



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115667496 A

(43) 申请公布日 2023. 01. 31

(21) 申请号 202180038053.0

(22) 申请日 2021.05.26

(30) 优先权数据

2020-092303 2020.05.27 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/019947 2021.05.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/241621 JA 2021.12.02

(71) 申请人 大塚制药株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立研究开发法人理化学研究所

(72) 发明人 森本充 藤村崇

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 鲁雯雯 金龙河

(51) Int.Cl.

C12N 5/074 (2010.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 35/42 (2015.01)

A61L 27/38 (2006.01)

权利要求书3页 说明书40页 附图24页

(54) 发明名称

来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的制
造方法

(57) 摘要

本发明是包括在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的步骤的、由肺上皮细胞或肺癌细胞制造类器官的方法,其中,上述培养用培养基中,含有0~10%v/v的胞外基质,并且含有选自角质细胞生长因子(KGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)10和肝细胞生长因子(HGF)组成的组中的至少1种、骨形成蛋白(BMP)抑制剂以及TGF β 抑制剂的组合,并且上述培养用培养基实质上不含饲养细胞。

1. 一种由肺上皮细胞或肺癌细胞制造类器官的方法,其包括在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的步骤,其中,

所述培养用培养基中,含有0~10%v/v的胞外基质,并且含有选自由角质细胞生长因子(KGF)、成纤维细胞生长因子(FGF) 10和肝细胞生长因子(HGF)组成的组中的至少1种、骨形成蛋白(BMP)抑制剂以及TGF β 抑制剂的组合,并且

所述培养用培养基实质上不含饲养细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述组合还含有Wnt信号激活剂和Rho-激酶(ROCK)抑制剂中的任意一者或两者。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述组合为:

KGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

KGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

FGF10、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

FGF10、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

HGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

KGF、FGF10、HGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

KGF、FGF10、HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;

ROCK抑制剂、KGF、FGF10、HGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;或

ROCK抑制剂、KGF、FGF10、HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,所述BMP抑制剂为Noggin,并且/或者所述TGF β 抑制剂为SB431542。

5. 根据权利要求2~4中任一项所述的方法,其中,所述Wnt信号激活剂为CHIR99021,并且/或者所述ROCK抑制剂为Y-27632。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其中,所述试样中所含的肺上皮干细胞包括选自由基底细胞、棒状细胞、支气管肺泡干细胞和肺泡上皮细胞组成的组中的至少1个细胞种类。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其包括下述步骤:在所述培养用培养基中培养所述试样之前,基于分别针对棒状细胞-I、AT2细胞和棒状细胞-II而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种,从所述试样中选择出棒状细胞-I、AT2细胞或棒状细胞-II,

表A

棒状细胞-I	AT2细胞	棒状细胞-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Su1t1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1

Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gstol
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec1413	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		I113ra1
		Slc15a2
		Cd14

8. 一种来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官,其通过权利要求1~7中任一项所述的方法制造。

9. 一种来自肺上皮细胞的类器官,其包含内腔和面向所述内腔的细胞层,其中,所述肺上皮细胞为肺泡细胞,所述细胞层如下构成:

本质上由AT2细胞构成;

本质上由AT2细胞与表达AT2细胞标志物和支气管上皮标志物的细胞的组合构成;或

本质上由表达支气管上皮标志物的细胞构成,或者,

所述肺上皮细胞为气道细胞,所述细胞层本质上由基底细胞与表达基底细胞标志物和支气管上皮标志物的细胞的组合构成。

10. 根据权利要求9所述的类器官,其中,所述肺上皮细胞为肺泡细胞,所述细胞层本质上由AT2细胞构成,所述AT2细胞表达HT2-280和SFTPC中的任意一者或两者,并且所述HT2-280在所述AT2细胞中局部存在于面向所述内腔的细胞膜或其附近。

11. 根据权利要求9所述的类器官,其中,

所述AT2细胞标志物为HT2-280和SFTPC中的任意一者或两者,

所述支气管上皮标志物为SOX2,并且/或者所述基底细胞标志物为KRT5。

12. 一种再生医疗用组合物,其含有通过权利要求1~7中任一项所述的方法制造的来自肺上皮细胞的类器官、权利要求9~11中任一项所述的来自肺上皮细胞的类器官、和/或所述类器官的细胞。

13. 一种筛选用于处置肺癌的物质方法,其包括下述步骤:

使通过权利要求1~7中任一项所述的方法制造的来自肺癌细胞的类器官与受试物质接触;

对与所述受试物质接触后的类器官进行测定;以及

对与所述受试物质接触后的类器官的测定值和对照值进行比较。

来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及来自肺上皮细胞的类器官的制造方法。另外,本发明还涉及来自肺癌细胞的类器官的制造方法。本发明进而还涉及来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官、含有来自肺上皮细胞的类器官的再生医疗用组合物以及筛选用于处置肺癌的物质的方法。

背景技术

[0002] 组织干细胞有助于稳态下分化细胞的适当周转。在器官受到损伤时,组织干细胞通过供给分化细胞而在损伤后的再生中承担着关键作用。肺中存在多种组织干细胞。已建立了关于各种组织干细胞的类器官培养方法,并且已用于以干细胞研究和再生医疗为目标的应用研究中。作为类器官培养方法,广泛采用使用饲养细胞的培养方法(专利文献1)。近年来,也在研究不使用饲养细胞的类器官培养方法(专利文献2、非专利文献1)。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本特表2016-513469

[0006] 专利文献2:日本特表2018-503360

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Biochemical and Biophysical Research Communications、Volume 515,Issue 4,6 August 2019,Pages 579-585

发明内容

[0009] 发明所要解决的问题

[0010] 本发明的主要目的在于,提供来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的新的制造方法。

[0011] 用于解决问题的方法

[0012] 本发明提供由肺上皮细胞或肺癌细胞制造类器官的方法,上述方法包括在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的步骤,上述培养用培养基中,含有0~10%v/v的胞外基质,并且含有选自由角质细胞生长因子(KGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)10和肝细胞生长因子(HGF)组成的组中的至少1种、骨形成蛋白(BMP)抑制剂以及TGFβ抑制剂的组合,并且上述培养用培养基实质上不含饲养细胞。

[0013] 本发明还提供通过上述方法制造的来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官。本发明提供包含内腔和面向上述内腔的细胞层的、来自肺上皮细胞的类器官。

[0014] 本发明还提供含有通过上述方法制造的来自肺上皮细胞的类器官的再生医疗用组合物。

[0015] 本发明还提供筛选用于处置肺癌的物质的方法,其包括下述步骤:使通过上述方法制造的来自肺癌细胞的类器官与受试物质接触;对与上述受试物质接触后的类器官进行测定;以及对与上述受试物质接触后的类器官的测定值和对照值进行比较。

[0016] 本发明还提供包括在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的步骤的、由肺上皮细胞或肺癌细胞制造类器官的方法,其中,上述培养用培养基含有0~10%v/v的胞外基质并且含有以下的组合:含有Wnt信号激活剂、骨形成蛋白(BMP)抑制剂、TGFβ抑制剂和肝细胞生长因子(HGF)的组合;含有角质细胞生长因子(KGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)10中的任意一者或两者以及BMP抑制剂、TGFβ抑制剂和HGF的组合;或者,含有KGF和FGF10中的任意一者或两者以及Wnt信号激活剂、BMP抑制剂、TGFβ抑制剂和HGF的组合,上述培养用培养基实质上不含饲养细胞。

[0017] 本发明提供下述发明:

[0018] [项1]一种由肺上皮细胞或肺癌细胞制造类器官的方法,其包括在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的步骤,其中,上述培养用培养基中,含有0~10%v/v的胞外基质,并且含有选自由角质细胞生长因子(KGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)10和肝细胞生长因子(HGF)组成的组中的至少1种、骨形成蛋白(BMP)抑制剂以及TGFβ抑制剂的组合,并且上述培养用培养基实质上不含饲养细胞。

[0019] [项2]根据项1所述的方法,其中,上述组合还含有Wnt信号激活剂和Rho-激酶(ROCK)抑制剂中的任意一者或两者。

[0020] [项3]根据项2所述的方法,其中,上述组合为:KGF、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;KGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;FGF10、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;FGF10、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;HGF、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;KGF、FGF10、HGF、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;KGF、FGF10、HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;ROCK抑制剂、KGF、FGF10、HGF、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合;或ROCK抑制剂、KGF、FGF10、HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGFβ抑制剂的组合。

[0021] [项4]根据项1~3中任一项所述的方法,其中,上述BMP抑制剂为Noggin,并且/或者上述TGFβ抑制剂为SB431542。

[0022] [项5]根据项2~4中任一项所述的方法,其中,上述Wnt信号激活剂为CHIR99021,并且/或者上述ROCK抑制剂为Y-27632。

[0023] [项6]根据项1~5中任一项所述的方法,其中,上述试样中所含的肺上皮干细胞包括选自由基底细胞、棒状细胞、支气管肺泡上皮干细胞和肺泡上皮细胞组成的组中的至少1个细胞种类。

[0024] [项7]根据项1~5中任一项所述的方法,其中,上述试样中所含的肺上皮细胞如下构成:本质上由2型肺泡上皮细胞(以下也称为“AT2细胞”)构成;本质上由棒状细胞构成;或本质上由基底细胞与棒状细胞的组合构成。

[0025] [项8]根据项1~5中任一项所述的方法,其中,上述试样中所含的肺上皮细胞如下构成:本质上由2型肺泡上皮细胞构成;或本质上由棒状细胞构成。

[0026] [项9]根据项1~8中任一项所述的方法,其包括下述步骤:在上述培养用培养基中培养上述试样之前,基于分别针对棒状细胞-I、AT2细胞和棒状细胞-II而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种,从上述试样中选择出棒状细胞-I、AT2细胞或棒状细胞-II。

[0027] 表A

[0028]

棒状细胞-I	AT2细胞	棒状细胞-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec1413	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Lv6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0029] [项10]根据项1~9中任一项所述的方法,其包括下述步骤:将在含有上述组合的上述培养用培养基中培养的上述细胞在不含上述组合的培养用培养基中进一步培养。

[0030] [项11]一种来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官,其通过项1~10中任一项所述的方法制造。

[0031] [项12]一种来自肺上皮细胞的类器官,其包含内腔和面向上述内腔的细胞层,其中,上述肺上皮细胞为肺泡细胞,上述细胞层如下构成:本质上由AT2细胞构成;本质上由AT2细胞与表达AT2细胞标志物和支气管上皮标志物的细胞的组合构成;或本质上由表达支气管上皮标志物的细胞构成,或者,上述肺上皮细胞为气道细胞,上述细胞层本质上由基底细胞与表达基底细胞标志物和支气管上皮标志物的细胞的组合构成。

[0032] [项13]根据项12所述的类器官,其中,上述肺上皮细胞为肺泡细胞,上述细胞层本质上由AT2细胞构成,上述AT2细胞表达HT2-280和SFTPC中的任意一者或两者,并且上述

HT2-280在上述AT2细胞中局部存在于面向上述内腔的细胞膜或其附近。

[0033] [项14]根据项12所述的类器官,其中,上述AT2细胞标志物为HT2-280和SFTPC中的任意一者或两者,上述支气管上皮标志物为SOX2,并且/或者上述基底细胞标志物为KRT5。

[0034] [项15]一种再生医疗用组合物,其含有通过项1~10中任一项所述的方法制造的来自肺上皮细胞的类器官、项12~14中任一项所述的来自肺上皮细胞的类器官、和/或上述类器官的细胞。

[0035] [项16]一种再生医疗用组合物,其含有本质上由表达表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种的棒状细胞-I、AT2细胞或棒状细胞-II构成的肺上皮细胞。

[0036] 表A

[0037]

棒状细胞-I	AT2细胞	棒状细胞-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgbla1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgblc1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elovl1	Pigr
Retn1a	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		I113ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0038] [项17]一种筛选用于处置肺癌的物质的方法,其包括下述步骤:使通过项1~10中任一项所述的方法制造的来自肺癌细胞的类器官与受试物质接触;对与上述受试物质接触

后的类器官进行测定;以及对与上述受试物质接触后的类器官的测定值和对照值进行比较。

[0039] [项18]一种药物组合物,其含有:本质上由棒状细胞-II构成的肺上皮细胞,所述棒状细胞-II是基于针对棒状细胞-II而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种从含有肺上皮细胞的试样中选择出的棒状细胞-II;以及用于处置肺损伤或肺疾病的药剂。

附图说明

[0040] 图1为基于来自SFTPC-GFP小鼠来源的肺上皮干细胞的绿色荧光蛋白(GFP)荧光强度的、上述肺上皮干细胞的散布图。

[0041] 图2为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{hi}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的形成比例的条形图。

[0042] 图3为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{hi}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的长径的条形图。

[0043] 图4为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{lo}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的形成比例的条形图。

[0044] 图5为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{lo}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的长径的条形图。

[0045] 图6为示出在含有胞外基质作为分散成分的培养用培养基中形成的、来自肺上皮干细胞的类器官的形成比例的条形图。

[0046] 图7为来自肺癌细胞的类器官的形成比例的条形图。

[0047] 图8为基于来自SFTPC-GFP小鼠来源的肺上皮干细胞的GFP荧光强度的、上述肺上皮干细胞的散布图。

[0048] 图9为示出各GFP级分中的各标志物基因的表达量的条形图。

[0049] 图10为GFP^{neg}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的荧光图像。

[0050] 图11为GFP^{lo}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的荧光图像。

[0051] 图12为GFP^{hi}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的荧光图像。

[0052] 图13A为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{hi}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的形成比例的条形图。图13B为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{hi}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的长径的图。

[0053] 图14A为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{lo}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的形成比例的条形图。图14B为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{lo}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的长径的图。

[0054] 图15A为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{neg}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的形成比例的条形图。图15B为示出在含有胞外基质作为支架的培养用培养基中形成的、GFP^{neg}级分中的来自肺上皮干细胞的类器官的长径的图。

[0055] 图16A为实施例3中使用的供体小鼠和受体小鼠的示意图。图16B为实施例3的方案图。图16C为给药了来自类器官的细胞的小鼠的肺的冷冻切片的荧光图像。图16D为将图16C的白色方框所包围的区域放大后的荧光图像。

[0056] 图17A为由人肺泡细胞形成的类器官的显微镜图像。图17B为由人气道细胞形成的类器官的显微镜图像。

[0057] 图18A为由人肺泡细胞形成的肺泡型的类器官的荧光图像。图18B为由人肺泡细胞形成的支气管肺泡型的类器官的荧光图像。图18C为由人肺泡细胞形成的支气管型的类器官的荧光图像。

[0058] 图19A为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的面积的图。图19B为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的周长的图。图19C为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的长径的图。图19D为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的短径的图。图19E为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的球形度的图。图19F为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的灰度值(平均值)的图。图19G为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的灰度值(众数值)的图。图19H为示出以细胞群培养时的、形成了类器官的细胞的重心的图。

[0059] 图20A为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的面积的图。图20B为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的周长的图。图20C为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的长径的图。图20D为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的短径的图。图20E为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的球形度的图。图20F为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的灰度值(平均值)的图。图20G为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的灰度值(众数值)的图。图20H为示出以单细胞培养时的、形成了类器官的细胞的重心的图。

[0060] 图21A为示出各聚类簇中的Scgb1a1的表达水平的散布图。图21B为示出各聚类簇中的Sftpc的表达水平的散布图。图21C为示出各聚类簇的细胞种类的散布图。图21D为示出各聚类簇的面积图。

[0061] 图22为示出在与聚类簇2对应的细胞中强烈表达的9种细胞表面标志物的图。

[0062] 图23A为示出CD14^{+/+}细胞中的标志物基因的表达水平的条形图。图23B为示出CD14^{+/+}细胞的面积图。

[0063] 图24A为示出培养第9天的CD14^{+/+}细胞的显微镜图像。图24B为示出来自CD14^{+/+}细胞的类器官的形成比例的条形图。

[0064] 图25为示出来自CD14^{+/+}细胞的类器官中的标志物基因的表达量的条形图。

[0065] 图26A为CD14⁺细胞的培养第9天的类器官的免疫染色的荧光图像。图26B为CD14⁺细胞的培养第12天的类器官的免疫染色的荧光图像。

[0066] 图27A为示出在给药了CD14^{+/+}细胞的肺中观察到的聚类簇数量的条形图。图27B为示出在给药了CD14^{+/+}细胞的肺中观察到的聚类簇中所含的细胞数的图。

[0067] 图28为示出给药于受到博来霉素伤害的肺的CD14⁺细胞分化为1型肺泡上皮细胞(以下也称为“AT1细胞”)或2型肺泡上皮细胞(以下也称为“AT2细胞”)的荧光图像。

[0068] 图29为示出给药于受到博来霉素伤害的肺的CD14⁺细胞分化为纤毛细胞的荧光图像。

具体实施方式

[0069] [来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的制造方法]

[0070] 本发明的一个方式提供由肺上皮细胞或肺癌细胞制造类器官的方法。上述方法包括在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的步骤,上述培养用培养基含有0~10%v/v的胞外基质并且含有本发明的添加剂,上述培养用培养基实质上不含饲养细胞。

[0071] 本说明书中的术语“类器官”是指:在试管内(体外)形成的三维的类似生物体组织的细胞聚集体。类器官的上下文中,“类似生物体组织”或“与生物体组织类似”是指:类器官的解剖学结构与生物体组织的解剖学结构相似。构成类器官的细胞例如大部分为具有分化能力和增殖能力的细胞。构成类器官的培养细胞可以按照公知的方法使其分化为各种细胞型。构成类器官的培养细胞例如可以通过使培养用培养基中包含添加剂或除去添加剂而分化为多种细胞型。构成类器官的培养细胞例如可以通过在不含本发明的添加剂的培养用培养基中进行培养而进行分化诱导。类器官可以含有一部分已分化的细胞或不具有分化能力的细胞。类器官例如可以按照公知的细胞培养方法进行制造。类器官例如可以通过在细胞培养装置中维持处于含有本发明的添加剂的培养用培养基中的规定细胞来制造。一个实施方式中,类器官为来自肺上皮干细胞或肺癌细胞的类器官。

[0072] 一个实施方式中,在显微镜下进行观察时,类器官是其直径为至少50 μ m的培养细胞聚集体。培养细胞聚集体为椭圆形时,直径为长径的长度。培养细胞聚集体为复杂形状时,直径为上述细胞聚集体的外接圆的直径。类器官形成效率(CFE:Colony Forming Efficiency)以在培养用培养基中培养含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样6天后的培养物中的直径50 μ m以上的细胞块数量除以上述培养用培养基中含有的肺上皮细胞或肺癌细胞的细胞数而得到的比例[%]来表示。

[0073] 本说明书中的术语“干细胞”是指:具有自增殖能力(也称为“增殖能力”)和分化为特定细胞型的能力(也称为“分化能力”)的细胞。干细胞例如可以分化为上皮干细胞。干细胞例如可以按照公知的方法在维持其分化能力的状态下增殖。干细胞还可以按照公知的方法在分化为特定细胞型的同时进行增殖。

[0074] 本说明书中的术语“肺上皮细胞”是指:构成肺的上皮组织的细胞。肺上皮细胞可以例如:棒状细胞(Club cell)、纤毛细胞(Ciliated cell)、神经内分泌细胞、基底细胞(Basal cell)、杯状细胞或肺泡上皮细胞、或者具备分化为上述细胞的能力的肺上皮干细胞。肺泡上皮细胞例如可以为1型肺泡上皮细胞(Type II alveolar epithelial cell:AT1细胞)和2型肺泡上皮细胞(AT2细胞)中的任意一者或两者。本说明书中的术语“肺上皮干细胞”是指:存在于肺组织中的具有增殖能力和分化为特定肺上皮细胞的能力的细胞。肺组织包括例如气管、支气管、细支气管和肺泡。

[0075] 肺上皮干细胞例如具有分化为选自由基底细胞、棒状细胞和2型肺泡上皮细胞组成的组中的至少1个细胞种类的能力。肺上皮干细胞例如可以为支气管肺泡干细胞(Bronchioalveolar stem cell:BASCs)。肺上皮干细胞可以按照公知的方法(例如专利文献2中记载的方法)来制备。

[0076] 基底细胞具有在稳态下在气管受损再生时分化为棒状细胞和纤毛细胞的能力。棒状细胞具有在稳态下在支气管受损再生时分化为纤毛细胞的能力,但在肺泡重度受损时分化为AT2细胞和AT1细胞。AT2细胞具有在稳态下在肺泡受损时分化为AT1细胞的能力。

[0077] 本说明书中的术语“肺泡细胞”是指:由肺泡组织得到的细胞。肺泡细胞可以按照

公知的方法由肺泡组织制备。肺泡细胞可以商购获得。肺泡细胞例如包括肺泡上皮细胞。1个例子中,肺泡细胞包括AT1细胞和AT2细胞中的任意一者或两者。本说明书中的术语“气道细胞”是指:由气道组织得到的细胞。气道细胞可以按照公知的方法由气道组织制备。气道细胞可以商购获得。

[0078] 本说明书中的术语“含有肺上皮细胞的试样”例如可以由哺乳动物的肺组织来制备。含有肺上皮细胞的试样例如可以由哺乳动物的肺组织以规定的细胞标志物(例如细胞膜表面上的特定蛋白质)为指标而制备。规定的细胞标志物例如可以为EPCAM。另外,可以由含有肺上皮细胞的试样制备含有期望的肺上皮细胞种类的试样。在制备含有期望的肺上皮细胞种类的试样时,就基底细胞而言,例如可以将神经生长因子受体(NGFR)作为细胞标志物(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,vol.106(31):12771-12775,2009),就AT2细胞而言,例如可以将AT2-280作为细胞标志物(Journal of Histochemistry&Cytochemistry,vol.58(10):891-901,2010)。规定的细胞标志物可以为存在于活细胞内的特定的RNA靶标。RNA靶标例如可以为EPCAM、Sftpc、KRT-5或Scgb1a1。

[0079] 在利用细胞膜表面上的特定蛋白质作为规定的细胞标志物时,可以使用结合有针对上述蛋白质的荧光物质的抗体并且以来自该荧光物质的荧光为指标。为了制备以细胞标志物为指标的细胞,可以使用公知的装置(例如FACS)。另外,在使用RNA靶标作为规定的细胞标志物时,可以包括下述步骤:将含有肺上皮细胞的试样在特定条件下利用FACS进行分级,基于RNA靶标(例如RT-PCR)来确定得到的各级分中的部分标本所含有的细胞种类。

[0080] 含有肺上皮细胞的试样例如可以如下制备:将哺乳动物的肺组织切碎,将上述肺组织片用蛋白酶(例如胶原酶、分散酶、弹性蛋白酶或胰蛋白酶)处理后,转移到规定的溶液(例如基础培养基)中并悬浮,由此而制备。对如此制得的细胞悬液,可以进行过滤和/或离心分离而除去组织片等夹杂物。一个实施方式中,含有肺上皮细胞的试样可以由哺乳动物的成体、幼体、新生儿或婴儿的肺组织来制备。一个实施方式中,含有肺上皮细胞的试样可以包含:在由哺乳动物的肺组织制备后以具有期望特征的方式实施了基因改造(其中,不包括赋予多能性的改造)的肺上皮细胞。

[0081] 一个实施方式中,上述试样中所含的肺上皮细胞含有选自由基底细胞、棒状细胞、支气管肺泡干细胞和肺泡上皮细胞(例如AT1细胞和AT2细胞中的任意一者或两者)组成的组中的至少1个细胞种类。含有肺上皮细胞的试样可以商购获得。含有肺上皮细胞的试样例如可以为含有人肺泡细胞的试样或含有人气道细胞的试样。一个实施方式中,上述试样中所含的肺上皮细胞本质上由选自由基底细胞、棒状细胞、支气管肺上皮干细胞和肺泡上皮细胞组成的组中的至少1种、至少2种或至少3种细胞构成。一个实施方式中,上述试样中所含的肺上皮细胞本质上由2型肺泡上皮细胞构成。一个实施方式中,上述试样中所含的肺上皮细胞本质上由棒状细胞构成。一个实施方式中,上述试样中所含的肺上皮细胞本质上由基底细胞与棒状细胞的组合构成。肺上皮细胞的上下文中的“本质上由……构成”不排除“仅由……构成”。一个实施方式中,上述试样中所含有的肺上皮细胞仅由特定的细胞种类构成。上述试样中所含的肺上皮细胞例如含有80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上的特定的细胞种类。

[0082] 一个实施方式中,本方式的方法还包括下述步骤:由哺乳动物的肺组织制备含有上述肺上皮细胞或肺癌细胞的试样。上述试样的制备可以按照本说明书中公开的方法或公

知的方法来实施。本说明书中的术语“肺癌细胞”例如为来自肺肿瘤的肿瘤细胞。肺癌细胞例如可以为在血液中循环着的肿瘤细胞或非循环状态的肿瘤细胞。肺癌细胞例如可以商购获得或由含有肿瘤细胞的肺组织按照公知的方法制备。肺癌细胞例如为肺腺癌细胞。

[0083] 本说明书中的术语“含有肺癌细胞的试样”例如可以由罹患肺癌的哺乳动物的肺组织以肺癌细胞标志物为指标进行分取。肺癌细胞标志物例如可以为SOX2、CD24、CD44、CD133、CD166和ESA中的任一种或它们的组合。肺癌细胞例如可以以肺癌细胞标志物为指标利用FACS进行分取。含有肺癌细胞的试样例如可以通过培养商购获得的肺癌细胞并将增殖出的细胞悬浮于规定的溶液中而制备。含有肺癌细胞的试样例如可以按照对于含有肺上皮细胞的试样所说明的方法来制备。含有肺癌细胞的试样例如可以含有正常的肺上皮细胞。

[0084] 本说明书中的术语“哺乳动物”例如为人、人以外的哺乳动物。人以外的哺乳动物例如可以为：小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠等啮齿类；黑猩猩等非人灵长类；牛、山羊、绵羊等偶蹄目；马等奇蹄目；兔、狗、猫等宠物。一个实施方式中，哺乳动物为啮齿类或非人灵长类。一个实施方式中，哺乳动物为人。

[0085] 本说明书中的术语“来自肺上皮细胞的类器官”或“来自肺癌细胞的类器官”是指：在试管内（体外）形成的来自肺上皮细胞或肺癌细胞的三维的生物体组织类似体。一个实施方式中，来自肺上皮细胞的类器官或来自肺癌细胞的类器官为通过在含有本发明的添加剂的培养用培养基中培养肺上皮细胞或肺癌细胞而形成的类器官。一个实施方式中，来自肺上皮细胞的类器官包含内腔和面向上述内腔的细胞层。

[0086] 本说明书中的术语“培养用培养基”是指：含有细胞培养所需的成分的液体。培养用培养基例如含有基础培养基和本发明的添加剂。培养用培养基例如可以通过将基础培养基与本发明的添加剂组合来制备。培养用培养基例如可以通过将混合了用于制备基础培养基的规定量的各成分（固体）和规定量的本发明的添加剂（固体）而成的混合物与使其成为规定浓度的量的纯水混合而制备。培养用培养基可以进一步含有胞外基质和辅助干细胞增殖的饲养细胞中的任意一者或两者。培养用培养基例如可以通过向混合了基础培养基和本发明的添加剂而成的混合物中添加胞外基质和辅助干细胞增殖的饲养细胞中的任意一者或两者来制备。

[0087] 本说明书中的术语“基础培养基”可以为公知的用于细胞培养的培养基，例如可以为杜尔贝科改良伊戈尔培养基（DMEM）、最小必需培养基（MEM）、伊戈尔基础培养基（BME）或DMEM/F12。一个实施方式中，基础培养基为DMEM/F12。

[0088] 本发明的“添加剂”是指：对来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的形成效率有影响的2种以上物质的组合。添加剂例如可以为提高来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的形成效率的2种以上物质的组合。添加剂例如可以含有维持所形成的类器官的构成细胞的分化能力或诱导向特定细胞种类分化的物质。

[0089] 一个实施方式中，添加剂可以为：含有选自由角质细胞生长因子（KGF）、肝细胞生长因子（HGF）和成纤维细胞生长因子（FGF）10组成的组中的至少1种、骨形成蛋白（BMP）抑制剂（例如Noggin）以及TGFβ抑制剂（例如SB431542）的组合；或者，选自由角质细胞生长因子（KGF）、肝细胞生长因子（HGF）和成纤维细胞生长因子（FGF）10组成的组中的至少1种、骨形成蛋白（BMP）抑制剂（例如Noggin）以及TGFβ抑制剂（例如SB431542）所构成的组合。从高效形成AT2的类器官的观点出发，上述组合优选还含有Wnt信号激活剂（例如CHIR99021）。上述

组合可以还含有Rock抑制剂(例如Y-27632)。

[0090] 从高效地形成类器官的观点出发,添加剂为:含有Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)和HGF的组合;或者,Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)和HGF所构成的组合。上述组合可以还含有Rock抑制剂。

[0091] 从更高效地形成类器官的观点出发,添加剂为:含有KGF和FGF10中的任意一者或两者、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)和HGF的组合;或者,KGF和FGF10中的任意一者或两者、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)和HGF所构成的组合。一个实施方式中,添加剂为:含有KGF、FGF10、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)和HGF的组合;或者,KGF、FGF10、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)和HGF所构成的组合。从高效地形成AT2的类器官的观点出发,上述组合优选还含有Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)。上述组合可以还含有Rock抑制剂。

[0092] 从进一步高效地形成类器官的观点出发,添加剂为:含有KGF、FGF10、Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)、HGF和FGF10的组合;或者,KGF、FGF10、Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)、HGF和FGF10所构成的组合。添加剂例如为:含有KGF、FGF10、Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)、HGF、FGF10和Rock抑制剂的组合;或者,KGF、FGF10、Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)、BMP抑制剂(例如Noggin)、TGFβ抑制剂(例如SB431542)、HGF、FGF10和Rock抑制剂所构成的组合。

[0093] 本说明书中的术语“角质细胞生长因子(KGF)”是指:刺激构成皮肤表面、口腔、胃和肠管等的粘膜上皮细胞的增殖的物质。KGF例如可以商购获得。KGF存在于培养用培养基中时,例如为10~250ng/mL、20~100ng/mL、30~70ng/mL、优选50ng/mL的浓度。KGF在本说明书中有时简记为“K”。

[0094] 本说明书中的术语“肝细胞生长因子(HGF)”是指:作为肝细胞的最强力的生长因子已知的细胞因子。HGF通常具有分子量约6万的重链与约3.5万的轻链通过二硫键结合而成的异源二聚体结构。HGF例如可以商购获得。HGF存在于培养用培养基中时,例如为5~150ng/mL、10~75ng/mL、20~40ng/mL、优选30ng/mL的浓度。HGF在本说明书中有时简记为“H”。

[0095] 本说明书中的术语“成纤维细胞生长因子(FGF) 10”是指:通过刺激上皮细胞的增殖、移动和分化来促进受到损伤的皮肤或粘膜组织的修复的信号因子。FGF10例如可以商购获得。FGF10存在于培养用培养基中时,例如为10~250ng/mL、20~100ng/mL、30~70ng/mL、优选50ng/mL的浓度。FGF10在本说明书中有时简记为“F10”。

[0096] 本说明书中的术语“Wnt信号激活剂”是指:在细胞内激活T细胞转录因子(TCF/LEF)介导的转录的物质。Wnt信号激活剂也被称为Wnt激动剂。Wnt信号激活剂例如可以为:抑制介导向丝氨酸和苏氨酸的氨基酸残基上添加磷酸分子的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶GSK-3的作用的物质(也称为“GSK-3抑制剂”)、Wnt家族蛋白、或β-连环蛋白分解抑制剂,或者这些中的2种以上的组合。Wnt信号激活剂例如可以商购获得。

[0097] Wnt信号激活剂例如可以为GSK-3抑制剂。GSK-3抑制剂例如可以为SB216763(Chemscene公司)、CHIR-98014(Abcam)、TWS119(Cayman Chemical公司)或CHIR99021

(SIGMA), 或者可以为这些中的2种以上的组合。Wnt信号激活剂例如可以为Wnt家族蛋白(也称为“Wnt配体”)。Wnt家族蛋白例如可以为该领域中公知的19种来自Wnt基因的蛋白质中的任意1种或2种以上的组合。Wnt家族蛋白例如可以为Wnt1、2、3a、6、7a、7b、8a、9a、10a或16, 或者可以为这些中的2种以上的组合。Wnt家族蛋白例如可以为Wnt1。Wnt信号激活剂例如可以为 β -连环蛋白分解抑制剂。 β -连环蛋白分解抑制剂例如可以为抑制 β -连环蛋白的磷酸化的物质(例如UBE1-41)。

[0098] 一个实施方式中, Wnt信号激活剂为GSK-3抑制剂。GSK-3抑制剂优选为CHIR99021。Wnt信号激活剂存在于培养用培养基中时, 例如为0.5~15 μ M、1~7 μ M、2~5 μ M、优选为显示出与3 μ M的CHIR99021所显示的抑制作用相当的抑制作用的量。CHIR99021在本说明书中有时简记为“C”。

[0099] 本说明书中的术语“BMP抑制剂”是指: 与BMP分子结合而形成复合体的物质。BMP抑制剂例如可以为低分子化合物、蛋白质(例如抗体)、DNA、RNA、低分子干扰RNA或反义寡核苷酸。BMP抑制剂例如可以商购获得。BMP抑制剂例如可以为Noggin(Bmp抑制剂)、腱蛋白或含有其结构域的腱蛋白样蛋白(R&D systems)、卵泡抑制素或含有其结构域的卵泡抑制素相关蛋白(R&D systems)、含有DAN或DAN半胱氨酸-knot结构域的DAN样蛋白(R&D systems)、骨硬化蛋白/SOST(R&D systems)、核心蛋白聚糖(R&D systems)或 α -2巨球蛋白(R&D systems), 或者可以为这些中的2种以上的组合。一个实施方式中, BMP抑制剂为Noggin。BMP抑制剂存在于培养用培养基中时, 例如为20~500ng/ml、40~250ng/ml、80~125ng/ml、优选显示出与100ng/ml的Noggin所显示的抑制作用相当的抑制作用的量。Noggin在本说明书中有时简记为“N”。

[0100] 本说明书中的术语“TGF β 抑制剂”是指: 抑制TGF β 信号转导的物质。TGF β 抑制剂例如是指: 抑制介导结合TGF β 而活化的I型受体(ALK5)的丝氨酸/苏氨酸激酶引起的Smad2/3蛋白磷酸化的细胞内信号转导的物质。TGF- β 抑制剂例如可以为低分子化合物、蛋白质(例如抗体)、DNA、RNA、低分子干扰RNA或反义寡核苷酸。TGF- β 抑制剂可以为A83-01(Abcam)、SB-431542(Calbiochem)、SB-505124(R&D systems)、SB-525334(Chemscene LLC)、LY364947(Sigma-Aldrich)、SD-208(Sigma-Aldrich)或SJN2511(R&D systems), 或者可以为这些中的2种以上的组合。一个实施方式中, TGF β 抑制剂为SB431542。TGF β 抑制剂存在于培养用培养基中时, 例如为2~50 μ M、4~25 μ M、8~12 μ M、优选显示出与10 μ M的SB431542所显示的抑制作用相当的抑制作用的量。SB431542在本说明书中有时简记为“S”。

[0101] 本说明书中的术语“上皮细胞生长因子(EGF)”是指: 与存在于细胞表面的上皮生长因子受体(EGFR)结合、并承担细胞的生长和增殖的调节的蛋白质。EGF通常具有53个氨基酸残基和3个分子内二硫键且具有约6000道尔顿的分子量。EGF例如可以商购获得(例如Corning公司)。EGF存在于培养用培养基中时, 例如为5~125ng/ml、10~60ng/ml、20~30ng/ml、优选25ng/ml。EGF在本说明书中有时简记为“E”。

[0102] 本说明书中的术语“Rho-激酶(ROCK)抑制剂”例如为R-(+)-反-4-(1-氨基乙基)-N-(4-吡啶基)环己烷甲酰胺二盐酸盐一水合物(Y-27632、Sigma-Aldrich)、5-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基磺酰基)异喹啉(法舒地尔或HA1077, Cayman Chemical公司)、或(S)-(+)-2-甲基-1-[(4-甲基-5-异喹啉基)磺酰基]-六氢-1H-1,4-二氮杂环庚烷二盐酸盐(H-1152, Tocris Bioscience)。ROCK抑制剂例如可以商购获得。一个方式中, ROCK抑制剂为Y-27632。

Rock抑制剂存在于培养用培养基中时,例如为2~50 μ M、4~25 μ M、8~12 μ M、优选显示出与10 μ M的Y-27632所显示的抑制作用相当的抑制作用的量。Y-27632在本说明书中有时简记为“Y”。

[0103] 一个实施方式中,本发明的添加剂可以为选自由KGF、FGF10和HGF组成的组中的至少1种、BMP抑制剂以及TGF β 抑制剂的组合。上述添加剂可以还含有Wnt信号激活剂和ROCK抑制剂中的任意一者或两者。一个实施方式中,上述添加剂例如可以为:KGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;KGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;FGF10、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;FGF10、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;HGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;KGF、FGF10、HGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;KGF、FGF10、HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;ROCK抑制剂、KGF、FGF10、HGF、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合;或者,ROCK抑制剂、KGF、FGF10、HGF、Wnt信号激活剂、BMP抑制剂和TGF β 抑制剂的组合。上述添加剂中,上述BMP抑制剂可以为Noggin,上述TGF β 抑制剂可以为SB431542,上述Wnt信号激活剂可以为CHIR99021,并且/或者上述ROCK抑制剂可以为Y-27632。

[0104] 一个实施方式中,培养用培养基含有“胞外基质”。胞外基质(ECM)没有限定,包括水、多糖、弹性蛋白、整联蛋白和糖蛋白。糖蛋白例如包括胶原蛋白、巢蛋白(nidogen)、纤连蛋白和层粘连蛋白。ECM例如可以通过在试管内培养ECM产生细胞(例如上皮细胞、内皮细胞、脏壁内胚层样细胞或成纤维细胞)后除去上述ECM细胞来制备。ECM产生细胞例如可以为:主要产生胶原蛋白和蛋白聚糖的软骨细胞;主要产生IV型胶原蛋白、层粘连蛋白、间质胶原蛋白原和纤连蛋白的成纤维细胞;以及主要产生胶原蛋白(I型、III型、和V型)、硫酸软骨素蛋白聚糖、透明质酸、纤连蛋白和肌腱蛋白-C的结肠肌成纤维细胞。ECM可以商购获得。可商购的胞外基质例如可以为胞外基质蛋白(Invitrogen)、来自Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)小鼠肉瘤细胞的基底膜制备物(例如,Cultrex(注册商标)Basement Membrane Extract(Trevigen, Inc.)、或基质胶(Matrigel, 注册商标)(corning公司))。ECM可以为合成胞外基质(例如ProNectin(Sigma Z378666))。胞外基质可以为1种或2种以上的混合物。一个实施方式中,ECM为基质胶。一个实施方式中,培养用培养基不含胞外基质。

[0105] 胞外基质存在于培养用培养基中时,可作为“分散成分”存在。作为分散成分的胞外基质没有限定,胞外基质成分在培养用培养基中为分散或溶解的状态。就作为分散成分的胞外基质而言,例如,在培养用培养基的单位体积内以10%v/v以下、7%v/v以下、5%v/v以下、例如2.5%v/v的分量存在上述胞外基质。一个实施方式中,培养用培养基以0~10%v/v、0~7%v/v、0~5%v/v、0.1~10%v/v、0.1~7%v/v、0.1~5%v/v、1~10%v/v、1~7%v/v、1~5%v/v、1~2.5%v/v、2~10%v/v、2~7%v/v、2~5%v/v或2~2.5%v/v的分量含有胞外基质。胞外基质含有来自生物体的生成物(例如来自小鼠肉瘤细胞的基底膜制备物)时,从防止或降低所制造的类器官的污染的观点出发,培养用培养基中的胞外基质的含有浓度优选为低浓度。

[0106] 胞外基质存在于培养用培养基中时,可作为“支架”存在。作为支架的胞外基质没有限定,为提供至少部分模仿细胞天然存在的细胞生态位的微环境的形态。作为支架的胞外基质例如可以为凝胶的形态。作为支架的胞外基质例如可以为以超过10%v/v、20%v/v以上、30%v/v以上、50%v/v以上或70%v/v以上的浓度形成的凝胶。

[0107] 本说明书中的术语“饲养细胞”是指：用于辅助干细胞增殖的细胞种类。饲养细胞通常与目标细胞共培养，用于提供适合于辅助目标细胞增殖的表面。饲养细胞为：特定的细胞种类（例如原代成年小鼠成纤维细胞、小鼠成纤维细胞株（MLg）、人胎儿成纤维细胞株：MRC-5）本身；或预先以不死亡的程度给予抗生素或照射 γ 射线来制备。使用饲养细胞会使目标细胞的传代操作变得复杂，因此不期望使用。一个实施方式中，培养用培养基实质上不含饲养细胞。本说明书中的术语“实质上不含”不排除“完全不含”。一个实施方式中，实质上不含饲养细胞的培养用培养基完全不含饲养细胞。一个实施方式中，实质上不含饲养细胞的培养用培养基可以相对于所培养的含有肺上皮细胞或肺癌细胞的培养细胞数含有小于3%、小于2%、小于1%、或小于0.5%的饲养细胞。优选含有要进行培养的肺上皮细胞或肺癌细胞的培养用培养基不含饲养细胞。

[0108] 作为在培养用培养基中“培养”含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样的方法，可以使用专利文献2中公开的方法。上述培养例如可以包括下述步骤：将含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样添加到培养容器中的培养用培养基中，将上述培养用培养基在37℃、5%CO₂下维持。进行培养的温度不限于37℃，可以适当使用细胞培养领域中公知的温度。CO₂浓度不限于5%，可以适当使用细胞培养领域中公知的CO₂浓度。上述培养用培养基可以以任意间隔、例如每1~14天、每2~12天或每3~10天更换为新的培养用培养基。例如，在所培养的细胞为肺上皮细胞时，可以每3~7天、每3~5天或每3天对培养用培养基进行更换。例如在所培养的细胞为肺癌上皮干细胞时，可以每3~14天、每5~10天或每10天对培养用培养基进行更换。

[0109] 可以从培养用培养基中分离出通过上述培养而形成的“来自肺上皮细胞的类器官”或“来自肺癌细胞的类器官”。分离例如可以包括下述步骤：基于其尺寸分取细胞，将未形成细胞块的细胞与类器官分开。分离例如可以使用CELLHANDLER (Yamaha公司) 进行。

[0110] 一个实施方式中，本方式的方法包括下述步骤：在含有本发明的添加剂的培养用培养基中培养由哺乳动物的肺组织制备的含有肺上皮细胞的试样之前，基于分别针对棒状细胞-I、AT2细胞和棒状细胞-II而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种从上述试样中选择出棒状细胞-I、AT2细胞或棒状细胞-II。

[0111] [表1]

[0112] 表A

[0113]

棒状细胞-I	AT2细胞	棒状细胞-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6

Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxc115	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retn1a	Fas	Scgb3a2
Sec1413	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		I113ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0114] 一个实施方式中,上述方法包括下述步骤:基于针对棒状细胞-I而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种从上述试样中选择出棒状细胞-I。一个实施方式中,上述方法包括下述步骤:基于针对AT2细胞而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种从上述试样中选择出AT2细胞。一个实施方式中,上述方法包括下述步骤:基于针对棒状细胞-II而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种从上述试样中选择出棒状细胞-II。

[0115] 本说明书中,术语“棒状细胞-I”是指:作为棒状细胞的、表达表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种的细胞。棒状细胞-I例如在含有本发明的添加剂的培养用培养基中形成类器官。棒状细胞-I例如表达选自Cbr2、Hp、Cyp2f2、Prdx6、Scgb1a1、Ldhd、Ces1d、Cckar、Selenbp1、Gstm2、Scnn1b、Scgb1c1、Plpp3、Ephx1、Dcxr、Alas1、Retn1a、Sec1413、Ptgr1和Krtap17-1以及它们的同源物组成的组中的至少1种、至少2种、至少3种或至少4种细胞标志物。

[0116] 本说明书中,术语“棒状细胞-II”是指:作为棒状细胞的、表达表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种的细胞。棒状细胞-II例如在含有本发明的添加剂的培养用培养基中形成类器官。棒状细胞-II例如与棒状细胞-I相比形成类器官的倾向更高。棒状细胞-II例如表达选自Tff2、Reg3g、Bpifb1、Muc5b、Sult1d1、Fxyd3、Scgb3a1、Lypd2、Chad、S100a6、Pglyrp1、Aldh3a1、Bpifa1、Gsto1、Lgals3、Pigr、Scgb3a2、Ltf、Qsox1、Cyp2a5、Cpd、Ly6a、Perp、Kcne3、I113ra1、Slc15a2和Cd14以及它们的同源物组成的组中的至少1种、至少2种、至少3种或至少4种细胞标志物。棒状细胞-II例如表达选自Fxyd3、Pigr、Cpd、Ly6a、Perp、Kcne3、I113ra1、Slc15a2和Cd14以及它们的同源物组成的组中的至少1种、至少2种、至少3种或至少4种细胞标志物。

[0117] 基于细胞标志物选择出规定的细胞的实施方式中的术语“AT2细胞”或“2型肺泡上

皮细胞”是指：表达表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种的AT2细胞。上述AT2细胞例如在含有本发明的添加剂的培养用培养基中形成类器官。上述AT2细胞例如表达选自Lamp3、Lyz2、Napsa、Slc34a2、Lyz1、Rnase4、Hc、Cd74、Scd1、Sftpc、Lgi3、Cldn18、Etv5、Cxcl15、Sl100g、Elovl1、Fas、H2-Aa、Fabp5和Rn4.5s以及它们的同源物组成的组中的至少1种、至少2种、至少3种或至少4种细胞标志物。

[0118] 本说明书中，“选择出”规定的细胞是指：从含有多种细胞的试样中选出出规定的细胞。选择出规定的细胞例如可以如下实施：测定规定的细胞标志物（例如表A中记载的细胞标志物）的表达，基于该测定结果从含有各种细胞的试样中分取出表达上述规定的细胞标志物的细胞作为规定的细胞，由此而实施。规定的细胞的选择例如可以通过荧光激活细胞分选（FACS）来实施。FACS例如可以使用使荧光物质偶联于与规定的细胞标志物结合的探针（例如抗体）而成的荧光探针，利用可商购获得的FACS装置来实施。1个例子中，当被检细胞的规定的细胞标志物的表达水平高于阴性对照的上述规定的细胞标志物的表达水平时，可以选择上述被检细胞作为规定的细胞。荧光物质例如可按照公知的方法来制备，或可以商购获得。与规定的细胞标志物结合的探针、例如抗体可以按照公知的方法制备，或可以商购获得。荧光物质与上述探针的偶联例如可以按照公知的方法实施。一个实施方式中，规定的肺上皮细胞的选择可以基于表A中记载的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种的表达来实施。

[0119] 本说明书中，术语“同源物”是指：在同种或异种的生物之间，其序列和功能相似的基因或蛋白质。本说明书中，同源物包括直系同源物、旁系同源物和异同源物。特定的基因或蛋白质的“同源物”例如相对于上述特定的基因或蛋白质的序列具有至少75%、80%、85%或90%的同源性，优选具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同源性。同源性是指：使用本领域技术人员熟知的比对算法排列2个基因或蛋白质的序列后，这2个序列间相同的核苷酸或氨基酸残基的比例。同源性例如可以使用公知的方法或公众可获得的计算机程序（例如BLAST或FASTA）来执行。

[0120] 本说明书中，术语“Cbr2”是指羧基还原酶2，参与NADPH的合成。

[0121] 本说明书中，术语“Hp”是指触珠蛋白，为血色素结合蛋白。

[0122] 本说明书中，术语“Cyp2f2”是指细胞色素P450（CYP）2f2，为局部存在于内质网膜的小鼠特异性的膜结合蛋白。小鼠以外的哺乳动物的Cyp2f2同源物是公知的，例如其人同源物为CYO2F1。

[0123] 本说明书中，术语“Prdx6”是指过氧化物还原酶-6，为属于抗氧化酶中的过氧化物还原酶家族的蛋白质。人类情况下，由PDRX6基因编码。

[0124] 本说明书中，术语“Scgb1a1”是指分泌球蛋白家族1A成员1，具有抗炎症性功能。

[0125] 本说明书中，术语“Ldhd”是指乳酸脱氢酶B，为LDHB基因编码的LDH酶的单体。

[0126] 本说明书中，术语“Ces1d”是指羧酸酯酶1d。

[0127] 本说明书中，术语“Cckar”是指胆囊收缩素A受体，Cckar为与肽激素结合的G蛋白偶联型受体的2个亚型中的亚型A。

[0128] 本说明书中，术语“Selenbp1”是指硒结合蛋白1，为属于硒结合蛋白家族的蛋白质。Selenbp1在人类中由SELENBP1基因编码。

[0129] 本说明书中，术语“Gstm2”是指谷胱甘肽S-转移酶Mu2，是在人类的情况下由GSTM2

基因编码的酶。

[0130] 本说明书中,术语“Scnn1b”是指钠通道亚单元B1,为在人类的情况下由SCN1B基因编码的蛋白质。

[0131] 本说明书中,术语“Scgb1c1”是指分泌球蛋白1C1,也作为配体结合蛋白RYD5而为人所知。Scgb1c1由分泌球蛋白1C1基因编码。

[0132] 本说明书中,术语“Plpp3”是指磷脂磷酸酶3,也作为磷脂酸磷酸酶2B型而为人所知。Plpp3为在人类的情况下由第1染色体上的PPAP2B基因编码的酶。

[0133] 本说明书中,术语“Ephx1”是指环氧化物水解酶1,为在人类的情况下由EPHX1基因编码的酶。

[0134] 本说明书中,术语“Dcxr”是指二羧基L-木酮糖还原酶,是在各种生理学系统中参与各种蛋白质相互作用过程的多功能蛋白。

[0135] 本说明书中,术语“Alas1”是指也作为氨乙酰丙酸 δ 合酶1而为人所知的蛋白质,在人类的情况下由ALAS1基因编码。

[0136] 本说明书中,术语“Retnla”是指抗胰岛素蛋白样分子 α (Resistin-like molecule alpha),为属于小型富含半胱氨酸的分泌蛋白家族的蛋白质。

[0137] 本说明书中,术语“Sec14l3”是指SEC14-like3,也作为生育酚相关蛋白2而为人所知,为在高尔基体源输送囊泡的生物合成中发挥重要作用的磷脂酰肌醇转移蛋白。

[0138] 本说明书中,术语“Ptgr1”是指前列腺素还原酶-1,为参与类花生酸的分解代谢和4-羟基壬烯醛等的脂质过氧化的蛋白质。

[0139] 本说明书中,术语“Krtap17-1”是指角蛋白相关蛋白17-1,为属于角蛋白相关蛋白(KAP)家族的蛋白质。

[0140] 本说明书中,术语“Tff2”是指三叶因子2,为在人类的情况下由TFF2基因编码的蛋白质。

[0141] 本说明书中,术语“Reg3g”是指再生胰岛衍生蛋白3 γ ,为在人类的情况下由REG3G基因编码的蛋白质。

[0142] 本说明书中,术语“Bpifb1”是指BPI包含折叠的家族B成员1,为在人类的情况下为由BPIFB1基因编码的蛋白质。

[0143] 本说明书中,术语“Muc5b”是指黏蛋白5亚型B,为在人类的情况下由MUC5B基因编码的蛋白质。

[0144] 本说明书中,术语“Sult1d1”是指硫酸转移酶1D成员1,将硫酸基转移给激素、神经递质。在人类情况下,已知因突变而假基因化。

[0145] 本说明书中,术语“Fxyd3”是指含FXYP结构域的离子转运调节因子3,为在人类的情况下由FXYP3基因编码的蛋白质。

[0146] 本说明书中,术语“Scgb3a1”是指分泌球蛋白家族3A成员1,为在人类的情况下由SCGB3A1基因编码的蛋白质。

[0147] 本说明书中,术语“Lypd2”是指含有Ly6/PLAUR结构域的蛋白2,为在人类的情况下由LYPD1基因编码的蛋白质。

[0148] 本说明书中,术语“Chad”是指钙黏蛋白,为参与动物细胞间的粘附的跨膜型糖蛋白。

[0149] 本说明书中,术语“S100a6”是指S100钙结合蛋白A6,为在人类的情况下由S100A6基因编码的蛋白质。

[0150] 本说明书中,术语“Pglyrp1”是指肽聚糖识别蛋白1,为在人类的情况下由PGLYRP1基因编码的蛋白质。

[0151] 本说明书中,术语“Aldh3a1”是指醛脱氢酶3家族成员A1,为在人类的情况下由ALDH3A1基因编码的蛋白质。

[0152] 本说明书中,术语“Bpifa1”也被称为腭、肺及鼻咽上皮克隆蛋白(Palate, lung, and nasal epithelium clone protein, PLUNC),为由BPIFA1(Bactericidal/permeability-increasing fold-containing family A1)基因编码的蛋白质。

[0153] 本说明书中,术语“Gsto1”是指谷胱甘肽S-转移酶 Ω -1,为在人类的情况下由GSTO1基因编码的蛋白质。

[0154] 本说明书中,术语“Lgals3”是指半乳糖凝集素-3,为在人类的情况下由LGALS3基因编码、属于凝集素家族的蛋白质。

[0155] 本说明书中,术语“Pigr”是指高分子免疫球蛋白受体,为在人类的情况下由PIGR基因编码的跨膜蛋白。

[0156] 本说明书中,术语“Scgb3a2”是指分泌球蛋白家族3A成员2,为在人类的情况下由SCGB3A2基因编码的蛋白质。

[0157] 本说明书中,术语“Ltf”是指乳铁蛋白,为哺乳动物中主要存在于乳汁中的铁结合性的糖蛋白。

[0158] 本说明书中,术语“Qsox1”是指巯基氧化酶1,为在人类的情况下由QSOX1基因编码的蛋白质。

[0159] 本说明书中,术语“Cyp2a5”是指细胞色素P450(CYP)2A5,为在小鼠中在肝脏和鼻腔的嗅上皮表达的蛋白质。小鼠以外的哺乳动物的Cyp2a5的同源物或直系同源物是公知的,例如,其人直系同源物为CYP2A6/13,大鼠直系同源物为CYP2A3。

[0160] 本说明书中,术语“Cpd”是指羧肽酶D,在人类的情况下由CPD基因编码的蛋白质。

[0161] 本说明书中,术语“Ly6a”是指淋巴细胞抗原6复合物,基因座A,是也被称为Sca-1的糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定型蛋白。

[0162] 本说明书中,术语“Perp”是指与PMP-22相关的p53凋亡效应物,为在人类的情况下由PERP基因编码的膜蛋白。

[0163] 本说明书中,术语“Kcne3”是指钾离子通道蛋白Isk相关家族成员3,也被称为Mink相关肽2(MiRP2)。Kcne3为在人类的情况下由KCNE3基因编码的蛋白质。

[0164] 本说明书中,术语“Il13ra1”是指白介素13受体亚单元 α 1,与白介素4受体 α 构成异源二聚体,由此作为白介素13的受体起作用。

[0165] 本说明书中,术语“Slc15a2”是指溶质载体家族15成员2,作为质子结合肽转运体起作用。

[0166] 本说明书中,术语“Cd14”是指CD14蛋白,作为天然免疫系统的构成用途发挥功能。CD14例如可以是作为膜结合型蛋白的mCD14或作为可溶性蛋白的sCD14。在对棒状细胞-II细胞进行选择的上下文中,CD14例如为mCD14。

[0167] 本说明书中,术语“Lamp3”是指溶酶体相关膜糖蛋白3,为在人类的情况下由LAMP3

基因编码的蛋白质。

[0168] 本说明书中,术语“Lyz2”是指溶菌酶C-2。

[0169] 本说明书中,术语“Napsa”是指napsin A,为在人类的情况下由NAPSA基因编码的天冬氨酸蛋白酶。

[0170] 本说明书中,术语“Slc34a2”是指钠依赖性磷酸转运蛋白2B (NaPi2b),为在人类的情况下由SLC34A2基因编码的蛋白质。

[0171] 本说明书中,术语“Lyz1”是指溶菌酶C-1。

[0172] 本说明书中,术语“Rnase4”是指核糖核酸酶4,为在人类的情况下由RNASE4基因编码的蛋白质。

[0173] 本说明书中,术语“Hc”是指溶血补体。为天然免疫的补体系统的构成要素。

[0174] 本说明书中,术语“Cd74”是指HLA II类组织相容性抗原 γ 链,为在人类的情况下由CD74基因编码的蛋白质。

[0175] 本说明书中,术语“Scd1”是指硬脂酰-CoA去饱和酶1,为脂肪酸代谢中重要的酶。

[0176] 本说明书中,术语“Sftpc”是指表面活性物质关联蛋白C (SP-C),为肺表面活性物质关联蛋白之一。在人类的情况下,Sftpc由SFTPC基因编码。

[0177] 本说明书中,术语“Lgi3”是指富亮氨酸神经胶质瘤失活蛋白3,为属于LGI家族的脊椎动物中的分泌蛋白。

[0178] 本说明书中,术语“Clnd18”是指密封蛋白18,为在人类的情况下由CLDN18基因编码的蛋白质。

[0179] 本说明书中,术语“Etv5”是指Ets变体5,也被称为ERM转录因子。Etv5为在人类的情况下由ETV5基因编码的转录因子。

[0180] 本说明书中,术语“Cxc115”是指趋化因子 (C-X-C基序) 配体15,为属于CXC角化因子家族的细胞因子。

[0181] 本说明书中,术语“S100g”是指S100钙结合蛋白G,为在人类的情况下由S100G基因编码的蛋白质。

[0182] 本说明书中,术语“Elov11”是指脂肪酸延伸酶1,为在饱和和一价不饱和极长链脂肪酸的产生中发挥重要作用的酶。

[0183] 本说明书中,术语“Fas”是指脂肪酸合酶,为在人类的情况下由FASN基因编码的酶。

[0184] 本说明书中,术语“H2-Aa”是指组蛋白H2A型1-A,为在人类的情况下由HIST1H2AA基因编码的蛋白质。

[0185] 本说明书中,术语“Fabp5”是指表皮型脂肪酸结合蛋白,为在人类的情况下由FABP5基因编码的蛋白质。

[0186] 本说明书中,术语“Rn4.5s”是指4.5S RNA。

[0187] 一个实施方式中,本方式的方法包括下述步骤:将在含有本发明的添加剂的培养用培养基中培养的肺上皮细胞在不含上述添加剂的培养用培养基中进一步培养。该实施方式中,在培养用培养基中培养的上述肺上皮细胞可以已形成类器官,或者可以为直径小于50 μ m的细胞聚集体。在培养用培养基中培养的碱性肺上皮细胞优选已形成类器官。通过将含有本发明的添加剂的培养用培养基中培养的肺上皮细胞在不含上述添加剂的培养用

培养基进一步培养,从而可诱导所培养的肺上皮细胞的分化、例如从棒状细胞分化为肺泡细胞(例如AT2细胞、AT1细胞)。

[0188] 不含本发明的添加剂的培养用培养基例如可以为基础培养基。在含有上述添加剂的培养用培养基中培养上述细胞例如可以包括对培养的细胞进行传代。在不含上述添加剂的培养用培养基中培养上述细胞例如可以包括对培养的细胞进行传代。在培养用培养基中培养上述细胞的天数没有特别限定。在培养用培养基中培养上述细胞例如可以为1~30天、1~25天、或1~20天。

[0189] 来自肺上皮细胞的类器官例如可模拟肺上皮组织的基本生理功能。因此来自肺上皮细胞的类器官在再生医疗中 useful。另外,来自肺癌细胞的类器官在用于处置肺癌的物质的筛选中 useful (NATURE COMMUNICATIONS 2019 103991)。

[0190] [来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官]

[0191] 本发明的一个方式提供来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官。上述类器官可以按照本发明的类器官的制造方法由含有肺上皮细胞或肺癌细胞的试样制造。所制造的来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官例如含有内腔和面向上述内腔的细胞层。

[0192] 一个实施方式中,来自肺上皮细胞的类器官含有内腔和面向上述内腔的细胞层。上述类器官可以为来自肺上皮细胞的类器官,或者可以为来自气道细胞的类器官。1个例子中,来自肺上皮细胞的类器官含有内腔和面向上述内腔的细胞层,上述细胞层本质上由AT2细胞构成。上述例中,AT2细胞例如表达HT2-280和SFTPC中的任意一者或两者,并且上述HT2-280在上述AT2细胞中局部存在于面向上述内腔的细胞膜或其附近。

[0193] 另一例中,来自肺上皮细胞的类器官含有内腔和面向上述内腔的细胞层,上述细胞层本质上由AT2细胞与表达AT2细胞标志物和支气管上皮标志物的细胞的组合构成。另一例中,来自肺上皮细胞的类器官含有内腔和面向上述内腔的细胞层,上述细胞层本质上由表达支气管上皮标志物的细胞构成。1个例子中,来自气道细胞的类器官含有内腔和面向上述内腔的细胞层,上述细胞层本质上由基底细胞与表达基底细胞标志物和支气管上皮标志物的细胞的组合构成。

[0194] 上述AT2细胞标志物没有特别限定,可以使用公知的AT2细胞标志物。AT2细胞标志物例如可以为HT2-280和SFTPC中的任意一者或两者。上述支气管上皮标志物没有特别限定,可以使用公知的支气管上皮标志物。支气管上皮标志物例如可以为SOX2。上述基底细胞标志物没有特别限定,可以使用公知的上述基底细胞标志物。基底细胞标志物例如可以为KRT5。

[0195] 本说明书中的术语“HT2-280”是指2型肺泡上皮细胞中表达的280~300kDa的蛋白质。本说明书中的术语“SFTPC”是指肺表面活性物质关联蛋白C。SFTPC具有在由26个氨基酸形成的疏水性 α 螺旋结构上连接有9个亲水性氨基酸的结构。本说明书中的术语“SOX2”是指SRY盒包含基因2(SRY-box containing gene 2)。SOX2有作为DNA结合部位的HMG (high mobility group, 高迁移率组) 结构域和其C末端侧的转录活化结构域构成。HMG结构域含有2个核定位信号序列,SOX2主要局部存在于核内。本说明书中的术语“KRT5”是指中间丝蛋白,在人类的情况下由KRT5基因编码。

[0196] [再生医疗用组合物]

[0197] 本发明的一个方式提供再生医疗用组合物。一个实施方式中,上述再生医疗用组

合物含有本发明的来自肺上皮细胞的类器官和/或上述类器官的细胞。一个实施方式中,上述再生医疗用组合物含有本质上由表达表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种的棒状细胞-I、AT2细胞或棒状细胞-II构成的肺上皮细胞。

[0198] [表2]

[0199] 表A

[0200]

棒状细胞-I	AT2细胞	棒状细胞-II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyz2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgbla1	Lyz1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gstol
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elov11	Pigr
Retn1a	Fas	Scgb3a2
Sec1413	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0201] 再生医疗用组合物例如可以为用于修复肺损伤或肺疾病的药物组合物。一个实施方式中,含有本质上由表达上述至少1种细胞标志物的棒状细胞-I、AT2细胞或棒状细胞-II构成的肺上皮细胞的再生医疗用组合物含有本发明的添加剂。1个例子中,含有包含棒状细胞-I或本质上由棒状细胞-I构成的肺上皮细胞的再生医疗用组合物能够具有在上述棒状细胞-I被送达的肺中不引起炎症等不良影响的情况下形成类器官的能力,并且具有分化为肺泡和支气管系统的细胞的能力,因此作为用于修复肺损伤或肺疾病的再生医疗用组合物

有用。1个例子中,含有包含棒状细胞-II或本质上由棒状细胞-II构成的肺上皮细胞的再生医疗用组合物具有在上述棒状细胞-II被送达的肺中高效地形成类器官的能力,并且具有分化成肺泡和支气管系统的细胞的能力,因此作为用于修复肺损伤或肺疾病的再生医疗用组合物有用。

[0202] 1个例子中,含有包含棒状细胞-II或本质上由棒状细胞-II构成的肺上皮细胞的再生医疗用组合物被用作用于转运用于处置棒状细胞-II受损的肺或罹患疾病的肺的药剂(例如有机化合物、基因或蛋白质)的载体,由此作为用于处置肺损伤或肺疾病的药物组合物有用。因此,本发明的一个方式提供含有本质上由棒状细胞-II构成的肺上皮细胞和用于处置肺损伤或肺疾病的药剂的药物组合物,其中,棒状细胞-II是基于针对棒状细胞-II而在表A中列出的细胞标志物以及它们的同源物中的至少1种从由哺乳动物的肺组织制备的含有肺上皮细胞的试样中选择出的棒状细胞-II。

[0203] 再生医疗用组合物例如可以适当含有药学上允许的载体。再生医疗用组合物可以按照公知的方法适当制造。再生医疗用组合物例如可以通过将来自肺上皮细胞的类器官和/或上述类器官的细胞与药学上允许的载体混合而制造。“药学上允许的载体”是指:对于哺乳动物而言安全性高、变态反应性小的除本发明的来自肺上皮细胞的类器官以外的任意成分。药学上允许的载体例如包括适合于给药药物的水性或非水性溶剂、溶液(例如生理盐水、基础培养基或细胞悬浮保存液)、抗冻剂(例如甘油)、水溶性高分子(例如葡聚糖)、或缓冲剂(例如磷酸缓冲液)。

[0204] 上述来自肺上皮细胞的类器官可以按照本发明的制造方法来制备。上述来自肺上皮细胞的类器官例如含有内腔和面向上述内腔的细胞层。“来自肺上皮细胞的类器官的细胞”可以为构成来自肺上皮细胞的类器官的细胞块的形态,和/或从来自肺上皮细胞的类器官分离出的单个细胞的形态。从来自肺上皮细胞的类器官分离出的单个状态的细胞例如可以如下制备:将上述类器官用蛋白酶(例如胶原酶、分散酶、弹性蛋白酶或胰蛋白酶)处理后,悬浮于规定的溶液(例如基础培养基),由此而制备。再生医疗用组合物含有来自肺上皮细胞的类器官的细胞块形态的细胞时,上述再生医疗用组合物中的细胞块例如可以在给药于需要其的哺乳动物之前实施处理,以形成单个状态的细胞。

[0205] 再生医疗用组合物例如可通过外科方法移植至规定部位或通过注射而注入到规定部位、从而给药到需要其的哺乳动物中。从减轻移植片排斥反应的观点出发,优选给药再生医疗用组合物的哺乳动物和提供该类器官的肺上皮细胞的哺乳动物为同种,进一步优选为同一个体。在再生医疗用组合物的上下文中,哺乳动物例如为人。

[0206] 本说明书中的术语“肺损伤”或“肺疾病”可列举例如病原性疾病、肺癌(例如小细胞肺癌或非小细胞肺癌(例如腺癌、鳞状细胞癌或大细胞癌))、间质性肺病、肺炎(例如器质性肺炎)、结核、囊性纤维化、支气管炎、肺纤维化、类肉瘤病、II型增生、慢性堵塞性肺病、肺气肿、哮喘、肺水肿、急性呼吸窘迫综合征、喘鸣、支气管扩张、汉坦病毒肺综合征、中东呼吸综合征(MERS)、严重急性呼吸道综合征(SARS)和尘肺。病原性疾病例如可以为腺病毒、冠状病毒(例如COVID-19、SARS-CoV、SARS-CoV-2或MERS-CoV、或它们的变异株)、人类间质肺炎病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、汉坦病毒、肠病毒(例如肠病毒D68:EV-D68)、百日咳杆菌、肺炎衣原体、白喉杆菌、伯氏考克斯氏体、流感细菌、嗜肺军团菌、卡他莫拉菌、结核杆菌、肺炎支原体、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、或化脓性链球菌所引起的

疾病。

[0207] [用于处置肺癌的物质的筛选方法]

[0208] 本发明的一个方式提供用于处置肺癌的物质的筛选方法。上述筛选方法包括下述步骤：使利用本发明而制造的来自肺癌细胞的类器官与受试物质接触；对与上述受试物质接触后的类器官进行测定；以及对与上述受试物质接触后的类器官的测定值和对照值进行比较。一个实施方式中，上述方法包括基于比较结果判定上述受试物质是否为能够处置肺癌的物质。

[0209] 本说明书中的术语“肺癌”没有限定，可以为小细胞肺癌或非小细胞肺癌（例如腺癌、鳞状细胞癌或大细胞癌）。

[0210] 本说明书中的术语“受试物质”例如可以为低分子化合物、蛋白质（例如抗体）、DNA、RNA、低分子干扰RNA、或反义寡核苷酸。受试物质例如可以为用于治疗肺癌以外的疾病或癌的药剂。受试物质例如可以为1种或2种以上的混合物。受试物质优选为1种物质。

[0211] 本发明的使来自肺癌细胞的类器官与受试物质“接触”是指：将上述类器官和受试物质置于可接触的状况下。上述类器官与受试物质的接触例如可以是向含有上述类器官的溶液中添加受试物质。

[0212] 本说明书中的术语“对类器官进行测定”例如可以是测定类器官的尺寸或测定构成类器官的细胞的标志物蛋白的表达。类器官的尺寸例如可以使用公知的装置（例如显微镜或FACS）来测定。构成类器官的细胞的标志物蛋白的表达可以使用公知的装置（例如显微镜或FACS）和公知的试剂（例如经荧光物质标记的抗体）来测定。类器官的尺寸例如可以为类器官的周长、直径（例如长径和短径）或面积。构成类器官的细胞的标志物蛋白的表达例如可以为与类器官每单位面积所表达的标志物蛋白量对应的荧光强度。所测定的标志物蛋白可以为1种或2种以上的组合。所测定的标志物蛋白优选为2种以上的组合。

[0213] 本说明书中的术语“类器官的测定值”例如可以1次测定的1个测定值，也可以为多次测定的平均值，还可以为多个类器官的测定值的平均值。类器官的测定值例如可以为接触受试物质前后的变化值（例如差值或倍数）。

[0214] 本说明书中的术语“对照值”例如可以为将用于处置肺癌细胞的药剂用作对照物质时的测定值。就对照值而言，例如在将接触受试物质后的值作为类器官的测定值时，可以将接触上述受试物质前或未接触上述受试物质的对照类器官的测定值作为对照值。

[0215] 例如，在测定值为类器官的尺寸时，受试物质是否为能够处置肺癌的物质的“判定”可以包括下述步骤：在接触受试物质后的类器官的尺寸测定值小于对照值（即，类器官尺寸的增加程度下降或尺寸缩小时），将上述受试物质判定为能够处置肺癌的物质。

[0216] [培养用培养基]

[0217] 本发明的一个方式提供用于制造来自肺上皮细胞或肺癌细胞的类器官的培养用培养基。上述培养用培养基中，含有0~10%v/v的胞外基质，并且含有选自由角质细胞生长因子(KGF)、成纤维细胞生长因子(FGF) 10和肝细胞生长因子(HGF)组成的组中的至少1种、骨形成蛋白(BMP)抑制剂以及TGFβ抑制剂的组合。

[0218] 上述培养用培养基例如可以为以期望浓度配合有各成分的液体形态。上述培养用培养基例如可以为以可通过混合规定量的纯水而使各成分成为期望浓度的方式配合而成的固体形态。

[0219] 只要没有特别声明,则本发明所提供的术语和实施方式的说明可适当地用于本发明所提供的方式和实施方式之间。

[0220] 以下记载具体的实施例,但是它们为示出本发明的优选实施方式的例子,对所附的权利要求书中记载的发明没有任何限定。

[0221] 实施例

[0222] [制备例1]

[0223] (含有肺上皮干细胞的悬液的制备)

[0224] 准备具有在人肺表面活性物质关联蛋白C (SFTPC) 启动子控制下编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因、并且随着Sftpc的表达而表达GFP的SFTPC-GFP小鼠 (J Immunol 2008;180:881-888和Rapid Communications:L349-L356)。在SFTPC-GFP小鼠的肺末梢区域的组织切片中,进行针对Sftpc和Scgbla1 (又称CC10或CCSP) 的免疫染色。

[0225] Scgbla1作为棒状细胞的细胞标志物而为人所知。上述免疫染色表明:肺泡区域中存在表达Sftpc和GFP的AT2细胞;以及,支气管的末梢存在表达Sftpc和GFP和Scgbla1的支气管肺泡干细胞 (BASCs)、和弱表达Sftpc和GFP且表达Scgbla1的棒状细胞 (又称variant club cell)。肺末梢区域中的GFP表达模式与STEM CELLS2012;30:1948-1960中报告的表达模式相同。该免疫染色的结果表明:通过以其表达处于SFTPC启动子控制下的GFP为指标,能够从SFTPC-GFP小鼠的肺组织中所含的各种细胞中识别作为肺上皮干细胞的AT2细胞、BASCs和棒状细胞。

[0226] 利用二氧化碳使SFTPC-GFP小鼠安乐死,除去血液。去除胸骨而使肺和气管露出。从气管插入Surflo留置针,经由其向上述肺和气管注入1.5mL的蛋白酶溶液。将肺从SFTPC-GFP小鼠切出,转移到注入了2.5mL的蛋白酶溶液的培养皿。将切出的肺在上述培养皿中切碎,通过吹打操作得到肺组织悬液。将上述肺组织悬液供于4℃的离心分离 (400g×5分钟),分离为沉淀物和上清,将上述上清废弃。向上述沉淀物中加入含有3%FBS的PBS而悬浮,得到含有肺上皮干细胞的悬液。

[0227] 向上述含有肺上皮干细胞的悬液中添加经荧光物质标记的抗EpCAM抗体。EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule,上皮细胞粘附分子) 是作为上皮细胞特异性的细胞间细胞粘附分子而为人所知的I型跨膜糖蛋白。使用FACS Aria II (BD公司),基于来自抗EpCAM抗体的荧光强度确定肺上皮干细胞。进而基于GFP来源的荧光强度将确定的肺上皮干细胞分为3个级分 (P17、P18、P19) (图1)。

[0228] [试验例1]

[0229] 通过调查标志物基因的表达模式而确定各级分中所含的细胞种类。通过利用qPCR扩增各标志物基因来调查标志物基因的表达模式。其结果是,表明P17级分主要含有棒状细胞、纤毛细胞、AT1细胞 (Type I alveolar epithelial cell, I型肺泡上皮细胞) 和基底细胞。同样地,表明P18级分含有末梢棒状 (distal club) 细胞、P19级分含有AT2细胞和BASCs。

[0230] (基础培养基)

[0231] 将含有图1中的P19级分的肺上皮干细胞的悬液、含有P18级分的肺上皮干细胞的悬液、和含有P17级分的肺上皮干细胞的悬液在不使用饲养细胞的情况下进行培养,使其形成类器官。培养中使用MTEC/B27作为基础培养基。将MTEC/B27的成分示于以下。

[0232] [表3]

[0233]

成分	销售商	分量 (mL)
DMEM/F12 无酚红	Lifetechnologies	500
1M HEPES	ナカライテスク	7.5
7.5% NaHCO ₃	ナカライテスク	2
B27 (注册商标) 添加剂 (×50) 无血清	GIBCO	10
FBS (终浓度 5%)	SIGMA	25
fungizone (终浓度 250 ng/mL)	ThermoFisher	500 [μ L]
青霉素/链霉素 (终浓度 100 U/mL、100 μ g/mL)	Nacalai	5

[0234] (添加剂)

[0235] 在上述基础培养基适当组合以下的添加剂,作为培养用培养基。

[0236] [表4]

[0237]

缩写符号	名称	销售商	终浓度	备注
K	KGF/Fgf7 小鼠重组品	R & D	50 ng/mL	Fgf7, Fgf 配体
C	CHIR99021	SIGMA	3 μ M	GSK-3 抑制剂 (Wnt 激活剂)
N	重组鼠 Noggin	PeproTech	100 ng/mL	Bmp 抑制剂
S	TGF-BETA RI 激酶抑制剂VI SB431542	Calbiochem	10 μ M	ALK4, 5 抑制剂 (Tgf β 信号抑制剂)
H	HGF 小鼠重组品	R & D	30 ng/mL	Met 配体
F10	重组人FGF-10	PEPROTECH	50 ng/mL	Fgf 配体
E	EGF	Corning	25 ng/mL	Egf 配体
X	XAV939	SIGMA	10 μ M	端锚聚合酶抑制剂 (Wnt/ β 连环蛋白抑 制剂)
Y	Y-27632 二盐酸盐	LC Laboratories	10 μ M	Rock 抑制剂

[0238] (肺上皮干细胞的类器官形成)

[0239] 将含有肺上皮干细胞的悬液供于离心分离(400g、10分钟、4℃),将沉淀物悬浮于MTEC/B27。将规定数量的肺上皮干细胞与50%或75%的基质胶(注册商标)(Matrigel Matrix basement membrane growth factor reduced(Corning公司))混合。将得到的混合液20 μ L滴加于升温至37℃的48孔板的各孔,将上述板在37℃维持20分钟,使各孔中形成凝胶。将在上述基础培养基中添加有Hgf、Fgf10、KGF、Noggin和SB431542的组的培养用培养基250 μ L应用于形成的凝胶上,将上述板在37℃、5%CO₂下培养6天。培养用培养基3天更换一次。

[0240] 分别如上述那样培养含有P17级分~P19级分的肺上皮干细胞的悬液的结果是,在显微镜下观察到直径50 μ m以上的细胞块。对培养物进行免疫组织染色。免疫组织染色显示在P19级分中观察到的细胞块是以AT2细胞为主的表达Sftpc的类器官。显示在P18级分中观察到的细胞块是以末梢棒状细胞之类的表达Sftpc和Scgb1a1的细胞为主的类器官。显示出:在P17级分中观察到的细胞块分别形成了认为来自棒状细胞的强烈表达Scgb1a1的类器官和认为来自基底细胞的表达Krt5的类器官。

[0241] [试验例2]

[0242] 如制备例1中记载那样从6只SFTPC-GFP小鼠分别制备含有肺上皮干细胞的悬液 ($n=6$)。在图1所示的基于GFP荧光强度的肺上皮干细胞的散布图中,以下将与P19级分相当的级分称为GFP^{hi}级分。同样地,将低于对应于P19级分的GFP强度的GFP荧光强度所对应的与P18级分相当的级分称为GFP^{lo}级分,将低于对应于P18级分的GFP荧光强度的GFP强度所对应的与P17级分相当的级分称为GFP^{neg}级分。

[0243] (GFP^{hi}级分)

[0244] 与试验例1同样地培养GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞的悬液。其中,试验例2中与试验例1不同的是,向培养用培养基中添加以下的添加剂的组合,将1个含有肺上皮干细胞的悬液在4个孔中以每孔5000个细胞的方式进行培养。

[0245] [表5]

[0246]

	名称	KCNS	HCNS	F10CNS	KNS	KCS	KCN	KF10HCNS	ECNS
K	KGF	+	-	-	+	+	+	+	-
C	CH1R99021	+	+	+	-	+	+	+	+
N	Noggi0	+	+	+	+	-	+	+	+
S	SB431542	+	+	+	+	+	-	+	+
H	HGF	-	+	-	-	-	-	+	-
F10	FGF10	-	-	+	-	-	-	+	-
E	EGF	-	-	-	-	-	-	-	+

[0247] +: 作为添加剂使用

[0248] -: 未作为添加剂使用

[0249] 培养6天后,使用显微镜拍摄培养物,使用软件对直径50 μm 以上的细胞块进行计数。使用将各孔中的细胞块数量除以添加的细胞数而得的比例即CFE[%]作为类器官形成效率的指标。由6只小鼠所得到的CFE计算CFE ($n=6$) 的平均值和其标准偏差(图2)。另外,由6只小鼠所得到的类器官的长径计算长径 [μm] ($n=6$) 的平均和其标准偏差(图3)。

[0250] • 4种添加剂的组合

[0251] 图2和图3分别示出4种添加剂的组合“KCNS”的情况下CFE为约0.18%、长径为约136 μm 。使用将KCNS中的添加剂K置换为H而成的添加剂的组合“HCNS”时的CFE和长径与使用KCNS时的CFE和长径分别同等。该结果表明,4种添加剂的组合KCNS中,添加剂“K”和“H”在高效地形成类器官方面可替换。

[0252] 将“KCNS”中的添加剂K置换为F10而成的添加剂的组合“F10CNS”的CFE和长径与“KCNS”的CFE和长径分别同等。该结果表明,在4种添加剂的组合“KCNS”中,添加剂“K”和“F10”在高效地形成类器官方面可替换。将“KCNS”中的添加剂“K”置换为“E”而成的添加剂的组合“ECNS”的CFE显著小于“KCNS”的CFE (Tukey检验、* : $P<0.05$)。

[0253] • 3种添加剂的组合

[0254] 研究了从4种添加剂的组合“KCNS”中除去可与添加剂“H”或“F10”替换的添加剂“K”而成的3种添加剂对高效地形成类器官(高的CFE)和长径的重要性。从“KCNS”中除去添加剂“N”而成的添加剂的组合“KCS”的CFE和长径分别显著小于“KCNS”的CFE和长径 (Tukey检验、* : $P<0.05$)。从“KCNS”除去添加剂“S”而成的添加剂的组合“KCN”的CFE虽然与“KCNS”的CFE相比没有显著差异,但有降低的倾向。这些结果表明在4种添加剂的组合

“KCNS”中添加剂“N”和“S”对于高效地形成类器官很重要。

[0255] 从“KCNS”中除去添加剂“C”而成的添加剂的组合“KNS”的CFE与“KCNS”的CFE和长径没有显著差异。该结果表明4种添加剂的组合“KCNS”中添加剂“C”对于高效地形成类器官不重要。但是,如试验例3所述,添加剂“C”可能引起构成细胞块的肺上皮干细胞的分化转化。

[0256] • 6种添加剂的组合

[0257] 图2和图3分别示出6种添加剂的组合“KF10HCNS”的CFE为约0.87%、长径约113 μ m。“KF10HCNS”的CFE显著大于4种添加剂的组合“KCNS”和“F10CNS”(Tukey检验、* : $P < 0.05$)。使用“KF10HCNS”时的长径与在4种添加剂的组合中显示出最大长径的“KCNS”同等。该结果表明:6种添加剂的组合“KF10HCNS”在高效地形成类器官方面是优选的。

[0258] • 5种添加剂的组合

[0259] 如上所述,6种添加剂的组合“KF10HCNS”中的添加剂“C”在高效地形成类器官方面不重要。因此,表明从“KF10HCNS”中除去添加剂“C”而成的5种添加剂的组合“HF10KNS”对于高效地形成类器官而言是优选的。

[0260] (GFP^{lo}级分)

[0261] 与上述GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞的悬液同样地,与试验例1同样地培养GFP^{lo}级分的肺上皮干细胞的悬液并计算CFE[%]。其中,与GFP^{hi}级分不同的是,以每孔150个细胞的方式进行培养。计算CFE($n=6$)的平均值和标准偏差(图4)。进而计算了类器官的长径($n=6$)的平均值和标准偏差(图5)。

[0262] • 4种添加剂的组合

[0263] 图4和图5分别示出4种添加剂的组合“KCNS”的CFE为约8.0%、长径为约127 μ m。将“KCNS”中的添加剂“K”置换为“H”或“F10”而成的添加剂的组合“HCNS”或“F10CNS”的CFE和长径与“KCNS”的CFE没有显著差异。该结果表明,在4种添加剂的组合“KCNS”中添加剂“K”以及“H”或“F10”在高效地形成类器官方面可替换。将“KCNS”中的添加剂“K”置换为“E”而成的添加剂的组合“ECNS”的CFE显著小于“KCNS”的CFE(Tukey检验、* : $P < 0.05$)。

[0264] • 3种添加剂的组合

[0265] 如对于GFP^{hi}级分所进行的操作那样,对于GFP^{lo}级分,也调查从4种添加剂的组合“KCNS”中除去添加剂“C”、“N”或“H”而成的3种添加剂的组合“KNS”、“KCS”或“KCN”的CFE和长径。“KCS”与“KCNS”相比CFE和长径显著小(Tukey检验、* : $P < 0.05$)。“KNS”的CFE与“KCNS”相比CFE和长径没有显著差异,但是显示出降低的倾向。从“KCNS”中除去了添加剂“C”而成的添加剂的组合“KNS”的CFE和长径与“KCNS”的CFE没有显著差异。这些结果与关于GFP^{hi}级分的结果相同。

[0266] • 6种添加剂的组合、和5种添加剂的组合

[0267] 图4和图5示出6种添加剂的组合“KF 10HCNS”在高效地形成类器官方面与4种添加剂的组合“KCNS”没有显著差异,但是有变大的倾向。“KF10HCNS”在高效地形成类器官方面与4种添加剂的组合“HCNS”和“F10CNS”没有显著差异。6种添加剂的组合“KF1 0HCNS”中的添加剂“C”如上所述在高效地形成类器官方面不重要,因此表明5种添加剂的组合“HF10KNS”对于GFP^{lo}级分而言在高效地形成类器官方面也是优选的添加剂的组合。

[0268] (GFP^{neg}级分)

[0269] 与上述GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞的悬液同样地,对于GFP^{neg}级分的肺上皮干细胞的悬液也计算CFE[%]。3种添加剂的组合“KNS”的CFE为0.75%。

[0270] 试验例2表明:在高效地形成类器官方面,优选选自由添加剂KGF (K)、HGF (H) 和FGF 10 (F10) 组成的组中的至少1种以及Noggin (N) 等BMP抑制剂和SB431542 (S) 等TGFβ抑制剂所构成的组合,在更高效地形成类器官方面,更优选由CHIR99021 (C)、“N”、“S”和“H”构成的组合,进一步优选由“K”、“N”、“S”、“H”和“F10”构成的组合或由“K”、“C”、“N”、“S”、“H”和“F10”构成的组合。在高效形成AT2的类器官方面,如试验例3所示,优选含有“C”。

[0271] [试验例3]

[0272] 试验例2表明,即使不添加CHIR99021 (Wnt信号激活剂),类器官的形成效率也没有变化。试验例3研究了CHIR99021 (C) 对肺上皮干细胞的分化转化的影响。使用典型Wnt抑制剂XAV939 (X)。与试验例2同样地培养含有GFP^{hi}级分和GFP^{lo}级分的肺上皮干细胞的悬液,形成类器官。将4种添加剂的组合“KCNS”或“KXNS”添加于基础培养基MTEC/B27,作为培养用培养基。培养后,制作所形成的类器官的石蜡切片。对于上述石蜡切片中的类器官,使用针对Sffpc的抗体和针对支气管上皮细胞标志物Sox2的抗体进行组织免疫染色。

[0273] 对于GFP^{hi}级分,在含有Wnt信号激活剂CHIR99021 (C) 的添加剂的组合KCNS的情况下,在类器官中的Sox2表达方面,一部分类器官确认到较弱的表达。在含有10μM的Wnt/β连环蛋白抑制剂XAV939 (X) 的添加剂的组合“KXNS”的情况下,在一部分类器官中观察到强烈的Sox2表达。存在添加剂的组合“KCNS”与添加剂的组合“KXNS”相比细胞Sffpc的表达强烈的倾向。如试验例1所示,GFP^{hi}级分主要含有AT2且含有一部分BASCs。因此,由这些结果推测:在GFP^{hi}级分的悬浮液中部分存在的BASCs在Wnt信号激活剂存在下分化转化为AT2,其结果是形成AT2的类器官,以及在Wnt抑制剂存在下形成包含部分存在的BASCs的类器官和主要存在的AT2的类器官的至少2种类器官。

[0274] 对于GFP^{lo}级分,类器官中的Sox2的表达在含有Wnt信号激活剂的添加剂的组合“KCNS”下较弱,在含有Wnt抑制剂的添加剂的组合“KXNS”的情况下Sox2的表达较强。“KCNS”与“KXNS”相比,有Sffpc的表达强的倾向。GFP^{lo}级分的结果与GFP^{hi}级分的结果显示出同样的倾向。

[0275] 试验例3表明:在Wnt信号激活剂(例如CHIR99021)存在下形成肺上皮干细胞的类器官时,可以由AT2细胞以外的细胞种类诱导AT2的类器官形成。

[0276] [实施例1]由肺上皮干细胞形成类器官

[0277] 将GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞以每孔2500个细胞的方式接种于96孔超低吸附板(cell repellent 96孔板)。向在冰上冷却后的基础培养基MTEC/B27中添加7种添加剂Y-27632 (Y)、HGF (H)、Fgf10 (F10)、KGF (K)、CHIR99021 (C)、CHIR99021 (N) 和SB431542 (S) 的组合,在所得培养用培养基中添加2.5%的基质胶而得到所得培养用培养基,使用其与试验例2同样培养6天并计算CFE (图6)。与上述同样地以每孔200个细胞的方式接种GFP^{lo}级分的肺上皮干细胞,培养6天后计算CFE (图6)。

[0278] 图6示出通过在含有2.5%的低浓度的基质胶的培养用培养基中培养肺上皮干细胞而形成肺上皮干细胞的类器官、以及其类器官形成效率在GFP^{hi}级分中为约1.4%、在GFP^{lo}级分中为约6.4%。该结果表明:在含有利用50%或75%基质胶形成的凝胶的培养用培养基中,肺上皮干细胞的类器官形成效率在GFP^{hi}级分中为0.86%、在GFP^{lo}级分中为12%,

为同等程度。

[0279] 实施例1表明:只要存在本发明的添加剂,则不论是含有作为支架的胞外基质的凝胶(例如50%或75%基质胶)的培养用培养基中的培养还是含有作为分散成分的胞外基质(例如2.5%基质胶)的培养用培养基中的培养,均能够形成肺上皮干细胞的类器官。

[0280] [试验例4]

[0281] 调查了所形成的类器官是否具有分化能力。将GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞与试验例2同样地在于基础培养基MTEC/B27中添加4种添加剂的组合“KCNS”而成的培养用培养基中培养8天。2个培养物中的1个在上述培养用培养基中进一步培养4天。另1个在基础培养基中进一步培养4天。显示:在培养第12天,在于基础培养基中培养而形成的类器官中,作为肺泡的分化细胞的AT1细胞的细胞标志物Hopx强烈表达。试验例4表明:在本发明的添加剂存在下形成的类器官具有分化能力。

[0282] [制备例2]

[0283] (含有肺腺癌细胞的悬液的制备)

[0284] 准备使小鼠B6.129S-Sftpc^{tm1}(cre/ERT2)Blh/J(以下记作“Sftpc-CreERT2”)(Jackson Lab, StockNo.028054)、小鼠B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J(以下记作“Rosa26-mTmG”)(Jackson Lab, StockNo.007676)和小鼠B6N.Cg-Krastm4Tyj/CjDswJ(以下记作KrasLSLG12D)(Jackson Lab, StockNo.019104)这3种小鼠交配而得的Sftpc-CreERT2;KrasLSLG12D;Rosa26-mTmG小鼠。在Sftpc-CreERT2;KrasLSLG12D;Rosa26-mTmG小鼠中,Kras被激活的细胞的细胞膜会发出来自EGFP的绿色荧光。

[0285] Sftpc-CreERT2的情况下,在未给药他莫昔芬时Cre基因重组酶被激活,约5-10%的细胞发生重组(Barkauskas CE.et al., J Clin Invest.2013;123(7):3025-36.)。Sftpc-CreERT2;KrasLSLG12D;Rosa26-mTmG小鼠的肺中,确认到多个结节,表明上述小鼠的肺中存在癌变细胞。

[0286] 与制备例1同样地,从Sftpc-CreERT2;KrasLSLG12D;Rosa26-mTmG小鼠中制备含有肺上皮细胞的悬液。与制备例1同样地,从制备的含有肺上皮细胞的悬液中基于来自经荧光物质标记的抗EpCAM抗体的荧光和来自GFP的荧光得到含有Kras被激活的肺腺癌细胞的悬液。

[0287] [实施例2]由肺腺癌细胞形成类器官

[0288] 将上述中得到的肺腺癌细胞以每孔2500个细胞的方式接种于96孔超低吸附板(cell repellent 96孔板)。向在冰上冷却后的基础培养基MTEC/B27中添加7种添加剂Y-27632(Y)、HGF(H)、Fgf10(F10)、KGF(K)、CHIR99021(C)、CHIR99021(N)和SB431542(S)的组合,向所得培养用培养基中添加2.5%的基质胶而得到所得培养用培养基,使用其与试验例2同样地培养6天并计算CFE(图7)。与上述同样地将上述中得到的肺腺癌细胞在含有基础培养基MTEC/B27和2.5%的基质胶的培养用培养基中培养6天后,计算CFE(图7)。

[0289] 如图7所示,通过在上述添加剂存在下(图7中“+”)培养肺腺癌细胞而形成类器官,其CFE为约1.7%。上述添加剂不存在的情况下(图7中“-”),未观察到肺腺癌细胞的类器官的形成。

[0290] 实施例2表明:只要存在本发明的添加剂,则在不使用支架的培养用培养基中的培

养中也能够形成肺腺癌细胞的类器官。

[0291] [制备例3]

[0292] 与制备例1同样地,从SFTPC-GFP小鼠的肺得到含有肺上皮干细胞的悬液,使用FACS Aria II (BD公司) 基于来自GFP的荧光强度将所确定的肺上皮干细胞分为3个级分(GFP^{hi} 、 GFP^{lo} 、和 GFP^{neg}) (图8)。 GFP^{hi} 级分相当于试验例2的P19级分。 GFP^{lo} 级分相当于试验例2的P18级分。 GFP^{neg} 级分相当于试验例2的P17级分。

[0293] [试验例5]

[0294] 与试验例1同样地,利用qPCR扩增各标志物基因并调查标志物基因的表达模式,从该表达模式推测各级分中所含的细胞种类(图9)。其结果表明, GFP^{neg} 级分主要含有作为Krt5阳性细胞的基底细胞以及Scgb1a1和Scgb3a2为阳性的棒状细胞。 GFP^{neg} 级分与试验例1的P17级分同样地含有纤毛细胞和AT1细胞。表明 GFP^{lo} 级分只要含有Scgb1a1和Scgb3a2为阳性的棒状细胞。表明 GFP^{hi} 级分主要含有Sftpc和Abca3为阳性的AT2细胞,并且显示含有一部分BASC。

[0295] [试验例6]

[0296] 对于 GFP^{hi} 级分、 GFP^{lo} 级分、和 GFP^{neg} 级分的细胞,分别在于基础培养基MTEC/B27中以表2记载的终浓度添加HGF (H)、FGF10 (F10)、KGF (K)、NOGGIN (N)、SB431542 (S) 和CHIR99021 (C) 而成的增殖培养基(含有50%基质胶)中在不使用饲养细胞的情况下进行培养。基础培养基中添加的CHIR99021 (C) 并非类器官形成所必需,但是由于其可能参与棒状细胞向AT2细胞的分化,因此进行了添加。培养第9天,将上述增殖培养基更换为基础培养基MTEC/B27,进一步培养3天,形成分化得到促进的类器官。

[0297] 通过使用以下试剂的免疫染色,调查了分化促进前后形成的类器官中的标志物蛋白的表达。

[0298] [表6]

[0299]

名称	编号	销售商	备注
CC10(B6)	sc-390313	Santa cruz	主体: 小鼠 1:500-1000
表面活性蛋白C前体 (proSP-C)	AB3786	Millipore	主体: 兔子 1:300
人/小鼠/大鼠 SOX2 抗体	14-9965-82	R&D	主体: 山羊 1:200
细胞角蛋白5抗体(EP1601Y) (兔子)	ab52635	Abcam	主体: 兔子 1:500
在小鼠中制造的单克隆抗乙酰化微管蛋白抗体	T7541	Sigma	主体: 小鼠 1:1000
抗 m/rRAGE 纯化大鼠单克隆 IgG 175410	MAB1179	R&D	主体: 大鼠 1:200
在兔子中制作的抗 HOPX 抗体	HPA030180	Sigma	主体: 兔子 1:200
抗 HT2-280	TB-27AHT2-280	TERRACE BIOTECH	主体: 小鼠 1:50
胰蛋白酶, 来自猪胰腺, 细胞生物学用	T4799-5G	Sigma	
抗原修复液	H-3300	Vector	
抗原修复液 (高 pH)	H-3301	Vector	
M.O.M.(mouse on mouse) 免疫检测试剂盒	BMK-2202	Vector	

[0300] 通过培养GFP^{neg}级分的细胞而形成至少2种类器官(图10)。一种类器官在分化前(d9, 第9天)由含有Krt5阳性(基底细胞标志物)的基底细胞和SCGB1A1阳性(棒状细胞标志物)的棒状细胞的细胞群构成。构成在试验例6的分化条件下形成的上述类器官的细胞未分化为纤毛细胞。另一种类器官在分化前(d9)由含有SCGB1A1阳性(棒状细胞标志物)的棒状细胞的细胞群构成, 分化后(d12, 第12天)由含有ACTUB阳性(纤毛细胞标志物)的棒状细胞的细胞群构成。

[0301] 通过培养GFP^{lo}级分的细胞而形成至少2种类器官(图11)。一种类器官在分化前(d9)由含有SCGB 1A1阳性(棒状细胞标志物)的棒状细胞、SOX2阳性(支气管上皮标志物)的细胞和SFTPC阳性(AT2细胞标志物)的细胞的细胞群构成, 分化后(d12)由含有AGER阳性(AT1细胞标志物)的肺泡系统(lineage)细胞的细胞群构成。另一种类器官在分化前(d9)由SOX2阳性(支气管上皮标志物)且SFTPC阳性(AT2细胞标志物)的细胞群构成, 分化后(d12)由含有AGER阳性(AT1细胞标志物)的肺泡系统细胞的细胞群构成。

[0302] 通过培养GFP^{hi}级分的细胞而形成至少1种类器官(图12)。上述类器官在分化前(d9)由含有SFTPC阳性(AT2细胞标志物)细胞的细胞群构成, 分化后(d12)由含有AGER阳性(AT1细胞标志物)AT2细胞的细胞群构成。

[0303] [试验例7]

[0304] 使用来自SFTPC-GFP小鼠的GFP^{hi}级分、GFP^{lo}级分和GFP^{neg}级分的细胞作为对象细胞, 研究对高效地形成类器官有用的添加剂的组合。使用50%或75%的基质胶(注册商标), 与试验例2同样地形成含有上述细胞的凝胶并进行培养。类器官形成效率基于CFE[%]和类器官的长径值来评价。试验例7中使用6只SFTPC-GFP小鼠, 使用以合计计分别为120000个细胞、3600个细胞和24000个细胞的GFP^{hi}级分、GFP^{lo}级分和GFP^{neg}级分的细胞(n=6)。

[0305] (GFP^{hi}级分)

[0306] 将GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞在添加了以下的添加剂的组的培养用培养基中与试验例2同样地培养,使其形成类器官。上述培养中,以每孔5000个细胞的方式进行接种、培养。通过与试验例2同样的方法测定CFE[%]和长径[μm] (图13)。

[0307] [表7]

[0308]

	名称	KCNS	KNS	KCS	KCN	CNS	ECNS	F10CNS	HCNS	KF10HCNS
K	KGF	+	+	+	+	-	-	-	-	+
C	CHIR99021	+	-	+	+	+	+	+	+	+
N	Noggin	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S	SB431542	+	+	+	-	+	+	+	+	+
H	HGF	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F10	FGF10	-	-	-	-	-	-	+	-	+
E	EGF	-	-	-	-	-	+	-	-	-

[0309] +:作为添加剂使用

[0310] -:未作为添加剂使用

[0311] 表明:与3种添加剂的组合“CNS”的CFE相比,“KCNS”、“KNS”、“F10CNS”、“HCNS”、或“KF10HCNS”的CFE的值大(图13A)。使用任一添加剂的组合时,类器官的长径均未观察到显著差异(图13B)。

[0312] • 6种添加剂的组合

[0313] 使用6种添加剂的组合“KF10HCNS”时,与试验例2的结果同样地得到了最大的CFE(图13A)。例如,使用“KF10HCNS”时的CFE显著大于使用3种添加剂的组合“CNS”、在上述3种添加剂的组合中进一步组合1种受体酪氨酸激酶活化因子的4种添加剂的组合“KCNS”、“ECNS”或“F10CNS”时的CFE。

[0314] • 4种添加剂的组合

[0315] 4种添加剂的组合“HCNS”的CFE显著大于“CNS”或“ECNS”的CFE(图13A)。4种添加剂的组合“KCNS”、“F10CNS”和“HCNS”分别得到了同等的CFE(图13A)。该结果表明:与试验例2的结果同样地,在高效地形成类器官方面,添加剂“K”、“F10”和“H”可替换。

[0316] • 3种添加剂的组合

[0317] 从4种添加剂的组合“KCNS”中除去添加剂“N”而成的3种添加剂的组合“KCS”或除去添加剂S的3种添加剂的组合“KCN”的CFE分别为低于“KCNS”的CFE的倾向。(图13A) 该结果表明:与试验例2的结果同样地,4种添加剂“KCNS”中,添加剂“N”和“S”对于高效地形成类器官而言很重要。

[0318] 从KCNS中除去添加剂C而成的添加剂的组合“KNS”的CFE与“KCNS”的CFE没有显著差异(图13A)。该结果表明:与试验例2的结果同样地,在高效地形成类器官方面添加剂“C”不重要。但是,如试验例3所示,添加剂“C”可能引起构成细胞块的肺上皮干细胞的分化转化。

[0319] (GFP^{lo}级分)

[0320] 对于GFP^{lo}级分的肺上皮干细胞,也与上述GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞同样地计算CFE[%]。其中,与GFP^{hi}级分不同的是,以每孔150个细胞的方式进行培养。计算CFE(n=6)的

平均值和标准偏差(图14A)。进而计算类器官的长径(n=6)的平均值和标准偏差(图14B)。

[0321] 表明:与3种添加剂的组合“CNS”的CFE相比,“KCNS”、“KNS”、“F10CNS”、“HCNS”、或“KF10HCNS”的CFE的值大(图14A)。

[0322] • 6种添加剂的组合

[0323] 使用6种添加剂的组合“KF10HCNS”时,与试验例2的结果同样地得到了最大的CFE和长径(图14A和B)。例如,“KF10HCNS”的CFE显著大于3种添加剂的组合“CNS”的CFE、或在上述3种添加剂的组合中进一步组合了EGF(E)的4种添加剂的组合“ECNS”的CFE(图14A)。“KF10HCNS”时的长径显著大于“ECNS”时的长径(图14B)。

[0324] • 4种添加剂的组合

[0325] 4种添加剂的组合“F10CNS”或“HCNS”的CFE显著大于3种添加剂的组合“CNS”的CFE(图14A)。4种添加剂的组合“KCNS”、“F10CNS”和“HCNS”分别显示出同等的CFE(图14A)。该结果表明:与试验例2的结果同样地,在高效地形成类器官方面,添加剂“K”、“F10”和“H”可替换。在“KCNS”中使用添加剂“E”代替添加剂“K”的4种添加剂的组合“ECNS”显示显著小于KCNS的CFE和长径(图14A和B)。这些结果表明:在高效地形成类器官方面,添加剂“E”不能与添加剂“K”、“F10”或“H”互换。

[0326] • 3种添加剂的组合

[0327] 从4种添加剂的组合“KCNS”中去除添加剂“N”或“K”而成的3种添加剂的组合“KCS”或“CNS”的CFE分别显著低于“KCNS”的CFE(图14A)。使用“KCNS”时的长径显著小于使用“KCS”时的长径(图14B)。另外,从“KCNS”中除去添加剂S而成的3种添加剂的组合“KCN”的CFE有低于“KCNS”的CFE的倾向(图14A)。这些结果表明:与试验例2的结果同样地,4种添加剂“KCNS”中,添加剂“N”和“S”对于高效地形成类器官而言很重要。

[0328] 从“KCNS”中除去添加剂“C”而成的添加剂的组合“KNS”的CFE与“KCNS”的CFE没有显著差异(图14A)。该结果表明:与试验例2的结果同样地,在高效地形成类器官方面,添加剂“C”不重要。

[0329] (GFP^{neg}级分)

[0330] 对于GFP^{neg}级分的肺上皮干细胞,也与上述GFP^{hi}级分的肺上皮干细胞同样地计算CFE[%]。其中,与GFP^{hi}级分不同的是,以每孔1000个细胞的方式进行培养。计算CFE(n=6)的平均值和标准偏差(图15A)。进而,计算类器官的长径(n=6)的平均值和标准偏差(图15B)。

[0331] 表明:与3种添加剂的组合“CNS”的CFE细胞,“KCNS”、“KNS”、“F10CNS”、“HCNS”、或“KF10HCNS”的CFE值大(图15A)。这些添加剂的组合含有“N”和“C”、进一步含有选自“K”、“H”和“F10”组成的组中的至少1种。

[0332] • 6种添加剂的组合

[0333] 使用6种添加剂的组合“KF10HCNS”时,得到了最大的CFE和长径(图15A和B)。例如,“KF 10HCNS”的CFE显著大于不含受体酪氨酸激酶活化因子的3种添加剂的组合“CNS”的CFE(图15A)。

[0334] 使用在3种添加剂的组合CNS中进一步组合1种受体酪氨酸激酶活化因子的4种添加剂的组合“KCNS”、“ECNS”、“F10CNS”或“HCNS”时的长径显著大于使用上述3种添加剂的组合CNS时的长径(图15B)。该结果表明:对于类器官形成而言重要的是将4种受体酪氨酸激酶

活化因子“K”、“E”、“F10”和“H”中的任一种与3种添加剂的组合“CNS”进行组合。

[0335] 在类器官形成方面,GFP^{neg}级分的细胞与GFP^{hi}/¹⁰级分的细胞不同,使用ECNS时与使用CNS时相比可观察到显著性差异(图13A、图14A和图15B)。该结果与不使用饲养细胞而培养基底细胞的情况下使用EGF时是一致的(Proc Natl Acad Sci U S A.2009Aug4;106(31):12771-5)。

[0336] 试验例7表明:对于高效地形成类器官而言,优选选自由添加剂KGF(K)、HGF(H)和FGF10(F10)组成的组中的至少1种与Noggin(N)等BMP抑制剂、SB431542(S)等TGFβ抑制剂所构成的组合,对于更高效地形成类器官而言,更优选CHIR99021(C)与“N”、“S”和“H”所构成的组合,进一步优选“K”、“N”、“S”、“H”和“F10”所构成的组合或“K”、“C”、“N”、“S”、“H”和“F10”所构成的组合。

[0337] [实施例3]来自棒状细胞的类器官向肺损伤小鼠中的移植

[0338] 准备作为基因重组小鼠的rShh-Cre;Rosa26-CAG-LSL-H2B-mCherry;SFTPC-GFP小鼠(图16A,供体小鼠)。上述基因重组小鼠是使小鼠B6.Cg-Shhtml(EGFP/cre)Cjt/J(本说明书中简记为“Shh-Cre”)(Jackson Lab.Stock No.005602)、小鼠B6;129S-Gt(ROSA)26Sortm1.1Ksvo/J(本说明书中简记为“ROSA26-mCherry”)(Jackson Lab.Stock No.023139)和SFTPC-GFP小鼠这3种小鼠交配而得到的。

[0339] 按照与制备例1相同的方法从上述基因重组小鼠获得GFP¹⁰的细胞群(棒状细胞)。利用mCherry对获得的细胞的核进行染色。在上述细胞为AT2细胞时,会强烈表达GFP。

[0340] 由从上述基因重组小鼠获得的上述细胞,按照以下的方法形成类器官,将来自上述类器官的细胞给药于肺损伤小鼠(图16B)。将在培养基(MTEC/B27+YHF10KCNS+2.5%基质胶2mL)中含有由上述基因重组小鼠获得的上述细胞的细胞悬液以每孔 1×10^4 个细胞的方式接种于6孔板。每3天一次地将不含基质胶的上述培养基1mL添加到上述孔中,总计培养9天。培养第9天时将含有类器官的培养液供于离心分离(400G、3分钟、4℃)而回收类器官。向回收的类器官中添加预先升温到37℃的蛋白酶溶液10mL(accutase、I型胶原酶(450U/mL、Worthington)、DNase(0.1mg/mL、SIGMA)),在37℃下使用转子平稳地搅拌20分钟。对上述溶液进行吹打而得到细胞悬液,将其供于离心分离(400G、5分钟、4℃),回收细胞块。向回收的细胞块中添加0.25%胰蛋白酶5mL(Gibco、含有0.1mg/mL的DNase),在37℃下用转子平稳地搅拌10分钟。对上述溶液进行吹打而得到细胞悬液,为了停止蛋白酶反应而向上述细胞悬液中添加DMEM/F12 10mL(含有10%FBS)。将上述细胞悬液供于离心分离(400G、5分钟、4℃),将回收的细胞以每75μL培养基中的活细胞为 4×10^5 的方式悬浮在90μL的培养基(MTEC/B27+“YHF10KNS”)中。

[0341] 肺损伤小鼠如下制备:在给药来自类器官的上述细胞的9天前,将裸小鼠用异氟烷(辉瑞)麻醉,经鼻给药3mg/Kg体积的博来霉素溶液(日本化药),由此而制备。

[0342] 在给药来自类器官的上述细胞当天,将上述肺损伤小鼠用异氟烷(辉瑞)麻醉,从气管将以上制备的细胞悬液给药于上述小鼠。在给药细胞2周后将上述肺损伤小鼠解剖,制作肺冷冻切片。用荧光显微镜拍摄上述冷冻切片的来自mCherry和GFP的荧光,调查给予的上述细胞对肺组织的粘附和存活(图16C和D)。

[0343] 在肺切片中观察到细胞核发出了mCherry来源的荧光的细胞(图16C)。该结果表明:由从作为供体的基因重组小鼠获得的棒状细胞形成类器官后,得到的棒状细胞粘附于

作为受体的肺损伤小鼠的肺组织并存活。细胞核发出了mCherry来源的荧光的细胞中,一些细胞发出了GFP来源的荧光(图16D)。该结果表明:由棒状细胞分化为AT2细胞而成的细胞粘附于肺损伤小鼠的肺组织并存活。

[0344] [实施例4]由人原代细胞形成类器官

[0345] 购买了以下的人肺泡细胞(Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells: HPAEpiC,人肺泡上皮细胞)和人气道细胞(Human Small Airway Epithelial Cells: HPSAEpiC,人小气道上皮细胞)。

[0346] [表8]

[0347]	名称	编号	销售商	Lot.
	人小气道上皮细胞(HPSAEpiC)	3230	ScienCell	28775
	人肺泡上皮细胞(HPAEpiC)	3200	ScienCell	28699

[0348] 将购买的冷冻人原代细胞在37℃下融解,将融解液100μl悬浮于培养用培养基(MTEC/B27+“YHF10KCNS”+5%基质胶)2mL中,将细胞悬液接种于6孔斥水板(repellent plate)。HPAEpiC以每孔 1.44×10^5 个细胞的方式接种。HPSAEpiC以每孔 5.6×10^4 个细胞的方式接种。培养第3天时加入上述培养用培养基1ml。培养第6天时,将培养细胞以每孔 2×10^5 个细胞的方式传代。此后每12天对培养细胞进行传代。

[0349] 将培养第6天的人原代细胞传代而成的细胞培养12天,观察培养细胞(图17)。在培养人肺泡细胞和人气道细胞的孔中分别观察到类器官(图17A和B)。利用使用试验例6的表4中示出的试剂的免疫染色调查形成的类器官的标志物蛋白的表达(图18)。免疫染色使用类器官的石蜡切片进行。其结果表明,由人肺泡细胞形成3种类型的类器官(图18A~C),由人气道细胞形成1种类型的类器官(图18D)。

[0350] 图18A表明:由人肺泡细胞形成的类器官为表达人特异性AT2细胞标志物(HT2-280)和与小鼠共通的AT2细胞标志物(SFTPC)的肺泡型。图18B表明:由人肺泡细胞形成的类器官为表达上述2种标志物蛋白HT2-280和SFTPC、且表达支气管上皮标志物SOX2的支气管肺泡型。图18C表明:由人肺泡细胞形成的类器官为仅表达支气管上皮标志物SOX2的支气管型。实施例4中,由人肺泡细胞形成3种类型的类器官。认为该结果的一个原因是购买的人肺泡细胞中混有末梢气道细胞。

[0351] 图18D表明:由人气道细胞形成的类器官是由表达基底细胞标志物(KRT5)和支气管上皮标志物(SOX2)的基底细胞形成的。

[0352] 实施例4表明:通过在含有本说明书中公开的添加剂的组的培养用培养基中培养人肺原代细胞,能够形成类器官。

[0353] [实施例5]以细胞群进行培养时的类器官形成的成像

[0354] 由基因重组小鼠Scgblal-CreER;Rosa26-mTmG制备肺上皮细胞。对上述基因重组小鼠给药他莫昔芬,则Scgblal介由Cre重组酶而整合于Rosa26基因座。其结果是,可以通过细胞膜局部存在型GFP(mGFP)来源的荧光来检测Scgblal的表达。

[0355] 对上述基因重组小鼠给药5次他莫昔芬。给药他莫昔芬3周后,摘出切除了气管的肺。从摘出的肺中,与制备例1同样地制备细胞悬液。向上述细胞悬液中添加下述抗体:抗EPCAM-PE-Cy7(#25-5791-80,eBioscience)、抗CD24-APC(#25-0242-80,Invitrogen)、抗CD45-biotin(#13-0451,eBioscience)、抗CD31-biotin(#13-0311,eBioscience),在冰上

反应20分钟。将上述反应液悬浮于500μL的DPBS(-)/3%FBS后,供于离心分离(400g、3分钟、4℃),将沉淀细胞重悬于100μL的DPBS(-)/3%FBS中。向细胞悬液中添加相对于 1×10^6 个细胞为0.25μL的链霉亲和素APC-Cy7,在冰上反应10分钟。将上述细胞悬浮于500μL的DPBS(-)/3%FBS后,供于离心分离(400g、3分钟、4℃),将沉淀细胞重悬于500μL的DPBS(-)/3%FBS中。向细胞悬液中添加相对于 1×10^6 个细胞为5μL的7-氨基-放线菌素D(7-AAD),在冰上反应20分钟。使用40μm的细胞滤网从上述反应液中除去细胞块后供于FACS。

[0356] 通过进行FACS,从制备的上述细胞悬液中除去被7-AAD染色的死细胞,除去被抗CD31染色的内皮细胞,再除去被抗CD45抗体染色的血细胞系细胞。从剩余的细胞群中,收集被抗EPCAM抗体染色的上皮细胞,收集发出GFP来源的荧光的Scgblal阳性细胞(主要为棒状细胞),再收集被抗CD24抗体染色的组织干细胞/祖细胞(CD24^{lo})。将得到的细胞供于离心分离(400g、5分钟、4℃),将沉淀细胞悬浮于培养用培养基(MTEC/B27+5%FBS+“YHF10KNS”)中,然后加入培养用培养基(MTEC/B27+5%FBS+“YHF10KNS”+2.5%基质胶),制备在250μL中含有300个细胞的细胞悬液。将上述细胞悬液接种于超低吸附96孔板(CELLSTAR、#655970、Greiner),将上述96孔板设置于培养器一体型显微镜Celldiscoverer7(Zeiss)。将上述细胞培养10天且以规定的间隔在明视场下拍摄培养细胞。首日(第0天)每隔4小时进行拍摄,第1~10天以每天一次的间隔进行拍摄。物镜的倍率使用10倍。以Z宽度45μm拍摄17张。因此,拍摄的图像文件在各时刻在Z轴方向包含17张图像数据。

[0357] (图像分析方法)

[0358] 将拍摄的图像文件用图像分析软件ZEN3.0(blue edition)转变为Tiff文件,接着使用图像分析软件ImageJ(ver.1.52n)进行分析。通过第0天至第10天的图像文件追踪由单细胞至形成类器官的过程。在细胞块的长径为50μm以上时,判断形成类器官。在类器官形成的追踪中,将焦点偏离的细胞、位于平面端部而观察不到整体图像的细胞、与其它细胞接触的细胞、和由于一些原因在培养第6天前无法追踪的细胞(例如与生长中的类器官重叠的细胞)从分析中排除。从第0天的图像数据中,裁剪出含有在由单细胞形成类器官的过程中可观察到的细胞的区域而制作图像文件。将裁剪出的图像文件的Z轴方向的图像数据使用ImageJ的外挂程序StackReg(<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/>)进行整合。对整合后的图像数据中的三维构建的细胞形态进行计测。形态计测对面积(Area)、周长(Perimeter)、长径(Major axis)、短径(Minor axis)、球形度(Circularity)、灰度值(Gray value)和重心(Centroid)这些项目进行。

[0359] (结果)

[0360] 对由3只小鼠得到的细胞悬液中的1056个细胞的细胞群进行培养,对该细胞群内的各细胞观察类器官形成过程。1056个细胞中,235个细胞形成类器官,821个细胞未形成类器官。对形成了类器官的细胞和未形成类器官的细胞分别进行形态计测(图19)。图19A示出:形成了类器官的细胞与未形成类器官的细胞相比,面积显著大。图19B~图19D分别示出:形成了类器官的细胞与未形成类器官的细胞相比,周长、长径和短径显著大。图19E~图19H示出:形成了类器官的细胞与未形成类器官的细胞之间在球形度、灰度值(平均、众数值)和重心方面没有显著差异。

[0361] 实施例5表明:由小鼠得到的肺上皮细胞中,比较大的细胞、具体而言其面积、周长、长径和/或短径大的细胞形成类器官的倾向高。

[0362] [实施例6]以单细胞培养形成类器官的成像

[0363] 如实施例5那样以聚类簇来培养细胞并观察该聚类簇内的各个细胞的培养经过时,随着时间的经过,一些细胞与其它细胞一起形成细胞块等,有时无法追踪该细胞的类器官形成过程。实施例6中通过在1孔中接种一个细胞并进行培养,更准确地调查容易形成类器官的细胞的形态特征。

[0364] 与实施例5同样地,由小鼠制备肺上皮细胞的细胞悬液,接着将上述细胞悬液供于FACS,收集棒状细胞。将上述棒状细胞悬浮于培养用培养基(MTEC/B27+5%FBS+“YHF10KNS”)中,制备每1ml培养用培养基中含有2500个~5000个细胞的细胞悬液。将上述细胞悬液2ml接种于用Biosurfine AWP-MRH(6%aq)(东洋合成)进行了非粘附化的Elplasia6孔板(Corning 4444),将上述板静置30分钟。然后使用细胞采集&成像系统Cellhandler(Yamaha)获得上述板的孔的明视场(BF)图像和碘丙啶(PI、#130-093-233、Miltenyi Biotec)荧光图像,将PI阴性的活细胞一个一个地添加到384孔板(CELLSTAR、#655892、Greiner)的1孔中的50μL培养液(MTEC/B27+5%FBS+“YHF10KNS”+2.5%基质胶)中。将各孔中的细胞在37℃、5%CO₂下培养10天,形成类器官。在细胞块的长径达到50μm以上时,判断形成类器官。以与实施例5相同的时间间隔拍摄由单细胞形成类器官的过程。对于获得的图像数据,使用ImageJ(ver.1.52n)与实施例5同样地计测细胞形态的项目。

[0365] (结果)

[0366] 将由3只小鼠得到的1053个细胞分别在每个孔中培养,观察由单细胞形成类器官的过程。1053个细胞中,307个细胞形成了类器官,746个细胞未形成类器官。对形成了类器官的细胞和未形成类器官的细胞各自的形态进行计测(图20)。形成了类器官的细胞与未形成类器官的细胞相比,面积、周长、长径和短径显著大(图20A~图20D)。在球形度、灰度值(平均、众数值)和重心方面,形成了类器官的细胞与未形成类器官的细胞之间没有显著差异(图20E~图20H)。

[0367] 实施例6表明:与实施例5同样地,由小鼠得到的肺上皮细胞中,比较大的细胞、具体而言其面积、周长、长径和/或短径大的细胞形成类器官的倾向高。

[0368] [实施例7]单细胞时的细胞形态的计测和RNA测序的组合

[0369] 为了调查具有实施例5和6所示的形态特征的细胞中的基因表达模式,将单分子的细胞形态计测数据与单分子RNA测序数据组合进行分析。

[0370] 与实施例6同样地,由从小鼠得到的肺上皮细胞回收棒状细胞,将上述棒状细胞悬浮于培养用培养基(MTEC/B27+5%FBS+“Y”)中,制备每1ml培养用培养基含有2500个~5000个细胞的细胞悬液。将上述细胞悬液2ml接种于用Biosurfine AWP-MRH(6%aq)(东洋合成)进行非粘附化的Elplasia6孔板(Corning 4444),将上述板静置30分钟。然后使用Cellhandler(Yamaha)获得上述板的孔的BF图像和PI图像,将PI阴性的活细胞1个一个地加入到96孔的PCR板的1个孔中的RNase抑制剂溶液2μL(RNasin plus 0.2μL、5xMaxima H-buffer 0.4μL、无RNase水1.4μL)。对于上述各细胞,进行RNA测序,获得单细胞RNA测序数据。另外,使用ImageJ(ver.1.52n)与实施例5同样地,由关于各细胞的图像数据计测细胞形态的项目。将计测而得的关于细胞形态的图像分析数据和单细胞RNA测序数据用分析软件Seurat(ver.3)进行整合。

[0371] (结果)

[0372] 将单细胞时的关于细胞形态的图像分析数据与单细胞RNA测序数据组合,进行聚类分析,结果将测定的细胞主要分为3个聚类簇(图21)。在图21A~C中,右上方所示的聚类簇称为“聚类簇0”,右下所示的聚类簇称为“聚类簇1”,左下所示的聚类簇称为“聚类簇2”。图21A示出各聚类簇中的棒状细胞标志物Scgb1a1的表达水平,表明聚类簇0和2强烈表达Scgb1a1。该结果表明,聚类簇0和2所对应的细胞为棒状细胞(图21C)。图21B示出各聚类簇中的AT2细胞标志物Sftpc的表达水平,表明聚类簇1强烈表达Sftpc。该结果表明,对应于聚类簇1的细胞为AT2细胞(图21C)。

[0373] 图21D示出对应于各聚类簇的细胞的面积。图21D示出对应于聚类簇2的棒状细胞(图21D的右侧)的细胞面积大于对应于聚类簇0的棒状细胞((图21D的左侧)。若考虑实施例4和5的结果,则暗示对应于聚类簇2的较大的棒状细胞为形成类器官的倾向高的细胞。

[0374] 通过将关于细胞形态的图像分析数据和单细胞RNA测序数据整合,明确了对应于各聚类簇的细胞强烈表达特定的基因。下表分别示出了在各聚类簇中强烈表达的基因中的前20种基因。

[0375] [表9]

[0376]

表达水平排序	类别0	类别1	类别2
1	Cbr2	Lamp3	Tff2
2	Hp	Lyz2	Reg3g
3	Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
4	Prdx6	Slc34a2	Muc5b
5	Scgb1a1	Lyz1	Sult1d1
6	Ldhb	Rnase4	Fxyd3
7	Ces1d	Hc	Scgb3a1
8	Cckar	Cd74	Lypd2
9	Selenbp1	Scd1	Chad
10	Gstm2	Sftpc	S100a6
11	Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
12	Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
13	Plpp3	Etv5	Bpifa1
14	Ephx1	Cxcl15	Gsto1
15	Dcxr	S100g	Lgals3
16	Alas1	Elov11	Pigr
17	Retn1a	Fas	Scgb3a2
18	Sec14l3	H2-Aa	Ltf
19	Ptgr1	Fabp5	Qsox1
20	Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5

[0377] 调查了在对应于聚类簇2的细胞中与对应于其它聚类簇的细胞相比强烈表达的细胞表面蛋白的相应基因转录水平(图22)。其结果是,明确了Fxyd3、Pigr、Cpd、Ly6a、Perp、Kcne3、I113ra1、Slc15a2、和Cd14在聚类簇2的表达相对强烈。

[0378] 实施例5~7表明:通过选择表达在实施例7中发现的标志物的肺上皮细胞,能够选

择出形成类器官的倾向高的肺上皮细胞。

[0379] [实施例8]CD14⁺棒状细胞的类器官的形成

[0380] 使用实施例7中发现的标志物中的CD14,从肺上皮细胞中分取表达CD14的CD14⁺细胞(对应于聚类簇2的细胞),调查CD14⁺细胞形成类器官的倾向是否高。

[0381] 使用下述抗体:抗CD14-APC(#17-1401-81、invitrogen)、抗MHCclass2-eFluoro450(#48-5321、eBioscience)、抗CD24-PEcy7(#25-0242-80、invitrogen)、抗CD45-biotin(#13-0451、eBioscience)、抗CD31-biotin(#13-0311、eBioscience),除此以外与实施例5同样地制备用于供于FACS的细胞悬液。

[0382] (CD14⁺细胞的分取)

[0383] 通过进行FACS,从而从制备的细胞悬液中除去被7-AAD染色的死细胞,除去被抗CD31染色的内皮细胞的、被抗CD45抗体染色的血细胞系细胞,再除去被抗MHC 2类抗体染色的AT2细胞(对应于聚类簇1的细胞)。从剩余的细胞群中,收集发出GFP来源的荧光的Scgb1a1阳性细胞(主要为棒状细胞),收集抗CD24抗体染色的组织干细胞/祖细胞(CD24¹⁰)。由此,选择对应于聚类簇0和聚类簇2的细胞。接着,分别分取被抗CD14抗体染色的CD14⁺细胞和未染色的CD14⁻细胞。利用FACS的CD14⁺细胞和CD14⁻细胞的分取如下那样进行。首先,将使用同种型抗体的细胞悬液供于FACS,以包含所得到的细胞分布的方式设定门。然后,将使用抗CD14抗体的细胞悬液供于FACS,分取所得到的细胞分布中的超过所设定门范围的细胞,作为CD14⁺细胞,分取该门内的细胞,作为CD14⁻细胞。

[0384] 为了调查CD14⁺细胞是否为对应于聚类簇2的棒状细胞,利用qPCR调查发现在对应于聚类簇2的细胞中强烈表达的基因Muc5b、Scgb3a1和Tff2的表达水平(图23A)。图23A表明:CD14⁺细胞中,在对应于聚类簇2的细胞中强烈表达的标志物基因Muc5b、Scgb3a1和Tff2的表达水平高。该结果表明:CD14⁺细胞为对应于聚类簇2的棒状细胞。

[0385] 进而调查CD14⁺细胞是否为形成类器官的倾向高的比较大的细胞(图23B)。将如此得到的CD14^{+/+}细胞供于离心分离(400G、5分钟、4℃),重悬于250μL的基础培养基中,添加5μL的PI,分注于黑色的玻璃底96孔板(Sensoplate、Greiner#655892),将上述96孔板静置30分钟。之后,对于上述孔的各孔,获得明视场(BF)图像和GFP/PI荧光图像。将被PI染色的死细胞从以后的分析中排除。另外,焦点偏离的细胞、位于平面端部而观察不到整体图像的细胞、与其它细胞接触的细胞也被排出在以后的分析之外。对于发出GFP来源的荧光的棒状细胞,计测细胞形态。细胞形态的计测中,与实施例5同样地使用ImageJ对BF图像数据进行(图23B)。图23B示出:CD14⁺细胞与CD14⁻细胞相比,细胞的面积显著大。

[0386] 这些结果表明:通过基于用于选择聚类簇2的上述细胞标志物中的至少1种(例如CD14⁺)来选择细胞,能够得到细胞面积比较大的对应于聚类簇2的细胞。

[0387] (形成CD14⁺细胞的类器官)

[0388] 调查如上述那样得到的CD14⁺细胞形成类器官的倾向是否高。将CD14^{+/+}细胞与实施例3同样地,将包含于培养用培养基(MTEC/B27+“YHF10KNS”+2.5%基质胶2mL)中的细胞悬液以每孔300个细胞的方式接种并培养9天,使其析出类器官(图24A)。图24A示出:与CD14⁻细胞相比,CD14⁺细胞更多地形成了更大的类器官。培养CD14^{+/+}细胞而形成的细胞块的比例(CFE[%])也证实了与CD14⁻细胞相比CD14⁺细胞形成类器官的倾向显著高(图24B)。

[0389] 对于培养第9天的来自CD14^{+/+}细胞的类器官,调查对应于聚类簇2的棒状细胞分化

至何种程度(图25)。图25示出:CD14⁺细胞和CD14⁻细胞在Alveolar系统的标志物基因、具体而言Sftpc、Ager和Hopx的表达方面均没有显著差异。另一方面,在Bronchiolar系统的标志物基因、具体而言Sox2(支气管上皮细胞标志物)的表达方面,CD14⁻细胞显著小于CD14⁺细胞。另外,在Scgb1a1(棒状细胞标志物)和Foxj1(纤毛细胞标志物)的表达方面,显示出CD14⁻细胞小于CD14⁺细胞的倾向。这些结果表明:对应于聚类簇0的CD14⁻细胞从棒状细胞分化为肺泡细胞的倾向高。

[0390] 对于将上述CD14^{+/+}细胞培养第9天和第12天(为了诱导分化,在培养第9天将培养用培养基置换为基础培养基并培养3天)的类器官,进行免疫染色(图26)。图26A示出:培养第9天的类器官含有共表达棒状细胞标志物SCGB1A1和AT2细胞标志物SFTPC这两者的细胞。图26B示出:培养第9天的类器官共表达AT1标志物AGER和HOPX这两者。这些结果表明:对应于聚类簇2的CD14⁺细胞在来自上述细胞的类器官中分化为肺泡系统的细胞的倾向高。

[0391] [实施例9]原代肺上皮细胞向肺损伤模型小鼠的移植

[0392] 调查了CD14^{+/+}细胞在处于肺损伤恢复过程中的肺中能否增殖或能否分化为肺泡细胞。

[0393] 从基因重组小鼠Scgb1a1-CreER;Rosa26-mTmG中,与实施例8同样地回收CD14^{+/+}细胞,将上述CD14⁻细胞和CD14⁺细胞分别悬浮于培养用培养基(MTEC/B27+5%FBS+“YHF10KNS”)中,制备每75μL培养用培养基中含有7000个细胞的CD14^{+/+}细胞悬液。在给药上述细胞悬液的1周前,向缺失胸腺和T细胞功能的裸小鼠BALB/cS1c-nu/nu(10周龄、25g以上)中以3mg/Kg经鼻注入博来霉素,由此准备肺损伤模型小鼠。向上述肺损伤模型小鼠的肺中经气管给药上述细胞悬液。

[0394] 在给药上述细胞悬液2周后,将上述肺损伤模型小鼠解剖,调查给药的上述细胞在肺中的存活和增殖(图27)。上述调查中,使用上述小鼠的左肺。使用左肺制作冷冻块,将上述块用切片机制成厚8μm的组织切片。每片组织切片的间隔为约100μm。在每只小鼠的40片组织切片中,观察GFP来源的荧光。基于上述肺中确认到聚类簇数量(图27A)和1个聚类簇中所含的细胞数(图27B)来评价所给药的细胞在上述肺中的存活能力。实施例9中,将发出GFP来源的荧光的细胞间的距离为100μm以下的细胞基团定义为1个聚类簇。

[0395] 图27A示出:CD14⁺细胞和CD14⁻细胞分别能够在受到博来霉素伤害的肺中存活。图27A示出:与CD14⁻细胞相比,在上述肺中存活的CD14⁺细胞显著多。图27B示出:与来自CD14⁻细胞的聚类簇相比,来自CD14⁺细胞的聚类簇由显著多的细胞构成。给药了CD14⁺细胞的小鼠的肺中,观察到认为由炎症导致的纤维化。另一方面,给药了CD14⁻细胞的小鼠的肺与给药了CD14⁺细胞的小鼠的肺中观察到的纤维化相比,观察到轻度的纤维化。

[0396] 通过调查在上述肺中发出GFP来源的荧光的细胞中的细胞标志物的表达,来调查所给药的细胞在上述肺中的分化能力。上述调查中使用上述小鼠的右肺。由冷冻的右肺制作石蜡块,由上述块制备厚6μm的组织切片。对上述组织切片进行免疫染色。上述免疫染色表明在给药了CD14⁺细胞的肺中存在表达GFP且表达AT2细胞标志物SFTPC的AT2细胞、和表达GFP且表达AT1细胞标志物PDPN的AT1细胞。上述肺中未观察到表达纤毛细胞标志物AcTub的纤毛细胞、和表达基底细胞标志物AcTub的细胞。这些结果表明:给药的CD14⁺细胞(GFP阳性细胞)分化为作为肺泡系统细胞的AT2细胞和AT1细胞(图28)。另外表明,上述免疫染色表明在给药了CD14⁺细胞的肺中存在表达GFP且表达棒状细胞标志物SCGB1A1的棒状细胞、以

及表达GFP且表达纤毛细胞标志物AcTub的纤毛细胞。该结果表明：给药的CD14⁺细胞(GFP阳性细胞)共表达棒状细胞标志物SCGB1A1和纤毛细胞标志物AcTUB,因此也分化为作为支气管系统细胞的纤毛细胞(图29)。

[0397] 实施例9表明：对应于聚类簇0的细胞(例如CD14⁺细胞)能够具有在被送达的肺中不引起炎症等不良影响的情况下形成类器官的能力,以及具有分化成肺泡和支气管系统的细胞的能力,因此作为用于修复肺损伤或肺疾病的再生医疗用组合物有用。另外,实施例9表明：对应于聚类簇2的细胞(例如CD14⁺细胞)具有高效地形成类器官的能力以及具有分化成肺泡和支气管系统的细胞的能力,因此作为用于修复肺损伤或肺疾病的再生医疗用组合物有用。另外表明,对应于聚类簇2的细胞(例如CD14⁺细胞)作为用于输送用于修复受损的肺或罹患疾病的肺的药剂(例如有机化合物、基因或蛋白质)的载体有用。

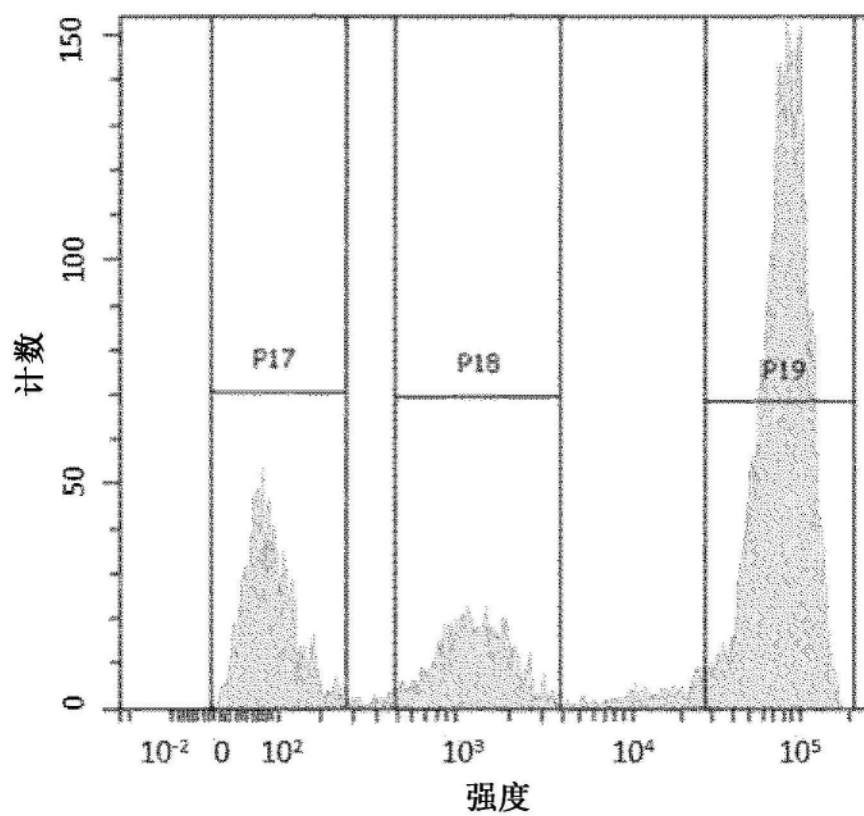


图1

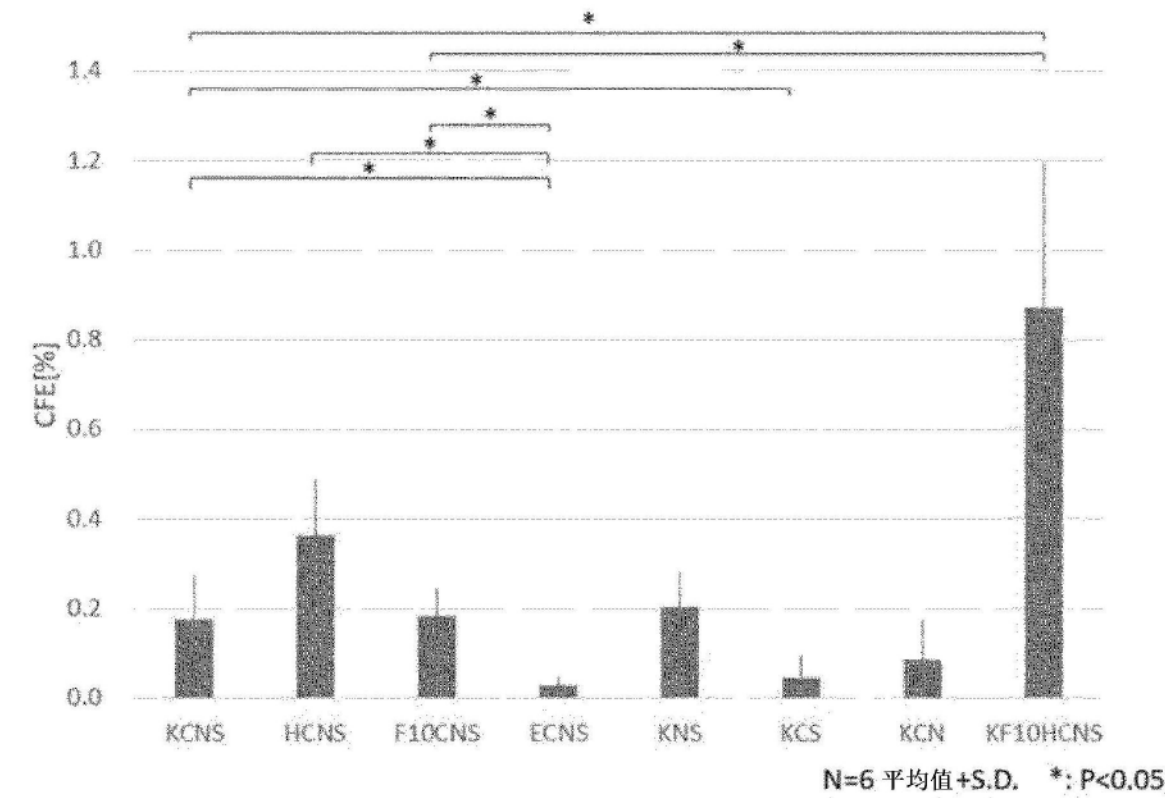


图2

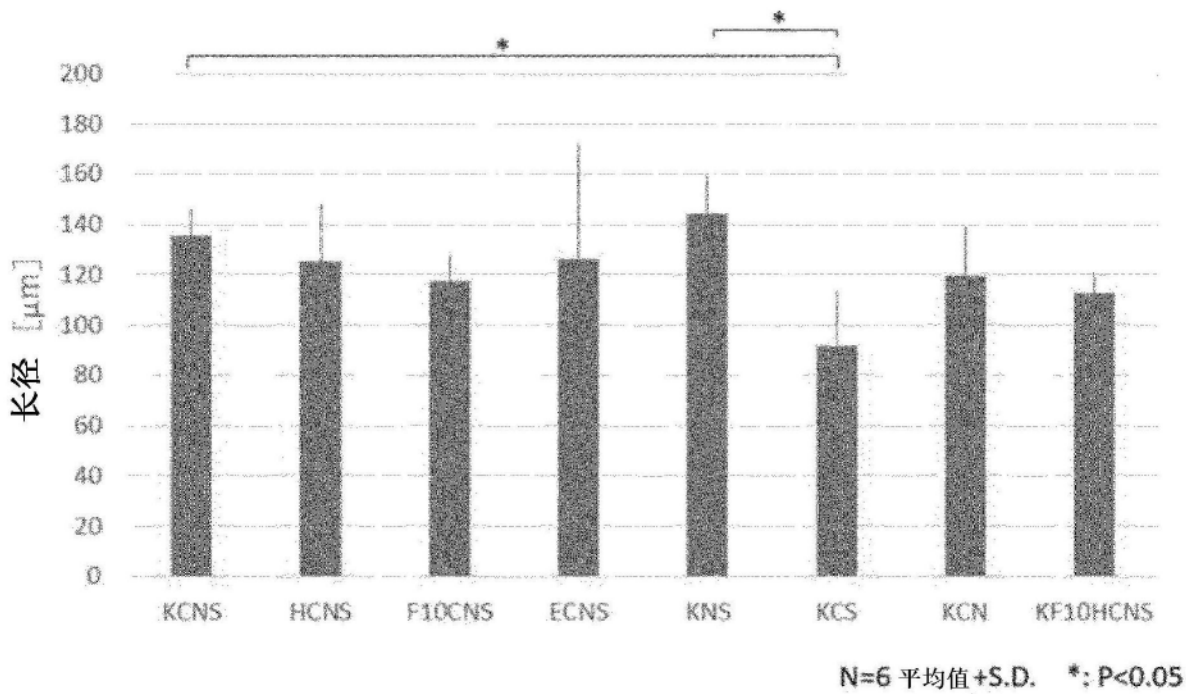
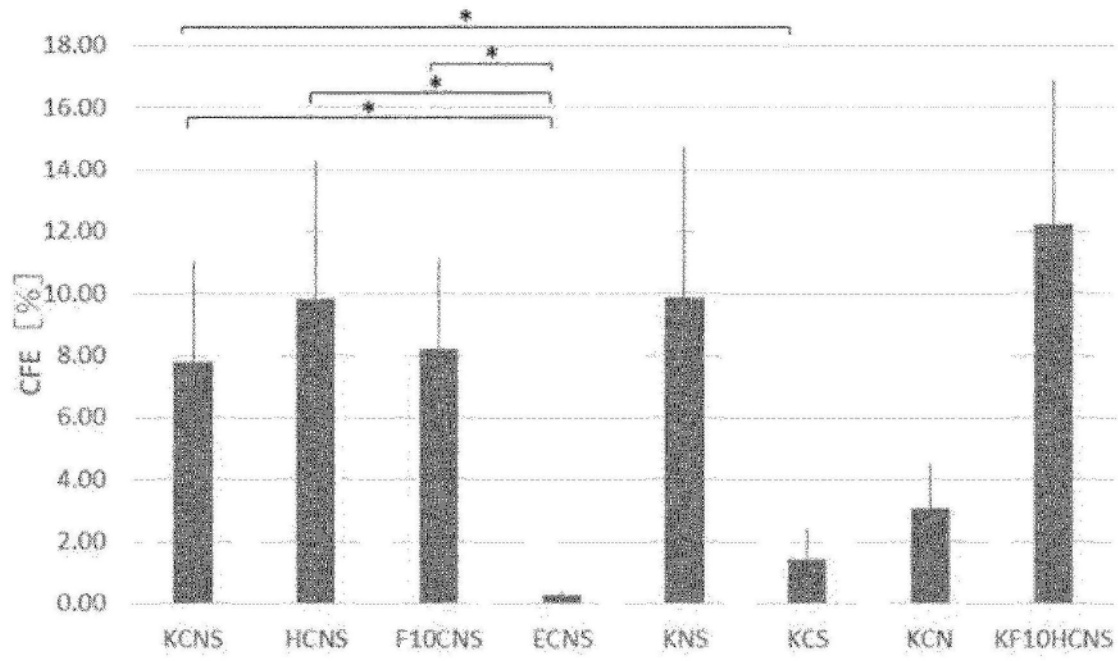
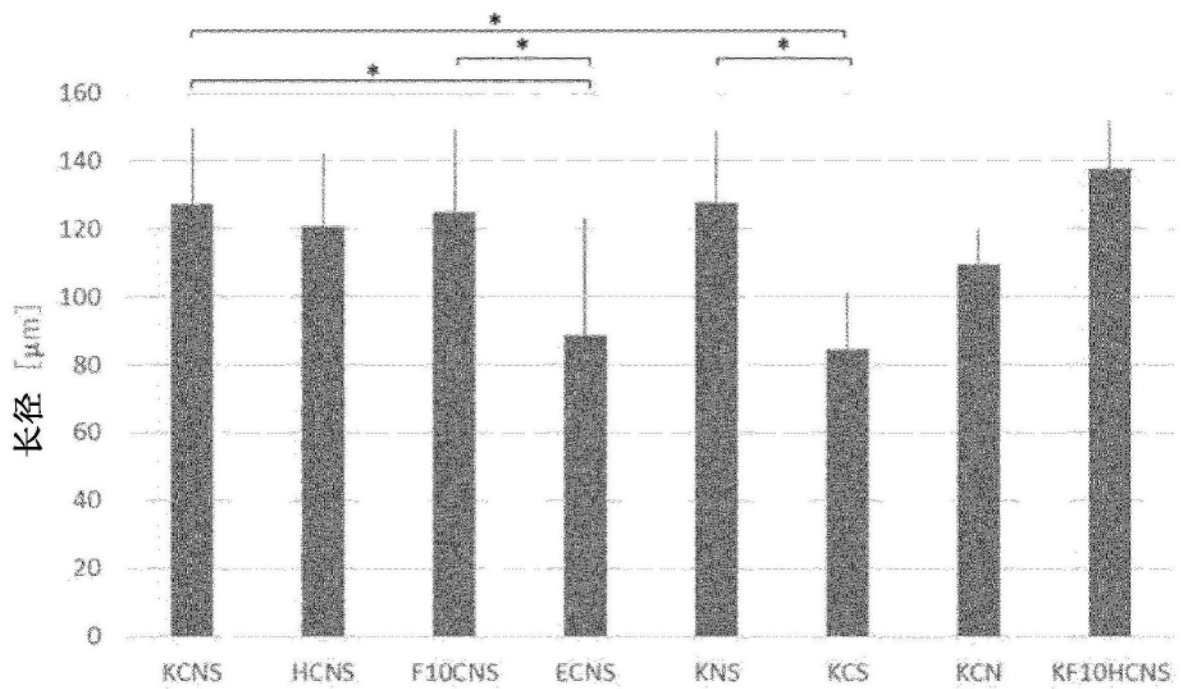


图3



N=6 平均值+S.D. *: P<0.05

图4



N=6 平均值+S.D. *: P<0.05

图5

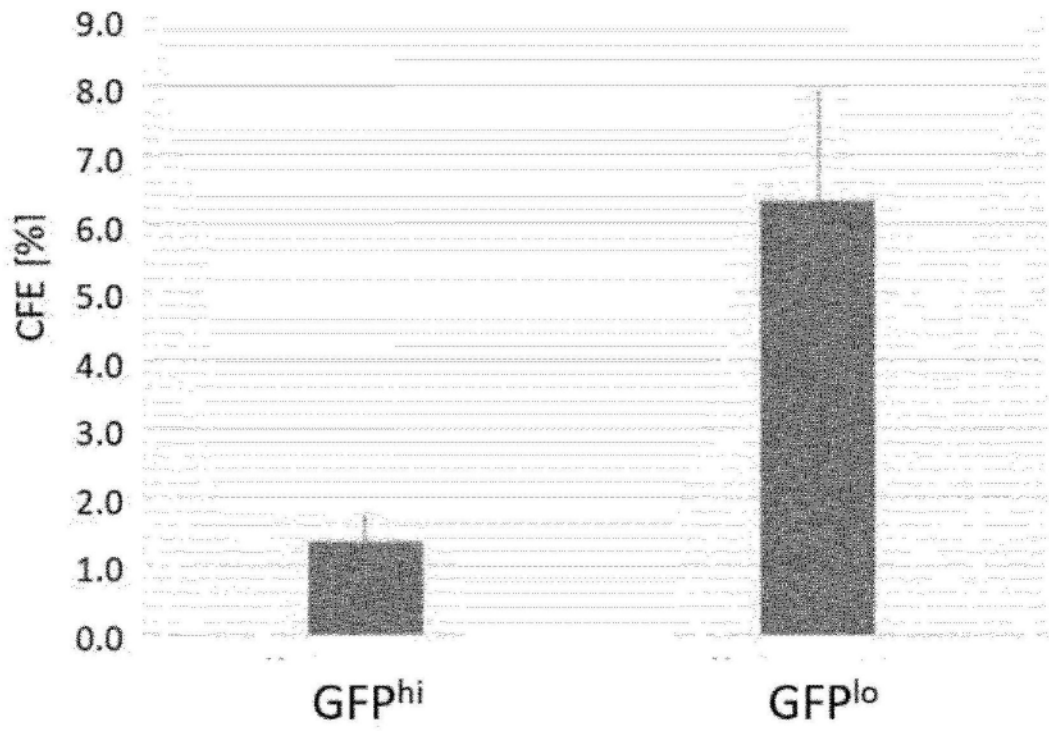


图6

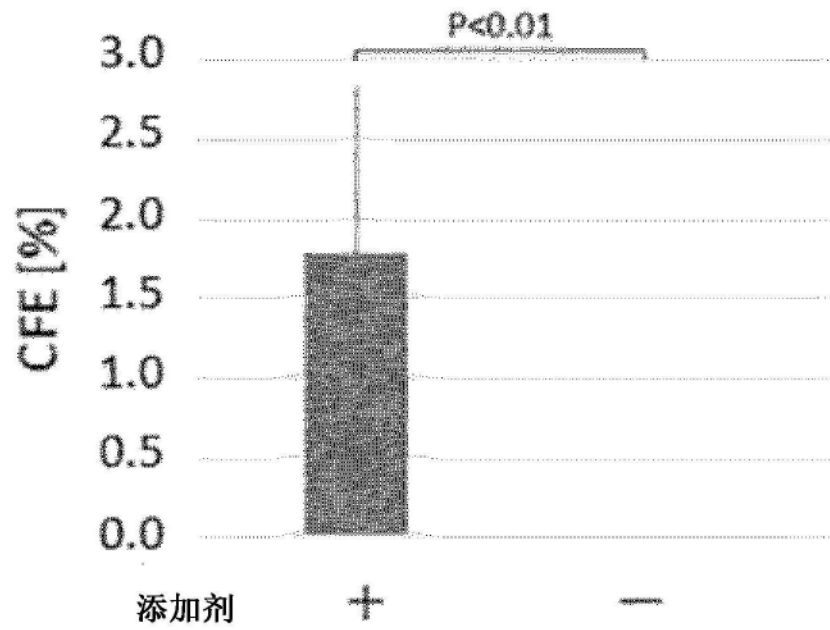


图7

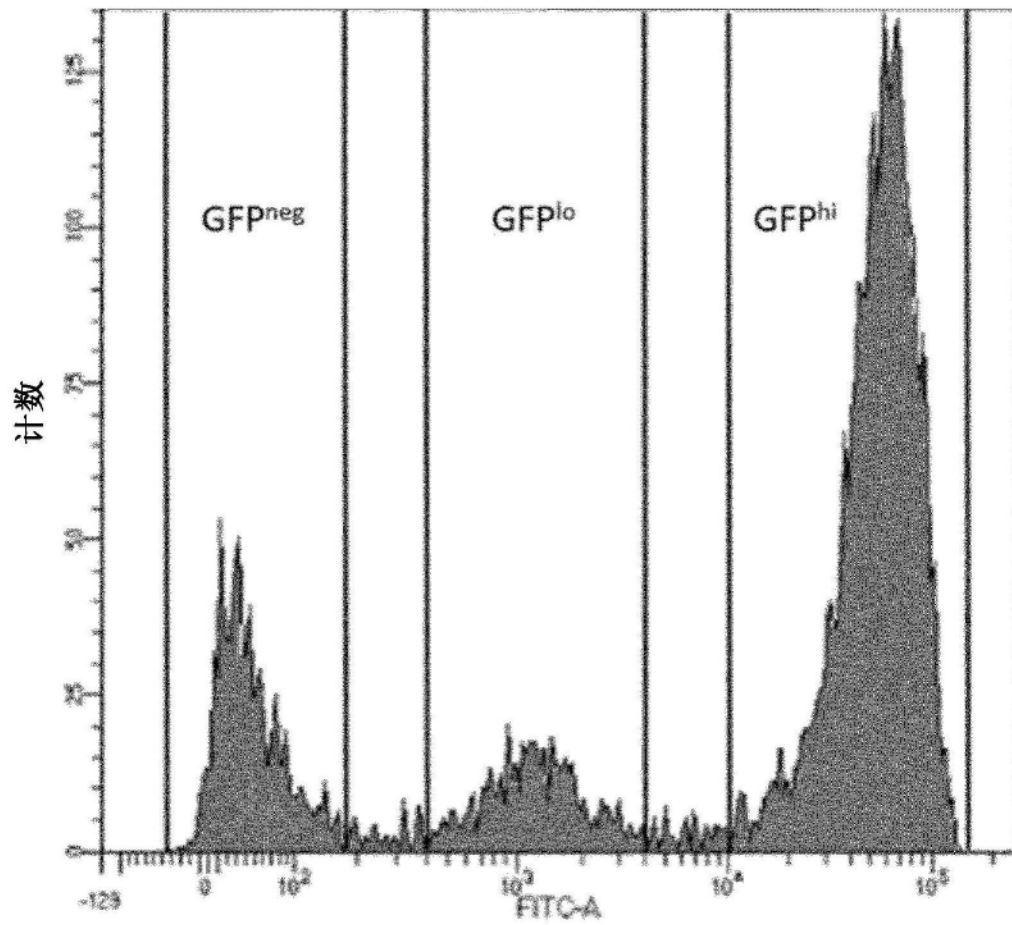


图8

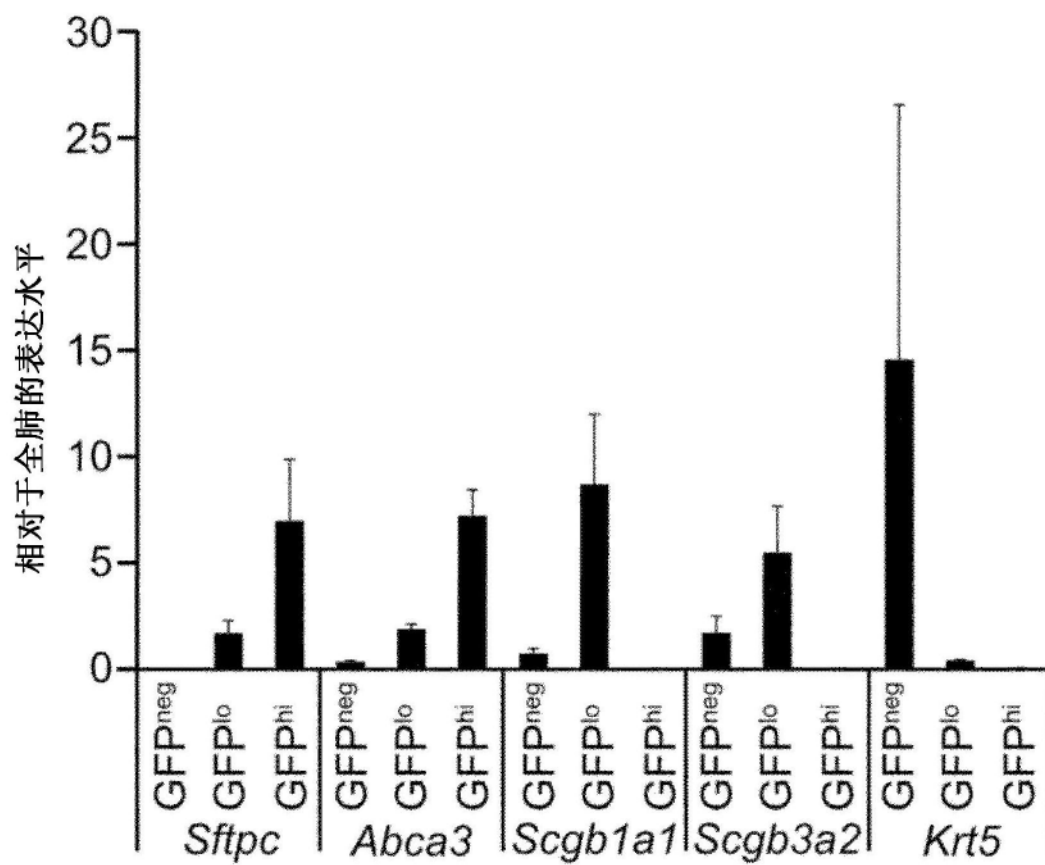


图9

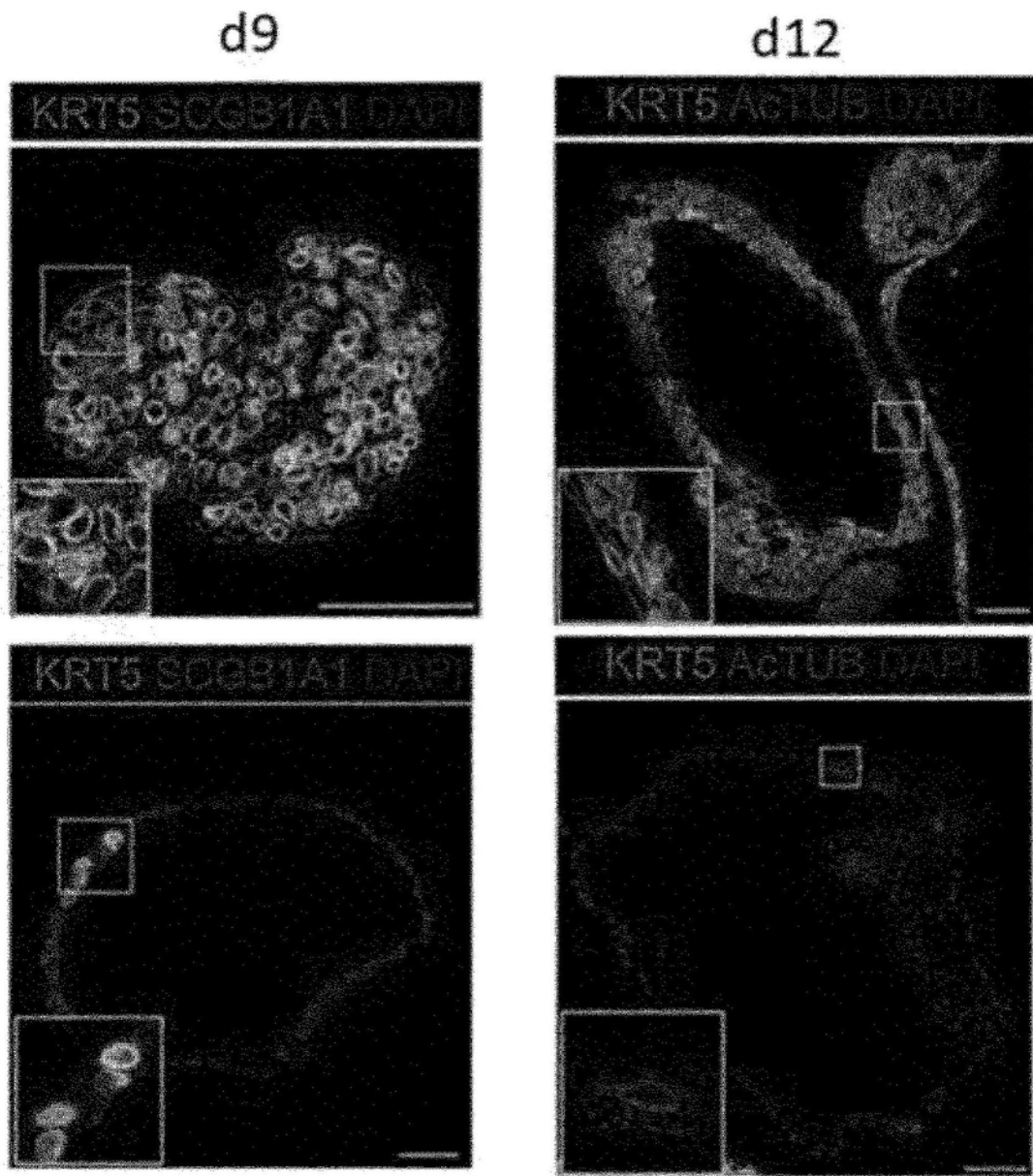


图10

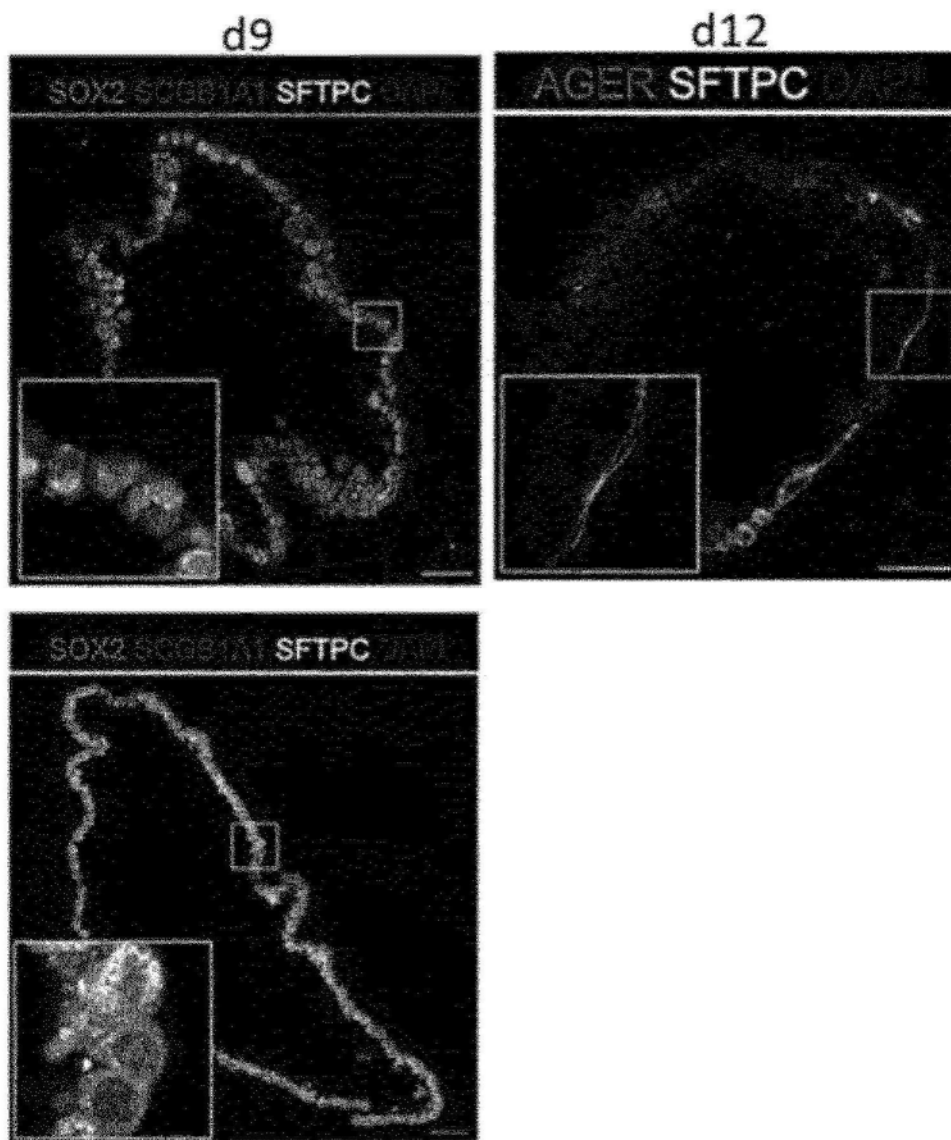


图11

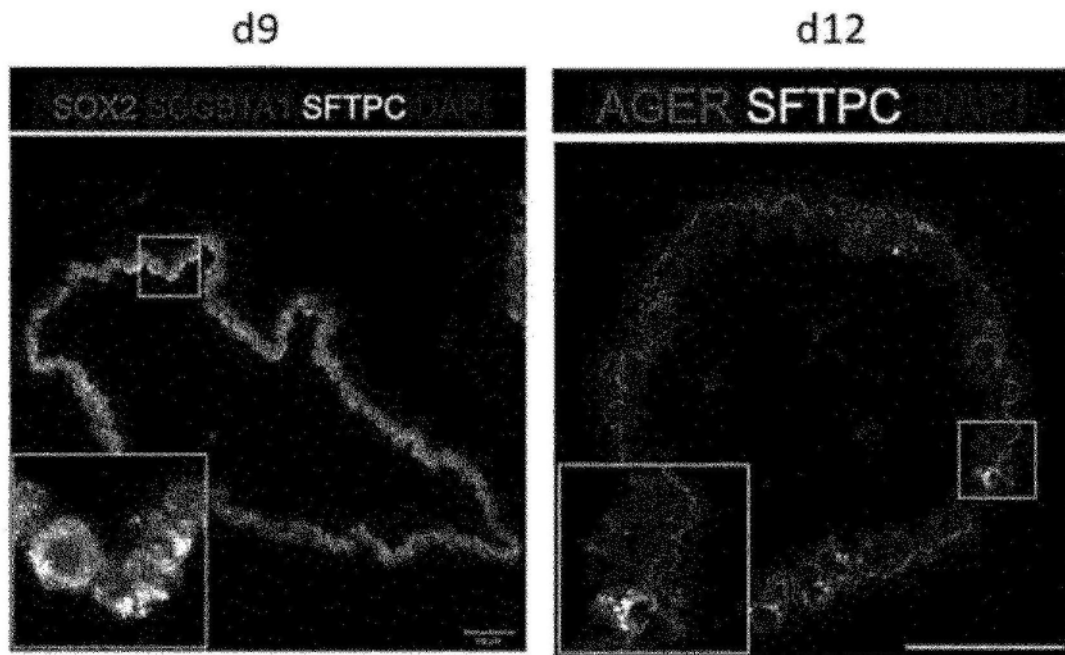


图12

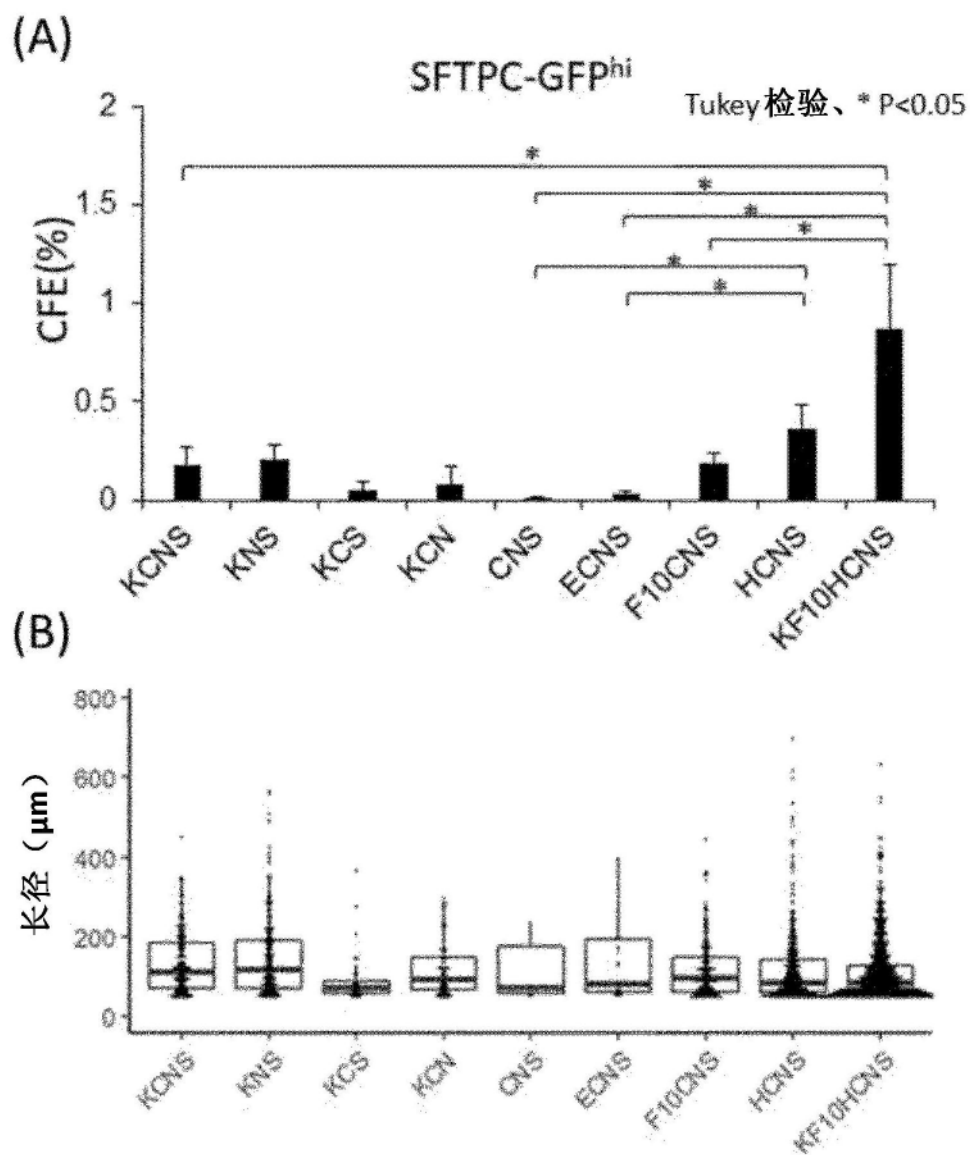


图13

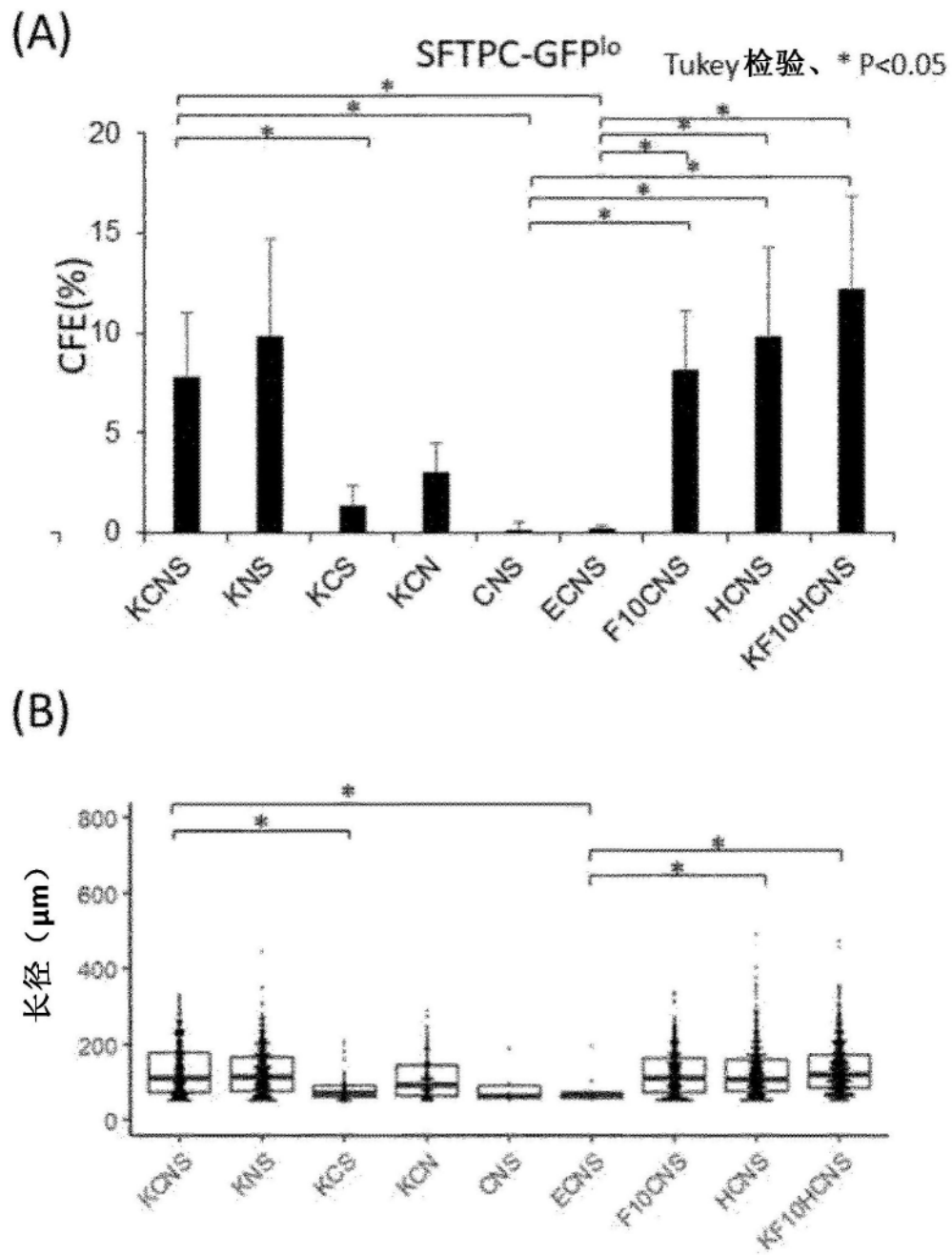


图14

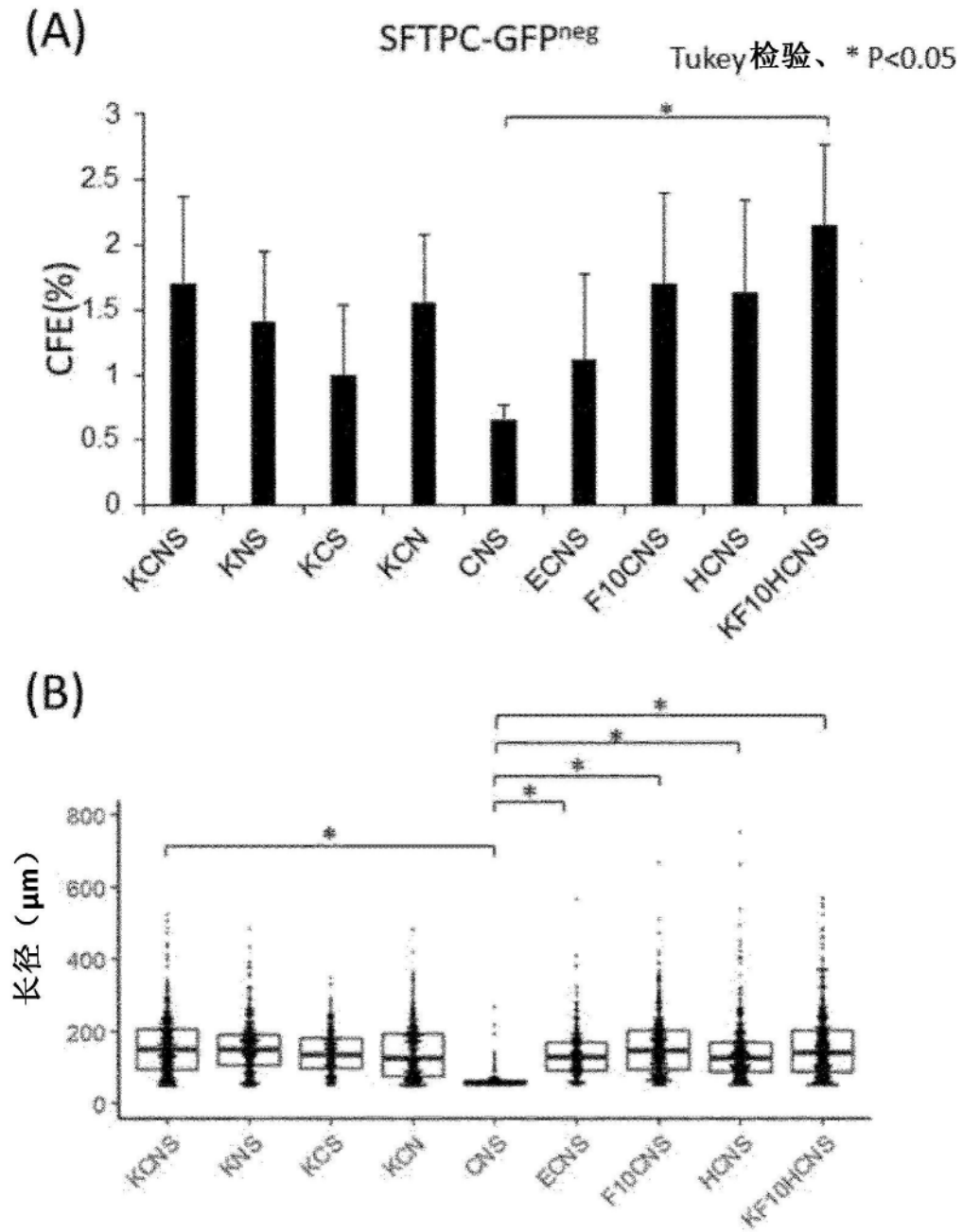


图15

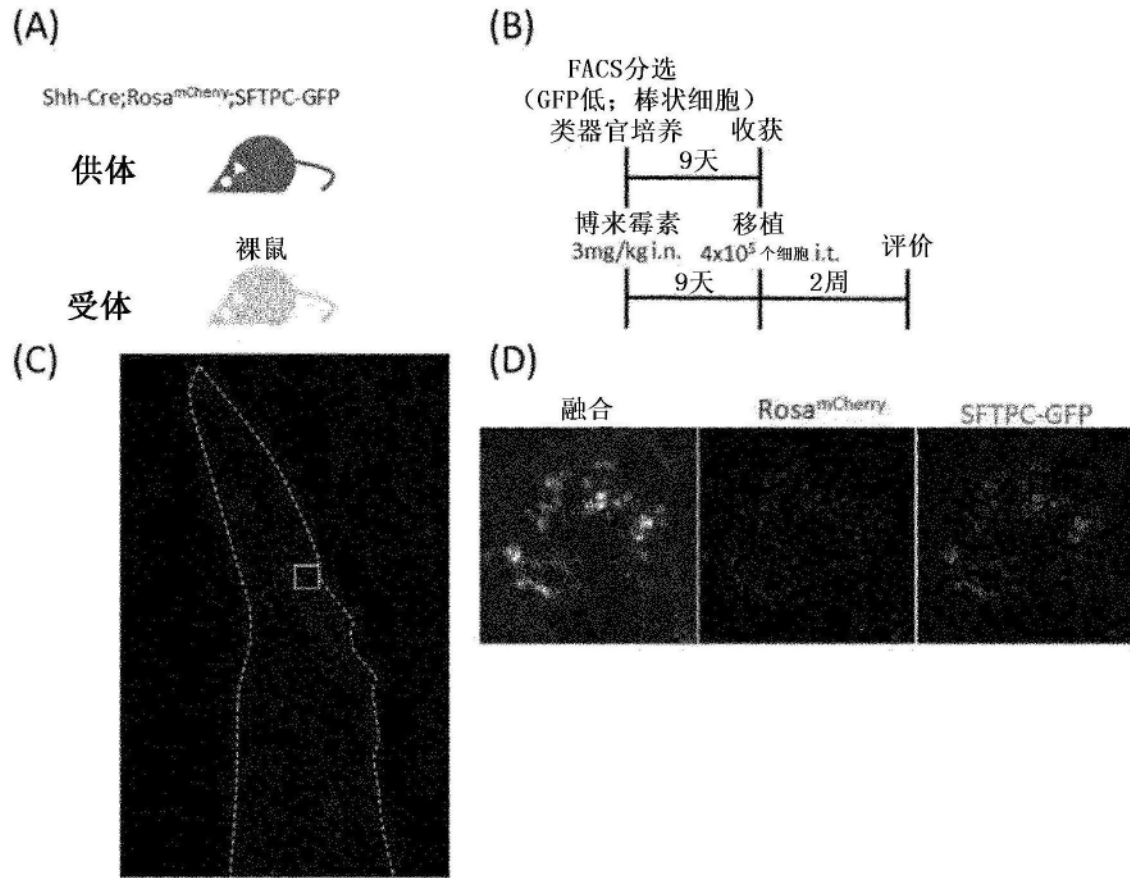


图16

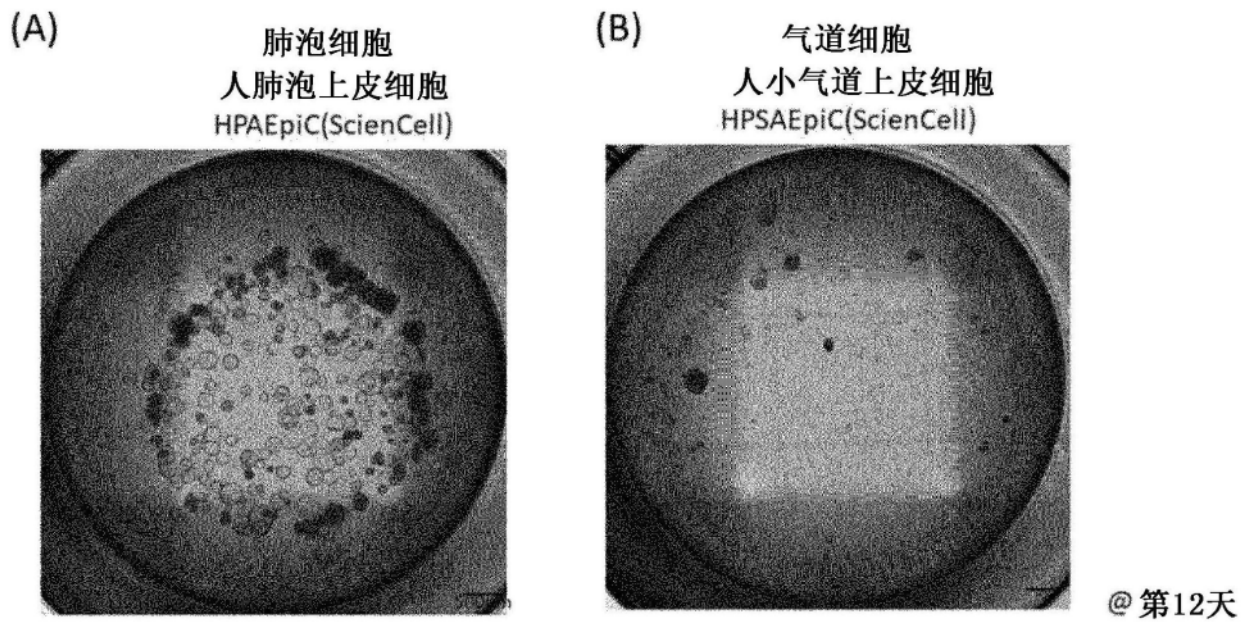


图17

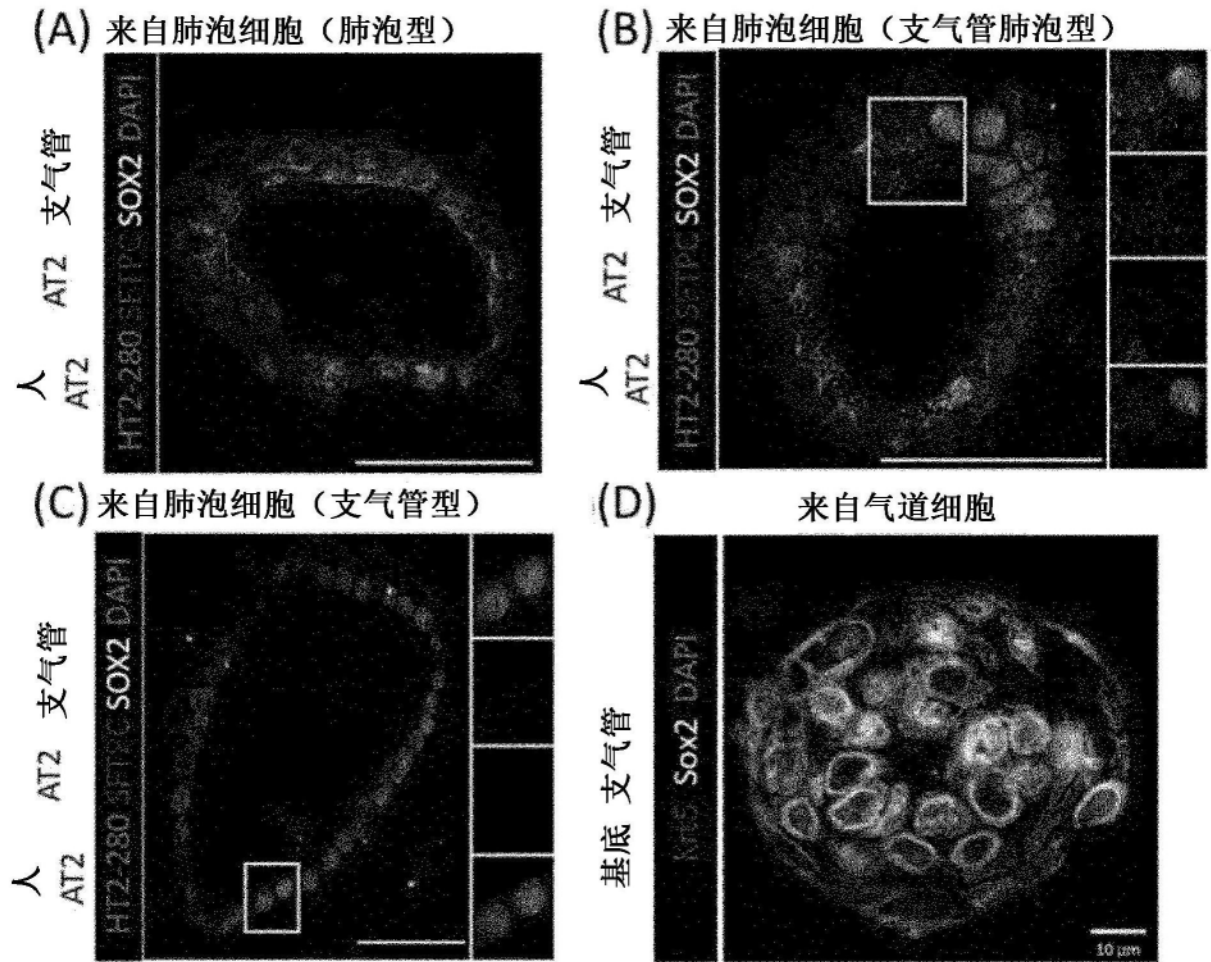


图18

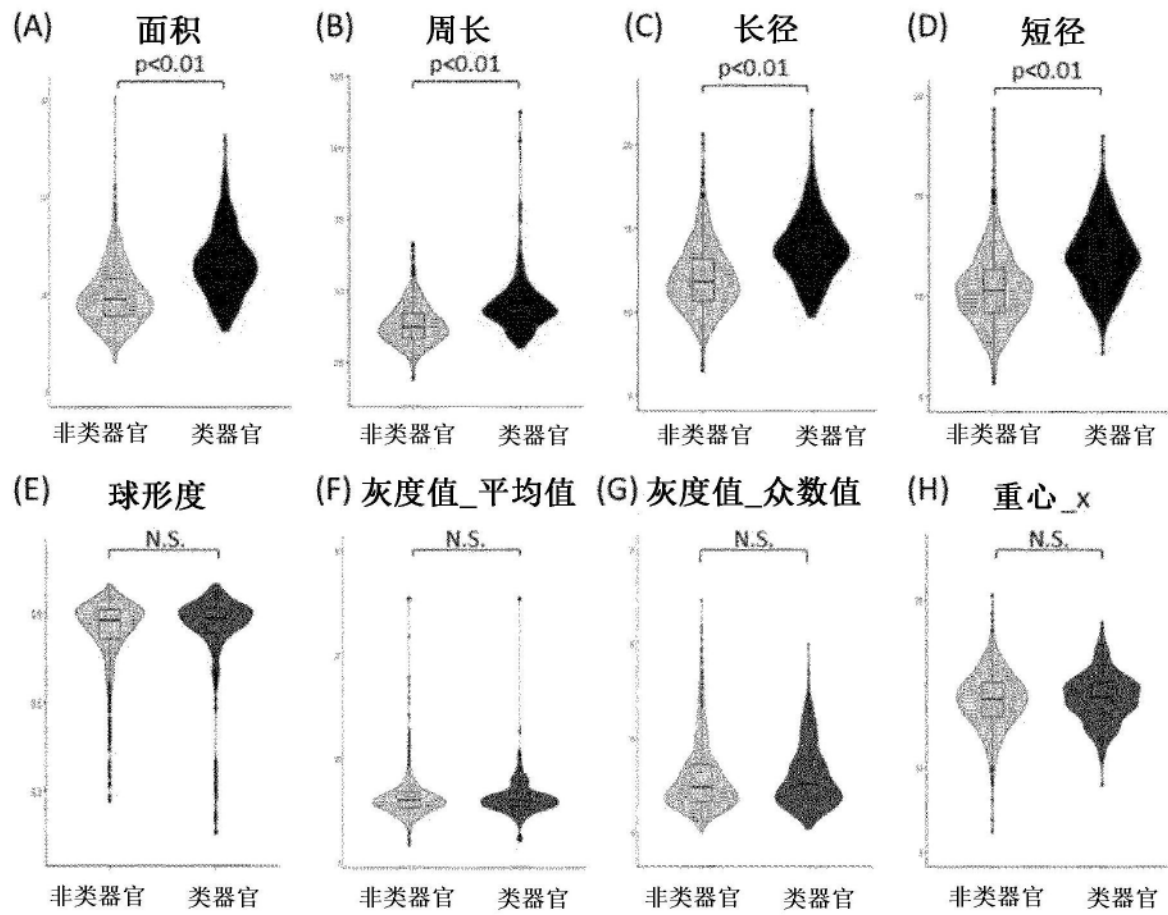


图19

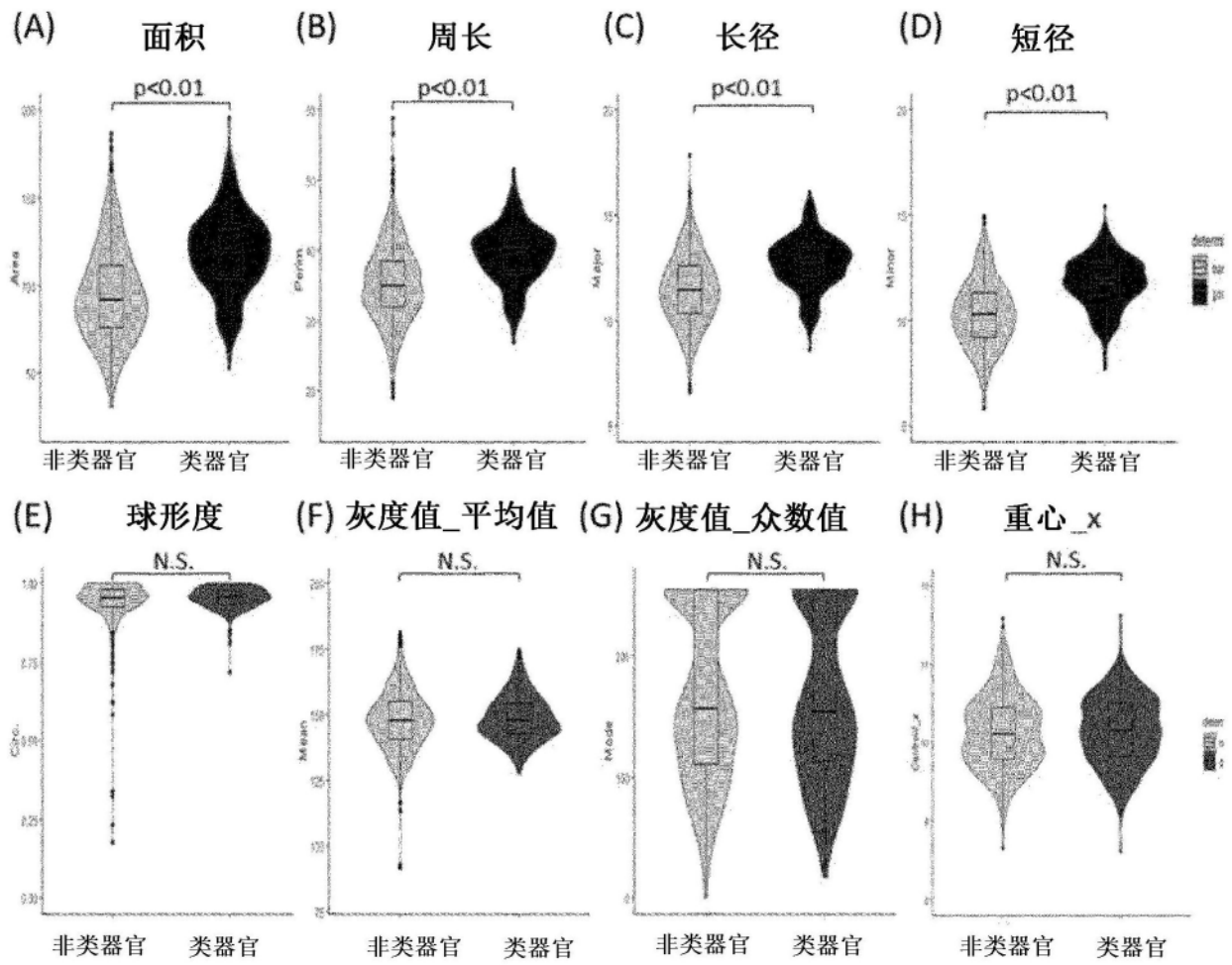


图20

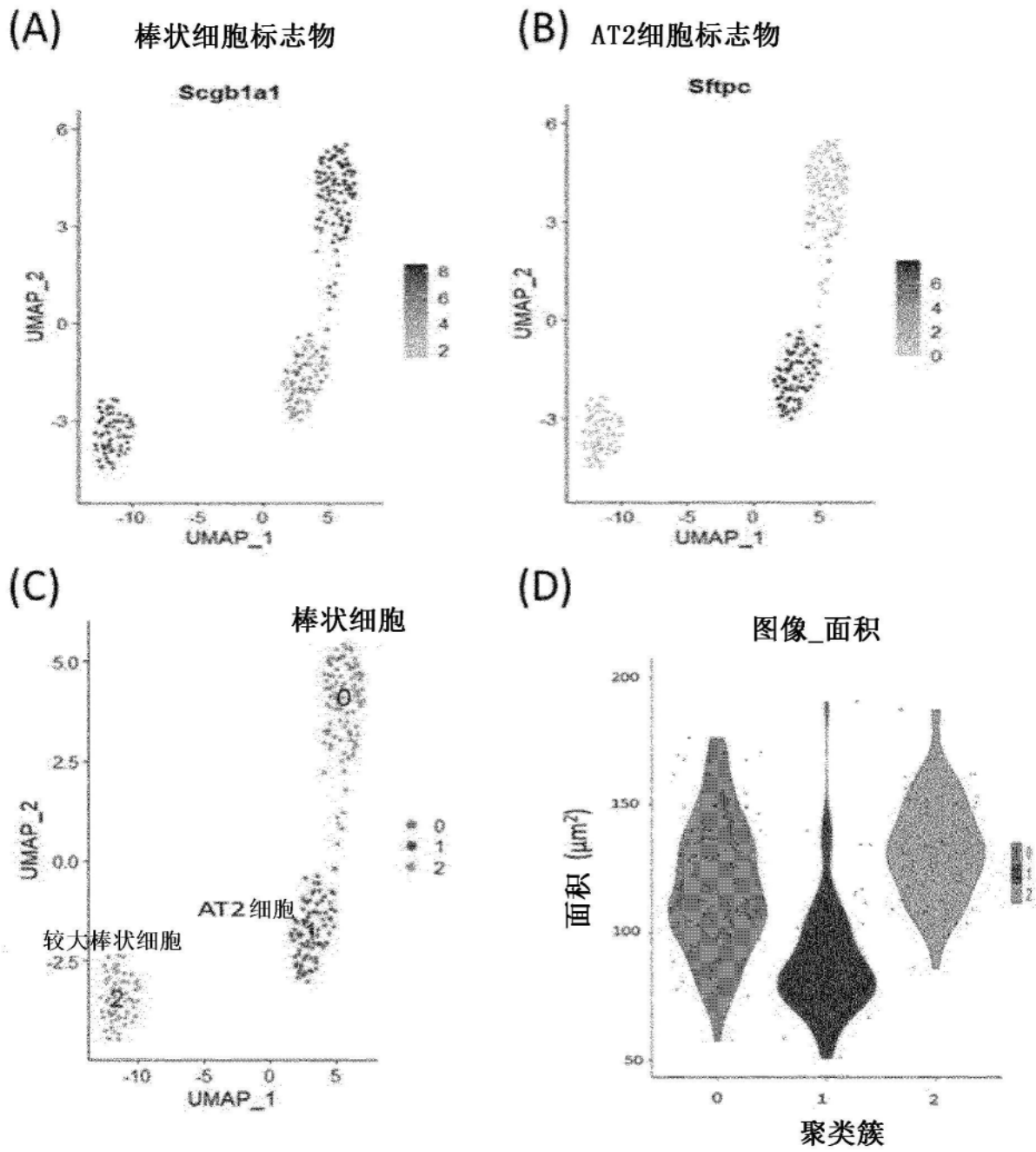


图21

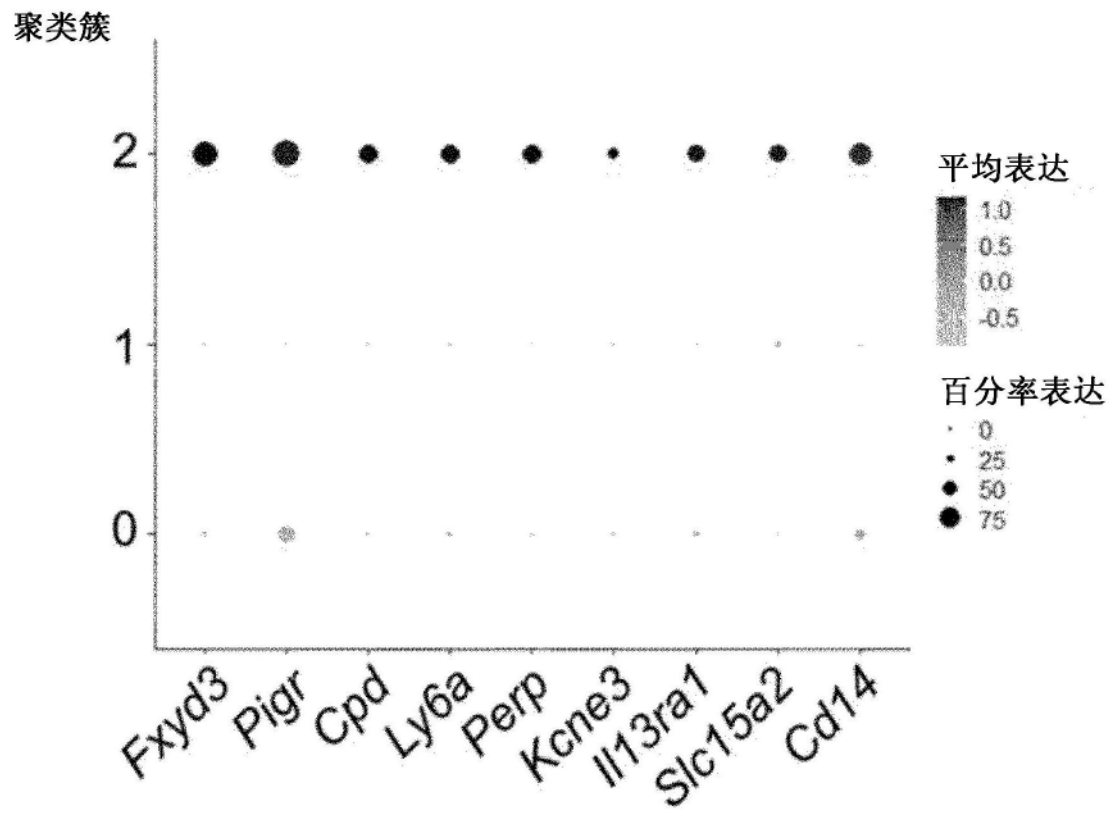


图22

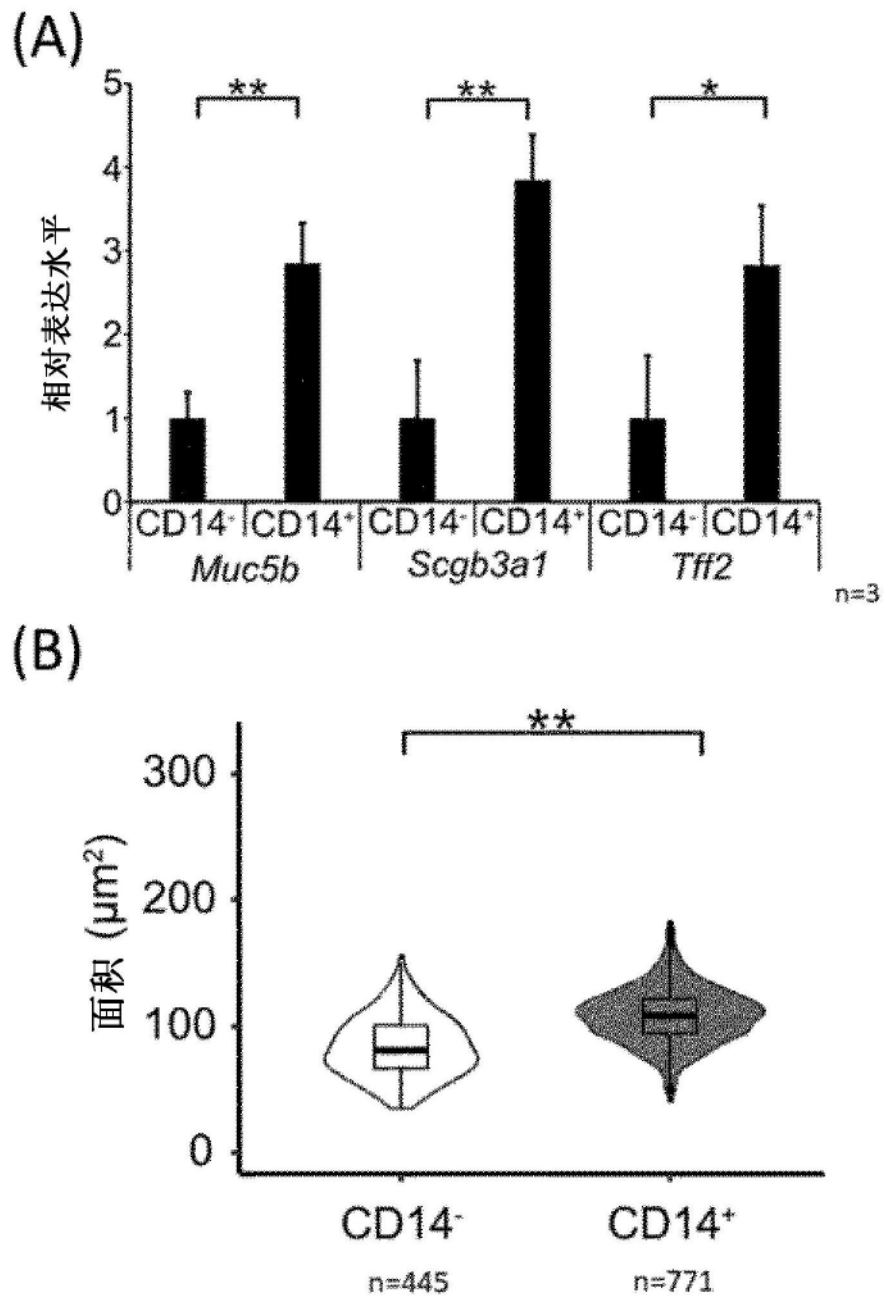


图23

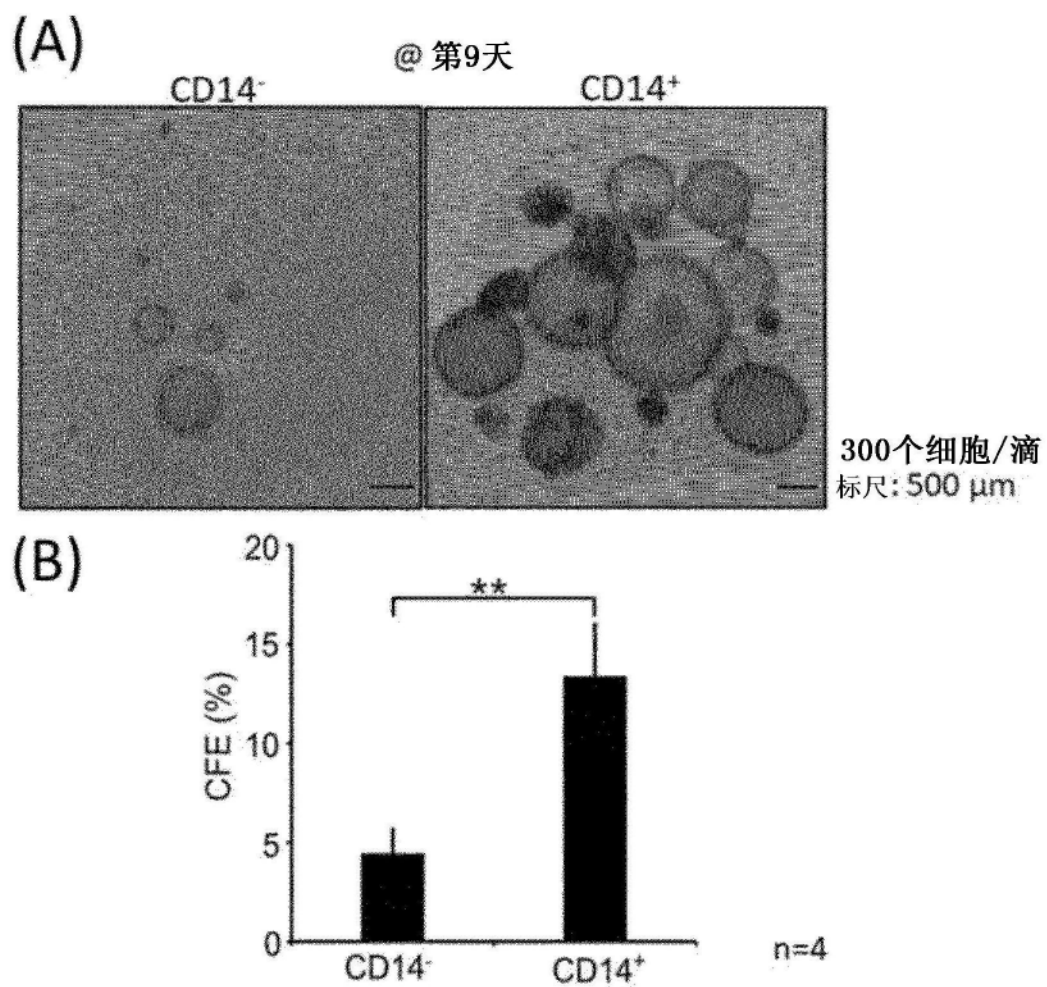


图24

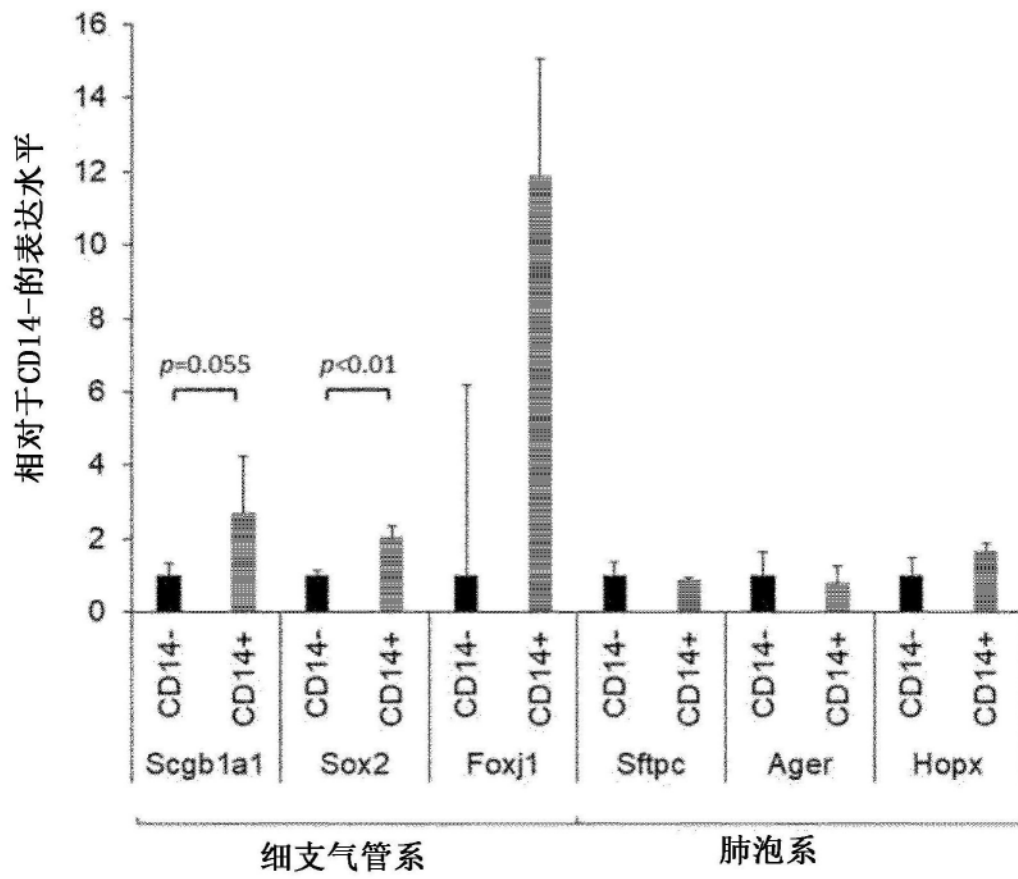


图25

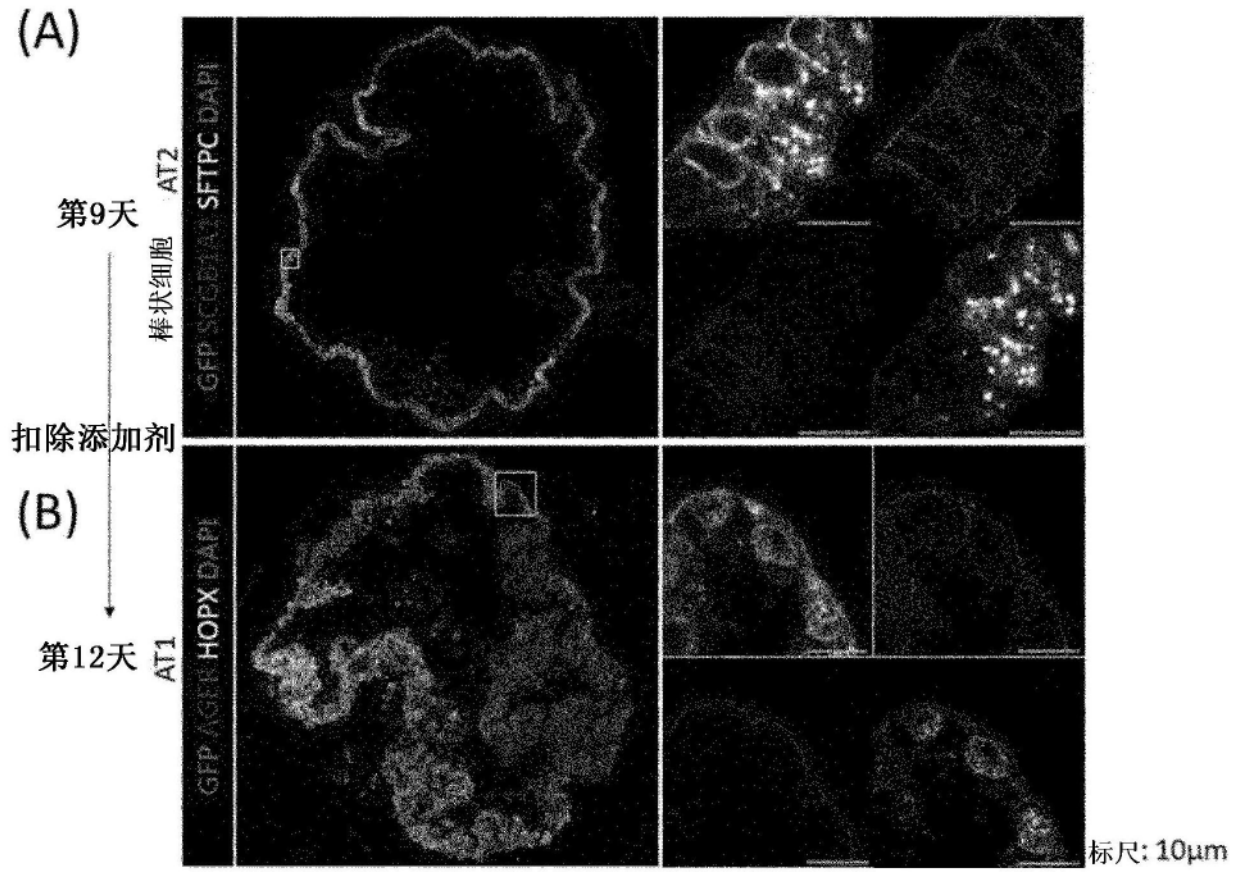


图26

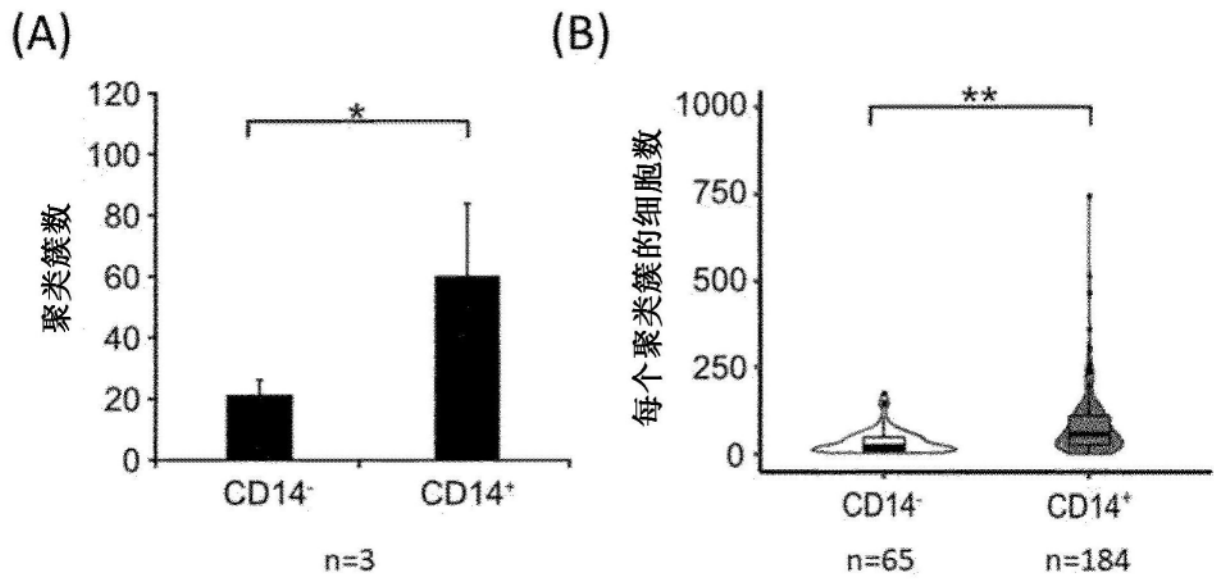


图27

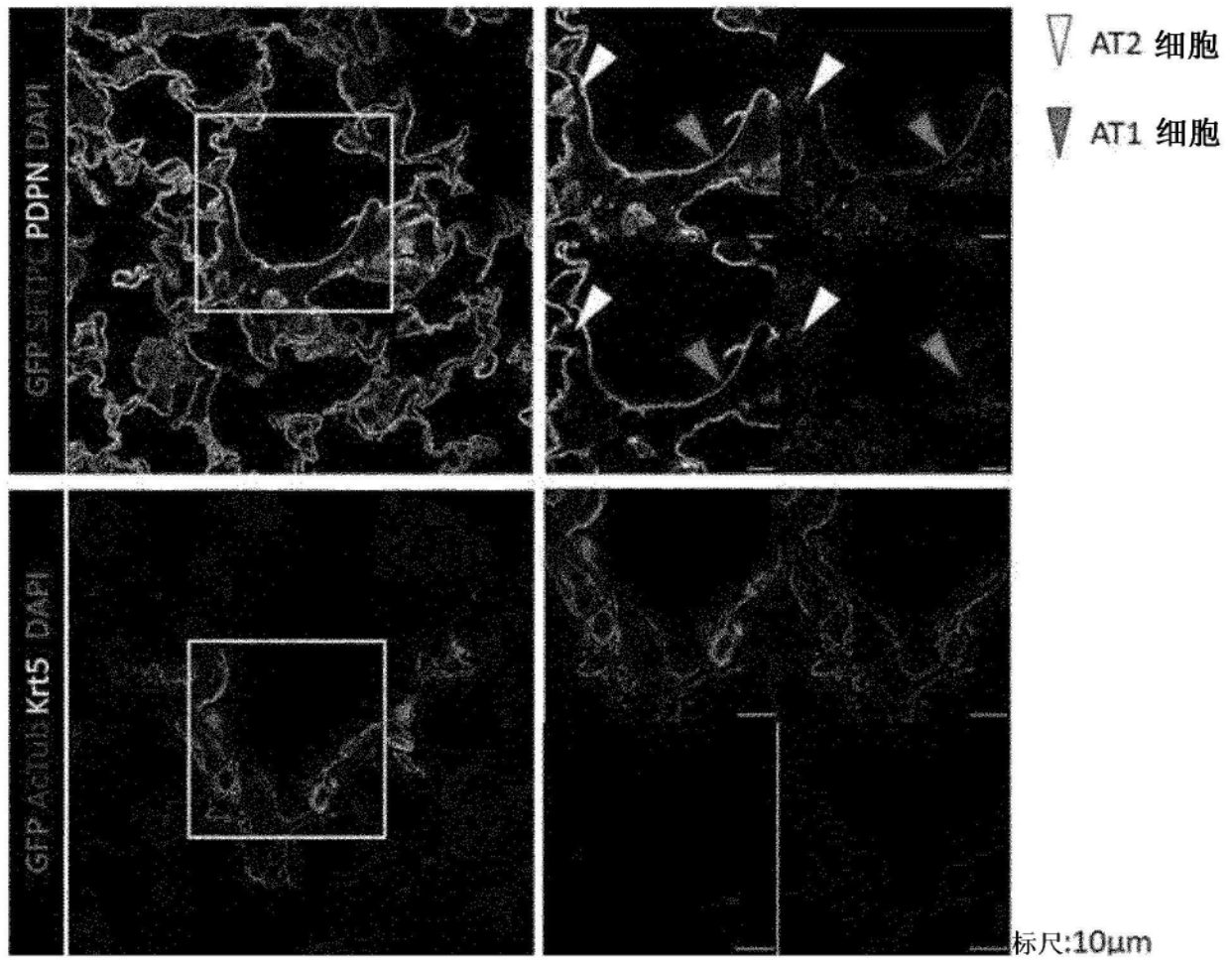


图28

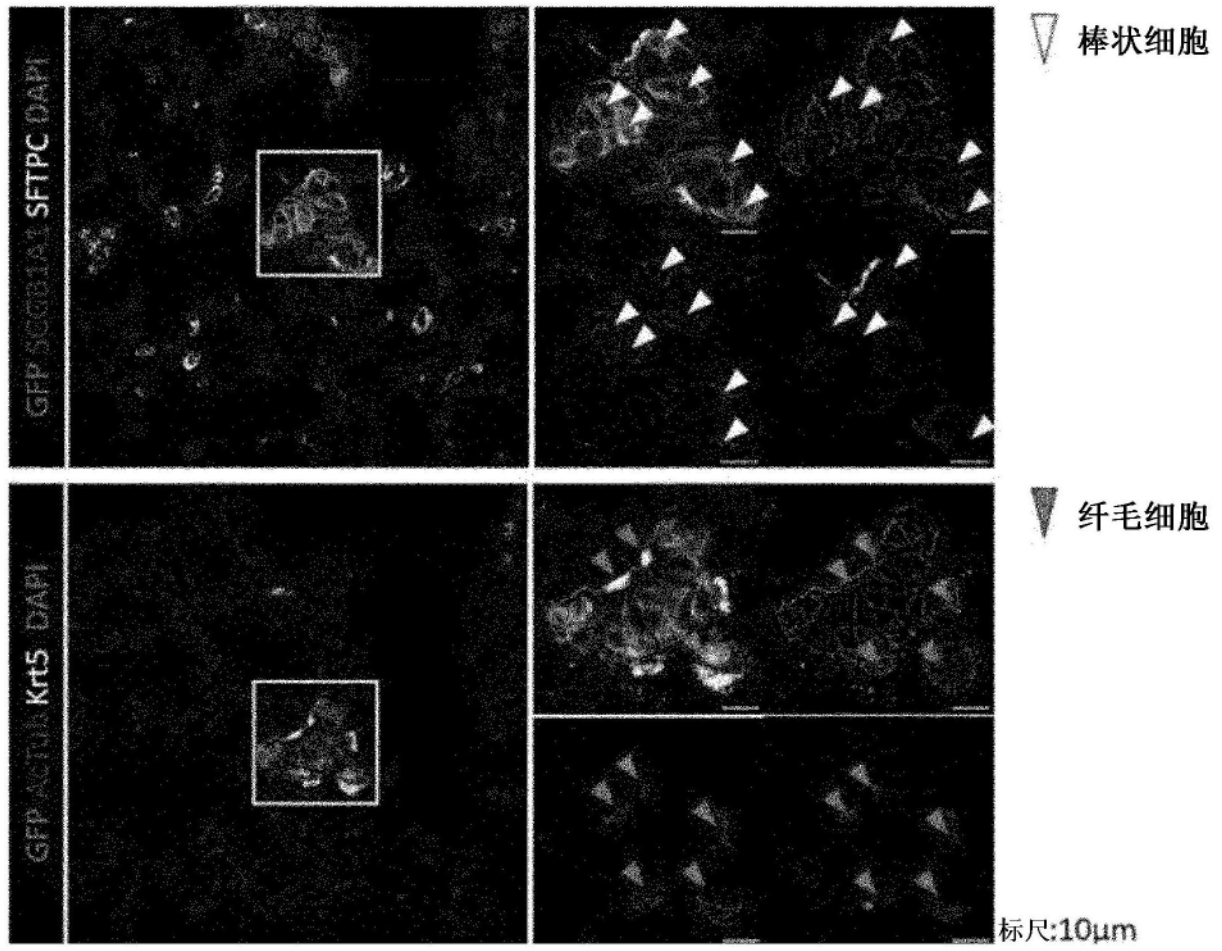


图29