

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7657439号

(P7657439)

(45)発行日 令和7年4月7日(2025.4.7)

(24)登録日 令和7年3月28日(2025.3.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/09 (2010.01)

C 1 2 N 5/09

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34

D

C 1 2 M 3/04 (2006.01)

C 1 2 M 3/04

C 1 2 N 5/071(2010.01)

C 1 2 N 5/071

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

請求項の数 36 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-505509(P2019-505509)

(86)(22)出願日 平成29年8月3日(2017.8.3)

(65)公表番号 特表2019-524128(P2019-524128
A)

(43)公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/045277

(87)国際公開番号 WO2018/027023

(87)国際公開日 平成30年2月8日(2018.2.8)

審査請求日 令和2年7月29日(2020.7.29)

審査番号 不服2023-3589(P2023-3589/J1)

審査請求日 令和5年3月2日(2023.3.2)

(31)優先権主張番号 62/370,320

(32)優先日 平成28年8月3日(2016.8.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 507189574

ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシテ

ィ・ヘルス・サイエンス

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7

1 5 7, ウィンストン・セイラム, メデ

ィカル・センター・ブルヴァード

(74)代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(72)発明者 スカール, アレクサンダー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7

1 0 2, クレモンズ, キャスルトン・ド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんモデル化プラットフォームおよびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生きた腫瘍細胞と架橋ヒドロゲルとからなるコアであって、前記生きた腫瘍細胞が、悪性細胞を含み、前記生きた腫瘍細胞が C a c o - 2 細胞ではない、コアと、

前記コアを囲むシェルであって、前記シェルが、生きた良性細胞と架橋ヒドロゲルとからなり、前記生きた良性細胞が生きた上皮細胞を含む、シェルとを含み、

前記コアに含まれる架橋ヒドロゲルと、前記シェルに含まれる架橋ヒドロゲルが、それぞれ、チオール化ヒアルロン酸、チオール化ゼラチン、及び少なくとも二つのポリエチレングリコール (P E G) 架橋剤を含む組成物から形成された架橋ヒドロゲルであって、前記少なくとも二つのポリエチレングリコール (P E G) 架橋剤のうち少なくとも一つがアルキンを含む、腫瘍モデルとして有用な i n v i t r o 細胞構築物。

【請求項 2】

前記生きた腫瘍細胞が、結腸直腸がん細胞、中皮腫がん細胞、虫垂がん細胞、および／または肉腫がん細胞を含む、またはからなる、請求項 1 に記載の構築物。

【請求項 3】

前記腫瘍細胞および前記良性細胞が、哺乳動物細胞を含む、請求項 1 または 2 に記載の構築物。

【請求項 4】

前記構築物が、1 日または 2 日の期間、培地中で増殖させた構築物である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 5】

前記生きた良性細胞が、C a c o - 2 細胞を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 6】

前記腫瘍細胞が、検出可能な化合物を含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 7】

前記構築物が、1 週から 2 週、またはそれ以上の期間、培地中で増殖させた構築物である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 8】

生きた腫瘍細胞と架橋ヒドロゲルからなるコアであって、前記生きた腫瘍細胞が、悪性細胞を含み、前記生きた腫瘍細胞が C a c o - 2 細胞ではない、コアと、

前記コアを囲むシェルであって、生きた良性細胞と架橋ヒドロゲルとからなり、前記生きた良性細胞が生きた組織細胞を含むシェルとを含み、

前記コアに含まれる架橋ヒドロゲルと、前記シェルに含まれる架橋ヒドロゲルが、それぞれ、チオール化ヒアルロン酸、チオール化ゼラチン、及び少なくとも二つのポリエチレングリコール (P E G) 架橋剤を含む組成物から形成された架橋ヒドロゲルであって、前記少なくとも二つのポリエチレングリコール (P E G) 架橋剤のうち少なくとも一つがアルキンを含み、

前記生きた腫瘍細胞が対象由来である、腫瘍モデルとして有用な i n v i t r o 細胞構築物。

【請求項 9】

前記生きた良性細胞が、前記対象由来である、請求項 8 に記載の構築物。

【請求項 10】

前記生きた腫瘍細胞が、結腸直腸がん細胞、中皮腫がん細胞、虫垂がん細胞、および／または肉腫がん細胞を含む、またはからなる、請求項 8 または 9 に記載の構築物。

【請求項 11】

前記腫瘍細胞および前記良性細胞が、哺乳動物細胞を含む、請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 12】

前記生きた良性細胞が、上皮細胞を含む、請求項 11 に記載の構築物。

【請求項 13】

前記腫瘍細胞が、検出可能な化合物を含む、請求項 8 から 12 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 14】

前記構築物が、1 日もしくは 2 日、または 1 週から 2 週、またはそれ以上の期間、培地中で増殖させた構築物である、請求項 8 から 13 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 15】

前記腫瘍細胞および／または良性細胞が、少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % の生着率を有する方法を使用して調製される、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 16】

1、2、3、または 4 週培養した構築物中の細胞の平均数に基づいて少なくとも 75 %、80 %、85 %、または 90 % の生細胞を含む、請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 17】

抗腫瘍活性について目的の化合物を i n v i t r o でスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの構築物を提供するステ

10

20

30

40

50

ップと、

(b) 前記化合物を前記構築物に *in vitro* で接触させるステップと、次いで、

(c) 目的の前記化合物の抗腫瘍活性を示す、前記生きた腫瘍細胞の増殖、または前記生きた腫瘍細胞の減少を判定するステップと

を含む、方法。

【請求項 18】

前記腫瘍細胞が、腫瘍に侵されている患者から採取されたものである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記腫瘍細胞が、患者の腫瘍から採取されたものである、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも 1 つの追加のオルガノイドを提供するステップであって、少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、少なくとも 1 つの前記構築物と異なる細胞を含み、少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、生きた腫瘍細胞を含むステップと、少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドの中の前記生きた腫瘍細胞の量を決定するステップとをさらに含む、請求項 17 から 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、良性細胞を含み、任意選択的に、良性細胞が、前記腫瘍細胞と同一の患者から採取されたものである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記良性細胞および／または前記腫瘍細胞が、前記患者由来の生検から得られたものであり、前記化合物が、前記生検後 1 週間以内に、少なくとも 1 つの前記構築物および／または少なくとも 1 つの追加のオルガノイドに接触する、請求項 18、19、または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、肝臓オルガノイドである、請求項 20 から 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記腫瘍細胞を検出可能な化合物で標識するステップをさらに含む、請求項 17 から 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

生きた腫瘍細胞構築物を有するチャンバーと、
前記チャンバーと流体連通するチャンネルと、
前記チャンバーおよび前記チャンネル中の増殖培地と、
前記チャンネル中の微孔膜であって、それを通して前記チャンバーから前記増殖培地が流動するように位置決めした微孔膜と、

前記チャンバーおよびチャンネルと連係する流体回路であって、操作上、前記チャンバーから前記チャンネルおよび前記微孔膜を通り前記チャンバーへ戻る流体流れをもたらす閉ループ流体システムを構成するようにした流体回路とを備えた、腫瘍細胞を *in vitro* で評価するのに有用なデバイスであって、

前記生きた腫瘍細胞構築物が、請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の構築物である、デバイス。

【請求項 26】

転移活性について腫瘍細胞を *in vitro* でスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 25 に記載のデバイスを提供するステップと、

(b) 前記デバイス内に前記培地を循環させるステップと、

(c) 前記微孔膜上で捕捉した腫瘍細胞を検出するステップと

を含み、捕捉した腫瘍細胞が多数であるほど、前記腫瘍細胞の転移活性が高くなることを示す、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

転移活性について腫瘍細胞を *in vitro* でスクリーニングする方法であって、
(a) 生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー、および前記生きた腫瘍細胞オルガノイドと異なる細胞を含む少なくとも1つのオルガノイドを含む少なくとも1つの二次チャンバーを備える、デバイスを提供するステップであって、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドが請求項1の構築物であるステップと、
(b) 前記デバイス内に培地を循環させるステップと、
(c) 少なくとも1つの前記二次チャンバー中の腫瘍細胞を検出するステップと
を含み、少なくとも1つの前記二次チャンバー中に存在する腫瘍細胞が多数であるほど、前記腫瘍細胞の転移活性が高くなることを示す、方法。

10

【請求項 28】

少なくとも1つの前記オルガノイドが、肝臓、結腸、脳、肺、内皮、心臓、または上皮オルガノイドである、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

少なくとも1つの前記オルガノイドが、肝臓オルガノイドおよび追加のオルガノイドを含み、前記肝臓オルガノイドおよび前記追加のオルガノイドが、流体連通する別々の二次チャンバー中に存在する、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 30】

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングする方法であって、
(a) 請求項25に記載のデバイスを提供するステップと、
(b) 前記デバイス内に前記培地を循環させるステップと、
(c) 前記目的の化合物を前記腫瘍細胞に投与するステップと、次いで、
(d) 前記微孔膜上で捕捉した腫瘍細胞を検出するステップと
を含み、捕捉した腫瘍細胞が少数であるほど、目的の前記化合物の抗転移活性および／または抗腫瘍活性が高くなることを示す、方法。

20

【請求項 31】

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングする方法であって、
(a) 肝臓オルガノイドを含む第1のチャンバー、および生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む第2のチャンバーを備えるデバイスを提供するステップであって、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドが請求項1から16のいずれかの構築物であるステップと、
(b) 前記第1のチャンバーから前記第2のチャンバーへ増殖培地を循環させるステップと、
(c) 目的の化合物を前記肝臓オルガノイドおよび／または前記生きた腫瘍細胞オルガノイドに投与するステップと、
(d) 前記目的の化合物を投与しない場合の前記生きた腫瘍細胞オルガノイド中に存在する腫瘍細胞数と比較して、前記第2のチャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少を判定するステップと
を含む、方法。

30

40

【請求項 32】

前記目的の化合物を投与しない場合の前記第1のチャンバー中に存在する腫瘍細胞数と比較して、前記第1のチャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少を判定するステップをさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記デバイスが、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび肝臓オルガノイドと異なる細胞を有する少なくとも1つのオルガノイドを含む、少なくとも1つの追加のチャンバーをさらに備える、請求項31または32に記載の方法。

【請求項 34】

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスク

50

リーニングする方法であって、

(a) 生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー、および前記生きた腫瘍細胞オルガノイドと異なる細胞を含む追加のオルガノイドを含む、少なくとも1つの二次チャンバーを備えるデバイスを提供するステップであって、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドが請求項1から16のいずれかの構築物であるステップと、

(b) 前記デバイス内に培地を循環させるステップと、

(c) 前記目的の化合物を前記腫瘍細胞に投与するステップと、

(d) 前記目的の化合物を投与しない場合の前記生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび／または少なくとも1つの前記二次チャンバー中に存在する腫瘍細胞数と比較して、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび／または少なくとも1つの前記二次チャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少を判定するステップと

を含む、方法。

【請求項35】

前記追加のオルガノイドが、脳、結腸、肺、内皮、心臓、上皮、および／または肝臓オルガノイドである、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記腫瘍細胞が、前記腫瘍に侵されている患者から採取されたものである、請求項26から35のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願情報

本出願は、2016年8月3日出願の米国仮特許出願第62／370,320号、および2017年6月20日出願の米国仮特許出願第62／522,313号の利点を主張し、各開示は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0002】

政府支援の声明

本発明は、国立衛生研究所により付与された認可番号1U54TR001362-01および5UL1TR001420-03の下、政府の支援により行った。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0003】

本出願は、腫瘍モデルとして使用することができる*in vitro*細胞構築物（または「オルガノイド」）ならびにその作製および使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

高精度医療は、がん患者の治療の向上に素晴らしく有望である。現在、遺伝子プロファイリングを腫瘍生検において実施して、鍵となる重要な変異に基づいた薬物選択の範囲を絞り込むことができるが、特定の患者に絶対的に最良な薬物を選択することは困難なままである。患者自身の細胞で作製した腫瘍モデルにより薬物選択をスクリーニングすると、遺伝子スクリーニングを補完して、最も有効な薬物を決定し得る。このような患者特異的ながんモデルは、腫瘍の増殖およびその転移能に対する薬物の効果についての個別化した予測的データをもたらすことができる。

【発明の概要】

【0005】

本発明の第1の態様は、(a) 生きた腫瘍細胞からなるコアと、(b) コアを囲む（例えば、被包する）シェルとを含み、シェルが、生きた良性細胞（例えば、組織細胞、良性または分化腫瘍細胞等）からなる、腫瘍モデルとして有用な*in vitro*細胞構築物（または「オルガノイド」）である。生きた腫瘍細胞および／または生きた良性細胞は、対象から、例えば、対象から採取した生検（例えば、腫瘍生検および／または組織生検）等から得ることができる。

【0006】

本発明の第2の態様は、対象由来の生きた腫瘍細胞を含む、腫瘍モデルとして有用な *in vitro* 細胞構築物（または「オルガノイド」）である。いくつかの実施形態では、生きた腫瘍細胞は、対象から採取した生検（例えば、腫瘍生検）由来である。

【0007】

本発明のさらなる態様は、（a）チャンバー、およびチャンバーと流体連通するチャンネルを有するマイクロ流体デバイスと、（b）チャンバー中の生きた腫瘍細胞構築物（例えば、オルガノイド）と、（c）チャンバーおよびチャンネル中の増殖培地と、（d）チャンバーおよびチャンネルと作動的に結合し、チャンバーからチャンネルを通りチャンバーへ戻って培地を循環させるように構成したポンプと、（e）チャンネル中の微孔膜（例えば、TRANSWELL（登録商標）微孔膜）とを備え、それを通して培地が流動するように位置決めした、腫瘍細胞を *in vitro* で評価するのに有用な（例えば、腫瘍細胞の転移を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞の遊走および／もしくは浸潤を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞を含む構築物の増殖を *in vitro* で評価するのに、ならびに／または目的の化合物、例えば、薬物もしくはプロドラッグ等に対する応答を評価するのに有用な）デバイスである。

【0008】

本発明の別の態様は、腫瘍細胞を *in vitro* で評価するのに有用な（例えば、腫瘍細胞の転移を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞の遊走および／もしくは浸潤を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞を含む構築物の増殖を *in vitro* で評価するのに、ならびに／または目的の化合物、例えば、薬物もしくはプロドラッグ等に対する応答を評価するのに有用な）デバイスであり、このデバイスが、各チャンバーに少なくとも1つのオルガノイドを有する2つ以上のチャンバーを備える。デバイス内に存在する、この1つまたは複数のオルガノイドは、単一の対象から得た細胞から作製してもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは、第1のチャンバー中に生きた腫瘍細胞オルガノイドを、第2のチャンバー中に肝臓オルガノイドを含む。生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび肝臓オルガノイドは、同一の対象から得た細胞から形成してもよく、これにより個別化した分析を提供することができる。

【0009】

前述および他の本発明の目的および態様を以下に、より詳細に説明する。本発明を様々な形態で具体化することができることが理解されるべきであり、本明細書に記載する実施形態に制限するものとして解釈されるべきではない。むしろ、このような実施形態は、この開示が漏れなく完全であり、この開示により本発明の範囲が当業者に十分に伝わるように提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】改変された3D *in vitro* モデル使用して、高精度医療治療レジメンの情報を個々の患者に応じて、よりよく提供するための概念を示す図である。実線矢印は、現行技術の高精度医療のパイプラインであり、この場合、治療は、患者の腫瘍遺伝子プロファイルに基づいて患者のために判定される。しかし、実際には、鍵となる重要な変異の同定後であっても、腫瘍専門医は、可能性のある薬物のいくつかの選択肢を押しつけられることが多く、結果として、最適な治療は何かについての最も妥当とされる推測または見込みが生じることとなる。破線矢印は、患者の細胞で作製したオルガノイドを導入することにより、生検した腫瘍細胞の遺伝子スクリーニングを補完し、最終的に、患者にとって最適な療法を予測することができることを示す。

【図2A】マイクロ流体デバイス層の組立を示す模式図である。上から下の順に、チューブ、流体出入口を有するポリスチレン（PS）スライド、オルガノイド用チャンバーおよび対応する流体出入口を有する接着フィルム、スライドガラス、ならびにフォトマスク層である。

【図2B】*in situ* パターニング技術を示す模式図である。マイクロ流体チャンバ

10

20

30

40

50

ー (i) を H A ヒドロゲル、光開始剤および腫瘍細胞を含有するヒドロゲル混合物で満たし (i i)、次いで、フォトマスクを通して U V 照明に曝露する (i i i)。曝露したヒドロゲルを架橋し (i v)、その後、清浄な緩衝液を使用して非架橋ゲルを洗い流す (v)。最後に、インキュベーションのために、洗い流した緩衝液を培地と置き換える (v i)。

【図 2 C】コンピュータ制御蠕動ポンプにより流動が促進される、各オルガノイド用の低容量、閉ループ流体回路を特徴とする測定装置全体を示す模式図である。

【図 2 D】7 日目および 14 日目の L I V E / D E A D アッセイ後のデバイス上の腫瘍構築物の最大投影共焦点画像および分割画像である。それぞれ 93.3% および 86.4% のパーセント生存率を示す。

【図 3 A - 3 F】パネル a ~ f (i) は、L I V E / D E A D アッセイ後の腫瘍構築物の最大投影共焦点画像であり、パネル a ~ f (i i) は、I m a r i s ソフトウェアを使用した分割画像である。中灰色は死細胞を表し、明灰色は生細胞を表す。パネル a) は、> 90% の生存率を有する 1 週目の対照の画像である。パネル b) は、2 週目の対照の画像である。パネル c) は、7 日間カルボプラチンおよびペメトレキセド薬物の影響下にあった構築物を示す。パネル d) は、7 日間カルボプラチンおよびペメトレキセド薬物の影響下にあった構築物を示す。パネル e) は、7 日間シスプラチンおよびペメトレキセド薬物の影響下にあった構築物を示す。パネル f) は、7 日間シスプラチンおよびペメトレキセド薬物の影響下にあった構築物を示す。

【図 3 G】対照および薬物で処置したオルガノイドの分割画像から得た生存率 (生細胞 / 死細胞) 測定値を示すグラフである。薬物曝露は 7 日目に開始した。有意性: * $p < 0.1$ 、** $p < 0.05$ 、*** $p < 0.01$

【図 4 A . 4 B】患者由来の腫瘍構築物における、バイオマーカーによる治療薬スクリーニングを示す図である。パネル A) では、腫瘍生検試料の遺伝子分析により、P B R M 1 および B A P 1 の 2 つの変異を同定した。E Z H 2 阻害剤である D Z N e p により標的とし得るものとして B A P 1 変異を同定した。パネル B) では、M T S ミトコンドリア代謝アッセイにより、D Z N e p 薬物で処置したオルガノイドと比較して、対照オルガノイドが最も増殖性であり、細胞数の減少に比例してミトコンドリア代謝の低下が生じたことが示された。反対に、H C T 116 オルガノイドは、D Z N e p に対して負に応答するようには見えない。

【図 4 C - 4 F】患者由来の腫瘍構築物における、バイオマーカーによる治療薬スクリーニングを示す図である。パネル C) では、さらに、アネキシン V および K i 67 バイオマーカー画像を使用して分析を行ったところ、すべての薬物処置物が、アネキシン V を K i 67 に対して高い割合で有し、アポトーシス細胞量の増加を示した。アネキシン V および K i 67 蛍光バイオマーカーの代表的画像を、D Z N e p 処置物について示す。赤色染色 (白黒画像中の中灰色) は、アネキシン V であり、緑色染色 (白黒画像中の明灰色) は、K i 67 である。スケールバーは、100 μm を示す。パネル D) では、さらに、アネキシン V および K i 67 バイオマーカー画像を使用して分析を行ったところ、すべての薬物処置物が、アネキシン V を K i 67 に対して高い割合で有し、アポトーシス細胞量の増加を示した。アネキシン V および K i 67 蛍光バイオマーカーの代表的画像を、D Z N e p 処置物について示す。赤色染色 (白黒画像中の中灰色) は、アネキシン V であり、緑色染色 (白黒画像中の明灰色) は、K i 67 である。スケールバーは、100 μm を示す。パネル E) では、中皮腫オルガノイドにおいて D Z N e p 濃度が上昇するにつれて、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色したオルガノイド切片が正常形態を失い、核のないゴースト細胞が出現することを示す。パネル F) では、E の中皮腫オルガノイドとは反対に、H C T 116 細胞は、E の中皮腫オルガノイドのような用量依存的変化を示さず、D Z N e p が中皮腫オルガノイドにおいて、H C T 116 オルガノイドよりも効果的に細胞死を誘導することを示唆する。

【図 5 A】培養することが難しい腫瘍由来の生存可能なオルガノイドを示す図である。パネル A) 低悪性度虫垂 (L G A) を示す。

【図5B】培養することが難しい腫瘍由来の生存可能なオルガノイドを示す図である。パネルB) 高分化型乳頭状腹膜中皮腫を示す。

【図5C】培養することが難しい腫瘍由来の生存可能なオルガノイドを示す図である。パネルC) 臨床診療において既に疑われているように、LGAオルガノイドは、療法にตอบสนองしないが、高悪性度虫垂腫瘍オルガノイドは、療法にตอบสนองすることを示す。

【図5D】培養することが難しい腫瘍由来の生存可能なオルガノイドを示す図である。パネルD) 希少な肉腫からの生存可能な腫瘍オルガノイドの構築を示す。

【図6】図6Aは、2D薬物試験プロトコルを示す図である。図6Bは、種々の濃度の抗がん剤で処置後の2次元微小環境におけるHCT116、HT29、CACO2、およびSW480結腸直腸がん細胞株のパーセント相対細胞生存率の値を示すグラフである。A = レゴラフェニブ (μM) B = ソラフェニブ (μM) C = トラメチニブ (nM) D = 5-FU (mM) E = ダブラフェニブ (μM)。

10

【図7】図7Aは、3D薬物試験プロトコルを示す図である。図7Bは、種々の濃度の抗がん剤で処置後の3次元微小環境におけるHCT116、HT29、CACO2、およびSW480結腸直腸がん細胞株のパーセント相対細胞生存率の値を示すグラフである。A = レゴラフェニブ (μM) B = ソラフェニブ (μM) C = トラメチニブ (nM) D = 5-FU (mM) E = ダブラフェニブ (μM)。

【図8】HCT116およびCACO2結腸直腸細胞株についてレゴラフェニブ、ソラフェニブ、および5-FUを用いた、2Dおよび3D薬物スクリーニングの結果を比較したグラフである。p値により判定した有意差を再度表示する ($<0.10 = *$ $<0.05 = **$ $<0.01 = ***$)。

20

【図9A】環状オルガノイド薬物試験プロトコルを示す図である。

【図9B】レゴラフェニブによるHCT116の標的細胞死、ならびに5-FUによるHCT116およびCACO2の両方の普遍的細胞死を詳細に示す7日目の顕微鏡画像である。緑色 (白黒画像中の明灰色) 蛍光色素 (カルセインAM) は、生細胞を示し、一方、赤色 (白黒画像中の中灰色) 蛍光色素 (エチジウムホモダイマー1) は、死細胞を示す (スケールバー = $200\mu\text{m}$)。

【図9C】各濃度のレゴラフェニブおよび5-FUの比率、ならびにそれに対する無処置の場合の比率である対照の比率を示すグラフである。

【図10】デバイスを通して培地を循環させる、マイクロ流体デバイスの内部構成要素および外部構成要素を表す図である。

30

【図11】カペシタピンを5-FUの薬物活性形態へ代謝して、心臓および肺オルガノイドにおいて細胞死の増加を誘導するのに肝臓オルガノイドを必要とすることを示すLIVE/DEADの結果を示す画像である。

【図12】小型化したシステムにおけるLIVE/DEADの結果を示す画像であり、肝臓が存在すると、カペシタピンが毒性薬物である5-FUに代謝されて、心臓および肺に毒性を生じることを示す。肝臓なしでは、この代謝は発生せず、心臓および肺オルガノイド生存率は低下しない。

【図13】標準サイズのシステムおよび小型化したシステムにおける最初のバイオマーカー分析のグラフである。

40

【図14】テープ流体工学と接着フィルムおよび/または両面テープ (DST)、ポリ (メチルメタクリレート) (PMMA)、ならびにポリジメチルシロキサン (PDMS) 構成要素を組み込むハイブリッドマイクロリアクター作製戦略の図である。

【図15A】本発明の態様による2つのチャンバーを有するデバイス例の異なる構成要素および/または図である。

【図15B】本発明の態様による2つのチャンバーを有するデバイス例の異なる構成要素および/または図である。

【図15C】本発明の態様による2つのチャンバーを有するデバイス例の異なる構成要素および/または図である。

【図15D】本発明の態様による2つのチャンバーを有するデバイス例の異なる構成要素

50

および／または図である。

【図16】本発明の態様による6つのチャンバーを有するデバイス例を示す図である。

【図17】本発明の態様によるデバイス構造の模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

これより本発明を、本発明の実施形態を示す添付の図面を参照して、以下、より詳細に記載する。ただし、本発明は、多様な形態で具体化することができ、本明細書に記載する実施形態に制限されるものとして解釈されるべきではない。むしろ、このような実施形態は、この開示が、漏れなく完全であり、この開示により本発明の範囲が当業者に十分に伝わるように提供するものである。

【0012】

本明細書において使用する用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであり、本発明を制限することを意図するものではない。本明細書において使用する場合、文脈上明白に他に指示しない限り、単数形「a」、「an」および「the」は、複数形をも含むことを意図する。用語「含む」または「含んでいる」は、本明細書において使用する場合、記述した特徴、整数、ステップ、操作、要素、成分および／または、その群もしくは組合せの存在を明示するが、1つまたは複数の他の特徴、整数、ステップ、操作、要素、成分および／または、その群もしくは組合せの存在または追加を排除しないことが、さらに理解される。

【0013】

他に定義しない限り、本明細書において使用する、すべての用語（技術的および科学的用語を含む）は、本発明の属する分野の当業者により一般に理解されるものと同一の意味を有する。一般に使用される辞書において定義されるもの等の用語が、その意味と本明細書および特許請求の範囲との関連において一致した意味を有するものとして解釈されるべきであり、本明細書において、そのように明示的に定義しない限り、理想的な、または過度に形式的な意味に解釈されるべきではないことが、さらに理解される。公知の機能または構造は、簡潔性および／または明確性のため、詳細に記載しない場合がある。本明細書において言及する、すべての出版物、特許出願、特許および他の参考文献は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。用語において矛盾する場合は、本明細書が支配する。

【0014】

また、本明細書において使用する場合、「および／または」は、関連する列挙した項目のうちの1つまたは複数の、任意またはすべての可能な組合せ、ならびに選択的に解釈する場合（「または」）、組合せが不足していることを言及および包含する。

【0015】

文脈上他に指示しない限り、本明細書において記載する本発明の種々の特徴は、任意の組合せで使用し得ることを特に意図する。さらに、本発明はまた、本発明のいくつかの実施形態において、本明細書に記載する、いかなる特徴または特徴の組合せも除外または省略し得ることを意図する。例示すると、本明細書が、複合体が成分A、BおよびCを含むことを示す場合、A、BもしくはCのいずれか、またはその組合せは、省略および排除し得ることを特に意図する。

【0016】

本明細書において使用する場合、移行句「本質的にからなる」（および文法的変化形）は、主張する本発明の列挙した材料またはステップ「ならびに基本的小および新規の特徴に実質的に影響しないもの」を包含するものとして解釈されるべきである。したがって、本明細書において使用する用語「本質的にからなる」は、「含んでいる」と等価であると解釈されるべきではない。

【0017】

本明細書において使用する用語「約」は、量または濃度等の測定可能な値を指す場合、限定されないが、特定の値の±10%、±5%、±1%、±0.5%、またはさらに±0

10

20

30

40

50

・1%等、特定の値の±20%までの変動、ならびに特定の値を指すことを意味する。例えば、「約X」は、Xが測定可能な値である場合、XならびにXの±20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%、またはさらに±0.1%の変動を含むことを意味する。本明細書において提供する、測定可能な値の範囲は、他の任意の範囲および／またはその範囲内のそれぞれの値を含んでもよい。

【0018】

本発明において使用する「細胞」は、一般に、動物細胞、特に哺乳動物および霊長類の細胞であり、その例は、ヒト、イヌ、ネコ、ウサギ、サル、チンパンジー、ウシ、ブタ、またはヤギを含むが、それに限定されない。細胞は、肝臓、腸、脾臓、リンパ節、平滑筋、骨格筋、中枢神経、末梢神経、皮膚、免疫系等の特定の細胞または組織型に少なくともある程度分化していることが好ましい。いくつかの細胞は、下記にさらに考察するように、がん細胞であってもよく、この場合、いくつかの細胞は、また下記にさらに考察するように、任意選択的にあるが、好ましくは、検出可能な化合物を（天然に、または組換え技術により）発現する。

【0019】

本明細書において使用する「対象」は、一般に、ヒト対象であるが、本発明の態様では、他の動物対象、特に獣医科用の哺乳動物対象（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ヤギ、ヒツジ）を用いて実行し得る。対象は、男性または女性および乳児、若年、青年、成年、ならびに老年を含む、いかなる年齢の対象であってもよい。

【0020】

「オルガノイド」は、本明細書において「細胞構築物」および「3次元組織構築物」と互換的に使用し、3次元または多層構造（単層とは対照的な）に作製した、典型的には担体培地中の生細胞の組成物を指す。適した担体培地は、下記に記載するような、架橋したヒドロゲル等のヒドロゲルを含む。ヒドロゲルのさらなる例として、引用することにより本明細書の一部をなすものとする、国際出願PCT/US2015/055699に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。オルガノイドは、モデルまたは模倣とする特定の組織または臓器に応じて、1つの分化細胞型、または2つ以上の分化細胞型を含むことができる。いくつかのオルガノイドは、下記にさらに考察するように、がん細胞を含むことができる。オルガノイドが、がん細胞を含む場合、オルガノイドは、組織細胞を含むことができ、かつ／または細胞外マトリックス（または、それに由来するタンパク質またはポリマー）、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、アルギン酸他、その組合せを含むもの等の細胞を含まない組織模倣体を含むことができる。したがって、いくつかの実施形態では、細胞外マトリックス、または架橋したマトリックスと共に細胞を混合して、オルガノイドまたは構築物を形成するが、他の実施形態では、スフェロイドまたはオルガノイド等の細胞凝集体を予備形成し、次いで、細胞外マトリックスと混合してもよい。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、腫瘍性オルガノイドおよび／または非腫瘍性オルガノイドである。

【0021】

いくつかの実施形態では、オルガノイドは、ヒト由来細胞である細胞を含み、いくつかの実施形態では、オルガノイドは、ヒト由来細胞からなる細胞を含む。本発明のオルガノイドは、*in vivo*の細胞により産生されたバイオマーカーと同一の、1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、またはそれ以上）のバイオマーカーを発現および／または産生し得る。例えば、*in vivo*の肝臓細胞は、アルブミンを産生し、肝臓細胞を含む本発明のオルガノイドは、アルブミンを発現し得る。いくつかの実施形態では、オルガノイドは、*in vivo*の相当する細胞が産生および／または発現する、同一の量または平均量の±20%、±10%、もしくは±5%の量のバイオマーカーを発現し得る。バイオマーカーの例として、アルブミン、尿素、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）（例えば、α-GST）、ケモカイン（例えば、IL-8、IL-1β等）、プロスタサイクリン、SB100B、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、ホルモン（例えば、テストステロン、エストラジオール、プロ

10

20

30

40

50

ゲステロン等)、インヒピンA/B、乳酸脱水素酵素(LDH)、および/または腫瘍壊死因子(TNF)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、直径が約200 μ m~約350 μ mであり、例えば、約200、250、300、または350 μ mである。オルガノイドは、合計で約1,500または2,000~約3,000または3,500個の細胞を含むことができる。本発明のオルガノイドは、例えば、任意の3次元形状または多層形状等、任意の適した形状であってもよい。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、スフェロイドの形態である。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、懸濁液または培地(例えば、架橋したヒドロゲル)中に自己組織化させてもよい。

10

【0023】

本明細書において使用する「増殖培地」は、本発明を実行するのに使用する細胞を維持する、任意の天然または人口の増殖培地(典型的には水性液体)であってもよい。例としては、必須培地もしくは最小必須培地(MEM)、またはその変形、例えば、イーグル最小必須培地(EMEM)およびダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ならびに血液、血清、血漿、リンパ液他、その合成模倣体を含むもの等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、増殖培地は、pH変色指示薬(例えば、フェノールレッド)を含む。

【0024】

本明細書において使用する「候補化合物」または「目的の化合物」は、原発部位から第2の部位へのがん細胞拡大の阻害活性を判定する、または、がん細胞生存率の低下における活性および/もしくは抗腫瘍活性を判定する、任意の化合物であってもよい。実証のために、マリマスタット(N-[2,2-ジメチル-1-(メチルカルバモイル)プロピル]-2-[ヒドロキシ-(ヒドロキシカルバモイル)メチル]-4-メチルペンタンアミド)を、試験化合物として使用する。しかし、任意の化合物が使用可能であり、一般的には、タンパク質、ペプチド、核酸、および低分子の有機化合物(脂肪族、芳香族、および混合脂肪族/芳香族化合物)等の有機化合物が使用可能である。候補化合物は、組合せ技術によりランダムに生成する技術、および/または特定の標的に基づいて合理的にデザインする技術を含む、任意の適した技術により生成することができる。例えば、A. M. Stock et al. Targets for anti-metastatic drug development, Curr. Pharm. Des. 19(28):5127-34(2013)を参照されたい。いくつかの実施形態では、候補化合物は、本発明の試験および/または方法の実施中に活性薬物に変換可能な、プロドラッグである。いくつかの実施形態では、プロドラッグは、肝臓オルガノイドにより活性薬物に変換される。

20

30

【0025】

本明細書において使用する「検出可能な化合物」は、蛍光タンパク質(例えば、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質等);酵素、蛍光、もしくは放射性基、または他の標識と結合した抗体が特異的に結合する抗原タンパク質またはペプチド;あるいは他の任意の適した検出可能な化合物であってもよい。検出可能な化合物は、がん細胞において天然発生するもの(例えば、非がん細胞よりも、がん細胞において高レベルで発現する細胞マーカータンパク質)、または遺伝子工学/組換えDNA技術によりがん細胞中に挿入される(すなわち、異種性の)のものであってもよい。

40

【0026】

本発明を実行するのに使用する細胞は、動物細胞(例えば、トリ、爬虫類、両生類等)であることが好ましく、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(例えば、イヌ、ネコ、マウス、ラット、サル、類人猿、ヒト)であることが好ましい。細胞は、分化または未分化の細胞であってもよいが、いくつかの実施形態では、組織細胞(例えば、肝実質細胞等の肝臓細胞、脾臓細胞、心筋細胞、骨格筋細胞等)である。

【0027】

細胞の選択は、作製する特定のオルガノイドに依存する。例えば、肝臓オルガノイドで

50

は、肝臓実質細胞を使用し得る。末梢または中枢神経オルガノイドでは、末梢神経細胞、中枢神経細胞、グリア細胞、またはその組合せを使用し得る。骨オルガノイドでは、骨芽細胞、破骨細胞、またはその組合せを使用し得る。肺オルガノイドでは、肺気道上皮細胞を使用し得る。リンパ節オルガノイドでは、濾胞樹状リンパ細胞、線維芽細胞網リンパ細胞、白血球、B細胞、T細胞、またはその組合せを使用し得る。平滑または骨格筋オルガノイドでは、平滑筋細胞、骨格筋細胞、またはその組合せを使用し得る。皮膚オルガノイドでは、皮膚ケラチノサイト、皮膚メラノサイト、またはその組合せを使用し得る。細胞は、組成物へ最初に組み込む際に分化していてもよく、またはその後分化する未分化細胞を使用してもよい。上記の組成物のうちのいずれかに追加の細胞を加えてもよく、また下記のように、一次または「第1」のオルガノイドに下記のがん細胞を加えてもよい。

10

【0028】

本発明において使用するがん細胞は、メラノーマ、癌腫、肉腫、芽細胞種、神経膠腫、および星状細胞種の細胞等を含むが限定されない、任意の型のがん細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、本発明において使用するがん細胞は、本明細書で教示する方法においてN-カドヘリンを発現し、かつ／または上皮間葉転換を示す。がん細胞は、腸（小腸、大腸、結腸）、肺、乳房、前立腺、皮膚、骨、脳、肝臓、膵臓、子宮、子宮頸部、精巣、および卵巣がん細胞等を含むが限定されない、任意の原発組織由来のがん細胞であってもよい。

【0029】

いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、がん治療を受けている対象もしくは患者、および／または、がんを有する対象もしくは患者、および／または免疫不全を有する対象等の対象から得ることが可能である。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、生検から得た腫瘍細胞等の腫瘍細胞であり、このような細胞から作製したオルガノイドを使用して、潜在的に有効な薬物および／または治療をスクリーニングすることができる。生検から得た腫瘍オルガノイドの例としては、中皮腫、結腸直腸、虫垂、肺、メラノーマ、および肉腫オルガノイドが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、細胞は、組織生検から得た良性細胞を含む。細胞は、脳、肝臓、腸、膵臓、リンパ節、平滑筋、骨格筋、中枢神経、末梢神経、皮膚、免疫系等の特定の細胞または組織型に少なくともある程度分化していてもよい。生検から得た細胞（例えば、腫瘍および／または良性）を使用して、本発明のオルガノイドを形成および／または作製することができ、生じたオルガノイドを本発明の方法および／またはデバイスにおいて、生検後約1、2、3、4、5、6、7、もしくは8日の間に作製および／または使用することができる。いくつかの実施形態では、限定されないが、蛍光化合物（例えば、色素、タンパク質他）等で、検出可能な化合物で細胞を標識してもよい。

20

30

【0030】

いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、不死化細胞株由来の細胞から作製せず、かつ／または不死化細胞株由来の細胞を含まない。本発明のオルガノイドは、腫瘍細胞ならびに／または限定されないが、初代細胞および／もしくは幹細胞（例えば、人工多能性幹細胞および／または分化型iPS由来細胞）等の高機能細胞を含み、かつ／あるいは使用して作製してもよい。

40

【0031】

本明細書に記載する本発明の態様および特徴は、本発明の属する分野の当業者に自明である既知の材料、方法および技術、またはその変形に従って実行することができる。例えば、Skardal A、Devarasetty M、et al. A reductonist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening. *Biotechnology and Bioengineering* 113 (9)、2020~32 (2016) ; Skardal A、Devarasetty M、et al. A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and

50

mechanical properties in bioprinted tissue constructs. Acta Biomaterialia 25、24～34 (2015) ; Bhise N、Manoharan V、et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. Biofabrication 8 (1) ; 014010 (2016) を参照されたい。

【0032】

上述のように、本発明は、(a) 生きた腫瘍細胞からなるコアと、(b) コアを囲む（例えば、被包する）シェルとを含み、シェルが、生きた良性細胞（例えば、組織細胞、良性または分化腫瘍細胞等）からなる、腫瘍モデルとして有用な *in vitro* 細胞構築物（または「オルガノイド」）を提供する。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、生きた腫瘍細胞は、悪性細胞を含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、生きた腫瘍細胞は、結腸直腸がん細胞（例えば、HCT116細胞、HT29細胞、SW480細胞、Caco2細胞等）を含む、またはからなる。

【0035】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞および良性細胞は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル等）を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、生きた良性細胞は、上皮細胞を含む。

20

【0037】

いくつかの実施形態では、生きた良性細胞は、Caco-2細胞を含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、検出可能な化合物（例えば、蛍光化合物）を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、コアおよび／またはシェルは、ヒドロゲルを含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、構築物は、1日もしくは2日、または1週から2週、またはそれ以上の期間、培地中で増殖させる。

30

【0041】

いくつかの実施形態によれば、対象由来の生きた腫瘍細胞を含む腫瘍モデルとして有用な *in vitro* 細胞構築物（または「オルガノイド」）を提供する。いくつかの実施形態では、生きた腫瘍細胞は、例えば、対象の腫瘍等の対象から採取および／または由来する。生きた腫瘍細胞は、腫瘍生検から採取および／または由来し得る。いくつかの実施形態では、生きた腫瘍細胞は、オルガノイドのコアを形成し、オルガノイドは、生きた良性細胞のシェルを含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、対象由来の生きた良性細胞を含むオルガノイドを提供する。良性細胞は、例えば、対象の組織等の対象から採取および／または由来し得る。いくつかの実施形態では、生きた良性細胞は、組織生検から採取および／もしくは由来し得、かつ／または組織特異的であり得る。生きた良性細胞を含むオルガノイドは、生きた腫瘍細胞を含むオルガノイドから分離（例えば、デバイスの異なるチャンバー中で別々に形成および／または存在）することができる。いくつかの実施形態では、単一の対象から採取および／または由来する細胞を用いて（例えば、対象由来の1つまたは複数の生検を使用して）、対象由来の腫瘍生検から得た生きた腫瘍細胞を含む少なくとも1つのオルガノイド、および対象由来の生きた肝臓細胞を含む少なくとも1つの別のオルガノイドを有する、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8つ、またはそれ以上）の異なるオルガノイドを形成する。いくつかの実施形態では、単一の対象から採取および／または由来

40

50

する細胞を用いて（例えば、対象由来の1つまたは複数の生検を使用して）、対象由来の腫瘍生検から得た生きた腫瘍細胞を含む少なくとも1つのオルガノイド、および肝臓腫瘍細胞と同一の組織型である、対象由来の生きた良性細胞を含む少なくとも1つの別のオルガノイドを有する、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8つ、またはそれ以上）のオルガノイドを形成する。

【0043】

本発明のオルガノイドは、療法および／または治療の開始前に任意選択的に、患者の治療を決定するのに使用可能な患者特異的モデル系を提供することができる。いくつかの実施形態では、限定されないが、遺伝子バイオマーカー評価および／または遺伝子プロファイリング等の追加のスクリーニング方法に加えて任意選択的に、抗腫瘍活性について目的の化合物をスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドおよび／または方法により、細胞バイオマーカー認識、バイオマーカー発現の定量、および／もしくは化学療法薬物有効性のリアルタイム試験が可能となり、かつ／または提供され得る。

【0044】

抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングする方法を（a）本明細書に記載の生きた腫瘍細胞を含む少なくとも1つの構築物を提供するステップと、（b）化合物を構築物に *in vitro* で接触させるステップと、次いで（c）目的の化合物の抗腫瘍活性を示す、（例えば、化合物に接触していない少なくとも1つの同様の構築物の腫瘍細胞と比較した、および／または構築物を囲むシェルの中に存在し、かつ／もしくは別のオルガノイド中に存在する生きた良性細胞と比較した）生きた腫瘍細胞の増殖、生きた腫瘍細胞の増殖の減少（例えば、腫瘍細胞の増殖の欠如、腫瘍細胞の死滅、腫瘍細胞によるシェルへの浸潤の減少等）を判定するステップとにより実行することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍に侵されている患者から腫瘍細胞を採取する。いくつかの実施形態では、目的の化合物は、プロドラッグである。いくつかの実施形態では、化合物が腫瘍細胞の増殖を *in vitro* で減少させると判定される場合、本発明の方法は、化合物を患者に治療有効量投与するステップをさらに含むことができる。

【0045】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、対象（例えば、患者）から腫瘍生検を得るステップ、およびこの細胞を使用して本発明のオルガノイドを調製するステップを含む。腫瘍生検は、変異を同定するために一部または全部を遺伝子配列決定することができ、同定した任意の変異が、対象の治療（例えば、抗腫瘍活性）のための目的の化合物の1つまたは複数を指示および／または示唆することができる。本発明の方法は、遺伝子配列決定において同定した目的の化合物の1つまたは複数をスクリーニングするステップ、ならびに目的の化合物の1つまたは複数のそれぞれ、および／またはその組合せを、腫瘍生検由来の細胞を使用して作製したオルガノイドと接触させるステップを含むことができる。本発明の方法は、目的の化合物の1つまたは複数が腫瘍細胞の増殖を *in vitro* で減少させると判定される場合、目的の化合物の1つまたは複数を、腫瘍生検を採取した対象に治療有効量投与するステップをさらに含むことができる。

【0046】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、対象由来の腫瘍生検から得た生きた腫瘍細胞から腫瘍細胞オルガノイドを調製するステップ、および同一の対象または異なる源から得た生きた肝臓細胞から肝臓オルガノイドを調製するステップを含む。いくつかの実施形態では、生きた腫瘍細胞および生きた肝臓細胞を同一の対象から得る。生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび肝臓オルガノイドは、相互に流体連通して（例えば、デバイス、例えば、本明細書に記載のデバイスで）作製することができ、生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび／または肝臓オルガノイドと目的の化合物を接触させることができる。さらに、生きた腫瘍細胞オルガノイドにおける生きた腫瘍細胞の増殖を判定することができる。いくつかの実施形態では、目的の化合物は、肝臓オルガノイドが代謝して活性薬物を生成することができ、活性薬物の活性が判定可能となる（例えば、生きた腫瘍細胞および／または肝臓

10

20

30

40

50

細胞の増殖がプロドラッグおよび／または活性薬物の影響を受ける場合、この活性を判定することができる）プロドラッグである。1つまたは複数の追加のオルガノイドを本発明の方法において使用してもよい。いくつかの実施形態では、化合物1つまたは複数の追加のオルガノイドは、同一の対象から得ることができ、対象の同一の組織または異なる組織由来であってもよい。

【0047】

いくつかの実施形態では、本発明の方法および／またはデバイスは、2つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7つまたはそれ以上）の目的の化合物の平行スクリーニングを提供および／または可能とすることができる。いくつかの実施形態では、目的の化合物の2つ以上のうちの少なくとも1つは、プロドラッグである。

【0048】

いくつかの実施形態では、本発明の方法および／またはデバイスは、その細胞を使用して本発明の方法および／またはデバイスにおいて使用した本発明のオルガノイドを作製した、対象由来の生検（例えば、腫瘍生検）を得た後、約1週または2週以内に（例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、または10日以内に）、結果（例えば、薬物スクリーニング結果および／または治療分析）を提供および／または可能とすることができる。

【0049】

また、（a）チャンバー、およびチャンバーと流体連通するチャンネルを有するマイクロ流体デバイスと、（b）チャンバー中の生きた腫瘍細胞構築物（例えば、オルガノイド）と、（c）チャンバーおよびチャンネル中の増殖培地と、（d）チャンバーおよびチャンネルと作動的に結合し、チャンバーからチャンネルを通り、チャンバーへ戻って培地を循環させるように構成したポンプと、（e）チャンネル中の微孔膜（例えば、TRANSWELL（登録商標）微孔膜）とを備え、それを通して培地が流動するように位置決めした、腫瘍細胞を *in vitro* で評価するのに有用なデバイスを本明細書において記載する。いくつかの実施形態では、デバイスは、腫瘍細胞の転移を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞の遊走および／もしくは浸潤を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞を含む構築物の増殖を *in vitro* で評価するのに、ならびに／または目的の化合物に対する応答を評価するのに有用である。いくつかの実施形態では、デバイスは、構築物のサイズを *in vitro* で、腫瘍細胞数を *in vitro* で、かつ／または腫瘍細胞死を *in vitro* で評価するのに有用であり得る。

【0050】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞を *in vitro* で評価するのに有用なデバイスは、各チャンバー中に少なくとも1つのオルガノイドを有し、相互に流体連通する2つ以上のチャンバーを備える。デバイスは、腫瘍細胞の転移を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞の遊走および／もしくは浸潤を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞を含む構築物の増殖を *in vitro* で評価するのに、ならびに／または目的の化合物に対する応答を評価するのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、構築物のサイズを *in vitro* で、腫瘍細胞数を *in vitro* で、かつ／または腫瘍細胞死を *in vitro* で評価するのに有用であり得る。デバイス内に存在する1つまたは複数のオルガノイドを、単一の対象から得た細胞から作製してもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは、第1のチャンバー中に生きた腫瘍細胞オルガノイドを、および第2のチャンバー中に肝臓オルガノイドを含む。生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび肝臓オルガノイドは、同一の対象から得た細胞から形成してもよく、これにより個別化した分析を提供することができる。

【0051】

いくつかの実施形態では、デバイスは、生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー；異なるオルガノイドを含む少なくとも1つの二次チャンバー；一次および二次チャンバーに接続し、それらの間に流体連通（例えば、増殖培地の流動等）を可能とする少なくとも1つの一次導管；ならびに任意選択的に、一次チャンバー、各二次チャンバー、および一次導管中に増殖培地を備えることができる。いくつかの実施形態では、2つ以上（

10

20

30

40

50

例えば、2、3、4、5、6、7、8つまたはそれ以上)の二次チャンバーを備え、それぞれが他と異なる細胞を含むオルガノイドを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの二次チャンバーは、肝臓オルガノイドを含み、任意選択的に、この同一の対象から得た細胞から生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび肝臓オルガノイドを作製する。追加のデバイスの例としては、その全内容を本明細書に組み込む、国際出願PCT/US2016/054611に記載のものが挙げられるが、これに限定されない。

【0052】

2つのチャンバーを備えるデバイスの例を図15に示す。5つのチャンバーを有するデバイスの別の例を、異なる段階で培地がデバイスのチャンバーを通してどのように流動し得るかと共に図16に示す。図17は、本発明の態様に従って検出可能な化合物で標識した細胞(例えば、腫瘍細胞)を追跡するのに使用可能なデバイス構造の模式図を示す。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞構築物は、ヒドロゲルを含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞構築物は、単一細胞型からなる。

【0055】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞構築物は、結腸直腸がん細胞(例えば、HCT116細胞、HT29細胞、SW480細胞、Caco2細胞等)を含む、またはからなる。

【0056】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの少なくとも一部は透明であり、このデバイスは、微孔膜と作動的に結合し、微孔膜上で腫瘍細胞を検出する(例えば、撮像する)ように構成した検出器(例えば、カメラ)をさらに備える。

20

【0057】

いくつかの実施形態では、本発明の方法において使用するデバイスは、組織容量の割合に対して生理的または超生理的な流体を供給するように構成することができる。例えば、デバイスのチャンバーの1つまたは複数は、約2 μ L~約10 μ Lの範囲の平均的容量を有することができる。いくつかの実施形態では、デバイスのチャンバーの1つまたは複数は、約2、3、4、5、6、7、8、9、または10 μ Lの平均的容量を有することができる。いくつかの実施形態では、デバイス(例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれ以上のチャンバーを備える装置)では、例えば、約95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40 μ Lもしくはそれ以下等、約100 μ L未満の量の液体を使用し、かつ/または約100 μ L未満の容量を有してもよい。本明細書において使用するデバイスの容量は、デバイスのチャンバーおよびチャネルを満たす容量を指す。いくつかの実施形態では、デバイスは、約50 μ L未満の量の液体を使用し、かつ/または約50 μ L未満の容量を有してもよい。

30

【0058】

本発明のオルガノイドは、少なくとも1、2、3、4週間、またはそれ以上、生存可能であり得る。いくつかの実施形態では、デバイス内の、かつ/または本発明の方法において使用するオルガノイドは、少なくとも1、2、3、4週間、またはそれ以上、生存可能であり得る。いくつかの実施形態では、本発明のオルガノイドは、生存可能であってもよく、1、2、3、4週、またはそれ以上、オルガノイド中に存在する細胞の平均数に基づいて、少なくとも約75%以上(例えば、約80%、85%、90%、95%またはそれ以上)生存する細胞を含むことができる。

40

【0059】

本明細書に記載する場合、細胞および/または細胞試料を本発明の方法において使用して、本発明のオルガノイドを形成することができる。本発明の方法では、生存可能なオルガノイドを作製することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、例えば、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上等の少なくとも50%以上の生着率を達成することができる。例えば、90%の生着率は、生存可能なオルガノイドまたは複数のオルガノイド(例えば

50

、オルガノイドのセット)を本発明の方法により獲得および／または作製する回数の90%を意味する。つまり、90%の生着率では、本発明の方法に従って作製した場合、10細胞試料のうちの9細胞試料(例えば、腫瘍細胞試料)により、生存可能なオルガノイドまたは複数のオルガノイドが得られることとなる。オルガノイドまたは複数のオルガノイドを本発明の別の方法および／または診断において使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞および／または細胞試料は、例えば、中皮腫生体試料および／またはGI腫瘍生体試料等の腫瘍由来であり得る。

【0060】

転移活性について腫瘍細胞を*in vitro*でスクリーニングする方法は、(a)本明細書に上述のように、デバイスを提供するステップと、(b)デバイス内に培地を循環させるステップと、(c)微孔膜上で捕捉した腫瘍細胞を定量的または定性的に検出するステップとにより実行することができ、この場合、捕捉した腫瘍細胞が多数であるほど(例えば、同様の条件下の他の腫瘍細胞、および／または同様の条件下の非転移性細胞と比較して)、腫瘍細胞の転移活性が高くなることを示す。

【0061】

転移活性について腫瘍細胞を*in vitro*でスクリーニングする方法は、(a)本明細書に上述のように、デバイス(例えば、生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー、および少なくとも1つの二次チャンバーを備えるデバイス)を提供するステップと、(b)デバイス内に培地を循環させるステップと、(c)二次チャンバーのうちの1つまたは複数の中に存在する(例えば、任意選択的に、二次チャンバー中に存在するオルガノイド上または／および中の)腫瘍細胞を定量的または定性的に検出するステップとにより実行することができ、この場合、二次チャンバーのうちの1つまたは複数の中に存在する腫瘍細胞が多数であるほど(例えば、同様の条件下の他の腫瘍細胞、および／または同様の条件下の非転移性細胞と比較して)、腫瘍細胞の転移活性が高くなることを示す。抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を*in vitro*でスクリーニングする方法は、(a)本明細書に上述のように、デバイスを提供するステップと、(b)デバイス内に培地を循環させるステップと、(c)化合物を腫瘍細胞に(例えば、化合物を培地に加えることにより)投与するステップと、次いで(d)微孔膜上で捕捉した腫瘍細胞を定量的または定性的に検出するステップとにより実行することができ、この場合、捕捉した腫瘍細胞が少数であるほど(例えば、同様の条件下であるが、目的の化合物を投与していない他の腫瘍細胞と比較して)、目的の化合物の抗転移活性が高くなることを示す。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、腫瘍に侵されている患者から採取する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、化合物が腫瘍細胞の転移を*in vitro*で減少させ、構築物のサイズを*in vitro*で減少させ、腫瘍細胞数を*in vitro*で減少させ、および／または腫瘍細胞死を*in vitro*で誘導すると判定される場合、化合物を患者に治療有効量投与するステップをさらに含む。

【0062】

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を*in vitro*でスクリーニングする方法は、(a)本明細書に上述のように、デバイスを提供するステップと、(b)デバイス内に培地を循環させるステップと、(c)化合物を腫瘍細胞に(例えば、化合物を培地に加えることにより)投与するステップと、次いで(d)一次チャンバーおよび／または二次チャンバー中に存在する腫瘍細胞を定量的または定性的に検出するステップとにより実行することができ、この場合、チャンバー中に存在する腫瘍細胞が少数であるほど(例えば、同様の条件下であるが、目的の化合物を投与していない他の腫瘍細胞と比較して)、目的の化合物の抗転移活性および／または抗腫瘍活性が高くなることを示す。いくつかの実施形態では、腫瘍に侵されている患者から腫瘍細胞を採取する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、化合物が腫瘍細胞の転移を*in vitro*で減少させ、構築物のサイズを*in vitro*で減少させ、腫瘍細胞数を*in vitro*で減少させ、および／または腫瘍細胞死を*in vitro*で誘導すると判定される場合、化合物を患者に治療有効量投与するステップをさらに含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングするステップを含むことができ、この方法は、(a) 本明細書に上述のように、デバイスを提供するステップと、(b) 肝臓オルガノイドを含む第1のチャンバーから生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む第2のチャンバーへ増殖培地を循環させるステップと、(c) 肝臓オルガノイドおよび／または生きた腫瘍細胞オルガノイドに目的の化合物を(例えば、増殖培地に化合物を加えることにより)投与するステップと、(d) 試験化合物を投与しない場合の生きた腫瘍細胞オルガノイド中に存在する腫瘍細胞数と比較して、第2のチャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少(例えば、数または密度の変化)を判定するステップとを含む。良性および／または腫瘍細胞を任意選択的に含む、1つまたは複数の追加のオルガノイド、例えば、限定されないが、脳、結腸、肺、内皮、心臓、上皮等のオルガノイドは、デバイスの追加のチャンバーの1つまたは複数中に存在してもよく、このチャンバーは、相互に流体連通する。

10

【0064】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングするステップを含むことができ、この方法は、(a) 本明細書に上述のように、デバイス(例えば、生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー、および異なるオルガノイド(例えば、良性細胞を含むオルガノイド)を含む少なくとも1つの二次チャンバーを備えるデバイス)を提供するステップと、(b) デバイス内に培地を循環させるステップと、(c) 化合物を腫瘍細胞に(例えば、化合物を培地に加えることにより)投与するステップと、(d) 試験化合物を投与しない場合の生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび／または二次チャンバー中に存在する腫瘍細胞数と比較して、一次チャンバー(例えば、生きた腫瘍細胞オルガノイドと関連する)および／または二次チャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少(例えば、数または密度の変化)を判定するステップとを含む。1つまたは複数の二次チャンバー中の異なるオルガノイドの例は、良性および／または腫瘍細胞を含むことができ、脳、結腸、肺、内皮、心臓、上皮、肝臓等のオルガノイドを含むが、これらに限定されない。

20

【0065】

本発明の方法は、限定されないが、蛍光化合物(例えば、色素、タンパク質他)等の検出可能な化合物を含む標識細胞(例えば、腫瘍細胞)を含むことができる。本発明の前述および他の態様を以下の実施例においてさらに説明する。

30

【実施例】

【0066】

【実施例1】

本プロジェクトの第1の目的は、正常な宿主組織に囲まれた結腸直腸がん腫瘍の3Dモデルを評価することであった。改変した同心円状の環状構築物は、結腸直腸腫瘍コアおよび結腸上皮の外輪から構成されており、還元主義的であるが、生理的に適切な環境下の腫瘍をモデル化する。この構築物を使用して、腫瘍コアの増殖、観察された任意の腫瘍細胞の上皮層への浸潤、および薬物の有効性を測定した。ヒアルロン酸およびゼラチンベースのヒドロゲル中に懸濁した細胞で構築物を作製した。4つの結腸直腸がん細胞型のうちの1つを使用して腫瘍コアを作製し、これにより4レベルの悪性度のモデルを作製した。HCT116細胞は、最も悪性であり、次いでHT29、SW480、およびCaco2細胞であった。Caco2細胞が健常な上皮細胞に最も類似しているため、Caco2細胞をまた、外輪に使用した。腫瘍コアを蛍光標識し、蛍光造影を使用して、7～14日の経過を通じて腫瘍コアを監視した。この期間の後、腫瘍コアは、高密度となることが示されたが、浸潤は、ほとんど見られなかった。Caco2外輪およびSW480コアで作製した環状構築物をまた、化学療法剤であるレゴラフェニブで処置した。MTSアッセイにより、処置後、生存可能な細胞の量の減少が確認され、LIVE/DEAD染色により、レゴラフェニブが、より腫瘍原性が低いCaco2細胞よりも構築物の内輪を選択的に標的としたことが示された。

40

50

【0067】

第2の目的は、3D結腸直腸がん腫瘍構築物から転移する細胞数を定量化するシステムを開発することであった。マイクロ流体灌流デバイスをデザインして、循環する転移細胞を、デバイス内のチャンネル中に封着したTranswell膜上で捕捉した。ポリジメチルシロキサン(PDMS)のソフトリソグラフィーを使用してデバイスを作成した。ヒドロゲル中に懸濁した単一腫瘍細胞型からなる腫瘍構築物を適切なチャンバー中に配置し、デバイスを密封、固定した。デバイス内を通して培地を循環させ、約2週間、2～3日毎に画像を取得した。2週間後、Transwell膜上で細胞を観察したところ、デバイスが、腫瘍構築物から循環に入った腫瘍細胞の定量化を支援することが可能であることを示した。さらなる試験を実行して、悪性度の異なるレベルの腫瘍細胞が、異なる遊走数を定量的に示すかどうかを確認する。

10

【0068】

要約すれば、このような2つのモデル、3D同心円環状腫瘍モデルおよびマイクロ流体循環腫瘍細胞定量デバイスは、腫瘍細胞の増殖、腫瘍細胞応答に対する薬物の効果、および循環する細胞の定量化を試験する新規の方法をもたらす。

【0069】

[実施例2]

3D腫瘍オルガノイドを新鮮腫瘍生検から直接マイクロエンジニアリングにより作製して、療法の開始前の治療最適化の実施を可能とする、患者特異的モデルシステムを作成した。ここで、患者から摘出した中皮腫瘍生体試料を使用して、このプラットフォームの初期導入を実証する。tumor-on-a-chipマイクロ流体デバイス内で、生存可能な3D腫瘍構築物を生物学的に作製および維持する能力について示す。次いで、on-chip化学療法スクリーニングにより、薬物のシスプラチンおよびペメトレキセドに対する患者の応答を模倣することを実証する。最後に、遺伝子バイオマーカー評価により同定した候補化合物の有効性をin vitroで実証する。

20

【0070】

方法

薄膜マイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体デバイス作製方法は、他で既に公表されている方法に基づく。カッティングプロッター(GraphTec-CE6000-40)を使用して、両面接着フィルムにチャンネルを形成し、パターン層の底表面を清浄な顕微鏡スライドガラスに接着した。チャンネルへの流体送達のための出入口として作用するようにボール盤で空けた穴を特徴とするポリスチレンスライド(Tedpella, Inc)を上表面に接着した。デバイス構築の後、PTFEチューブを各ポートに接続し、UV硬化ポリエステル樹脂を使用して固定した。

30

【0071】

患者の病歴

患者は、衰弱性悪液質、ECOG2機能ステータスおよび腹部膨満を呈している50歳男性である。組織診断について診断的腹腔鏡検査を実施し、これにより類上皮悪性腹膜中皮腫の診断が確定した。彼の腫瘍の高精度医療分析により、利用可能な標的薬物または臨床試験が存在しない、2つのゲノム変化(BAP1スプライス部位1729+1G>AおよびPBRM1 N258fs×6)が明らかとなった。iv造影剤を用いたコンピュータ断層撮影(CT)により、腹膜腔外に疾患の徴候なくして、多量の悪性腹水が示された。彼は、腹腔内温熱化学療法(HIPEC)を併用した腫瘍縮小術(CRS)について検査を受けた。腫瘍の体積が過度であるため、その時点で完全なCRSを達成する見込みはなかった。したがって、彼には、腫瘍体積の縮小を目指して、最新の全身化学療法が勧められた。シスプラチン-ゲムシタビンを6サイクル、その後シスプラチンに伴う聴器毒性の懸念のため、カルボプラチン-ゲムシタビンを単一サイクル用いることにより彼を治療した。彼は、シスプラチンベースの化学療法に対して良好な臨床応答を示し、反復病期診断CTとカルボプラチンベースの化学療法前に実施する臨床検査との両方において、その

40

50

悪性腹水が、ほとんど完全に消失した。続いて、彼を手術室へ誘導し、CRS／シスプラチンベースのHIPECを施術したところ、術後経過に特筆すべきことはなかった。外科的診査の間およびHIPEC前に、その大網疾患の区域を剪刀で切除し、氷中に置き、腫瘍オルガノイドを構築するために研究室へ直ちに移した。

【0072】

腫瘍生体試料の入手および細胞処理

細胞処理のために摘出から1時間以内に腫瘍を研究室へ運んだ。受け取るとすぐに、2%のペニシリンーストレプトマイシンを含むリン酸緩衝液(PBS)中で5分間3サイクル腫瘍を洗浄し、次いで、2%のペニシリンーストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で5分間2サイクル洗浄した。腫瘍をそれぞれ刻み、37℃のシェーカープレート上で、2%のペニシリンーストレプトマイシンおよび10%のコラゲナーゼ／ヒアルロニダーゼを含むDMEM中に入れて18時間置いた(10X Collagenase/hyaluronidase in DMEM, STEMCELL Technologies, Seattle, WA)。次いで、消化分解された腫瘍を100μmの細胞フィルターによりろ過し、遠心分離してペレットを生成する。血漿および非細胞物質を除去し、9mLの脱イオン水を含む1mLのBD PharmLyse中に5分間、ペレットを再懸濁した(BD PharmLyse, San Diego, CA)。コニカルビーカーを50mLまで脱イオン水で満たし、遠心分離した、細胞を溶解した溶解緩衝液を吸引し、細胞ペレットを使用可能なものとした。

【0073】

細胞外マトリックスヒドロゲルの調製および基本的オルガノイド形成

ECM模倣HA／ゼラチンベースヒドロゲル(HyStem-HP, ESI-BIO, Alameda, CA)を上述のように調製した^{15, 18, 27}。簡潔には、チオール化HA成分(Glycosil)およびチオール化ゼラチン成分(Gelin-S)を0.05%w/vの光開始剤2-ヒドロキシ-4'-(2-ヒドロキシエトキシ)-2-メチルプロピオフェノン(Sigma, St. Louis, MO)を含む滅菌水中に溶解して、1%w/vの溶液を調製した。ポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)架橋剤(Extralink, ESI-BIO)を光開始剤溶液中に溶解して、2%w/vの溶液を調製した。次いで、Glycosil、Gelin-S、およびExtralinkをそれぞれ2:2:1の容量比で混合した。腫瘍構築物形成では、調製した溶液を、ボルテックスを細胞の再懸濁に使用することにより完全に混合し(2,000万細胞/mL)、その後、1秒間の紫外線曝露(365nm、18Wcm⁻²)により架橋およびオルガノイド形成を開始する。

【0074】

Tumor-on-a-chipバイオフィabrication

発明者らの以前の研究に類似のフォトパターニング技術を使用して、マイクロ流体デバイス内で腫瘍構築物を生物学的に作製した¹⁵。ここで、チャンネル形成に使用した同一のカッティングプロッター技術により1~3mmの開口を特徴とするフォトマスクをアルミ箔で作製し、適合するパターニングした接着フィルムでマイクロ流体デバイスの底表面に接着した。次いで、ヒドロゲル前駆物質の溶液を、密度2,000万細胞/mLの患者の中皮腫生検由来の細胞と混合した。混合物を各デバイスチャンネルに入口から導入し、オルガノイド構築物を1秒間、接着したフォトマスクを通して紫外光に曝露することにより(365nm、18Wcm⁻²)明確化した。このように曝露することによってチオレンの段階的架橋反応を迅速に開始し、これにより3Dカラム中で細胞を被包した。最後に、曝露しない前駆物質／細胞混合物をリン酸緩衝食塩水でデバイスから洗い流して、各チャンネル中に3D患者由来中皮腫構築物を残した。細胞構築物を有するデバイスの各チャンネルを、DMEMを有する別々のリザーバーに接続した。MP2 Precision micro-peristaltic pump(Elemental Scientific Inc. Omaha, NE)に接続したシラスティックチューブにより、チャンネルを通してリザーバーから培地を流した。流動を開始し、10μL/分に維持した。

【0075】

組織学的評価

5 μm 厚のオルガノイド切片をパラフィンで包埋した構築物から作製し、次いで、染色するために脱パラフィンした。IHCを使用してバイオマーカーであるサイトケラチン5／6（CK5／6）、カルレチニン、およびトロポモジュリンを可視化した。Dako Protein Block存在下で15分間のインキュベーションによりブロッキングを実施した。一次抗体CK5／6（Abcam、ab17133、マウス中で産生）およびカルレチニン（Abcam、ab702、ウサギ中で産生）またはCK5／6およびトロポモジュリン（Abcam、ab109189、ウサギ中で産生）をDako Antibody Diluentで1：200に希釈して、スライド上の切片に適用し、室温で1時間インキュベートした。次に、適切な種反応性を有するAlexa Fluor 488またはAlexa Fluor 594二次抗体をDako Antibody Diluentで1：200に希釈して、すべての試料に適用し、室温で1時間放置した（抗マウスAlexa Fluor 488および抗ウサギAlexa Fluor 594、Life Technologies、Carlsbad、CA、A-11070）。次いで、カバースリップで覆う前にDapiで5分間、切片をインキュベートした。後続のバイオマーカーによる実験では、アネキシンVおよびKi67染色（Abcam、Cambridge、MA、それぞれab14196およびab16667）に同一プロトコルを使用した。Leica DM400B複合顕微鏡を使用して蛍光画像を取得し、分析のためにオーバーレイした。

10

20

【0076】

シスプラチン、カルボプラチン、およびペメトレキセド薬物試験

第1週の終わりに、2つの構築物について後述のようにLIVE／DEAD染色を実施して、薬物の添加前に細胞が生きていたことを確かめた。薬物の2つの組合せを考えて、このがんモデルについて試験した。DMEM中に混合した0.1 μm および10 μm の2つの異なる濃度のシスプラチン+ペメトレキセドおよびカルボプラチン+ペメトレキセドである。DMEMリザーバーを2mLの容量のこの薬物混合物に置き換えた。

【0077】

LIVE／DEAD染色（哺乳動物細胞用LIVE／DEAD Viability／Cytotoxicity Kit、Life Technologies、Grand Island、NY）を薬物曝露期間の終わりの7日目に実施した。はじめに、循環する培地を清浄なPBSでデバイスチャネルから洗い流し、次いで、2 μM のカルセインAMおよび2 μM のエチジウムホモダイマー1を含有する、PBSとDMEM（1：1）の混合物1mLを導入した。構築物を60分間インキュベートし、その後、チャネルを清浄なPBSで再び洗い流した。Olympus Fluoview（商標）FV1000共焦点顕微鏡を使用してin situ造影を実施した。赤色および緑色蛍光の両方に適したフィルターを使用して、各構築物について5 μm のzスタックを取得し、次いで、オーバーレイした。

30

【0078】

Imaris MeasurementPro（Bitplane、Concord、MA）を使用して共焦点画像を処理した。このソフトウェアにより、各カラーチャネルの画像を細胞のサイズ、形状、および蛍光強度について分析し、細胞の位置を標識した。整合性のために、各画像の450 μm ×900 μm の面積を考慮した。赤色チャネル（死（DEAD））で識別した細胞の総数と比較して、緑色チャネル（生（LIVE））で識別した細胞の総数の定量化により細胞生存率を算出した。

40

【0079】

バイオマーカーによる実験薬物試験

腫瘍生体試料を採取した患者は、ウェイクフォレストバプテストメディカルセンター（Wake Forest Baptist Medical Center）の総合がんセンター（Comprehensive Cancer Center）における高精度医療

50

プログラムに参加し、生検の一部は、腫瘍中の潜在的なアクションナブル変異の同定のために送られることとなった。匿名化したデータは、BAP1遺伝子に陽性の変異を示し、zesteホモログ2エンハンサー(EZH2)阻害剤を実験的な標的療法として試験するのに有利な条件を示した。

【0080】

腫瘍構築物をもう一度生物学的に作製し、その後、薬物スクリーニング前に3日間、これを維持した。次いで、患者のオルガノイドを、細胞培養培地中で0.1 μM、1 μM、および10 μMの濃度のヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2阻害剤である薬物3-デアザネプラノシンA(3-deazaneplanocin A)(DZNep)に96時間のインキュベーション期間、曝した。EZH2阻害に応答することがわかっている結腸直腸がん細胞株であるHCT116細胞を使用して生物学的に作製したオルガノイドを、陽性対照として並行して試験した。MTSアッセイおよび免疫組織化学的検査により薬物の効果を定量化した。MTSアッセイ(CellTiter 96 One Solution Reagent Promega, Madison, WI)により、ミトコンドリア代謝を定量化して相対的細胞数を判定した。波長490 nmの調節可能なプレートリーダーシステムであるMolecular Devices SpectrumMax M5(Molecular Devices)上で吸光度値を測定した。

【0081】

5 μm厚のオルガノイド切片についてバイオマーカーアネキシンVおよびKi67を使用して免疫組織化学染色を実施した。パラフィンに包埋し、薄片にし、次いで、IHC染色のために脱パラフィンした、以前に染色しなかったオルガノイドから切片を採取した。一次抗体アネキシンVをDako Antibody Diluentで1:200の濃度に希釈してスライドに適用し、室温で60分間放置した(アネキシンV、Abcam, Cambridge, MA, ab14196)。平行して、別の試料について、一次抗体Ki67をDako Antibody Diluentで1:200の濃度に希釈して適用した(Ki67、Abcam, ab16667)。Alexa488二次抗体をDako Antibody Diluentで1:200の濃度に希釈して、すべての試料に適用し、室温で1時間放置した(Alexa 488、Life Technologies, Carlsbad, CA, A-11070)。Leica DM400B複合顕微鏡を使用して蛍光画像を取得し、アネキシンVおよびKi67についてGFPの隣り合う切片の画像を取り、分析のためにオーバーレイした。アネキシンVの画像を赤色に着色し(白黒画像中の中灰色)、Ki67の画像を緑色に着色した(白黒画像中の明灰色)。

【0082】

結果

高精度医療による腫瘍オルガノイド戦略

発明者らの目的は、有効性について抗がん剤を試験し、次いで、治療最適化の情報を提供することが可能な、患者特異的腫瘍からなるプラットフォームを開発することであった。個別化した高精度医療の概念は、以下のように働く。腫瘍生検を患者から採取する場合、生体試料のうちのいくつかまたはすべては、ドラッグナブルな標的を示し得る変異を同定するために、一部または全部を遺伝子配列決定する。続いて、このようなバイオマーカーのうち1つを標的とする、FDAが認可した薬物が利用可能であるか、または臨床試験が進行中である場合、患者が受ける、その薬物または試験のための療法は、それに応じて調整することとなる(図1-実線矢印)。至適条件下では、この戦略は、標準的化学療法において、より有効な療法をもたらす。しかし、実際には、頻繁に多重変異が同定され、明確で最良な治療がないことにより可能性のある薬物の一連の選択肢が生じ、このような薬物ならびに可能性のある実験薬物を試験する追加手段が必要となる。発明者らの方法は、遺伝子プロファイリングのために送られた同一の生体試料材料を使用して形成した、患者由来の腫瘍オルガノイドを組み込むことである。この方法では(図1-破線矢印)、生体試料の一部を採用して、細胞を支持する細胞外マトリックスヒドロゲル生体材料を用いた多数のマイクروسケール3D腫瘍オルガノイドを生物学的に作製する。次いで、遺伝子ス

10

20

30

40

50

クリーニングで同定した薬剤を試験するようにデザインした薬物スクリーニングに、このようなオルガノイドを使用し、これによって、その患者にどの薬剤が最も有効かを判定する。

【0083】

患者特異的 *tumor-on-a-chip* バイオフィブレーション

図2のパネルA～Cは、薄膜マイクロ流体デバイスの生物学的作製、腫瘍オルガノイドの *in situ* 組込み、および一般的デバイス操作のプロセスを表す。6つの独立した腫瘍オルガノイドを収容することが可能なデバイスは、流体チャネルおよびオルガノイドチャンバーを遮断する接着フィルムからなり、これは、出入口を有するポリスチレンスライドとフォトマスクを接着したスライドガラスとの間に挟まれている（図2、パネルA）。患者の腫瘍由来の細胞を含有するヒドロゲル前駆物質溶液を使用して腫瘍オルガノイドをパターン形成し、この腫瘍オルガノイドを6チャネルそれぞれの中に導入し、フォトマスクの開口を通してオルガノイドとして光重合した（図2、パネルB）。オルガノイドを生物学的に作製した後、マイクロ蠕動ポンプおよび培地リザーバーにチューブを介してデバイスを接続し、その後、オルガノイド培地の流動を開始した（図2、パネルC）。

【0084】

はじめに、循環するDMEM存在下で7日間または14日間、各腫瘍構築物を放置した。生存可能な患者由来腫瘍モデルを維持するプラットフォームの能力を検証するために、発明者らは、7日目および14日目に、オルガノイドについてLIVE/DEAD分析を実施した（図2、パネルD）。結果は、7日目には90%より高く、14日目には85%より高い、高細胞生存率を示し、これによって、発明者らのデバイス構造およびその支持ヒドロゲルマトリックスにより、実験法の拡張のために、患者由来細胞を支持することが可能であることを実証した。

【0085】

Tumor-on-a-chip が患者の薬物応答と相関する生存可能な患者由来モデルおよび化学療法薬試験を支持する

7日目に、腫瘍構築物のサブセットを、2つの異なる用量である、カルボプラチン／ペメトレキセドおよびシスプラチン／ペメトレキセドの各化学療法薬混合物のうちの1つ、または薬物なしに曝露した。7日の治療の後、LIVE/DEAD分析をすべてのオルガノイドについて実施した（図3、パネルa(i)～f(i)およびa(ii)～f(ii)）。対照（薬物なし）条件下では、腫瘍構築物を観察して高生存率に維持したところ、デバイス内で合計14日後、87%までの統計学的に有意な低下を示した。しかし、薬物混合物に曝露したオルガノイドは、生細胞率の大幅な低下を示した。カルボプラチン／ペメトレキセドで処置した試料では、0.1 μ Mの循環濃度の場合は生存率が52.1%に、10 μ Mの場合は39.8%に低下したことを発明者らは確認した。高用量では、低用量よりも2桁高い濃度であったが、認められた生存率の変化は、低い有意性しか有さず（ $p < 0.1$ ）、潜在的に中等度の薬物効果を示した。対照的に、シスプラチン／ペメトレキセドで処置したオルガノイドでは、0.1 μ Mの濃度の場合は39.0%、10 μ Mの場合は11.8%までの生存率の低下がもたらされた。これらは、相互（ $p < 0.05$ ）と対照測定（それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.001$ ）の両方と比較して有意な低下を示した。したがって、シスプラチン／ペメトレキセドは、発明者等のデバイスにおいて、カルボプラチン／ペメトレキセドよりも有意に有効であった。このような結果を図3、パネルgに纏める。

【0086】

このようなデータは、2つの中心的な成果を有する。第一に、このデータは、広範な試験のために、生体工学により作製したオルガノイド系において長期的に、患者の腫瘍生検由来の細胞を持続することが可能であることを実証する。発明者らの知るところでは、本発明は、この能力を初めて報告したものである。第二に、このデータは、このようなオルガノイドを *in vitro* で薬物スクリーニングすることが実行可能であり、細胞生存率の薬物依存的低下をもたらすことを示す。治療の施行前に患者特異的方法で薬物有効性

を原理的に確立することができるため、これは、療法デザインに対して有望な利点となる。例えば、このような測定において、発明者らの結果は、シスプラチン／ペメトレキセドを、カルボプラチン／ペメトレキセドよりも優れた治療選択肢として提案する。個別化医療の性質として、患者において2つの薬剤の有効性を体系的に比較することができない。しかし、決定的には、患者をシスプラチン／ペメトレキセドで治療して、良好な応答を得た。これは、患者特異的薬物の有効性が、発明者らの *in vitro* システムにおいて正確に再現可能であることを示唆する。

【0087】

遺伝子バイオマーカー同定による実験薬物スクリーニング

高精度医療試験により、腫瘍生体試料において既知の2つの変異を同定した。BAP1 スプライス部位 1729+1G>A および PBRM1 N258fs×6 である。BAP1 (BRCA1 関連タンパク質1) は、脱ユビキチン化酵素²⁸であり、一方、PBRM1 は、いくつかのがんと関連する腫瘍抑制遺伝子²⁹である。試験時には、中皮腫または他の任意の腫瘍型において、いずれの変異もFDA認可療法と関連しなかった。

【0088】

しかし、さらなる調査において、発明者らは、動物モデルおよび *in vitro* 試験において、DNAのメチル化および転写抑制に関与する酵素であるEZH2を阻害することにより³⁰、BAP1の変異を標的として成功してきたことを確認した(図4、パネルA)。したがって、発明者らは、EZH2阻害剤であるDZNepを使用して、薬物スクリーニング実験を実施した。対照集団として、広範に研究されている結腸直腸がん細胞株HCT116を使用して、オルガノイドを作製した。重要なことには、HCT116細胞は、DZNep³¹で処置すると、細胞周期が停止するが、必ずしも顕著なレベルの細胞死を受けないことがわかっており、したがって、発明者らは、HCT116細胞が、この試験に適切な対照であると考えた。

【0089】

発明者らの結果は、薬物治療後、HCT116の増殖の有意な減少は無かったが、中皮腫の増殖の有意な減少があったことを示す(図4、パネルB)。HCT116および中皮腫の対照は類似していたが、DZNepで処置した中皮腫は、薬物濃度の上昇とともに、対照と比較して増殖が減少したことを示した。DZNep濃度が上昇するにつれて、細胞増殖は減少した。さらに、HCT116と中皮腫とで比較すると、すべての治療薬濃度について、中皮腫細胞増殖が有意に減少することが示される。両方の細胞型について、すべての条件にわたってアネキシンVおよびKi67免疫組織化学的検査を実行した。アネキシンVでは、DZNep濃度の上昇とともに中皮腫が増加するように見え、これは、アポトーシス細胞の増加を表す(図4、パネルC)。しかし、すべてのHCT116条件にわたって増殖の微小変化が見られ、これは、DZNepが増殖に大きく影響しなかったことを示す(図4、パネルD)。各オルガノイドについてヘマトキシリンおよびエオシン染色を行ったところ、中皮腫の代表的な画像では、DZNepで処置した場合、ゴースト細胞および核のないゴースト細胞を示す(図4、パネルE)。この応答は、中皮腫またはHCT116対照では見られず、HCT116のいかなる処置物においても存在しない(図4、パネルF)。中皮腫のみが応答したことにより、DZNepが患者試料の増殖を測定可能に減少させ、HCT116が応答を示さない適切な陽性対照として作用したことが、さらに示される。

【0090】

考察

腫瘍DNAを配列決定してアクションナブルな遺伝子変異を同定する高精度腫瘍学が、がん治療の療法決定における標準的な臨床診療となる態勢は整っている。しかし、現在、いかなる既報の遺伝子変異と可能性のある薬物との相関性も治療開始前には確認できず、その上、たった11%の高精度医療を試験した患者のみが、高精度医療が導く治療に従うこととなる。さらに、組織型、悪性度および腫瘍体積に基づく、がんの生物学的挙動には多変性がある。

10

20

30

40

50

【0091】

研究では、患者由来の異種移植片（PDX）を使用して患者の腫瘍の進行および薬物治療応答を試験してきた。このようなモデルは、マウス由来細胞が浸潤する原因となる生検または腫瘍試料を留置する、免疫不全マウスを必要とすることがない。細胞はまた、その新たな環境に適応し、初期試料から遺伝的浮動を示しており、これにより、やはり理想的とは言えないものとなっている。PDX技術の広範な採用における1つのさらなる制限要因は、免疫不全マウス中に導入した場合、最も悪性の腫瘍生体試料のみが「生着」に成功することである。一般的に25～33%のパーセント成功率範囲であると認められる、その乏しい生着率により、大多数のがん患者に対するPDX技術の適応性およびその予測的応用が制限されている。本明細書に記載の研究、および平行して進行中の試験の初期では、発明者らの方法に対する主要な批評は、PDXの生着率の割合を発明者らが改善することができたかというものであった。注目すべきことには、これは、発明者らのプラットフォームにおいては、驚くほど簡単なものであった。図2に示すように、発明者らは、培養の7日目および14日目に高い細胞生存率を確認している。さらに、発明者らが、他の中皮腫生体試料および他のGI腫瘍生体試料を用いて同様の試験を実施する場合、発明者らは、90%より高い生着率を観察した。10%の非生着率が、低悪性度虫垂粘液性腫瘍患者から得た無細胞試料を反映している可能性があることに言及することは重要である。上記は、現時点ですべての高悪性度の試料が、オルガノイドを増殖させたという知見から生じる。これは、意味のあることであり、3D、ECM微小環境支持オルガノイド技術を使用することによって、PDX技術により可能なものよりも、より多くの患者にとって採用可能なモデルを作製することが可能であり得ることを我々に示す。非常に見込みのある一方で、生着効率のさらなるこの証拠のため、有意なさらなる確認試験が必要とされる。

【0092】

この一連の実験では、生着率および生存率評価を越えて、発明者らは、1)患者と腫瘍オルガノイドとの相関性および2)実験薬物のバイオマーカーによる試験、の2つのさらなる概念実証のシナリオの実現可能性を実証する。第一に、発明者らは、中皮腫オルガノイドプラットフォームを使用して、この型のがんに臨床的に使用する、一般的な化学療法レジメンのうちの2つをスクリーニングした。特に、発明者らは、シスプラチンおよびペメトレキセド対カルボプラチンおよびペメトレキセドの組合せに対するオルガノイドの応答を試験した（図3）。マイクロ流体システムを介して循環する培地中へ注入することにより7日間、薬物に曝露すると、シスプラチン-ペメトレキセド治療が、より有効であったことを示す、明確な結果がもたらされた。生細胞に対する死細胞の比率は、相対的濃度のカルボプラチンおよびペメトレキセドと比較して、10 μ Mのシスプラチンおよびペメトレキセドの治療においてより高かった。発明者らが、そのプラットフォームにより薬物スクリーニング試験の実施に成功することができるという点では、この結果は、それ自体で、発明者らのプラットフォームを立証する。しかし、より重要なことには、このようなオルガノイドを導出した患者はまた、そのシスプラチンベース化学療法の終わりに実施したCT造影において、その多量の腹水が、ほとんど完全に消失したことにより実証されたように、シスプラチンベースの化学療法に対して劇的に応答した。実際には、この患者は、その腫瘍がシスプラチンベースの治療に応答しなければ、有効な対象ではなかった。これは、重要なことであり、患者と発明者らのオルガノイド技術との、このような相関の結果は、臨床適用を目的としたこの方法を実証するために、発展し続ける上で重要なデータセットである。

【0093】

第二に、発明者らは、患者の腫瘍生体試料の一部を使用した遺伝子試験結果を確認した。この報告は、この腫瘍に特異的な2つの変異が同定されたことを示した。BAP1スプライス部位1729+1G>AおよびPBRM1 N258fs $\times$ 6である。上記のように、BAP1は、脱ユビキチン化酵素²⁸であり、一方、PBRM1は、いくつかのがんに関連する腫瘍抑制遺伝子²⁹である。このような試験時には、中皮腫または他の任意の腫瘍型において、いずれの変異もFDA認可療法と関連せず、進行中のいずれの適切な臨

床試験とも関連しなかった。しかし、発明者らは、動物モデルおよび *in vitro* 試験において、EZH2を阻害することにより³⁰、BAP1の変異を標的としてきたことを確かに確認した。したがって、発明者らは、遺伝子分析において示される、このようなバイオマーカーが、アクションナブルな標的として確かに使用され得たかどうかを問う試験シナリオとして、EZH2阻害剤であるDZNePを使用して、薬物スクリーニング実験を実施した(図4)。実際に、この化合物による治療において、発明者らは、一般的には細胞数に比例する一測定基準である、ミトコンドリア代謝の低下を認めた。その上、発明者らは、アポトーシスを示す、アネキシンVの発現の増加傾向に対して、増殖細胞を示す、Ki67の発現の減少傾向を認めた。さらに、H&E染色により、細胞形態および損傷のない細胞核が、化合物により用量依存的に損傷を受けることが示される。広範に使用されているHCT116結腸直腸がん細胞株から同一の方法で作製したオルガノイドは、同様に応答しなかった。むしろ、DZNePは、濃度にかかわらず、その間でほとんど効果を有さないように見えた。

【0094】

循環系を有する平行化したマイクロ流体プラットフォームにおいて、このような3D腫瘍モデルを導入することによって、発明者らは、単一デバイス上で複数の薬物の種類および用量を評価する能力を有するだけでなく、発明者らは、遠隔部位への転移前に発生する、腫瘍の進行、遊走、および循環系への血管内浸潤の動態を可視化し、追跡する有利な条件をも得る。

【0095】

[実施例3]

*in vitro*で90%より高い生着率で(対して2D細胞培地では10%未満)、患者腫瘍由来オルガノイドの複数のセットが作製されており、これは、最も高悪性度の生体試料のみが増殖する、患者由来の異種移植片(PDX)モデルにおける既報の生着率25~33%と比較して有利である。この乏しい生着率により、多くのがん患者のための予測診断へPDX技術を応用することが制限されている。発明者らの腫瘍オルガノイド系を薬物スクリーニングに引き続き使用して、患者と同様に、その腫瘍オルガノイドが異なる薬物に対する選択的応答を維持することを実証している。現在までに、結腸直腸がん、高および低悪性度虫垂転移部位から網、卵巣および肝臓まで、腹膜中皮腫、ならびに四肢の肉腫を含む、一次細胞の多様な群と、その転移部位から患者特異的オルガノイドのセットが作製されている。1)腫瘍オルガノイド薬物応答とオルガノイドを導出する患者の薬物応答との相関性、2)患者の腫瘍におけるドラッグブルな変異の同定に基づいてデザインした療法の有効性を試験する能力、および3)培養することが難しい腫瘍集団から、生存可能なオルガノイドを構築することを実証する、いくつかの例を本明細書に記載する。

【0096】

発明者らは、希少で単離および培養することが難しいがん型から、生存可能な腫瘍オルガノイドモデルを作製する能力を実証した。例えば、発明者らは、低悪性度虫垂(LGA)腫瘍(図5、パネルA)、および従来から「良性」中皮腫と呼ばれる、高分化型乳頭状中皮腫(図5、パネルB)から生存可能な患者特異的腫瘍オルガノイドを作製した。この両方は、緩慢な増殖パターンおよび予測できない形質転換能力を有する。現在まで、一次細胞から低い増殖指数で細胞培養物を構築することは、本質的に不可能であった。重要なことには、治療によく応答する高悪性度オルガノイドおよび2D培養物と比較して、発明書らのLGAオルガノイドは、化学療法剤に応答しない(図5、パネルC)。このようなデータは、LGAが確かに化学療法抵抗性の腫瘍であり、したがって、化学療法を用いたLGA患者の治療は有益ではなく、その治療に無用の毒性を残すという初めての有用で確実な証拠となり得る。さらに、発明者らは最近に四肢の肉腫を処理し、発明者らのプラットフォームにおいて高生存率をも示す患者特異的肉腫オルガノイドのセットを作製した(図5、パネルD)。このような肉腫オルガノイドは、薬物スクリーニング試験において現在、採用されている。

【0097】

〔実施例 4〕

悪性腫瘍細胞に対する正常細胞型の制限は、細胞間相互作用の変化により、および物理的障壁により維持される (Lodish H、Berk A、Zipursky SL、et al. 2000)。抗がん剤は、循環系を介して腫瘍へ移動し、血管外組織を貫通して、臓器の内部に存在する、がん細胞を標的とすることに成功しなければならない (Tannock et al. 2002)。環状オルガノイドモデルでは、異なる細胞型に囲まれる浸潤性のがん型を含む単純な 3D 微小臓器、またはオルガノイドを作製し、次いで、特異的抗がん剤を使用して内部の浸潤性細胞株を標的とすることにより、抗がん剤送達の *in vivo* プロセスを再現することを試みる。さらに、本明細書に記載の実験を実施して、*in vivo* で見られる環境と同様の 3D 微小環境に外部および内部の細胞型の両方が存在する場合、抗がん剤が、外部の細胞型とは対照的に、内部の、より浸潤性の細胞株を標的とすることに成功するかどうかを判定した (前述の 3D 薬物スクリーニングにより有効性を判定した)。

10

【0098】

抗がん剤の有効性について細胞外微小環境の影響を調査するために、種々の濃度の抗がん剤 (レゴラフェニブ、ソラフェニブ、トラメチニブ、5-フルオロウラシル、およびダブラフェニブ) を 4 つの結腸直腸がん細胞株 (HCT116、HT29、SW480、および CACO2) に投与し、さらに、これをヒアルロン酸ベースのヒドロゲルに包埋、またはウェルプレートのウェル中に直接播種した。ヒアルロン酸ベースのヒドロゲルに包埋した結腸直腸がん細胞は、*in vitro* 3 次元微小環境中のがん細胞を模擬し、ウェル中に直接播種した細胞は、従来の 2 次元微小環境中で増殖したがん細胞とした。

20

【0099】

2D 腫瘍構築物薬物スクリーニング

単層培地中に存在する結腸直腸がん細胞株を用いた 2D 薬物スクリーニングを行って、*in vivo* の悪性腫瘍に典型的に見られる細胞 ECM 間相互作用を欠く、従来の薬物スクリーニングの実践において抗がん剤の有効性を判定した。

【0100】

ウェル中に直接播種したがん細胞に 4～5 時間を与えて、ウェル底部に再接着させた。その後、抗がん剤溶液を培地の代わりに投与し (図 6、パネル A)、2 日後に MTS アッセイを実行して細胞生存率を判定した。抗がん剤の MTS 吸光度の結果を、薬物なしの対照の MTS 値の結果と比較して示す (図 6、パネル B)。100 μ M の濃度のレゴラフェニブおよびソラフェニブ、ならびに 100 mM の濃度の 5-FU では、細胞生存率は、使用した結腸直腸がん細胞株の 4 つすべてについて、対照の生存率の 20% 未満に留まった。しかし、ダブラフェニブおよびトラメチニブによるスクリーニングでは、高濃度の他の 3 つの抗がん剤と異なる結果がもたらされた。100 μ M の濃度のダブラフェニブは、HCT116 細胞について約 36% から SW480 細胞について約 93% の範囲の相対細胞生存率の値を生じ、100 nM の濃度のトラメチニブは、CACO2 細胞について約 39%～SW480 細胞について約 58% の範囲の相対細胞生存率の値を生じた。1 mM の濃度の 5-FU で処置した場合、相対細胞生存率は、SW480 細胞については約 39% であり、HCT116、HT29、および CACO2 細胞については 10%～22% 未満に留まった。このような値は、最も低い濃度の他の抗がん剤の相対細胞生存率の値よりも、かなり低かった。

30

40

【0101】

3D 腫瘍構築物薬物スクリーニング

結腸直腸がん細胞株について 3D 薬物スクリーニングを行い、さらに、ヒアルロン酸ベースのヒドロゲル構築物に包埋して、ヒアルロン酸の存在下での細胞 ECM 間相互作用が、抗がん剤の有効性にどのように影響するかを観察した。

【0102】

ポリジメチルシロキサン、すなわち PDMS を使用してウェル底部をコートした。ヒアルロン酸ベースのヒドロゲルで細胞を包埋し、5 日を与えて、その 3 次元環境に順化させ

50

、5日目に異なる抗がん剤溶液を投与した（図7、パネルA）。7日目にMTSアッセイを行い、結果は、対照値の結果と比較して示した（図7、パネルB）。100 μ Mの濃度のレゴラフェニブおよびソラフェニブでは、細胞生存率は、使用した結腸直腸がん細胞株の4つすべてについて、対照の生存率の25%未満に留まった。この唯一の例外は、100 μ MのレゴラフェニブをCACO2細胞に投与した場合であり、パーセント相対細胞生存率は、約48%まで上昇した。100 mMの5-FUを用いてスクリーニングすると、SW480細胞に使用した場合の48%からHCT116細胞に投与した場合の81%の間の相対細胞生存率の値が生じた。しかし、10 mMの濃度の5-FUのみが、4つの細胞株すべてについて、SW480細胞の9%からHT29細胞の50%の間の範囲の細胞生存率の値を生じた。100 μ Mの濃度では、ダブラフェニブは、HCT116およびSW480細胞株を標的とする上で高い有効性を示し、38%および43%の相対細胞生存率の値を示した。これは、HT29およびCACO2細胞株と対照的であり、93%および75%のより高い細胞生存率の値を示した。100 μ Mの濃度のトラメチニブでは、4つの結腸直腸がん細胞株について、狭い範囲内に収まる相対細胞生存率の結果がもたらされ、SW480細胞で54%およびHT29細胞で74%の値であった。

【0103】

2Dおよび3D薬物スクリーニングの比較

2Dおよび3D薬物スクリーニングについて有意差統計を実行して、いずれかの環境にある場合、結腸直腸がん細胞が抗がん剤に異なって反応したかどうかを確かめた。このような薬物スクリーニングにおける薬物に対する細胞応答の有意差は、細胞とヒアルロン酸との間の細胞ECM間相互作用が原因であることを示唆する。レゴラフェニブ、ソラフェニブ、および5-フルオロウラシルに対するHCT116およびCACO2の応答は、このような細胞型間の形態学的相違および類似のためである。この試験の後の部分において、このような細胞および薬物を使用する。

【0104】

同一の細胞株に同一の濃度の抗がん剤溶液を与えても、2次元対3次元*in vitro*微小環境に置いた場合、細胞が薬物治療に異なって応答したことは明白である。HCT116およびCACO2にレゴラフェニブ、ソラフェニブ、および5-フルオロウラシルを使用した、2次元薬物スクリーニングの結果と3次元薬物スクリーニングの結果との間に細胞生存率における有意差が認められた（図8）。HCT116細胞では、両者の結果は、レゴラフェニブを用いた、2Dスクリーニングと3Dスクリーニングとの間で有意に異なり（両方<0.05）、ソラフェニブについて1つが有意に異なり（<0.10）、2つが5-FUについて有意に異なった（両方<0.01）。CACO2細胞では、両者の結果は、レゴラフェニブを用いた、2Dスクリーニングと3Dスクリーニングとの間で有意に異なり（両方<0.01）、ソラフェニブについて3つが有意に異なり（2つは<0.01および1つは<0.05）、5-FUについて3つが有意に異なった（2つは<0.01および1つは<0.10）。

【0105】

HCT116細胞では、ソラフェニブの10 μ M溶液および5-FUの10 mM溶液を除いて、3D薬物スクリーニングを行うと、相対細胞生存率の値は2D薬物スクリーニングよりも高かった。CACO2細胞では、レゴラフェニブおよびソラフェニブの10 μ M溶液ならびに5-FUの10 mM溶液を除いて、3D薬物スクリーニングを行うと、相対細胞生存率の値は2D薬物スクリーニングよりもやはり高かった。2Dおよび3D薬物スクリーニング（図8）の結果を比較すると、レゴラフェニブが、CACO2細胞よりもHCT116細胞の細胞生存率の変化に対して、より有意な影響を与えたこと、ソラフェニブが、HCT116細胞よりもCACO2細胞の細胞生存率の変化に対して、より有意な影響を与えたこと（HCT116は、両方のスクリーニングにおいて既に大きく影響されていたが）、および5-FUが、HCT116細胞とCACO2細胞の両方の細胞生存率を有意に変化させたことがわかる。3D薬物スクリーニングの間、100 μ Mの濃度のレゴラフェニブおよびソラフェニブでは、CACO2細胞と比べてHCT116細胞は、4

8 %に対して21 %、および25 %に対して15 %と低いパーセント相対細胞生存率の値を示した。100 mMの濃度の5-FUにより、10 mMの5-FUの薬物スクリーニングの間の生存率よりもはるかに高い生存率の値が生じたため、3D微小環境におけるHCT116細胞およびCACO2細胞の両方についての10 mMの濃度の5-FUの結果に注目した場合、これらの相対細胞生存率は、18 %および22 %と、ほぼ同様の値まで低下したことが明らかである。

【0106】

環状オルガノイド薬物スクリーニング

環状オルガノイド試験では、3Dヒアルロン酸ベースヒドロゲル微小環境での異なる細胞型間の細胞ECM間相互作用または細胞間相互作用が、特定のがん細胞を標的とする上で、抗がん剤の有効性および特異性に影響するかどうかを、3D薬物スクリーニングにおいて、これまでに観察したように試験した。

【0107】

ポリジメチルシロキサン、すなわちPDMSを再度使用してウェル底部をコートした。HCT116細胞をヒアルロン酸ヒドロゲルに包埋し、PDMS表面上に構築物を作製した。ヒアルロン酸ゲルに同様に包埋したCACO2細胞を使用して、HCT116内輪構築物を囲む外輪を作製した(図9、パネルA)。100 μ Mの濃度のレゴラフェニブを投与した場合、3D微小環境において、HCT116細胞が、CACO2細胞と比較して低い相対細胞生存率の値を示したため(21 %対48 %)、また5-FUが、3D微小環境において、相対細胞生存率の低下に対して同様の効果を示したため、このような薬物を当量濃度(1 μ M、10 μ M、および100 μ M)で環状構築物に投与して、比較のため2つの細胞株について、このような薬物の有効性を観察、定量化した。

【0108】

7日目にLIVE/DEAD染色を環状構築物に行い、Axiovert顕微鏡上で撮像した(図9、パネルB)。画像ソフトウェア、MATLABを使用して、環状構築物について%死滅:%生存(または%赤色(白黒画像中の中灰色)対%緑色(白黒画像中の明灰色))の比率を導いた。次いで、値をグラフ化して、各濃度のレゴラフェニブおよび5-FUの比率、ならびにそれに対する無処置の場合の比率である対照の比率を示した(図9、パネルC)。100 μ Mでは、レゴラフェニブおよび5-FUは共に、0.98の%死滅:%生存率を示した。これは、HCT116およびCACO2細胞のおよそ半数が生存しており、半数が抗がん剤により標的とされたことを意味する。1 μ Mおよび10 μ Mの濃度のレゴラフェニブおよび5-FUを投与した場合に相対細胞生存率を分析すると、%死滅:%生存率は、5-FU溶液について、レゴラフェニブ溶液についてよりも大幅に高くなる。1 μ Mでの%死滅:%生存率は、レゴラフェニブについての0.48とは対照的に、5-FUについては0.95であり、10 μ Mでの%死滅:%生存率は、レゴラフェニブについての0.08とは対照的に、5-FUについては0.78である。3濃度のレゴラフェニブおよび5-FUの%死滅:%生存率は、たった0.03である対照の%死滅:%生存率の値よりも実質的に高かった。

【0109】

パネルBのlive-dead画像に注目すると、赤色(白黒画像中の中灰色)の細胞の大部分が外輪(画像の左側)ではなく内輪(画像の右側)中に現れるため、内部のHCT116細胞は、CACO2細胞よりも大幅にレゴラフェニブに影響されたように見える。対照的に、赤色(白黒画像中の中灰色)エチジウムホモダイマー1色素で染色されていた死細胞が内部(HCT116)および外部(CACO2)の輪の両方に現れるため、5-FUは、両方の細胞型を同程度、標的としているように見える。さらに、抗がん剤の濃度を10倍に上昇させると、薬物による標的細胞死が観察可能に増加する。

【0110】

転移を定量化するマイクロ流体デバイス

PDMSベースマイクロ流体デバイス(図10)を開発して、がん細胞を3Dヒアルロン酸ベース構築物に包埋し、簡易循環系を流動する抗がん剤溶液を投与した場合、がん細胞

10

20

30

40

50

胞転移の比率がどのように変化するかを判定した。さらに、マイクロ流体デバイスによって、抗がん剤が、「一次」腫瘍構築物およびtranswell膜上で捕捉した「二次」がん細胞中で、がん細胞生存率にどのように影響するかの判定を目指した。

【0111】

7日実行して、培地循環に入った細胞をtranswell膜上で捕捉する上でのデバイスの実現可能性を観察することを意図して、2つのマイクロ流体デバイスを設定した。HCT116細胞を包埋した3D構築物を両方のデバイスの「構築チャンバー」中に留置した。一方のデバイスの流体リザーバーに無処置の培地を加え（対照）、他方のデバイスの流体リザーバーにソラフェニブの10μM溶液を加えた。1日目および7日目にZeiss Axiovert 200M 487-1顕微鏡を用いて、対照デバイスの構築物およびtranswell膜の画像を取得した。1日目から7日目の間に対照デバイスのtranswell膜上で捕捉した細胞の増加が、緑色膜色素であるDiOが示すように認められた。デバイスを解体した後、7日目にtranswell膜を共焦点顕微鏡上で撮像し、また、このデバイスにより、3D構築物外に遊走し循環に入った細胞の捕捉に成功したことを確認した。デバイスの流量は、0.20mL/分と記録された。

【0112】

ソラフェニブ10μMの薬物培地溶液を循環させるデバイスは、3日目に内部の真菌感染の徴候を示したため、この観察の後、解体、廃棄した。結果として、このデバイスから収集することができたはずのいかなるデータも失われた。デバイスの出口からの微量な漏出が、真菌混入の原因であると特定された。

【0113】

考察

このような試験は、3D細胞外微小環境が、抗がん剤の有効性を判定する上で重要な役割を果たすことを確立した。4つの結腸直腸がん細胞株は、ヒアルロン酸ベースヒドロゲルに包埋および被包し、5つの抗がん剤を投与した後、細胞生存率において有意差を示した。環状オルガノイドは、3Dヒドロゲル環境に包埋した場合、異なるがん細胞を標的とする薬物の定性的比較を可能とし、環状オルガノイドが、細胞の遊走を測定する方法をもたらし得ることを示した。開発したマイクロ流体デバイスは、転移性がん細胞を捕捉する能力を示し、3D構築物および補足した細胞の継続的顕微鏡観察を可能とし、個別化化学療法薬物スクリーニングのためのモデルおよびプラットフォームとしての使用を提案する。

【0114】

材料および方法

がん細胞株の由来

使用するHCT-116、HT-29、SW-480、およびCACO-2結腸直腸がん細胞株は、ウェイクフォレスト大学医学部（Wake Forest University School of Medicine）のCell and Viral Vector Core Laboratoryに由来した。15cmの細胞培養プレートで細胞を培養し、DMEM高グルコース溶液（HyClone、Utah、USA）、10%のウシ胎仔血清、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、および1%のL-グルタミンを含む標準DMEM-10（ダルベッコ改変イーグル培地）を細胞増殖培地として使用した。

【0115】

2D薬物スクリーニング

滅菌および細胞継代：培地を細胞培養プレートから吸引し、10mLのPBS（25℃）を各プレート中にピペットで滴下した。細胞培養プレートを操作して、プレート中の細胞全体をPBSで覆い、次いで、このPBSをプレート外に吸引した。0.05%のトリプシン5mL（37℃）を各細胞培養プレート中にピペットで滴下した。次いで、細胞培養プレートを37℃のインキュベーターに約8分間置いた。この後、5mLのDMEM-10培地を各プレートに加えた。次いで、10mLの細胞および培地の成分を4つの清浄な15mLの遠心管に入れた。

【0116】

血球計数器上での細胞の計数およびローディング：1000 μ Lの単一チャンネルピペットで15 mL遠心管中に細胞を再懸濁し、各細胞株のチューブから新たな15 mL遠心管中へ100 μ Lを移した。次いで、400 μ LのDMEM-10培地および500 μ LのGibcoトリパンブルー染色（0.4%）（Thermo-Fischer Scientific、Massachusetts、USA）色素をそれぞれの遠心管中にピペットで滴下した。その第2の遠心管を1：10に希釈して細胞計数を促進し、トリパンブルー染色を加えることにより、細胞計数対象から死細胞を除外した。10 μ Lの1：10に希釈した試料を2～20 μ Lの単一チャンネルピペットで滴下し、予め消毒した血球計数器の血球計算盤内に載せた。生細胞を計数し、計算を実行して各がん細胞株の存在する細胞の総数を確定した。

10

【0117】

細胞播種：10 mLのDMEM-10、細胞、およびトリプシンを含む最初の15 mL遠心管を遠心分離機に入れた。遠心分離設定は、1500 RPMおよび最大加速度で5分間であった。その後、培地とトリプシンの混合物をチューブから吸引して、細胞ペレットを未損傷のままで放置した。次いで、5 mLのDMEM-10を各チューブ中にピペットで滴下して、そのプロセス中に細胞を再懸濁した。算出した5 mLの細胞培地溶液の体積を確定して、それぞれ4つの結腸直腸がん細胞株の25,000細胞を、ポリスチレン製透明底96ウェルプレートの各ウェル中に直接播種したことを確認した。次いで、100 μ LのDMEM-10培地をウェル中に直接ピペットで滴下した。96ウェルプレートを37℃および5%のCO₂で5時間インキュベートして、培地を吸引し抗がん剤溶液を加えるまで、ウェル底部に細胞を再接着させた。

20

【0118】

スクリーニングのための抗がん剤の添加：このスクリーニングで使用する抗結腸直腸がん薬物は、5-FU、レゴラフェニブ、ソラフェニブ、トラメチニブ、およびダブラフェニブ（Sigma-Aldrich、Missouri、USA）を含んだ。高濃度の薬物原液の溶液を、DMSOを用いて調製した。低濃度の薬物原液の溶液は、抗がん剤原液をDMEM-10培地と混合することにより調製した。5-FUについては、1 mM、10 mM、および100 mMの薬物溶液を調製し、レゴラフェニブ、ソラフェニブ、およびダブラフェニブについては、1 μ M、10 μ M、および100 μ Mの薬物溶液を調製し、トラメチニブについては、1 nM、10 nM、および100 nMの薬物溶液を調製した。培地をウェルから注意深く吸引し、200 μ Lの種々の薬物-培地溶液を、細胞を含むウェル中に入れた。各抗がん剤濃度について、異なる細胞型のそれぞれを有する、3つの複製を作製して、平均値を算出し、得たデータについて統計を行った。次いで、ウェルプレートを37℃および5%のCO₂で24時間インキュベートした。

30

【0119】

細胞生存率アッセイ：抗がん剤溶液への曝露から48時間後、細胞生存率を判定した。CellTiter 96（登録商標）Aqueous One Solution Cell Proliferation (MTS) アッセイ（Promega、Wisconsin、USA）により細胞の生存率を調べた。抗がん剤-培地溶液をウェルから吸引し、200 μ LのMTS試薬をウェル中に注意深くピペットで滴下した。MTS試薬を含んだ細胞のインキュベーション時間は、約45分であった。別の96ウェルプレート上で細胞生存率アッセイを実施し、EnVision Multilabel Plate Reader（PerkinElmer、California、USA）により吸光度を定量化した。

40

【0120】

薬物スクリーニング用3Dがんオルガノイド

PDMSによるウェルコーティングおよび細胞単離：ポリジメチルシロキサン、すなわちPDMS（DOW Corning、North Carolina、USA）を1：10の硬化剤比率で使用して96ウェルプレートの底部をコートし、次いで、プレートを80℃のオーブンに少なくとも1時間入れた。4つの結腸直腸がん細胞型すべてについて、

50

それぞれ100,000細胞を含む(10,000,000/μL)3Dヒアルロン酸ベースヒドロゲル構築物10μLを96ウェルプレートのウェル中に入れるために、上述のもの(A)と同一の方法で細胞を継代した。細胞数に応じて、細胞一培地溶液として新たな15mL遠心管中で所望の数の細胞を単離し、遠心分離に供した。

【0121】

単一細胞型構築物のヒドロゲル成分：ヒアルロン酸ベースヒドロゲル(ESI BIO、California, USA)をHeprasil、Gelin-S、およびExtralink PEGDA 2-ARMアクリレート架橋剤の3つの成分の混合物を使用して作製した。2:2:1の容量比で、このような成分を混合した。その混合前に、0.1%のIrgacure光開始剤(Sigma-Aldrich, Missouri, USA)を3つの成分のそれぞれに加え、3つの成分を37℃のインキュベーター中に約30分間置いて可溶化した。

【0122】

オルガノイド構築物の形成：可溶化してすぐに、15mL遠心管から培地を吸引し(遠心分離後)、細胞をペレットとして単離した。細胞を含む遠心管中にヒドロゲル成分を直接加え、細胞をその混合物中に注意深く再懸濁した。10μLのゲル-細胞溶液をPDMSでコートしたウェルの中央に置いた。細胞を含むすべてのウェルについて、これを継続し、各細胞型について繰り返した。この時点の後、Blue Wave 200スポットライト(Dymax, Connecticut, USA)からのUV光にゲルを曝露して、ヒドロゲルを凝固させることができる。または、ゲルがそのまま形成するのを約30分待つことが可能である。次いで、DMEM-10培地をウェル中に置き、構築物を5日間インキュベートした。

【0123】

抗がん剤スクリーニングおよび細胞生存率：5日目に同じ5つの抗がん剤を加え、7日目に細胞生存率アッセイを行った。

【0124】

抗がん剤効果比較用環状オルガノイド

環状オルガノイド構築物のヒドロゲル成分：環状オルガノイドの作製に使用したヒアルロン酸ベースヒドロゲルは、Heprasil、Gelin-S、およびPEGDA 2-ARMアクリレート架橋剤(Extralink)、およびアルキン-PEG-アルキン 2-ARM架橋剤(ESI BIO、California, USA)の4つの成分の混合物であった。4:4:1:1の容量比で、このような成分を混合した。その混合前に、0.1%のIrgacure光開始剤を4つの成分のそれぞれに加え、3つの成分を37℃のインキュベーター中に約30分間置いて可溶化した。HCT116およびCACO2細胞を上述の継代方法で単離し、PDMSを使用して96ウェルプレート底部をコートした。

【0125】

環状オルガノイド構築物の形成：HCT116細胞ペレットを含む15mL遠心管にヒドロゲルの4つの成分を加え、細胞をこの混合物中に再懸濁した。ヒドロゲルを含む10μLのHCT116をウェルの中央に置き、96ウェルプレートをアルミ箔で覆って約35分間そのままにしておいた。この間、PEGDA 2-ARMアクリレートは、ゲルを架橋し、一方、UV感受性2-ARMアルキン-PEG-アルキンは、架橋されずに留まる。

【0126】

PEGDAが架橋するのを待つ間に、単離したCACO2細胞を含む15mL遠心管に4つのヒドロゲル成分を加え、細胞をゲル中に再懸濁する。96ウェルプレート上を覆うアルミ箔を除去し、構築物を検査して、これらが既に凝固したかどうかを見る。凝固した場合、CACO2を包埋したヒドロゲルを25μL採取し、HCT116構築物の周辺に注意深く置く。ピペットの先端を使用して、四方の構築物周辺のCACO2ゲルを物理的に移動する。Blue Wave 200スポットライトからのUV光を使用して、両方の

ゲルを共に架橋し、融合した環状構築物を形成する。DMEM-10培地を加えて、ウェルを満たす。

【0127】

抗がん剤スクリーニング：5日目に、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、および $100\mu\text{M}$ の5-FUの薬物溶液を環状構築物に加え、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、および $100\mu\text{M}$ のレゴラフェニブの薬物溶液を別の環状構築物に加えた。各薬物濃度について3つの複製を作製し、また薬物なしの対照も維持した。

【0128】

Live-Dead染色および顕微鏡検査：7日目に、環状構築物をLive-Dead染色に供し、Axiovert 200M 487-1顕微鏡 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) 上で構築物を撮像した。カルセインAMおよびエチジウムホモダイマー1染色 (Thermo-Fischer Scientific, Massachusetts, USA) を $1.0\mu\text{L}/\text{mL}$ の当量濃度で含む培地に環状構築物を曝露した。Live-Dead染色溶液への曝露前後に構築物をPBSで2回洗浄した。MATLAB (Math Works, Massachusetts, USA) ソフトウェアを使用してパーセント赤色対パーセント緑色率を算出し、レゴラフェニブおよび5-FUの存在下で、HCT116-CACO2環状構築物について薬物の有効性を判定した。％赤色対％緑色率は、％死滅：％生存細胞率を表す。

【0129】

マイクロ流体デバイス

構築：Graphtec Studioソフトウェアを利用して、新規のマイクロ流体デバイスの型を作成した。デバイスの型は、Graphtec ce6000-60プロッター (Graphtec, Tokyo, Japan) を使用して、アルミ箔を片面に接着した両面テープにエッチングし、次いで、この型を細胞培養プレートと物理的に接着した。20mLのPDMS (1:10の硬化剤比率) をプレート中に入れ、次いで、PDMSを80℃のオーブンに一晩入れて凝固させた。翌日すぐに、このPDMS型をプレートから切断した。

【0130】

$8.0\mu\text{m}$ のIsopore Transwell Membrane Filters (Merck Millipore, Massachusetts, USA) を切断して、細胞捕捉のためにtranswell膜を備えるデバイス区画のサイズに特別に適合させた。Plasma Cleaner PDC-32G (Harrick Plasma Inc., New York, USA) を使用して、PDMS層に結合するプラズマによって2つのPDMS層間にtranswell膜を仕掛けた。その使用前に実験室フード内で、70%のエタノール溶液を用いてデバイスのPDMS層を消毒した。

【0131】

実行：HCT116細胞を継代し、DiO膜色素 (Thermo-Fischer Scientific, Massachusetts, USA) を用いて、 $5\mu\text{L}/\text{mL}$ のDMEM-10培地で約20分間、細胞を処置した。100,000個のHCT116細胞を含む ($10,000,000/\mu\text{L}$) ヒアルロン酸ベースヒドロゲル構築物 $10\mu\text{L}$ をオルガノイドチャンバーに入れた。PDMS層を共にプレスし、プラスチッククランプをデバイスのいずれかの面に使用して、PDMS層を4本のネジで適所に固定した。無処置の培地3mLを流体リザーバーに加えた。Axiovert 200M 487-1顕微鏡を使用して、構築物およびtranswell膜について撮像を行い、7日目に、transwell膜について共焦点顕微鏡 (Leica Camera, Wetzlar, Germany) で撮像した。

【0132】

【実施例5】オルガノイドに組み込んだ5つの薬物のスクリーニング

実験の目的：肝臓オルガノイド代謝機能についての複合オルガノイド毒性の依存性を評価する。一例として、肝臓の代謝活性は、いくつかの薬物の結果および有効性に重度に影響する。

響し得る。例えば、一般的に第1に選択されるがん治療薬である5-FUは、腫瘍だけでなく、体内の多くの細胞に対して細胞傷害性である。したがって、5-FUは、通常、プロドラッグであるカペシタビンの形態で投与され、これは、肝臓を通過するまで基本的に不活性であり、その活性形態へと代謝される。

【0133】

実験のデザインおよび結果：肝臓、心臓、肺、精巣、および脳オルガノイドを含む、5つの組織プラットフォームの作製を開始し、薬物試験の開始前に7日間維持した。この時点で、肝臓モジュールをプラットフォームの半分から除去した。カペシタビン（20 μ M）をすべてのプラットフォームに投与し、その後、曝露から7日後（全試験のうちの14日目）にlive/dead染色または心拍挙動により生存率を評価した。

10

【0134】

結果は、肝臓が存在すると、カペシタビンが毒性薬物である5-FUに代謝されて、心臓および肺に毒性を生じることを実証した（図11）。肝臓なしでは、この代謝は発生せず、心臓および肺オルガノイド生存率は低下しない。驚くべきことに、脳オルガノイドは、両方の群において損傷を受けた（図11）。LIVE/DEADの結果は、カペシタビンを5-FUの薬物活性形態に代謝して、心臓および肺オルガノイドにおいて細胞死の増加を誘導するのに肝臓オルガノイドを必要とすることを示す。

【0135】

1、3、5、7、9、11、13、および15日目に、尿素、アルブミン、 α -GST、IL-8、およびIL-1 β を含む可溶性バイオマーカーを培地のアリコットから定量化した（図13）。培地のアリコットを質量分析に送って、カペシタビンの5-FUへの代謝を検証した。

20

【0136】

【実施例6】小型化したマイクロ流体プラットフォームにおけるオルガノイドに組み込んだ5つの薬物のスクリーニング

設置面積および流体量を小型化したマイクロ流体プラットフォームを作成し、このプラットフォーム上で同一の複合的な薬物試験が可能かどうかを評価した。流体量を最小化すると、システム循環における関連バイオマーカーの信号対雑音比を増加させることができる。

【0137】

30

実験のデザインおよび結果：接着フィルムをベースとしたマイクロ流体プラットフォームを下記のように作製した。実施例4に記載のフルスケールのプラットフォームと同様に、肝臓、心臓、肺、精巣、および脳オルガノイドを含む、5つの組織構築物作製を開始し、薬物試験の開始前に7日間維持した。この時点で、肝臓モジュールをプラットフォームの半分から除去した。カペシタビン（20 μ M）をすべてのプラットフォームに投与し、その後、曝露から7日後（全試験のうちの14日目）にlive/dead染色または心拍挙動により生存率を評価した。

【0138】

小型化したシステムでは、肝臓が存在すると、カペシタビンが毒性薬物である5-FUに代謝されて、心臓および肺に毒性を生じる（図12）。肝臓なしでは、この代謝は発生せず、心臓および肺オルガノイド生存率は低下しない。重要なことには、このプラットフォームにおいて、脳オルガノイド生存率は高い（図12）。LIVE/DEADの結果は、カペシタビンを5-FUの薬物活性形態に代謝して、心臓および肺オルガノイドにおいて細胞死の増加を誘導するのに肝臓オルガノイドを必要とすることを示す。さらに、脳オルガノイドは生存可能であり、このことは、特定の理論に拘束されることは望まないが、おそらくシステムの容量をスケールダウンすると、培地がより良く調製され、脳オルガノイド生存率を支持することを示唆する。これは、他のオルガノイドタイプと共に、このシステムにおいて、脳オルガノイドを維持することが可能であることを実証する。

40

【0139】

7日目および15日目に、尿素、アルブミン、 α -GST、IL-8、およびIL-1

50

β を含む可溶性バイオマーカーを培地のアリコートから定量化した（図13）培地のアリコートを質量分析に送って、カペシタビンの5-FUへの代謝を検証した。

【0140】

小型化したシステムのデザイン

このシステムは、標準サイズのシステム等、他のシステムと比較して、培地に曝露されるPDMSの表面積を削減または除去し、これにより薬物化合物、毒素、可溶性タンパク質、および分泌化合物が、デバイス壁上またはデバイス壁中へ吸着または吸収される機会を減少させる。デバイス製造戦略は、テープマイクロ流体工学、レーザー切断PMMA、およびいくつかのPDMS成型をベースとしており、これによりデバイスの培地と接触するPDMS表面積の量を著しく最小化する。図14は、この作製方法の概要を提示する。

【0141】

前述は、本発明の説明であり、その制限として解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲に含まれる、その等価物と共に、以下の特許請求の範囲により定義する。本明細書に引用する出版物、特許出願、特許、特許公開、GenBankにより認められた配列および／またはSNP受託番号、ならびに他の参考文献はすべて、参照を示す文章および／または段落に関する教示のため、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

本願の出願当初の特許請求の範囲の各請求項に記載されていた発明は、以下の通りであった。

請求項1：

（a）生きた腫瘍細胞からなるコアと、

（b）前記コアを囲む（例えば、被包する）シェルと

を含み、前記シェルが、生きた良性細胞（例えば、組織細胞、良性型または分化型腫瘍細胞等）からなる、腫瘍モデルとして有用な *in vitro* 細胞構築物（または「オルガノイド」）。

請求項2：

前記生きた腫瘍細胞が、悪性細胞を含む、請求項1に記載の構築物。

請求項3：

前記生きた腫瘍細胞が、結腸直腸がん細胞（例えば、HCT116細胞、HT29細胞、SW480細胞、Caco2細胞等）、中皮腫がん細胞（例えば、高分化型乳頭状中皮腫細胞）、虫垂がん細胞（例えば、低悪性度虫垂（LGA）細胞）、および／または肉腫がん細胞を含む、またはからなる、請求項1または2に記載の構築物。

請求項4：

前記腫瘍細胞および前記良性細胞が、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル等）を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の構築物。

請求項5：

前記生きた良性細胞が、上皮細胞を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の構築物。

請求項6：

前記生きた良性細胞が、Caco-2細胞を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の構築物。

請求項7：

前記腫瘍細胞が、検出可能な化合物（例えば、蛍光化合物）を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の構築物。

請求項8：

前記コアおよび／または前記シェルが、ヒドロゲルを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の構築物。

請求項9：

1日もしくは2日、または1週から2週、またはそれ以上の期間、培地中で増殖させた、前記請求項のいずれか1項に記載の構築物。

請求項10：

対象由来の生きた腫瘍細胞を含む、腫瘍モデルとして有用な *in vitro* 細胞構築物（または「オルガノイド」）。

請求項 1 1：

前記生きた腫瘍細胞のコアを囲む（例えば、被包する）シェルをさらに含み、前記シェルが、生きた良性細胞（例えば、組織細胞、良性または分化腫瘍細胞等）からなり、前記生きた良性細胞が、任意選択的に前記対象由来である、請求項 1 0 に記載の構築物。

請求項 1 2：

前記生きた腫瘍細胞が、悪性細胞を含む、請求項 1 0 または 1 1 に記載の構築物。

請求項 1 3：

前記生きた腫瘍細胞が、結腸直腸がん細胞（例えば、HCT 116 細胞、HT 29 細胞、SW 480 細胞、Caco 2 細胞等）、中皮腫がん細胞（例えば、高分化型乳頭状中皮腫細胞）、虫垂がん細胞（例えば、低悪性度虫垂（LGA）細胞）、および／または肉腫がん細胞を含む、またはからなる、請求項 1 0 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の構築物。

10

請求項 1 4：

前記腫瘍細胞および前記良性細胞が、存在する場合、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル等）を含む、請求項 1 0 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の構築物。

請求項 1 5：

前記生きた良性細胞が、上皮細胞を含む、請求項 1 4 に記載の構築物。

請求項 1 6：

前記生きた良性細胞が、Caco-2 細胞を含む、請求項 1 4 に記載の構築物。

20

請求項 1 7：

前記腫瘍細胞が、検出可能な化合物（例えば、蛍光化合物）を含む、請求項 1 0 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の構築物。

請求項 1 8：

前記コアおよび／または前記シェルが、ヒドロゲルを含む、請求項 1 0 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の構築物。

請求項 1 9：

1 日もしくは 2 日、または 1 週から 2 週、またはそれ以上の期間、培地中で増殖させた、請求項 1 0 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の構築物。

請求項 2 0：

前記腫瘍細胞および／または良性細胞が、少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % の生着率を有する方法を使用して調製される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の構築物。

30

請求項 2 1：

1、2、3、または 4 週培養した構築物中の細胞の平均数に基づいて少なくとも 75 %、80 %、85 %、または 90 % の生細胞を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の構築物。

請求項 2 2：

抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングする方法であって、（a）前記請求項のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの構築物を提供するステップと、（b）前記化合物を前記構築物に *in vitro* で接触させるステップと、次いで、（c）目的の前記化合物の抗腫瘍活性を示す、（例えば、前記化合物と接触していない少なくとも 1 つの同様の構築物の腫瘍細胞と比較した、および／または前記シェルの前記生きた良性細胞と比較した）前記生きた腫瘍細胞の増殖、前記生きた腫瘍細胞の減少（例えば、前記腫瘍細胞の増殖の欠如、前記腫瘍細胞の死滅、前記腫瘍細胞による前記シェルへの浸潤の減少等）を判定するステップとを含む、方法。

40

請求項 2 3：

前記腫瘍細胞が、腫瘍に侵されている患者から採取される、請求項 2 2 に記載の方法。

請求項 2 4：

50

前記腫瘍細胞が、患者の腫瘍から採取される、請求項 2 2 または 2 3 に記載の方法。

請求項 2 5 :

少なくとも 1 つの追加のオルガノイド（例えば、脳、結腸、肺、内皮、心臓、上皮、および／または肝臓オルガノイド）を提供するステップをさらに含み、少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、少なくとも 1 つの前記構築物と異なる細胞を含む、請求項 2 2 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 2 6 :

少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、良性細胞を含み、任意選択的に、良性細胞が、前記腫瘍細胞と同一の患者から採取される、請求項 2 5 に記載の方法。

請求項 2 7 :

前記良性細胞および／または前記腫瘍細胞が、前記患者由来の生検から得られ、前記化合物が、前記生検後約 1 週間以内に、少なくとも 1 つの前記構築物および／または少なくとも 1 つの追加のオルガノイドに接触する、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

請求項 2 8 :

少なくとも 1 つの前記追加のオルガノイドが、肝臓オルガノイドである、請求項 2 2 から 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 2 9 :

前記腫瘍細胞を検出可能な化合物で標識するステップをさらに含む、請求項 2 2 から 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 3 0 :

前記化合物が、前記腫瘍細胞の増殖を *in vitro* で減少させると判定される場合、前記化合物を前記患者に治療有効量投与するステップをさらに含む、請求項 2 2 から 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 3 1 :

前記腫瘍細胞についての遺伝子スクリーニング情報に基づいて、目的の前記化合物を同定するステップをさらに含む、請求項 2 2 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 3 2 :

前記腫瘍細胞に対して遺伝子スクリーニング分析を実施するステップをさらに含む、請求項 2 2 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 3 3 :

前記化合物が、プロドラッグである、請求項 2 2 から 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

請求項 3 4 :

(a) チャンバー、および前記チャンバーと流体連通するチャネルを有するマイクロ流体デバイスと、

(b) 前記チャンバー中の生きた腫瘍細胞構築物（例えば、オルガノイド）と、

(c) 前記チャンバーおよび前記チャネル中の増殖培地と、

(d) 前記チャンバーおよびチャネルと作動的に結合し、前記チャンバーから前記チャネルを通り前記チャンバーへ戻って前記培地を循環させるように構成したポンプと、

(e) 前記チャネル中の微孔膜（例えば、TRANSWELL（登録商標）微孔膜）とを備え、それを通して前記培地が流動するように位置決めした、腫瘍細胞を *in vitro* で評価するのに有用な（例えば、腫瘍細胞の転移を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞の遊走および／もしくは浸潤を *in vitro* で評価するのに、腫瘍細胞を含む構築物の増殖を *in vitro* で評価するのに、ならびに／または目的の化合物に対する応答を評価するのに有用な）デバイス。

請求項 3 5 :

前記腫瘍細胞構築物が、ヒドロゲルを含む、請求項 3 4 に記載のデバイス。

請求項 3 6 :

前記腫瘍細胞構築物が、単一細胞型からなる、請求項 3 4 または 3 5 に記載のデバイス。

請求項 3 7 :

前記腫瘍細胞構築物が、結腸直腸がん細胞（例えば、HCT116 細胞、HT29 細胞

10

20

30

40

50

、SW480細胞、Caco2細胞等）、中皮腫がん細胞（例えば、高分化型乳頭状中皮腫細胞）、虫垂がん細胞（例えば、低悪性度虫垂（LGA）細胞）、および／または肉腫がん細胞を含む、またはからなる、請求項34から36のいずれか1項に記載のデバイス。

請求項38：

前記マイクロ流体デバイスの少なくとも一部が透明であり、前記デバイスが、前記微孔膜と作動的に結合し、前記微孔膜上で腫瘍細胞を検出する（例えば、撮像する）ように構成した検出器（例えば、カメラ）をさらに含む、請求項34から37のいずれか1項に記載のデバイス。

請求項39：

前記生きた腫瘍細胞構築物が、請求項1から21のいずれか1項に記載の構築物である、請求項34から38のいずれか1項に記載のデバイス。

請求項40：

転移活性について腫瘍細胞をin vitroでスクリーニングする方法であって、
（a）前記請求項のいずれか1項に記載のデバイスを提供するステップと、
（b）前記デバイス内に前記培地を循環させるステップと、
（c）前記微孔膜上で捕捉した腫瘍細胞を検出するステップと
を含み、捕捉した腫瘍細胞が多数であるほど（例えば、同様の条件下の他の腫瘍細胞、および／または同様の条件下の非転移性細胞と比較して）、前記腫瘍細胞の転移活性が高くなることを示す、方法。

請求項41：

転移活性について腫瘍細胞をin vitroでスクリーニングする方法であって、
（a）生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー、および前記生きた腫瘍細胞オルガノイドと異なる細胞を含む少なくとも1つのオルガノイドを含む少なくとも1つの二次チャンバーを備える、デバイスを提供するステップと、
（b）前記デバイス内に前記培地を循環させるステップと、
（c）少なくとも1つの前記二次チャンバー中の腫瘍細胞を検出するステップと
を含み、少なくとも1つの前記二次チャンバー中に存在する腫瘍細胞が多数であるほど（例えば、同様の条件下の他の腫瘍細胞、および／または同様の条件下の非転移性細胞と比較して）、前記腫瘍細胞の転移活性が高くなることを示す、方法。

請求項42：

少なくとも1つの前記オルガノイドが、肝臓、結腸、脳、肺、内皮、心臓、または上皮オルガノイドである、請求項41に記載の方法。

請求項43：

少なくとも1つの前記オルガノイドが、肝臓オルガノイドおよび追加のオルガノイドを含み、前記肝臓オルガノイドおよび前記追加のオルガノイドが、流体連通する別々の二次チャンバー中に存在する、請求項41または42に記載の方法。

請求項44：

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物をin vitroでスクリーニングする方法であって、

（a）前記請求項のいずれか1項に記載のデバイスを提供するステップと、
（b）前記デバイス内に前記培地を循環させるステップと、
（c）前記化合物を前記腫瘍細胞に（例えば、前記化合物を前記培地に加えることにより）投与するステップと、次いで、
（d）前記微孔膜上で捕捉した腫瘍細胞を検出するステップと
を含み、捕捉した腫瘍細胞が少数であるほど（例えば、同様の条件下であるが、目的の前記化合物を投与していない他の腫瘍細胞と比較して）、目的の前記化合物の抗転移活性および／または抗腫瘍活性が高くなることを示す、方法。

請求項45：

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物をin vitroでスクリーニングする方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 肝臓オルガノイドを含む第1のチャンバー、および生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む第2のチャンバーを備えるデバイスを提供するステップと、

(b) 前記第1のチャンバーから前記第2のチャンバーへ増殖培地を循環させるステップと、

(c) 目的の化合物を前記肝臓オルガノイドおよび／または前記生きた腫瘍細胞オルガノイドに（例えば、前記化合物を前記増殖培地に加えることにより）投与するステップと、

(d) 前記試験化合物を投与しない場合の前記生きた腫瘍細胞オルガノイド中に存在する腫瘍細胞数と比較して、前記第2のチャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少（例えば、数または密度の変化）を判定するステップと

を含む、方法。

10

請求項46：

前記試験化合物を投与しない場合の前記第1のチャンバー中に存在する腫瘍細胞数と比較して、前記第1のチャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少（例えば、数または密度の変化）を判定するステップをさらに含む、請求項45に記載の方法。

請求項47：

前記デバイスが、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび肝臓オルガノイドと異なる細胞を有する少なくとも1つのオルガノイドを含む、少なくとも1つの追加のチャンバーをさらに備える、請求項45または46に記載の方法。

請求項48：

抗転移活性および／または抗腫瘍活性について目的の化合物を *in vitro* でスクリーニングする方法であって、

20

(a) 生きた腫瘍細胞オルガノイドを含む一次チャンバー、および前記生きた腫瘍細胞オルガノイドと異なる細胞を含む追加のオルガノイドを含む、少なくとも1つの二次チャンバーを備えるデバイスを提供するステップと、

(b) 前記デバイス内に培地を循環させるステップと、

(c) 前記化合物を前記腫瘍細胞に（例えば、前記化合物を前記培地に加えることにより）投与するステップと、

(d) 前記試験化合物を投与しない場合の前記生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび／または少なくとも1つの前記二次チャンバー中に存在する腫瘍細胞数と比較して、前記生きた腫瘍細胞オルガノイドおよび／または少なくとも1つの前記二次チャンバー中の腫瘍細胞の存在の減少（例えば、数または密度の変化）を判定するステップと

30

を含む、方法。

請求項49：

前記追加のオルガノイドが、脳、結腸、肺、内皮、心臓、上皮、および／または肝臓オルガノイドである、請求項48に記載の方法。

請求項50：

前記腫瘍細胞が、前記腫瘍に侵されている患者から採取される、請求項40から49のいずれか1項に記載の方法。

請求項51：

前記化合物が前記腫瘍細胞の転移を *in vitro* で減少させ、構築物のサイズを *in vitro* で減少させ、腫瘍細胞数を *in vitro* で減少させ、および／または腫瘍細胞死を *in vitro* で誘導すると判定される場合、前記化合物を前記患者に治療有効量投与するステップをさらに含む、請求項40から50のいずれか1項に記載の方法。

40

【図面】
【図 1】

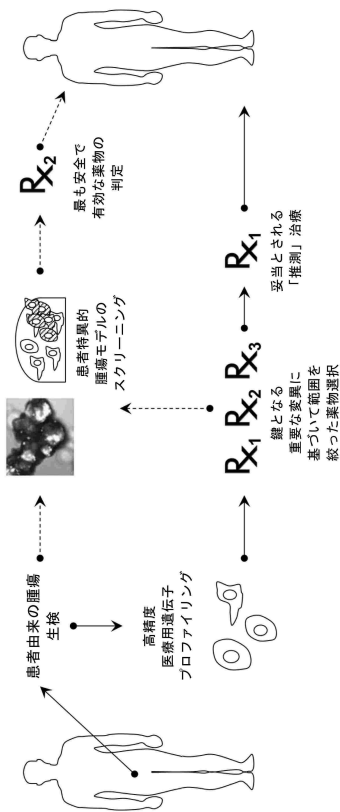
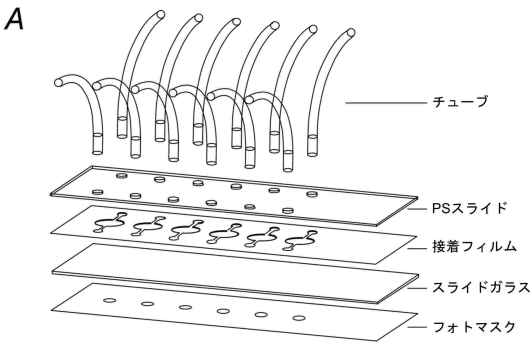


FIG. 1

【図 2 A】



10

20

【図 2 B】
B

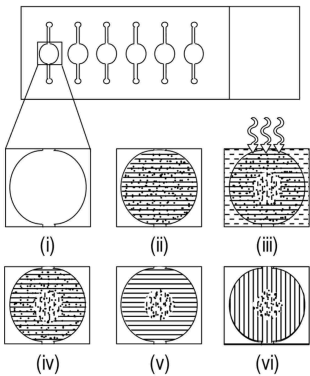
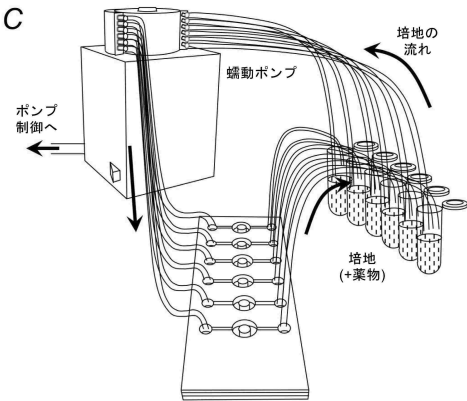


FIG. 2

【図 2 C】



30

40

50

【図 2 D】

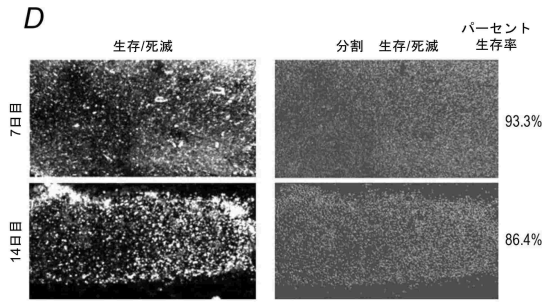


FIG. 2 (続き)

【図 3 A - 3 F】

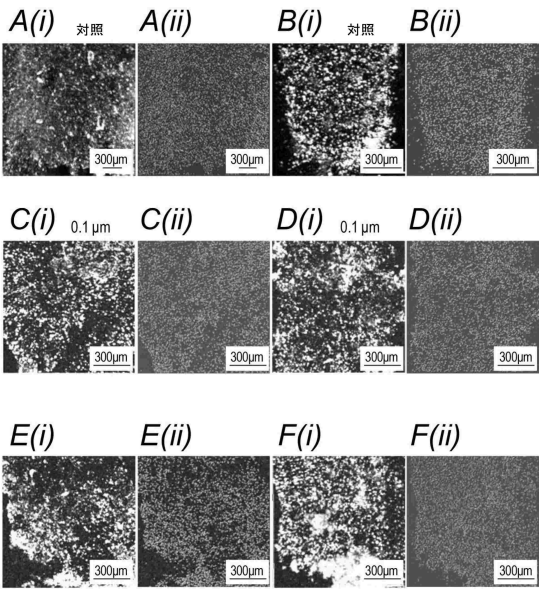


FIG. 3

【図 3 G】

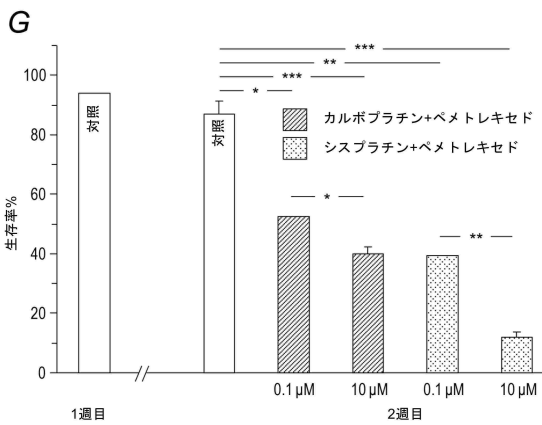


FIG. 3 (続き)

【図 4 A . 4 B】

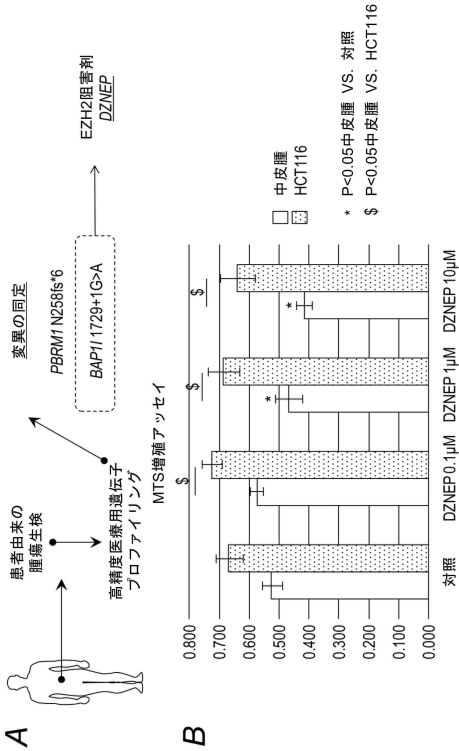
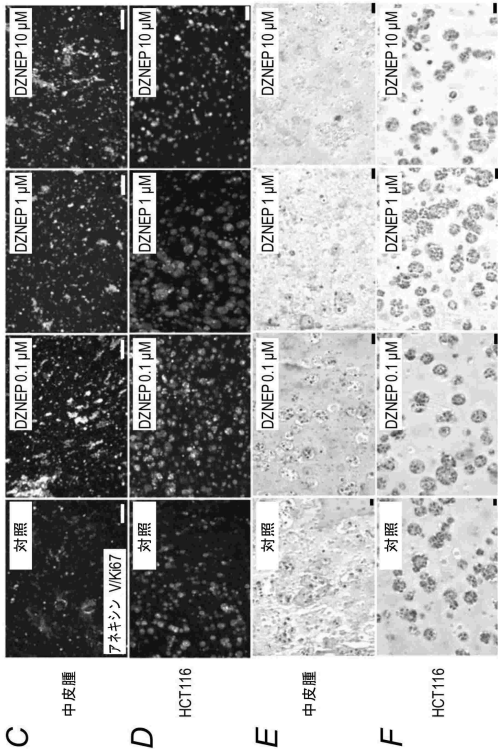
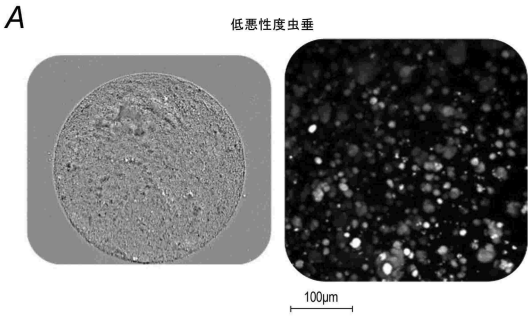


FIG. 4

【図 4 C - 4 F】



【図 5 A】



10

20

【図 5 B】

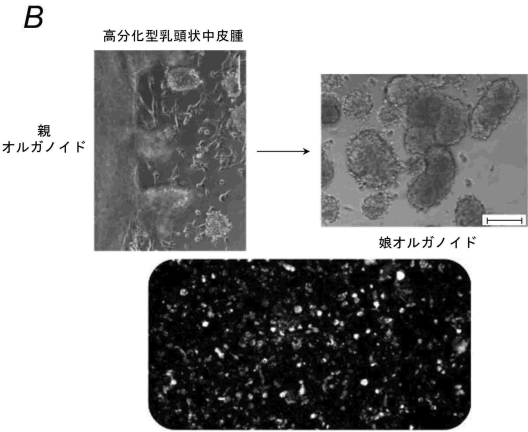
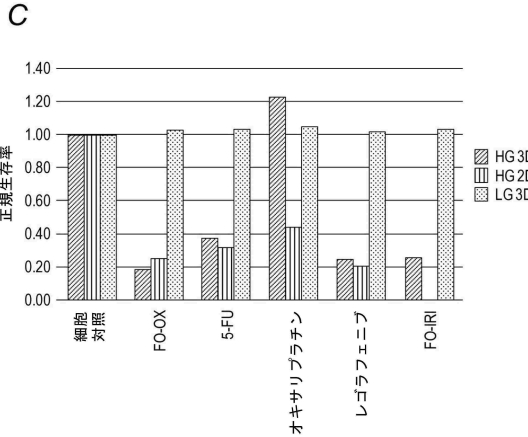


FIG. 5

【図 5 C】



30

40

50

【図 5 D】

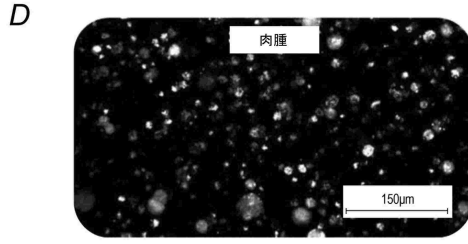


FIG. 5 (続き)

【図 6】

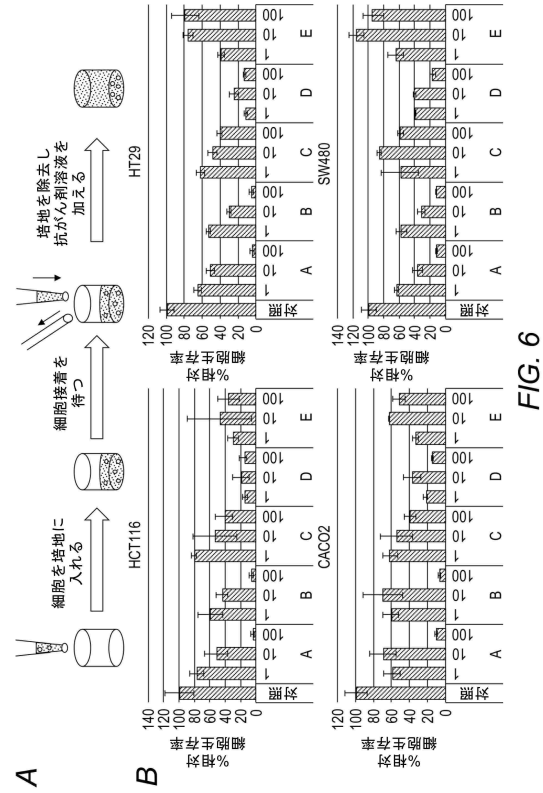


FIG. 6

【図 7】

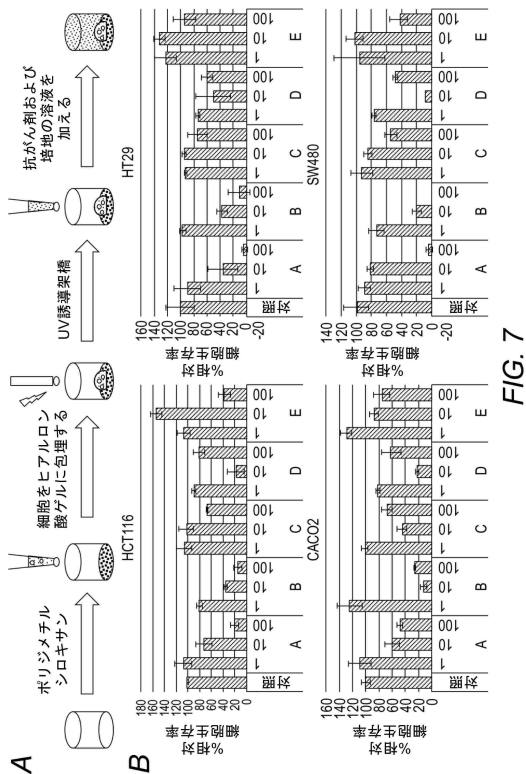


FIG. 7

【図 8】

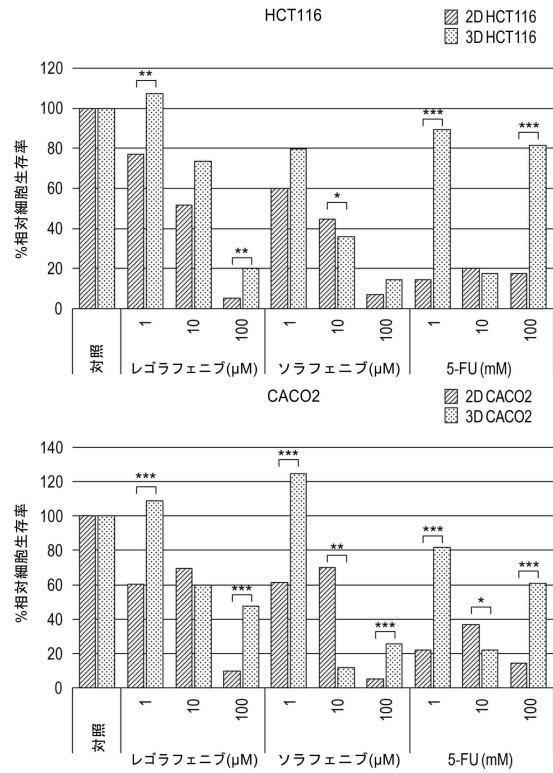


FIG. 8

10

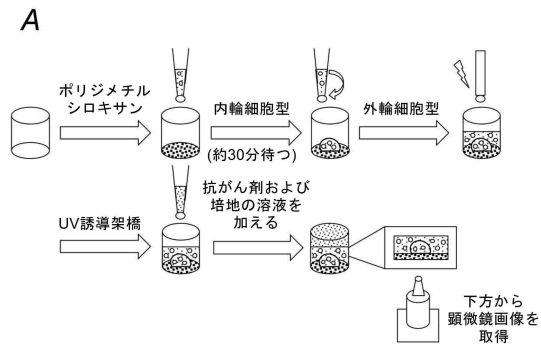
20

30

40

50

【図 9 A】



【図 9 B】

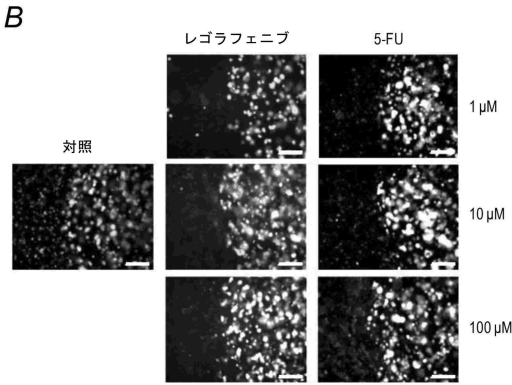


FIG. 9

【図 9 C】

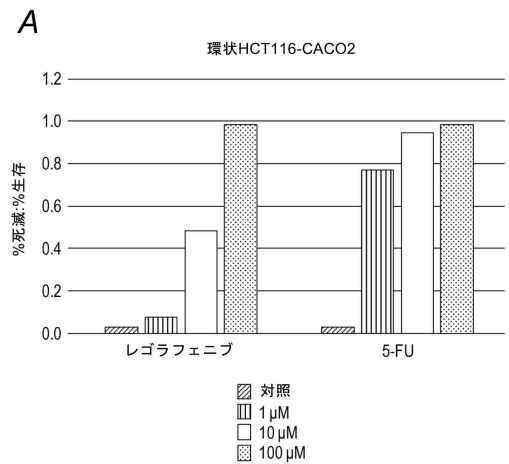


FIG. 9 (続き)

【図 10】

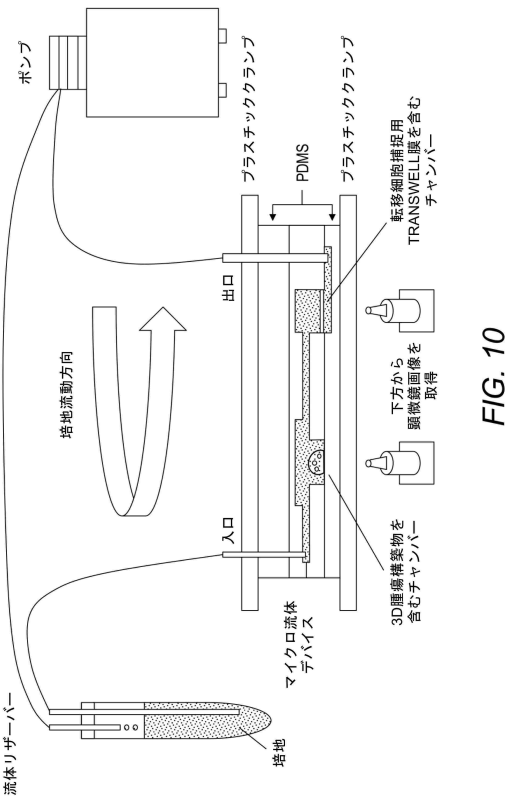


FIG. 10

【図 1 1】

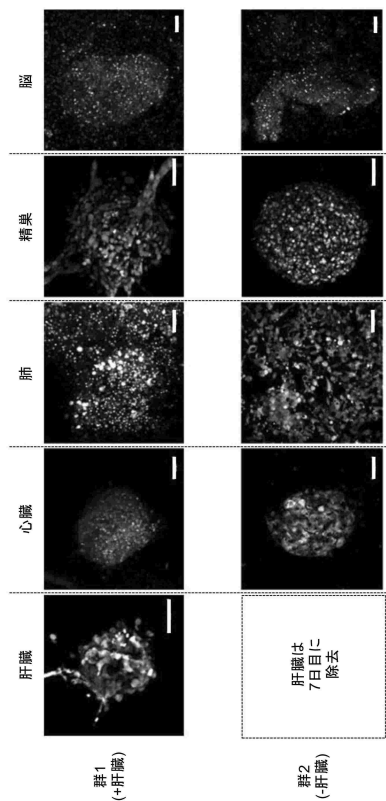


FIG. 11

【図 1 2】

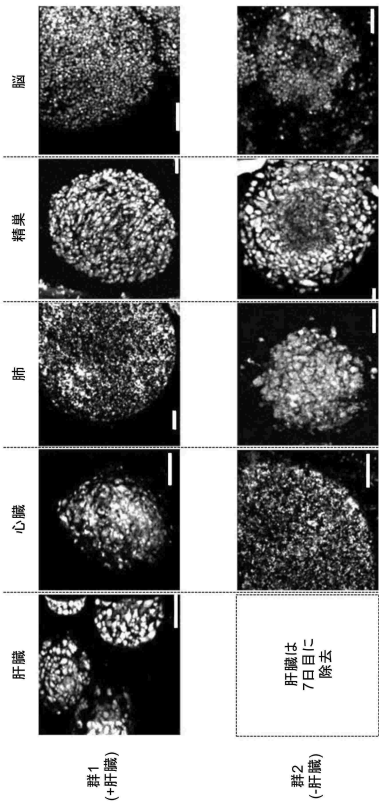


FIG. 12

【図 1 3】

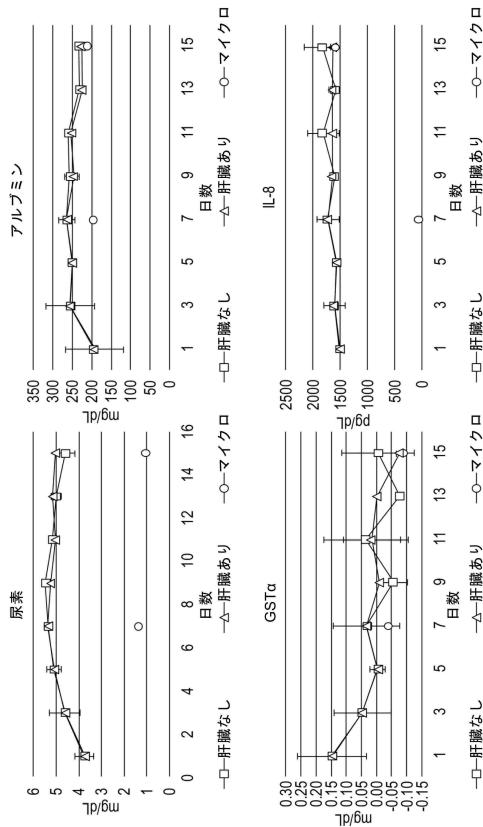


FIG. 13

【図 1 4】

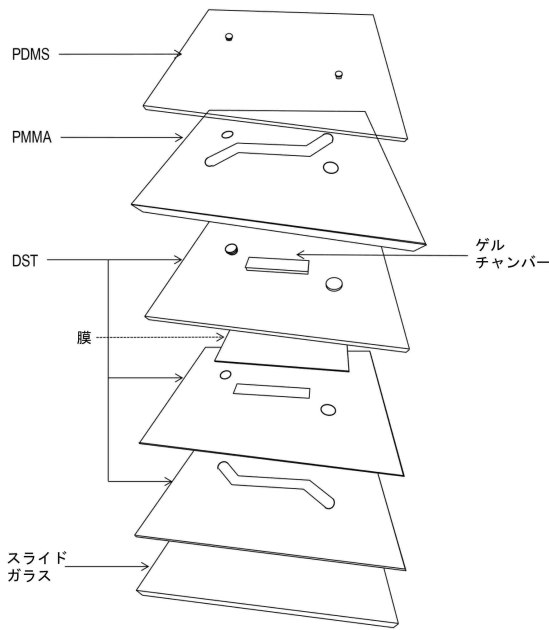
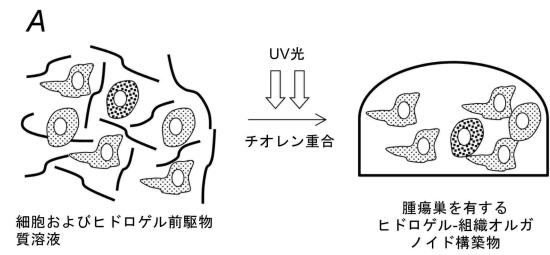


FIG. 14

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】

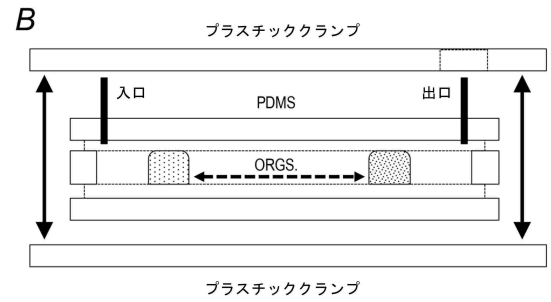
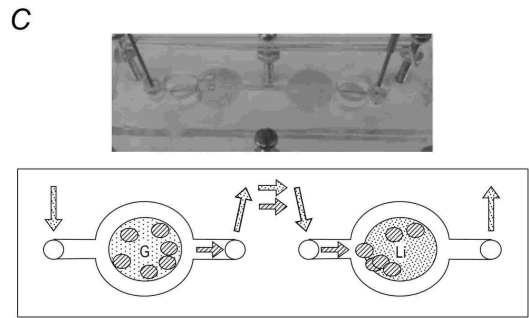


FIG. 15

【図 1 5 C】



【図 1 5 D】

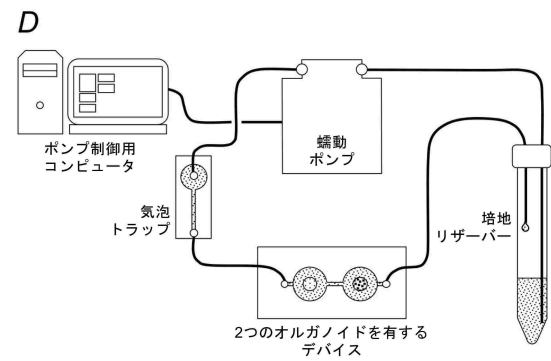


FIG. 15 (続き)

【図 16】

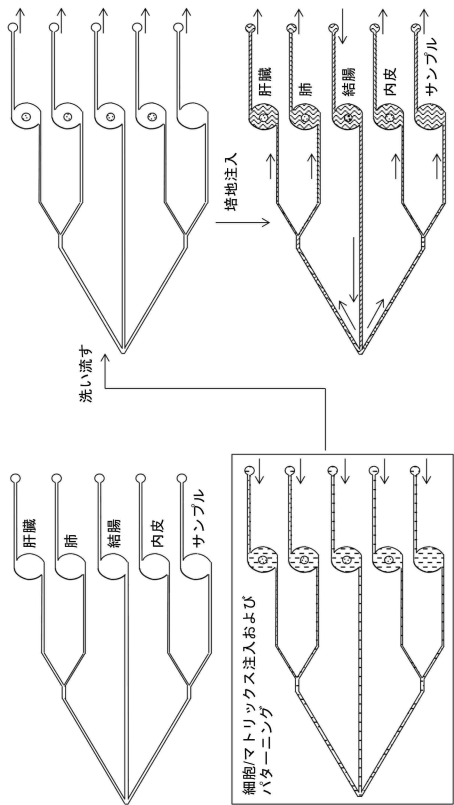


FIG. 16

【図 17】

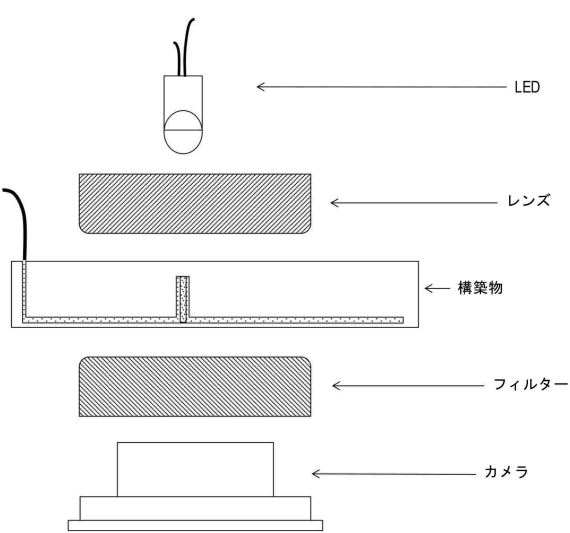


FIG. 17

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N

33/15

Z

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N

33/50

Z

C 1 2 Q 1/6886(2018.01)

C 1 2 Q

1/6886

Z

(31)優先権主張番号 62/522,313

(32)優先日 平成29年6月20日(2017.6.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ライヴ 6 7 1 9

(72)発明者 ヴォタノポーロス, コンスタンティノス

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27106, ウィンストン・セイラム, ダウニング・クリーク
・コート 1121

合議体

審判長 上條 肇

審判官 深草 亜子

審判官 北田 祐介

(56)参考文献 国際公開第15/152954号(WO, A1)

Tissue Eng.: Part A, 2014, 発行日, Vol. 20, Suppl. 1, pp. S-15

Ann. Biomed. Eng., 2015年03月17日, 発行日, Vol. 43, pp. 2361-2373

Biotechnol. Bioeng., 2016年03月08日, 発行日, Vol. 113, pp. 2020-2032

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C12N5/00

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)