

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年8月15日(15.08.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/166834 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/09 (2010.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/78 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/003577
- (22) 国際出願日: 2024年2月2日(02.02.2024)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2023-016949 2023年2月7日(07.02.2023) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)

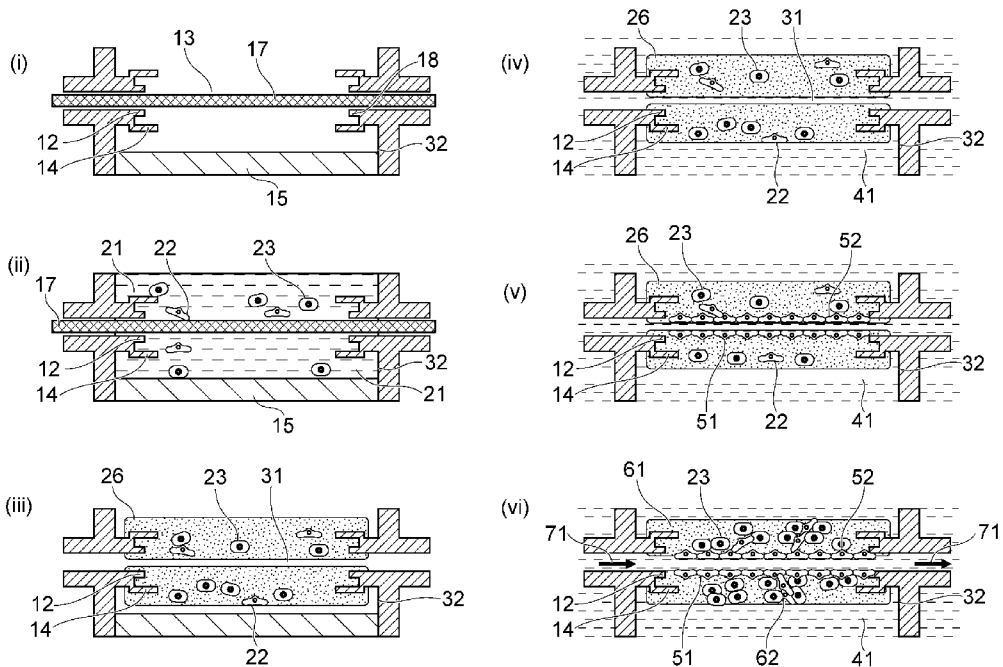
[JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 森 宣仁(MORI Nobuhito); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 木田 泰之(KIDA Yasuyuki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 古賀 宣勝(KOGA Yoshikatsu); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目5番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 津村 遼(TSUMURA Ryo); 〒2778577 千葉県柏市柏の

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL TUMOR TISSUE MODEL, AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) 発明の名称: 3次元腫瘍組織モデル、及びその製造方法

[図2]



(57) Abstract: One purpose of the present disclosure is to provide a three-dimensional tumor tissue model having a main vessel-like structure and a tumor vessel-like structure, and a production method of the same. Another purpose of the present disclosure is to provide a method for evaluating the effect of an evaluation target on a tumor tissue using the three-dimensional tumor tissue model. The three-dimensional tumor tissue model of the present disclosure has a main vessel-like structure and a tumor vessel-like structure connected to the main vessel-like structure, and contains vascular



WO 2024/166834 A1

葉六丁目5番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP).

- (74) 代理人: 長谷川 芳樹 (HASEGAWA Yoshiki);
〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 MY PLAZA (明治安田生命ビル)
9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- 一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

cells, cancer cells, and extracellular matrix.

(57) 要約: 本開示は、主血管様構造及び腫瘍血管様構造を有する3次元腫瘍組織モデル、及びその製造方法を提供することを目的とする。本開示はまた、3次元腫瘍組織モデルを用いた評価対象の腫瘍組織に対する影響を評価する方法を提供することを目的とする。本開示の3次元腫瘍組織モデルは、主血管様構造及び前記主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、血管系細胞、がん細胞、及び細胞外マトリックスを含む。

明 細 書

発明の名称： 3次元腫瘍組織モデル、及びその製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、3次元腫瘍組織モデル、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] がん治療のための新規薬剤の開発等において、その薬剤の有効性を正確に評価することは重要であり、非臨床モデルとして例えば、2次元培養したがん細胞、動物モデルが利用されている（例えば、非特許文献1～2）。しかしながら、2次元培養細胞を利用した場合、がん細胞の薬剤感受性を過大評価してしまうことがある。また、動物モデルを利用した場合には、種の相違、作製時間及びコストがかかる等の問題点がある。

[0003] 近年、人工組織（3次元組織）の開発や利用が進展しており、がん治療のための薬剤評価における非臨床モデルとしても、がん細胞等を3次元培養して作製するスフェロイド、又はオルガノイドが利用されている（例えば、非特許文献3）。しかしながら、従来のがん細胞を用いたスフェロイド又はオルガノイドでは、血管を欠くため、血管を通じた薬剤の送達・分布、T細胞等の血球細胞の挙動等の評価はできない。

[0004] 血管様構造を有する人工組織としては例えば、特許文献1に、主血管様構造及び類洞様構造を有する3次元肝臓組織モデルが開示されている。しかしながら、血管様構造を有する3次元腫瘍組織モデルは知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2021/066196号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：L. Austin Doyle, et al., "A multi drug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 15665-15670. doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665.

非特許文献2 : Y. Il Kim, et al., “Enhanced efficacy of CKD-516 in combination with doxorubicin: Pre-clinical evaluation using a hepatocellular carcinoma xenograft model”, *Anticancer Res.* 34 (2014) 1715-1722.
非特許文献3 : N. Boucherit et al., “3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies”, *Front. Immunol.* 2020, 11:603640. doi: 10.3389/fimmu.2020.603640.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本開示は、主血管様構造及び腫瘍血管様構造を有する3次元腫瘍組織モデル、及びその製造方法を提供することを目的とする。また、3次元腫瘍組織モデルを用いた評価対象の腫瘍組織に対する影響を評価する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 腫瘍組織は、がん細胞の高い増殖性、血管誘引性及び移動性、酸素・栄養供給を阻む間質の存在、盲端構造を持つ特殊な血管ネットワーク構造などを特徴としており、腫瘍ではない生体組織（例えば肝組織）とは栄養と酸素の要求性や、細胞外マトリックスの硬さ及び流体刺激等の力学的条件への反応性の点で大きく異なるため、腫瘍組織ではない生体組織（例えば肝組織）の3次元腫瘍組織モデルの構築方法は、一般的にそのまま腫瘍組織モデルの構築に用いられることは困難とされている。

[0009] 本発明者らは、鋭意研究の結果、後述の実施例に示す方法によって、血管様構造を有する3次元腫瘍組織モデルを構築できることを見出し、本開示の完成に至った。

[0010] すなわち、本開示は、例えば以下のとおりである。

[1]

主血管様構造及び前記主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、血管系細胞、がん細胞、及び細胞外マトリックスを含む、3次元腫瘍組織モデル。

[2]

血管層及び前記血管層に接する腫瘍層を備え、

上記血管層が主血管様構造及び上記主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、かつ血管系細胞及び細胞外マトリックスを含み、

上記腫瘍層ががん細胞及び細胞外マトリックスを含む、[1]に記載の3次元腫瘍組織モデル。

[3]

更に間質細胞を含む、[1]又は[2]に記載の3次元腫瘍組織モデル。

[4]

上記間質細胞が、リンパ球を含む、[3]に記載の3次元腫瘍組織モデル

。

[5]

上記リンパ球がT細胞である、[4]に記載の3次元腫瘍組織モデル。

[6]

[1]、[3]～[5]に記載の3次元腫瘍組織モデルの製造方法であって、

上記主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞及びがん細胞を含む細胞外マトリックスゲルを形成する工程と、

上記貫通流路の内壁に第2の血管系細胞を播種することにより、上記主血管様構造を形成する工程と、

上記主血管様構造に培地を灌流して前記腫瘍血管様構造を形成する工程とを備える、製造方法。

[7]

[2]～[5]に記載の3次元腫瘍組織モデルの製造方法であって、

上記主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる血管層を形成する工程と、

上記血管層の前記貫通流路側と反対側の表面の少なくとも一部に接するように、がん細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる腫瘍層を形成する工

程と、

上記貫通流路の内壁に第2の血管系細胞を播種することにより、上記主血管様構造を形成する工程と、

上記主血管様構造に培地を灌流して前記腫瘍血管様構造を形成する工程とを備える、製造方法。

[8]

上記培地が、上記培地全量に対して50質量%以上の血管系細胞用培地を含む、[6]又は[7]に記載の製造方法。

[9]

上記灌流の流速が、0.5 mL/時以上20 mL/時以下である、[6]～[8]のいずれかに記載の製造方法。

[10]

[1]～[5]のいずれかに記載の3次元腫瘍組織モデルに、評価対象を含む溶液を灌流する工程、及び、上記評価対象の上記3次元腫瘍組織モデルに与える影響を評価する工程を備える、評価対象の腫瘍組織に与える影響の評価方法。

[11]

上記評価対象が、リンパ球を含む、[10]に記載の評価方法。

[12]

上記リンパ球が、T細胞である、[11]に記載の評価方法。

発明の効果

[0011] 本開示によれば、主血管様構造及び腫瘍血管様構造を有する3次元腫瘍組織モデル、及びその製造方法を提供することができる。また、本開示によれば、3次元腫瘍組織モデルを用いた評価対象の腫瘍組織に対する影響を評価する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]灌流デバイスの一例を示す斜視図である。

[図2]一実施形態に係る単層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法の作製工程を

示す図であり、(i) ~ (vi) はそれぞれ図1の灌流デバイスにおけるA-A'軸での断面図である。

[図3]実施例1において細胞密度、培地種類、細胞種類を変化させて構築した4種類の3次元腫瘍組織に対して免疫染色した結果を示す図である。

[図4]実施例1において灌流を一定の流量にして構築した3次元腫瘍組織に対してHE染色(A)及び免疫染色(B)した図、並びに実施例において灌流の流量を変化させて構築した3次元腫瘍組織に対してHE染色(C)及び免疫染色(D)した図である。

[図5]実施例2において様々な大腸がん細胞株を使用して構築した3次元腫瘍組織に対して免疫染色した結果を示す図である。

[図6]実施例2において構築した3次元腫瘍組織を用いてドキソルビシン塩酸塩の薬効評価を行った際に蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図(A)及びドキソルビシン塩酸塩の投与による大腸がん細胞数を評価した結果を示す図(B)である。

[図7]実施例2において構築した3次元腫瘍組織を用いてドキソルビシン塩酸塩の薬効評価を行った際に毛細血管形成に対する影響を調べた結果を示す図である。

[図8]実施例3において構築した3次元腫瘍組織を用いてドキソルビシン塩酸塩及びセツキシマブの分布を計測した際に蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

[図9]実施例4においてT細胞のH U V E Cに対する拒絶反応を調べた結果を示す図である。

[図10]実施例4においてT細胞のH U V E Cに対する拒絶反応を調べた結果を示すグラフである。

[図11]実施例4においてH U V E Cを培養する培地条件を、T細胞培地(A)、T細胞培地とE G M 2培地の等量混合培地(B)、E G M 2培地(C)を用いて検討した結果を示す図である。

[図12]実施例4においてT細胞を培養する培地条件を検討した結果を示すグ

ラフである。

[図13]実施例5において3次元腫瘍組織へT細胞を灌流した際の結果を示す図であり、H U V E C及びT細胞の局在を示す図(A)及びD i F i及びT細胞の局在を示す図(B)である。

[図14]実施例5においてT細胞の灌流の有無による3次元腫瘍組織の外観への影響を調べた結果を示す図である。

[図15]実施例5において3次元腫瘍組織にT細胞を灌流する際の揺動の有無による影響を調べた結果を示す図である。

[図16]一実施形態に係る二層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法の作製工程を示す図であり、(i)～(vii)はそれぞれ図1の灌流デバイスにおけるA-A'軸での断面図である。

[図17]実施例6において構築した二層型の3次元腫瘍組織に対してH E染色及び免疫染色した結果を示す図である。

[図18]実施例7において灌流培地へのE G F R - C D 3二重特異性抗体(E G F R - C D 3抗体)非添加条件(A)及び添加条件(B)における3次元腫瘍組織の核及びC K 1 8の免疫染色画像である。

[図19]実施例7において灌流培地へのE G F R - C D 3二重特異性抗体(E G F R - C D 3抗体)非添加条件及び添加条件における3次元腫瘍組織のC K 1 8陽性細胞の細胞密度を示すグラフである。

[図20]灌流デバイスの一例を示す斜視図である。

[図21]図20に示す灌流デバイスの分解斜視図である。

[図22]実施例8にて使用した灌流デバイスで3次元腫瘍組織を構築した際の当該組織の外観への影響を調べた結果を示す図である。

[図23]実施例8において構築した3次元腫瘍組織の核(A)、C D 3 1 (B)、C D 3 (C)の免疫染色画像、及びこれらをマージした画像(D)である。

[図24]実施例9における方法で3次元腫瘍組織を構築した際の当該組織の外観への影響を調べた結果を示す図である。

[図25]実施例9において構築した3次元腫瘍組織に対してHE染色した図である。

[図26]実施例9において構築した3次元腫瘍組織の核(A)、CD31(B)、CD3(C)の免疫染色画像、及びこれらをマージした画像(D)である。

[図27]実施例9において構築した3次元腫瘍組織の核(A)、CK18(B)、CD3(C)の免疫染色画像、及びこれらをマージした画像(D)である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。なお、本発明は以下の実施形態に限定されない。

[0014] <3次元腫瘍組織モデル>

本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、主血管様構造及び該主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、血管系細胞、がん細胞、及び細胞外マトリックスを含む。

[0015] 本明細書において、3次元腫瘍組織とは、細胞外マトリックス中において、血管系細胞とがん細胞とが3次的に配置された構造体であり、腫瘍組織を模倣した、人工的に構築された3次元腫瘍様組織を意味する。3次元腫瘍組織モデルの形状は、特に限定はなく、細胞外マトリックスを収容する容器の形状によって様々であり得、例えば、管状、球体状、楕円体状、直方体状等が挙げられる。

[0016] 血管様構造とは、生体の血管を模倣した、人工的に構築された、血管系細胞を含むか又は血管系細胞からなる筒状の構造を意味する。主血管様構造とは、3次元腫瘍組織モデルを貫通しており、外部から灌流可能な開口を有しており、かつ、後述の腫瘍血管様構造、毛細血管様構造等よりも大きい太さ(直径)を有する血管様構造である。主血管様構造の当該開口に外部の灌流装置等を接続し、3次元腫瘍組織モデルを灌流できる。腫瘍血管様構造とは、がん細胞へ酸素及び栄養素などを運ぶための毛細血管を模倣した、人工的

に構築された、血管系細胞を含むか又は血管系細胞からなる筒状の血管様構造であり、主血管様構造に連通する開口部を有する。がん細胞は、細胞外マトリックス中において存在しており、がん細胞の少なくとも一部は互いに接触し腫瘍組織様構造を有してよく、また、がん細胞の少なくとも一部は、主血管様構造及び／又は腫瘍血管様構造の周りに集まってもよい。したがって、外部の灌流装置等によって灌流される場合は、酸素及び栄養素等が主血管様構造及び腫瘍血管様構造を通じてがん細胞に運ばれる。

[0017] 本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルによれば、例えば、がん治療のための薬剤等の有効性を正確に評価することができ、また、本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルにおける主血管様構造から任意の薬剤を含む溶液を灌流することで、任意の薬剤の腫瘍組織における分布、送達についても評価することができる。さらに、同様にして、任意の薬剤の腫瘍組織における血管への影響を評価することも可能となる。加えて、同様にして腫瘍組織に浸潤する細胞の腫瘍組織への影響を評価することもできる。

[0018] 主血管様構造の太さ（直径）は、3次元腫瘍組織モデルを灌流するために十分な太さであれば特に限定されないが、例えば、50 μ m超、100 μ m以上、200 μ m以上であってよく、1000 μ m以下、900 μ m以下、800 μ m以下、700 μ m以下、600 μ m以下、500 μ m以下、400 μ m以下、300 μ m以下であってよい。3次元腫瘍組織モデルの主血管様構造の長さは、特に限定されないが、例えば、50000 μ m以下、40000 μ m以下、30000 μ m以下、20000 μ m以下、10000 μ m以下、9000 μ m以下、8000 μ m以下、7000 μ m以下、6000 μ m以下、5000 μ m以下、4000 μ m以下、3000 μ m以下、2000 μ m以下、1000 μ m以下、750 μ m以下、500 μ m以下、400 μ m以下、300 μ m以下、200 μ m以下であってよく、50 μ m以上、100 μ m以上、200 μ m以上、300 μ m以上、400 μ m以上、500 μ m以上であってよい。3次元腫瘍組織モデルにおける主血管様構造は、一つ（一本）あればよく、二つ（二本）又はそれ以上であってもよい。

。

[0019] 腫瘍血管様構造は、主血管様構造から分岐して新生した血管様構造であり、毛細血管様構造ともいう。腫瘍血管様構造は、盲端構造を有するものであることが好ましい。腫瘍血管様構造の太さ（直径）は、がん細胞へ酸素及び栄養素等を運ぶために十分な太さであれば特に限定されないが、例えば、1 μm 以上、2 μm 以上、3 μm 以上、4 μm 以上、5 μm 以上であってよく、50 μm 以下、40 μm 以下、30 μm 以下、20 μm 以下、10 μm 以下であってよい。3次元腫瘍組織モデルの腫瘍血管様構造の長さは、特に限定されないが、例えば、5000 μm 以下、4000 μm 以下、3000 μm 以下、2000 μm 以下、1000 μm 以下、750 μm 以下、500 μm 以下、400 μm 以下、300 μm 以下、200 μm 以下であってよく、50 μm 以上、100 μm 以上、200 μm 以上、300 μm 以上、400 μm 以上、500 μm 以上であってよい。3次元腫瘍組織モデルにおける腫瘍血管様構造は、一つ（一本）あればよく、複数本があることが好ましく、例えば、3本以上、5本以上、7本以上、10本以上、15本以上であってよい。

[0020] 血管系細胞は、血管様構造を形成できる細胞であれば特に限定されず、例えば、哺乳動物由来の細胞であってよく、哺乳動物としては、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、マウス、ラット等が挙げられる。血管系細胞としては、例えば、血管上皮細胞、血管内皮細胞等が挙げられ、血管内皮細胞が好ましく、ヒト由来血管内皮細胞がより好ましい。また、血管系細胞は、細胞株であってよく、初代培養細胞であってよく、また、多能性幹細胞を分化誘導して得た血管系細胞であってよい。多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（ES細胞：Embryonic stem cell）、人工多能性幹細胞（iPS細胞：induced pluripotent stem cell）等が挙げられる。

[0021] ヒト由来血管内皮細胞としては、例えば、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells：HUVEC）、ヒト臍帯動脈内皮細胞（Human

Umbilical Artery Endothelial Cells : HUAEC)、ヒト冠状動脈内皮細胞 (Human Coronary Artery Endothelial Cells : HCAEC)、ヒト伏在静脈内皮細胞 (Human Saphenous Vein Endothelial Cells : HSaVEC)、ヒト肺動脈内皮細胞 (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells : HPAEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells : HAoEC)、ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells : HDMEC)、ヒト皮膚血管内皮細胞 (Human Dermal Blood Endothelial Cells : HDBEC)、ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells : HDLEC)、ヒト肺微小血管内皮細胞 (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells : HPMEC)、ヒト心臓微小血管内皮細胞 (Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells : HCMEC)、ヒト膀胱微小血管内皮細胞 (Human Bladder Microvascular Endothelial Cells : HBdMEC)、ヒト子宮微小血管内皮細胞 (Human Uterine Microvascular Endothelial Cells : HUtMEC)、ヒト脳微小血管内皮細胞等が挙げられる。ヒト由来血管内皮細胞としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞が好ましい。また、ヒト腫瘍から分離された血管内皮細胞も利用可能である。

[0022] 主血管様構造を形成する血管系細胞と、腫瘍血管様構造等の主血管様構造以外の部分に存在する血管系細胞とは、同じ種類であっても異なる種類であってもよい。

[0023] がん細胞は、例えば、哺乳動物由来の細胞であってもよく、哺乳動物としては、ヒト、マウス、ラット等が挙げられる。がん細胞としては、例えば、白血病細胞、悪性リンパ腫細胞、骨髄腫細胞、肺がん細胞、乳がん細胞、胃がん細胞、大腸がん細胞 (例えば、SW620、HT-29、DiFi)、子宮がん細胞、卵巣がん細胞、喉頭がん細胞、咽頭がん細胞、舌がん細胞、骨肉腫細胞、軟骨肉腫細胞、横紋筋肉腫細胞、平滑筋肉腫細胞、線維肉腫細胞、脂肪肉腫細胞、血管肉腫細胞、肝がん細胞、膵がん細胞、胆道がん細胞、脳腫瘍細胞、神経膠腫細胞、前立腺がん細胞、皮膚がん細胞等が挙げられる。また、がん細胞株や患者から切除した腫瘍をマウスに移植して作製した

腫瘍組織から分離したがん細胞を用いてもよい。この場合、腫瘍組織からがん細胞のみを単離してもよいし、がん細胞と間質細胞が混在したまま用いてもよい。また、がん細胞株や患者から切除した腫瘍をオルガノイドとして培養した組織から分離したがん細胞を用いてもよい。この場合も、オルガノイドからがん細胞のみを単離してもよいし、がん細胞と間質細胞が混在したまま用いてもよい。

[0024] 細胞外マトリックス (Extracellular matrix ; ECM) とは、生物において細胞の外側に存在している不溶性物質である。3次元腫瘍組織モデルにおける細胞外マトリックスは、後述の水性媒体に分散された状態のものであってよく、細胞培養温度 (例えば30~37℃) において、固体 (ゲル状) であることが好ましい。3次元腫瘍組織モデルに使用される細胞外マトリックスは好ましくは、細胞外マトリックスを水性媒体に溶解した溶液 (以下、単に「細胞外マトリックス溶液」という場合がある) が、細胞培養温度よりも低い温度 (例えば、0~20℃) において液状であるが、細胞培養温度 (例えば30~37℃) において、ゲル化されたもの (以下、単に「細胞外マトリックスゲル」という) である。細胞外マトリックス溶液又は細胞外マトリックスゲルにおける細胞外マトリックスの濃度は、特に限定されず、ゲル化した際に、一般的に細胞培養及び細胞の移動に適した硬さを提供できる濃度であればよく、例えば、0.1 mg/mL以上、0.5 mg/mL以上、1 mg/mL以上、1.5 mg/mL以上、2 mg/mL以上、2.5 mg/mL以上、又は3 mg/mL以上であってよく、50 mg/mL以下、40 mg/mL以下、30 mg/mL以下、20 mg/mL以下、15 mg/mL以下、10 mg/mL以下、5 mg/mL以下であってよい。

[0025] 細胞外マトリックスとしては、例えば、コラーゲン、フィブリン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、フィブリリン、グリコサミノグリカン、アルギン酸等が挙げられる。好ましくは、コラーゲン又はフィブリンであり、より好ましくはコラーゲンである。3次元腫瘍組織モデルにおい

て、細胞外マトリックスは、1種類を単独で含んでいてもよく、2種類以上を組み合わせて含んでいてもよい。コラーゲンは、例えば、I型、II型、III型、IV型、V型、XI型等の各種コラーゲンであってよい。また、MatrigelやGeltrex等の基底膜抽出物を用いてもよい。

[0026] 本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルにおける細胞外マトリックスは、特に除外しない限り、水分を含む。ここで、水分は後述の水性媒体を意味する。本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルにおける細胞外マトリックスの含有量（水分を含む）は、特に限定されないが、3次元腫瘍組織モデルの全質量を基準として、例えば、10質量%以上、15質量%以上、20質量%以上、25質量%以上、又は30質量%以上であってよく、95質量%以下、90質量%以下、80質量%以下、70質量%以下、60質量%以下、50質量%以下、30質量%以下、20質量%以下、又は15質量%以下であってよい。

[0027] 本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルの厚みは、特に限定されないが、例えば、5000 μm 以下、4000 μm 以下、3000 μm 以下、2000 μm 以下、1000 μm 以下、750 μm 以下、500 μm 以下、400 μm 以下、300 μm 以下、200 μm 以下であってよく、50 μm 以上、100 μm 以上、200 μm 以上、300 μm 以上、400 μm 以上、500 μm 以上であってよい。ここで、本明細書において、3次元腫瘍組織モデルの厚みとは、主血管様構造の血管壁面（血管の外側壁面）から、当該3次元腫瘍組織モデルの表面までの距離を意味する。

[0028] 本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、間質細胞を含んでいてもよい。間質細胞とは、上皮細胞の支持組織を構成する細胞である。間質細胞としては、例えば、線維芽細胞、免疫細胞、周皮細胞、神経細胞、肥満細胞、上皮細胞、心筋細胞、肝細胞、膵島細胞、組織幹細胞、平滑筋細胞、間葉系幹細胞等が挙げられる。

[0029] 免疫細胞としては、例えば、リンパ球、マクロファージ、顆粒球、樹状細胞が挙げられ、リンパ球が好ましい。リンパ球としては、例えば、T細胞、

B細胞、ナチュラルキラー細胞等が挙げられ、T細胞が好ましい。

[0030] がん間質に存在する細胞は、がん間質細胞と呼ばれており、例えばがん増殖を促進するサイトカイン又は成長因子を分泌する、がんの進展を促進する等の性質を有すると考えられている。また、がん間質細胞は、腫瘍組織内で間質細胞が活性化されて分化すると考えられている。そのため、より腫瘍組織に近い3次元腫瘍組織を構築するため、本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、間質細胞としてがん間質細胞を含んでいてもよい。がん間質細胞は、例えば、がん間質に存在する線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞等が挙げられる。がん間質に存在する線維芽細胞としては例えば、がん関連線維芽細胞(CAF)等が挙げられる。がん間質に存在する免疫細胞としては、例えば、腫瘍関連マクロファージ(TAM)等が挙げられる。がん間質に存在する血管内皮細胞としては、例えば、腫瘍血管内皮細胞等が挙げられる。

[0031] 本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、単層型の3次元腫瘍組織モデルであってもよく、重層型の3次元腫瘍組織モデルであってもよい。単層型の3次元腫瘍組織モデルとは、一つの層を有する3次元腫瘍組織モデルであり、すべて細胞及び細胞外マトリックスがこの一つの層に含まれている3次元腫瘍組織モデルをいう。

[0032] 重層型の3次元腫瘍組織モデルとは、2以上の層を含む3次元腫瘍組織モデルであり、2以上の互いに接している、すなわち、積層されている層を有する3次元腫瘍組織モデルであり、2以上の層のうちの一層は全ての種類の細胞を含まなくてもよい。重層型の3次元腫瘍組織モデルは、特に限定されないが、二層、三層、四層又は五層であってもよく、二層の3次元腫瘍組織モデルであることが好ましい。複数の層は、主血管様構造の長手軸を同心軸とする層である。二層の3次元腫瘍組織モデルである場合、一実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、血管層と腫瘍層とを備え、血管層が主血管様構造を囲む層であり、腫瘍層は主血管様構造上(すなわち、主血管様構造側と反対側)に積層されている。重層型の3次元腫瘍組織にすることで、より生体の腫瘍組織に近い構造の3次元腫瘍組織モデルとなる。

[0033] 血管層は、主血管様構造及び腫瘍血管様構造を有し、かつ血管系細胞及び細胞外マトリックスを含む層であり、細胞外マトリックス中に、血管系細胞を含む又は血管系細胞からなる、主血管様構造及び該主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有する。3次元腫瘍組織モデルを培養しているうちに、血管系細胞の増殖により、血管層における腫瘍血管様構造は増え、また、腫瘍血管様構造の長さも延伸する。その結果、血管層における腫瘍血管様構造は腫瘍層内へ延伸することがある。また、後述の腫瘍層において増殖したがん細胞が血管層内まで浸潤する場合もある。血管層はさらに上述の間質細胞を含んでもよい。

[0034] 腫瘍層は、がん細胞及び細胞外マトリックスを含む層である。3次元腫瘍組織モデルを培養しているうちに、がん細胞が増殖して、血管層まで浸潤したり、また、血管層から延伸してきた腫瘍血管様構造の周りに集まったりすることがある。腫瘍層は、さらに上述の間質細胞を含んでもよい。

[0035] 一実施形態に係る重層型の3次元腫瘍組織モデルは、最外層に生体適合性材料を含む層（以下、「被覆層」ともいう。）を備えるものであってもよい。被覆層は、生体適合性材料がゲル化して形成されたゲル層である。本明細書において、「最外層」とは主血管様構造の長手軸から一番離れた層を意味する。被覆層は、細胞を含まないことが好ましい。本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルが被覆層備えることにより、灌流を続けても、3次元腫瘍組織の構造（例えば、主血管様構造、3次元腫瘍組織全体の構造等）がより安定に保たれる。その灌流期間は、例えば、1日間以上であってよく、2週間であってよく、1カ月間であってよく、2カ月間であってよく、3カ月間であってよいが、これらの期間に限定されない。

[0036] 本明細書において、「生体適合性材料」とは、細胞の生育等に悪影響がなく、3次元腫瘍組織モデルの形成が妨げられない材料である。生体適合性材料としては、例えば、細胞外マトリックス成分（例えば、フィブリン、マトリゲル、コラーゲン、及びアルギン酸）等の生体由来材料、並びにポリエチレングリコールハイドロゲル等の合成ポリマーが挙げられる。生体適合性材

料としては、生体由来材料が好ましく、細胞外マトリックスがより好ましく、フィブリンがさらに好ましい。

[0037] 一実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、組織層及び上記組織層に接する被覆層を備え、上記組織層が主血管様構造及び主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、かつ血管系細胞、がん細胞、及び細胞外マトリックスを含み、上記被覆層が、生体適合性材料を含み、3次元腫瘍組織モデルにおいて最外層に位置する。組織層については、がん細胞を含むという点以外は上記血管層と同様である。

[0038] 一実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルは、血管層及び上記血管層に接する腫瘍層を備える3次元腫瘍組織モデルであり、被覆層を更に備え、上記被覆層が生体適合性材料を含み、上記3次元腫瘍組織モデルにおいて最外層に位置する。

[0039] <3次元腫瘍組織モデルの製造方法>

本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデル（以下、単に「3次元腫瘍組織」という場合がある）の製造方法は、血管様構造及び腫瘍血管様構造を有する3次元腫瘍組織体モデルの製造方法であり、上記主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞及びがん細胞を含む細胞外マトリックスゲルを形成する工程（ゲル形成工程）と、上記貫通流路の内壁に第2の血管系細胞を播種することにより、上記主血管様構造を形成する工程（主血管様構造形成工程）と、上記主血管様構造に培地を灌流して腫瘍血管様構造を形成する工程（腫瘍血管様構造形成工程）と、を備える。

[0040] 以下、一実施形態に係る製造方法について、図面を参照しつつ説明する。以下の説明において、同一又は相当要素には同一符号を用い、重複する説明を省略する。

[0041] （灌流デバイス）

一実施形態に係る製造方法は、例えば、灌流デバイスを用いた製造方法であってもよい。一実施形態に係る灌流デバイスは、例えば、図1に示すようなものであってもよい。図1に示す灌流デバイス1は、灌流デバイス本体部

11と底蓋15を備える。灌流デバイス本体部11は、少なくともチャンバー13、並びに管状コネクタ12及び18が設けられているものである。灌流デバイス1の形状、大きさ等は特に限定はされず、3次元腫瘍組織モデルが所望の形状、大きさになるように適宜設計することができる。灌流デバイス1は、例えば、3Dプリンタ技術により製造することもできる。灌流デバイス1の材質は、特に限定されないが、例えば、アクリル樹脂等であってよい。灌流デバイス1は、3次元腫瘍組織モデルを構築した後に、そのまま管状コネクタ12又は18を介して灌流デバイス1の外部から3次元腫瘍組織モデルの内部へ送液する灌流装置等と接続し、3次元腫瘍組織モデルを灌流できるものであることが好ましい。

[0042] チャンバー13は、灌流デバイス本体部11に設けられる、3次元腫瘍組織モデルを形成及び培養するためのチャンバー（空間）である。チャンバー13は、内壁部32によって囲まれており、上側及び下側にそれぞれ開口部を有する。当該下側開口部は、底蓋15によって塞ぐことができ、これによりチャンバー13は液体を収容することができる。灌流デバイス本体部11において、チャンバー13の下側開口部に対応する溝部16を有していてもよく、当該溝部16に底蓋15をはめ込むことができる。灌流デバイス本体部11は溝部16を有することにより、より容易にチャンバー13の下側開口部を塞ぐことができる。チャンバー13は、3次元腫瘍組織モデルを形成できれば、その形状及び大きさは特に限定されない。

[0043] 管状コネクタ12及び18は、灌流デバイス本体部11の対向する側面にそれぞれ、少なくとも1対設けられており、灌流デバイス本体部11の外部からチャンバー13内部に連通している貫通孔121及び181を有する。管状コネクタ12の貫通孔121と、管状コネクタ18の貫通孔181は、同じ直径を有しており、また、貫通孔の中心が同じ軸にある。それによって、後述の棒状部材17を貫通孔121及び181を通すことができる。また、3次元腫瘍組織モデルにおける主血管様構造が、貫通孔121及び181と連通するため、管状コネクタ12及び18を介して、灌流デバイス本体部

11の外部から、主血管様構造内に通液可能となる。貫通孔121及び181の直径は、特に制限されず、主血管様構造の直径にあわせて適宜設定してよい。

[0044] 管状コネクタ12及び18は、特に限定されないが、1対（1つの管状コネクタ12と1つの管状コネクタ18）であればよく、2対以上（2つ以上の管状コネクタ12と2つ以上の管状コネクタ18）であってもよい。管状コネクタ12及び18は、そのチャンバー13に露出する側にそれぞれアンカー構造部14が設けられているものであることが好ましい。管状コネクタ12及び18にアンカー構造部14が設けられていることにより、3次元腫瘍組織の収縮を極力抑え、所望の形状の3次元腫瘍組織モデルが構築しやすくなるとともに、3次元腫瘍組織モデルの灌流デバイス1からの脱離を抑制することができる。また、管状コネクタ12及び18のチャンバー13に露出する側の表面に、大気プラズマ処理、及び／又はフィブロネクチンによるコーティング処理を行ってもよい。当該処理により、培養した3次元腫瘍組織モデルの脱離をさらに抑制することができる。

[0045] 別の実施形態に係る灌流デバイスは、例えば、図20に示す灌流デバイス1aであってもよい。図20に示す灌流デバイス1aは、図21の分解斜視図でも示すとおり、上蓋81と、シール部材91と、灌流デバイス本体部11aとを備える。灌流デバイス本体部11aは、上記灌流デバイス1の灌流デバイス本体部11と底蓋15とが一体になったものである。すなわち、灌流デバイス本体部11aは、灌流デバイス1におけるチャンバー13の説明で述べた下側開口部は有しない。それ以外の灌流デバイス本体部11aの具体的な態様は、灌流デバイス本体部11で述べたとおりである。

[0046] 一実施形態に係る上蓋81は、蓋部811と、蓋部811の四隅に、爪部813が設けられた4つの脚部812を備えている。上蓋81は、灌流デバイス本体部11aの上側に固定され、蓋部811により灌流デバイス本体部11aにおけるチャンバー13の上側開口部を閉じるための部材である。灌流デバイス1aが上蓋81を備えることにより、3次元腫瘍組織の構造（例

例えば、主血管様構造、３次元腫瘍組織全体の構造等）を、より安定に保ちながら灌流することができる。

[0047] 上蓋８１を、灌流デバイス本体部１１ａに固定する方法としては、例えば、スナップフィット機構、クランプ、又はネジにより固定する方法であってもよい。図２１に示す上蓋８１は、スナップフィット機構により灌流デバイス１１ａに固定するため、脚部８１２を備え、脚部８１２には爪部８１３が設けられている。

爪部８１３が、灌流デバイス本体部１１ａの突出部１９と係合することにより、上蓋８１が灌流デバイス１１ａに固定される。上蓋８１は、灌流デバイス本体部１１ａの管状コネクタ１２側及び１８側のいずれか一方に本体凹部８１４を有していてもよく、管状コネクタ１２側及び１８側両方に本体凹部８１４を有していてもよい。本体凹部８１４の形状は、例えば、四角形状、三角形上、湾曲形状、及びこれらの組み合わせであってもよい。上蓋８１が本体凹部８１４を有することにより、管状コネクタに対する操作性が向上する。

[0048] 上蓋８１の形状、大きさ等はチャンバー１３の上側開口部を閉じることができれば特に限定はされず、適宜設計することができる。上蓋８１は、例えば、３Ｄプリンタ技術により製造することもできる。上蓋８１の材質は、特に限定されないが、例えば、アクリル樹脂等であってもよい。

[0049] 一実施形態に係るシール部材９１は、凹部９１１が設けられている。シール部材９１は、灌流デバイス本体部１１ａ及び上蓋８１の間に介在し、上蓋８１の密閉性を向上させるための部材である。シール部材９１は、例えば、パッキン等である。シール部材９１は、灌流デバイス本体部１１ａの管状コネクタ１２側及び１８側のいずれか一方に凹部９１１を有していてもよく、管状コネクタ１２側及び１８側両方に凹部９１１を有していてもよい。凹部９１１の形状は、例えば、四角形状、三角形上、湾曲形状、及びこれらの組み合わせであってもよい。凹部９１１は、上蓋８１が本体凹部８１４を有している場合、同じ方向に設けられることが好ましい。シール部材９１が凹部

911を有することにより、管状コネクタに対する操作性が向上する

[0050] シール部材91の形状、大きさ等はチャンバー13の上側開口部を閉じることができれば特に限定はされず、適宜設計することができる。シール部材91は、例えば、3Dプリンタ技術、切削加工、又は鋳型を用いた転写等の方法により製造することもできる。シール部材91の材質は、特に限定されないが、例えば、ゴム、シリコン（例えば、ジメチルポリシロキサン（PDMS））等であってよい。

[0051] [単層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法]

一実施形態に係る単層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法の作製工程を図2に示す。図2は、灌流デバイス1を用いて3次元腫瘍組織モデルを製造した図であり、図1における灌流デバイスのA-A'断面図である。以下、図2中の各工程を「工程(2-i)」等ともいう。

[0052] (ゲル形成工程)

ゲル形成工程では、主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞及びがん細胞を含む細胞外マトリックスゲルを形成する。主血管様構造については、上述のとおりである。第1の血管系細胞は、主血管様構造を形成する血管系細胞であり、第1の血管系細胞の種類としては上述のとおりである。

[0053] ゲル形成工程は、例えば図2中の工程(2-i)～(2-iii)を含む工程であってもよい。

[0054] [工程(2-i)]

工程(2-i)は、上記一対の管状コネクタ12及び18が設けられた灌流デバイス本体部11に、一方の管状コネクタ12の貫通孔121から他方の管状コネクタ18の貫通孔181へ棒状部材17を通す工程であり、後述の工程(2-iii)においてゲル(細胞外マトリックスゲル26)に貫通流路31を形成させるための工程である。

[0055] 棒状部材17の太さは、後述の3次元腫瘍組織61中の主血管様構造52の外径に対応しているため、棒状部材17の太さは、所望の主血管様構造の

外径によって適宜設計すればよい。また、棒状部材 17 の材質についても特に限定されないが、例えば、金属製であってよく、ステンレス製であることが好ましい。棒状部材 17 の形状は特に限定はされず、例えば、針状（例えば、シリンジ針等）やワイヤー状のもの等であってよく、所定の内径及び長さの主血管様構造 52 が構築できるものであればよい。

[0056] [工程 (2-i-i)]

工程 (2-i-i) は、第 1 の血管系細胞 22 及びがん細胞 23 を含む細胞外マトリックスゲル 26 を形成する工程である。より具体的には、工程 (2-i-i) では、上記工程 (2-i) の後、下側開口部が塞がれた状態のチャンバー 13 に、細胞外マトリックス溶液 21 に第 1 の血管系細胞 22 及びがん細胞 23 を懸濁した細胞懸濁液を充填し、ゲル化させる。これにより、本実施形態に係る 3次元腫瘍組織モデルのベースとなる部分を構築することができる。第 1 の血管系細胞、がん細胞、及び細胞外マトリックスについては、上述のとおりである。

[0057] 細胞外マトリックス溶液 21 に血管系細胞 22 及びがん細胞 23 を懸濁した細胞懸濁液は、必要に応じてさらに上述の間質細胞等の細胞を含んでもよい。

[0058] 細胞外マトリックス溶液 21 は、細胞外マトリックスを水性媒体に溶解、分散等を行うことにより調製することができる。水性媒体に溶解、分散等する細胞外マトリックスは、溶液、凍結乾燥品、粉末であってもよい。

[0059] 細胞外マトリックス溶液 21 中の細胞外マトリックスの濃度は、0.1 mg/mL 以上、0.5 mg/mL 以上、1 mg/mL 以上、1.5 mg/mL 以上、2 mg/mL 以上、2.5 mg/mL 以上、又は 3 mg/mL 以上であってよく、50 mg/mL 以下、40 mg/mL 以下、30 mg/mL 以下、20 mg/mL 以下、15 mg/mL 以下、10 mg/mL 以下、5 mg/mL 以下であってよい。

[0060] 本明細書において水性媒体とは、水又は水溶液を意味する。水としては、脱イオン水、蒸留水等が挙げられ、水溶液としては、トリス-塩酸緩衝液、

又はHEPES（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンエタンサルホン酸）等の緩衝液、液体培地等が挙げられる。液体培地は特に限定はなく、培養する細胞の種類に応じて好適な液体培地を選択できる。

- [0061] 細胞懸濁液中の血管系細胞の細胞密度は、3次元腫瘍組織モデルが構築できれば特に限定されないが、例えば、 1×10^5 細胞/mL以上、 5×10^5 細胞/mL以上、 1×10^6 細胞/mL以上、 5×10^6 細胞/mL以上、又は 1×10^7 細胞/mL以上であってもよく、また、 5×10^8 細胞/mL以下、 1×10^8 細胞/mL以下、 5×10^7 細胞/mL以下、 3×10^7 細胞/mL以下、 1×10^7 細胞/mL以下、 5×10^6 細胞/mL以下、又は 1×10^6 細胞/mL以下であってもよい。
- [0062] 細胞懸濁液中のがん細胞の細胞密度は、3次元腫瘍組織モデルが構築できれば特に限定されないが、例えば、 1×10^5 細胞/mL以上、 5×10^5 細胞/mL以上、 1×10^6 細胞/mL以上、 5×10^6 細胞/mL以上、又は 1×10^7 細胞/mL以上であってもよく、また、 5×10^8 細胞/mL以下、 1×10^8 細胞/mL以下、 5×10^7 細胞/mL以下、 3×10^7 細胞/mL以下、 1×10^7 細胞/mL以下、 5×10^6 細胞/mL以下、又は 1×10^6 細胞/mL以下であってもよい。
- [0063] 細胞懸濁液中の血管系細胞とがん細胞との細胞密度の比（血管系細胞：がん細胞）は、 $1 : 0.3 \sim 1 : 3$ であってもよく、 $1 : 0.5 \sim 1 : 2.5$ 、 $1 : 0.8 \sim 1 : 2$ 、又は $1 : 1 \sim 1 : 1.5$ であってもよい。
- [0064] 細胞懸濁液中の間質細胞の細胞密度は、3次元腫瘍組織モデルが構築できれば特に限定されないが、例えば、 1×10^4 細胞/mL以上、 5×10^4 細胞/mL以上、 1×10^5 細胞/mL以上、 5×10^5 細胞/mL以上、又は 1×10^6 細胞/mL以上であってもよく、また、 5×10^7 細胞/mL以下、 1×10^7 細胞/mL以下、 5×10^6 細胞/mL以下、 3×10^6 細胞/mL以下、 1×10^6 細胞/mL以下、 5×10^5 細胞/mL以下、又は 1×10^5 細胞/mL以下であってもよい。
- [0065] 上記細胞懸濁液のゲル化は、例えば、細胞懸濁液を加温することにより実

施することができる。加温する際の温度及び加温時間は、細胞外マトリックス成分の種類、濃度等に応じて適宜設定することができるが、例えば、加温する際の温度は25～45℃であってよく、加温時間は1～3時間であってよい。

[0066] [工程(2-iii)]

工程(2-iii)は、工程(2-ii)で形成した第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26に貫通流路を形成する工程である。より具体的には、工程(2-iii)では、上記工程(2-ii)の後に上記工程(2-i)において灌流デバイス本体部11に通した棒状部材17を抜去する工程であり、工程(2-iii)において形成された第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26に貫通流路31を形成する。当該貫通流路31が、本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルにおける主血管様構造52のベースとなる。

[0067] 工程(2-iii)における第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26は、上記工程(2-ii)において細胞懸濁液中の細胞外マトリックスをゲル化させたのち、収縮したものであってもよく、収縮していないものであってもよい。工程(2-iii)においては、血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26は工程(2-ii)の後に収縮した状態のものを示している。血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26が収縮した状態のものである場合、灌流デバイス本体部11の内壁部32と細胞外マトリックスゲル26とは少なくとも一部において接触していない状態である。

[0068] (主血管様構造形成工程)

主血管様構造形成工程では、ゲル形成工程で形成した細胞外マトリックスゲルにおける貫通流路の内壁に第2の血管系細胞を播種することにより、上記主血管様構造を形成する。第2の血管系細胞は、主血管様構造を形成する血管系細胞であり、第2の血管系細胞の種類としては上述のとおりである。第2の血管系細胞は、第1の血管系細胞と同じ種類であってもよく、異なる

種類であってもよい。

[0069] 主血管様構造形成工程は、特に限定されないが、例えば工程（2-i v）～（2-v）を含む工程であってもよい。

[0070] [工程（2-i v）]

図2中の工程（2-i v）では、上記工程（2-i i）又は上記工程（2-i i i）の後に、工程（2-i i）において形成した血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26を、血管系細胞用培地を含む培地41で浸漬する。

[0071] 上記ゲル26の培地への浸漬は、当該細胞外マトリックスゲル26全体が浸漬するように培地を投入する、又は当該細胞外マトリックスゲル全体を培地中に浸漬させることであってもよい。

[0072] 本明細書において、「血管系細胞用培地」とは、血管系細胞が増殖可能な培地を意味する。血管系細胞用培地としては、例えば、Promocell社Endothelial Growth Medium、Endothelial Growth Medium2、Endothelial Growth Medium MV、Endothelial Growth Medium MV2、Lonza社EGM BulletKit、EGM-2 BulletKit、EGM-2MV BulletKit、EGM-Plus BulletKit等が挙げられる。また、工程（4）において用いる培地41は、血清を添加した培地であってもよく、無血清培地であってもよい。また、工程（4）において用いる培地41は、成長因子、分化誘導因子、ホルモン、アミノ酸、糖類、塩類、抗生物質等の細胞の培養に用いられる成分を含むものであってもよい。

[0073] 工程（2-i v）において用いる培地41は、培地全量に対して血管系細胞用培地が50質量%以上含むことが好ましく、50質量%以上、60質量%以上、70質量%以上、80質量%以上、90質量%以上、又は100質量%含むことがより好ましい。

[0074] [工程（2-v）]

工程（2-v）では、上記工程（2-iv）の後に、上記工程（2-iii）で第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26に形成した貫通流路31に第2の血管系細胞51を播種し、主血管様構造52を形成させる。

[0075] 工程（2-v）において播種する第2の血管系細胞51は、例えば、水性媒体に血管系細胞51を懸濁した細胞懸濁液であってもよい。貫通流路31に第2の血管系細胞51を播種する方法は、特に限定されないが、例えば、シリンジ及びシリンジポンプ等を用いて血管系細胞51の懸濁液を貫通流路31に注入する方法が挙げられる。

[0076] 工程（2-v）においては、貫通流路31に第2の血管系細胞51を播種した後、主血管様構造52を形成させるために、所定の時間でインキュベートすることで貫通流路31の内壁に血管系細胞51を接着させる。第2の血管系細胞51を貫通流路31の内壁への均一に接着させるために、必要に応じて、灌流デバイス本体部11の向きを変えてもよい。

[0077] インキュベートは、貫通流路31の内壁に第2の血管系細胞51が接着されれば特に限定されないが、例えば、35～40℃であってよく、好ましくは37℃であり、インキュベート時間は、例えば、15分～1時間程度であってよく、CO₂の条件は、例えば、5%であってもよい。

[0078] （腫瘍血管様構造形成工程）

腫瘍血管様構造形成工程では、主血管様構造形成工程で形成した主血管様構造に培地を灌流して腫瘍血管様構造を形成する。第2の血管系細胞は、主血管様構造を形成する血管系細胞であり、第2の血管系細胞の種類としては上述のとおりである。第2の血管系細胞は、第1の血管系細胞と同じ種類であってもよく、異なる種類であってもよい。

[0079] 腫瘍血管様構造形成工程は、特に限定されないが、例えば以下の工程（2-vi）を含む工程であってもよい。

[0080] [工程（2-vi）]

工程（2-vi）では、例えば、上記工程（2-v）の後、灌流デバイス

本体部 1 1 に設けられた管状コネクタ 1 2 から主血管様構造 5 2 に血管系細胞用培地を、灌流方向 7 1 の方向に灌流させて、3次元腫瘍組織モデル 6 1 に含まれる細胞を灌流培養する。工程 (2-v i) にて灌流させる培地は、血管系細胞用培地を含む培地であればよく、上記工程 (2-i v) で用いた血管系細胞用培地を含む培地 4 1 と同じ種類の培地であっても、異なる種類の培地であってもよい。工程 (2-v i) で用いる血管系細胞用培地としては、上述のものが挙げられる。

[0081] 培養する3次元腫瘍組織モデル 6 1 が管状コネクタ 1 2 及び 1 8 から脱離していない状態で、管状コネクタ 1 2 又は 1 8 中に培地を流入させることで、主血管様構造 5 2 に培地を灌流させることができる。これにより、培養する3次元腫瘍組織モデル 6 1 内部からも栄養分が提供され、3次元腫瘍組織モデル 6 1 中の第 1 の血管系細胞 2 2、第 2 の血管系細胞 5 1、がん細胞 2 3 等が培養される。その結果、第 1 の血管系細胞 2 2 により主血管様構造 5 2 に接続する腫瘍血管様構造 6 2 が形成され、本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデル 6 1 全体としての構築が効果的に行われる。培地の灌流は、外部ポンプ等を用いて、管状コネクタ 1 2 又は 1 8 から3次元腫瘍組織モデル 6 1 内に灌流させることも好ましい。

[0082] 外部ポンプとしては、例えば、ペリスタルティックポンプ、シリンジポンプ、空気圧駆動ポンプ等が挙げられる。外部ポンプとしては、より容易に後述の培地循環路を形成できる観点から、吸引及び送液できるものが好ましく、ペリスタルティックポンプがより好ましい。

[0083] 外部ポンプを用いて、3次元腫瘍組織モデル 6 1 内に培地を灌流する場合、培地循環路を形成させて灌流してもよい。培地循環路は、例えば、チューブ及び外部ポンプを用いることにより形成することができる。培地循環路の一実施形態として、例えば、灌流させる培地が入った培養皿に、第 1 の血管系細胞 2 2 及びがん細胞 2 3 を含む細胞外マトリックスゲル 2 6 を把持した灌流デバイス本体部 1 1 を浸漬した状態にし、チューブの一方の端を培養皿に入った培地に入れ、チューブのもう一方の端を管状コネクタ 1 2 に接続す

る。さらに、チューブにペリスタルティックポンプを接続する。こうすることで、チューブの端部から培地皿に入った培地をペリスタルティックポンプによって吸引し、管状コネクタ12を介して3次元腫瘍組織モデル61内に送液して灌流する。3次元腫瘍組織モデル61内に送液された培地は、培養皿に管状コネクタ18を介して放出される。

[0084] チューブの材質は、特に限定されず、例えば、シリコーン、テフロン（登録商標）、塩化ビニル等が挙げられ、シリコーンであることが好ましい。

[0085] 培養皿の材質は、特に限定されず、例えば、プラスチック、ガラス等が挙げられ、プラスチックが好ましく、ポリスチレンであることが好ましい。培養皿としては、通常の細胞培養に利用されるポリスチレンのディッシュを用いるのが好ましい。

[0086] 培地循環路は、適宜バブルトラップ等を接続したものであってもよい。バブルトラップは、例えば、培地に混入したバブルが浮力によって培地の流れから分離され、容器内に蓄積されるもの等であってもよい。より具体的には、密閉容器に培地を流入させるチューブと密閉容器から培地を流出させるチューブとを通じ、密閉容器中に存在する流入させるチューブの端部よりも、密閉容器中に存在する流出させるチューブの端部を低く配置することで構成できる。また、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）等の空気を透過する膜を用いた膜分離等のバブル除去装置を用いてもよい。

[0087] 培地循環路において、灌流デバイス本体部11を浸漬する培養皿と、3次元腫瘍組織モデル61内に送液された培地を放出する先の培養皿を分離してもよい。この場合、ペリスタルティックポンプは放出先の培養皿から培地を吸引する。培地を循環させずに、常時新しい培地を吸引し、腫瘍組織に送液し、そして廃液を廃液ボトルに放出する方式であってもよい。

[0088] 工程(2-vi)における灌流培養の条件は、主血管様構造52及び腫瘍血管様構造62が形成されれば特に限定されないが、例えば、35~40℃であってよく、好ましくは37℃であり、培養期間は、例えば、2~20日程度であってよく、CO₂の条件は、例えば、5%であってもよい。

- [0089] 工程(2-vi)における灌流の流速は、特に限定されないが、例えば、0.5 mL/時以上、1 mL/時以上、2 mL/時以上、3 mL/時以上、4 mL/時以上、5 mL/時以上、6 mL/時以上、7 mL/時以上、8 mL/時以上、9 mL/時以上、又は10 mL/時以上であってよく、また、20 mL/時以下、19 mL/時以下、18 mL/時以下、17 mL/時以下、16 mL/時以下、15 mL/時以下、14 mL/時以下、13 mL/時以下、12 mL/時以下、11 mL/時以下、10 mL/時以下であってよい。
- [0090] 工程(2-vi)における灌流の流速は、一定であってもよく、変化させてもよい。工程(2-vi)において灌流の流速を変化させる場合、例えば、1日～7日間、1日～5日間、1日～3日間、1日～2日間、又は1日間一定の流速で灌流した後に、流速を変化させてもよい。変化させる回数は、特に限定されないが、例えば、5回以下、3回以下、2回以下、又は1回であってよい。
- [0091] 工程(2-vi)において灌流の流速を変化させる場合、例えば、流速を速くしても遅くしてもよいが、速くすることが好ましい。流速を速くする場合、変化前後で2～15倍の速さにしてもよく、3倍～14倍、4倍～13倍、5倍～12倍、6倍～11倍、7倍～10倍、8倍～10倍、又は9倍～10倍であってもよい。
- [0092] 一実施形態に係る3次元腫瘍組織の製造方法は、ゲル形成工程以降任意のタイミングで、上記被覆層を形成する工程(被覆層形成工程)を備えていてもよい。被覆層は上述のとおりである。本実施形態に係る3次元腫瘍組織の製造方法が被覆層形成工程を備えることにより、3次元腫瘍組織の構造(例えば、主血管様構造、3次元腫瘍組織全体の構造等)を、より安定に保ちながら灌流することができる。
- [0093] 被覆層形成工程は、主血管様構造形成工程を実施した後に実施することが好ましい。被覆層形成工程は、例えば、ゲル形成工程における(2-ii)と同様の手順により行うことができる。より具体的には、下側開口部が塞が

れた状態のチャンバー13に、生体適合性材料を含む溶液を充填しゲル化させる。

[0094] 生体適合性材料を含む溶液は、生体適合性材料を水性媒体に溶解、分散等を行うことにより調製することができる。水性媒体に溶解、分散等する生体適合性材料は、溶液、凍結乾燥品、粉末であってもよい。

[0095] 生体適合性材料を含む溶液中の生体適合性材の濃度は、0.1 mg/mL以上、0.5 mg/mL以上、1 mg/mL以上、1.5 mg/mL以上、2 mg/mL以上、2.5 mg/mL以上、又は3 mg/mL以上であってよく、150 mg/mL以下、140 mg/mL以下、130 mg/mL以下、120 mg/mL以下、110 mg/mL以下、100 mg/mL以下、90 mg/mL以下、80 mg/mL以下、70 mg/mL以下、60 mg/mL以下、50 mg/mL以下、40 mg/mL以下、30 mg/mL以下、20 mg/mL以下、15 mg/mL以下、10 mg/mL以下、又は5 mg/mL以下であってよい。

[0096] 上記溶液のゲル化は、例えば、当該溶液を加温することにより実施することができる。加温する際の温度及び加温時間は、生体適合性材料の種類、濃度等に応じて適宜設定することができるが、例えば、加温する際の温度は25～45℃であってよく、加温時間は1秒～3時間であってよい。

[0097] [二層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法]

二層型3次元腫瘍組織モデルを製造する場合は、上記ゲル形成工程の代わりに、主血管様構造を形成するための貫通孔を有し、第1の血管系細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる血管層を形成する工程（血管層形成工程）と、上記血管層の前記貫通流路側と反対側の表面の少なくとも一部に接するようにがん細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる腫瘍層を形成する工程（腫瘍層形成工程）を備える。二層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法は、単層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法と同様な主血管様構造形成工程及び腫瘍血管様構造形成工程をさらに備える。一実施形態に係る二層型3次元腫瘍組織の製造方法は、腫瘍層形成工程以降任意のタイミングで、被覆層

形成工程を備えていてもよい。被覆層形成工程は、主血管様構造形成工程を実施した後に実施することが好ましい。

[0098] 一実施形態に係る二層型3次元腫瘍組織モデルの製造方法の作製工程を図16に示す。図16は、灌流デバイス1を用いて二層型3次元腫瘍組織モデルを製造する工程を示す図であり、(i)～(vii)はそれぞれ図1における灌流デバイスのA-A'軸での断面図である。以下、図16中の各工程を、「工程(16-i)」等ともいう。工程(2-i)と工程(16-i)は同様の工程である。工程(16-iv)は、第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26の代わりに、第1の血管系細胞22を含む細胞外マトリックスゲル26からなる血管層24に対して行うこと以外は、工程(2-iii)と同様の工程である。工程(16-v)は、第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26の代わりに、血管層24及び腫瘍層25からなる細胞外マトリックスゲルに対して行うこと以外は、工程(2-iv)と同様の工程である。工程(16-vi)は、第1の血管系細胞22及びがん細胞23を含む細胞外マトリックスゲル26の代わりに、血管層24に対して行うこと以外は工程(2-v)と同様の工程である。工程(16-vii)は、単層型3次元腫瘍組織モデル61の代わりに、二層型3次元腫瘍組織モデル61に対して行うこと以外は、工程(2-vi)と同様の工程である。

[0099] (血管層形成工程)

血管層形成工程では、主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる血管層を形成する。主血管様構造、貫通流路、第1の血管系細胞については、上述のとおりである。

[0100] 血管層形成工程では、例えば、工程(16-ii)のように、下側開口部が塞がれた状態のチャンバー13に第1の液体を充填し、ゲル化させることにより血管層24を形成する。第1の液体は、第1の血管系細胞22を細胞外マトリックス溶液21に懸濁した細胞懸濁液であり、上記工程(2-ii

)の細胞懸濁液と同様にして調製することができる。それ以外は、上記工程(2-i-i)と同様にして血管層24を形成することができる。

[0101] (腫瘍層形成工程)

腫瘍層形成工程では、血管層の貫通流路側と反対側の表面の少なくとも一部に接するようにがん細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる腫瘍層を形成する。がん細胞、腫瘍血管様構造については、上述のとおりである。

[0102] 腫瘍層形成工程は、特に限定されないが、例えば以下の工程(16-ii-ii)であってもよい。工程(16-ii-ii)においては、血管層24上に第2の液体を充填し、ゲル化させることにより腫瘍層25を形成する。上記第2の液体は、がん細胞23を細胞外マトリックス溶液21に懸濁した細胞懸濁液であり、上記工程(2-i-i)の細胞懸濁液と同様にして調製することができる。それ以外は、上記工程(2-i-i)と同様にして腫瘍層25を形成することができる。

[0103] 腫瘍層25は、血管層24の貫通流路31側と反対側の表面の少なくとも一部に接するように形成されるものであればよく、血管層24の貫通流路側と反対側の表面の全体に接していてもよい。腫瘍層25と血管層24とが接する程度は、適宜上記第2の液体を血管層24上に充填する部位、及び充填する第2の液体の量を調整すること等によって変化させることができる。

[0104] 血管層24及び腫瘍層25のそれぞれの厚みは、血管様構造が形成することができる厚みであれば、特に限定されないが、例えば、5000 μ m以下、4000 μ m以下、3000 μ m以下、2000 μ m以下、1000 μ m以下、750 μ m以下、500 μ m以下、400 μ m以下、300 μ m以下、200 μ m以下であってよく、50 μ m以上、100 μ m以上、200 μ m以上、300 μ m以上、400 μ m以上、500 μ m以上であってもよい。ここで、血管層の厚みとは、主血管様構造の血管壁面(血管の外側壁面)から、血管層24の腫瘍層25に接する表面までの距離を意味し、腫瘍層25の厚みとは、血管層24に接する表面か血管層と反対側の表面までの距離を意味する。

[0105] 3次元腫瘍組織モデル61において、主血管様構造52及び腫瘍血管様構造62が形成されたことは、例えば、後述の実施例に示すとおり免疫染色等によって確認することができる。

[0106] <評価対象の腫瘍組織に与える影響の評価方法>

本実施形態に係る評価対象の腫瘍組織に与える影響の評価方法（以下、「本実施形態に係る評価方法」ともいう。）は、上記本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルに評価対象を含む溶液を灌流する工程（灌流工程）、及び、上記評価対象の上記3次元腫瘍組織モデルに与える影響を評価する工程（評価工程）を含む。

[0107] 灌流工程は、上述の本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルの製造方法における腫瘍血管様構造形成工程と同様の条件で実施することができる。

[0108] 評価対象は、任意のものであってよく、例えば、抗がん剤等の薬剤、リンパ球等の細胞等であってもよい。抗がん剤としては、例えば、ドキソルビシン、セツキシマブ、シスプラチン、リツキシマブ、カルボプラチン、シクロホスファミド、ドセタキセル、タモキシフェン、テガフル、エルロチニブ、アキシチニブ、エトポシド、デキサメタゾン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、パクリタキセル、ドキシル、ベバシズマブ、アフアチニブ、ニボルマブ、5-FU、T細胞エンゲージャー等が挙げられる。T細胞エンゲージャーは、疾患の原因となっている細胞又は病原体に、例えばキラーT細胞のような異物を駆除する役割を持つ免疫細胞を近づけ、疾患の原因を取り除いて治療することを狙った医薬品又は化合物である。リンパ球は、例えば、T細胞であってもよい。また、T細胞は遺伝子改変を行ったものでもよく、例えばキメラ抗原受容体を発現させたCAR-T細胞等が挙げられる。T細胞エンゲージャーは、例えば、EGFR-CD3二重特異性抗体であってもよい。なお、EGFR-CD3二重特異性抗体は、T細胞の抗原であるCD3及びがん細胞(DiFi)の抗原であるEGFRの両方に結合する二重特異性抗体である(Asano, R., et al., Sci Rep 10, 4913 (2020).)。評価対象は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい

- 。
- [0109] 溶液は、本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルを培養するための培地を含んでいてもよい。当該培地としては、上述の腫瘍血管様構造形成工程のとおりである。
- [0110] 評価工程では、例えば評価対象が薬剤である場合、本実施形態に係る3次元腫瘍組織に対する薬剤の薬効を評価してもよく、薬剤の3次元腫瘍組織における分布を評価してもよく、薬剤の3次元腫瘍組織における送達を評価してもよく、薬剤の3次元腫瘍組織における血管に対する影響を評価してもよい。また、評価工程では、例えば評価対象がリンパ球である場合、本実施形態に係る3次元腫瘍組織におけるリンパ球の浸潤を評価してもよい。
- [0111] 評価工程は、例えば、評価対象を本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルに灌流した直後又は灌流する前の3次元腫瘍組織と、評価対象を本実施形態に係る3次元腫瘍組織モデルに所定時間灌流した後の3次元腫瘍組織とを比較することにより実施することができる。具体的な手法としては、例えば後述の実施例に記載の方法（がん細胞数の計測、免疫染色等）等により評価することができる。

実施例

- [0112] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。
- [0113] <実施例1. 単層型の3次元腫瘍組織構築の条件検討(1)>

(1-1. 細胞培養)

実施例1において、各細胞は以下のとおりに培養した。大腸がん細胞(SW620、HT-29、Difi)は、10%のウシ胎児血清、1%の100倍非必須アミノ酸、及び1%の100倍濃度ペニシリンストレプトマイシン溶液を添加したダルベッコ改変イーグル培地(以下FBS-DMEM)によって培養した。HUVECはキットに含まれる成長因子及び1%の100倍濃度ペニシリンストレプトマイシン溶液を添加した内皮細胞培地(Endothelial Growth Medium 2; EGM2、Prom

o cell社) によって培養した。不死化MSCは、10%のウシ胎児血清、1%の100倍濃度非必須アミノ酸溶液及び1%の100倍濃度ペニシリンストレプトマイシン溶液を添加したDMEMによって培養した。CD8陽性T細胞は、T細胞培地 (Stemcell technologies社、ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium) に、IL-2 10ng/mL、及びImmunoCult Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator 25µL/mLを添加した培地で培養した。肺がん細胞 (SBC-3) は、10%のウシ胎児血清及び1%の100倍濃度ペニシリンストレプトマイシン溶液を添加したRPMI-1640で培養した。ただし、T Cell Activatorは解凍後3日間のみ添加し、以降の継代時にはIL-2のみ添加した。全ての細胞は37℃、5%CO₂環境において培養した。

[0114] (1-2. 灌流デバイスの作製)

3Dプリンタ (ProJet MJP 3600 MAX (3D Systems社)) によって、図1に示す灌流デバイス1をアクリル系UV硬化樹脂 (製品名: VisiJet M3 Crystal、3D Systems社) で作製した。灌流デバイスは超音波洗浄機によって洗浄後、70%エタノールによって滅菌した。クリーンベンチ内で乾燥させた後、細胞及びコラーゲンゲルの接着性向上のため、灌流デバイスを5分間の真空プラズマで処理し、10µg/mLのウシ由来フィブロネクチンに浸漬して37℃で2時間コーティング処理を行った。灌流デバイスは管状コネクタ12及び18の貫通孔121及び181に棒状部材17として針を通した後、3次元腫瘍組織の構築に利用するまで、最大で1週間4℃で保管した。

[0115] (1-3. 単層型3次元腫瘍組織の構築及び培養)

図2に示す手順に従い、下記表1に示す条件になるようサンプル1~4の単層型の3次元腫瘍組織を構築した。具体的には、上記1. の条件で培養した大腸がん細胞 (6×10^7 又は 3×10^7 細胞/mL)、HUVEC (3×10^7 細胞/mL)、MSC (0又は 5×10^6 細胞/mL) を採取し、当該

細胞を 3 mg/mL の中性化 I 型コラーゲン溶液に懸濁し、これを灌流デバイスに充填した。中性化 I 型コラーゲン溶液は、高研社 5 mg/mL コラーゲン酸性溶液 I-AC50 をカルシウム及びマグネシウム不含の 10 倍濃度ダルベッコリン酸緩衝液及び表 1 に示すそれぞれの培地を 9 : 1 : 5 の比率で混合して調製した。充填したコラーゲンのゲル化のため 37°C でインキュベートした後、灌流デバイスに設置しておいた針を抜去して貫通流路を形成し、灌流デバイスを培養皿に入った組織培養用培地に浸漬した。組織培養用培地として、FBS-DMEM と EGM2 を等量混合したもの、又は EGM2 を用いた。貫通流路に $100 \mu\text{L}$ の HUVEC 懸濁液 (4×10^6 細胞/mL) をシリンジ及びシリンジポンプを用いて注入した。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、20 分間のインキュベートの後、貫通流路の上面に細胞を接着させるため灌流デバイスを裏返してさらに 20 分間インキュベートした。その後、再び灌流デバイスを元の位置に戻した。80 分経過後、灌流デバイスにチューブ、ペリスタルティックポンプ、バブルトラップを接続して培地循環路を形成し、培地を灌流した。3 次元腫瘍組織の灌流培養は 5 日間実施した。

[0116] [表1]

サンプル番号	培地	懸濁液中の HT-29 の細胞密度	懸濁液中の MSC の細胞密度
1	DMEM/EGM2	60M/mL	-
2	EGM2	60M/mL	-
3	EGM2	60M/mL	5M/mL
4	EGM2	30M/mL	-

[0117] (1-4. 組織学的解析)

灌流培養 5 日後、3 次元腫瘍組織モデルを 4% パラフォルムアルデヒドによって固定し、パラフィンに包埋した。3 次元腫瘍組織モデルは $5 \mu\text{m}$ に薄

切し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色及び血管内皮細胞の蛍光免疫染色又は酵素抗体免疫染色に供した。HE染色については、薄切切片を脱パラフィン及び再水和し、マイヤーのヘマトキシリン及びエオジンYエタノールによって染色した。蛍光免疫染色については、再水和後の薄切切片をpH6のクエン酸緩衝液に浸漬し、オートクレーブ装置により121℃、5分間処理することで抗原賦活化を行った。切片を超純水によって洗浄後、4%ブロッカーで20分間ブロッキングした。次にリン酸緩衝液で希釈した1次抗体で一晩インキュベートした。1次抗体としてヒト抗CD31抗体（BBA7、R&D Systems社、又はab28364、Abcam社）を用いた。切片をPBSで洗浄した後、1次抗体に対応する動物種の2次抗体（Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse又はAlexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit, Thermo Fisher Scientific社）で1時間インキュベートした。さらにヘキストを用いて対比染色を行った。酵素抗体免疫染色については、再水和後の薄切切片をpH6のクエン酸緩衝液に浸漬し、オートクレーブ装置により121℃、5分間処理することで抗原賦活化を行った。切片を3%過酸化水素水に10分間浸漬することで内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、超純水によって洗浄し、ウマ血清で20分間ブロッキングした。次にリン酸緩衝液で希釈した1次抗体で一晩インキュベートした。1次抗体としてヒト抗CD31抗体（BBA7、R&D Systems社、又はab28364、Abcam社）を用いた。切片をPBSで洗浄した後、1次抗体に対応する動物種の2次抗体（ImmPRESS Reagent, VECTOR LABORATORIES社）で1時間インキュベートした。ImmPACT DAB（VECTOR LABORATORIES社）によって発色させた後、ヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。酵素抗体免疫染色の結果を図3に示す。

[0118] 図3に示すとおり、大腸がん細胞の密度を 6×10^7 細胞/mLとして構築した3次元腫瘍組織と 3×10^7 細胞/mLとして構築した3次元腫瘍組織を

比較したところ、細胞密度を 3×10^7 細胞/mL として構築した 3 次元腫瘍組織においてより多くの毛細血管（腫瘍血管様構造）の形成が確認された（図 3（B）及び図 3（D））。MSC が 0 細胞/mL（導入無し）である 3 次元腫瘍組織と 5×10^6 細胞/mL として構築した 3 次元腫瘍組織とで比較したところ、毛細血管の形成において大きな差はなかった（図 3（B）及び図 3（C））。MSC を導入することでがん関連線維芽細胞の影響を評価可能になると考えられるが、以降の検討ではシンプルな系での評価を行うため 3×10^7 細胞/mL の大腸がん細胞及び 3×10^7 細胞/mL の HUVEC を用いて単層型の 3 次元腫瘍組織を構築した。

[0119] 組織培養用培地として、FBS-DMEM と EGM2 を等量混合したものをを用いて構築した 3 次元腫瘍組織と EGM2 を用いて構築した 3 次元腫瘍組織とを比較したところ、FBS-DMEM と EGM2 を等量混合したものをを用いて構築した場合には、がん細胞の維持はできたが毛細血管が形成されなかったが、EGM2 のみを用いて構築した場合にはがん細胞の維持と毛細血管の形成が両立できた（図 3（A）及び図 3（B））。よって以降の検討では、EGM2 を組織培養用培地として用いた。

[0120] また、灌流の流量について、3 次元腫瘍組織の培養期間中 1 mL/時で実施した場合と、最初の 1 日間は 1 mL/時、残りの培養期間は 10 mL/時で実施した場合とを比較した。なお、組織内での灌流は、墨汁と PBS を 2 : 1 で混合したものをシリンジポンプによって注入することにより可視化した。その結果、図 4 に示すとおり、3 次元腫瘍組織の培養期間中 1 mL/時で実施した場合（図 4（A）及び（B））と比較して、最初の 1 日間は 1 mL/時、残りの培養期間は 10 mL/時で灌流した場合（図 4（C）及び（D））において、3 次元腫瘍組織により多くの毛細血管の形成が観察された。腫瘍組織は栄養要求性が高いため、培養 1 日目に 1 mL/時で灌流した後に、1 mL/時よりも大きな流速である 10 mL/時で灌流することが 3 次元腫瘍組織モデルを構築するためにより好ましいと考えられる。よって、以降の検討では最初の 1 日間は 1 mL/時、残りの培養期間は 10 mL/時で

灌流を実施した。

[0121] さらに、上記の培養条件にて、HT-29の他にも、大腸がん細胞であるSW620、又はDif1を用いて同様に3次元腫瘍組織を構築した。そして上記1-4.と同様にして3次元腫瘍組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、1次抗体としてヒト抗CD31抗体を用いて酵素抗体免疫染色を実施した。その結果、図5に示すとおり、どのがん細胞を用いても毛細血管が形成されており、主血管様構造及び毛細血管（腫瘍血管）を持つ3次元腫瘍組織が構築可能であることが示された。

[0122] <実施例2. 3次元腫瘍組織を用いた薬効評価>

上記1-3.で構築した3次元腫瘍組織の灌流培養2日目に、循環させている組織培養用培地を低分子抗がん剤であるドキソルビシン塩酸塩（ドキソルビシン）を0 μ M（添加なし）、1 μ M、又は10 μ Mの終濃度で添加した培地で置換し、灌流培養を継続した。5日目に上記1-4.と同様の方法で組織を固定して、パラフィン包埋切片を作製し、がん細胞の蛍光免疫染色を実施し、蛍光顕微鏡により撮影を行った。蛍光免疫染色も、上記1-4.と同様の方法で1次抗体としてヒト抗CK18抗体（MA5-12104、Thermo fisher Scientific社）を用いてがん細胞を染色した。撮影画像からがん細胞を計数するため、ImageJにより以下のA~Fの画像処理を行った。その結果を図6に示す。

A：CK18、及び核それぞれのチャンネルを「Threshold」により処理し、二値化する。

B：主血管壁から100 μ mの範囲を解析対象（ROI）に設定する。

C：核チャンネルのROIにおいて「Analyze Particle」プラグインを使用して核の領域を抽出してリスト化する。

D：CK18チャンネルに対して「Dilate」を適用し、CK18のシグナルを拡大する。CK18のシグナルは細胞膜に局在しているため、本来、核とは重ならないが、本処理によりシグナルの面積が拡大されるため、次ステップにおいて核との重なりが検出可能となる。

E：Cでリスト化した各々の核領域について、CK18チャンネルの対応領域における輝度値の和を算出する。これにより、各々の核にどの程度CK18のシグナルが重なっているかが算出される。

F：所定閾値以上のCK18シグナルを持つ核をがん細胞として計数する。

[0123] 図6(A)及び(B)に示すとおり、ドキソルビシンの濃度依存的にCK18陽性細胞(がん細胞)数が減少することが確認でき、本発明の3次元腫瘍組織モデルが抗がん剤の試験ツールとして使用可能であることが示された。

[0124] また、ドキソルビシン0 μ M及び1 μ M投与した3次元腫瘍組織において、上記1-4.と同様の方法でパラフィン包埋切片を作製し、一次抗体としてヒト抗CD31抗体を用いて血管内皮細胞を蛍光免疫染色した。これにより、抗がん剤が3次元腫瘍組織において毛細血管の形成に与える影響を評価した。その結果を図7に示す。

[0125] 図7に示すとおり、ドキソルビシン投与によって毛細血管の形成が亢進されることが分かった。ドキソルビシン投与によって毛細血管密度が向上することはこれまでマウスの腫瘍モデルでのみ報告のある現象であり、本発明の3次元腫瘍組織が従来の*in vitro*モデルと比べてより生体に類似していることを示している。

[0126] <実施例3. 3次元腫瘍組織を用いた薬剤分布の計測>

上記1-3.で構築した3次元腫瘍組織の灌流培養2日目に循環させている組織培養用培地をドキソルビシン塩酸塩又はセツキシマブを添加した培地で置換して灌流を継続した。5日目に上記1-4.と同様の方法で組織を固定し、パラフィン包埋及び薄切を行った。ドキソルビシンを投与した3次元腫瘍組織に対しては、核をヘキストで染色した後、顕微鏡による蛍光観察を行った。ドキソルビシンはそれ自身が蛍光を持つため、核染色以外の染色を実施せずに蛍光観察が可能であった。また、セツキシマブを投与した組織に対しては、上記1-4.と同様にしてヒト抗IgG抗体(ab109489、Abcam社)によりセツキシマブを蛍光免疫染色し、顕微鏡による蛍光

観察を行った。その結果を図8に示す。

[0127] 図8に示すとおり、このような適切な染色を行うことで、抗がん剤の3次元腫瘍組織中での分布が計測可能であることが示された。

[0128] <実施例4. T細胞と3次元腫瘍組織の共培養のための条件検討>

T細胞を3次元腫瘍組織に灌流するにあたって諸条件の検討実験を実施した。まず、使用するT細胞とH U V E Cは別個のドナーに由来するため、ヒト白血球抗原のミスマッチによる拒絶反応が懸念された。そこで、培養皿で培養されたH U V E Cに対し、T細胞を懸濁した培地を投与し、上記1-1.の条件下で3日間、H U V E CとT細胞が共存する環境で培養を行った。その後、P B Sにより洗浄してT細胞を除去し、T細胞非投与群とH U V E Cの細胞数を比較した。その結果を図9~10に示す。

[0129] 図9~10に示すとおり、T細胞の投与の有無でH U V E Cの細胞数に有意な差はなく、T細胞のH U V E Cに対する拒絶反応はないか、無視できる程度であることが分かった。

[0130] また、T細胞を3次元腫瘍組織に灌流する際に使用する培地条件についても検討を実施した。より具体的には、T細胞培地、E G M 2、及び両培地の等量混合培地を用いて上記1-1.の条件下で3日間H U V E C又はT細胞を培養した。その結果を図11~12に示す。

[0131] 図11に示すとおり、T細胞培地においてはH U V E Cの培養面に孔が形成された(図11(A)矢尻)。一方、E G M 2及び等量混合培地においてはH U V E Cの培養面は維持され、T細胞培地において見られたような孔は観察されなかった(図11(B)及び(C))。また、図12に示すとおり、T細胞をT細胞培地、E G M 2、及び両培地の等量混合培地で3日間培養したところ、T細胞培地では細胞数がほぼ維持されたが、等量混合培地で約1/2に減少し、E G M 2で約1/4に減少した。以上の結果から、H U V E Cによって形成される組織中の血管を維持しつつ、T細胞を灌流するための培地として等量混合培地を用いることとした。

[0132] <実施例5. 3次元腫瘍組織へのT細胞の灌流>

上記1-3. で構築した3次元腫瘍組織の灌流培養3日目に、それまで3次元腫瘍組織培養のため循環させていた培地であるEGM2を、T細胞を 1×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁したT細胞培地及びEGM2の等量混合培地で置換した。この後、引き続き灌流を継続した。灌流培養5日目に、上記1-4. と同様の方法で組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、蛍光免疫染色を実施した。蛍光免疫染色では、一次抗体としてヒト抗CD31、ヒトCD3抗体（SP7、Abcam）、ヒト抗CK18抗体を用いて、それぞれHUVEC、T細胞、がん細胞（Difi）を染色した。また、核はヘキストで染色した。その結果を図13に示す。なお、図14に示すとおり、組織固定前に観察したところ、T細胞の灌流の有無によって3次元腫瘍組織の外観に大きな違いはなかった。

[0133] 図13に示すとおり、毛細血管の付近にT細胞が存在している様子（図13（A））や、がん細胞の間にT細胞が存在している様子（図13（B））等が観察された。このことから、本発明の3次元腫瘍組織モデルを用いて腫瘍へのT細胞の灌流及び浸潤を模擬し、観察・評価することが可能であることが示唆された。

[0134] 一方、このように単にT細胞を培地に懸濁して灌流した場合、培養皿やバブルトラップの底にT細胞が沈降し、投入したT細胞のうち少数しか組織内に灌流されなかった。そこで、より効率的にT細胞を灌流するために、ポンプ、培養皿、バブルトラップ、灌流デバイス、シリコンチューブからなる培養システムをシェーカーに搭載し、30rpmの回転速度で揺動しながら灌流培養を行った。その後同様に一次抗体としてヒト抗CD31、ヒトCD3抗体、ヒト抗CK18抗体を用いて、それぞれHUVEC、T細胞、がん細胞（Difi）を蛍光免疫染色した。その結果を図15に示す。

[0135] 図15に示すとおり、揺動しない場合と比較して揺動しながら灌流培養を行うことで、より多くのT細胞が3次元腫瘍組織に存在していることが確認でき、3次元腫瘍組織に灌流されるT細胞の割合を改善することができることが示された。

[0136] <実施例 6. 二層型の 3 次元腫瘍組織構築及び培養>

より生体の腫瘍組織に近い構造を持つ 3 次元腫瘍組織を得るため、二層型の 3 次元腫瘍組織の構築を図 1 6 の手順のとおりに行った。より具体的には、 3×10^7 細胞/mL の H U V E C を懸濁したハイドロゲル溶液を灌流デバイス 1 に充填し、当該ゲル溶液のゲル化のため 37°C でインキュベートして血管層を形成した。なお、ハイドロゲルとして 2 mg/mL の I 型コラーゲンと 2.5 mg/mL のフィブリンを混合したものを用いた（いずれも混合後の濃度）。血管層の形成後、 3×10^7 細胞/mL の肺がん細胞 S B C - 3 を懸濁した 2 mg/mL の I 型コラーゲンを血管層 2 4 の上に充填し、当該コラーゲンのゲル化のため 37°C でインキュベートして腫瘍層 2 5 を形成した。なお、S B C - 3 として、血管内皮細胞増殖因子 V E G F を強制発現させた株と、非強制発現の株 (m o c k) を用いた。この後、あらかじめ包埋しておいた針を抜去して貫通流路 3 1 を形成し、デバイスを組織培養用培地に浸漬した。組織培養用培地として E G M 2 を用いた。貫通流路 3 1 に $100 \mu\text{L}$ の H U V E C 懸濁液 (4×10^6 細胞/mL) をシリンジ及びシリンジポンプを用いて注入した。20 分間のインキュベートの後、流路の上面に細胞を接着させるためデバイスを裏返してさらに 20 分間インキュベートした。その後、再び灌流デバイス 1 を元の位置に戻し、80 分経過後、ペリスタルティックポンプを用いて培地を灌流した。灌流培養は 5 日間実施した。上記 1 - 4. と同様の方法で組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、H E 染色及び蛍光免疫染色に供した。蛍光免疫染色は、1 次抗体としてヒト抗 C D 3 1 抗体を用いて H U V E C を染色した。その結果を図 1 7 に示す。

[0137] 図 1 7 に示すとおり、H E 染色により血管層と腫瘍層の二層が形成されたことが確認できた。また、蛍光免疫染色により、m o c k 株を使用した組織と比較して V E G F 強制発現株を使用した組織の方が、腫瘍層と主血管との間により多くの毛細血管の形成が観察され、さらに、がん細胞の増殖及び毛細血管中への侵入も観察された。この結果は、本発明の 3 次元腫瘍組織においてはがん細胞の V E G F 発現量等、血管形成能の違いが当該 3 次元腫瘍組

織の形態に現れることを示しており、がん治療において用いられる抗VEGF薬の評価等に利用できることが示唆された。

[0138] <実施例7. 3次元腫瘍組織を用いたT細胞エンゲージャーの薬効評価>

上記1-3. で構築した3次元腫瘍組織の灌流培養3日目に、それまで3次元腫瘍組織培養のため循環させていた培地であるEGM2を、T細胞を 1×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁し、さらに終濃度 100 ng/mL のEGFR-CD3二重特異性抗体（以下、単に「EGFR-CD3抗体」ともいう。）を添加したT細胞培地及びEGM2の等量混合培地で置換した。この後、引き続き灌流を継続した。灌流培養5日目に、上記1-4. と同様の方法で組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、蛍光免疫染色を実施した。蛍光免疫染色では、一次抗体としてヒト抗CK18抗体を用いて、それぞれがん細胞(DiFi)を染色した。また、核はヘキストで染色した。その結果を図18及び図19に示す。

[0139] 図18及び図19に示すとおり、EGFR-CD3抗体添加条件において、非添加条件と比べてCK18陽性細胞(DiFi)の密度が減少した。この結果は、EGFR-CD3抗体が灌流液から組織中に浸潤したT細胞とDiFiとの結合を促進し、T細胞によるDiFiの殺傷を引き起こしたことによるものと推測される。このことから、本発明の3次元腫瘍組織を用いることで、二重特異性抗体の薬効を評価可能であることが示唆された。

[0140] <実施例8. 単層型の3次元腫瘍組織構築の条件検討(2)>

(8-1. 灌流デバイスの作製)

3Dプリンタ(ProJet MJP 3600 MAX(3D Systems社))によって図20~21に示す灌流デバイスの本体部11aをアクリル系光硬化性樹脂(製品名:VisiJet M3 Crystal、3D Systems社)で作成した。3Dプリンタ(Form3、Formlabs社)によって図20~21に示す上蓋81をアクリル系光硬化性樹脂(製品名:クリアレジン、Formlabs社)で作成した。鋳型を作製し、鋳型にシリコーン(PDMS)を流し込み、硬化させることでシー

ル部材 9 1 (パッキン) を作製した。そして、上記灌流デバイスの本体部 1 1 a、上蓋 8 1、及びシール部材 9 1 を備える図 2 0 ~ 2 1 に示す灌流デバイス 1 a を作製した。その後、上記 1 - 2. と同様の処理を行い、最大で 1 週間 4 °C で保存した。

[0141] (8 - 2. 単層型の 3 次元腫瘍組織の構築、培養及び組織学的解析)

上記 8 - 1. で作製した灌流デバイス本体部 1 1 a を用いて 3 次元腫瘍組織の構築し、灌流デバイス本体部 1 1 a に上蓋 8 1 及びシール部材 9 1 を装着して組織の培養空間 (チャンバー) を密閉したこと以外は実施例 5 と同様にして、3 次元腫瘍組織の構築と培養を行った。また、実施例 5 と同様の方法で組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、蛍光免疫染色を実施した。その結果を図 2 3 に示す。なお、図 2 2 に示すとおり、組織の固定前に灌流デバイス本体部 1 1 a から上蓋 8 1 及びシール部材 9 1 を取り外して 3 次元腫瘍組織を観察したところ、3 次元腫瘍組織の外観は灌流デバイス 1 で構築した場合と大きな差異はなかった。

[0142] 図 2 3 に示すとおり、上記 8 - 1. で作製した灌流デバイス 1 a を用いた場合でも、主血管様構造が形成されている様子 (図 2 3 (B))、及び毛細血管の付近に T 細胞が存在している様子 (図 2 3 (C)、(D)) 等が観察された。また、3 次元腫瘍組織の培養空間を密閉することで、例えば主血管様構造又は 3 次元腫瘍組織自体の構造を、より安定に保ちながら灌流及び当該組織に与える評価対象の影響を評価できることが示された。これは、培養空間を密閉することで、主血管様構造への灌流で生じる内圧による組織の変形を抑制できることが一つの要因であると考えられる。

[0143] <実施例 9. 単層型の 3 次元腫瘍組織構築の条件検討 (3) >

灌流デバイス本体部 1 1 a を作製してこれを灌流デバイスとして用いたこと、灌流培養をする前に灌流デバイスにおける 3 次元腫瘍組織の培養空間 (チャンバー) 内にフィブリン糊を注入し、3 次元腫瘍組織を被覆するフィブリンゲル層を形成したこと以外は実施例 5 と同様にして、3 次元腫瘍組織の構築と培養を行った。

- [0144] フィブリンゲル層の形成は以下の手順で行った。フィブリン糊としてボルヒール（登録商標）（KMバイオロジクス社）を用いた。まずフィブリノゲンを主成分とするA液30 μ Lを灌流デバイスのチャンバー（組織の周囲）に注入し、組織となじませるためによく攪拌した。次に、トロンビンを主成分とするB液30 μ Lを灌流デバイスのチャンバー（組織の周囲）に注入し、注入済みのA液とよく混合したのち、加温することで組織を被覆するフィブリンゲル層を形成した。その際、B液とA液を混合した直後の溶液において、フィブリンの前駆体であるフィブリノゲンの濃度は80mg/mLであった。
- [0145] その後、実施例5と同様の方法で組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、蛍光免疫染色を実施した。上記1-4.と同様の方法で組織を固定してパラフィン包埋切片を作製し、HE染色を実施した。結果を図25~26に示す。なお、図24に示すとおり、組織の固定前に3次元腫瘍組織を観察したところ、3次元腫瘍組織の外観はフィブリンゲル層が形成されている以外には、他の実施例で構築した単層型の3次元腫瘍組織と大きな差異はなかった。
- [0146] 図25に示すとおり、3次元腫瘍組織の周囲にフィブリン糊を注入したことにより、3次元腫瘍組織がフィブリンゲルに被覆されており、フィブリンゲルの被覆層が形成されていた。また、図26に示すとおり、3次元腫瘍組織の周囲にフィブリンゲルの被覆層を形成した場合でも、主血管様構造が形成されている様子（図26（B））、及び毛細血管の付近にT細胞が存在している様子（図26（C）、（D））等が観察された。また、実施例8と同様に、例えば主血管様構造又は3次元腫瘍組織自体の構造を、より安定に保ちながら灌流及び当該組織に与える評価対象の影響を評価できることが示された。フィブリンゲルの被覆層が、実施例8にて用いた上蓋81及びシール部材91と同様の役割を果たしたためだと考えられる。
- [0147] また、実施例9にて構築した3次元腫瘍組織を、実施例7と同様の手順でEGFR-CD3抗体及びT細胞を培地に添加して灌流培養した。その結果

、図27に示すようにT細胞の浸潤、及び図18に示すEGFR-CD3抗体添加条件と同程度のがん細胞密度が観察された。このようにフィブリンゲル層で組織を被覆した場合でも、当該組織を用いてT細胞エンゲージャーの評価試験が可能であることが示された。

符号の説明

[0148] 1, 1a…灌流デバイス、11, 11a…灌流デバイス本体部、12, 18…管状コネクタ、13…チャンバー、14…アンカー構造部、15…底蓋、16…溝部、17…棒状部材、19…突出部、21…細胞外マトリックス溶液、22…第1の血管系細胞、23…がん細胞、24…血管層、25…腫瘍層、26…細胞外マトリックスゲル、31…貫通流路、32…内壁部、41…血管系細胞用培地を含む培地、51…第2の血管系細胞、52…主血管様構造、61…3次元腫瘍組織モデル、62…腫瘍血管様構造、71…灌流方向、121, 181…貫通孔、81…上蓋、91…シール部材、811…蓋部、812…脚部、813…爪部、814…本体凹部、911…凹部。

請求の範囲

- [請求項1] 主血管様構造及び前記主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、血管系細胞、がん細胞、及び細胞外マトリックスを含む、3次元腫瘍組織モデル。
- [請求項2] 血管層及び前記血管層に接する腫瘍層を備え、
前記血管層が主血管様構造及び前記主血管様構造に接続された腫瘍血管様構造を有し、かつ血管系細胞及び細胞外マトリックスを含み、
前記腫瘍層ががん細胞及び細胞外マトリックスを含む、請求項1に記載の3次元腫瘍組織モデル。
- [請求項3] 更に間質細胞を含む、請求項1に記載の3次元腫瘍組織モデル。
- [請求項4] 前記間質細胞が、リンパ球を含む、請求項3に記載の3次元腫瘍組織モデル。
- [請求項5] 前記リンパ球がT細胞である、請求項4に記載の3次元腫瘍組織モデル。
- [請求項6] 請求項1に記載の3次元腫瘍組織モデルの製造方法であって、
前記主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞及びがん細胞を含む細胞外マトリックスゲルを形成する工程と、
前記貫通流路の内壁に第2の血管系細胞を播種することにより、前記主血管様構造を形成する工程と、
前記主血管様構造に培地を灌流して前記腫瘍血管様構造を形成する工程と
を備える、製造方法。
- [請求項7] 請求項2に記載の3次元腫瘍組織モデルの製造方法であって、
前記主血管様構造を形成するための貫通流路を有し、第1の血管系細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる血管層を形成する工程と、
、
前記血管層の前記貫通流路側と反対側の表面の少なくとも一部に接するように、がん細胞を含む細胞外マトリックスゲルからなる腫瘍層

を形成する工程と、

前記貫通流路の内壁に第2の血管系細胞を播種することにより、前記主血管様構造を形成する工程と、

前記主血管様構造に培地を灌流して前記腫瘍血管様構造を形成する工程と

を備える、製造方法。

[請求項8] 前記培地が、前記培地全量に対して50質量%以上の血管系細胞用培地を含む、請求項6又は7に記載の製造方法。

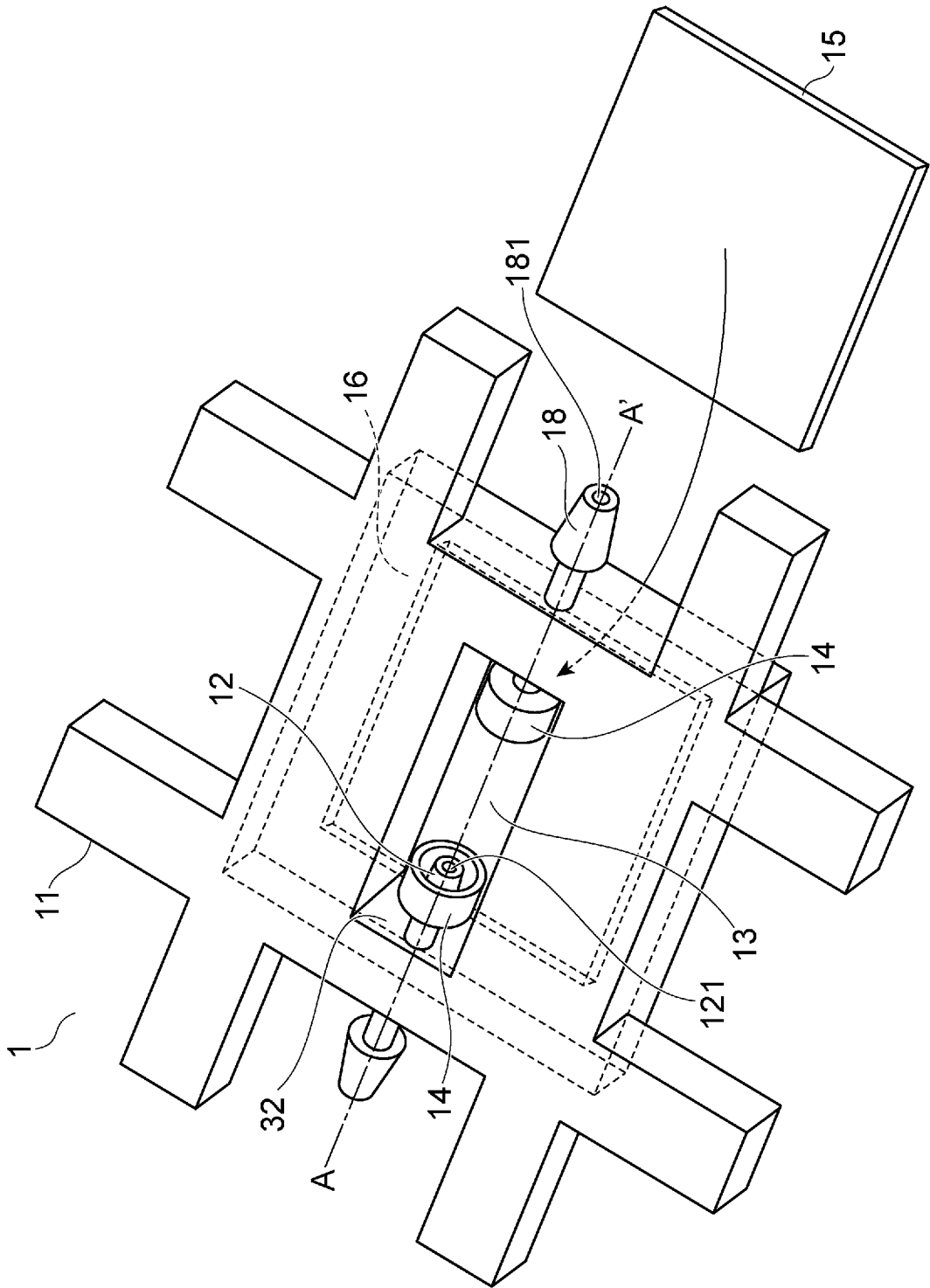
[請求項9] 前記灌流の流速が、0.5 mL/時以上20 mL/時以下である、請求項6又は7に記載の製造方法。

[請求項10] 請求項1～5のいずれか一項に記載の3次元腫瘍組織モデルに、評価対象を含む溶液を灌流する工程、及び、前記評価対象の前記3次元腫瘍組織モデルに与える影響を評価する工程を備える、評価対象の腫瘍組織に与える影響の評価方法。

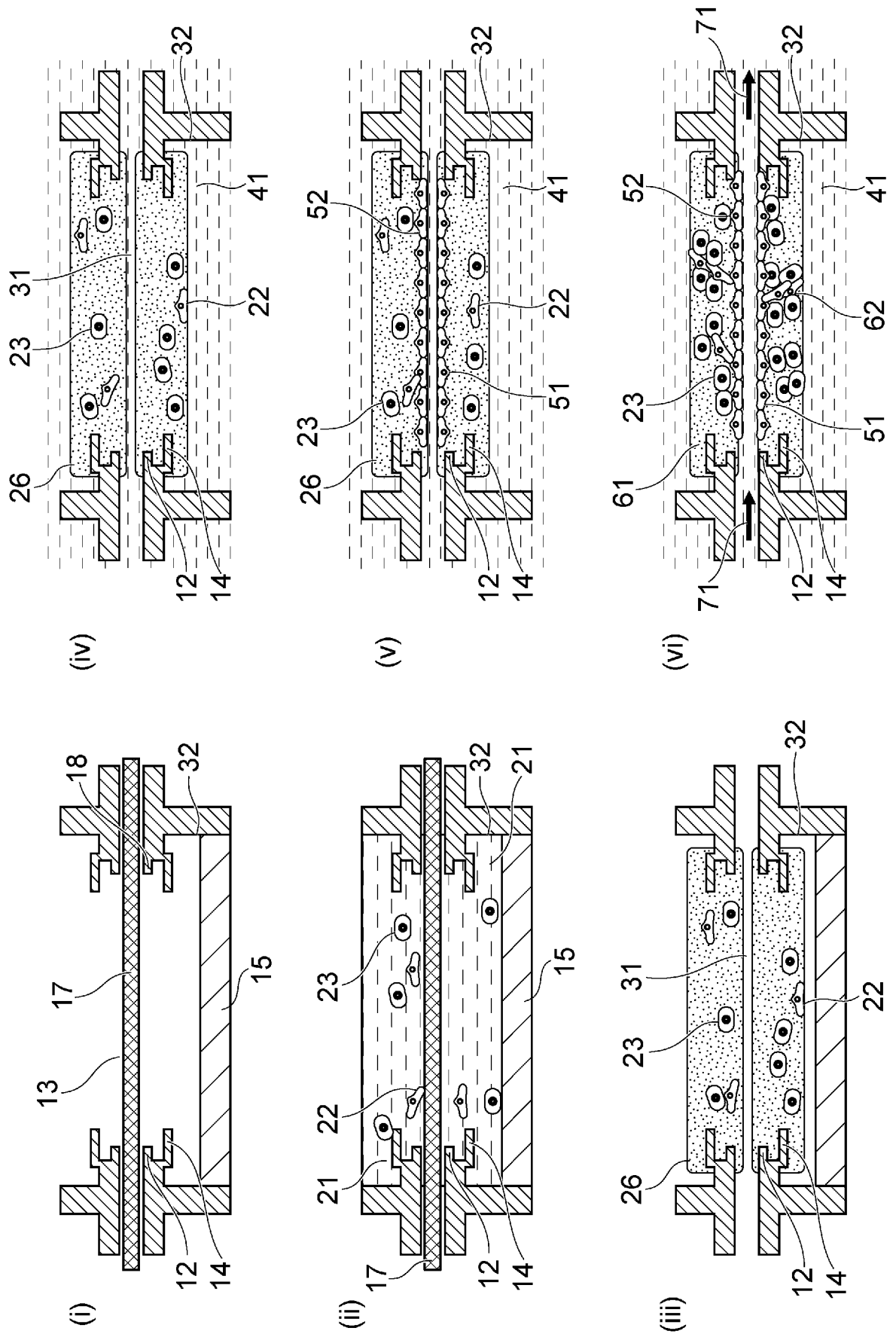
[請求項11] 前記評価対象が、リンパ球を含む、請求項10に記載の評価方法。

[請求項12] 前記リンパ球が、T細胞である、請求項11に記載の評価方法。

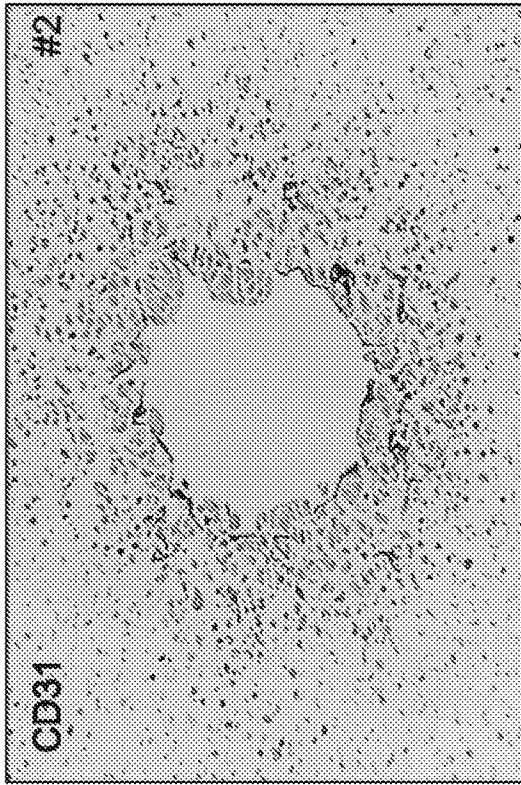
[図1]



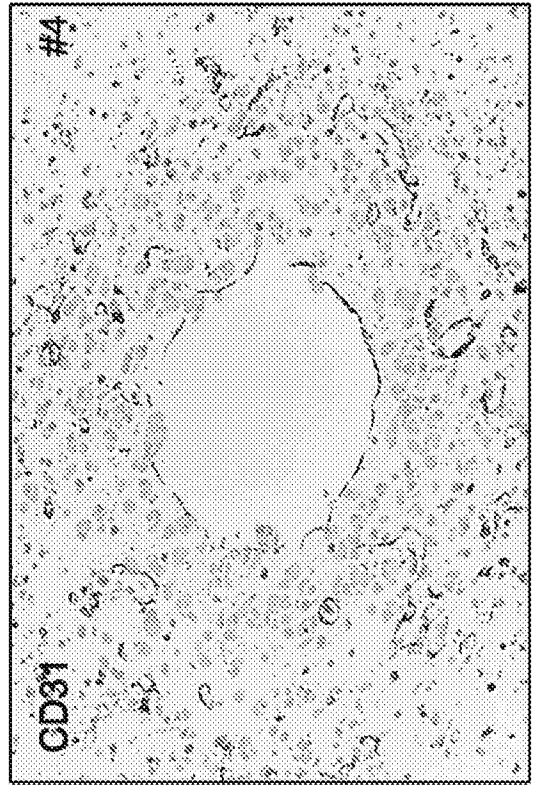
[図2]



[図3]



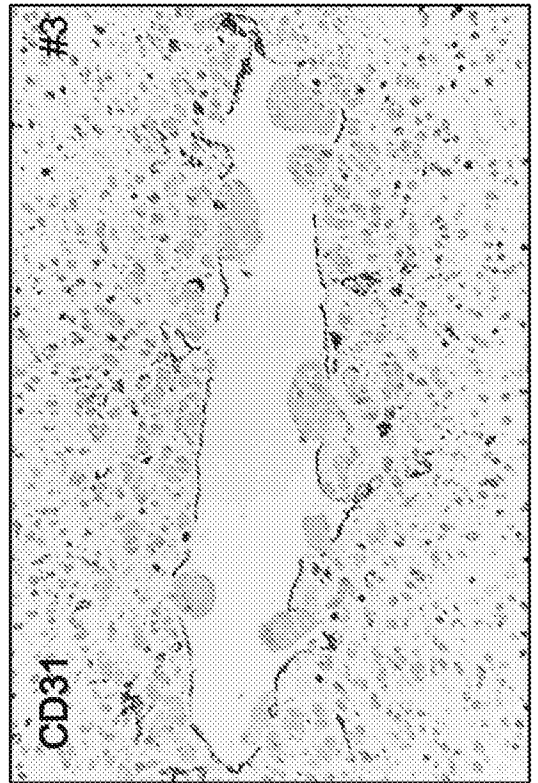
(B)



(D)

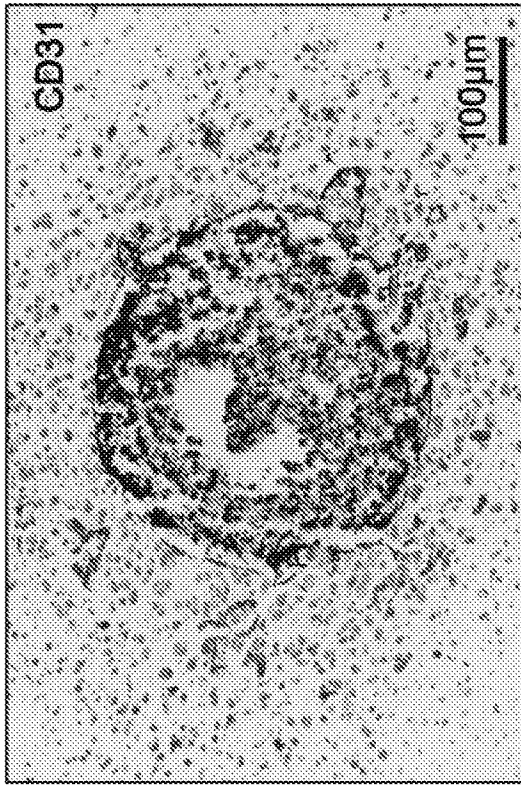


(A)

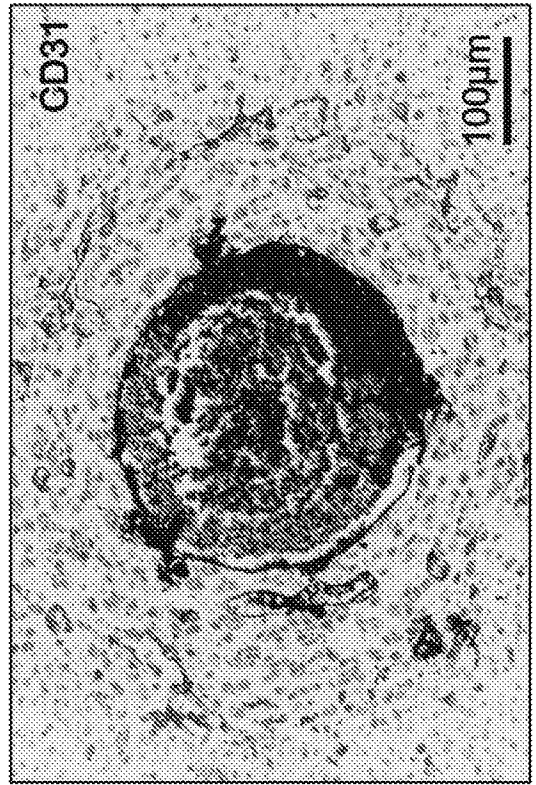


(C)

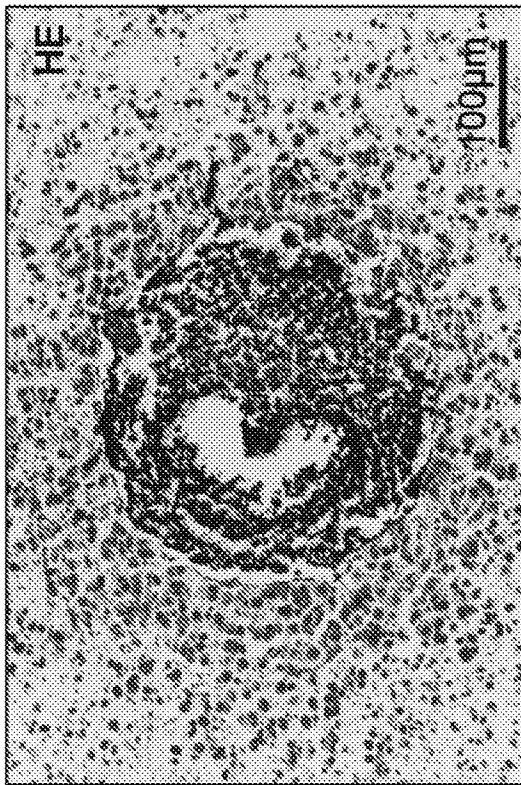
[図4]



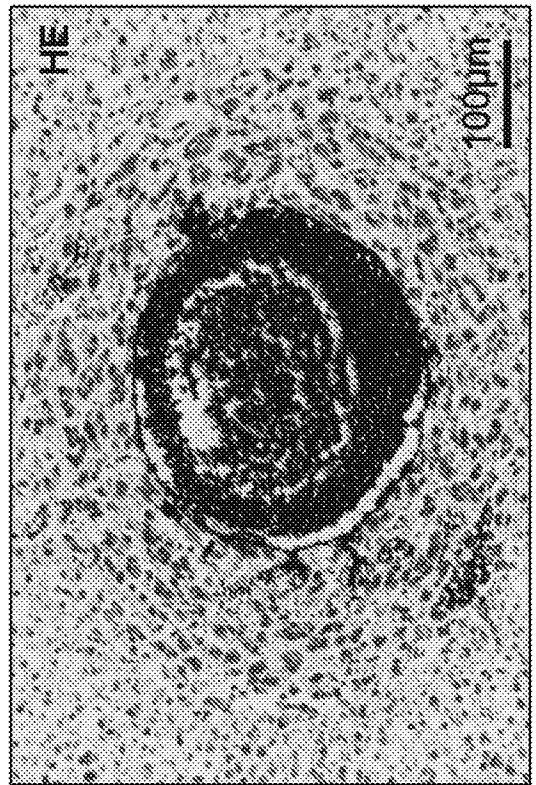
(B)



(D)

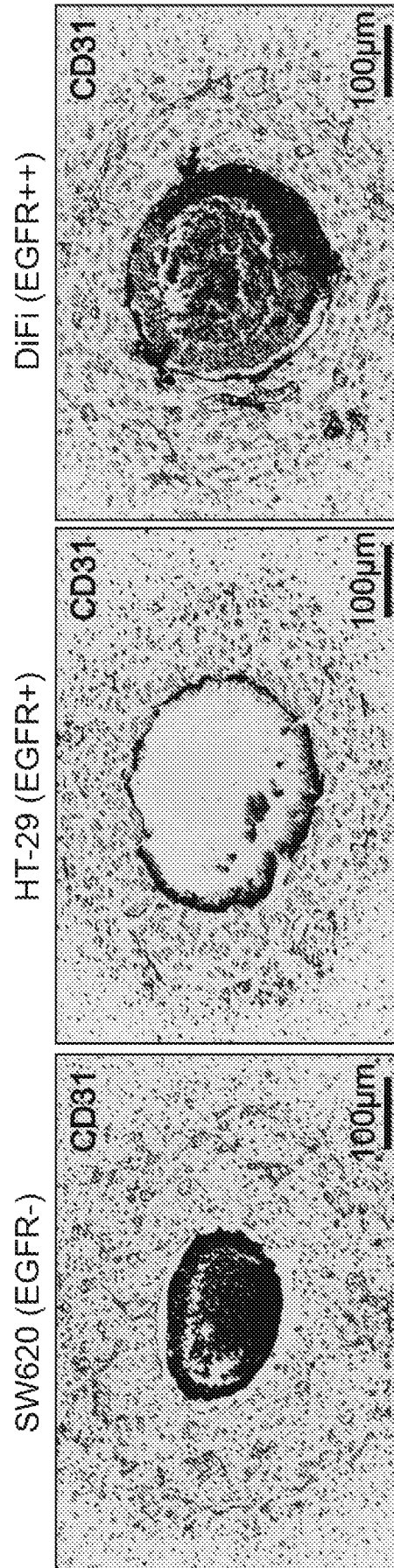


(A)

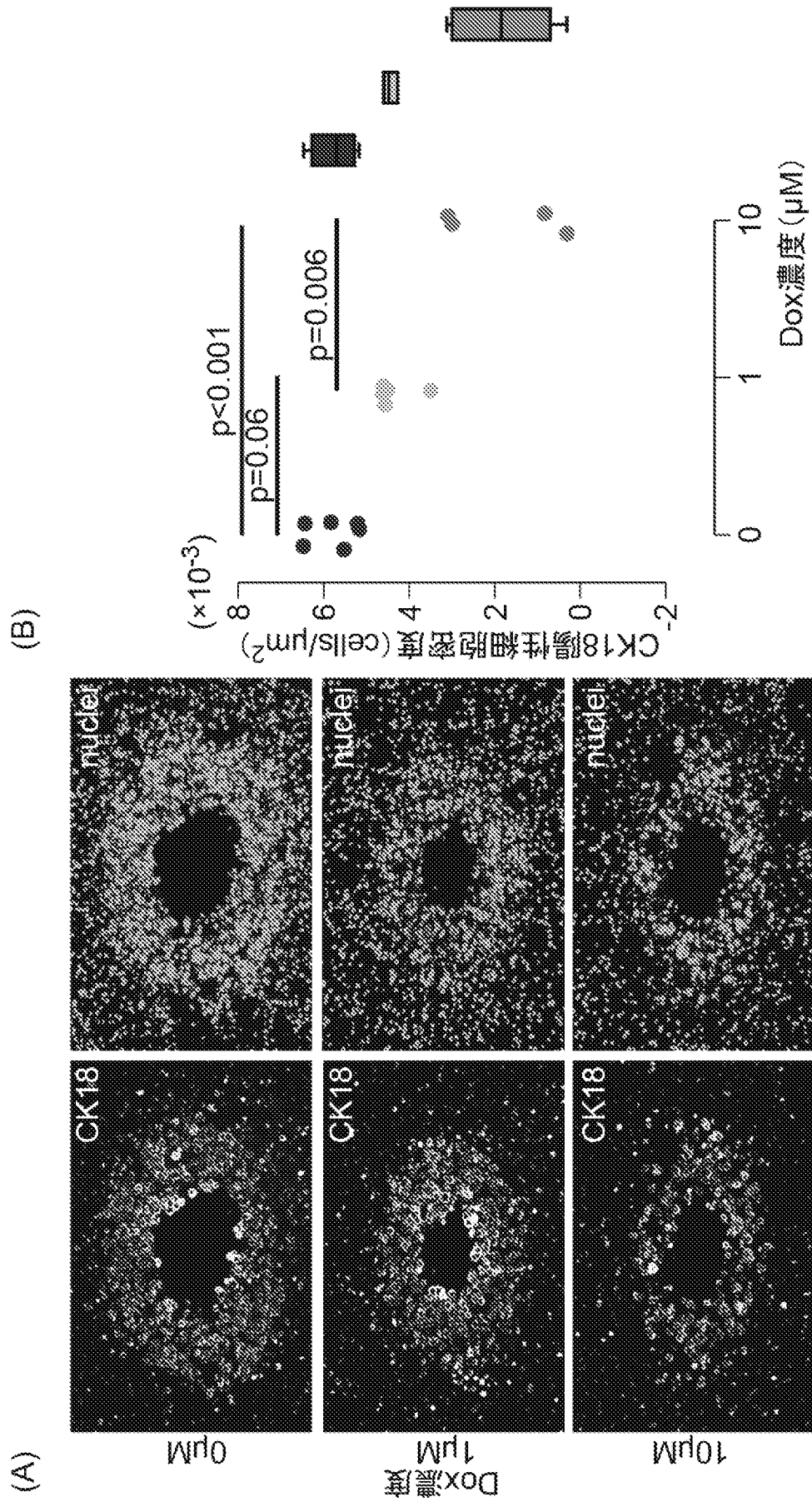


(C)

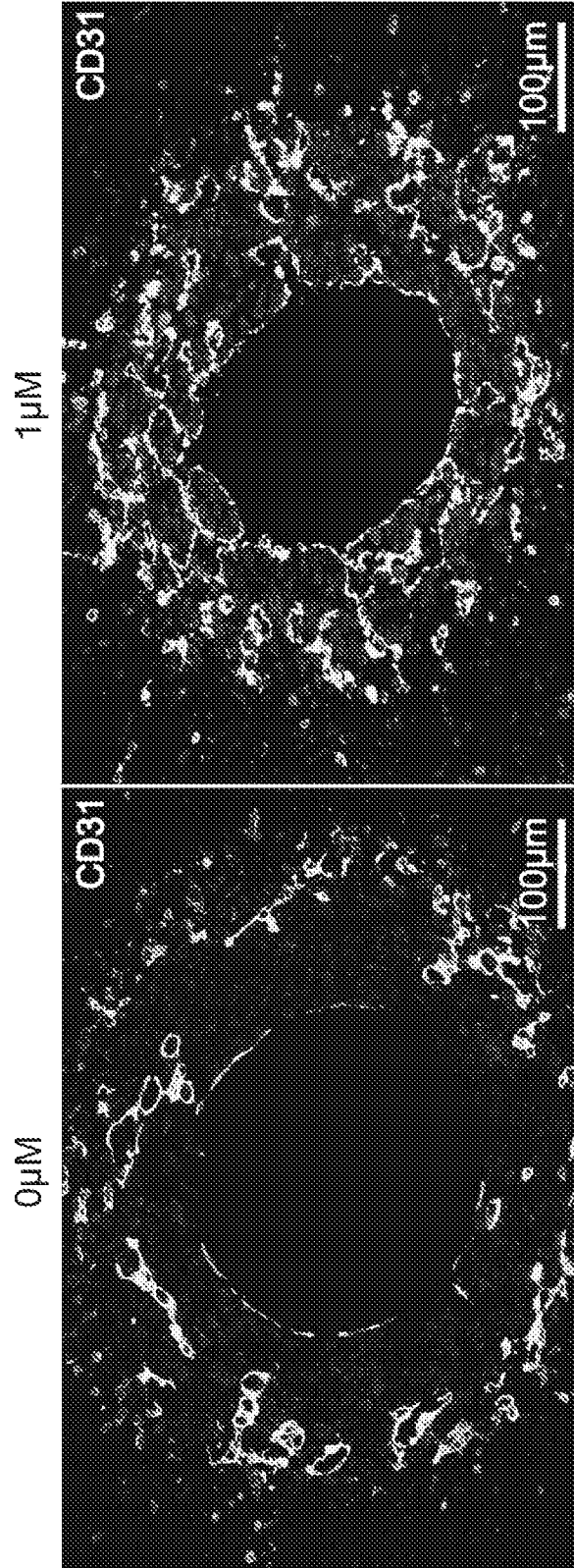
[5]



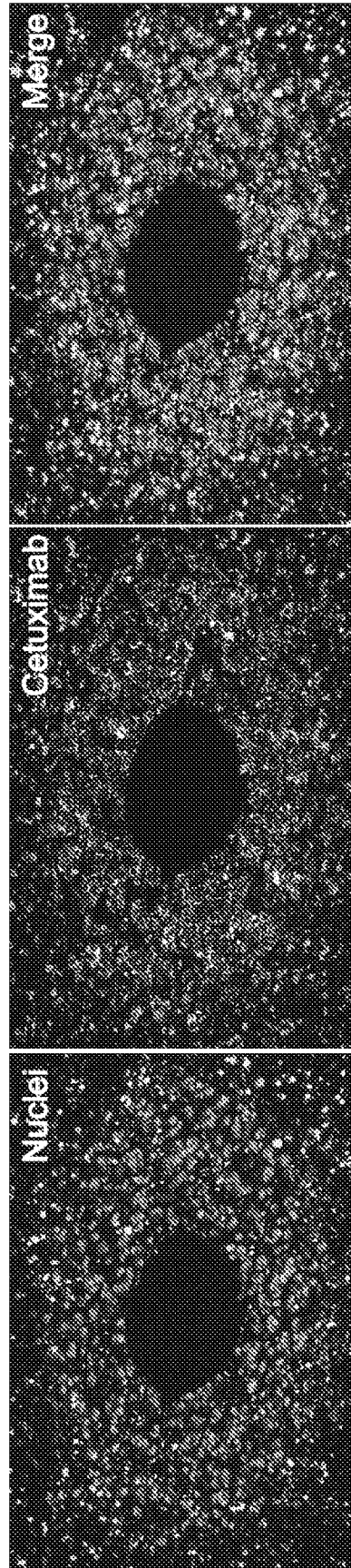
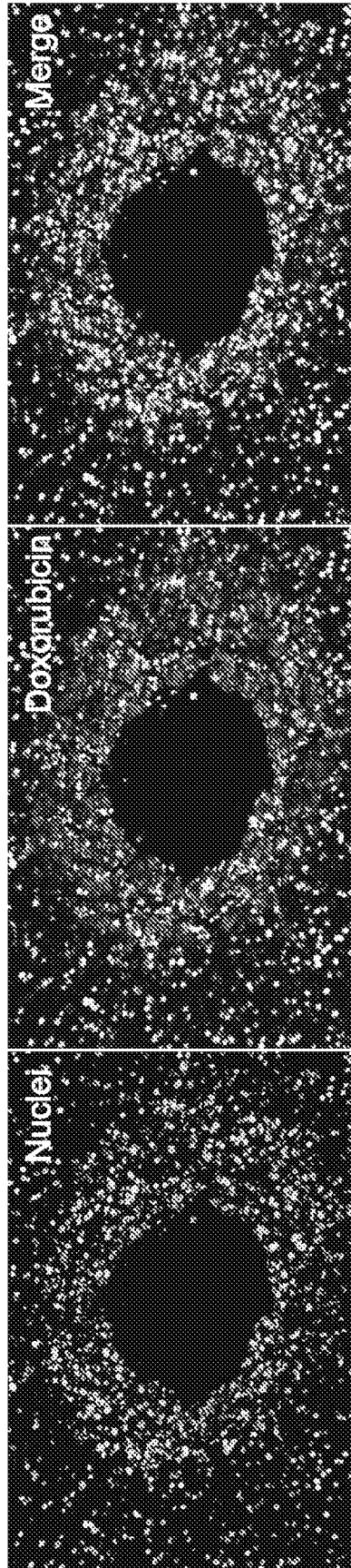
[図6]



[図7]

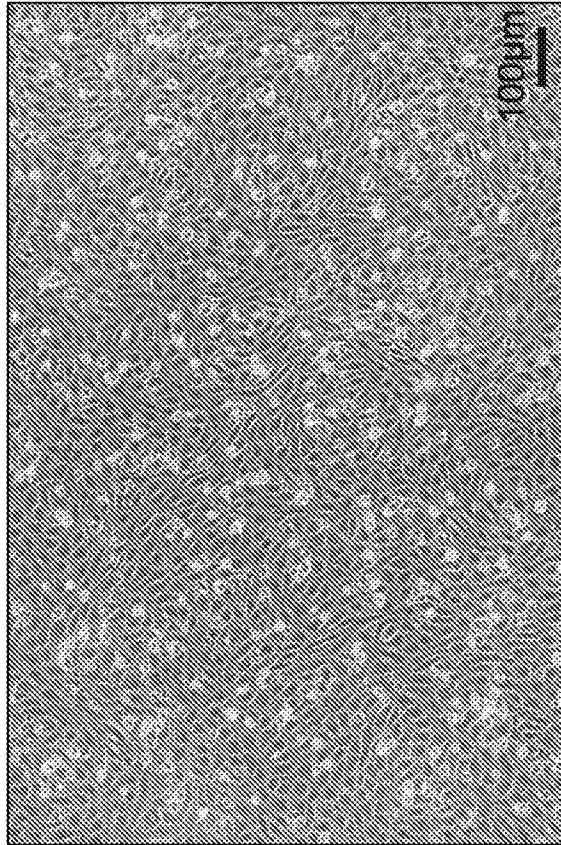


[図8]

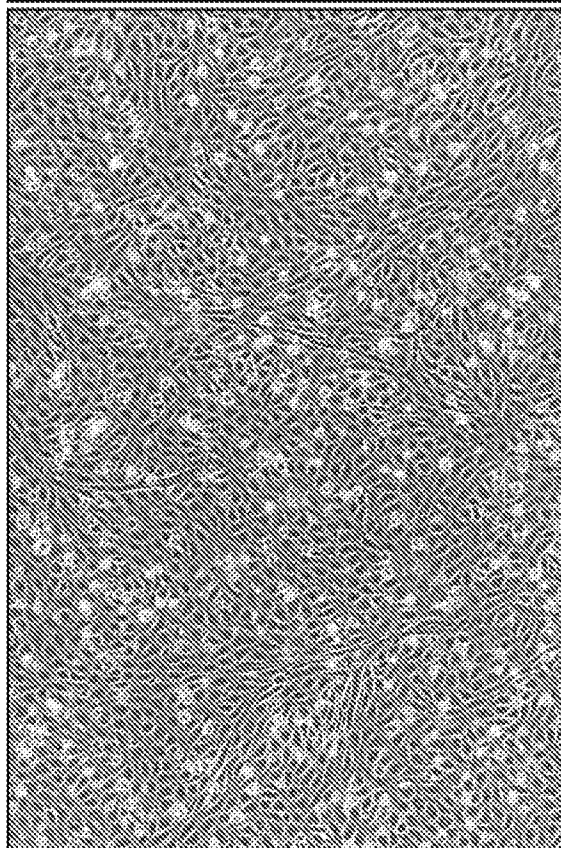


[図9]

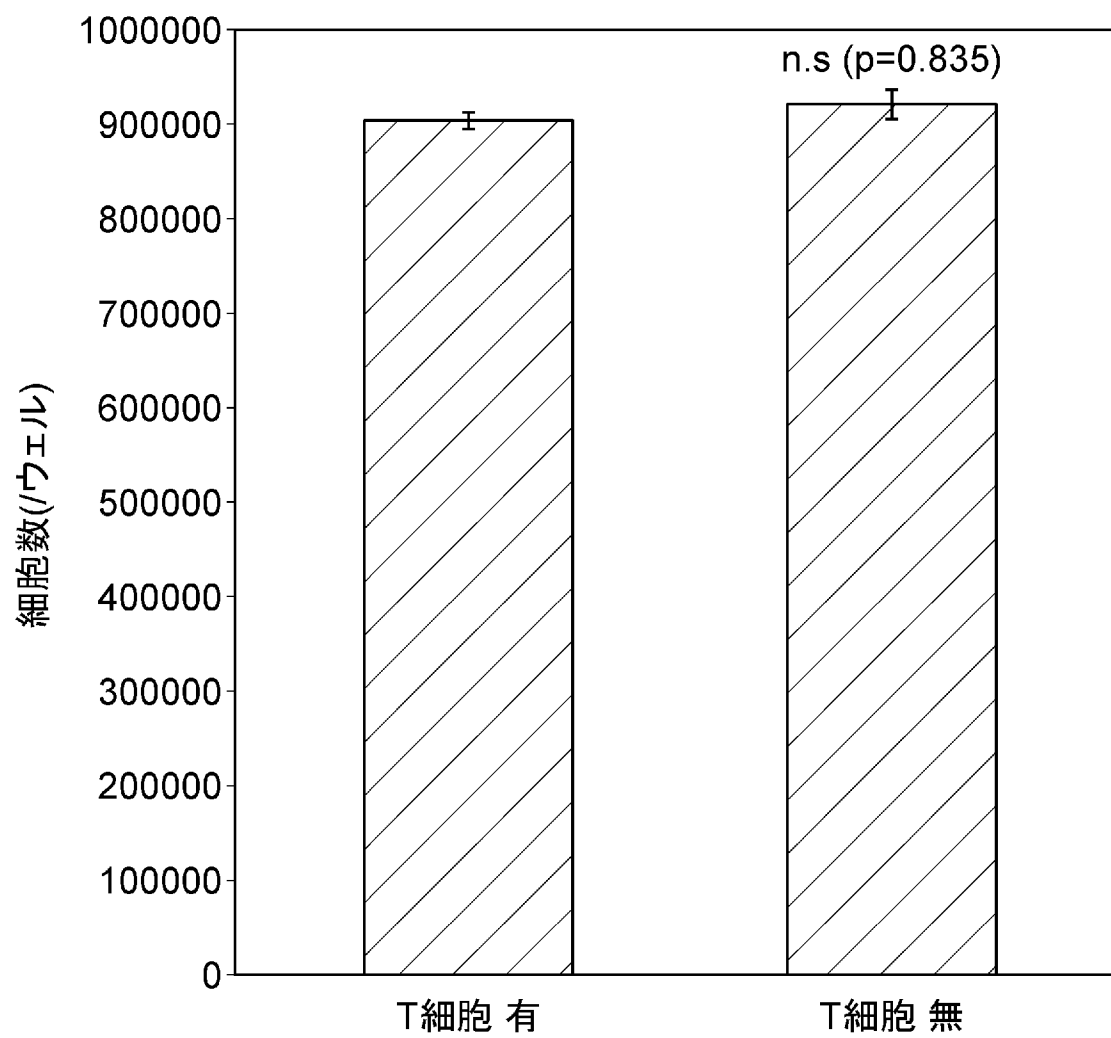
T細胞 無



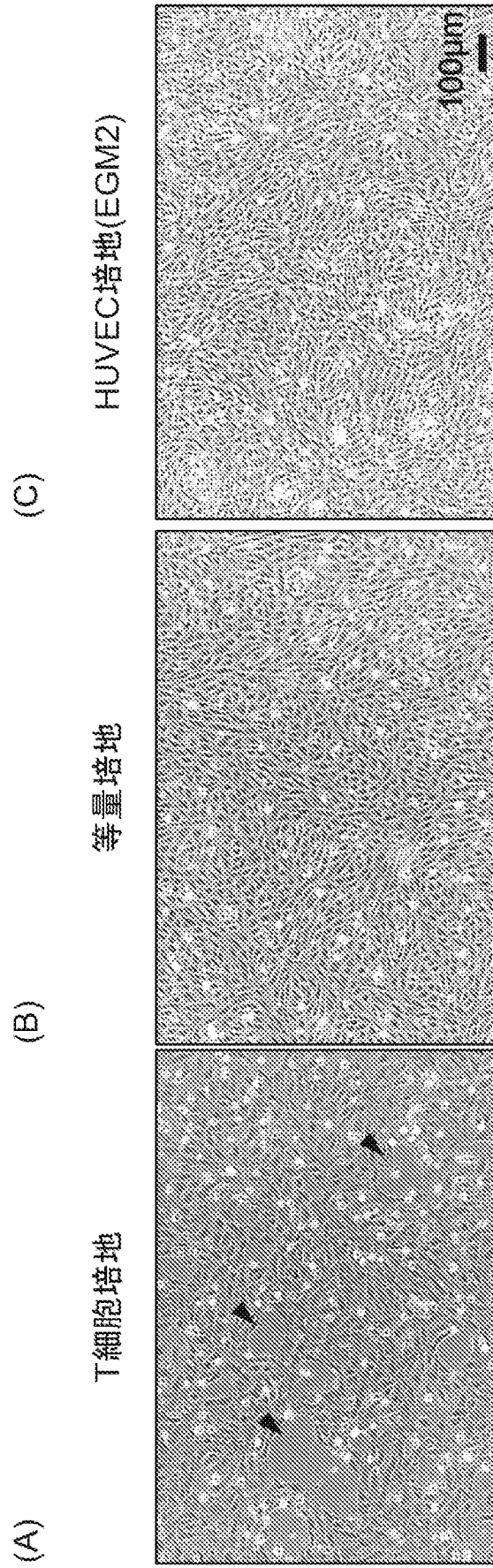
T細胞 有



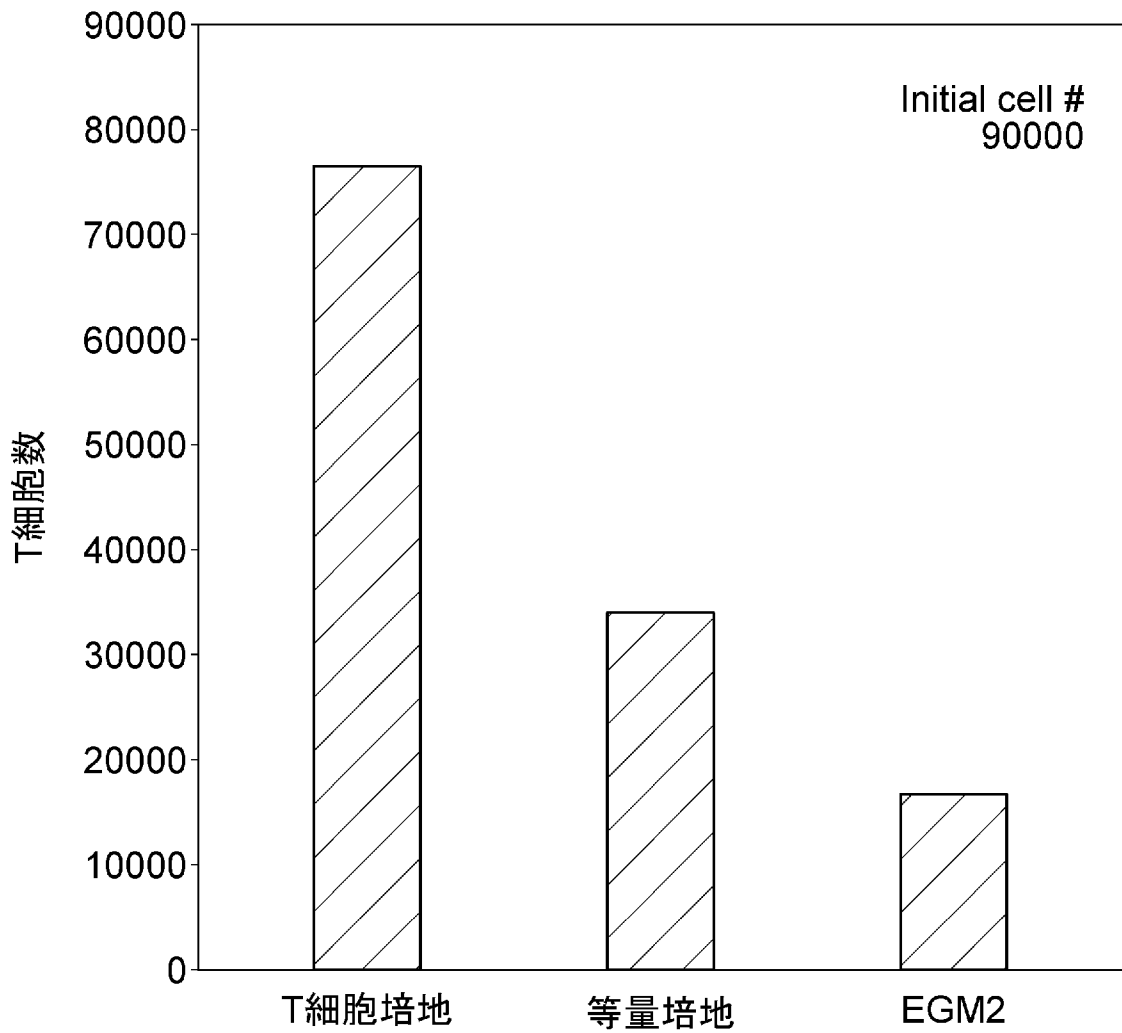
[図10]



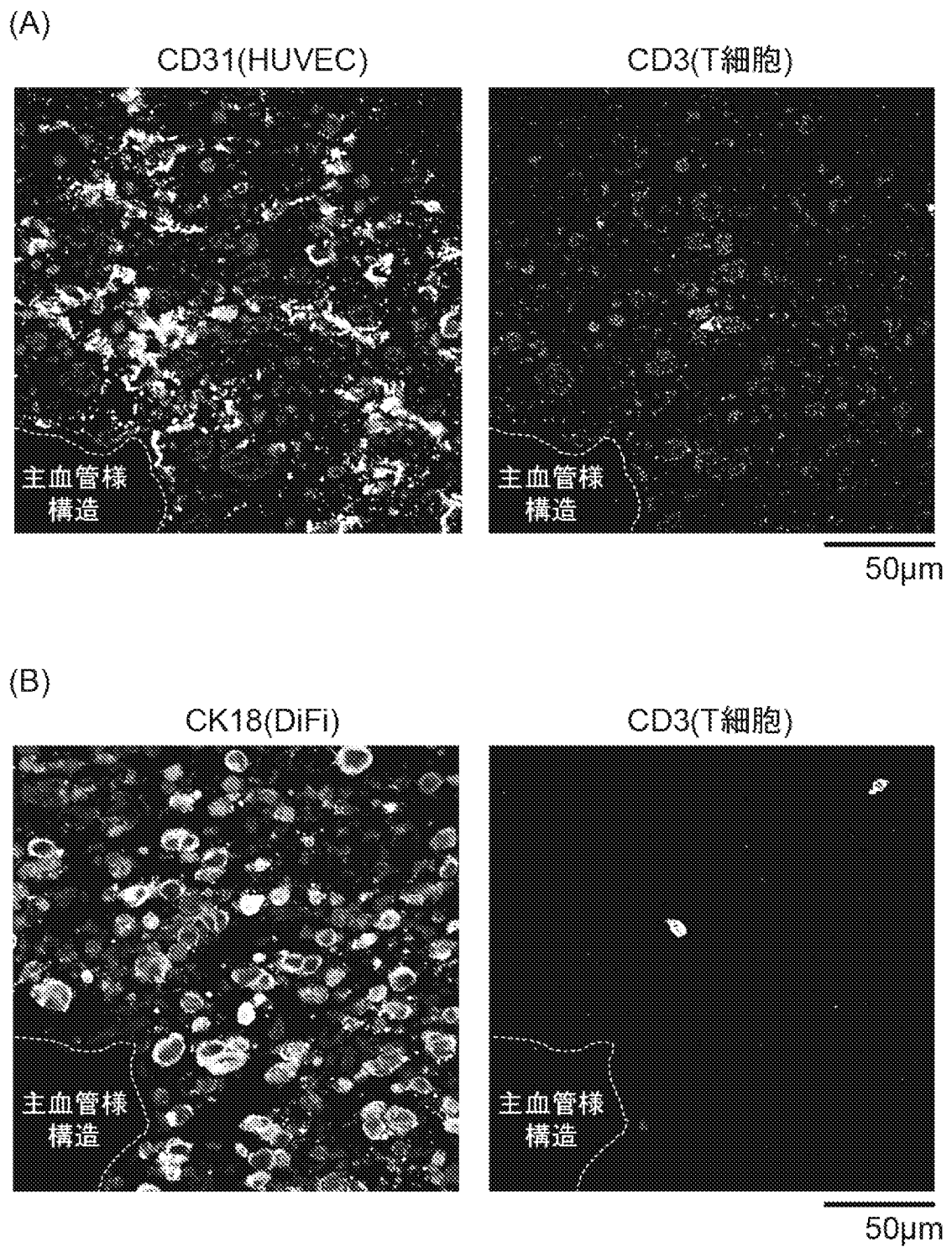
[図11]



[図12]

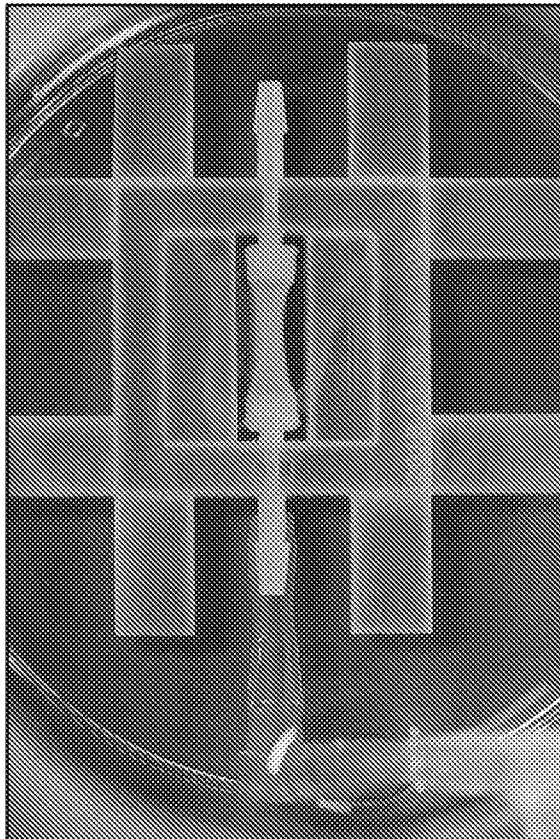


[図13]

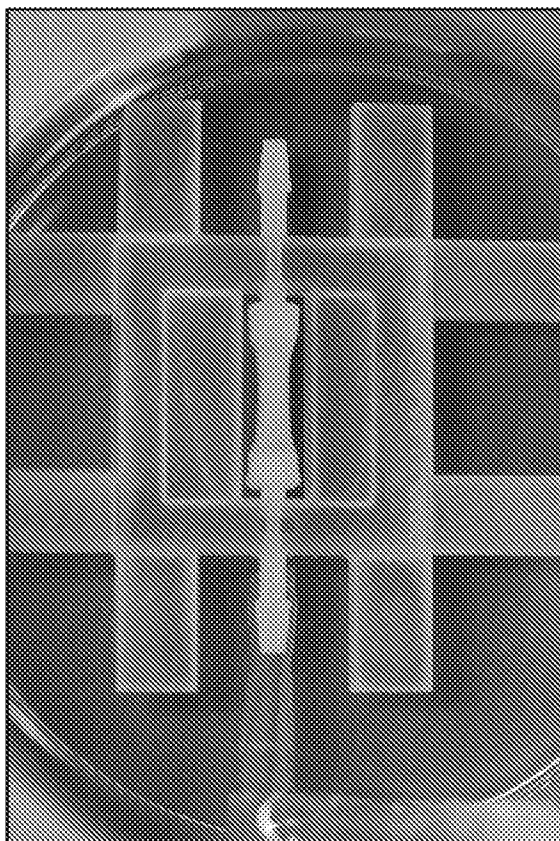


[図14]

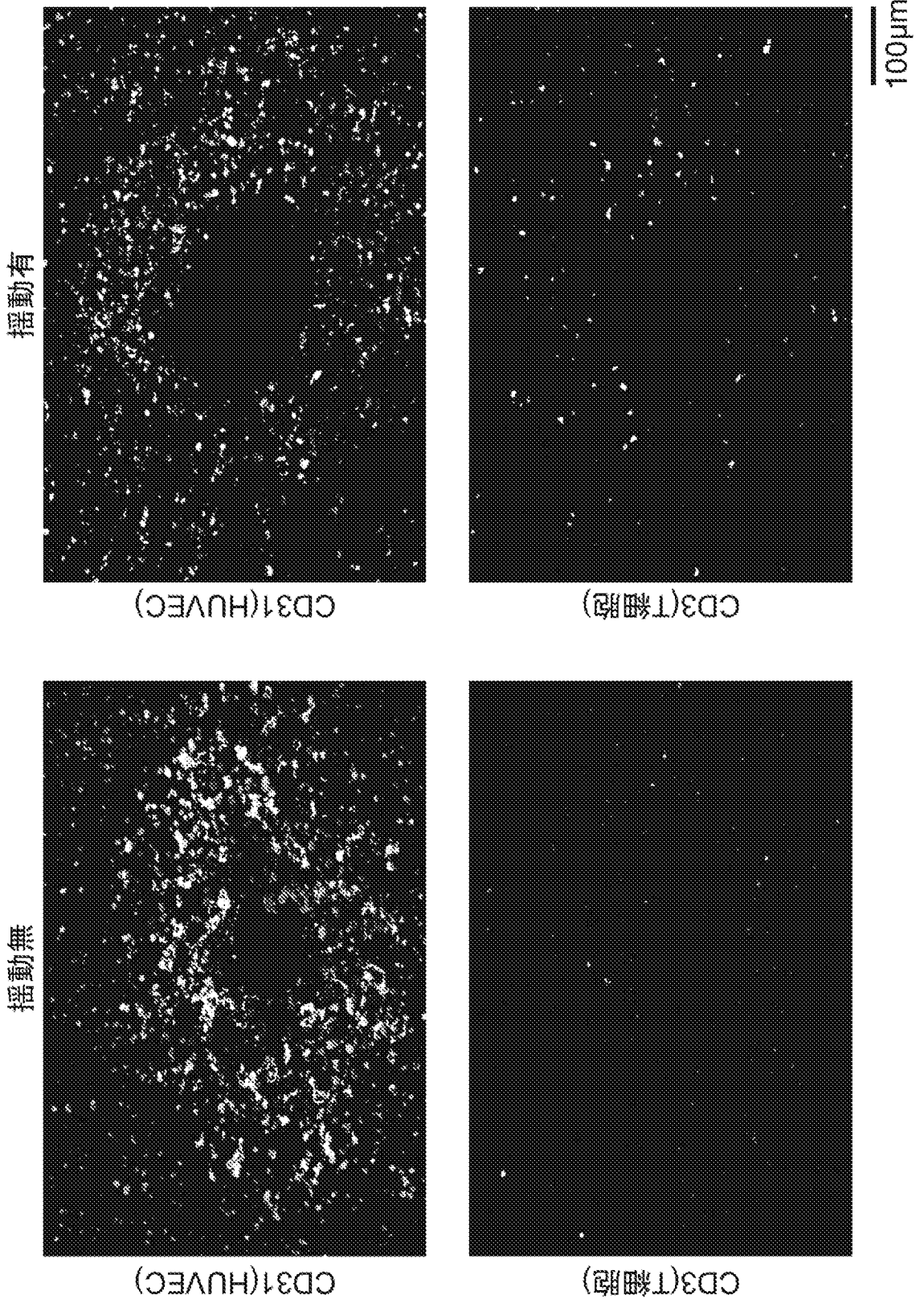
T細胞 無



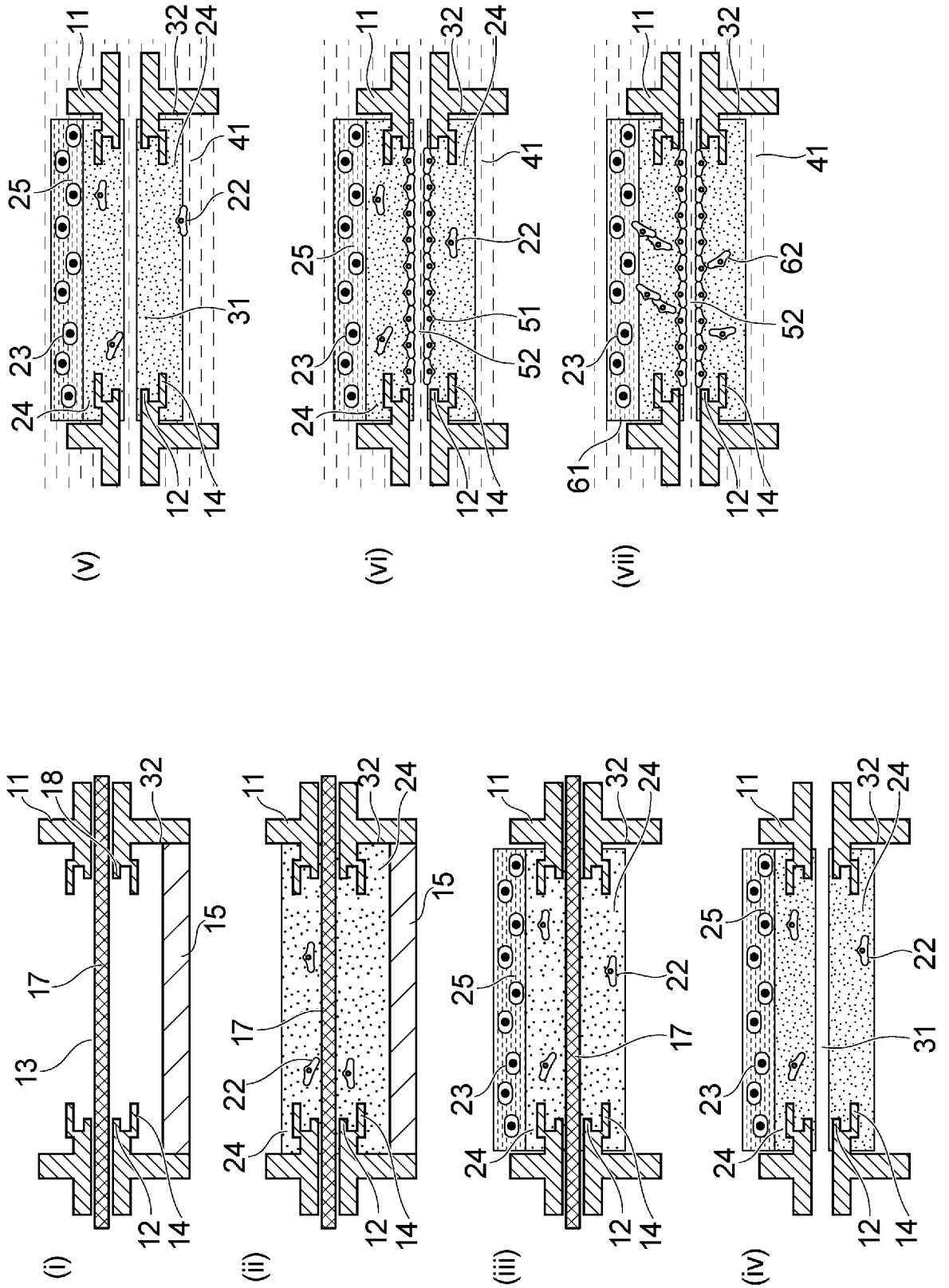
T細胞 有



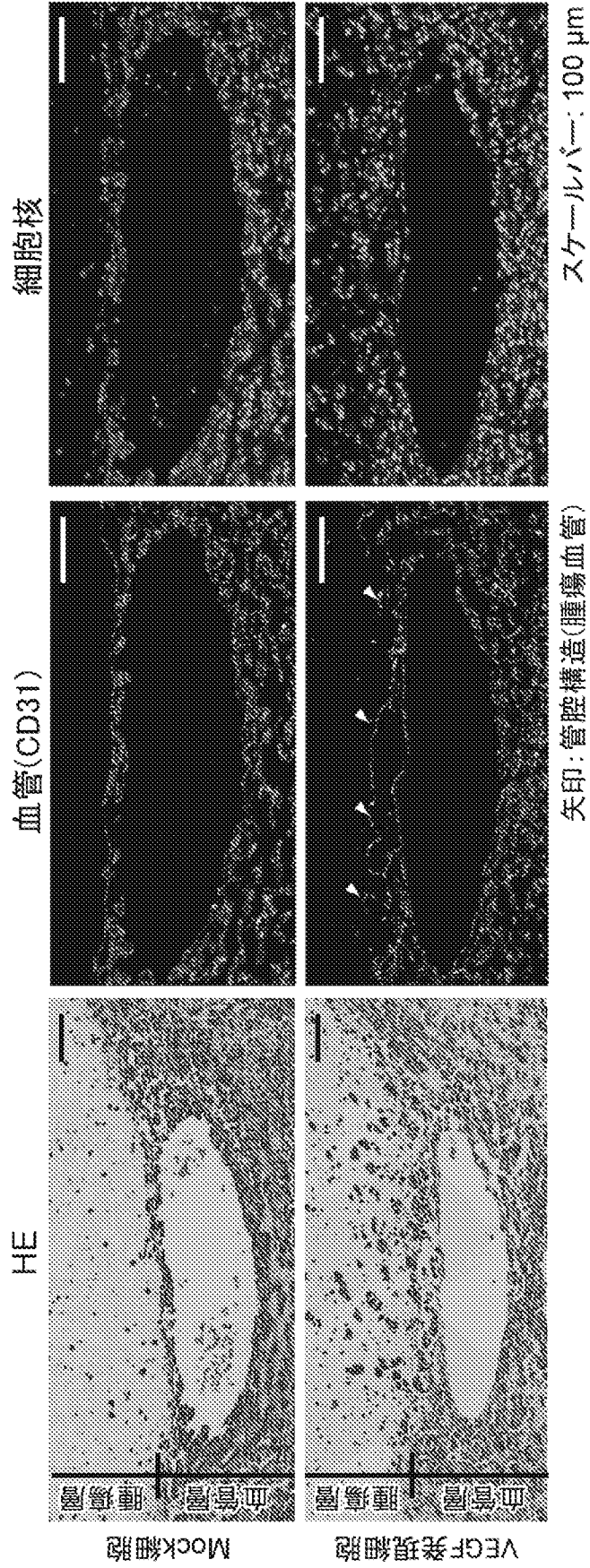
[図15]



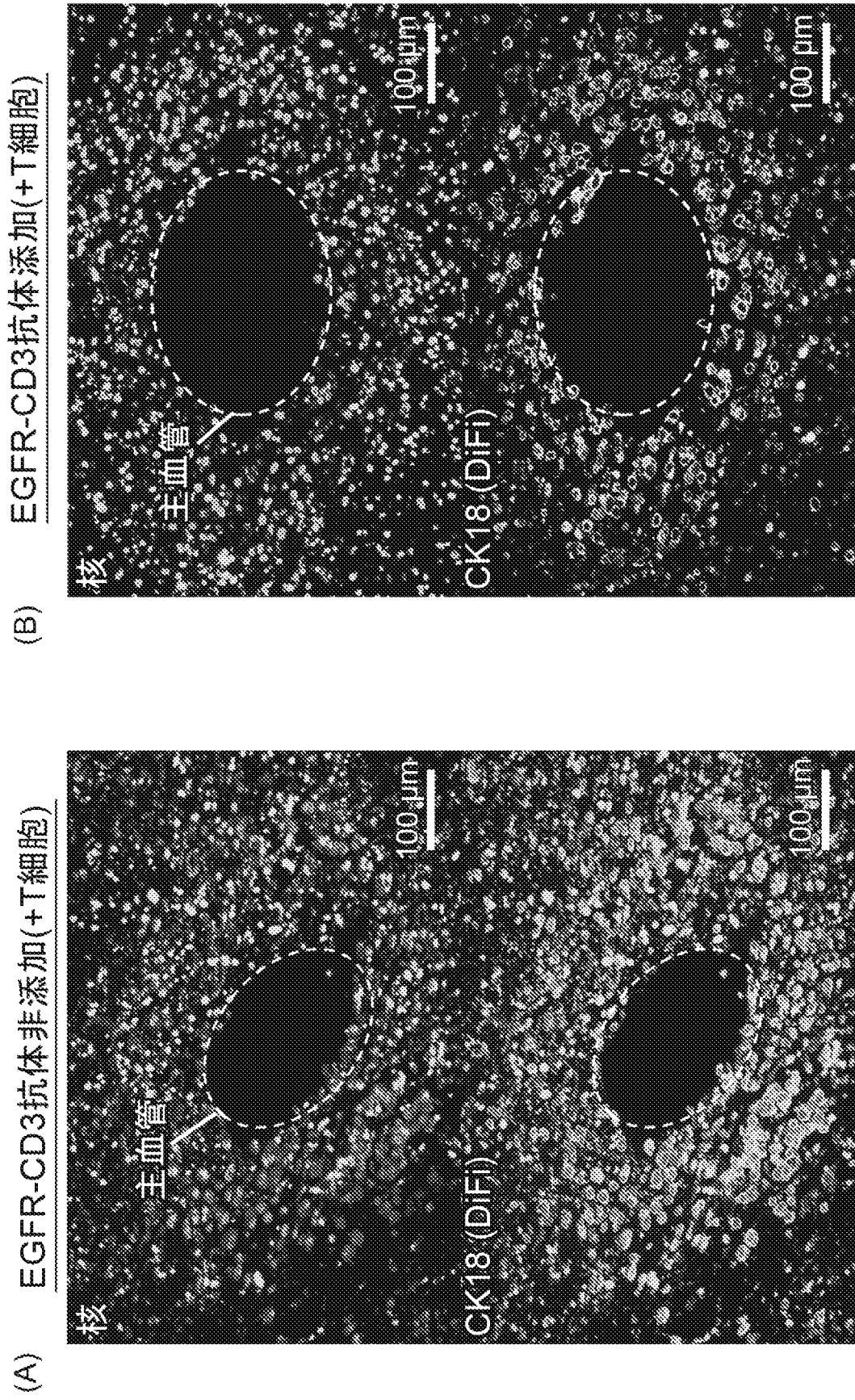
[図16]



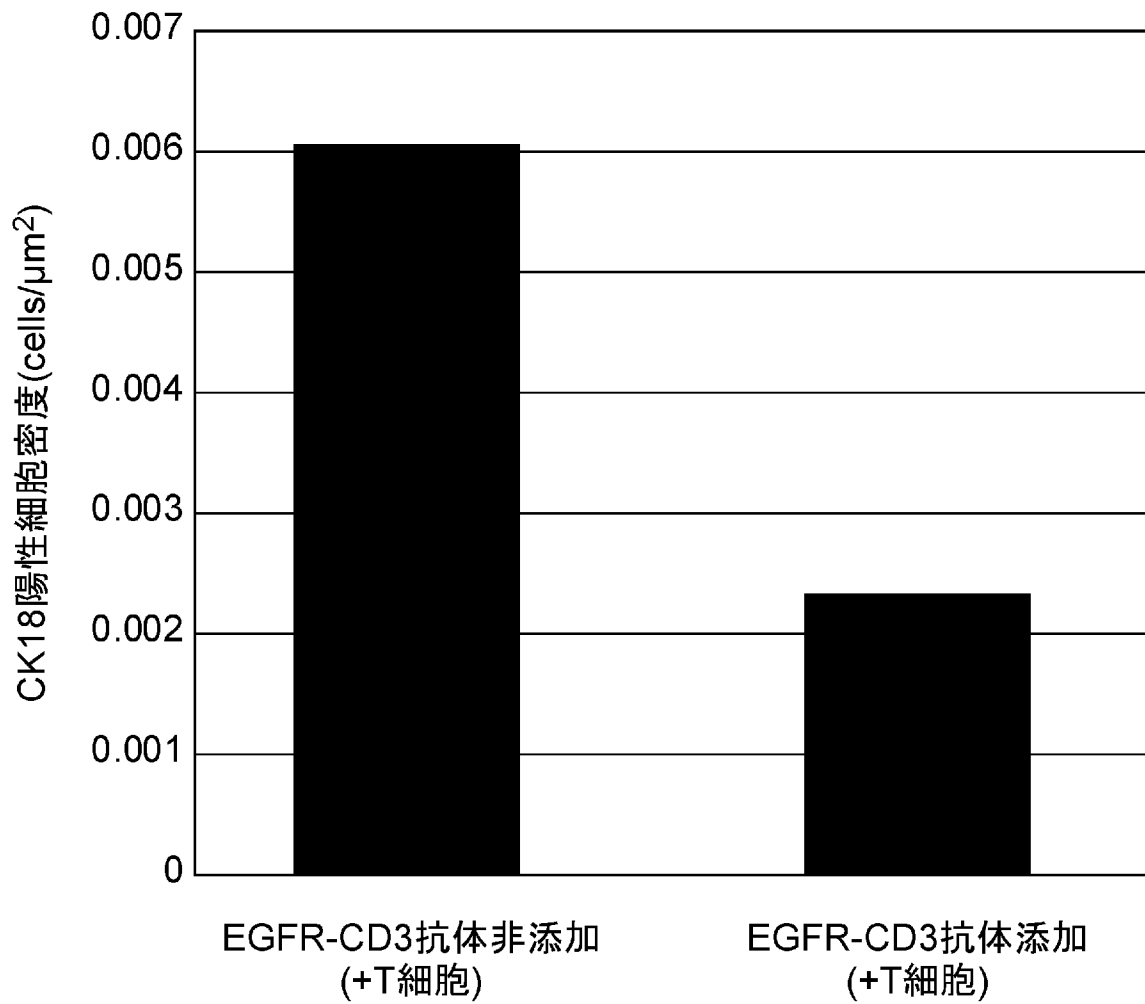
[図17]



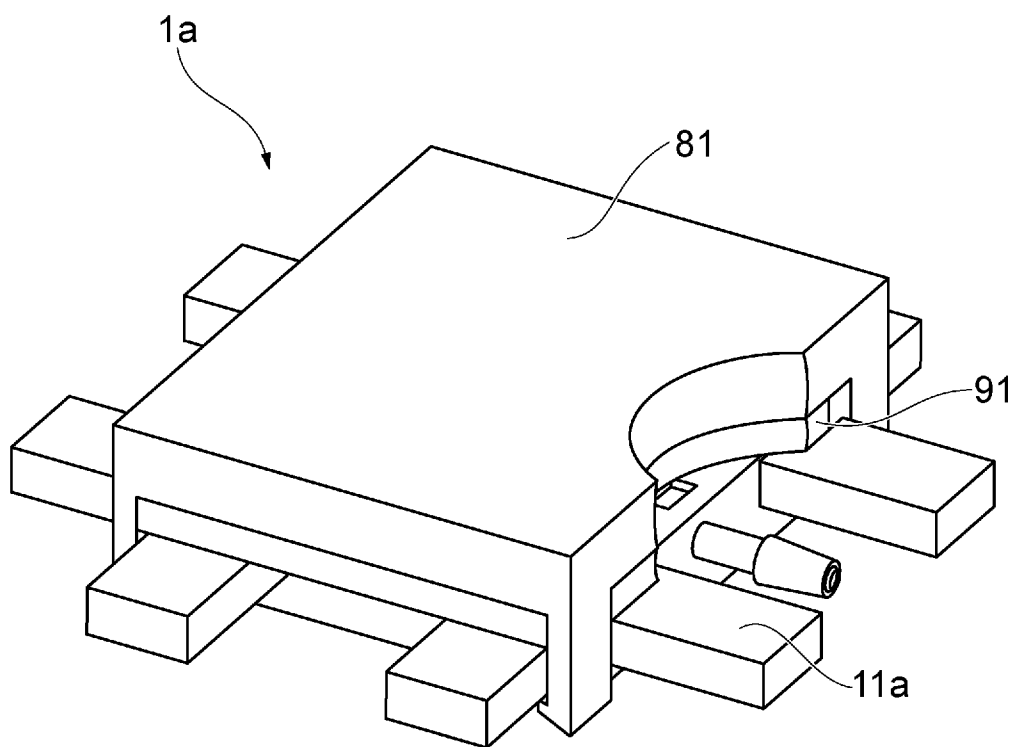
[圖18]



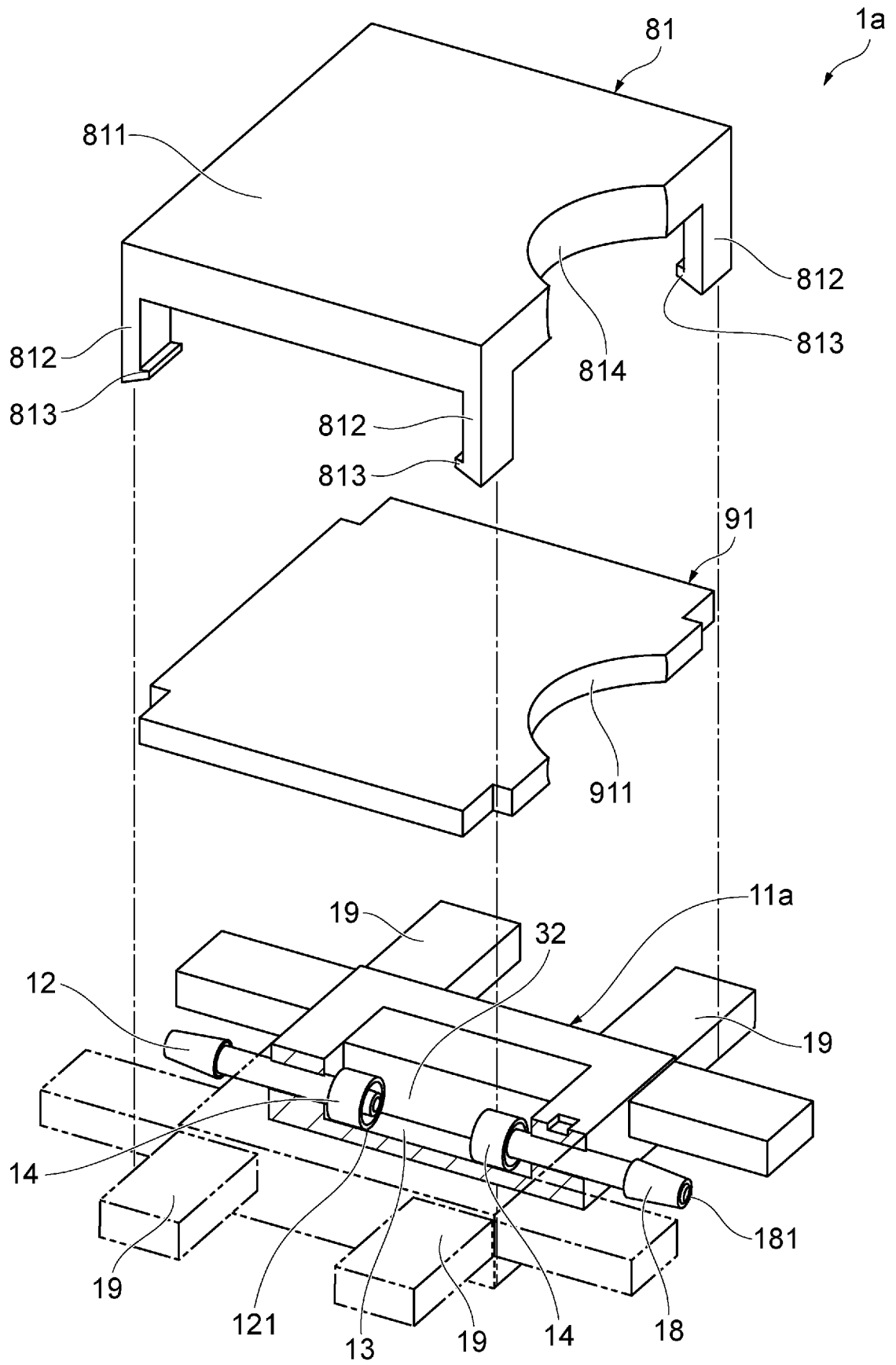
[図19]



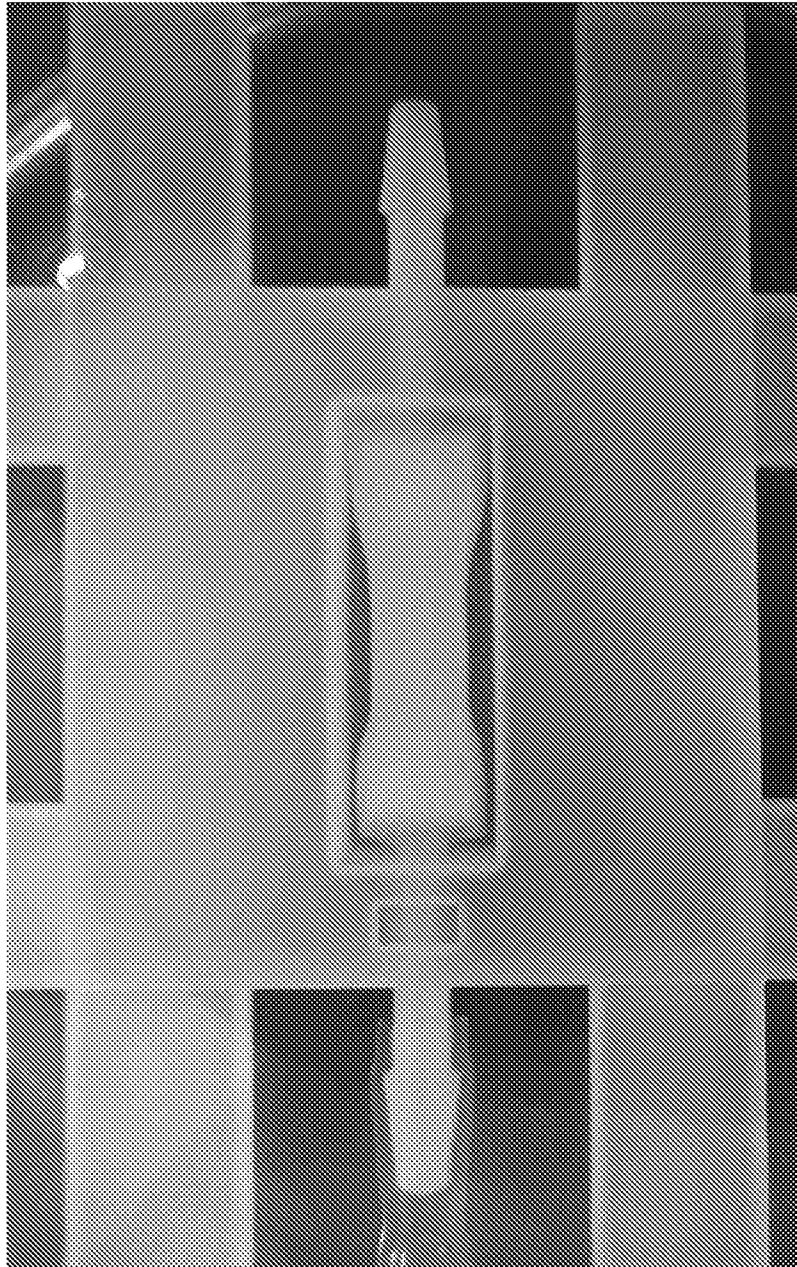
[図20]



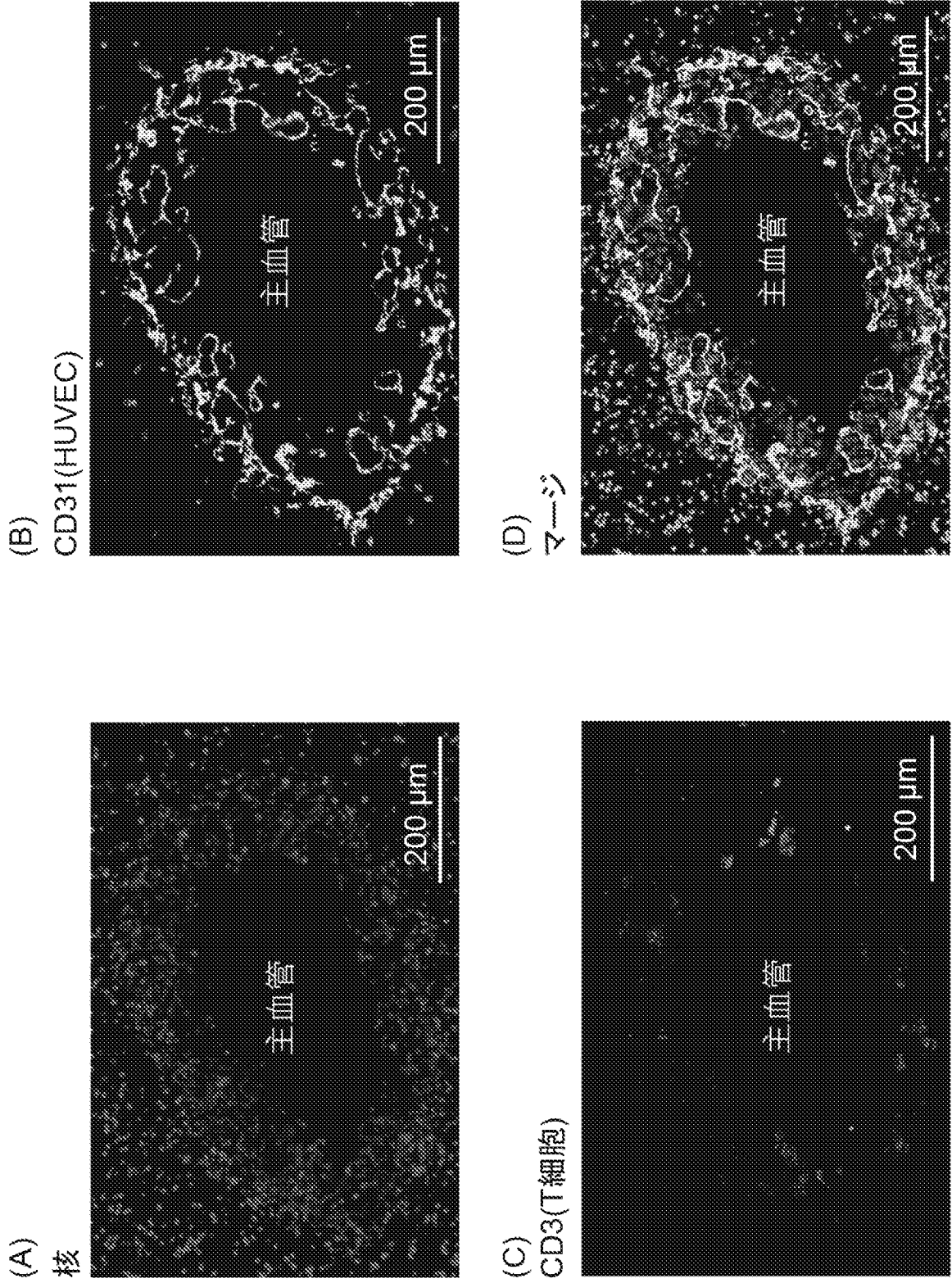
[図21]



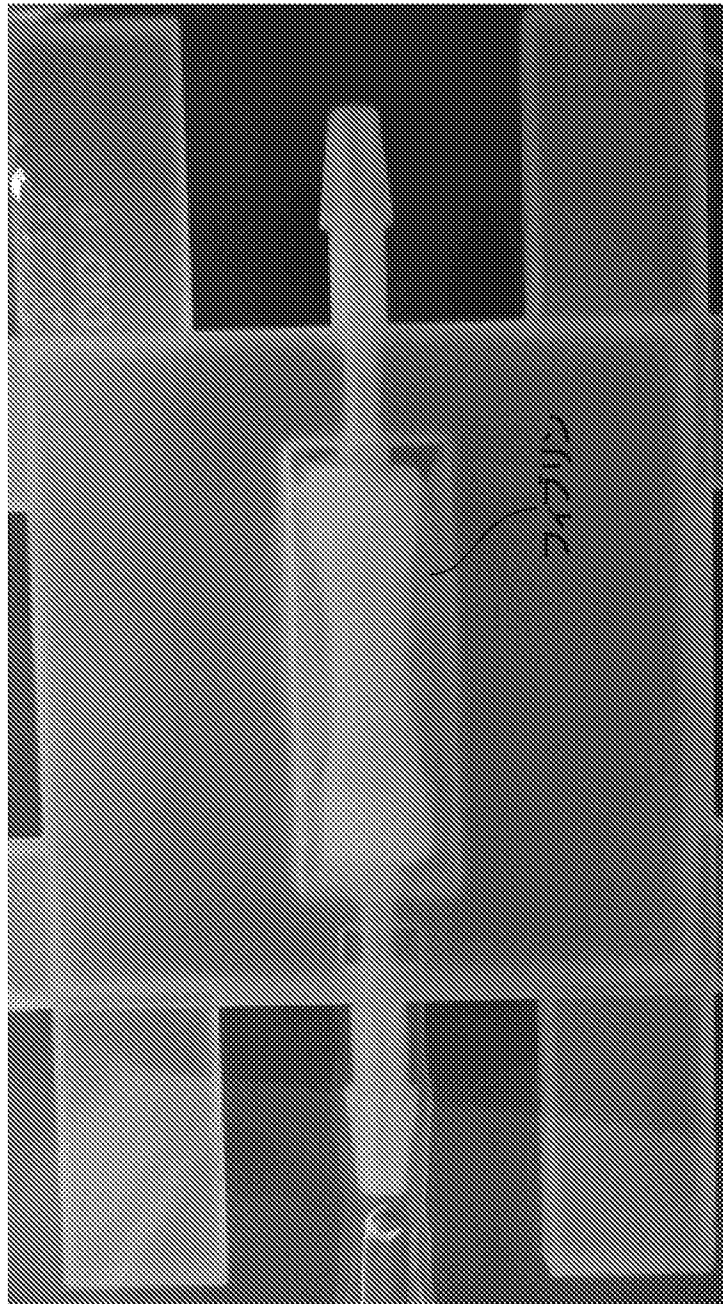
[図22]



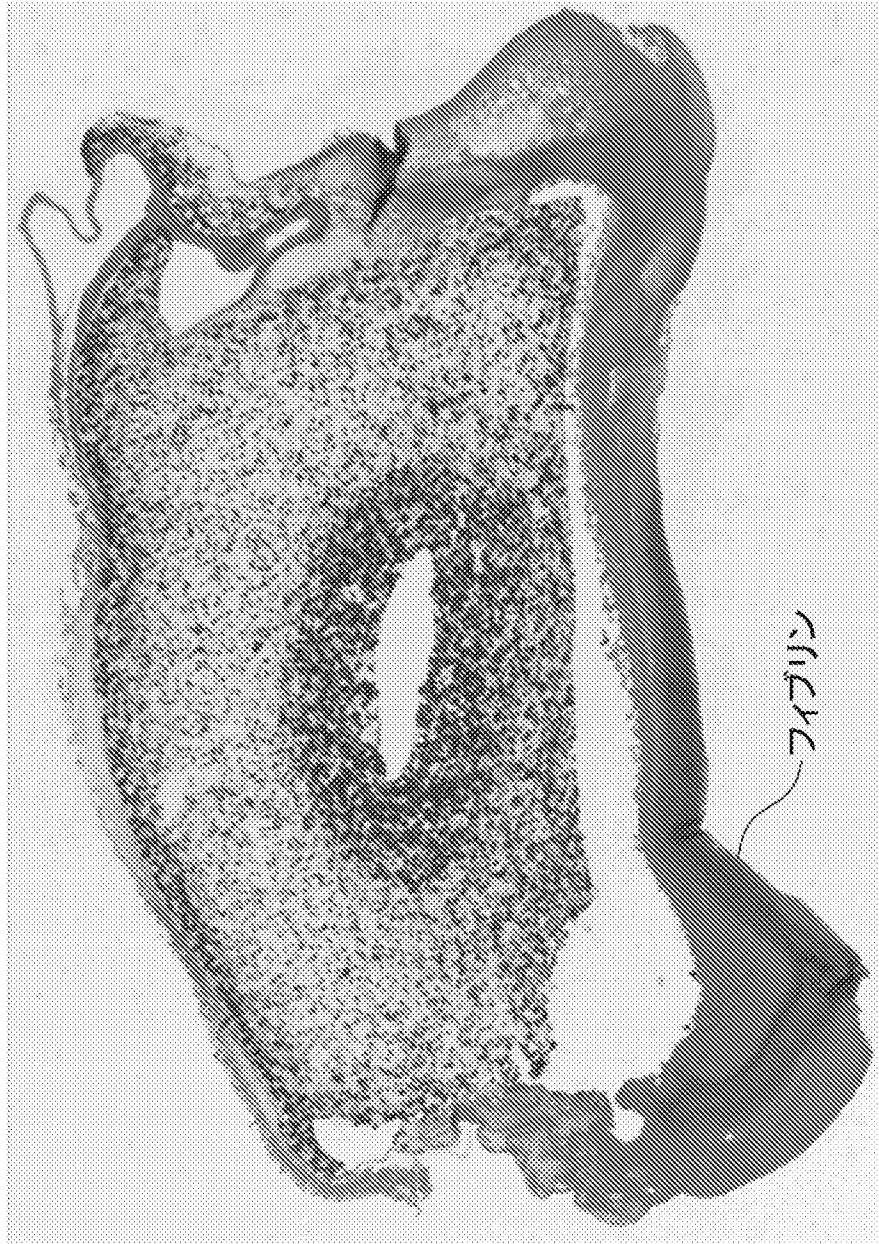
[図23]



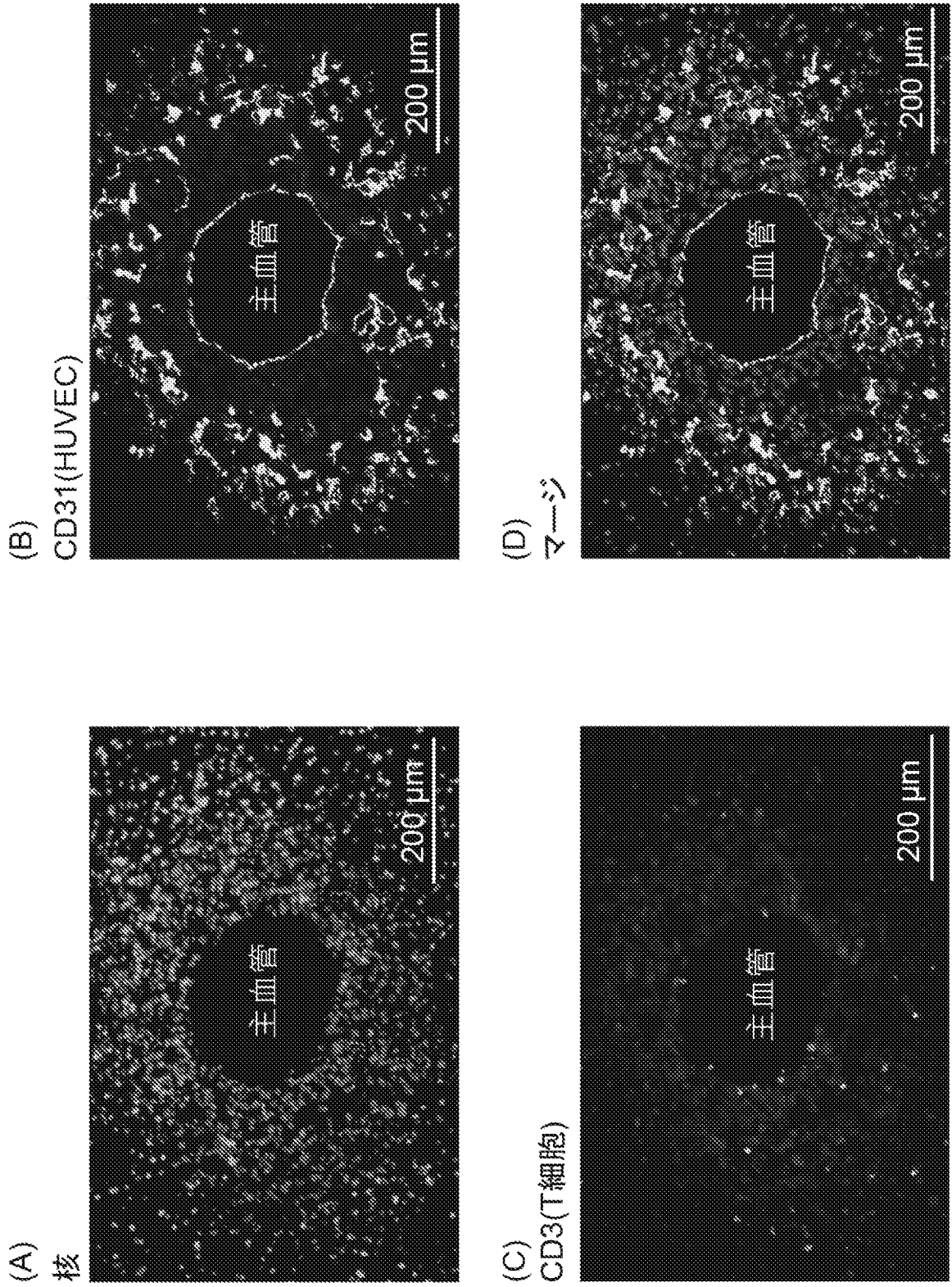
[図24]



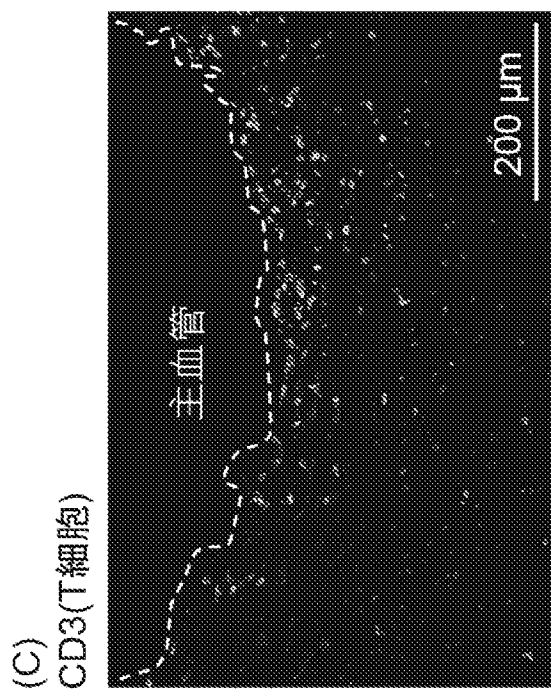
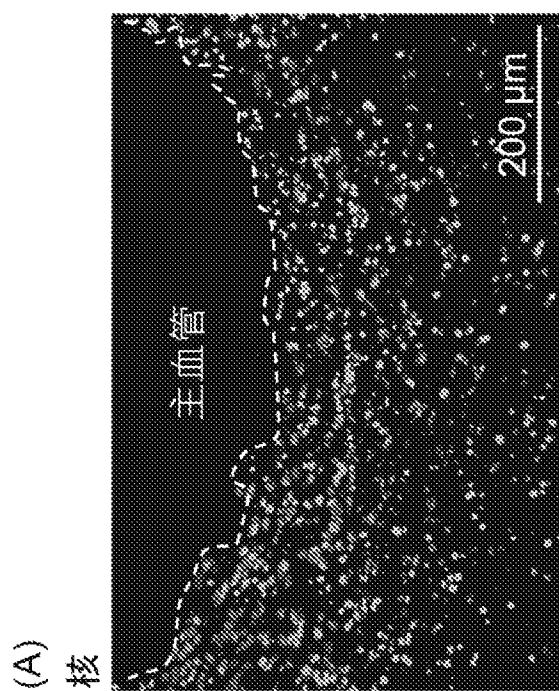
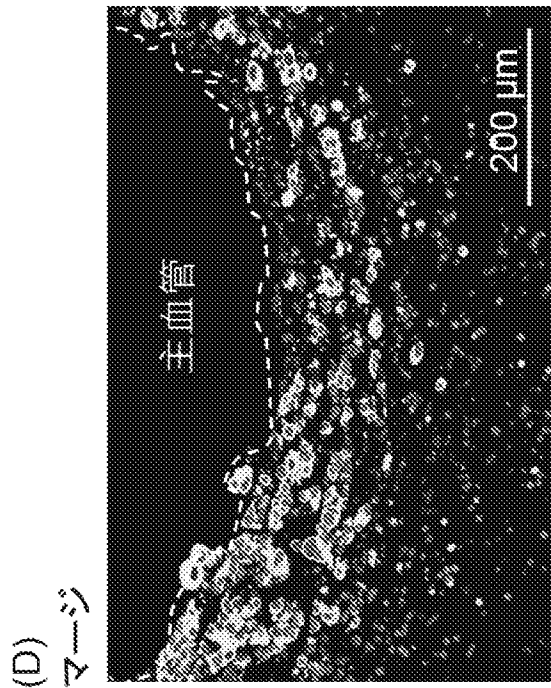
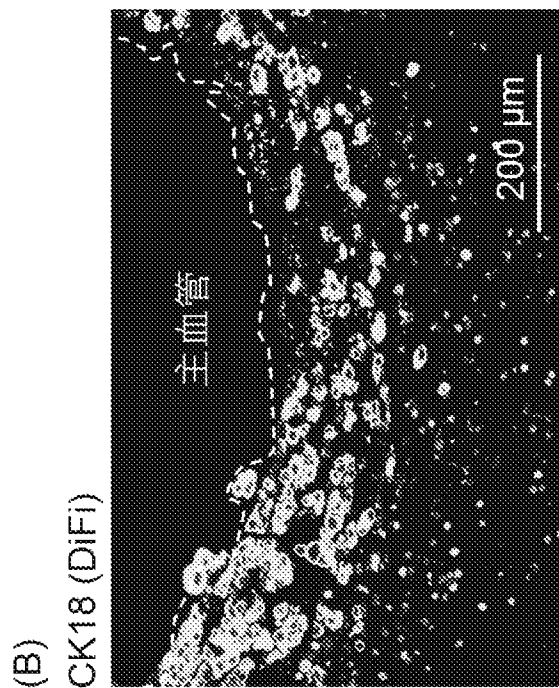
[図25]



[図26]



[図27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 5/09</i>(2010.01)i; <i>C07K 14/78</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/071</i>(2010.01)i; <i>C12N 5/0783</i>(2010.01)i; <i>C12Q 1/02</i>(2006.01)i FI: C12N5/09; C07K14/78; C12N5/071; C12N5/0783; C12Q1/02</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/09; C07K14/78; C12N5/071; C12N5/0783; C12Q1/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	人工組織に血管を作製する技術を開発, 産業技術総合研究所 [online], 2020, [retrieved on 11 April 2024], Internet: <URL:https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2020/pr20200414/pr20200414.html>, (Development of Technology to Produce Blood Vessels in Artificial Tissues. NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.) Abstract, Research content, Future plans, fig. 1-2	1-12
A	KIM, Dasom et al. Vascularized Lung Cancer Model for Evaluating the Promoted Transport of Anticancer Drugs and Immune Cells in an Engineered Tumor Microenvironment. Adv. Healthcare Mater. 2022, vol. 11, article number 2102581 entire text, all drawings	1-12
A	US 2020/0115667 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 16 April 2020 (2020-04-16) entire text, all drawings	1-12
A	JP 2009-531067 A (NORITS, INC.) 03 September 2009 (2009-09-03) entire text, all drawings	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 April 2024		Date of mailing of the international search report 07 May 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003577

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-100334 A (OSAKA UNIVERSITY) 04 June 2015 (2015-06-04) entire text, all drawings	1-12
A	WO 2021/066196 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 April 2021 (2021-04-08) entire text, all drawings	1-12
A	MORI, Nobuhito. KIDA, Yasuyuki S. Expression of genes involved in drug metabolism differs between perfusable 3D liver tissue and conventional 2D-cultured hepatocellular carcinoma cells. FEBS Open Bio. 2020, vol. 10, pp. 1985-2002 entire text, all drawings	1-12
A	MORI, Nobuhito et al. Fabrication of Perfusable Vascular Channels and Capillaries in 3D Liver-like Tissue. Scientific Reports. 2020, vol. 10, article number 5646 entire text, all drawings	1-12
A	池田 行徳, 松永 行子, 血行性転移時の細胞動態解明に向けた生体模倣血管モデルによるアプローチの現状, 生産研究, 2020, vol. 72, no. 3, pp. 261-267, (IKEDA, Yukinori. MATSUNAGA, Yuiko. Introduction of In Vitro Microvessel Model for Understanding Cellular Dynamics on Cancer Metastasis. SEISAN KENKYU.) entire text, all drawings	1-12
A	ステムセルバイオテクノロジー研究グループ, 産業技術総合研究所 [online], 16 May 2022, Internet: <URL:https://unit.aist.go.jp/cmb5/group/3-9Group.html>, (Stem Cell Biotechnology Research Group. NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.) Research topic 2: Development of innovative cancer treatment methods with a model of reproducing the tumor microenvironment	1-12
A	森 宣仁 他, P-3 灌流可能な腫瘍血管を有する3次元腫瘍デバイスの開発, 第29回H A B研究機構学術年会 プログラム・要旨集, 19 May 2022, p. 61, (MORI, Nobuhito et al. P-3 Development of 3D tumor device with perfusable tumor vessels.), non-official translation (Programs and Abstracts of 29th Academic Annual Meeting of Human & Animal Bridging Research Organization) entire text	1-12
A	森 宣仁 他, P2-6 灌流可能な腫瘍血管を有する3次元腫瘍デバイスの開発, 第20回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会 要旨集, 24 June 2022, p. 37, (MORI, Nobuhito et al. P2-6 Development of 3D tumor device with perfusable tumor vessels.), non-official translation (Abstracts of 20th Joint Research Presentation of Department of Life Science and Biotechnology) entire text	1-12
A	森 宣仁, 産業技術総合研究所 新技術説明会 [held online], 科学技術振興機構 [online], 26 July 2022, [retrieved on 11 April 2024], Internet: <URL:https://shingi.jst.go.jp/list/list_2022/2022_aist.html#20220908X-010>, 10) Creating artificially vascularized tissue, (MORI, Nobuhito. Japan Science and Technology Agency.), non-official translation (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. New Technology Presentation Meetings.) entire text	1-12
X	森 宣仁, 人工的に血管の付いた組織をつくる, 科学技術振興機構 [online], 13 September 2022, [retrieved on 11 April 2024], Internet: <URL:https://shingi.jst.go.jp/pdf/2022/2022_aist_010.pdf>, (MORI, Nobuhito. Japan Science and Technology Agency.), non-official translation (Creating artificially vascularized tissue) Example 2: Vascularized cancer tissue	1-12
X	森 宣仁, 「人工的に血管の付いた組織をつくる」産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 ステムセルバイオテクノロジー研究グループ 研究員 森 宣仁, youtube [online]. 13 September 2022, [retrieved on 11 April 2024], Internet: <URL:https://www.youtube.com/watch?v=50D0q8rT4q8>, (MORI, Nobuhito), non-official translation (Creating artificially vascularized tissue. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, Stem Cell Biotechnology Group Researcher: MORI, Nobuhito.) Example 2: Vascularized cancer tissue	1-12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	森 宣仁 他, P-68 灌流血管を有する3Dがんデバイスの開発, 日本動物実験代替法学会 第35回大会 プログラム・講演要旨集, 01 November 2022, p. 185, (MORI, Nobuhito et al.), non-official translation (P-68 Development of 3D cancer device with perfusion blood vessels. Programs and Lecture Abstracts of 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments.) entire text	1-12
X	SINGH, Rinki et al. P-30 3D Tumor Model with Perfusable Blood Vessels. つくば医工連携フォーラム2023 プログラム・予稿集, 15 January 2023, p. 80, non-official translation (Programs and Preprints of Tsukuba Biomedical Engineering Forum 2023) entire text	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/003577

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020/0115667	A1	16 April 2020	WO	2018/237132	A1	
JP	2009-531067	A	03 September 2009	WO	2007/112192	A2	
JP	2015-100334	A	04 June 2015	WO	2015/079759	A1	
WO	2021/066196	A1	08 April 2021	(Family: none)			

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/09(2010.01)i; C07K 14/78(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i FI: C12N5/09; C07K14/78; C12N5/071; C12N5/0783; C12Q1/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/09; C07K14/78; C12N5/071; C12N5/0783; C12Q1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	人工組織に血管を作製する技術を開発、産業技術総合研究所 [オンライン], 2020, [検索日 2024.04.11] インターネット: <URL: https://www.aist.go.jp/aist_j/ press_release/pr2020/pr20200414/pr20200414.html> 概要, 研究の内容, 今後の予定, 図1-2	1-12
A	KIM, Dasom et al., Vascularized Lung Cancer Model for Evaluating the Promoted Transport of Anticancer Drugs and Immune Cells in an Engineered Tumor Microenvironment, Adv. Healthcare Mater., 2022, Vol.11, Article number 2102581 全文, 全図	1-12
A	US 2020/0115667 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 16.04.2020 (2020 - 04 - 16) 全文, 全図	1-12
A	JP 2009-531067 A (ノーティス, インク.) 03.09.2009 (2009 - 09 - 03) 全文, 全図	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 16.04.2024	国際調査報告の発送日 07.05.2024	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 山▲崎▼ 真奈 4N 7884 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2015-100334 A (国立大学法人大阪大学) 04.06.2015 (2015 - 06 - 04) 全文, 全図	1-12
A	WO 2021/066196 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 08.04.2021 (2021 - 04 - 08) 全文, 全図	1-12
A	MORI, Nobuhito and KIDA, Yasuyuki S., Expression of genes involved in drug metabolism differs between perfusable 3D liver tissue and conventional 2D-cultured hepatocellular carcinoma cells, FEBS Open Bio, 2020, Vol. 10, pp. 1985-2002 全文, 全図	1-12
A	MORI, Nobuhito et al., Fabrication of Perfusable Vascular Channels and Capillaries in 3D Liver-like Tissue, Scientific Reports, 2020, Vol. 10, Article number 5646 全文, 全図	1-12
A	池田 行徳, 松永 行子, 血行性転移時の細胞動態解明に向けた生体模倣血管モデルによるアプローチの現状, 生産研究, 2020, Vol. 72, No. 3, pp. 261-267 全文, 全図	1-12
A	ステムセルバイオテクノロジー研究グループ, 産業技術総合研究所 [オンライン], 2022.05.16, インターネット: <URL: https://unit.aist.go.jp/cmb5/group/3-9Group.html> 研究課題2 : がん微小環境再現モデルによる革新的がん治療法の開発	1-12
A	森 宣仁 他, P-3 灌流可能な腫瘍血管を有する3次元腫瘍デバイスの開発, 第29回HAB研究機構学術年会 プログラム・要旨集, 2022.05.19, p. 61 全文	1-12
A	森 宣仁 他, P2-6 灌流可能な腫瘍血管を有する3次元腫瘍デバイスの開発, 第20回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会 要旨集, 2022.06.24, p. 37 全文	1-12
A	森 宣仁, 産業技術総合研究所 新技術説明会 [オンライン開催], 科学技術振興機構 [オンライン], 2022.07.26, [検索日 2024.04.11], インターネット: <URL: https://shingi.jst.go.jp/list/list_2022/2022_aist.html#20220908X-010>, 10) 人工的に血管の付いた組織をつくる 全文	1-12
X	森 宣仁, 人工的に血管の付いた組織をつくる, 科学技術振興機構 [オンライン], 2022.09.13, [検索日 2024.04.11], インターネット: <URL: https://shingi.jst.go.jp/pdf/2022/2022_aist_010.pdf> 実例2 : 血管付きがん組織	1-12
X	森 宣仁, 「人工的に血管の付いた組織をつくる」産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 ステムセルバイオテクノロジー研究グループ 研究員 森 宣仁, youtube [オンライン], 2022.09.13, [検索日 2024.04.11], インターネット: <URL: https://www.youtube.com/watch?v=50D0q8rT4q8> 実例2 : 血管付きがん組織	1-12
X	森 宣仁 他, P-68 灌流血管を有する3Dがんデバイスの開発, 日本動物実験代替法学会 第35回大会 プログラム・講演要旨集, 2022.11.01, p. 185 全文	1-12
X	SINGH, Rinki et al., P-30 3D Tumor Model with Perfusable Blood Vessels, つくば医工連携フォーラム2023 プログラム・予稿集, 2023.01.15, p. 80 全文	1-12

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/003577

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2020/0115667 A1	16.04.2020	WO 2018/237132 A1	
JP 2009-531067 A	03.09.2009	WO 2007/112192 A2	
JP 2015-100334 A	04.06.2015	WO 2015/079759 A1	
WO 2021/066196 A1	08.04.2021	(ファミリーなし)	