(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-508298
(P2020-508298A)
(43)公表日　令和2年3月19日(2020.3.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 35/12	(2015.01)	A61K	35/12		4B065
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C084
A61K 35/15	(2015.01)	A61K	35/15	Z	4C087
A61K 35/35	(2015.01)	A61K	35/35		
A61K 35/407	(2015.01)	A61K	35/407		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 52 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-543979 (P2019-543979)
(86)(22)出願日　平成30年2月20日 (2018.2.20)
(85)翻訳文提出日　令和1年10月10日 (2019.10.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/018684
(87)国際公開番号　WO2018/152488
(87)国際公開日　平成30年8月23日 (2018.8.23)
(31)優先権主張番号　62/460,267
(32)優先日　平成29年2月17日 (2017.2.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/574,119
(32)優先日　平成29年10月18日 (2017.10.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　501102988
ユニバーシティ　オブ　ピッツバーグ　－　オブ　ザ　コモンウェルス　システム　オブ　ハイヤー　エデュケイション
アメリカ合衆国　ペンシルベニア州　１５２６０、ピッツバーグ、サッカレイ　アベニュー　１３０、ガードナー　スティール　カンファレンス　センター　ファースト　フロア
1st Floor Gardner Steel Conference Center, 130 Thackeray Avenue, Pittsburgh PA 15260, United States of America
最終頁に続く

(54)【発明の名称】移植、組織再生、器官形成及び複数の組織に対する機能のための部位としての脂肪関連リンパ球集積（ｆａｔ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｌｙｍｐｈｏｉｄ　ｃｌｕｓｔｅｒ）

(57)【要約】
本開示は、機能的異所性組織を生成するために使用することができる、脂肪関連リンパ球集積(「FALC」又は「乳斑」)における細胞の生着及び増殖に関する。本開示は、リンフォトキシンベータ受容体(LTβR)及び/又はNF-κB誘導性キナーゼ(NIK)シグナル伝達経路を活性化することによって、FALCにおいて、細胞をグラフトし増殖させるための方法及び組成物をさらに提供する。本開示は、FALC(乳斑)において異所性肝臓組織を確立するため及び治療的有益性のためにこのような異所性肝臓組織を使用するための方法及び組成物も提供し、治療的有益性のために対象に使用することができる、FALCにおける異所性腎臓組織を生成するための方法及び組成物も提供する。
【選択図】図１

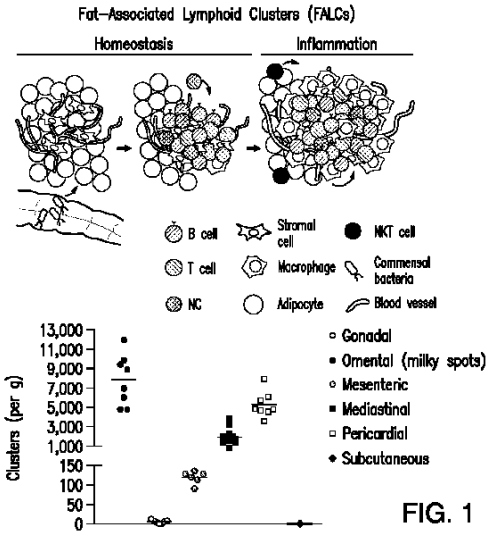


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象において異所性組織を生成する方法であって、対象の脂肪関連リンパ球集積に1つ以上の細胞を導入すること、及び異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を提供することを含む、方法。
【請求項２】
異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤が、骨髄由来細胞、間質細胞又は両方を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
1つ以上の薬剤が、間質細胞を含む、請求項1又は2に記載の方法。
【請求項４】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項2又は3に記載の方法。
【請求項５】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項2、3又は4のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
間質細胞が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せで処置される、請求項2から5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
アクチベーターが、LTβR、NIK又はこれらの組合せのアクチベーターである、請求項6に記載の方法。
【請求項８】
アクチベーターが、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターである、請求項6に記載の方法。
【請求項９】
LTβRシグナル伝達経路、NIKシグナル伝達経路、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路又はこれらの組合せの活性化によって、1つ以上の細胞の増殖、異所性組織の血管形成又はこれらの組合せが促進される、請求項6、7又は8のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤が、炎症を促進する薬剤を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項11に記載の方法。
【請求項１３】
炎症が、対象の脂肪関連リンパ球集積に1つ以上の細胞を導入する前に誘導される、請求項10から12のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
1つ以上の細胞が肝細胞を含み、異所性組織が異所性肝臓組織を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
1つ以上の細胞が、腎細胞、1つ以上の腎臓組織断片又はこれらの組合せを含み、異所性組織が異所性腎臓組織を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
脂肪関連リンパ球集積が、対象の大綱、腸間膜、脾臓、門脈及び/又は生殖腺の脂肪などの、胸膜腔、囲心腔及び/又は腹膜腔の脂肪組織に位置する、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７】
肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の肝細胞を投与すること、及び対象の脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成を促進することを含む、方法。
【請求項１８】
脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成が、脂肪関連リンパ球集積の解剖学的領域に局所的に肝細胞を投与することによって促進される、請求項17に記載の方法。
【請求項１９】
脂肪関連リンパ球集積が、対象の大網、腸間膜、脾臓、門脈及び/又は生殖腺の脂肪に位置する、請求項17又は18に記載の方法。
【請求項２０】
脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成が、1つ以上の骨髄由来細胞又は間質細胞の同時投与によって促進される、請求項17から19のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
間質細胞が同時投与される、請求項20に記載の方法。
【請求項２２】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項20又は21に記載の方法。
【請求項２３】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項20から22のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せの同時投与によって促進される、請求項17から23のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成が、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される、請求項17から24のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項17から24のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項26に記載の方法。
【請求項２８】
炎症が、肝細胞を投与する前に誘導される、請求項26又は27に記載の方法。
【請求項２９】
脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって促進される、請求項17から25のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
肝細胞を投与する前に、対象に炎症を促進する薬剤が投与される、請求項29に記載の方法。
【請求項３１】
異所性肝臓を生成する方法であって、脂肪関連リンパ球集積中に1つ以上の肝細胞を導入すること、及び異所性肝臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法。
【請求項３２】
インビボで実施される、請求項31に記載の方法。
【請求項３３】
インビトロで実施される、請求項31に記載の方法。

【請求項３４】
異所性肝臓組織の形成を促進する薬剤が、骨髄由来細胞、間質細胞、又はこれらの組合せを含む、請求項31、32又は33のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
薬剤が、間質細胞を含む、請求項34に記載の方法。
【請求項３６】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項34又は35に記載の方法。
【請求項３７】
間質細胞が、1つのポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項34、35又は36のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
間質細胞が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せで処置される、請求項34から37のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
異所性組織の形成を促進する薬剤が、LTβRシグナル伝達経路、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター、炎症を促進する薬剤又はこれらの組合せを含む、請求項31から38のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
炎症を誘導することをさらに含む、請求項31から38のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
炎症が、炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項40に記載の方法。
【請求項４２】
腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の腎細胞、腎臓組織断片又はこれらの組合せを投与すること、及び対象の脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成を促進することを含む、方法。
【請求項４３】
脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成が、脂肪関連リンパ球集積の解剖学的領域に局所的に腎細胞を投与することによって促進される、請求項42に記載の方法。
【請求項４４】
脂肪関連リンパ球集積が、対象の大網、腸間膜、脾臓、門脈及び生殖腺の脂肪に位置する、請求項42又は43に記載の方法。
【請求項４５】
脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成が、1つ以上の骨髄由来細胞、間質細胞又はこれらの組合せの同時投与によって促進される、請求項42から44のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
間質細胞が、同時投与される、請求項45に記載の方法。
【請求項４７】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項45又は46に記載の方法。
【請求項４８】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項45から47のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せの同時投与によって促進される、請求項42から48のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成が、非カノニカルNF-κBシグナル

伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される、請求項42から49のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成が、炎症を促進する薬剤を投与することによって促進される、請求項42から50のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
腎細胞、腎臓組織断片又はこれらの組合せを投与する前に、炎症を促進する薬剤が投与される、請求項51に記載の方法。
【請求項５３】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項42から50のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項53に記載の方法。
【請求項５５】
炎症が、対象の脂肪関連リンパ球集積に1つ以上の細胞を導入する前に誘導される、請求項51から54のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
異所性腎臓組織を生成する方法であって、脂肪関連リンパ球集積に1つ以上の腎細胞、腎臓組織断片、又はこれらの組合せを導入すること、及び異所性腎臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法。
【請求項５７】
インビボで実施される、請求項56に記載の方法。
【請求項５８】
インビトロで実施される、請求項56に記載の方法。
【請求項５９】
異所性肝臓組織の形成を促進する薬剤が、骨髄由来細胞、間質細胞又はこれらの組合せを含む、請求項56、57又は58のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
薬剤が、間質細胞を含む、請求項59に記載の方法。
【請求項６１】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項59又は60に記載の方法。
【請求項６２】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項59、60又は61に記載の方法。
【請求項６３】
間質細胞が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せで処置される、請求項59から62のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
異所性組織の形成を促進する薬剤が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター、炎症を促進する薬剤又はこれらの組合せを含む、請求項56から63のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項56から63のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項65に記載の方法。
【請求項６７】

対象において異所性腎臓組織を生成する方法であって、対象の脂肪関連リンパ球集積に1つ以上の腎細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβRシグナル伝達経路、NIKシグナル伝達経路又はこれらの組合せの活性化によって、異所性腎臓組織の形成が促進される、方法。

【請求項６８】

対象において異所性肝臓組織を生成する方法であって、対象の脂肪関連リンパ球集積に1つ以上の肝細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβRシグナル伝達経路、NIKシグナル伝達経路又はこれらの組合せの活性化によって、異所性肝臓組織の形成が促進される、方法。

【請求項６９】

複数の細胞及び異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を含む、異所性組織を生成するための組成物。

【請求項７０】

複数の肝細胞及び異所性肝臓の形成を促進する1つ以上の薬剤を含む、異所性肝臓組織を生成するための組成物。

【請求項７１】

複数の腎細胞及び異所性腎臓の形成を促進する1つ以上の薬剤を含む、異所性腎臓組織を生成するための組成物。

【請求項７２】

1つ以上の薬剤が、複数の骨髄由来細胞、複数の間質細胞又はこれらの組合せを含む、請求項69、70又は71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７３】

間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項72に記載の組成物。

【請求項７４】

1つ以上の薬剤が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せを含む、請求項69、70又は71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７５】

1つ以上の薬剤が、炎症を促進する薬剤を含む、請求項69、70又は71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７６】

1つ以上の薬剤が、(a)複数の骨髄由来細胞、複数の間質細胞若しくはこれらの組合せ、(b)LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター若しくはこれらの組合せ、又は(c)炎症を促進する薬剤のうちの2つ以上を含む、請求項69、70又は71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７７】

合成培養培地をさらに含む、請求項69から76のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７８】

請求項69から77のいずれか一項に記載の組成物を含むキット。

【請求項７９】

対象において異所性腎臓組織を生成する方法であって、対象の脂肪関連リンパ球集積に有効量の腎細胞、腎臓組織断片又はこれらの組合せを導入することを含む、方法。

【請求項８０】

腎細胞が、胚腎臓、後腎から単離される細胞、インビトロで形成された腎臓オルガノイドから単離された細胞又はこれらの任意の組合せを含む、請求項79に記載の方法。

【請求項８１】
肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の肝細胞を投与すること、及び対象のリンパ節における異所性肝臓組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を提供することを含み、1つ以上の薬剤が、(a)複数の骨髄由来細胞、複数の間質細胞、若しくはこれらの組合せ、(b)LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター若しくはこれらの組合せ、又は(c)炎症を促進する薬剤のうちの2つ以上を含む、方法。
【請求項８２】
腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の腎細胞、腎臓組織断片、又はこれらの組合せを投与すること、及び対象のリンパ節における異所性腎臓組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を提供することを含み、1つ以上の薬剤が、(a)複数の骨髄由来細胞、複数の間質細胞、若しくはこれらの組合せ、(b)LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター若しくはこれらの組合せ、又は(c)炎症を促進する薬剤のうちの2つ以上を含む、方法。
【請求項８３】
対象において異所性組織を生成する方法であって、対象のリンパ節中に1つ以上の細胞を導入すること、及び異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を提供することを含む、方法。
【請求項８４】
異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤が、骨髄由来細胞、間質細胞又は両方を含む、請求項83に記載の方法。
【請求項８５】
1つ以上の薬剤が、間質細胞を含む、請求項83又は84に記載の方法。
【請求項８６】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項83、84又は85のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項84、85又は86のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
間質細胞が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せで処置される、請求項84から87のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９】
異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せである、請求項83から88のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０】
アクチベーターが、LTβR、NIK又はこれらの組合せのアクチベーターである、請求項88又は89に記載の方法。
【請求項９１】
アクチベーターが、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターである、請求項88又は89に記載の方法。
【請求項９２】
LTβRシグナル伝達経路の活性化、NIKシグナル伝達経路の活性化、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路の活性化又はこれらの組合せによって、1つ以上の細胞の増殖、異所性組織の血管形成又はこれらの組合せが促進される、請求項88、89、90又は91のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤が、炎症を促進する薬剤を含む、請求項83から92のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項83から92のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９５】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項94に記載の方法。
【請求項９６】
炎症が、対象のリンパ節に1つ以上の細胞を導入する前に誘導される、請求項93から95のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７】
1つ以上の細胞が肝細胞を含み、異所性組織が異所性肝臓組織を含む、請求項83から96のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９８】
1つ以上の細胞が、腎細胞、1つ以上の腎臓組織断片又はこれらの組合せを含み、異所性組織が異所性腎臓組織を含む、請求項83から96のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９】
肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の肝細胞を投与すること、及び対象のリンパ節における異所性肝臓組織の形成を促進することを含む、方法。
【請求項１００】
リンパ節における異所性肝臓組織の形成が、リンパ節の解剖学的領域に局所的に肝細胞を投与することによって促進される、請求項99に記載の方法。
【請求項１０１】
リンパ節における異所性肝臓組織の形成が、1つ以上の骨髄由来細胞又は間質細胞の同時投与によって促進される、請求項99又は100に記載の方法。
【請求項１０２】
間質細胞が、同時投与される、請求項101に記載の方法。
【請求項１０３】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項101又は102に記載の方法。
【請求項１０４】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項101から103のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０５】
リンパ節における異所性肝臓組織の形成が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せの同時投与によって促進される、請求項99から104のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０６】
リンパ節における異所性肝臓組織の形成が、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される、請求項99から105のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０７】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項99から106のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０８】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤の対象を投与することによって誘導される、請求項107に記載の方法。
【請求項１０９】
炎症が、肝細胞を投与する前に誘導される、請求項107又は108に記載の方法。
【請求項１１０】
リンパ節における異所性肝臓組織の形成が、対象に炎症を促進する薬剤を投与すること

によって促進される、請求項99から106のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１１】
肝細胞を投与する前に、対象に炎症を促進する薬剤が投与される、請求項110に記載の方法。
【請求項１１２】
リンパ節中に1つ以上の肝細胞を導入すること、及び異所性肝臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、異所性肝臓を生成する方法。
【請求項１１３】
インビボで実施される、請求項112に記載の方法。
【請求項１１４】
インビトロで実施される、請求項112に記載の方法。
【請求項１１５】
異所性肝臓組織の形成を促進する薬剤が、骨髄由来細胞、間質細胞又はこれらの組合せを含む、請求項112、113又は114のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１６】
薬剤が、間質細胞を含む、請求項115に記載の方法。
【請求項１１７】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項115又は116に記載の方法。
【請求項１１８】
間質細胞が、1つのポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項115、116又は117のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１９】
間質細胞が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せで処置される、請求項115から118のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２０】
異所性組織の形成を促進する薬剤が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター、炎症を促進する薬剤又はこれらの組合せを含む、請求項112から119のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２１】
炎症を誘導することをさらに含む、請求項112から119のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２２】
炎症が、炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項121に記載の方法。
【請求項１２３】
腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の腎細胞、腎臓組織断片又はこれらの組合せを投与すること、及び対象のリンパ節における異所性腎臓組織の形成を促進することを含む、方法。
【請求項１２４】
リンパ節における異所性腎臓組織の形成が、リンパ節の解剖学的領域に局所的に腎細胞を投与することによって促進される、請求項123に記載の方法。
【請求項１２５】
リンパ節における異所性腎臓組織の形成が、骨髄由来細胞、間質細胞又はこれらの組合せの同時投与によって促進される、請求項123又は124に記載の方法。
【請求項１２６】
間質細胞が、同時投与される、請求項125に記載の方法。
【請求項１２７】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項125又は126に記載の方法。
【請求項１２８】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項125か

ら127のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２９】
リンパ節における異所性腎臓組織の形成が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せの同時投与によって促進される、請求項123から128のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３０】
リンパ節における異所性腎臓組織の形成が、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される、請求項123から129のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３１】
リンパ節における異所性腎臓組織の形成が、炎症を促進する薬剤を投与することによって促進される、請求項123から130のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３２】
腎細胞、腎臓組織断片又はこれらの組合せを投与する前に、炎症を促進する薬剤が投与される、請求項131に記載の方法。
【請求項１３３】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項123から131のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３４】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項133に記載の方法。
【請求項１３５】
炎症が、対象のリンパ節に1つ以上の細胞を導入する前に誘導される、請求項131から134のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３６】
異所性腎臓組織を生成する方法であって、リンパ節に1つ以上の腎細胞、腎臓組織断片又はこれらの組合せを導入すること、及び異所性腎臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法。
【請求項１３７】
インビボで実施される、請求項136に記載の方法。
【請求項１３８】
インビトロで実施される、請求項136に記載の方法。
【請求項１３９】
異所性肝臓組織の形成を促進する薬剤が、骨髄由来細胞、間質細胞、又はこれらの組合せを含む、請求項136、137又は138のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４０】
薬剤が、間質細胞を含む、請求項139に記載の方法。
【請求項１４１】
間質細胞が、線維芽細胞を含む、請求項139又は140に記載の方法。
【請求項１４２】
間質細胞が、ポドプラニン、NIK、LTβR又はこれらの組合せを発現する、請求項139、140又は141のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４３】
間質細胞が、LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せで処置される、請求項139から142のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４４】
異所性組織の形成を促進する薬剤が、LTβRシグナル伝達経路、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター、炎症を促進する薬剤又はこれらの組合せを含む、請求項136から143のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４５】
対象において炎症を誘導することをさらに含む、請求項136から142のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４６】
炎症が、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される、請求項145に記載の方法。
【請求項１４７】
対象において異所性腎臓組織を生成する方法であって、対象のリンパ節に1つ以上の腎細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβRシグナル伝達経路の活性化、NIKシグナル伝達経路の活性化又はこれらの組合せが、異所性腎臓組織の形成を促進する、方法。
【請求項１４８】
対象において異所性肝臓組織を生成する方法であって、対象のリンパ節に1つ以上の肝細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβRシグナル伝達経路の活性化、NIKシグナル伝達経路の活性化又はこれらの組合せによって、異所性肝臓組織の形成が促進される、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権の情報
本出願は、2017年2月17日に出願された米国仮特許出願第62/460,267号、及び2017年10月18日に出願された米国仮特許出願第62/574,119号に対する優先権を主張し、そのそれぞれの内容が参照により全体として本明細書に組み込まれ、そのそれぞれに対する優先権が主張される。
【０００２】
助成金情報
該当なし。
【０００３】
1．導入
本開示は、対象の器官機能を補うか又は置き換えるために使用され得る異所性組織を生成するための脂肪関連リンパ球集積(「FALC」、「乳斑(milky spot)」としても知られる)における器官細胞の生着及び増殖に関する。
【背景技術】
【０００４】
2．本発明の背景
肝疾患を有する患者に対する有効な処置が不足している。肝疾患は、米国において、毎年、31,000名を超える死亡の原因である。同所性肝移植(OLT)は、最後の手段であることが非常に多く、現在、重篤疾患の唯一の治療的処置である(1, 2)。さらに、推定100,000名の患者が新たな肝臓を必要としているが、かろうじて6,000名を超える患者が、毎年肝移植を受ける。利用可能なドナーの不足は、末期の肝疾患に罹患した患者が直面する主要な課題のうちの1つである。併存症を有する高齢の患者は、OLTの候補とみなされず、又は移植後生存率が低下することが予測される(3-5)。さらに、移植手順は、財政上と保健医療資源の観点の両方で損失が大きい。これらの理由から、患者は利用可能な器官を待っているため、細胞ベースの移植が、OLTに代わる治療選択肢として、又は橋渡しとして提案されている(6)。
【０００５】
今日までに、肝細胞移植は、動物モデルにおけるその機能的有用性を実証してきた。ト

ランスジェニックウロキナーゼ(7-9)から誘導性チロシン血症マウス(10-15)まで、肝細胞移植によって、肝臓の完全再生による治療可能性を確立することに成功した。これらの有望な結果にもかかわらず、ヒト肝細胞移植は、以前として臨床調査の実験相にあり(6，16)、動物研究の肯定的結果をヒト疾患に対する治療的有用性にトランスレーションできるということが期待されている。

【０００６】

しかし、終末期の肝疾患を患っている患者にとって、想定される細胞療法のほとんどが、罹患した肝臓自体への細胞生着を対象とするというさらなる課題がある。移植された肝細胞は、一般的に、脾臓を介して(例えば、ヒト患者の脾動脈を通って又はげっ歯類の脾実質中に)又は門脈を介して注入される。肝細胞は、能動的又は受動的に、罹患した肝臓に迅速に移動し、そこで、移植肝細胞による肝再生が生じることが期待される。この手法は、罹患した肝臓の一般的な病理学的特徴である、硬変及び線維症(17)が存在するため、重度の肝疾患を有する大多数の患者における細胞療法の有効性を限定し、排除する可能性もある。結果として、これらの患者、すなわち、処置を必要とするほとんどの患者にとってのネイティブ肝臓の再生が主要な課題である。

【０００７】

したがって、進行した肝疾患を有する患者に対する新たな療法が必要とされている。調査されてきた1つの選択肢は、補助肝臓を操作することである(18-20)。一般的に、これはネイティブ肝臓の全部又は一部をインタクトにしたまま、異所的又は同所的に配置される健康な肝臓移植片を埋め込むことからなる。この手法は、ある特定のカテゴリーの患者にとってOLTを回避する潜在的可能性を有するだけではなく、ネイティブ肝臓の一時的再生及び免疫抑制薬の最終的な中止の潜在的可能性も包含する(21-24)。初期の試験では問題が認められたが(18-20，25-27)、最近では好ましい結果が報告されており、急性肝不全(25)、代謝障害(28-31)、さらに硬変肝(26，27)の場合にも有望である。今日まで、肝細胞及び補助肝臓を長期間安定且つ生存可能に保つのに必要な細胞及び分子機序について理解されていない。

【０００８】

何人かの研究者らは、様々な肝臓外の部位に肝細胞を移植してきた(37-40)。最も肝臓外の部位における肝細胞の生着については、不定の結果を伴ってきた。マウスでは、リンパ節に移植された肝細胞が、肝機能を長期間(6か月を超えて)復元することができる機能的な補助肝臓を生成したことが、以前に実証されている(例えば、米国特許第9,125,891号を参照)。これらの結果から、組織又は器官の代替物を成長させるためにリンパ部位をインビボバイオリアクターとして使用することにより、組織再生の新たなパラダイムの基礎が形成された(32-36)。

【０００９】

肝疾患に加えて、腎疾患が集団内に蔓延しており、米国では死亡数が毎年47,000を超えている。腎疾患を処置するための公知の治療方法は、休息、食事の変更、薬物療法、血液透析治療及び腎臓移植を含み、疾患の重症度によって決まる。腎不全にまで到達すると、血液透析又は腹膜透析又は腎臓移植などの透析治療が必要である。血液透析治療によって、体内に蓄積する老廃物の排除が可能となるが、損傷した腎臓の機能は回復しない。腎不全の場合には、患者は、腎臓移植を受けなければ、人生にわたって透析治療を受け続けることになる。しかし、ドナーの不足、組織適合性における困難及び拒絶反応の回避を含む、腎臓移植に伴う多くの困難が存在する。したがって、腎機能の低下した患者のための新たな療法が必要とされている。

【００１０】

リンパ節及び脂肪関連リンパ球集積(本明細書において「乳斑」とも称される「FALC」)は、リンパ系の二次的リンパ器官であり、十分に血管形成されている。FALCは、大網を含むいくつかの解剖学的位置において生じる(図1を参照のこと)。FALCは、免疫系において重要な役割を有し、細菌又はウイルス感染などの種々の状態の間に白血球細胞の大幅な増殖を可能とする。興味深いことに、リンパ節及び乳斑は、早期の転移性事象、すなわち、

腫瘍浸潤及び初期の転移性成長の部位に存在するため、がんにおける臨床的意義も有する。リンパ節における腫瘍転移は、通常、がんの病期分類及び予後のために使用される。

【発明の概要】

【００１１】

3．発明の概要

本開示は、宿主対象中への移植のための機能的異所性組織を生成するために使用され得る、脂肪関連リンパ球集積(「FALC」又は「乳斑」)における細胞の生着及び増殖に関する。これは、肝機能障害を有するマウスに腹腔内移植された肝細胞が、大綱のFALC(乳斑)、並びに腸間膜、脾臓、門脈及び/又は生殖腺の脂肪のFALCにおいて局在及び増殖し、マウスの肝機能を有益に強化することができる異所性肝臓組織を生じるという発見に少なくとも部分的に基づく。また、胎仔の腎細胞が大綱のFALCにおいて増殖し、異所性腎臓組織を生じるという発見に少なくとも部分的に基づく。さらに、間質細胞におけるLTβRシグナル伝達が、グラフトされた細胞の血管形成/血管新生を促進することに成功するという発見に部分的に基づく。

【００１２】

ある特定の実施形態では、本開示は、大綱のFALC(乳斑)、並びに腸間膜、脾臓、門脈及び/又は生殖腺の脂肪のFALCにおける異所性肝臓組織を確立し、治療的有益性のためにこのような異所性肝臓組織を使用するための方法及び組成物を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、治療的有益性のために対象において使用することができる、FALCにおいて異所性肝臓組織を生成するための方法及び組成物をさらに提供する。

【００１３】

ある特定の実施形態では、本開示は、リンフォトキシンベータ受容体(LTβR)及び/又はNF-κB誘導性キナーゼ(NIK)シグナル伝達経路を活性化することによって、FALC又はリンパ節において、細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞をグラフトし増殖させる方法及び組成物をさらに提供する。

【００１４】

本開示は、対象において異所性組織を発達させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節中に1つ以上の細胞を導入すること、並びに1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進する1つ以上の薬剤を提供して異所性組織を形成することを含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の細胞は肝細胞であり、異所性組織は異所性肝臓組織である。ある特定の実施形態では、1つ以上の細胞は腎細胞であり、並びに/又は腎臓組織断片及び異所性組織は異所性腎臓組織である。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積は、胸膜腔及び/又は囲心腔及び/又は腹膜腔の脂肪組織に位置する。腹膜腔では、FALCは、対象の大綱及び/又は腸間膜及び/又は脾臓及び/又は門脈及び/又は生殖腺の脂肪に位置し得る。

【００１５】

ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の薬剤は、間質細胞、例えば、線維芽細胞を含む。ある特定の実施形態では、間質細胞は、1つ以上のポドプラニン、NIK及び/又はLTβRを発現する。ある特定の実施形態では、間質細胞は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターで処置される。

【００１６】

ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーター、例えば、LTβR及び/又はNIKのアクチベーターを含む。ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターを含む。ある特定の実施形態では、LTβR及び/又はNIKの活性化及び/又は非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路の活性化によって、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成が促進されて異所性組織が形成される。

【００１７】

ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、炎症を促進する薬剤で

ある。ある特定の実施形態では、炎症は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の細胞を導入する前に誘導される。

【００１８】

本開示は、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、対象に治療有効量の肝細胞を投与すること、及び対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における肝細胞の増殖を促進して異所性肝臓組織を形成することを含む。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積における異所性肝臓組織の形成は、脂肪関連リンパ球集積の解剖学的領域に局所的に肝細胞を投与することによって促進される。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積は、大網及び/又は腸間膜及び/又は脾臓及び/又は門脈及び/又は生殖腺の脂肪に位置する。

【００１９】

ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性肝臓組織の形成は、1つ以上の骨髄由来細胞又は間質細胞の同時投与によって促進される。例えば、限定するものではないが、間質細胞が同時投与される。ある特定の実施形態では、間質細胞は、線維芽細胞である。ある特定の実施形態では、間質細胞は、1つ以上のポドプラニン、NIK及び/又はLTβRを発現する。

【００２０】

ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性肝臓組織の形成は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性肝臓組織の形成は、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される。

【００２１】

ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性肝臓組織の形成は、対象において炎症を誘導することによって促進される。ある特定の実施形態では、炎症は、対象の炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される。ある特定の実施形態では、炎症は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の細胞を導入する前に誘導される。

【００２２】

本開示は、異所性肝臓を生成する方法であって、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節中に1つ以上の肝細胞を導入すること、及び異所性肝臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、インビボ又はインビトロで実施される。ある特定の実施形態では、異所性肝臓組織の形成を促進する薬剤は、1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を含む。ある特定の実施形態では、間質細胞は、線維芽細胞である。ある特定の実施形態では、間質細胞は、1つ以上のポドプラニン、NIK及び/又はLTβRを発現する。ある特定の実施形態では、間質細胞は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターで処置される。ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを含む。ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、炎症を促進する薬剤を含む。

【００２３】

ある特定の実施形態では、対象において異所性肝臓組織を生成する方法は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の肝細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路の活性化によって、1つ以上の肝細胞の増殖及び/又は血管形成が促進されて異所性肝臓組織が形成される。

【００２４】

ある特定の実施形態では、対象において異所性肝臓組織を生成する方法は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の肝細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導

入すること、並びにLTβR及び/又はNIKのアクチベーターを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβR及び/又はNIKの活性化によって、1つ以上の肝細胞の増殖及び/又は血管形成が促進されて異所性肝臓組織が形成される。ある特定の実施形態では、腎細胞は、胚腎臓、後腎から単離された細胞、インビトロで形成された腎臓オルガノイドから単離された細胞又はそれらの任意の組合せを含む。

【００２５】

本開示は、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、対象に治療有効量の腎細胞(又は腎臓組織断片)を投与すること、及び対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における腎細胞の増殖を促進して異所性腎臓組織を形成することを含む。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積における異所性腎臓組織の形成は、脂肪関連リンパ球集積の解剖学的領域に局所的に肝細胞を投与することによって促進される。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積は、大綱及び/又は腸間膜及び/又は脾臓及び/又は門脈及び/又は生殖腺の脂肪に位置する。

【００２６】

ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性腎臓組織の形成は、1つ以上の骨髄由来細胞又は間質細胞の同時投与によって促進される。例えば、限定するものではないが、間質細胞は同時投与される。ある特定の実施形態では、間質細胞は、線維芽細胞である。ある特定の実施形態では、間質細胞は、1つ以上のポドプラニン、NIK及び/又はLTβRを発現する。

【００２７】

ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性腎臓組織の形成は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される。ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性腎臓組織の形成は、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターの同時投与によって促進される。

【００２８】

ある特定の実施形態では、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における異所性腎臓組織の形成は、対象において炎症を誘導することによって促進される。ある特定の実施形態では、炎症は、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導される。ある特定の実施形態では、炎症は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の腎細胞を導入する前に誘導される。

【００２９】

本開示は、異所性腎臓を生成する方法であって、脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節中に1つ以上の腎細胞(又は1つ以上の腎臓組織断片)を導入すること、並びに異所性腎臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、インビボ又はインビトロで実施される。ある特定の実施形態では、異所性腎臓組織の形成を促進する薬剤は、1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を含む。ある特定の実施形態では、間質細胞は、線維芽細胞である。ある特定の実施形態では、間質細胞は、1つ以上のポドプラニン、NIK及び/又はLTβRを発現する。ある特定の実施形態では、間質細胞は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターで処置される。ある特定の実施形態では、異所性腎臓組織の形成を促進する薬剤は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを含む。ある特定の実施形態では、異所性腎臓組織の形成を促進する薬剤は、炎症を促進する薬剤を含む。

【００３０】

ある特定の実施形態では、対象において異所性腎臓組織を生成する方法は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の腎細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路の活性化によって、1つ以上の腎細胞の増殖及び/又は血管形成が促進されて異所性腎臓組織が形成される。

【００３１】
ある特定の実施形態では、対象において異所性腎臓組織を生成する方法は、対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節に1つ以上の腎細胞及び1つ以上の間質細胞を含む細胞を導入すること、並びにLTβR及び/又はNIKのアクチベーターを提供することを含み、1つ以上の間質細胞におけるLTβR及び/又はNIKの活性化によって、1つ以上の腎細胞の増殖及び/又は血管形成が促進されて異所性腎臓組織が形成される。
【００３２】
本開示は、異所性組織を生成するための組成物をさらに提供する。ある特定の実施形態では、組成物は、異所性組織の形成を促進する複数の細胞及び1つ以上の薬剤を含む。ある特定の実施形態では、異所性肝臓組織を生成するための組成物は、異所性肝臓の形成を促進する複数の肝細胞及び1つ以上の薬剤を含む。ある特定の実施形態では、異所性腎臓組織を生成するための組成物は、異所性腎臓の形成を促進する複数の腎細胞及び1つ以上の薬剤を含む。
【００３３】
ある特定の実施形態では、本開示の主題の組成物中に含まれる1つ以上の薬剤は、複数の骨髄由来細胞及び/又は複数の間質細胞を含む。ある特定の実施形態では、間質細胞は、1つ以上のポドプラニン、NIK及び/又はLTβRを発現する。ある特定の実施形態では、1つ以上の薬剤は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターである。ある特定の実施形態では、1つ以上の薬剤は、炎症を促進する薬剤である。ある特定の実施形態では、1つ以上の薬剤は、(a)複数の骨髄由来細胞及び/又は複数の間質細胞、(b)LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーター、並びに(c)炎症を促進する薬剤のうちの2つ以上を含む。ある特定の実施形態では、組成物は、合成培養培地をさらに含む。
【００３４】
ある特定の実施形態では、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、対象に治療有効量の肝細胞を投与すること、及び対象のリンパ節における異所性肝臓組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を提供することを含み、1つ以上の薬剤は、(a)複数の骨髄由来細胞、複数の間質細胞若しくはこれらの組合せ、(b)LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター若しくはこれらの組合せ、又は(c)炎症を促進する薬剤のうちの2つ以上を含む。
【００３５】
ある特定の実施形態では、本開示は、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の腎細胞、腎臓組織断片、又はこれらの組合せを投与すること、及び対象のリンパ節における異所性腎臓組織の形成を促進する1つ以上の薬剤を提供することを含み、1つ以上の薬剤が、(a)複数の骨髄由来細胞、複数の間質細胞若しくはこれらの組合せ、(b)LTβRシグナル伝達経路のアクチベーター、NIKシグナル伝達経路のアクチベーター若しくはこれらの組合せ、又は(c)炎症を促進する薬剤のうちの2つ以上を含む、方法をさらに提供する。
【００３６】
本開示は、本明細書に開示の1つ以上の組成物を含むキットをさらに提供する。
【００３７】
4．図面の簡単な説明
【図面の簡単な説明】
【００３８】
【図１】脂肪関連リンパ球集積;模式図(上のパネル)、及び分布(下のパネル)を示す図である。
【図２－１】図２Ａ～Ｄ：二次的リンパ組織における異所性肝臓の生成を示す図である。(A)肝細胞のIP移植の12週間後の$Fah^{-/-}$マウスの顕微鏡画像。黄色の円は、リンパ組織中で生成された多くの異所性肝結節を強調する(乳斑及びリンパ節(LN))。(B)門脈大静脈シャント、部分肝切除及び肝細胞移植の2か月後のブタの腸間膜リンパ節。左側のパネル、OCTブロック及びLNにおいて肝細胞に対してCK18及び高内皮細静脈に対してPNAdで染色した

このブロック由来の凍結切片。LN質量の51.5%がCK18+肝細胞として特定された。右側のパネル、対照の肝臓並びにCK18(肝細胞)及びER-TR7(線維芽細胞)で染色した異所性肝臓の凍結切片。H&Eは、ブタの異所性肝臓(C)に存在する正常な微小血管構造を示す。上のパネル、肝臓(L)に隣接し、膵臓の上の胃(S)及び小腸(I)を覆うより大きな大網(O)(図示せず)を示すマウスの腹膜腔の巨視的視点。真中のパネル、豊富な血管構造を示す手術用顕微鏡下のマウス大網。下のパネル、乳斑を供給する血管樹を示す大網の模式図。(D)GFP+肝細胞のIP移植。肝細胞の生着の12週間後のFah-/-マウスの乳斑において、異所性結節が生じた。

【図２－２】図２－１の続きである。

【図３】肝細胞のIP移植の3から4週間後の$Fah^{-/-}$マウス;毛管スペースの拡大及び乳斑における血管の出芽を示す写真である。

【図４】マウスにおける大網の乳斑を示す図である。

【図５】大網の乳斑における移植肝細胞の生着を示す写真である。肝細胞は、GFP標識され、緑色蛍光の明るい領域として存在する。ER-TR7は、リンパ組織の細胞外マトリックスに見られる抗原であり、この画像では蛍光ブルーである(矢印で示す)。

【図６】大網の乳斑が、FRGN($Fah^{-/-}Rag2/\gamma c^{-/-}$Nod)マウスにおいて欠如していることを示す写真である。野生型(左)及びFRGNの大網、(「MS」)と標識した乳斑の免疫蛍光染色。

【図７】FRGNマウスの大網における肝細胞の生着を示す写真である。

【図８】大網における生着肝細胞が、12週間にわたってFRGNマウスにおいて成長することが観察されていないことを示す写真である。

【図９】乳斑が、骨髄移植によって、FRGNマウスの大網において復元されることを示す写真である。

【図１０】乳斑が、骨髄移植によって、FRGNマウスの大網において復元されることを示す写真である。右側のパネルの矢印が乳斑における生着肝細胞を示すことに留意されたい。

【図１１】骨髄移植後のFRGNマウスにおける異所性肝臓の形成を示す図である。

【図１２】骨髄移植後のFRGNマウスにおける異所性肝臓の形成を示す写真である。左側のパネルは、骨髄移植なしの結果を示す - 異所性肝臓の形成はないが、肝細胞の凝集が見られる。右側のパネルは、骨髄移植ありの結果、異所性肝臓の生成を示す。

【図１３】間質細胞/リンパ組織誘導物質の相互作用(左側)及びNIKシグナル伝達経路(右側)を示す図である。

【図１４】NIK欠失(aly/aly)及び対照の$Fah^{-/-}$マウスにおける腹腔内(IP)注入対脾臓(SP)注入による肝機能の救済におけるNIK機能の影響を試験するための研究の模式図である。脾臓(SP)注入(左側)又はIP注入(右側)によって、10^6個の肝細胞を移植したFah-/-マウス及びaly/aly Fah-/-マウスのカプランマイヤー生存曲線。

【図１５】NIK機能がIP注入によって$Fah^{-/-}$マウスを救済する必要があることを示す写真である。10^6個のGFP+肝細胞をIP注入によって、それぞれ、$Fah^{-/-}$マウス及びリンパ形成不全症の$Fah^{-/-}$マウス(aly/aly $Fah^{-/-}$)中に接種した。様々な時点での大網の乳斑の全組織標本画像。ドナー肝細胞の蛍光(緑色)と融合した明視野画像が示される。上のパネル、$Fah^{-/-}$マウス;下のパネル、aly/aly $Fah^{-/-}$マウス。

【図１６】IP肝細胞移植後に観察した結果の概略図である。

【図１７－１】図１７Ａ～Ｄ：(A)細網線維芽細胞(「FRC」)、リンパ管内皮細胞(LEC)、及び脳内皮細胞(BEC)におけるポドプラニン(PDPLN)及びCD31の分布、並びに乳斑と比較したリンパ節におけるこれらのマーカーのフローサイトメトリー分析を示す図である。(B)肝細胞が、乳斑においてER-TR7間質細胞のすぐそばに自身を確立することを示す写真である。(C)単離した間質細胞、移植IPが、大網の乳斑に移動して戻ることになることを示す写真である。(D)移植肝細胞を含む乳斑を示す写真である。

【図１７－２】図１７－１の続きである。

【図１８】肝細胞が、リンフォトキシンアルファ及びベータ陽性であり、間質細胞が、NIK及びリンフォトキシンベータ受容体陽性であることを実証する免疫蛍光研究を示す写真である。

【図１９】2、4及び6週間後に、Fah$^{-/-}$又はFah/LTbR$^{-/-}$マウスのいずれかに腹腔内移植された野生型GFP+(緑色蛍光タンパク質)肝細胞を示す写真である。写真は、これらの動物の大綱における生着を示す。
【図２０－１】図２０Ａ～Ｇ：(A)上、左から右へ、ヒト胎児の腎臓、腎臓断片移植後の空腸のLN、及び移植の3週間後のLNの画像を示す写真である。真中の左側、パラフィン包埋したドナーのであるヒト胎児の腎臓のH&E染色切片。真中の右側、腎臓移植の3週間後のヘマトキシリン染色したLN 3の凍結切片。橙色の破線で囲んだ領域は、生着していないLNエリアを示す。下、挿入図は、未成熟(左側)又は成熟(右側)糸球体を示す。(B)NCAM、WT-1、PDPLN、α-SMA、Megalin、AQ1、LTL、NKCC2、BRN1/DBA、LTL/DBA、K8/AQ2又はEPOに関する3週間目の移植片切片の代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。(C)8週間目の移植片の代表的な3D再構成を示す図である。左側、LN内部で生着した糸球体及び尿細管の画像。右側、糸球体及び尿細管のみに関する画像。(D)11週目の移植片保有マウスにおける10,000 kDa MWのTexas Red Dextran蓄積を示す写真である。(E)マウス及びヒトのCD31に関する1、3及び8週目の移植片切片の代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。(F)左側、移植前のマウスのNPオルガノイドにおけるNCAM、SIX2、WT-1又はE-CADHに関する代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。右側、NPオルガノイド移植の8週間後のLNにおける血管形成糸球体様構造を示すPDPLN/CD31、PDPLN/CD105、又はPDPLN/Ly-76に関する代表的な免疫蛍光染色。(G)左側、DBA/BRN1及びE-CADH/LTLに関するiPSC-由来腎臓オルガノイドの代表的な全組織標本免疫蛍光染色を示す写真である。下、2つの別個のネフロン様構造を示す連続的切片であり、それぞれ、LNへのオルガノイド移植の6週間後の、LTL/メガリン反応性の近位様尿細管に隣接する、推定糸球体上皮細胞(PDPLN、SYNPO、PODXL)、メサンギウム細胞(CIV)、及び内皮細胞(CD31)を含有する糸球体様構造によって構成される。核は、ヘキスト(青色)を使用して対比染色された。
【図２０－２】図２０－１の続きである。
【図２０－３】図２０－２の続きである。
【図２０－４】図２０－３の続きである。
【図２１】カノニカル及び非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路の概略図である。
【図２２－１】図２２Ａ～Ｇ：(A)左側、実験計画の概略図である。GFP+胚腎臓断片のそれらのLN(1日目)への移植を受ける2日前に、100μgのLTβR-Fc又は対照のIgをマウスにIP注入した。8日目及び15日目に、マウスを再度処置した。22日目にLNを採取した。右側、処置又は未処置マウスから単離したLNを保有する腎臓の全組織標本。(B)PDPLN、LTL、CD31、CD105、Ly-76に関するAにおける腎臓移植片の連続的断片の代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。(C)LN又は大綱の間質細胞集団(CD45-)における細網線維芽細胞(FRC)、リンパ管内皮細胞(LEC)、及び血管内皮細胞(BEC)のフローサイトメトリープロファイルを示す図である。(D)大綱の間質細胞のPDPLN及びLTβRに関する代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。(E)GFP+胚腎臓の移植後、移植の6週間後の、野生型又はLTβR-/-マウス由来の大綱を保有する腎臓の全組織標本を示す写真である(左側の融合した蛍光/明視野の画像及び右側の手術用スコープ画像)。新たな腎臓を成体マウスの腎臓と比較して示す。(F)Eの大綱間腎臓移植片の連続的断片のCD31、CD105、及びLy-76に関する代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。(G)GFP+(左側及び真中)又は野生型(右側)胚腎臓のLN移植片の断片のERTR-7、LTα、LTβ、LTβR、NIK、NIK/CD34に関する代表的な免疫蛍光染色を示す写真である。核は、ヘキスト(青色)を使用して対比染色した。
【図２２－２】図２２－１の続きである。
【図２２－３】図２２－２の続きである。
【図２２－４】図２２－３の続きである。
【図２２－５】図２２－４の続きである。
【図２３】腹腔の炎症が、大綱において、劇的変化を誘導することを示す図である。上のパネル。実験の概略図。0日目に、ザイモサンを腹腔内(IP)注入する。3日後に、100万個の肝細胞をIP注入する。肝細胞注入の7日後に、試料を採取する。下の左側パネル。ザイモサン誘導及び対照動物由来の大綱の巨視図。下の右側パネル。対照と比較した際の、ザ

イモサンに誘導された炎症後の大網重量の劇的増加。
【図２４】FALC及び肝臓の成長を示す図である。GFP+肝細胞移植の1週間後のザイモサン又はPBS注入後におけるC57bl/6マウスの大網及び腸間膜の脂肪。GFP+肝細胞の生着を劇的に増加させたザイモサンによって炎症を誘導されたFALCの数及び大きさ。大網及び腸間膜の脂肪を比較し、GFP+肝細胞を蛍光顕微鏡下で特定した。
【図２５】腹腔の炎症が、肝細胞移植後のチロシン血症マウスの生存率を増加させることを示すグラフである。以前に炎症を誘導されたか又は誘導されていない$Fah^{-/-}$ C57bl/6マウスに、野生型肝細胞をIP移植し、続いて2回選別した(NTBCなし)。炎症なしの動物(左側のパネル)は、2回目の選別後に体重が減り続け、動物H146及びH148は、移植の8週間後の辺り/8週間後に死亡した。以前に炎症を誘導された動物(右側のパネル)は、2回目の選別の間、体重が増加し、機能的肝臓質量の復元を伴う肝疾患の救済を示した。
【図２６】腹腔の炎症が、FALCを含有する脂肪に存在する肝臓質量を増加させることを示す写真である。以前に炎症を誘導されていない(H146)及び誘導された(H150)、$Fah^{-/-}$ C57bl/6マウス由来の肝臓組織を含有する腹腔内脂肪の巨視図。炎症は、FALCにおける異所性肝臓の成長を支持する。
【発明を実施するための形態】
【００３９】
5．発明の詳細な説明
明確化のためであって、限定するものではないが、本開示の主題の詳細な説明は、以下の下位項目に分けられる:
(i)定義、
(ii)処置方法、
a．肝疾患及び肝障害の処置、
b．腎疾患及び腎障害の処置、並びに
(iii)組成物。
【００４０】
5.1 定義
別段定義されていなければ、この出願で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、当業者によって通常理解されているのと同じ意味を有する。
【００４１】
本明細書で使用する場合、「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値に対して許容される誤差範囲内を意味し、値が測定又は決定される方法、すなわち、測定系の限界に応じて変化する。例えば、「約」は、当技術分野の慣行では、3又は3を超える標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の20%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%まで、さらにより好ましくは1%までの範囲を意味し得る。あるいは、特に、生体系又は生体プロセスに関して、この用語は、値の同じ桁内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味し得る。
【００４２】
脂肪関連リンパ球集積(「FALC」、あるいは、本明細書では「乳斑」と称される)は、本明細書で使用する場合、リンパ節ではないリンパ球系の構造である。FALCは、これらに限定されないが、腸間膜、縦隔、心膜及び皮下組織を含む、いくつかの解剖学的位置に存在する(図1を参照のこと)。FALCは、胸膜腔、囲心腔及び腹膜腔の脂肪組織に位置する。腹膜腔では、FALCは、対象の大網及び腸間膜、脾臓、門脈並びに生殖腺の脂肪に位置する。ある特定の非限定的実施形態では、異所性組織の成長、例えば、肝臓又は腎臓組織の成長のために使用されるFALCは、大網に位置する。ある特定の非限定的実施形態では、FALCは、縦隔又は心膜に位置する。
【００４３】
「リンパ節」又は「LN」は、本明細書で使用する場合、任意のリンパ節、例えば、これらに限定されないが、腹部リンパ節、腹腔リンパ節、傍大動脈リンパ節、脾門リンパ節、肝門部リンパ節、胃リンパ節(左右)、胃の大網(胃大網)リンパ節(左右)、後腹膜リンパ節

、幽門リンパ節(幽門上、幽門下、幽門後)、膵臓リンパ節(上膵、下膵、脾臓線状リンパ節)、肝臓リンパ節(胆嚢、ウインスロー孔を含む孔)、膵十二指腸リンパ節(上膵十二指腸、下膵十二指腸)、上腸間膜リンパ節、回結腸リンパ節、盲腸前リンパ節、盲腸後リンパ節、体肢リンパ節、結腸間膜リンパ節(結腸傍、左結腸、中結腸、右結腸、下腸間膜リンパ節、S字、上直腸)、総腸骨リンパ節(岬角の内側総腸骨、中間総腸骨、外側総腸骨、大動脈化総腸骨、総腸骨リンパ節)、及び外腸骨リンパ節(内側外腸骨、中間外腸骨、外側外腸骨、内側小窩-大腿骨、中間小窩-大腿骨、外側小窩-大腿骨、腸骨間外腸骨、閉塞筋外腸骨の閉鎖)、空腸、膝窩及び腋窩リンパ節を指す。

【００４４】

器官の細胞は、1つ又は複数の細胞型から構成され得る。ある特定の実施形態では、細胞は、起源の器官で見られる複数の細胞型から構成されるが、その器官に見られるすべての細胞型を必ずしも含む必要はない。非限定的一例として、本開示による生着に関する「肝臓の細胞」は、肝細胞を含み、肝臓の1つ以上の胆細胞、内皮細胞、幹細胞及び始原細胞をさらに含んでもよい。別の非限定例として、本開示による生着に関する「腎細胞」は、腎実質細胞を含み、腎臓の1つ以上の糸球体細胞、内皮細胞、幹細胞及び始原細胞をさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、細胞は、生着のための導入前に解離される。ある特定の実施形態では、細胞は、導入前に、凝集体中に含まれる。ある特定の実施形態では、細胞は、インビトロで増殖したオルガノイドから構成される。ある特定の実施形態では、細胞は、インビトロで増殖したiPS又は他の幹細胞から構成される。ある特定の実施形態では、細胞は、インタクトな器官から得られる組織断片中に含まれるが、前記断片は、器官の約5%以下、又は約10%以下、又は約25%以下又は約50%以下を構成する。

【００４５】

「アクチベーター」は、本明細書で使用する場合、タンパク質又は経路の活性、機能、発現及び/又は生成を活性化する(例えば、増加させる、促進する又は増強する)化合物又は分子(例えば、小分子、ペプチド、ペプチド模倣体、天然化合物又は抗体)を指す。アクチベーターは、LTβR又はNIKなどの、命名されたタンパク質(分子、命名された分子又は命名された関連分子に関与する任意の分子)の任意の活性を促進するか、又は命名されたタンパク質、例えば、LTβR又はNIKの、シグナル伝達パートナー若しくは結合パートナーとの相互作用を促進する、任意の化合物又は分子であり得る。アクチベーターは、命名されたタンパク質、例えば、LTβR又はNIKの生体活性を、シグナル伝達分子の上流を妨害することによって間接的に調節する分子も含み得る。ある特定の実施形態では、アクチベーターは、LTβR又はNIKなどの命名されたタンパク質の生成及び/又は産生を、例えば、LTβR又はNIKを生成及び/又は産生する酵素の活性及び/又は機能を増加させることによって、促進、増加及び/又は増強する分子を含み得る。

【００４６】

本明細書で使用する場合、「処置(treatment)」(及び「処置する(treat)」又は「処置する(treating)」などのその文法上の変形)は、処置される個体の自然経過を変更することを試みる臨床的介入を指し、予防として又は臨床病理の経過中のいずれかで実施することができる。処置の望ましい効果として、これらに限定されないが、疾患の発症又は再発を防止すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果を減少させること、疾患進行速度を減速すること、疾患状態の改善又は緩和及び寛解又は予後の改善が挙げられる。ある特定の実施形態では、「処置」は、合併症、症状及び/又は悪化の重症度の低下を指す場合がある。例えば、限定するものではないが、低下は、例えば、処置を受けていない比較対照の対象に対して、合併症、症状及び/又は悪化の重症度における10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%又は99%の低下であり得る。ある特定の実施形態では、「処置」は、処置を受けていない場合に予測される生存率と比較した、生存率の延長も意味し得る。

【００４７】

「治療有効量」又は「有効量」は、本明細書で使用する場合、症状の軽減、疾患進行速度を減速すること、生存率の延長、疾患状態の改善又は緩和及び/又は予後の改善のうち

の1つ以上を達成することができる量を指す。

【００４８】

「対象」又は「個体」は、本明細書で互換的に使用され、ヒト又は非ヒト対象を指し得る。非ヒト対象の非限定例として、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタなどが挙げられる。

【００４９】

「移植(transplantation)」、「細胞置換」又は「グラフティング(grafting)」という用語又はフレーズは、本明細書で互換的に使用され、標的組織、例えば、FALC又はFALCを含有する組織への細胞の導入を指す。

【００５０】

「と組み合わせて」は、本明細書で使用する場合、グラフトされる1つ以上の細胞又はその組成物、及び薬剤、例えば、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターが、処置レジメン又は計画の一部として対象に投与されることを意味し得る。ある特定の実施形態では、組み合わせて使用されることは、1つ以上の細胞及び1つ以上の薬剤が、投与前に物理的に組み合わされること又はそれらが同じ時間枠にわたって投与されることを要求するものではない。例えば、限定するものではないが、グラフトされる1つ以上の細胞及び1つ以上の薬剤は、処置される対象に同時に投与されてもよく、又は同じ時間に若しくは任意の順番で若しくは異なる時点で順次投与されてもよい。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、グラフトされる1つ以上の細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞の投与前の1つ以上の薬剤の投与を含むことができる。

【００５１】

5.2 処置の方法

ある特定の実施形態では、本開示は、異所性組織を発生するための脂肪関連リンパ球集積(「FALC」又は「乳斑」)における細胞の生着及び増殖に関する。

【００５２】

本開示は、FALC内又はその周辺に異所性組織を生成する方法を提供する。ある特定の実施形態では、異所性組織を生成する本方法は、対象のFALC中に細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞を導入して、異所性組織、例えば、異所性肝臓組織又は異所性腎臓組織を形成することを含み得る。ある特定の実施形態では、異所性組織を生成する方法は、対象のリンパ節に細胞を導入することを含み得る。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、異所性組織の生成が有益である可能性のある医学的状態及び/又は障害(例えば、病理、疾患、症状)を処置するために使用することができる。例えば、限定するものではないが、対象は、疾患又は障害、例えば、これらに限定されないが、肝疾患及び/若しくは肝不全又は腎疾患及び/若しくは腎不全に罹患している対象であり得る。

【００５３】

ある特定の実施形態では、対象は、ヒト又は非ヒトであってもよい。非ヒトの非限定例として、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタなどが挙げられる。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【００５４】

ある特定の実施形態では、対象のFALC中にグラフトされる細胞は、ヒト細胞、非ヒト細胞又は両方であってもよい。ある特定の実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。ある特定の実施形態では、ヒト細胞は、非ヒト対象、例えば、マウスのFALC、又はFALCを含有する領域中にグラフトされてもよい。

【００５５】

生着のための細胞は、グラフトを受けている対象から得ることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、グラフトを受けている対象以外の供給源から得ることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、新鮮であるか又は凍結した細胞集団から得ることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、組織から単離され、移植前に様々な培養条件下で、インビトロで成長させることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、胚、胎児、小児又は成体の組織から得ることができる。ある特定の実施形態では、細胞は、始原細胞

又は前駆細胞であってもよい。ある特定の実施形態では、始原細胞又は前駆細胞は、移植される細胞型に分化され得る。

【００５６】

本開示による使用のための細胞は、当技術分野で公知の任意の手段によって調製することができる。ある特定の実施形態では、細胞溶液、例えば、本明細書に開示の組成物は、注入他のために使用される。本開示の方法における使用のための組成物の非限定例は、以下の項目5.3に記載される。ある特定の実施形態では、細胞は、Liら J Tissue Culture Methods 14:139～146ページ(1992)の方法に従って調製することができる。簡潔には、単離は、1つだけの切断面を有する限られた大きさ(50g未満)の試料のコラゲナーゼかん流に関与する。ある特定の実施形態では、具体的には、米国特許第7,211,404号に開示されたものなどの、濃縮した細胞集団を使用することができる。

【００５７】

細胞は、当技術分野で公知の任意の方法によって、対象に投与することができる。ある特定の実施形態では、細胞は、これらに限定されないが、腹腔内、静脈内若しくは動脈内注入によって又は局所点滴注入によって、注入することができる。ある特定の実施形態では、細胞は、例えば、従来の又は内視鏡手術による技法によって、外科的に生着させることができる。ある特定の実施形態では、細胞は局所的に投与することができる。例えば、限定するものではないが、細胞は、FALC、例えば、これらに限定されないが、生殖腺、大綱、腸間膜、縦隔、心膜及び皮下の組織を含有する解剖学的位置の近傍に導入することができる。ある特定の実施形態では、解剖学的領域は、大綱である。ある特定の実施形態では、例えば、肝細胞又は腎細胞(又は腎臓組織の断片)は、例えば、標的化腹腔内注入によって又は従来の若しくは内視鏡手術の技法によって、大綱(及びそこに存在するFALC)の近傍に導入することができる。ある特定の実施形態では、生着される細胞は、インビボでFALC又はリンパ節中に導入する前に、最初に培養で増殖され得る。

【００５８】

ある特定の実施形態では、細胞は、注入のための任意の適当な緩衝液中に懸濁させることができる。このような緩衝液の非限定例として、とりわけ、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ハンクス塩及びリンガー溶液が挙げられる。

【００５９】

ある特定の実施形態では、FALC又はリンパ節において又はその周辺で異所性組織を生成する方法は、異所性組織の形成を促進する薬剤を提供することをさらに含み得る。例えば、限定するものではないが、本方法は、グラフトされる1つ以上の細胞を、異所性組織の形成を促進する1つ以上の薬剤と組み合わせて投与することを含み得る。ある特定の実施形態では、1つ以上の薬剤は、グラフトされる1つ以上の細胞を含む組成物中に含まれ得る。あるいは及び/又はさらに、1つ以上の細胞をグラフトする前、後又はそれと同時に、1つ以上の薬剤を投与することができる。ある特定の実施形態では、薬剤は、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性組織を形成する。類似の方法を使用して、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００６０】

ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、異所性組織を形成する細胞、例えば、腎細胞又は肝細胞の細胞型と異なる細胞型であってもよい。ある特定の実施形態では、薬剤は、1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を含む。ある特定の実施形態では、薬剤は、間質細胞、例えば、線維芽細胞、細網線維芽細胞(FRC)、濾胞樹状細胞(FDC)、リンパ管内皮細胞(LEC)、血管内皮細胞(BEC)、アルファ7インテグリン周皮細胞(AIP)及びダブルネガティブ細胞(DNC)を含む。ある特定の実施形態では、線維芽細胞は、ヒトの包皮線維芽細胞、ヒトの胚線維芽細胞、マウスの胚線維芽細胞、皮膚線維芽細胞、血管線維芽細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞、間葉肝細胞(MSC)由来線維芽細胞又はこれらの組合せであり得る。例えば、限定するものではないが、異所性組織を生成する方法は、(a)対象のFALC(又はFALCを含有する解剖学的領域)又はリンパ節(又はリンパ節を含有する解剖学的領域)中に1つ以上の細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞を導入して、異所性組織

、例えば、異所性肝臓組織又は異所性腎臓組織を形成すること、並びに(b)1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を導入して、例えば、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性組織を形成することによって、異所性組織の形成を促進することを含み得る。ある特定の実施形態では、グラフトされる1つ以上の細胞並びに1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞は、同じ組成物中に含まれてもよい。

【００６１】

ある特定の非限定的実施形態では、異所性組織の形成を促進する間質細胞、例えば、間質内皮細胞又は線維芽細胞は、検出可能なレベルの、1つ以上のポドプラニン、リンフォトキシンベータ受容体(「LTβR」)、NIK又はこれらの組合せを発現することができる。あるいは及び/又はさらに、間質細胞は、対象への投与前、投与中又は投与後に、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーター、例えば、LTβR若しくはNIK又はその下流標的のアクチベーターで処置され得る。ある特定の実施形態では、間質細胞、例えば、間質内皮細胞又は線維芽細胞は、NIKのアクチベーターで処置され得る。ある特定の実施形態では、間質細胞は、一般的に、LTβR及び/若しくはNIKを外因的に発現する並びに/又はLTβR及び/若しくはNIKを過剰発現するように改変することができる。

【００６２】

ある特定の実施形態では、例えば、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性組織を形成することによって、異所性組織の形成を促進する薬剤は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターであり得る。例えば、限定するものではないが、FALC又はリンパ節において又はその周辺で、異所性組織を生成する方法は、対象のFALC(又はFALCを含有する解剖学的領域)又はリンパ節中に細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞を導入すること、並びにLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路の少なくとも1つのアクチベーターを提供することを含むことができ、LTβR及び/若しくはNIK又はその下流標的の活性化によって、異所性組織、例えば、異所性肝臓組織又は異所性腎臓組織の形成が促進される。ある特定の実施形態では、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、LTβR及び/若しくはNIKのアクチベーター又は非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターである。ある特定の実施形態では、グラフトされる1つ以上の細胞並びにLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、同じ組成物中に含まれてもよい。あるいは、アクチベーターは、対象中に、グラフトされる1つ以上の細胞を導入する前、導入中又は導入後に投与される。

【００６３】

ある特定の実施形態では、移植を受けている対象中に存在する、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターによって、細胞、例えば、間質細胞又は間質内皮細胞におけるLTβR又はNIKの発現を増加させることができる。例えば、限定するものではないが、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターによって、対象のFALCに存在する間質細胞中のシグナル伝達経路が活性化される。

【００６４】

あるいは及び/又はさらに、グラフトされる細胞は、間質細胞又は間質内皮細胞を含む不均質な細胞集団、例えば、不均質な細胞集団を含む組成物であってもよく、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターによって、移植される組成物中に存在する間質細胞又は間質内皮細胞におけるLTβR又はNIKの発現が増加され得る。例えば、限定するものではないが、異所性組織を生成する方法は、(a)対象のFALC又はリンパ節中に1つ以上の細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞を導入して、異所性組織、例えば、異所性肝臓組織又は異所性腎臓組織を形成すること、(b)1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を導入して、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性組織を形成すること、並びに(c)LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを投与することを含み得る。ある特定の実施形態では、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、グラフトされる1つ以上の細胞並びに1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を含む組成物中に存在し、又はLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を含む組成物中に存在する。

【００６５】
ある特定の実施形態では、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、LTβRのアクチベーター又はLTβRの下流標的であってもよい。ある特定の実施形態では、アクチベーターは、NIKのアクチベーター又はNIKの下流標的、例えば、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターであってもよい。ある特定の実施形態では、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、LTβR又はNIKに特異的に結合するアゴニスト抗体(又はその抗体断片)又は単鎖抗体であってもよい。抗LTβRアゴニスト抗体の非限定例として、Adipogen Life Sciences.、カタログ番号AG-20B-0008によって製造されるモノクローナル抗体、抗LTβRアゴニスト抗体CBE11(例えば、Lukashevら、Cancer Res. 66(19):9617～9624ページ(2006)を参照のこと)、抗LTβRアゴニスト抗体BS-1(例えば、Huら、Carcinogenesis 34(5):1105～1114ページ(2013)を参照のこと)及び抗LTβRアゴニスト抗体4H8(例えば、Scarzelloら、Gut 65:1765～1775ページ(2016)を参照のこと)が挙げられる。抗LTβRアゴニスト抗体のさらなる非限定例は、米国特許出願公開第2002/0090366号に開示されており、その内容は全体として本明細書に開示される。ある特定の実施形態では、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターは、LTβR若しくはNIK又はその下流標的の機能及び/又は活性を増加させる小分子であってもよい。

【００６６】
ある特定の実施形態では、本開示は、対象において異所性組織を生成する方法であって、対象のFALC又はリンパ節に1つ以上の細胞を導入すること、並びにLTβR及び/又はNIKのアクチベーターを提供することを含み、LTβR及び/又はNIKの活性化によって、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成が促進されて異所性組織を生成する、方法を提供する。ある特定の実施形態では、1つ以上の細胞は肝細胞を含み、異所性組織は異所性肝臓組織を含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の細胞は腎細胞を含み、異所性組織は異所性腎臓組織を含む。ある特定の実施形態では、1つ以上の細胞は、1つ以上の間質細胞をさらに含み、LTβR及び/又はNIKのアクチベーターによって、間質細胞におけるLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路が活性化される。

【００６７】
ある特定の実施形態では、異所性組織の形成を促進する薬剤は、対象における炎症を促進する薬剤であってもよい。例えば、限定するものではないが、FALC又はリンパ節において又はその周辺で異所性組織を生成する方法は、例えば、対象における炎症を促進する薬剤の投与によって、対象において炎症を誘導することをさらに含み得る。このような薬剤の非限定例として、サイトカイン、血管拡張薬、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン及びザイモサンが挙げられる。サイトカインの非限定例として、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-24、IL-27、IFN-アルファ、IFN-アルファ2、IFN-ベータ、又はIFN-ガンマ、TNF-アルファ及びTNF-ベータ、TGF-アルファ及びTGF-ベータ、リンフォトキシン-アルファ及びリンフォトキシン-ベータが挙げられる。ケモカインの非限定例として、CCL18、CCL19、CCL21、CXCL8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 CCL7、CXCL12及びCXCL13が挙げられる。ある特定の実施形態では、薬剤は、補体系を活性化する化合物及び/又は分子を含む。ある特定の実施形態では、薬剤はザイモサンを含む。ある特定の実施形態では、薬剤は、細胞をグラフトされたか又はグラフトされるFALCに及び/又はFALC周辺に投与される。ある特定の実施形態では、炎症は、局所的に、例えば、細胞が移植されたか又は移植されるFALC又はリンパ節を含有する解剖学的領域に又は解剖学的領域付近に、誘導される。あるいは及び/又はさらに、炎症は、全身的に誘導される。

【００６８】
ある特定の実施形態では、炎症は、一時的である。例えば、限定するものではないが、炎症は、約10週間以下、約9週間以下、約8週間以下、約7週間以下、約6週間以下、約5週間以下、約4週間以下、約3週間以下、約2週間以下、約1週間以下、約6日間以下、約5日間以下、約4日間以下又は約3日間以下の間続く。

【００６９】

ある特定の実施形態では、炎症は、グラフトされる1つ以上の細胞を導入する前に誘導される。例えば、限定するものではないが、炎症は、グラフトされる1つ以上の細胞の導入の少なくとも2時間前、少なくとも4時間前、少なくとも6時間前、少なくとも8時間前、少なくとも10時間前、少なくとも12時間前、少なくとも14時間前、少なくとも16時間前、少なくとも18時間前、少なくとも20時間前、少なくとも22時間前、1日前、少なくとも2日前、少なくとも3日前、少なくとも4日前、少なくとも5日前、少なくとも6日前、少なくとも7日前、少なくとも8日前、少なくとも9日前又は少なくとも10日前に誘導される。

【００７０】

あるいは及び/又はさらに、炎症は、グラフトされる1つ以上の細胞を導入した後に誘導される。例えば、限定するものではないが、炎症は、グラフトされる1つ以上の細胞の導入の少なくとも10分後、少なくとも30分後、少なくとも1時間後、少なくとも2時間後、少なくとも4時間後、少なくとも6時間後、少なくとも8時間後、少なくとも10時間後、少なくとも12時間後、少なくとも14時間後、少なくとも16時間後、少なくとも18時間後、少なくとも20時間後、少なくとも22時間後、1日後、少なくとも2日後、少なくとも3日後、少なくとも4日後、少なくとも5日後、少なくとも6日後、少なくとも7日後、少なくとも8日後、少なくとも9日後又は少なくとも10日後に誘導される。

【００７１】

ある特定の非限定的実施形態では、細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞の移植レシピエントは、グラフトされた細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞の免疫拒絶を最小限にするために、免疫抑制剤をさらに投与されてもよい。免疫抑制剤は、これらに限定されないが、T細胞及び/又はB細胞の活性を含む、任意の生来の免疫系の活性を阻害又は抑制することによって、外来の又はグラフトされた組織に対するレシピエント哺乳動物における有害免疫応答を低減又は防止することができる。免疫抑制剤の投与として、これらに限定されないが、放射線療法の投与及び/又は免疫抑制薬の投与が挙げられる。適切な免疫抑制薬の例として、これらに限定されないが、ステロイド(例えば、コルチコステロイド、デキサメタゾン、及びプレドニゾン)、Cox-1及びCox-2阻害剤、マクロライド系抗生物質(例えば、ラパマイシン及びタクロリムス)、並びにB細胞、T細胞、及び/又は他の生来の免疫活性を制限、低減、若しくは抑制する他の物質が挙げられる。ある特定の実施形態では、本開示に関して使用するのに特に適切な免疫抑制剤として、肝臓及び/又は腎臓移植に関して使用するために公知の免疫抑制剤、これらに限定されないが、ステロイド、シクロスポリン、ラパマイシン、アザチオプリン、プレドニゾン、及びOKT3が挙げられる。ある特定の実施形態では、肝細胞移植片レシピエントは、FK506とも呼ばれる免疫抑制剤タクロリムスが投与され、それによりIL-2及び下流Bリンパ球の活性が阻害され得る。

【００７２】

ある特定の非限定的実施形態では、対象は、免疫抑制剤、例えば、この段落の上記に記載された薬剤が投与されない(例えば、限定するものではないが、自己の肝細胞又は腎細胞が移植される場合)。

【００７３】

5.2.1 肝疾患及び肝障害の処置

本開示は、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、治療的有益性のために対象に、例えば、肝機能の低下した対象において使用することができる、異所性肝臓組織を産生する目的で、FALC又はリンパ節に肝細胞を伝播させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、FALCは大綱に位置する。

【００７４】

肝機能の強化を必要とする対象は、これらに限定されないが、線維症肝及び/若しくは肝硬変、又は疾患、外傷若しくは毒作用によって損傷した肝臓を有する対象を含む、健康状態を維持するのに十分な機能的肝臓を欠いている対象である。例えば、健康状態は、対象に対して正常範囲内にある1つ以上の肝機能パラメータによって証明される。肝機能パラメータの非限定的な例として、アルブミンレベル、アラニントランスアミナーゼ(「ALT」)レベル、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(「AST」)レベル、クレアチニンレベル、

総ビリルビンレベル、直接ビリルビンレベル、フェニルアラニンレベル、アラニンレベル、グリシンレベル、バリンレベル、グルタミン酸レベル、プロトロンビン時間、乳酸デヒドロゲナーゼ及びアルカリホスファターゼが挙げられ、これらのレベルの正常範囲は、ヒト対象を含む様々な対象に関して当技術分野で公知である。ある特定の非限定的実施形態では、1つ以上、又は2つ以上、又は3つ以上の前記パラメータの、正常レベルに対する少なくとも約25%又は少なくとも約50%の上昇が、肝機能強化の必要性を示す。対象の肝機能強化を達成することは、少なくとも1つの肝機能パラメータの正常範囲への移行、例えば、限定するものではないが、少なくとも約10パーセント又は少なくとも約20パーセント又は少なくとも約30パーセント又は少なくとも約40パーセント又は少なくとも約50パーセントの改良を意味する。

【００７５】

ある特定の非限定的実施形態では、肝機能の強化は、例えば、少なくとも約20%又は少なくとも約30%の対象の生存率の延長によって示される。

【００７６】

ある特定の実施形態では、肝機能の強化を必要とする対象は、肝疾患、肝障害、肝不全及び/又は肝機能低下に罹患している可能性がある。本開示の方法によって処置することができる肝疾患及び/又は肝障害の非限定例として、代謝障害、クリグラーナジャー症候群I型、急性肝不全、肝硬変、ヘモクロマトーシス、高シュウ酸尿症、シュウ酸症、ウィルソン病、アルファ-1アンチトリプシン欠損、肝臓がん、肝炎(アルコール性及び自己免疫性)、脂肪肝及び非アルコール性脂肪肝が挙げられる。本開示の方法によって処置することができる胆管系(及び肝臓に間接的に)に関連する疾患及び/又は障害の非限定例として、原発性胆汁性肝硬変及び原発性硬化性胆管炎が挙げられる。

【００７７】

ある特定の非限定的実施形態では、本開示は、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の肝細胞を投与することを含み、投与した肝細胞の少なくとも1つが、FALC又はリンパ節において又はその周辺で増殖し、異所性肝臓組織を生じ、それによって、対象の肝機能が強化される、方法を提供する。

【００７８】

ある特定の実施形態では、対象中に移植される肝細胞は、ヒト肝細胞、非ヒト肝細胞又は両方であってもよい。肝細胞は、意図したレシピエントに対して、同系又は同種であってもよい。非限定的実施形態では、肝細胞は、意図したレシピエントに対して自家性である(例えば、移植前の培養で回収及び増殖したか、又は意図したレシピエントの前駆細胞若しくは肝細胞から生成した)。ある特定の非限定的実施形態では、1つの種の肝細胞が、別の種中に移植されてもよく、例えば、これらに限定されないが、ヒト肝細胞が、非ヒト(例えば、マウス)宿主中に移植されてもよい。例えば、限定するものではないが、非ヒト肝細胞は、ヒトレシピエントのFALCにグラフトすることができる。

【００７９】

グラフトされる肝細胞の有効量又は治療有効量は、約10^4から10^{11}個の間の肝細胞、又は約10^5から10^{10}個の間の肝細胞又はFALC若しくはリンパ節において異所性肝臓組織の少なくも1つの部位を生じるのに有効であることが見出された量を含み得る。ある特定の実施形態では、肝細胞の有効量は、1つ以上の肝細胞を含んでもよい。ある特定の実施形態では、対象に約10^5から約10^{11}個、約10^5から約10^9個、約10^5から約10^8個、約10^5から約10^7個、約10^5から約10^6個、約10^6から約10^{11}個、約10^6から約10^{10}個、約10^6から約10^9個、約10^6から約10^8個、約10^6から約10^7個、約10^7から約10^{11}個、約10^7から約10^{10}個、約10^7から約10^9個又は約10^7から約10^8個の肝細胞を投与することができる。

【００８０】

ある特定の実施形態では、所望の異所性肝臓組織を達成するために、対象に肝細胞を2回以上、投与することができる。例えば、限定するものではないが、対象に肝細胞を少なくとも2回、少なくとも3回又は少なくとも4回、投与することができる。あるいは又はさらに、2つ以上の異所性肝臓組織を得るために、FALC又はリンパ節を含有する2つ以上の異

なる解剖学的領域に肝細胞をグラフトすることができる。

【００８１】

ある特定の非限定的実施形態では、本開示は、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の肝細胞を投与すること、及び対象のFALCにおける肝細胞の少なくとも1つの増殖を促進することを含む、方法を提供する。ある特定の実施形態では、このような増殖は、例えば、これらに限定されないが、異所性肝臓組織の形成のために標的とされるFALCを含有する解剖的領域に局所的に肝細胞を投与することによって、及び/又は上記に開示されているように、異所性肝臓組織の形成を促進する少なくとも1つ薬剤を提供することによって、促進することができる。ある特定の実施形態では、薬剤は、例えば、これらに限定されないが、複数の骨髄由来細胞及び/又は複数の間質細胞であってもよい。ある特定の実施形態では、薬剤は、上述のように、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーター、例えば、LTβR又はNIK又はその下流標的のアクチベーターであってもよい。ある特定の実施形態では、薬剤は、骨髄由来細胞、間質細胞、LTβR及び/若しくはNIKシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せであってもよい。類似の方法を使用して、肝機能を強化するために、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００８２】

ある特定の非限定的実施形態では、本開示は、異所性肝臓組織を生成する方法であって、例えば、上記に記載したように、FALC中に肝細胞を導入すること、及び異所性肝臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法を提供する。例えば、限定するものではないが、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、(a)対象に、治療有効量の肝細胞を対象のFALC中に投与して異所性肝臓組織を形成すること、並びに(b)対象に1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を投与して、例えば、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性肝臓組織を形成することによって、異所性肝臓の形成を促進することを含む。類似の方法を使用して、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００８３】

ある特定の非限定的実施形態では、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、(a)対象に、治療有効量の肝細胞を対象のFALC中に投与して異所性肝臓組織を形成すること、(b)対象にLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを投与して異所性肝臓組織の形成を促進することを含むことができる。類似の方法を使用して、肝機能を強化するために、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００８４】

ある特定の非限定的実施形態では、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、(a)対象に、治療有効量の肝細胞を対象のFALC中に投与して異所性肝臓組織を形成すること、(b)対象に1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を投与して、例えば、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性肝臓組織を形成することによって、異所性肝臓の形成を促進すること、並びに(c)LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを投与することを含むことができる。類似の方法を使用して、肝機能を強化するために、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００８５】

ある特定の実施形態では、肝機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、対象において炎症を誘導することをさらに含み得る。例えば、限定するものではないが、上記に開示されているように、炎症は、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導することができる。ある特定の実施形態では、炎症は、上述のように、グラフトされる1つ以上の肝細胞を導入する前に誘導される。

【００８６】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、上述のように、インビボで実施される。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、例えば、培養した組織外植片のように、インビトロ/エクスビボで実施される。ある特定の非限定的実施形態では、本開示の主題は、例

えば、肝機能の強化を必要としている対象に後で移植するために、このようなインビトロ/エクスビボでの方法で産生された肝臓組織を提供する。

【００８７】

5.2.2 腎疾患及び腎障害の処置

本開示は、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、治療的有益性のために対象に、例えば、腎機能の低下した対象に使用することができる、異所性腎臓組織を産生する目的で、FALC又はリンパ節に腎細胞又は腎臓組織の断片を伝播させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、FALCは大綱に位置する。

【００８８】

腎機能の強化を必要とする対象は、これらに限定されないが、腎不全、又は疾患、外傷若しくは毒作用によって損傷した腎臓を有する対象を含む、健康状態を維持するのに十分な機能的腎臓を欠いている対象である。例えば、限定するものではないが、健康状態は、対象に対して正常範囲内にある1つ以上の腎機能パラメータによって証明される。腎機能パラメータの非限定例として、クレアチニンレベル、タンパク質レベル及びアルブミンレベルが挙げられ、これらのレベルの正常範囲は、ヒト対象を含む様々な対象に関して当技術分野で公知である。ある特定の非限定的実施形態では、1つ以上、又は2つ以上、又は3つ以上の前記パラメータの、正常レベルに対する少なくとも約25%又は少なくとも約50%の上昇が、腎機能強化の必要性を示す。対象の腎機能強化を達成することは、少なくとも1つの腎機能パラメータの正常範囲への移行、例えば、限定するものではないが、少なくとも約10パーセント又は少なくとも約20パーセント又は少なくとも約30パーセント又は少なくとも約40パーセント又は少なくとも約50パーセントの改良を意味する。ある特定の実施形態では、対象の糸球体濾過量(GFR)が、腎機能低下の指標である。例えば、限定するものではないが、対象のGFRの約10%、約20%、約30%、約40%又は約50%の低下が、腎機能低下の指標である。ある特定の実施形態では、生着した細胞は、濃縮尿を産生することができる。

【００８９】

ある特定の非限定的実施形態では、腎機能の強化は、例えば、少なくとも約20%又は少なくとも約30%の対象の生存率の延長によって示される。

【００９０】

ある特定の実施形態では、腎機能の強化を必要とする対象は、腎疾患、腎障害、腎不全及び/又は腎機能低下に罹患している可能性がある。本開示の方法によって処置することができる腎疾患及び/又は腎障害の非限定例として、急性腎不全、慢性腎疾患、糸球体腎炎、ループス、多発性嚢胞腎疾患、腎症、ネフローゼ、腎奇形及び腎臓がんが挙げられる。腎疾患に関連する他の非限定例は、赤血球生成の減少、活性型ビタミンDの欠如及び異常な非甲状腺性疾病である。

【００９１】

ある特定の非限定的実施形態では、本開示は、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の腎細胞を投与することを含み、投与した腎細胞の少なくとも1つが、FALC又はリンパ節において又はその周辺で増殖し、異所性腎臓組織を生じ、それによって対象の腎機能が強化される、方法を提供する。

【００９２】

ある特定の実施形態では、腎細胞又は腎臓組織の断片をFALC又はリンパ節に又はその周辺にグラフトして、異所性腎臓組織を生成する。ある特定の実施形態では、対象中に移植される腎細胞又は腎臓組織の断片は、ヒト又は非ヒト細胞であってもよい。非ヒト腎細胞の非限定例として、非ヒト霊長類腎細胞及び様々な非ヒト動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ由来などの腎細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、腎細胞及び/又は腎臓組織断片は、意図したレシピエントに対して、同系又は同種であってもよい。非限定的実施形態では、腎細胞及び/又は腎臓組織断片は、意図したレシピエントに対して自家性である(例えば、移植前の培養で回収及び増殖し

たか、又は意図したレシピエントの前駆細胞若しくは幹細胞から生成した)。ある特定の実施形態では、腎細胞は、胎児の腎細胞又は組織、例えば、後腎である。ある特定の実施形態では、腎細胞は、後腎、例えば、インタクトな後腎ではない。ある特定の実施形態では、腎細胞は、腎臓始原細胞であってもよい。ある特定の非限定的実施形態では、1つの種の腎細胞及び/又は腎臓組織断片が、別の種中に移植されてもよく、例えば、これらに限定されないが、ヒト腎細胞が、マウス宿主中に移植されてもよい。例えば、限定するものではないが、非ヒト腎細胞及び/又は腎臓組織断片は、ヒトレシピエントのFALCにグラフトすることができる。

【００９３】

ある特定の実施形態では、腎細胞の有効量は、約10^4と10^{11}個との間の腎細胞、又は約10^5から10^{10}個の間の腎細胞又はFALCにおいて異所性腎臓組織の少なくも1つの部位を生じるのに有効であることが見出された量を含み得る。ある特定の実施形態では、腎細胞の有効量は、1つ以上の腎細胞を含んでもよい。ある特定の実施形態では、対象に約10^5から約10^{11}個、約10^5から約10^9個、約10^5から約10^8個、約10^5から約10^7個、約10^5から約10^6個、約10^6から約10^{11}個、約10^6から約10^{10}個、約10^6から約10^9個、約10^6から約10^8個、約10^6から約10^7個、約10^7から約10^{11}個、約10^7から約10^{10}個、約10^7から約10^9個又は約10^7から約10^8個の量の腎細胞を投与することができる。

【００９４】

ある特定の実施形態では、所望の異所性腎臓組織を達成するために、対象に腎細胞及び/又は腎臓組織断片を2回以上、投与することができる。例えば、限定するものではないが、対象に腎細胞及び/又は腎臓組織断片を少なくとも2回、少なくとも3回又は少なくとも4回、投与することができる。あるいは又はさらに、2つ以上の異所性腎臓組織を得るために、FALC又はリンパ節を含有する2つ以上の異なる解剖学的領域に腎細胞及び/又は腎臓組織断片をグラフトすることができる。

【００９５】

ある特定の実施形態では、本開示は、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の腎細胞(又は腎臓組織の断片)を投与すること、及び対象の脂肪関連リンパ球集積又はリンパ節における腎細胞の増殖を促進することを含む、方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、このような増殖は、例えば、これらに限定されないが、異所性腎臓組織の形成のために標的とされるFALC又はリンパ節を含有する解剖的領域に局所的に腎細胞を投与すること、及び/又は異所性腎臓組織の形成を促進する少なくとも1つ薬剤を提供することによって、促進することができる

【００９６】

ある特定の実施形態では、薬剤は、例えば、これらに限定されないが、複数の骨髄由来細胞及び/又は複数の間質細胞若しくは間質内皮細胞であってもよい。あるいは及び/又はさらに、薬剤は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーター、例えば、LTβR又はNIK又はその下流標的のアクチベーターであってもよい。ある特定の実施形態では、薬剤は、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターであってもよい。ある特定の実施形態では、薬剤は、骨髄由来細胞、間質細胞、LTβR及び/若しくはNIKシグナル伝達経路のアクチベーター、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーター又はこれらの組合せであってもよい。

【００９７】

ある特定の非限定的実施形態では、本開示は、異所性腎臓組織を生成する方法であって、FALC中に腎細胞を含む組成物を導入すること、及び、例えば、上記に記載したように、異所性腎臓組織の形成を促進する少なくとも1つの薬剤を提供することを含む、方法を提供する。例えば、限定するものではないが、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、(a)対象に、治療有効量の腎細胞又は腎臓組織断片を対象のFALC中に投与して異所性腎臓組織を形成すること、並びに(b)対象に1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を投与して、例えば、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性腎臓組織を形成することによって、異所性腎臓の形成を促進することを含む。類似の方法を使用し

て、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００９８】

ある特定の非限定的実施形態では、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、(a)対象に、治療有効量の腎細胞又は腎臓組織断片を対象のFALC又はリンパ節中に投与して異所性腎臓組織を形成すること、並びに(b)対象に1つ以上の骨髄由来細胞及び/又は間質細胞を投与して、例えば、1つ以上の細胞の増殖及び/又は血管形成を促進して異所性腎臓組織を形成することによって、異所性腎臓の形成を促進することを含む。類似の方法を使用して、腎機能を強化するために、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【００９９】

ある特定の非限定的実施形態では、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、(a)対象に、治療有効量の腎細胞又は腎臓組織断片を対象のFALC又はリンパ節中に投与して異所性腎臓組織を形成すること、(b)対象にLTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを投与して異所性腎臓組織の形成を促進することを含み得る。類似の方法を使用して、腎機能を強化するために、リンパ節において異所性組織を生成してもよい。

【０１００】

ある特定の実施形態では、腎機能の強化を必要とする対象を処置する方法は、対象において炎症を誘導することをさらに含み得る。例えば、限定するものではないが、上記に開示されているように、炎症は、対象に炎症を促進する薬剤を投与することによって誘導することができる。ある特定の実施形態では、炎症は、上述のように、グラフトされる1つ以上の肝細胞を導入する前に誘導される。

【０１０１】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、上述のように、インビボで実施される。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、例えば、培養した組織外植片のように、インビトロ/エクスビボで実施される。ある特定の非限定的実施形態では、本開示の主題は、例えば、腎機能の強化を必要としている対象中に後で移植するために、このようなインビトロ/エクスビボでの方法で産生された腎臓組織を提供する。

【０１０２】

5.3 組成物及びキット

本開示の主題は、異所性組織を生成するための組成物を提供する。本開示は、1つ以上の細胞及び1つ以上の細胞からの異所性組織の形成を促進するために使用することができる1つ以上の薬剤を含む異所性組織を生成するための組成物を提供する。

【０１０３】

ある特定の実施形態では、組成物中に存在する1つ以上の細胞は、肝細胞を含む。ある特定の実施形態では、組成物中に存在する1つ以上の細胞は、腎細胞を含む。ある特定の実施形態では、肝細胞又は腎細胞は、移植のために調製することができ、及び/又は移植手順は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,125,891号に記載されている方法論を使用して実行することができる。

【０１０４】

本開示において使用するのに適切な細胞は、任意の適切な供給源に由来し得る。例えば、限定するものではないが、細胞は、自己の供給源に由来し得る。ある特定の実施形態では、細胞は、細胞が埋め込まれる対象に由来し得る。ある特定の実施形態では、細胞は、異種の供給源に由来し得る。ある特定の実施形態では、細胞は、細胞が埋め込まれる対象と異なる個体に由来し得る。ある特定の実施形態では、細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞は、様々な供給源に由来する幹細胞から生成することもでき、次いで、関連する細胞型に分化する。ある特定の実施形態では、細胞は、様々な条件下で一定期間培養して、本開示の組成物及び/又は方法において使用する前に、ある特定の表現型を誘導することができる。

【０１０５】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示の組成物内に含有される細胞数は様々であってもよい。ある特定の実施形態では、組成物は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、

約10、約15、約20、約25、約30、約35、約50、約100、約150、約200、約300、約400、約500、約1000、約10,000、約100,000又は約1,000,000個の細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞を含むことができる。ある特定の実施形態では、組成物は、約10^4から約10^{11}個の細胞、例えば、肝細胞又は腎細胞を含むことができる。

【０１０６】

ある特定の実施形態では、本開示は、異所性肝臓を生成するため又は肝機能の強化を必要とする対象を処置するための組成物を提供する。ある特定の実施形態では、組成物は、複数の肝細胞及び1つ以上の、異所性肝臓の形成を促進する以下の薬剤を含む。ある特定の実施形態では、薬剤は、肝細胞ではない1つ以上の細胞であってもよい。例えば、限定するものではないが、1つ以上の薬剤は、複数の骨髄由来細胞及び/又は複数の間質細胞を含むことができる。ある特定の実施形態では、骨髄由来細胞は、造血幹細胞であってもよい。ある特定の実施形態では、間質細胞は、線維芽細胞又は線維芽様細胞、例えば、細網線維芽細胞(FRC)、濾胞樹状細胞(FDC)、リンパ管内皮細胞(LEC)、血管内皮細胞(BEC)、アルファ-7インテグリン周皮細胞(AIP)及びダブルネガティブ細胞(DNC)であってもよい。

【０１０７】

ある特定の実施形態では、本開示は、異所性腎臓を生成するため又は腎機能の強化を必要とする対象を処置するための組成物を提供する。ある特定の非限定的実施形態では、本開示は、複数の腎細胞(又は腎臓組織の断片)及び異所性腎臓の形成を促進する1つ以上の薬剤を含む、異所性腎臓を生成するための組成物を提供する。ある特定の実施形態では、薬剤は、腎細胞ではない1つ以上の細胞であってもよい。例えば、限定するものではないが、1つ以上の薬剤は、複数の骨髄由来細胞及び複数の間質細胞を含んでもよい。ある特定の実施形態では、骨髄由来細胞は、造血幹細胞であってもよい。ある特定の実施形態では、間質細胞は、線維芽細胞又は線維芽様細胞、例えば、細網線維芽細胞(FRC)、濾胞樹状細胞(FDC)、リンパ管内皮細胞(LEC)、血管内皮細胞(BEC)、アルファ-7インテグリン周皮細胞(AIP)及びダブルネガティブ細胞(DNC)であってもよい。

【０１０８】

ある特定の実施形態では、組成物は、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターをさらに含んでもよい。LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターの非限定例は、上記で議論されている。ある特定の実施形態では、組成物は、非カノニカルNF-κBシグナル伝達経路のアクチベーターをさらに含んでもよい。例えば、限定するものではないが、本開示の組成物は、複数の細胞、例えば、腎細胞(又は腎臓組織の断片)又は肝細胞、及び治療有効量の、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを含んでもよい。

【０１０９】

ある特定の実施形態では、本開示は、(a)複数の細胞、例えば、腎細胞(又は腎臓組織の断片)又は肝細胞、(b)複数の骨髄由来細胞及び複数の間質細胞、並びに(c)治療有効量の、LTβR及び/又はNIKシグナル伝達経路のアクチベーターを含んでもよい組成物を提供する。

【０１１０】

ある特定の実施形態では、組成物は、任意選択で、合成培養培地及び/又は足場を含んでもよい。ある特定の実施形態では、培地及び/又は足場は、これらに限定されないが、ペプチド、タンパク質、炭水化物、マトリゲル、ヒアルロン酸、コラーゲン、フィブリン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、ポリオルトエステル、ポリビニルアルコール、ポリアミド、ポリカーボネート、アガロース、アルギン酸、ポリ(エチレン)グリコール、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン、ポリビニルピロリドン、海洋接着タンパク質、シアノアクリレート、高分子ヒドロゲル、これらのアナログ又は組合せを含んでもよい。

【０１１１】

ある特定の実施形態では、組成物は、任意選択で、抗生物質を含んでもよい。抗生物質の非限定例として、これらに限定されないが、ペニシリン、例えば、ペニシリン及びアモ

キシシリン;セファロスポリン、例えば、セファレキシン;スルホンアミド、例えば、コトリモキサゾール及びトリメトプリム;マクロライド、例えば、エリスロマイシン、カリスロマイシン及びアジスロマイシン;フルオロキノロン、例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン及びオフロキサシン;テトラサイクリン、例えば、テトラサイクリン及びドキシサイクリン;並びにアミノグリコシド、例えば、ゲンタマイシン及びトブラマイシンが挙げられる。

【０１１２】

本開示は、上記開示の方法によって産生される異所性組織を誘導する組成物をさらに提供する。例えば、限定するものではないが、本開示の組成物は、上記に開示されているように、非ヒト宿主において産生されたヒト肝臓組織を含んでもよい。ある特定の実施形態では、組成物は、任意選択で、合成培養培地及び/又は足場を含んでもよい。ある特定の実施形態では、組成物は、任意選択で、抗生物質を含んでもよい。

【０１１３】

本開示は、本明細書に開示の1つ以上の組成物を含むキットをさらに提供する。ある特定の実施形態では、キットが、1つ以上の組成物を含む場合、各組成物は、キットにおいてそれ自身の容器内で提供され得る。ある特定の実施形態では、本開示のキットは、キットを使用するための使用説明書、例えば、キット中に存在する組成物を投与するための使用説明書をさらに提供する。ある特定の実施形態では、この開示のキットは、使用のための使用説明書、デバイス及び追加の試薬などの1つ以上の構成成分、並びに上記開示の方法を実施するためのチューブ、容器及びシリンジなどの構成成分をさらに含んでもよい。

【０１１４】

以下の実施例は、本開示をより十分に例証するために提供されるが、その範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【０１１５】

[6. 実施例1: 二次的リンパ組織における肝臓の生体工学]

6.1. リンパ節(LN)及び乳斑(FALC)における補助肝臓の生成

全器官移植の代替としての肝細胞移植に関する新たな部位を特定するために、肝細胞によって、誘導肝不全のモデルである$Fah^{-/-}$マウス(チロシン分解酵素であるフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ(Fah)が欠乏したマウス)への腹腔内注入(IP)後に、デノボで異所性結節が形成され、続いて、2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチルベンゾイル)-1,3-シクロヘキサンジオン(「NTBC」)を飲料水から除去することができるという異常観察を行った(32)。最初に、正常な肝細胞が、リンパ系に移動して、$Fah^{-/-}$マウスのリンパ節でコロニーを形成し(図2A)、ネイティブ肝臓の質量の70%を超えて異所的に生成することを観察した。これは、特に、どのようなリンパ節が、いくつかのがんに関する初期転移の共通部位であるかを考慮すると、驚くべき結果であった。図3は、肝細胞のIP移植の3から4週間後の$Fah^{-/-}$マウス、毛管スペースの拡大及び乳斑における血管の出芽を示す。

【０１１６】

これは、リンパ節が、組織及び器官の機能を復元するために、複数の細胞型の異所性移植に関する部位として、直接的に標的とされ得るという仮説を導く。肝細胞の単一の$Fah^{-/-}$マウスリンパ節(腋窩、膝窩又は腸間膜)への直接的注入により、致死性の代謝疾患に罹患したこれらの突然変異体マウスの生存を救済するのに十分に機能的な異所性肝臓塊が生成されたことが確立された(33)。

【０１１７】

より最近では、異所性肝臓を生成するという概念が、肝疾患を誘導した後のより大きな動物にも変換され得ることが実証された(図2B)。ここで、肝疾患のブタモデルを作成し、門脈大静脈シャントを実施することによって、リンパ節における異所性肝臓組織を成長させ、続いて、腸間膜リンパ節への肝細胞移植を行った。部分肝切除を使用してさらに増加させた肝臓の傷害を6頭のブタに移植した。この実験の結果は、リンパ節における肝細胞の生着及びすべての移植動物における異所性肝臓の質量増加を伴う肝組織の生成の実証で

あった(図2B)。門脈大静脈シャントは、重篤な肝疾患を有する患者に対する主要な外科手術の手段であるが、現在は、あまり一般的には使用されていない。門脈大静脈シャントによって、門脈圧亢進症による衰弱を軽減するために、血管(門脈から大静脈へ)の間に新たな接続を創出することによって、肝臓の血流の75%が低減される。さらに、この、肝臓への血流の劇的な低減は、肝栄養因子及び肝細胞増殖を誘導することが知られている(41)。

【０１１８】

今日、重大な門脈圧亢進症を有する肝硬変患者において、門脈から肝静脈の間に新たな接続を開始するための、同様であるが好ましい、侵襲性が最小限の手順が、経頸静脈的肝内門脈大循環短絡術(TIPS)である。ブタモデルにおけるこれらの有望な結果及びTIPS後の患者に関する有効な変換による結果によって、リンパ微小環境が、移植細胞に対してこのように良好な宿主である方法及び理由が決定されるべきであった。

【０１１９】

肝細胞は、乳斑へも生着する。IP注入後のFah$^{-/-}$マウスにおける肝細胞生着部位を注意深く解析すると、リンパ節に加えて、肝細胞は、肝リンパ節を生成する、大綱の乳斑へも移動することが判明した(図2C～D、図3～5)。図3に示すように、毛管スペースの拡大及び乳斑における血管の出芽(例えば、下の右側のパネル)に留意されたい。乳斑は、より大きな大綱において最も見られる、リンパ組織の小さな「乳白色」のエリア(脂肪関連リンパ球集積又は「FALC」)である(図2C)。造血幹細胞(リンパ細胞及びマクロファージ)及び間質細胞のこれらの凝集体は、リンパ節に類似する、二次的リンパ器官として知られている(42、43)。驚くべきことではないが、乳斑は、特に、転移性卵巣がんを伴う癌性腹膜炎の早期標的としても特定されていた。

【０１２０】

異所性肝臓の形成がリンパ組織環境を必要としたことを確認するために、IP移植を、組換え活性化遺伝子2(RAG2)及び一般的なサイトカイン受容体ガンマ鎖(ガンマc)に突然変異をさらに有するFah$^{-/-}$NODマウス(「FRGN」マウス)において、実施した;このようなマウスは完全に無リンパ球である(44)。図6に示すように、大綱の乳斑、及びFALCは、FRGNマウスにおいて欠失している。肝細胞のIP移植によって、野生型の対照に対してFRGNマウスの大綱では生着が乏しい結果となり(図7)、生着した細胞の成長は観察されなかった(図8)。興味深いことに、乳斑及びFALCを形成する能力は、骨髄移植によってFRGNマウスで復元され(図9及び10)、これらの乳斑及びFALCは、異所性肝臓の形成を支持することができた(図11及び12)。

【０１２１】

6.2. 異所性肝臓発生に関する分子機序

次いで、リンパ節が、肝細胞の生着及びFah$^{-/-}$の生存に必要とされるかどうかを求めた。肝細胞は、乳斑及びリンパ節のコロニーを形成していると考えられ、機能的リンパ節を欠くFah$^{-/-}$マウスが、乳斑に、生存するのに十分な異所性肝臓の質量を生じることができるかどうかを知ろうとした。この仮説を試験するために、リンパ芽球性マウス(aly/aly)を誘導可能な腎不全を受けたマウス(Fah$^{-/-}$)と交雑した。aly/alyマウスはリンパ節、パイエル板を欠き、細胞において非カノニカルNF-κBシグナル伝達を中断するNF-κB誘導性キナーゼ(NIK)における点突然変異に起因して脱組織化した脾臓を有する(図13)。非カノニカルNF-κBシグナル伝達がない場合、リンパ節の器官形成は、発生の間に当然起こらないが(リンパ節なし)、リンパ管、及び重要なことに乳斑は、これらのマウスにおいて存在し、機能的である(43)。

【０１２２】

IP移植した肝細胞がaly/aly-Fah$^{-/-}$マウスにおいて生着するかどうかを最初に試験した(図14)。肝細胞の大多数が、大綱の乳斑に移動したことが判明し、肝細胞が、Fah$^{-/-}$マウスと同様にaly/aly-Fah$^{-/-}$マウスの大綱に生着したが(図15)、6週間経過しても大きな結節を形成することができず、移植したマウス(n=28)は、大綱における最初の生着にもかかわらず、12週間(対照のFah-/-マウスを救済するのに必要とされる時間)後にも救済されなかったことが確認された(図14、最も右側のカプランマイヤー生存率のプロット)。剖検で

は、Fah$^{-/-}$マウスにおいて生じた異所性結節と比較した血管形成の限界が観察された。肝細胞はまた、aly/aly-Fah$^{-/-}$マウスの肝臓(脾臓注入による)中に移植され、マウスが肝不全から救済されたことが分かった(図14、最も左側のカプランマイヤー生存率のプロット)。この結果は、aly/aly-Fah$^{-/-}$マウスにおける肝細胞の腹腔内での成長の欠如がこの部位に特有であり、aly(NIK)突然変異によるNIK経路の中断の結果であることをため、重要である(図16)。肝臓中に注入した肝細胞(脾臓注入)は、NIK経路を必要とせず、正常な肝臓構造内の傷害肝細胞(dying hepatocyte)をおそらく置き換える。

【０１２３】

次に、異所性肝臓の形成に対して宿主の役目を果たし得るリンパ球の環境を特徴付けるための研究を行った。図17Aは、乳斑と比較した、リンパ節におけるリンパ球のマーカーであるポドプラニン及び内皮マーカーであるCD31の分布を示す。図17Bに示すように、移植肝細胞は、ER-TR7保有間質細胞との密接な関連を形成する。興味深いことに、肝細胞ではなく、大綱の間質細胞が腹腔内注入により移植されると、大綱の間質細胞もまた、大綱内の乳斑に移動して戻る(図17C)。図18に示すように、間質細胞は、NIK及びリンフォトキシンベータ受容体の両方を発現することが判明し、肝細胞は、順に、リンフォトキシンアルファ(腫瘍壊死因子ベータとしても知られる)及びリンフォトキシンベータ(腫瘍壊死因子Cとしても知られる)陽性であった。

【０１２４】

肝細胞がリンフォトキシンベータ(「LTb」)を発現し、間質細胞がリンフォトキシンベータ受容体(「LTbR」)を発現するという観察を考慮すると、肝細胞が、LTbRを欠くFah$^{-/-}$マウスの乳斑において生着及び成長するかどうかを確かめることは興味の対象である。結果は図19に示され、Fah/LTbR$^{-/-}$マウスにおける肝細胞の成長がFah$^{-/-}$、LTbR^{+}マウスにおける肝細胞の成長よりも低いことが観察された。

【０１２５】

結論として、IP注入した肝細胞は、器官形成を経て、Fah$^{-/-}$マウスにおいて異所性肝臓の質量を支持する新たな血管形成を完了し、NIK経路は、完了されるこのプロセスに必要な特有の経路である。

【０１２６】

Dr. Stephen Paget博士(1889)によるがんについての古典的な種と畑仮説では、種(転移性のがん)は、成功するために畑(肥沃な環境)を必要とする。本明細書に記載の結果は、種(肝細胞)が、異所性部位で肝臓組織を生着及び生成するために、畑(二次的リンパ器官)を必要とすることを実証する。いかなる特定の理論にも拘束されることなく、このデータは、間質細胞を有する肝細胞が、リンフォトキシン/NIK経路を活性化して、乳斑中に補助肝臓を生成する機序を支持する。さらに、このデータは、肝臓(脾臓ルート)又は乳斑(IPルート)における肝細胞の移植による肝臓組織の再生が、機構的に異なることを示す。NF-κB誘導性キナーゼ(NIK)におけるaly/aly点突然変異によって、ネイティブ肝修復以外の異所性肝臓発生が中断された。NIKは、二次的リンパ器官発生のための非カノニカルNF-κBシグナル伝達において中心的機能を有する。NIKは、マイトジェン活性化タンパク質3(MAP3)キナーゼのメンバーであり、受容体ライゲーションの後、検出可能なレベルまで蓄積する。このことにより、NIKをリン酸化させ、κBキナーゼαの阻害剤(IKKα)を活性化し、したがって、p100のIKKαに媒介されるリン酸化を開始する(図13を参照のこと)。

【０１２７】

6.3. (参照文献)

1. Starzl, T.E. et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. Ann Surg 168, 392-415 (1968).
2. Reuben, A. Alcohol and the liver. Curr Opin Gastroenterol 23, 283-291 (2007).
3. Perkins, J.D. et al. Should liver transplantation in patients with model for end-stage liver disease scores <or= 14 be avoided? A decision analysis approach. Liver Transpl 15, 242-254 (2009).
4. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Lok, A.S. & Marrero, J.A. Modified Charlson como

rbidity index for predicting survival after liver transplantation. Liver Transpl 13, 1515-1520 (2007).
5. Lipshutz, G.S. & Busuttil, R.W. Liver transplantation in those of advancing age: the case for transplantation. Liver Transpl 13, 1355-1357 (2007).
6. Strom, S.C., Chowdhury, J.R. & Fox, I.J. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. Semin Liver Dis 19, 39-48 (1999).
7. Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science (New York, N.Y.) 263, 1149-1152 (1994).
8. Weglarz, T.C., Degen, J.L. & Sandgren, E.P. Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. Am J Pathol 157, 1963-1974 (2000).
9. Braun, K.M. & Sandgren, E.P. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. Am J Pathol 157, 561-569 (2000).
10. Grompe, M. et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet 10, 453-460 (1995).
11. Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M. & Grompe, M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. The American journal of pathology 151, 1273-1280 (1997).
12. Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med 6, 1229-1234 (2000).
13. Grompe, M. Principles of therapeutic liver repopulation. J Inherit Metab Dis 29, 421-425 (2006).
14. Grompe, M., Overturf, K., al-Dhalimy, M. & Finegold, M. Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: a progress report. J Inherit Metab Dis 21, 518-531 (1998).
15. Overturf, K. et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet 12, 266-273 (1996).
16. Fox, I.J. et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. N Engl J Med 338, 1422-1426 (1998).
17. Nishikawa, T. et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. The Journal of clinical investigation 125, 1533-1544 (2015).
18. Tretbar, L.L., Beven, E.G. & Hermann, R.E. Homotransplantation of an auxiliary dog liver into the pelvis; effect of protacaval shunt in the prevention of liver atrophy. Surgical forum 16, 219-221 (1965).
19. Marchioro, T.L., Porter, K.A., Dickinson, T.C., Faris, T.D. & Starzi, T.E. Physiologic Requirements For Auxiliary Liver Homotransplantation. Surgery, gynecology & obstetrics 121, 17-31 (1965).
20. Van Thiel, D.H., Makowka, L. & Starzl, T.E. Liver transplantation: where it's been and where it's going. Gastroenterology clinics of North America 17, 1-18 (1988).
21. Moritz, M.J. et al. Heterotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure--a bridge to recovery. Transplantation 50, 524-526 (1990).
22. Boudjema, K. et al. Temporary auxiliary liver transplantation for subacute liver failure in a child. Lancet (London, England) 342, 778-779 (1993).
23. Terpstra, O.T., Reuvers, C.B. & Schalm, S.W. Auxiliary heterotopic liver tra

nsplantation. Transplantation 45, 1003-1007 (1988).
24. Metselaar, H.J. et al. Recovery of failing liver after auxiliary heterotopic transplantation. Lancet (London, England) 335, 1156-1157 (1990).
25. Faraj, W. et al. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure in children. Annals of surgery 251, 351-356 (2010).
26. Dokmak, S., Elkrief, L. & Belghiti, J. Auxiliary liver transplantation with a small deceased liver graft for cirrhotic liver complicated by hepatocellular carcinoma. Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation 26, e102-104 (2013).
27. Ren, W., Zhang, A. & Dong, J. Integrating repopulation and regeneration of the auxiliarily transplanted small liver graft: the solution for organ shortage and immunosuppression. Medical hypotheses 79, 241-245 (2012).
28. McKiernan, P. Liver transplantation and cell therapies for inborn errors of metabolism. Journal of inherited metabolic disease 36, 675-680 (2013).
29. Shanmugam, N.P. et al. Auxiliary liver transplantation: a form of gene therapy in selective metabolic disorders. Journal of clinical and experimental hepatology 1, 118-120 (2011).
30. Rela, M. et al. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I. Annals of surgery 229, 565-569 (1999).
31. Burdelski, M. & Rogiers, X. Liver transplantation in metabolic disorders. Acta gastro-enterologica Belgica 62, 300-305 (1999).
32. Hoppo, T., Komori, J., Manohar, R., Stolz, D.B. & Lagasse, E. Rescue of lethal hepatic failure by hepatized lymph nodes in mice. Gastroenterology 140, 656-666 e652 (2011).
33. Komori, J., Boone, L., DeWard, A., Hoppo, T. & Lagasse, E. The mouse lymph node as an ectopic transplantation site for multiple tissues. Nat Biotechnol 30, 976-983 (2012).
34. DeWard, A.D., Komori, J. & Lagasse, E. Ectopic transplantation sites for cell-based therapy. Current opinion in organ transplantation 19, 169-174 (2014).
35. Francipane, M.G. & Lagasse, E. Maturation of embryonic tissues in a lymph node: a new approach for bioengineering complex organs. Organogenesis, 1-9 (2014).
36. Francipane, M.G. & Lagasse, E. in Stem Cells Translational Medicine In press (2015).
37. Gupta, S. et al. Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. Hum Gene Ther 5, 959-967 (1994).
38. Jirtle, R.L. & Michalopoulos, G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. Cancer Res 42, 3000-3004 (1982).
39. Ohashi, K. et al. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. Nat Med 6, 327-331 (2000).
40. Ohashi, K. et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. Hepatology (Baltimore, Md.) 41, 132-140 (2005).
41. Nordlinger, B. et al. Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen? Demonstration by autohistoradiography in the rat. European surgical research. Europaische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes 19, 381-387 (1987).
42. Shah, S. et al. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. PloS one 7, e38368 (2012).

43. Rangel-Moreno, J. et al. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. Immunity 30, 731-743 (2009).
44. Mazurier F1, Fontanellas A, Salesse S, Taine L, Landriau S, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Peault B, Di Santo JP, de Verneuil H., A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. J Interferon Cytokine Res. 1999 May;19(5):533-41.
45. Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Ten Dijke P; IT-LIVER Consortium., TGF-β signalling and liver disease. FEBS J. 2016 Jun;283(12):2219-32.
46. Rogers S., Lowell J., Hammerman N., and Hammerman M., Transplantation of developing metanephroi into adult rats. Kidney International 1998; 54:27-37.

【０１２８】

[7. 実施例2:二次的リンパ組織における腎臓の生体工学]

マウスリンパ節(LN)、二次的リンパ器官(SLO)は、マウスの後腎の糸球体及び尿細管の機能を有するネフロンへの成熟を支持することができ、LNは、マウスのネフロン始原細胞(NP)又はヒトの誘導多能性幹細胞(hiPSC)から生じた腎臓オルガノイド培養物と同様に、移植したヒト胎児の腎臓の成熟も助長することができる(図20)。LTβRシグナル伝達、LN起源の重要なシグナル伝達メディエーターが、異所性器官形成を支持したかどうかを試験するために、LN腎臓移植片を保有するマウスをLTβR-Fc融合タンパク質で処置した。LTβR-Fc融合タンパク質は、LTβRリガンド(LTα及びLTβ)に結合することによってLTβRに媒介される効果に拮抗する(図21を参照のこと)。図22A～Bに示すように、LTβR-Fc処置は、移植片の大きさ及び移植片の血管形成を有意に低減する。

【０１２９】

LTβRリガンドに結合する他に、LTβR-Fcも、LTβRと相互作用するだけでなく、HVEM及びDcr3受容体とも相互作用し得る、非TNFファミリーのメンバーであるLIGHTに結合する(図21を参照のこと)。移植片の血管形成/血管新生不全が、LTβRによって媒介されるシグナル伝達経路以外のシグナル伝達経路に関するLTβR-Fcによる妨害から生じた可能性を除外するために、LTβR-/-マウスによって提供されるものなどの、LTβR欠乏環境における腎臓移植の結果を調査した(図22を参照のこと)。この手法により、観察した効果が、移植の時点で、ドナーの腎細胞又は間質細胞及び造血細胞を含むドナーの組織に存在する他の細胞型におけるLTβR/HVEM/Dcr3阻害に起因し得る可能性の排除も可能となった。

【０１３０】

LTβR-/-マウスは、LNを有さないため、移植のための代替のSLOとして、より大きな大網を使用した。大網は、乳斑と呼ばれるリンパ球の凝集体を含有し、これは、腹腔の抗原に対する免疫を促進する(図1を参照のこと)。LNにおけるように、細網線維芽細胞(FRC)の網状ネットワークが乳斑中の白血球を支持する。LNと比較して、大網の定常状態の間質の組成を調査すると、同様の間質細胞のフローサイトメトリープロファイルが見られた(図22C)。さらに、PDPLN+/LTβR+及びPDPLN-/LTβR+細胞のサブセットが、大網の細胞懸濁液中で特定され、大網におけるLT反応性FRC及び脳内皮細胞(BEC)の希少集団の存在が示された(図22D)。胚腎臓断片の成長は、LTβR-/-の大網において有意に影響を及ぼされ、移植片の成長がより小さいだけでなく、ほとんど血管形成されることもなく、これらの対照の対応物と比較すると異常な形態を示し、異所性腎臓移植片の血管形成/血管新生の成功のための宿主間質細胞におけるLTβRシグナル伝達の重要性を指摘した(図22E～F)。未処置のLN腎臓移植片では、非カノニカルNF-κB経路のLTβR下流標的及び中心的構成成分である、NIKを、糸球体内皮細胞に制限した(図22G)。逆に、LTβR-Fc処置によって、これらの細胞におけるNIK発現が抑止された。同様に、NIK発現を、LTβR-/-の大網において成長した移植片において検出できなかった。いかなる特定の理論にも拘束されることなく、LTβRはNIKを使用して、非カノニカルNF-κBシグナル伝達を伝播させ、移植組織の血管形成/

血管新生を促進することができる。さらに、いかなる特定の理論にも拘束されることなく、二次的リンパ器官内に存在する間質細胞は、LTβRシグナル伝達を使用して、器官形成を助け、間質内皮細胞に制限されるNIK活性化が移植片の血管新生を促進し得るようである。

【０１３１】

[8．実施例3:炎症はグラフトされた肝細胞の成長を増強する]

腹腔の炎症は、脂肪関連リンパ球集積(FALC)の数及び大きさの増加を誘導する(Benezech, C.ら Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. Nature immunology 16、819～828ページ(2015))。この効果は、骨髄細胞によるTNF発現及び間質細胞へのTNFRシグナル伝達に依存する(Benezechら(2015))。炎症が、肝細胞の生着の増加も導くかどうかを決定するために、ザイモサン(酵母由来のToll様受容体2のリガンド)によって駆動された滅菌した腹腔の炎症を、野生型C57bl/6及び対照動物(PBSを注入した野生型C57bl/6)において開始された(図23を参照のこと)。3日後に、GFP+肝細胞を両群の動物に移植し、1週間後に屠殺した。

【０１３２】

図24に示すように、ザイモサンに誘導された炎症は、組織中で並びに大綱及び腸間膜の脂肪中でGFP+肝細胞の定量化によって可視化されたように、GFP+細胞の存在を劇的に増加させた。重要なことに、IP注入後のFALCにおける肝細胞の生着が野生型マウスで観察され、FALCにおける生着が肝臓の傷害に依存しないことが示された。FALCの形成を炎症の開始又は消散とタイミングを合わせる方法、及び肝細胞の生着が消散期に維持されるかどうかは、依然として調査されるべきである。

【０１３３】

次に、このプレコンディショニングレジメンは、$Fah^{-/-}$ C57bl/6マウスにおいて試験し、肝疾患誘導後のチロシン血症マウスの生存率に影響を及ぼすかどうかを決定した(NTBCなし)。図23に記載したものと同じ手法を使用して、炎症を誘導した又は誘導していない$Fah^{-/-}$ C57bl/6マウスに野生型肝細胞を移植し、続いて、肝疾患を誘導した(NTBCなし)。図25に示すように、炎症を有さない左側のパネルの動物は、2回の選別後に救済されなかったが(体重低下=肝疾患)、一方、炎症を有する動物は、8週間後に救済された。

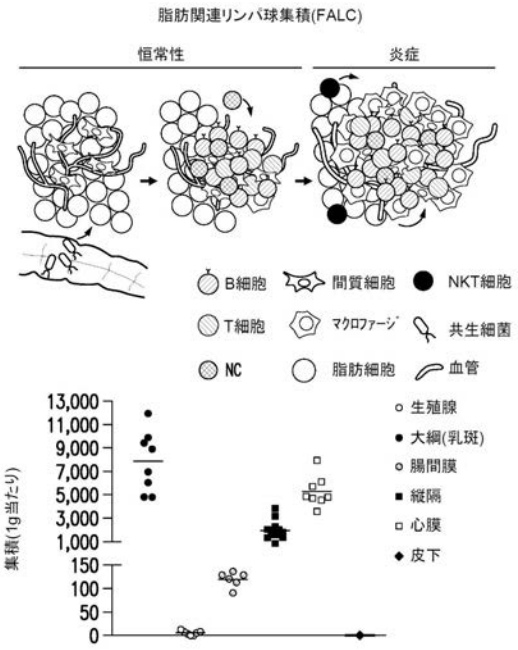
【０１３４】

炎症が誘導されなかった動物の剖検により、大綱、脾臓、門脈、生殖腺及び腸間膜の脂肪に存在するFALCにおける肝臓への生着及び肝臓の質量の低下/限界が明らかになった(図26)。対照的に、炎症が誘導された動物は、これらの位置により大きな質量の肝臓組織を有した。

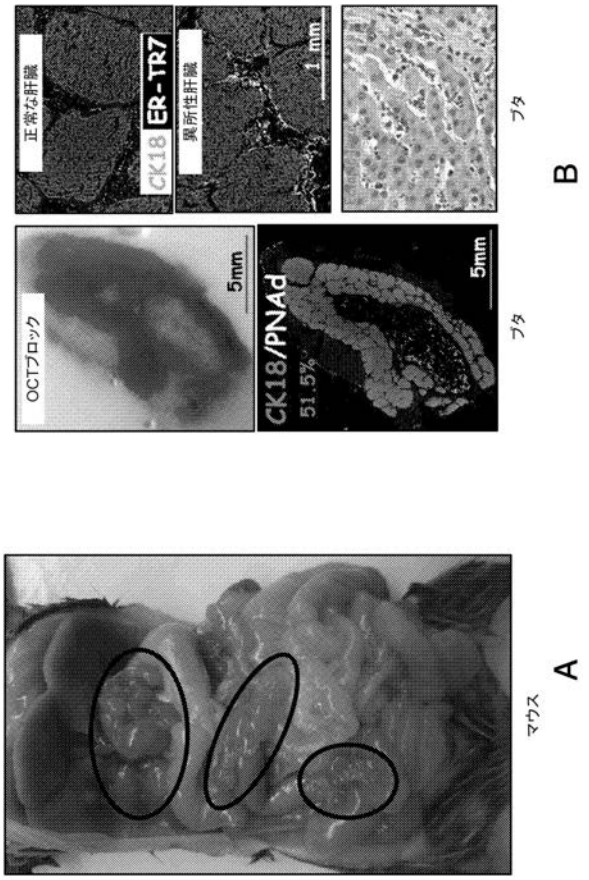
【０１３５】

様々な参照文献、特許及び特許出願が、本明細書において引用され、その内容は参照によりその全体として本明細書に組み込まれる。

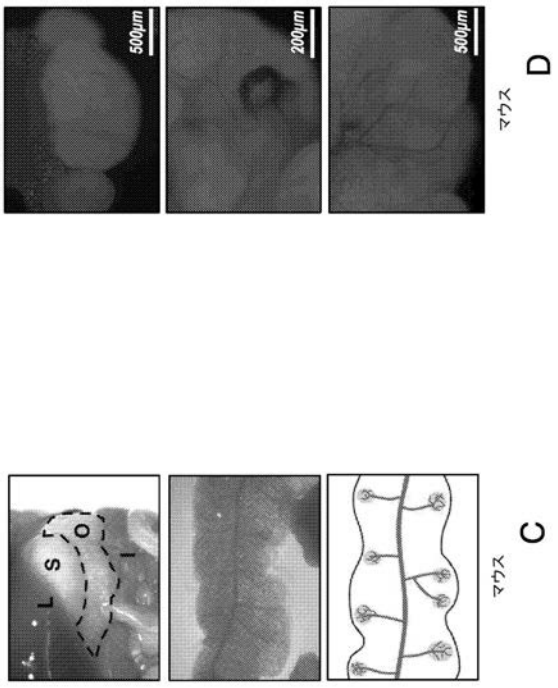
【図１】


脂肪関連リンパ球集積(FALC)
恒常性
炎症
B細胞
T細胞
NC
間質細胞
マクロファージ
脂肪細胞
NKT細胞
共生細菌
血管
集積(1g当たり)
13,000
11,000
9,000
7,000
5,000
3,000
1,000
150
100
50
0
生殖腺
大網(乳斑)
腸間膜
縦隔
心膜
皮下

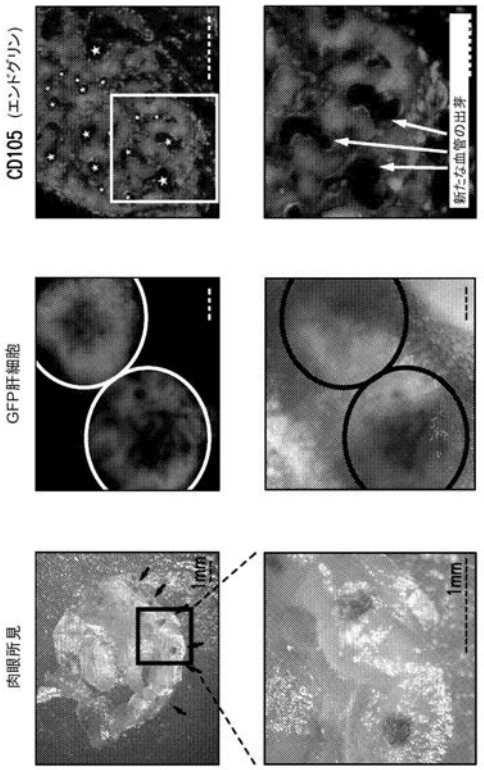
【図２－１】


正常な肝臓
CK18
ER-TR7
異所性肝臓
1 mm
ブタ
B
OCTブロック
5mm
CK18/PNAd
51.5%
5mm
ブタ
マウス
A

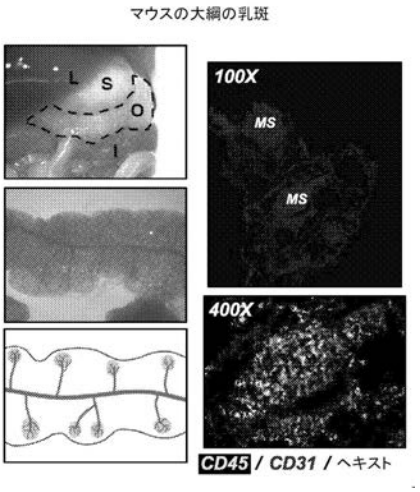
【図２－２】


500μm
200μm
500μm
マウス
D
L
S
O
I
マウス
C

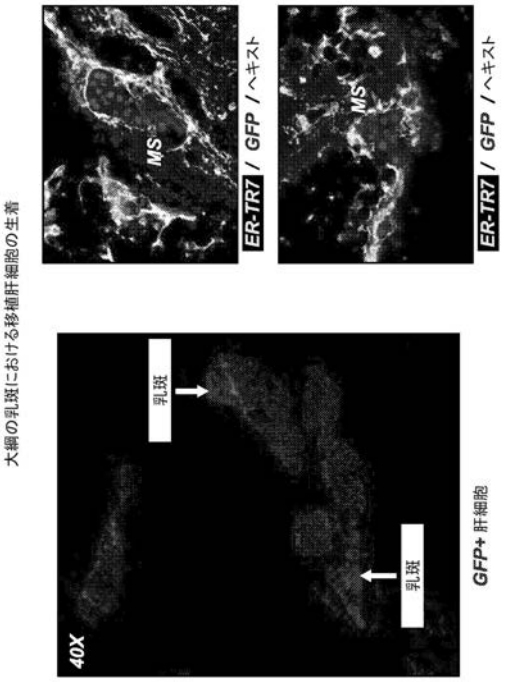
【図３】


CD105（エンドグリン）
新たな血管の出芽
GFP肝細胞
肉眼所見
1mm
1mm

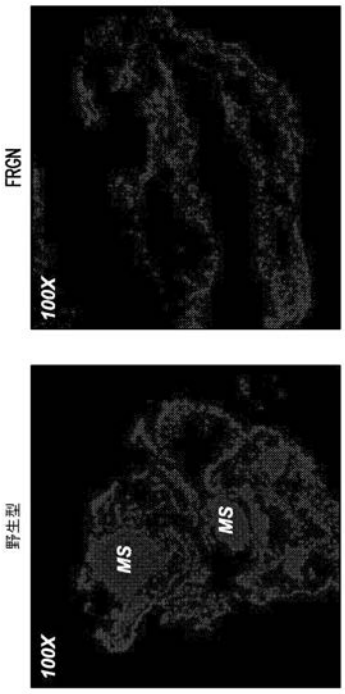
【図４】


マウスの大網の乳斑
L
S
O
100X
MS
MS
400X
CD45 / CD31 / ヘキスト

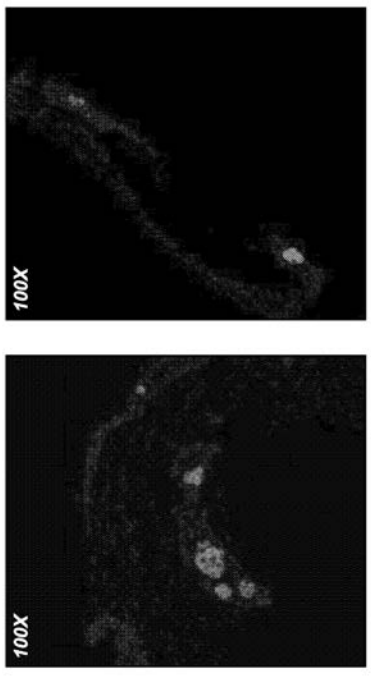
【図５】


大網の乳斑における移植肝細胞の生着
MS
ER-TR7 / GFP / ヘキスト
MS
ER-TR7 / GFP / ヘキスト
乳斑
乳斑
40X
GFP+ 肝細胞

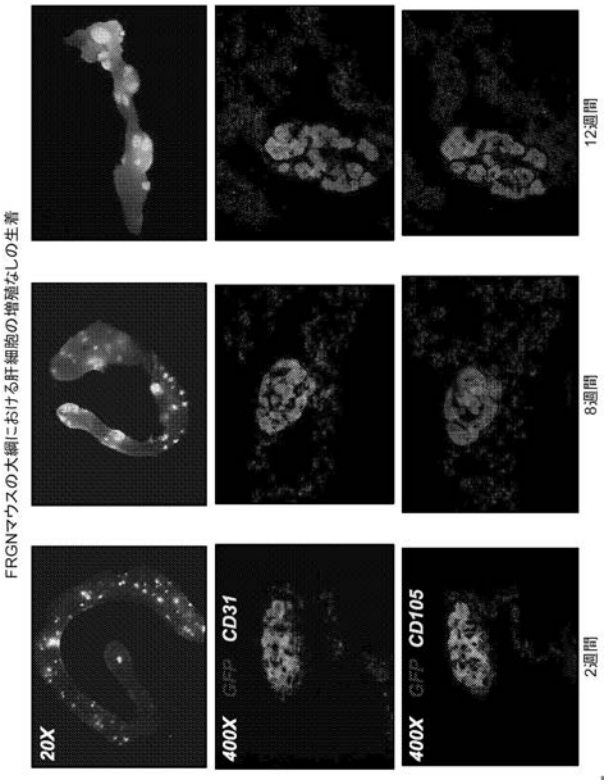
【図６】


FRGN
100X
野生型
MS
MS
100X

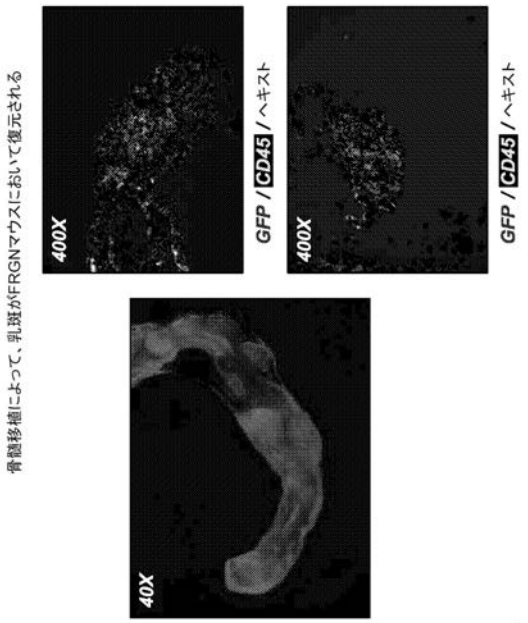
【図７】


100X
100X

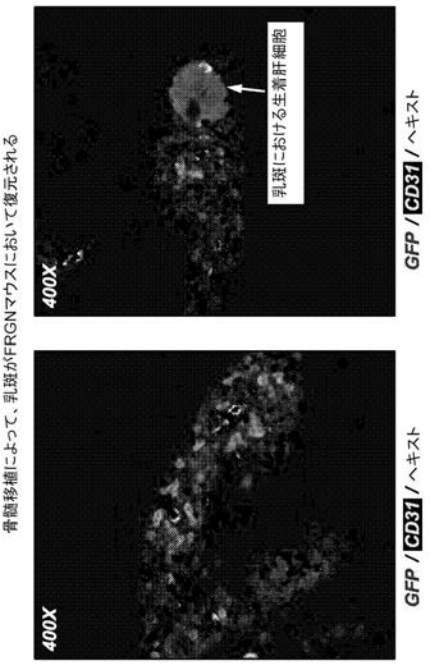
【図８】


FRGNマウスの大網における肝細胞の増殖なしの生着
20X
400X GFP CD31
400X GFP CD105
2週間
8週間
12週間

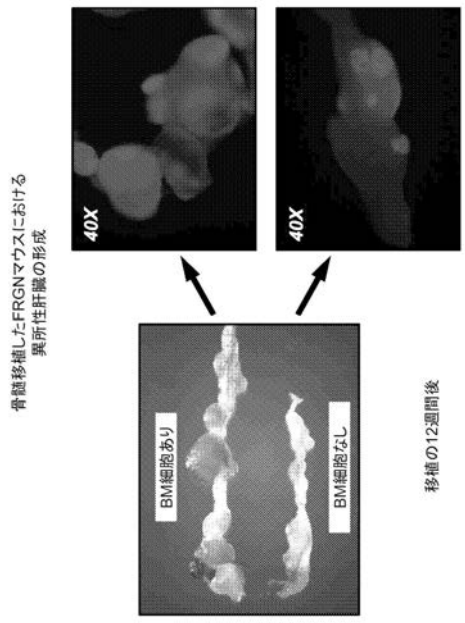
【図９】


骨髄移植によって、乳斑がFRGNマウスにおいて復元される
400X
GFP / CD45 / ヘキスト
400X
GFP / CD45 / ヘキスト
40X

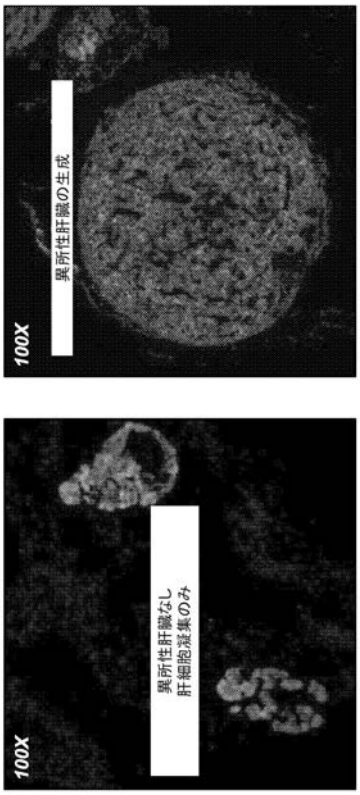
【図１０】


骨髄移植によって、乳斑がFRGNマウスにおいて復元される
400X
GFP / CD31 / ヘキスト
400X
乳斑における生着肝細胞
GFP / CD31 / ヘキスト

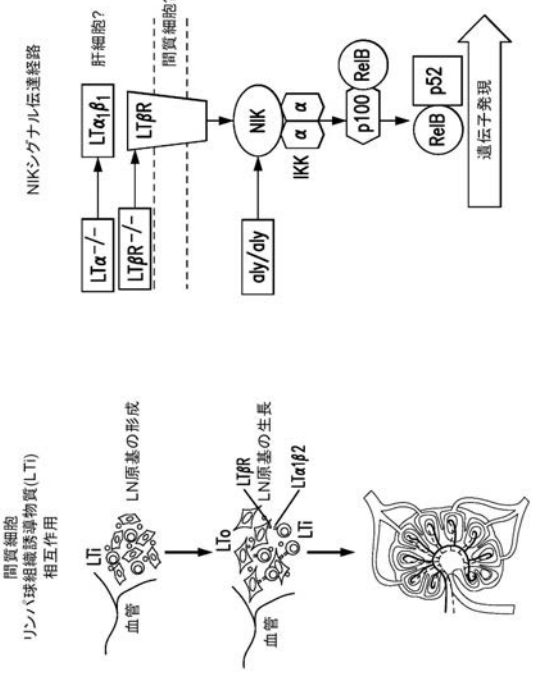
【図１１】


骨髄移植したFRGNマウスにおける
異所性肝臓の形成
40X
40X
BM細胞あり
BM細胞なし
移植の12週間後

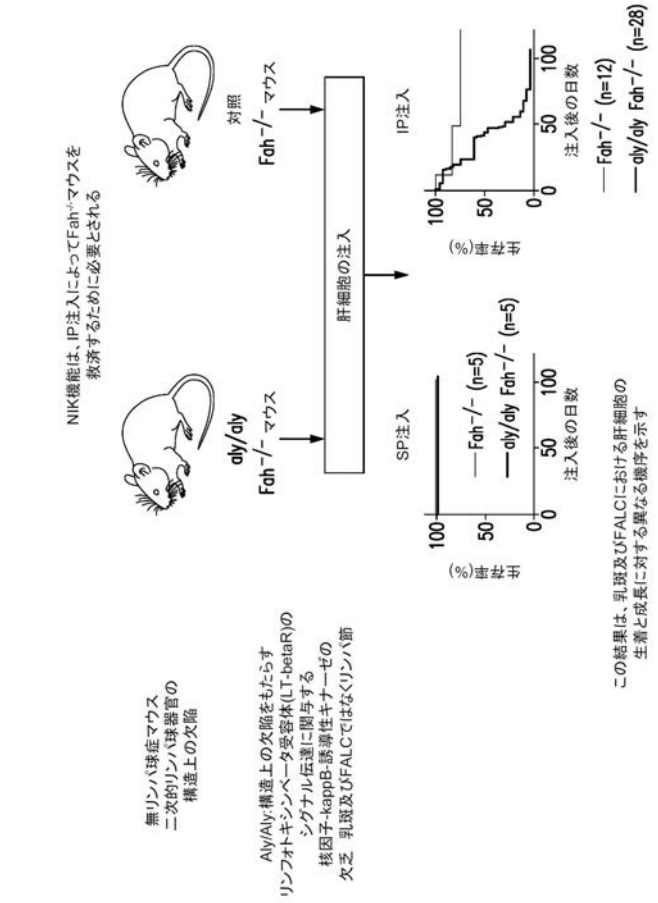
【図１２】



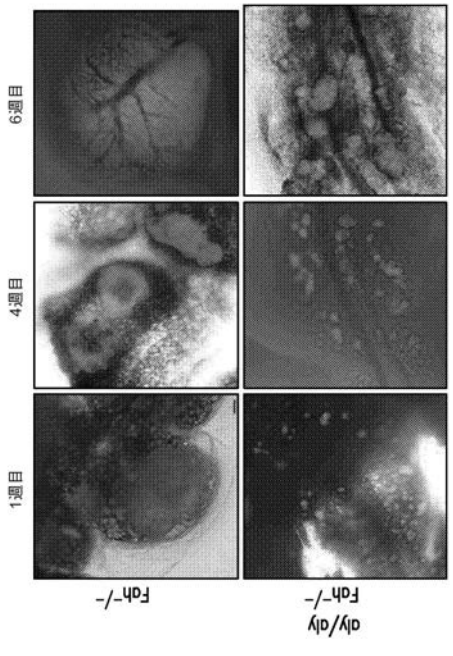
【図１３】



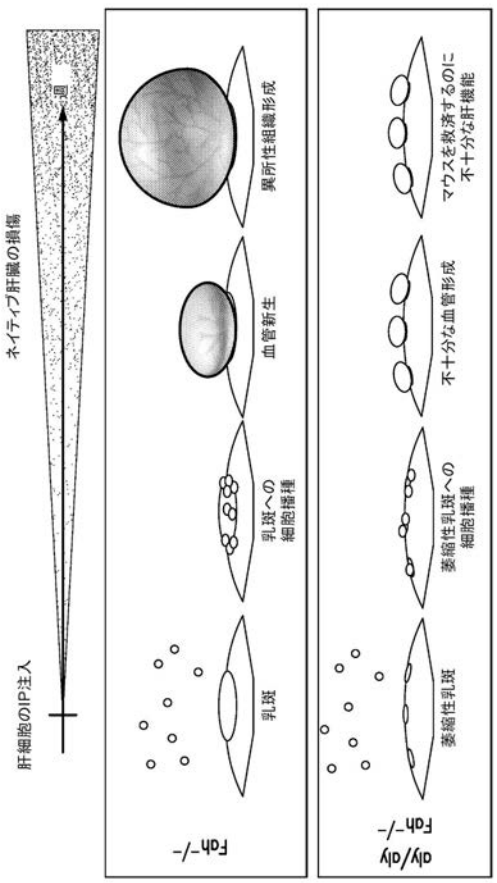
【図１４】



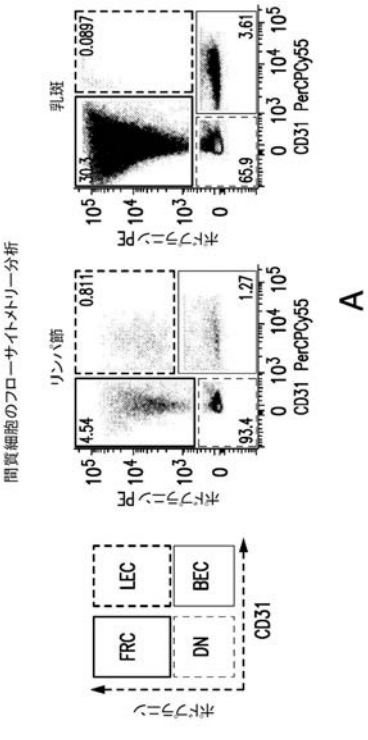
【図１５】



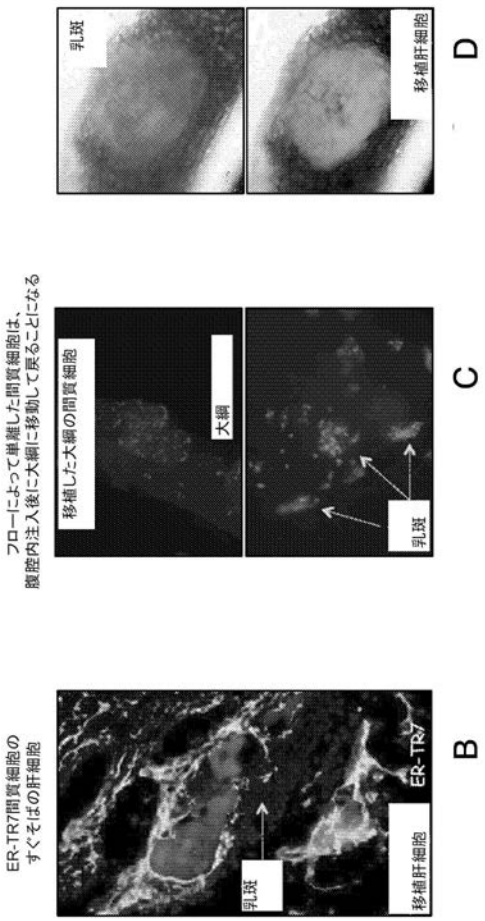
【図１６】



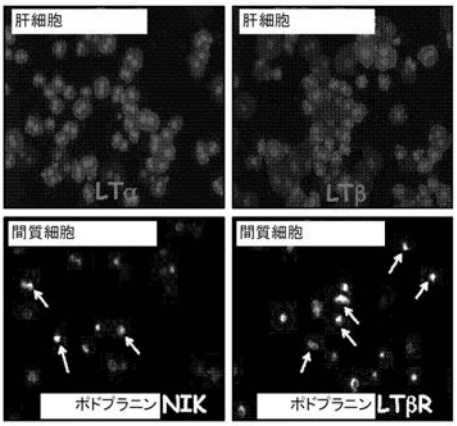
【図１７－１】



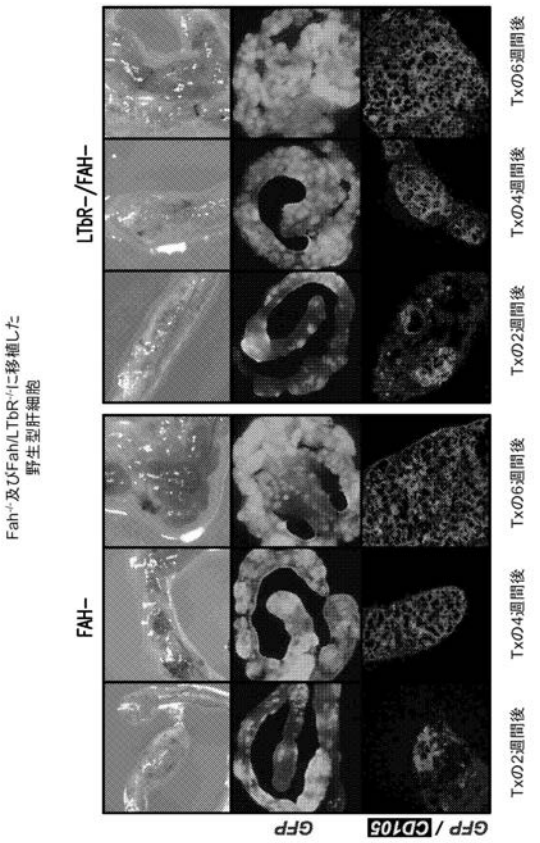
【図１７－２】



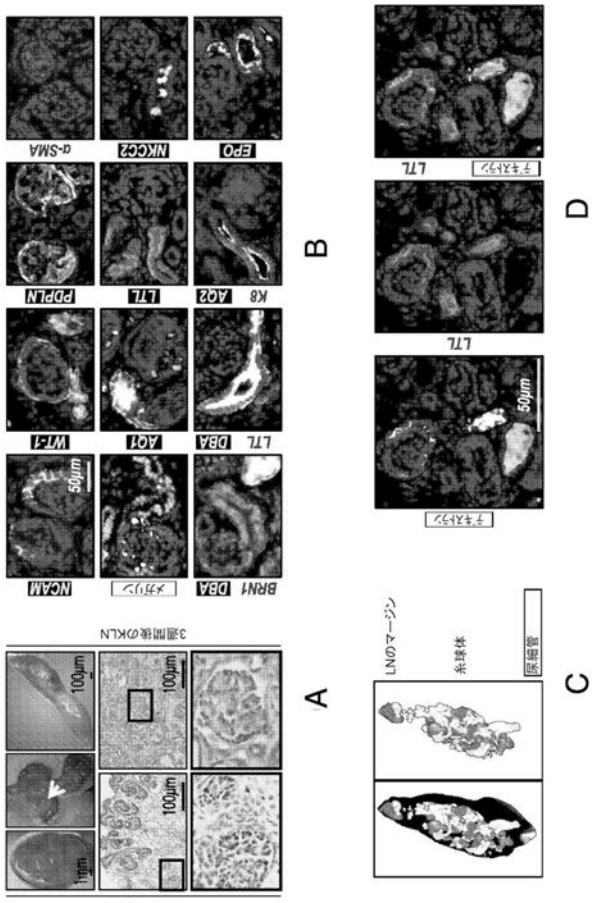
【図１８】



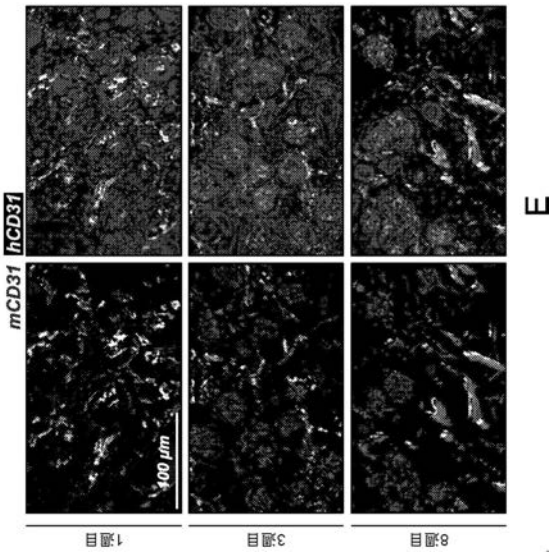
【図１９】



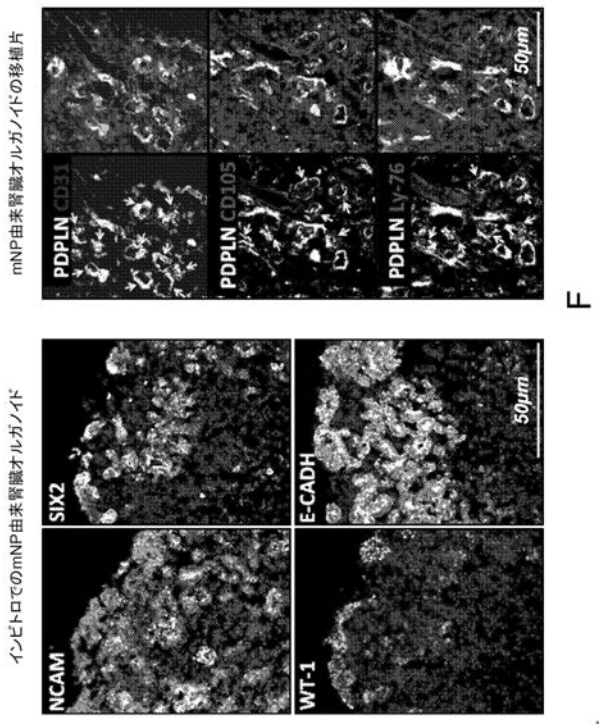
【図２０－１】



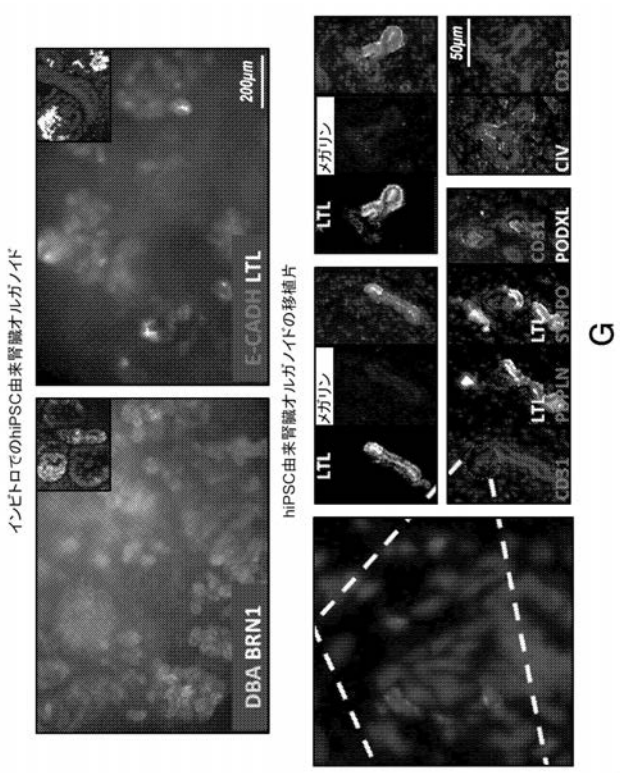
【図２０－２】



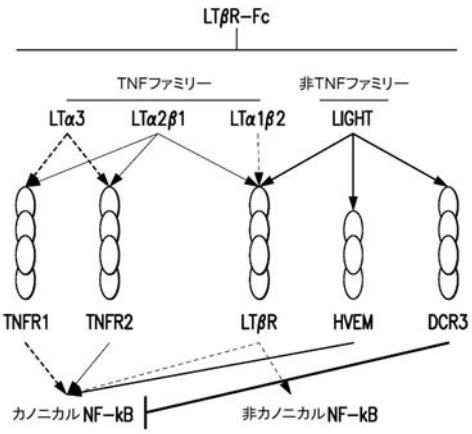
【図２０－３】



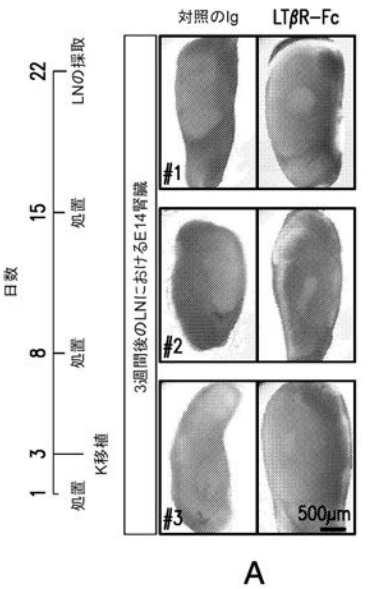
【図２０－４】



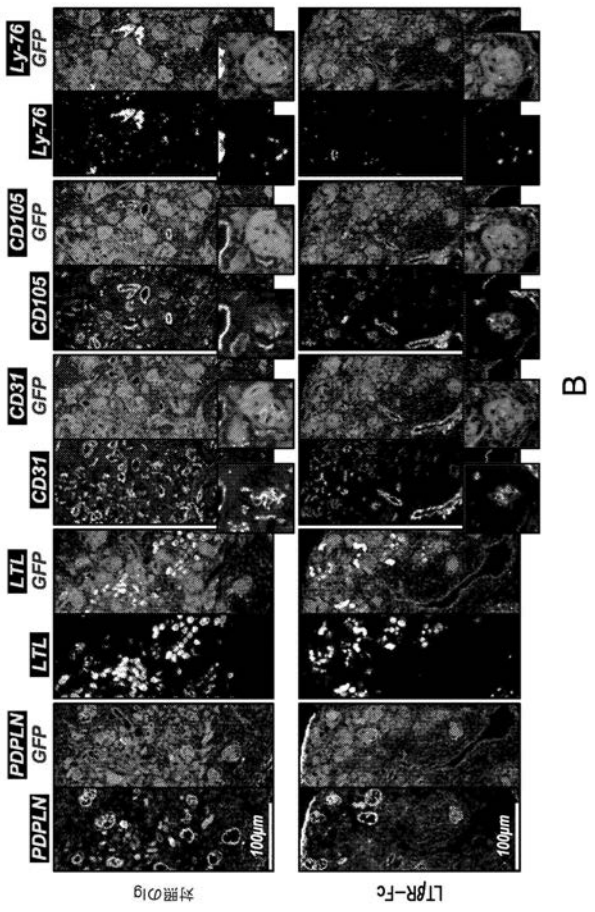
【図２１】



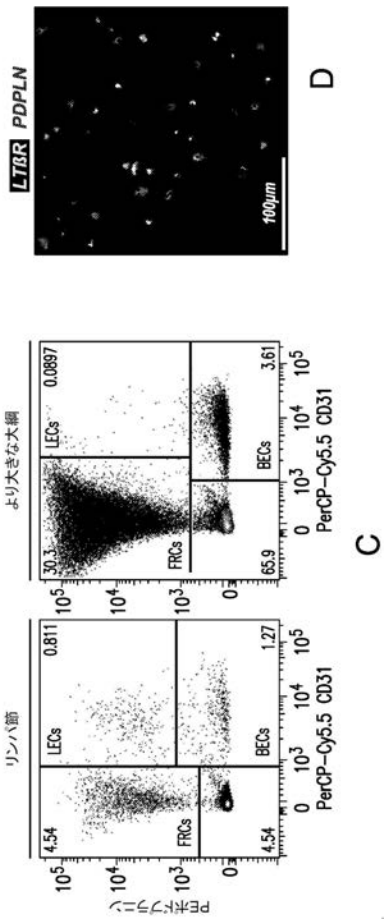
【図２２－１】



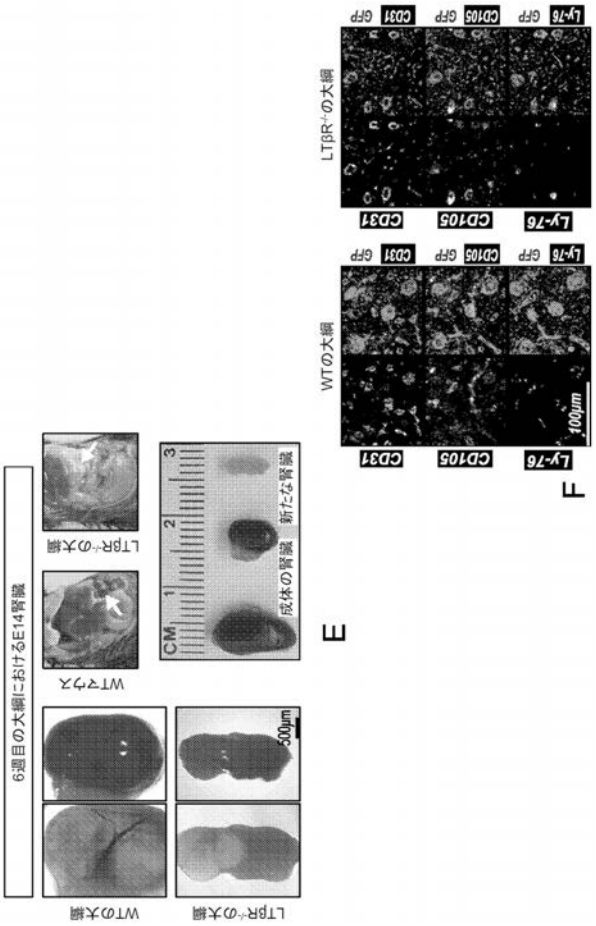
【図２２－２】



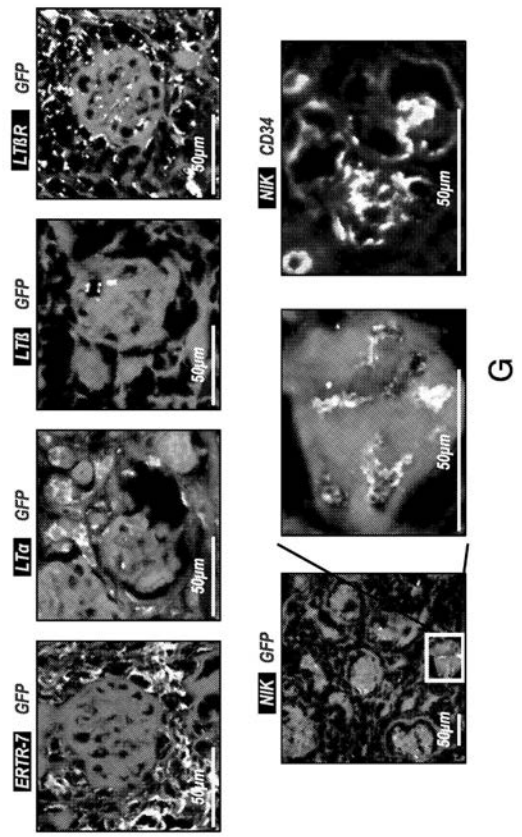
【図２２－３】



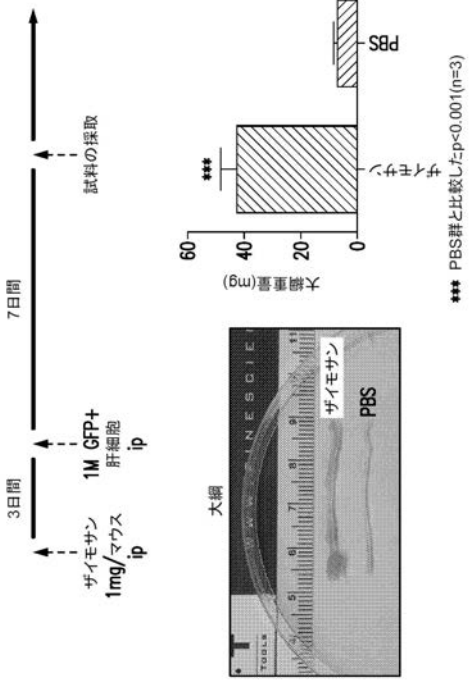
【図２２－４】



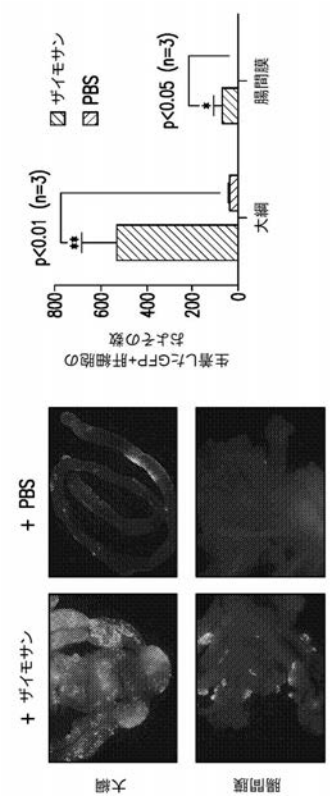
【図２２－５】



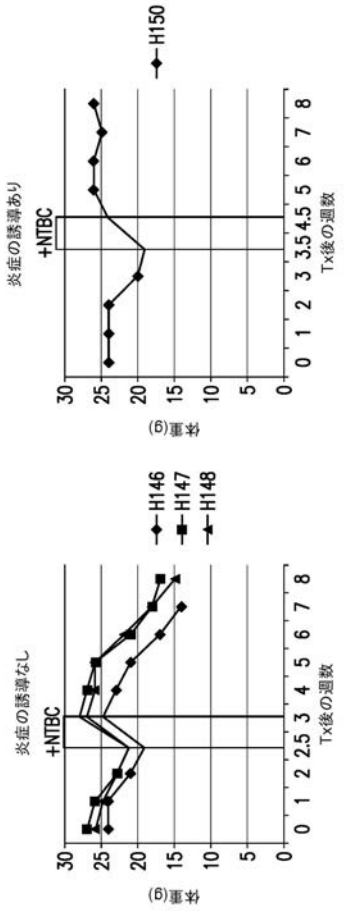
【図２３】



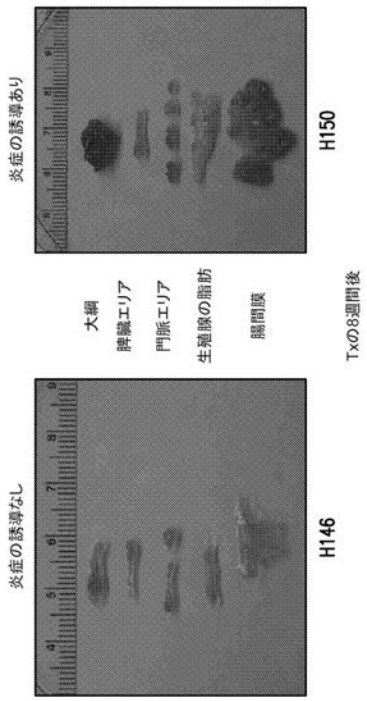
【図２４】


ザイモサン
PBS
p<0.01 (n=3)
p<0.05 (n=3)
大網
腸間膜
+ ザイモサン
+ PBS
大網
腸間膜

【図２５】


炎症の誘導あり
+NTBC
H150
体重(g)
Tx後の週数
炎症の誘導なし
+NTBC
H146
H147
H148
体重(g)
Tx後の週数

【図２６】


炎症の誘導なし
H146
大網
脾臓エリア
門脈エリア
生殖腺の脂肪
腸間膜
Txの8週間後
炎症の誘導あり
H150

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/18684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 35/26, A61K 35/407, A61K 35/22 (2018.01)
CPC - A61K 35/26, A61K 35/407, A61K 35/22, A01K 67/0271, C12N 5/077, C12N 5/071

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

Electroni- 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	US 2016/0058794 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH) 3 March 2016 (03.03.2016); para [0008], [0009], [0063], [0103], [0125], [0211], [0212]	1-3, 17-19, 31-35, 42-44, 56-60, 67-68, 79-80
Y	BENEZECH et al., Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. Nat Immunol. August 2015, Vol 16, No 8, pp 819-828. Especially abstract; p 820, col 1, para 1; p 820, Figure 1 (c)	1-3, 17-19, 31-35, 42-44, 56-60, 67-68, 79-80
Y	US 9,493,532 B2 (THE UNIVERSITY OF CHICAGO) 15 November 2016 (15.11.2016); col. 2, ln 27-49	67-68

☐ 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 May 2018	06 JUL 2018
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 W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/18684

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.: 4-16, 20-30, 36-41, 45-55, 61-66, 77-78, 86-98, 103-111, 117-122, 127-135, 141-146
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 examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 17-19, 31-35, 42-44, 56-60, 67-68, 79-80, drawn to methods comprising introducing one or more cells in a fat-associated lymphoid cluster of the subject.

Group II: Claims 69-76, drawn to compositions for generating an ectopic tissue.

Group III: Claims 81-85, 99-102, 112-116, 123-126, 136-140, 147-148, methods comprising introducing one or more cells into a lymph node of the subject.

*****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.:
1-3, 17-19, 31-35, 42-44, 56-60, 67-68, 79-80,

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/18684

Continuation of Box No. III (Observations where unity of invention is lacking):

The inventions listed as Groups I, II, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires introducing one or more cells in a fat-associated lymphoid cluster of the subject, not required by Groups II and III.

Group II requires compositions of matter comprising a plurality of cells and one or more agents that promote the formation of an ectopic tissue, not required by the methods of Groups I and III.

Group III requires introducing one or more cells into a lymph node of the subject, not required by Groups I and II.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I, II, and III is generating an ectopic tissue.

Another feature shared by Groups I, II, and III is ectopic liver tissue.

Another feature shared by Groups I, II, and III is ectopic kidney tissue

The feature shared by Groups I and III is a method of treating a subject in need of augmented organ function, comprising administering, to the subject, a therapeutically effective amount of cells derived from said organ, and promoting formation of ectopic tissue in the subject.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2016/0058794 A1 to the University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education (hereinafter 'Univ Pittsburgh').

Univ Pittsburgh teaches generating an ectopic tissue (para [0008] - "The present invention relates to the use of the lymph node environment to promote the survival and expansion of healthy cells and tissues"; para [0009] - "The present invention is based, at least in part, on the discoveries that (i) hepatocytes injected directly into a . . . lymph node generate an ectopic hepatic mass and rescue mice from lethal liver failure").

Univ Pittsburgh teaches ectopic liver tissue (para [0102] - "A functional ectopic liver in the lymph node").

Univ Pittsburgh teaches ectopic kidney tissue (para [0214] - "To assess whether the ectopic kidney tissue could proliferate in response to growth stimuli, we performed unilateral nephrectomy 12 days after embryonic kidney injection into the lymph node")

Univ Pittsburgh teaches a method of treating a subject in need of augmented organ function (para [0009] - "The present invention is based, at least in part, on the discoveries that (i) hepatocytes injected directly into a . . . lymph node generate an ectopic hepatic mass and rescue mice from lethal liver failure"; para [0063] - "the present invention provides for a method of providing or supplementing a biological function in a host comprising introducing, into a lymph node of a host, a non-lymphoid cell of an organ where the cell or organ normally provides said function; for example, but without limitation, introducing an islet cell to provide insulin production, or, introducing a thyroid cell to provide thyroxin, or introducing a kidney cell to provide kidney function (filtering, etc.), or introducing a thymus cell to provide immune function, etc"),
comprising administering, to the subject, a therapeutically effective amount of cells derived from said organ, and promoting formation of ectopic tissue in the subject (para [0009] - "hepatocytes injected directly into a . . . lymph node generate an ectopic hepatic mass and rescue mice from lethal liver failure"; para [0103] - "we asked whether transplantation of syngeneic hepatocytes into single jejunal lymph nodes of Fah-/- tyrosinemic mice (19-21), a model of lethal metabolic liver failure, would induce hepatocyte proliferation. Twelve weeks after hepatocyte injection into the lymph nodes, the mice were rescued from lethal liver failure by the newly hepatized growth in the jejunal lymph nodes (FIG. 2). Hepatocyte engraftment was localized to the transplanted lymph nodes . . . The 'hepatized' lymph nodes were composed mostly of newly formed liver tissue . . . The lymph nodes were transformed into hepatic organoids composed of characteristically cuboidal hepatocytes but with the absence of a biliary system . . . Notably, we observed survival of the mice (FIG. 2c) and long-term persistence (over 25 weeks) of the graft after transplantation to the lymph nodes").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Another feature shared by Groups I, II, and III is an agent that promotes the formation of the ectopic tissue, specifically an activator of a LT.beta.R signaling pathway, an activator of a NIK signaling pathway or a combination thereof

Another feature shared by Groups I and III is a method for generating an ectopic tissue in a subject, comprising
introducing one or more cells and one or more stromal cells to lymphoid tissue in a subject, and providing one or more agents that promote the formation of the ectopic tissue.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught byUS 9,493,532 B2 to The University of Chicago (hereinafter 'Univ Chicago') in view of Univ Pittsburgh.

*****Continued on next page*****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/18684

Continuation of previous page:

Univ Chicago discloses an activator of a LT.beta.R signaling pathway is required for the formation of organized lymphoid structures (col 2, ln 27-49 - "LT.beta.R signaling is required for the formation of organized lymphoid structures, which can be attributed, at least in part, to its ability to induce the expression of chemokines and adhesion molecules that attract naive T cells and dendritic cells (DC) in lymphoid organs. Stimulation of LT.beta.R on stromal cells by LIGHT in vivo leads to the expression of CCL21, which attracts naive T cells in the T cell area of the spleen in the absence of LT.alpha..beta., another ligand for LT.beta.R. These results demonstrate that LIGHT is able to interact with LT.beta.R to regulate CCL21 chemokine expression. . . . Signaling via LT.beta.R is required for the formation of organized lymphoid tissues. Lymphotoxin .beta. Receptor (LT.beta.R) plays an important role in the formation of lymphoid structures. LT.beta.R is activated by two members of the TNF family, membrane lymphotoxin .alpha. .beta. and LIGHT. LT.beta.R plays pivotal roles in the formation of lymph nodes (LNs) and the distinct organization of T, B zones in secondary lymphoid organs. Signaling via LT.beta.R regulates the expression of chemokines and adhesion molecules within secondary lymphoid organs"). Univ Chicago does not teach that the activator of a LT.beta.R signaling pathway promotes the formation of the ectopic tissue. However, Univ Pittsburgh teaches that lymph node environment promotes the survival and expansion of ectopic tissue (para [0008] - "The present invention relates to the use of the lymph node environment to promote the survival and expansion of healthy cells and tissues"; para [0009] - "The present invention is based, at least in part, on the discoveries that (i) hepatocytes injected directly into a . . . lymph node generate an ectopic hepatic mass and rescue mice from lethal liver failure"; para [0218] - "The current studies indicate that the lymph node might be considered as a unique niche to grow several tissues. . . . Not only did the lymph node furnish the developing tissue with host cells, but also provided it with growth and homeostatic signals, since a decrease in native renal mass could push maturation of the ectopic graft"). Given that Univ Chicago teaches that an activator of a LT.beta.R signaling pathway is required for the formation of organized lymphoid structures and plays pivotal roles in the formation of lymph nodes and secondary lymphoid structures, and Univ Pittsburgh teaches that the lymph node environment promotes the survival and expansion of ectopic tissue, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that an activator of a LT.beta.R signaling pathway, as taught by Univ Chicago, is an agent that promotes the formation of the ectopic tissue.

Univ Pittsburgh teaches a method for generating an ectopic tissue in a subject (para [0008] - "The present invention relates to the use of the lymph node environment to promote the survival and expansion of healthy cells and tissues"; para [0009] - "The present invention is based, at least in part, on the discoveries that (i) hepatocytes injected directly into a . . . lymph node generate an ectopic hepatic mass and rescue mice from lethal liver failure"), comprising introducing one or more cells to lymphoid tissue in a subject (para [0012] - "In certain embodiments, the present invention also provides a method of transplanting allograft tissue to a subject comprising (i) introducing non-lymphoid cells in a lymphoid tissue of the subject under conditions such that the cells are able to proliferate").

Univ Pittsburgh does not teach introducing one or more stromal cells to lymphoid tissue in a subject. However, Univ Pittsburgh does teach that stromal cells are present in lymph nodes and are known to secrete chemokines to enhance cell recruitment and survival (para [0007] - "The lymph node also contains fibroblastic reticular cells and other stromal cells that secrete chemokines to enhance cell recruitment and survival") and are also known to be present in ectopic tissue grafts and contribute to the regeneration of the ectopic tissue (para [0218] - "both bone marrow hematopoietic and stromal cells were found in the ectopic kidney graft. These cells contributed to mesangial cells and podocyte regeneration. Not only did the lymph node furnish the developing tissue with host cells, but also provided it with growth and homeostatic signals, since a decrease in native renal mass could push maturation of the ectopic graft"). Given that stromal cells present in lymph nodes support the growth and survival of cells to form ectopic tissue, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the method of Univ Pittsburgh can further comprise introducing one or more stromal cells to lymphoid tissue in a subject in order to enhance the survival and growth of cells into ectopic tissue.

Univ Pittsburgh also does not teach providing one or more agents that promote the formation of the ectopic tissue. However, Univ Pittsburgh teaches that lymph node environment promotes the survival and expansion of ectopic tissue (para [0008] - "The present invention relates to the use of the lymph node environment to promote the survival and expansion of healthy cells and tissues"; para [0009] - "The present invention is based, at least in part, on the discoveries that (i) hepatocytes injected directly into a . . . lymph node generate an ectopic hepatic mass and rescue mice from lethal liver failure"; para [0218] - "The current studies indicate that the lymph node might be considered as a unique niche to grow several tissues. . . . Not only did the lymph node furnish the developing tissue with host cells, but also provided it with growth and homeostatic signals, since a decrease in native renal mass could push maturation of the ectopic graft"). Univ Chicago discloses an activator of a LT.beta.R signaling pathway is required for the formation of organized lymphoid structures (col 2, ln 27-49 - "LT.beta.R signaling is required for the formation of organized lymphoid structures, which can be attributed, at least in part, to its ability to induce the expression of chemokines and adhesion molecules that attract naive T cells and dendritic cells (DC) in lymphoid organs. Stimulation of LT.beta.R on stromal cells by LIGHT in vivo leads to the expression of CCL21, which attracts naive T cells in the T cell area of the spleen in the absence of LT.alpha..beta., another ligand for LT.beta.R. These results demonstrate that LIGHT is able to interact with LT.beta.R to regulate CCL21 chemokine expression. . . . Signaling via LT.beta.R is required for the formation of organized lymphoid tissues. Lymphotoxin .beta. Receptor (LT.beta.R) plays an important role in the formation of lymphoid structures. LT.beta.R is activated by two members of the TNF family, membrane lymphotoxin .alpha. .beta. and LIGHT. LT.beta.R plays pivotal roles in the formation of lymph nodes (LNs) and the distinct organization of T, B zones in secondary lymphoid organs. Signaling via LT.beta.R regulates the expression of chemokines and adhesion molecules within secondary lymphoid organs"). Given that Univ Chicago teaches that an activator of a LT.beta.R signaling pathway is required for the formation of organized lymphoid structures, and Univ Pittsburgh teaches that lymphoid structures promotes the survival and expansion of ectopic tissue, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that providing an activator of a LT.beta.R signaling pathway, as taught by Univ Chicago, would help promote the formation of the ectopic tissue and thereby enhance the formation of the ectopic tissue. Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the method of Univ Pittsburgh can further include the step of providing an agent that promotes the formation of the ectopic tissue, such as the activator of a LT.beta.R signaling pathway as taught by Univ Chicago, in order to support the maintenance of lymphoid structures to enhance the formation of the ectopic tissue.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I, II, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)
Claims 4-16, 20-30, 36-41, 45-55, 61-66, 77-78, 86-96, 103-111, 117-122, 127-135, 141-146 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	*35/22*	*(2015.01)*	A61K	35/22		
A61P	*1/16*	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61P	*13/12*	*(2006.01)*	A61P	13/12		
C12N	*5/077*	*(2010.01)*	C12N	5/077		
C12N	*5/071*	*(2010.01)*	C12N	5/071		
C12N	*1/00*	*(2006.01)*	C12N	1/00	F	

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人　110002572
特許業務法人平木国際特許事務所
(72)発明者　ラガス，エリック
アメリカ合衆国　１５２１５　ペンシルバニア州，ピッツバーグ，デラフィールド　ロード　１０００

Ｆターム(参考) 4B065 AA93X AC12 AC20 BB34 BB40 CA44
4C084 AA19 ZC751
4C087 AA01 AA02 BB41 BB44 BB52 BB63 MA02 NA03 NA05 NA06
ZA75 ZA81 ZC01 ZC75