

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7562416号
(P7562416)

(45)発行日 令和6年10月7日(2024.10.7)

(24)登録日 令和6年9月27日(2024.9.27)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/074(2010.01)

C 1 2 N 5/074

請求項の数 18 (全54頁)

(21)出願番号	特願2020-552401(P2020-552401)	(73)特許権者	501345323
(86)(22)出願日	平成31年3月28日(2019.3.28)		ザ ユニバーシティ オブ ノース カロラ
(65)公表番号	特表2021-519585(P2021-519585		イナ アット チャペル ヒル
	A)		THE UNIVERSITY OF N
(43)公表日	令和3年8月12日(2021.8.12)		ORTH CAROLINA AT CH
(86)国際出願番号	PCT/US2019/024543		APEL HILL
(87)国際公開番号	WO2019/191402		アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノースカロ
(87)国際公開日	令和1年10月3日(2019.10.3)		ライナ州 チャペル ヒル スイート 1 0
審査請求日	令和4年3月24日(2022.3.24)		0, イースト ローズマリー ストリート
(31)優先権主張番号	62/650,208		1 3 6, オフィス オブ テクノロジー
(32)優先日	平成30年3月29日(2018.3.29)	(73)特許権者	519357947
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		サビエンツァ ウニヴェルシタ ディ ロ
前置審査			ーマ
			イタリア共和国 0 0 1 8 5 ローマ, ピ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 十二指腸ブルンナー腺由来の幹／前駆細胞ならびにそれらの単離および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ブルンナー腺、その一部分、またはそこから採取された試料から、幹／前駆細胞（ブルンナー腺幹／前駆細胞またはB G S Cと称される）または幹／前駆細胞の集団を単離する方法であって、

（a）十二指腸から腸粘液を可能な限り除去する工程；

（b）前記十二指腸の粘膜層を、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液と、前記粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で接触させること；

（c）機械的、外科的および／または化学的方法により前記粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得るか含み得ない残部を残し、および／または曝露させること、ここで前記残部はブルンナー腺を含み；

（d）ブルンナー腺を含む前記残部を消化するか、または分離すること；および

（e）一つまたは複数のB G S C、またはB G S Cの集団をブルンナー腺を含む前記残部から単離すること、ここで単離する工程は、

（i）Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpcAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、および／または、

（ii）SOX17とPDX1の両方、

を発現するB G S Cを単離することを含む；

を含む方法。

【請求項 2】

前記単離する工程が、

(a) T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、N A N O G、E p C A M、S O X 9、C K 7、L g r 5、N I S、C D 4 4、および C K 1 9 からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現する B G S C、および、

(b) S O X 1 7 と P D X 1 の両方を発現する B G S C、を単離することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記十二指腸を上部から下部に押すことにより下位の切開部から腸粘液を除去する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する前記培地または溶液が、低張、低浸透圧、高張、または高浸透圧溶液を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記粘膜層または前記その細胞の少なくとも一部分の除去が、乳化剤および／または界面活性剤の使用を含む化学的破壊によって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記界面活性剤および／または乳化剤が、水、生理食塩水および／または緩衝液中にある、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記界面活性剤および／または乳化剤が、15分未満適用される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記乳化剤が、レシチン、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート 20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ポリソルベート 80）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（ポリソルベート 40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（ポリソルベート 60）、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート（ポリソルベート 65）、アンモニウムホスファチド、脂肪酸のナトリウム、カリウムおよびカルシウム塩、脂肪酸のマグネシウム塩、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリド、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの酢酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの乳酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのクエン酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのモノアセチル酒石酸エステルおよびジアセチル酒石酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの混合酢酸と酒石酸エステル、脂肪酸のスクロースエステル、スクログリセリド、脂肪酸のポリグリセロールエステル、ポリグリセロールポリリシノレエート、脂肪酸のプロパン-1,2-ジオールエステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドと相互作用した熱酸化大豆油、ステアロイル-2-ラクチル酸ナトリウム、ステアロイル-2-ラクチル酸カルシウム、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノパルミテートおよびその組み合わせからなる群から選択され、

前記界面活性剤が、1-ヘプタンスルホン酸、N-ラウリルサルコシン、ラウリル硫酸塩、1-オクタンスルホン酸およびタウロコール酸、塩化ベンザルコニウム、セチルピリジニウム、塩化メチルベンズトニウム、臭化デカメトニウム、アルキルベタイン、アルキルアミドアルキルベタイン、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アムモニオ-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルコリン、N-デシルA-D-グルコピラノシド、N-デシルA-D-マルトピラノシド、N-ドデシルB-D-マルトシド、N-オクチルB-D-グルコピラノシド、N-テトラデシルB-D-マルトシド、2-[4-(2,4,4-トリメチルペンタン-2-イル)フェノキシ]エタノール、オクチル-フェノキシ（ポリオキシエチレン）エタノール、ポロキサマー 188、ラウリル硫酸ナトリウム、デオ

10

20

30

40

50

キシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウムおよびその組み合わせを含む群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

消化または分離が酵素的に行われる、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記残部が、前記消化または分離工程の前に刻まれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記消化もしくは分離工程および／または前記単離工程が、低付着プレートにおいて行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記単離工程が、無血清培地を含む培養条件を用いた培養セレクションを使用して行われ、前記無血清培地がクボタの培地ある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記単離された細胞が、スフェロイド、一つまたは複数のオルガノイド、細胞集団、または細胞凝集物を支持または生じる条件下で培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を殺傷するか、不活化するか、または除去する工程を追加的に含み、該工程は任意の時点で、または 2 回以上実施することができる、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を殺傷するか、不活化するか、または除去する前記工程が、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の水溶液、または皮膚または表面の消毒のため使用される任意の溶液または薬剤の適用を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

病原体ならびに／または病原性および／または有益な微生物を殺傷するか、不活化するか、または除去する前記工程が、前記粘膜層または前記その細胞の少なくとも一部分の除去前に行われるか、または前記消化もしくは分離後に行われるか、または粘液の除去後に行われる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ブルンナー腺幹／前駆細胞 (BGSC)、または BGSC の集団を、ブルンナー腺、その一部分、またはそこから採取された試料から単離する方法であって、

(a) 十二指腸、その一部分、またはそこから採取された試料を消化または分離して、消化物または分離した細胞材料を生じさせること、ここで、前記十二指腸からは腸粘液が可能な限り除去され、前記消化物または分離した細胞材料はブルンナー腺を含み；

(b) ブルンナー腺を含む前記消化物または分離した細胞材料から：(i) Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44 および CK19 の一つまたは複数を発現する細胞；
および／または (ii) SOX17 と PDX1 の両方を発現する細胞を得ること、を含む、方法。

【請求項 18】

前記十二指腸、その一部分、そこから採取された試料、前記消化物、前記分離した細胞材料、またはそれらの組み合わせが、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液と接触される、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年3月29日に提出された米国仮出願第62/650,208号の優先権を主張するものであり、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

複数の幹／前駆細胞微小環境は、胎児および出生後のヒト胆管内の特定の解剖学的部位に残っている。幹／前駆細胞集団は、胎児組織では長い間認識されてきたが、成人組織でのその持続性が新たに認識されている。腸管陰窩と平行する腺成分である胆道周囲の腺（PBG）は、肝外胆管内、巨大な肝内胆管内、および肝臓総胆管内に位置し、PBGにおける後期の幹／前駆細胞およびそれから誘導されるものは、胆のう内で見出される。このネットワークは、肝臓総胆管のPBGの幹／前駆細胞から、膵臓内の膵管腺（PDG）内の運命付けられた前駆細胞まで継続する。これらの微小環境の全てにおける幹／前駆細胞は、胆管幹／前駆細胞（BTSC）と総称される。PBG内のBTSCは、増殖能、自己再生能および多能性を含む内胚葉系幹細胞／前駆細胞の形質を有し、これらは、増殖能および多能性を含むPDG内の前駆細胞の形質を有するが、PBG内の幹／前駆細胞よりも自己再生能は低い。

10

【0003】

肝－膵管間膨大部のレベルに位置するBTSCは原始的であり、いくつかの多能性マーカー（例えば、OCT4、SOX2、NANOG）を同時発現し、自己再生するか、または機能的肝細胞、胆管細胞および膵島に分化することができる（それらが腺房細胞も生じ得るかどうかは、進行中の研究で検討されている）。BTSCを含有する微小環境は、肝臓および膵臓にまで広がる。ヒトにおける詳細な解剖学的研究により、BTSC微小環境組織の近位から遠位への軸が、最も原始的な幹細胞が位置する近位部位である肝膵管膨大部から、成熟細胞が見つかる遠位部位である肝臓または膵臓へと進むことが明らかにされている。この軸は、これらの臓器の器官形成を再構築し、その一般的な胚発生の起源を反映する。実際に、発生学的観点から、肝臓、胆管系および膵臓の共通の前駆細胞が、前腸を形成する確定的な近位内胚葉の発生の早期段階に存在する。この発生段階では、原始十二指腸は近位内胚葉系幹／前駆細胞を保持する。

20

【0004】

特定された最も原始的な幹／前駆細胞は、十二指腸の粘膜下層内にあるブルンナー腺内に見られるものである。これらの細胞は、肝臓および膵臓になる、幹／前駆細胞微小環境のネットワーク全体の出発点であり得る。成人十二指腸からのこれらの細胞の単離は困難であり、これまでに当該技術分野において開示されている方法によって達成されていない。これらの細胞の実質的な意義は多様である。例えば、これらの細胞は、インビトロでの薬物効果の評価、モデルシステム（例えば、オルガノイド）の生成、肝臓および膵臓発生、機能維持ならびに／または修復の分析（但し、これらは両方の臓器の前駆細胞を含む）、肝臓、膵臓および他の内胚葉系組織に関連する他の臨床または分析検査、肝臓、膵臓および／または他の内胚葉系組織に関与するかまたは影響を及ぼす疾患または状態の診断または治療のため使用することができる。ブルンナー腺由来の細胞は、内視鏡検査によりアクセス可能である位置である十二指腸に存在する内胚葉系幹／前駆細胞源の中で稀であり、自己細胞療法もしくは異種細胞療法または遺伝子療法のための幹／前駆細胞の供給に有用である。さらに、これらのブルンナー腺由来の腫瘍は、様々な形態の癌治療の論理的標的である。したがって、当技術分野において、「ブルンナー腺幹／前駆細胞」として知られている、目的の細胞を単離する方法を開発する必要が依然として存在する。

30

【発明の概要】

【0005】

一態様では、本開示は、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9およびサイトケラチン7（CK7）からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現し、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化での増殖能としてさらに特徴付けられる、十二指腸から単離された幹／前駆細胞（ブルンナー腺幹／前駆細胞またはBGSCと称される）に関する。

40

50

【0006】

別の態様では、本開示は、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現し、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化での増殖能としてさらに特徴付けられる、十二指腸から単離された幹／前駆細胞（ブルナー腺幹／前駆細胞またはBGSCと称される）に関する。

【0007】

別の態様では、本開示は、SOX17とPDX1の両方を発現し、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化での増殖能としてさらに特徴付けられる、十二指腸から単離された幹／前駆細胞（ブルナー腺幹／前駆細胞またはBGSCと称される）に関する。

10

【0008】

別の態様では、本開示は、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現するか、またはSOX17とPDX1の両方を発現し、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化での増殖能としてさらに特徴付けられる、十二指腸から単離された幹／前駆細胞（ブルナー腺幹／前駆細胞またはBGSCと称される）に関する。

【0009】

一部の実施形態では、BGSCは、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に含まない。一部の実施形態では、BGSCは、少なくとも1カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、BGSCは、少なくとも2カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、BGSCは、少なくとも6カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、BGSCは、少なくとも12カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。

20

【0010】

一部の実施形態では、BGSCの自己再生を支持する培養条件は、無血清培地、任意選択でクボタの培地を含む。一部の実施形態では、自己再生を支持する培養条件は、血清を含有する培地を含む。

【0011】

一態様では、本開示は、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関し、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9およびCK7からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現する。

30

【0012】

一態様では、本開示は、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関し、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現する。

【0013】

一態様では、本開示は、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関し、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、SOX17とPDX1の両方を発現する。

40

【0014】

一態様では、本開示は、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関し、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現するか、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、SOX17とPDX1の両方を発現する。

【0015】

50

一部の実施形態では、幹／前駆細胞の集団は、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に含まない。

【0016】

一部の実施形態では、幹／前駆細胞の集団は、少なくとも1カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、幹／前駆細胞の集団は、少なくとも2カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、幹／前駆細胞の集団は、少なくとも6カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、幹／前駆細胞の集団は、少なくとも12カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。

【0017】

一部の実施形態では、幹／前駆細胞集団の自己再生を支持する培養条件は、無血清培地、任意選択でクボタの培地を含む。一部の実施形態では、幹／前駆細胞集団の自己再生を支持する培養条件は、血清を含有する培地を含む。

【0018】

一態様では、本開示は、一つまたは複数のBGSC、またはBGSCの集団を対象の十二指腸、その一部分、またはそこから採取された試料から単離する方法であって、

(a) 腸粘液を実質的に含まない十二指腸の粘膜層を、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液と、粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で接触させること；

(b) 機械的、外科的および／または化学的方法により粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得る残部を残し、および／または曝露させること；

(d) 残部を消化するか、または分離すること；

(e) 一つまたは複数のBGSCまたはBGSCの集団を消化された残部から単離すること、を含む方法に関する。

【0019】

一部の実施形態では、単離工程は、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現するBGSC、または細胞の少なくとも一部、または細胞の実質的な部分、または細胞の大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現するBGSCの集団を単離することを含む。

【0020】

一部の実施形態では、単離工程は、SOX17とPDX1の両方を発現するBGSC、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、SOX17とPDX1の両方を発現するBGSCの集団を単離することを含む。

【0021】

一態様では、本開示は、一つまたは複数のBGSC、またはBGSCの集団を、対象の十二指腸、その一部分、またはそこから採取された試料から単離する方法であって、以下の工程

(a) 腸粘液を除去する工程；

(b) 生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液を、粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で適用する工程；

(c) 機械的、外科的および／または化学的方法により粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得る残部を残し、および／または曝露させる工程；

(d) 粘膜層および／または残部に、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液を適用する工程；

10

20

30

40

50

(e) 消化または分離を粘膜下層に適用して、消化物、分離した細胞材料、または細胞懸濁液を生じさせる工程；

(f) 任意選択で消化物、分離した細胞材料、または細胞懸濁液由来の細胞の少なくとも一部を培養する工程；

(g) Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19の一つまたは複数を発現する細胞、もしくは細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19の一つまたは複数を発現する細胞の集団、および／またはSOX17とPDX1の両方を発現するその細胞を単離する工程、を含み、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去する工程は、任意の時点で、または2回以上実施することができる。

10

【0022】

一部の実施形態では、腸粘液の除去は、十二指腸組織を圧迫することを含む。

【0023】

一部の実施形態では、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液は、低張、低浸透圧、高張、または高浸透圧溶液を含む。

【0024】

一部の実施形態では、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液は、グルコース溶液、高塩溶液、または蒸留水を含む。

20

【0025】

一部の実施形態では、除去は、乳化剤および／または界面活性剤の使用を含む化学的破壊によって行なわれる。

【0026】

一部の実施形態では、界面活性剤および／または乳化剤は、水、生理食塩水および／または緩衝液中にある。

【0027】

一部の実施形態では、界面活性剤および／または乳化剤は、短期間（15分未満）適用される。

30

【0028】

一部の実施形態では、乳化剤は、レシチン、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ポリソルベート80）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（ポリソルベート40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（ポリソルベート60）、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート（ポリソルベート65）、アンモニウムホスファチド、脂肪酸のナトリウム、カリウムおよびカルシウム塩、脂肪酸のマグネシウム塩、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリド、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの酢酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの乳酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのクエン酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのモノアセチル酒石酸エステルおよびジアセチル酒石酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの混合酢酸と酒石酸エステル、脂肪酸のスクロースエステル、スクログリセリド、脂肪酸のポリグリセロールエステル、ポリグリセロールポリリシノレエート、脂肪酸のプロパン-1,2-ジオールエステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドと相互作用した熱酸化大豆油、ステアロイル-2-ラクチル酸ナトリウム、ステアロイル-2-ラクチル酸カルシウム、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノパルミテートおよびその組み合わせからなる群から選択される。

40

【0029】

一部の実施形態では、界面活性剤は、1-ヘプタンスルホン酸、N-ラウリルサルコシ

50

ン、ラウリル硫酸塩、1-オクタンスルホン酸およびタウロコール酸、塩化ベンザルコニウム、セチルピリジニウム、塩化メチルベンズトニウム、臭化デカメトニウム、アルキルベタイン、アルキルアミドアルキルベタイン、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アムモニオ-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルコリン、N-デシルA-D-グルコピラノシド、N-デシルA-D-マルトピラノシド、N-ドデシルB-D-マルトシド、N-オクチルB-D-グルコピラノシド、N-テトラデシルB-D-マルトシド、トリトン（トリトンX-100）、ノニデット-P-40、ポロキサマー188、ラウリル硫酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウムおよびその組み合わせからなる群から選択される。

【0030】

一部の実施形態では、残部は粘膜下層を含む。

【0031】

一部の実施形態では、消化または分離は酵素的に行われる。

【0032】

一部の実施形態では、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液は、次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）の水溶液、または皮膚または表面の消毒のため使用される任意の溶液または薬剤を含む。

【0033】

一部の実施形態では、病原体ならびに／または病原性および／または有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液の適用は、界面活性剤および／もしくは乳化剤の適用前に行われるか、または消化もしくは分離後に行われるか、または粘液の除去後に行われる。

【0034】

一部の実施形態では、組織試料は、消化または分離工程前に刻まれる。

【0035】

一部の実施形態では、消化もしくは分離工程および／または単離工程は、低付着プレートにおいて行われる。

【0036】

一部の実施形態では、単離工程は、無血清培地、任意選択で、クボタの培地を含む培養条件を用いた培養セクションを使用して行われる。

【0037】

一部の実施形態では、単離工程は、血清を含有する培地を含む培養条件を用いた培養セクションを使用して行われる。

【0038】

一部の実施形態では、単離された細胞は、スフェロイド、一つまたは複数のオルガノイド、細胞集団、または細胞凝集物を支持または生じる条件下で培養される。

【0039】

一態様では、本開示は、低付着プレートにおいてBGSC、またはBGSCの集団を培養することにより生じるスフェロイド、オルガノイド、細胞凝集物または細胞集団に関する。

【0040】

一態様では、本開示は、BSGC、またはBSGCの集団を懸濁液または3D培養条件において培養することにより生じるスフェロイド、オルガノイド、細胞凝集物または細胞集団に関する。

【0041】

一態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、有効量のBGSCまたはBGSCの集団を投与することを含む方法に関する。

【0042】

10

20

30

40

50

一態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、腸または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、有効量の B G S C の投与を含む方法に関する。

【0043】

一態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、腸または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、有効量の B G S C の集団の投与を含む方法に関する。

【0044】

一態様では、本開示は、有効数の B G S C、または B G S C の集団の投与を含む、自己細胞または遺伝子療法に関する。

【0045】

一態様では、本開示は、有効数の B G S C、または B G S C の集団の投与を含む、同種細胞または遺伝子療法に関する。

【0046】

一態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、有効量の B G S C または B G S C の集団を投与することを含み、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である、方法に関する。

【0047】

一態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、有効量の B G S C または B G S C の投与を含み、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である、方法に関する。

【0048】

一態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、有効量の B G S C の集団の投与を含み、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である、方法に関する。

【0049】

一態様では、本開示は、有効数の B G S C、または B G S C の集団の投与を含む、自己細胞または遺伝子療法であって、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である、方法に関する。

【0050】

一態様では、本開示は、有効数の B G S C、または B G S C の集団の投与を含む、同種細胞または遺伝子療法であって、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である、方法に関する。

【0051】

一態様では、本開示は、ヒトおよび／または動物のための自家または同種の細胞もしくは遺伝子療法のための、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態の治療のための、B G S C の細胞の使用に関する。

【0052】

一態様では、本開示は、ヒトおよび／または動物のための自家または同種の細胞もしくは遺伝子療法のための、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態の治療のための、B G S C の細胞の使用であって、細胞は、遺伝子操作または修飾されている、使用に関する。

【0053】

一態様では、本開示は、ヒトおよび／または動物のための自家または同種の細胞もしくは遺伝子療法のための、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態の治療のための、B G S C の集団の使用に関する。

【0054】

10

20

30

40

50

一態様では、本開示は、ヒトおよび／または動物のための自家または同種の細胞もしくは遺伝子療法のための、肝臓、膵臓、胃、腸、または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態の治療のための、BGSCの集団の集団の使用であって、細胞は、遺伝子操作または修飾されている、使用に関する。

【0055】

一部の実施形態では、スフェロイド、オルガノイド、細胞凝集物または細胞の集団は、BGSC、またはBGSCの集団を、成熟細胞を含む後の系譜段階の細胞に分化させる能力がある培養条件をさらに含む。

【0056】

一態様では、本開示は、ブルンナー腺幹／前駆細胞（BGSC）、またはBGSCの集団を、対象の十二指腸、その一部分、またはそこから採取された試料から単離する方法であって、

（a）十二指腸、その一部分、またはそこから採取された試料を消化または分離して、消化物または分離した細胞材料を生じさせること；

（b）消化または分離した細胞材料から：（i）Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、CK7、Lgr5、NIS、CD44およびCK19の一つまたは複数を発現するこれらの細胞、もしくは細胞の少なくとも一部、実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、CK7、Lgr5、NIS、CD44、およびCK19を発現する細胞の集団；および／または（ii）SOX17とPDX1の両方を発現するこれらの細胞、もしくは細胞の少なくとも一部、実質的な部分、または大部分が、SOX17とPDX1の両方を発現する細胞の集団を得ること、を含む、方法に関する。

【0057】

一部の実施形態では、十二指腸、その一部分、そこから採取された試料、消化物、分離した細胞材料、またはそれらの組み合わせは、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液と接触される。

【0058】

一態様では、本開示は、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、以下の順序で生じ得るか、または他の実施形態では、異なる順序で生じ得る、次の工程：

（a）粘膜層および粘膜下層を有する組織の粘膜層を、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液と、粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で接触させる工程；

（b）機械的、外科的および／または化学的方法により粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得る残部を残し、および／または曝露させる工程；

（c）残部を病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的にさしようにするか、不活化するか、または除去するための培地または溶液と接触させる工程；

（d）残部を消化するか、または分離する工程；

（e）一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を単離する工程、を含む、方法に関する。

【0059】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層

10

20

30

40

50

を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法は、表面粘液の除去をさらに含む。

【0060】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液は、低張、低浸透圧、高張、または高浸透圧溶液を含む。

【0061】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液は、グルコース溶液、高塩溶液、または蒸留水を含む。

【0062】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、除去は、乳化剤および／または界面活性剤の使用を含む、化学的破壊により行われる。

【0063】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、界面活性剤および／または乳化剤は、水、生理食塩水および／または緩衝液中にある。

【0064】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、界面活性剤および／または乳化剤は、短期間（15分未満）適用される。

【0065】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、乳化剤は、レシチン、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ポリソルベート80）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（ポリソルベート40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（ポリソルベート60）、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート（ポリソルベート65）、アンモニウムホスファチド、脂肪酸のナトリウム、カリウムおよびカルシウム塩、脂肪酸のマグネシウム塩、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリド、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの酢酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの乳酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのクエン酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのモノアセチル酒石酸エステルおよびジアセチル酒石酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの混合酢酸と酒石酸エステル、脂肪酸のスクロースエステル、スクログリセリド、脂肪酸のポ

10

20

30

40

50

リグリセロールエステル、ポリグリセロールポリリシノレエート、脂肪酸のプロパン-1, 2-ジオールエステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドと相互作用した熱酸化大豆油、ステアロイル-2-ラクチル酸ナトリウム、ステアロイル-2-ラクチル酸カルシウム、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノパルミテートからなる群から選択される。

【0066】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、界面活性剤は、1-ヘプタンスルホン酸、N-ラウリルサルコシン、ラウリル硫酸塩、1-オクタンスルホン酸およびタウロコール酸、塩化ベンザルコニウム、セチルピリジニウム、塩化メチルベンズトニウム、臭化デカメトニウム、アルキルベタイン、アルキルアミドアルキルベタイン、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アムモニオ-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルコリン、N-デシルA-D-グルコピラノシド、N-デシルA-D-マルトピラノシド、N-ドデシルB-D-マルトシド、N-オクチルB-D-グルコピラノシド、N-テトラデシルB-D-マルトシド、トリトン（トリトンX-100）、ノニデット-P-40、ポロキサマー188、ラウリル硫酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウムからなる群から選択される。

【0067】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液は、次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）の水溶液、または皮膚または表面の消毒のため使用される任意の溶液または薬剤を含む。

【0068】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液は、界面活性剤および／もしくは乳化剤の適用前に行われるか、または消化もしくは分離後に行われるか、または粘液の除去後に行われる。

【0069】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、残部は、粘膜下層を含む。

【0070】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、消化または分離は、酵素的に行われる。

【0071】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複

数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、組織試料は、消化または分離工程前に刻まれる。

【0072】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、消化または分離は、粘膜下組織を、細胞懸濁液、細胞の混合物、集団、凝集塊または凝集物、および／または組織断片に崩壊する。

10

【0073】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、単離工程は、無血清培地、任意選択で、クボタの培地を含む培養条件を用いた培養セクションを使用して行われる。

【0074】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、単離工程は、血清を含有する培地を含む培養条件を用いた培養セクションを使用して行われる。

20

【0075】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、単離工程は、低付着プレートにおいて行われる。

30

【0076】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、単離された細胞または細胞集団は、スフェロイド、一つまたは複数のオルガノイド、細胞集団、または細胞凝集物を支持または生じる条件下で培養される。

【0077】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、生理学的に許容される培地を用いて1回または複数回の洗浄工程をさらに含む、方法。

40

【0078】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、組織は、内胚葉系組織である。

【0079】

50

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、組織は、気管、主気管支、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸および直腸を含む群から選択される。

【0080】

一部の実施形態では、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織（またはその一部もしくは試料）から単離する方法であって、組織は、肝臓、膵臓、胆嚢および胆管を含む群から選択され、胆管管は、総胆管および胆嚢管を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】図1は、A) 過ヨウ素酸シッフ (PAS) で染色されたヒト十二指腸を示す。十二指腸粘膜は、腸絨毛まで隆起し、腸陰窩 (矢頭) で折り畳まれる。粘膜下組織 (SM) は、PAS⁺腺要素 (ブルンナー腺: BG、点線) が多い。BGは、粘膜筋板 (MM) を介して腸陰窩と解剖学的に連続している。粘膜の粘膜固有層内に位置するBG腺房はほとんどなく、腸陰窩 (右画像の矢印) と連続している。B) ヒト十二指腸におけるサイトケラチン7 (CK7) の免疫組織化学染色。CK7は、BGによって特異的に発現するが、腸陰窩によって発現するものではない。C) ヒト十二指腸におけるSOX9の免疫組織化学染色。腸陰窩とBGの両方が、SOX9を発現する細胞 (矢印) を含有する。D) SOX9 (赤色) およびCK7 (緑色) の免疫蛍光染色、核は青色で表される。BGでは、SOX9は、同じ細胞 (矢印) においてCK7と共発現する。

20

【図2】図2は、A) ヒト十二指腸における増殖細胞核抗原 (PCNA)、CD44、上皮細胞接着分子 (EPCAM)、Gタンパク質共役受容体5を含有するロイシンリッチリピート (Lgr5)、Tra-1-60、およびTra-1-81の免疫組織化学を示す。PCNA⁺、CD44⁺、EPCAM⁺、およびLgr5⁺細胞は、腸陰窩 (矢印) とブルンナー腺 (矢印) の両方にある。Tra-1-60⁺細胞およびTra-1-81⁺細胞は、ブルンナー腺 (矢印) に存在するが、腸陰窩には存在しない。MM=粘膜筋板。B) 多能性に関連する転写因子の免疫組織化学染色および免疫蛍光染色。Oct4AとSOX2は、ブルンナー腺内の細胞で陽性であり、Tra-1-60⁺細胞 (矢印) で共発現する。

30

【図3】図3は、A) 粘膜の化学的および機械的除去の前後のヒト十二指腸のヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色切片を示す。まれな腸陰窩 (右の画像の点線の円) を除き、表面上皮 (絨毛) および腸陰窩 (矢頭) 内のほぼすべての上皮細胞が、除去された。粘膜下層のブルンナー腺は、保存されている (アスタリスク)。B) 粘膜の機械的および化学的除去後のヒト十二指腸におけるサイトケラチン7 (CK7) の免疫組織化学染色。ブルンナー腺のCK7⁺細胞は、保持される。C) 粘膜の機械的および化学的除去後のヒト十二指腸におけるTra-1-60の免疫組織化学染色。ブルンナー腺のTra-1-60⁺細胞は、保存される。MM=粘膜筋板。

40

【図4】図4は、A~B) 十二指腸粘膜下層から単離された細胞における上皮細胞接着分子 (EPCAM)、Gタンパク質共役受容体5 (Lgr5) を含有するロイシンリッチリピート、およびTra-1-60のフローサイトメトリーを示す。EPCAMおよびTra-1-60の免疫選別法により、それぞれ、EPCAM⁺ (A) およびTra-1-60⁺ (B) 集団の部分的濃縮がもたらされた。C~D) 培養セレクション戦略により、さらにTra-1-60⁺細胞を選別した。Cでは、細胞をクボタの培地においてプラスチック上に均一な密度で播種した。細胞は1~2日の遅延期後に増殖し始め、6~8日後に10~15個の細胞の小さな集団を形成した。14日後、大きなコロニーが認められた。各コロニーは、Tra-1-60⁺の小型で密集した均一な細胞によって形成された。Dでは、細胞はオルガノイド形成用に調整された条件で培養され、単一のブルンナ

50

一腺幹細胞 (B G S C) は、球状構造に自己組織化し始め、その大きさと数がさらに拡大した。オルガノイド形成は、オルガノイドを形成する主な表現型を表す $T r a - 1 - 6 0 ^{+}$ 細胞の濃縮を決定した。P h - C : 位相差。スケールバー = $200 \mu m$ 。

【図5】図5は、A~B) 内胚葉マーカーおよび多能性マーカーの位相差 (P h - C)、ヘマトキシリン・エオシン (H & E)、および過ヨウ素酸シッフ (P A S) 染色、免疫組織化学および免疫蛍光を示す。パネルAでは、ブルンナー腺幹細胞 (B G S C) を自己再生条件 (すなわち、無血清クボタの培地) 下で培養した。パネルBでは、オルガノイド形成用に調整した条件下でB G S Cを培養した。両方の条件において、培養細胞は、ブルンナー腺を形成する細胞によりインサイツで観察されるものと類似する典型的な表現型を示した。核は青色で示される。C~D) R T - P C R解析により、内胚葉 (C) および多能性 (D) 遺伝子の発現を確認した。胆道系幹/前駆細胞 (B T S C) およびN t e r a細胞株を、それぞれ、内胚葉および多能性遺伝子の陽性対照として使用した。* = 他の群に対して $p < 0.05$ 。G O I = 目的の遺伝子。

【図6】図6は、A) インビトロでの肝細胞分化を示す。肝細胞分化についてホルモンで定義した培地 (H D M - H) で培養したヒトブルンナー腺幹/前駆細胞 (h B G S C) 中のアルブミンの位相差 (P h - C)、過ヨウ素酸シッフ (P A S) 染色および免疫蛍光染色。H D M - Hで14日後、ほとんどの細胞の形態が多角形に形作られた細胞に顕著に変化した。これらの細胞は凝集して多細胞帯を形成し、P A S陽性 (グリコーゲン貯蔵) であり、アルブミンを発現した。核は青色で示される。H D M - 肝臓で14日間培養した細胞における肝細胞マーカーのリアルタイムP C R。アルブミン (A L B)、トランスフェリン (T F)、およびシトクロムP 4 5 0 3 A 4 (C Y P 3 A 4) を含む肝細胞特異的遺伝子は、自己複製条件 (すなわち、無血清のクボタの培地: K M) 下での細胞と比較して増加した。初代ヒト肝細胞 (h H e p) を陽性対照として使用する。* = 他の群に対して $p < 0.05$ 。G O I = 目的の遺伝子。B) インビトロでの内分泌性膵分化。膵島細胞分化 (H D M - P) についてホルモンで定義した培地で培養したヒトブルンナー腺幹/前駆細胞 (h B G S C) におけるニューロゲニン3 (N G N 3) およびインスリンのP h - C、ヘマトキシリン・エオシン (H & E) 染色および免疫蛍光。H D M - Pでの14日後、膵島様構造が培養物に出現し、これらの凝集物はN G N 3およびインスリン陽性であった。核は青色で示される。H D M - P中で14日間培養した細胞における膵内分泌マーカーのリアルタイムP C R。P D X 1、インスリンおよびグルカゴンは、自己複製条件 (すなわち、クボタ培地: K M) での細胞と比較して、高い増加を示した。正常な膵島細胞を陽性対照として使用した。* = K Mでのh B G S Cに対して $p < 0.05$ 。G O I = 目的の遺伝子。

【図7】図7は、脾臓内注射によるS C I Dマウスの肝臓へのヒトブルンナー腺幹細胞 (h B G S C) のインビボ移植を示す。A) 30日後、ヒトミトコンドリア抗原 (h M i t o) を発現する細胞が、マウス肝臓に存在し、主に門脈三管空間の周囲 (矢印) に位置した。生理食塩水 (V e h) を注射したマウスには陽性細胞は存在しなかった。B) h M i t o陽性細胞は、マウス肝臓の肝細胞の5%近くを占めた。C) ヒトアルブミン (h A L B) 遺伝子の発現は、h B G S Cを注射したマウスの肝臓においてR T - q P C Rにより検出されたが、V e hを注射したマウスでは検出されなかった (N D : 検出されず)。データは、3回の実験の平均 $\pm$ S Dとして表した。D~E) 二重免疫蛍光染色により、ヒトアルブミン (h A l b)、H e p - P a r 1、h M i t oなどの成熟ヒト肝細胞のマーカーの発現を同じ細胞で確認した。核 (N u) を青色で表示した (D A P I)。

【図8】図8は、十二指腸粘膜の選択的可溶化を示す。A) 洗浄方法; B) 十二指腸四肢のクランピング; C) 組織切断および粘液除去; D) こし器による機械的ろ過。

【図9】図9は、ヒト十二指腸におけるサイトケラチン7 (C K 7) の免疫組織化学を示す。十二指腸壁は、粘液、粘膜下層および粘膜層を含む。ブルンナー腺 (B G) は、粘膜下層内に位置する。C K 7は、B Gによって特異的に発現するが、腸陰窩における細胞によって発現するものではない。四角内の領域を、右側の画像で拡大する。

【図10】図10は、A) ヒト十二指腸におけるS O X 9 (赤色) およびL g r 5 (緑色

10

20

30

40

50

）の免疫蛍光染色を示す。核は青色で示される。ブルンナーの腺（点線に含まれる）では、Lgr5はSOX9（矢印）と共局在し、その発現は、粘膜筋板の内部に位置する腺房においてより高く、粘膜下層内のより深い層に位置する腺房においてよりも腸陰窩（矢頭）と連続していた。MM＝粘膜筋板。B～D）ナトリウム／ヨウ素共輸送体（NIS）の免疫組織化学染色。NISは、腸陰窩（パネルAおよびCの矢頭）の底部およびブルンナー腺（パネルAおよびBの矢印）で表される。

【図11】図11は、粘膜下層の生存率の保存と合わせた粘膜上皮細胞の除去の失敗したプロトコルおよび手法を示す。手法1番：外科的切開、2番：粘膜下の生理食塩水の事前注射による粘膜切除術、3番：粘膜の搔破。これらの戦略は、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）および過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色において示されたように、粘膜層の部分除去および腸絨毛（矢頭）および陰窩（矢印）の保存をもたらした。

10

【図12】図12は、膵島細胞分化についてホルモンで定義した培地（HDM-P）下で7日間培養したヒトブルンナー腺幹／前駆細胞（hBGSC）におけるリアルタイムPCRを示す。PDX1およびグルカゴン遺伝子は自己複製条件（すなわち、クボタの培地：KM）下の細胞と比較したとき、7日後には大きく増加するが、インスリン遺伝子はしない。正常な膵島細胞を陽性対照として使用した。＊＝KMでのhBGSCに対して $p < 0.05$ 。GOI＝目的の遺伝子。

【図13】図13は、マウスの十二指腸粘膜下腺が腸陰窩に対して別個の区画を表し、増殖性の特徴を示すことを示す。A）は、マウス（m）十二指腸におけるサイトケラチン19（Ck19）、SOX9および増殖細胞核抗原（PCNA）についてのヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色、および免疫蛍光染色を示す。点線は、腸陰窩と粘膜下腺（SG：アスタリスク）の境界を個別化する。十二指腸のSGは、陰窩よりも細胞質が明瞭であり、その粘液含有量のため、区別可能である。げっ歯類の十二指腸では、腸陰窩およびj内陰窩はCk19陽性であり、SG（白色のアスタリスク）はほぼ陰性である。SOX9＋細胞は、主にSG内に位置し（緑色の細胞）、PCNA＋細胞は、主に腸陰窩内に位置する（赤色の細胞）。核は青色で示される。スケールバー＝200 μm （H&EおよびCk19）または100 μm （SOX9／PCNA）。B）マウス（m）空腸におけるCk19、SOX9およびPCNAについてのヘマトキシリン・エオシン染色および免疫蛍光染色を示す。げっ歯類の空腸では、腸陰窩および絨毛は、Ck19陽性である。十二指腸に関する区別は、SOX9＋細胞が陰窩に位置し、PCNAを共発現していることである（黄色の矢印）。核は青色で示される。スケールバー＝200 μm （H&EおよびCk19）または100 μm （SOX9／PCNA）。C）タモキシフェン注射の14日後にKrt19CreTdTomatoLSLマウスにおけるCk19およびTdTomato（Td-Tom）の免疫蛍光染色を示す。マウス（m）空腸では、陽性のものと接して位置する陰性の陰窩（緑色の矢印）と共に、ほとんどの腸陰窩はTd-Tom＋（赤色の矢印）である。Td-Tom＋陰窩の上に位置する絨毛は、完全にTd-Tom陽性である。マウス十二指腸では、SGは大部分がtd-Tom－およびCk19－であるため、td-Tom＋陰窩（赤色の矢印）からのその起源を除外する。白色のアスタリスクはSGを示す。点線は、腸陰窩とSGの間の境界を個別化する。核は青色で示される。スケールバー＝200 μm 。D）マウス十二指腸では、PCNA＋505およびSOX9＋細胞は常にTd-Tom陰性である（赤色の矢印）。黄色と緑色の矢印は、Td-Tom＋腸陰窩を指し、十二指腸ではPCNA陽性、SOX9陰性である。核は青色で示される。点線は、腸陰窩とSGの間の境界を個別化する。図13の画像は、 $n = 5$ の動物を表す。

20

30

40

【図14】図14は、十二指腸粘膜下層から単離したTra-1-60＋細胞が、インビトロで内分泌系の膵臓に限定され、インビボでインスリン＋細胞に分化する能力を示すことを示す。A～C）インビトロでの内分泌系の膵分化。パネルA）は、ヒト十二指腸粘膜下腺から単離し、膵分化（PM）について定義した培地または自己複製条件（クボタの培地：KM）で培養した細胞の位相差（Ph-C）およびヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色を示す。PMでは、膵島様構造は7日後（PM7）に現れ、14日後（PM14）に数が増加する；＊他の群に対して $p < 0.001$ 。スケールバー＝100 μm 。 $n =$

50

5の生物学的複製物。B)リアルタイム(RT)-PCRは、PM7-14でのPDX1遺伝子発現の増加を示し、583の核Pdx1発現を、免疫蛍光染色により確認する。n=4の生物学的複製物。C)は、インスリン(INS)およびグルカゴン(GLU)遺伝子発現がPM14の後で増加することを示す(n=4の生物学的複製物)。ヒト膵島細胞(ISL)を対照として使用する(n=3の生物学的複製物)。14日のPMでは、膵島様構造が免疫蛍光染色によりインスリンおよびグルカゴンの発現を示す。スケールバー=100μm。D~G)は、マウスにおいて実験的に誘発した糖尿病が、インビボでのdSGにおける増殖および膵臓形質を誘発し得ることを示す(各群につきn=5の動物)。D)ストレプトゾトシン(STZ)で処置したマウスは、対照(CTR)と比較してdSGの領域画分(アスタリスク)の範囲が増加したことを示す。点線は、dSGから腸陰窩を個別化する。スケールバー=200μm。E)STZマウスのdSGは、免疫蛍光(IF)によって決定される対照と比較して、増殖細胞核抗原(PCNA)、Pdx-1、ニューロゲニン3(Ngn3)、およびインスリンの発現が増加したことを示す。スケールバー=100μm。F)はIFスコアのヒートマップを示す。G)は、げっ歯類の十二指腸由来の標本が、RT-PCR解析によって決定した対照と比較して、STZマウスにおけるNGN3およびINS遺伝子の発現をわずかに増加させることを示す。同じマウスの膵臓組織を基準として使用する。H)2型糖尿病(T2D)を患う患者から得たヒト十二指腸におけるインスリン発現の研究を示す。これらの器官(n=5の十二指腸)では、まれなインスリン+細胞がSG内に存在する(矢印)。膵組織を右に示す。スケールバー=50μm。免疫蛍光染色では、核は青色で表示される。A~DおよびGについて、エラーバーは平均±s.d.を示す。A~DおよびGについて、p値は、両側t検定により決定した。

【図15】図15は、ヒト十二指腸球部の内視鏡生検により得た自己複製ブルンナー腺細胞の取得を示す。A)生検によるブルンナー腺(アスタリスク)を含む粘膜下層の採取を示す(左パネル)。ブルンナー腺におけるSOX9発現細胞は矢印で示さる(右パネル)。B)は、自己複製条件で胎児十二指腸から単離したブルンナー腺細胞を培養して得たインビトロ細胞コロニー(点線)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0082】

定義

本発明の説明および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に別途示されていない限り、複数形を含むことが意図されている。

【0083】

本明細書で使用される「約」という用語は、量または濃度などの測定可能な値を指す場合、特定量の20%、10%、5%、1%、0.5%、またはさらに0.1%の変動を包含することを意味する。

【0084】

本明細書に開示される任意の成分、範囲、剤形などの選択を説明するために使用される用語または「許容可能」、「有効」もしくは「十分」は、該成分、範囲、剤形などが開示された目的に適していることを意図する。

【0085】

また、本明細書で使用される場合、「および／または」は、一つまたは複数の関連する列挙された項目のうちの任意のおよび全ての可能性のある組み合わせ、ならびに二者択一(「または」)で解釈された時の組み合わせの欠如を意味し、包含する。

【0086】

本明細書で使用される場合、「含む」という用語は、組成物および方法が列挙された要素を含むが、他のものを除外しないことを意味することを意図する。本明細書で使用される場合、「本質的に〜から成る」(および文法的変形)という移行句は、列挙した材料またはステップおよび列挙された実施形態の「基本的および新規な特性に実質的に影響を与えないもの」を包含すると解釈されるべきである。In re Herz, 537 F.2

10

20

30

40

50

d 549, 551-52, 190 U. S. P. Q. 461, 463 (CCPA 1976) (emphasis in the original); MPEP § 2111.03を参照のこと。したがって、本明細書で使用される「本質的に〜から成る」という用語は、「含む」と同等として解釈されるべきではない。「から成る」は、他の成分の微量または少量以上の要素、および本明細書に開示される組成物を投与するための実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行用語の各々によって定義される態様は、本開示の範囲内である。

【0087】

「同等」または「生物学的同等物」という用語は、特定の分子、生物学的、または細胞材料を指すときに互換的に使用され、所望の構造または機能を維持しながら、最小限の相同性を有するものを意図する。

10

【0088】

本明細書で使用される場合、スフェロイドという用語は、細胞を浮遊培養環境で相互作用させることを可能にする三次元（3D）構造に組織化された、実質的にまたは主に同じタイプの細胞の凝集物を指す場合に使用される。

【0089】

本明細書で使用される場合、オルガノイドという用語は、細胞が浮遊培養環境で相互作用することを可能にする三次元（3D）構造に組織化された一つまたは複数のタイプの細胞の凝集物を指す場合に使用される。場合によっては、オルガノイドは、[ヒトもしくは動物] 器官または組織の構造および機能の態様を模倣しうる。

20

【0090】

本明細書で使用される場合、微生物という用語は、所望される細胞または細胞集団を得るよう処理されている組織の内部または外部に存在する、病原性であるかもしくは疾患を引き起こし得るか、または起こし得ないか、あるいは有益であり得るか、またはあり得ない微生物を指す。

【0091】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、DNAまたはポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセスおよび／または転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを意味する。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。遺伝子の発現レベルは、例えば、細胞または組織試料中のmRNAまたはタンパク質の量を測定することによって決定されてもよく、さらに、複数の遺伝子の発現レベルは、特定の試料の発現プロファイルを確立するために決定されてもよい。

30

【0092】

本明細書で使用される場合、「機能的」という用語は、ある特定の効果を達成することを意図するために、任意の分子、生物学的、または細胞材料を修飾するために使用され得る。

【0093】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」または「遺伝子の」という用語は、DNAまたはRNAがコード（例えば、mRNA）または非コード（例えば、ncRNA）であるかどうかにかかわらず、RNA分子に転写され得るか、またはされ得ない任意の核酸配列を広く含むことを意味する。「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはその類似体のいずれかの任意の長さのヌクレオチドの高分子形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を実施し得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、転移RNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プロ

40

50

ープおよびプライマー。

【0094】

「遺伝子操作または改変された」という用語は本明細書で使用される場合、遺伝子または遺伝物質の欠損、付加または調節、組換えDNA技術、ウイルスベクターまたはエレクトロポレーションを介した遺伝子改変、CRISPER（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）またはそれ以外を介した遺伝子ターゲティングまたは編集、DNA断片の欠損または付加、遺伝子変異の補正などを非限定的に含む、細胞またはその遺伝物質の任意の形態の改変を広く含むことを意味している。

【0095】

ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ポリヌクレオチドのアセンブリの前または後に、ヌクレオチド構造に対する修飾を付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断される可能性がある。ポリヌクレオチドは、標識成分との結合などにより、重合後にさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子および一本鎖分子の両方を指す。別途指定または必要な場合を除き、ポリヌクレオチドであるこの技術の任意の態様は、二本鎖型と、二本鎖型を構成することが公知のまたは予測される、それぞれの二つの相補的な一本鎖型との両方を包含する。

【0096】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、二つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチド模倣体の化合物を意味するために、互換的に最も広い意味で使用される。サブユニットは、ペプチド結合によって連結されてもよい。別の態様では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテルなどによって連結されてもよい。タンパク質またはペプチドは、少なくとも二つのアミノ酸を含む必要があり、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得る、アミノ酸の最大数に制限はない。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、グリシンおよびDおよびL両方の光学異性体、アミノ酸類似体、およびペプチド模倣体を含む、天然および／または非天然または合成アミノ酸のいずれかを指す。

【0097】

本明細書で使用される場合、「対象」および「患者」という用語は、互換的に使用され、任意のヒトまたは動物を意味することが意図されている。いくつかの実施形態では、対象は哺乳類であってもよい。さらなる実施形態では、対象は、ヒトまたは非ヒト動物（例えば、マウスまたはラット）であってもよい。

【0098】

本明細書で使用される場合、「組織」という用語は、生きているもしくは死亡した生物体の組織、または生きているもしくは死亡した生物体の一部の態様由来のまたはそれを模倣するように設計された任意の組織を指す。組織は、健常であり、罹患しており、および／または遺伝子変異もしくは改変を有してもよい。「自然組織」または「生体組織」という用語および変形は、本明細書で使用される場合、その自然状態、または生物体に由来するときから未修飾の状態が存在する生体組織を指す。「微小器官」は、「自然組織」上でモデル化されているか、または「自然組織」を模倣する「生物工学的組織」のセグメントを指す。

【0099】

生体組織は、任意の単一組織（例えば、相互接続され得る細胞の集合）または生物体の体の器官もしくは部分もしくは領域を構成する組織の群を含み得る。組織は、均質または不均一な細胞材料を含んでもよく、または例えば、肺組織、骨格組織、および／または筋組織を含むことができる胸部を含む体の領域で見られるような複合構造であってもよい。例示的組織としては、肝臓、肺、胸腺、皮膚、脾臓、血管、膀胱、腎臓、脳、胆管、十二指腸、腹部大動脈、腸骨静脈、心臓および腸、任意のその組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0100】

10

20

30

40

50

「単離された」という用語は、本明細書で使用される場合、その他の材料を実質的に含まない分子または生物学的もしくは細胞材料を指す。「単離された」という用語はまた、その自然環境から除去された（例えば、インビボからエクスビボまたはインビトロに）材料を説明するためにも使用される。「滅菌」という用語は本明細書で使用される場合、細菌または他の生きた微生物を含まない材料を指す（すなわち、無菌性、滅菌、無菌、防腐性、消毒など）。

【0101】

単離されたブルナー腺幹／前駆細胞および細胞培地

本明細書で使用される場合、「細胞」という用語は真核細胞を指す。様々な実施形態では、この細胞はヒトまたは動物由来であり、幹細胞または前駆細胞、または体細胞であり得る。「細胞の集団」という用語は、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分または大部分が、同じまたは異なる起源および／もしくは系譜段階を有する、同じまたは異なる細胞タイプの一つまたは複数の細胞の群を指す。一部の実施形態では、この細胞の集団は、細胞株からもたらされてもよく、一部の実施形態では、この細胞の集団は、その器官もしくは組織、その一部、またはその試料からもたらされてもよい。

【0102】

「幹細胞」という用語は、自己複製することができ（親細胞と同一の娘細胞を生成）、多能性であり、すなわち、複数のタイプの成体細胞を生じさせることができる細胞集団を指す。本明細書において使用される場合、「前駆細胞」または「前駆体」という用語は多能性でもあるが、前駆細胞または前駆体の多能性の範囲または範囲は、幹細胞の多能性よりも限定されていてもよい。「前駆細胞」または「前駆体」という用語はまた、幹細胞の子孫およびその子孫を包含するように広く定義される。前駆体は、多能性、両能性、または単能性の細胞集団であり得るが、幹細胞より限定された自己複製能を有し得る。運命付けられた前駆体は、特定の系譜に分化することができるものである。幹細胞の非限定的な例としては、胚性幹（ES）細胞、人工多能性幹（iPS）細胞、胚葉幹細胞、決定された幹細胞、成人幹細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞、間葉系幹細胞（MSC）、および血管芽細胞が挙げられるが、これらに限定されない。幹細胞と運命づけられた前駆体との間の中間体には、肝芽細胞および膵管前駆体などの細胞集団、および多能性であり得るが、限定的な複製能を有し得る、他の形態の一過性増殖細胞が含まれる。

【0103】

本開示における目的の細胞は、本明細書ではブルナー腺幹／前駆細胞（BGSC）と称され、ヒトまたは動物の十二指腸（しかし腸内の他の場所ではない）から誘導され得る。これらのBGSCは、少なくとも以下の特徴に基づいて、腸幹細胞と区別可能である：

10

20

30

40

50

【表 1】

表現型形質 (マーカー)		
	B G S C	腸幹細胞*
T r a - 1 - 6 0	+	—
T r a - 1 - 8 1	+	—
O C T 4 A	+	—
サイトケラチン7	+	—
サイトケラチン19	+	+
E p C A M	+	+
S O X 9	+	+
C D 4 4	+	+
N I S	+	+
L g r 5	+ / —	+
機能特性 (オルガノイド形成および分化能)		
オルガノイド形成	+	+ ¹
内分泌腺臓系統	+	— ²
肝臓系統	+	— ²

【0104】

出願人は、十二指腸とそのブルナー腺を、肝臓、膵臓、ならびに他の内胚葉系細胞および組織を生じる、十二指腸の粘膜下層に位置する腺幹／前駆細胞微小環境の一部である重要な幹／前駆細胞として初めて認識した。B G S Cは、ブルナー腺（十二指腸粘膜下腺としても知られる）内の細胞の小さな亜集団（例えば、約5%）であり、T R A - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、およびN A N O Gなどの多能性遺伝子を発現するものとして認識可能である。B G S Cは、肝臓、胆管、膵臓、腸、ならびにL g r 5、N I S、C D 4 4、C K 1 9、S O X 9、およびE p C A Mを含み得る、および／またはS O X 1 7とP D X 1の両方を含み得るバイオマーカーを有する他の内胚葉系組織に関連する。

【0105】

B G S Cは、上述のように腸幹細胞とは異なり、B G S Cは、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4およびC K 7を発現し、一方、腸幹細胞は発現しない。B G S Cはまた、B G S Cが、S O X 1 7とP D X 1の両方を発現するという点で肝幹細胞および膵幹細胞とも区別されるが、肝幹細胞は、S O X 1 7を発現するがP D X 1は発現せず、膵幹細胞はP D X 1を発現するがS O X 1 7は発現しない。

【0106】

したがって、一態様では、本開示は、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4

、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9およびCK7からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現する十二指腸から単離されたBGSCに関し、それらは、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力としてさらに特徴付けられる。別の態様では、十二指腸から単離されたBGSCは、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現し、BGSCは、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力としてさらに特徴付けられる。別の態様では、十二指腸から単離されたBGSCは、SOX17とPDX1の両方を発現し、BGSCは、自己再生を支持する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力としてさらに特徴付けられる。一部の実施形態では、単離されたBGSCは、Tra1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、およびSOX17とPDX1の両方を発現してもよい。一部の実施形態では、単離されたBGSCは、病原体ならびに／または病原性および／もしくはは有益な微生物を実質的に含まない。

【0107】

一部の実施形態では、単離されたBGSCは、少なくとも1カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、単離されたBGSCは、少なくとも2カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。一部の実施形態では、単離されたBGSCは、少なくとも6カ月間または少なくとも12カ月間、限定的または最小限の分化で増殖することができる。

【0108】

一部の実施形態では、BGSCの自己再生を支持する培養条件は、無血清培地を含む。一部の実施形態では、無血清培地は、クボタの培地を含む。

【0109】

「培養」または「細胞培養」という用語は、インビトロ環境での細胞の維持を意味する。「細胞培養システム」は本明細書で使用される場合、細胞の集団がエクスピボ（生体外で）で成長し得る培養条件を指す。培養物は、単一タイプの細胞または異なる細胞タイプの混合物を含んでもよい。

【0110】

細胞培養物は、細胞が、細胞外基質成分のコーティングなどのコーティングを有するかまたは有さない表面に、生物学的流体（例えば、血清またはリンパ液）ならびに／またはホルモン、成長因子およびサイトカインの定義された混合物（ホルモンで定義された培地もしくははHDM）を添加した栄養培地（ミネラル、ビタミン、アミノ酸、脂質）に播種される単層であるものを含む。HDMは、特定の成熟系統段階において、特定のタイプの細胞または細胞の集団でその有用性について経験的に定義される。

【0111】

細胞培養物はまた、低付着ディッシュ上に播種された細胞の浮遊集団または凝集物であり得、および／または懸濁培養であり得る。浮遊集団もしくは凝集物、および／または懸濁培養物を支持する培地は、単層培養に使用されるものと同じ培地であることができる。培地は無血清であり得るか、または血清を含有し得る。無血清培地は、浮遊凝集物に単層を生成させ得る付着タンパク質（例えば、フィブロネクチン）を欠く。浮遊凝集物が実質的または主に一つの細胞タイプを含むなら、それらはスフェロイドと呼ばれる。それらが複数の細胞タイプ（例えば、上皮および間葉系細胞パートナー）を含むなら、それらは、オルガノイドと呼ばれる。b懸濁培養物に浮遊している細胞集団または凝集物、スフェロイドおよびオルガノイドは、3D微小環境内にあるとみなされ、細胞は3次元で相互作用することができる。

【0112】

本明細書で使用される「培養培地」は、細胞の培養、成長、または増殖のための栄養液を指す。培養培地は、非限定的に、細胞を特定の状態（例えば、多能性状態、静止状態など）で維持する能力、細胞の成熟を促進する能力、一部の 경우에는、多能性細胞の特定の

系統の細胞への分化を促進する能力などの機能的特性により特徴付けられてもよい。

【0113】

培地の非限定的な例は、典型的には約10%のレベルで血清（市販品および農産物のため日常的に殺される動物に由来する）を添加した任意の基礎培地である、血清添加培地（SSM）である。

【0114】

「単離された」という用語は本明細書で使用される場合、他の材料（培地および／または細胞外マトリックス、ならびにそれらのそれぞれの成分を除く）を実質的に含まない分子または生物学的物質または細胞材料を指す。「単離された」という用語はまた、その自然環境から除去された（例えば、インビボからエクスピボまたはインビトロに）材料を説明するためにも使用される。

10

【0115】

「滅菌、消毒または消毒された」という用語は本明細書で使用される場合、病原体ならびに／または病原性および／もしくはは有益な微生物（すなわち、無菌性、滅菌、無菌、防腐性、消毒など）を含まない材料を指す。

【0116】

BGSCの単離された集団

別の態様では、本開示は、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9およびCK7からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現し、自己再生を指示する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力として特徴付けられる、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関する。別の態様では、本開示は、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関し、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカーを発現する。別の態様では、本開示は、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団に関し、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、SOX17とPDX1の両方を発現する。一部の実施形態では、十二指腸から単離された幹／前駆細胞集団における細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、およびSOX17とPDX1の両方を発現する。

20

30

【0117】

一部の実施形態では、前述の段落に記載された幹／前駆体の単離された集団は、病原体が実質的に存在しない、ならびに／または病原性および／もしくはは有益な微生物が存在しない。

【0118】

一部の実施形態では、本開示は、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19、CD44、CK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、およびSOX17とPDX1の両方を発現する単離されたBGSC集団を含む組成物に関し、一部の実施形態では、このBGSC集団は滅菌、消毒、または消毒されている。

40

【0119】

別の態様では、本開示は、細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9およびCK7、Lgr5、NIS、CD44およびCK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、およびSOX17とPDX1の両方を発現し、自己再生を支持する培養条件下で、任意選択で低付着プレート上または懸濁液中で、非限定的または最小限の分化で増殖する能力としてさらに特徴付けられる、単離されたBGSC集団を培養することによって産生されるオルガノイドに関する。一部の実施形態では、オ

50

ルガノイドは培地をさらに含み、培地は、B G S Cを、成熟細胞を含むより後の系統段階細胞に分化する能力がある。

【0120】

一部の実施形態では、自己再生を支持する培養条件は、無血清培地を含む。一部の実施形態では、無血清培地は、クボタの培地を含む。

【0121】

一部の実施形態では、無血清培養条件は、上皮細胞または間葉系細胞に関わらず、細胞の特定の成熟系統段階用に設計されたホルモン定義培地（HDM）である。SSMに加えて、上皮細胞または間葉系細胞に関わらず、細胞の特定の成熟系統段階用に設計された無血清のHDM培地である。この例は、内胚葉系幹／前駆体用に設計された無血清培地である、クボタの培地は、銅および低カルシウムを含まず、インスリン、トランスフェリン／Fe、および様々な質を添加するが、サイトカインまたは成長因を添加されていない基礎培地（鉱物、アミノ酸、糖、塩、ビタミン、脂質を含有する栄養培地）を含む。この培地は、肝臓、膵臓、肺、および腸由来の内胚葉系幹／前駆細胞を支持することができる。

【0122】

本明細書で使用する場合、「クボタの培地」は、銅を含有しないが、カルシウム（＜0.5 mM）、セレン、亜鉛、インスリン、トランスフェリン／Fe、精製アルブミンに結合した遊離脂肪酸の混合物、および任意選択で、高密度リポタンパク質（HDL）を含有する任意の培地を指す。一部の実施形態では、クボタの培地は、銅、低カルシウム（例えば、0.3 mM）、約10～9 Mのセレン、約0.1%ウシ血清アルブミンまたはヒト血清アルブミン（高精製および脂肪酸なし）、約4.5 mMのニコチンアミド、約0.1 nMの硫酸亜鉛七水和物、約10～8 Mのヒドロコルチゾン（肝臓前駆体には使用されるが膵臓前駆体には使用されない任意の成分）、約5 μg/mlのトランスフェリン／Fe、約5 μg/mlのインスリン、約10 μg/mlの高密度リポタンパク質、および精製血清アルブミンに結合した後に加えられた精製遊離脂肪酸の混合物を含まない、任意の培地（例えば、RPMI 1640またはDMEM-F12）を含む。遊離脂肪酸混合物は、それぞれ約100 mMのパルミチン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、およびステアリン酸から成る。この培地の調製の非限定的な例示的方法は、他で公開されており、例えば、Kubota H, Reid LM, Proc. Nat. Acad. Scien. (USA) 2000年; 97: 12132～12137であり、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0123】

幹細胞／前駆体を、肝細胞（HDM-H）または胆管細胞（HDM-C）などの特定の成人運命にするよう設計され得る他の無血清HDMが存在する。これらのHDMの一部は、本明細書では以下にさらに定義される。一部の実施形態では、培地は、細胞を所与の環境に提示または導入するために使用される「播種培地」であってもよい。他の実施形態では、培地は、細胞の分化を促進するために使用される「分化培地」であってもよい。

【0124】

このような培地は、栄養素、鉱物、アミノ酸、糖、脂質、および微量元素の混合物である「基礎培地」を含む（例えば、ダルベッコ変法イーグル培地またはDME、ならびにHam's F10またはF12、およびRPMI 1640、Roswell Park Memorial Instituteで確立された定義された基礎培地を含む）。これらの基本培地は、血清（血清添加培地もしくはSSM）または精製されたホルモン、成長因子および栄養素の定義された混合物のいずれかを添加され、ホルモンで定義された培地（HDM）であり、エキスピボでの細胞の維持のため使用することができる。本明細書で 사용되는場合、「HDM-H」は、オルガノイドのため、または成熟肝細胞への内胚葉系幹／前駆体の分化をもたらすように、IV型コラーゲンおよびラミニンの基質上に播種された単層培養物用に使用されるHDMである。HDM-Cは、オルガノイドのため使用されるか、または細胞を成熟胆管細胞にするためにI型コラーゲンおよびフィブロネクチンの基質に播種された単層のため使用されるHDMである。

【0125】

特定のホルモンで定義された培地（HDM）組成物を、以下にさらに詳細に説明する：

・改変KM（MKM）：以下のHDMの三つはいずれも、0.6mM濃度、 10^{-12} M銅、および20ng/mlのFGFに達するようさらにカルシウムを添加したKMを使用した。

・肝細胞分化（HDM-L）：MKMに7ug/Lグルカゴン、2g/Lガラクトース、1nMトリヨードチロキシ3（T3）、10ng/mlオンコスタチンM（OSM）、10ng/ml上皮成長因子（EGF）、20ng/ml肝細胞成長因子（HGF）、および1μmデキサメタゾンで補充して調製した。

・胆管細胞分化（HDM-C）：20ng/ml血管内皮細胞増殖因子（VEGF）165および10ng/mlHGFをMKMに添加することにより調製した。

・膵分化用の定義された培地（PMまたはHDM-P）：ヒドロコルチゾンを含まず、さらに2% B27、0.1mMアスコルビン酸、0.25μMシクロパミン、1μMレチノイン酸を添加したMKMを使用して調製し、bFGFは、最初の4日間使用され、残りの期間、50ng/mlエキセンディン-4および20ng/mlHGFで置き換えた。

【0126】

基底培地は、細胞培養に使用される緩衝液であり、アミノ酸、糖、脂質、ビタミン、ミネラル、塩、微量元素、および細胞周囲の間質液の化学成分を模倣する組成物中の様々な栄養素から成る。さらに、細胞培養培地は通常、生物学的プロセス（例えば、増殖、分化）をもたらすのに必要とされる必須のシグナル伝達分子（ホルモン、成長因子）を提供するために、低い割合（典型的には2～10%）の血清を添加した基礎培地からなる。血清は、培養で使用される細胞タイプに対して自己であり得るが、最も一般的には、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマなどの血清などの農業または食品目的で日常的に殺され動物由来の血清である。血清はまた、組織分離プロセスの一部である酵素を不活化するためにも使用される。

【0127】

粘膜層および粘膜下層を有する組織から多能性細胞を単離する方法

別の態様では、本開示は、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性幹／前駆細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的に一部、または大部分が所望のバイオマーカーを発現する集団を、粘膜層および粘膜下層を有する組織から単離する方法であって、

（a）腸粘液を実質的に含まない十二指腸の粘膜層を、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液と、粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で接触させること；

（b）機械的、外科的および／または化学的方法により粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得る残部を残し、および／または曝露させること；

（c）残部を消化または分離すること；

（d）一つまたは複数のBGS Cまたは細胞の集団を消化された残部から単離すること、を含む方法に関する。

【0128】

本明細書で使用される場合、「浸透圧ショック」という用語は、細胞に損傷を引き起こす細胞内の生理学的浸透圧に対する浸透圧の変化を指す。一部の実施形態では、浸透圧ショックを細胞に誘発する条件下で、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液を適用することによって、細胞は浸透圧ショックによって損傷される。生理学的範囲外の浸透圧特性を有する培地または溶液は、生理学的浸透圧より低い浸透圧を持つ低張性または低浸透圧または低浸透圧性の溶液であってもよい。生理学的範囲外の浸透圧特性を有する培地または溶液は、生理学的浸透圧より高い浸透圧を持つ高張性または高浸透圧または高浸透圧性の溶液であってもよい。生理学的範囲外の浸透圧特性を有する培地または溶液は、任意の種類の溶液であってもよい。一部の実施形態では、生理学的範囲外にある

浸透圧特性を有する培地または溶液は、水、超純水、蒸留水、5 % グルコース溶液、高塩溶液などであってもよい。

【0129】

浸透圧ショックは、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液を管腔に、十二指腸が膨張するのを誘導する量で適用することによって、またはそのような培地または溶液を組織の粘膜層に適用することによって誘発され得る。一部の実施形態では、生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液は、約0.5分、1分、約2分、約5分、約10分または約15分の間、管腔または粘膜層と接触され得る。

【0130】

一部の実施形態では、粘膜層および粘膜下層を有する組織由来の一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現している、一つまたは複数の多能性細胞、またはこのような細胞を含む集団を単離する方法は、選別または単離工程の前に、混合物の細胞懸濁液へのさらなる処理を含む。一部の実施形態では、粘膜層および粘膜下層を有する組織由来の一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現している、一つまたは複数の多能性細胞、またはこのような細胞を含む集団を単離する方法は、生理学的に許容される培地を使用した1回または複数回の洗浄工程を含む。

10

【0131】

粘膜層および粘膜下層を有する組織由来の一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現している、一つまたは複数の多能性細胞、またはこのような細胞を含む集団を単離する方法を使用して、粘膜層および粘膜下層を有する任意の適当な組織から多能性幹細胞を単離し得る。一部の実施形態では、組織は、内胚葉系組織である。一部の実施形態では、組織は、小腸、大腸、直腸を含む群から選択される。一部の実施形態では、組織は、気管、主気管支、食道、胃および十二指腸を含む群から選択される。

20

【0132】

特定の態様では、本開示は、一つまたは複数のBGSCまたはBGSCを含む集団を、組織、かかる組織の一部、または対象の十二指腸から採取されたその試料から単離する方法であって、

(a) 腸粘液を除去すること；

(b) 生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する培地または溶液を、粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で適用すること；

30

(c) 機械的、外科的および／または化学的方法により粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得る残部を残し、および／または曝露させること；

(d) 粘膜層および／または残部に、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的に殺傷するか、不活化するか、または除去するための培地または溶液を適用すること；

(e) 消化または分離を、粘膜下層を含む残部に適用して、消化物、分離した細胞材料、または細胞懸濁液を生じさせること；

(f) 任意選択で消化物、分離した細胞材料、または細胞懸濁液由来の細胞の少なくとも一部を培養すること；

40

(g) Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19の一つまたは複数を発現する細胞、もしくは細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19の一つまたは複数を発現する細胞の集団、および／またはSOX17とPDX1の両方を発現するその細胞を単離すること、を含む、方法に関する。

【0133】

本明細書で使用される場合、用語「残部」は、粘膜下層が露出されるように、粘膜層が部分的または完全に破壊および／または除去された、組織、その一部、またはその試料を

50

指す。B G S Cなどの所望の多能性細胞は、残りの粘膜下層内に含まれる。

【0134】

一つまたは複数のB G S C、またはB G S Cを含む集団を、対象の十二指腸、その一部、またはその試料から単離する方法の一部の実施形態では、除去工程は、乳化剤および／または界面活性剤の使用を含む、化学破壊によって行われる。一部の実施形態では、消毒または滅菌は、次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて工程（d）で行われる。一部の実施形態では、消化は酵素的に行われる。一つまたは複数のB G S CまたはB G S Cを含む集団を単離する方法の一部の実施形態では、除去または溶解工程後の残部は、粘膜下層を含み、消化された残部は、組織断片を含む。一つまたは複数のB G S CまたはB G S Cを含む集団を単離する方法の一部の実施形態では、組織もしくは組織部分または試料は、消化工程（e）の前に刻まれる。一つまたは複数のB G S CまたはB G S Cを含む集団を単離する方法の一部の実施形態では、単離工程（f）は、無血清培地、任意選択で、クボタの培地を含む培養条件での培養セレクションを使用して行われる。一つまたは複数のB G S CまたはB G S Cを含む集団を単離する方法の一部の実施形態では、単離工程（f）は、血清を含有する培養条件での培養セレクションを用いて行われる。一つまたは複数のB G S CまたはB G S Cを含む集団を単離する方法の一部の実施形態では、消化工程（e）および／または単離工程（f）は、低付着プレート上で行われる。一つまたは複数のB G S Cを単離する方法の一部の実施形態では、単離された細胞は、スフェロイド、一つまたは複数のオルガノイド、細胞集団、または細胞凝集物を支持または生じる懸濁液または3 D条件下で培養される。

10

20

【0135】

機械的破壊／粘膜切除術は、粘膜層を除去する様々な可能な手法およびツールによって行うことができる。一部の実施形態では、細胞表面層は剥離される。小さなビーズを使用して細胞壁をせん断すること、超音波処理を使用して細胞壁を破壊すること、乳鉢および乳棒による粉碎を使用すること、ブレンダーを使用すること、凍結および解凍サイクルを使用すること、マイクロ波を使用して細胞壁内の結合を破壊すること、およびタンパク質を変性させること、または高圧を使用すること等のような、細胞層の機械的破壊の多くの異なる方法が知られている。

【0136】

一つまたは複数のB G S CまたはB G S Cを含む細胞の集団を単離する方法の一部の実施形態では、除去または分解工程は、レシチン、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ポリソルベート80）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（ポリソルベート40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（ポリソルベート60）、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート（ポリソルベート65）、アンモニウムホスファチド、脂肪酸のナトリウム、カリウムおよびカルシウム塩、脂肪酸のマグネシウム塩、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリド、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの酢酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの乳酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのクエン酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドのモノアセチル酒石酸エステルおよびジアセチル酒石酸エステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドの混合酢酸と酒石酸エステル、脂肪酸のスクロースエステル、スクログリセリド、脂肪酸のポリグリセロールエステル、ポリグリセロールポリリシノレエート、脂肪酸のプロパン-1,2-ジオールエステル、脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリドと相互作用した熱酸化大豆油、ステアロイル-2-ラクチル酸ナトリウム、ステアロイル-2-ラクチル酸カルシウム、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノパルミテートから選択される乳化剤の使用を含む、化学的破壊によって行われる。

30

40

【0137】

一つまたは複数のB G S Cを単離する方法の一部の実施形態では、除去または分解工程

50

は、1-ヘプタンスルホン酸、N-ラウリルサルコシン、ラウリル硫酸塩、1-オクタンスルホン酸およびタウロコール酸、塩化ベンザルコニウム、セチルピリジニウム、塩化メチルベンズトニウム、臭化デカメトニウム、アルキルベタイン、アルキルアミドアルキルベタイン、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アムモニオ-1-プロパンスルホネート、ホスファチジルコリン、N-デシルA-D-グルコピラノシド、N-デシルA-D-マルトピラノシド、N-ドデシルB-D-マルトシド、N-オクチルB-D-グルコピラノシド、N-テトラデシルB-D-マルトシド、トリトン（トリトンX-100）、ノニデット-P-40、ポロキサマー188、ラウリル硫酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、およびドデシル硫酸ナトリウムを含む群から選択される界面活性剤の使用を含む、化学的破壊により行われる。

10

【0138】

一態様では、本開示は、一つまたは複数のBGSCまたはBGSCを含む細胞集団を対象の十二指腸から採取された組織試料から単離する方法であって、

(a) 粘膜層を生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する溶液を、粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で適用すること；

(b) 機械的、外科的および／または化学的方法により粘膜層またはその細胞の少なくとも一部分を除去または溶解し、粘膜下層を含み得る残部を残し、および／または曝露させること；

(c) 残部を病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を実質的にさししょうするか、不活化するか、または除去するための培地または溶液と接触させること；

20

(d) 残部を消化または分離して細胞懸濁液をもたらすこと；

(e) 任意選択で消化物もしくは分離した細胞材料または組織材料由来の細胞の少なくとも一部を培養すること；

(f) 一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する一つまたは複数の多能性細胞、または細胞の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、一つまたは複数の所望のバイオマーカーを発現する細胞の集団を単離すること、を含む、方法に関する。一部の実施形態では、粘液は、粘膜層を生理学的範囲外にある浸透圧特性を有する溶液と粘膜層の細胞に浸透圧ショックを誘発する条件下で接触させる前に、組織もしくは組織部分または試料から除去される。

【0139】

30

別の態様では、本開示は、BGSCを十二指腸、その一部、またはそれから採取された試料から単離する方法であって、

(a) 十二指腸、その一部分、またはそこから採取された試料を消化または分離して、消化物または分離した細胞材料を生じさせること；

(b) 消化または分離した細胞材料から：(i) Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、CK7、Lgr5、NIS、CD44およびCK19の一つまたは複数を発現するこれらの細胞、もしくは細胞の少なくとも一部、実質的な部分、または大部分が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EpCAM、SOX9、CK7、CK7、Lgr5、NIS、CD44、およびCK19を発現する細胞の集団；および／または(ii) SOX17とPDX1の両方を発現するこれらの細胞、もしくは細胞の少なくとも一部、実質的な部分、または大部分が、SOX17とPDX1の両方を発現する細胞の集団を得ること、を含む、方法に関する。

40

【0140】

BGSCまたはBGSCを含む細胞の集団を単離する方法の一部の実施形態では、十二指腸、その一部、それから採取された試料、残部および／あるいは消化物または分離した細胞もしくは組織材料、あるいはその組み合わせは、消毒剤または滅菌媒体、溶液もしくは薬剤と接触される。

【0141】

本明細書で使用される場合、「消毒剤」という用語は、細菌、ウイルスおよび真菌など

50

の病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を破壊するすべての媒体、溶液または薬剤を含むように意図され、また細菌または真菌胞子を殺傷する媒体、溶液または薬剤も含むように意図されている。一部の実施形態では、消毒剤は次亜塩素酸溶液である。一部の実施形態では、消毒剤は、約0.01%～約0.1%の次亜塩素酸ナトリウム、または約0.1%～約0.2%の次亜塩素酸ナトリウムを含む溶液である。一部の実施形態では、消毒剤は、0.01%次亜塩素酸ナトリウム溶液、0.02%次亜塩素酸ナトリウム溶液、0.05%次亜塩素酸ナトリウム溶液、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液、0.15%次亜塩素酸ナトリウム溶液、または0.2%次亜塩素酸ナトリウム溶液である。好ましい実施形態では、消毒剤は0.05%次亜塩素酸ナトリウム溶液である。

【0142】

あるいは、一部の実施形態では、消毒剤は、アルコール、水酸化ナトリウム、アルデヒド、酸化剤、ペルオキシ酸およびペルオキソ酸、フェノール類、四級アンモニウム化合物、無機化合物（塩素、ヨウ素、酸および塩基、金属など）、またはテルペン等を含む群から選択される媒体、溶液または薬剤であってもよい。本明細書で使用される場合、消毒剤はまた、ペニシリン、ポリミキシン、リファマイシン、リピアルマイシン、キノロン、またはスルホンアミドなどの抗生物質を含む。

【0143】

十二指腸、その一部、またはそれから採取された試料を消毒剤または滅菌媒体、溶液または薬剤と接触させることにより、得られたBGSCをもたらし、BGSCを含む細胞の集団は、病原体を実質的に含まず、ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を含まないことは、本開示の知見である。生物学分野の当業者であれば、生物学および化学的現象は、稀、極めて稀に、完了し、および／または完全に進み、または絶対的な結果を達成もしくは回避することを理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、多くの生物学および化学的現象に固有の完全性の可能性のある欠如を拾うために本明細書で使用される。例えば、一部の実施形態では、「病原体が実質的に存在しない、ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物が存在しない」という用語は、病原体ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物の存在が、所望の使用に許容できるか、もしくはBGSCまたはBGSCを含む細胞の集団の所望の使用を妨げないレベル、または一般に公知の方法によって決定される目的の試料において検出できないレベルである状況を指し得る。かかる方法には、例えば、グラム陽性、グラム陰性、好気性および嫌気性細菌についての標準的な無菌検査、マイコプラズマならびにエンドトキシン試験を含む。これは、組織、もしくは組織部分または試料から得られたBGSC以外の細胞または細胞の集団に関連する「病原体が実質的に存在しない、ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物が存在しない」という用語に適用する。

【0144】

したがって、本開示の組成物は、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EPCAM、SOX9、CK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19の一つまたは複数のマーカー、およびSOX17とPDX1の両方を発現している、病原体を実質的に含まない、ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を含まないBGSCまたはBGSCを含む細胞集団を含んでもよい。

【0145】

本開示の組成物はまた、生理学的に許容される媒体と組み合わせた、単離されたBGSCもしくは他の多能性細胞、またはかかる細胞を含む細胞集団を含み得る。本明細書で使用される場合、「生理学的に許容される媒体」という用語は、従来の医薬実施が、ヒト患者などの対象に投与するための医薬組成物を製剤化するため使用する任意の媒体を指す。生理学的に許容可能な媒体は、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、酸化剤、ビタミン、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、および保存剤などの他の補助剤を含有する生理食塩水または等張溶液を含み得る。本発明の組成物は、対象の循環または標的器官もしくは組織

に直接、B G S C または B G S C を含む細胞集団の注入用に製剤化されてもよい。

【0146】

したがって、本開示は、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、N A N O G、E p C A M、S O X 9、C K 7、L g r 5、N I S、C D 4 4、C K 1 9 の一つまたは複数のマーカー、および S O X 1 7 と P D X 1 の両方を発現している、病原体を実質的に含まない、ならびに／または病原性および／もしくは有益な微生物を含まない B G S C または B G S C を含む細胞集団、および生理学的に許容される媒体を含んでもよい。

【0147】

単離したブルナー腺幹／前駆細胞（B G S C）の使用法

10

本明細書に開示される B G S C および／または B G S C を含む細胞の集団は、医療処置における使用が意図されている。

【0148】

例えば、本開示は、肝臓、脾臓、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸および／または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、有効量の B G S C の集団を投与することを含む、方法に関する。

【0149】

一部の実施形態では、本開示は、肝臓、脾臓、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸および／または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態と診断された対象を治療する方法であって、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、N A N O G、E p C A M、S O X 9 および C K 7、L g r 5、N I S、C D 4 4、C K 1 9 からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、および S O X 1 7 と P D X 1 の両方を発現している、B G S C の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分を含む、有効量の細胞の集団の投与を含む、方法に関する。

20

【0150】

別の態様では、本開示は、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、N A N O G、E p C A M、S O X 9 および C K 7、L g r 5、N I S、C D 4 4、C K 1 9 からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、および S O X 1 7 と P D X 1 の両方を発現し、自己再生を指示する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力として特徴付けられる、有効量の B G S C、または B G S C の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団の投与を含む、自己細胞または遺伝子療法に関する。自己細胞または遺伝子療法の一部の実施形態では、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である。

30

【0151】

別の態様では、本開示は、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、N A N O G、E p C A M、S O X 9 および C K 7、L g r 5、N I S、C D 4 4、C K 1 9 からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、および S O X 1 7 と P D X 1 の両方を発現し、自己再生を指示する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力として特徴付けられる、有効量の B G S C、または B G S C の少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分が、十二指腸から単離された幹／前駆細胞の集団の投与を含む、同種細胞または遺伝子療法に関する。同種細胞または遺伝子療法の一部の実施形態では、細胞は、遺伝子操作または改変された細胞である。

40

【0152】

別の態様では、本開示は、肝臓、脾臓、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸および／または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態の治療のため、および／または任意選択で、遺伝子操作または改変されている細胞を用いて自己もしくは同種細胞または遺伝子療法のための使用のための、T r a - 1 - 6 0、T r a - 1 - 8 1、O C T 4、S O X 2、N A N O G、E p C A M、S O X 9 および C K 7、L g r 5、N I S、C D 4 4、C K 1 9 からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、および S O X

50

17とPDx1の両方を発現し、自己再生を指示する培養条件下で、限定的または最小限の分化で増殖する能力として特徴付けられる、BGSCの使用に関する。

【0153】

別の態様では、本開示は、肝臓、膵臓、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸および／または他の内胚葉系組織に関係するか、または影響する疾患または状態の治療のため、および／または任意選択で、遺伝子操作または改変されている細胞を用いて自己もしくは同種細胞または遺伝子療法のための使用のための、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4、SOX2、NANOG、EPCAM、SOX9およびCK7、Lgr5、NIS、CD44、CK19からなる群から選択される一つまたは複数のマーカー、およびSOX17とPDx1の両方を発現している、BGSCの少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分を含む細胞の集団の使用に関する。

10

【0154】

本明細書で使用される場合、対象の疾患を「治療する」または疾患の「治療」は、(1) 疾患の症状がまだ表れていないか、または限られた症状を表す対象に、症状または疾患が発生するのを防ぐこと、(2) 疾患を抑制すること、もしくはその発症を阻止すること、または(3) 疾患の退縮または疾患の症状を改善することまたは引き起こすことを指す。当技術分野で理解されているように、「治療」は、臨床結果を含む、有益または望ましい結果を得るための手法である。本技術の目的のための有益または望ましい結果は、検出可能または検出不能にかかわらず、一つまたは複数の症状の緩和または軽減、改善または休止、状態の程度の減弱（疾患を含む）、状態の状況（疾患を含む）の安定化（すなわち、悪化しない）、状態の遅延または減速（疾患を含む）、状態の進行、改善、または緩和（疾患を含む）、状況および寛解（部分的か全身的か）のうちの一つまたは複数を含むことができるが、これらに限定されない。

20

【0155】

本明細書で使用される場合、「有効な量」または「有効量」という用語は、強調されている疾患または状態を治療するのに十分な量を指す。有効量は、一回または複数回の投与、塗布または用量で投与することができる。このような送達は、個別の投与単位が使用される期間、組成物の生物学的利用性、投与経路などを含む多くの変数に依存する。しかしながら、任意の特定の患者に対する組成物の特定の量は、使用される特定の薬剤の活性、患者の年齢、体重、健康状態、併存疾患、性別、および患者の食事、投与の時間、代謝および／または排泄の速度、組成物の組み合わせ、治療している特定の疾患または状態（例えば、肝臓疾患）の重症度、ならびに投与の形態を含む種々の要因に依存することが理解される。

30

【0156】

開示の実施方法

本明細書の本開示は、i) ヒトおよび／または動物の十二指腸が、多能性または多分化能マーカー、および幹細胞の他のバイオマーカーまたは「幹細胞性」について陽性の内胚葉系幹／前駆細胞の表現型形質を有する、本明細書においてブルナー腺幹／前駆細胞（BGSC）と称される、ブルナー腺を含む、細胞を含有すること、ii) これらの細胞が、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT4およびCK7発現を含むが、これらに限定されない、粘膜陰窩内の腸幹細胞の表現型とは異なる表現型を有すること、iii) BGSCはSOX17とPDx1の両方を発現し、これらの細胞がまた、肝幹細胞（SOX17を発現するがPDx1は発現しない）の表現型、および膵幹細胞（PDx1を発現するがSOX17は発現しない）の表現型とは異なる表現型も有すること、iv) BGSCが、少なくとも一部、粘膜上皮細胞（絨毛および陰窩）を破壊するが、少なくとも一部、粘膜下層を維持する、化学的、機械的および／または外科的手法もしくは方法により単離され得ること、v) BGSCが、それらが、スフェロイド、オルガノイド、細胞凝集物または細胞集団を形成し、成長する能力である、自己再生特性を示し、多分化能を示す、インビトロで選択され得ること、vi) インビボで、BGSCが、組織に生着し、かかる組織に関連する系統に分化することができること、例えば、SCIDマウスの肝臓に生着し

40

50

、成熟肝細胞に向かって分化すること、を示す。

【0157】

ブルンナー腺は、十二指腸の粘膜下層内に位置する固有の粘液腺である。これらの腺は、胃では見いだされず、小腸の他の部分（すなわち、空腸および回腸）でも大腸でも見いだされていない。その主な公知の機能は、胃から出る物質の酸性度から十二指腸粘膜を保護する粘液の生成にある。ブルンナー腺の数は、幽門口から十二指腸空腸の湾曲部に向け徐々に減少し、下側および上行性十二指腸部分ではほぼ消失する。十二指腸壁では、ブルンナー腺は、腸陰窩（または腺）と粘膜筋板により分けられているが、それらとの直接的な解剖学的連続性にある。腸陰窩は、腸の陰窩から絨毛軸に従った、腸上皮の連続的な再生に関与する幹細胞の特定の集団を含む。

10

【0158】

本明細書において提供されるデータは、粘液細胞のそばで、ブルンナー腺が、SOX9、Lgr5、EPCAM、CD44、および／またはSOX17とPDX1の両方などの幹細胞マーカーの特定の群を発現する細胞の集団を有することを確立する。これらの細胞は小さく、わずかな細胞質、高い細胞質対核の比を有し、その表現型は、胚の腹側内胚葉の特性と適合する。さらに、これらの細胞の限定された部分集団（ほぼ5%）は、Oct4A、SOX2、Tra-1-60、およびTra-1-81などの多能性マーカーを発現する。さらに、BGSCは、増殖マーカーPCNAの発現を示し、これにより、その複製活性を示し、これはおそらくムチン産生細胞の複製に関与している。興味深いことに、幹細胞マーカーの発現は、正確に分布し、多能性マーカーは、より深い腺房に位置する細胞で発現され、一方でLgr5およびPCNAは、粘膜筋板近くの細胞内、腸陰窩と連続していた。この分布は、二つの異なるが重複するBGSC集団の存在を示唆し、一方の集団は、原始表現型を有し、静止期であり、粘膜下層内に深く位置し、他方の集団は、一過性の増幅特性を示し、粘膜筋板を横断し、腸陰窩と空間上関連している。しかし、「静止」と一過性増幅性BGSC集団の両方が、腸陰窩の細胞（Lgr5⁺/CK7⁻/CK19⁺/Tra-1-60⁻）と明確に区別する、表現型（Lgr5⁺/-/CK7⁺/CK19⁺/Tra-1-60⁺）を示した。

20

【0159】

本明細書に開示される態様は、表面上皮を少なくとも部分的に除去するための粘膜層の化学的、機械的または外科的破壊を含む工程、粘膜下層を露出させ得る；粘膜下層の消化もしくは分離；本開示において記載されるマーカーを発現する細胞、細胞を含む細胞の集団の単離、残部をそのままにする工程を含む、BGSC、またはBGSCの少なくとも一部、または実質的な部分、または大部分を、ヒト十二指腸から単離するために開発されたアプローチに関するものであり、この方法は、無血清のクボタの培地で維持されたスフェロイド、オルガノイド、細胞凝集物または細胞集団などの培養セレクション条件を含み得る。単離されると、細胞は、インビトロで器官に表される表現型（例えば、Lgr5⁺/-/CK7⁺/CK19⁺/Tra-1-60⁺/多能性遺伝子⁺）と一致し、細胞調製物由来の腸幹細胞の枯渇を確かにする。インビトロでは、BGSCは、スフェロイド、オルガノイド、細胞凝集物または細胞集団として成長し、その未分化の表現型を維持することができ、成熟細胞マーカーの発現は無く、ムチン産生の証拠はない。特筆すべきことに、BGSCは、特定の分化条件に移したときに、少なくとも肝細胞、胆管細胞および内分泌膵臓系統を含む様々な運命に向かって速やかに成熟することができた。

30

【0160】

興味深いことに、過去の報告では、ヒトの胃上皮細胞および十二指腸細胞は、再プログラミングすることなく幹細胞の挙動および多能性を示さなかった（表を参照）ことを示した。本明細書において開示される結果は、対照的に、幹／前駆細胞（BGSC）が、ブルンナー腺を含む、ヒトおよび動物の十二指腸内に見出されることを示す。器官内でのそれらの位置を考慮すると、これらのBGSCまたはこれらのBGSCを含む細胞集団は、本開示に記載される方法を使用して容易に単離可能であり、再プログラミングを必要としないが、内胚系幹／前駆細胞の特性、特徴および能力を本質的に示し、多能性特性を有す

40

50

る。

【0161】

この研究では、成熟内皮運命への分化能が試験されている。例えば、BGSCは、血管経路を介してマウス肝臓に注入されている。

【0162】

肝疾患の分野において、同所性肝移植は、現在、急性肝不全および末期慢性肝疾患に対する唯一の根治療法である。肝臓移植は、器官ドナーの深刻な不足により制限されるため、細胞療法戦略は、器官の割り当てを待っている間に肝機能をサポートする実行可能な代替選択肢を表し得る。しかし、肝疾患に対する再生医療アプローチは、持続可能で、容易に利用可能な細胞供給源の同定を必要とする。

【0163】

本開示は、多能性能力を有する新規の幹細胞微小環境、および適用可能な細胞を出生後の十二指腸から単離する手法を提供する。ヒトBGSCは、ヒトドナーから入手可能な、容易に利用可能な供給源を表す。細胞は、遺伝子リプログラミングまたは大きな操作を必要とせず、リプログラミングされた細胞と比較して、臨床プログラムにおいてより容易に使用可能（かつ潜在的により安全なアプローチ）であるべきである。さらに、これらは、内視鏡検査を使用して回収し、次に、自家または同種細胞および遺伝子治療に使用することができる細胞供給源としての固有の可能性を有する。

【0164】

略語

A F P (A F P)、 α -フェトタンパク質；A L B、アルブミン；B T S C、胆管幹細胞；C D、共通決定因子；C D 4 4、ヒアルロナン受容体；C D 1 3 3、プロミニン；C F T R、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子、c G M P、医薬品適正製造基準；C K、サイトケラチンタンパク質；C X C R 4、C X C-ケモカイン受容体4（フシンまたはC D 1 8 4とも呼ばれ；血小板第4因子とも呼ばれる）；D A P I、6-ジアニジノー2-フェニルインドール；D P B S、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水；E G F、上皮成長因子；E p C A M、上皮細胞接着分子；F B S、ウシ胎児血清（またはF C S、胎児仔牛血清）；F G F、線維芽細胞増殖因子（F G F 1 0は、F G Fの多くの型の一つである）；H B、肝芽球；H D M、ホルモンで定義される培地；H D M-C、細胞を胆管細胞に限定する系統に設計されているH D M；H D M-H、細胞を肝細胞に限定する系統に設計されたH D M；H D M-P、細胞を脾運命に限定する系統に設計されたH D M、H G F、肝細胞成長因子；H p S C、肝幹細胞；I F、免疫蛍光染色；I H C、免疫組織化学；K M、クボタの培地、内胚葉系幹細胞用に設計された無血清培地；K R T、サイトケラチン遺伝子；L g r 5、R-スポンジンに結合するロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体5；M K M、カルシウム、銅、およびb F G Fを添加したクボタの培地からなる改変されたクボタの培地；N A N O G、自己再生に決定的に関与する転写因子；N C A M、神経細胞接着分子；N I S、ナトリウム/ヨウ素共輸送体；O C T 4、（オクタマー結合転写因子4）、P O U 5 F 1（P O Uドメイン、クラス5、転写因子1）としても公知、幹細胞によって発現される遺伝子；P B S、リン酸緩衝生理食塩水；P D X 1、膵臓および十二指腸ホメオボックス1、膵発生に重要な転写因子；P B G、胆管周囲腺、胆管幹細胞の幹細胞微小環境；R M P I、ロズウェルパーク記念研究所—研究所の研究者が確立した様々な基礎培地の頭字語；R T-P C R、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応；S A L L 4、幹細胞の自己再生に重要であると見出されたS a l様タンパク質4；S O X、S r y関連H M Gボックス；S O X 2、自己再生の維持、または胚性幹細胞および決定した幹細胞の多能性に必須である転写因子。S O X 9、内胚葉系組織（肝臓、胆道系および膵臓）と関連する転写因子；S O X 1 7、肝臓の分化に必須の転写因子；V E G F、血管内皮細胞成長因子。

【0165】

材料および方法

ヒト組織ソーシング

10

20

30

40

50

ヒトの十二指腸は、イタリア、ローマ、ローマ・ラ・サピエンツァ大学、一般外科および臓器移植「Paride Stefanini」部の臓器ドナーから採取した。研究目的で組織を使用するというインフォームド・コンセントは、本発明者らの移植プログラムから取得した。プロトコルは、治験審査委員会の承認を得ており、処理は現行の製造管理および品質管理に関する基準（c GMP）を遵守していた。研究プロトコルは、ローマのウンベルト1世総合病院の倫理委員会によって審査され、承認された。

【0166】

培地および溶液

すべての培地は滅菌ろ過し（ $0.22\mu\text{m}$ のフィルター）、使用前は暗所で 4°C に保った。RPMI-1640、すべての細胞培養物の基礎培地、およびウシ胎児血清（FBS）を、GIBCO/Invitrogen社（カールスバッド、カリフォルニア州）から入手した。特に指定がない限り、すべての試薬はSigma社（セントルイス、ミズーリ州）から入手した。成長因子は、記載されているものを除き、R&D Systems社（ミネアポリス、ミネソタ州）から購入した。

【0167】

クボタの培地（KM）は、銅を含まず、低カルシウム（ 0.3mM ）、 10^{-9}M セレン、 0.1% ウシ血清アルブミン（BSA）、 4.5mM ニコチンアミド、 0.1nM 硫酸亜鉛七水和物、 10^{-8}M ヒドロコルチゾン（またはデキサメタゾン）、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のトランスフェリン/Fe、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリン、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 高密度リポタンパク質、および精製ヒト血清アルブミンに結合した添加された脂肪酸の混合物からなる、任意の基礎培地（ここではRPMI 1640である）からなる。その調製の詳細なプロトコルは、肝芽球の明確な培地としてKubotaとReidによって最初に報告された²。その後、クボタの培地は、マウス、げっ歯類、およびヒト肝幹細胞、胆管幹細胞、肝芽細胞、胆嚢由来幹細胞お臍前駆細胞に有効であることが示された^{3~9}。

【0168】

分化研究のため、無血清KMにカルシウム（最終濃度： 0.6mM ）、銅（ 10^{-12}M ）、および $20\text{ng}/\text{mL}$ のbFGFを添加し、改変クボタの培地（MKM）と称した。MKMを基礎として、特定の補助剤と共に使用して、臍島運命（HDM-P）に対して肝臓運命（HDM-H）に向かうBG細胞の選択的分化を誘導するために使用されるホルモンで定義された培地（HDM）を調製した：

- ・肝細胞分化用HDM-Hは、MKMに $7\mu\text{g}/\text{L}$ グルカゴン、 $2\text{g}/\text{L}$ ガラクトース、 1nM トリヨードチロキシン3（T3）、 $10\text{ng}/\text{mL}$ オンコスタチンM（OSM）、 $10\text{ng}/\text{mL}$ 上皮成長因子（EGF）、 $20\text{ng}/\text{mL}$ 肝細胞成長因子（HGF）、および $1\mu\text{M}$ デキサメタゾンを補充して調製した。

- ・臍島細胞分化用HDM-P：ヒドロコルチゾンを含まないMKMに 2% B27、 0.1mM アスコルビン酸、 $0.25\mu\text{M}$ シクロパミン、 $1\mu\text{M}$ レチノイン酸を添加し、最初の4日間bFGFを添加し、次に $50\text{ng}/\text{mL}$ エキセンディン-4および $20\text{ng}/\text{mL}$ HGFで置換した。

【0169】

磁気ソーティング法

細胞は、製造業者（Miltenyi Biotec Inc.、ドイツ）により特定されたプロトコルにより磁気ビーズ免疫選択使用することにより、EpCAMまたはTRA-1-60について選別した。簡潔に述べると、陽性細胞は、EpCAMマイクロビーズ（Miltenyi Biotec Inc.、カタログ番号130-061-101）またはTRA-1-60マイクロビーズ（Miltenyi Biotec Inc.、カタログ番号130-100-832）で磁気標識した。次いで、細胞懸濁液をMACS LSCラム（Miltenyi Biotec Inc.、カタログ番号130-042-401）に装填し、これをMACSセパレーターの磁場に置いた。磁氣的に標識された細胞は、ラム内に保持され、非標識細胞はラムを通過した。磁場からラムを除去した後、磁気で保持された細胞は、正に選択された細胞分画として溶出された。陽性細胞は、前

10

20

30

40

50

述されたように細胞数および細胞生存率により評価された。陽性細胞は、1 ml 当たり 30 万個の細胞の濃度で基底培地に懸濁し、最終細胞懸濁液として使用された。約 20 万個の細胞を含む N. 4 アリコートが、フローサイトメトリーのために収集された。

【0170】

GMP 条件下での細胞分離および無菌性試験

将来の臨床適用のため cGMP 条件下で BG 幹／前駆細胞を製造するために、十二指腸は、「欧州連合における医薬品規制規則」およびヒト使用のための医薬品の製造管理および品質管理に関する基準の欧州ガイドライン (EudraLex - 第 4 巻、製造管理および品質管理に関する基準) に従って処理された。無菌性試験は、cGMP 条件下で「直接接種法」により、ならびにヒトおよび家畜使用のための医薬品の製造管理のガイドラインに従って行われた。

【0171】

細胞培養およびクローン性増殖

十二指腸標本から得られた、分類されていない細胞および分類された細胞 (約 3×10^5 個) を、直径 3 cm のプラスチック培養皿に播種し、10% FBS を含む KM で一晚 (約 12 時間) 維持した。その後、無血清 KM 中で細胞培養物を維持し、少なくとも 2 か月間観察した。クローン性増殖を試験するために、単一細胞懸濁液を得て、自己複製培地である、無血清 KM 中 500 個細胞 / cm^2 のクローン性播種密度で細胞を播種した。

【0172】

オルガノイドの調製および培養

遠心分離後、細胞ペレットは、KM 中に懸濁され、 3×10^5 個の細胞が、直径 2.2 cm の 12 ウェルプラスチック培養皿に置かれ、10% FBS を含む KM 中で一晚 (約 12 時間) 維持され、その後、培養物に、無血清 KM が与えられた。細胞は、KM 中、37°C、大気酸素および 5% CO_2 を有するのインキュベーターで 1 週間培養され、これにより、より多くの細胞集団を得た。7 日後、細胞は、12 ウェルプレートから除去され、細胞のペレットは、冷マトリゲル (Corning Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced、フェノールレッドフリー) 400 μl で包埋された。出願人は、12 ウェルプレート 1 枚当たり 2×10^5 個の細胞を含む、ゲル 400 μl の体積で播種した。重合 (15 分、37°C) 後、ゲルは、オルガノイド培地 500 μl で覆われた。オルガノイド培地は、B27、N2 (Life Technologies 社)、および 1.25 mM N-アセチルシステイン (Sigma-Aldrich 社)、10 nM ガストリン (Sigma-Aldrich 社)、ならびに成長因子: 50 ng/ml EGF (PeproTech 社)、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 組み換えヒト R-スポンジン-1 (PeproTech 社)、100 ng/ml FGF10 (PeproTech 社)、25 ng/ml HGF (PeproTech 社)、10 mM ニコチンアミド (Sigma-Aldrich 社)、5 μM A83-01 (Tocris 社)、および 10 μM フォルスコリン (FSK) を添加した Ad-DMEM/F12 (Life Technologies 社) に基づく。出願人は、オルガノイドのサイズおよび数を顕微鏡で制御しながら、2~3 日毎に培地を交換した。

【0173】

10~14 日後、細胞回収溶液 (Corning 社) および氷冷 PBS を使用して、オルガノイドをマトリゲルから取り出した。培養ゲル中のオルガノイドを、細胞回収溶液 (Corning 社) で緩やかに破壊し、オルガノイドを球全体として保持しながら、マトリゲルを小断片に分解した。次いで、オルガノイドを、穏やかに遠心分離して、管の底に集まったインタクトなオルガノイドを得た。上清の大部分は、ピペットで除去され、オルガノイドペレットは、さらなる分析のため、4% ホルマリンで固定された。

【0174】

陽性対照

NTERA-2 クローン D1 多能性ヒト胚性細胞株 (Sigma Aldrich 社、米国ミズーリ州セントルイス、コード: 01071221) が、フローサイトメトリー、

10

20

30

40

50

細胞培養およびRT-PCR実験のための多能性マーカー（SOX2、OCT4AおよびNANOG）の陽性対照として使用された¹⁰。さらに、ヒトセミノーマ精巣の断片は、多能性マーカーについての免疫組織化学実験の陽性対照として使用されている。

【0175】

ヒト結腸腺癌細胞株（LGC Standards S.r.L、ミラノ、イタリア、コード：ATCC-HTB-38）であるHT-29は、フローサイトメトリーおよびRT-PCR実験用のLgr5抗体の陽性対照として使用された。正常な膵島細胞は、膵島分化についての実験の対照として使用されており、米国カリフォルニア州アーバインのProdoLab社から購入された（HIR-001）。

【0176】

初代ヒト肝細胞（Clonetics（商標）Human Hepatocyte Cell Systems NHEPS（商標）細胞、コード：CC-2591S）は、Lonza社（スイス、バーゼル）から購入され、肝細胞分化についての実験の陽性対照として使用されている。

【0177】

正常な膵島細胞は、膵島分化についての実験の対照として使用されており、米国カリフォルニア州アーバインのProdoLab社から購入された（HIR-001）。

【0178】

光学顕微鏡法（LM）、免疫組織化学染色（IHC）、免疫蛍光染色（IF）

標本は、10%緩衝ホルマリンで2～4時間固定され、低温流動パラフィン（55～57℃）に包埋され、3～4μmの切片が、標準的なプロトコルに従って、ヘマトキシリン・エオシンおよびシリウスレッド／ファストグリーンで染色された。IHCについて、内因性ペルオキシダーゼ活性は、メタノール過酸化水素（2.5%）で30分間のインキュベーションによりブロックされた。ベンダーによって示されるように、プロテイナーゼK（Dako社、コードS3020）を室温で10分間適用することにより、抗原が回収された。次いで、切片は、一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートされた（補足表1）。試料は、PBSで5分間2回すすがれ、二次ビオチン化抗体（LSAB+System-HRP、Dako社、コードK0690；Glostrup、デンマーク）と共に、次いでストレプトアビジン-HRP（LSAB+System-HRP、Dako社、コードK0690）と共に室温で20分間インキュベートされた。ジアミノベンジジン（Dako社）は、基質として使用され、切片は、ヘマトキシリンで対比染色された。細胞培養物での免疫蛍光染色について、スライドチャンバーは、室温で10分間アセトン中で固定され、次いで、PBS-Tween20ですすがれた。非特異的なタンパク質結合は、5%正常ヤギ血清によってブロッキングされた。固定した細胞は、一次抗体と共にインキュベートされた。次に、細胞は、洗浄され、標識されたアイソタイプ特異的二次抗体（抗マウスAlexaFluor-546、抗マウスAlexaFluor-488、抗ウサギAlexaFluor-488、抗体ヤギAlexaFluor-546、Invitrogen、Life Technologies Ltd社、Paisley、英国）と共に1時間インキュベートされ、細胞核の視覚化のため4,6-ジアミジノー2-フェニルインドール（DAPI）で対比染色された。すべての免疫反応について、陰性対照も含まれ、一次抗体を免疫前血清で置換することからなる。切片は、Jenoptik ProgRes C10 Plus Videocam（Jena、ドイツ）を装備した、Leica Microsystems DM 4500 B光学および蛍光顕微鏡（Wetzlar、ドイツ）によってコード化された方法で調べられた。IF染色はまた、共焦点顕微鏡（Leica TCS-SP2）によって解析された。LM、IHCおよびIFは、画像解析システム（IAS - Delta Sistemi、ローマ、イタリア）で処理され、盲検法で二人の研究者によって独立して行われた。

【0179】

BGが占める領域は、画像解析システム（IAS-Delta Sistemi、ローマ-イタリア）により評価された。これを使用して、出願人は、BGが占める体積が、腺

10

20

30

40

50

房が占める総面積として計算され、総十二指腸粘膜下層に対する割合として表されると決定した。すべてのカウントは、各スライドについて六つの重複しないフィールド（倍率×20）で行われ、各標本から少なくとも三つの異なるスライドが採取された。

【0180】

IHC／IF染色のため、各スライド／培養物について、陽性細胞数は、六つの重複しないフィールド（倍率×20）で無作為に盲検でカウントされ、データは%陽性細胞として表される。IF染色は、デジタルスキャナ（Aperio Scanscope FL System、Aperio Technologies、Inc社、オックスフォード、英国）によって走査され、ImageScopeによって処理された。画像解析アルゴリズムを使用して、単一蛍光色素分子の陽性ピクセル領域の割合または二つの蛍光色素分子の共局在化領域を定量した。グリコーゲン貯蔵能を試験するために、製造業者の手順に従って、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色システム（Sigma Aldrich、INC社、カタログ番号395）およびα-アミラーゼ（Sigma Aldrich、INC社、カタログ番号A 3176）消化法（PAS染色後）が用いられた。

【0181】

フローサイトメトリー（FC）解析

培養中の細胞は、トリプシン処理され、優しくピペット操作することにより分離され、PBS中約 2×10^5 個細胞/mLで懸濁された。単離された細胞は、蛍光一次抗体またはアイソタイプ対照で標識された。細胞内抗原については、細胞は、4%パラホルムアルデヒド中で固定され、一次抗体とインキュベーションする前に、PBS-サポニン0.5%-FCS10%で透過処理された。一次抗体は、EpCAM（EpCAM-FITC、Miltenyi Biotec Inc.社、カタログ番号130-080-301）、Lgr5（Lgr5-PE、Origene Technologies Inc.社、Rockville、MD、米国、カタログ番号TA400001）、TRA-1-60（TRA-1-60-PE、Miltenyi Biotec Inc.社、カタログ番号130-100-347）を含んでいた。細胞は、BD FACScanto（商標）フローサイトメーター（Becton、Dickinson and Company社、ニュージャージー州、米国）により解析された。1万件の現象が取得され、BD FACSDiva（商標）ソフトウェア（Becton、Dickinson and Company社、NJ、米国）によって解析された。

【0182】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）解析

RNA抽出は、無血清KMで6日間維持され、次に、KMまたはHDMの一つのいずれかでさらに7日間インキュベーション（合計13日間）された組織または培養物で行われた。トータルRNAは、ChomczynskiおよびSacchiの手法により抽出された¹¹。RNAの質および量は、既に記載されたRNA StSens解析チップ（Bio-Rad Laboratories社、ハーキュレス、カリフォルニア州、米国）を備えたExperion自動電気泳動システムRNAを用いて評価された。RNA抽出は、無血清KMで6日間維持され、KMまたはHDMの一つのいずれかでさらに7日間インキュベーション（合計13日間）された培養物で行われた。アルブミン（ALB）、シトクロムP450（CYP3A4）、インスリン（INS）、グルカゴン（GLUC）、PDX-1、SOX17、OCT4A、SOX2、およびNANOG遺伝子の発現は、細胞および組織から抽出されたトータルRNA試料について、閉鎖チューブ（OneStep RT-PCR by Qiagen、ハンプルク、ドイツ）における逆転写およびPCR増幅により行われた。これらの遺伝子は、参照として使用されるGAPDHハウスキーピング遺伝子と同時に増幅された。遺伝子発現は、Experion System（Bio-Rad社、英国）を用いて行われたオンチップキャピラリーマイクロ電気泳動を用いたアンプリコンの定量により測定された。目的の遺伝子の発現は、目的の遺伝子の濃度および参照遺伝子GAPDH（装置によりnmol/Lで報告される）の比によって計算された（補足表2）。

【0183】

正常マウスの肝臓へのBGSCのインビボ移植

5匹のSCID（重症複合免疫不全症）雄マウスは、12時間の明暗サイクルで22℃の平均一定温度で部屋に収容され、標準ペレット固形飼料および水に自由にアクセスした。研究プロトコルは、本発明者らの施設ガイドラインに従って行われた。実験手法は、ローマ・ラ・サピエンツァ大学およびローマのウンベルト1世大学病院のEU指令2010/63/EUの動物実験に関する倫理委員会（Prot. 番号：541）によって承認された。脾動脈を介し肝臓に生理食塩水100μl中のヒトBGSCの懸濁液 2×10^6 を注入した。偽対照マウスは、生理食塩水100μlのみを注入された。全ての動物は、回復まで近くで観察され、食事および水に自由にアクセスできた。死亡例は認められなかった。

10

【0184】

移植1カ月後、動物は、殺され、肝臓が回収された。肝臓断片は、組織学および免疫組織化学用に10%緩衝ホルマリン中に、遺伝子発現解析用にトリゾール試薬中に置かれた。壊死および線維症は、それぞれ、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）およびシリウスレッド染色で評価された。マウス肝臓におけるヒトBGSC生着、およびそれらの分化は、他で記載されたマウス抗原と反応しない抗ヒト抗体（抗ヒトミトコンドリア、抗ヒトHepPar-1、抗ヒトアルブミン）についての免疫組織化学により評価された。免疫組織化学染色（抗ヒトミトコンドリア）されたスライドは、ImageScopeによって処理されたデジタルスキャナ（Aperio Scanscope CS System, Aperio Technologies, Inc社、オクスフォード、英国）によりスキャンされた。画像解析アルゴリズムは、抗ヒトミトコンドリア陽性細胞により占められた面積の割合を定量することであった。

20

【0185】

マウスにおけるヒトアルブミンについてのRT-PCRは、前述された通り行われた。簡潔に述べると、ヒトアルブミン用の特異的プライマー（補足表2）をプログラム可能な特異的配列として設計して、Universal Probe Library Assay Design Center（Roche社）を使用することにより、マウス遺伝子からヒトアルブミン遺伝子の特異的に識別した。

【0186】

統計解析

データは、平均値±標準偏差（SD）で表される。統計解析は、SPSS統計ソフトウェア（SPSS Inc. 社、シカゴ、イリノイ州、米国）により行われた。正規分布でないパラメータの群間差は、Mann-Whitney U検定により試験された。統計学的有意は、 $p < 0.05$ と設定された。

30

【0187】

実施例1—粘膜からの細胞の単離

肝-脾膨大部および脾臓を含むヒトの十二指腸を、イタリア、ローマ、ローマ・ラ・サピエンツァ大学、一般外科および臓器移植「Paride Stefanini」部の臓器ドナーから採取した。研究目的で組織を使用するというインフォームド・コンセントを、本発明者らの移植プログラムを通じて取得した。全ての試料を、19~73歳の成人から採取した。プロトコルを、本発明者らの治験審査委員会の承認を得ており、処理は現行の製造管理および品質管理に関する基準（cGMP）を遵守していた。研究プロトコルは、ローマのウンベルト1世大学病院の倫理委員会によって審査され、承認された。ヒトの十二指腸を、脾臓から慎重に分離し、肝脾管膨大部を含む腸を外科的に摘出した。十二指腸をメスでスライスに切断した。その後、組織試料を前述の通り処理した。簡潔に述べると、組織を、0.1%ウシ血清アルブミン、1nMセレン、抗生物質、I型コラゲナーゼ（300コラーゲン消化単位/ml）（Sigma-Aldrich社、イタリア）、0.3mg/mlデオキシリボヌクレアーゼ（Sigma-Aldrich社、イタリア）を添加したRPMI 1640中、37℃で、30~45分間頻繁に攪拌しながら消化させ

40

50

た。懸濁液を、800ミクロンの金属メッシュフィルター（IDEALE ACLRI9 inoxステンレス鋼）を通して濾過し、270gで10分間遠心分離して、その後、再懸濁した。その後、細胞懸濁液を、100および30ミクロンのメッシュフィルターに連続で通過させ、次に、細胞計数を、Fast-Read 102（Biosigma Srl社、ベネツィア、イタリア）により行い、トリパンプルーアッセイにより細胞生存率（全細胞に対する生細胞の割合%として表示）を測定した。ヒトの十二指腸に用いられた場合、肝臓および胆管に対して既に開発され、活用された同じ方法により、代わりにマクロ凝集物を得た。これらのマクロ凝集物は、常に（N=10）生存不能な単離された細胞を導き、細胞培養物を得るのを不可能にする、コーティングされ、破碎された細胞を含んだ。これは、粘膜上皮細胞から放出される粘液や分解産物で高度に飽和している消化組織の物理的および化学的性質により、手技中に破碎される細胞を取り込んでいる分子ウェブのようなものとなると推測した。実際に、腸から細胞を単離するために動物またはヒトで確立された方法は、粘膜上皮の破壊を回避する。

【0188】

この方法により得られた培養の別の特徴は、頻繁な汚染であった（6/10）。これらの結果から、ブルナー腺を保持し、上述の微生物汚染の問題を回避するために、粘膜上皮を粘膜下層から分離するストラテジーを適合した。四つの異なるストラテジー：1）外科的切開術（N=3）、2）粘膜下での生理食塩水の従前の注入による粘膜切除術（N=3）、3）粘膜の擦過（N=3）、4）粘膜の選択的可溶化（N=10）を試した。全ての方法が、腸管内腔に注入した特定の界面活性剤溶液による十二指腸粘膜の選択的可溶化を除き、非論理的であり、初期方法と同一の結果が得られた。

【0189】

失敗におわり、準最適な単離方法

ヒトの十二指腸を、臍臓から慎重に分離し、肝臓膨大部を含む腸の全体部分を外科的に摘出した。十二指腸をメスでスライスに切断した。その後、組織標本を、0.1%ウシ血清アルブミン、1nMセレン、抗生物質、I型コラゲナーゼ（300コラーゲン消化単位/ml）（Sigma-Aldrich社、イタリア）、0.3mg/mlデオキシリボヌクレアーゼ（Sigma-Aldrich社、イタリア）を添加したRPMI 1640中、37℃で、30~45分間頻繁に攪拌しながら消化させた。懸濁液を、800ミクロンの金属メッシュフィルター（IDEALE ACLRI9 inoxステンレス鋼）を通して濾過し、270gで10分間遠心分離して、その後、再懸濁した。その後、細胞懸濁液を、100および30ミクロンのメッシュフィルターに連続で通過させ、次に、細胞計数を、Fast-Read 102（Biosigma Srl社、ベネツィア、イタリア）により行い、トリパンプルーアッセイにより細胞生存率（全細胞に対する生細胞の割合%として表示）を測定した。

【0190】

ヒトの十二指腸（N=5）で用いた場合、肝臓および胆管に対して以前に開発され、首尾よく利用された同じ方法により、40,816,000個（標準偏差）の細胞を単離し、そのうちの半数のみが、トリパンプルーアッセイによって生存していた（生存率43±12.8%）。生細胞数に関わらず、単離した細胞は、マクロ凝集物が、被覆され、破碎した細胞を含み、細胞死をもたらし、細胞培養を得ることを不可能にすることを明らかにした培養において、接着し、生存できなかった。さらに、この方法により得られた培養物は、常に細菌に汚染されていた（5/5）。

【0191】

この不成功な結果は、粘膜上皮細胞によって放出される粘液および消化産物で高度に飽和した消化した組織の物理的および化学的特性に起因し得、これは、粘膜破片内の細胞の封じ込めにつながり、処置中に粉碎される。

【0192】

別の重要な点は、粘膜層内の腸幹細胞微小環境（腸陰窩）の存在であった。これらの所見を得て、本発明者らは、粘膜上皮を粘膜下層から分離することを決めた。四つの異なる

10

20

30

40

50

ストラテジー：１）外科的切開術（ $N=3$ ）、２）粘膜下での生理食塩水の注入後の粘膜切除術（ $N=3$ ）、３）粘膜の擦過（ $N=3$ ）、および４）粘膜層の選択的可溶化（ $N=10$ ）により、これらを行った。ストラテジー番号１～３は、腸陰窩の存在を伴う粘膜層の部分的除去をもたらしたので、粘膜除去という点で最善のストラテジーは、ストラテジー番号４であった（図１１）。さらに、ストラテジー番号４は、細胞単離および生存率の点で最善のアプローチをもたらした。

【０１９３】

腸管内腔に注入した特定の界面活性剤溶液による十二指腸粘膜の選択的可溶化

臍頭付近で十二指腸を分離後、ペイターの膨大部を全摘し、腸を、外科クランプで挟むことにより、閉鎖した。十二指腸の四肢を開放し、組織を上部から下部に押すことにより、下位の石灰部からそれを絞り出すことにより、腸管粘液を除去した。組織は、可能な限り少ない粘液を含むべきであるので、この部分の操作は非常に重要である。25 mLの血清学的ピペットを使用することにより、蒸留水（Gibco社、イタリア）約200 mLを、上肢の切開部から十二指腸に流し入れ、下肢の切開部を挟んで、水を回収した（図8 A）。その後、約20分間両四肢を挟んで、粘膜上皮細胞に選択的に浸透圧障害を惹起することにより、蒸留水で腸を完全に満たした。この方法で、十二指腸は膨らんで見える（図8 B）。下肢を開き、水を除去した後、25 mLの血清学的ピペットを用いることにより、DPBS（Gibco社）100 mLで2回、十二指腸内を洗浄した。25 mLの血清学的ピペットを使用することにより、DPBS（Gibco社、イタリア）約200 mLを上肢切開部から十二指腸に流し入れた。同様の手順を採用することにより、内部十二指腸を充填し、ホスファチジルコリン（Sigma-Aldrich社、イタリア）0.5 mL、デオキシコール酸（Sigma-Aldrich社、イタリア）20 mg、DPBS（Gibco社、イタリア）99.5 mLからなる界面活性剤溶液（100 mL）で1分間充填を維持した。下腿を開放することにより、溶液を再度除去し、内部の十二指腸を、DPBS 100 mLで洗浄した。最後に、十二指腸を10 cmの無菌ペトリディッシュに移し、縦切開により開いた（図8 C）。

【０１９４】

組織の小さなポリカ（折り目）から粘液を除去するために細心の注意を払いながら、上下ならびに横方向に無菌の外科用メスを使用し、最新の注意を払い、組織の小さな皺襞（折り畳み）から粘液を除去することにより、粘膜のさらなる剥離を行った。DPBS（Gibco社、イタリア）100 mLを含む無菌の容器で、組織を洗浄した。組織を0.05%次亜塩素酸ナトリウム200 mLに数秒間浸漬し、続いてDPBS溶液ですすぐことによって洗浄し、無菌通過させた。次いで、無菌のはさみおよび外科用メスを使用することにより、組織を小片に切断した。粘膜を除去するための機械的および化学的手法の後、標本を収集し、組織形態学的分析のため処理した。その後、組織試料を前述の通り処理した（図8 D）。簡潔に述べると、組織断片を、消化緩衝液を充填した二つのMチューブ（Milteny Biotec社、ドイツ）に集め、振とうした。分離状態の組織に至るために、MACS分離器（Milteny Biotec社、ドイツ）のプログラムを1または2サイクル行った（溶液の不透明度は、非常に小さな組織片の産生とともに記載されるべきである）。消化緩衝液を、34℃まで10分間予め加温した（酵素が最高の効率を持つ温度）。機械的分離後、組織断片を含む溶液を、DTT（Sigma-Aldrich社、イタリア）を含む溶液（以下の組成の詳細を参照）で希釈し、2本の50 mLのFalconチューブに入れた。Falconチューブを、1,300 rpm（300 g）で5分間遠心分離した。ペレットを集め、消化緩衝液150 mLの存在下で75 cmの角型培養フラスコに入れた。フラスコをパラフィルム（Parafilm社、米国）で密封し、消化を制御するために時々振とうしながら、37℃および5%CO₂で約30分間、水加熱器に水平に置いた。その後、フラスコを約10分間垂直に置き、細胞を重力によって沈殿させた。溶液の表面の浮遊上清は、不純物を含み、10 mLの血清学的ピペットを使用して破棄し得る。

【０１９５】

酵素消化後、組織断片を含有する緩衝液を、四つの50mlのFalconチューブに入れた。Falconチューブを、1,300rpm(300g)で5分間遠心分離した。ペレットを二つの50mlのFalconチューブに集め、DTTを含有する溶液(以下の組成の詳細を参照)で希釈し、次いで、チューブを1,300rpm(300g)で5分間遠心分離した。上清を集め、800ミクロンの金属メッシュフィルター(IDEAL ACRLR19 inoxステンレス鋼)上に置き、新鮮な細胞洗浄液で濾過した。ろ液を、無菌容器に集めた。スクレーパーおよびシリンジ(Terumo #SS-20ESS2)のプランジャーを使用して、通過物を濾過し、濾過中に、組織をさらに解体した。得られた懸濁液、平均200mlを、DNase Pulmozyme 2500U/2.5ml(Roche社、イタリア)のバイアル2本で処理した(図8D)。

10

【0196】

胎児十二指腸および成人対象で行った内視鏡十二指腸生検からのBGSCの単離

BGSCを十二指腸生検および胎児器官から単離する方法は、成人の無傷の十二指腸から細胞を得るのに最適化された手法と比較して、あまり複雑ではない。

【0197】

十二指腸生検を、移植および精密医療部での胃カメラ検査中に、球状部のレベルで、鉗子を使用して遠隔で採取した。訓練を受けた消化器専門医が、幅広い疾患についての材料を得るためにこの方法を使用する。内視鏡下で柔軟な内視鏡を用いて、手技を行った。内視鏡は経口で導入した。目視で生検を得て、これにより、動脈も静脈も回避した。収集した生検の組織学的検査により、BGが、球状部から得られた生検には存在するが、遠位十二指腸から得られた生検には存在せず(図15A)、BGが、粘膜筋層のすぐ下の粘膜下層にあることを明らかにした。次に、この手技中に、患者1人当たり、十二指腸球部から二から四つの生検を収集し、細胞を単離するために使用した。

20

【0198】

近位では幽門部のレベルで、遠位ではトライツ靱帯のレベルで切除することにより、胎児の十二指腸を胎児(第18~22週:産婦人科での治療的流産)から回収した。膵臓および膵管内胆管を、肝臓膨大部のレベルでそれらを除去することにより、除去した。

【0199】

続いて、胎児十二指腸全体または十二指腸生検全体を、外科用メスおよびMACS分離器(Miltenyi Biotec社)により、さらに解離させ、300U/ml I型コラーゲン(Sigma Aldrich社)および0.3mg/mlデオキシリボヌクレアーゼ(Sigma Aldrich社)を含む緩衝液中、37℃で20~30分間消化させた。新たに単離した細胞を、磁気ビーズ(Miltenyi biotec社)を使用してTRA1-60陽性細胞について免疫選別した。

30

【0200】

選別により、胎児十二指腸から平均1,200万個の生細胞(N=3)、および十二指腸球状部生検から100,000個の生細胞(N=2)を得た。単離手技の時間は、平均5時間であった。細胞を、1mlあたり100万個の細胞で無菌の10%グルコース溶液に懸濁し、培養前に4℃の制御した温度下で45分間維持した。このプロトコルによる自己複製しているブルンナー腺細胞を、図15Bに示す。すべての手技を、「欧州連合における医薬品規制規則」およびヒト使用のための医薬品の製造管理および品質管理に関する基準の欧州ガイドライン(EudraLex-第4巻、製造管理および品質管理に関する基準)に従って行った。細胞生成物を、グラム陽性、グラム陰性、好気性および嫌気性細菌、真菌、ならびにエンドトキシン試験についての標準的な無菌試験により評価し、TRA1-60(Miltenyi Biotec社、ヒト、希釈率1:50)のフローサイトメトリー(FC)により直ちに特徴付けた。

40

【0201】

実施例2-組織および細胞の特徴決定

ヒト十二指腸組織での研究

成人のヒト十二指腸の粘膜(N=10)を、腸内絨毛まで隆起させ、横に切断され、固

50

有層内深くで観察される、腸の腺（陰窩）で折り畳んだ（図1A）。十二指腸の近位部（上部および下行部）では、粘膜下層は、腺要素（十二指腸腺またはブルンナー腺：BG）を含有し、これは、まとめると、 $9.95 \pm 2.68\%$ の粘膜下層面積および $4.62 \pm 1.93\%$ の全壁面積を占めた。BGは、主にPAS陽性粘液細胞から構成された（図1A）。BGは、粘膜筋板を介して腸陰窩と解剖学的に連続している。粘膜の粘膜固有層内に位置するBG腺房はほとんどなく、腸陰窩と連続していた（図1A）。十二指腸の遠位部（下部および上行部）では、BGは徐々に消失し、下部では腺成分がほとんどみられず（20倍の視野に約1個）、上行部にはほとんど腺が認められなかった。

【0202】

ヒト十二指腸では、免疫組織化学的解析により、BG細胞および腸陰窩が、部分的に表現型形質を共有することを示した。サイトケラチン発現に関しては、腸陰窩とBGの両方が、CK19陽性であり、対照的に、CK7は、一部のBG細胞によって特異的に発現されたが、腸の腺によっては発現されなかった（図1Bおよび図9）。腸の腺とBGの両方が、SOX9（内胚葉系幹細胞のマーカー、図1C）を発現する細胞を含んでおり、BGでは、SOX9は、同一細胞内でCK7と共発現した。

【0203】

さらに、腸の腺およびBGは、増殖マーカーであるPCNA、およびCD44、EpCAM、およびLgr5などのいくつかの他の幹／前駆細胞マーカーを発現している細胞を含有していた（図2A）。BGでは、Lgr5はSOX9と共局在し、その発現は、粘膜筋板の内部に位置する腺房においてより高く、粘膜下層内のより深い層に位置する腺房においてよりも腸陰窩と連続していた（図10A）。

【0204】

BG細胞の亜集団は、多能性マーカーを発現した（図2）。興味深いことに、Tra-1-60およびTra-1-81は、BG細胞によって発現されたが、腸陰窩内の細胞によっては発現されなかった（図2A）。Tra-1-60は、同じBG細胞においてSOX2およびOct4Aと共局在化した（図2B）。最後に、BGは、NISを発現する細胞を含み、これは腸陰窩によっても発現された（図10B）。

【0205】

要約すると、幹／前駆細胞マーカー発現の半定量的解析により、BGが、 $SOX9^+$ （ $9.12\% \pm 3.30$ ）細胞および増殖細胞（ $PCNA^+$ ： $4.82\% \pm 1.33$ ）から構成された微小環境を含むことが明らかになった。さらに、BGの微小環境は、Lgr5（ $4.76\% \pm 1.04$ ）、EpCAM（ $8.80\% \pm 0.65$ ）などの内胚葉系幹細胞形質を発現する細胞を含有し、細胞のほぼ5%が、Tra-1-60、Tra-1-81、Oct4A、およびSOX2などの多能性マーカーを発現していた。興味深いことに、 $PCNA^+ / SOX9^+ / Lgr5^+$ 細胞は、粘膜下層のより深くに位置するもの（ $SOX9^+ / Lgr5^+$ ： $4.80\% \pm 1.50$ ； $PCNA^+$ ： $0.98\% \pm 0.62$ ； $p < 0.05$ ）においてより、腸の腺と直接的に連続性の腺房においてより多かった（ $SOX9^+ / Lgr5^+$ ： $11.80\% \pm 4.40$ ； $PCNA^+$ ： $5.95\% \pm 2.25$ ； $p < 0.05$ ）。対照的に、多能性細胞は、粘膜下層内のより深い位置に位置する腺房においてより多かった。

【0206】

げっ歯類十二指腸組織における研究

ヒトにおいて同様に、げっ歯類の十二指腸は、粘膜下に位置した、粘液腺を含んでいた。げっ歯類SGは、完全な粘膜筋層を含まない腸陰窩と直接関連していた。それらは、粘液含有量により、その透明な細胞質のおかげで、陰窩と区別可能であった（図13A）。SGは、げっ歯類十二指腸近位部に限定した。SOX9およびPCNAの発現を研究したとき、 $SOX9^+$ 細胞はSG内に存在し、一方、 $PCNA^+$ 細胞は、主に陰窩に位置し（ $26.1 \pm 5.7\%$ ）、少数のSG細胞のみがPCNA陽性であった（ $6.7 \pm 2.2\%$ 、陰窩に対して $p < 0.01$ ）。十二指腸SGおよび陰窩はまた、CK19発現に関して異なっており、前者はほぼ陰性であり、後者は陽性であった（図13A）。マウス空腸で

10

20

30

40

50

は、陰窩は、SOX9+、PCNA+、およびCk19+である細胞を含有していた（図13B）。この表現型特性およびSG内のPCNA+細胞の割合の低さに基づき、本発明者らは、Krt19CreTdTomatoLSLマウス系統追跡モデルを導入して、SG複製が、十二指腸陰窩内のCk19+/PCNA+細胞から進んだかどうかを評価した。まず、空腸を解析して、腸陰窩における組み換え効率を推定した（図13C）。td-Tomato（Td-Tom）陽性の陰窩の割合は、 $72 \pm 6\%$ であり、陰性の陰窩は、陽性の陰窩の横に位置していた。td-Tom+陰窩の上の絨毛は、常にtd-Tom陽性となり、一方、これにより、td-Tom-陰窩の直ぐ上の縦横は、td-Tom陰性であった。マウスの十二指腸を調べたとき、Ck19-SGはほとんど全てが130td-Tom+陰窩のすぐ下に位置する細胞を含めtd6-Tom-であり（図13C）、一貫して、SG内のPCNA+細胞およびSOX9+細胞は、td-Tom-であった（図13D）。まとめると、これらのデータは、げっ歯類SGにおける細胞増殖率が、十二指腸陰窩と比較して低いことを示している。さらに、生理学的条件では、SG複製は、十二指腸陰窩細胞によって支持されず、SG中のSOX9+およびPCNA+細胞は、Ck19+陰窩細胞から誘導されない。

【0207】

成功したBGSC単離および培養法

実施例1の十二指腸組織の化学的および機械的処理の後、粘膜層の表面上皮およびほぼすべての陰窩を除去し、一方、固有層および粘膜筋板の結合組織は残存した（図3A）。これにより、粘膜筋板の下、および粘膜下層内の海場字学的位置のおかげで、BGの保存を可能にし、従って、BGは無傷なままであり、それらのCK7+（図3B）、Tra-1-60+（図3C）、およびSOX9+（示していない）細胞を保持した。

【0208】

十二指腸粘膜下層は、方法に記載されるようにさらに処理され、生存率 $>80\%$ （ $85 \pm 5\%$ ）で約 350 ± 1 億個の細胞を単離した。FCは、新たに単離した細胞の $40.0 \pm 18.5\%$ がEpCAM+であったことを示した。細胞をEpCAMに対して免疫選別したとき、細胞集団は、 $70.3 \pm 19.3\%$ のEpCAM+細胞に濃縮し（選別前に対して $p < 0.05$ ）、そのうちこれらの細胞の $46.3\% \pm 7.3$ 個がまた、Lgr5+であった（図4A）。十二指腸から単離した細胞も、Tra-1-60発現についてフローサイトメトリー（FC）により調べた。FCは、新たに単離した細胞の $5.8 \pm 1.6\%$ がTra-1-60+であったことを示した。細胞をTra-1-60に対して免疫選別したとき、細胞集団は、 $30.4 \pm 19.8\%$ のTra-1-60+細胞に濃縮し（選別前に対して $p < 0.05$ ）、Tra-1-60+細胞の $7.3\% \pm 4.2$ も、EpCAM+であった（代表的な散布図を図4Bに示す）。磁気免疫選別の後、汚染している細胞集団を、プラスチック上およびオルガノイドとしての二つの異なる培養セクションアプローチによってさらに除去した。最初に、単一細胞懸濁液を得て、無血清クボタの培地中のプラスチック上500個の細胞/cm²のクローン性播種密度で播種し、培地により、内胚葉系幹/前駆細胞の生存および自己複製が可能になるが、成熟細胞の生存および自己複製は可能ではなく、間葉系細胞の生存または自己複製のいずれかはかろうではない。これらの条件下で、Tra-1-60+細胞のみが増殖可能であり（図4C）、1~2日の遅延期後に増殖し始め、6~8日間培養後に10~15個の細胞の小さな集団を形成した（図4C）。14日後、大きなコロニーを観察した（図4C）。各コロニーは、高い細胞質対核の比を有する、小さく（直径= $12.06 \pm 5.76 \mu\text{m}$ ）、密集した、均一の細胞により主に形成された。自己複製培養条件は、BTSCについての培養セクションで前述した通り、ほぼすべての間葉系細胞（示していない）の消失をもたらした。第二に、オルガノイド形成用に調整した培養条件において、単一のBGSCは、大きさおよび数がさらに拡大した球状構造として自己組織化を開始した。一般に、オルガノイドは、培養3~5日後に視認でき、その平均直径は、約13~14日以内に $2.3 \pm 5 \text{ mm}$ に達した。オルガノイド形成は、オルガノイドを形成する優性細胞表現型を表すTra-1-60+細胞の濃縮を決定した（図4D）。

【0209】

BGSCの2DコロニーおよびBGSC由来オルガノイドの表現型特性

プラスチック上およびKM（自己複製条件、図5A）において、表現型解析は、どのように培養物が、CK7、SOX9、EpCAM、Lgr5、および多能性マーカー（SOX2、Tra-1-60、Tra-1-81）を発現する細胞から構成されるかを示した。

【0210】

平行して、オルガノイド（図5B）は、CK7⁺およびCK19⁺細胞から構成され、オルガノイド細胞が、内胚葉系幹細胞（EpCAM、Pdx1）ならびに多能性マーカー（Oct4AおよびTra-1-60）のマーカーを発現した。オルガノイドは、PAS陰性（杯細胞特性）であり、ビリジン、CFTR、アルブミン、Hep-Par1、およびインスリンなどのいくつかの成熟細胞マーカーが陰性であった（データは示していない）。

10

【0211】

BGSC表現型を、RT-PCRによってさらに調べ、適切な正の対照との比較により、プラスチック上およびオルガノイド中の単層のBGSCが、内胚葉のバイオマーカー（例えば、EpCAM、SOX17、およびPDX1、図5C）および多能性（例えば、SOX2、OCT4A、およびNANOG、図5D）遺伝子が発現したことを明らかにした。これらの条件では、肝細胞系統のマーカー（すなわち、アルブミン）、胆管細胞系統のマーカー（すなわち、CFTR）、およびβ-膵臓細胞系統のマーカー（すなわち、インスリン）について、細胞はほぼ陰性であった（データは示されていない）。

20

【0212】

BGSCのインビトロでの分化能

BGから単離した細胞の分化能は、肝臓（HDM-H）または内分泌膵臓（HDM-P）系統への分化を誘発するように特異的に調整した別個の培地へとそれらに移すことによって評価した。

【0213】

HDM-Hにおいて7～14日後（図6A）、大部分の細胞の形態は、小さい紡糸形細胞から多角形（立方体）形細胞に顕著に変化した。これらの細胞は、凝集して多細胞コートを形成し、KMで培養した細胞と比較して直径が長く（ $p < 0.01$ ）、細胞サイズは、正常な二倍体である成体ヒト肝細胞の細胞サイズと一致した。IFは、これらの大きな多角形細胞がアルブミンを発現したことを示した（図6A）。さらに、PAS染色は、HDM-H中のPAS陽性細胞の存在を示した（図6A）が、KMでの細胞では存在せず（示していない）、α-アミラーゼによる消化後、目に見えるPAS染色は検出できなかった（示していない）。これは、HDM-H中で培養した細胞のグリコーゲン貯蔵能を支持した。RT-PCR解析（図6A）は、KMの細胞と比較したとき、HDM-Hでの細胞が、アルブミン（約2倍）、トランスフェリン（中間またはゾーン2； > 100 倍）、およびCYP3A4（薬物代謝、後期またはゾーン3遺伝子； > 100 倍）遺伝子を含む肝細胞特異的遺伝子の発現を増加させたことを示した。

30

【0214】

HDM-Pで14日間後、膵島様構造を観察し、これらの構造は、Ngn3およびインスリンを発現する密集した細胞から構成された（図6B）。HDM-Pでの7日後、RT-PCR解析により、インスリンおよびグルカゴン遺伝子発現ではなく、PDX1発現が、KMでの細胞における知見と比較して増加したことを示した（図12）。HDM-Pでの14日後、KMでの細胞についてのものと比較して、PDX1、インスリンおよびグルカゴン遺伝子発現の有意な増加を検出した（図6B）。

40

【0215】

Tra-1-60+十二指腸SG細胞を、インビトロでβ-膵臓運命に直ぐに限定することができ、SGは、インビボでインスリン発現細胞を自発的に生成することができる。十二指腸SGから単離した細胞のインビトロ分化能を、それらを調整した培地（PM）に移して、内分泌膵島系統への分化を誘導することにより評価した。PMでの7日後、稀な膵島様構造の存在を、観察し（1回の培養当たり 1.4 ± 0.5 ）（図14A）、RT-

50

PCR解析により、インスリン遺伝子ではなく、PDX1遺伝子が、KMと比較してPMでアップレギュレートされたことを示した。並行して、膵島様構造は、免疫蛍光分析によって決定したように、PDX1の発現を示したが、インスリンの発現は示されなかった（図14B）。PMでの14日後、膵島様構造の数は、7日間と比較して有意に増加した（1回の培養あたり 4.8 ± 0.8 、 $p < 0.01$ ）。PDX1遺伝子発現は、KMと比較して14日間のPMで高かったが、RT-PCR解析に基づき、7日間のPMと比較して低かった（図14B）。インスリンおよびグルカゴン遺伝子発現は、14日で著しく増加した（図14C）、対照として使用した膵島のレベルに達する。14日後、インスリン+およびグルカゴン+細胞は、膵島様構造で出現した（図14C）。

【0216】

十二指腸SG細胞のインビボで内分泌系膵運命に運命付ける能力を研究するために、本発明者らは、マウスにおいて実験的に誘導した糖尿病が、特定の膵臓形質の取得を誘発し得るかどうかを調べた。したがって、二つの異なるストレプトゾトシン（STZ）モデルを研究した。高用量STZモデルを、血糖レベルの急激な増大および高い死亡率により特徴付ける。低用量STZモデルは、グリセミアのより緩徐で目立たない増加および生存期間の延長を示し、これにより、観察時間が延長した。マウスを高いSTZ用量で処置し、14日後に殺したとき、対照と比較して、十二指腸SG程度が、増加した（図14D）。さらに、より高い割合のSG細胞が、対照と比較して、PCNA、PDX1およびNGN3を発現した（図14E~F）。最後に、対照では観察されなかったが、2/5のSTZ処置マウスでは、インスリン+およびグルカゴン+細胞を、十二指腸SG内で観察した（図14E~F）。しかし、血糖特性との相関は認められなかった。これらのデータは、膵臓内分泌運命と関連する遺伝子の発現の増加を特徴とする、げっ歯類十二指腸由来の標本のRT-PCR分析と一致した（図14G）。低いSTZ用量を投与したとき、これらの特性は、出現しなかった（データは示していない）。最後に、2型糖尿病（T2D）を患う患者から得たヒト十二指腸におけるインスリン発現を研究した。稀な（<5%）インスリン+細胞は、T2D患者由来の十二指腸SGには見られるが、正常対象由来のものでは見られなかった（図14H）。

【0217】

未分化ヒトBGSCのマウス肝臓へのインビボ移植

BGSCが、インビボで成熟肝細胞を生成する能力を、血管経路を通じた注射（脾臓注射）を介して、SCIDマウスの肝臓への移植により調べた。これまでに報告されたように、ヒト抗原（すなわち、抗ヒトミトコンドリア、抗ヒト核、抗ヒトアルブミン、および抗ヒトHepPar-1）とのみ反応する特異的抗体についての免疫染色により、BGSCの生着を評価した。細胞注入の1ヵ月後、マウス肝臓内でヒト（h）ミトコンドリア+細胞を観察し（図7A）、陽性細胞は、主に門脈腔の周囲に位置し、一部の細胞も小葉中心位方向に拡大した。注射したマウスでは、宿主肝細胞のほぼ $5.1 \pm 1.3\%$ を、ヒト抗原+細胞により表した（図7B）。さらに、h-ミトコンドリア+生着細胞は、アルブミン（図7D）およびHepPar-1（図7E）なるの成熟肝細胞マーカー陽性であった。稀に、抗ヒト核陽性細胞を、小葉間胆管内で観察した。これらの細胞は、CK19陽性であった（データは示していない）。

【0218】

移植したhBGSCの効果的な生着および分化を確認するために、出願人は、マウス肝臓におけるヒトアルブミンmRNA発現をさらに調べた。ヒトアルブミンmRNAは、注射したマウスから回収した肝臓で測定可能であった（図7C）が、偽対象マウス（生理食塩水を注入）では検出しなかった。

参考文献

Kubota, H. & Reid, L. M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I an

10

20

30

40

50

tigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97, 12132–12137 (2000).

Furth, M. E., et al. Stem Cell Populations Giving Rise to Liver, Biliary Tree and Pancreas. in *The Stem Cells Handbook*, 2nd Edition (ed. Sell, S.) 75–126 (Springer Science Publishers, NY, NY, NYC, NY, 2013).

Harrill, J. A., et al. Lineage Dependent Effects of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists Contribute to Liver Tumorigenesis. *Hepatology* 61 548–560 (2015).

Lanzoni G, Cardinale V, Carpino G. The hepatic, biliary, and pancreatic network of stem/progenitor cell niches in humans: A new reference frame for disease and regeneration. *Hepatology* 2016; 64: 277–286.

Dipaola F, Shivakumar P, Pfister J, Walters S, Sabla G, Bezerra JA. Identification of intramural epithelial networks linked to peribiliary glands that express progenitor cell markers and proliferate after injury in mice. *Hepatology* 2013; 58: 1486–1496.

Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Cui CB, Gatto M, Rossi M, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology* 2011; 54: 2159–2172.

Carpino G, Cardinale V, Onori P, Franchitto A, Berloco PB, Rossi M, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J Anat* 2012; 220: 186–199.

Carpino G, Renzi A, Cardinale V, Franchitto A, Onori P, Overi D, et al. Progenitor cell niches in the human pancreatic duct system and associated pancreatic duct glands: an anatomical and immunophenotyping study. *J Anat* 2016; 228: 474–486.

Carpino G, Cardinale V, Gentile R, Onori P, Semeraro R, Franchitto A, et al. Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder. *J Hepatol* 2014; 60: 1194–1202.

Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y, Cui CB, Carpino G, Cardinale V, et al. Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. *Stem Cells* 2013; 31: 2047–2060.

10

20

30

40

50

- Wang Y, Lanzoni G, Carpino G, Cui CB, Dominguez-Bendala J, Wauthier E, et al. Biliary tree stem cells, precursors to pancreatic committed progenitors: Evidence for possible life-long pancreatic organogenesis. *Stem Cells* 2013;31:1966–1979.
- Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Mendel G, Alpini G, Gaudio E, et al. The biliary tree—a reservoir of multipotent stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:231–240. 10
- Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008;322:1490–1494.
- Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. *Development* 2015;142:3126–3137.
- Semeraro R, Carpino G, Cardinale V, Onori P, Gentile R, Cantafora A, et al. Multipotent stem/progenitor cells in the human foetal biliary tree. *J Hepatol* 2012;57:987–994. 20
- Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc* 2016;11:1724–1743.
- Onori P, Alvaro D, Floreani AR, Mancino MG, Franchitto A, Guido M, et al. Activation of the IGF1 system characterizes cholangiocyte survival during progression of primary biliary cirrhosis. *J Histochem Cytochem* 2007;55:327–334. 30
- Carpino G, Puca R, Cardinale V, Renzi A, Scafetta G, Nevi L, et al. Peribiliary Glands as a Niche of Extrapancreatic Precursors Yielding Insulin-Producing Cells in Experimental and Human Diabetes. *Stem Cells* 2016;34:1332–1342.
- Della Corte C, Carpino G, De Vito R, De Stefanis C, Alisi A, Cianfarani S, et al. Docosahexanoic Acid Plus Vitamin D Treatment Improves Features of NAFLD in Children with Serum Vitamin D Deficiency: Results from a Single Centre Trial. *PLoS One* 2016;11:e0168216. 40
- Carpino G, Pastori D, Baratta F, Overi D, Labbadia G, Polimeni L, et al. PNPLA3 variant and portal/periportal histological pattern in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a possible role for oxidative stress. *Sci Rep* 2017;7:15756. 50

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1:581-585.

Weiss TS, Lichtenauer M, Kirchner S, Stock P, Aurich H, Christ B, et al. Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Gut* 2008;57:1129-1138.

Woo DH, Kim SK, Lim HJ, Heo J, Park HS, Kang GY, et al. Direct and indirect contribution of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells to liver repair in mice. *Gastroenterology* 2012;142:602-611.

10

Nevi L, Cardinale V, Carpino G, Costantini D, Di Matteo S, Cantafora A, et al. Cryopreservation protocol for human biliary tree stem/progenitors, hepatic and pancreatic precursors. *Sci Rep* 2017;7:6080.

Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MM, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 2015;160:299-312. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007;204:1973-1987.

20

Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, et al. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;364:1795-1806. Riccio M, Carnevale G, Cardinale V, Gibellini L, De Biasi S, Pisciotto A, et al. Fas/Fas ligand apoptosis pathway underlies immunomodulatory properties of Human Biliary Tree Stem/Progenitor Cells. *J Hepatol* 2014;61:1097-1105.

30

Hughes NR, Bhathal PS, Francis DM. Phenotypic identity of gastric mucous neck cells and mucous cells of cardiac, pyloric, and Brunner's glands. *J Clin Pathol* 1994;47:53-57. Krause WJ. Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile. *Prog Histochem Cytochem* 2000;35:259-367.

40

Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 2013;154:274-284.

Stevens ML, Chaturvedi P, Rankin SA, Macdonald M, Jagannathan S, Yukawa M, et al. Genomic integration of Wnt/beta-catenin and BMP/Smad1 signaling coordinates foregut and hi

50

ndgut transcriptional programs. Development 2017;144:1283–1295.

Wang Y, Qin J, Wang S, Zhang W, Duan J, Zhang J, et al. Conversion of Human Gastric Epithelial Cells to Multipotent Endodermal Progenitors using Defined Small Molecules. Cell Stem Cell 2016;19:449–461.

Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. Gastroenterology 2009;137:62–79.

10

Udager A, Prakash A, Gumucio DL. Dividing the tubular gut: generation of organ boundaries at the pylorus. Prog Mol Biol Transl Sci 2010;96:35–62.

Wandzioch E, Zaret KS. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. Science 2009;324:1707–1710.

Burke ZD, Tosh D. Ontogenesis of hepatic and pancreatic stem cells. Stem Cell Rev 2012;8:586–596.

20

Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. J Hepatol 2015;62:S157–169.

Hannoun Z, Steichen C, Dianat N, Weber A, Dubart-Kupperschmitt A. The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. J Hepatol 2016;65:182–199.

30

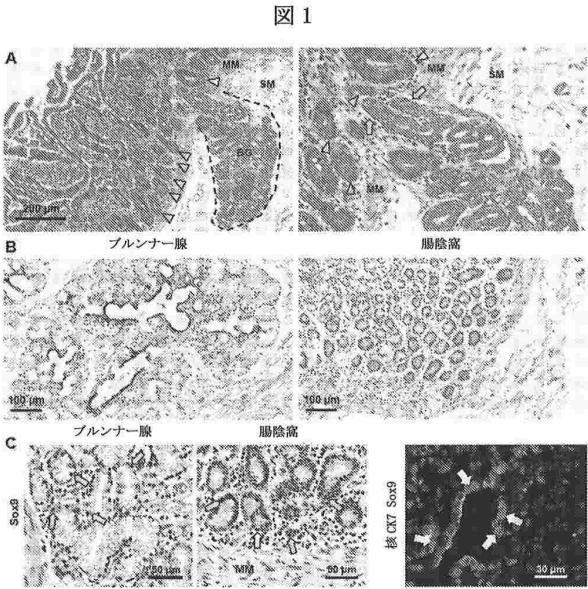
Reid LM. Stem/progenitor cells and reprogramming (plasticity) mechanisms in liver, biliary tree, and pancreas. Hepatology 2016;64:4–7.

Rezvani M, Grimm AA, Willenbring H. Assessing the therapeutic potential of lab-made hepatocytes. Hepatology 2016;64:287–294.

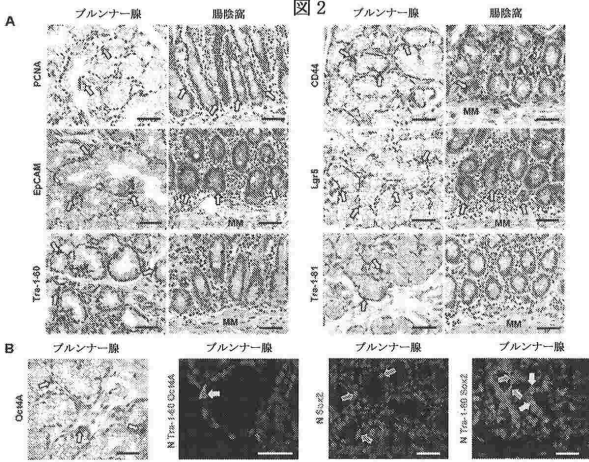
40

50

【図面】
【図 1】



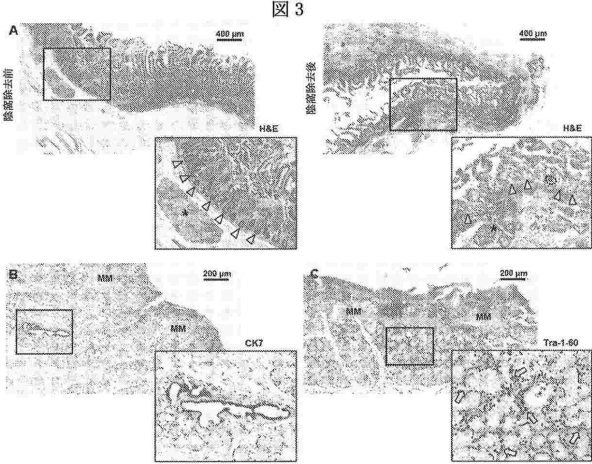
【図 2】



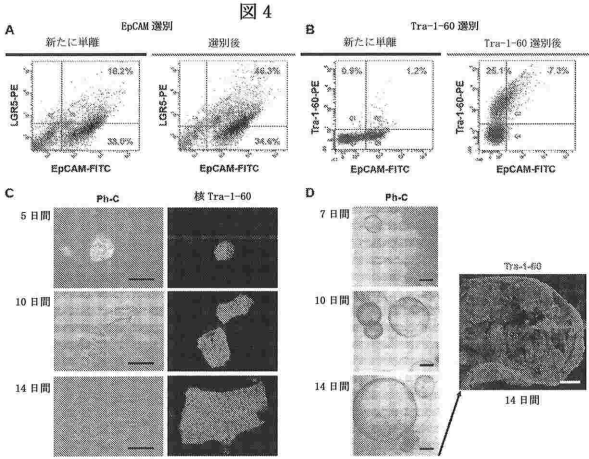
10

20

【図 3】



【図 4】

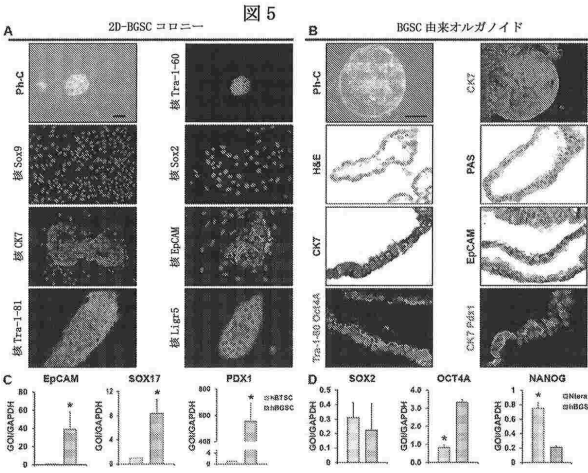


30

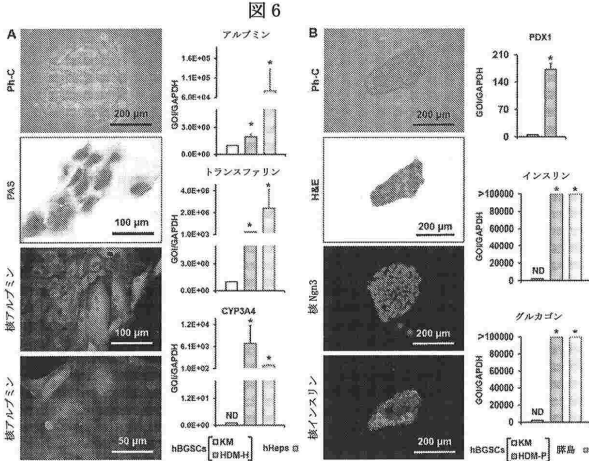
40

50

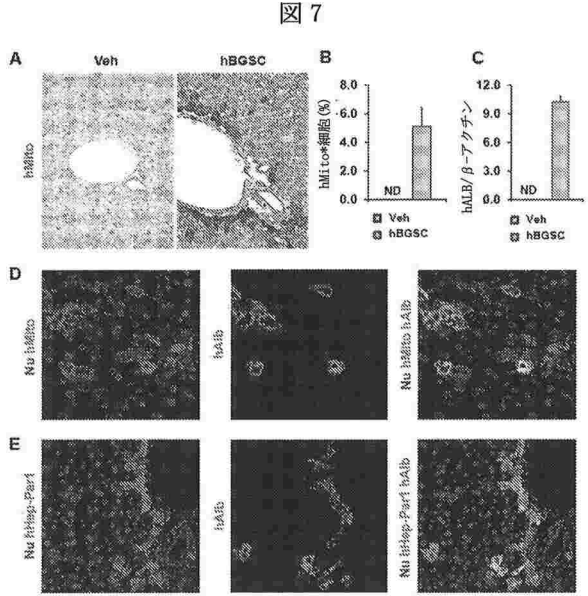
【図 5】



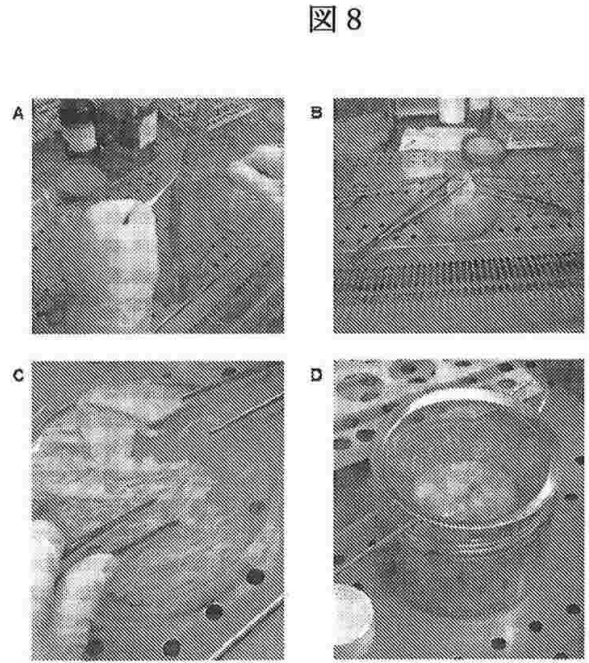
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

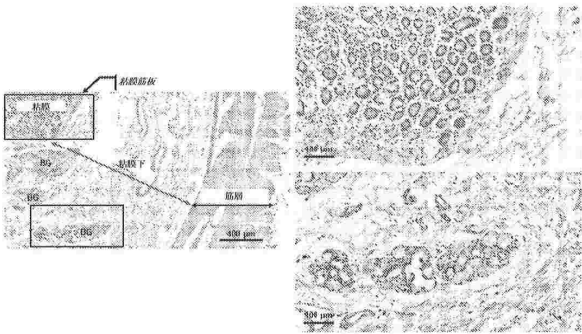
30

40

50

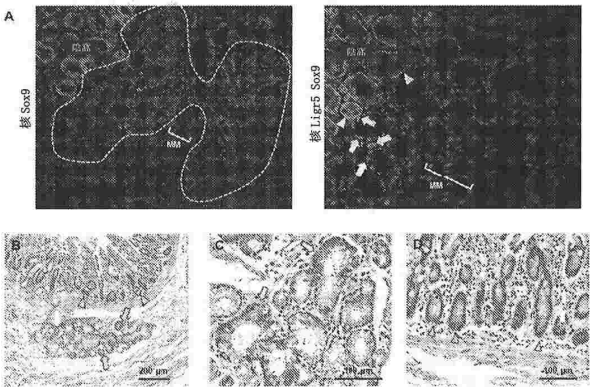
【図 9】

図 9



【図 10】

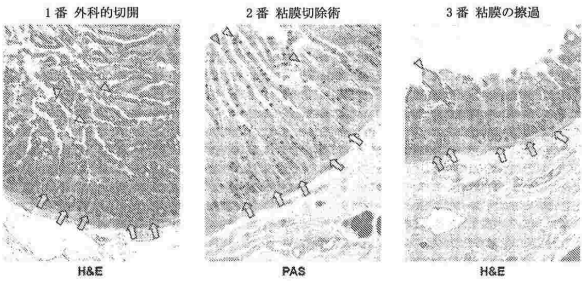
図 10



10

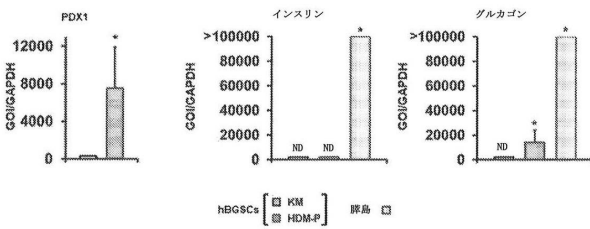
【図 11】

図 11



【図 12】

図 12



20

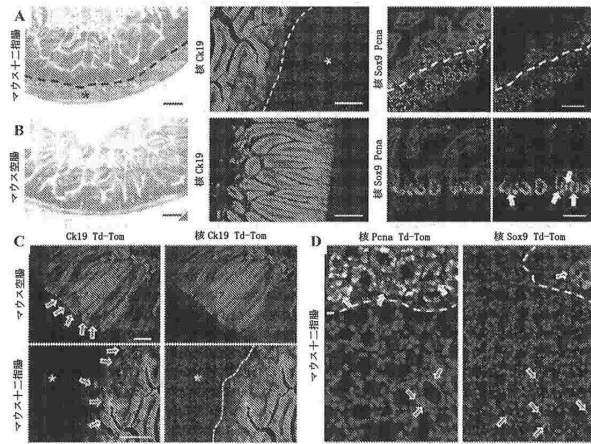
30

40

50

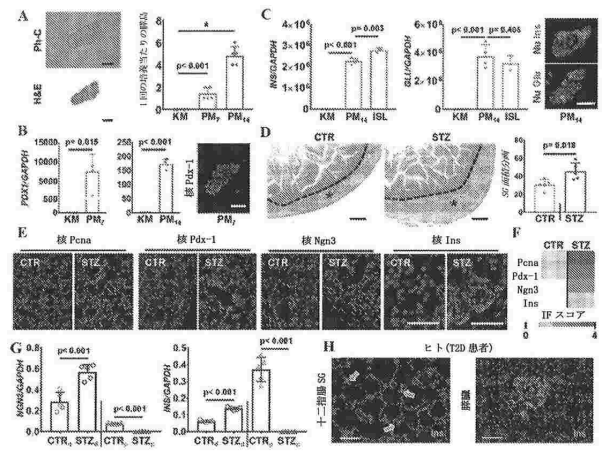
【図 13】

図 13



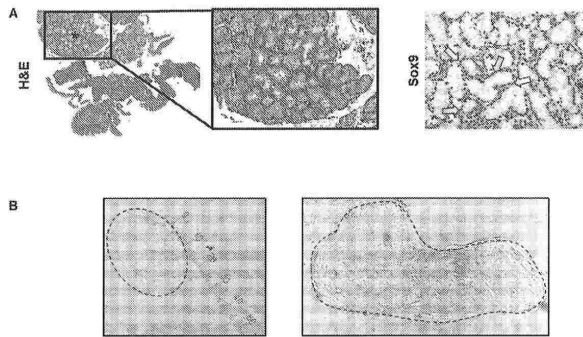
【図 14】

図 14



【図 15】

図 15



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- アツツァーレ アルド モロ, ナンバー 5
(74)代理人 100149076
弁理士 梅田 慎介
(74)代理人 100119183
弁理士 松任谷 優子
(74)代理人 100173185
弁理士 森田 裕
(74)代理人 100162503
弁理士 今野 智介
(74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
(72)発明者 カルピーノ, グイード
イタリア共和国 00199 ローマ, ヴィア モリコーネ 16
(72)発明者 カーディナル, ヴィンチェンツォ
イタリア共和国 00185 ローマ, ストリート オブ ザ カンパニ 82
(72)発明者 リード, ローラ エム.
アメリカ合衆国 27514 ノース カロライナ州, チャペル ヒル, スウィートン クリーク ロード 3621
(72)発明者 アルヴァロ, ドメニコ
イタリア共和国 00162 ローマ, ヴィア ジュゼッペ ヴァジ, 18
(72)発明者 ガウディオ, エウジェニオ
イタリア共和国 00197 ローマ, ヴィア ジ. トウッチメイ, 1
審査官 中野 あい
(56)参考文献 米国特許出願公開第2016/0084824 (US, A1)
特表2016-513466 (JP, A)
米国特許第09212382 (US, B2)
米国特許出願公開第2005/0256077 (US, A1)
米国特許出願公開第2007/0128584 (US, A1)
Stem Cells, 2013 Jul 11, vol.31, no. 9, pp. 1966-1979
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000 Mar, vol. 278, no. 3, pp. G477-485
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 1/00-7/08
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)