欠失が生じた(図20A)。Runx1欠失の後、TGF-Bを使用して筋線維形成を誘導した。しかし、野生型線維芽細胞とは異なり、Runx1が欠失した線維芽細胞は、aSMAを発現せず、PDGFRA発現を維持し、これは、Runx1が筋線維形成に必要であることを示している(図20B)。遺伝的欠失に加えて、これらの実験を、薬物Ro5-3335によるRunx1の薬理的障害を用いて反復した。リポ線維

50

芽細胞を、R o 5 - 3 3 3 5 および T G F - B の存在下で 4 8 時間培養した。Runx 1 欠失と同様に、R o 5 - 3 3 3 5 で処置したリポ線維芽細胞は、PDGFR A 発現およびそれらの星型形状を維持し、a S M A 発現および筋線維化 (myofibrotic) 変換は事実上存在しなかった。

【0202】

当業者は、本開示が、目的を実行し、言及された目標および利点ならびにその中の固有のものを得るために十分に適合されていることを容易に理解する。本明細書で記載される開示は、好ましい実施形態を目下代表しており、例示的であり、本開示の範囲に対する限定として意図されない。特許請求の範囲によって定義される本開示の精神の範囲内に包含されるその中の変化および他の使用は、当業者に想起される。

【0203】

本明細書で引用される任意の非特許文書または特許文書を含む任意の参考文献が先行技術を構成するという承認は行わない。特に、他に述べられない限り、本明細書の任意の文書に対する言及は、これらの文書のいずれも、米国でも任意の他の国でも、当該分野の共通の一般知識の一部を形成するという承認を構成しないことが理解される。参考文献の任意の議論は、その著者らが何を主張しているかを述べており、出願人は、本明細書で引用された文書のいずれかの正確さおよび適切性に対して異議を申し立てる権利を留保している。本明細書で引用される全ての参考文献は、他が明示的に示されない限り、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0204】

引用された参考文献中に見出される任意の定義および／または記載間に相違が存在する場合には、本開示が支配するものとする。

【図面】

【図 1 - 1】

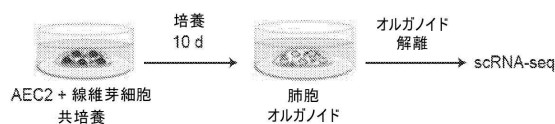


FIG. 1A

【図 1 - 2】

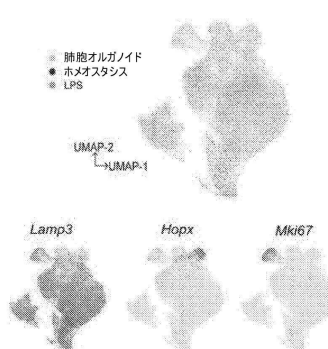


FIG. 1C

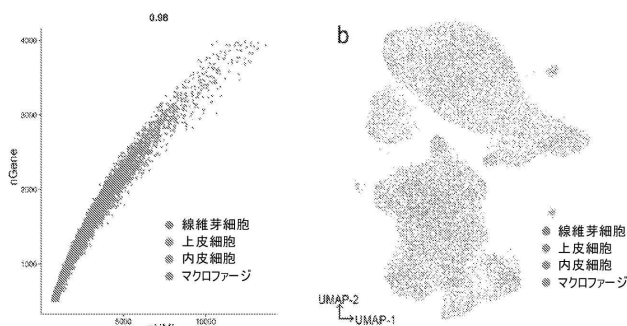


FIG. 1B

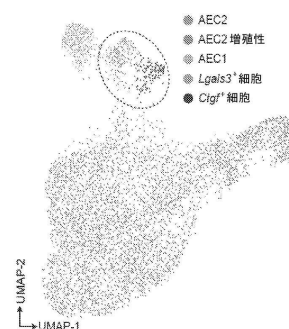


FIG. 1D

10

20

30

40

50

【図 1 - 3】

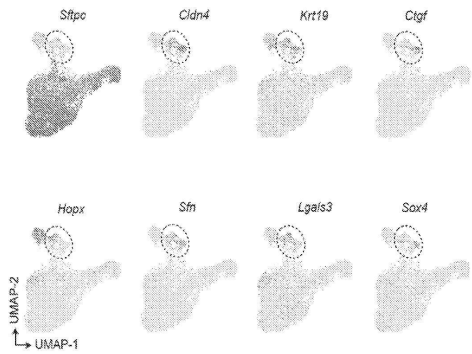


FIG. 1E

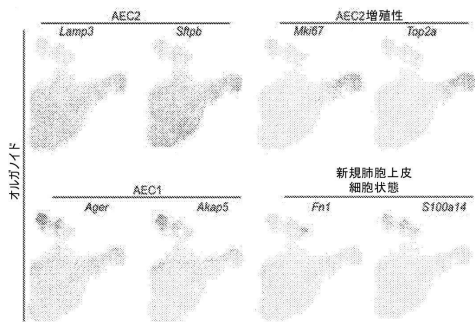


FIG. 1F

【図 1 - 4】

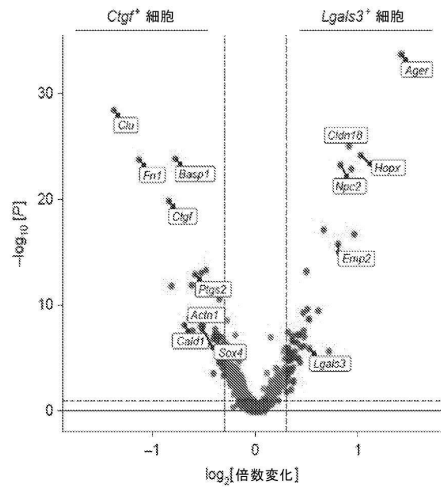


FIG. 1G

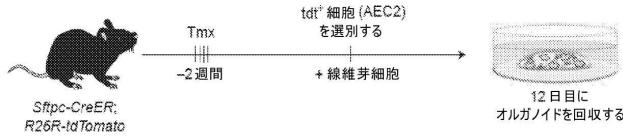


FIG. 1H

【図 2】

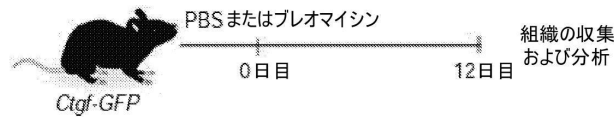


FIG. 2

【図 3】

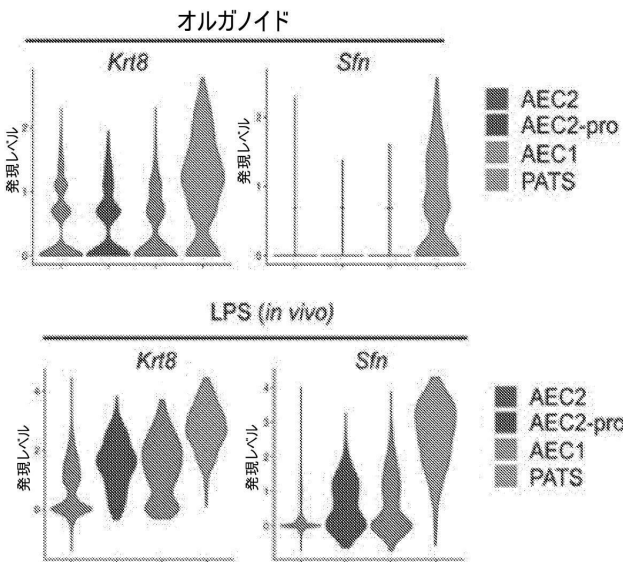


FIG. 3

10

20

30

40

50

【図 4】

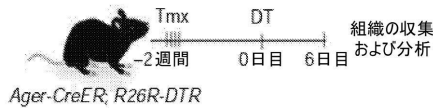


FIG. 4A

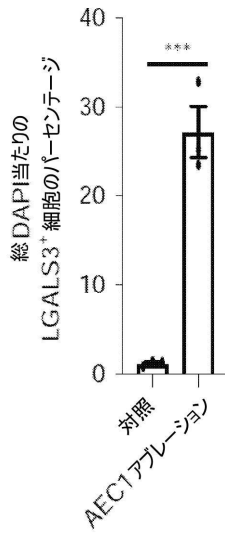


FIG. 4B

【図 5 - 2】

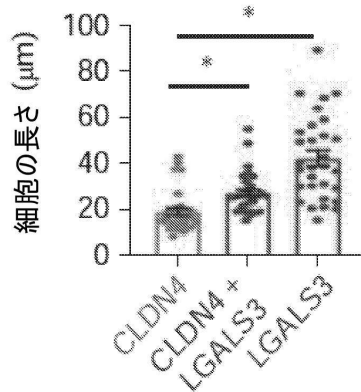


FIG. 5D

【図 5 - 1】

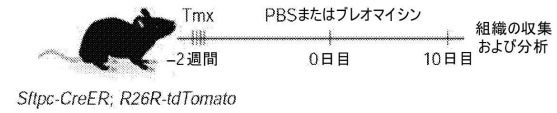


FIG. 5A



FIG. 5B

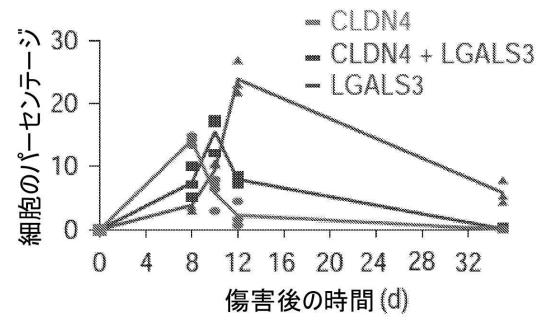


FIG. 5C

【図 5 - 3】

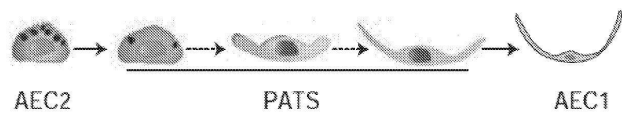


FIG. 5F

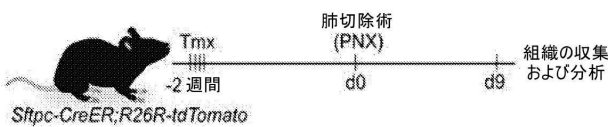


FIG. 5E

10

20

30

40

50

【図 6 - 1】

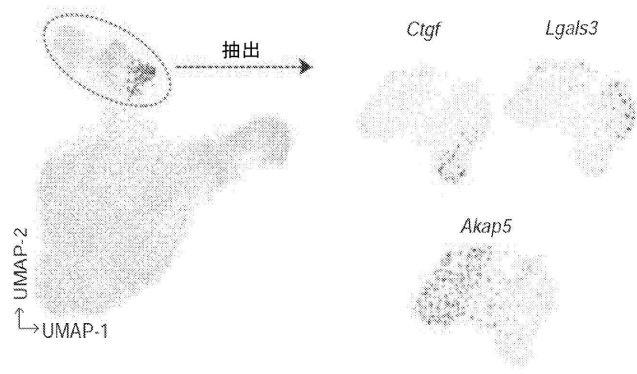


FIG. 6A

FIG. 6B

【図 6 - 2】

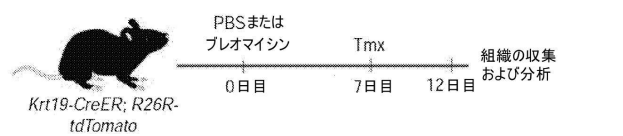


FIG. 6C

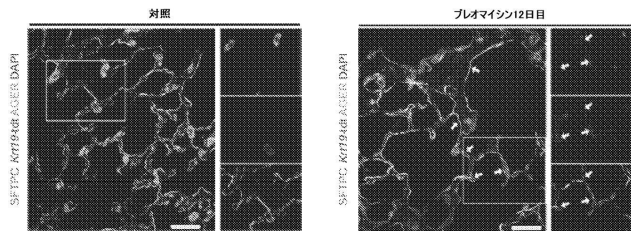


FIG. 6D

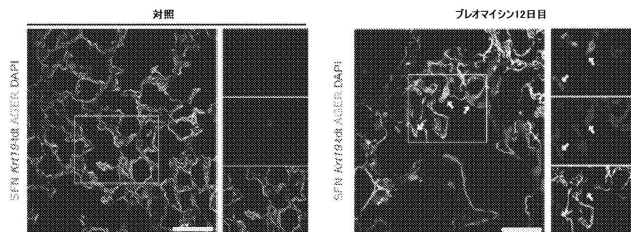


FIG. 6E

【図 6 - 3】

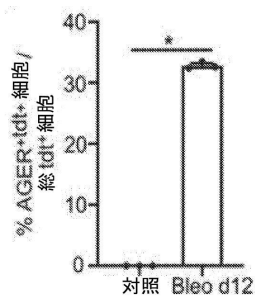


FIG. 6F

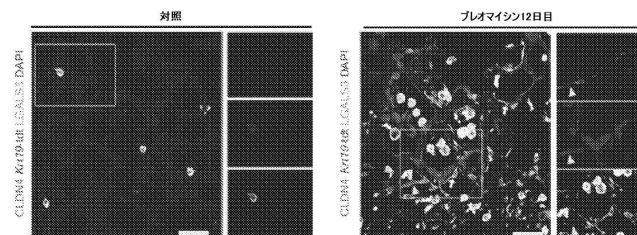


FIG. 6G

【図 6 - 4】

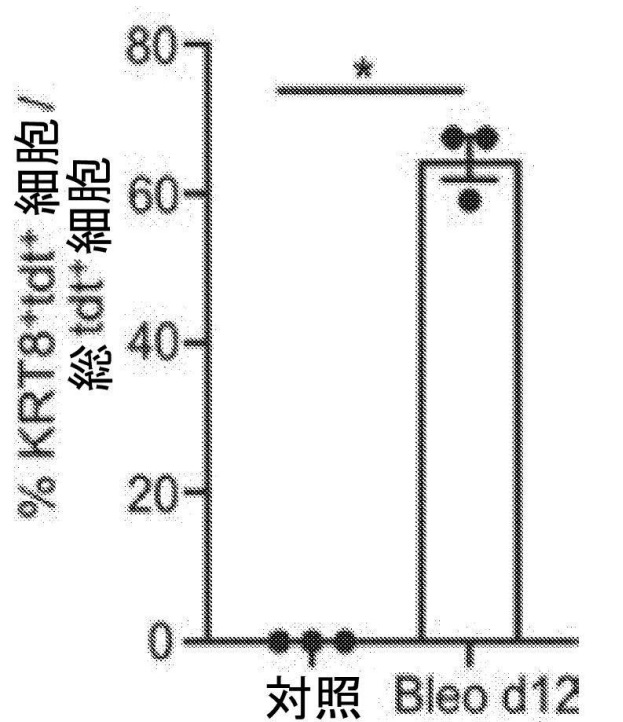


FIG. 6H

10

20

30

40

50

【図 7 - 1】

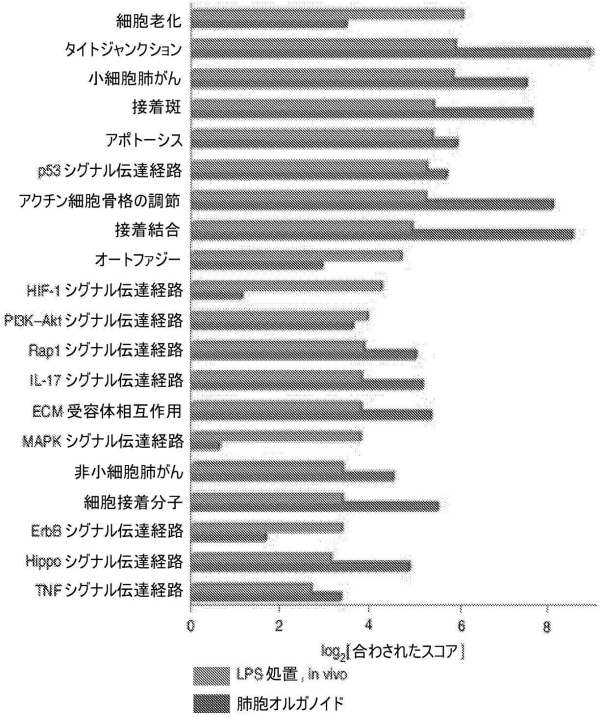


FIG. 7A

【図 7 - 3】

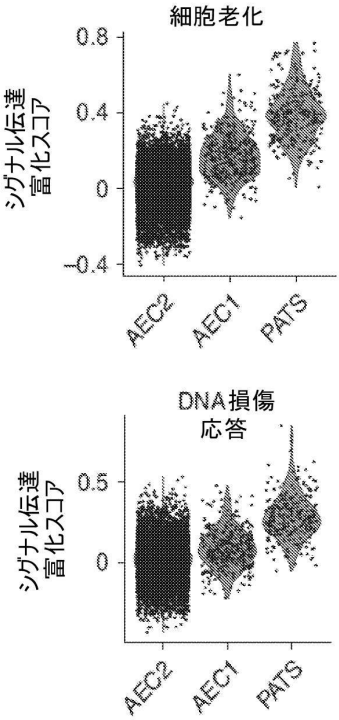


FIG. 7C

【図 7 - 2】

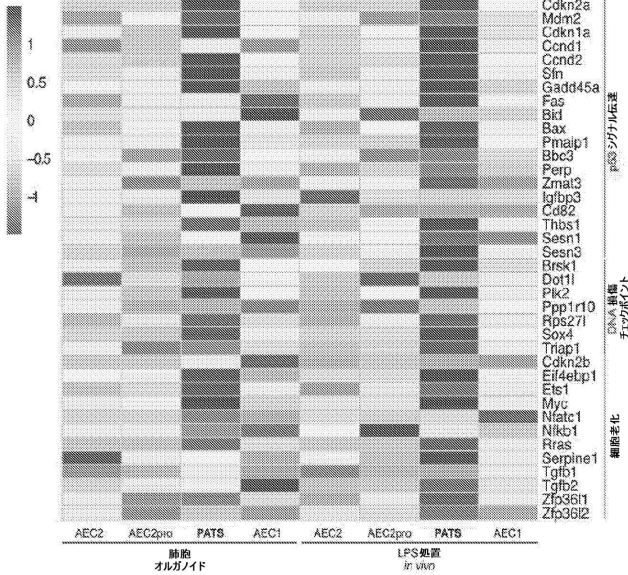


FIG. 7B

【図 8 - 1】

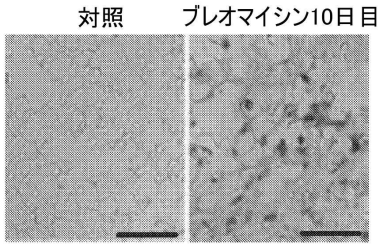


FIG. 8A

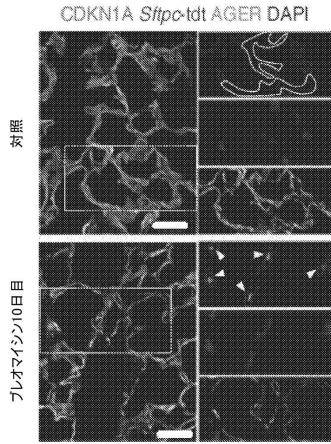


FIG. 8B

【図 8 - 2】

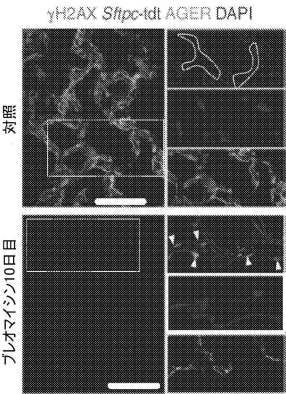


FIG. 8C

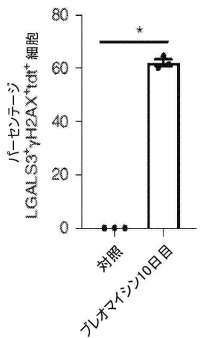


FIG. 8D

【図 8 - 3】

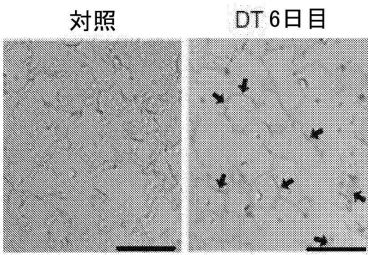


FIG. 8E

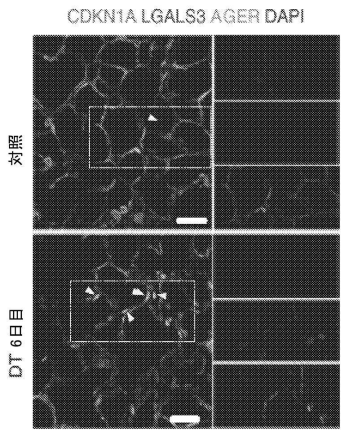


FIG. 8F

【図 8 - 4】

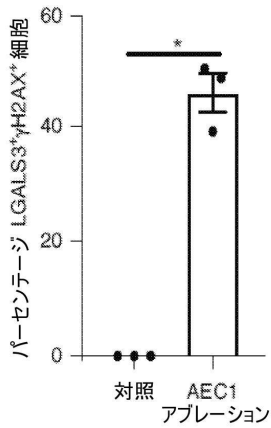


FIG. 8G

【図 8 - 5】

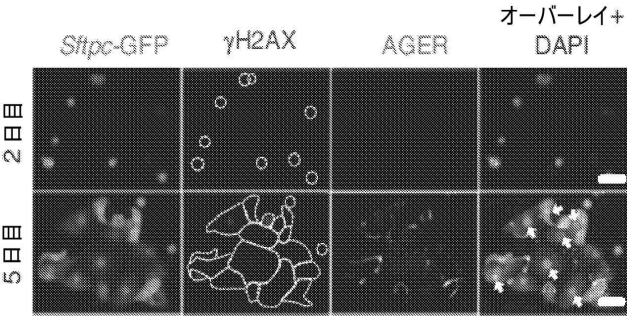


FIG. 8I

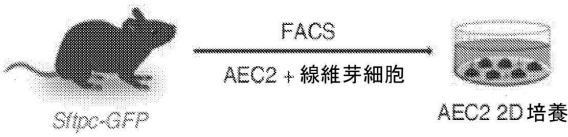


FIG. 8H

10

20

30

40

50

【図 9 - 1】

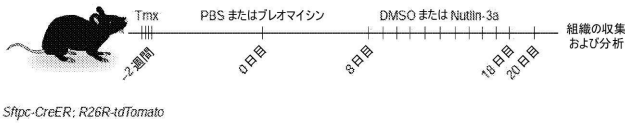


FIG. 9A

【図 9 - 2】

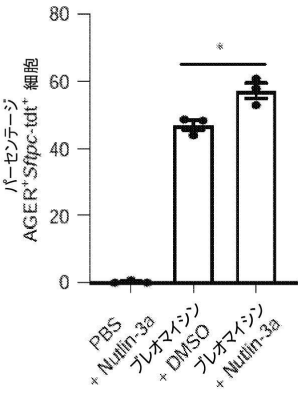


FIG. 9B

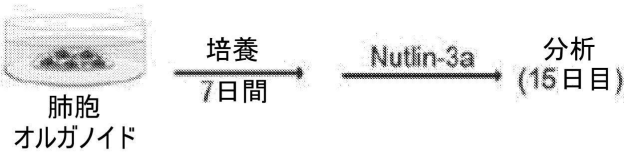


FIG. 9C

【図 9 - 3】

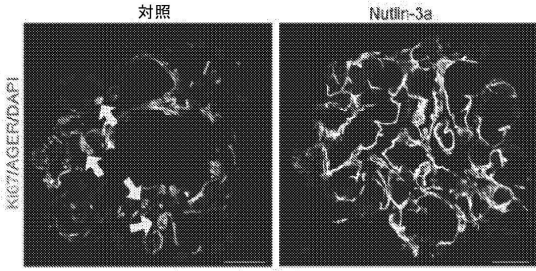


FIG. 9D

【図 9 - 4】

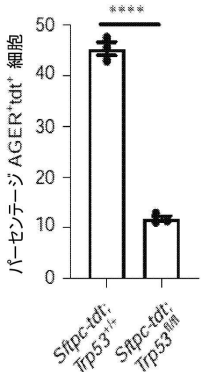


FIG. 9F

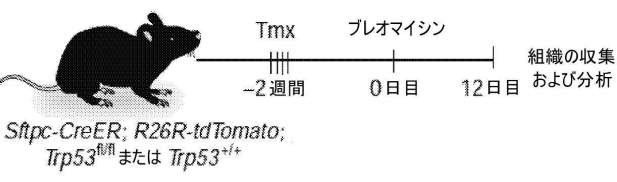


FIG. 9E

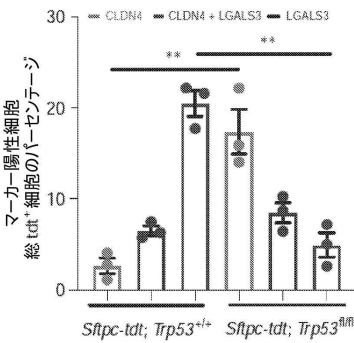


FIG. 9G

10

20

30

40

50

【図 9 - 5】

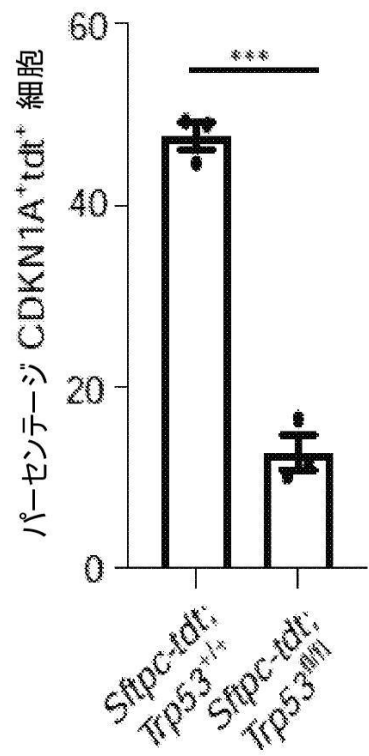


FIG. 9H

【図 1 0 - 1】

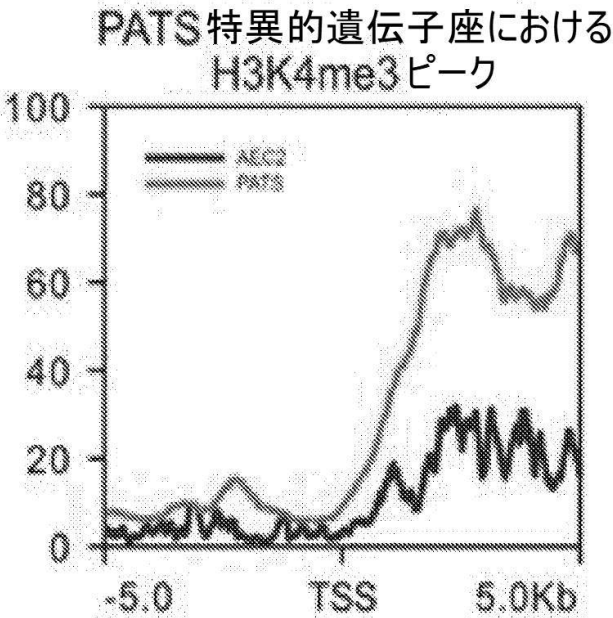


FIG. 10A

【図 1 0 - 2】



FIG. 10B

【図 1 0 - 3】

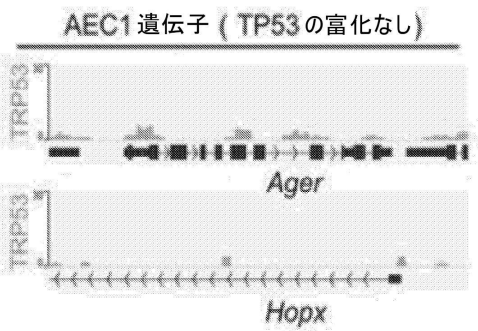


FIG. 10D

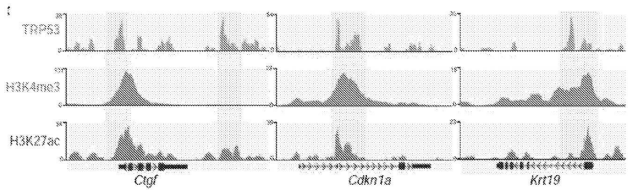


FIG. 10C

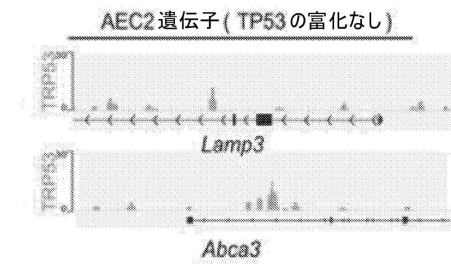


FIG. 10E

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 1】

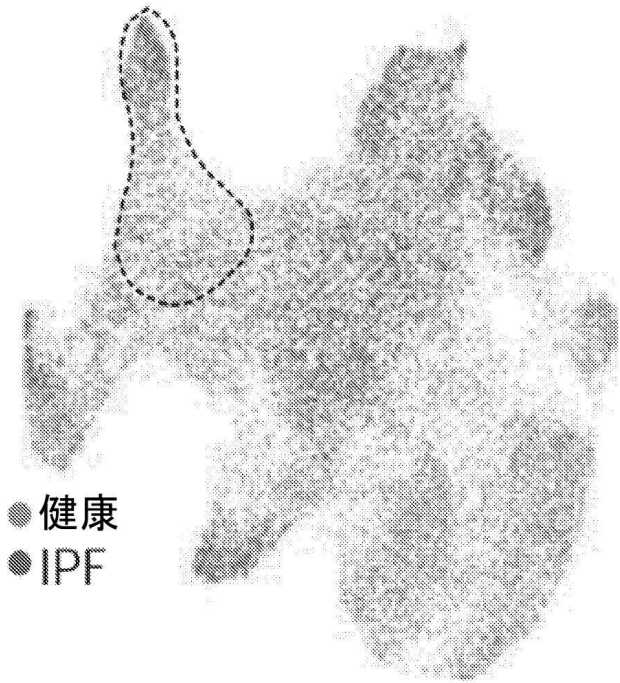


FIG. 11A

【図 1 1 - 2】

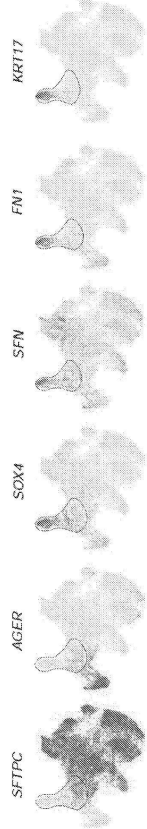


FIG. 11B

【図 1 1 - 3】

IPF肺に対するヘマトキシリンおよびエオシン染色

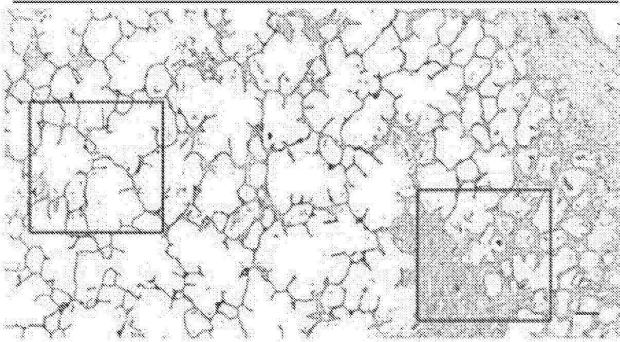


FIG. 11C

【図 1 1 - 4】

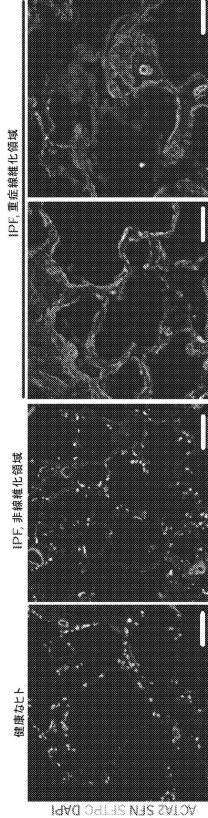


FIG. 11D

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 5】

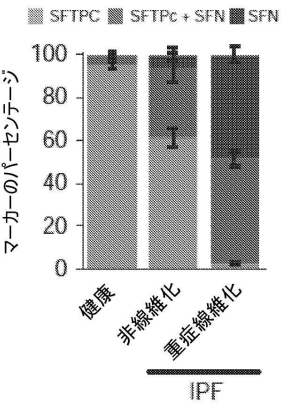


FIG. 11E

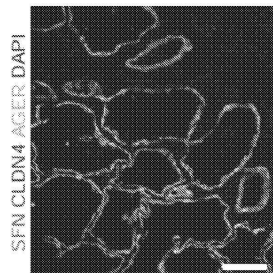


FIG. 11F

【図 1 1 - 6】

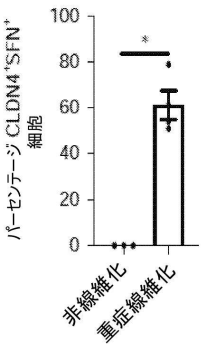


FIG. 11G

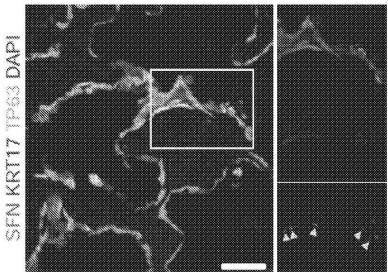


FIG. 11H

【図 1 1 - 7】

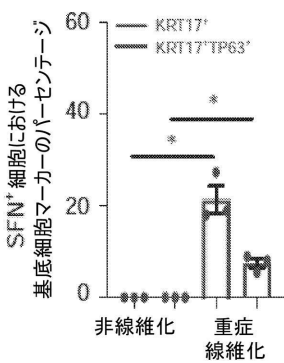


FIG. 11I

【図 1 1 - 8】

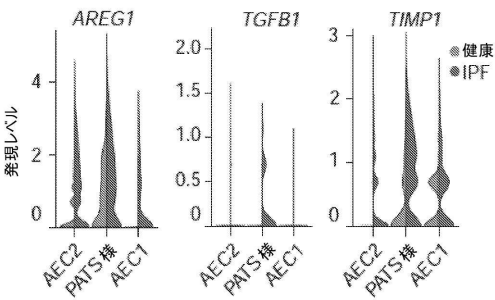


FIG. 11K

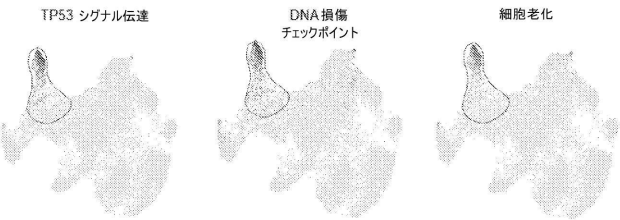


FIG. 11J

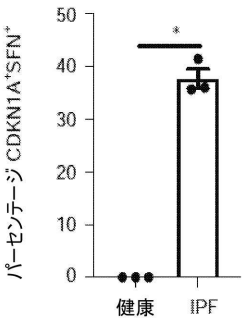


FIG. 11L

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 9】

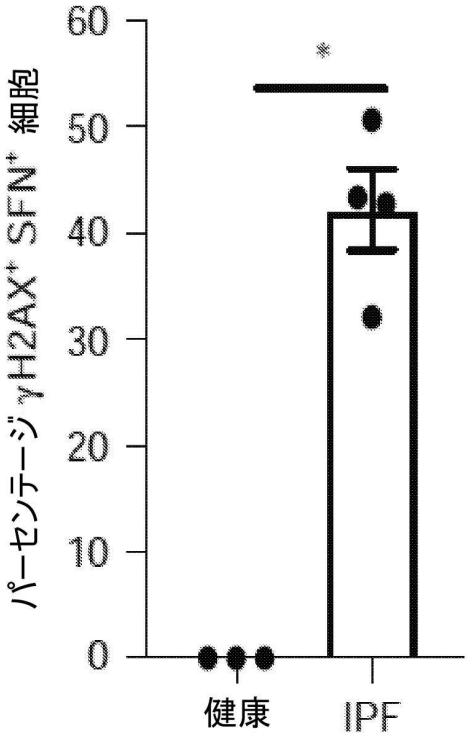


FIG. 11M

【図 1 2】

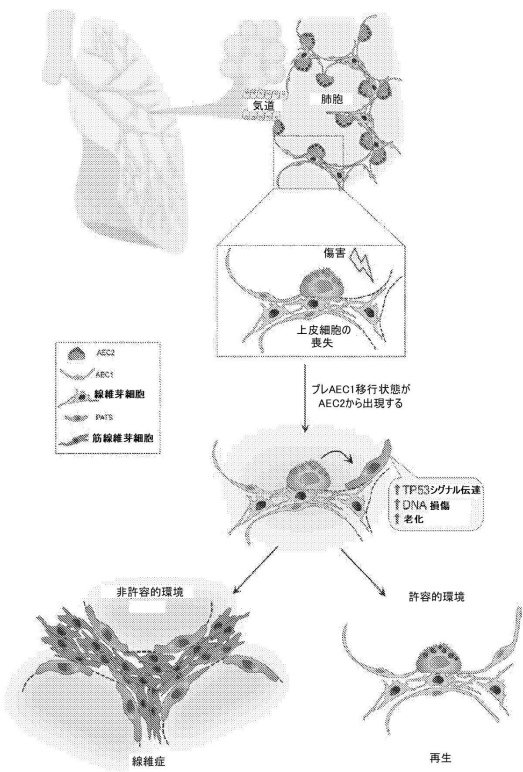


FIG. 12

【図 1 3】



FIG. 13A

【図 1 4 - 1】

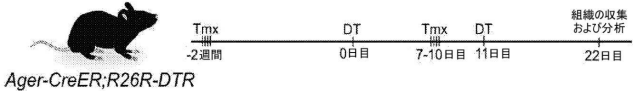


FIG. 14A

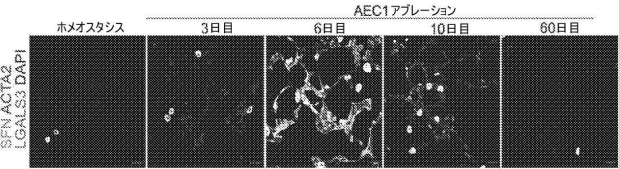


FIG. 13B

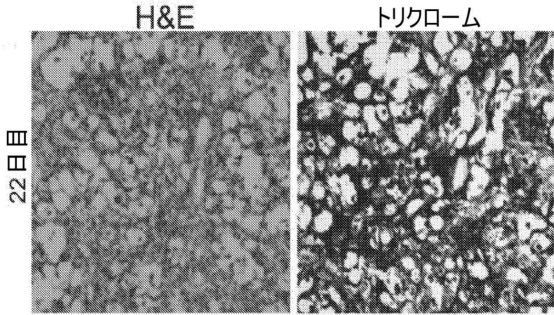


FIG. 14B

10

20

30

40

50

【図 1 4 - 2】

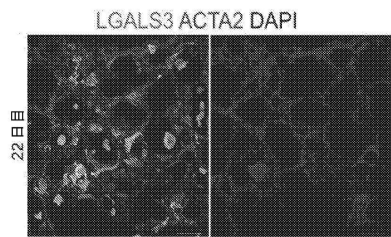


FIG. 14C

【図 1 4 - 3】

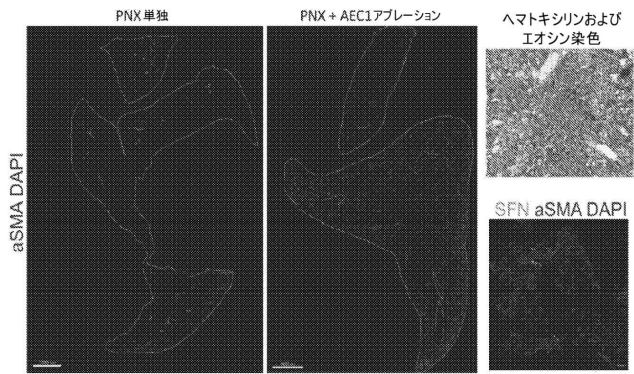


FIG. 14E

10

20

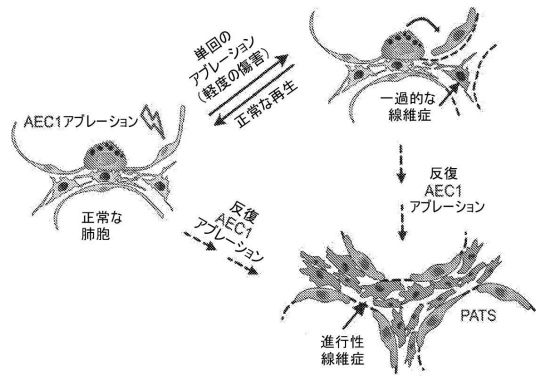


FIG. 14D

【図 1 5】

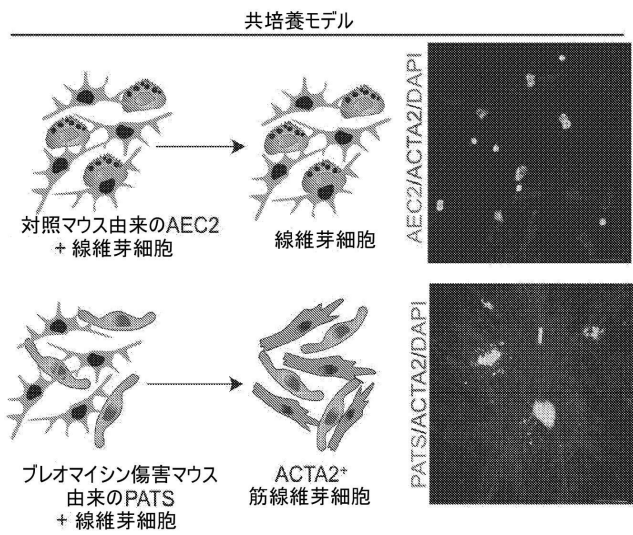


FIG. 15

【図 1 6】

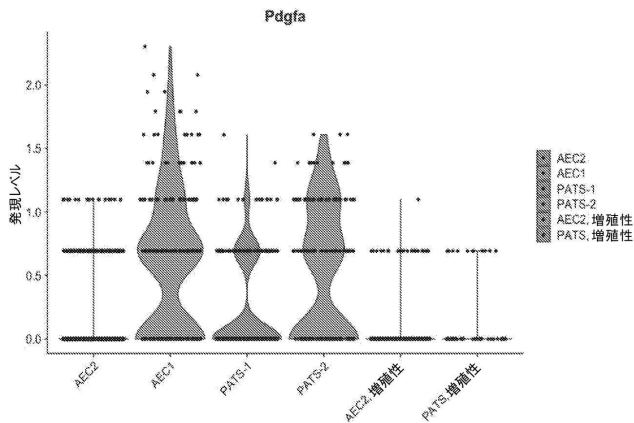


FIG. 16

30

40

50

【図 17】

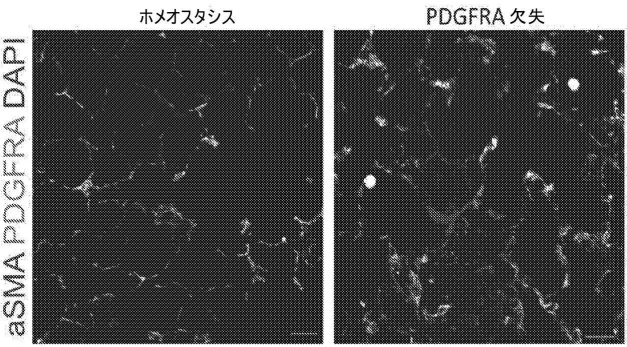


FIG. 17

【図 18】

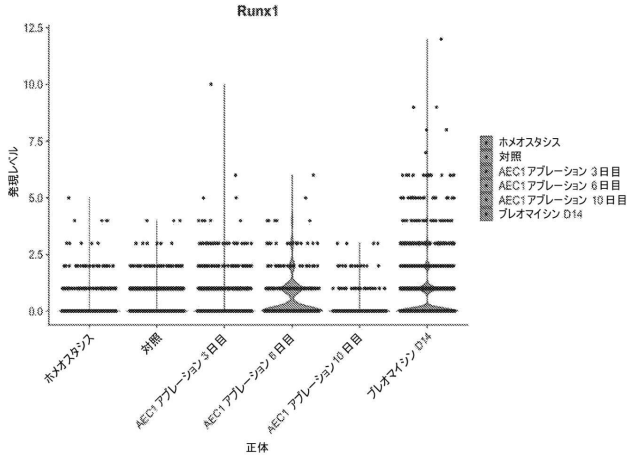


FIG. 18

【図 19】

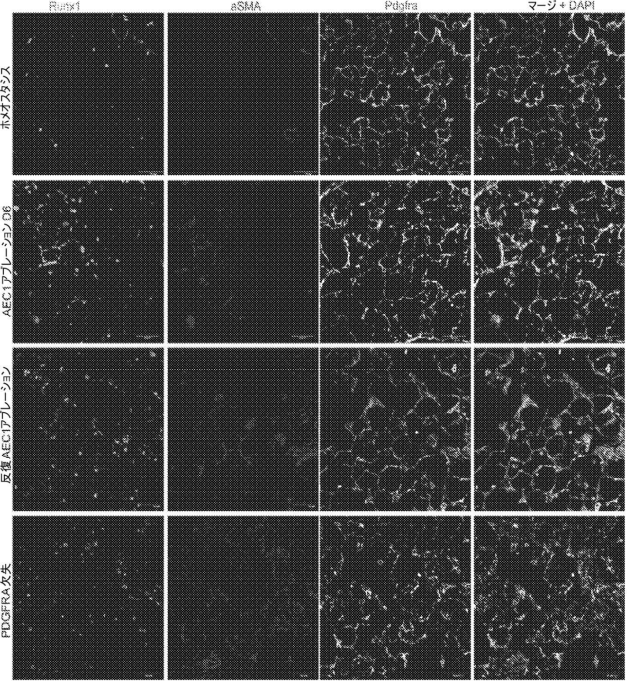


FIG. 19

【図 20】

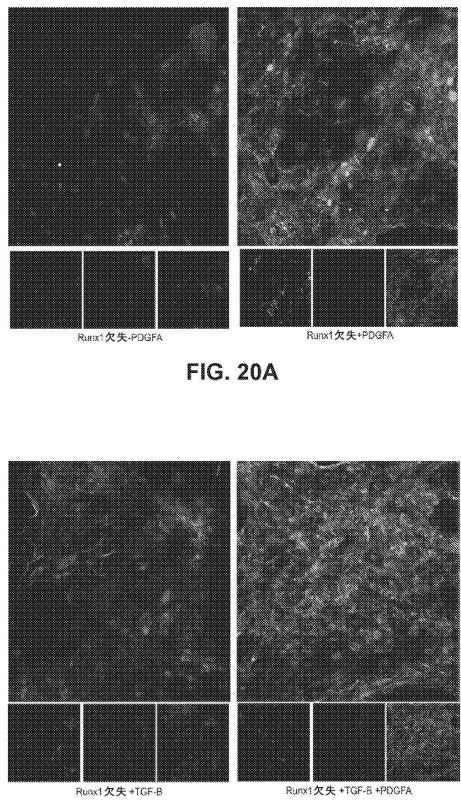


FIG. 20A

FIG. 20B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/42, A61K 45/06, A61P 11/00 (2021.01)

CPC - C12N 5/0689, C12N 5/0688, A61L 2430/40, C12N 2506/02, C12N 2501/16

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BARKAUSKAS et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. J Clin Invest., July 2013, vol 123, no 7, pp 3025-3036. Especially abstract, pg 3032, col 1, para 2, pg 3032, col 1, para 2, pg 3025, col 2, para 4, pg 3026, col 2, para 5, pg 3034, col 1, para 2-3, pg 3034, col 2 para 1-2, pg 3035, col 2, para 3, Fig. 1 legend, Fig. 4 F, Figure 7	1-12, 21-29
Y	BARKAUSKAS et al. Lung organoids: current uses and future promise Development, March 2017, vol 144, no 6, pp 986-997. Especially pg 988, col 2 para 1, pg 991, box 1 text, pg 991, col 1, para 2 - col 2, para 1, pg 992, col 2, para 2, Fig. 4 Table 3	1-12, 21-29
Y	MCCAULEY et al. Single-Cell Transcriptomic Profiling of Pluripotent Stem Cell-Derived SCGB3A2+ Airway Epithelium. Stem Cell Reports. 8 May 2018, vol 10, No 5, pp 1579-1595. Especially abstract, pg 1584, col 2, para 2, pg 1584, col 2, para 2, pg 1588, col 2, para 3, Figs 6-7	21-29
Y	SHIMIZU et al. Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, September 2000, vol 279, no 3, pp L503-510. Especially abstract, Fig. 6	9-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2021

Date of mailing of the international search report

08 FEB 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53164

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

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

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

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-12 and 21-29, directed to a method of generating a lung injury organoid model with cells identified as pre-alveolar type -1 transitional cell state (PATs) cells and alveolar fibroblasts

Group II: Claims 13-20, directed to a method of generating an ex vivo model for lung fibrosis using AEC1 cells that have undergone ablation.

Group III: Claims 30-37, directed to method of generating an in vivo tissue fibrosis model by introducing a genetic loss of PDGF ligands and/or PDGFR.

*****Continued in Supplemental Box*****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12, 21-29

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 31/4439(2006.01)
 A 6 1 K 39/395(2006.01)
 C 1 2 Q 1/04 (2006.01)
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)

A 6 1 K 31/4439
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 C 1 2 Q 1/04
 G 0 1 N 33/50
 C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 16/18

D
 N
 Z

4 C 0 8 6
 4 H 0 4 5

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

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 7 0 5 , ダーラム, アーウィン ロード 2 8 1 2

(72)発明者 コンキマラ, アルビン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 7 0 5 , ダーラム, アーウィン ロード 2 8 1 2

(72)発明者 小林 芳彦

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 7 0 5 , ダーラム, アーウィン ロード 2 8 1 2

F ターム (参考)

2G045 AA40 CB01 CB09 CB26 DA36 DA37 FB13
 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QR48 QS32 QS33 QX02
 4B065 AA90X AC20 BB04 CA44 CA46
 4C084 AA17 NA14 ZA591 ZB211 ZC412
 4C085 AA13 BB11
 4C086 AA02 BC39 BC56 GA07 GA08 MA01 MA05 NA14 ZA59 ZB21
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50