

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-176864

(P2019-176864A)

(43) 公開日 令和1年10月17日(2019. 10. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 1
A 6 1 K 35/407 (2015.01)	A 6 1 K 35/407	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-101150 (P2019-101150)	(71) 出願人	513016460
(22) 出願日	令和1年5月30日 (2019. 5. 30)		コーニンクレッカ ネザーランド アカデ
(62) 分割の表示	特願2017-44694 (P2017-44694)		ミー ヴァン ウェテンシャッペン
原出願日	平成23年7月29日 (2011. 7. 29)		オランダ王国 ユトレヒト ウブサララー
(31) 優先権主張番号	61/520, 569		ン 8 ハイブレヒト インスティテュー
(32) 優先日	平成23年6月10日 (2011. 6. 10)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/368, 736	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成22年7月29日 (2010. 7. 29)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

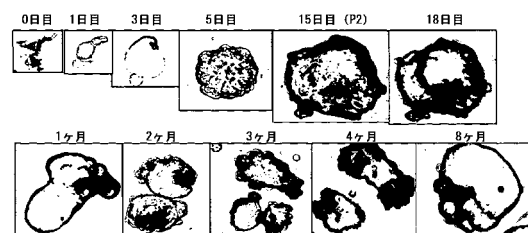
(54) 【発明の名称】 肝臓オルガノイド、その使用、およびそれを得るための培養方法

(57) 【要約】

【課題】肝臓オルガノイド、その使用、及びそれを得るための方法の提供。

【解決手段】分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子 (EGF)、FGFR2又はFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、および好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジ1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、またはR-スポンジン4が加えられた動物細胞用又はヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞及び/又は該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む、肝臓断片又は肝臓オルガノイドを得る方法。

【選択図】 図1 D



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法:

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子(EGF)、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、および好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、またはR-スポンジン4が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程。

10

【請求項 2】

肝臓断片が胆管に由来する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

肝臓断片が損傷、例えば、機械的損傷を受けている、請求項1または請求項2記載の方法。

【請求項 4】

基本培地がadvanced-DMEM/F12である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

BMP阻害剤、ガストリン、B27、N2、およびN-アセチルシステインの群からの1つまたは複数、好ましくは、2つ、3つ、4つ、または全てが基本培地に加えられる、請求項1記載の方法。

20

【請求項 6】

EGF、BMP阻害剤、R-スポンジン、およびWntアゴニストが全て基本培地に加えられる、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

BMP阻害剤が、Noggin、DAN、ならびにCerberusおよびGremlinを含むDAN様タンパク質より選択される; ならびに/または

Wntアゴニストが、Wnt、Wnt-3a、Norrin、およびGSK阻害剤のうちの1つまたは複数より選択される、ならびに/または

R-スポンジンが、R-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、およびR-スポンジン4より選択される、
請求項6記載の方法。

30

【請求項 8】

HGFも基本培地に加えられる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

培養して少なくとも1日後に、培地を、BMP阻害剤もWntアゴニストも含まない培地と交換する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

BMP阻害剤もWntアゴニストも含まない培地が、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子(EGF)、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ニコチンアミド、ならびにR-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、R-スポンジン4のうちのいずれか1つのR-スポンジンが加えられた基本培地を含む、請求項9記載の方法。

40

【請求項 11】

EGF、R-スポンジン1、FGF10、HGF、およびニコチンアミドが全て基本培地に加えられるか、または任意で、R-スポンジン1の代わりにR-スポンジン4が加えられる、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

培養して少なくとも2週間後に、培地を、BMP阻害剤もWntアゴニストも含まない培地と交換する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 13】

第2の培地が、EGF、FGF、および/またはHGF、TGF- β 阻害剤、ならびにNotch阻害剤が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子；FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、およびHGF；Notch阻害剤、ならびにTGF- β 阻害剤が全て基本培地に加えられる、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

FGFがFGF10である、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

Notch阻害剤が、 γ -セクレターゼ阻害剤、任意で、DAPTまたはジベンザゼピン(DBZ)またはベンゾジアゼピン(BZ)またはLY-411575である、請求項13～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

TGF- β 阻害剤がタンパク質、ペプチド、または低分子である、請求項13～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

TGF- β 阻害剤が、A83-01 SB-431542、SB-505124、SB-525334、LY364947、SD-208、SJN2511からなる群より選択される低分子阻害剤である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

ガストリン、B27、N2、およびN-アセチルシステインの群からの1つまたは複数、好ましくは、2つ、3つ、または全てが基本培地に加えられる、請求項13～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

上皮幹細胞および/または単離された組織断片を、EGF、BMP阻害剤、R-スポンジン、およびWntが加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地において培養し；その後、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2もしくはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ニコチンアミド、ならびに好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1もしくはR-スポンジン4が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地において培養し；その後、EGF、FGF、および/もしくはHGF、TGF- β 阻害剤、ならびにNotch阻害剤が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地において培養する工程を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

肝臓オルガノイドが、Lgr5を発現する単一細胞から生じる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 22】

フィーダー細胞を含まない、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

Lgr5、Hnf1 α 、およびHnf4のうちの1つまたは複数のマーカーの、有意なレベルでの天然発現を特徴とする、成体肝臓幹細胞の集団。

【請求項 24】

成体肝臓幹細胞がヒト成体肝臓幹細胞である、請求項23記載の成体肝臓幹細胞集団。

【請求項 25】

請求項1～21のいずれか一項記載の方法によって得られた、請求項23または請求項24記載の成体肝臓幹細胞集団。

【請求項 26】

請求項23、24、または25に記載のタイプの細胞を少なくとも1種類含む、肝臓オルガノイド。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

少なくとも1種類の肝細胞および少なくとも1種類の胆管細胞をさらに含む、請求項26記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 28】

以下のマーカーのうちの少なくとも1つを発現する、請求項26または27のいずれか一項記載の肝臓オルガノイド：

肝細胞マーカー、例えば、アルブミン、B-1インテグリン、トランスサイレトリン(trans thyretin)、およびグルタミンシンテターゼ；ならびに/または少なくとも1つの胆管細胞マーカー、例えば、ケラチン7および19。

【請求項 29】

少なくとも 1×10^3 個の細胞 $\sim 5 \times 10^4$ 個の細胞、例えば、少なくとも 1×10^3 個の細胞 $\sim 5 \times 10^3$ 個の細胞の集団を含む、請求項26 $\sim$ 28のいずれか一項記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 30】

嚢胞構造と、その外側にある、少なくとも1つの芽および中心管腔を有する細胞層とを含む、請求項26 $\sim$ 29のいずれか一項記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 31】

以下の特徴のうちの1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、4つ、または5つ全て)を有する、請求項26 $\sim$ 30のいずれか一項記載の肝臓オルガノイド：

(a) $>5 \times 10^5$ 細胞/ cm^3 、好ましくは $>10 \times 10^5$ 細胞/ cm^3 の細胞密度を有すること；(b)2 $\sim$ 30層の細胞層に相当する厚み、好ましくは、2 $\sim$ 15層の細胞層に相当する厚みを有すること；(c)細胞が三次元で相互に接触し、(d)健康な肝臓組織に固有の機能を示し、(e)2つの規定されたドメインを有する細長い形状を有すること。

【請求項 32】

アルブミンを分泌することができる、請求項23 $\sim$ 31のいずれか一項記載の細胞集団またはオルガノイド。

【請求項 33】

尿素を分泌する、請求項23 $\sim$ 32のいずれか一項記載の細胞集団またはオルガノイド。

【請求項 34】

目に見えるグリコーゲン貯蔵を示す、請求項23 $\sim$ 33のいずれか一項記載の細胞集団またはオルガノイド。

【請求項 35】

誘導性チトクロムP450活性を有する、請求項23 $\sim$ 34のいずれか一項記載の細胞集団またはオルガノイド。

【請求項 36】

形態学的に細胞が肝細胞様に見える、請求項23 $\sim$ 35のいずれか一項記載の細胞集団またはオルガノイド。

【請求項 37】

細胞外マトリックスと接触している、請求項23 $\sim$ 36のいずれか一項記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 38】

少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月間、少なくとも8ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも15ヶ月間、少なくとも20ヶ月間、少なくとも24ヶ月間またはそれ以上培養することができる、請求項23 $\sim$ 37のいずれか一項記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 39】

幹細胞シグネチャー遺伝子であるLGR4、TACSTD1/Epcam、CD44、SOX9、SP5、CD24、PROM1、CDCA7、およびELF3のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、請求項23 $\sim$ 38のいずれか一項記載のヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

【請求項 40】

リプログラミング遺伝子であるKLF4、MYC、POU5F1、およびSOX2のうちの少なくとも1つ

10

20

30

40

50

、好ましくは全てを発現する、請求項23～39のいずれか一項記載のヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

【請求項41】

肝細胞/胆管細胞特異的遺伝子であるHNF1A、HNF1B、HNF4A、HHEX、ONECUT1、ONECUT2、PROX1、CDH1、FOXA2、GATA6、FOXM1、CEBPA、CEBPB、CEBPD、CEBPG、GLUL、KRT7、KRT19、およびMETのうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、請求項23～40のいずれか一項記載のヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

【請求項42】

肝細胞/胆管細胞特異的遺伝子であるNEUROG2、IGF1R、およびCD34、AFP、GCG、およびPTF1Aのうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現しない、例えば、NEUROG2、IGF1R、およびCD34を発現しない、請求項23～41のいずれか一項記載のヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。 10

【請求項43】

肝細胞特異的遺伝子であるTTR、ALB、FAH、TAT、CYP3A7、APOA1、HMGCS1、PPARG、CYP2B6、CYP2C18、CYP2C9、CYP2J2、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP4F8、CYP4V2、およびSCARB1のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、請求項23～42のいずれか一項記載のヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

【請求項44】

創薬スクリーニング、毒性アッセイ、または再生医療における、請求項23～43のいずれか一項記載の肝臓オルガノイドの使用。 20

【請求項45】

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、

ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、およびN-アセチルシステイン；ならびに好ましくは、

BMP阻害剤；ならびに

Wntアゴニスト

が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む、細胞培地。

【請求項46】

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、ならびに好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1および/またはWnt-3aが加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む、細胞培地。 30

【請求項47】

HGFをさらに含む、請求項46記載の細胞培地。

【請求項48】

EGF、FGF、および/もしくはHGF、TGF- β 阻害剤、ならびにNotch阻害剤が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる、細胞培地。

【請求項49】

上皮幹細胞または単離された組織断片を細胞外マトリックス上で培養するための、請求項45～48のいずれか一項記載の培地の使用。 40

【請求項50】

肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための、請求項49記載の使用。

【請求項51】

肝臓におけるWntシグナル伝達を刺激する工程を含む、肝臓を再生するための、またはLgr5を発現する細胞を得るための方法。

【請求項52】

肝臓の障害、状態、または疾患の治療において使用するための、請求項23～43のいずれか一項記載の肝臓オルガノイドまたは細胞集団。 50

【請求項53】

肝臓の障害、状態、または疾患を治療する方法であって、それを必要とする患者に、請求項23～43のいずれか一項記載の細胞集団または肝臓オルガノイドを投与する工程を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、肝臓オルガノイド、その使用、およびそれを得るための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

肝臓の基本構造単位は肝小葉である。それぞれの肝小葉は、中心輸出静脈に向かって放射状に延びている、洞様毛細血管によって裏打ちされた肝細胞板状構造からなる。肝小葉はほぼ六角形をなし、6つの角はそれぞれ門脈三管(門脈、胆管、および肝動脈)の存在によって定められる。肝細胞は肝臓の主要な実質細胞タイプであるが、胆管細胞(胆管上皮細胞)、内皮細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、ナチュラルキラー細胞、および肝臓星状細胞と協力して機能する。この複合構造は肝機能にとって極めて重要である。

【0003】

肝臓幹細胞の存在は議論の余地が残されている。一方で、肝臓における組織維持およびある特定のタイプの損傷の際の肝臓再生は、幹細胞ではなく、成熟細胞(肝細胞または胆管細胞)の分裂によって動かされる。しかしながら、肝細胞増殖が阻害されている肝臓損傷モデルも損傷に応答して臓器が再生する能力を示した。このことは、肝臓が、条件付きの幹細胞(facultative stem cell)をもつ臓器とみなされることを示唆している。

【0004】

従来より、肝細胞に由来する肝臓培養物または胚性幹細胞(ES)もしくは人工多能性幹細胞の分化によって得られた肝臓培養物は長期間にわたって拡大および自己複製しない。

【0005】

最近、小腸において、パネート細胞間に点在する小さな細胞である循環陰窩底部円柱(Crypt Base Columnar)(CBC)細胞において特異的に発現する遺伝子Lgr5が同定された(Barker et al., 2007. Nature 449:1003-1007(非特許文献1))。GFP/タモキシフェン誘導性CreリコンビナーゼカセットをLgr5遺伝子座に組み込んだマウスを用いた細胞系譜解析によって、Cre誘導の14ヶ月後に評価した時でも、Lgr5⁺CBC細胞が上皮の全細胞タイプを生じる多能性幹細胞を構成することが示された。

【0006】

Lgr5に加えてLgr6も成体幹細胞の独特のマーカーであるが、Lgr4は成体幹細胞の独特のマーカーでないことが最近発見された。Lgr5は、脳、腎臓、肝臓、網膜、胃、腸、膵臓、乳房、毛包、卵巣、副腎髄質、および皮膚の幹細胞において発現しているのに対して、Lgr6は脳、肺、乳房、毛包、および皮膚の幹細胞において発現している。

【0007】

本明細書において、本発明者らは、成体肝臓前駆体を培養する方法、ならびに長寿命の維持能力を示し、肝細胞系列および胆管細胞系列の両方に分化することができ、単離された肝臓断片の基本生理機能を保っている肝臓オルガノイドを得る方法を開発した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Barker et al., 2007. Nature 449:1003-1007

【発明の概要】

【0009】

本発明は、肝臓オルガノイドを得るための方法であって、細胞を第1の「拡大」培地(本

10

20

30

40

50

明細書においてEMとも呼ばれる)において培養し、好ましくは、その後に、細胞を第2の「分化」培地(本明細書においてDMとも呼ばれる)において培養する工程を含む前記方法を提供する。

【0010】

肝臓オルガノイドは、単一のLgr5+幹細胞、少なくとも1つのLgr5+幹細胞を含む細胞の集団、および/または肝臓断片を培養することによって得ることができる。本明細書において「培地における細胞/培地の細胞」が述べられている場合、この意味は、単一のLgr5+幹細胞、少なくとも1つのLgr5+幹細胞を含む細胞の集団、および/または肝臓断片を含む。

【0011】

1つの態様において、拡大培地は、EGF、Wntアゴニスト、FGF、およびニコチンアミドを含む。好ましくは、WntアゴニストはR-スポンジン1であり、そのため、拡大培地は「ERFNic」と呼ばれる。特に好ましい拡大培地はHGFをさらに含み、「ERFHNic」と呼ばれる。

【0012】

1つの態様において、分化培地は、EGF、TGF- β 阻害剤、FGF、およびNotch阻害剤を含む。1つの態様において、TGF- β 阻害剤はA83-01である、および/またはNotch阻害剤はDAPTである。この分化培地は本明細書において「EAFD」と呼ばれ、本発明の好ましい分化培地である。FGFは、任意で、HGFと交換されてもよい、または分化培地中にFGFおよびHGFの両方が存在してもよく、存在しなくてもよい。デキサメタゾンも加えられてよい。

【0013】

好ましい態様において、細胞は、最初に、WntおよびNogginをさらに含む拡大培地、例えば、EGF、Noggin、R-スポンジン、およびWnt、任意で、FGF、HGF、およびニコチンアミドを含む「ENRW」培地において培養することができる。本発明者らは、この培地は、最初の数日間、細胞の初期拡大を刺激するのに最も適していることを発見した。従って、この第1の拡大培地は本明細書においてEM1と呼ばれるときもある。一部の態様において、WntおよびNogginは、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日またはそれ以上、例えば、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月またはそれ以上、14ヶ月またはそれ以上たった後に取り除かれる。次いで、細胞は、WntまたはNogginを含まない、前記の本発明の拡大培地において拡大されてもよい。この第2の拡大培地は本明細書においてEM2と呼ばれるときもある。一部の態様において、細胞は、EM2において、約1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、またはさらに長期間、例えば、3週間、4週間、5週間、10週間、20週間またはそれ以上、培養される。次いで、培地は、TGF- β 阻害剤およびNotch阻害剤を含む、前記の最適化された分化培地に交換することができる。典型的に、分化培地はWntアゴニストもR-スポンジンもニコチンアミド含まない。これにより、成熟した肝細胞および胆管細胞になるように細胞の分化が促進される。これらの細胞はヒトまたは動物への移植に適している。

【0014】

本発明は肝臓オルガノイドも提供する。本願は、肝臓オルガノイドがエキスビボで増殖されたことを初めて説明する。

[本発明1001]

以下の工程を含む、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法:

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子(EGF)、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、および好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、またはR-スポンジン4が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程。

[本発明1002]

肝臓断片が胆管に由来する、本発明1001の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1003]

肝臓断片が損傷、例えば、機械的損傷を受けている、本発明1001または本発明1002の方法。

[本発明1004]

基本培地がadvanced-DMEM/F12である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1005]

BMP阻害剤、ガストリン、B27、N2、およびN-アセチルシステインの群からの1つまたは複数、好ましくは、2つ、3つ、4つ、または全てが基本培地に加えられる、本発明1001の方法。

[本発明1006]

EGF、BMP阻害剤、R-スポンジン、およびWntアゴニストが全て基本培地に加えられる、本発明1005の方法。

[本発明1007]

BMP阻害剤が、Noggin、DAN、ならびにCerberusおよびGremlinを含むDAN様タンパク質より選択される；ならびに/または

Wntアゴニストが、Wnt、Wnt-3a、Norrin、およびGSK阻害剤のうちの1つまたは複数より選択される、ならびに/または

R-スポンジンが、R-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、およびR-スポンジン4より選択される、
本発明1006の方法。

[本発明1008]

HGFも基本培地に加えられる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]

培養して少なくとも1日後に、培地を、BMP阻害剤もWntアゴニストも含まない培地と交換する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1010]

BMP阻害剤もWntアゴニストも含まない培地が、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子(EGF)、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ニコチンアミド、ならびにR-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、R-スポンジン4のうちのいずれか1つのR-スポンジンが加えられた基本培地を含む、本発明1009の方法。

[本発明1011]

EGF、R-スポンジン1、FGF10、HGF、およびニコチンアミドが全て基本培地に加えられるか、または任意で、R-スポンジン1の代わりにR-スポンジン4が加えられる、本発明1010の方法。

[本発明1012]

培養して少なくとも2週間後に、培地を、BMP阻害剤もWntアゴニストも含まない培地と交換する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]

第2の培地が、EGF、FGF、および/またはHGF、TGF- β 阻害剤、ならびにNotch阻害剤が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子；FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、およびHGF；Notch阻害剤、ならびにTGF- β 阻害剤が全て基本培地に加えられる、本発明1013の方法。

[本発明1015]

FGFがFGF10である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

Notch阻害剤が、 γ -セクレターゼ阻害剤、任意で、DAPTまたはジベンザゼピン(DBZ)またはベンゾジアゼピン(BZ)またはLY-411575である、本発明1013～1015のいずれかの方法

10

20

30

40

50

。

[本発明1017]

TGF- β 阻害剤がタンパク質、ペプチド、または低分子である、本発明1013～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

TGF- β 阻害剤が、A83-01 SB-431542、SB-505124、SB-525334、LY364947、SD-208、SJN2511からなる群より選択される低分子阻害剤である、本発明1017の方法。

[本発明1019]

ガストリン、B27、N2、およびN-アセチルシステインの群からの1つまたは複数、好ましくは、2つ、3つ、または全てが基本培地に加えられる、本発明1013～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

上皮幹細胞および/または単離された組織断片を、EGF、BMP阻害剤、R-スポンジン、およびWntが加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地において培養し；その後、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2もしくはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ニコチンアミド、ならびに好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1もしくはR-スポンジン4が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地において培養し；その後、EGF、FGF、および/もしくはHGF、TGF- β 阻害剤、ならびにNotch阻害剤が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地において培養する工程を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1021]

肝臓オルガノイドが、Lgr5を発現する単一細胞から生じる、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1022]

フィーダー細胞を含まない、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1023]

Lgr5、Hnf1 α 、およびHnf4のうちの1つまたは複数のマーカーの、有意なレベルでの天然発現を特徴とする、成体肝臓幹細胞の集団。

[本発明1024]

成体肝臓幹細胞がヒト成体肝臓幹細胞である、本発明1023の成体肝臓幹細胞集団。

[本発明1025]

本発明1001～1021のいずれかの方法によって得られた、本発明1023または本発明1024の成体肝臓幹細胞集団。

[本発明1026]

本発明1023、1024、または1025のタイプの細胞を少なくとも1種類含む、肝臓オルガノイド。

[本発明1027]

少なくとも1種類の肝細胞および少なくとも1種類の胆管細胞をさらに含む、本発明1026の肝臓オルガノイド。

[本発明1028]

以下のマーカーのうちの少なくとも1つを発現する、本発明1026または1027のいずれかの肝臓オルガノイド：

肝細胞マーカー、例えば、アルブミン、B-1インテグリン、トランスサイレトリン(transferrin)、およびグルタミンシンターゼ；ならびに/または少なくとも1つの胆管細胞マーカー、例えば、セラチン7および19。

[本発明1029]

少なくとも 1×10^3 個の細胞～ 5×10^4 個の細胞、例えば、少なくとも 1×10^3 個の細胞～ 5×10^3 個の細胞の集団を含む、本発明1026～1028のいずれかの肝臓オルガノイド。

[本発明1030]

嚢胞構造と、その外側にある、少なくとも1つの芽および中心管腔を有する細胞層とを含む、本発明1026～1029のいずれかの肝臓オルガノイド。

[本発明1031]

以下の特徴のうちの1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、4つ、または5つ全て)を有する、本発明1026～1030のいずれかの肝臓オルガノイド:

(a) $>5 \times 10^5$ 細胞/cm³、好ましくは $>10 \times 10^5$ 細胞/cm³の細胞密度を有すること; (b)2～30層の細胞層に相当する厚み、好ましくは、2～15層の細胞層に相当する厚みを有すること; (c)細胞が三次元で相互に接触し、(d)健康な肝臓組織に固有の機能を示し、(e)2つの規定されたドメインを有する細長い形状を有すること。

10

[本発明1032]

アルブミンを分泌することができる、本発明1023～1031のいずれかの細胞集団またはオルガノイド。

[本発明1033]

尿素を分泌する、本発明1023～1032のいずれかの細胞集団またはオルガノイド。

[本発明1034]

目に見えるグリコーゲン貯蔵を示す、本発明1023～1033のいずれかの細胞集団またはオルガノイド。

[本発明1035]

誘導性チトクロムP450活性を有する、本発明1023～1034のいずれかの細胞集団またはオルガノイド。

20

[本発明1036]

形態学的に細胞が肝細胞様に見える、本発明1023～1035のいずれかの細胞集団またはオルガノイド。

[本発明1037]

細胞外マトリックスと接触している、本発明1023～1036のいずれかの肝臓オルガノイド。

[本発明1038]

少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月間、少なくとも8ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも15ヶ月間、少なくとも20ヶ月間、少なくとも24ヶ月間またはそれ以上培養することができる、本発明1023～1037のいずれかの肝臓オルガノイド。

30

[本発明1039]

幹細胞シグネチャー遺伝子であるLGR4、TACSTD1/Epcam、CD44、SOX9、SP5、CD24、PROM1、CDCA7、およびELF3のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、本発明1023～1038のいずれかのヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

[本発明1040]

リプログラミング遺伝子であるKLF4、MYC、POU5F1、およびSOX2のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、本発明1023～1039のいずれかのヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

40

[本発明1041]

肝細胞/胆管細胞特異的遺伝子であるHNF1A、HNF1B、HNF4A、HHEX、ONECUT1、ONECUT2、PROX1、CDH1、FOXA2、GATA6、FOXM1、CEBPA、CEBPB、CEBPD、CEBPG、GLUL、KRT7、KRT19、およびMETのうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、本発明1023～1040のいずれかのヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

[本発明1042]

肝細胞/胆管細胞特異的遺伝子であるNEUROG2、IGF1R、およびCD34、AFP、GCG、およびPTF1Aのうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現しない、例えば、NEUROG2、IGF1R、およびCD34を発現しない、本発明1023～1041のいずれかのヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

50

[本発明1043]

肝細胞特異的遺伝子であるTTR、ALB、FAH、TAT、CYP3A7、APOA1、HMGCS1、PPARG、CYP2B6、CYP2C18、CYP2C9、CYP2J2、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP4F8、CYP4V2、およびSCARB1のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てを発現する、本発明1023～1042のいずれかのヒト肝臓細胞集団またはヒト肝臓オルガノイド。

[本発明1044]

創薬スクリーニング、毒性アッセイ、または再生医療における、本発明1023～1043のいずれかの肝臓オルガノイドの使用。

[本発明1045]

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、

ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、およびN-アセチルシステイン；ならびに好ましくは、

BMP阻害剤；ならびに

Wntアゴニスト

が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む、細胞培地。

[本発明1046]

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、ならびに好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1および/またはWnt-3aが加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む、細胞培地。

[本発明1047]

HGFをさらに含む、本発明1046の細胞培地。

[本発明1048]

EGF、FGF、および/もしくはHGF、TGF- β 阻害剤、ならびにNotch阻害剤が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる、細胞培地。

[本発明1049]

上皮幹細胞または単離された組織断片を細胞外マトリックス上で培養するための、本発明1045～1048のいずれかの培地の使用。

[本発明1050]

肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための、本発明1049の使用。

[本発明1051]

肝臓におけるWntシグナル伝達を刺激する工程を含む、肝臓を再生するための、またはLgr5を発現する細胞を得るための方法。

[本発明1052]

肝臓の障害、状態、または疾患の治療において使用するための、本発明1023～1043のいずれかの肝臓オルガノイドまたは細胞集団。

[本発明1053]

肝臓の障害、状態、または疾患を治療する方法であって、それを必要とする患者に、本発明1023～1043のいずれかの細胞集団または肝臓オルガノイドを投与する工程を含む前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】肝臓オルガノイド増殖因子の必要条件。(A)FGF10、HGF、およびニコチンアミドが添加された、EGF(E)、R-スポンジン1(R)、Noggin(N)、Wnt3A条件培地(W)、またはこれらの組み合わせを用いて維持された肝臓オルガノイドのDIC画像。

【図1B】肝臓オルガノイド増殖因子の必要条件。(B)オルガノイドの数を毎週数え、必要に応じて継代した。結果を3回の独立した実験の平均 $\pm$ SEMとして示した。

【図1C】肝臓オルガノイド増殖因子の必要条件。(C)Lgr5、ケラチン7(K7)、およびアル

10

20

30

40

50

ブミン (Alb) 遺伝子の RTPCR による遺伝子発現分析。

【図 1 D】肝臓オルガノイド増殖因子の必要条件。(D) 単離された胆管はオルガノイドに増殖する。播種後、対応する日からの微分干渉画像。倍率 10x (0 日目、1 日目、3 日目、および 5 日目)。15 日目、倍率 4x。4~7 日ごとに機械的解離により培養物を継代した。培養物は少なくとも 8 ヶ月間、増殖された。

【図 2 A】肝臓オルガノイドの形態。(A) 上パネル: 異なるドメイン (PT=門脈三管、CV=中心静脈) を示したマウス肝臓のパラフィン切片。下パネル: 異なるドメイン b (単層上皮) および h (重層上皮) を示した肝臓オルガノイドのパラフィン切片。

【図 2 B】肝臓オルガノイドの形態。(B) 右パネル: 肝臓オルガノイドにおける E カドヘリン染色。2 つの異なるドメインを特定することができる。ドメイン b、肝臓内の胆管構造に似た単層上皮により形成される。この胆管ドメインは、パンサイトケラチン (PCK) 陽性染色を示す高度に極性化した細胞により形成される (下パネル)。左パネルは、肝臓オルガノイド内の第 2 のドメインの存在を示す。この h ドメインは、極性化していない細胞を有する重層上皮によって形成される。細胞は中心管腔周囲に組織化され、肝細胞マーカー Alb を発現する。倍率 10x。

【図 3】肝臓培養物における Wnt シグナル伝達。Lgr5-LacZ マウスまたは Axin2LacZ マウスに由来する培養物において LacZ 発現が検出された。B16 マウスに由来する肝臓培養物において陽性染色は検出されなかった。倍率 4x、挿入図 20x。

【図 4】肝臓分化マーカーの発現。(A) 胆管細胞マーカーケラチン 7 (K7) ならびに肝細胞マーカーケラチン 8 (K8) およびアルブミン (Alb) の発現の免疫組織化学分析および免疫蛍光分析。(B) 肝細胞マーカー: アルブミン (Alb)、トランスサイレトリン (Ttr)、グルタミシンテターゼ (Glu1)、グルコース 6 ホスファターゼ (G6P)、およびチトクロム p450 アイソフォーム 3A11 (CYP3A11); ならびに胆管細胞マーカーケラチン 7 (K7) およびケラチン 19 (K19) の遺伝子発現の分析。

【図 5 A】肝臓単一細胞培養物。(A) 分取細胞の面積を示すフローサイトメトリープロット。

【図 5 B】肝臓単一細胞培養物。(B) 示された時点におけるオルガノイドに増殖した単一細胞。倍率 40x (1~3 日目)、10x (16 日目)、4x (21 日目-on)。

【図 5 C】肝臓単一細胞培養物。(C および D) Lgr5GFP 単一分取細胞のコロニー形成効率の代表的な画像。100 個の細胞を 3 回繰り返して播種し、10 日後にコロニーを計数した。

【図 5 D】肝臓単一細胞培養物。(C および D) Lgr5GFP 単一分取細胞のコロニー形成効率の代表的な画像。100 個の細胞を 3 回繰り返して播種し、10 日後にコロニーを計数した。

【図 6】肝臓培養物のマイクロアレイ分析。成体肝臓組織、ならびに ER 培地、または Noggin が添加された ER 培地 (ENR) もしくは noggin および Wnt が添加された ER 培地 (ENRW) において 1 ヶ月維持された肝臓オルガノイド培養物の遺伝子発現プロファイルの分析。異なる試料間での遺伝子プロファイル、褐色脂肪組織 (BAT)、白色脂肪組織 (WAT)、筋肉、および新生児肝臓の遺伝子プロファイルを比較した。(A) 培養物が成体肝臓に似たプロファイルを提示するが、筋肉および BAT および WAT などの非肝臓関連組織とは異なるプロファイルを提示することを示すヒットマップ (hit map) 分析。(B) 異なる条件における肝細胞マーカーおよび胆管細胞マーカーのリスト。

【図 7】マウス肝臓オルガノイド培養物は長期間培養後に安定した核型を示す。A-24 ヶ月間にわたって、FGF10、HGF、およびニコチンアミドが添加された、EGF (E) および R-スポンジン 1 (R) において維持された肝臓オルガノイドの DIC 画像 (左図、ER)、または Noggin (N) および Wnt3A 条件培地 (W) が添加された同じ組み合わせにおいて維持された肝臓オルガノイドの DIC 画像 (右図、ENRW)。B-培養状態で 8 ヶ月後のマウス肝臓オルガノイドの核型分析。正常な染色体数 (n=40、左パネル図) および典型的な肝細胞の特徴である倍数性 (n=80、右パネル図) が見出された。

【図 8 A】補助因子である FGF10、HGF、およびニコチンアミド; 増殖および分化に対する影響。A-肝芽細胞から成熟肝細胞まで 3 種類の肝臓発生段階の間に異なって発現した遺伝子を示した図。

10

20

30

40

50

【図 8 B】補助因子であるFGF10、HGF、およびニコチンアミド；増殖および分化に対する影響。B-使用したプロトコルを示した図。実験の2日前に、培養物を、拡大培地EM2(ERFHNic: FGF10、HGF、およびニコチンアミドが添加された、EGF(E)およびR-スポンジン1(R)；図8BにおいてERFHNicを「ER」と示した)に播種した。2日後に、培地を、EGF(E)のみ、または本文に示した濃度のFGF10(F)もしくはHGF(H)もしくはニコチンアミド(Nic)もしくはこれらの組み合わせから選択されるさらなるサプリメントを含む、もしくは含まない、R-スポンジン1(ER)が添加されたEGFと交換した。5日後に、培養物をスプリットし、それぞれの条件について1:4比で再プレートした。これらの条件下で、培養物は計10週間にわたって7日ごとにスプリットされ、再プレートされた。

【図 8 C】補助因子であるFGF10、HGF、およびニコチンアミド；増殖および分化に対する影響。C-試験したそれぞれの培養条件において最初にスプリットした後の最初の日。結果から、少なくとも1継代を実現するためには、FGF10またはHGFまたはニコチンアミドまたはこれらの組み合わせと組み合わせたEGFおよびR-スポンジン1は必須であることが分かる。

10

【図 8 D】補助因子であるFGF10、HGF、およびニコチンアミド；増殖および分化に対する影響。D-長期間培養後に、FNicが添加されたERまたはFHNicが添加されたERの組み合わせによって継代数が増える。継代10後に、3種類の補助因子を含む培養条件；ERFHNicの増殖速度の方が優れている(図15A、B)。

【図 8 E】補助因子であるFGF10、HGF、およびニコチンアミド；増殖および分化に対する影響。E-ある特定の因子を除去して5日後の、異なる肝細胞マーカー(CYP3A11、Alb、FAH)および胆管細胞マーカー(K19)および幹細胞マーカーIGR5の発現を示したRT-PCR分析(出発点はERFHNicであった)。条件EFだけが、試験した全ての肝細胞マーカーの発現を示したことに留意のこと。遺伝子発現を標準化するためにハウスキーピング遺伝子としてHPRTを使用した。

20

【図 9】3つの異なる肝臓培養条件に由来する細胞および成体肝臓組織における異なる肝細胞特異的転写因子および胆管細胞特異的転写因子の定量を示した表。Notchシグナル伝達経路およびTGF- β シグナル伝達経路の重要な成分の発現も示した。E=EFHNic、ER=ERFHNic、ENRW=ENRWFNic。

【図 10 A】分化プロトコル。A-使用したプロトコルを示した図。実験の2日前に、培養物を拡大培地(ERFHNic: FGF10、HGF、およびニコチンアミドが添加された、EGF(E)およびR-スポンジン1(R)；図10AにおいてERFHNicを「ER」と示した)に播種した。2日後に、培地を、示した濃度のA8301(A)、またはDAPT(D)、またはFGF10(F)、またはHGF(H)、またはニコチンアミド(Nic)、またはR-スポンジン1(R)、またはWnt3A、またはNoggin(N)、またはこれらの組み合わせが添加されたEGF(E)と交換した。いくつかの時点でRNAを単離した。マウス肝臓組織を正の対照(+)とみなしたのに対して、水を負の対照(-)とみなした。

30

【図 10 B】分化プロトコル。B-分化条件の7日後の肝細胞マーカーCYP3A11、Alb、FAH、tbx3、TAT、およびGckの発現を示したRT-PCR分析。条件EADFだけが、試験した全ての肝細胞マーカーの発現を示したことに留意のこと。遺伝子発現を標準化するためにハウスキーピング遺伝子としてHPRTを使用した。

【図 10 C】分化プロトコル。C-分化条件後の時間経過発現分析。分化させて2日後、5日後、および8日後に、肝細胞マーカーCYP3A11、Alb、FAH、および胆管細胞マーカーK19の発現をRTPCRによって分析した。肝臓マーカーCYP3A11およびFAHの発現は5日目から始まり、8日目にピークに達することに留意のこと。遺伝子発現を標準化するためにハウスキーピング遺伝子としてHPRTを使用した。A; A8301、D; DAPT、F; FGF10、H; HGF、De; デキサメタゾン。

40

【図 10 D】分化プロトコル。D-異なる濃度の分化化合物AおよびDの7日後の肝細胞マーカーCYP3A11、Alb、FAH、tbx3、TAT、G6P、およびGckの発現を示した滴定実験。遺伝子発現を標準化するためにハウスキーピング遺伝子としてHPRTを使用した。

【図 10 E】分化プロトコル。E-肝臓マーカーK19、アルブミンおよび肝細胞表面マーカーの免疫蛍光染色。ヘキストを用いて核を染色した。

50

【図10F】分化プロトコール。F-Albcreert2LacZマウス肝臓由来オルガノイドにおけるXgal染色。タモキシフェンによって誘導されたAlbcreert2LacZ由来培養物におけるEADF分化後に、アルブミン陽性細胞(矢印)が検出された。

【図11】ERFHNic培養条件下でのヒト由来肝臓培養物。

【図12】生理学的条件下での、または損傷後、再生中のWntシグナル伝達刺激に対する肝臓応答。A:Axin2LacZマウスにおけるLgr5リガンドR-スポンジン1の注射は、肝臓細胞がWnt刺激に応答することを示す(矢印はX-gal陽性細胞を示す)。Lgr5発現は無かった。そのため、本発明者らは、応答を開始するのにLgr4が用いられたと仮説を立てている。B:Axin2LacZマウスにおけるCCL4注射は、再生中にWntシグナル伝達に対する応答が活性化されたことを示している。

10

【図13A】肝臓損傷後のLgr5アップレギュレーション-再生モデル。成体Lgr5-LacZ KIマウスに0.8ml/kgの肝毒性化合物CCL4を注射した。写真は、注射されなかった(未損傷の)肝臓では、管を裏打ちする細胞にしかWnt経路が活発でなかったことを示している。CCL4による損傷後、管を裏打ちしない細胞も、活性化されたWnt経路を有する。A-CCL4損傷肝臓におけるLgr5のアップレギュレーションを示した時間経過実験(矢印はx-gal陽性細胞を示す)。対照CCL4注射WTマウスおよびプラセボ注射Lgr5LacZKiマウスは染色を示さなかった(右側パネル)。

【図13B】肝臓損傷後のLgr5アップレギュレーション-再生モデル。成体Lgr5-LacZ KIマウスに0.8ml/kgの肝毒性化合物CCL4を注射した。写真は、注射されなかった(未損傷の)肝臓では、管を裏打ちする細胞にしかWnt経路が活発でなかったことを示している。CCL4による損傷後、管を裏打ちしない細胞も、活性化されたWnt経路を有する。B-肝臓マーカ

20

ーとのLgr5共染色。

【図14】単離された胆管のK19染色。Lgr5LacZ管の単離。K19染色は、単離および播種された構造が実際に肝内胆管であることを裏付けている。

【図15】増殖因子の必要条件。3種類の補助因子(FGF10、HGF、およびニコチンアミド)は肝臓培養物の長期間の自己維持に必須である。長期間培養後に、FNicを含むER(\$)またはERFHNic(\$\$)の組み合わせによって継代数が増える。継代10の後、3種類の補助因子;ERFHNicを含む培養条件の増殖速度の方が優れている(図16Bを参照されたい)。

【図16A】分化条件下でのマウス肝臓オルガノイドの遺伝子発現プロファイルは成体肝臓プロファイルおよび新生児肝臓プロファイルに似ている。A-分化条件EADFと成体肝臓または新生児肝臓との間で、(a)同じように発現している遺伝子または(b)同じように停止している遺伝子を示した遺伝子クラスター。

30

【図16B】分化条件下でのマウス肝臓オルガノイドの遺伝子発現プロファイルは成体肝臓プロファイルおよび新生児肝臓プロファイルに似ている。B-(a)肝臓オルガノイドと成体肝臓または新生児肝臓との間で異なって発現している遺伝子、および(b)EADFと新生児肝臓との間で同じように発現している遺伝子を示した遺伝子クラスター。

【図16C】分化条件下でのマウス肝臓オルガノイドの遺伝子発現プロファイルは成体肝臓プロファイルおよび新生児肝臓プロファイルに似ている。C-成体肝臓、成体膵臓、拡大培地中の膵臓オルガノイドおよび肝臓オルガノイドにおける、選択された胆管マーカー、Ngn3発現に必要な転写因子、および内分泌マーカーの発現レベルを比較したマイクロアレイ分析からのシグナル生データ。

40

【図17A】肝臓疾患マウスモデルへの細胞の移植。オルガノイドをマウスモデル:成体FGRマウス(FAH-/-RAG-/-IL2R-/-)に移植した。対照としてマウスに肝細胞を移植した。A-肝臓オルガノイドに由来するK19陽性細胞(左上パネル)およびFah陽性細胞(真ん中のパネル)をFAHノックアウトマウスに移植した。肝細胞が移植された対照(右上パネル)。下のフローサイトメトリープロットは、陽性FAH移植肝細胞を生じた群において肝細胞陽性細胞の%が高かったことを示す。

【図17B】肝臓疾患マウスモデルへの細胞の移植。オルガノイドをマウスモデル:成体FGRマウス(FAH-/-RAG-/-IL2R-/-)に移植した。対照としてマウスに肝細胞を移植した。C-移植細胞のフローサイトメトリー分析。(C)Lgr5-GFPマウスから得られたクローン1。肝細胞

50

胞表面マーカーは、大きな細胞および高顆粒細胞、すなわち、成熟肝細胞の表現型を表す細胞を含む陽性亜集団を示す。

【図17C】肝臓疾患マウスモデルへの細胞の移植。オルガノイドをマウスモデル:成体FGRマウス(FAH^{-/-}RAG^{-/-}IL2R^{-/-})に移植した。対照としてマウスに肝細胞を移植した。D-移植細胞のフローサイトメトリー分析。(D)Lgr5-lacZマウスから得られたクローン2。肝細胞表面マーカーは、大きな細胞および高顆粒細胞、すなわち、成熟肝細胞の表現型を表す細胞を含む陽性亜集団を示す。

【図17D】肝臓疾患マウスモデルへの細胞の移植。オルガノイドをマウスモデル:成体FGRマウス(FAH^{-/-}RAG^{-/-}IL2R^{-/-})に移植した。対照としてマウスに肝細胞を移植した。E-移植計画。

【図18】マウス肝臓シグネチャー遺伝子。a)マウス肝臓幹細胞において発現しているマーカー; b)マウス肝臓幹細胞において発現していないマーカー; c)拡大培地中のマウス肝臓オルガノイドのマウス肝臓幹細胞シグネチャーにおいて発現している肝細胞マーカーおよび胆管細胞マーカー; d)拡大培地中のマウス肝臓オルガノイドのマウス肝臓幹細胞シグネチャーにおいて発現していない肝細胞マーカーおよび胆管細胞マーカー; e)マウス肝臓オルガノイドにおいて発現しているリプログラミング遺伝子; f)マウス肝臓オルガノイドにおいて発現していないリプログラミング遺伝子を示した表。結果は、参照RNAとしてUniversal Mouse Reference RNA(Stratagene, カタログ番号740100)を用いた肝臓マイクロアレイを用いて得られた。検出された絶対数が100未満であれば、遺伝子を未検出とみなした。

【図19-1】ヒト肝臓シグネチャー遺伝子。ヒトオルガノイドの肝臓マイクロアレイの結果を示した表。左から右にかけて、a)拡大培地EM1、b)拡大培地EM2、c)分化培地、d)成体肝臓の結果を示した。左の4つの縦列にある数字(log2)は、試料と、全てのアレイに用いられた参照(市販)RNA試料を比較した結果である。参照試料に存在するRNAと比較した、それぞれの試料におけるmRNAの相対発現を示した。使用した参照RNAは、Universal Human Reference RNA(Stratagene, カタログ番号740000)であった。従って、これらの縦列にあるマイナスの数字は真の発現レベルと関係がなく、そのRNAの発現レベルが参照試料中のRNAの発現レベルより少ないことを意味しているのに過ぎない。右側にある4つの縦列は絶対数である。絶対数が100未満であれば、未検出とみなした。

【図19-2】ヒト肝臓シグネチャー遺伝子。ヒトオルガノイドの肝臓マイクロアレイの結果を示した表。左から右にかけて、a)拡大培地EM1、b)拡大培地EM2、c)分化培地、d)成体肝臓の結果を示した。左の4つの縦列にある数字(log2)は、試料と、全てのアレイに用いられた参照(市販)RNA試料を比較した結果である。参照試料に存在するRNAと比較した、それぞれの試料におけるmRNAの相対発現を示した。使用した参照RNAは、Universal Human Reference RNA(Stratagene, カタログ番号740000)であった。従って、これらの縦列にあるマイナスの数字は真の発現レベルと関係がなく、そのRNAの発現レベルが参照試料中のRNAの発現レベルより少ないことを意味しているのに過ぎない。右側にある4つの縦列は絶対数である。絶対数が100未満であれば、未検出とみなした。

【図19-3】ヒト肝臓シグネチャー遺伝子。ヒトオルガノイドの肝臓マイクロアレイの結果を示した表。左から右にかけて、a)拡大培地EM1、b)拡大培地EM2、c)分化培地、d)成体肝臓の結果を示した。左の4つの縦列にある数字(log2)は、試料と、全てのアレイに用いられた参照(市販)RNA試料を比較した結果である。参照試料に存在するRNAと比較した、それぞれの試料におけるmRNAの相対発現を示した。使用した参照RNAは、Universal Human Reference RNA(Stratagene, カタログ番号740000)であった。従って、これらの縦列にあるマイナスの数字は真の発現レベルと関係がなく、そのRNAの発現レベルが参照試料中のRNAの発現レベルより少ないことを意味しているのに過ぎない。右側にある4つの縦列は絶対数である。絶対数が100未満であれば、未検出とみなした。

【図19-4】ヒト肝臓シグネチャー遺伝子。ヒトオルガノイドの肝臓マイクロアレイの結果を示した表。左から右にかけて、a)拡大培地EM1、b)拡大培地EM2、c)分化培地、d)成体肝臓の結果を示した。左の4つの縦列にある数字(log2)は、試料と、全てのアレイに用

いられた参照(市販)RNA試料を比較した結果である。参照試料に存在するRNAと比較した、それぞれの試料におけるmRNAの相対発現を示した。使用した参照RNAは、Universal Human Reference RNA(Stratagene, カタログ番号740000)であった。従って、これらの縦列にあるマイナスの数字は真の発現レベルと関係がなく、そのRNAの発現レベルが参照試料中のRNAの発現レベルより少ないことを意味しているのに過ぎない。右側にある4つの縦列は絶対数である。絶対数が100未満であれば、未検出とみなした。

【図19-5】ヒト肝臓シグネチャー遺伝子。ヒトオルガノイドの肝臓マイクロアレイの結果を示した表。左から右にかけて、a)拡大培地EM1、b)拡大培地EM2、c)分化培地、d)成体肝臓の結果を示した。左の4つの縦列にある数字(log2)は、試料と、全てのアレイに用いられた参照(市販)RNA試料を比較した結果である。参照試料に存在するRNAと比較した、それぞれの試料におけるmRNAの相対発現を示した。使用した参照RNAは、Universal Human Reference RNA(Stratagene, カタログ番号740000)であった。従って、これらの縦列にあるマイナスの数字は真の発現レベルと関係がなく、そのRNAの発現レベルが参照試料中のRNAの発現レベルより少ないことを意味しているのに過ぎない。右側にある4つの縦列は絶対数である。絶対数が100未満であれば、未検出とみなした。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の説明

第1の局面において、本発明は、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法であって、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、ならびに好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、またはR-スポンジン4、および/またはWnt-3aが加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む前記方法を提供する。好ましくは、HGFも添加される。

【0017】

例えば、1つの態様において、本発明は、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法であって、BMP阻害剤、Wntアゴニスト、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、ならびにN-アセチルシステインが加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む前記方法を提供する。

【0018】

驚いたことに、本発明の方法は、未分化表現型および自己維持能を保持する幹細胞の存在を保ちながら、上皮幹細胞および/または前記幹細胞を含む肝臓から単離された断片の培養を可能にすることが本発明者らによって発見された。さらに驚くべきことは、本発明の方法は、幹細胞ニッチの非存在下で、単離された単一の上皮幹細胞を肝臓オルガノイドに成長できるという観察であった。

【0019】

幹細胞は成体ヒトおよびマウスの多くの臓器において見られる。個々の組織において成体幹細胞の正確な特徴には大きなばらつきがあり得るが、成体幹細胞は、少なくとも、以下の特徴を共有する：成体幹細胞が未分化表現型を保持していること；成体幹細胞の子孫が、関連組織に存在する全ての系列に分化できること；成体幹細胞が生涯を通じて自己複製能を保持していること、および成体幹細胞が損傷後に関連組織を再生できること。幹細胞は、幹細胞ニッチという特殊な場所に存在する。幹細胞ニッチは、前記幹細胞集団の維持のための適切な細胞間接触およびシグナルを提供する。

【0020】

上皮幹細胞は、上皮を構成する特異な細胞タイプを形成することができる。皮膚または

腸などの上皮の中には急速な細胞交替を示すものもある。このことは、存在する幹細胞が連続して増殖していなければならないことを示している。肝臓または膵臓などの他の上皮は正常条件下では非常にゆっくりとした交替を示す。

【0021】

肝臓上皮幹細胞の単離は多くの異なるプロトコールによって行うことができる。本発明者らは特定の理論に拘束されたくはないが、組織損傷時に肝臓再生を担う幹細胞集団が肝臓内に存在すると本明細書において仮説を立てた。この損傷に応答した再生を担う細胞集団は活性化されるとマーカーLgr5を発現すると考えられる。

【0022】

肝臓損傷をシミュレートするためにLgr5-LacZノックインマウスに肝毒性化合物CCl4を注射することによって、本発明者らは、肝臓損傷が、肝臓の活発な再生部位においてLgr5発現を誘導することを初めて証明した(実施例4を参照されたい)。本発明者らはまた、WntアゴニストであるR-スポンジンを注射すると、胆管においてWntシグナル伝達発現がアップレギュレーションされることも示した。本発明者らは特定の理論に拘束されたくはないが、肝臓損傷後に、再生幹細胞/前駆体がWntシグナル伝達によって活性化され得ると本明細書において仮説を立てた。次に、Lgr5陽性細胞は、本明細書に記載のように必要に応じて肝臓/肝臓断片から単離することができる。従って、本発明は、肝臓損傷を誘導する工程を含む、またはWntシグナル伝達を刺激することによって、例えば、R-スポンジンを用いてWntシグナル伝達を刺激することによって、肝臓からLgr5+細胞を得る/単離するための方法を提供する。これは、一部の態様では、Lgr5+細胞が、肝臓オルガノイドをインビトロで得るための出発点であるので有用である(本発明の培地の使用は、R-スポンジンなどのWntアゴニストの添加によってLgr5+細胞の発生を可能にし、そのため、本発明を実施するために肝臓からLgr5+細胞を得ることは必須でない)。この方法によって得られたLgr5+細胞も提供される。一部の態様において、このような細胞は、好ましくは、星状細胞、例えば、SMAのマーカーを発現しない。その代わりに、このような細胞は、好ましくは、1種類または複数種の肝臓前駆体マーカーまたは幹細胞マーカー、例えば、Sox9を発現する。好ましくは、1種類または複数種の肝臓前駆体マーカーまたは幹細胞マーカー、例えば、Sox9の発現は成体肝臓と比較して前記細胞においてアップレギュレートされる。

【0023】

本発明はまた、Wntシグナル伝達を刺激する工程を含む、肝臓を再生するための方法を提供する。このような方法は肝臓障害の治療において有用であり得る。損傷またはWntシグナル伝達の刺激による肝臓細胞におけるLgr5発現の誘導はインビボで行われてもよく、単離された肝臓内でエキスビボで行われてもよく、肝臓断片または肝臓細胞集団においてインビトロで行われてもよい。Lgr5発現の誘導がエキスビボまたはインビトロで行われる態様において、Lgr5陽性細胞は、それを必要とする患者に、任意の適切な手段によって、例えば、注射または移植によって投与することができる。一部の態様において、移植される細胞は生体適合性マトリックスの中に入れられる。一部の態様において、細胞は、療法において用いられる前にエキスビボで拡大される。

【0024】

本発明の好ましい方法において、前記上皮幹細胞は、肝臓断片または肝臓胆管、より好ましくは胆管組織から単離される。

【0025】

胆管組織を単離するための方法は当業者に公知である。例えば、本明細書において開示される実施例に記載のように、胆管を肝臓から単離することができる。簡単に述べると、成体肝臓組織を、冷(4~10℃)培地、好ましくは、Advanced-DMEM/F12(Invitrogen)で洗浄してもよく、次いで、組織を約5mmの断片に切り刻み、さらに、冷解離緩衝液(コラゲナーゼ、ディスパーゼ、FBSを含むDMEM培地)を用いて洗浄することができる。組織断片を、好ましくは、解離緩衝液と約37℃で約2時間インキュベートする。次いで、10mlピペットを用いて、組織断片を冷(4~10℃)単離緩衝液10ml中で激しく懸濁することができる。好ましくは、死細胞を含有する最初の上清を捨て、好ましくは、解離緩衝液(例えば、10~15m

1)を用いて沈殿物を懸濁する。さらに組織断片を激しく懸濁した後に、上清を胆管の中で濃縮する。このように、胆管を含む懸濁液を得ることができる。胆管を顕微鏡下で収集し、冷培地(DMEM+5~10%FBS)に入れて保持する。少なくとも10~20個の胆管/ウェルが収集されるまで、この手順を繰り返してもよい。次いで、単離された胆管を沈殿させてもよい。単離された胆管を、好ましくは、20個の胆管/ウェルのおおよその比でマトリゲル50ulに播種する。

【0026】

短期間でコンフルエンスになるまで増殖した後に死滅する成熟肝細胞とは対照的に、本発明に従って単離された肝臓上皮幹細胞は無期限に自己複製および増殖する。自己複製細胞集団は表面上にLgr5を発現することができる細胞であると分かっている。Lgr5陰性細胞は自己複製しない。「自己複製」という用語は、本発明の細胞の元々の増殖特性および分化特性を維持しながら、細胞がそれ自身で再生する能力を表すと理解されるはずである。このような細胞は分裂によって増殖してクローンを形成し、このクローンはさらに分裂してクローンになり、従って、外部介入なく、分化能が制限された細胞に進化することなく細胞集団のサイズを拡大する。

【0027】

好ましい方法は、本発明による肝臓幹細胞が表面上にLgr5および/またはLgr6を発現するという事実に基づく。これらのタンパク質はラージGタンパク質共役受容体(GPCR)スーパーファミリーに属する(例えば、W02009/022907を参照されたい。この内容はその全体が本明細書に組み入れられる)。Lgrサブファミリーは、リガンド結合に重要な大きなロイシンリッチ外部ドメインを有する点で独特である。従って、好ましい方法は、前記のように前記上皮組織から細胞懸濁液を調製する工程、前記細胞懸濁液をLgr5および/またはLgr6に結合する化合物(例えば、抗体)と接触させる工程、Lgr5および/またはLgr6に結合する化合物を単離する工程、ならびに前記結合化合物から幹細胞を単離する工程を含む。

【0028】

上皮幹細胞を含む単一細胞懸濁液は、単離された胆管から機械的に作製されることが好ましい。このように、機械的破碎によって作製された小さなオルガノイド断片は、好ましくは、約1:6の比にスプリットされる。必要に応じて、このような断片は、短時間(2分間または3分間だけ)、トリプシン中で約1:2に希釈してインキュベートすることができる。この段階において、トリプシン処理された上皮幹細胞はかなり低い生存率をも生じることが分かっている。すなわち、複数の細胞が細胞1つ1つにスプリットされるのであれば、Lgr5を発現する細胞だけが生き残る。この画分はかなり少ない(全細胞集団の約12%)。

【0029】

好ましいLgr5および/またはLgr6に結合する化合物は、Lgr5またはLgr6いずれかの細胞外ドメインを特異的に認識および結合する抗体、例えば、モノクローナル抗体、例えば、マウスモノクローナル抗体およびラットモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体(例えば、W02010/016766を参照されたい。この内容はその全体が本明細書に組み入れられる)を含む。このような抗体を使用すると、例えば、当業者に明らかなように磁気ビーズの助けを借りて、または蛍光標識細胞分取によって、Lgr5および/またはLgr6を発現する幹細胞を単離することができる。本発明の方法を使用すると、Lgr5および/またはLgr6を発現する単一細胞の単離、ならびにLgr5および/またはLgr6を発現する単一細胞への本発明の方法の適用が可能になる。従って、単一細胞から肝臓オルガノイドを得ることができる。

【0030】

幹細胞ニッチ

単離された幹細胞は、好ましくは、前記幹細胞が天然に存在する細胞ニッチを少なくとも部分的に模倣する微小環境において培養される。この細胞ニッチは、幹細胞運命を制御する重要な調節シグナルである生体材料、例えば、マトリックス、スキャフォールド、および培養基の存在下で前記幹細胞を培養することによって模倣することができる。このような生体材料は、天然生体材料、半合成生体材料、および合成生体材料、ならびに/また

はその混合物を含む。スキャフォールドは二次元ネットワークまたは三次元ネットワークを提供する。このようなスキャフォールドに適した合成材料は、多孔性固体、ナノファイバー、およびヒドロゲル、例えば、自己組織化ペプチドを含むペプチド、リン酸ポリエチレングリコールからなるヒドロゲル、フマル酸ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリ酢酸セルロース、および/またはそのコポリマー(例えば、Saha et al., 2007. Curr Opin Chem Biol. 11(4):381-387; Saha et al., 2008. Biophysical Journal 95:4426-4438; Little et al., 2008. Chem. Rev 108, 1787-1796を参照されたい)より選択されるポリマーを含む。当業者に公知のように、例えば、スキャフォールドの弾力性などの機械的特性は、幹細胞の増殖、分化、および移動に影響を及ぼす。好ましいスキャフォールドは、例えば、組織再生および/または創傷治癒を促進するために、対象における移植後に天然成分によって交換される生分解性(コ)ポリマーを含む。前記スキャフォールドは、対象における移植後の免疫原性応答を実質的に誘導しないことがさらに好ましい。前記スキャフォールドには、幹細胞の増殖および/または分化および/または移動に必要なシグナルを供給する、天然リガンド、半合成リガンド、または合成リガンドが添加される。好ましい態様において、前記リガンドは明確なアミノ酸断片を含む。前記合成ポリマーの例は、Pluronic(登録商標)F127ブロック共重合体界面活性剤(BASF)およびEthisorb(登録商標)(Johnson and Johnson)を含む。

【0031】

細胞ニッチは、幹細胞および周囲細胞、ならびにニッチの中にある、これらの細胞によって産生される細胞外マトリックス(ECM)によってある程度決定される。本発明の好ましい方法において、単離された肝臓断片または単離された胆管または上皮幹細胞はECMに取り付けられる。ECMは様々な多糖類、水、エラスチン、および糖タンパク質からなり、糖タンパク質は、コラーゲン、エンタクチン(ニドゲン)、フィブロネクチン、およびラミニンを含む。ECMは結合組織細胞によって分泌される。異なるタイプの糖タンパク質および/または異なる組み合わせの糖タンパク質を含む異なる組成物を含む異なるタイプのECMが公知である。前記ECMは、ECM産生細胞、例えば、線維芽細胞を容器中で培養することによって得ることができ、この後に、これらの細胞が取り出され、単離された肝臓断片または単離された胆管または単離された上皮幹細胞が加えられる。細胞外マトリックス産生細胞の例は、主にコラーゲンおよびプロテオグリカンを生産する軟骨細胞、主にIV型コラーゲン、ラミニン、間質プロコラーゲン、およびフィブロネクチンを生産する線維芽細胞、ならびに主にコラーゲン(I型、III型、およびV型)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、ならびにテネイシン-Cを生産する結腸筋線維芽細胞である。または、前記ECMは市販されている。市販の細胞外マトリックスの例は、細胞外マトリックスタンパク質(Invitrogen)およびEngelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス肉腫細胞に由来する基底膜調製物(例えば、Matrigel(商標)(BD Biosciences))である。合成細胞外マトリックス材料、例えば、ProNectin(SigmaZ378666)が用いられてもよい。所望であれば、細胞外マトリックス材料の混合物が用いられてもよい。幹細胞を培養するためのECMの使用は幹細胞の長期生存を延ばし、未分化幹細胞の途切れることのない存在を強化する。ECMの非存在下では、幹細胞培養物を長期間培養することができず、未分化幹細胞の途切れることのない存在は観察されなかった。さらに、ECMが存在すると三次元組織オルガノイドを培養することができ、ECMの非存在下では三次元組織オルガノイドを培養することができなかった。細胞外マトリックス材料は、通常、細胞培養容器の上にコーティングされるが、(さらに、または代わりに)溶解状態で供給されてもよい。細胞培養容器をコーティングするために、約1mg/ml、または約1 μ g/cm²~約250 μ g/cm²、または約1 μ g/cm²~約150 μ g/cm²のフィブロネクチン溶液が用いられてもよい。一部の態様において、細胞培養容器は8 μ g/cm²~125 μ g/cm²のフィブロネクチンでコーティングされる。

【0032】

本発明の方法において使用するための好ましいECMは、少なくとも2種類の特異な糖タンパク質、例えば、2つの異なるタイプのコラーゲンまたはコラーゲンおよびラミニンを含む。ECMは合成ヒドロゲル細胞外マトリックスでもよく、天然ECMでもよい。さらに好まし

いECMは、ラミニン、エンタクチン、およびコラーゲンIVを含むMatrigel(商標)(BD Biosciences)によって提供される。

【0033】

本明細書の他の場所で述べられるように、本発明の組成物は血清を含んでもよく、無血清でもよく、および/または血清交換が無くてもよい。培地および細胞調製物は、好ましくは、生物製剤についてFDAにより求められる、製品の一貫性を保証するための規格に準拠したGMPプロセスである。

【0034】

培地

本発明の方法において用いられる細胞培地は、本明細書において提供される限定を受ける任意の適切な細胞培地を含む。細胞培地は、典型的には、培養細胞の維持を支援するのに必要な多数の成分を含有する。以下の開示を考慮に入れて、適切な成分組み合わせを容易に処方することができる。一般的に、本発明による培地は、文献および以下に詳述されるように、標準的な細胞培養成分、例えば、アミノ酸、ビタミン、無機塩、炭素エネルギー源、および緩衝液を含む栄養溶液である。

【0035】

本発明の培地は、通常、脱イオン蒸留水に溶解して処方される。本発明の培地は、典型的には、汚染を防ぐために使用前に、例えば、紫外線、加熱、放射線照射、または濾過によって滅菌される。培地は、保管または輸送のために(例えば、 -20°C または -80°C)で凍結されてもよい。培地は、汚染を防ぐために1種類または複数種の抗生物質を含有してもよい。培地のエンドトキシン含有率は0.1エンドトキシン単位/mlでもよく、0.05エンドトキシン単位/ml未満でもよい。培地のエンドトキシン含有率を求めるための方法は当技術分野において公知である。

【0036】

5%~10%CO₂、または少なくとも5%かつ10%CO₂以下、好ましくは、5%CO₂を含む雰囲気中で細胞が培養される間、好ましい細胞培地は、炭酸塩ベースの緩衝液を用いてpH7.4(好ましくは、pH7.2~7.6または少なくとも7.2であり、かつ7.6以下)に緩衝化された明確な合成培地である。

【0037】

当業者であれば、通常の一般的な知識から、本発明の細胞培地中に基本培地として用いられ得る培地のタイプを理解するであろう。潜在的に適した細胞培地は市販されており、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、基礎培地(MEM)、ノックアウト-DMEM(KO-DMEM)、グラスゴー基本培地(G-MEM)、イーグル基礎培地(BME)、DMEM/ハムF12、Advanced DMEM/ハムF12、イスコフ改変ダルベッコ培地および基礎培地(MEM)、ハムF-10、ハムF-12、199培地、ならびにRPMI1640培地を含むが、これに限定されない。

【0038】

好ましい細胞培地は、グルタミン、インシュリン、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびトランスフェリンが添加されたDMEM/F12およびRPMI1640より選択される。さらなる好ましい態様において、無血清培養に最適化され、インシュリンを既に含んでいるAdvanced DMEM/F12またはAdvanced RPMIが用いられる。この場合、前記Advanced DMEM/F12またはAdvanced RPMI培地には、好ましくは、グルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシンが添加される。

【0039】

一部の態様において、基本培地は、Advanced DMEM F12、hepes、ペニシリン/ストレプトマイシン、グルタミン、Nアセチルシステイン、B27、N2、およびガストリンを含む。一部の態様において、N2およびガストリンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを含む基本培地を用いて培養が開始されるが、これらは後で除去される。例えば、一部の態様において、N2およびガストリンおよびペニシリン/ストレプトマイシンは本発明のEM1培地に存在するが、EM2にもDMにも存在しない。例えば、一部の態様において、N2およびガストリンおよびペニシリン/ストレプトマイシンは本発明のEM1およびEM2培地に存在するが、DM

に存在しない。特に好ましい態様において、基本培地は、ペニシリン/ストレプトマイシン、N2、B27、グルタミン、およびガストリンが添加されたAdvanced DMEM/F12またはDMEM変種である。

【0040】

好ましい態様において、基本培地はガストリンを含む。一部の態様において、基本培地はNACおよび/またはB27も含む。

【0041】

前記細胞培地には、精製された増殖因子、天然増殖因子、半合成増殖因子、および/または合成増殖因子が添加され、前記細胞培地は、胎仔ウシ血清またはウシ胎仔血清などの明確に分かっていない成分を含まないことがさらに好ましい。様々な異なる血清交換製剤が市販されており、当業者に公知である。血清交換が用いられる場合には、従来法に従って、培地体積に対して約1%～約30%で使用するすることができる。

【0042】

拡大培地(EM2):

本発明の1つの局面において、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2もしくはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、および好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地が提供される。この培地はEM2と呼ばれる。

【0043】

好ましくは、WntアゴニストはR-スポンジン1である。EGF、R-スポンジン1、FGF、およびニコチンアミドを含む培地は本明細書においてERFHNicと呼ばれる。

【0044】

一部の態様において、EM2培地はnogginを含まず、より好ましくは、BMP阻害剤を含まない。一部の態様において、EM2培地はWnt、例えば、Wnt-3aを含まない。

【0045】

一部の態様において、FGFに加えてHGFが存在する。FGFに加えてHGFを含む好ましい培地は、ERFHNic(EGF+R-スポンジン(好ましくはR-スポンジン1)+FGF(好ましくはFGF10)+HGF+ニコチンアミド)である。本発明者らは、ERFHNic培地が細胞の長期拡大に最適な培地であることを発見した。HGFの非存在下では、細胞は3ヶ月を超えて培養状態で生存しなかった。さらに、HGFの非存在下では10継代後に、低い増殖比によって証明されたように、細胞は、HGFの存在下で培養された細胞と比較して増殖の不利益を示した。特に、15継代後に、HGFの非存在下の細胞はHGFの存在下と同じ速度比でオルガノイドを増殖しなかった。従って、HGFは、長期培養中の良好な増殖速度の維持に極めて重要であることが判明した。従って、本発明は、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、より好ましくは少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月間、少なくとも8ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも15ヶ月間、少なくとも20ヶ月間、少なくとも24ヶ月間、少なくとも25ヶ月間、少なくとも30ヶ月間またはそれ以上、例えば、3年間またはそれ以上、細胞を培養するための本発明のERFHNic培地の使用を提供する。実際には、本発明の一部の態様は、細胞を約20～30回継代するためのE2の使用を含む。例えば、細胞は20～30回、一般的に1週間に1回、スプリットされてもよい。好ましくは、細胞は、1週間に約4倍または1週間に2集団倍化の速度で拡大する。さらに、本発明は、少なくとも10継代、例えば、少なくとも11継代、少なくとも12継代、少なくとも15継代、少なくとも20継代、少なくとも25継代、少なくとも30継代、少なくとも40継代、少なくとも50継代、少なくとも60継代、または15～35継代、例えば、約20～30継代、細胞を培養するための本発明のERFHNic培地の使用を提供する。一部の態様において、TGF- β 阻害剤、例えば、A83-01がEM2培地にさらに存在する。これは、ヒト細胞またはオルガノイドを培養している時に特に有用である。一部の態様において、A83-01は、400～600nM、例えば450～550nM、470～530nM、または約500nMの濃度で存在する。TGF- β 阻害剤がEM2に存在する態様において、好ましくは、Notch阻害剤

10

20

30

40

50

は存在しない。

【0046】

拡大培地(EM1):

1つの局面において、本発明は、EGF、BMP阻害剤、R-スポンジン、およびWntが加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地を提供する。好ましくは、BMP阻害剤はNogginであり、EM1培地は「ENRW」(EGF、Noggin、R-スポンジン、およびWnt)と呼ばれる。この培地はEM1と呼ばれる。本発明者らは、WntおよびNogginを含有する培地が、細胞の初期拡大を刺激するのに理想的であることを発見した。従って、一部の態様において、EM1培地は1継代または1週間しか用いられないが、細胞に有害(farmful)でないので約1年間使用できることも予想される。従って、一部の態様において、EM1培地は、0日目～10日目、例えば、0～7日目、0～6日目、0～5日目、0～4日目、0～3日目、0～2日目、0～1日目に細胞を培養するのに用いられるか、1週間またはそれ以上、例えば、2週間、3週間、4週間またはそれ以上、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月またはそれ以上用いられる。この場合、0日目は、細胞の起源組織から細胞が単離された日であり、1日目は次の日である。一部の態様において、EM1培地は培養の最初の日のみ、または最初の2日間のみ用いられる。一部の態様において、EM1培地は、1継代またはそれ以上、例えば、1継代、2継代、3継代、4継代、5継代、6継代、7継代、8継代、9継代、10継代、15継代、20継代、25継代、30継代またはそれ以上、例えば、20～30継代、用いられる。一部の態様において、EM1培地は、凍結工程後に、または最適な増殖と両立しない培地もしくは温度変化を伴う他の任意の輸送工程後に用いられる。

10

20

【0047】

EM1培地には、FGF、HGF、ニコチンアミド、ガストリン、B27、N-アセチルシステイン、およびN2からなる群より選択される化合物の1つまたは複数が添加される。凍結ストックまたは単一細胞から培養を開始する場合、EM1培地には、好ましくは、ROCK阻害剤が添加される。Y27632は、本発明において使用するための好ましいROCK阻害剤である。

【0048】

従って、1つの態様において、

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2もしくはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、

30

ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、およびN-アセチルシステイン、ならびに好ましくは;

BMP阻害剤、好ましくはNoggin; ならびに

Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1および/もしくはWnt-3a

が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる細胞培地が提供される。

【0049】

前記で定義された培地には、B27(Invitrogen)、N-アセチルシステイン(Sigma)およびN2(Invitrogen)、ガストリン(Sigma)、およびニコチンアミド(Sigma)も加えられ、細胞の増殖を刺激すると考えられている。本発明の文脈においてニコチンアミドは本明細書において「Nic」とも呼ばれる。

40

【0050】

「N2サプリメント」は、Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; カタログ番号17502-048; およびPAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; カタログ番号F005-004; Bottenstein & Sato, PNAS, 76(1):514-17, 1979から入手することができる。N2サプリメントは、500 µg/mlヒトトランスフェリン、500 µg/mlウシインシュリン、0.63 µg/mlプロゲステロン、161 µg/mlブトレシン、および0.52 µg/ml亜セレン酸ナトリウムを含有する100x液体濃縮液としてPAA Laboratories GmbHから供給される。N2サプリメントは濃縮液として培地に加えられてもよく、培地に加えられる前に希釈されてもよい。N2サプリメントは1×最終濃度で用いられてもよく、他の最終濃度で用いられてもよ

50

い。N2サプリメントの使用は、トランスフェリン、インシュリン、プロゲステロン、ブトレシン、および亜セレン酸ナトリウムを本発明の培地に組み込む便利なやり方である。

【0051】

ビオチン、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、ブトレシン、レチノール、酢酸レチニル、亜セレン酸ナトリウム、トリヨードチロニン(T3)、DL- α トコフェロール(ビタミンE)、アルブミン、インシュリン、およびトランスフェリンを含む培地を処方するために、「B27サプリメント」(Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; 現在、カタログ番号17504-044; およびPAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; カタログ番号F01-002; Brewer et al., J Neurosci Res., 35(5):567-76, 1993から入手することができる)が用いられてもよい。B27サプリメントは、成分の中でも特に、ビオチン、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、ブトレシン、レチノール、酢酸レチニル、亜セレン酸ナトリウム、トリヨードチロニン(T3)、DL- α トコフェロール(ビタミンE)、アルブミン、インシュリン、およびトランスフェリンを含有する50x液体濃縮液としてPAA Laboratories GmbHから供給される。これらの成分のうち、少なくともリノレン酸、レチノール、酢酸レチニル、およびトリヨードチロニン(T3)は核ホルモン受容体アゴニストである。B27サプリメントは濃縮液として培地に添加されてもよく、培地に添加される前に希釈されてもよい。それは1×最終濃度で用いられてもよく、他の最終濃度で用いられてもよい。B27サプリメントの使用は、ビオチン、コレステロール、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、ブトレシン、レチノール、酢酸レチニル、亜セレン酸ナトリウム、トリヨードチロニン(T3)、DL- α トコフェロール(ビタミンE)、アルブミン、インシュリン、およびトランスフェリンを本発明の培地に組み込む便利なやり方である。

【0052】

BMP阻害剤

好ましくは基本培地に加えられる成分はBMP阻害剤である。BMPは、二量体リガンドとして、2つの異なる受容体セリン/スレオニンキナーゼであるI型受容体およびII型受容体からなる受容体複合体に結合する。II型受容体はI型受容体をリン酸化し、その結果、この受容体キナーゼが活性化される。その後、I型受容体は特異的受容体基質 (SMAD)をリン酸化し、その結果、転写活性につながるシグナル伝達経路が生じる。

【0053】

BMP阻害剤は、BMP分子に結合して複合体を形成する薬剤として定義される。この場合、例えば、BMP分子とBMP受容体との結合を阻止または阻害することによって、BMP活性は中和される。または、前記阻害剤は、アンタゴニストとして作用する、またはアゴニストを逆転させる薬剤である。このタイプの阻害剤はBMP受容体と結合し、BMPと前記受容体との結合を阻止する。後者の薬剤の一例は、BMP受容体に結合し、BMPと抗体結合受容体との結合を阻止する抗体である。

【0054】

BMP阻害剤は、細胞におけるBMP依存性活性を、同じ細胞タイプにおいて評価された時に前記阻害剤の非存在下でのBMP活性レベルに対して最大で90%、より好ましくは最大で80%、より好ましくは最大で70%、より好ましくは最大で50%、より好ましくは最大で30%、より好ましくは最大で10%、より好ましくは0%まで阻害するのに有効な量で培地に加えられてもよい。当業者に公知のように、BMP活性は、例えば、Zilberberg et al., 2007. BMC Cell Biol. 8:41に例示されるように、BMPの転写活性を測定することによって求めることができる。

【0055】

Noggin(Peprotech)、コーディン、およびコーディンドメインを含むコーディン様タンパク質(R&D systems)、フォリスタチン、およびフォリスタチンドメインを含むフォリスタチン関連タンパク質(R&D systems)、DAN、およびDANシステイン-knotドメインを含むDAN様タンパク質(R&D systems)、スクレロスチン/SOST(R&D systems)、デコリン(R&D systems)、ならびに α -2マクログロブリン(R&D systems)を含む、いくつかのクラスの天然BMP

結合タンパク質が公知である。

【0056】

本発明の方法において使用するための好ましいBMP阻害剤は、Noggin、DAN、ならびにCerberusおよびGremlinを含むDAN様タンパク質(R&D systems)より選択される。これらの拡散性タンパク質は様々な程度の親和性でBMPリガンドに結合し、BMPリガンドがシグナル伝達受容体に接近するのを阻害することができる。これらのBMP阻害剤のいずれかを基本培地に加えると、幹細胞の消失が妨げられる。

【0057】

好ましいBMP阻害剤はNogginである。本発明の培地に関して、Nogginは本明細書において「N」とも呼ばれる。Nogginは、好ましくは、少なくとも10ng/ml、より好ましくは少なくとも20ng/ml、より好ましくは少なくとも50ng/ml、より好ましくは少なくとも100ng/mlの濃度で基本培地に加えられる。さらにより好ましい濃度は約100ng/mlまたは正確に100ng/mlである。幹細胞の培養中に、前記BMP阻害剤は、必要な時に、例えば、毎日または1日おきに培地に加えられてもよい。BMP阻害剤は、好ましくは、1日おきに培地に加えられる。培地は、必要な時に、例えば、毎日または1日おきに交換されてもよいが、好ましくは、3日おきに交換される。

【0058】

Wntアゴニスト

基本培地に加えられるさらなる成分はWntアゴニストである。本発明の培地に関して、Wntアゴニストは本明細書において「W」とも呼ばれる。Wntシグナル伝達経路は、Wntタンパク質がFrizzled受容体ファミリーメンバーの細胞表面受容体に結合した時に起こる一連の事象によって定義される。これによって、細胞内 β -カテニンを分解する、アキシン(axin)、GSK-3、およびタンパク質APCを含むタンパク質複合体を阻害するDishevelledファミリータンパク質が活性化される。その結果として生じる核 β -カテニンの増加によって、TCF/LEFファミリー転写因子による転写が増強される。

【0059】

Wntアゴニストは、細胞におけるTCF/LEFを介した転写を活性化する薬剤と定義される。従って、Wntアゴニストは、Wntファミリータンパク質のいずれかおよび全てを含む、Frizzled受容体ファミリーに結合し、活性化する真のWntアゴニスト、細胞内 β -カテニン分解阻害剤、ならびにTCF/LEFアクチベーターより選択される。前記Wntアゴニストは、細胞におけるWnt活性を、同じ細胞タイプにおいて評価された時に前記分子の非存在下での前記Wnt活性レベルに対して少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも100%刺激するのに有効な量で培地に加えられる。当業者に公知なように、Wnt活性は、Wnt転写活性を測定することによって、例えば、pTOPFLASHおよびpFOPFLASH Tcfルシフェラーゼレポーター構築物(Korinek et al., 1997. Science 275:1784-1787)によって求めることができる。

【0060】

Wntアゴニストは、Wnt-1/Int-1; Wnt-2/Irp(Int-1関連タンパク質); Wnt-2b/13; Wnt-3/Int-4; Wnt-3a(R&D systems); Wnt-4; Wnt-5a; Wnt-5b; Wnt-6(Kirikoshi H et al. 2001. Biochem Biophys Res Com 283:798-805); ; Wnt-7a(R&D systems); Wnt-7b; Wnt-8a/8d; Wnt-8b; Wnt-9a/14; Wnt-9b/14b/15; Wnt-10a; Wnt-10b/12; Wnt-11; およびWnt-16を含む分泌型糖タンパク質を含んでもよい。ヒトWntタンパク質の概説は、「THE WNT FAMILY OF SECRETED PROTEINS」, R&D Systems Catalog, 2004に示される。

【0061】

さらなるWntアゴニストには、Wntシグナル伝達経路の活性化および調節に結びつけられ、4つのメンバー(R-スポンジン1(NU206, Nuvelo, SanCarlos, CA)、R-スポンジン2((R&D systems)、R-スポンジン3、およびR-スポンジン-4)からなるR-スポンジン分泌タンパク質ファミリー; ならびにFrizzled-4受容体に高親和性結合し、Wntシグナル伝達経路の活性化を誘導する点でWntタンパク質のように機能する分泌型調節タンパク質であるNorrin(ノ

リエ病タンパク質またはNDPとも呼ばれる)(R&D systems)(Kestutis Planutis et al.(2007) BMC Cell Biol. 8:12)が含まれる。

【0062】

R-スポンジンの活性を模倣する化合物が本発明のWntアゴニストとして用いられてもよい。最近、R-スポンジンはLgr5と相互作用することが見出された。従って、抗Lgr5抗体などのLgr5アゴニストは、本発明において使用され得るWntアゴニストの例である。

【0063】

本発明の培地に関して、R-スポンジンは本明細書において「R」とも呼ばれる。

【0064】

最近、Wntシグナル伝達経路の低分子アゴニストであるアミノピリミジン誘導体が特定され、これもWntアゴニストとしてはっきりと含められた(Liu et al.(2005) Angew Chem Int Ed Engl. 44, 1987-90)。

【0065】

公知のGSK阻害剤は、低分子干渉RNA(siRNA; Cell Signaling)、リチウム(Sigma)、ケンパウロン(Biomol International; Leost, M. et al.(2000) Eur. J. Biochem. 267, 5983-5994)、6-プロモインジルピン-30-アセトオキシム(Meijer, L. et al.(2003) Chem. Biol. 10, 1255-1266)、SB216763およびSB415286(Sigma-Aldrich)、ならびにGSK-3とアキシンとの相互作用を阻止する、FRATファミリーメンバーおよびFRAT由来ペプチドを含む。概説は、参照により本明細書に組み入れられる、Meijer et al.,(2004) Trends in Pharmacological Sciences 25, 471-480に示される。GSK-3 阻害レベルを求めるための方法およびアッセイは当業者に公知であり、例えば、Liao et al 2004, Endocrinology,145(6):2941-9に記載の方法およびアッセイを含む。

【0066】

好ましい態様において、前記Wntアゴニストは、Wntファミリーメンバー、R-スポンジン1~4(例えば、R-スポンジン1またはR-スポンジン4)、Norrin、およびGSK阻害剤のうちの1つまたは複数より選択される。基本培地への少なくとも1種類のWntアゴニストの添加が肝臓上皮幹細胞または単離された胆管または単離された肝臓断片の増殖に重要なことが本発明者らによって見出された。

【0067】

さらなる好ましい態様において、前記WntアゴニストはR-スポンジン1を含む、またはR-スポンジン1からなる。R-スポンジン1は、好ましくは、少なくとも200ng/ml、より好ましくは少なくとも300ng/ml、より好ましくは少なくとも500ng/mlの濃度で基本培地に加えられる。R-スポンジン1のさらにより好ましい濃度は約500ng/mlまたは正確に500ng/mlである。幹細胞の培養中に、前記Wntファミリーは、必要な時に、例えば、毎日または1日おきに培地に加えられてもよい。Wntファミリーメンバーは、好ましくは、1日おきに培地に加えられる。培地は、必要な時に、例えば、毎日または1日おきに交換されてもよいが、好ましくは、3日おきに交換される。

【0068】

好ましい態様において、Wntアゴニストは、R-スポンジン、Wnt-3a、およびWnt-6からなる群より選択される。より好ましくは、R-スポンジンおよびWnt-3aはいずれもWntアゴニストとして用いられる。驚いたことに、この組み合わせにはオルガノイド形成に対して相乗効果があるので、この組み合わせは特に好ましい。好ましい濃度は、R-スポンジンについては1~500ng/ml、例えば、1~10ng/ml、10~100ng/ml、1~50ng/ml、10~200ng/ml、200~500ng/ml、30ng/mlであり、Wnt3aについては100ng/ml~1000ng/ml、例えば、100ng/ml、または1000ng/mlである。

【0069】

Wntアゴニストは、好ましくは、例えばWnt3aなどのWntリガンドであり、培地に新鮮に加えられてもよい。または、Wntリガンドは、前記Wntリガンドを発現する適切な発現構築物を用いて細胞株をトランスフェクトすることによって、または前記Wntリガンドを発現する適切な発現構築物に細胞株を感染させることによって細胞株において発現される。前

記細胞株は培養され、分泌Wntリガンドを含む培地が適切な時間間隔で採取される。例えば、細胞はコンフルエンスに達し、増殖を停止したらすぐにWnt3aを産生する。前記発現構築物を用いてトランスフェクトされていない、または前記発現構築物に感染していない細胞に由来する培地は対照として用いられる。条件培地が収集され、例えば、Wnt3aなどのWntアゴニストの存在を試験するためにルシフェラーゼ発現がTCF応答配列によって制御されているアッセイにおいて試験される(Korinek et al., 1997. Science 275:1784-1787)。組織を再生するために培養において用いられる時に、培地は希釈される。当業者に公知のように、過剰なWntリガンドの添加は、少なすぎるWntリガンドの添加と同じくらい培養に有害な時がある。従って、条件培地の実際の希釈は、試験において求められたWntリガンドの量によって決まる。

10

【0070】

分裂促進増殖因子

基本培地に加えられるなおさらなる成分は、上皮細胞増殖因子(EGF; (好ましくは、Peprotechから入手する)、FGFR2またはFGFR4に結合することができる線維芽細胞増殖因子(FGF)、および肝細胞増殖因子(HGF)(好ましくは、これもPeprotechから入手する)の群より選択される分裂促進増殖因子の組み合わせである。FGFR2(FGF受容体)またはFGFR4に結合することができるFGFは、好ましくは、FGF4、FGF7、またはFGF10(好ましくは、Peprotechから入手する)であり、最も好ましくは、FGF10である。好ましくは、EGF、FGF、およびHGFの3つ全てが用いられる。本発明の培地に関して、EGFは本明細書において「E」とも呼ばれ、FGFは本明細書において「F」とも呼ばれ、HGFは本明細書において「H」とも呼ばれる。EGFは、様々な外胚葉性培養細胞および中胚葉性培養細胞の強力な分裂促進因子であり、インビボおよびインビトロでの特定の細胞の分化ならびに細胞培養中の一部の線維芽細胞の分化に非常に大きな影響を及ぼす。EGF前駆体は、タンパク分解されると、細胞を刺激する53アミノ酸ペプチドホルモンを生じる膜結合分子として存在する。EGFは、原形質膜に位置するEGF受容体に結合することによって標的細胞において効果を発揮する。EGF受容体は膜貫通タンパク質チロシンキナーゼである。EGFと受容体が結合するとキナーゼが活性化され、その後に、受容体の自己リン酸化が起こる。自己リン酸化は、受容体と受容体基質との相互作用に必須である。EGFによって活性化されるシグナル伝達経路には、プロテインキナーゼCの活性化および細胞内Ca²⁺濃度の上昇につながるホスファチジルイノシトール経路、ならびにMAPキナーゼ活性化につながるras経路が含まれる。これらの経路は、細胞の増殖、分化、および生存の調節に関与する(Herbst, 2004, Int Journal of radiation oncology, 59, 2, S21-S26)。

20

30

【0071】

EGFは、好ましくは、5~500ng/mlの濃度で、または少なくとも5ng/mlかつ500ng/ml以下の濃度で基本培地に加えられる。好ましい濃度は、少なくとも10ng/ml、20ng/ml、25ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、45ng/ml、または50ng/mlであり、かつ500ng/ml以下、450ng/ml以下、400ng/ml以下、350ng/ml以下、300ng/ml以下、250ng/ml以下、200ng/ml以下、150ng/ml以下、または100ng/ml以下である。より好ましい濃度は少なくとも50ng/mlかつ100ng/ml以下である。さらにより好ましい濃度は約50ng/mlまたは50ng/mlである。

【0072】

FGF10は、線維芽細胞増殖因子(FGF)タンパク質ファミリーに属するタンパク質である。FGFファミリーメンバーは広範囲の分裂促進活性および細胞生存活性を有し、胚発生、細胞増殖、形態形成、組織修復、腫瘍成長および浸潤を含む様々な生物学的プロセスに関与する。FGFは、細胞表面チロシンキナーゼ受容体(FGFR)と相互作用することによって細胞を刺激する。4種類の密接に関連する受容体(FGFR1~FGFR4)が同定されている。FGFR1~FGFR3遺伝子は複数のアイソフォームをコードすることが示されており、これらのアイソフォームはリガンド特異性の決定において重要なことがある。ほとんどのFGFは複数種の受容体に結合する(Ornitz J Biol Chem. 1998 Feb 27; 273(9):5349-57)。しかしながら、FGFの中でもFGF10およびFGF7は、上皮細胞にのみ発現しているFGFR2bと呼ばれる、ある特定のFGFR2アイソフォームとしか相互作用しない点で独特である(Igarashi, J Biol Chem.

40

50

1998 273(21):13230-5)。FGF10は、FGFR2またはFGFR4に結合することができる好ましいFGFである。

【0073】

肝細胞増殖因子/分散因子(HGF/SF)は、プロトオンコジーンc-Met受容体に結合した後にチロシンキナーゼシグナル伝達カスケードを活性化することによって細胞増殖、細胞運動性、および形態形成を調節する形態形成因子である。

【0074】

FGF10およびHGFには同じ濃度が用いられてもよい。FGF10の好ましい濃度は、20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、500ng/ml、500ng/ml以下である。HGFの好ましい濃度は、1ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml、50ng/ml以下である。幹細胞の培養中には、分裂促進増殖因子の前記組み合わせ(すなわち、EGF、FGF10、およびHGF)は、好ましくは、必要な時に、例えば、毎日または1日おきに培地に加えられる。組み合わせは1日おきに加えられることが好ましい。培地は、必要な時に、例えば、毎日または1日おきに交換されてもよいが、好ましくは、3日おきに交換される。

【0075】

一部の態様において、A83-01などのTGF- β 阻害剤がEM1培地にさらに存在する。これは、ヒト細胞またはオルガノイドが培養されている時に特に有用である。一部の態様において、A83-01は、400~600nM、例えば、450~550nM、470~530nM、または約500nMの濃度で存在する。TGF- β 阻害剤がEM1に存在する態様において、好ましくは、Notch阻害剤は存在しない。

【0076】

本発明の好ましい拡大培地

好ましい培地およびその使用方法を実施例において説明する。

【0077】

例えば、細胞培地は、FGF10、HGF、およびニコチンアミドが添加された、EGFおよびR-スポンジン1; 例えば、FGF10(100ng/ml)、HGF(25~50ng/ml)、およびニコチンアミド(1~10mM)が添加された、EGF(50ng/ml)およびR-スポンジン1(1 μ g/ml)が加えられた基本培地を含んでもよく、または該基本培地からなってもよい。本発明者らは、この培地が細胞の長期拡大に好ましいことを発見した。従って、この細胞培地は、本発明のEM2として使用するのに好ましい。基本培地には、好ましくは、B27、N2、および200ng/ml N-アセチルシステインが添加される。一部の態様において、基本培地はAdvanced-DMEM/F12である。しかしながら、他の任意の適切な基本培地を使用することができる。

【0078】

別の好ましい細胞培地およびこの培地を使用する方法が実施例において説明され、Advanced-DMEM/F12を含むか、またはAdvanced-DMEM/F12からなり、好ましくは、B27、N2、200ng/mlのN-アセチルシステイン、50ng/mlのEGF、1 μ g/mlのR-スポンジン、10nMのガストリン、100ng/mlのFGF10、10mMのニコチンアミド、および50ng/mlのHGF、および50%のWnt条件培地、および好ましくは、10~100ng/mlのNogginが添加されたAdvanced-DMEM/F12を含むか、またはこれからなる。Wnt条件培地は、Advanced DMEM、P/S、B27、N2を含み、FCSも含む。Wnt3A発現プラスミドによってトランスフェクトされた293T細胞はWntを産生する。数日後に全培地(すなわち、分泌Wntを含む)が採取され、Wnt供給源として用いられる。

【0079】

従って、本発明は、

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2もしくはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、

ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、およびN-アセチルシステイン、ならびに好ましくは、

BMP阻害剤、より好ましくはNoggin、ならびに

Wntアゴニスト、より好ましくはR-スポンジン1および/もしくはWnt-3a

が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からな

る細胞培地を提供する。

【0080】

従って、本発明は、
分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGF10、およびHGF、
ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、およびN-アセチルシステイン、
BMP阻害剤、より好ましくはNoggin、ならびに
Wntアゴニスト、より好ましくはR-スポンジン1およびWnt-3a

が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる第1の好ましい培地を含む。

【0081】

この培地は、細胞の初期拡大を刺激するために、本発明のEM1細胞培地として用いられ
てもよい。

【0082】

一部の態様において、EM1細胞培地として用いられる培地は本発明のEM2培地の全成分を
含み、Wnt-3aおよびNogginをさらに含む。

【0083】

基本培地にN-アセチルシステイン、B27、およびN2が添加される態様において、好まし
くは、以下が培地に加えられる：EGF、R-スポンジン1、ガストリン、FGF10、ニコチンア
ミド、およびHGF、およびWnt条件培地。好ましくは、基本培地に、前記で述べられた量と
一致する、N-アセチルシステイン、EGF、R-スポンジン1、ガストリン、FGF10、ニコチン
アミド、およびHGF、およびWnt条件培地が添加される。

【0084】

例えば、一部の態様において、基本培地には、150ng/ml～250ng/mlのN-アセチルシステ
インが添加される。好ましくは、基本培地には、約200ng/mlまたは正確に200ng/mlのN-ア
セチルシステインが添加される。例えば、一部の態様において、基本培地には40ng/ml～6
0ng/mlのEGFが添加されてもよい。好ましくは、基本培地には約50ng/mlまたは正確に50ng
/mlのEGFが添加される。例えば、一部の態様において、基本培地には0.5 μg/ml～1.5 μg/
mlのR-スポンジン1が添加されてもよい。好ましくは、基本培地には約1 μg/mlまたは正確
に1 μg/mlのR-スポンジン1が添加される。例えば、一部の態様において、基本培地には5n
M～15nMのガストリンが添加されてもよい。好ましくは、基本培地には約10nMまたは正確
に10nMのガストリンが添加される。例えば、一部の態様において、基本培地には25～200n
g/mlのFGF10、例えば70ng/ml～130ng/mlのFGF10が添加されてもよい。好ましくは、基本
培地には約100ng/mlまたは正確に100ng/mlのFGF10が添加される。例えば、一部の態様
において、基本培地には5mM～15mMのニコチンアミドが添加されてもよい。好ましくは、基
本培地には約10mMまたは正確に10mMのニコチンアミドが添加される。例えば、一部の態様
において、基本培地には25ng/ml～100ng/mlのHGF、例えば35ng/ml～65ng/mlのHGFが添加さ
れてもよい。好ましくは、基本培地には約50ng/mlまたは正確におよび50ng/mlのHGFが添
加される。例えば、一部の態様において、基本培地には35%～65%のWnt条件培地が添加
されてもよい。好ましくは、基本培地には約50%または正確に50%のWnt条件培地が添加
される。

【0085】

一部の態様において、ガストリンおよびN2の一方または両方が細胞培地に存在しない。

【0086】

好ましくは、基本培地はadvanced-DMEM/F12である。

【0087】

この第1の培地(例えば、EM1、EM2、またはEM1およびEM2の両方)は、好ましくは、本発
明の培養方法の最初の2週間に用いられる。しかしながら、この第1の培地は、さらに短い
期間、例えば、1日間、2日間、3日間、5日間、7日間、もしくは10日間、またはさらに長
期間、例えば、3週間、4週間、5週間、10週間、20週間またはそれ以上、5ヶ月またはそれ
以上、例えば、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月またはそれ以上用

10

20

30

40

50

いられてもよい。

【0088】

分化培地(DM):

別の局面において、EGF、TGF- β 阻害剤、およびNotch阻害剤が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる第2の細胞培地が提供される。本発明者らは、この培地が細胞分化に有用であることを発見した。細胞分化に用いられる培地は本明細書においてDMと呼ばれることがある。

【0089】

好ましくは、第2の細胞培地はFGFおよび/またはHGFも含む。1つの態様において、第2の培地は、

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGF10、およびHGF;

Notch阻害剤; ならびに

TGF- β 阻害剤

が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むか、または該基本培地からなる。

【0090】

1つの態様において、TGF- β 阻害剤はA83-01であり、および/またはNotch阻害剤はDAPTである。別の態様において、DM細胞培地はデキサメタゾンを含み、さらに含む。

【0091】

好ましい第2の細胞培地およびこの培地を使用する方法は実施例において説明され、50ng/mlのEGF、100ng/mlのFGF10、50nMのA8301、および10uMのDAPTが加えられた基本培地を含むか、または該基本培地からなる。Advanced-DMEM/F12が基本培地として用いられてもよく、同様に、他の任意の適切な基本培地が用いられてもよい。

【0092】

一部の態様において、第2の細胞培地はR-スポンジンもWntも含まない。一部の態様において、第2の細胞培地はWntアゴニストを含まない。一部の態様において、第2の細胞培地はニコチンアミドを含まない。一部の態様において、第2の細胞培地はBMP阻害剤を含まない。

【0093】

本発明者らは、R-スポンジン1およびニコチンアミドがいずれも成熟肝細胞マーカーCYP3A11の発現を阻害するが、肝芽細胞マーカーアルブミンの発現を促進することを発見した。従って、より成熟した肝臓運命への細胞分化を増やすために、本発明者らは細胞培養物からR-スポンジンおよびニコチンアミドを除去した。本発明者らはまた、特定の胆管転写因子の発現が、R-スポンジン1を含有する拡大培養物において高度にアップレギュレートされることも発見した。このことから、培養物の遺伝子発現は胆管細胞運命に向かって不均衡になっていたことが分かる。Notchシグナル伝達経路およびTGF- β シグナル伝達経路はインビボで胆管細胞運命に結びつけられてきた。実際に、(活発なNotchシグナル伝達を達成するのに必須の)Rbpjの欠失は異常な管形成をもたらした(Zong Y. Development 2009)、TGF- β の肝臓外植片への添加はインビトロでの胆管分化を促進する(Cloutman F. Genes and Development 2005)。Notchシグナル伝達経路およびTGF- β シグナル伝達経路はいずれも肝臓培養物において高度にアップレギュレートされたので(図9)、本発明者らは胆管細胞運命の阻害が肝細胞表現型への細胞の分化を誘発し得ると考えた。TGF- β 阻害剤(例えば、A8301)およびNotch阻害剤(例えば、DAPT)を分化培地、好ましくは、R-スポンジンもWntも含有しない分化培地に加えると、成熟肝細胞マーカーの発現は増強し、肝細胞様細胞の数は増加することが見出された(例えば、実施例2を参照されたい)。

【0094】

Notchは、複数回のタンパク質切断を介して活性化することができる膜貫通表面受容体であり、このうちの1つは γ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼ活性を有するタンパク質複合体によって切断される。 γ -セクレターゼは、膜の中で切断活性を発揮するプロテアーゼである。 γ -セクレターゼは多成分酵素であり、少なくとも4つの異なるタンパク質

10

20

30

40

50

、すなわち、プレセニリン(プレセニリン1または2)、ニカストリン(nicastroin)、PEN-2、およびAPH-Iからなる。プレセニリンは γ -セクレターゼの触媒中心である。リガンドが結合すると、Notch受容体はコンホメーション変化を受け、これにより、メタロプロテアーゼであるADAMプロテアーゼの作用による外部ドメインシェディングが可能になる。この直後に γ -セクレターゼ複合体が働いてNotch細胞内ドメイン(NICD)が放出される。NICDは核に移動し、CSL(Cプロモーター結合因子/組換えシグナル配列結合タンパク質J κ /Suppressor-of-Hairless/Lag1)と相互作用する。NICDが結合すると、CSLは転写リプレッサーから、Notch標的遺伝子を発現させるアクチベーターに変わる。本発明の状況において使用することができる好ましいNotch阻害剤の例は、 γ -セクレターゼ阻害剤、例えば、DAPTもしくはジベンザゼピン(DBZ)もしくはベンゾジアゼピン(BZ)もしくはLY-411575、(例えば、NotchのドミナントネガティブリガンドもしくはドミナントネガティブNotchを介して、またはNotchリガンドとNotchとの相互作用を少なくとも部分的にブロックすることができる抗体を介して)Notchのリガンド媒介性活性化を弱めることができる阻害剤、あるいはADAMプロテアーゼ阻害剤である。

【0095】

TGF- β シグナル伝達は、細胞増殖、細胞運命、およびアポトーシスを含む多くの細胞機能に参与する。シグナル伝達は、典型的には、TGF- β スーパーファミリーリガンドがII型受容体に結合することから始まり、これによりI型受容体がリクルートおよびリン酸化される。次いで、I型受容体はSMADをリン酸化する。SMADは核において転写因子として働き、標的遺伝子発現を調節する、または、TGF- β シグナル伝達は、例えば、p38 MAPキナーゼを介してMAPキナーゼシグナル伝達経路を活性化することができる。TGF- β スーパーファミリーリガンドは、骨形成タンパク質(BMP)、増殖分化因子(GDF)、抗ミューラー管ホルモン(AMH)、アクチビン、nodal、およびTGF- β を含む。

【0096】

TGF- β 阻害剤は、TGF- β シグナル伝達経路の活性を低減する薬剤である。当技術分野において公知であり、本発明と共に使用することができる、TGF- β シグナル伝達経路を破壊する多くの手法がある。例えば、TGF- β シグナル伝達は、低分子干渉RNA戦略によるTGF- β 発現の阻害；フューリン(TGF- β 活性化プロテアーゼ)の阻害；生理学的阻害剤による経路の阻害、例えば、Noggin、DAN、またはDAN様タンパク質によるBMPの阻害；モノクローナル抗体によるTGF- β の中和；TGF- β 受容体キナーゼ1(アクチビン受容体様キナーゼとも知られる、ALK5)、ALK4、ALK6、ALK7、または他のTGF- β 関連受容体キナーゼの低分子阻害剤を用いた阻害；生理学的阻害剤であるSmad7の過剰発現による、またはSmadを活性化させないSmadアンカーとしてチオレドキシンを用いた、Smad2およびSmad3シグナル伝達の阻害(Fuchs, O. Inhibition of TGF-Signaling for the Treatment of Tumor Metastasis and Fibrotic Diseases. Current Signal Transduction Therapy, Volume 6, Number 1, January 2011, pp. 29-43(15))によって破壊することができる。

【0097】

物質がTGF- β 阻害剤かどうか確かめるための様々な方法が公知であり、本発明と共に用いられてもよい。例えば、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を動かすヒトPAI-1プロモーターまたはSmad結合部位を含むレポーター構築物を用いて細胞が安定にトランスフェクトされている細胞アッセイが用いられることがある。対照群に対するルシフェラーゼ活性の阻害を化合物活性の尺度として使用することができる(De Gouville et al., Br J Pharmacol. 2005 May; 145(2):166-177)。

【0098】

本発明によるTGF- β 阻害剤は、タンパク質、ペプチド、低分子、低分子干渉RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、または抗体でもよい。阻害剤は天然でもよく、合成でもよい。本発明の文脈において使用することができる好ましい低分子TGF- β 阻害剤の例には、表1に列挙された低分子阻害剤が含まれる。

【0099】

(表1) 受容体キナーゼを標的とする低分子TGF- β 阻害剤

阻害剤	標的	IC50 (nM)	分子量	名称	式
A83-01	ALK5 (TGF- β RI)	12	421.52	3-(6-メチル-2- ピリジニル-N-フェニル-4- (4-キノリニル)-1H- ピラゾール-1- カルボチオアミド	C25H19N5S
	ALK4	45			
	ALK7	7.5			
SB-431542	ALK5	94	384.39	4-[4-(1,3- ベンゾジオキソール-5-イル)- 5-(2-ピリジニル)- 1H-イミダゾール-2- イル]ベンズアミド	C22H16N4O3
	ALK4				
	ALK7				
SB-505124	ALK5	47	335.4	2-(5-ベンゾ[1,3] ジオキソール-5-イル-2- tert-ブチル-3H イミダゾール-4-イル)- 6-メチルピリジン 塩酸塩水和物	C20H21N3O2
	ALK4	129			
SB-525334	ALK5	14.3	343.42	6-[2-(1,1-ジメチルエチル)- 5-(6-メチル-2- ピリジニル)-1H- イミダゾール-4- イル]キノキサリン	C21H21N5
SD-208	ALK5	49	352.75	2-(5-クロロ-2- フルオロフェニル)- 4-[(4-ピリジル)アミノ] プテリジン	C17H10ClFN6
LY-36494	TGR- β RI	59	272.31	4-[3-(2-ピリジニル)- 1H-ピラゾール-4-イル]- キノリン	C17H12N4
	TGF- β RII	400			
	MLK-7K	1400			
SJN-2511	ALK5	23	287.32	2-(3-(6-メチルピリジン -2-イル)-1H-ピラゾール -4-イル)-1,5-ナフチリジン	C17H13N5

【0100】

本発明の方法は、表1に列挙された阻害剤のいずれか1つまたは複数の使用を含んでもよい。本発明の方法は、ある阻害剤と列挙された別の阻害剤との任意の組み合わせの使用を含んでもよい。例えば、本発明の方法はSB-525334またはSD-208またはA83-01の使用を含んでもよい。または、本発明の方法はSD-208およびA83-01の使用を含んでもよい。または、本発明の方法はSD-208およびA83-01の使用を含んでもよい。当業者であれば、主に、他のキナーゼを標的とするように設計されたが、高濃度ではTGF- β 受容体キナーゼも阻害する可能性のある他の多くの低分子阻害剤が存在することを理解するであろう。例えば、SB-203580は、高濃度(例えば、約10 μ Mまたはそれ以上)ではALK5を阻害すると考えられているp38 MAPキナーゼ阻害剤である。本発明の文脈において、TGF- β シグナル伝達経路を阻害するこのような任意の阻害剤も使用することができる。

【0101】

A83-01は、10nM～10 μ M、または20nM～5 μ M、または50nM～1 μ Mの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、A83-01は約500nMで培地に加えられてもよい。EMにおいて用いられる時、A83-01は、350～650nM、例えば、450～550nM、より好ましくは約500nMの濃度で培地に加えられてもよい。DMにおいて用いられる時、A83-01は、25～75nM、例えば、40～60nM、または約50nMの濃度で培地に加えられてもよい。

【0102】

SB-431542は、80nM～80uM、または100nM～40uM、または500nM～10uMの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、SB-431542は約1uMで培地に加えられてもよい。

【0103】

SB-505124は、40nM～40uM、または80nM～20uM、または200nM～1uMの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、SB-505124は約500nMで培地に加えられてもよい。

【0104】

SB-525334は、10nM～10uM、または20nM～5uM、または50nM～1uMの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、SB-525334は約100nMで培地に加えられてもよい。

【0105】

LY364947は、40nM～40uM、または80nM～20uM、または200nM～1uMの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、LY364947は約500nMで培地に加えられてもよい。

【0106】

SD-208は、40nM～40uM、または80nM～20uM、または200nM～1uMの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、SD-208は約500nMで培地に加えられてもよい。

【0107】

SJN2511は、20nM～20uM、または40nM～10uM、または100nM～1uMの濃度で培地に加えられてもよい。例えば、A83-01は約200nMで培地に加えられてもよい。

【0108】

さらなる局面において、本発明は、
分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGF10、およびHGF;
ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、およびN-アセチルシステイン
が加えられた動物細胞用もしくはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる代替の第2の培地を提供する。

【0109】

この代替の第2の培地は分化培地(DM)として有用である。この代替の第2の培地は、好ましくは、培養して最初の2週間後に用いられる。この段階では、BMP阻害剤およびWntリガンドはもはや必要とされないように見える。従って、一部の態様において、代替の第2の培地はBMP阻害剤もWntリガンドも含まない。一部の態様において、代替の第2の培地はBMP阻害剤もWntアゴニストも含まない。

【0110】

第1の培地(EM、すなわち、EM1およびEM2、またはEM1、またはEM2)と同様に、一部の態様において、基本培地には、前記の量に従ってN-アセチルシステイン、EGF、ガストリン、FGF10、ニコチンアミド、およびHGFが添加されてもよい。例えば、好ましくは、基本培地には約200ng/mlまたは正確に200ng/mlのN-アセチルシステインが添加される。好ましくは、基本培地には約50ng/mlまたは正確に50ng/mlのEGFが添加される。好ましくは、基本培地には約10nMまたは正確に10nMのガストリンが添加される。好ましくは、基本培地には約100ng/mlまたは正確に100ng/mlのFGF10が添加される。好ましくは、基本培地には約10mMまたは正確に10mMのニコチンアミドが添加される。好ましくは、基本培地には約50ng/mlまたは正確に50ng/mlのHGFが添加される。

【0111】

本発明に従って用いられる第1の細胞培地および第2の細胞培地は、細胞外マトリックス上で、上皮幹細胞または肝臓上皮幹細胞または単離された胆管または単離された肝臓断片の生存および/または増殖および/または分化を可能にする。

【0112】

生存および/または増殖を可能にする培地は、好ましくは、少なくとも5日間、10日間、15日間、20日間、30日間、40日間、50日間、60日間、70日間、80日間、90日間、100日間、120日間、140日間、160日間、180日間、200日間の培養の間に細胞の生存および/または増殖を誘導または促進する培地である。BrdU染色、Edu染色、Ki67染色などの当技術分野において公知の技法を用いて増殖を評価することができ、増殖曲線アッセイを使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。例えば、本発明者らは、10個の胆管から、6日後に、1ウェルにつき10個のオルガノイドを含む6個のウェル(60個の新たなオルガノイド)まで希釈することが可能なことを示した。6日間の継代ごとに、本発明者らは約360個のオルガノイドを作製することができる。32週間にわたって1週間に1回の継代を行うことによって、本発明者らは、7ヶ月だけで11,000超(11520)の新たなオルガノイド構造を作製することができる。移植用の細胞およびオルガノイドの入手可能性が重大な問題を投げかけるので、このことは産業にとって重要である。マウス移植の場合、例えば、最低 10^5 個の細胞が必要とされる。おそらく、ヒト移植の場合、移植が成功するためには 10^6 個または 10×10^6 個が必要となる可能性がある。

【0113】

10

言い換えると、本発明に従って用いられる培地は、適切な条件下で幹細胞集団を拡大して、少なくとも3継代、少なくとも4継代、少なくとも5継代、少なくとも6継代、少なくとも7継代、少なくとも8継代、少なくとも9継代、少なくとも10継代、少なくとも20継代、少なくとも30継代、少なくとも40継代、少なくとも50継代、少なくとも60継代、少なくとも70継代、少なくとも80継代、少なくとも90継代、または少なくとも100継代にわたって肝臓オルガノイドを形成することができる。

【0114】

20

前記で特定された第2の培地は、好ましくは、少なくとも5日間の培養中に細胞の特異的分化を誘導または促進する。分化は、本明細書において定義された肝臓系列に関連する特異的マーカーの存在を検出することによって測定することができる。分化は、本明細書において定義された肝臓系列に関連する特異的マーカーの存在を検出することによって測定することができる。マーカーの同一性に応じて、前記マーカーの発現は、本明細書において定義された第1の培地において、または第1の培地の後に第2の培地において少なくとも5日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間培養した後にRT-PCRまたは免疫組織化学によって評価することができる。

【0115】

分化培地は、好ましくは、少なくとも5日間の培養中に細胞の特異的分化を誘導または促進する培地である。分化は、本明細書において定義された肝臓系列に関連する特異的マーカーの存在を検出することによって測定することができる。

【0116】

30

本発明の文脈の中で、細胞培地という用語は、培地、培養培地、または細胞培地、または基本培地もしくは基本細胞培地もしくは基本細胞培養培地、または拡大培地、または分化培地と同義である。

【0117】

本発明のなおさらなる局面によれば、本発明の培地を含む密閉封止された容器が提供される。一部の態様において、培地は拡大培地である。一部の態様において、培地は分化培地である。密閉封止された容器は、汚染を防ぐために、培地を輸送または保管するのに好ましいものでもよい。容器は、フラスコ、プレート、瓶、広口瓶、バイアル、またはバックなどの任意の適切な容器でよい。

【0118】

40

幹細胞を得るおよび/または培養するための方法

肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法は、本発明による1種類または複数種の細胞培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む。

【0119】

一部の態様において、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法は、EM1培地の存在下で、次いで、EM2培地において、次いで、DM培地において、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む。

【0120】

50

一部の態様において、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法は、EM2培地の存在下で、次いで、EM1培地を使用することなくDM培地において、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む。

【0121】

一部の態様において、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法は、EM1培地の存在下で、次いで、EM2培地を使用することなくDM培地において、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む。

【0122】

肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法は、

i) 分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ニコチンアミド、ならびに好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1~4のうちのいずれか1つが加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程；ならびにその後、

ii) 本明細書において定義された第2の細胞培地(DM培地)の存在下で、幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含んでもよい。

【0123】

一部の態様において、工程i)の前に、前記方法は、EGF、BMP阻害剤、R-スポンジン、およびWntが加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含むかまたは該基本培地からなる培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む。好ましくは、BMP阻害剤はNogginであり、EM1培地は「ENRW」(EGF、Noggin、R-スポンジン、およびWnt)と呼ばれる。

【0124】

1つの態様において、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法であって、本明細書に記載のEM2培地、例えば、Wntアゴニスト、例えば、R-スポンジン、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびニコチンアミドを含む培地において、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む前記方法が提供される。好ましくは、培地はHGFも含む。

【0125】

さらなる態様において、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法であって、BMP阻害剤、Wntアゴニスト、分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、およびHGF、ガストリン、ニコチンアミド、B27、N2、ならびにN-アセチルシステインを含む培地において、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程を含む前記方法が提供される。

【0126】

別の好ましい方法において、前記のEM1培地において少なくとも2週間培養した後に、BMP阻害剤およびWntアゴニストを含まない培地において培養が続けられる。一部の態様において、この培養は本発明のEM2において続けられる。別の態様において、培養は、TGF- β 阻害剤、例えば、A83-01、およびNotch阻害剤、例えば、DAPTをさらに含む本発明の第2の培地(DM)において続けられる。一部の態様において、この培養はEM2において続けられ、次いで、本発明のDM培地において続けられる。

【0127】

従って、肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための好ましい方法において、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された肝臓組織断片は、第1の工程において第1の培地(EM)において培養され、その後、別個の第2の工程において第2の培地(DM)において培養される。第1の培養工程の継続期間は少なくとも2週間でもよく、それより長く、例えば、3週間またはそれ以上、4週間またはそれ以上、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月またはそれ以上でもよい。第2の工程の継続期間は、好ましくは、6週間またはそれ以下、より好ましくは1ヶ月またはそれ以下、例えば3週間またはそれ以下、2週間またはそれ以下、1週間またはそれ以下である。多くの細胞は、DMにおいて2週間後に死滅し始めることが見出されており、そのため、好ましくは、第2の工程は2週間またはそれ以下または最大で1ヶ月である。従って、従って、第2の工程の継続期間が8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、または3週間、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月またはそれ以上になってもよいことは、あまり好ましい態様にしかない。それぞれの工程は、好ましくは、本明細書において定義された細胞外マトリックスを用いて、かつ本明細書において詳述された培地を用いて行われる。

10

【0128】

または、別の態様において、前記方法は、第2の培地に交換することなく第1の培地において行われる。この方法の継続期間は、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、または3週間、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月またはそれ以上でもよい。

20

【0129】

一部の態様において、本発明の第1の培地において培養する工程は、EM1培地において培養する工程、次いで、EM2培地において培養する工程を両方とも含む。従って、前記の期間は、細胞または断片がEM1において培養され、その後、EM2培地において培養される全期間を指すことがある。一部の態様において、EM1培地において培養する工程の継続期間は、10日未満、例えば、9日未満、8日未満、7日未満、6日未満、5日未満、4日未満、3日未満、2日未満、または1日未満でもよい。一部の態様において、EM1培地において培養する工程の継続期間は、1~10日、例えば、1~7日、2~6日、3~5日、例えば、4日または5日でもよい。一部の態様において、EM2培地において培養する工程の継続期間は、10日またはそれ以上、例えば、11日、12日、13日、14日、15日、16日またはそれ以上、または1~3週間もしくは2~4週間もしくは3~6週間、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月またはそれ以上でもよい。

30

【0130】

それぞれの培地に存在するそれぞれの化合物の好ましい濃度は、本明細書の説明または実施例において既に定義されている。

【0131】

肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための本明細書に記載の方法はまた、Lgr5を発現する細胞の集団を得るおよび/または培養するために用いられてもよく、このような方法は本発明に含まれる。従って、本発明の方法によって得られるLgr5を発現する細胞の集団も提供される。

40

【0132】

当業者に明らかなように、好ましい本発明の培養方法はフィーダー細胞が必要とされないもので有利である。フィーダー細胞層は、多くの場合、幹細胞培養を支援し、幹細胞の分化を阻害するのに用いられる。フィーダー細胞層は、一般的に、関心対象の細胞と共培養され、関心対象の細胞の増殖に適した表面を提供する細胞の単層である。フィーダー細胞層は、関心対象の細胞が増殖することができる環境を提供する。フィーダー細胞は増殖しないように、(例えば、放射線照射またはマイトマイシンC処理によって)有糸分裂が不活化されていることが多い。フィーダー細胞の使用は細胞継代を複雑にするので望ましくない(継代ごとにフィーダー細胞から細胞を分離しなければならず、継代ごとに新たなフィーダー細胞が必要とされる)。フィーダー細胞の使用はまたフィーダー細胞による望まし

50

い細胞の汚染につながることもある。これは、医療用途の場合、明らかに問題となっており、研究の場合であっても、この細胞に対して行われた実験の結果の分析を複雑にする。本明細書の他の場所で述べたように、本発明の培地は、フィーダー細胞と接触することなく細胞を培養するのに使用することができるので特に有利である。すなわち、本発明の方法は、増殖が支持されている細胞を支援するためにフィーダー細胞層を必要としない。

【0133】

従って、本発明の組成物はフィーダー細胞を含まない組成物でもよい。組成物中の肝臓細胞が少なくとも1回の継代のためにフィーダー細胞層の非存在下で培養されていれば、従来より、組成物はフィーダー細胞を含まないとみなされる。本発明のフィーダー細胞を含まない組成物は、通常、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満の

10

【0134】

1つの好ましい態様において、例えば、再生医療のために肝臓オルガノイドが用いられるのであれば、前記方法は上皮細胞または単離された肝臓断片から開始してもよい。細胞または肝臓断片は自己由来でもよく、同種異系でもよい。「自己由来」細胞は、細胞療法のために、例えば、組織再生を可能にするために細胞が再導入される生物と同じ生物に由来する細胞である。自己由来細胞は、原則的に、免疫拒絶反応の問題を克服するために、および/または移植の際の免疫抑制介入の必要性を小さくするために患者とのマッチングを必要としない。「同種異系」細胞は、細胞療法のために、例えば、組織再生を可能にするために細胞が導入される個体と異なるが、同種の個体に由来する細胞である。拒絶反応の問題を阻止するために、ある程度の患者マッチングが依然として必要とされる場合がある。組織拒絶反応を最小限にするための技法が当業者に公知であろう。

20

【0135】

好ましい本発明の方法は、前記上皮幹細胞を含む単離された肝臓断片を培養するための方法を含む。

【0136】

別の好ましい方法は、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された肝臓断片から肝臓オルガノイドを得るための方法を含む。

【0137】

別の好ましい方法は、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された肝臓断片から肝臓オルガノイドを得るおよび培養するための方法を含む。

30

【0138】

本明細書において前記で特定された好ましい方法において、BMP阻害剤は、Noggin、DAN、ならびにCerberusおよびGremlinを含むDAN様タンパク質より選択され、好ましくは、Nogginを含む、もしくはNogginであり、ならびに/あるいは前記Wntアゴニストは、Wnt、好ましくは、Wnt-3a、R-スポンジン1~4、Norrin、およびGSK阻害剤のうちの1つまたは複数より選択され、より好ましくは、Wnt-3aおよび/もしくはR-スポンジンを含む、またはWnt-3aおよび/もしくはR-スポンジンである。

【0139】

別の好ましい方法において、肝臓オルガノイドは単一細胞、好ましくは、Lgr5を発現する細胞に由来し、より好ましくは、単一細胞は、関心対象の核酸分子を含む核酸構築物を含む。細胞はまた、Hnf1 α およびHnf4などの肝臓特異的マーカーも発現してよい。

40

【0140】

ある特定のLgr5発現細胞タイプの単離が既に以前に述べられている(例えば、W02009/022907およびW02010/016766を参照されたい)。しかしながら、本明細書において開示されたタイプのLgr5を発現する肝臓特異的幹細胞は以前に述べられたことはない。従って、本発明は、少なくともLgr5の、ならびにHnf1 α 、Hnf4a、Sox9、KRT7、およびKRT19のうちの1つまたは複数のマーカーの、有意なレベルでの天然発現を特徴とする成体幹細胞の集団を提供する。この細胞集団はまた、小腸および胃に共通する前駆体集団マーカー、例えば、

50

Cd44およびSox9(Barker & Huch et al Cell stem cell 2010)も発現する。これらは本発明による幹細胞において高発現しているが、成体肝臓では発現されず、本明細書に記載の肝臓培養物の自己複製能を強化する。本発明のこの局面による細胞はまた、例えば、MMP7、Sp5、およびTnfrs19を含むWnt標的遺伝子もアップレギュレートすることがある。これは、これらの培養物の自己複製能を維持するために、活発なかつ強い古典的Wntシグナル伝達活性が必要だという強い根拠となっている。

【0141】

「天然発現」とは、いかなるやり方でも細胞が組換えによって操作されていない、すなわち、外因性遺伝物質の導入によって、例えば、内因性遺伝子または外因的に導入される形の遺伝子に機能的に連結された異種(非天然)プロモーターもしくはさらに強力なプロモーターまたは他の調節配列の導入によって、これらのマーカーを発現するように、またはこれらのマーカーの発現を調節するように、細胞が人工的に誘導されていないことを意味する。天然発現は、これらが存在するエキソコード配列間のイントロンを含む、細胞内のゲノムDNAからの発現である。天然発現はcDNAからの発現ではない。天然発現は、必要に応じて、無関係の異種配列が存在しないことを調べるために遺伝子の読み枠内から配列決定するなど様々な方法のいずれか1つによって証明することができる。「成体」とは出生後を意味する。本発明の幹細胞に関して「成体幹細胞」という用語は、幹細胞が、胚段階より後の成長段階にある動物の組織または臓器から単離されたことを意味する。

【0142】

この幹細胞集団はまた、任意の有意なレベルでの、ある特定のマーカーの天然発現の欠如によって特徴付けることができ、これらの多くは細胞分化に関連する。具体的には、単離された成体幹細胞集団の細胞は、Cd11b、CD13、CD14、AFP、Pdx1、任意のCYPメンバー(例えば、CYP3A11、CYP11A1)のうちの1つまたは複数を有意なレベルで天然発現しない。本明細書において定義されるように、これらのマーカーはネガティブマーカーといわれる。

【0143】

「発現している」という用語は、細胞内のマーカーの存在について述べるために用いられる。発現していると見なされるためには、マーカーは検出可能なレベルで存在しなければならない。「検出可能なレベル」とは、PCR、ブロッディング、またはFACS分析などの標準的な実験方法の1つを用いてマーカーを検出できることを意味する。30回のPCRサイクル後に、細胞内で少なくとも約100コピー/細胞の発現レベルに相当する発現が妥当に検出できれば、遺伝子は本発明の集団の細胞によって発現されているとみなされる。「発現する」および「発現」という用語は対応する意味を有する。この閾値より少ない発現レベルでは、マーカーは発現しているとみなされない。本発明の細胞におけるマーカーの発現レベルと、例えば、胚性幹細胞などの別の細胞における同じマーカーの発現レベルとの比較は、好ましくは、同じ種から単離された2つの細胞タイプを比較することによって行うことができる。好ましくは、この種は哺乳動物であり、より好ましくは、この種はヒトである。このような比較は、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)実験を用いて都合よく行うことができる。

【0144】

当技術分野において公知の多数の物理的分離方法のいずれか1つを用いて、本発明のこの局面の細胞を選択し、これを他の細胞タイプと区別することができる。このような物理的方法は、本発明の細胞が特異的に発現するマーカーに基づくFACSおよび様々なイムノアフィニティ方法を伴ってもよい。前記のように、Lgr5、Hnf1 α 、およびHnf4は、本発明の細胞において高レベルに発現している細胞マーカーのうちの3つである。従って、例示のみとして、本発明の細胞は、これらのマーカーの存在に頼る多数の物理的分離方法によって単離することができる。

【0145】

1つの態様において、本発明の細胞は、抗体、例えば、これらのマーカーの1つに対する抗体を用いたFACSによって単離することができる。当業者に明らかなように、これは、蛍光標識抗体によって、または一次抗体に対する結合特異性のある蛍光標識二次抗体によ

て達成されてもよい。適切な蛍光標識の例には、FITC、Alexa Fluor(登録商標)488、GFP、CFSE、CFDA-SE、DyLight488、PE、PerCP、PE-Alexa Fluor(登録商標)700、PE-Cy5(TRI-COLOR(登録商標))、PE-Cy5.5、PI、PE-Alexa Fluor(登録商標)750、およびPE-Cy7が含まれるが、これに限定されない。このリストは例としてしか示されず、限定することを目的としない。

【0146】

抗Lgr5抗体を用いたFACS分析が、精製された細胞集団を提供することは当業者に明らかであろう。しかしながら、一部の態様において、他の特定可能なマーカー、好ましくは、Hnf1 α およびHnf4の1つまたは複数を用いて、さらなる回のFACS分析をさらに行うことによって細胞集団を精製することが好ましい場合があるが、その他も使用することができる。

10

【0147】

別の態様において、本発明の細胞は、当技術分野において周知の分離方法であるイムノアフィニティ精製によって単離することができる。例示のみとして、本発明の細胞は、c-kitに対するイムノアフィニティ精製によって単離することができる。当業者に明らかのように、この方法は精製カラム上への抗体の固定化に頼る。次いで、細胞試料をカラムにロードし、適切な細胞を抗体に結合させ、従って、カラムに結合させる。洗浄工程後に、固定化抗c-kit抗体に優先的に結合し、細胞をカラムから放出させる競合物質を用いてカラムから細胞を溶出させる。

【0148】

固定化抗体を用いたイムノアフィニティ精製が、精製された細胞集団を提供することは当業者に明らかであろう。しかしながら、一部の態様において、他の特定可能なマーカーの1つまたは複数、例えば、Hnf4を用いた、さらなる回のイムノアフィニティ精製をさらに行うことによって細胞集団を精製し、単離されたクローンのアリコートを用いて他の関連する細胞内マーカーの発現を確認することが好ましい場合がある。

20

【0149】

同じ物理的分離方法を伴う連続した精製工程が必ずしも必要とされないことは当業者に明らかであろう。従って、例えば、細胞は、抗Lgr5抗体を用いたFACS工程の後に、SSEA-1アフィニティカラムを用いたイムノアフィニティ精製工程によって精製することができる。ある特定の態様において、細胞は、単離後に少なくとも約15日間、少なくとも約20日間、少なくとも約25日間、または少なくとも約30日間、培養することができる。ある特定の局面において、細胞は、細胞集団における細胞表現型の均一性を改善するために培養状態でさらに長期間、拡大される。

30

【0150】

この方法の他の特徴は、定義のために割り当てられた説明の一部において定義される。当技術分野において公知のように、通常、大きな細胞クラスターではなく単細胞懸濁液または小さな細胞クラスター(2~50細胞/クラスター)が播種される。このような細胞は分裂するにつれて、細胞増殖を促進する密度で支持体に播種される。典型的に、単一細胞が単離される時、少なくとも1~500細胞/ウェルのプレーティング密度が用いられ、ウェルの表面は0.32cm²である。クラスターが播種される時、プレーティング密度は、好ましくは、250~2500細胞/cm²である。リプレーティングのために、約2500細胞/cm²~約5,000細胞/cm²の密度が用いられてもよい。リプレーティングの間、当技術分野において公知のように、通常、大きな細胞クラスターではなく単細胞懸濁液または小さな細胞クラスターが播種される。

40

【0151】

本発明のオルガノイド

前記の細胞は、本明細書において「オルガノイド」と呼ばれる物体に増殖する。従って、本発明の方法によって取得可能な肝臓オルガノイドは本発明のさらなる局面である。本発明者らが知る限りでは、このような長期間(すなわち、少なくとも7ヶ月間の培養; 本明細書に含まれる実施例を参照されたい)の後に機能し、かつ生きている肝臓オルガノイド

50

が得られたのは今回が初めてである。機能は、好ましくは、本明細書において定義された肝臓マーカーの存在によって、および/または本明細書において定義された前記オルガノイドの構造によって特徴付けられる。得られた肝臓オルガノイドの最終量は培養期間と関連するので、当業者であれば、本発明が先駆的な発明であり、例えば、再生医療における新たな可能性を開く可能性があることを理解するだろう。

【0152】

例えば、本発明によるオルガノイドは、少なくとも 1×10^3 個の細胞、少なくとも 1×10^4 個の細胞、少なくとも 1×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 1×10^7 個の細胞、またはそれより多い細胞を含んでもよい。一部の態様において、それぞれのオルガノイドは約 1×10^3 個の細胞～ 5×10^3 個の細胞を含む。一般的に、24ウェルプレート

10

【0153】

本発明による細胞およびオルガノイドは非ヒト動物でもよく、ヒトでもよい。本発明者らは、本発明の培地および方法を用いて動物肝臓オルガノイドおよびヒト肝臓オルガノイドを両方ともインビトロで増殖および維持できることを初めて示した。

【0154】

本発明に従って作製されたオルガノイドの説明に役立つ例を添付の図面に示した。本発明によるオルガノイドは、嚢胞構造と、その外側にある、少なくとも1つの芽(bud)および中心管腔を有する細胞層とを有し得ることが分かる。マトリゲルの外側にあるオルガノイドは、おそらく、必要な増殖因子に接近しやすいために、マトリゲル中心にあるオルガノイドより大きくなる傾向がある。構造上、本発明によるオルガノイドは形が細長くなることが多い。本発明によるオルガノイドは、胆管によく似た構造を有する単一細胞上皮層である1つまたは複数の出芽(budding)構造を含むことがある。共焦点顕微鏡観察下では、この構造はケラチン陽性に染色されることがある。本発明によるオルガノイドは、極性化した核および小さな細胞質のある細胞を含むことがある。オルガノイドは、複数の層から形成される部分を有することがある。このような細胞は、多くの場合、細胞のより中心に核がある、すなわち、極性化していない傾向がある。多層部分にある細胞は、細胞間に隙間すなわち管腔を含むように自己組織化することがある。

20

【0155】

肝臓オルガノイドは、好ましくは、肝細胞および胆管細胞を含み、より好ましくは、以下のマーカーの少なくとも1つを検出することができる肝細胞および胆管細胞を含む：少なくとも1種類の肝細胞マーカー、例えば、アルブミン、トランスサイレトリン(transferrin)、B-1インテグリン、およびグルタミンスyntetase、ならびに/もしくはCYP3A11、FAH、tbx3、TAT、およびGckの少なくとも1つ、ならびに/または少なくとも1種類の胆管細胞マーカー、例えば、ケラチン7および19。当業者であれば、これらの各マーカーを検出する方法(すなわち、RT-PCRおよび/または免疫組織化学)を知っている。好ましくは、これらの各マーカーの発現は、実験パートにおいて実施されるように評価される。これらの各マーカーは、通常、本発明の方法を用いて培養して少なくとも2週間後、3週間後、または1ヶ月後に発現している。両培養条件におけるオルガノイドのマイクロアレイ分析から、肝臓オルガノイドは成体肝臓組織に似ていることが分かった。

30

40

【0156】

一部の態様において、肝臓オルガノイドにおける細胞の約35%、例えば、細胞の25～45%、30～40%、33～37%、35%またはそれ以下、または15～35%は肝細胞表面マーカーを発現する。

【0157】

好ましくは、本発明に従って作製された作製された細胞およびオルガノイドはまた、肝細胞機能、例えば、成熟肝臓マーカーであるアルブミン、B-1インテグリン、CK-8、CK-18、トランスサイレチン(TTR)、グルコース6P、Met、グルタミンスyntetase(Glu1)、トランスフェリン、Fahd1、Fahd2a、K7、K19、ならびにチトクロムP450アイソフォーム3A13(CYP3A13)、51(CYP51)、2D10(CYP2D10)、2j6(CYP2j6)、39A1(CYP39A1)、4A10(CYP4A10)、4F13

50

(CYP4F13)、4F16(CYP4F16)、CYP4B1、および20A1(CYP20A1)の発現または陽性染色も有する。また、一部の態様において、胚肝臓遺伝子AFPは、成体肝臓と同様にどちらの培養条件でも検出されない。一部の態様において、 α 胎児タンパク質の発現はバックグラウンド遺伝子の発現をほんの少しだけ上回る。

【0158】

また、HNF1a、HNF1b、およびHNF4aとして周知の肝臓転写因子は両条件において高発現している。

【0159】

肝臓および膵臓は密接に関連する臓器であるので、本発明者らは、本発明者らの肝臓培養物が膵臓特異的遺伝子も発現するのかどうか調べた。膵臓は機能的に膵内分泌部および膵外分泌部に分けられる。膵内分泌部は、主に、インシュリン、グルカゴン、およびソマトスタチンの発現を特徴とする。これらのホルモンの発現は一組の内分泌膵臓特異的転写因子によって密接に調節され、最も重要な内分泌膵臓特異的転写因子はPdx1およびNeuroDである。膵外分泌部は、特に、消化酵素アミラーゼ、膵臓リパーゼ、およびキモトリプシンの産生を担う腺房区画および管区画によって形成される。これらの遺伝子の発現もPtf1などの特異的膵外分泌部遺伝子によって調節される。

【0160】

本明細書に記載の肝臓培養物には、膵臓特異的遺伝子Ptf1a、膵臓アミラーゼ(Amy2a4)、膵臓リパーゼ(Pnlip)、インシュリン(ins1およびins2)、グルカゴン(Gcg)、キモトリプシン(cela1)、Pdx1、ならびにNeuroDは存在しなかった。

【0161】

一部の態様において、肝臓オルガノイドにおいて以下の遺伝子の1つもしくは複数または全ては、成体肝臓肝細胞における対応する遺伝子に類似するレベルで発現している：Aqp1、Bmp2、Apo3、Apol7a、Sord、C3、Ppara、Pparg、tbx3、lgf1、ll17rb、ll1b、Tgfbi、Apoa1、Apoa4、Apob、Cyp26b1、Cyp27a1、Cyp2b13、Cyp2b9、Cyp2c37、Cyp2f2、Cyp2g1、Cyp2j13、Cyp3a11、Cyp4a10、およびCypf14。例えば、図16Aを参照されたい。

【0162】

一部の態様において、肝臓オルガノイドにおいて以下の遺伝子の1つまたは複数は、成体肝臓肝細胞における対応する遺伝子と比較して類似する停止レベルで発現している：Cc12、Osmr、Icam1、およびCxc12。

【0163】

一部の態様において、以下の遺伝子の一方または両方が肝臓オルガノイドおよび新生児肝臓において異なって発現している：mKi67およびcdkn3。

【0164】

一部の態様において、以下の遺伝子の1つ、2つ、または全てが肝臓オルガノイドおよび新生児肝臓において類似するレベルで発現している：cyp2j6、olfm4、およびLefty1。例えば、図16Bを参照されたい。

【0165】

一部の態様において、本発明の肝臓オルガノイドは、本発明の拡大培地(例えば、EM1またはEM2)において培養された時に管表現型を有する。

【0166】

一部の態様において、本発明の肝臓オルガノイドは、本発明の分化培地において培養された時に成体肝臓マーカーを発現する。

【0167】

1つの態様において、本発明の肝臓オルガノイドは、図16Cに示した遺伝子発現プロファイルを有する。

【0168】

特に好ましい態様において、本発明のマウス肝臓細胞集団またはオルガノイドは、図18に示した遺伝子発現プロファイルを有する。例えば、1つの好ましい態様において、本発明のマウス肝臓細胞集団またはオルガノイドは、

a)以下の幹細胞マーカーの少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11)、好ましくは全てを発現する: lgr5、lgr4、epcam、Cd44、Tnfrsf19、Sox9、Sp5、Cd24a、Prom1、Cdca7、およびElf3; ならびに/または

b)以下の幹細胞マーカーを発現しない: lgr6; ならびに/または

c)本発明の拡大培地において増殖された時に、以下の肝細胞マーカーまたは胆管細胞マーカーの少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19)、好ましくは全てを発現する: Hnf1a、Hnf1b、Hnf4a、Hhex、Onecut1、Onecut2、Prox1、Cdh1、Foxa2、Gata6、Foxm1、Cebpa、Cebpb、Cebpd、Cebpg、Glu1、Krt7、Krt19、およびMet; ならびに/または

d)本発明の拡大培地において増殖された時に、以下の遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17)を発現しない: afp、Ins1、Ins2、Gcg、Ptfla、Cela1、Cela2a、Cela3b、Neurod1、Neurod2、Neurog1、Neurog2、Neurog3、Amy2a4、Igflr、Igf2、およびCd34; ならびに/または

e)以下のリプログラミング遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、もしくは3)を発現する: Klf4、Myc、およびPou5f1; ならびに/または

f)以下のリプログラミング遺伝子を発現しない: Sox2。

ここで、遺伝子の発現は、好ましくは、発現を、例えば、マイクロアレイを用いてmRNAレベルで測定することによって検出される。

【0169】

より好ましくは、本発明のマウス肝臓細胞集団またはオルガノイドは前記の特徴a)～f)の全てを有する。

【0170】

一部の態様において、本発明のマウス細胞集団またはオルガノイドの前記の遺伝子発現プロファイルは、本発明の拡大培地において培養されたマウス細胞集団またはオルガノイドの遺伝子発現プロファイルである。

【0171】

一部の態様において、図19に示された遺伝子発現シグネチャーを有する本発明のヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドが提供される。例えば、本発明のEM1において培養されたヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドは、好ましくは、EM1細胞培地において発現されるような、図19において示された遺伝子を発現する。例えば、本発明のEM2において培養されたヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドは、好ましくは、EM2細胞培地において発現されるような、図19において示された遺伝子を発現する。例えば、本発明のDMにおいて培養されたヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドは、好ましくは、DM細胞培地において発現されるような、図19において示された遺伝子を発現する。

【0172】

例えば、好ましい1つの態様において、本発明のヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドは、

a)以下の幹細胞シグネチャー遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9)、好ましくは、全てを発現する: LGR4、TACSTD1/Epcam、CD44、SOX9、SP5、CD24、PROM1、CDCA7、およびELF3; ならびに/または

b)以下のリプログラミング遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4)、好ましくは、全てを発現する: KLF4、MYC、POU5F1、およびSOX2; ならびに/または

c)以下の肝細胞/胆管細胞特異的遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19)、好ましくは、全てを発現する: HNF1A、HNF1B、HNF4A、HHEX、ONECUT1、ONECUT2、PROX1、CDH1、FOXA2、GATA6、FOXO1、CEBPA、CEBPB、CEBPD、CEBPG、GLUL、KRT7、KRT19、およびMET; ならびに/または

d)以下の肝細胞/胆管細胞特異的遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6)、好ましくは、全てを発現しない: NEUROG2、IGF1R、およびCD34、AFP、GCG、およびPTF1A、例えば、NEUROG2、IGF1R、およびCD34を発現しない; ならびに/または

e)以下の肝細胞特異的遺伝子の少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1

10

20

30

40

50

0、11、12、13、14、15、16、17、18)、好ましくは、全てを発現する：TTR、ALB、FAH、TAT、CYP3A7、APOA1、HMGCS1、PPARG、CYP2B6、CYP2C18、CYP2C9、CYP2J2、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP4F8、CYP4V2、およびSCARB1。

ここで、遺伝子の発現は、好ましくは、発現を、例えば、マイクロアレイを用いてmRNAレベルで測定することによって検出される。

【0173】

より好ましくは、本発明のヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドは前記のa)～e)の特徴の全てを有する。

【0174】

一部の態様において、図19に示したように、本発明のヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドにおける遺伝子は参照RNAの発現に対してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる。好ましくは、参照RNAは、Universal Human Reference RNA(Stratagene,カタログ番号740000)である。一部の態様において、遺伝子は、図19においても参照RNAに対してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされると示されているのであれば参照RNAに対してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされるが、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションの程度は同じである必要はない。他の態様において、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションの程度は、図19に示したように+/-35%、+/-30%、+/-25%、+/-20%、+/-20%、+/-15%、+/-10%、+/-5%、+/-3%、またはほぼ同じである。他の態様において、図19に示したように、本発明のヒトオルガノイドにおける遺伝子の絶対発現レベルは、+/-35%、+/-30%、+/-25%、+/-20%、+/-15%、+/-10%、+/-5%、+/-3%、またはほぼ同じである。

【0175】

本発明のヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドはまた、好ましくは、Lgr5および/またはTnfrsf19、好ましくは両方を発現する。一部の態様において、ヒト肝臓細胞集団またはオルガノイドは本発明の拡大培地において培養された時にLgr5および/またはTnfrsf19、好ましくは両方を発現する。好ましくは、Lgr5および/またはTnfrsf19の発現はRT PCRによって検出される。一部の態様において、分化培地において培養された時のオルガノイドまたは細胞におけるLgr5および/またはTnfrsf19は、拡大培地において培養された時のオルガノイドまたは細胞における発現レベルと比較してかなり低い(例えば、少なくとも1/2、少なくとも1/3、少なくとも1/4、少なくとも1/5、少なくとも1/10、少なくとも1/15の)発現レベルで存在する。

【0176】

本発明による細胞およびオルガノイドは、好ましくは、例えば、約1μg/時間/10⁶細胞～10μg/時間/10⁶細胞、好ましくは、2μg～6μg/時間/10⁶細胞の速度でアルブミンを分泌することができてよい。

【0177】

さらに、このような細胞およびオルガノイドは尿素を分泌してもよい。例えば、35mm細胞ディッシュにおいて、尿素合成の活性は48時間で1g～50μg、好ましくは、5μg～30μgでもよい。

【0178】

本発明による細胞およびオルガノイドは、例えば、染色された時に目に見えるグリコーゲン貯蔵を示してもよい。本発明による細胞およびオルガノイドがグリコーゲンを活発に合成する能力は、低グルコース分化培地から、10%FBSおよび0.2μMデキサメタゾンが添加された高グルコースDMEMに培地を2日間交換することによって試験することができる。

【0179】

本発明による細胞およびオルガノイドは誘導性チトクロムP450活性(例えば、CYP1A)を有してもよい。このような活性は、例えば、エトキシレゾルフィン-O-デエチラーゼ(EROD)アッセイ(Cancer Res, 2001, 61:8164-8170)を用いて試験することができる。例えば、細胞またはオルガノイドを3-メチルコラントレンなどのP450基質に曝露し、EROD活性レベルを対照細胞と比較することができる。

【0180】

形態学的に、細胞は肝細胞様に見える。

【0181】

好ましい肝臓オルガノイドは、図2に図示したように、嚢胞構造と、その外側にある、芽および中心管腔を有する細胞層とを含む、またはこれらからなる。この肝臓オルガノイドは、以下の特徴のうちの1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、または4つ全て)を有してもよい: (a) $>5 \times 10^5$ 細胞/cm³、好ましくは $>10 \times 10^5$ 細胞/cm³ の細胞密度を有すること; (b) 2~30層の細胞層に相当する厚み、好ましくは、2~15層の細胞層に相当する厚みを有すること; (c) 細胞が三次元で相互に接触し、(d) 健康な肝臓組織に固有の機能を示し、(e) 2つの規定されたドメインを有する細長い形状を有すること。すなわち、高度に極性化した細胞が検出され、ケラチンマーカーが発現している単層上皮ドメイン(このドメインは胆管ドメインに似ている)、および他方のドメインはオルガノイド本体を構成し、アルブミン発現が検出されることがある極性化していない細胞を有する多層上皮によって形成される。このような肝臓オルガノイドは、好ましくは、肝臓断片でない、および/または血管を含まない、および/または肝小葉も胆管も含まないことが当業者に明らかである。

10

【0182】

本発明の文脈の中で、肝臓断片は、成体肝臓、好ましくは、ヒト成体肝臓の一部である。従って、好ましくは、本明細書において特定された肝臓オルガノイドは肝臓断片でない。肝臓オルガノイドは、好ましくは、成体肝臓に由来する細胞、好ましくは、成体肝臓に由来する上皮幹細胞、より好ましくは、Lgr5を発現する成体肝臓に由来する上皮幹細胞を用いて得られる。

20

【0183】

一部の態様において、肝臓オルガノイドは、Lgr5を発現する細胞を含む。例えば、一部の態様において、肝臓オルガノイド中の細胞の少なくとも2%、より好ましくは少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%はLgr5を発現する。同様に、本発明は、Lgr5を発現し、本発明の肝臓オルガノイドに由来する細胞または細胞の集団を提供する。このような細胞の子孫も本発明に含まれる。

【0184】

1つの態様において、肝臓オルガノイドは、本発明の方法を用いて、従って、細胞外マトリックスと接触させてなお培養されている肝臓オルガノイドである。好ましくは、肝臓オルガノイドは非間葉系細胞外マトリックスの中に埋め込まれる。本発明の文脈の中で、「接触させて」とは物理的または機械的または化学的な接触を意味する。物理的または機械的または化学的な接触とは、前記肝臓オルガノイドを前記細胞外マトリックスから分離するために、力が用いられる必要があることを意味する。

30

【0185】

好ましい態様において、肝臓オルガノイドは、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月またはそれ以上、培養することができる。

40

【0186】

別の好ましい態様において、肝臓オルガノイドは、単一細胞、好ましくは、Lgr5を発現する単一細胞から生じ、より好ましくは、単一細胞は、関心対象の核酸分子を含む核酸構築物を含む。

【0187】

さらに、本発明は、上皮幹細胞またはこれらの幹細胞を含む単離されたオルガノイド構造を細胞外マトリックス上で培養するための本発明による培地の使用を提供する。前記幹細胞は、好ましくは、ヒト胚性幹細胞を含まない。ヒト成体幹細胞が好ましい。さらに、肝臓に由来する単一の選別された上皮幹細胞はまた、本発明による培地において、これらの三次元オルガノイドを開始することができる。さらに、本発明は、幹細胞を含む肝臓断

50

片を培養するための本発明による培地の使用を提供する。

【0188】

前記幹細胞は肝臓幹細胞または上皮幹細胞であることが好ましい。本発明による培地は、全ての分化細胞タイプが存在する肝臓オルガノイドが形成される長期間培養条件の確立を可能にした。本発明による培養方法の使用によって、少なくとも7ヶ月、少なくとも8ヶ月、少なくとも9ヶ月、少なくとも10ヶ月の培養期間が可能になった。

【0189】

さらに、本発明は、肝臓オルガノイド、好ましくは、少なくとも50%生細胞、より好ましくは少なくとも60%生細胞、より好ましくは少なくとも70%生細胞、より好ましくは少なくとも80%生細胞、より好ましくは少なくとも90%生細胞を含む肝臓オルガノイドを提供する。細胞の生存率は、FACSにおいてヘキスト染色またはヨウ化プロピジウム染色を用いて評価することができる。

10

【0190】

生細胞は、好ましくは、前記の肝機能または肝細胞の特徴を有する。

【0191】

本発明の細胞およびオルガノイドの使用

さらなる局面において、本発明は、創薬スクリーニング、毒性アッセイ、または再生医療における、前記の本発明による肝臓細胞またはオルガノイドの使用を提供する。さらに、本発明は、毒性アッセイにおける本発明の肝臓オルガノイドの子孫の使用を提供する。このような毒性アッセイは、肝臓オルガノイドに由来する細胞または肝臓オルガノイドもしくはその一部を用いたインビトロアッセイでもよい。このような子孫および肝臓オルガノイドは、例えば、毒性アッセイにおいて現在用いられている上皮細胞株、例えば、Caco-2 (ATCC HTB-37)、I-407(ATCC CCL6)、およびXBF(ATCC CRL8808)より培養しやすく、初代上皮細胞によく似ている。肝臓オルガノイドを用いて得られる毒性結果は、患者において得られる結果によく似ていると予想される。細胞ベースの毒性試験は、臓器特異的細胞傷害性を確かめるのに用いられる。前記試験において試験される化合物は癌化学予防剤、環境化学物質、栄養補助食品、および潜在的な中毒物質を含む。細胞は、ある期間、複数種の濃度の試験薬剤に曝露される。アッセイにおける試験薬剤の濃度は、5日間の曝露および最大溶解濃度からの対数希釈を用いた予備アッセイにおいて確かめられる。曝露期間の終わりに、培養物の増殖阻害を評価する。データを分析して、エンドポイントを50パーセント阻害した濃度(TC50)を求める。

20

30

【0192】

例えば、肝細胞におけるチトクロムP450酵素の誘導は薬物の効力および毒性を確かめる重要な要因である。特に、P450の誘導は、厄介な薬物間相互作用の重要な機構であり、薬物効力を限定し、薬物毒性を支配する重要な要因でもある。チトクロムP450誘導アッセイはインタクトな正常ヒト肝細胞を必要とするので開発が難しかった。これらの細胞は、ハイスループットアッセイの量産を維持するのに十分な数で産生することが困難なことが分かっている。

【0193】

例えば、本発明のこの局面によれば、候補化合物は本明細書に記載の細胞またはオルガノイドと接触されてもよく、細胞または細胞活性に対する変化がモニタリングされてもよい。本発明の細胞またはオルガノイドの他の非治療的使用の例には、肝臓発生学、肝臓細胞系列、および分化経路の研究；組換え遺伝子発現を含む遺伝子発現研究；肝臓損傷および修復に関与する機構；肝臓の炎症および感染症の研究；発病機構の研究；ならびに肝臓細胞トランスフォーメーション機構および肝臓癌病因の研究が含まれる。

40

【0194】

ハイスループット目的で、前記肝臓オルガノイドは、マルチウェルプレート、例えば、96ウェルプレートまたは384ウェルプレートの中で培養される。前記オルガノイドに影響を及ぼす分子を特定するために分子ライブラリーが用いられる。好ましいライブラリーは、抗体断片ライブラリー、ペプチドファージディスプレイライブラリー、ペプチドライブ

50

ライリー(例えば、LOPAP(商標), Sigma Aldrich)、脂質ライブラリー(BioMol)、合成化合物ライブラリー(例えば、LOP AC(商標), Sigma Aldrich)、または天然化合物ライブラリー(Specs, TimTec)を含む。さらに、腺腫細胞の子孫における1種類または複数種の遺伝子の発現を誘導または抑制する遺伝子ライブラリーを使用することができる。これらの遺伝子ライブラリーは、cDNAライブラリー、アンチセンスライブラリー、およびsiRNAライブラリーまたは他の非コードRNAライブラリーを含む。細胞は、好ましくは、ある特定の期間、複数種の濃度の試験薬剤に曝露される。曝露期間の終わりに、培養物が評価される。「影響を及ぼす」という用語は、増殖、形態学的変化、および細胞死の低減または消失を含むが、これに限定されない、細胞における任意の変化をカバーするために用いられる。前記肝臓オルガノイドはまた、特異的に上皮癌腫細胞を標的とするが、前記肝臓オルガノイドを標的としない薬物を特定するのに使用することもできる。

10

【0195】

さらに、本発明による肝臓オルガノイドは、潜在的な新規の薬物または公知もしくは新規の栄養補助食品の毒性アッセイにおいて、Caco-2細胞などの細胞株の使用によって代わることができる。

【0196】

さらに、このような肝臓オルガノイドは病原体を培養するのに使用することができる。

【0197】

肝臓オルガノイドを含む培養物は、再生医療において、例えば、放射線照射後および/または外科手術後の肝臓上皮修復において、慢性または急性の肝不全または疾患に罹患している患者における上皮修復において有用である。肝臓疾患には、肝細胞癌、アラジール症候群、 α -1-アンチトリプシン欠損症、自己免疫肝炎、胆道閉鎖症、慢性肝炎、肝臓癌、肝硬変、嚢胞、脂肪肝、ガラクトース血症、ジルベール症候群、原発性胆汁性肝硬変、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、原発性硬化性胆管炎、ライ症候群、類肉腫症、チロシン血症、I型糖原病、ウィルソン病、新生児肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、ポルフィリン症、およびヘモクロマトーシスが含まれるが、これに限定されない。

20

【0198】

肝不全につながる遺伝的状態は、本発明の培地および/または方法に従って培養された細胞を用いた部分的または完全な細胞交換の形をとる細胞療法から利益を得る可能性がある。肝不全につながる遺伝的状態の非限定的なリストには、進行性家族性肝内胆汁うっ滞、III型糖原病、チロシン血症、デオキシグアノシンキナーゼ欠損症、ビルビン酸デカルボキシラーゼ欠損症、先天性赤血球異形成貧血、多嚢胞性肝疾患、多発性嚢胞腎、 α -1-アンチトリプシン欠損症、尿素回路欠陥(Urea cycle defects)、有機酸血症(organic acid emia)、リソソーム蓄積症、および脂肪酸酸化障害が含まれる。細胞療法から利益を得る可能性がある他の状態には、ウィルソン病および遺伝性アミロイドーシス(FAP)が含まれる。

30

【0199】

完全な治療効果に到達するために肝臓全移植を必要とする肝不全の肝細胞関連しない他の原因は、本発明の培地および/または方法に従って培養された細胞を用いた細胞療法を用いたある程度の一時的な機能回復からなお利益を得る可能性がある。このような状態の例の非限定的なリストには、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、アグラギル(Agilie)症候群、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、硬変のあるB型肝炎、硬変のあるC型肝炎、バッド・キアリ症候群、原発性高シュウ酸尿症、自己免疫肝炎、およびアルコール性肝疾患が含まれる。

40

【0200】

本発明の肝臓オルガノイドは、機能不全肝細胞が関与する遺伝性疾患を治療する方法において使用することができる。このような疾患は早期発症型または晩期発症型でもよい。早期発症型疾患には、代謝産物に関連する臓器不全(例えば、 α -1-アンチトリプシン欠損症)、糖原病(例えば、GSDII、ポンペ病)、チロシン血症、軽度DGUOK、CDA I型、尿素回路欠陥(例えば、OTC欠損症)、有機酸血症(organic academia)、および脂肪酸酸化障害が含

50

まれる。晩期発症型疾患には、原発性高シュウ酸尿症、家族性高コレステロール血症、ウィルソン病、遺伝性アミロイドーシス、および多嚢胞性肝疾患が含まれる。本発明の肝臓オルガノイドから生じた健康な肝細胞との部分的または完全な交換を用いて、肝機能を回復または肝不全を遅延することができる。

【0201】

本発明の肝臓オルガノイドは、遺伝性代謝疾患に起因する、または肝細胞感染の結果として生じた慢性肝不全を治療する方法において使用することができる。遺伝性代謝疾患の治療は、遺伝子組換えされた自己由来の本発明の肝臓オルガノイドの投与を伴ってもよい。肝細胞感染の治療は同種異系の本発明の肝臓オルガノイドの投与を伴ってもよい。一部の態様において、肝臓オルガノイドは2〜3ヶ月の期間にわたって投与される。

10

【0202】

本発明の肝臓オルガノイドは、急性肝不全、例えば、パラセタモール、薬物、またはアルコールの使用に起因し得る肝臓中毒の結果としての急性肝不全を治療するために使用することができる。一部の態様において、肝機能を回復させる療法は、本発明のオルガノイドから得られた凍結された使いやすい同種異系肝細胞から肝細胞懸濁液を注射する工程を含む。適切なオルガノイドを凍結できることは、オルガノイドをすぐに送達することができる、そのため、輸血のために待つ必要が無いことを意味する。

【0203】

欠陥のある肝機能を交換または矯正する場合、本発明に従って作製された1つまたは複数の肝臓オルガノイドから細胞-マトリックス構造を構築することが可能でありうる。十分な機能には肝臓細胞集団の約10%しか必要としないと考えられている。このために、ドナーが現れるのが比較的限られていることと小児臓器の大きさが小さいために、特に、臓器全体の移植には、小児へのオルガノイドユニット組成物の移植が好ましい。例えば、8ヶ月の小児は約250gの重さの正常肝臓を有する。従って、この小児は約25gの組織を必要とする。成体肝臓の重さは約1500gである。従って、必要とされる移植片は成体肝臓の約1.5%しかないだろう。本発明によるオルガノイドユニットが、任意で、ポリマースキャフォールドに取り付けられて移植されると、新たな宿主において増殖が起こり、結果として生じた肝臓細胞集団が、欠陥のある宿主機能に取って代わる。本発明者らは、成体肝臓幹細胞または幹細胞を含む肝臓組織断片から、非ヒト動物またはヒトへの移植に適した成熟肝細胞を作製できることを初めて示した。本発明による第1の培地を用いて、本発明者らは、肝臓幹細胞集団を維持および拡大できることを証明した。本発明による第2の培地を用いて、本発明者らは、肝芽細胞をインビボで、移植目的に適した成熟肝細胞に分化できることを示した。従って、本発明者らは、肝臓再生、欠陥のある肝機能の交換または矯正のための新たな肝細胞源を提供する。

20

30

【0204】

本発明者らはまた、本発明の方法によって増殖されたオルガノイドの免疫不全マウスへの首尾良い移植も証明した(実施例7を参照されたい)。移植されたオルガノイド由来細胞はインビボで胆管細胞および肝細胞を両方とも生じた。従って、1つの態様において、本発明は、ヒトまたは動物に移植するための本発明のオルガノイドまたはオルガノイド由来細胞を提供する。

40

【0205】

移植目的でのヒト肝臓オルガノイドの使用は、多くの理由で胎児肝細胞または成体肝細胞の使用より有利である。第1に、本発明の培養方法は、無限の細胞拡大、従って、無限の供給を提供する。特に、本発明者らは、適切な培養条件下(例えば、本発明の拡大培地を用いた適切な培養条件)では、Lgr5+細胞がインビトロで1000回超分裂することを示した。従って、Lgr5+細胞を肝臓オルガノイドから抽出し、再継代して、移植可能な肝細胞発生細胞および胆管細胞発生細胞の連続した自己複製源とすることができる。対照的に、胎児肝細胞または成体肝細胞は、1回しか移植されないドナー肝臓から得られる。さらに、ドナー細胞は数日しか生存できず、幹細胞特性を失う。このことは、ドナーが現れたらすぐに移植片を作製しなければならないことを意味している。他方で、オルガノイド由来細胞

50

胞は複数回分裂しても、かつ長期間にわたっても表現型を保持している。このことは、オルガノイド由来細胞はいかなる段階でも移植する準備が整っており、移植に使用できることを意味している。このために、肝臓移植のウェイティングリストに登録された患者の寿命を延ばす一時的な肝臓治療法としてオルガノイド由来細胞を使用できる可能性がある。本発明の肝臓オルガノイドのさらなる利点は、機能が失われることなく肝臓オルガノイドを凍結し、後で解凍できることである。このために、細胞バンキングが可能になり、保管が容易になり、急な使用のために迅速に使用することができる。これは、例えば、急性肝臓毒性の治療に使用可能な「既製」品の調製において有用である可能性がある。オルガノイドはまた、生きているドナーから小さな生検材料として採取された細胞または組織断片から増殖することもでき、そのために、治療に対する倫理上の反対が最小限になる。ドナーは、治療しようとする患者からのものであってもよい。これにより、外来の細胞および臓器の移植に関連した副作用を低減し、免疫抑制薬の必要を減らすことができる可能性がある。

10

【0206】

従って、細胞療法によってヒト患者または動物患者を治療する方法が本発明の範囲内に含まれる。本明細書において「動物」という用語は、全ての哺乳動物、好ましくはヒト患者を指す。これはまた、胚段階および胎児段階を含む全ての発生段階にある個々の動物も含む。例えば、患者は成体でもよく、療法は、小児科で使用するための(例えば、新生児、小児、または青少年を対象とする)ものでもよい。このような細胞療法は、任意の適切な手段による、本発明に従って作製された細胞またはオルガノイドの患者への投与を含む。具体的には、このような治療方法は損傷のある組織の再生を伴う。本明細書で使用する「投与」という用語は、静脈内投与または注射などのよく認識された投与形態、ならびに移植、例えば、外科手術による投与、グラフトイング、または本発明による細胞またはオルガノイドに由来する組織工学的に作製された肝臓の移植を指す。細胞の場合、個体への全身投与は、例えば、胸管を通じた上腸間膜動脈、腹腔動脈、鎖骨下静脈への注入、上大静脈を介した心臓への注入、または腹腔への注入と横隔下リンパ管を介したその後の細胞移動、または直接、肝動脈血液供給もしくは門脈への注入を介した肝臓部位への注入によって可能であり得る。

20

【0207】

1回の注入につき $10^4 \sim 10^{13}$ 細胞/100kg人間を投与することができる。好ましくは、約 $1 \sim 5 \times 10^4 \sim 1 \sim 5 \times 10^7$ 細胞/100kg人間を静脈内に注入することができる。より好ましくは、約 $1 \times 10^4 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/100kg人間を静脈内に注入することができる。一部の態様において、細胞またはオルガノイドの単回投与が提供される。他の態様において、複数回投与が用いられる。複数回投与は、初回治療法にわたって、例えば、3～7日間連続して提供され、次いで、他の時に繰り返されてもよい。

30

【0208】

一部の態様において、患者の肝臓の10～20%を、本発明の肝臓オルガノイドに由来する健康な肝細胞を用いて再配置/交換することが望ましい。

【0209】

本明細書において定義されたLgr5を発現する単一細胞から肝臓オルガノイドを再構築することも可能である。この単一細胞は、例えば、遺伝子欠損または変異を矯正するために、本明細書において定義された核酸構築物を導入することによって改変されていてもよい。所望に応じて、例えば、siRNAを用いて、発現を特異的に無くすることも可能だろう。発現させようとする潜在的なポリペプチドは、例えば、AAT(α アンチトリプシン)を含む、肝臓代謝病において欠損しているポリペプチドのいずれでもよい。肝臓生理機能を解明するために、本発明者らはまた、Wnt経路、EGF経路、FGF経路、BMP経路、またはnotch経路に結びつけられている遺伝子を発現または不活化することができる。また、薬物毒性をスクリーニングする場合、肝臓薬物代謝を担う遺伝子(例えば、CYPファミリーの遺伝子)の発現または不活性化は関心が高いだろう。

40

【0210】

50

1つの態様において、拡大された上皮幹細胞は、関連する組織運命、例えば、肝細胞および胆管細胞を含む肝臓細胞にリプログラミングすることができる。これまで、成体幹細胞から肝臓細胞を再生することは不可能であった。本発明の培養方法は、密接に関連する上皮幹細胞を、肝細胞および胆管細胞を含む肝臓細胞に分化転換する因子を分析することができるだろう。

【0211】

損傷または病気のある組織の修復に向けられた方法において遺伝子療法をさらに使用できることは当業者に明らかであろう。使用は、例えば、DNAおよび/またはRNAのような遺伝情報を幹細胞に送達するアデノウイルス遺伝子送達ビヒクルまたはレトロウイルス遺伝子送達ビヒクルからなってもよい。当業者であれば、遺伝子療法において標的化された特定の遺伝子を置換または修復することができる。例えば、機能しない遺伝子を置換するために、正常遺伝子をゲノム内の非特異的な位置に挿入することができる。別の例では、相同組換えによって、正常な遺伝子配列の代わりに異常な遺伝子配列を置換することができる。または、選択的復帰変異は遺伝子をその正常機能に戻すことができる。さらなる例は、特定の遺伝子の調節(遺伝子をオンまたはオフする程度)を変えることである。好ましくは、幹細胞は、エクスピボで遺伝子療法アプローチによって治療され、その後に、哺乳動物、好ましくは、治療を必要とするヒトに移入される。例えば、オルガノイド由来細胞は患者に移植される前に培養状態で遺伝子組換えされてもよい。

【0212】

本発明者らは、健康な肝臓においてLgr5が検出不可能であるが、残存するLgr5が検出され得ることを発見した。従って、本発明は、Lgr5が発現しているかどうか検出する工程を含む肝臓損傷を診断する方法であって、Lgr5タンパク質の発現が肝臓損傷を示す、前記方法をさらに提供する。本発明はまた、肝臓においてLgr5の発現をモニタリングすることによって肝臓の修復または再生をモニタリングする方法を提供する。Lgr5発現は、任意の適切な方法、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、またはPCR法の使用によって検出することができる。

【0213】

本発明はまた、前記の本発明の局面のいずれか1つによる細胞および/またはオルガノイドならびに前記の本発明の局面のいずれか1つによる培地を含む、組成物または細胞培養容器を提供する。例えば、このような組成物または細胞培養容器は、本発明の方法に従って前記の培地において培養された任意の数の細胞またはオルガノイドを含んでもよい。例えば、好ましい培地は、B27、N2、200ng/mlのN-アセチルシステイン、50ng/mlのEGF、1μg/mlのR-スポンジン1、10nMのガストリン、100ng/mlのFGF10、10mMのニコチンアミド、および50ng/mlのHGF、および50%のWnt条件培地が添加されたAdvanced-DMEM/F12を含む、またはこれからなる。

【0214】

定義

核酸構築物は関心対象の核酸分子を含み、核酸構築物が導入されている細胞において所定の核酸分子の発現を確かなものにする。特に好ましい核酸構築物は、ポリペプチドをコードする核酸分子が、前記細胞において前記核酸分子(すなわち、コード配列)を発現させることができるプロモーターに機能的に連結された発現ベクターである。「発現ベクター」という句は、一般的に、発現ベクターが含む遺伝子/核酸分子を、このような配列と適合する細胞において発現させることができる核酸分子を指す。これらの発現ベクターは、典型的には、少なくとも適切なプロモーター配列を含み、任意で、転写集結シグナルを含む。ポリペプチドをコードする核酸配列またはDNA配列またはヌクレオチド配列は、本発明の方法において特定されるように、インビトロ細胞培養物への導入が可能であり、インビトロ細胞培養物において発現可能なDNA/核酸構築物の中に組み込まれる。特定の細胞に導入するために調製されたDNA構築物は、典型的には、前記細胞によって認識される複製系、望ましいポリペプチドをコードする目的のDNAセグメント、ならびにポリペプチドをコードするセグメントに機能的に連結された転写および翻訳の開始調節配列および終結調

節配列を含む。DNAセグメントは、別のDNAセグメントと機能的な関係で配置された時に「機能的に連結されている」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーはコード配列の転写を刺激するのであればコード配列に機能的に連結されている。シグナル配列のDNAは、ポリペプチド分泌に関与するプレタンパク質として発現されるのであれば、ポリペプチドをコードするDNAに機能的に連結されている。一般的に、機能的に連結されたDNA配列は連続しており、シグナル配列の場合、連続しており、かつ読み枠(reading phase)の中にある。しかしながら、エンハンサーは、エンハンサーによって転写が制御されるコード配列と連続している必要はない。便利な制限部位またはその代わりに挿入されるアダプターもしくはリンカーにおける連結によって、連結は成し遂げられる。

【0215】

10

適切なプロモーター配列の選択は、一般的に、DNAセグメント発現のために選択される宿主細胞に左右される。適切なプロモーター配列の例には、当技術分野において周知の真核生物プロモーター(例えば、Sambrook and Russell, 2001, 前記を参照されたい)が含まれる。転写調節配列は、典型的に、細胞によって認識される異種エンハンサーまたは異種プロモーターを含む。適切なプロモーターにはCMVプロモーターが含まれる。発現ベクターには、複製系ならびに転写調節配列および翻訳調節配列と、ポリペプチドをコードするセグメント用の挿入部位が含まれる。細胞株および発現ベクターの実行可能な組み合わせの例は、Sambrook and Russell (2001, 前記)および Metzger et al. (1988) Nature 334:31-36に記載されている。

【0216】

20

本発明は、本明細書において特定されたLgr5を発現する細胞において発現させようとする関心対象の特定のポリペプチドまたは核酸分子に限定されない。本方法の目的に応じて、肝臓細胞におけるポリペプチドの発現および/または肝臓細胞におけるポリペプチドの発現の不活性化を想定することができる。発現させようとする潜在的なポリペプチドは、egAAT(α アンチトリプシン)のような肝臓代謝病において欠損しているポリペプチドの全てでもよい。肝臓生理機能を解明するために、本発明者らは、Wnt経路、EGF経路、FGF経路、BMP経路、またはnotch経路に結びつけられている遺伝子を発現または不活性化することもできる。また、薬物毒性をスクリーニングする場合、肝臓薬物代謝を担う遺伝子(例えば、CYPファミリーの遺伝子)の発現または不活性化は関心が高いであろう。

【0217】

30

本発明の一部の局面は、前記で定義されたヌクレオチド配列を含む核酸構築物または発現ベクターの使用に関する。この場合、ベクターは遺伝子療法に適したベクターである。遺伝子療法に適したベクターは、Anderson 1998, Nature 392:25-30; Walther and Stein, 2000, Drugs 60:249-71; Kay et al., 2001, Nat. Med. 7:33-40; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81:2573-604; Amado and Chen, 1999, Science 285:674-6; Federico, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10:448-53; Vigna and Naldini, 2000, J. Gene Med. 2:308-16; Marin et al., 1997, Mol. Med. Today 3:396-403; Peng and Russell, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10:454-7; Sommerfelt, 1999, J. Gen. Virol. 80:3049-64; Reiser, 2000, Gene Ther. 7:910-3; およびこれらの中で引用された参考文献において述べられている。例には、組み込み型ベクターおよび非組み込み型ベクター、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス(AdV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レンチウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、およびヘルペスウイルスをベースとするものが含まれる。

40

【0218】

特に適切な遺伝子療法ベクターには、アデノウイルス(Ad)ベクターおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが含まれる。これらのベクターは、肝臓細胞を含む多数の分裂細胞および非分裂細胞に感染する。さらに、アデノウイルスベクターは高レベルのトランスジェン発現が可能である。しかしながら、細胞侵入後のアデノウイルスベクターおよびAAVベクターのエピソーム特性のために、これらのウイルスベクターは、前記のようにトランスジェンの一過的発現のみを必要とする治療用途(Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81:2573-2604; Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43)に最も適している。好ましいアデノウイ

50

ルスベクターは、Russell(2000, 前記)により概説されたように宿主応答を低減するように改良されている。AAV遺伝子導入の安全性および効力はヒトにおいて広範に研究されており、肝臓、筋肉、CNS、および網膜において有望な結果が得られている(Manno et al Nat medicine 2006, Stroes et al ATVB 2008, Kaplitt, Feigin, Lancet 2009; Maguire, Simonelli et al NEJM 2008; Bainbridge et al NEJM 2008)。AAV2は、遺伝子導入研究のためにヒトおよび実験モデルにおいて最も良く特徴付けられている血清型である。AAV2は、骨格筋、ニューロン、血管平滑筋細胞、および肝細胞に対して天然親和性を示す。従って、AAV2は、肝臓組織を標的化するための良いベクター選択肢である。アデノ随伴ウイルススペースの非組み込み型ベクターの他の例には、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、および偽型AAVが含まれる。AAV8およびAAV9のような非ヒト血清型の使用は、対象におけるこれらの免疫応答を克服するのに有用な可能性があり、臨床試験がちょうど始まったばかりである(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00979238)。肝臓細胞への遺伝子導入の場合、アデノウイルス血清型5またはAAV血清型2、7、もしくは8は有効なベクターであり、従って、好ましいAd血清型またはAAV血清型であることが示されている(Gao, Molecular Therapy (2006) 13, 77-87)。

10

【0219】

本発明における用途に好ましいレトロウイルスベクターはレンチウイルスベースの発現構築物である。レンチウイルスベクターは非分裂細胞に感染する独特の能力を有する(Ama do and Chen, 1999 Science 285:674-6)。レンチウイルスベースの発現構築物を構築および使用するための方法は、米国特許第6,165,782号、米国特許第6,207,455号、米国特許第6,218,181号、米国特許第6,277,633号、および米国特許第6,323,031号、ならびにFederico (1999, Curr Opin Biotechnol 10:448-53)およびVigna et al. (2000, J Gene Med 2000; 2:308-16)において述べられている。

20

【0220】

一般的に、遺伝子療法ベクターは、発現させようとする本発明のポリペプチドをコードし、前記で示されたように適切な調節配列に機能的に連結されたヌクレオチド配列を含むという意味で前述された発現ベクターである。このような調節配列は少なくともプロモーター配列を含む。遺伝子療法ベクターからポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるのに適したプロモーターには、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、ウイルス末端反復配列プロモーター(LTR)、例えば、マウスモロニー白血病ウイルス(MMLV)、ラウス肉腫ウイルス、またはHTLV-1に由来するLTR、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターが含まれる。適切なプロモーターを以下で説明する。

30

【0221】

小さな有機化合物または無機化合物を投与することによって誘導され得る、いくつかの誘導性プロモーター系が述べられている。このような誘導性プロモーターには、重金属によって制御される誘導性プロモーター、例えば、メタロチオニン(metallothionine)プロモーター(Brinster et al. 1982 Nature 296:39-42; Mayo et al. 1982 Cell 29:99-108)、RU-486(プロゲステロンアンタゴニスト)によって制御される誘導性プロモーター(Wang et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8180-8184)、ステロイドによって制御される誘導性プロモーター(Mader and White, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607)、テトラサイクリンによって制御される誘導性プロモーター(Gossen and Bujard 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; 米国特許第5,464,758号; Furth et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9302-9306; Howe et al. 1995 J. Biol. Chem. 270:14168-14174; Resnitzky et al. 1994 Mol. Cell. Biol. 14:1669-1679; Shockett et al. 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6522-6526)、ならびにVP16の活性化ドメインとしてtetRポリペプチドおよびエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインからなるマルチキメラトランスアクチベーターをベースとするtTAER系(Yee et al., 2002, US6,432,705)が含まれる。

40

【0222】

50

RNA干渉(以下を参照されたい)による特異的遺伝子のノックダウンのための低分子RNAをコードするヌクレオチド配列に適したプロモーターには、前記のポリメラーゼIIプロモーターに加えてポリメラーゼIIIプロモーターが含まれる。RNAポリメラーゼIII(pol III)は、5S、U6、アデノウイルスVA1、Vault、テロメラーゼRNA、およびtRNAを含む、多種多様な小さな核非コードRNAおよび細胞質非コードRNAの合成を担っている。これらのRNAをコードする多数の遺伝子のプロモーター構造が決定されており、RNA pol IIIプロモーターは3種類の構造に分類されることが見出されている(総説については、Geiduschek and Tocchini-Valentini, 1988 Annu. Rev. Biochem. 57:873-914; Willis, 1993 Eur. J. Biochem. 212:1-11; Hernandez, 2001, J. Biol. Chem. 276:26733-36を参照されたい)。siRNA発現には、3型RNA pol IIIプロモーターが特に適しており、これによる転写は、5'隣接領域、すなわち、転写開始点の上流にしか見られないシス作用エレメントにより動かされる。上流配列エレメントには、従来のTATAボックス(Mattaj et al., 1988 Cell 55, 435-442)、近位配列要素および遠位配列要素(DSE; Gupta and Reddy, 1991 Nucleic Acids Res. 19, 2073-2075)が含まれる。3型pol IIIプロモーターの制御下にある遺伝子の例は、U6低分子核内RNA(U6 snRNA)、7SK、Y、MRP、H1、およびテロメラーゼRNA遺伝子である(例えば、Myslinski et al., 2001, Nucl. Acids Res. 21:2502-09を参照されたい)。

【0223】

遺伝子療法ベクターは、任意で、第2のまたはさらなるポリペプチドをコードする第2のまたは1つもしくは複数のさらなるヌクレオチド配列を含んでもよい。第2のまたはさらなるポリペプチドは、発現構築物を含有する細胞の特定、選択、および/またはスクリーニングを可能にする(選択)マーカーポリペプチドでもよい。この目的に適したマーカータンパク質は、例えば、蛍光タンパク質GFPおよび選択マーカー遺伝子HSVチミジンキナーゼ(HAT培地上での選択用)、細菌ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(ハイグロマイシンB上での選択用)、Tn5アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(G418上での選択用)、ならびにジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)(メトトレキセート上での選択用)、CD20、低親和性神経成長因子遺伝子である。これらのマーカー遺伝子を得るための供給源およびこれらを使用する方法は、Sambrook and Russel(2001)「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに示されている。

【0224】

または、第2のまたはさらなるヌクレオチド配列は、必要と思われる場合に、トランスジェニック細胞から対象を治療することができるフェールセーフ機構を提供するポリペプチドをコードしてもよい。このようなヌクレオチド配列はよく自殺遺伝子と呼ばれ、プロドラッグを、ポリペプチドが発現しているトランスジェニック細胞を死滅することができる毒性物質に変換することができるポリペプチドをコードする。このような自殺遺伝子の適切な例には、例えば、大腸菌(E.coli)シトシンデアミナーゼ遺伝子、または単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、および水痘帯状疱疹ウイルスに由来するチミジンキナーゼ遺伝子の1つが含まれる。この場合、対象におけるIL-10トランスジェニック細胞を死滅するために、プロドラッグとしてガンシクロビルを使用することができる(例えば、Clair et al., 1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31:844-849を参照されたい)。

【0225】

特定のポリペプチドをノックダウンする場合、好ましくは、RNAi薬剤、すなわち、RNA干渉することができる、またはRNA干渉することができるRNA分子の一部であるRNA分子をコードする望ましいヌクレオチド配列を発現するために、遺伝子療法ベクターまたは他の発現構築物が用いられる。このようなRNA分子は、siRNA(例えば、ショートヘアピンRNAを含む低分子干渉RNA)と呼ばれる。または、siRNA分子は、直接的に、例えば、Lgr5を発現する細胞、または肝臓細胞(すなわち、肝細胞もしくは胆管細胞)、または肝臓オルガノイドの中に、あるいはLgr5を発現する細胞、または肝臓細胞(すなわち、肝細胞もしくは胆管細胞)、または肝臓オルガノイドの付近に投与される薬学的組成物の中にあってもよい。

10

20

30

40

50

【0226】

望ましいヌクレオチド配列は、標的遺伝子mRNAの領域に対するアンチセンスRNAをコードするアンチセンスコードDNA、および/または標的遺伝子mRNAの同じ領域に対するセンスRNAをコードするセンスコードDNAを含む。本発明のDNA構築物において、アンチセンスRNAを発現することができるアンチセンスコードDNAおよびセンスRNAを発現することができるセンスコードDNAは、本明細書において前記で定義された1つまたは複数のプロモーターに機能的に連結される。「siRNA」とは、好ましくは、哺乳動物細胞において毒性のない、長さが短い二本鎖RNAである低分子干渉RNAを意味する(Elbashir et al., 2001, Nature 411:494-98; Caplen et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-47)。長さは、必ずしも21~23ヌクレオチドに限定されとは限らない。毒性を示さない限り、siRNAの長さには特段の限定はない。「siRNA」は、例えば、長さが少なくとも15、18、または21ヌクレオチドであり、かつ25、30、35、または49までのヌクレオチドでもよい。または、発現されるsiRNAの最終転写産物の二本鎖RNA部分は、例えば、長さが少なくとも15、18、または21ヌクレオチドであり、かつ25、30、35、または49までのヌクレオチドでもよい。

10

【0227】

「アンチセンスRNA」は、好ましくは、標的遺伝子mRNAに相補的な配列を有するRNA鎖であり、標的遺伝子mRNAと結合することによってRNAiを誘導すると考えられている。「センスRNA」は、アンチセンスRNAに相補的であり、その相補的アンチセンスRNAにアニールしてsiRNAを形成する配列を有する。この文脈において「標的遺伝子」という用語は、好ましくは、本システムにより発現されたsiRNAのために発現が止められる遺伝子を指し、任意に選択することができる。この標的遺伝子として、好ましくは、例えば、公知の配列を有するが、まだ明らかにされていない機能を有する遺伝子、および発現が疾患の原因だと考えられている遺伝子が選択される。siRNAの鎖の一方(アンチセンスRNA鎖)に結合することができる長さである少なくとも15ヌクレオチドまたはそれ以上を有する遺伝子のmRNAの部分配列が決定されている限り、標的遺伝子は、完全に明らかにされていないゲノム配列を有する遺伝子でもよい。従って、一部の配列(好ましくは少なくとも15ヌクレオチド)が明らかにされている、遺伝子、発現配列タグ(EST)、およびmRNAの一部は、これらの完全長配列が決定されていなくても「標的遺伝子」として選択することができる。

20

【0228】

2本のRNA鎖が対になっているsiRNAの二本鎖RNA部分は、完全に対になっている部分に限定されず、ミスマッチ(対応するヌクレオチドが相補しない)、バルジ(一方の鎖に、対応する相補ヌクレオチドが無い)などのために対になっていない部分を含有してもよい。非対形成部分はsiRNA形成を妨げない程度まで含められてもよい。本明細書において用いられる「バルジ」は、好ましくは、1~2個の非対形成ヌクレオチドを含み、2本のRNA鎖が対になっているsiRNAの二本鎖RNA領域は、好ましくは1~7個、より好ましくは1~5個のバルジを含有する。さらに、好ましくは、本明細書において用いられる「ミスマッチ」は、好ましくは1~7個、より好ましくは1~5個の数で、2本のRNA鎖が対になっているsiRNAの二本鎖RNA領域に含められる。好ましいミスマッチにおいて、ヌクレオチドの一方はグアニンであり、他方はウラシルである。このようなミスマッチは、センスRNAをコードするDNAにおけるCからTへの変異、GからAへの変異、またはその混合物によるものであるが、特にこれらに限定されない。さらに、本発明において、2本のRNA鎖が対になっているsiRNAの二本鎖RNA領域はバルジおよびミスマッチを両方とも含有してよく、これらの数は合計して好ましくは1~7個、より好ましくは1~5個である。このような非対形成部分(ミスマッチまたはバルジなど)は、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとの下記の組換えを抑制し、下記で述べられるsiRNA発現系を安定にすることができる。さらに、2本のRNA鎖が対になっているsiRNAの二本鎖RNA領域において非対形成部分を含有しないステムループDNAを配列決定することは難しいが、前記のミスマッチまたはバルジを導入することによって配列決定が可能になる。さらに、対形成二本鎖RNA領域においてミスマッチまたはバルジを含有するsiRNAには、大腸菌または動物細胞において安定しているという利点があ

30

40

50

る。

【0229】

siRNAがそのRNAi効果のために標的遺伝子発現を止めることができる限り、siRNAの末端構造は平滑末端でもよく付着末端(突出末端)でもよい。付着(突出)末端構造は3'オーバーハングだけに限定されず、5'突出構造がRNAi効果を誘導することができる限り含められてもよい。さらに、突出ヌクレオチドの数は、既に報告されている2個または3個に限定されず、オーバーハングがRNAi効果を誘導することができる限り任意の数でよい。例えば、オーバーハングは1~8、好ましくは2~4ヌクレオチドからなる。本明細書において、付着末端構造を有するsiRNAの全長は、対となった二本鎖部分の長さ、と、両端にある突出一本鎖を含む一对の長さの合計と表される。例えば、両端に4ヌクレオチドオーバーハングを有する19bp二本鎖RNA部分の場合、全長は23bpと表される。さらに、この突出配列は標的遺伝子に対して低い特異性を有するので、必ずしも、標的遺伝子配列に対して相補的(アンチセンス)または同一(センス)であるとは限らない。さらに、siRNAが標的遺伝子に対してその遺伝子サイレンシング効果を維持することができる限り、例えば、一方の末端にある突出部分において低分子量RNA(tRNA、rRNA、もしくはウイルスRNAなどの天然RNA分子、または人工RNA分子でもよい)を含有してもよい。

10

【0230】

さらに、「siRNA」の末端構造は、必ず、前記のように両端においてカットオフ構造であり、二本鎖RNAの片側の末端がリンカーRNAによってつながれているステムループ構造を有してもよい(「shRNA」)。二本鎖RNA領域(ステムループ部分)の長さは、例えば、長さが少なくとも15、18、または21のヌクレオチドであり、かつ25、30、35、または49までのヌクレオチドでもよい。または、発現されるsiRNAの最終転写産物である二本鎖RNA領域の長さは、例えば、長さが少なくとも15、18、または21のヌクレオチドであり、かつ25、30、35、または49までのヌクレオチドである。さらに、リンカーの長さがステム部分の対形成を妨げない限り、リンカーの長さには特に制限はない。例えば、ステム部分の安定した対形成、およびその部分をコードするDNA間の組換えの抑制のためには、リンカー部分はクロバー葉tRNA構造を有してもよい。リンカーは、ステム部分の対形成を妨げる長さを有するが、例えば、前駆RNAから成熟RNAへのプロセッシングの間にイントロンが切り出され、それによって、ステム部分が対形成するように、イントロンを含めるようにリンカー部分を構築することができる。ステムループsiRNAの場合、ループ構造の無いRNAの一方の末端(ヘッドおよびテール)は低分子量RNAを有してもよい。前記のように、この低分子量RNAは、tRNA、rRNA、snRNA、またはウイルスRNAなどの天然RNA分子でもよく、人工RNA分子でもよい。

20

30

【0231】

アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAからそれぞれアンチセンスRNAおよびセンスRNAを発現させるために、本発明のDNA構築物は、前記で定義されたプロモーターを含む。構築物におけるプロモーターの数および位置は、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAを発現することができる限り、原則として任意に選択することができる。本発明のDNA構築物の簡単な例として、タンデム発現系を形成することができる。タンデム発現系では、プロモーターはアンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流に位置する。このタンデム発現系は、両端に上述のカットオフ構造を有するsiRNAを産生することができる。ステムループsiRNA発現系(ステム発現系)において、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAは反対方向に配置され、これらのDNAは、ユニットを構築するためにリンカーDNAを介してつながれる。ステムループsiRNA発現系を構築するために、プロモーターはこのユニットの片側に連結される。本明細書において、リンカーDNAの長さおよび配列には特に制限はなく、その配列が終結配列でない限り、前記のように成熟RNA産生中に、その長さおよび配列がステム部分の対形成を妨げない限り、任意の長さおよび配列でよい。一例として、前述のtRNAなどをコードするDNAをリンカーDNAとして使用することができる。

40

【0232】

50

タンデム発現系およびステムループ発現系のどちらの場合でも、5'末端は、プロモーターからの転写を促進することができる配列を有してもよい。具体的には、タンデムsiRNAの場合、siRNA産生の効率は、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの5'末端に、プロモーターからの転写を促進することができる配列を付加することによって改善することができる。ステムループsiRNAの場合、このような配列は前記のユニットの5'末端に付加することができる。siRNAによる標的遺伝子サイレンシングが妨げられない限り、このような配列からの転写物は、siRNAに取り付けられた状態において使用することができる。この状態が遺伝子サイレンシングを妨げるのであれば、トリミング手段(例えば、当技術分野において公知のリボザイム)を用いて転写物のトリミングを行うことが好ましい。アンチセンスRNAおよびセンスRNAを同じベクターにおいて、または異なるベクターにおいて発現できることは当業者に明らかであろう。センスRNAおよびアンチセンスRNAの下流にある余分な配列の付加を避けるために、それぞれの鎖(アンチセンスRNAをコードする鎖およびセンスRNAをコードする鎖)の3'末端に転写ターミネーターを配置することが好ましい。ターミネーターは、4つまたはそれ以上の連続したアデニン(A)ヌクレオチドからなる配列でもよい。

【0233】

本文書およびその特許請求の範囲において、「含む」という動詞およびその語形変化は、この言葉に続く項目が含まれるが、具体的に言及されなかった項目が排除されないことを意味する非限定的な意味で用いられる。さらに、「からなる」という動詞は、本明細書において定義された製品が、具体的に特定された成分以外のさらなる成分を含んでもよいという意味である「から本質的になる」に置き換えることができ、前記のさらなる成分は本発明の独特の特徴を変えない。さらに、本明細書において定義された方法は、具体的に特定された工程以外のさらなる工程を含んでもよく、前記のさらなる工程は本発明の独特の特徴を変えない。さらに、文脈から1つおよび1つだけの要素があることがはっきりと必要とされていない限り、不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」による要素への言及は複数の要素が存在する可能性を排除しない。従って、不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」は、通常、「少なくとも1つ」を意味する。「約(about)」または「約(approximately)」という言葉が数値(約10)に関連して用いられる時には、好ましくは、この値が、特定の値10の1%より多くても少なくともよいことを意味する。

【0234】

本明細書において引用された全ての特許および参考文献はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0235】

以下の実施例は例示のみの目的で提供され、いかなるやり方でも本発明の範囲を限定することを目的としない。

【実施例】

【0236】

実施例1-肝臓オルガノイドの増殖および拡大のための拡大培地

単離後、胆管(図1を参照されたい)をマトリゲルに懸濁し、異なる増殖因子条件下で培養した。FGF10(100ng/ml)、HGF(25~50ng/ml)、およびニコチンアミド(1~10mM)が添加された、EGF(50ng/ml)およびR-スポンジン1(1ug/ml)の組み合わせ(ERFHNic)は培養物の長期維持に必須であった。このことから、Wntシグナル伝達およびEGFシグナル伝達は、成体肝臓前駆体増殖をインビトロで維持するために厳格に必要とされることが分かる。Noggin(100ng/ml)およびWnt条件培地(50%)の添加もまた培養物の長期維持を示した(図1Aおよび1Bを参照されたい)。長期維持を支援したこれらの条件下で、Lgr5発現ならびに肝細胞マーカー(アルブミン)および胆管細胞マーカー(K7)がRT-PCRによって検出された(図1Cを参照されたい)。これらの条件下で、肝臓オルガノイドは機械的解離または酵素的解離によって1:8に希釈されて毎週継代され、何ヶ月も増殖された(図1D)。

【0237】

本発明者らは、培養物におけるWnt標的遺伝子Axin2およびLgr5の発現を分析した。Axin

2LacZ肝臓およびLgr5-LacZ肝臓の培養物から、播種して1ヶ月後にAxin2陽性細胞およびLgr5陽性細胞が肝臓オルガノイドに存在することが明らかになった。従って、Wntシグナル伝達は活性があり、培養増殖に必要とされることが裏付けられた(図3)。肝臓培養物はまた肝細胞マーカー(例えば、アルブミン、トランスサイレトリン(transferrin)、グルタミンシンターゼ)ならびに胆管細胞マーカー(ケラチン7および19)も発現する(図4を参照されたい)。

【0238】

Lgr5LacZマウスまたはLgr5GFPマウスから単一Lgr5細胞を分取した時に、シングルコロニーはオルガノイドに増殖した。これらの培養物は胆管細胞系列および肝細胞系列のマーカーも発現し、4ヶ月超にわたって維持され、定期的に1:6~1:8にスプリットされた(図5Aおよび図5Bを参照されたい)。興味深いことに、Lgr5陽性細胞に由来する培養物しかオルガノイドに増殖しなかった(図5CおよびD)。これらのデータから、Lgr5細胞はこれらの培養物の前駆細胞であり、2つの異なる肝臓系列の子孫を増やすことができることが分かる。

【0239】

肝臓オルガノイドがLgr5+ve細胞に由来することが証明されたので、本発明者らは、成体肝臓シグネチャーと比較して肝臓オルガノイドの個々の遺伝子シグネチャーを確かめることに着手した。RNAを、成体肝臓、ならびにFGF10、ニコチンアミド、および肝細胞増殖因子が添加されたER培地またはENRW培地において増殖した肝臓オルガノイドから単離した。その後、Universal RNA参照の発現に対する比較遺伝子発現プロファイリングによって、成体肝臓および2種類の肝臓培養条件の遺伝子シグネチャーを得た。全ての試料に対するハイブリダイゼーションのために同じ参照RNAを使用したので、これら(成体肝臓、ER、およびENRW)の間で3つの独立した試料を比較することができた。ヒートマップ分析から、両培養条件の発現プロファイルは成体肝臓組織発現プロファイルに極めて似ているが、筋肉組織プロファイルまたは脂肪組織プロファイルと比較して同じプロファイルを共有しないことが明らかになった(図6を参照されたい)。成体肝臓および肝臓培養物間の類似した遺伝子発現プロファイルの中で、肝臓特異的遺伝子であるHNF1a、HNF1b、HNF4、Alb、Glul1、Met、G6P、Fahd1、Fahd2a、CYP4B1、K7、およびK19が検出された。ヒートマップ分析から、両培養条件が互いに、および成体肝臓試料と比較して類似する発現パターンを示すことが明らかになった。しかしながら、データを詳細に分析した時に、本発明者らは、Wntおよびnogginを含まない条件が、両増殖因子を含む条件より分化したパターンを示すことを観察することができる。このことは、Wntの存在下では(アルブミン発現による)肝細胞分化がほとんど存在しない図1Cに示したデータと一致している。この結果から、Wntは培養物の自己複製に有利であり、分化の妨げになるものであることが分かるだろう。

【0240】

また、両培養条件ならびに成体肝臓において、非特異的成体肝臓遺伝子であるAFPおよび非肝臓転写因子であるPdx1またはNeuroDも検出することができる。

【0241】

両培養条件において、幹細胞マーカーLgr5は肝臓培養シグネチャーにおいて最も多量にある遺伝子の1つであったが、成体肝臓ではそうではなかったことが注目になる。また、小腸および胃における前駆体集団の細胞マーカーであるCd44およびSox9(Barker & Huch et al Cell stem cell 2010)が両培養条件において高発現していたが、成体肝臓では高発現していなかった。このことも肝臓培養物の自己複製能および正常成体肝臓の静止状態を示している。

【0242】

さらに、成体肝臓と比較して肝臓培養物においては、Lgr5の他に、特に、MMP7、Sp5、およびTnfrsf19を含む複数のWnt標的遺伝子も高度にアップレギュレートされていた。このことは、培養物の自己複製能を維持するためには、活発な強い古典的Wntシグナル伝達活性が必要だという強い根拠となっている。

【0243】

実施例2-改善された分化培地

ER条件下またはENRW条件下では、肝臓培養物は自己複製し、週単位で、1年まで維持および拡大することができる(図7A)。1年後の核型分析は染色体異常の証拠を示さない。分析した細胞の66%超が正常な染色体数を示し、これらの13%が肝細胞の特徴的な形質である倍数性も示した(図7B)。

【0244】

培養物の長期維持には、FGF10(100ng/ml)、HGF(25~50ng/ml)、およびニコチンアミド(1~10mM)が添加された、EGF(50ng/ml)およびR-スポンジン1(1ug/ml)の組み合わせが好ましかった。これらの条件下で、本発明者らは、胆管マーカーおよびいくつかの肝芽細胞マーカーまたは未熟肝細胞マーカー(Glu1、アルブミン)を発現する長寿命の細胞培養物を得た。しかしながら、これらの肝細胞マーカーが陽性の細胞の数は非常に少なかった。これらの培養条件下では、成熟肝細胞マーカー(例えば、p450チトクロム)は検出されなかった。これらの結果から、ここに記載した培養条件は、少数ではあるが肝細胞様細胞を生じることができる肝臓前駆体の拡大を促進するが、完全に成熟した肝細胞の拡大を促進しないことが示唆される(図8A)。

【0245】

インビトロで培養物の肝細胞特性を強化し、成熟肝細胞を得るために、本発明者らは、EGFおよびR-スポンジン1に加えられる3種類の補助因子(FGF10、HGF、およびニコチンアミド)が肝細胞発現ならびに培養物の自己複製に対して良い影響または悪い影響を発揮しているかどうか初めて確かめた。本発明者らは肝臓オルガノイド培養物を作製し、EGF、またはEGFおよびR-スポンジン1+FGF10またはHGFまたはニコチンアミドまたはこれらの組み合わせと共に培養した。本発明者らは、計10週間、1週間に1回、培養物をスプリットした。各時点で、本発明者らはいくつかの成熟肝細胞マーカー(FAH、CYP3A11)および肝芽細胞マーカー(アルブミン)の発現も分析した(図8B)。

【0246】

図1のデータと一致して(実施例1を参照されたい)、本発明者らは、肝臓培養物の増殖および自己複製にはR-スポンジン1およびニコチンアミドとFGF10の組み合わせが必須であることを観察した(図8CおよびD)。R-スポンジン1およびニコチンアミドはいずれも成熟マーカーCYP3A11の発現を阻害するか、肝芽細胞マーカーアルブミンの発現を促進する。EGFのみを含有する(R-スポンジン1を含まず、ニコチンアミドを含まない)培地にFGF10またはHGFを添加すると、非常に低レベルであるが成熟マーカーCYP3A11の発現が促進された(図8E)。肝細胞分化を促進し得るさらなる化合物を特定するために、本発明者らは、EGF+HGFおよび/またはFGF10の基本条件に基づいて2つの異なるアプローチを使用した。

【0247】

第1のアプローチは、EGF+FGF10またはHGF条件に加えて一連の化合物を試験することを伴った。分析した化合物の完全なリストを表2に示した。

【0248】

(表2)

化合物	シグナル		濃度	結果	
				<i>Alb</i>	<i>CYP3AII</i>
エキセンディン4	グルカゴン様 ペプチド2類似体	Sigma E7144	0.1-1uM		
レチノイン酸	RAR-RXR 受容体リガンド	Sigma	25nM		
レチノイン酸+ エキセンディン4					
ソニックヘッジホッグ		Invitrogen C25II	500-100ng/ml		
BMP4	BMPシグナル伝達	Peptotech 120-05	20ng/ml		
DAPT	γ-セクレターゼ 阻害剤	Sigma D5942	10 nM		
A8301	Alk5/4 /7 阻害剤	Tocris Bioscience 2939	50 nM		
DAPT + A8301				+++	+++
FGF4	FGFR1,2 リガンド	Peptotech	50ng/ml		
FGF1	FGFR1,2,3,4 リガンド	Peptotech 450-33A	100ng/ml		
デキサメタゾン		Sigma D4902 25MG	10 μM-1mM		
オンコスタチンM (OSM)		R&D systems	10-1000 ng/ml		

10

20

30

VEGF+DEXA		495-MO-025			
FGF4+OSM+Dexa					
IGF		peprotech	100ng/ml		
バルプロ酸	ヒストン デアセチラーゼ 阻害剤、およびERK, PKC Wnt/ β -カテニン経路の 調節因子	Stemgent 04-0007	250 μ M		
酪酸ナトリウム	ヒストン デアセチラーゼ 阻害剤	Stemgent 04-0005	250 μ M		
BIX01294	G9a HMTase 阻害剤	Stemgent 04-0002	1 μ M		
RG 108	DNAメチル トランスフェラーゼ 阻害剤	Stemgent 04-0001	1 μ M		
TSA			100 nM	+	-
ヒドロコルチゾン	グルココルチコイド	Sigma H6909	5nM		
オンコスタチンM (OSM)		R&D systems 495-MO- 025	10-1000 ng/ml		
ARA		Sigma A 0937	500 nM		
R 59022	ジアシルグリセロール キナーゼ阻害剤	Sigma D 5919	500nM-50nM	+	+
酒石酸アルテレノール: ----	アドレナリン受容体 アゴニスト	sigma A 0937	500nM-50nM- 5nM		
LIF			10 ³		
PD 035901	MEK1 阻害剤	Axon Medchem cat n 1386	500nM		
CHIR99021	GSK3 阻害剤	Axon Medchem cat n 1408	3uM		
DMSO			1%		
L-アスコルビン酸		Sigma 077K13021	1mM		
VEGF		Peprtech			
マトリゲル 50%					
マトリゲル 20%					

【 0 2 4 9 】

第2のアプローチは、インビボで胆管分化および肝細胞分化を実現するために必須の転

10

20

30

40

50

写因子の発現に関する公開された発生研究からの知識を考慮に入れた。FGF10、HGF、およびニコチンアミドが添加された、E条件下またはER条件下またはENRW条件下でのオルガノイドにおける転写因子発現の比較分析を図8に示した。tbx3およびprox1に加えて、肝細胞特異化に必要とされる転写因子が全て存在した。しかしながら、本発明者らまた、R-スポンジン1(R)を含有する培養物において、特異的な胆管転写因子の発現が高度にアップレギュレートされたことにも気づいた。このことから、培養物の遺伝子発現は胆管細胞運命に向かって不均衡になっていたことが分かる。

【0250】

Notchシグナル伝達経路およびTGF- β シグナル伝達経路はインビボでの胆管細胞運命に結びつけられてきた。実際に、(活発なNotchシグナル伝達を実現するのに必須の)Rbpjが欠失すると異常な管形成が発生し(Zong Y. Development 2009)、インビトロで肝臓外植片にTGF- β が添加されると胆管分化が促進される(Cloutman F. Genes and Development 2005)。Notchシグナル伝達経路およびTGF- β シグナル伝達経路はいずれも肝臓培養物において高度にアップレギュレートされていたので(図9)、本発明者らは、胆管細胞運命を阻害すると、肝細胞表現型に向かう細胞分化が誘発される可能性があると考えた。TGF- β 受容体ALK5、4、および7阻害剤としてA8301を選択し、Notch経路を活性化するのに必須の活性プロテアーゼである γ -セクレターゼの阻害剤としてDAPTを選択した。本発明者らは、最初に、拡大条件(ER培地)において2日間、細胞を培養し、2日目(図10A)に、異なる化合物の組み合わせを加えることによって分化条件を開始した。1日おきに培地を交換し、8~9日後に分化マーカーの発現を分析した。ER条件およびENRW条件を負の対照として使用した。

【0251】

驚いたことに、EGF+FGF10とDAPTおよびA8301の組み合わせによって、分析した肝細胞マーカー(CYP3A11、TAT、アルブミン)の発現が大幅に強化された(図10B)。この効果は既に5日目に検出することができ、8~9日目にピークに達した(図10C)。それぞれ、10 μ M(DAPT)および50nM(A8301)(図10D)で最大濃度効率に達した。デキサメタゾン(公知の肝細胞分化分子)を加えても遺伝子発現は改善しなかった。EGF、FGF10、A8301、およびDAPTの組み合わせは発現を強化するだけでなく、肝細胞マーカーアルブミンおよび2F8に対する免疫蛍光ならびにAlbCreLacZ由来オルガノイド上でのXgal染色によって評価されたように肝細胞様細胞の数も増やした(図10EおよびF)。従って、本発明者らは、上述の分化プロトコールがインビトロで肝臓幹細胞培養物からの肝細胞様細胞の発生を促進すると結論づけることができる。

【0252】

実施例3-ヒト肝臓オルガノイド

これらの拡大条件(ERFHNicおよびENRWFHNic)を使用し、500 μ MのTGF β 阻害剤(A83-01)を拡大培地に加えて、本発明者らはヒト胆管由来培養物を拡大することもできた(図11)。

【0253】

材料および方法(実施例1~3)

肝臓培養-胆管単離

単離された成体肝臓組織を冷Advanced-DMEM/F12(Invitrogen)で洗浄し、次いで、組織を約5mmの動物断片に切り刻み、冷解離緩衝液(DMEM培地に溶解したコラゲナーゼ、ディスペラーゼ、FBS)でさらに洗浄した。組織断片を解離緩衝液と37°Cで2時間インキュベートした。次いで、10mlピペットを用いて、組織断片を冷単離緩衝液10mlに激しく懸濁した。死細胞を含有する最初の上清を捨て、沈殿物を10~15mlの解離緩衝液に懸濁した。さらに組織断片を激しく懸濁した後に、胆管の中に上清が豊富にある。十分な胆管が得られるまで、この手順を繰り返す。

【0254】

単離された胆管をペレット化し、50 μ lのマトリゲル(BD Bioscience)と混合し、24ウェル組織培養プレートに播種し、マトリゲルが完全に重合するまで37°Cで5~10分間インキュベートする。重合した後に、500 μ lの組織培地を重層する。

【0255】

培地組成: B27、N2、200ng/ml N-アセチルシステイン、50ng/ml EGF、1 µg/ml R-スポンジン1、ガストリン:10nM、FGF10 100ng/ml、ニコチンアミド10mM、およびHGF:50ng/ml、および50%Wnt条件培地が添加されたAdvanced-DMEM/F12。

【0256】

全培地を2日ごとに交換した。1週間後に、Wnt条件培地を除去し、形成したオルガノイドを、1000 µlピペットを用いてマトリゲルから取り出し、機械的に解離して小さな断片にし、新鮮なマトリゲルに移した。週1回または週2回、1:4のスプリット比で継代を行った。これらの条件下で培養物は少なくとも6ヶ月間維持された。

【0257】

試薬

ヒト肝細胞増殖因子(HGF)はPeprotechから購入し、EGFはinvitrogenから購入し、R-スポンジンはNuveloから購入し、Nogginはpeprotechから購入し、FGF10はPeprotechから購入し、ガストリンはSigma Aldrichから購入し、ニコチンアミドはSigmaから購入した。

【0258】

マイクロアレイ

Lgr5に由来する肝臓培養物の発現分析のために、Qiagen RNAaseキットを用いて、RNAを、成体肝臓、またはWntcmおよびNogginを含まない培地(ER)、もしくはWntcmおよびNogginを含む培地(ENRW)において培養した肝臓培養物から単離した。150ngの全RNAを、low RNA Input Linear Amp kit(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)で標識した。Universal mouse Reference RNA(Agilent)には異なる標識をし、成体肝臓組織またはERもしくはENRWで処理された培養物にハイブリダイズさせた。4X44K Agilent Whole Mouse Genome dual colour Microarrays(G4122F)を使用した。標識、ハイブリダイゼーション、および洗浄はAgilentのガイドラインに従って行った。

【0259】

実施例4-Lgr5発現は肝臓損傷後にアップレギュレートされる

肝臓において、Wntシグナル伝達は中心静脈領域において活発である。本発明者らは、最近、Wntシグナル伝達が肝臓代謝において重要な役割を果たしていることを観察した(Boj et al. 私信)。胆管細胞において、肝臓損傷後にWntシグナル伝達は活性化される(Hu et al 2007, Gastroenterology, 133(5):1579-91)。同様に、Wntシグナル伝達の確かな普遍的レポーターであるAxin2-LacZ対立遺伝子を用いて、本発明者らは、WntアゴニストRspolの注射後(図12Aを参照されたい)または肝毒性化合物である四塩化炭素(CCl4)による肝臓損傷後(図12Bを参照されたい)にも、肝臓実質全体においてWntシグナル伝達がアップレギュレートされることを観察した。

【0260】

Wnt標的遺伝子Lgr5は、いくつかの活発に自己複製している組織にある幹細胞を標識するが、損傷時に発現することは以前に報告されたことがない。以前に述べられた本発明者らのLgr5-LacZノックインマウス(Barker et al, 2007, Nature 449(7165):1003-7)は、Lgr5が健康な肝臓において本質的に検出できないが、残存するmRNA発現がqPCRによって検出されることを示す。Lgr5-LacZノックインマウスにおいてCCl4を注射した後に(LacZマウスについてはBarker et al, 2007, 前記、CCl4法の説明についてはFuruyama K et al., Nat Genetics, 43, 34-41, 2001を参照されたい)、本発明者らは、肝臓に新たに形成された芽構造においてレポーターがはっきりと発現していることを観察した(図13Aを参照されたい)。レポーターの発現は損傷後6.5日目にピークに達し、9日目まで維持され、損傷後13日目に肝臓が完全に再生すると、はっきりとした減少が示された(図13A、右上パネルを参照されたい)。類似の損傷プロトコルを受けた野生型同腹仔においてはレポーターの発現は検出されなかった(図13A、右下パネルを参照されたい)。

【0261】

活発な再生部位におけるLgr5発現の出現から、Lgr5は、損傷時の再生幹細胞/前駆体のWntによる新規活性化の先導となり得ることが示唆された。実際に、本発明者らは、新規に

現れたLgr5細胞は成熟肝臓細胞マーカー(K19またはFAH)も星状細胞マーカー(SMA)も発現せず、代わりに、最近述べられた肝臓前駆体マーカーSox9陽性であることを発見した(図13B)。このことは、インビトロでオルガノイドを得るための出発点であるLgr5+細胞は、肝臓損傷を誘導することによって、またはR-スポンジンを用いてWntシグナル伝達を刺激することによって肝臓断片から得ることができることを意味している。細胞を、エキスビボで、単離された肝臓において得る前に、またはインビトロで、肝臓断片または肝臓細胞集団において得る前に、損傷によって、またはR-スポンジンによって肝臓細胞におけるLgr5発現をインビボで誘導してもよい。

【0262】

実施例5-肝臓オルガノイド培養物の長期間拡大

10

実施例1において、培養物の長期維持には、FGF10(100ng/ml)、HGF(25~50ng/ml)、およびニコチンアミド(1~10mM)が添加された、EGF(50ng/ml)およびR-スポンジン1(1ug/ml)の組み合わせが好ましいことが見出された。今や、本発明者らは、3ヶ月超、培養物を拡大するには、EGFおよびR-スポンジン1に加えられる3種類の補助因子(FGF10、HGF、およびニコチンアミド)が全て必要だという証拠をつかんでいる。これを評価するために、本発明者らは、図14に示したように肝臓実質から胆管を単離し(K19染色を用いて、単離された構造の同一性を確認した)、i)EGF; またはii)EGFおよびR-スポンジン1+FGF10もしくはHGFもしくはニコチンアミド; またはiii)EGFおよびR-スポンジン1+FGF10およびHGFおよびニコチンアミド(ERFHNic)と共に胆管を培養することによって肝臓オルガノイド培養物を作製した。本発明者らは、計14週間にわたって1週間に1回、培養物をスプリットした。実施例1および実施例2において報告したように、結果から、肝臓培養物の増殖および自己複製には、EGF、R-スポンジン1、およびニコチンアミドとFGF10の組み合わせが必須であることが確かめられた。10回の継代後に、HGFを含まない培養物は、HGFが添加された培養物と比較して増殖の不利益を示した。依然として生存していたが、増殖比は、完全な組み合わせ(FGF10、HGF、およびニコチンアミド)が添加された培養物の1:6~1:8と比較して1:2~1:4まで減少した。15回の継代後に、HGFが添加されていないERFHNicを用いた培養物はもはや生存していなかった。従って、これらの結果は、長期維持後、良好な増殖速度の維持にはHGFが必須であることを示唆している(図15)。

20

【0263】

実施例6-分化条件下で肝臓オルガノイドにおいて発現しているマーカー

30

実施例2に記載の分化プロトコルを用いて、本発明者らは、肝臓オルガノイドにおいて肝芽細胞マーカー(アルブミン)および肝細胞表面マーカーを検出することができた。これらの肝細胞様細胞の数を定量するために、本発明者らは、肝細胞表面マーカーを用いて培養物のフローサイトメトリー分析を行った。本発明者らは、拡大培養条件では肝細胞表面マーカー陽性細胞はほとんど検出されなかったのに対して、分化後には、細胞の35%までがこの肝細胞表面マーカー陽性であったことを観察した(図17BおよびCを参照されたい)。

【0264】

次いで、本発明者らは、これらの分化条件下でマウス肝臓オルガノイドの遺伝子発現プロファイルを分析した(図16および図1。本発明者らは、egAlb、FAH、およびTATならびにCyp3遺伝子の強いアップレギュレーションを観察した)。本発明者らは、分化後のマウス肝臓オルガノイドの遺伝子発現が成熟マウス肝細胞および/またはマウス肝臓の遺伝子発現に似ていることを発見した。

40

【0265】

実施例7-マウスへの肝臓オルガノイドの移植

ERFHNic拡大条件およびEAFD分化条件を用いて増殖させたオルガノイドから細胞を採取し、チロシン血症I型ヒト疾患のマウスモデルであるチロシン異化酵素フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ(FAH)欠損マウスの免疫不全系統(Azuma et al. 2007, Nature Biotech, 25(8), 903-910)に移植した。移植計画を図17Dに示した。予備結果から、FAH欠損マウスの肝臓実質において分散したFAH陽性細胞が見られることが分かった。このことは、オルガ

50

ノイド培養物に由来する肝臓細胞がレシピエント肝臓に移植されたことを示している(図17A、右側を参照されたい)。さらに、レシピエントマウスの肝臓において極めて多数のK19陽性細胞も検出された。このことは、オルガノイドに由来する移植細胞がインビボで両系列を産生できることを示唆している: 肝細胞(FAHマーカーにより証明される)および胆管細胞(K19マーカーにより証明される)(図17A、左上パネルを参照されたい)。このことは、2つの別個の培養物に由来する2つの別個のクローンに由来する移植細胞のフローサイトメトリー分析によってさらに裏付けられた(それぞれ図17Bおよび17C)。Lgr5+細胞をGFP含有ウイルスによって形質導入し、分化後にフローサイトメトリー分析を行った。肝細胞表面マーカー陽性細胞は、大きな細胞を示す広い分散を示す。これは、粒状性および成熟性、すなわち、成熟した肝細胞を表している。肝細胞表面マーカー陰性の細胞の分散はわずかであった。このことは、小さな細胞、すなわち、成熟していない前駆体を示している。従って、分化しつつある培養物には全ての細胞タイプが存在する(成熟細胞および未熟細胞)。分化細胞の残りである、FACS分析に用いられなかった細胞を移植実験に使用した。

10

【0266】

実施例8

発現している遺伝子および発現していない遺伝子を確認するためにマイクロアレイ分析を用いて、本発明の方法に従って培養されたマウス肝臓に由来するオルガノイドを分析した。

【0267】

実施例9

発現している遺伝子および発現していない遺伝子を確認するためにオリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析を用いて、本発明のEM1培地、EM2培地、およびDM培地を用いて培養したヒト肝臓に由来するオルガノイドならびにヒト肝臓を分析した。拡大培地において発現している遺伝子と、分化培地において発現している遺伝子と、成体肝臓において発現している遺伝子との間で、有意に異なる遺伝子発現プロファイルが目に見えて分かった。肝細胞遺伝子発現の傾向はマウスとほぼ同じであるが、オルガノイドの分化はマウス肝臓オルガノイドの方が弱かった。これは、使用したヒト細胞の使用によるものである可能性がある。

20

【0268】

オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた分析においてよくあるように、Lgr5およびTnfrsf19は検出されなかった。しかしながら、これらは、拡大培地において培養されたオルガノイドに存在することが見出された。

30

【0269】

材料および方法(実施例4~7)

動物処置

2~8ヶ月齢のLgr5LacZまたはAxin2-LacZまたはWT同腹仔BL6/Balbc F1マウスに、トウモロコシ油に溶解した0.8ml/kg CCL4(n=)またはトウモロコシ油のみ(n=)を腹腔内注射した。2日後または5日後または9日後または13日後にマウスを屠殺した。肝臓を単離し、RNAまたはβガラクトシダーゼ染色のためにさらに処理した。

【0270】

β-ガラクトシダーゼ(lacZ)染色

肝臓組織を単離し、すぐに、20倍量の氷冷固定液(1%ホルムアルデヒド; 0.2%グルタルアルデヒド; 0.02%NP40を含むPBSO)に入れ、回転プラットフォーム(rolling platform)の上に置いて4℃で2時間インキュベートした。固定液を除去し、組織を、回転プラットフォームの上に置いて洗浄緩衝液(PBSO; 2mM MgCl₂; 0.02%NP40; 0.1%デオキシコール酸Na)で室温で20分間、2回洗浄した。次いで、β-ガラクトシダーゼ基質(5mM K₃Fe(CN)₆; 5mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O; 2mM MgCl₂; 0.02%NP40; 0.1%デオキシコール酸Na; 1mg/ml X-galをPBSOに溶解)を添加し、組織を暗所、37℃で2時間および室温で一晩インキュベートした。基質を除去し、組織を回転プラットフォームの上に置いて室温で20分間、PBSOで2回洗浄した。次いで、組織を、PBSOに溶解した20倍量の4%パラホルムアルデヒド(PFA)に

40

50

入れ、回転プラットフォームの上に置いて暗所、4℃で一晩固定した。PFAを除去し、組織を回転プラットフォームの上に置いてPBSOで室温で20分間、2回洗浄した。

【0271】

染色された組織を組織カセットに移し、パラフィンブロックを標準的な方法を用いて調製した。組織切片(4 μM)を調製し、ニュートラルレッドを用いて対比染色した。

【0272】

R-スポンジン1処置

6～8週間齢のAxin2-lacZマウスに100 μgの精製ヒトR-スポンジン1をIP注射し、肝臓におけるLacZ発現分析のために48時間後に屠殺した。

【0273】

RT-PCR

RNAを、RNeasy Mini RNA Extraction Kit(Qiagen)を用いて胃細胞培養物または新鮮に単離された組織から抽出し、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(Promega)を用いて逆転写した。cDNAを、以前に述べられたように(Huch et al., 2009)、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, London, UK)において増幅した。使用したプライマーを以下の表3に示した。

【0274】

(表3) RT-PCR用のプライマー

遺伝子名	遺伝子 略号	配列	PCR 産物 (bp)
チトクロム P450, ファミリー 3,	CYP3A11	fw TGGTCAAACGCCTCTCCTTGCT G	100
サブファミリー-a, ポリペプチド11		rv ACTGGGCCAAAATCCCGCCG	

グルコース-6-ホスファターゼ	G6P	fw	GAATTACCAAGACTCCAGG	581
		rv	TGAGACAATACTTCCGGAGG	
ケラチン 19	Krt19	fw	GTCCTACAGATTGACAATGC	549
		rv	CACGCTCTGGATCTGTGACA	
アルブミン	Alb	fw	GCGCAGATGACAGGGCGGAA	358
		rv	GTGCCGTAGCATGCGGGAGG	
t-box 3	Tbx3	fw	AGCGATCACGCAACGTGGCA	441
		rv	GGCTTCGCTGGGACACAGATCT TT	
Prospero関連ホメオボックス	Prox1	fw	TTCAACAGATGCATTACC	270
タンパク質1		rv	TCTTTGCCCCGCGATGATG	
フマリルアセト酢酸	Fah	fw	ACGACTGGAGCGCACGAGAC	183
ヒドロラーゼ		rv	AGGGCTGGCTGTGGCAGAGA	
チロシンアミノトランスフェラーゼ	Tat	fw	TTTGGCAGTGGCTGAAAGGCA	258
		rv	GGGCCCAGGATCCGCTGACT	
トリプトファン2,3 -ジオキシゲナーゼ	Tdo2	fw	ACTCCCCGTAGAAGGCAGCGA	583
		rv	TCTTTCCAGCCATGCCTCCACT	
ロイシンリッチリピート	Lgr5	fw	GGAAATGCTTTGACACACATTC	413
含有Gタンパク質		rv	GGAAGTCATCAAGGTTATTATA A	
共役受容体5				
トランスサイレチン	TTR	fw	ATGGTCAAAGTCCTGGATGC	220
		rv	AATTCATGGAACGGGGAAAT	
グルコキナーゼ	Gck	fw	AAGATCATTGGCGGAAAG	193
		rv	GAGTGCTCAGGATGTTAAG	
ヒポキサンチン	Hprt	fw	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA	186
ホスホリボシルトランスフェラーゼ		rv	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT	

10

20

30

40

ここで使用した免疫染色手順は、Huch et al. 2009において以前に述べられた。簡単に述べると、5マイクロメートル切片を脱パラフィンし、再水和し、組織切片を、PBS-T(PBS; Tween20 0.1%)を用いて透過処理した。必要に応じて、抗原賦活化のために切片を10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)で処理し、Universalブロッキング緩衝液(BioGenex)を用いてブロックし、一次抗体とインキュベートした。次いで、切片をPBSで2回洗浄し、ペルオキシダーゼ結合二次抗体とインキュベートした。DAB+(DAKO)を色素原基質として使用した。切片をマイヤーヘマトキシリンで対比染色し、Leica DMR顕微鏡において視覚化した。使用した一次抗体は、ウサギ抗Sox9(1:600; RTで1時間, Millipore)、マウス抗SMA(1:1000, 4℃で一晩, Sigma)、ウサギ抗FAH(1:5000; 37℃で一晩, M.Grompeからの寄贈品)、ウサギ抗K19(1:500; 4℃で一晩, M.Grompeからの寄贈品)であった。使用したペルオキシダーゼ結合二次抗体はMouseまたはRabbit Brightvision(Immunologic)であった。

10

【0276】

免疫蛍光法

ホールマウント染色のために、オルガノイドまたは単離された胆管をアセトン(オルガノイド)またはPFA4%(胆管)で30分間固定し、PBSで1回洗浄し、PBS 0.3%Triton-X100で5分間、透過処理し、Universalブロッキング溶液(Power block HK085-5KE BioGenex)を用いてブロックし、PBS1%FBSで希釈した一次抗体と一晩インキュベートした。PBSで数回洗浄した後に、試料を二次抗体とインキュベートした。核をHoescht33342で染色した。共焦点顕微鏡観察(Leica, SP5)を用いて画像を取得した。Volocityソフトウェア(Improvision)を用いて三次元再構築を行った。使用した一次抗体は、ウサギ抗K19(1:500; M.Grompeからの寄贈品)、ラット抗肝細胞表面マーカー(1:50, M.Grompeからの寄贈品)、ヤギ抗アルブミン(1:50, santa Cruz)であった。使用した二次抗体は全てロバにおいて作製され、異なるAlexaフルオロフォアに結合された(ロバ抗ヤギ568、ロバ抗ラット488、ロバ抗ウサギ-647, Molecular Probes)。

20

【0277】

フローサイトメトリー

解離した細胞を、1mlのDMEM+2%FBSに 1×10^4 細胞/ミリリットルで再懸濁した後に、1:200に希釈したMIC1-1C3ハイブリドーマ上清または1:50に希釈したOC2-2F8ハイブリドーマ上清を添加し、4℃で30分間インキュベートした。冷ダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)で洗浄した後に。細胞を、マウス血清タンパク質に対して吸着されたAPC結合ヤギ抗ラット二次抗体(Jackson Immunoresearch)の1:200希釈液を含有するDMEM+2%FBSに再懸濁した。排除のためにヨウ化プロピジウム染色を用いて死細胞を標識した。細胞を分析し、Cytopeia inFluxV-GS(Becton-Dickenson)を用いて分取した。

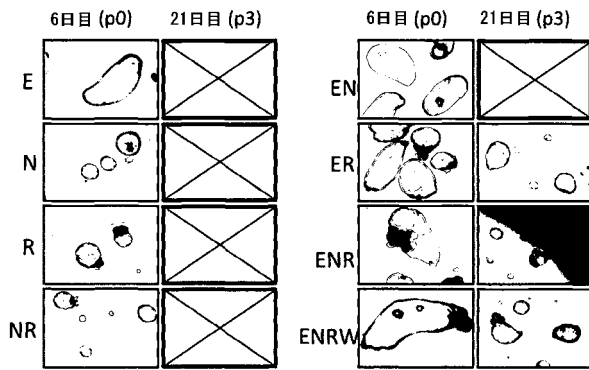
30

【0278】

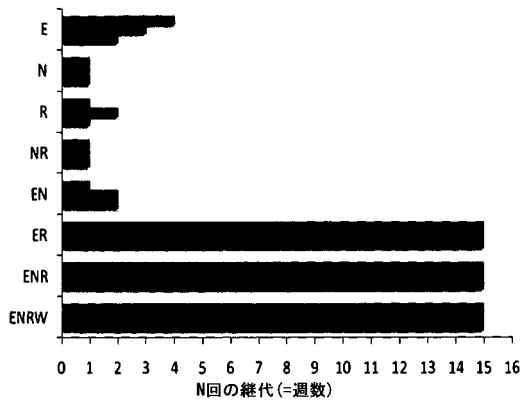
移植アッセイ

以前に述べられたように(Overturf et al. 1996)、脾臓への選別された細胞集団の注射および肝細胞選択を誘導するNTBCの中止を行った。3週間で休薬がなされた後に、レシピエント動物において正常体重が回復するまで再投与が行われた。

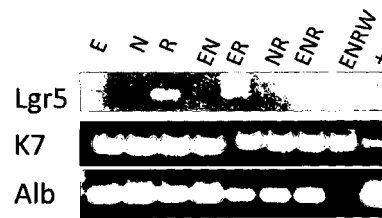
【図 1 A】



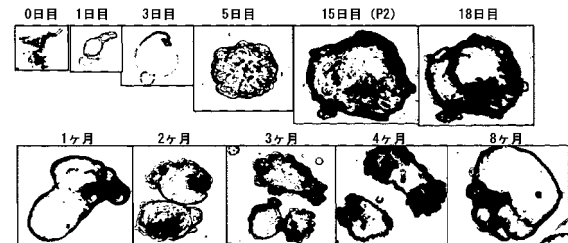
【図 1 B】



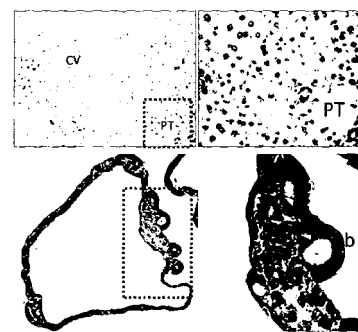
【図 1 C】



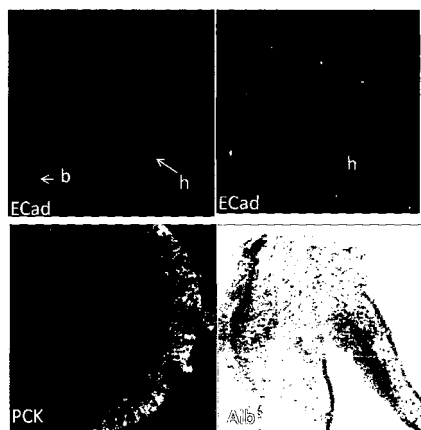
【図 1 D】



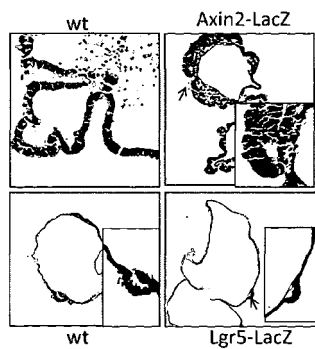
【図 2 A】



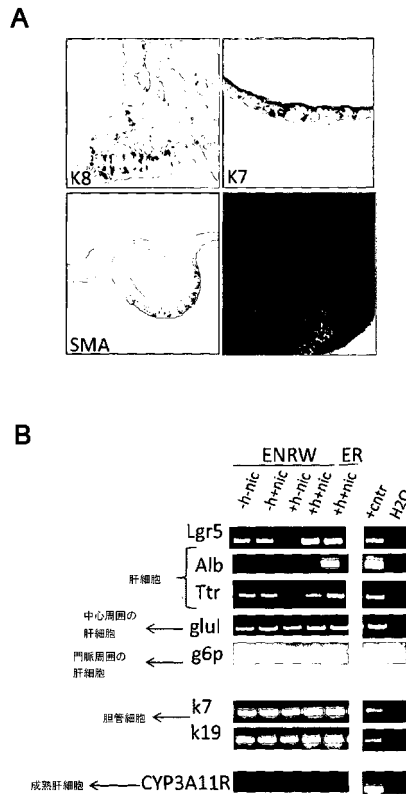
【図 2 B】



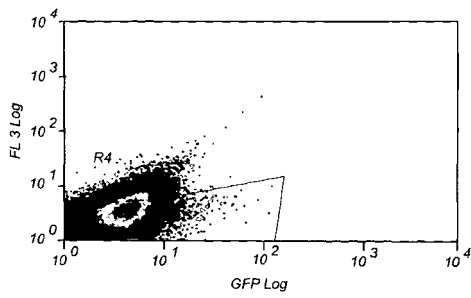
【図 3】



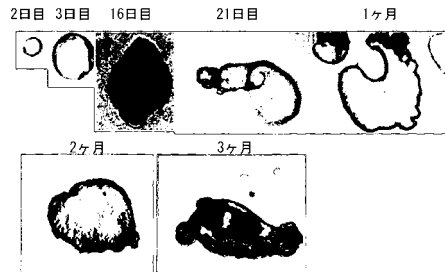
【図 4】



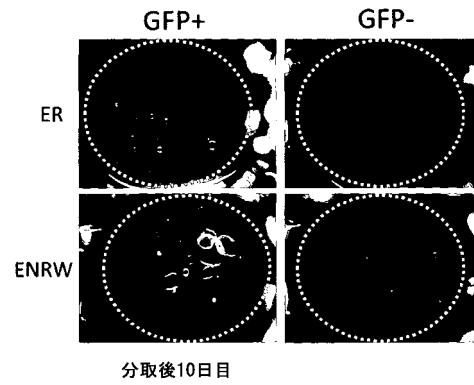
【図 5 A】



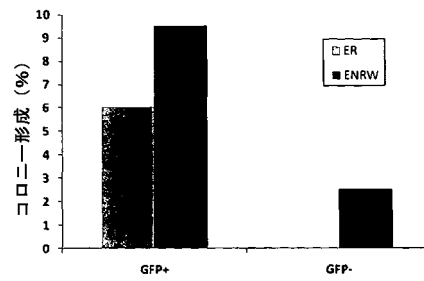
【図 5 B】



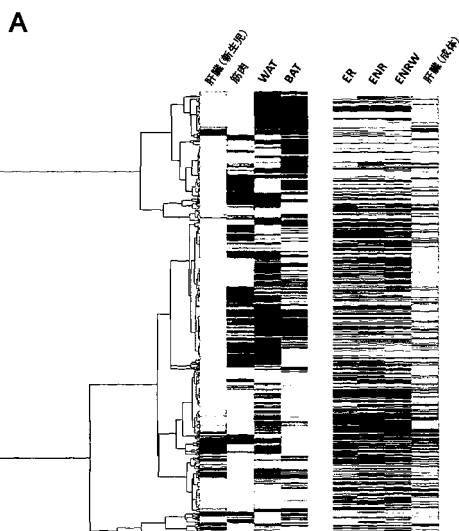
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6】



B

	ER	ENR	ENRW	肝臓 (成体)
G6pc2	119.5	122	125	117.5
G6pc3	4679.5	4340.5	4139.5	685.5
Glul	923.5	839.5	1387	18345
Met	5337	5743.5	4172	1828.5
Hnf1a	10980	9865	6176	8334
Hnf1b	2357	2632	2770.5	361
Hnf4a	1336	1283	1086	4033
Cyp39a1	1190.5	1167	1391	1051
Cyp2j6	938.5	918	998.5	1164
Cyp3a13	344	426.5	244	10787
Cyp4b1	1567	1567	370.5	2247
Lp3	4704	4659.5	5069.5	20262
Krt7	163790	161041	195354	386.5
Krt19	88264	79467.5	54949.5	347

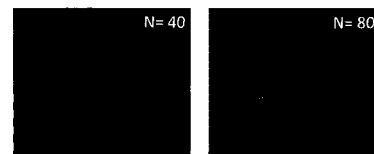
【図 7】

マウス肝臓培養物-24ヶ月齢



B

n本の染色体	カウント
40	10/15
80	2/15
42	1/15
36	1/15
85	1/15



【図 8 A】

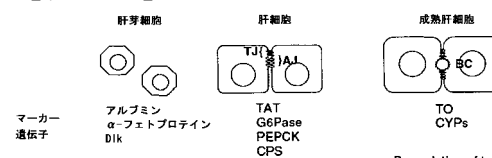


Figure 1: Schematic diagram of the experimental design. The timeline starts with '実験開始' (Experiment Start) leading to '播種実験' (Sowing Experiment). This is followed by a series of 'RNA収集' (RNA Collection) points labeled 'スプリットP1' through 'スプリットP5'. The timeline is divided into '異なる条件' (Different Conditions) by vertical lines. A '2日目' (Day 2) marker is shown at the beginning. The timeline ends with a diagonal line indicating the end of the experiment.

Genotype	世代数 (Generations)
E	1.0
EF	1.0
EH	1.0
ENic	1.0
EFH	1.0
EFNiC	1.0
EHNic	1.0
EFHNic	1.0
ER	1.0
ERF	2.0
ERH	2.0
ERNic	6.0
ERFH	2.0
ERFNic	10.0
ERHNic	7.0
ERFHNic	10.0

Figure 1 shows RT-PCR analysis of gene expression in E14.1 ES cell-derived embryoid bodies. The figure displays 12 horizontal gel images, each representing a different gene: Hprt, Cyp3A11, Alb, FAH, K19, and LGR5. Each gene has two rows of bands, one for each of the two independent ES cell lines. The lanes are labeled at the top: E, EF, EH, ENic, EFH, EFHic, EFHic, ER, ERH, ERHic, ENic, ENic, ENic, ENic. The bands for Hprt, Cyp3A11, Alb, FAH, K19, and LGR5 are visible in the lanes corresponding to the embryoid bodies (EF, EH, ENic, EFH, EFHic, ER, ERH, ENic). The bands for Hprt are visible in all lanes, including the E lane, indicating that Hprt is a housekeeping gene. The bands for Cyp3A11, Alb, FAH, K19, and LGR5 are only visible in the embryoid body lanes, indicating that these genes are expressed in the embryoid bodies.

胆管特異的TF

EL ER ER ENRW マウス 膵臓肝臓



Gata6	4981,5	5381	5124	5184	740
Cebpa	1431	1188	856	946	10640
Hnf1a	11640	10980	9865	6176	8334
Hnf4a	2573	1336	1283	1086	4033

Notchシグナル伝達					
Jag1	6832,5	3638,5	4111	3394	3432
Dll1	4035	3758	2791,5	2714,5	415,5
Notch3	557	718	476	788	234

TGFbシグナル伝達					
Tgfbbr1	3439	2971	4281	3664	733
Tgfbbr1	245	234	243	210	116
Tgfbbr2	8442	9942	13874	11392	1364

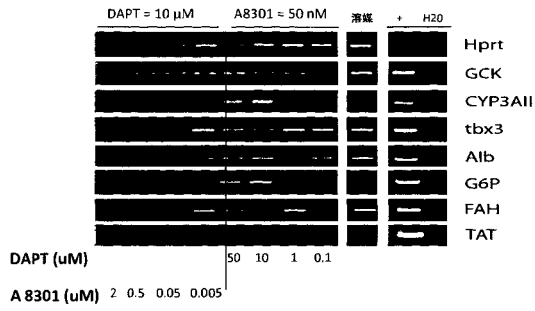
Figure 1: Experimental timeline. The timeline starts at 0 days (0日目) with 'ER' (Erythrocyte Reticulation) and '擇種実験' (Selection Experiment). At 2 days (2日目), '実験開始' (Experiment Start) occurs, followed by '異なる条件' (Different Conditions). At 3 days (3日目), '培地交換' (Medium Change) occurs. At 4 days (4日目), another '培地交換' occurs. At 7 days (7日目), a third '培地交換' occurs. At 9 days (9日目), 'RNA収量' (RNA Yield) is measured. The timeline is divided into four segments by vertical lines at 2, 3, 4, and 7 days, each containing a horizontal line with a double-headed arrow indicating the duration of the experiment.

E EA ED EAD EAF EAN EAO EAOH EAOH₂ EAOH₃ EAFH EDF EDH EADHC EAOHC EPHHC ENR-HK-Wnt

Hprt
 Gck
 Cyp3AII
 tbx3
 Alb
 Fah
 TAT

Figure 1 is a Northern blot image showing gene expression levels for five genes: Hprt, Alb, CYP3AII, Fah, and K19. The lanes are organized by gene (rows) and treatment/stage (columns). The columns are labeled at the top: EAD, EADf, EADH, EADNc, EADf De, EAD De, EADf, EADH, EADNc, EADf De, EADf, EADH, EADNc, EADf De, and finally a control lane with '+' and '-' markers. Below the columns, the developmental stages are indicated: '2日目' (Day 2) for the first four columns, '5日目' (Day 5) for the next four columns, and '8日目' (Day 8) for the last four columns. The genes are labeled on the right side of the blot. The bands represent the mRNA levels of each gene under the specified conditions.

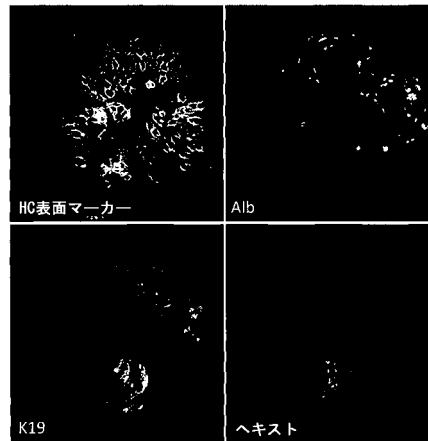
【図 10 D】



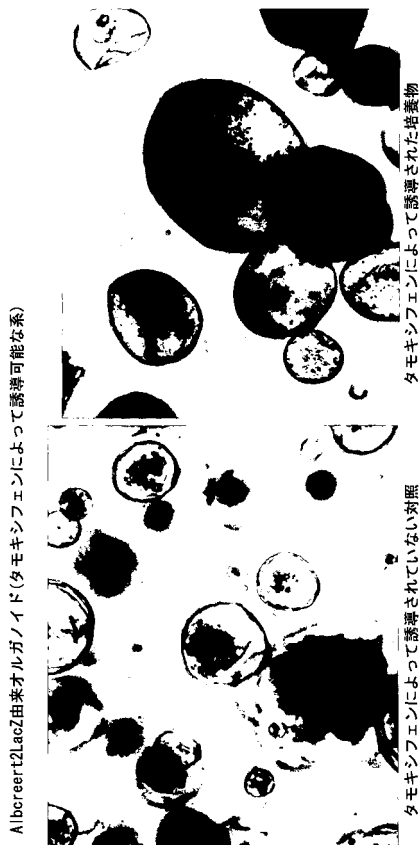
E=EGF 50ng/ml Nic=ニコチンアミド 10nM
A=A8301 50nM R=Rスポンジン1 500ng/ml
D=DAPT 10nM Wnt= Wnt条件培地50%
F=FGF10 100ng/ml De= デキサメタゾン 10mM
H=HGF 50ng/ml

【図 10 E】

8日間の分化条件EADF後の肝臓マーカーの染色

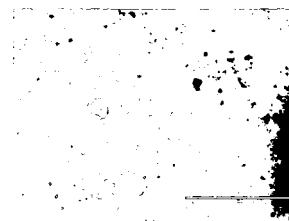


【図 10 F】

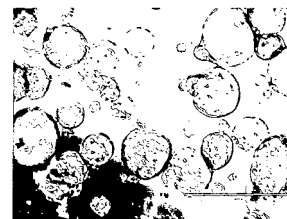


【図 11】

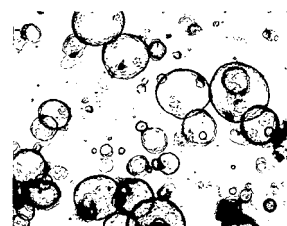
ヒト由来肝臓培養物 ERFHNic培養条件



播種後5日目 4×

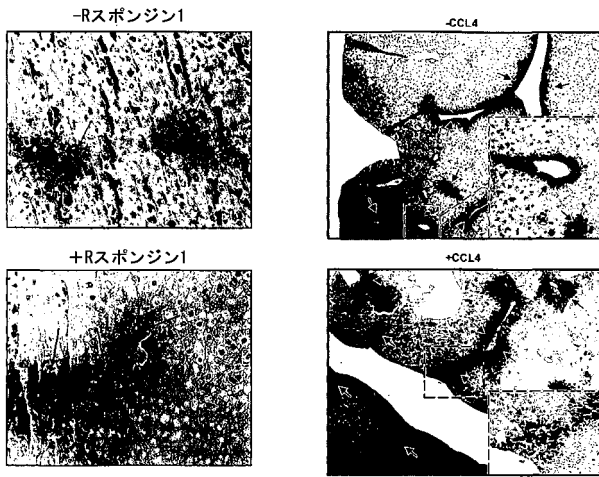


P1(10日目) 4×

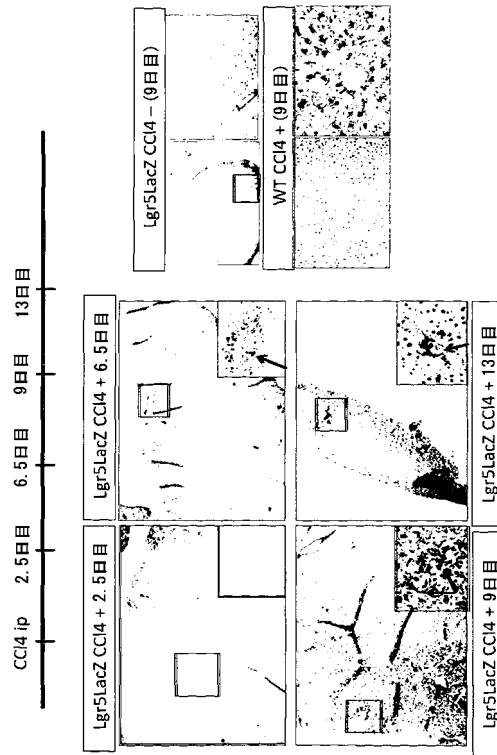


P2(20日目) 4×

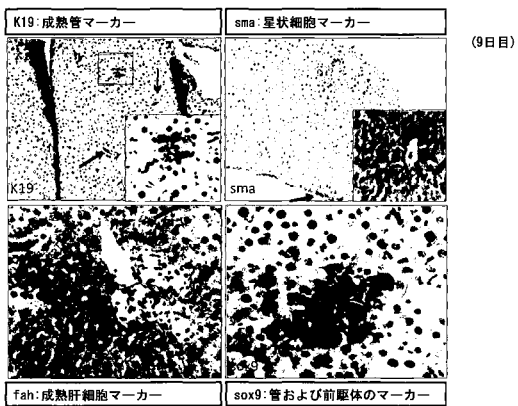
【図 1 2】



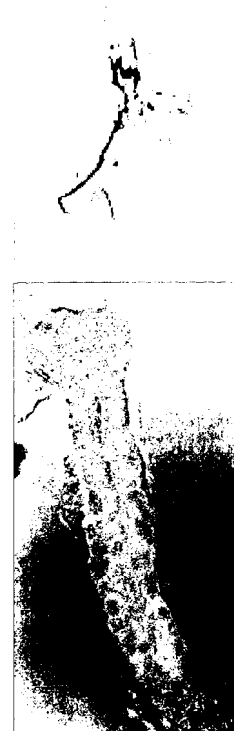
【図 1 3 A】



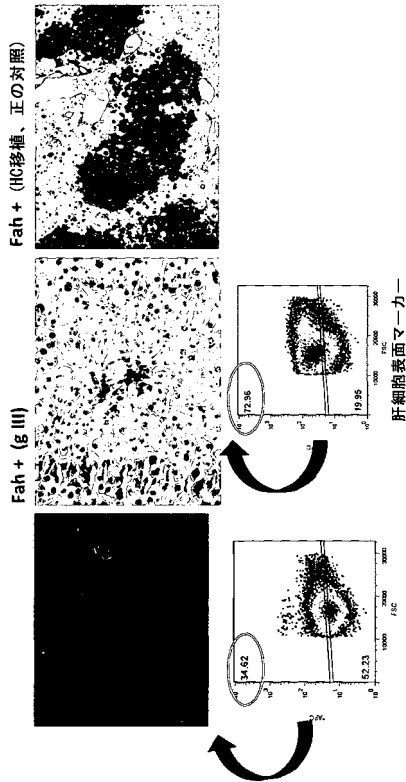
【図 1 3 B】



【図 1 4】

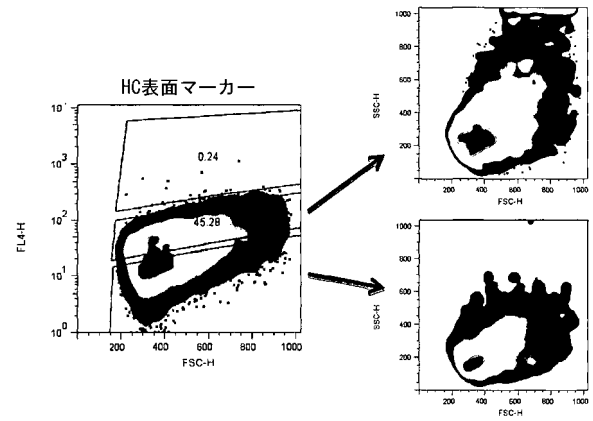


【図 17 A】



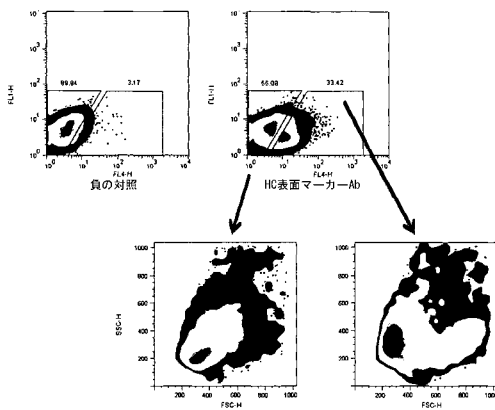
【図 17 B】

クローンIに由来する移植細胞上の肝細胞(HC)表面マーカーのフローサイトメトリー分析



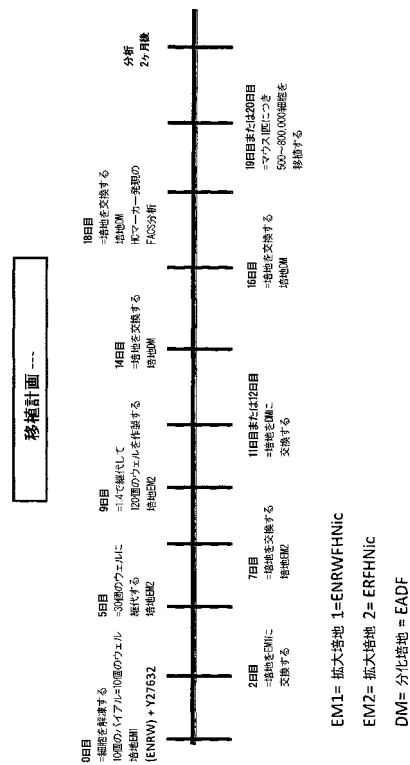
【図 17 C】

クローン2に由来する移植細胞上の肝細胞(HC)表面マーカーのフローサイトメトリー分析



【図 17 D】

マウスモデル、成体FGRマウス (Fah^{-/-}/RAG^{-/-}/IL2R^{-/-})。対照としてのオルガノイドまたは肝細胞の移植



【図 19-1】

[illegible]

【図 19-3】

30379	NM_004852	ref1 + tone cup homeobox 2 (ONECUT2), mRNA [NM_004852]	ONECUT2	3,4671	3,7373	3,5642	4653	6955	6460	498	
20892	NM_002763	ref1 + prospero homeobox 1 (PROX1), mRNA [NM_002763]	PROX1	2,4930	1,0227	1,1415	98	98	97.5	101	
12860	NM_004360	ref1 + 1 box 1 F-actinin (epithelial) (CCH1), mRNA [NM_004360]	CDH1	3,3253	3,6614	4,1381	10803	16648	24328	1076.5	
39803	NM_021784	ref1 + forkhead box A2 (FOXA2), mRNA [NM_021784]	FOXA2	2,9837	3,2434	3,0108	289.5	306	398	128.5	
39806	NM_005257	ref1 + forkhead box A2 protein 6 (GATA6), mRNA [NM_005257]	GATA6	3,0032	3,5538	3,8552	12789	1620	2038	3585	136
16668	NM_020202	ref1 + forkhead box M1 (FOXM1), mRNA [NM_020202]	FOXM1	-1,9203	-3,6288	-5,0418	-4,512	329	159.5	117.5	94
9214	NM_004364	ref1 + forkhead box O binding protein (CEBP), alpha (CEBPA), mRNA [NM_004364]	CEBPA	-0,9322	1,2903	-0,0086	4,2303	304	1257	647	1586.5
14125	NM_005194	ref1 + CCAAT enhancer binding protein (CEBP), beta (CEBPB), mRNA [NM_005194]	CEBPB	-0,1111	-0,2252	0,4127	2,5221	5217	5653.5	10124	5163.5
37458	NM_005195	ref1 + CCAAT enhancer binding protein (CEBP), delta (CEBPD), mRNA [NM_005195]	CEBPD	-0,1615	0,9115	0,4583	4,1610	1525	3232	2733	2651
145	NM_001806	ref1 + CCAAT enhancer binding protein (CEBP), gamma (CEBPG), mRNA [NM_001806]	CEBPG	0,9187	2,0261	1,2760	0,7494	2185	4317.5	4980	364
41435	NM_002065	ref1 + glutamine ammonia ligase (glutamine synthetase) (GLUL), mRNA [NM_002065]	GLUL	-0,1834	0,0758	-0,3704	0,4736	1365.5	1338	876	311
30469	NM_005556	ref1 + keratin 7 (KRT7), mRNA [NM_005556]	KRT7	5,1396	4,8373	4,3773	-0,0401	7538.5	4712	2627	96
13920	NM_002276	ref1 + keratin 19 (KRT19), mRNA [NM_002276]	KRT19	4,1830	3,7196	3,8914	-2,4731	353708	424094	309350	1371
5427	NM_000245	ref1 + basic fibroblast growth factor receptor (MET), mRNA [NM_000245]	MET	1,3614	1,0546	1,2510	-0,3692	7623.5	6639	8627	406

【図 19-5】

[illegible]

1710	NM_000339	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_002130]	APOA1	-3.5478	-2.8913	-2.1400	5.2314	370	536	1014.5	24560
8511	NM_002130	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_002130]	HMGCS1	1.9834	1.8579	-1.2536	1.9013	1518	1248	264	271
2331	NM_138711	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_138711]	PPARG	1.9376	3.5421	1.0259	-0.9723	794	2235	489	102
42261	NM_000767	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_000767]	CYP2B6	3.1686	3.8423	3.7438	7.0424	691	835	1376	23535
40096	NM_000772	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_000772]	CYP2C18	7.6059	8.9559	7.5195	8.1267	441	938	458.5	231
16549	NM_000771	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_000771]	CYP2C9	7.4072	9.3744	7.5571	10.9138	371.5	1144	785	3195
1249	NM_000775	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_000775]	CYP2J2	2.8839	2.5692	2.5672	5.4100	839	595.5	802	682.5
37457	NM_017460	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_017460]	CYP3A4	6.0850	6.9956	7.3093	9.3567	400.5	1260	1142	496.5
ENST00000439761		relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [ENST00000439761]	CYP3A5	-0.3739	0.1057	0.0937	1.4438	736	962.5	1172	403.5
2423	NM_000785	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_000785]	CYP3A7	5.5511	7.1200	6.6750	9.9567	3649	10927	9953	5989
14586	NM_007253	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_007253]	CYP4F8	2.7132	4.1535	2.5950	5.9628	686	2541.5	825.5	1176
14415	NM_207352	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_207352]	CYP4V2	2.9194	2.9333	2.7663	5.2822	853	995	923.5	822
28103	NM_005505	relE-1, cytochrome P450, methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (isoform 1) (HMGCS1), 転写因子 F42, mRNA [NM_005505]	SCARB1	-0.6468	-0.4215	-1.0325	2.0324	14042	23763	13137	22012

【配列表】

2019176864000001.app

【手續補正書】

【提出日】令和1年6月27日(2019.6.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、肝臓断片または肝臓オルガノイドを得るおよび/または培養するための方法:

分裂促進増殖因子として、上皮細胞増殖因子(EGF)、FGFR2またはFGFR4に結合することができるFGF、好ましくはFGF10、ニコチンアミド、および好ましくは、Wntアゴニスト、好ましくはR-スポンジン1、R-スポンジン2、R-スポンジン3、またはR-スポンジン4が加えられた動物細胞用またはヒト細胞用の基本培地を含む培地の存在下で、上皮幹細胞および/または該上皮幹細胞を含む単離された組織断片を、細胞外マトリックスと接触させて培養する工程。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 L	27/36	(2006.01)	A 6 1 L	27/36	3 0 0
A 6 1 L	27/54	(2006.01)	A 6 1 L	27/54	
A 6 1 L	27/38	(2006.01)	A 6 1 L	27/38	1 0 0
			A 6 1 L	27/38	3 0 0

(31)優先権主張番号 10171265.1

(32)優先日 平成22年7月29日(2010.7.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハイヒ オルテガ メリチェル
オランダ王国 ユトレヒト ヴィレム バレンツストラート 2 5 - 1 1

(72)発明者 クレヴァース ヨハネス カロルス
オランダ王国 ハイス テル ヘイデ ロイスダールラーン 7

Fターム(参考) 4B063 QA05 QQ08 QR77 QS07 QS24 QX01
4B065 AA93X AC12 AC14 BB34 BB40 BC01 BC41 CA44 CA46
4C081 AB00 BA12 CD34
4C087 AA01 AA02 AA03 BB52 BB64 NA14 ZA75