

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-520213

(P2023-520213A)

(43)公表日 令和5年5月16日(2023.5.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	4 B 0 2 9
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 M	3/04 (2006.01)	C 1 2 M	3/04	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全50頁)

(21)出願番号	特願2022-559825(P2022-559825)	(71)出願人	501345323
(86)(22)出願日	令和3年4月5日(2021.4.5)		ザ ユニバーシティ オブ ノース カロラ
(85)翻訳文提出日	令和4年10月24日(2022.10.24)		イナ アット チャペル ヒル
(86)国際出願番号	PCT/US2021/025741		THE UNIVERSITY OF N
(87)国際公開番号	WO2021/203087		ORTH CAROLINA AT CH
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)		APEL HILL
(31)優先権主張番号	63/004,537		アメリカ合衆国 2 7 5 1 6 ノースカロ
(32)優先日	令和2年4月3日(2020.4.3)		ライナ州 チャペル ヒル, チャーチ ス
(33)優先権主張国・地域又は機関			トリート 1 0 9
	米国(US)	(71)出願人	517075883
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		ユニバーシティ オブ ワシントン
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		University of Washi
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		ngton
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		アメリカ合衆国 9 8 1 0 5 ワシントン
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		, シアトル, スイート 4 0 0, ルー
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 隣接した腸単層システムに於いて腸内分泌細胞及び其れ等のサブタイプを富化する方法

(57)【要約】

本明細書に於いて血管作動性腸管ペプチド (VIP) 支援気液界面 (ALI) 培養物として記載される、従来の液内培養よりも腸内分泌 (EEC) 細胞及び腸クロム親和性 (EC) 細胞の数を、同時に単層の高いバリア完全性を維持しながら、大幅に増やす新しい戦略、方法、及びシステムが提供される。新しい戦略、方法、及びシステムは、共培養又は遺伝子工学／誘導の複雑な手順を必要とせずに、高い細胞生存率及びバリア完全性を維持する事に依り、既存の EEC 富化方法の制限を払拭する。作り上げられた EEC 富化された隣接した単層プラットフォームは、高いシグナルバックグラウンド比及び再現性を伴う EEC 細胞からのホルモン分泌の機能研究を可能にする頑健な分析ツールとして機能する。

【選択図】 図 1 C

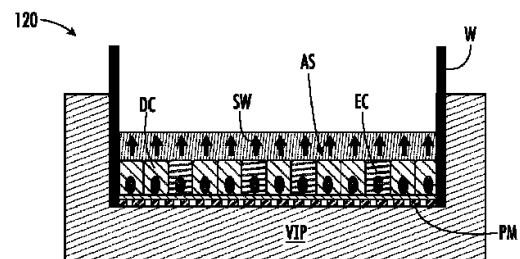


FIG. 1C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腸内分泌細胞及び腸内分泌細胞のサブタイプを含む生細胞構築物を生成する方法であって、

腸内分泌（E E C）細胞に分化する事が出来る幹細胞を、上表面及び下表面の両方を有する細胞支持構造物の上表面上で、前記細胞支持構造物の前記上表面の少なくとも一部が前記幹細胞に依って実質的に覆われる迄培養する事と、

前記支持構造物の前記上表面に在る流体の薄層を維持する事に依って、前記幹細胞を E E C 細胞へと分化させる事と、

を含み、此处で、前記幹細胞は、E E C 細胞及び E E C 細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を含む生細胞構築物を生成する、方法。

10

【請求項 2】

前記流体の薄層は、液体、スラリー、ヒドロゲル、及び／又は半固体材料を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記上表面に在る前記流体の薄層は、前記細胞単層の管腔側の上方の約 0.001 mm ～ 約 10 mm、任意に約 0.001 mm ～ 約 1 mm の範囲に於いて維持される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ホルモン及び／又は化合物（任意に、前記ホルモン及び／又は化合物は、化学物質（例えば、イオノマイシン）、ホルモン（例えば、血管作動性腸管ペプチド、セロトニン、ガストリン等）、サイトカイン、代謝産物、細菌及び／又は細菌成分を含む）を培地組成物に添加して、管腔流動液体分泌を誘導し、任意に、高張培地を前記管腔側に更に添加し、前記管腔側に向かう流体分泌を刺激して、厚い粘液層を作る事に依って、前記上表面に在る前記流体の薄層を維持する、請求項 1 ～ 3 の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

化学的化合物（例えば、ジテルペノイド（例えば、フォルスコリン）、メチルキサンチン（例えば、IBM X））、プレバイオティクス（例えば、オリゴフルクトース及びイヌリン型フルクタン）、ホルモン（例えば、セロトニン、アルギニンバソプレシン、アンジオテンシン II）、受容体アゴニスト（例えば、BIMU 8、リラグルチド（サクセンダ）、AM1638（例えば、FFAR1 アゴニスト）、AR231453（例えば、GPR119 アゴニスト）、及び GPBAR1 アゴニスト）、サイトカイン（例えば、IL-1 β 、IL-6、TNF- α ）、細菌又は食品代謝産物（例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、及び酪酸塩）、細菌及び／又は細菌成分（例えば、LPS、アッカーマンシア・ムシニフィラ（*Akkermansia muciniphila*）、ビフィドバクテリウム属の複数種（*Bifidobacterium* spp.）、ラクトバシラス属の複数種（*Lactobacillus* spp.））を前記生細胞構築物に添加して、前記 E E C 細胞の密度を高める事を更に含む、請求項 1 ～ 4 の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

化学的化合物（例えば、ジテルペノイド（例えば、フォルスコリン）、メチルキサンチン（例えば、IBM X））、プレバイオティクス（例えば、オリゴフルクトース及びイヌリン型フルクタン）、ホルモン（例えば、セロトニン、アルギニンバソプレシン、アンジオテンシン II）、受容体アゴニスト（例えば、BIMU 8、リラグルチド（サクセンダ）、AM1638（例えば、FFAR1 アゴニスト）、AR231453（例えば、GPR119 アゴニスト）、及び GPBAR1 アゴニスト）、サイトカイン（例えば、IL-1 β 、IL-6、TNF- α ）、細菌又は食品代謝産物（例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、及び酪酸塩）、細菌及び／又は細菌成分（例えば、LPS、アッカーマンシア・ムシニフィラ（*Akkermansia muciniphila*）、ビフィドバクテリウム属の複数種（*Bifidobacterium* spp.）、ラクトバシラス属の複数種（*Lactobacillus* spp.））を前記生細胞構築物に添加して、E E C 細胞の分化段階を模倣して、前記 E E C 細胞の密度を更に

40

50

高める事を更に含む、請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記流体の薄層は、マイクロ流体流動機構に依って維持される、請求項 1 ～ 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

高いバリア完全性が維持される、請求項 1 ～ 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 E E C 細胞は、セロトニンを分泌する、請求項 1 ～ 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 E E C 細胞は、グルカゴン様ペプチド-1 (G L P - 1) を分泌する、請求項 1 ～ 9 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記 E E C 細胞は、ペプチド Y Y (P Y Y)、又はコレシストキニン、モチリン、ニューロテンシン、レプチン、及び／又はセクレチンを含む他の腸管ホルモンを分泌する、請求項 1 ～ 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 E E C 細胞は、L 細胞を含む、請求項 1 ～ 11 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 L 細胞の密度は、約 50 個の細胞 / mm² より高く、任意に約 100 個の細胞 / mm² より高い、請求項 12 に記載の方法。

20

【請求項 14】

薬物、代謝産物、食品、又は化合物に誘発される E E C 細胞からのホルモンの分泌のスクリーニングに使用される、請求項 1 ～ 13 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 15】

E E C 細胞からのホルモンの分泌を遮断する薬物、代謝産物、食品、又は化合物のスクリーニングに使用される、請求項 1 ～ 14 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 16】

E E C 細胞からのホルモンの分泌を強化する薬物、代謝産物、食品、又は化合物のスクリーニングに使用される、請求項 1 ～ 15 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 17】

消化管上皮細胞が、哺乳類細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、及び昆虫細胞から成る群から選択される、請求項 1 ～ 16 の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 18】

前記消化管上皮細胞は、ヒト消化管上皮細胞である、請求項 1 ～ 17 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記消化管上皮細胞は、結腸細胞、小腸細胞、胃細胞、食道細胞、舌細胞、鼻咽頭細胞、中咽頭細胞、喉頭咽頭細胞、及び腭臓上皮細胞から成る群から選択される、請求項 1 ～ 18 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 20】

増殖段階の間の幹細胞の早期の系譜の運命決定を防ぐ為に増殖培地中に 1 つ以上の化合物を添加する事を更に含み、此处で、任意に、前記増殖培地中に前記 1 つ以上の化合物を添加する事に依って、E E C 細胞の形成を更に増強する事が出来る、請求項 1 ～ 19 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 21】

前記 1 つ以上の化合物は、W n t シグナル伝達アクチベーター及び／又は W n t シグナル伝達エンハンサーから選択され、此处で、任意に、前記シグナル伝達アクチベーターは、C H I R 9 9 0 2 1、W A Y 3 1 6 6 0 6、A B C 9 9、I Q 1、及び／又はアリールピリミジンを含み、前記 W n t シグナル伝達エンハンサーは、W n t - 3 A 及び／又は R - スポンジンのタンパク質を含む、請求項 20 に記載の方法。

50

【請求項 22】

E E C細胞及びE E C細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を含む、請求項 1～21の何れか一項に記載の方法に依って生成される生細胞構築物。

【請求項 23】

前記E E C細胞は、セロトニンを分泌する、請求項 22に記載の生細胞構築物。

【請求項 24】

前記E E C細胞は、グルカゴン様ペプチド-1 (G L P - 1) を分泌する、請求項 22～23の何れか一項に記載の生細胞構築物。

【請求項 25】

前記E E C細胞は、ペプチドY Y (P Y Y)、又はコレシストキニン、モチリン、ニューロテンシン、レプチン、及び／又はセクレチンを含む他の腸管ホルモンを分泌する、請求項 22～24の何れか一項に記載の生細胞構築物。

【請求項 26】

前記E E C細胞は、L細胞を含み、此处で、前記L細胞の密度は、約50個の細胞/mm²より高く、任意に約100個の細胞/mm²より高い、請求項 22～25の何れか一項に記載の生細胞構築物。

【請求項 27】

上表面及び下表面の両方を有し、前記上表面上に多孔質担体を更に含む細胞支持構造物と、

前記細胞支持構造物を取り囲み、培養培地を収容する領域を提供する培養容器と、
を備えた生細胞培養システムであって、

前記培養培地は、前記細胞支持構造物の前記下表面下に収容されており、前記細胞支持構造物は、前記細胞支持構造物上に播種された幹細胞から生細胞構築物を生成する様に構成されており、前記システムは、前記支持構造物の前記上表面に在る流体の薄層を維持する事に依って、前記幹細胞を腸内分泌 (E E C) 細胞へと分化させる様に構成されており、前記上表面に在る前記流体の薄層は、管腔流動液体分泌を誘導する前記培養容器に収容される前記培養培地中のホルモン及び／又は化合物に依って維持される、生細胞培養システム。

【請求項 28】

E E C細胞及びE E C細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を生成する様に構成されている、請求項 27に記載のシステム。

【請求項 29】

前記流体の薄層は、前記細胞支持構造物のマイクロ流体流動に依って維持される、請求項 27～28の何れか一項に記載のシステム。

【請求項 30】

前記培養容器は、マルチウェルプレート、培養ディッシュ、バイアル、又はチューブを含む、請求項 27～29の何れか一項に記載のシステム。

【請求項 31】

管腔流動液体分泌を誘導する前記培養培地中のホルモン及び／又は化合物 (任意に、前記ホルモン及び／又は化合物は、化学物質 (例えば、イオノマイシン)、ホルモン (例えば、血管作動性腸管ペプチド、セロトニン、ガストリン等)、サイトカイン、代謝産物、細菌及び／又は細菌成分を含む) に依って前記上表面に在る前記流体の薄層が維持され、任意に、高張培地を前記管腔側に更に添加し、前記管腔側に向かう流体分泌を刺激して、厚い粘液層が作られる、請求項 27～30の何れか一項に記載のシステム。

【請求項 32】

試験化合物又は微生物を毒物学的効果、生理学的効果、又は発癌性効果についてスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 22～26の何れか一項に記載の細胞構築物を準備し、

(b) 試験化合物又は微生物を前記細胞構築物に接触させ、次に、

(c) 前記細胞構築物の細胞に対する前記微生物の毒物学的効果、薬理学的生理学的効果

10

20

30

40

50

、又は発癌性効果を、任意に、接触後の前記細胞構築物と前記化合物又は微生物が接触されていない同様の細胞構築物とを比較する事に依って、及び／又は接触後の前記細胞構築物と接触工程前の前記細胞構築物とを比較する事に依って検知する、方法。

【請求項 3 3】

前記試験化合物又は微生物は、芳香族有機化合物、脂肪族有機化合物、及び芳香族と脂肪族との混合型の有機化合物から成る群から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記試験化合物又は微生物は、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、酵母、及びカビから成る群から選択される、請求項 3 2 ～ 3 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

糖尿病に関する薬理学的介入の為のスクリーニングを含む、請求項 3 2 ～ 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

肥満に関する薬理学的介入の為のスクリーニングを含む、請求項 3 2 ～ 3 5 の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

（関連出願の相互参照）

本出願は、2020年4月3日に出願された米国仮特許出願第 63 / 004, 537 号明細書に対する優先権を主張するものであり、此れは、引用する事に依り其の内容全体が本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

（政府支援の記載）

本発明は、米国国立衛生研究所に依って授与された D K 1 0 9 5 5 9 及び D K 1 2 1 5 8 0 に依る政府支援を受けて成されたものである。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

本開示の主題は、隣接した腸単層システムに於いて腸内分泌細胞及び其れ等のサブタイプを富化する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

腸内分泌（E E C）細胞は、ヒトの腸上皮集団の約 1 % 未満を構成し、其れにも拘わらず、此れ等は、様々な重要な生理学的機能を制御する 20 種を超える様々なホルモンを産生し分泌する（表 1）¹。E E C 細胞は、少なくとも 15 種の異なるサブタイプ（例えば、腸クロム親和性細胞、L 細胞、K 細胞、M 細胞等）を含み、中でも腸クロム親和性（E C）細胞が最も豊富な細胞であり、此れ等は消化管全体で E E C 細胞の約 40 % を構成する^{2, 3}。E C 細胞は、管腔内容物からの様々な刺激（例えば、栄養素、微生物代謝産物、刺激物、毒素、感染、及び機械的刺激）を感知し、生体アミンであるセロトニン又は 5-ヒドロキシトリプタミン（5 H T）を合成して分泌する事が出来る^{4, 5}。人体の総 5 H T の 90 % 超が腸管内の E C 細胞に位置し、其処で、5 H T は、消化管の運動、消化酵素の分泌、及び其の他の重要な機能を調節するのに使用される⁵。

【0 0 0 5】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 腸の腸内分泌細胞の種類及び分泌されるホルモン

EEC細胞型	分泌されるホルモン	既知の効果
A	グレリン、ネスファチン-1	食欲を刺激する
腸クロム親和性 (EC)	セロトニン (5HT)	食欲及び腸の運動を刺激する
腸クロム親和性様 (ECL)	ヒスタミン	胃の酸性度を変える
D	ソマトスタチン	結腸の蠕動運動を刺激する
G	ガストリン	胃酸分泌を刺激する
I	コレシストキニン (CCK)	食欲及び腸の運動を刺激する
K	胃抑制ペプチド (GIP)	インスリン分泌を刺激する
L	GLP-1; GLP-2; オキシントモジュリン; ペプチドYY	食欲を抑え、腸の運動を抑制する
M	モチリン	消化管の運動を刺激する
N	ニューロテンシン	消化管の運動を刺激する
P	レプチン	食欲を抑える
S	セクレチン	消化管の分泌を調節する

10

【0006】

EEC細胞はヒトの生理学に於いて重要な役割を担うが、其れ等の希少性が、感覚機能及びホルモン分泌の掘り下げた研究の障壁となっている。此の課題を克服する為に、生きたEEC細胞が腸標本から分離され、蛍光活性化セルソーティング (FACS) に依って富化され、*in vitro*でのホルモン分泌及びシグナル伝達の研究の為に短期培養に於いて維持されている^{6, 7}。此のアプローチの主な障害は、各実験に於いて新鮮な腸標本が必要と成る事である。過去10年間で、腸上皮幹細胞 (IESC) の*in vitro*での培養技術に依り、初代細胞由来の生理学的に関連する腸の*in vitro*モデルを作る道が切り開かれた^{8~10}。此れ等のシステムは、IESCを細胞外マトリックス (ECM) 内で (オルガノイドとして) 又は其の上で (単層として) 特定の成長因子の存在下に於いて培養する事に依りIESCの増殖に対応する為、*in vitro*研究の為に無制限の細胞供給をもたらす。分化した腸上皮細胞の単層は、IESC又はIESC含有組織 (例えば、解離されたオルガノイド) を多孔質膜上に直接撒種してコンフルエンス迄成長させた後に、自発的又は強制的に分化させる事に依って樹立された^{11~15}。分化した単層は、刷子縁タンパク質及びタイトジャンクション等の腸上皮の特徴的な極性化形態及び免疫蛍光マーカーを示し、多様な腸上皮細胞系譜を含んでいた。EEC細胞は、此れ等の*in vitro*システム (オルガノイド及び単層) に於いて特定されたが、其れでもEEC細胞の存在は腸内と同じ位希少である^{11, 12}。

20

30

【0007】

*in vitro*システムに於いてEEC細胞及びEC細胞の存在を高める為に、幾つかの戦略が開発されている。上皮単層システムをニューロン及び筋線維芽細胞と共培養すると、EEC細胞への分化が促進され、其れ等の割合が0.3%から0.9%に増加する事が判明した¹⁶。オルガノイドシステムに於いては、EGFR/Wnt/MAPK阻害剤の組合せに依る強制的な分化に依り、EEC細胞は高い割合 (約50%) で生成される¹⁷。然しながら、此の方法は高い細胞死を起こした。此のプロトコルを100%の表面被覆率を有する単層システムに適用した場合に、4日間のEGFR/Wnt/MAPK阻害剤処理後に、生細胞を含む表面は10%未満しか残らなかった (未発表のデータ)。最近、EEC分化を駆動する転写因子であるニューロゲニン-3 (NGN3) のドキシサイクリン誘導性発現に依りIESCを安定的に操作する為に、レンチウイルス形質導入が使用された³。EECの割合は0.4% (非誘導) から40% (ドキシサイクリンで誘導) に増加した。此のモデルは幾らか見込みがあるが、此の方法は細胞ゲノムを改変し、遺伝子改変が細胞挙動に及ぼす影響を解明する必要がある。従って、此のアプローチも理想的ではない。

40

【0008】

50

上記の戦略には、低い細胞生存率、低いバリア完全性、及び／又は複雑な手順の何れかの様な幾つかの不利点がある。必要とされるのは、現在確立されている単層プロトコルを僅かに変更するだけで、E E C細胞を富化する簡単なプロトコルを確立する事である。新しいプロトコルは、共培養又は遺伝子工学／誘導の複雑な手順を必要とせずに、高い細胞生存率及びバリア完全性を維持する事に依り、上記の戦略の制限を払拭するべきである。本開示に依り、其の様な要求が満たされ、障害が克服される。

【発明の概要】

【0009】

此の概要は、本開示の主題の幾つかの実施形態を列挙し、多くの場合に、此れ等の実施形態の変形形態及び置換形態を列挙している。此の概要は、多数の様々な実施形態の単なる例示であるに過ぎない。所与の実施形態の1つ以上の代表的な特徴の言及も同様に例示である。其の様な実施形態は、典型的には、言及された特徴（複数を含む）の有無に拘わらず存在する事が出来、同様に、此れ等の特徴を、此の概要に列挙されているかどうか拘わらず、本開示の主題の他の実施形態に適用する事が出来る。過度の繰り返しを避ける為、此の概要は、其の様な機能の可能な組合せの全てを列挙又は示唆していない。

【0010】

幾つかの実施形態に於いては、腸内分泌細胞及び腸内分泌細胞のサブタイプを含む生細胞構築物を生成する方法が提供される。其の様な方法は、幾つかの態様に於いては、腸内分泌（E E C）細胞に分化する事が出来る幹細胞を、上表面及び下表面の両方を有する細胞支持構造物の上表面上で、細胞支持構造物の上表面の少なくとも一部が幹細胞に依って実質的に覆われる迄培養する事と、支持構造物の上表面に在る流体の薄層を維持する事に依って、幹細胞をE E C細胞へと分化させる事を含む場合があり、此处で、幹細胞は、E E C細胞及びE E C細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を含む生細胞構築物を生成する。

【0011】

幾つかの実施形態に於いては、其の様な方法は、増殖段階の間の幹細胞の早期の系譜の運命決定を防ぐ為に増殖培地中に1つ以上の化合物を添加する事を更に含む場合があり、此处で、任意に、増殖培地中に1つ以上の化合物を添加する事に依って、E E C細胞の形成を更に増強する事が出来る。1つ以上の化合物は、W n tシグナル伝達アクチベーター及び／又はW n tシグナル伝達エンハンサーから選択され、此处で、任意に、シグナル伝達アクチベーターは、C H I R 9 9 0 2 1、W A Y 3 1 6 6 0 6、A B C 9 9、I Q 1、及び／又はアリアルピリミジンを含み、W n tシグナル伝達エンハンサーは、W n t-3 A及び／又はR-スポンジンのタンパク質を含む。

【0012】

幾つかの実施形態に於いては、本明細書に於ける方法、システム、構築物、及びデバイスに関して、流体の薄層は、液体、スラリー、ヒドロゲル、及び／又は半固体材料を含む。上表面に在る流体の薄層は、細胞単層の管腔側の上方の約0.001mm～約10mm、任意に約0.001mm～約1mmの範囲に於いて維持され得る。ホルモン及び／又は化合物を培地組成物に添加して、管腔流動液体分泌を誘導し（任意に、ホルモン及び／又は化合物は、化学物質（例えば、イオノマイシン）、ホルモン（例えば、血管作動性腸管ペプチド、セロトニン、ガストリン等）、サイトカイン、代謝産物、細菌及び／又は細菌成分を含む）、任意に、高張培地を管腔側に更に添加し、管腔側に向かう流体分泌を刺激して、厚い粘液層を作る事に依って、上表面に在る流体の薄層を維持する事が出来る。流体の薄層は、マイクロ流体流動機構に依って維持され得る。幾つかの実施形態に於いては、高いバリア完全性も維持され得る。

【0013】

幾つかの実施形態に於いては、本明細書に於ける方法、システム、構築物、及びデバイスに関して、E E C細胞はセロトニンを分泌する事が出来る。E E C細胞は、グルカゴン様ペプチド-1（G L P-1）を分泌し得る。E E C細胞は、ペプチドY Y（P Y Y）、又はコレシストキニン、モチリン、ニューロテンシン、レプチン、及び／又はセクレチン

を含む他の腸管ホルモンを分泌する。E E C細胞は、L細胞を含む場合もあり、L細胞の密度は、約50個の細胞/mm²より高く、任意に約100個の細胞/mm²より高い。

【0014】

幾つかの実施形態に於いては、本明細書に於いて開示される方法は、薬物、代謝産物、食品、又は化合物に誘発されるE E C細胞からのホルモンの分泌のスクリーニングに使用され得る。此の方法は、E E C細胞からのホルモンの分泌を遮断する薬物、代謝産物、食品、又は化合物のスクリーニングに使用され得る。此の方法は、E E C細胞からのホルモンの分泌を強化する薬物、代謝産物、食品、又は化合物のスクリーニングに使用され得る。消化管上皮細胞は、哺乳類細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、及び昆虫細胞から成る群から選択され得る。消化管上皮細胞は、ヒト消化管上皮細胞であり得る。

10

【0015】

幾つかの実施形態に於いては、本明細書に於ける方法、システム、構築物、及びデバイスに関して、消化管上皮細胞は、結腸細胞、小腸細胞、胃細胞、食道細胞、舌細胞、鼻咽頭細胞、中咽頭細胞、喉頭咽頭細胞、及び膀胱上皮細胞から成る群から選択され得る。

【0016】

生細胞構築物が、E E C細胞及びE E C細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を含む、上記の請求項の何れかに記載の方法によって生成される生細胞構築物が本明細書に於いて提供される。其の様な構築物中のE E C細胞は、セロトニンを分泌し得る。其の様な構築物中のE E C細胞は、グルカゴン様ペプチド-1 (G L P-1) を分泌し得る。其の様な構築物中のE E C細胞は、ペプチドY Y (P Y Y)、又はコレシストキニン、モチリン、ニューロテンシン、レプチン、及び／又はセクレチンを含む他の腸管ホルモンを分泌し得る。其の様な構築物は、L細胞を含む場合があり、此处で、任意に、L細胞の密度は、約50個の細胞/mm²より高く、任意に約100個の細胞/mm²より高い。

20

【0017】

幾つかの実施形態に於いては、上表面及び下表面の両方を有し、上表面上に多孔質担体を更に含む細胞支持構造物と、細胞支持構造物を取り囲み、培養培地を収容する領域を提供する培養容器とを備えた生細胞培養システムであって、培養培地が、細胞支持構造物の下表面下に収容されており、細胞支持構造物は、細胞支持構造物上に播種された幹細胞から生細胞構築物を生成する様に構成されており、上記システムは、上記支持構造物の上表面に在る流体の薄層を維持する事に依って、幹細胞を腸内分泌 (E E C) 細胞へと分化させる様に構成されており、上表面に在る流体の薄層は、管腔流動液体分泌を誘導する培養容器に収容される培養培地中のホルモン及び／又は化合物に依って維持される、生細胞培養システムが本明細書に於いて提供される。其の様なシステムは、E E C細胞及びE E C細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を生成する様に構成され得る。幾つかの実施形態に於いては、其の様なシステム中の流体の薄層は、細胞支持構造物のマイクロ流体流動に依って維持され得る。培養容器は、マルチウェルプレート、培養ディッシュ、バイアル、又はチューブを含み得る。上表面に在る流体の薄層は、管腔流動液体分泌を誘導する培養培地中のホルモン及び／又は化合物 (任意に、ホルモン及び／又は化合物は、化学物質 (例えば、イオノマイシン)、ホルモン (例えば、血管作動性腸管ペプチド、セロトニン、ガストリン等)、サイトカイン、代謝産物、細菌及び／又は細菌成分を含む) に依って、任意に、高張培地を管腔側に更に添加し、管腔側に向かう流体分泌を刺激して、厚い粘液層を作る事に依って維持され得る。

30

40

【0018】

幾つかの実施形態に於いては、試験化合物又は微生物を毒物学的効果、生理学的効果、又は発癌性効果についてスクリーニングする方法であって、(a) 上記請求項の何れか一項に記載の細胞構築物を準備し、(b) 試験化合物又は微生物を細胞構築物に接触させ、次に(c) 細胞構築物の細胞に対する微生物の毒物学的効果、薬理学的生理学的効果、又は発癌性効果を、任意に、接触後の細胞構築物と化合物又は微生物が接触されていない同様の細胞構築物とを比較する事に依って、及び／又は接触後の細胞構築物と接触工程前の

50

細胞構築物とを比較する事に依って検知する、方法が本明細書に於いて提供される。試験化合物又は微生物は、芳香族有機化合物、脂肪族有機化合物、及び芳香族と脂肪族との混合型の有機化合物から成る群から選択され得る。試験化合物又は微生物は、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、酵母、及びカビから成る群から選択され得る。其の様な方法は、糖尿病に関する薬理学的介入の為のスクリーニングを含み得る。其の様な方法は、肥満に関する薬理学的介入の為のスクリーニングを含み得る。

【0019】

従って、此れ等の目的及び其の他の目的は、本開示の主題に依って全体的又は部分的に達成される。更に、上述した本開示の主題の目的、本開示の主題の他の目的及び利点は、以下の詳細な説明、図面、及び実施例を精査した上で、当業者に明らかに成るであろう。

10

【0020】

本開示の主題は、以下の図面を参照する事に依ってより良く理解され得る。図中の構成要素は、必ずしも縮尺通りではなく、其れどころか、本開示の主題の原理を（屢々、模式的に）説明する事に重点が置かれている。図中で、同様の参照番号は、異なる図全体に亘って対応する部分を示す。添付の図面の図解に於いて示される実施形態を参照する事に依り、本開示の主題の更なる理解を得る事が出来る。図解される実施形態は、本開示の主題を実施するシステムの単なる例示であるに過ぎないが、本開示の主題の構成及び操作方法の両方は、一般に、其れ等の更なる目的及び利点と共に、図面及び以下の詳細な説明を参照する事に依ってより容易に理解され得る。図面は、添付された又は後に補正された特許請求の範囲に於いて詳細に示されている本開示の主題の範囲を限定する事を意図するものではなく、単に本開示の主題を明瞭にし、例示する事を意図しているに過ぎない。

20

【0021】

本開示の主題をより完全に理解する為に、此处で、以下の図面について述べる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】乃至

【図1C】3つの細胞培養機構の違いを示す概略図を含む。図1Aは、頂端面（又は管腔側）が培地で覆われている液内培養物を示している。図1Bは、頂端面が空気に曝されて完全に乾燥している気液界面（ALI）培養物を示している。図1Cは、血管作動性腸管ペプチド（VIP）が細胞を刺激して頂端側に水の薄層を分泌して維持するVIP支援ALI培養物を示している。此の液体の薄層は、頂端面を水和する。

30

【図2A】乃至

【図2C】*in vitro*の単層プラットフォームに於けるEEC細胞及びEC細胞の希少性が5HT分泌アッセイの信頼性を低下させる事を示す実験結果を含む。図2Aは、従来の液内培養に依って生成された単層の蛍光顕微鏡画像である。左は、24ウェルインサートの表面全体を示すステッチ画像である（表面積=33mm²）。真ん中及び右に在るのは拡大図である。マーカーは以下の通りである：クロモグラニンA（ChgA、EECマーカー）、赤；5HT（ECマーカー）；Hoechst 33342で染色された核。図2Bは、単層上のEEC（ChgA⁺）及びEC（5HT⁺）の数の定量化を示している。図2Cは、DMSOビヒクル及び10μMのフォルスコリンに対する4時間の頂端曝露後の単層からの5-HT分泌を示している。3回の独立した実験を行った。試料数は各条件毎に3個である。t検定を使用して統計分析を行った。*：p<0.05、NS：非有意。

40

【図3A】乃至

【図3B】ヒト幹細胞由来の腸上皮単層上のEEC細胞及びEC細胞の数が分化戦略に依存する事を示している。図3Aは、VIPの不存在下又は存在下での液内（Sub）及び気液界面（ALI）の4つの分化戦略に依って、初代腸上皮幹細胞に由来する完全に分化したコンフルエントな単層を生成する方法又はプロセスを示す概略図である。図3Bは、単層の代表的な低倍率の蛍光顕微鏡画像である。挿入図は高倍率の画像を示している。マーカーは以下の通りである：クロモグラニンA（ChgA、EECマーカー）；5HT（

50

ECマーカー) ; Hoechst 33342で染色された核。最後の戦略であるVIP支援ALI培養に依り、最も豊富なEEC細胞及びEC細胞を含む単層が生成された。

【図4A】乃至

【図4F】EC富化された単層の特性評価の結果を示している。図4Aは、4つの分化戦略に依って生成された単層上のEEC(ChgA^+)細胞の数の定量化を示している。図4Bは、EC(5HT^+)細胞の数の定量化を示している。図4Cは、DMSOビヒクル及び $10\mu\text{M}$ のフォルスコリンに対する4時間の頂端曝露後の単層からの5HT分泌を示している。図4Dは、単層の見掛けの透過係数(Papp)の箱ひげ図を示しており、これは、単層の完全性がVIP支援ALI培養から生成された試料の場合に最良である事を示している。 $4 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ の Papp は、バリア完全性について一般的に受け入れられている閾値である。図4E~図4Fは、5HT分泌(図4E)及びバリア完全性(図4F、箱ひげ図)に対する分化期間(3日~7日)の影響を示している。図4D及び図4Fに於いては、試料数は各条件毎に6個である。他の図に於いては、試料数は各条件毎に3個である。t検定を使用して統計分析を行った： $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.005$ 。

10

【図5A】乃至

【図5C】図5Aは、様々な継代数での幹細胞から生成された単層からの5HT分泌を示している。図5Bは、5人のドナーからの幹細胞の情報(年齢及び性別)のリストを示している。図5Cは、5人のドナーからの横行結腸幹細胞から生成された単層からの5HT分泌を示している。他の図に於いては、試料数は各条件毎に3個である。t検定を使用して統計分析を行った： $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.005$ 。

20

【図6A】乃至

【図6D】5HT分泌の調節についての小規模化合物スクリーニングの結果を示している。図6Aは、形状が三角形又は角錐形のECを示す共焦点蛍光顕微鏡画像(XY及びXZ)である。EC細胞は、5HT(緑; 矢印表示を参照)及びChgA(赤; 矢印表示を参照)での共染色に依る黄色を呈している。核はHoechst 33342(青; 矢印表示を参照)で染色されている。図6Bは、食品化合物が、頂端に位置する受容体を刺激し、続いて基底外側境界を通して5HTを放出し得る事を示すECの概略図である。図6Cは、13種類の食品の刺激性成分、植物源、及び作業濃度のリストである。図6Dは、食品化合物で4時間頂端刺激した後の単層からの5HT分泌を示している。試料数は各条件毎に3個である。t検定を使用して、ビヒクルコントロールに対して統計分析を行った： $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.005$ 。

30

【図7】単層に於けるL細胞の存在を確認している。左のパネルでは、単層をGLP-1(緑、サンタクルーズ社(Santa Cruz)、sc-514592、1:200)及びHoechst 33342(青)で染色した。右のパネルでは、単層をPYY(赤、アブカム社(Abcam)、ab22663、1:200)及びHoechst 33342(青)で染色した。

【図8A】乃至

【図8B】L細胞を富化する為の分化培地及び培養形式の最適化を示している。図8Aは、単層の蛍光顕微鏡画像である。GLP-1: 緑。核: 青。図8Bは、GLP-1⁺L細胞の定量化である。試料数は3個である。 $* p < 0.05$ 。 $** p < 0.005$ 。# N.S。

40

【図9A】乃至

【図9C】分化時間の最適化を示している。図9A及び図9Bは、GLP-1(図9A)マーカー及びPYY(図9B)マーカーに依るL細胞の定量化を示している。図9Cは、XY平面及びYZ平面で画像化された単層の蛍光顕微鏡画像を示している。試料数は3個である。 $* p < 0.05$ 。 $** p < 0.005$ 。# N.S。

【図10】様々な化合物の4時間の頂端刺激に依るGLP-1の基底コンパートメントへの分泌を示している。刺激の濃度: グルコース=10mM、フォルスコリン=10 μM 、TGR5=10 μM 、IBMX=10 μM 、KCl=30mM、ボンベシン=10 μM 。

50

試料数は3個である。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.005$ 。# コントロールと比較してN.S。

【図11A】乃至

【図11B】増殖段階の間のEM中の試験Wntアクチベーター（CHIR99021）を示している。図11Aは、幹細胞をCHIRの存在下で培養した後に従来の液内培養に於いて分化させた場合に、EC（5HT⁺）細胞の存在量が増加する事を示す単層の蛍光画像を示している。図11Bは、EC細胞密度の定量化である。試料数は各条件毎に3個である。t検定を使用して、ビヒクルコントロールに対して統計分析を行った：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 。

【発明を実施するための形態】

【0023】

此处で、本開示の主題を以下でより十分に説明するが、本開示の主題の全てではないが、幾つかの実施形態を説明する。実際、本開示の主題は、多くの様々な形態で具現化され得るが、本明細書に示される実施形態に限定されると解釈されるべきではなく、寧ろ、此れ等の実施形態は、本開示が該当する法的要件を満たす様に提供される。

【0024】

幾つかの実施形態に於いては、EEC細胞及びEC細胞の数を、従来の液内培養よりも、同時に単層の高いバリア完全性を維持しながら大幅に押し上げる単純な戦略、即ち、VIP支援ALI培養が本明細書に於いて提供される。此の新しい戦略は、共培養又は遺伝子工学／誘導の複雑な手順を必要とせずに、高い細胞生存率及びバリア完全性を維持する事に依り、既存のEEC富化方法の制限を払拭する。生成されたEEC富化された隣接した単層プラットフォームは、高いシグナルバックグラウンド比及び再現性を伴うEEC細胞からのホルモン分泌の機能研究を可能にする頑健な分析ツールとして機能する。

【0025】

一般的な考慮事項

本発明を実施するのに使用される未分化細胞及び／又は消化管上皮細胞等の細胞は、例えば、限定されるものではないが、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、及び昆虫を含む由来のあらゆる種の細胞であり得る。幾つかの実施形態に於いては、細胞は哺乳類細胞であり、其の例としては、限定されるものではないが、ヒト、サル、類人猿、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、及びブタの消化管上皮細胞が挙げられる。幾つかの実施形態に於いては、細胞は、好ましくは原発組織に由来し、癌細胞又は腫瘍細胞ではない。限定されるものではないが、結腸細胞、小腸細胞、胃細胞、食道細胞、舌細胞、鼻咽頭細胞、中咽頭細胞、喉頭咽頭細胞、及び脾臓上皮細胞を含むあらゆる種類の消化管上皮細胞が使用され得る。

【0026】

多くの化合物、因子、代謝産物、食品、小分子、及び／又は薬物の化学スクリーニングを使用して、細胞シグナル伝達経路を調節して、EEC細胞形成を誘導するだけでなく、其れ等の分泌を遮断又は増強する事も出来る。因子、低分子、及び薬物としては、Wntシグナル伝達経路、BMPシグナル伝達経路、GREM1シグナル伝達経路、GREM2シグナル伝達経路、Notchシグナル伝達経路のアクチベーター及びインヒビターが挙げられる。非限定的な例は、CHIR99021（Wntアクチベーター）、IWP（Wntインヒビター）、Y-27632（Notchインヒビター）、Noggin（BMPインヒビター）、Jagged 1（Notchアクチベーター）、Gremlin（BMPアンタゴニスト）、サイトカイン、食品化合物（繊維、酪酸塩、その他の脂肪酸、代謝産物）等である。他の脂肪酸としては、繊維の微生物発酵によって産生される短鎖脂肪酸であるプロピオン酸塩及び酢酸塩が挙げられ、追加の代謝産物としては、分岐鎖脂肪酸、胆汁酸、及び微生物由来の二次胆汁酸、尿素、アミン、アンモニア、乳酸塩、フェノール、インドール、硫黄、二酸化炭素、水素、硫化水素、並びにメタンが挙げられる。代謝産物としては、複雑な炭水化物（可溶性繊維）、豆、及び難消化性デンプンからの代謝産物が挙げられ、マイクロバイオーームから産生され得る。其の他の化学物質としては、抗

10

20

30

40

50

利尿ホルモン、緩下剤、細菌性エンドトキシン、ホルモン（例えば、VIP）、及び内因性物質（例えば、胆汁酸）、アルドステロン、ソマトスタチン、 $\alpha 2$ -アドレナリン作動剤（例えば、クロニジン）、アセチルコリン、一酸化窒素、アデノシン三リン酸（ATP）等が挙げられる。

【0027】

本開示の適用及び使用

提案されたEEC細胞富化された表面は、平面である場合も、又は入り組んでいる場合もあるが、閉じた構造であるオルガノイドとは異なり、開いた構造を有する事を特徴としている。開いた構造を特徴とする非癌性培養システムを提供する事に依り、本開示では、オルガノイドシステムの制限が払拭された事から、初代細胞から構成されるEEC富化された組織の培養は、自動化された高スループットな培養及び分析プラットフォームに於いて使用される従来の組織培養方法及び現在のロボット工学と相性が良いものと成る。開いた構造及び透過性の基材に依り、細胞表面（基底／頂端又は管腔）の何れかへの様々な成熟剤の適用だけでなく、何れかの表面からの分泌の測定をしながら細胞を培養することが可能と成る。開いた構造とEEC細胞の富化とに依り、高感度を有する高い上皮バリア機能を伴って又は伴わずに、アッセイの分泌が可能と成る事に成る。EEC細胞と其の上に在る細菌及び微生物の他の成分との相互作用も、此处では可能と成る。富化されたEEC細胞を含む此れ等のex vivo組織は、取り分け、マウス、ブタ、及びヒトを含む様々な種から生成され得る。健康な供給源及び罹患した供給源、並びに様々な遺伝的背景の細胞から此れ等の組織を作る能力は、薬物のスクリーニング、疾患メカニズムの研究、及びEEC細胞の基礎生物学の研究にとって重要である事に成る。生体模倣足場上又は其の内部で共培養される様々な他の細胞型（例えば、免疫細胞、線維芽細胞、及びin vivoで特定の上皮組織との共存が判明した其の他の細胞）の追加は、EEC細胞間相互作用並びにEEC細胞に対する薬物及び代謝産物の効果を理解する上で貴重である事に成る。此れ等のEEC富化された上皮組織は、EEC細胞の生理学、毒物学、及び薬理学の理解に基づいて、現在のEEC細胞モデルよりも優れている。幾つかの例を以下に示すが、此のリストは全てを網羅するものではない。

（１）薬物、生物製剤、毒素、突然変異原、食品化合物、病原体、ウイルス、微生物叢等のスクリーニング研究、

（２）橋渡し（translational）動物モデル又はヒトに由来する初代細胞の使用に依る疾患モデル、

（３）薬物、食品化合物等についての包括的な用量－応答プロファイルを含む、スクリーニング用の薬理学的モデル及び薬物動態モデル、

（４）EEC細胞－神経相互作用の研究用のin vitroモデル、

（５）特定の遺伝的背景及び個々の患者に対して行われた研究に依る個別化医療、

（６）代謝性疾患、肥満、及び糖尿病用の療法薬についてのスクリーニングに於ける化合物の特定、

（７）EEC細胞機能に対するシンバイオティクス剤、プレバイオティクス剤、及びプロバイオティクス剤のアッセイ、

（８）EEC細胞に対する免疫細胞及び其れ等の産物（抗体及びサイトカイン）の影響。

【0028】

スクリーニング方法

従って、上記の様に、幾つかの実施形態に於いては、本開示は、EEC細胞に依って又はEEC細胞に対して発揮される毒物学的効果、生理学的効果、又は薬理学的効果について試験化合物又は微生物をスクリーニングする方法であって、（a）本明細書に於いて記載される細胞構築物を準備し、（b）試験化合物又は微生物を上記構築物に接触させ、次に（c）細胞構築物の細胞に対する上記微生物の毒物学的効果、生理学的効果、又は発癌性効果を（例えば、接触後の細胞構築物と上記化合物又は微生物が接触されていない同様の細胞構築物とを比較する事に依って、及び／又は接触工程後の構築物と上記接触工程前の細胞構築物とを比較する事に依って）検知する、方法を提供する。

【0029】

幾つかの実施形態に於いては、試験化合物又は微生物は、芳香族有機化合物、脂肪族有機化合物、及び芳香族と脂肪族との混合型の有機化合物から成る群から選択される。例えば、幾つかの実施形態に於いては、スクリーニング用の化合物は、天然産物、プレバイオティクス、プロバイオティクス、食品、食品代謝産物、発癌物質、薬物、薬物代謝産物、細菌代謝産物及び毒素、刺激物、土壌化合物、摂取可能な毒素等である化合物である。

【0030】

幾つかの実施形態に於いては、試験化合物又は微生物は、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、酵母、及びカビから成る群から選択される。例えば、幾つかの実施形態に於いては、微生物は、哺乳類、特にヒトの種の正常又は健康な腸内細菌叢（又は「マイクロバイオーーム」）に於いて見られる種類の細菌である。例えば、米国特許出願公開第2014/0093478号明細書を参照されたい。幾つかの実施形態に於いては、微生物は、クロストリジウム、コレラ、サルモネラ、赤痢菌、線虫（条虫、蟯虫、鉤虫等）、アメーバ（ジアルジア等）等の様な感染性生物である。従って、幾つかの実施形態に於いては、微生物は、良性及び感染性の両方の腸内細菌及び病原体を含む腸内細菌又は病原体である。

10

【0031】

適切な検出方法としては、限定されるものではないが、ELISA、電気化学、免疫組織化学、DNAについてのPCR、mRNA発現、RNAシーケンシング、経上皮電気抵抗、輸送アッセイ（イオン、化合物、タンパク質等）、分泌アッセイ、電子顕微鏡検査、フローサイトメトリー、上清又はリザーバーの質量分析、及び其れ等の放射化学アッセイ、其れ等の蛍光ベースのセンサー、並びに上皮細胞への微生物の付着が挙げられる。

20

【0032】

結腸単層の特定の例が示されているが、他の消化管上皮細胞、特に小腸細胞、腸細胞、胃細胞、食道細胞、舌細胞、鼻咽頭細胞、中咽頭細胞、喉頭咽頭細胞、及び膀胱上皮細胞等からの単層も、以下に記載されるのと同様の様式で、又は当業者に明らかな其の様な技術の変形形態に依って形成され得る事が理解される。

【0033】

VIP支援ALI培養の一般考察

気液界面（ALI）培養物は、液体又は培地を、全て区別無く使用される頂端リザーバー、又は管腔側リザーバー、又は管腔リザーバーから除去して調製され得る。従来の液内培養とは異なり、ALI培養物に於ける単層の頂端面は空気に曝されて完全に乾燥している。此の状況は、頂端面に高い含水量が無い為、*in vivo*での腸管腔環境を反映していない。実際、結腸粘膜の水及び電解質の恒常性は、管腔の内外に移動する水とバランスが取れている。ALI培養を改善する為に、本開示は、腸管ホルモン、血管作動性腸管ペプチド（VIP）を使用して、上皮を横切る流体移動のバランスを補助する為、流体の薄層（約0.1mm～約1.0mmの厚さ、又は約0.3mm～約0.5mmの厚さ、任意に約0.4mmの厚さ）が頂端リザーバーで維持されて、乾燥が抑えられた。本明細書に於いて「VIP支援ALI培養」と呼ばれるVIP培養とALI培養との此の組合せに依り、ALI培養単独又は液内培養単独と比較して、EEC細胞の数が大幅に増加した。VIP支援ALI培養の追加の利点は、バリア完全性の改善である（詳細については、実施例2を参照のこと）。特定の理論又は作用機序に縛られるものではないが、幾つかの実施形態に於いては、VIP支援ALI培養は、頂端側で流体の薄層（約0.1mm～約1.0mmの厚さ、又は約0.3mm～約0.5mmの厚さ、任意に約0.4mmの厚さ）を維持する事が出来る為、酸素の利用可能性が高まると同時に、乾燥に依るストレスが取り除かれる。本開示は、従来のALI培養又は液内培養の制限を払拭する。

30

40

【0034】

此处で図面を参照すると、図1A乃至図1Cは、3つの細胞培養機構の違いを示す概略図を含む。図1Aは、分化した細胞DCの頂端面AS（又は培養物の管腔側）が分化培地DMで覆われている液内培養物100の断面概略図である。其れに対して、図1Bは、頂端面ASが空気Aに曝されて完全に乾燥している気液界面（ALI）培養物110の断面

50

概略図である。最後に、図 1 C は、血管作動性腸管ペプチド (VIP) 支援 ALI 培養物 120 の断面概略図であり、此处で、血管作動性腸管ペプチド VIP は、細胞 (分化した細胞 DC 及び腸クロム親和性細胞 EC) を刺激して、水、即ち分泌された水 SW の薄層を頂端面 AS で分泌して維持する。此の液体、即ち分泌された水 SW の薄層は、頂端面 AS を水和する。図 1 A ~ 図 1 C の其々に於いて、培養物は、培養ウェル W、又は当業者に知られる、限定されるものではないが、マルチウェルプレート、アガープレート、培養ディッシュ、バイアル、チューブ等を含む他の適切な培養装置、培養容器、システム、若しくはデバイス内に存在し得る。図 1 A ~ 図 1 C の其々に於いて、培養物は、細胞 (分化した細胞 DC 及び腸クロム親和性細胞 EC) が此の上で培養される多孔質膜 PM を含む。

【0035】

更に詳しく説明すると、図 3 A は、ヒト幹細胞由来の腸上皮単層上の EEC 細胞及び EC 細胞の数が分化戦略に依存する事を示している。図 3 A は、VIP の不存在下又は存在下での液内 (Sub) 及び気液界面 (ALI) の 4 つの分化戦略に依って、初代腸上皮幹細胞 SC に由来する完全に分化したコンフルエントな単層を生成する方法又はプロセスの概略図である。図 3 A に於いて示される様に、幹細胞 SC を、多孔質膜 PM 上で細胞外マトリックス ECM 上に撒種した。細胞を EM 培地中で約 4 日間増殖させた。次に、4 つの分化戦略の内の 1 つを使用して、細胞を最大 5 日間分化させた。4 つの分化戦略の結果を図 3 B に示す。図 3 B は、単層の代表的な低倍率の蛍光顕微鏡画像である。挿入図は高倍率の画像を示している。マーカーは以下の通りである：クロモグラニン A (ChgA、EEC マーカー)；5HT (EC マーカー)；Hoechst 33342 で染色された核。最後の戦略である VIP 支援 ALI 培養に依り、最も豊富な EEC 細胞及び EC 細胞を含む単層が生成された。

【0036】

単層システムに於いて腸内分泌細胞を富化する方法

幾つかの態様に於いては、腸内分泌細胞及び腸内分泌細胞のサブタイプを含む細胞単層を含む生細胞構築物を生成する方法が本明細書に於いて提供される。其の様な方法は、腸内分泌 (EEC) 細胞に分化する事が出来る幹細胞を、上表面及び下表面の両方を有する細胞支持構造物の上表面上で、細胞支持構造物の上表面の少なくとも一部が幹細胞に依って実質的に覆われる迄培養する事と、上表面に在る流体の薄層を維持する事に依って、幹細胞を分化させる事を含む場合があり、此处で、幹細胞は、腸内分泌細胞及び腸内分泌細胞のサブタイプを含む実質的に連続した細胞単層を含む生細胞構築物を生成する。流体の薄層は、液体、スラリー、ヒドロゲル、及び／又は半固体材料を含み得る。上表面に在る流体の薄層は、細胞単層の管腔側の上方の約 0.001 mm ~ 約 10 mm、任意に約 0.001 mm ~ 約 1 mm、任意に約 0.3 mm ~ 約 0.5 mm の厚さの範囲、任意に約 0.4 mm の厚さに於いて維持され得る。幾つかの態様に於いては、ホルモン及び／又は化合物 (任意に、ホルモン及び／又は化合物は、化学物質 (例えば、イオノマイシン)、ホルモン (例えば、血管作動性腸管ペプチド、セロトニン、ガストリン等)、サイトカイン、代謝産物、細菌及び／又は細菌成分を含む) を培地組成物に添加して、管腔流動液体分泌を誘導し、任意に、高張培地を管腔側に更に添加し、管腔側に向かう流体分泌を刺激して、厚い粘液層を作る事に依って、上表面に在る流体の薄層を維持する。更に、幾つかの実施形態に於いては、流体の薄層は、マイクロ流体流動機構に依って維持され得る。

【0037】

幾つかの態様に於いては、其の様な方法は、培養に於いて高いバリア完全性を維持する事を可能にする。幾つかの EEC (例えば、EC 細胞) は、セロトニンを分泌し得る。幾つかの EEC 細胞 (例えば、L 細胞) は、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) を分泌し得る。幾つかの EEC 細胞は、ペプチド YY (PYY)、又はコレシストキニン、モチリン、ニューロテンシン、レプチン、及び／又はセクレチンを含む他の腸管ホルモンを分泌し得る。

【0038】

幾つかの実施形態に於いては、其の様な方法は、薬物、代謝産物、食品、又は化合物に

誘発される E E C 細胞からのホルモンの分泌のスクリーニングに使用される。此れ等の方法は、E E C 細胞からのホルモンの分泌を遮断する薬物、代謝産物、食品、又は化合物のスクリーニングにも使用され得る。消化管上皮細胞は、哺乳類細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、及び昆虫細胞から成る群から選択され得る。幾つかの実施形態に於いては、消化管上皮細胞は、ヒト消化管上皮細胞である。幾つかの態様に於いては、消化管上皮細胞は、結腸細胞、小腸細胞、胃細胞、食道細胞、舌細胞、鼻咽頭細胞、中咽頭細胞、喉頭咽頭細胞、及び膀胱上皮細胞から成る群から選択される。

【0039】

幾つかの実施形態に於いては、上記方法は、増殖段階の間の幹細胞の早期の系譜の運命決定を防ぐ為に増殖培地中に1つ以上の化合物を添加する事を更に含み、此処で、任意に、増殖培地中に1つ以上の化合物を添加する事に依って、E E C 細胞の形成を更に増強する事が出来る。1つ以上の化合物は、W n t シグナル伝達アクチベーター及び／又は W n t シグナル伝達エンハンサーから選択され得て、此処で、任意に、シグナル伝達アクチベーターは、C H I R 9 9 0 2 1、W A Y 3 1 6 6 0 6、A B C 9 9、I Q 1、及び／又はアリアルピリミジンを含み、W n t シグナル伝達エンハンサーは、W n t - 3 A、R - スポンジン1、並びに他の W n t 1 ~ W n t 1 6、及び他の R - スポンジン、例えば R - スポンジン1 ~ R - スポンジン4 のタンパク質を含む。

【0040】

本明細書に於いて開示される方法に依って生成される生細胞構築物も提供される。生細胞構築物は、腸内分泌細胞及び其れ等のサブタイプを含む細胞単層を含み得る。

【0041】

定義

別段の規定が無い限り、本明細書に於いて使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示の主題が属する技術分野に於ける当業者に依って通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に於ける本開示の主題の記載に於いて使用される用語は、特定の実施形態を説明する事のみを目的とし、本開示の主題を限定する事を意図するものではない。

【0042】

参考文献が示される文及び／又は段落に関連する教示について、本明細書に於いて引用される全ての出版物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、引用する事に依り其の内容全体が本明細書に援用される。

【0043】

文脈上特に明記されていない限り、本明細書に於いて記載される本開示の主題の様々な特徴を任意の組合せに於いて使用し得る事が特に意図される。更に、本開示の主題は、本開示の主題の幾つかの実施形態に於いては、本明細書に於いて示される任意の特徴又は特徴の組合せを除外又は省略し得る事も企図する。例として説明すると、組成物が構成要素 A、B 及び C を含む事が本明細書に示される場合に、A、B 若しくは C の何れか、又は其れ等の組合せを、単独で又はあらゆる組合せに於いて省略し、放棄し得る事が特に意図される。

【0044】

同様の番号は、全体を通して同様の要素を指す。図面に於いては、明確にする為に、或る特定の線の太さ、層、構成要素、要素、又は特徴が誇張されている場合がある。使用される場合に、破線は、別段の指定が無い限り、任意の特徴又は操作を示している。

【0045】

本開示の主題の詳細な説明及び添付の特許請求の範囲に於いて使用される場合に、単数形 ("a"、"an"、及び "the") は、文脈上特に明記されていない限り、複数形も同様に含む事が意図される。

【0046】

又、本明細書で使用される場合に、「及び／又は」は、関連する列挙された事項の1つ以上のあらゆる全ての可能な組合せだけでなく、選択肢（「又は」）で解釈される場合の組合せの欠如を指し、其れ等を包含する。

10

20

30

40

50

【0047】

量又は濃度等の様な測定可能な値を指す場合に本明細書で使用される「約」という用語は、指定された値の±10%、±5%、±1%、±0.5%、又は更に±0.1%の変動だけでなく指定された値も包含する事を意味する。例えば、Xが測定可能な値である場合の「約X」は、XだけでなくXの±10%、±5%、±1%、±0.5%、又は更に±0.1%の変動を含む事を意味する。測定可能な値について本明細書で示される範囲は、任意の他の範囲及び／又は其の中の個々の値を含み得る。

【0048】

本明細書で使用される場合に、「XとYとの間」及び「約XとYとの間」などの語句は、X及びYを含むと解釈されるべきである。本明細書で使用される場合に、「約XとYとの間」などの語句は、「約Xと約Yとの間」を意味し、「約X～Y」などの語句は、「約X～約Y」を意味する。

10

【0049】

或る要素が、別の要素「上に在る (on)」、別の要素に「取り付けられる (attached)」、別の要素に「接続される (connected)」、別の要素と「カップリングされる (coupled)」、別の要素と「接触している (contacting)」等と言及される場合に、其の要素は、他の要素の直上に在り、他の要素に取り付けられ、他の要素に接続され、他の要素とカップリング及び／又は接触している場合もあり、又は介在する要素が存在する場合もある。其れに対して、或る要素が、例えば、別の要素の「直上に在る (directly on)」、別の要素に「直接的に取り付けられる (directly attached)」、別の要素に「直接的に接続される (directly connected)」、別の要素と「直接的にカップリングされる (directly coupled)」、又は別の要素と「直接的に接触している (directly contacting)」と言及される場合には、介在する要素は存在しない。別の特徴に「隣接して (adjacent)」配置されている構造又は特徴についての言及は、隣接する特徴と重複する部分又は隣接する特徴の下にある部分を有し得る事も当業者には理解されるであろう。

20

【0050】

「～の下方 (under)」、「～の下 (below)」、「～より下 (lower)」、「～の上方 (over)」、「～より上 (upper)」等の様な空間的に相対的な用語は、本明細書では説明を容易にする為に、図面に示されている或る要素又は特徴と1つ以上の別の要素又は特徴との関係を説明する為に使用され得る。

30

【0051】

本明細書では、第1、第2等の用語を使用して様々な要素、構成要素、領域、層、及び／又は区間が説明され得るが、此れ等の要素、構成要素、領域、層、及び／又は区間は此れ等の用語に依って限定されるべきではない事が理解されよう。寧ろ、此れ等の用語は、或る要素、構成要素、領域、層、及び／又は区間を、別の要素、構成要素、領域、層、及び／又は区間と区別する為だけに使用される。従って、本明細書に於いて論じられる第1の要素、構成要素、領域、層、又は区間は、本開示の主題の教示から逸脱する事なく、第2の要素、構成要素、領域、層、又は区間と呼称され得る。操作（又は工程）の順序は、特段の具体的な指示が無い限り、特許請求の範囲又は図面に示される順序に限定されない。

40

【0052】

本明細書に於いて使用される「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、及び「含む (comprising)」という用語は、指定された特徴、整数、工程、操作、要素、及び／又は構成要素の存在を特定するが、1つ以上の他の特徴、整数、工程、操作、要素、構成要素、及び／又は其れ等の群の存在又は追加を排除するものではない。

【0053】

本明細書で使用される場合に、「実質的に～から成る (consisting essentially of)」という移行句は、特許請求の範囲が、特許請求の範囲に列挙される特定された材料又は工程、並びに特許請求の範囲に記載の基本的な特性及び新規の特性（複数を含む）に実

50

質的に影響を及ぼさない材料又は工程を包含すると解釈されるべきである事を意味する。従って、「実質的に～から成る (consisting essentially of)」という用語は、本発明の特許請求の範囲に於いて使用される場合に、「含む (comprising)」と同等であると解釈されるとは意図されない。

【0054】

本明細書で使用される場合に、「増加する (increase)」、「増加している (increasing)」、「増加した (increased)」、「増強する (enhance)」、「増強した (enhanced)」、「増強している (enhancing)」、及び「増強 (enhancement)」(及び其れ等の文法的別形)という用語は、コントロールと比較して少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%、500%以上の上昇を説明する。 10

【0055】

本明細書で使用される場合に、「低下する (reduce)」、「低下した (reduced)」、「低下している (reducing)」、「低下 (reduction)」、「減る (diminish)」、及び「減少する (decrease)」(及び其れ等の文法的別形)という用語は、コントロールと比較して少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、35%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%の減少を説明する。特定の実施形態に於いては、低下は、検出可能な活性又は量が全く無い事又は本質的に無い事(即ち、微々たる量、例えば、約10%未満又は更に5%未満)をもたらし得る。 20

【0056】

幾つかの実施形態に於いては、本開示で有用な幹細胞としては、限定されるものではないが、上皮幹細胞、腸上皮幹細胞、基底幹細胞、人工多能性幹細胞、呼吸器幹細胞、胃幹細胞、鼻幹細胞、生殖管細胞(子宮頸部、膣、子宮)、尿道細胞、嗅覚細胞、口細胞、舌細胞、及び／又は結膜細胞を挙げる事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、幹細胞は、腸上皮幹細胞である。

【0057】

幾つかの実施形態に於いては、細胞単層を含む生細胞構築物は、1つ以上の異なる細胞型(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は其れ以上)を含み得る。本明細書に於いて使用される「細胞型」は、種内の形態学的又は表現型的に異なる細胞形態を指す。幾つかの実施形態に於いては、細胞支持構造物上に配置された細胞は、健康な、炎症を起こした、又は罹患したヒト又は動物の組織に由来し得る。幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題の生細胞構築物を作るのに有用な細胞は、限定されるものではないが、炎症性腸疾患、便秘症、嚢胞性線維症、過敏性腸症候群、腸漏れ症候群、細菌異常増殖症候群、セリアック病、乳糖不耐症、過剰ガス症候群、下痢性疾患、及び／又はポリープ、虫垂炎を含む疾患を有するヒト又は動物の組織に由来し得る。 30

【0058】

幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題の細胞層は、例えば、図1A～図1Cに於いて示される様に、平坦な2次元であり得る。幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題の細胞単層を3次元形状又は構造に折り畳む事で、例えば、*in vivo*での腸の陰窩構造又は陰窩-絨毛構造を模倣する事も出来る。 40

【0059】

幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題の方法は、粘液産生細胞を含む細胞単層の管腔側に又は其の上方に(且つ粘液層上に又は其の上方／上部に)、不透過性の物理的バリア及び／又は部分的透過性(即ち、半透過性)の物理的バリアを配置する事を更に含み得る。幾つかの実施形態に於いては、液体／水の移動又は水蒸気の移動を制御する事に依って、水の輸送を調節する事が出来る。

【0060】

幾つかの実施形態に於いては、管腔(頂端)リザーバー(物理的障壁を伴う又は伴わない)中に又は細胞の管腔側に在る液体培地の体積は、細胞単層の管腔側の上方、約0.0 50

0.1 mm～約10 mmの範囲（例えば、約0.001 mm、0.002 mm、0.003 mm、0.004 mm、0.005 mm、0.006 mm、0.007 mm、0.008 mm、0.009 mm、0.01 mm、0.02 mm、0.03 mm、0.04 mm、0.05 mm、0.06 mm、0.07 mm、0.08 mm、0.09 mm、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.6 mm、0.7 mm、0.8 mm、0.9 mm、若しくは1 mm、1.1 mm、1.2 mm、1.3 mm、1.4 mm、1.5 mm、1.6 mm、1.7 mm、1.8 mm、1.9 mm、2 mm、2.1 mm、2.2 mm、2.3 mm、2.4 mm、2.5 mm、2.6 mm、2.7 mm、2.8 mm、2.9 mm、3 mm、3.1 mm、3.2 mm、3.3 mm、3.4 mm、3.5 mm、3.6 mm、3.7 mm、3.8 mm、3.9 mm、4 mm、4.1 mm、4.2 mm、4.3 mm、4.4 mm、4.5 mm、4.6 mm、4.7 mm、4.8 mm、4.9 mm、5 mm、5.1 mm、5.2 mm、5.3 mm、5.4 mm、5.5 mm、5.6 mm、5.7 mm、5.8 mm、5.9 mm、6 mm、6.1 mm、6.2 mm、6.3 mm、6.4 mm、6.5 mm、6.6 mm、6.7 mm、6.8 mm、6.9 mm、7 mm、7.1 mm、7.2 mm、7.3 mm、7.4 mm、7.5 mm、7.6 mm、7.7 mm、10 mm、又は其の中のあらゆる値若しくは範囲）（例えば、約0.005 mm～約10 mm、0.01 mm～約10 mm、約0.05 mm～約10 mm、0.1 mm～約10 mm、約0.5 mm～約10 mm、1 mm～約10 mm、約5 mm～約10 mm、約0.001 mm～約1 mm、約0.005～約1 mm、0.01 mm～約1 mm、約0.05 mm～約1 mm、0.1 mm～約1 mm、約0.5 mm～約1 mm、約0.001 mm～約0.1 mm、約0.005～約0.1 mm、0.01 mm～約0.1 mm、約0.05 mm～約0.1 mm、0.1 mm～約0.1 mm、約0.5 mm～約0.1 mm、又は其の中のあらゆる値若しくは範囲）の深さであり得る。

10

20

30

40

50

【0061】

本明細書に於いて使用される場合に、「部分的透過性の物理的バリア」又は「多孔質担体」は、ムチンに対して不透過性又は実質的に不透過性であるが、水はバリアを通過する事が出来る。従って、幾つかの実施形態に於いては、部分的透過性の物理的バリアは、約100 kDaの分子量カットオフ（MWCO）を有し得る、即ち、此のバリアは、約100 kDaより大きい（超の）分子に対して不透過性である。幾つかの実施形態に於いては、部分的透過性バリアは、約100 kDa～約150 kDaのMWCOを有し得る。ムチンは、約200 kDa～200 MDaの分子量を有する。

【0062】

本明細書に於いて使用される場合に、「不透過性の物理的バリア」は、液体培地（例えば、水）及びムチンに対して、少なくとも実質的に、好ましくは完全に不透過性である。

【0063】

従って、幾つかの実施形態に於いては、不透過性の物理的バリア又は部分的透過性の物理的バリア（又は透過性担体）を使用して、ムチン産生細胞単層の表面上に又は表面付近にムチンを拘束する事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、不透過性の物理的バリア及び／又は部分的透過性の物理的バリアを使用して、ムチンが細胞単層に依って産生される際のムチンの液体培地に依る希釈を防ぐ又は減らす事が出来る。

【0064】

物理的バリアの非限定的な例としては、半液体素材（例えば、ヒドロゲル）、ガス不透過性膜、ガス透過性膜、及び吸湿性材料（蜂蜜、グリセリン、糖、ナイロン、ABS（アクリロニトリル／ブタジエン／スチレン）、ポリカーボネート、セルロース、及びポリ（メチルメタクリレート））が挙げられる。幾つかの実施形態に於いては、部分的透過性（例えば、約100 kDaの分子量カットオフ）の物理的バリアとしては、限定されるものではないが、多孔質膜を含む多孔質材料、一部の合成ポリマー、ヒドロゲル（例えば、アガロース、ゼラチン、コラーゲン、Matrigel（登録商標）等）、一部の油、及び／又はメッシュ（例えば、ナイロン、フォトレジスト、ポリジメチルシロキサン、及び其の他の合成ポリマー等）を挙げる事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、蒸気透過性

の物理的バリアを使用する事が出来る。本開示の主題で有用な蒸気透過性膜の非限定的な例としては、コーティング／充填剤を含まないポリジメチルシロキサン（P D M S）、一部の合成ポリマー、及び／又はメッシュが挙げられる。不透過性膜（水及びムチンに対して不透過性）の非限定的な例としては、固形浮遊物（solid floaters）（例えば、ワックス、プラスチック等）、メッシュ（ナイロン、フォトレジスト、ポリジメチルシロキサン、及び他の合成ポリマー等）、油（例えば、鉱油、パーフルオロカーボン、天然油等）、及び／又は合成ポリマーが挙げられる。

【0065】

本明細書に於いて使用される場合に、「細胞支持構造物」は、1つ以上の細胞及び／又は組織を其の上に配置する事が出来るあらゆる構造物であり得て、有機物、無機物、又は其れ等の複合物であり得て、例えば、あらゆる多孔質膜又はメッシュ膜が挙げられる。

10

【0066】

幾つかの実施形態に於いては、細胞支持構造物は、コラーゲン等の有機ポリマーを、典型的には以下に論じられる他の成分と組み合わせて含み得る。幾つかの実施形態に於いては、支持物は多孔質である。以下でも論じられる様に、支持物を多孔質担体（例えば、多孔質膜、メッシュ、無機グリッド、ヒドロゲル、又は其れ等の組合せ）上に設けて又は取り付けて、其の支持物に構造的サポートを与える事が出来る。支持物は、平坦、管状、湾曲、球状、楕円体等を含むあらゆる適切な形状又は構成であり得て、其処には（例えば、マクロ解剖学的構造を真似る為に）複合物が含まれる。

【0067】

従って、本開示の主題で有用な細胞支持構造物としては、限定されるものではないが、膜、ECM（細胞外マトリックス）、ヒドロゲル、天然ポリマー又は合成ポリマー、及び／又は2次元又は3次元足場、及び／又は其れ等のあらゆる組合せを挙げる事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、例えば、管腔リザーバーの底壁は、細胞支持構造物（例えば、膜）であり得る。幾つかの実施形態に於いては、細胞支持構造物は、微細構造（例えば、約1mm未満（例えば、約100ミクロン、200ミクロン、又は300ミクロンの深さ、最大800ミクロン又は1000ミクロン以上の深さ、及び／又は約10ミクロン又は50ミクロンの幅、最大100ミクロン又は200ミクロン以上の幅）のサイズを有する特徴、例えば、マイクロウェル、柱、及び／又は溝）を含み得る。幾つかの実施形態に於いては、細胞支持構造物は、例えば、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリカーボネート（PC）、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリエーテルスルホン（PES）、酢酸セルロース、再生セルロース、窒化セルロース、ナイロン、カーボングリッド、グラフェンフィルム、ガラス、バイオガラス（例えば、45S5バイオガラス）、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素、酸化チタン、酸化アルミニウム、金、ニッケル、及び／又はステンレス鋼、又は其れ等のあらゆる組合せから構成され得る。

20

30

【0068】

幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題の細胞支持構造物として有用な、本来多孔質でない材料を、限定されるものではないが、焼結、エッチング、浸出、リソグラフィー、レーザー微細加工等を含む方法に依って多孔質にする事が出来る。例えば、ケイ素及び金の多孔質メッシュは、リソグラフィー／エッチングに依って加工され得る。幾つかの実施形態に於いては、フォトリソグラフィに依ってマイクロ細孔若しくはナノ細孔又はマイクロメッシュ若しくはナノメッシュを有するフィルムに加工されるフォトレジスト等の光反応性ポリマーを、細胞支持構造物に使用する事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、ソフトリソグラフィー又は成形に依って多孔質フィルム又はマイクロ／ナノメッシュに加工されるポリジメチルシロキサン（PDMS）又はEcoFlex等のエラストマーフィルムを、細胞支持構造物として使用する事も出来る。幾つかの実施形態に於いては、細胞支持構造物は、コラーゲン又はフィブリンのフィルム又は複合物等の脱水された又は柔軟であるが強力なマトリックスでもあり得る。

40

【0069】

50

細胞及び／又は組織は、追加の接着タンパク質又は細胞外マトリックスを有する又は有しない細胞支持構造物又は足場上に載置され得る。幾つかの実施形態に於いては、足場は、限定されるものではないが、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラチン硫酸、ヒアルロン酸、エンゲルブレス・ホルム・スワーム (Engelbreth-Holm-Swarm) マウス肉腫細胞に依って分泌されるゼラチン状タンパク質混合物 (例えば、Matrigel (登録商標)、Geltrex (登録商標)、MaxGel (商標) 等)、及び／又は市販の細胞基質 (例えば、CELLstart (商標) CTS (商標))、及び其れ等のあらゆる組合せ (例えば、コラーゲン／Matrigel (登録商標) 混合物) を含む細胞外マトリックス (ECM) 材料を含み得る。幾つかの実施形態に於いては、天然ポリマー、合成ポリマーからのヒドロゲル、及びハイブリッドヒドロゲルを使用して、2次元又は3次元の足場を構築する事が出来る。天然ポリマー及び合成ポリマーの例としては、限定されるものではないが、キトサン、アガロース、アルギン酸塩 (例えば、Algimatrix (登録商標))、フィブリン、絹、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリレートポリマー、ポリエチレングリコール (PEG)、合成ペプチド、ポリN-イソプロピルアクリルアミド、及び／又はポリアクリルアミド、及び／又は其れ等のあらゆる組合せが挙げられる。幾つかの実施形態に於いては、足場の表面を操作して、ECM分子、天然ポリマー若しくは合成ポリマー、又は限定されるものではないが、ポリ-レージン、RGD-ペプチド、及び他のインテグリン認識ペプチドセグメントを含む合成ペプチドの何れか1つ又は組合せとの細胞接着を促進する事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題で有用な細胞支持構造物を、細胞材料 (免疫細胞又は他の細胞型、組織、血液)、又は非細胞材料 (薬物、ポリマービーズ、磁性粒子等) と混合する事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、細胞支持構造物は、2次元又は3次元の微細パターン又は微細構造を含み得る。

10

20

【0070】

幾つかの実施形態に於いては、生細胞構築物の細胞は、例えば、細胞層全体に亘る水分バランスに寄与し得る添加剤、化合物、及び／又は溶液を含む液体培地中で培養され得る。幾つかの実施形態に於いては、添加剤、化合物、及び／又は溶液としては、限定されるものではないが、ホルモン、化学添加剤、食品添加剤、細菌代謝産物、及び／又は高張塩溶液を挙げる事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、添加剤、化合物、及び／又は溶液は、管腔リザーバー (細胞単層の管腔側) 及び／又は基底リザーバー (細胞単層の基底側) に存在する／其の中に導入され得る。従って、例えば、腸管腔への水及び電解質の分泌を刺激するホルモンを、細胞単層の基底側 (基底リザーバー) に添加して、細胞単層を横切る流体移動のバランスを補助する事が出来る。対照的に、食品添加剤及び細菌代謝産物を、細胞単層の管腔側 (管腔リザーバー) に添加することができる。

30

【0071】

幾つかの実施形態に於いては、開示された生細胞構築物、並びに関連する方法及びシステムは、細胞支持構造物、多孔質膜等を収容する為に、及び／又は本明細書に記載及び示される管腔リザーバー及び／又は基底リザーバーを作る為に、培養ウェル、又は当業者に知られる、限定されるものではないが、マルチウェルプレート、アガープレート、培養ディッシュ、バイアル、チューブ等を含む他の適切な培養装置、培養容器、システム、若しくはデバイスを含み得る (例えば、図1及び図3を参照のこと)。

40

【0072】

幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題で有用なホルモンとしては、限定されるものではないが、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、5-ヒドロキシトリプタミン (セロトニン、5-HT)、サブスタンスP、骨形成タンパク質 (BMP)、ガストリン、コレシストキニン、セクレチン、グレリン、モチリン、胃抑制ポリペプチド、レプチン、グルカゴン様ペプチド、ソマトスタチン、及び／又はニューロテンシンを挙げる事が出来る。

【0073】

有用な化学添加剤の非限定的な例としては、限定されるものではないが、酪酸塩、ジベ

50

ンズアゼピン、ガンマセクレターゼ阻害剤（DAPT、LY411575）、フォルスコリン、グアイフェネシン、カルバコール、プロスタグランジン、ホルボールエステル（phorbol ester）（ホルボール12-ミリステート13-アセート）、ヒスタミン、及び／又はN-（1-オキソブチル）-環状3',5'-（ハイドロジェンホスフェート）2'-ブタノエート-アデノシン、-ナトリウム塩（即ち、ジブチリル-cAMP、ナトリウム塩）（CAS 16980-89-5）が挙げられる。

【0074】

例示的な食品添加剤としては、N-ニトロソアナバシン、マタイレシノール（matairesinol）、及び／又はカフェインが挙げられる。

【0075】

幾つかの実施形態に於いては、細菌代謝産物としては、限定されるものではないが、短鎖脂肪酸を挙げる事が出来る。

【0076】

幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題で有用な高張塩溶液中の塩としては、限定されるものではないが、ナトリウム、塩素、カリウム、マグネシウム、リン酸塩、炭酸塩、及び／又はリチウムを挙げる事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、高張溶液中の塩の濃度は、約1mM～約1000mM（例えば、約1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM、100mM、105mM、110mM、115mM、120mM、125mM、130mM、135mM、140mM、145mM、150mM、155mM、160mM、165mM、170mM、175mM、180mM、185mM、190mM、195mM、200mM、205mM、210mM、215mM、220mM、225mM、230mM、235mM、240mM、245mM、250mM、255mM、260mM、265mM、270mM、275mM、280mM、285mM、290mM、295mM、300mM、305mM、310mM、315mM、320mM、325mM、330mM、335mM、340mM、345mM、350mM、355mM、360mM、365mM、370mM、375mM、380mM、385mM、390mM、395mM、400mM、405mM、410mM、415mM、420mM、425mM、430mM、435mM、440mM、445mM、450mM、455mM、460mM、465mM、470mM、475mM、480mM、485mM、490mM、495mM、500mM、505mM、510mM、515mM、520mM、525mM、530mM、535mM、540mM、545mM、550mM、555mM、560mM、565mM、570mM、575mM、580mM、585mM、590mM、595mM、600mM、605mM、610mM、615mM、620mM、625mM、630mM、635mM、640mM、645mM、650mM、655mM、660mM、665mM、670mM、675mM、680mM、685mM、690mM、695mM、700mM、705mM、710mM、715mM、720mM、725mM、730mM、735mM、740mM、745mM、750mM、755mM、760mM、765mM、770mM、775mM、780mM、785mM、790mM、795mM、800mM、805mM、810mM、815mM、820mM、825mM、830mM、835mM、840mM、845mM、850mM、855mM、860mM、865mM、870mM、875mM、880mM、885mM、890mM、895mM、900mM、905mM、910mM、915mM、920mM、925mM、930mM、935mM、940mM、945mM、950mM、955mM、960mM、965mM、970mM、975mM、980mM、985mM、990mM、995mM、1000mM、及び其の中のあらゆる値又は範囲）であり得る。従って、幾つかの実施形態に於いては、此の溶液中の塩の濃度は、約5mM～約50mM、約5mM～約100mM、約10mM～約100mM、約10mM～約250mM、約10mM～約500mM、約10mM～約1000mM、約50mM～約100mM、約50mM

10

20

30

40

50

M～約500mM、約50mM～約1000mM、約100mM～約250mM、約100mM～約500mM、約100mM～約1000mM、約200mM～約500mM、約200mM～約1000mM、約300mM～約500mM、約300mM～約800mM、約300mM～約1000mM、約400mM～約500mM、約400mM～約800mM、約400mM～約1000mM、約500mM～約750mM、約500mM～約1000mM、約600mM～約1000mM、約700mM～約1000mM、約800mM～約1000mM、及び其の中のあらゆる値又は範囲であり得る。

【0077】

細胞及び／又は組織の成長／維持に有用なあらゆる物質を、基底リザーバー又は管腔リザーバー中に導入する事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、物質としては、限定されるものではないが、フィブロネクチン、ラミニン、上皮成長因子（EGF）、R-スポンジン、ノギン、サイトカイン（例えば、インターロイキン（例えば、IL-6、IL-17、IL-22）、腫瘍壊死因子（TNF））、エフリン受容体（例えば、エフリンB、EphB）、骨形成タンパク質（BMP、BMP-2、BMP-7）、Wnt（ウィングレス関連の統合部位）（例えば、Wnt3、Wnt3A、及び其の他のWnt）、notchシグナル伝達因子（notch受容体）、DLL1/4、ノギン、Grem1、Grem2、酢酸塩、酪酸塩、プロピオン酸塩、デスアミノチロシン、カテコールアミン（例えば、ドーパミン、ノルエピネフリン）、サイトカイン、及び／又は短鎖脂肪酸を挙げることが出来る。

【0078】

幾つかの実施形態に於いては、生物に依る感染を予防する又は生物の感染能力を低下させる薬物の有効性を評価する方法であって、本開示の主題の生細胞構築物の管腔側を生物と接触させる事と、生細胞構築物の管腔側を薬物と接触させる事と、生物が生細胞構築物の細胞単層の1つ以上の細胞に感染するかどうかを判定する事とを含み、此处で、薬物は、コントロール（即ち、生物と接触させるが、薬物と接触させない）と比較して、生物が生細胞構築物の細胞単層の1つ以上の細胞に感染しなければ、生物の感染の予防又は生物の感染能力の低下に於いて有効であると判定される、方法が提供される。幾つかの実施形態に於いては、生細胞構築物の管腔側と生物との接触は、生細胞構築物の管腔側と薬物との接触の前、接触と同時に、又は接触の後である。幾つかの実施形態に於いては、薬物は、生物の約25%～約100（例えば、約25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、及び其の中のあらゆる値又は範囲）が殺傷される場合に有効であると判定され得る。

【0079】

幾つかの実施形態に於いては、本開示の主題は、生物に依る侵入、粒子に依る接触、及び／又は化学物質／化合物に依る接触に対する細胞単層の免疫学的応答を評価する方法であって、本開示の主題の生細胞構築物の管腔側を、生物、粒子、及び／又は化学物質／化合物と接触させる事と、生細胞構築物の細胞単層の細胞を、免疫応答に関連するマーカー（例えば、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、神経伝達物質、及び／又は抗微生物性ペプチド）の産生についてアッセイし、其れに依り、生物、粒子、及び／又は化学物質／化合物に依る接触に対する生細胞構築物の細胞単層の免疫学的応答を評価する事とを含む、方法を提供する。

【0080】

幾つかの実施形態に於いては、化学物質及び／又は化合物としては、限定されるもので

はないが、ビタミン又は短鎖脂肪酸等の食品代謝産物及び／又は細菌代謝産物を挙げる事が出来る。

【0081】

本開示の主題の方法及び生細胞構築物を使用して研究され得る生物は、あらゆる生物であり得て、例えば、細菌、ウイルス、真菌、原生動物、及び／又は蠕虫が挙げられる。従って、例えば、あらゆる細菌、ウイルス、真菌、原生動物、又は蠕虫を、細胞に感染する能力について研究して、生物に依る感染を予防する／生物の感染能力を低下させる薬物の有効性を評価する事が出来、及び／又は生物に依る接触に応答した生細胞構築物の細胞の免疫学的応答を評価する事が出来る。

【0082】

幾つかの実施形態に於いては、生物は細菌であり得る。細菌の非限定的な例としては、エシェリキア属の複数種 (*Escherichia* spp.)、エルシニア属の複数種 (*Yersinia* spp.)、サルモネラ属の複数種 (*Salmonella* spp.)、カンピロバクター属の複数種 (*Campylobacter* spp.)、クロストリジウム属の複数種 (*Clostridium* spp.)、ヘリコバクター属の複数種 (*Helicobacter* spp.)、バクテロイデス属の複数種 (*Bacteroides* spp.)、ペプトストレプトコッカス属の複数種 (*Peptostreptococcus* spp.)、ビブリオ属の複数種 (*Vibrio* spp.)、シゲラ属の複数種 (*Shigella* spp.)、サルモネラ属の複数種 (*Salmonella* spp.)、リステリア属の複数種 (*Listeria* spp.)、及びスタフィロコッカス属の複数種 (*Staphylococcus* spp.) からの細菌が挙げられる。幾つかの実施形態に於いては、細菌としては、限定されるものではないが、アシネトバクター・バウマニイ (*Acinetobacter baumannii*)、アクチノマイセス・イスラエリイ (*Actinomyces israelii*)、バシラス・アントラシス (*Bacillus anthracis*)、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*)、バルトネラ・ヘンセラエ (*Bartonella henselae*)、ボルデテラ・ペルトウシス (*Bordetella pertussis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・ガリニイ (*Borrelia garinii*)、ボレリア・アフゼリル (*Borrelia afzelii*)、ボレリア・リカレンシス (*Borrelia recurrentis*)、ブルセラ・アボルトス (*Brucella abortus*)、ブルセラ・カニス (*Brucella canis*)、ブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*)、ブルセラ・スイス (*Brucella suis*)、バークホルデリア・シュードマレイ (*Burkholderia pseudomallei*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア・トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*)、クラミドフィラ・シッタシ (*Chlamydophila psittaci*)、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、クロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、コリネバクテリウム・アミコラタム (*Corynebacterium amycolatum*)、コリネバクテリウム・ジフテリアエ (*Corynebacterium diphtheriae*)、コクシエラ・バーネッティ (*Coxiella burnetii*)、エールリヒア・カニス (*Ehrlichia canis*)、エールリヒア・シャフェンシス (*Ehrlichia chaffeensis*)、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、腸管毒素原性エシェリキア・コリ (*Enterotoxigenic Escherichia coli*)、腸管病原性エシェリキア・コリ (*Enteropathogenic Escherichia coli*)、腸管侵入性エシェリキア・コリ (*Enteroinvasive Escherichia coli*)、腸管出血性エシェリキア・コリ (*enterohemorrhagic Escherichia coli*)、フランシセラ・ツラレンシス (*Francisella tularensis*)、ヘモフィラス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、レプトスピラ属の複数種 (*Leptospira* species)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、マイコバクテリウム・レプラエ (*Mycobacterium leprae*)

10

20

30

40

50

)、マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、ナイセリア・ゴノレア (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、パラクラミジア (*Parachlamydia*)、シュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*)、ノカルジア・アステロイデス (*Nocardia asteroides*)、リケッチア・リケッチイ (*Rickettsia rickettsii*)、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*)、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*)、スタフィロコッカス・サブロフィティクス (*Staphylococcus saprophyticus*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・ビリダンス (*Streptococcus viridans*)、トレポネマ・パリダム (*Treponema pallidum*)、ビブリオ・コレラエ (*Vibrio cholerae*)、ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*)、ビブリオ・パラヘモリティカス (*Vibrio parahaemolyticus*)、及び／又はエルシニア・ペスティス (*Yersinia pestis*) を挙げる事が出来る。

10

【0083】

幾つかの実施形態に於いては、生物は原生動物であり得る。原生動物の非限定的な例としては、アメーボゾア、エクスカバータ、及び／又はクロムアルベオラータの門からの原生動物が挙げられる。幾つかの実施形態に於いては、原生動物としては、限定されるものではないが、アメーバ属の複数種 (*Amoeba* spp.)、エンタメーバ属の複数種 (*Entamoeba* spp.)、プラスモジウム属の複数種 (*Plasmodium* spp.)、ジアルジア属の複数種 (*Giardia* spp.)、及び／又はトリパノソーマ属の複数種 (*Trypanosoma* spp.) からの原生動物を挙げる事が出来る。幾つかの実施形態に於いては、原生動物としては、限定されるものではないが、エンタメーバ・ヒストリティカ (*Entamoeba histolytica*)、クリプトスポリジウム・パルバム (*Cryptosporidium parvum*)、クリプトスポリジウム・ホミニス (*Cryptosporidium hominis*)、シクロスポラ・カエタネンシス (*Cyclospora cayetanensis*)、及び／又はジアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*) を挙げる事が出来る。

20

30

【0084】

幾つかの実施形態に於いては、生物はウイルスであり得る。ウイルスの非限定的な例としては、単純ウイルス (*Simplexvirus*)、バリセロウイルス (*Varicellovirus*)、サイトメガロウイルス (*Cytomegalovirus*)、ロゼオロウイルス (*Roseolovirus*)、リンホクリプトウイルス (*Lymphocryptovirus*)、ラディノウイルス (*Rhadinovirus*)、アデノウイルス (*Adenovirus*)、アストロウイルス (*Astrovirus*)、カリシウイルス (*Calicivirus*)、マストアデノウイルス (*Mastadenovirus*)、アルファパピローマウイルス (*Alphapapillomavirus*)、ベータパピローマウイルス (*Betapapillomavirus*)、ガンマパピローマウイルス (*Gammapapillomavirus*)、ミューパピローマウイルス (*Mupapillomavirus*)、ニューパピローマウイルス (*Nupapillomavirus*)、ポリオーマウイルス (*Polyomavirus*)、モルシポックスウイルス (*Molluscipoxvirus*)、オルトポックスウイルス (*Orthopoxvirus*)、パラポックスウイルス (*Parapoxvirus*)、アルファトルクウイルス (*Alphatorquevirus*)、ベータトルクウイルス (*Betatorquevirus*)、ガンマトルクウイルス (*Gammatorquevirus*)、ジェミサーキュラーウイルス (*Gemycircularviruses*)、エリスロウイルス (*Erythrovirus*)、ディペンドウイルス (*Dependovirus*)、ボカウイルス (*Bocavirus*)、コルチウイルス (*Coltivirus*)、ロタウイルス (*Rotavirus*)、シードルナウイルス (*Seadornavirus*)、ヘペウイルス (*Hepevirus*)、アルファコロナウイルス (*Alphacoronavirus*)、ベータコロナウイルス (*Betacoronavirus*)、トロウイルス (*Torovirus*)、マムアストロウイルス (*Mamastrovirus*)、ノロウイルス (*Norovirus*)、サポ

40

50

ウイルス (Sapovirus)、フラビウイルス (Flavivirus)、ヘパシウイルス (Hepacivirus)、ペギウイルス (Pegivirus)、カルディオウイルス (Cardiovirus)、コサウイルス (Cosavirus)、エンテロウイルス (Enterovirus)、ヘパトウイルス (Hepatovirus) (例えば、A 型肝炎)、コブウイルス (Kobuvirus)、パレコウイルス (Parvovirus)、ロサウイルス (Rosavirus)、サリウイルス (Salivirus)、アルファウイルス (Alphavirus)、ルビウイルス (Rubivirus)、デルタウイルス (Deltavirus)、リッサウイルス (Lyssavirus)、ベシキュロウイルス (Vesiculovirus)、フィロウイルス科 (Filoviridae)、エボラウイルス (Ebola virus)、マールブルグウイルス (Marburgvirus)、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae)、ヘニパウイルス (Henipavirus)、モルビリウイルス (Morbillivirus)、レスピロウイルス (Respirovirus)、ルブラウイルス (Rubulavirus)、メタニューモウイルス (Metapneumovirus)、ニューモウイルス (Pneumovirus)、アレナウイルス (Arenavirus)、ペリブニャウイルス科 (Peribunyaviridae)、オルトブニャウイルス (Orthobunyavirus)、ハンタウイルス (Hantavirus)、ナイロウイルス (Nairovirus)、フェヌイウイルス科 (Phenuiviridae)、フレボウイルス (Phlebovirus)、A 型インフルエンザウイルス (Influenzavirus A)、B 型インフルエンザウイルス (Influenzavirus B)、C 型インフルエンザウイルス (Influenzavirus C)、トゴトウイルス (Togotavirus)、ガンマレトロウイルス (Gammaretrovirus)、デルタレトロウイルス (Deltaretrovirus)、レンチウイルス (Lentivirus)、スプマウイルス (Spumavirus)、及び／又はオルトヘパドナウイルス (Orthohepadnavirus) が挙げられる。

10

20

【0085】

幾つかの実施形態に於いては、生物は、限定されるものではないが、腸吸虫、回虫、蟯虫、及び／又は条虫を含む蠕虫であり得る。幾つかの実施形態に於いては、蠕虫としては、限定されるものではないが、アスカリス属の複数種 (*Ascaris* spp.)、アンシロストーマ属の複数種 (*Ancylostoma* spp.)、トリクリス属の複数種 (*Trichuris* spp.)、ストロンギロイデス属の複数種 (*Strongyloides* spp.)、ネカトール属の複数種 (*Necator* spp.)、スキストソーマ属の複数種 (*Schistosoma* spp.)、及び／又はトリキネラ属の複数種 (*Trichinella* spp.) からの蠕虫を挙げる事が出来る。蠕虫の更なる非限定的な例としては、アスカリス・ランブリコイデス (*Ascaris lumbricoides*) (回虫)、アンシロストーマ・ドゥオデナレ (*Ancylostoma duodenale*) (鉤虫)、ネカトール・アメリカヌス (*Necator americanus*) (鉤虫)、ストロンギロイデス・ステルコラリス (*Strongyloides stercoralis*)、トリキネラ・スピラリス (*Trichinella spiralis*)、及び／又はトリクリス・トリキウラ (*Trichuris trichiura*) (鞭虫) が挙げられる。

30

【0086】

幾つかの実施形態に於いては、生物は真菌であり得る。真菌の非限定的な例としては、カンジダ属の複数種 (*Candida* spp.)、アスペルギルス属の複数種 (*Aspergillus* spp.)、ムコール属の複数種 (*Mucor* spp.)、フザリウム属の複数種 (*Fusarium* spp.)、ブラストミセス属の複数種 (*Blastomyces* spp.)、コクシジオイデス属の複数種 (*Coccidioides* spp.)、クリプトコッカス属の複数種 (*Cryptococcus* spp.)、ヒストプラズマ属の複数種 (*Histoplasma* spp.)、リゾプス属の複数種 (*Rhizopus* spp.)、リクテイミア属の複数種 (*Lichtheimia* spp.)、ニューモシスティス属の複数種 (*Pneumocystis* spp.)、スポロトリクス属の複数種 (*Sporothrix* spp.)、及び／又はクニンガメラ属の複数種 (*Cunninghamella* spp.) からの真菌が挙げられる。真菌の更なる非限定的な例としては、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、アスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、クリプトコッカス・ガッティ (*Cryptococcus* spp.) が挙げられる。

40

50

cus gattii)、ニューモシスティス・イロベチイ (Pneumocystis jirovecii)、及び／又はトルロプシス・グラブラタ (Torulopsis, glabrata) が挙げられる。

【0087】

此处で、以下の実施例を参照して、本開示の主題を説明する。此れ等の実施例は、特許請求の範囲を本開示の主題に限定する事を意図するものではなく、寧ろ、或る特定の実施形態の例示である事を意図するものであると理解されるべきである。当業者に想起される例示された方法に於けるあらゆる変形形態は、本開示の主題の範囲内に含まれる事が意図される。

【実施例】

【0088】

以下の実施例は、本開示の主題の様々な実施形態を更に説明する為に盛り込まれている。然しながら、当業者は、本開示に照らして、本開示の主題の趣旨及び範囲から逸脱する事なく、開示された特定の実施形態に於いて多くの変更を加える事が出来、依然として同様の又は類似の結果を得る事が出来る事を理解すべきである。

【0089】

実施例 1

従来の単層培養方法では、信頼性の高いホルモンアッセイに十分な EEC 細胞及び EC 細胞を生成する事が出来ない。

腸上皮単層プラットフォームについての培養条件は、以前の出版物に於いて最適化されており、EEC 細胞系譜マーカー遺伝子 ChgA の最大発現レベルを得る為の培地組成を調査した¹¹。ニコチンアミド及び p38MAPキナーゼ阻害剤 (SB202190)、即ち、腸上皮細胞培養に於いて一般的に使用される2つの化合物は、此れ等が分泌細胞への分化を抑制する為、培地から除去する。単層培養物の適切な分化及び細胞形態の為に、TGF-β受容体シグナル伝達阻害剤であるA8301を含める事が必要とされる。此处では、同じ培地組成を採用し、従来の液内培養を使用して、in vitroの単層をヒト横行結腸由来の幹細胞から生成した。EEC (ChgA⁺) 細胞及びEC (5HT⁺) 細胞は、其々 $22 \pm 5 \text{ mm}^{-2}$ 及び $10 \pm 3 \text{ mm}^{-2}$ の密度で存在した (図2A、図2B)。従って、96ウェルインサート (表面積 = 11 mm^2) 内のEC細胞の総数は 110 ± 33 個である。EC細胞の数が機能的アッセイに十分であるかどうかを試験する為に、単層をビヒクル (ジメチルスルホキシド [DMSO]) 又はフォルスコリン ($10 \mu\text{M}$) で頂端側にて4時間刺激し、基底側から放出された5HTを収集し、定量化した (図2C)。フォルスコリンは、cAMP依存性経路の活性化を通じた5HT放出の強力な刺激である¹⁸。3つの独立した実験に於いては、フォルスコリンに依り刺激された5HT分泌は、其々 $0.97 \pm 0.34 \text{ ng/mL}$ 、 $0.88 \pm 0.28 \text{ ng/mL}$ 、及び $0.60 \pm 0.23 \text{ ng/mL}$ であり、ビヒクルコントロール (其々 $0.27 \pm 0.10 \text{ ng/mL}$ 、 $0.42 \pm 0.18 \text{ ng/mL}$ 、及び $0.25 \pm 0.07 \text{ ng/mL}$) に対する3.6倍、2.1倍、及び2.4倍の誘導に相当する。5HT測定値の標準偏差が高い為、実験間での有意なばらつきが観察された：1回目の実験での結果は統計的に非有意 ($p > 0.05$ 、t検定) であり、2回目の実験では統計的に有意 ($p < 0.05$) であるが、3回目の実験では再び統計的に非有意 ($p > 0.05$) であると見なされた。高い標準偏差は、多くの原因に依るものであった：酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に依る5HT測定値の誤差、ウェル間の変動、ウェル内に残った5HT残留物 (主に培地中のウシ胎児血清由来)、及びアッセイの間にアポトーシスECから自然に滲出した5HT。5HT分泌アッセイ及び其のシグナル／バックグラウンド比の信頼性を向上させるには、単層中のEEC細胞及びEC細胞の数を富化する必要がある。

【0090】

実施例 2

新規のVIP支援ALI培養方法及びシステムに依るEEC細胞及びEC細胞の富化

IESC及び其れ等の分化した細胞は、一般的に液内培養に於いて維持される。最近では、気液界面 (ALI) 培養を腸の単層培養に適用する事で、杯細胞及び粘液の形成に焦

10

20

30

40

50

点を当てた分泌細胞系譜の分化が改善されている^{19~21}。従来の液内培養とは異なり、A L I培養物に於ける単層の頂端面は空気に曝されて完全に乾燥していた。特に、此の状況は、頂端面に高い含水量が無い為、*in vivo*での腸管腔環境を反映していない。実際、結腸粘膜の水及び電解質の恒常性は、管腔の内外に移動する水とバランスが取れている。A L I培養を改善する為に、本開示は、腸管ホルモン、血管作動性腸管ペプチド（V I P）を使用して、上皮を横切る流体移動のバランスを補助した為、流体の薄層（約0.1 mm～約1.0 mm、又は約0.4 mmの厚さ）が頂端リザーバーで維持されて、乾燥が抑えられた。此のV I P支援A L I培養方法は、杯細胞の形成を大幅に押し上げ、粘液の分泌／蓄積を補助した。杯細胞及びE E C細胞は両方とも分泌細胞系譜に属している為、此れ等の単純な方法で、*in vitro*の単層システムに於いてE E C細胞及びE C細胞の存在を高める事が出来る可能性が高い。

10

【0091】

A L I培養及びV I PがE E C系譜の分化を改善するかどうかを検証する為に、ヒト横行結腸に由来する結腸単層を、図3 Aに概説されている4つの戦略下で分化させ、単層に於けるE E C細胞及びE C細胞の存在を免疫蛍光染色に依って明らかにした（図3 B）。液内培養（E E C： $22 \pm 5 \text{ mm}^{-2}$ 、E C： $10 \pm 3 \text{ mm}^{-2}$ ）と比較して、A L I単独では、E E C（259%）及びE C（260%）の数が大幅に増加した。液内培養にV I Pを添加すると、E E C（177%）及びE C（180%）の数も増加したが、A L Iと比較してより低い程度であった。A L IとV I Pとの組合せに依って相乗効果が観察され、其の効果は、V I Pを用いない従来の液内培養と比較して、E E C（377%）及びE C（430%）の数が大幅に増加した（図4 A及び図4 B）。単層は、E E C（ $83 \pm 11 \text{ mm}^{-2}$ ）及びE C（ $43 \pm 9 \text{ mm}^{-2}$ ）の富化された密度を有していた。E E Cの中でのE Cの割合は、此れ等の分化条件に於いて45%～51%の範囲に留まり、これは、E Cが近位結腸に於けるE E C集団の70%超を構成し、直腸に於いて約40%に低下する体内の其れ等の割合と合致している²。富化されたE C細胞が5 H T分泌を増加させるかどうかを試験する為に、単層をビヒクル（DMSO）又はフォルスコリン（ $10 \mu\text{M}$ ）で刺激した。5 H T分泌は、E C細胞の数と相関する事が判明した（図4 C）。V I P支援A L I培養物から生成された単層は、フォルスコリン刺激（ $3.79 \pm 0.57 \text{ ng/mL}$ ）の下で5 H T分泌を押し上げ、これは、液内培養（ $0.97 \pm 0.44 \text{ ng/mL}$ ）から生成された単層よりも390%高い。誘導は、ビヒクルコントロール（ $0.62 \pm 0.07 \text{ ng/mL}$ ）に対して6.1倍である。従って、富化されたE C細胞は、シグナル／バックグラウンド比を増加させる事に依り、5 H T分泌アッセイを改善する。

20

30

【0092】

実施例3

V I P支援A L I培養に依り、高いバリア完全性を伴う単層が生成された。

5 H T分泌の向上の他に、V I P支援A L I培養の追加の利点は、バリア完全性の改善である（図4 D）。4つの分化戦略の中で、V I P支援A L I培養のみが、許容可能なバリア完全性を有すると共に、低い透過係数（ $P_{app} < 4 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 、 $n=6$ ）及び高い経上皮電気抵抗（T E E R、 $842 \pm 166 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、 $n=6$ ）を有した。液内培養（V I Pの不存在下又は存在下）では、恐らく成長培地中の酸素勾配が原因で、隣接した単層が生成され得なかった。細胞呼吸と成長培地中の酸素の低い拡散速度との組合せに依り、細胞への酸素利用性の低下が引き起こされる場合がある²²。A L I培養は酸素利用性を高める事が出来るが、細胞は、頂端面での完全な乾燥の為にストレスを受けた。結果として、A L I培養に依り隣接した単層は生成され得なかった。其れに対して、V I P支援A L I培養では、頂端側で液体の薄層（約0.4 mmの厚さ）が維持された為、酸素利用性が高まると同時に、乾燥に依るストレスが排除された。頂端リザーバー及び基底リザーバーを効果的に隔離して刺激剤及び5 H Tの漏れを防ぐには、単層の高い完全性が必要とされる。

40

【0093】

E C細胞の顆粒内での5 H Tの生成及び貯蔵は細胞成熟度に依存する為、5 H T分泌の

50

レベルは単層の分化の長さに依って影響される。分化に最適な期間を突き止める為に、単層を、3日～7日に亘りVIP支援ALI培養に供した。予想通り、フォルスコリンで刺激された5HT分泌が、分化の長さと共に（細胞成熟に依り）増加した為、非刺激の基底分泌も増加した（図4E）。細胞がアポトーシスを受け始め得る分化の7日未満のバリア完全性を除いて、バリア完全性は、全ての試料について維持された（ $P_{app} < 4 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ）（図4F）。高い5HT誘導（5.7倍）及び単層バリア完全性を有する単層が生成されたので、分化に於いて5日間が最適であると見なされた。此の期間はヒト結腸に於ける分化した上皮の寿命と一致する。別段の指定が無い限り、本発明に於いて分化に5日間を使用した。

【0094】

実施例 4

継代及びドナー変動

幹細胞の継代数は、細胞ベースのアッセイを設計する際に重要な考慮事項である。其れというのも、幹細胞は、*in vitro*で増殖させると、複製老化に対して弱いからである²³。継代数が5HT分泌に影響するかどうかを研究する為に、ヒト横行結腸からの幹細胞を、様々な継代数（7回、9回、11回、13回、及び15回）でインサート上に撒種した。5HT分泌レベル（ビヒクル及びフォルスコリンに依る刺激の両方）の有意な変動は観察されなかった（図5A）。5HT分泌（フォルスコリン／DMSO）の誘導は、4.1倍～5.7倍の範囲であった。継代数16回以降の幹細胞は、染色体異常の可能性がある為廃棄した。

【0095】

様々なドナーに由来する初代幹細胞は、組織の由来元と成る個体の年齢、性別、及び健康に依じて、培養条件に於いて異なる挙動を示す事が知られている²⁴。ドナー変動を研究する為に、年齢及び性別が異なる5体の死体ドナーからの横行結腸の幹細胞（図5B）を使用して、5HT分泌に関する細胞挙動の変動を調査した。5HT分泌レベル（ビヒクル及びフォルスコリンに依る刺激の両方）の有意な変動が観察された（図5C）。ドナー3及びドナー4については低い5HT誘導（フォルスコリン／DMSO、3.6未満）が観察されたのに対して、ドナー1、ドナー2、及びドナー5については高い5HT誘導（5.0超）が観察された。有意なドナー変動は、5HT分泌挙動が複雑であり、性別及び年齢以外の多くの要因、例えば、ボディマス指数、血糖値、食習慣、及び健康状態に関連し得る事を示唆している。従って、ドナー変動の完全な調査を、初代細胞ベースのアッセイ用に確立する必要がある。ドナー2からの細胞は殆どの代表的な挙動を有する為、此れ等の細胞を上記の研究及び其の後のスクリーニング実験に使用した。

【0096】

実施例 5

刺激性食品成分の小規模スクリーニング

*in vivo*では、EC細胞は大きな基底面を有するピラミッド型の形状を特徴としている。此のピラミッド型の形状を、*in vitro*の単層プラットフォームに於いて再現した（図6A）。他のEECサブタイプと同様に、EC細胞は、細胞表面の感覚器受容体を通じて管腔内容物、特に食品化合物及び代謝産物を感知し、基底外側境界を通じて粘膜固有層へと5HTを放出する（図6B）⁷。EC富化された隣接した単分子層に依り、頂端側及び／又は基底側でEC応答を独立して刺激して分析する事が可能と成る。此れは、到達する事が出来ない管腔を有する広く使用されている腸オルガノイドシステムよりも有利である。単層システムの有用性を実証する為に、13種類の刺激性の植物性食品成分（図6C）を、管腔刺激に应答して5HT産生を調節する能力について試験した（図6D）。此れ等の化合物の中でも、クルクミン及びフォルスコリンは、其々7.3倍及び4.9倍の5HT誘導で最も強力なものである事が判明した。シンナムアルデヒド及びブラジキニン、其々1.8倍及び1.4倍の誘導で5HT分泌を僅かに高める。クルクミンは、 $51 \mu\text{M}$ の中央有効用量（ ED_{50} ）で、用量依存的に5HT分泌を刺激した。他の化合物は、5HTの分泌を有意に刺激しなかった。

【0097】

実施例 6

他の EEC サブタイプの存在

腸上皮内の腸内分泌 (EEC) 細胞は、少なくとも 15 種の異なるサブタイプから成る。腸クロム親和性 (EC) 細胞は最も豊富なサブタイプであり、消化管内の EEC 細胞の約 40% を占めている。EC 細胞に加えて、少なくとも 1 つの他の重要な EE サブタイプは L 細胞であり、此れ等は、腸-脳相互作用の主要な調節因子であり、食欲及びグルコース恒常性の調節に於いて重要である⁴。L 細胞は、食物の摂取に応答してペプチドホルモン GLP-1 及び PYY を共分泌する^{5~8}。GLP-1 は、膵臓 β 細胞からのインスリンの分泌を刺激し^{9, 10}、胃内容排出を減少させ、満腹感を高める¹¹。PYY は消化管の運動性を緩慢にし、食物摂取量を減らす¹²。栄養素に対する食後応答の調節因子としての其れ等の重要な機能の為、L 細胞は、肥満及び糖尿病の分野に於いて特に関心が持たれている^{13~17}。L 細胞は、VIP-ALI で培養された単層に於いても $12 \pm 2 \text{ mm}^2$ の密度で特定され、EE 集団の約 14% を占めていた (図 7)。然しながら、L 細胞の密度は依然として低過ぎて、GLP-1/PYY 分泌の信頼性の高い機能的アッセイが行われない。従って、L 細胞を富化するのに最適なプロトコルを開発する為に、更なる実験を行った (実施例 7 を参照のこと)。

10

【0098】

実施例 7

ホルモン分泌アッセイを可能にする幹細胞由来単層システムに於ける腸内分泌 L 細胞形成の最適化

20

L 細胞を富化する為の分化培地及び培養形式の最適化

L 細胞を富化する 4 つの条件を体系的に最適化する為に実験を行った：(1) ALI の有無、(2) VIP の有無、(3) 分化培地中で 1:4、1:1、及び 4:1 での R-スポンジン/ノギン比、(4) BIMU8 (強力な 5-HT₄ アゴニスト) の有無。結腸幹細胞を、Matrigel でコーティングされた多孔質膜上に撒種し、細胞単層がコンフルエンスに達する迄、成長因子濃縮された培地中で 3 日間培養した。次に、細胞を 4 日間分化させ、GLP-1 + L 細胞の密度を読み取り値として使用した (図 8A)。予想通り、本明細書に於いて提示されたデータに基づいて、全ての条件で、ALI 培養は、液内培養条件と比較して L 細胞の形成を大幅に増加させた。分化の間の VIP 及び BIMU8 の添加も、L 細胞の形成を増加させた。図 8B を参照のこと。分化培地中の R-スポンジン/ノギン比も L 細胞の密度に影響を及ぼし、4/1 の比を使用する事に依り最良の結果が得られた。本明細書に於いて開示された条件 (ALI、VIP、R-スポンジン/ノギン = 4/1、BIMU8) を使用する事に依り、 137 ± 12 個の細胞/ mm^2 の GLP-1 + L 細胞が得られ、此れは、以前に使用された条件 (液内、VIP 無し、R-スポンジン/ノギン = 1/1、BIMU8 無し) に於ける 3 ± 2 個の細胞/ mm^2 よりも約 46 倍高く、VIP-ALI 培養 (ALI 有り、VIP 有り、R-スポンジン/ノギン = 1/1、BIMU8 無し) に於ける $12 \pm 2 \text{ mm}^2$ よりも 11 倍高い。

30

【0099】

此の調査に基づき、開示されたシステム及び方法に於ける培地への他の化合物、化学物質、ホルモン等の添加を使用して、EEC 細胞及び EC 細胞の成長、特に L 細胞の発達を更に増強する事が出来る。化合物及びホルモンの更なる非限定的な例を以下の表 2 に列挙する。

40

【0100】

50

【表 2】

表 2

試薬	濃度の 範囲(μM)	参照	説明
フォスコリン	0.1-100	40	環状AMPのレベルを増加させる
イソブチルメチルキサンチン (IBMX)	0.1-100	40	細胞内cAMPを高める
オリゴフルクトース	0.01-10	41	エンテログルカゴン血漿レベルの増加と
イヌリン型フルクタン	0.1-100	41	関連する結腸に於ける細胞増殖を刺激する
セロトニン	0.001-1	42	L細胞形成を促進する隣接する 腸クロム親和性細胞からの傍分泌刺激
アルギニンバソプレシン	0.1-100	43	上皮の透過性を高める事に依り 水分保持を促進する
アンジオテンシンII	0.1-100	43	強力な昇圧活性があり、特定のGタンパク質 共役受容体と結合して相互作用する
BIMU8	—	42	セロトニン5-ヒドロキシトリプタミン受容体 4(5-HT ₄)シグナル伝達の活性化の誘導
リラグルチド	0.1-100	44	耐糖能及びインスリン応答の改善。 血糖降下作用
FFAR1アゴニスト	0.1-100	45	ペプチドYYの分泌を促進する
GPR119アゴニスト	0.1-100	42, 43, 45	Gsシグナル伝達経路を活性化して、 cAMPの増加をもたらす
GPBAR1アゴニスト	0.1-100	42, 43, 45	恐らく隣接する腸クロム親和性細胞 からの傍分泌刺激を通じて、下流の セロトニンシグナル伝達に依って模倣される
IL-1β	0.1-100	46	腸の恒常性の調節及び免疫応答の調節に依り、
IL-6	0.01-10	46	ヒストンアセチル化酵素又はGPCR経路を
TNF-α	0.1-100	46	阻害するEECが活性化される
酢酸塩	0.001-1	47	エネルギー及び代謝の調節を担う。
プロピオン酸塩	0.1-100	47	酪酸塩は、GPR43、GPR41、 及びGPR109A等の代謝産物を
酪酸塩	0.1-100	47, 48	感知するGタンパク質共役受容体(GPCR) のリガンドである
LPS	-	46	TLR4受容体を介して作用すると共に、 結果としてGLP-1が分泌される可能性がある
アッカーマンシア・ムシニフィラ、 ビフィドバクテリウム属の複数種、 ラクトバシラス属の複数種	0.1-100	41, 48	腸内分泌ペプチド分泌に関与する 腸内生物活性脂質の調節

10

20

30

40

50

【0101】

L細胞形成を増加させる開示されたシステム及び方法に於ける培地に添加するのに適した追加の化合物としては、限定されるものではないが、短鎖脂肪酸^{8、11}、オリゴフルクトース¹⁰、二次胆汁酸、植物由来の化合物、L-アミノ酸のPhe、Trp、Gln、及びAla、ジペプチドのグリシン-サルコシン¹¹が挙げられる。

【0102】

幾つかの実施形態に於いては、開示された培養方法及びシステムへの其の様な化合物、ホルモン等の添加はいずれも、EEC細胞及びEC細胞の成長、特にL細胞の発達を増強し得る。

【0103】

上記情報についての参考文献：

【0104】

G L P - 1 マーカ―及び P Y Y マーカ―の両方の分化期間及び定量化の改善

分化期間（4日～6日）を更に改善して、L細胞数を最大化し、ホルモン分泌アッセイを行うのに最良の時間を特定した（図9A及び図9B）。分化に於いて6日で、G L P - 1 マーカ―及び P Y Y マーカ―に関して最も豊富なL細胞が生成された（図9C）。全てのL細胞がG L P - 1 及び P Y Y の両方で共染色される訳ではない。86%のG L P - 1 + 細胞は P Y Y と共存し、81%の P Y Y + 細胞はG L P - 1 と共存している。断面画像（図9C、下方）は、隣接した単層内のL細胞の位置を示している。L細胞の到達可能な頂端に依り、頂端単層側からの刺激（つまり、生理的刺激の複製）が可能と成る。次に、ホルモン（G L P - 1 及び P Y Y ）が単層の基底側から分泌される。単層の高い耐性に依り、単層は不透過性バリアとして機能する事が可能と成る為、分泌されたホルモンは基底リザーバー内に留まり、頂端リザーバー及び基底リザーバーの両方に跨がって希釈されない。此れに依り、検出限界が更に向上する。単層の到達可能な基底側に依り、基底リザーバーの試料採取と共に分泌されたホルモンの定量化が可能と成る。

【0105】

L細胞プラットフォームからのホルモンG L P - 1 分泌アッセイ

ホルモン分泌アッセイについてのプラットフォームを検証する為に、最適化された単層を使用して、多数の頂端刺激下でのホルモン（G L P - 1 ）の分泌を研究した。分化した結腸単層の頂端面を、G L P - 1 分泌を刺激する可能性のある7種の異なる刺激に4時間曝した。基底側で培地を収集して、G L P - 1 の酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A ）を行った。フォルスコリン及びボンベシンは、G L P - 1 分泌の誘導に於いて最も強力であり、コントロール（D M S O ）の約6倍の高さであった。此れ等のデータ（図10）は、薬物、細菌及び其の他の微生物、食品、微生物及び食品代謝産物、並びに其の他の化学物質がL細胞のホルモン分泌に及ぼす影響についてのスクリーニングの為に此のシステムを使用出来る事を示している。

【0106】

実施例8

E E C 細胞及び E C 細胞を他のアプローチに依り増加させる：幹細胞の早期の系譜の運命決定を防ぐ。

幹細胞は、腸上皮に於ける主要な細胞型である腸細胞及び杯細胞に向かって増殖段階で系譜の運命決定がなされる可能性が高い。C H I R 9 9 0 2 1 等のシグナル伝達分子を添加して、早期の系譜の運命決定を防ぎ、幹細胞を強制的に其れ等の基底状態に留まらせる事が出来る。C H I R 9 9 0 2 1 は、G S K 3 の阻害に依り W n t シグナル伝達を活性化する。幹細胞を3 μ M の C H I R 9 9 0 2 1 下で E M 中にて培養した後に、D M 中で従来の液内培養を行うと、E C 細胞の存在が略200%増加した（図11A及び図11B）。此の結果は、W n t シグナル伝達の活性化が早期の系譜の運命決定を妨げる事を示唆している。C H I R 9 9 0 2 1 の他に、他の W n t アクチベーター（W A Y 3 1 6 6 0 6 、 A B C 9 9 、 I Q 1 、 アリールピリミジン）、並びに W n t - 3 A 及び R - スポンジンの組換えタンパク質（W n t シグナル伝達エンハンサー）は、E C 細胞の形成を増加させ得る可能性がある。W n t 活性化因子（E M 中）及び V I P 支援 A L I （D M 中）の相乗効果については研究しなかったが、両方の戦略を組み合わせる事で、E E C 細胞及び E C 細胞の形成が更に増加する事に成ると予想される。

【0107】

実施例1～実施例8の考察

上記実施例を含む本開示は、従来の液内培養よりも E E C 細胞及び E C 細胞の数を同時に単層の高いバリア完全性を維持しながら大幅に押し上げる、本明細書に於いて V I P 支援 A L I 培養として記載される新しい戦略及びシステムを示している。新しい戦略、システム、及びデバイスは、共培養又は遺伝子工学／誘導の複雑な手順を必要とせず、高い細胞生存率及びバリア完全性を維持する事に依り、既存の E E C 富化方法の制限を払拭する。作り上げられた E E C 富化された隣接した単層プラットフォームは、高いシグナルバックグラウンド比及び再現性を伴う E E C 細胞からのホルモン分泌の機能研究を可能にす

る頑健な分析ツールとして機能する。

【0108】

参考文献

限定されるものではないが、全ての特許、特許出願及び其れ等の公開公報、科学雑誌の論文、並びにデータベースのエントリー（例えば、G E N B A N K（登録商標）データベースのエントリー、及び其処で利用可能な全てのアノテーション）を含む、本明細書に於いて列記される全ての参考文献は、引用する事に依り、本明細書に於いて使用される方法論、技術、及び／又は組成物を其れ等が補足し、説明し、其の背景を提供し、又は教示する範囲で其の全体が本明細書に援用される。

【0109】

1. ラトーレ R (Latorre R), ステルニニ C (Sternini C), ダ・ジョルジョ R (De Giorgio R), グリーンウッドファン・メールフェルト B (Greenwood-Van Meerveld B) 著の「腸内分泌細胞：脳腸相関に於ける其れ等の役割のレビュー (Enterendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication)」. ニューロガストロエンテロロジー・アンド・モティリティ (Neurogastroenterology and Motility) 2016年; 第28巻: p. 620-630
2. グナワルデン AR (Gunawardene AR), コルフェ BM (Corfe BM), スタトン CA (Staton CA) 著の「下部消化管の腸内分泌細胞の分類及び機能 (Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract)」. インターナショナル・ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・パソロジー (International Journal of Experimental Pathology) 2011年; 第92巻: p. 219-231
3. チャンーグラハム AL (Chang-Graham AL), ダンホフ HA (Danhof HA), エンゲヴィク MA (Engevik MA), トマローデュヘスニュー C (Tomaro-Duchesneau C), カランディカル UC (Karandikar UC), エステス MK (Estes MK), ヴェルサロビッチ J (Versalovic J), ブリットン RA (Britton RA), ハイザー JM (Hyser JM) 著の「腸管ホルモン分泌の新規モデルとしての誘導性ニューロゲニン-3発現を伴うヒト腸エンテロイド (Human Intestinal Enteroids With Inducible Neurogenin-3 Expression as a Novel Model of Gut Hormone Secretion)」. セルラー・アンド・モレキュラー・ガストロエンテロロジー・アンド・ヘパトロジー (Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology) 2019年; 第8巻: p. 209-229
4. ブラウン T (Braun T), ヴォランド P (Volland P), クンツ L (Kunz L), プリンツ C (Prinz C), グラツル M (Gratzl M) 著の「ヒトの腸の腸クロム親和性細胞：香辛料及び匂い物質のセンサー (Enterochromaffin cells of the human gut: Sensors for spices and odorants)」. ガストロエンテロロジー (Gastroenterology) 2007年; 第132巻: p. 1890-1901
5. ベロノ NW (Bellono NW), ベイラー JR (Bayrer JR), リーチ DB (Leitch DB), カストロ J (Castro J), チャン CC (Zhang CC), オドンネル TA (O'Donnell TA), ブライアリー SM (Brierley SM), イングラハム HA (Ingraham HA), ジュリウス D (Julius D) 著の「腸クロム親和性細胞は、感覚神経経路につながる腸の化学センサーである (Enterochromaffin Cells Are Gut Chemoreceptors that Couple to Sensory Neural Pathways)」. セル (Cell) 2017年; 第170巻: p. 185-198
6. キッド M (Kidd M), グスタフソン BI (Gustafsson BI), ドロズドフ I (Drozdzov I), モドリン IM (Modlin IM) 著の「クローン病由来のEC細胞に於いては、IL1 β 及びLPSに誘導されるセロトニン分泌が増加する (IL1 β - and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease)」. ニューロガストロエンテロロジー・アンド・モティリティ (Neurogastroenterology & Motility) 2009年; 第21巻: p. 439-450

10

20

30

40

50

7. ルンド ML (Lund ML), エゲロッド KL (Egerod KL), エンゲルストフト MS (Engelstoft MS), ドミトリエワ O (Dmytriyeva O), テオドルッソン E (Theodorsson E), パテル BA (Patel BA), シュヴァルツ TW (Schwartz TW) 著の「腸クロム親和性 5-HT 細胞 - GLP-1 及び腸内微生物代謝産物に対する主要な標的 (Enterochromaffin 5-HT cells - A major target for GLP-1 and gut microbial metabolites)」. モレキュラー・メタボリズム (Molecular Metabolism) 2018 年; 第 11 巻: p. 70-83

8. サトウ T (Sato T), フリース RG (Vries RG), スニッペルト HJ (Snippert HJ), ファン・デ・ウェテリンク M (van de Wetering M), バーカー N (Barker N), シュタンゲ DE (Stange DE), ファン・エス JH (van Es JH), アボ A (Abo A), クジャラ P (Kujala P), ピーターズ PJ (Peters PJ), クレバース H (Clevers H) 著の「単一の Lgr5 幹細胞は、間葉系ニッチ無しに陰窩-絨毛構造を *in vitro* で構成する (Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche)」. ネイチャー (Nature), 2009 年; 第 459 巻: p. 262-U147

9. サトウ T (Sato T), シュタンゲ DE (Stange DE), フェランテ M (Ferrante M), フリース RGJ (Vries RGJ), ファン・エス JH (van Es JH), ファン・デン・ブリंक S (van den Brink S), ファン・フート WJ (van Houdt WJ), プロンク A (Pronk A), ファン・ガープ J (van Gorp J), シアセマ PD (Siersema PD), クレバース H (Clevers H) 著の「ヒト結腸、腺腫、腺癌、及びバレット上皮からの上皮オルガノイドの長期増殖培養 (Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium)」. ガストロエンテロロジー (Gastroenterology) 2011 年; 第 141 巻: p. 1762-1772

10. ワン Y (Wang Y), ディサルボ M (DiSalvo M), グナセカラ DB (Gunasekara DB), ダットン J (Dutton J), プロクター A (Proctor A), レブハー MS (Lebhar MS), ウィリアムソン IA (Williamson IA), シュペアー J (Speer J), ハワード RL (Howard RL), スミディ NM (Smiddy NM), ブルトマン SJ (Bultman SJ), シムズ CE (Sims CE), マグネス ST (Magness ST), アルブリットン NL (Allbritton NL) 著の「初代結腸又は直腸上皮細胞の自己再生する単層 (Self-renewing Monolayer of Primary Colonic or Rectal Epithelial Cells)」. セルラー・アンド・モレキュラー・ガストロエンテロロジー・アンド・ヘパトロジー (Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology) 2017 年; 第 4 巻: p. 165-182

11. コズカ K (Kozuka K), ヒー Y (He Y), クー・マッコイ S (Koo-McCoy S), クマラスワミ P (Kumaraswamy P), ニー B (Nie B), ショー K (Shaw K), チャン P (Chan P), レッドベター M (Leadbetter M), ヒー L (He L), ルイス JG (Lewis JG), ジョン Z (Zhong Z), シャルモット D (Charmot D), バラー M (Balaa M), キング AJ (King AJ), コールドウェル JS (Caldwell JS), シーゲル M (Siegel M) 著の「ヒト及びマウス腸上皮細胞単層プラットフォームの開発及び特性評価 (Development and Characterization of a Human and Mouse Intestinal Epithelial Cell Monolayer Platform)」. ステム・セル・レポート (Stem Cell Reports) 2017 年; 第 9 巻: p. 1976-1990

12. ヴァンデュッセン KL (VanDussen KL), マリンショー JM (Marinshaw JM), シャイク N (Shaikh N), ミヨシ H (Miyoshi H), ムーン C (Moon C), ター PI (Tarr PI), チョルバ MA (Ciorba MA), スタッペンベック TS (Stappenbeck TS) 著の「患者ベースのアッセイを容易にする増強されたヒト胃腸上皮培養システムの開発 (Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays)」. ガッ

10

20

30

40

50

ト (Gut) 2015 年; 第 64 巻: p. 911-920

13. ムーン C (Moon C), ヴァンデュッセン KL (VanDussen KL), ミヨシ H (Miyoshi H), スタッペンベック TS (Stappenbeck TS) 著の「IgA トランスサイトーシスを調節する因子を評価する初代マウス腸上皮細胞単層培養システムの開発 (Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis)」. ネイチャー・ムコサル・イムノロジー (Nature Mucosal Immunology) 2014 年; 第 7 巻: p. 818-28

14. ノエル G (Noel G), ベイツ NW (Baetz NW), スターブ JF (Staab JF), ドノヴィッツ M (Donowitz M), コブバスンジャック O (Kovbasnjuk O), パセッティ MF (Pasetti MF), ザコス NC (Zachos NC) 著の「粘膜腸管の生理学及び宿主-病原体相互作用を調査する初代ヒトマクロファージ-エンテロイド共培養モデル (A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions)」. サイエнтиフィック・レポート (Scientific Reports) 2017 年; 第 7 巻: p. 45270

15. イン J (In J), フォルケ・アーベル J (Foulke-Abel J), ザコス NC (Zachos NC), ハンセン A-M (Hansen A-M), ケイパー JB (Kaper JB), バーンスタイン HD (Bernstein HD), ハルシュカ M (Halushka M), ブラット S (Blutt S), エステス MK (Estes MK), ドノヴィッツ M (Donowitz M), コブバスンジャック O (Kovbasnjuk O) 著の「腸管出血性エシェリキア・コリは、ヒト幹細胞由来コロノイドに於いて粘液及び微絨毛間ブリッジを減らす (Enterohemorrhagic Escherichia coli Reduces Mucus and Intermicrovillar Bridges in Human Stem Cell-Derived Colonoids)」. セルラー・アンド・モレキュラー・ガストロエンテロロジー・アンド・ヘパトロジー (Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology) 2016 年; 第 2 巻: p. 48-62. e3

16. プザン M (Puzan M), ホシック S (Hosic S), ギオ C (Ghio C), コッペス A (Koppes A) 著の「腸幹細胞分化及び上皮単層機能の腸管神経系の調節 (Enteric Nervous System Regulation of Intestinal Stem Cell Differentiation and Epithelial Monolayer Function)」. サイエнтиフィック・レポート (Scientific Reports) 2018 年; 第 8 巻: p. 6313

17. バサック O (Basak O), ボイマー J (Beumer J), ヴィーブランズ K (Wiebrands K), セノ H (Seno H), ファン・オウデナアルデン A (van Ouden aarden A), クレバース H (Clevers H) 著の「腸オルガノイドに於ける Lgr5+ 幹細胞の誘導休眠は、ホルモン産生腸内分泌細胞の分化を可能にする (Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells)」. セル・ステム・セル (Cell Stem Cell) 2017 年; 第 20 巻: p. 177-190

18. チナジェロ JC (Tinajero JC), ファブリ A (Fabbri A), チョッカ DR (Ciocca DR), ドウフォ ML (Dufau ML) 著の「ラットライディッヒ細胞からのセロトニン分泌 (Serotonin secretion from rat Leydig cells)」. エンドクリノロジー (Endocrinology) 1993 年; 第 133 巻: p. 3026-3029

19. ウィルケ G (Wilke G), フンクハウザー・ジョーンズ LJ (Funkhouser-Jones LJ), ワン Y (Wang Y), ラヴィンドラン S (Ravindran S), ワン QL (Wang QL), ビーティー WL (Beatty WL), バルドリッジ MT (Baldridge MT), ヴァンデュッセン KL (VanDussen KL), シェン B (Shen B), クーレンシュミット MS (Kuhlschmidt MS), クーレンシュミット TB (Kuhlschmidt TB), ウィトラ WH (Witola WH), スタッペンベック TS (Stappenbeck TS), シブレイ LD (Sibley LD) 著の「幹細胞由来のプラットフォームは、in vitroでの完全なクリプトスポリジウム開発及び遺伝的取り扱い易さを可能にす

10

20

30

40

50

- る (A Stem-Cell-Derived Platform Enables Complete Cryptosporidium Development In Vitro and Genetic Tractability)」。セル・ホスト・アンド・マイクロブ (Cell Host & Microbe) 2019年;第26巻:p.123-134
20. ワン Y (Wang Y), キム R (Kim R), シムズ CE (Sims CE), アルブリットン NL (Allbritton NL) 著の「in vitroの初代結腸上皮モデルの生理学的関連性を改善する厚い粘液ヒドロゲル層の構築 (Building a Thick Mucus Hydrogel Layer to Improve the Physiological Relevance of In Vitro Primary Colonic Epithelial Models)」。セルラー・アンド・モレキュラー・ガストロエンテロロジー・アンド・ヘパトロジー (Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology) 2019年:doi:10.1016/j.jcmgh.2019.07.00
21. ワン Y (Wang Y), チャン IL (Chiang IL), オハラ TE (Ohara TE), フジイ S (Fujii S), チェン J (Cheng J), ムエッグ BD (Muegge BD), フェル・ヘール A (Ver Heul A), ハン ND (Han ND), ルー Q (Lu Q), ション S (Xiong S), チェン F (Chen F), ライ C-W (Lai C-W), ヤノヴァー H (Janova H), ウー R (Wu R), ホワイトハースト CE (Whitehurst CE), ファンデュッセン KL (VanDussen KL), リウ T-C (Liu T-C), ゴードン JI (Gordon JI), シブレイ LD (Sibley LD), スタッペンベック TS (Stappenbeck TS) 著の「長期培養は、結腸幹細胞の損傷修復サイクルを捉える (Long-Term Culture Captures Injury-Repair Cycles of Colonic Stem Cells)」。セル (Cell) 2019年;第179巻:p.1144-1159. e15
22. プレイス TL (Place TL), ドマン FE (Domann FE), ケース AJ (Case AJ) 著の「培養物中の細胞への酸素送達の限界:基礎研究及び橋渡し研究に於いて過小評価されている問題 (Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research)」。フリー・ラジカル・バイオロジー・アンド・メディシン (Free Radical Biology and Medicine) 2017年;第113巻:p.311-322
23. タン Q (Tan Q), ルイ PPY (Lui PPY), ルイ YF (Rui YF) 著の「腱由来幹細胞の幹細胞関連特性に対する in vitroの継代の効果 - 組織工学に於ける意味合い (Effect of in vitro passaging on the stem cell-related properties of tendon-derived stem cells-implications in tissue engineering)」。ステムセルズ・アンド・デベロップメント (Stem cells and development) 2012年;第21巻:p.790-800
24. ケッテル N (Ketterl N), ブラクトル G (Brachtel G), シュー C (Schuh C), ビーバック K (Bieback K), シャルモザー K (Schallmoser K), ライニッシュ A (Reinisch A), ストランク D (Strunk D) 著の「頑健な効力アッセイは、ヒト間葉系幹細胞/前駆細胞の免疫調節能力及び拡張された放射線耐性の大きなドナー変動を浮き彫りにする (A robust potency assay highlights significant donor variation of human mesenchymal stem/progenitor cell immune modulatory capacity and extended radio-resistance)」。ステムセル・リサーチ・アンド・セラピー (Stem cell research & therapy) 2015年;第6巻:p.236-236
25. イスラエリアン, N. (Israelyan, N.), デル・コッレ, A. (Del Colle, A.), リー, Z. (Li, Z.), パーク, Y. (Park, Y.), シン, A. (Xing, A.), ヤコブセン, J. P. R. (Jacobsen, J. P. R.), ルナ, R. A. (Luna, R. A.), イェンセン, D. D. (Jensen, D. D.), マドラ, M. (Madra, M.), サウルマン, V. (Saurman, V.), ラヒム, R. (Rahim, R.), ラトーレ, R. (Latorre, R.), ロー, K. (Law, K.), カルソン, W. (Carson, W.), バネット, N. W. (Bunnett, N. W.), キャロン, M. G. (Caron, M. G.), マーゴリス, K. G. (Margolis, K. G.) 著の「鬱病のマウスモデルに於ける消化管運動に対するセロトニ

- ン及び緩徐放出 5-ヒドロキシトリプトファンの効果 (Effects of Serotonin and Slow-Release 5-Hydroxytryptophan on Gastrointestinal Motility in a Mouse Model of Depression)」。ガストロエンテロロジー (Gastroenterology) 2019 年。https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.022
26. ワン, Y. (Wang, Y.)、シムズ, C. E. (Sims, C. E.)、アルブリットン, N. L. (Allbritton, N. L.) 著の「ヒト初代腸細胞からのセロトニン放出をアッセイする腸クロム親和性細胞富化された単層プラットフォーム (Enterochromaffin Cell-Enriched Monolayer Platform for Assaying Serotonin Release from Human Primary Intestinal Cells)」。アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.) 2020 年。https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02016 10
27. スプレックレイ, E. (Spreckley, E.)、マーフィー, K. G. (Murphy, K. G.) 著の「栄養感覚に於ける L 細胞及び食欲の調節 (The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite)」。フロンティアーズ・イン・ニュートリション (Frontiers in Nutrition) 2015 年。https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00023
28. ルイス, J. E. (Lewis, J. E.)、ミエジブロズカ, E. L. (Miedzybrodzka, E. L.)、フォアマン, R. E. (Foreman, R. E.)、ウッドワード, O. R. M. (Woodward, O. R. M.)、ケイ, R. G. (Kay, R. G.)、ゴールドスピンク, D. A. (Goldspink, D. A.)、グリブル, F. M. (Gribble, F. M.)、ライマン, F. (Reimann, F.) 著の「結腸 L 細胞の選択的刺激はマウスに於ける代謝転帰を改善する (Selective Stimulation of Colonic L Cells Improves Metabolic Outcomes in Mice)」。ディアベトロジー (Diabetologia) 2020 年。https://doi.org/10.1007/s00125-020-05149-w 20
29. デ・シルヴァ, A. (De Silva, A.)、セーラム, V. (Salem, V.)、ロング, C. J. (Long, C. J.)、マクワナ, A. (Makwana, A.)、ニューボウルド, R. D. (Newbould, R. D.)、ラビナー, E. A. (Rabiner, E. A.)、ガテイ, M. A. (Ghatei, M. A.)、ブルーム, S. R. (Bloom, S. R.)、マシューズ, P. M. (Matthews, P. M.)、ビーバー, J. D. (Beaver, J. D.)、ディロ, W. S. (Dhillon, W. S.) 著の「腸管ホルモン PYY 3-36 及び GLP-1 7-36 アミドは、食物摂取量を減らし、ヒトの食欲中枢に於ける脳活動を調節する (The Gut Hormones PYY 3-36 and GLP-1 7-36 Amide Reduce Food Intake and Modulate Brain Activity in Appetite Centers in Humans)」。セル・メタボリズム (Cell Metab.) 2011 年。https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.010 30
30. ハビブ, A. M. (Habib, A. M.)、リチャーズ, P. (Richards, P.)、ロジャース, G. J. (Rogers, G. J.)、ライマン, F. (Reimann, F.)、グリブル, F. M. (Gribble, F. M.) 著の「初代培養ヒト L 細胞からのグルカゴン様ペプチド 1 及びペプチド YY の共局在化及び分泌 (Co-Localisation and Secretion of Glucagon-like Peptide 1 and Peptide YY from Primary Cultured Human L Cells)」。ディアベトロジー (Diabetologia) 2013 年。https://doi.org/10.1007/s00125-013-2887-z 40
31. リー, Y. S. (Lee, Y. S.)、ジュン, H. S. (Jun, H. S.) 著の「膵臓ベータ細胞に対するグルカゴン様ペプチド-1 の抗糖尿病作用 (Anti-Diabetic Actions of Glucagon-like Peptide-1 on Pancreatic Beta-Cells)」。メタボリズム：クリニカル・アンド・エクスペリメンタル (Metabolism: Clinical and Experimental) 2014 年。https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.010
32. チャン, Y. (Zhang, Y.)、ディン, Y. (Ding, Y.)、ジョン, X. (Zhong, X.)、グオ, Q. (Guo, Q.)、ワン, H. (Wang, H.)、ガオ, J. (Gao, J.)、バイ, T. (Bai, T.)、レン, L. (Ren, L.)、グオ, Y. (Guo, Y.)、ジャオ, X. (Jiao, X.)、リウ, Y. (Liu, Y.) 著の「ゲニボシドは、GLP-1 受容体 / C AMP シグナル伝達及びイオンチャネルを調節する事に依り膵臓 β 細胞に於けるイン 50

スリン分泌を急激に刺激する (Geniposide Acutely Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells by Regulating GLP-1 Receptor/CAMP Signaling and Ion Channels)」。モレキュラー・アンド・セルラー・エンドクリノロジー (Mol. Cell. Endocrinol.) 2016年。https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.04.020

33. テン・カルヴェ, J. S. (Ten Kulve, J. S.)、ヴェルトマン, D. J. (Veltman, D. J.)、ファン・ブロエメンダール, L (Van Bloemendaal, L.)、グルート, P. F. C. (Groot, P. F. C.)、ルーエ, H. G. (Ruhe, H. G.)、バークホフ, F. (Barkhof, F.)、ディアマント, M. (Diamant, M.)、アイザーマン, R. G. (Ijzerman, R. G.) 著の「内因性GLP1及びGLP1類似体は、味の良い食物消費に対するCNS応答を変化させる (Endogenous GLP1 and GLP1 Analogue Alter CNS Responses to Palatable Food Consumption)」。ジャーナル・オブ・エンドクリノロジー (J. Endocrinol.) 2016年。https://doi.org/10.1530/JOE-15-0461

34. タフ, I. R. (Tough, I. R.)、フォーブス, S. (Forbes, S.)、トルハースト, R. (Tolhurst, R.)、エリス, M. (Ellis, M.)、ヘルツォグ, H. (Herzog, H.)、ボーンスタイン, J. C. (Bornstein, J. C.)、コックス, H. M. (Cox, H. M.) 著の「内因性ペプチドYY及びニューロペプチドYは、Y1及びY2受容体を介して、結腸のイオン輸送、収縮性、及び通過を阻害する (Endogenous Peptide YY and Neuropeptide y Inhibit Colonic Ion Transport, Contractility and Transit Differentially via Y1 and Y2 Receptors)」。ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー (Br. J. Pharmacol.) 2011年。https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01401.x

35. フン, C. C. C. (Hung, C. C. C.)、ピリエ, F. (Pirie, F.)、ルアン, J. (Luan, J.)、ランク, E. (Lank, E.)、モタラ, A. (Motala, A.)、イエオ, G. S. H. (Yeo, G. S. H.)、キーオ, J. M. (Keogh, J. M.)、ワレンハム, N. J. (Wareham, N. J.)、オライリー, S. (O'Rahilly, S.)、ファローキ, I. S. (Farooqi, I. S.) 著の「ヒト肥満及び肥満関連形質に関連するペプチドYY及びニューロペプチドY2受容体遺伝子の研究 (Studies of the Peptide YY and Neuropeptide Y2 Receptor Genes in Relation to Human Obesity and Obesity-Related Traits)」。ダイアベテス (Diabetes) 2004年。https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2461

36. フィールド, B. C. T. (Field, B. C. T.)、レン, A. M. (Wren, A. M.)、ピーターズ, V. (Peters, V.)、ベインズ, K. C. R. (Baynes, K. C. R.)、マーティン, N. M. (Martin, N. M.)、パターソン, M. (Patterson, M.)、アルサラフ, S. (Alsaraf, S.)、アンバー, V. (Amber, V.)、ワイン, K. (Wynne, K.)、ガテイ, M. A. (Ghatei, M. A.)、ブルーム, S. R. (Bloom, S. R.) 著の「PYY3-36及びオキシントモジュリンは、過体重及び肥満のヒトに於ける食物摂取に対する効果に於いて相加的であり得る (PYY3-36 and Oxyntomodulin Can Be Additive in Their Effect on Food Intake in Overweight and Obese Humans)」。ダイアベテス (Diabetes) 2010年。https://doi.org/10.2337/db09-1859

37. シュタイナート, R. E. (Steinert, R. E.)、フェインレ・ビセット, C. (Feinle-Bisset, C.)、アサリアン, L. (Asarian, L.)、ホロヴィッツ, M. (Horowitz, M.)、ベグリンガー, C. (Beglinger, C.)、ゲアリー, N. (Geary, N.) 著の「グレリン、CCK、GLP-1、及びPYY(3-36)：健康、肥満に於ける、及びRYGB後の摂食及び血糖症に於ける分泌制御及び生理学的役割 (Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and after RYGB)」。フィジオロジカル・レビューズ (Physiol. Rev.) 2017年。https://doi.org/10.1152/phys

10

20

30

40

50

rev.00031.2014

38. ガイダ, C. (Guida, C.)、ステファン, S. D. (Stephen, S. D.)、ワトソン, M. (Watson, M.)、デンプスター, N. (Dempster, N.)、ララウフィー, P. (Larraufie, P.)、マージョット, T. (Marjot, T.)、カーギル, T. (Cargill, T.)、リッカーズ, L. (Rickers, L.)、パヴリデス, M. (Pavlidis, M.)、トムリンソン, J. (Tomlinson, J.)、コボルド, J. F. L. (Cobbold, J. F. L.)、ザオ, C. M. (Zhao, C. M.)、チェン, D. (Chen, D.)、グリブル, F. (Gribble, F.)、レイマン, F. (Reimann, F.)、ギリース, R. (Gillies, R.)、スグロモ, B. (Sgromo, B.)、ローズマン, P. (Rorsman, P.)、リャン, J. D. (Ryan, J. D.)、ラムラケヤ, R. D. (Ramracheya, R. D.) 著の「PYY は、ヒトに於ける肥満手術後の糖尿病の解消に於いて重要な役割を担う (PYY Plays a Key Role in the Resolution of Diabetes Following Bariatric Surgery in Humans)」. イーバイオメディシン (EBioMedicine) 2019 年. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.040>

39. ベハリー, P. (Behary, P.)、タラカン, G. (Tharakan, G.)、アレキシアドウ, K. (Alexiadou, K.)、ジョンソン, N. (Johnson, N.)、ヴェーヴェル・アルブレヒトセン, N. J. (Wewer Albrechtsen, N. J.)、ケンクレ, J. (Kenkre, J.)、クエンコ, J. (Cuenco, J.)、ホープ, D. (Hope, D.)、アニアム, O. (Anyiam, O.)、チョードウリー, S. (Choudhury, S.)、アレシミイ, H. (Alessimii, H.)、ポダー, A. (Poddar, A.)、ミニオン, J. (Minnion, J.)、ドイル, C. (Doyle, C.)、フロスト, G. (Frost, G.)、ラ・ルー, C. (Le Roux, C.)、ブルカヤシャ, S. (Purkayastha, S.)、ムーシー, K. (Moorthy, K.)、ディロ, W. (Dhillon, W.)、ホルスト, J. J. (Holst, J. J.)、アーメド, A. R. (Ahmed, A. R.)、トビー・プレヴォスト, A. (Toby Prevost, A.)、ブルーム, S. R. (Bloom, S. R.)、タン, T. M. (Tan, T. M.) 著の「GLP-1、オキシントモジュリン、及びペプチド YY の組合せは、肥満及び前糖尿病 / 2 型糖尿病に於いて体重及び血糖症を改善する：無作為化単盲検プラセボ対照研究 (Combined GLP-1, Oxyntomodulin, and Peptide YY Improves Body Weight and Glycemia in Obesity and Prediabetes/Type 2 Diabetes: A Randomized, Single-Blinded, Placebo-Controlled Study)」. ダイアベテス・ケア (Diabetes Care) 2019 年. <https://doi.org/10.2337/dc19-0449>

40. ハビブ, A. M. (Habib, A. M.)、リチャーズ, P. (Richards, P.)、ロジャース, G. J. (Rogers, G. J.)、ライマン, F. (Reimann, F.)、グリブル, F. M. (Gribble, F. M.) 著の「初代培養ヒト L 細胞からのグルカゴン様ペプチド 1 及びペプチド YY の共局在化及び分泌 (Co-Localisation and Secretion of Glucagon-like Peptide 1 and Peptide YY from Primary Cultured Human L Cells)」. ディアベトロジー (Diabetologia) 2013 年. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2887-z>

41. エヴェラード, A. (Everard, A.) 及びカナイ, P. D. (Cani, P. D.) (2014 年) 著の「腸内細菌叢及び GLP-1 (Gut microbiota and GLP-1)」. レビューズ・イン・エンドクリン・アンド・メタボリック・ディスオーダーズ (Reviews in endocrine & metabolic disorders), 第 15 巻 (第 3 号), p. 189-196. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9288-6>

42. ルンド, M. L. (Lund, M. L.)、ソレンチノ, G. (Sorrentino, G.)、エゲロッド, K. L. (Egerod, K. L.)、クローネ, C. (Kroone, C.)、モルテンセン, B. (Mortensen, B.)、クノッパ, F. K. (Knop, F. K.)、レイマン, F. (Reimann, F.)、グリブル, F. M. (Gribble, F. M.)、ドルツカー, D. J. (Drucker, D. J.)、デ・コーニング, E. (de Koning, E.)、ショーンヤンス, K. (Schoonjans, K.)、ベックヘッド, F. (Baeckhed, F.)、シュヴァルツ, T. W. (Schwartz, T. W.)、及びピーターセン, N. (Petersen, N.) (2020 年)

著の「L細胞の分化は、GPBAR1及び傍分泌GLP-1及びセロトニンシグナル伝達を介して胆汁酸に依って誘導される(L-Cell Differentiation Is Induced by Bile Acids Through GPBAR1 and Paracrine GLP-1 and Serotonin Signaling)」．ダイアベテス(Diabetes)，第69巻(第4号)，p. 614-623. <https://doi.org/10.2337/db19-0764>

43. ゴールドスピク, D. A. (Goldspink, D. A.)、ルー, V. B. (Lu, V. B.)、ミエジブロズカ, E. L. (Miedzybrodzka, E. L.)、スミス, C. A. (Smith, C. A.)、フォアマン, R. E. (Foreman, R. E.)、ビルング, L. J. (Billing, L. J.)、ケイ, R. G. (Kay, R. G.)、レイマン, F. (Reimann, F.)、及びグリブル, F. M. (Gribble, F. M.) (2020年) 著の「初代回腸オルガノイド培養に於けるヒトGLP-1分泌性L細胞の標識及び特性評価(Labeling and Characterization of Human GLP-1-Secreting L-cells in Primary Ileal Organoid Culture)」．セル・リポート(Cell reports)，第31巻(第13号)，p. 107833. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107833>

44. タムラ, K. (Tamura, K.)、ミナミ, K. (Minami, K.)、クドウ, M. (Kudo, M.)、イエモト, K. (Iemoto, K.)、タカハシ, H. (Takahashi, H.)、及びセイノ, S. (Seino, S.) (2015年) 著の「リラグルチドは、アロキササンで誘発された糖尿病マウスに於ける膵臓ベータ細胞量及び機能を改善する(Liraglutide improves pancreatic Beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice)」．プロスワン(PloS one)，第10巻(第5号)，e0126003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126003>

45. ロゼングルト, N. (Rozengurt, N.)、ウー, S. V. (Wu, S. V.)、チェン, M. C. (Chen, M. C.)、ヒュアン, C. (Huang, C.)、ステルニニ, C. (Sternini, C.)、ロゼングルト, E. (Rozengurt, E.) 著の「ヒト結腸のL細胞に於けるガストデュシンの α -サブユニットとPYY及びGLP-1との共局在化(Colocalization of the α -Subunit of Gustducin with PYY and GLP-1 in L Cells of Human Colon)」．アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギー・ガストロインテスティナル・アンド・リバー・フィジオロギー(Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.) 2006年. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2006>

46. ルブラン, L. J. (Lebrun, L. J.)、レナエルツ, K. (Lenaerts, K.)、キアーズ, D. (Kiers, D.)、パイス・デ・バロス, J. P. (Pais de Barros, J. P.)、ル・グエルン, N. (Le Guern, N.)、プレスニック, J. (Plesnik, J.)、トーマス, C. (Thomas, C.)、ブルジョワ, T. (Bourgeois, T.)、デジョン, C. (Dejong, C.)、コックス, M. (Kox, M.)、フントシャイト, I. (Hundscheid, I.)、カーン, N. A. (Khan, N. A.)、マンダード, S. (Mandard, S.)、デッケルト, V. (Deckert, V.)、ピッカーズ, P. (Pickkers, P.)、ドルッカー, D. J. (Drucker, D. J.)、ラグロスト, L. (Lagrost, L.)、及びグロバー, J. (Grober, J.) (2017年) 著の「腸内分泌L細胞は腸バリア損傷後にLPSを感知してGLP-1分泌を増強する(Interoendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1 Secretion)」．セル・リポート(Cell reports)，第21巻(第5号)，p. 1160-1168. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.008>

47. ピーターセン, N. (Petersen, N.)、レイマン, F. (Reimann, F.)、バルトフェルト, S. (Bartfeld, S.)、ファリン, H. F. (Farin, H. F.)、リングナルダ, F. C. (Ringnalda, F. C.)、フリース, R. G. (Vries, R. G. J.)、ファン・デン・ブリンク, S. (Van Den Brink, S.)、クレバース, H. (Clevers, H.)、グリブル, F. M. (Gribble, F. M.)、デ・コーニング, E. J. P. (De Koning, E. J. P.) 著の「マウス及びヒトの小腸オルガノイドに於けるL細胞の生成(Generation of L Cells in Mouse and Human Small Intestine Organoids)」．ダイアベテス(Diabetes) 2014年. <https://doi.org/10.2337/db13-099>

10

20

30

40

50

1

48. コッポラ, S. (Coppola, S.)、アヴァグリアーノ, C. (Avagliano, C.)、カリグナーノ, A. (Calignano, A.)、及びベルニ・カナニ, R. (Berni Canani, R.) (2021年) 著の「肥満及び肥満関連疾患に対する酪酸塩の保護的役割 (The Protective Role of Butyrate against Obesity and Obesity-Related Diseases)」. モレキュールズ (Molecules) (スイス、バーゼル), 第26巻 (第3号), p. 682. <https://doi.org/10.3390/molecules26030682>

49. カナイ, P. D. (Cani, P. D.)、ホステ, S. (Hoste, S.)、ギオ, Y. (Guiot, Y.)、デルゼンネ, N. M. (Delzenne, N. M.) 著の「食事の非消化性炭水化物は、ラットの近位結腸に於けるL細胞の分化を促進する (Dietary Non-Digestible Carbohydrates Promote L-Cell Differentiation in the Proximal Colon of Rats)」. ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ニュートリション (Br. J. Nutr.) 2007年. <https://doi.org/10.1017/S0007114507691648>

50. パイス, R. (Pais, R.)、グリブル, F. M. (Gribble, F. M.)、レイマン, F. (Reimann, F.) 著の「マウス小腸の腸内分泌L細胞に依るペプトンの検出に關与するシグナル伝達経路 (Signalling Pathways Involved in the Detection of Peptones by Murine Small Intestinal Enteroendocrine L-Cells)」. ペプチズ (Peptides) 2016年. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.019>

【0110】

本開示の主題の様々な詳細は、本開示の主題の範囲から逸脱する事なく変更され得る事が理解されるであろう。更に、上述の詳細な説明は、例示を目的としているに過ぎず、限定を目的とするものではない。

【図面】

【図1A】

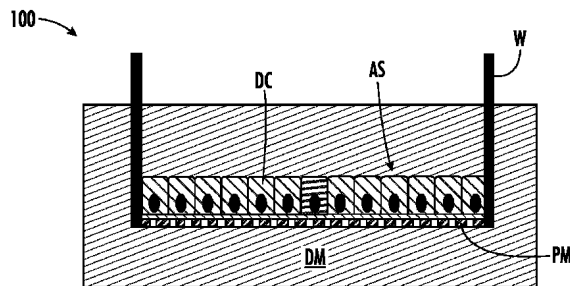


FIG. 1A

【図1B】

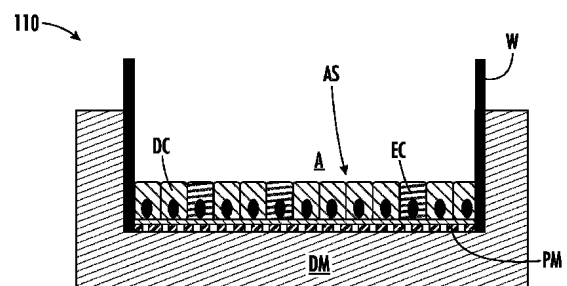


FIG. 1B

10

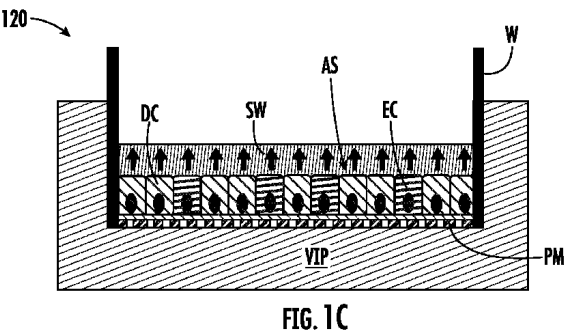
20

30

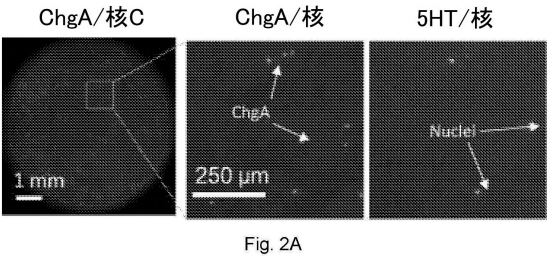
40

50

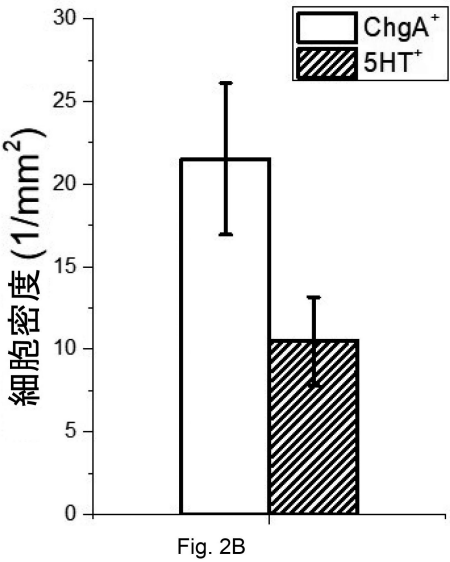
【図 1 C】



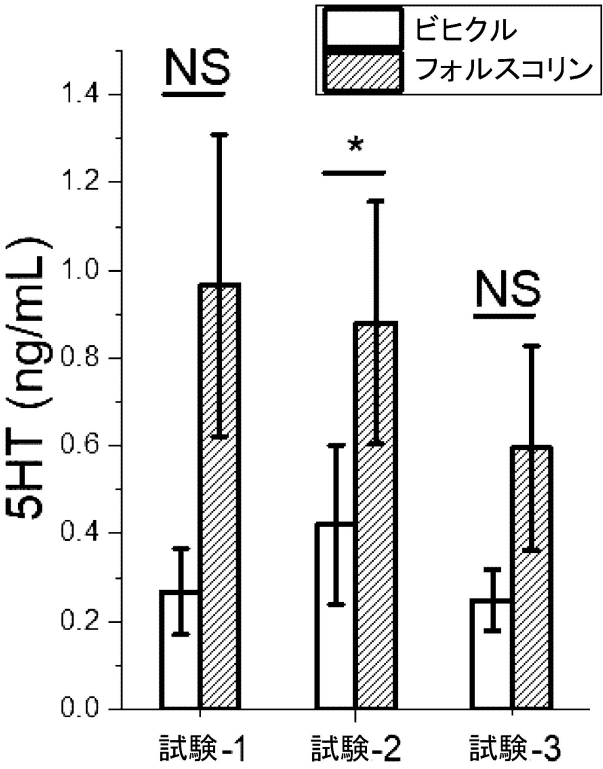
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 2 C】



10

20

30

40

50

【図 4 C】

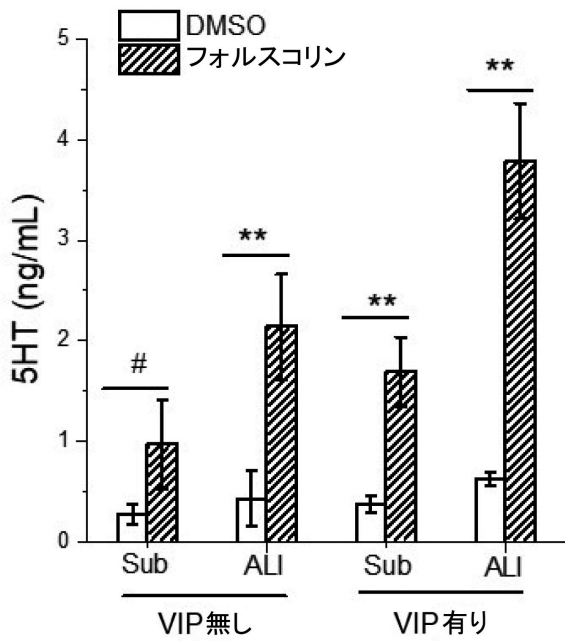


Fig. 4C

【図 4 D】

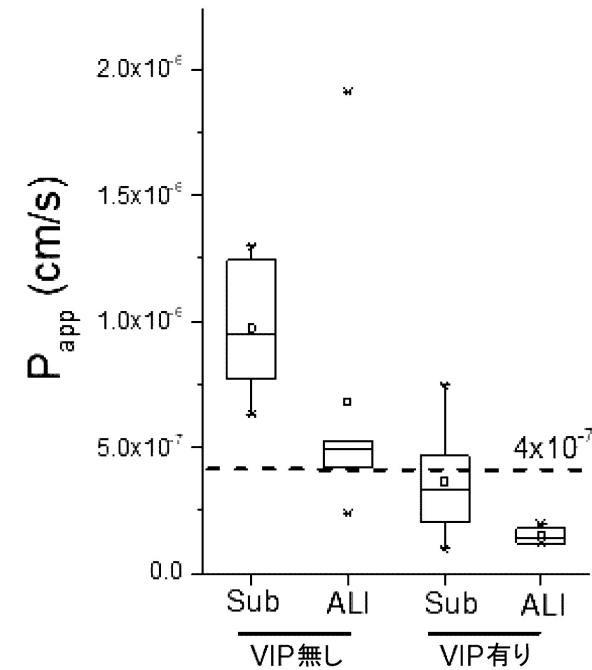


Fig. 4D

【図 4 E】

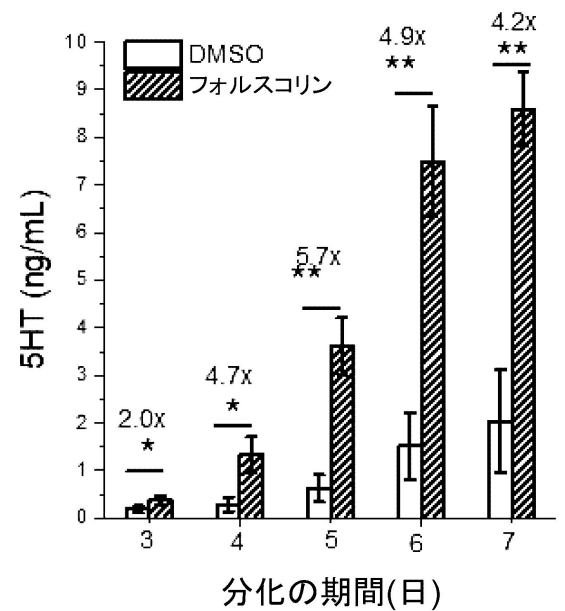


Fig. 4E

【図 4 F】

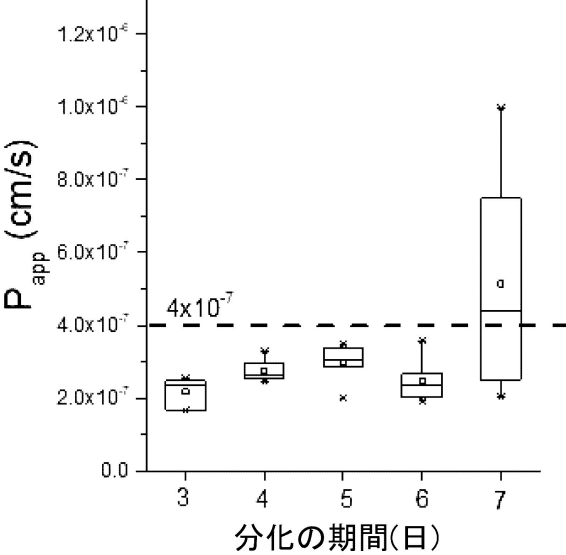


Fig. 4F

10

20

30

40

50

【図 5 A】

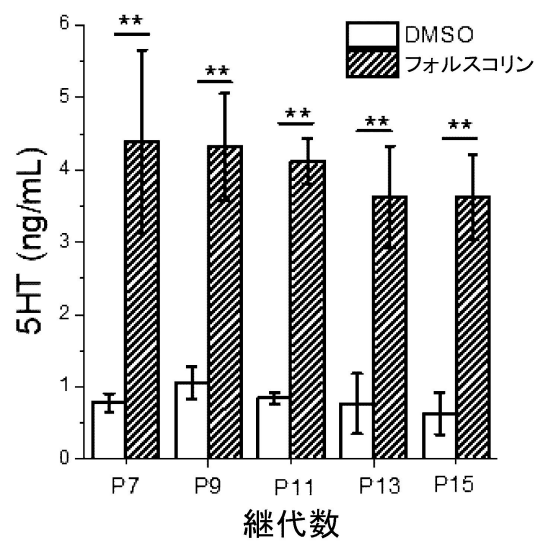


Fig. 5A

【図 5 B】

ドナー番号	年齢	性別
1	23 歳	男性
2	65 歳	女性
3	12 歳	男性
4	51 歳	女性
5	50 歳	男性

Fig. 5B

10

【図 5 C】

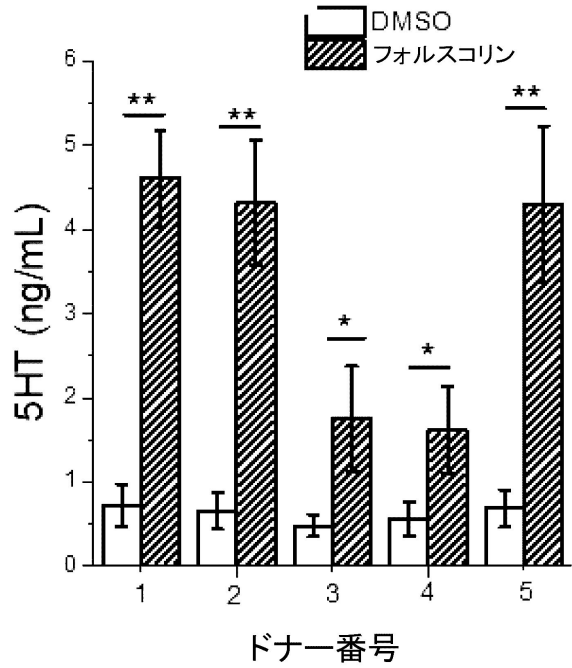
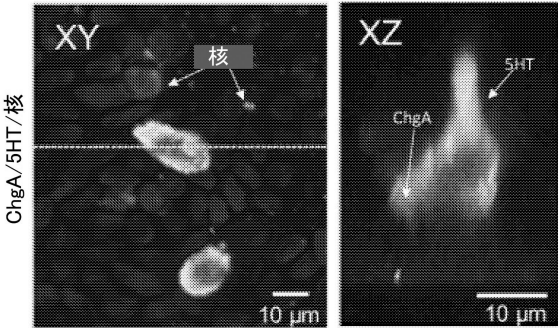


Fig. 5C

【図 6 A】



30

40

50

【図 6 B】

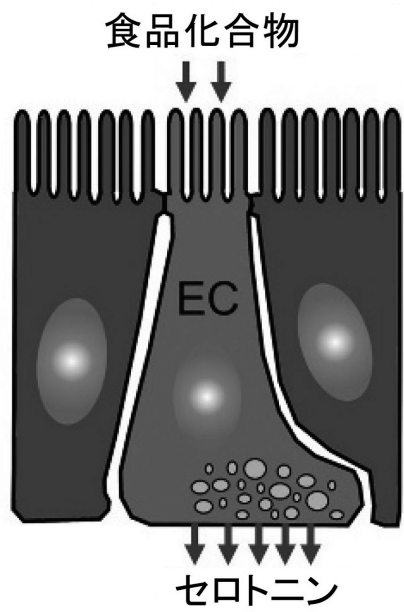


Fig. 6B

【図 6 C】

番号	化合物	植物源	作用濃度
1	フォルスコリン	インドコリウス	10 μ M
2	エビカテキン	紅茶及び仁果類	100 μ M
3	アリルイソチオシアネート	マスタード、ラディッシュ	100 μ M
4	シナナムアルデヒド	シナモン	100 μ M
5	葉酸	暗緑色野菜	100 μ M
6	リノール酸	ナッツ及び種	100 μ M
7	チアミン	ナッツ、オーツ麦、オレンジ	100 μ M
8	クルクミン	ウコン	100 μ M
9	カプサイシン	トウガラシ	100 μ M
10	アリイン	ニンニク	50 μ M
11	ギンゲロール	ショウガ	100 μ M
12	ブラジキニン	パイナップル植物	10 μ g/mL
13	サリチル酸塩	ホワイティローの樹皮	100 μ M

Fig. 6C

【図 6 D】

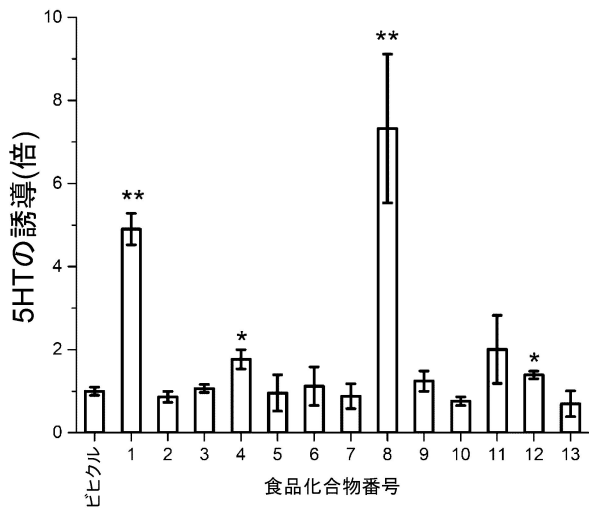


Fig. 6D

【図 7】

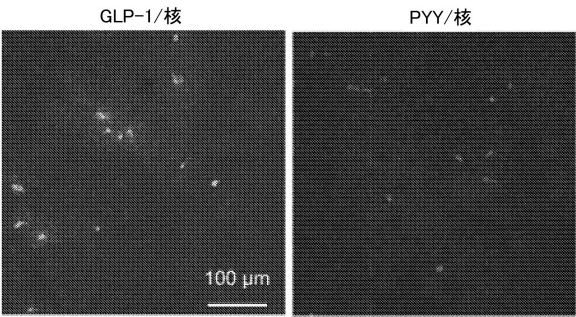


Fig. 7

10

20

30

40

50

【図 8 A】

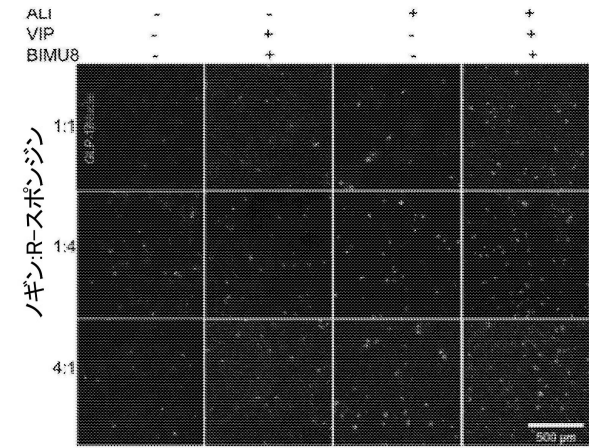


Fig. 8A

【図 8 B】

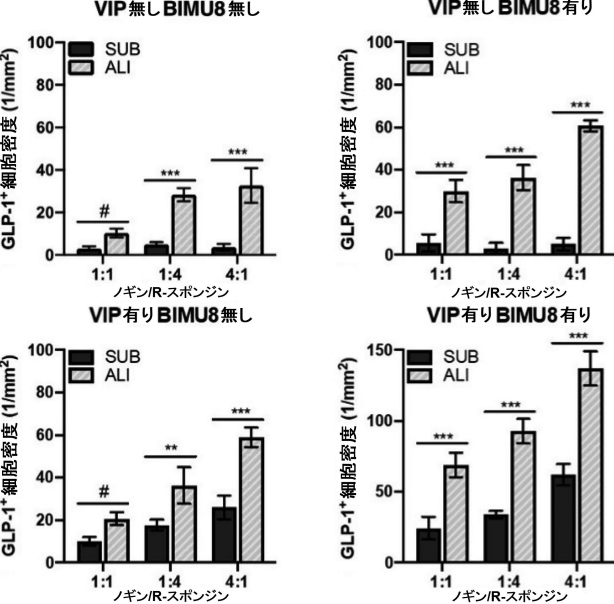


Fig. 8B

【図 9 A】

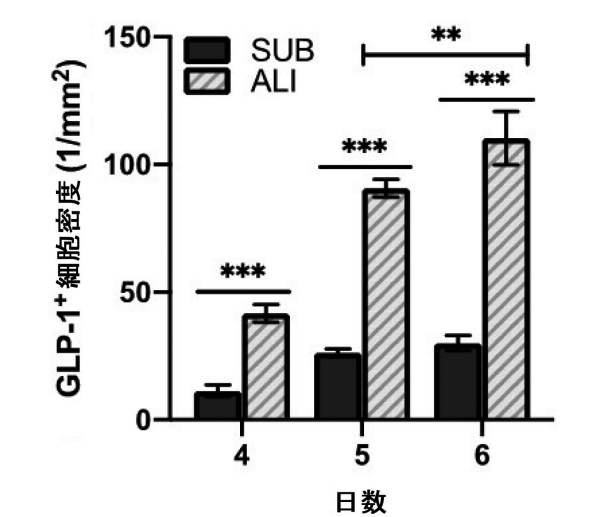


Fig. 9A

【図 9 B】

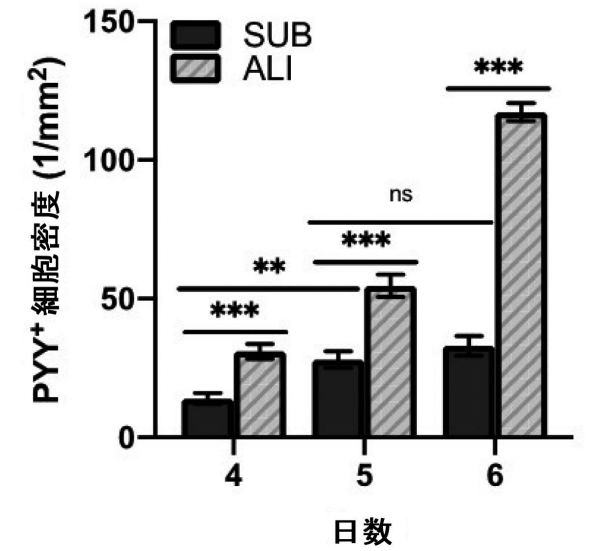


Fig. 9B

【図 9 C】

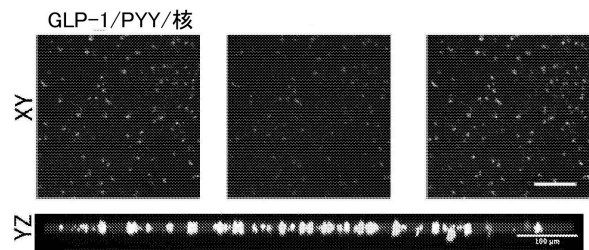


Fig. 9C

【図 1 0】

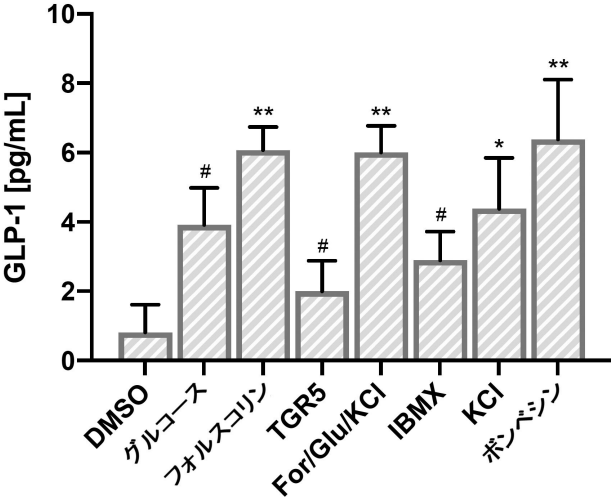


Fig. 10

【図 1 1 A】

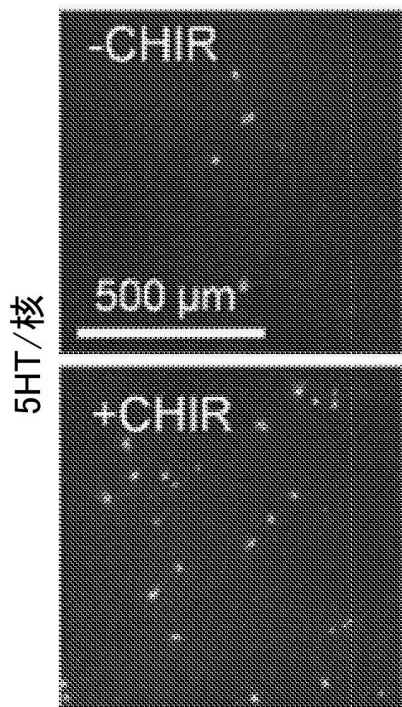
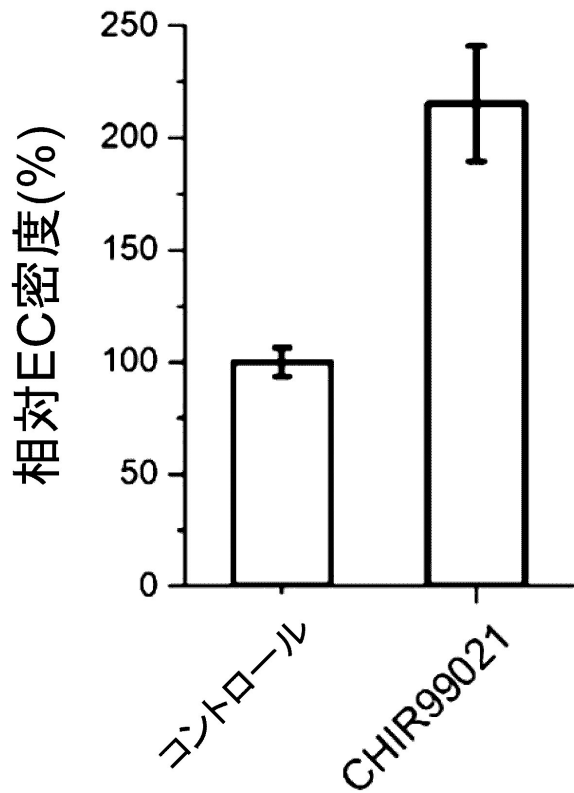


Fig. 11A

【図 1 1 B】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/025741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61P 1/00; C12M 1/00; C12M 1/12; C12M 1/34; C12M 3/00; C12M 3/06; C12N 5/00 (2021.01)
CPC - A61K 35/38; A61P 1/00; B01L 3/502761; C12M 21/08; C12M 23/16; C12M 41/46; C12N 5/0679;
C12N 5/0697; C12N 2501/11; C12N 2513/00; G01N 33/5082 (2021.05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/141824 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN EV) 25 July 2019 (25.07.2019) entire document	1-3, 27-29
A	GUNAWARDENE et al. "Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract," International Journal of Experimental Pathology, 01 August 2011 (01.08.2011), Vol. 92, Iss. 4, Pgs. 219-231. entire document	1-3, 27-29
A	WO 2019/227012 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 28 November 2019 (28.11.2019) entire document	1-3, 27-29
A	US 2018/0002672 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 04 January 2018 (04.01.2018) entire document	1-3, 27-29
P, A	WO 2020/102682 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 22 May 2020 (22.05.2020) entire document	1-3, 27-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 June 2021

Date of mailing of the international search report

JUL 09 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/025741

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-26, 30-36
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ズベルト ウェイ エヌイー 4545

4545 Roosevelt Way NE, Suite 400, Seattle, Wash
ington 98105 US

(74)代理人 100107364

弁理士 斉藤 達也

(72)発明者 アルブリトン, ナンシー, エル.

アメリカ合衆国 98105 ワシントン, シアトル, エヌイー 38 ストリート 3920

(72)発明者 ワン, ユリ

アメリカ合衆国 98087 ワシントン, リンウッド, 153 アールディー ストリート サウス
ウェスト 17

(72)発明者 シムズ, クリストファー, イー.

アメリカ合衆国 98105 ワシントン, シアトル, エヌイー 38 ストリート 3920

(72)発明者 ヴィレガス ノボア, セシリア

アメリカ合衆国 98105 ワシントン, シアトル, スイート 400, ルーズベルト ウェイ エ
ヌイー 4545 ユニバーシティ オブ ワシントン

F ターム (参考) 4B029 AA02 BB11 CC01 CC02 DA10 DG06

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ91 QR72 QR77 QS39 QX01

4B065 AA93X AC12 BC11 BC18 BD25 BD39 BD41 BD50 CA46