

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-522642

(P2024-522642A)

(43)公表日 令和6年6月21日(2024.6.21)

(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 6 3	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 B 0 6 5	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 C 0 8 6	
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	4 C 0 8 7	Z
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	1 0 1	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-576018(P2023-576018)	(71)出願人	500469235
(86)(22)出願日	令和4年6月10日(2022.6.10)		チルドレンズ ホスピタル メディカル
(85)翻訳文提出日	令和5年12月30日(2023.12.30)		センター
(86)国際出願番号	PCT/US2022/033066		アメリカ合衆国 4 5 2 2 9 - 3 0 3 9
(87)国際公開番号	WO2022/261471		オハイオ州, シンシナティ, バーネット
(87)国際公開日	令和4年12月15日(2022.12.15)		アベニュー 3 3 3 3
(31)優先権主張番号	63/209,908	(74)代理人	100104411
(32)優先日	令和3年6月11日(2021.6.11)		弁理士 矢口 太郎
(33)優先権主張国・地域又は機関		(72)発明者	武部 貴則
	米国(US)		アメリカ合衆国、4 5 2 2 9 - 3 0 3 9
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		オハイオ州, シンシナティ、3 3 3 3
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		バーネット アベニュー、エムエルシー
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		7 0 3 2、シー/オー チルドレンズ ホ
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		スピタル メディカル センター
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(72)発明者	レザ、ハッサン、アル
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高ビリルビン血症のための肝臓オルガノイドモデル及びその作製方法及び使用方法

(57)【要約】

本明細書では、ビリルビンなどのヘモグロビン代謝産物を使用して多能性幹細胞由来肝臓オルガノイドを成熟させる改善された方法が開示される。更に、使用されるビリルビンの量を調節することによって、肝臓オルガノイドを高ビリルビン血症のモデルとして使用することができる。これらの肝臓オルガノイドのスケラビリティ及び扱いやすさは、それらを高ビリルビン血症等の疾患に対する薬物スクリーニングのための優れた標的にした。また、本明細書では、ビリルビン処理された肝臓オルガノイドの生存率を改善するための外因性L-グルノラクトンオキシダーゼの使用も示されている。

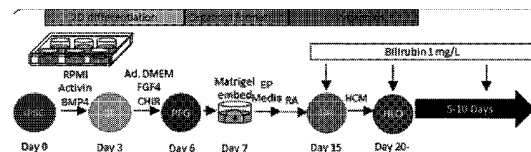


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

胎児様肝臓オルガノイドを低／第 1 濃度のビリルビンと接触させ、それによって前記胎児様肝臓オルガノイドを成熟肝臓オルガノイドに成熟させることを含む、胎児様肝臓オルガノイドを成熟させる方法。

【請求項 2】

ビリルビンの前記低／第 1 濃度が、ビリルビンのヒト胎児生理学的濃度である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ビリルビンの低／第 1 濃度が、

0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75 若しくは 3.0 mg/L であるか、約それらであるか、それら未満であるか、若しくは約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、0.1～3 mg/L、0.5～2.0 mg/L、0.5～1.5 mg/L、0.3～2.5 mg/L、若しくは 0.5～1.75 mg/L、あるいは

0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、若しくは 1 mg/L であるか、約それらであるか、それら未満であるか、若しくは約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば 0.1～1 mg/L、0.1～0.5 mg/L、0.5～1 mg/L、0.3～0.7 mg/L、若しくは 0.4～0.6 mg/L である、

請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記成熟肝臓オルガノイドが、毛細胆管に類似する管腔突起を示す、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイドと比較して、低レベルの AFP、CDX2、NANOG、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイドと比較して高レベルの ALB、SLC4A2、若しくは H O-1、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記成熟肝臓オルガノイドが、CYP2E1、CYP7A1、PROX1、MRP3、MRP3、若しくは OATP2、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイドと比較して増加した CYP3A4 及び CYP1A2 活性を示す、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記成熟肝臓オルガノイドが、機能性 GULO タンパク質、及び／又は機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、それによって成熟肝臓オルガノイドがアスコルビン酸を合成することができる、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記機能性 GULO タンパク質がマウス GULO (mGULO) である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘

10

20

30

40

50

導系を用いて条件付きで発現される、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記成熟肝臓オルガノイドが、CRISPRを用いて、前記機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子で操作される、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方が、トランスフェクションによって前記成熟肝臓オルガノイドに導入される、請求項 9～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのNRF2を発現する、請求項 9～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中又はアスコルビン酸の非存在下で培養された場合、前記胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのIL1B、IL6、若しくはTNFα、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、請求項 9～14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、低いカスパーゼ-3 活性を示す、請求項 9～15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのALBを発現する、請求項 9～16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、門脈周囲肝組織に類似し、門脈周囲肝臓マーカーを発現する、請求項 9～17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記門脈周囲マーカーが、FAH、ALB、PAH、CPS1、HGD、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、増加したCYP3A4及びCYP1A2 活性を示す、請求項 9～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して増加したビリルビン抱合活性を示す、請求項 9～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記機能性GULOタンパク質を含む前記成熟肝臓オルガノイドが、前記胎児様肝臓オルガノイド又は前記機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、培養において増加した生存率を示す、請求項 9～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記胎児様肝臓オルガノイドを、肝細胞培養培地中で前記低／第1濃度のビリルビンと接触させる、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

前記肝細胞培養培地が、肝細胞増殖因子、オンコスタチンM、デキサメタゾン、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記成熟肝臓オルガノイドがヒトである、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記成熟肝臓オルガノイドが不活性 UGT1A1 遺伝子を含み、前記成熟肝臓オルガノイドがクリグラー・ナジャー症候群のモデルである、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記胎児様肝臓オルガノイドが、多能性幹細胞、任意選択で胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞から分化されている、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記多能性幹細胞が、機能性 GULO タンパク質及び／又は前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、それによって前記多能性幹細胞がアスコルビン酸を合成することができる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記胎児様肝臓オルガノイドが、

a) 第 1 の期間、胚体内胚葉細胞 (DE) を FGF シグナル伝達経路活性化因子及び Wnt シグナル伝達経路活性化因子と接触させるステップ、

b) ステップ a) の前記細胞を第 2 の期間、前記 FGF シグナル伝達経路活性化因子、前記 Wnt シグナル伝達経路活性化因子、及びレチノイン酸 (RA) シグナル伝達経路活性化因子と接触させ、それによって前記 DE を後部前腸細胞に分化させるステップ、及び

c) 前記後部前腸細胞を基底膜マトリックスに埋め込み、前記後部前腸スフェロイドを第 3 の期間培養して、前記後部前腸細胞を前記胎児様肝臓オルガノイドに分化させるステップと、を含む方法に従って作製された、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

肝臓オルガノイドを高／第 2 濃度のビリルビンと接触させ、それによって高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを形成することを含む、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを産生する方法。

【請求項 31】

ビリルビンの前記高／第 2 濃度が、

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは 20 mg/L であるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超である、又は前述の濃度のいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、2～20 mg/L、2～10 mg/L、10～20 mg/L、5～15 mg/L、若しくは 8～12 mg/L、又は

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは 20 mg/L であるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超である、又は前述の濃度のいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、4～20 mg/L、2～10 mg/L、10～20 mg/L、5～15 mg/L、若しくは 8～12 mg/L である、

請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、高／第 2 濃度のビリルビンで処理されていない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルの UGT1A1 若しくは NRF2、又はその両方を発現する、請求項 30 又は 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドをグルココルチコイドアンタゴニストと接触さ

10

20

30

40

50

せて、前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症を低減することを更に含む、請求項 30～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを前記グルココルチコイドアンタゴニストと接触させることが、前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドにおける UGT1A1 及び NRF2 の発現を増加させ、ビリルビン抱合活性を増加させる、請求項 30～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記グルココルチコイドアンタゴニストが、ケトコナゾール、ミフェプリストン、若しくはその両方であるか、又はケトコナゾール、ミフェプリストン、メチラポン、アミノグルテチミド、若しくはそれらの任意の組み合わせである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、機能性 GULO タンパク質及び／又は前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドがアスコルビン酸を合成することができる、請求項 30～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記機能性 GULO タンパク質が mGULO である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘導系を使用して条件付きで発現される、請求項 36 又は 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが不活性 UGT1A1 遺伝子を含み、前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドがクリグラー・ナジャー症候群のモデルである、請求項 30～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

それを必要とする対象において高ビリルビン血症を治療する方法であって、それを必要とする前記対象にグルココルチコイドアンタゴニストを投与することを含み、任意選択で前記グルココルチコイドアンタゴニストが、ケトコナゾール、ミフェプリストン、若しくはその両方であるか、又はケトコナゾール、ミフェプリストン、メチラポン、アミノグルテチミド、若しくはそれらの任意の組み合わせである、方法。

【請求項 41】

請求項 1～29 のいずれか一項に記載の方法によって作製された、成熟肝臓オルガノイド。

【請求項 42】

請求項 30～39 のいずれか一項に記載の方法によって作製された、高ビリルビン血症肝臓オルガノイド。

【請求項 43】

機能性 GULO タンパク質、及び／又は前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、それによってアスコルビン酸を合成することができる肝臓オルガノイド。

【請求項 44】

前記機能性 GULO タンパク質が mGULO である、請求項 43 に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 45】

前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘導系を使用して条件付きで発現される、請求項 43 又は 44 に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 46】

前記肝臓オルガノイドが、CRISPR を用いて機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子で操作される、請求項 43～45 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

10

20

30

40

50

【請求項 47】

前記機能性 G U L O タンパク質をコードする遺伝子若しくは m R N A、又はその両方が、トランスフェクションによって前記成熟肝臓オルガノイドに導入される、請求項 43～46 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 48】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルの N R F 2 を発現する、請求項 43～47 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 49】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、低レベルの I L 1 B、I L 6、若しくは T N F α、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、請求項 43～48 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

10

【請求項 50】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して減少したカスパーゼ-3 活性を示す、請求項 43～49 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 51】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルの A L B を発現する、請求項 43～50 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

20

【請求項 52】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、門脈周囲肝組織に類似し、門脈周囲肝臓マーカーを発現する、請求項 43～51 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 53】

前記門脈周囲マーカーが、F A H、A L B、P A H、C P S 1、H G D、及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択され、任意選択で、前記マーカーが、F A H、A L B、P A H、C P S 1、及び H G D を含む、請求項 52 に記載の肝臓オルガノイド。

30

【請求項 54】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、増加した C Y P 3 A 4 及び C Y P 1 A 2 活性を示す、請求項 43～53 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 55】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して増加したビリルビン抱合活性を示す、請求項 43～54 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 56】

前記機能性 G U L O タンパク質を含む前記肝臓オルガノイドが、前記機能性 G U L O タンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、培養において増加した生存率を示す、請求項 43～55 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

40

【請求項 57】

前記肝臓オルガノイドがヒトである、請求項 43～56 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 58】

前記肝臓オルガノイドが不活性 U G T 1 A 1 遺伝子を含み、前記肝臓オルガノイドがクリグラー・ナジャー症候群のモデルである、請求項 43～57 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 59】

50

前記肝臓オルガノイドが、多能性幹細胞、任意選択で胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞から分化されている、請求項 43～58 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 60】

前記多能性幹細胞が、前記機能性 GULO タンパク質、及び／又は前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方で操作されており、それによって前記多能性幹細胞がアスコルビン酸を合成することができる、請求項 59 に記載の肝臓オルガノイド。

【請求項 61】

肝細胞であって、機能性 GULO タンパク質、及び／又は前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、それによって前記肝細胞がアスコルビン酸を合成することができる、肝細胞。

10

【請求項 62】

前記機能性 GULO タンパク質が mGULO である、請求項 61 に記載の肝細胞。

【請求項 63】

前記機能性 GULO タンパク質をコードする前記遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘導系を用いて条件付きで発現される、請求項 61 又は 62 に記載の肝細胞。

【請求項 64】

前記幹細胞が、CRISPR を用いて前記機能性 GULO タンパク質をコードする前記遺伝子で操作される、請求項 61～63 のいずれか一項に記載の肝細胞。

【請求項 65】

前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方が、トランスフェクションによって前記肝細胞に導入される、請求項 61～64 のいずれか一項に記載の肝細胞。

20

【請求項 66】

機能性 GULO タンパク質及び／又は前記機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を発現させ、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができることを含む、前記肝細胞におけるビリルビン抱合及び代謝を増加させる方法。

【請求項 67】

高ビリルビン血症の治療用の化合物又は組成物をスクリーニングする方法であって、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを前記化合物又は組成物と接触させること、及び高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症の改善を検出することを含む、方法。

30

【請求項 68】

前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、請求項 42 に記載の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドであり、前記高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、機能性 GULO タンパク質、及び／又は機能性又は機能的 CULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を任意選択で含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記改善を検出することが、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、UGT1A1 若しくは NRF2、又はその両方の発現の増加を検出することを含む、請求項 67 又は 68 に記載の方法。

40

【請求項 70】

改善を検出することが、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、非抱合型ビリルビンに対する抱合型ビリルビンの相対的増加を検出することを含む、請求項 67～69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害を有する対象を治療する方法であって、請求項 43～60 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド又は請求項 61～65 のいずれか一項に記載の肝細胞を前記対象に投与することを含む、方法。

50

【請求項 7 2】

ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療のための薬物の製造における使用のための、請求項 4 3～6 0 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド又は請求項 6 1～6 5 のいずれか一項に記載の肝細胞。

【請求項 7 3】

それを必要とする対象におけるビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療における使用のための、請求項 4 3～6 0 のいずれか一項に記載の肝臓オルガノイド又は請求項 6 1～6 5 のいずれか一項に記載の肝細胞。

【請求項 7 4】

ビリルビン代謝に関連する前記疾患又は障害が、高ビリルビン血症、黄疸、クリグラー・ナジャー症候群、ジルベール症候群、デュビン・ジョンソン症候群、又はローター症候群である、請求項 7 1 に記載の方法又は請求項 7 2 若しくは 7 3 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(連邦政府が後援する研究開発に関する声明)

本発明は、国立衛生研究所によって授与された D K 1 2 8 7 9 9 - 0 1 の下で政府の支援を得てなされた。政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本開示の態様は、概して、肝臓オルガノイド、及び肝臓オルガノイドを非胎児状態に類似するように成熟させる改善された方法に関する。更なる態様は、高ビリルビン血症モデルの生成に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

高ビリルビン血症及び関連する黄疸は、ヘム異化の天然産物であるビリルビンのレベル上昇の状態である。ビリルビンは、肝臓によって血液から濾過され、水溶性中間体に変換され、次いで、胆汁中で腸管に放出され、微生物叢によって代謝され、老廃物として排泄される。新生児では、元来胎盤を通して母親によって除去されたビリルビン値は、未熟な肝臓によって適切に除去されない可能性がある。過剰レベルのビリルビンは、重篤な神経学的損傷 (k e r n i c t e r u s) を引き起こしてもよい。成人では、高ビリルビン血症はまた、肝炎及び肝硬変等の肝臓に影響を及ぼす疾患に起因してもよい。新生児高ビリルビン血症は、光線療法によって、又は極端な場合には輸血によって治療されるが、成人での治療は根本的な原因に向けられる。高ビリルビン血症のための更なる治療及びこの状態を研究するためのモデルが依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0 0 0 4】

本明細書では、胎児様肝臓オルガノイドを成熟させる方法が開示される。いくつかの実施形態では、方法は、胎児様肝臓オルガノイドを低／第 1 濃度のビリルビンと接触させ、それによって胎児様肝臓オルガノイドを成熟肝臓オルガノイドに成熟させることを含む。いくつかの実施形態では、ビリルビンの低／第 1 の濃度は、ビリルビンのヒト胎児生理学的濃度である。

【0 0 0 5】

また、本明細書では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの産生方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、肝臓オルガノイドを高／第 2 濃度のビリルビンと接触させ、それによって高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを形成することを含む。

【0 0 0 6】

本明細書では、それを必要とする対象における高ビリルビン血症の治療方法も開示される。いくつかの実施形態において、方法は、グルココルチコイドアンタゴニストを、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0007】

本明細書では、本明細書に開示される方法によって作製されるものなどの、本明細書に開示される成熟肝臓オルガノイド組成物も開示される。

【0008】

本明細書では、本明細書に開示される方法によって作製されるものなどの、本明細書に開示される高ビリルビン血症肝臓オルガノイド組成物も開示される。

【0009】

また、本明細書では、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって肝臓オルガノイドがアスコルビン酸を合成することができる肝臓オルガノイドが開示される。

10

【0010】

また、本明細書では、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができる肝細胞が開示される。

【0011】

また、本明細書では、肝細胞におけるビリルビン抱合及び代謝を増加させる方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を発現することを含み、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができる。

【0012】

本明細書では、高ビリルビン血症の治療のための化合物又は組成物をスクリーニングする方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを化合物又は組成物と接触させること、及び高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症の改善を検出することを含む。

20

【0013】

本明細書では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害を有する対象を治療する方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に開示される肝臓オルガノイド又は肝細胞のいずれか1つを対象に投与することを含む。

【0014】

本明細書では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療のための薬物の製造における使用のための、本明細書に開示される肝臓オルガノイド又は肝細胞が開示される。

30

【0015】

本明細書では、それを必要とする対象におけるビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療に使用するための、本明細書に開示される肝臓オルガノイド又は肝細胞が開示される。

【0016】

本開示の例示的な実施形態は、以下の番号が付された実施形態において提供される：

1. 胎児様肝臓オルガノイドを低／第1濃度のビリルビンと接触させ、それによって胎児様肝臓オルガノイドを成熟肝臓オルガノイドに成熟させることを含む、胎児様肝臓オルガノイドを成熟させる方法。

40

2. ビリルビンの低／第1濃度は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75若しくは3.0mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、若しくは約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば0.1~3mg/L、0.5~2.0mg/L、0.5~1.5mg/L、0.3~2.5mg/L、又は0.5~1.75mg/Lである、又は0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、若しくは1mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、若しくは約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば0.1~1mg/L、0.1~0.5mg/L、0.5~1mg/L、0.3~0.7mg/L、

50

若しくは0.4～0.6 mg/Lである、実施形態1に記載の方法。

3. 成熟肝臓オルガノイドが、毛細胆管に類似する管腔突起を示す、実施形態1～2のいずれか1つに記載の方法。

4. 成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのAFP、CDX2、NANOG、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態1～3のいずれか1つに記載の方法。

5. 成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイドと比較して高レベルのALB、SLC4A2、若しくはHO-1、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態1～4のいずれか1つに記載の方法。

6. 成熟肝臓オルガノイドが、CYP2E1、CYP7A1、PROX1、MRP3、MRP3、若しくはOATP2、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態1～5のいずれか1つに記載の方法。

7. 成熟肝臓オルガノイドが、CYP3A4及びCYP1A2活性を示す、実施形態1～6のいずれか1つに記載の方法。

8. 肝臓オルガノイドを高/第2濃度のビリルビンと接触させ、それによって高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを形成することを含む、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを産生する方法。

9. ビリルビンの高/第2の濃度が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20 mg/Lであるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超であるか、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば2～20 mg/L、2～10 mg/L、10～20 mg/L、5～15 mg/L若しくは8～12 mg/L、若しくは4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20 mg/Lであるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超であるか、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば4～20 mg/L、2～10 mg/L、10～20 mg/L、5～15 mg/L、若しくは8～12 mg/Lである、実施形態8に記載の方法。

10. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、高/第2濃度のビリルビンで処理されていない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのUGT1A1若しくはNRF2、又はその両方を発現する、実施形態8又は9に記載の方法。

11. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドをケトコナゾール若しくはミフェプリストン、又はその両方と接触させて、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症を低減することを更に含む、実施形態8～10のいずれか1つに記載の方法。

12. それを必要とする対象の高ビリルビン血症を治療する方法であって、ケトコナゾール若しくはミフェプリストン、又はその両方をそれを必要とする対象に投与することを含む方法。

13. 実施形態1～7のいずれか1つに記載の成熟肝臓オルガノイド。

14. 実施形態8～11のいずれか1つに記載の高ビリルビン血症肝臓オルガノイド。

15. 機能性L-グルノラクトンオキシダーゼ(GULO)遺伝子を含む肝臓オルガノイド。

16. 機能性GULO遺伝子がマウスGULO(mGULO)遺伝子である、実施形態15に記載の肝臓オルガノイド。

17. 機能性GULO遺伝子を含む肝細胞。

18. 機能性GULO遺伝子がmGULO遺伝子である、実施形態17に記載の肝細胞。

19. 肝細胞におけるビリルビン抱合及び代謝を増加させる方法であって、肝細胞において機能性GULO遺伝子を発現させることを含む、方法。

20. 高ビリルビン血症の治療用の化合物又は組成物をスクリーニングする方法であって、

高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを化合物又は組成物と接触させること、及び高ビリ

10

20

30

40

50

ルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症の改善を検出することを含む、方法。

21. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、実施形態14に記載の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドであり、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、機能性GULO遺伝子を任意選択で含む、実施形態20に記載の方法。

22. 改善を検出することが、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、UGT1A1若しくはNRF2、又はその両方の発現の増加を検出することを含む、実施形態20又は21に記載の方法。

23. 改善を検出することが、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、非抱合型ビリルビンに対する抱合型ビリルビンの相対的増加を検出することを含む、実施形態20～22のいずれか1つに記載の方法。

【0017】

本開示の更なる例示的な実施形態は、以下の番号が付された実施形態において提供される。

1. 胎児様肝臓オルガノイドを低／第1濃度のビリルビンと接触させ、それによって胎児様肝臓オルガノイドを成熟肝臓オルガノイドに成熟させることを含む、胎児様肝臓オルガノイドを成熟させる方法。

2. ビリルビンの低／第1濃度が、ビリルビンのヒト胎児生理学的濃度である、実施形態1に記載の方法。

3. ビリルビンの低／第1濃度は、

0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75若しくは3.0mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、又は約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、0.1～3mg/L、0.5～2.0mg/L、0.5～1.5mg/L、0.3～2.5mg/L、若しくは0.5～1.75mg/L、あるいは

0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、若しくは1mg/L、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば0.1～1mg/L、

0.1～0.5mg/L、0.5～1mg/L、0.3～0.7mg/L、若しくは0.4～0.6mg/Lである、実施形態1又は2に記載の方法。

4. 成熟肝臓オルガノイドが、毛細胆管に類似する管腔突起を示す、実施形態1～3のいずれか1つに記載の方法。

5. 成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのAFP、CDX2、NANOG、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態1～4のいずれか1つに記載の方法。

6. 成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのALB、SLC4A2、若しくはHO-1、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態1～5のいずれか1つに記載の方法。

7. 成熟肝臓オルガノイドが、CYP2E1、CYP7A1、PROX1、MRP3、MRP3、若しくはOATP2、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態1～6のいずれか1つに記載の方法。

8. 成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイドと比較して増加したCYP3A4及びCYP1A2活性を示す、実施形態1～7のいずれか1つに記載の方法。

9. 成熟肝臓オルガノイドが、機能性GULOTタンパク質、及び／又は機能性GULOTタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって成熟肝臓オルガノイドがアスコルビン酸を合成することができる、実施形態1～8のいずれか1つに記載の方法。

10. 機能性GULOTタンパク質がマウスGULO(mGULO)である、実施形態9に記載の方法。

11. 機能性GULOTタンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン

10

20

30

40

50

誘導系を使用して条件付きで発現される、実施形態 9 又は 10 に記載の方法。

12. 成熟肝臓オルガノイドが、CRISPR を用いて、機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子で操作される、実施形態 9 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

13. 機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方が、トランスフェクションによって成熟肝臓オルガノイドに導入される、実施形態 9 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

14. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、高レベルの NRF2 を発現する、実施形態 9 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の方法。

15. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中又はアスコルビン酸の非存在下で培養された場合、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、低レベルの IL1B、IL6、若しくは TNFα、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態 9 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の方法。

16. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、低いカスパーゼ-3 活性を示す、実施形態 9 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の方法。

17. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、高レベルの ALB を発現する、実施形態 9 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の方法。

18. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、門脈周囲肝組織に類似し、門脈周囲肝臓マーカーを発現する、実施形態 9 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

19. 門脈周囲マーカーが、FAH、ALB、PAH、CPS1、HGD、又はそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 18 に記載の方法。

20. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、増加した CYP3A4 及び CYP1A2 活性を示す、実施形態 9 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の方法。

21. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して増加したビリルビン抱合活性を示す、実施形態 9 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の方法。

22. 機能性 GULO タンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドが、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性 GULO タンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、培養において増加した生存率を示す、実施形態 9 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の方法。

23. 胎児様肝臓オルガノイドを、肝細胞培養培地中で低/第 1 濃度のビリルビンと接触させる、実施形態 1 ~ 22 のいずれか 1 つに記載の方法。

24. 肝細胞培養培地が、肝細胞増殖因子、オンコスタチン M、デキサメタゾン、又はそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 23 に記載の方法。

25. 成熟肝臓オルガノイドがヒトである、実施形態 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

26. 成熟肝臓オルガノイドが不活性 UGT1A1 遺伝子を含み、成熟肝臓オルガノイドがクリグラー・ナジャー症候群のモデルである、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

27. 胎児様肝臓オルガノイドが、多能性幹細胞、任意選択で胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞から分化されている、実施形態 1 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の方法。

28. 多能性幹細胞が、機能性 GULO タンパク質及び/又は機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、それによって多能性幹細胞がアスコルビン酸を合成することができる、実施形態 27 に記載の方法。

10

20

30

40

50

29. 胎児様肝臓オルガノイドが、

a) 第1の期間、胚体内胚葉細胞 (DE) を FGF シグナル伝達経路活性化因子及び Wnt シグナル伝達経路活性化因子と接触させるステップ、

b) ステップ a) の細胞を第2の期間、FGF シグナル伝達経路活性化因子、Wnt シグナル伝達経路活性化因子、及びレチノイン酸 (RA) シグナル伝達経路活性化因子と接触させ、それによって DE を後部前腸細胞に分化させるステップ、及び

c) 後部前腸細胞を基底膜マトリックスに埋め込み、後部前腸スフェロイドを第3の期間培養して、後部前腸細胞を胎児様肝臓オルガノイドに分化させるステップと、を含む方法に従って作製された、実施形態 1~28 のいずれか 1 つに記載の方法。

30. 肝臓オルガノイドを高/第2濃度のビリルビンと接触させ、それによって高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを形成することを含む、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを産生する方法。

31. ビリルビンの高/第2濃度は、

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは 20 mg/L であるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超であるか、又は前述の濃度のいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、2~20 mg/L、2~10 mg/L、10~20 mg/L、5~15 mg/L、若しくは 8~12 mg/L であるか、又は

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは 20 mg/L であるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超であるか、又は前述の濃度のいずれか 2 つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、4~20 mg/L、2~10 mg/L、10~20 mg/L、5~15 mg/L、若しくは 8~12 mg/L である、実施形態 30 に記載の方法。

32. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、高/第2濃度のビリルビンで処理されていない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルの UGT1A1 若しくは NRF2、又はその両方を発現する、実施形態 30 又は 31 に記載の方法。

33. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドをグルココルチコイドアンタゴニストと接触させて、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症を低減することを更に含む、実施形態 30~32 のいずれか 1 つに記載の方法。

34. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドをグルココルチコイドアンタゴニストと接触させることが、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドにおける UGT1A1 及び NRF2 の発現を増加させ、ビリルビン抱合活性を増加させる、実施形態 30~33 のいずれか 1 つに記載の方法。

35. グルココルチコイドアンタゴニストが、ケトコナゾール、ミフェプリストン、若しくはその両方であるか、又はケトコナゾール、ミフェプリストン、メチラポン、アミノグルテチミド、若しくはそれらの任意の組み合わせである、実施形態 34 に記載の方法。

36. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、機能性 GULO タンパク質及び/又は機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子若しくは mRNA、又はその両方を含み、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドがアスコルビン酸を合成することができる、実施形態 30~35 のいずれか 1 つに記載の方法。

37. 機能性 GULO タンパク質が mGULO である、実施形態 36 に記載の方法。

38. 機能性 GULO タンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘導系を使用して条件付きで発現される、実施形態 36 又は 37 に記載の方法。

39. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが不活性 UGT1A1 遺伝子を含み、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドがクリグラー・ナジャー症候群のモデルである、実施形態 30~38 のいずれか 1 つに記載の方法。

40. それを必要とする対象において高ビリルビン血症を治療する方法であって、それを必要とする対象にグルココルチコイドアンタゴニストを投与することを含み、任意選択でグルココルチコイドアンタゴニストが、ケトコナゾール、ミフェプリストン、若しくはその両方であるか、又はケトコナゾール、ミフェプリストン、メチラポン、アミノグルテ

10

20

30

40

50

チミド、若しくはそれらの任意の組み合わせである、方法。

41. 実施形態1～29のいずれか1つに記載の方法によって作製された、成熟肝臓オルガノイド。

42. 実施形態30～39のいずれか1つに記載の方法によって作製された、高ビリルビン血症肝臓オルガノイド。

43. 機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによってアスコルビン酸を合成することができる肝臓オルガノイド。

44. 機能性GULOタンパク質がmGULOである、実施形態43に記載の肝臓オルガノイド。

45. 機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘導系を使用して条件付きで発現される、実施形態43又は44に記載の肝臓オルガノイド。

46. 肝臓オルガノイドが、CRISPRを用いて機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子で操作される、実施形態43～45のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

47. 機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方は、トランスフェクションによって成熟肝臓オルガノイドに導入される、実施形態43～46のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

48. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのNRF2を発現する、実施形態43～47のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

49. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのIL1B、IL6、若しくはTNFα、又はそれらの任意の組み合わせを発現する、実施形態43～48のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

50. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して減少したカスパーゼ3活性を示す、実施形態43～49のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

51. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのALBを発現する、実施形態43～50のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

52. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、門脈周囲肝組織に類似し、門脈周囲肝臓マーカーを発現する、実施形態43～51のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

53. 門脈周囲マーカーが、FAH、ALB、PAH、CPS1、HGD、及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択され、任意選択で、マーカーが、FAH、ALB、PAH、CPS1、及びHGDを含む、実施形態52に記載の肝臓オルガノイド。

54. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、増加したCYP3A4及びCYP1A2活性を示す、実施形態43～53のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

55. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して増加したビリルビン抱合活性を示す、実施形態43～54のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

56. 機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、培養において増加した生存率を示す、実施形態43～55のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

57. 肝臓オルガノイドがヒトである、実施形態43～56のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

10

20

30

40

50

58. 肝臓オルガノイドが不活性UGT1A1遺伝子を含み、肝臓オルガノイドがクリグラー・ナジャー症候群のモデルである、実施形態43～57のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

59. 肝臓オルガノイドが、多能性幹細胞、任意選択で胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞から分化されている、実施形態43～58のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド。

60. 多能性幹細胞が、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方で操作されており、それによって多能性幹細胞がアスコルビン酸を合成することができる、実施形態59に記載の肝臓オルガノイド。

61. 肝細胞であって、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができる、肝細胞。

62. 機能性GULOタンパク質がmGULOである、実施形態61に記載の肝細胞。

63. 機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子が、任意選択でテトラサイクリン誘導系を使用して条件付きで発現される、実施形態61又は62に記載の肝細胞。

64. 肝細胞が、CRISPRを用いて機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子で操作される、実施形態61～63のいずれか1つに記載の肝細胞。

65. 機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方が、トランスフェクションによって肝細胞に導入される、実施形態61～64のいずれか1つに記載の肝細胞。

66. 機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を発現させ、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができることを含む、肝細胞におけるビリルビン抱合及び代謝を増加させる方法。

67. 高ビリルビン血症の治療用の化合物又は組成物をスクリーニングする方法であって、

高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを化合物又は組成物と接触させること、及び高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症の改善を検出することを含む、方法。

68. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、実施形態42に記載の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドであり、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を任意選択で含む、実施形態67に記載の方法。

69. 改善を検出することが、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、UGT1A1若しくはNRF2、又はその両方の発現の増加を検出することを含む、実施形態67又は68に記載の方法。

70. 改善を検出することが、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、非抱合型ビリルビンに対する抱合型ビリルビンの相対的増加を検出することを含む、実施形態67～69のいずれか1つに記載の方法。

71. ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害を有する対象を治療する方法であって、実施形態43～60のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド又は実施形態61～65のいずれか1つに記載の肝細胞を対象に投与することを含む、方法。

72. ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療のための薬物の製造における使用のための、実施形態43～60のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド又は実施形態61～65のいずれか1つに記載の肝細胞。

73. それを必要とする対象におけるビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療における使用のための、実施形態43～60のいずれか1つに記載の肝臓オルガノイド又は実施形態61～65のいずれか1つに記載の肝細胞。

74. ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害が、高ビリルビン血症、黄疸、クリグラー・ナジャー症候群、ジルベール症候群、デュビン・ジョンソン症候群、又はローター症候群である、実施形態71に記載の方法又は実施形態72若しくは73に記載の使用。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0018】

本明細書に記載の特徴に加えて、追加の特徴及び変形例は、以下の図面及び例示的な実施形態の説明から容易に明らかになるであろう。これらの図面は実施形態を描写しており、範囲を限定することを意図するものではないことを理解されたい。

【図1A】HLOの生成及び低用量ビリルビンによる成熟のための概略図の実施形態を示す。

【図1B】対照と比較した低用量ビリルビン（1mg/L）で処置したHLOの明視野画像の実施形態、及びImageJを使用した管腔輪郭を示し、矢印は、ヒト肝臓に見られる毛細胆管に類似する管腔突起を示す。

【図1C】対照及び1mg/Lビリルビン処理HLOの管腔のサイズ及び円形度の比較の実施形態を示す。

【図1D】ヒト肝臓試料と比較した、対照オルガノイド及び1mg/Lのビリルビンで処理したオルガノイドについての未成熟及び成熟マーカー遺伝子（ALB、NANOG、SLC4A2、HO-1、AFP、及びCDX2）のRT-qPCRの実施形態を示す。

【図1E】対照及び1mg/Lビリルビン処理HLOにおけるリファンピシン及びオメプラゾールに応答したCYP3A4及びCYP1A2活性アッセイの実施形態を示す（RLU：相対発光量、CTG：CellTiter-Gloアッセイ）。

【図1F】1mg/Lビリルビン処理肝臓オルガノイドにおける成熟肝酵素及び輸送タンパク質の免疫蛍光の実施形態を示す。図1Fは、CYP2E1及びMRP3の検出を示す。図1Gは、CYP7A1及びMRP1の検出を示す。図1Hは、PROX1及びOATP2の検出を示す。

【図1G】1mg/Lビリルビン処理肝臓オルガノイドにおける成熟肝酵素及び輸送タンパク質の免疫蛍光の実施形態を示す。図1Fは、CYP2E1及びMRP3の検出を示す。図1Gは、CYP7A1及びMRP1の検出を示す。図1Hは、PROX1及びOATP2の検出を示す。

【図1H】1mg/Lビリルビン処理肝臓オルガノイドにおける成熟肝酵素及び輸送タンパク質の免疫蛍光の実施形態を示す。図1Fは、CYP2E1及びMRP3の検出を示す。図1Gは、CYP7A1及びMRP1の検出を示す。図1Hは、PROX1及びOATP2の検出を示す。

【図2A】対照と比較した15日目のアスコルビン酸枯渇を伴うHLOの明視野画像の実施形態を示す。

【図2B】mGULO iPSCを生成するための例示的なワークフローの実施形態を示す。

【図2C】hiPSCにおけるドキシサイクリン活性化TetOn系下でのmGULOの発現のために設計された合成mGULO-mCherry遺伝子の線形マップ、及びmGULO遺伝子をhiPSCにクローニングするために使用されたpAAVS1-ND1-CRISPRi(Gen1)プラスミドのベクターマップの実施形態を示す。

【図2D】TetOn mGULO遺伝子を発現するように改変されたiPSCを使用するHLOの生成のための概略図の実施形態を示す。

【図2E】対照HLOと比較した、ドキシサイクリン(Dox)処理mGULO HLOにおけるmCherry発現の明視野及び蛍光画像の実施形態を示す。

【図2F】18日目のDox処理有り又は無しのアスコルビン酸枯渇mGULO HLOにおけるmCherry発現の明視野及び蛍光画像の実施形態を示す。

【図2G】対照HLOと比較した、Dox（10又は100ng/mL）で処理したmGULO HLOにおけるmGULOタンパク質発現及び細胞抗酸化物質濃度についてのELISAの実施形態を示す。

【図2H】アスコルビン酸枯渇対照又はmGULO HLOと比較した、アスコルビン酸枯渇Dox処理mGULO HLOにおける炎症及び解毒マーカー遺伝子（NRF2、IL1B、IL6、及びTNFa）のRT-qPCRの実施形態を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 I】アスコルビン酸枯渇対照又は mGULO HLO と比較した、アスコルビン酸枯渇 Dox 処理 mGULO HLO についてのカスパーゼ 3 活性アッセイの実施形態を示す。

【図 2 J】対照 HLO と比較して、Dox 処理 mGULO HLO が門脈周囲マーカーを発現することを示す RNA-seq からのヒートマップの実施形態を示す。

【図 2 K】機能によって分類された遺伝子上方制御の実施形態を示し、Dox 処理 mGULO HLO において門脈周囲経路が過剰提示されることを示す。

【図 2 L】1 mg / L ビリルビン処理の有り又は無しの、Dox 処理 mGULO 及び対照 HLO の明視野画像及び Image J を使用した管腔輪郭の実施形態を示し、矢印は、ヒト肝臓に見られる毛細胆管に類似する管腔突起を示す。

【図 2 M】1 mg / L ビリルビン処理有り又は無しの Dox 処理 mGULO HLO 又は対照 HLO の管腔のサイズ及び円形度の比較の実施形態を示す。

【図 2 N】1 mg / L ビリルビン処理の有り又は無しの、Dox 処理 mGULO HLO 又は対照 HLO におけるアルブミン発現の定量化の実施形態を示す。

【図 2 O】ビリルビン及び様々な濃度 (0、10、100、又は 1000 ng / mL の Dox) の Dox で処理した mGULO HLO の明視野画像の実施形態を示す。

【図 2 P】1 mg / L ビリルビンを含む対照又は Dox 処理 mGULO HLO におけるリファンピシン及びオメプラゾールに応答した CYP3A4 及び CYP1A2 活性アッセイの実施形態を示す。

【図 2 Q】暗黄色ビリルビンの存在下であってもビリルビンの抱合を示す蛍光の喪失を示す Unag アッセイの実施形態を示す。

【図 2 R】対照と比較した、Dox で処理した mGULO オルガノイドについての Unag アッセイの実施形態を示す。

【図 2 S】対照と比較した、Dox 処理 mGULO オルガノイドにおける生存オルガノイド及び抱合型ビリルビンを有するオルガノイドの総百分率の定量化の実施形態を示す。

【図 3 A】HLO の生成及び様々な濃度のビリルビンによる処理のための概略図の実施形態を示す。

【図 3 B】1 日後及び 4 日後にビリルビン (0 ~ 10 mg / L) で処理した HLO の明視野画像の実施形態を示す。

【図 3 C】未処理オルガノイドと比較した、様々な濃度のビリルビンで処理したオルガノイドでの UGT1A1 及び NRF2 遺伝子の RT-qPCR の実施形態を示す。

【図 3 D】CNS iPSCs が生成されたクリグラー・ナジャー症候群 (CNS) の患者のプロファイルの実施形態を示す。患者の DNA 配列決定により、UGT1A1 遺伝子におけるナンセンス変異 c. 858 C > A (p. Cys 280 X) が明らかになった。

【図 3 E】クリグラー・ナジャー症候群を有する患者に由来する CNS iPSC が標準的な多能性マーカー Sox2 及び Oct4 を発現することを示す蛍光画像の実施形態を示す。

【図 3 F】標準プロトコルに従って、CNS iPSC を胚体内胚葉 (DE) 及び肝臓オルガノイド (hLO) に分化させることができることを示す明視野画像の実施形態を示す。

【図 3 G】CNS iPSC から産生された肝臓オルガノイドが増殖マーカー Ki67、肝臓特異的マーカー AFP、及び上皮マーカー ECAD を発現することを示す蛍光画像の実施形態を示す。

【図 3 H】1 日後及び 4 日後にビリルビン (10 mg / L) 及び対照 (0 mg / L ビリルビン) で処置された CNS HLO の明視野画像の実施形態を示し、これらの HLO がビリルビン毒性を被ることを示す。

【図 3 I】ビリルビン (10 mg / L) で処置した 10 日後に CNS HLO 及び UGT1A1 mRNA でトランスフェクトされた CNS HLO の明視野画像の実施形態を示す。

【図 3 J】図 3 I の HLO 中の非抱合型 (UCB) 及び抱合型 (CB) ビリルビンを測定

10

20

30

40

50

するビリルビンアッセイの実施形態を示す。

【図 3 K】10 mg / L ビリルビン及び Dox (0、10、100、又は 1000 ng / mL) で処理された mGULO HLO における非抱合型 (UCB) 及び抱合型 (CB) ビリルビンを測定するビリルビンアッセイの実施形態を示す。

【図 4 A】10 mg / L ビリルビン及びグルココルチコイドアゴニストヒドロコルチゾン (HC1 又は 5 μ M) 又はデキサメタゾン (Dex; 1 又は 5 μ M) で処置した肝臓オルガノイドの明視野画像の実施形態を示す。

【図 4 B】図 4 A の肝臓オルガノイドにおける非抱合型及び抱合型ビリルビンを測定するビリルビンアッセイの実施形態を示す。

【図 4 C】10 mg / L ビリルビン及びグルココルチコイドアンタゴニストケトコナゾール (KCZ、1 又は 5 μ M) 又はミフェプリストン (Mif、1 又は 5 μ M) で処置した肝臓オルガノイドの明視野画像の実施形態を示す。

【図 4 D】図 4 C の肝臓オルガノイドにおける非抱合型及び抱合型ビリルビンを測定するビリルビンアッセイの実施形態を示す。

【図 4 E】10 mg / L ビリルビン及びヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、ケトコナゾール、又はミフェプリストンで処置したオルガノイドと比較した、10 mg / L ビリルビンで処置したオルガノイドについての UGT1A1 及び NRF2 遺伝子の RT-qPCR の実施形態を示す。

【図 4 F】対照と比較した、10 mg / L ビリルビン及び 1 μ M ミフェプリストンで処理したオルガノイド間の RNA 配列決定から得られた濃縮経路の比較の実施形態、並びに濃縮 ROS 及び異物代謝を比較する GSEA プロットを示す。

【図 4 G】ROS 及び異物代謝において差次的に発現される遺伝子を示すベン図の実施形態を示す。

【図 4 H】10 mg / L ビリルビン及び 1 μ M ミフェプリストン (Mife) 又は 1 μ M デキサメタゾン (Dex) のいずれかで処置したオルガノイドについての ChIP-PCR 及び ChIP-qPCR の実施形態を示す。

【図 5 A】げっ歯類における HLO の同所性移植のためのワークフローの実施形態を示す。

【図 5 B】移植後の異なる時点で mGULO HLO 又は偽を移植された Gunn ラットから採取した血清に対するアルブミン ELISA の実施形態を示す。

【図 5 C】移植後の図 5 B の Gunn ラットに対するビリルビンアッセイの実施形態を示す。

【図 5 D】移植後の図 5 B の Gunn ラットに対する AST 及び ALT アッセイの実施形態を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

肝疾患の発生率は、加速度的に増加している。新生児高ビリルビン血症 (NH) は、新生児の健康を悪化させる 1 つの状態である。新生児高ビリルビン血症 (NH) は、全新生児の 60% に影響を及ぼし、世界中で 114,000 人の年間死亡者を占める。NH に対する唯一の治療は、12 時間の光線療法又は交換輸血であるが、他の合併症を引き起こす。したがって、これらの肝疾患の効率的でスケーラブルなモデル系が、現在、肝疾患の背後にある分子機構を理解し、潜在的な治療法を開発するために必要となっている。

【0020】

現在、NH をモデル化するための 2 つの主要なモデル生物、Gunn ラット及び UGT1A1 ノックアウトマウスが存在する。しかしながら、これらのモデルは、ビリルビン代謝に関与する重要なヒトタンパク質 (OATP ファミリー) 及びエピジェネティック制御を欠いている。最近の研究から、UGT1A1 調節の多くの態様が種全体でうまく翻訳されないことが明らかになった。ビリルビン代謝における律速酵素である UGT1A1 遺伝子の遺伝的調節は、ヒトにおいて有意に異なる。UGT 欠損の Gunn ラットは、維持することが非常に困難であり、特別な収容設備を必要とする。更に、UGT1KO マウスモ

10

20

30

40

50

デルは、致死的な高ビリルビン血症を示し、数週間までしか生存しない。これらのモデルを用いて多くの処置が試験されてきたが、ほとんどが失敗している。したがって、ビリルビン代謝のダイナミクスを理解するためのより釣り合ったモデルを開発する必要性が極めて大きい。

【0021】

本明細書では、ヒト肝臓オルガノイド（HLO）は、様々な濃度のビリルビンで処置することによって高ビリルビン血症をモデル化するために使用される。これらのHLOは、患者由来の人工多能性幹細胞（iPSC）に由来することができ、この患者は健康とすること又は疾患状態を有することができ、それぞれの患者と遺伝的内容が同一である。HLOは、発生の出生前段階で発現されるほとんどの肝臓マーカーを発現する。更に、HLOはクローンであり、したがって外部刺激及び生化学的摂動に対して同様に反応する。これらのHLOは、非常に拡張性があり扱いやすく、膨大な数の薬物及び小分子を試験するためのスクリーニングアプローチを可能にする。

10

【0022】

マウス及びラットなどの繁殖モデル生物は、数ヶ月の作業及び計画を要し、所望の遺伝子型を得る可能性は比較的低い。更に、モデル生物は、世代にわたる生化学的摂動に応じて高い変動を示す。これらのげっ歯類はまた、長期間にわたって飼育する場合、所望の遺伝子型を失うリスクがあり、また、疾患をモデル化し、治療の有効性を評価するために複雑な訓練及び手順を必要とする。逆に、HLOは、取り扱いが容易であり、バッチ間の変動が非常に小さい。大きなバッチのHLOでも、数週間以内に生成することができる。これらの性質を利用して、いくつかの薬物を短期間で試験して、ビリルビン代謝に関与する重要な経路を同定した。したがって、肝臓オルガノイドは、黄疸、クリグラー・ナジャー症候群、ジルベール症候群、デュビン・ジョンソン症候群、又はローター症候群等のビリルビン代謝の機能障害に関連する疾患及び障害を研究するための有用なモデルである。

20

【0023】

ビリルビンの異常代謝は疾患をもたらすが、ビリルビンは、初期胎児発生中の重要な代謝産物であり、成人において抗酸化的役割を果たす代謝ホルモンとして作用する。ビリルビンの使用を含まない以前の方法によって調製されたHLOモデルは、未成熟組織に類似しており、胎児及び腸マーカーを発現する。したがって、本明細書にも開示されるように、低用量（正常な生理学的レベルを模倣する）のビリルビンを使用することによってHLOの成熟を誘導した。ミフェプリストン及びケトコナゾールでの治療などによる、これらのHLOにおけるグルココルチコイド受容体経路の調節は、ビリルビンの抱合及び代謝を改善した。

30

【0024】

ビタミンCはまた、胎児の適切な発達に必要であり、肝臓の門脈周囲帯の形成に関与する。L-グルノラクトンオキシダーゼ（GULO）は、ビタミンCを合成する天然に存在する酵素であるが、この酵素は、ヒト及びモルモット等のいくつかの他の動物では機能せず、外因性ビタミンC補給（典型的には食餌による）を必要とする。モルモット動物モデルにおいて示されるように、ビタミンC欠乏症は、著しい代謝障害を引き起こす。

【0025】

モデル生物と比較して、iPSC細胞株の遺伝子改変ははるかに容易であり、オルガノイドへの分化前により長期間にわたって容易に維持することができる。これを利用して、マウスGULO（mGULO）等の機能性L-グルノラクトンオキシダーゼ（GULO）を発現するiPSC由来オルガノイドを生成した。iPSC及びオルガノイドがヒト起源である場合、機能性L-グルノラクトンの発現は、通常ヒトでは不活性であるアスコルビン酸合成を可能にする。これらのmGULOオルガノイドは、ビリルビンの抱合効率の増加を示し、ビリルビンで処理した場合に生存率の改善を示した。mGULOオルガノイドにおけるアスコルビン酸の産生は、オルガノイドの酸化ストレスを低下させ、細胞解毒経路の主要制御因子であるNRF2の発現を駆動し、次いで、ビリルビン抱合を触媒するUGT1A1の発現を促進する。これらのmGULOオルガノイドは、他の点では、mGULO

40

50

LOオルガノイドが由来する患者と遺伝的に同一であり、ヒトビリルビン代謝の態様を包含する。したがって、これらのオルガノイドは、NHの発生機構を解明し、NHに対する治療的処置を開発するためのモデル系として使用することができる。

【0026】

用語

以下の詳細な説明では、本願の一部を形成する添付の図面を参照する。図面では、文脈上別段の指示がない限り、典型的には、類似の記号は類似の構成要素を特定する。詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲に記載された例示的な実施形態は、限定することを意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、他の実施形態を利用することができ、他の変更を行うことができる。本明細書に一般に記載され、図に示される本開示の態様は、多種多様な異なる構成で配置、置換、結合、分離、及び設計することができ、それらは全て、本明細書に明示的に企図されることが容易に理解されよう。

【0027】

別段の定めがない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が属する当業者によって本開示に照らして読まれたときに一般に理解されるのと同じ意味を有する。本開示の目的のために、次の用語を以下に説明する。

【0028】

本明細書の開示は、多数の実施形態を説明するために肯定的な言葉を使用する。本開示はまた、物質又は材料、方法ステップ及び条件、プロトコル、又は手順等の主題が完全に若しくは部分的に除外される実施形態を含む。

【0029】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書では、冠詞の文法的目的語の1つ又は2つ以上（例えば、少なくとも1つ）を指すために使用される。例として、「要素」は、1つの要素又は2つ以上の要素を意味する。

【0030】

「約」は、参照する量（quantity）、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量（amount）、重量又は長さに対し10%と同程度に変動する量（quantity）、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量（amount）、重量又は長さを意味する。

【0031】

本明細書全体を通して、文脈上別段の必要がない限り、「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、及び「含むこと」という言葉は、記載されたステップ若しくは要素又はステップ若しくは要素のグループを包含することを意味するが、いかなる他のステップ若しくは要素又はステップ若しくは要素のグループも排除しないことを意味すると理解される。「からなる（consisting of）」は、語句「からなる」に続くもの全てを含み、それに限定されることを意味する。したがって、語句「からなる」は、列挙された要素が必要であり（required）又は必須（mandatory）であり、その他の要素が存在しなくてもよいことを示す。「本質的にからなる（consisting essentially of）」とは、この語句の後に列挙されたあらゆる要素を含み、列挙された要素に関して本開示で指定される活性若しくは作用に干渉しない又はこの活性若しくは作用に寄与しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「本質的にからなる」という語句は、列挙された要素が必要であり（required）、又は必須（mandatory）であるが、その他の要素は任意選択的であり、列挙された要素の活性若しくは作用に実質的に影響を及ぼすか否かに応じて存在してもよく、又は存在しなくてもよいことを示す。

【0032】

本明細書で使用される「個体」、「対象」、又は「患者」という用語は、本明細書に照らして理解される用語の明白かつ通常の意味を有し、ヒト又は非ヒト哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、非ヒト霊長類、又はトリ、例えば、ニワトリ、並びに任意の他の脊椎動物又は無脊椎動物を意味する。「哺乳動物」という用語は、通常の生物学的意味で使用される。したがって、この用語には、具体的には

、サル（チンパンジー、類人猿、サル）及びヒトを含む霊長類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、げっ歯類、ラット、マウス、モルモット等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

本明細書で使用される「有効量」又は「有効用量」という用語は、本明細書に照らして理解される用語の明白かつ通常の意味を有し、観察可能な効果をもたらす記載された組成物又は化合物の量を指す。現在開示されている主題の活性組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、特定の対象及び／又は用途に対して所望の応答を達成するのに有効な量の活性組成物又は化合物を投与するように変えることができる。選択される投薬量レベルは、組成物の活性、配合物、投与経路、他の薬物又は治療との組み合わせ、治療される状態の重症度、及び治療される対象の身体的状態並びに病歴が挙げられるが、これらに限定されない様々な因子に依存するであろう。いくつかの実施形態において、最小用量が投与され、用量制限毒性がない場合、用量は最小有効量に増量される。本明細書では、有効用量の決定及び調整、並びにそのような調整をいつどのように行うかの評価が企図されている。

10

【0034】

本明細書で使用される「機能」及び「機能性」という用語は、本明細書に照らして理解されるような明白で通常の意味を有し、生物学的、酵素的、又は治療的機能を指す。

【0035】

本明細書で使用される「阻害する」という用語は、本明細書に照らして理解される用語の明白かつ通常の意味を有し、生物学的活性の減少又は防止を指してもよい。減少は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、若しくは100%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下であるパーセンテージ、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲内にある量とすることができる。本明細書で使用される場合、「遅延」という用語は、本明細書に照らして理解されるような明白かつ通常の意味を有し、生物学的事象の、そうでない場合に予想されるよりも遅い時間への遅れ（slowing）、延期（postponement）、又は延期（deferment）を指す。遅延は、0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下であるパーセンテージ、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲内にある量の遅延とすることができる。阻害及び遅延という用語は、必ずしも100%の阻害又は遅延を示すとは限らない。部分的な阻害又は遅延が実現され得る。

20

30

【0036】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、本明細書に照らして理解されるような明白かつ通常の意味を有し、（1）最初に産生されたとき（自然界及び／又は実験環境で）に、それが関連付けられた成分の少なくともいくつかから分離されている、かつ／又は（2）人間の手によって産生、調製、及び／若しくは製造されたときにそれが関連付けられた成分の少なくともいくつかから分離されている、物質及び／又は実体を指す。単離された物質及び／又は実体は、それらが最初に関連していた他の成分の10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約99%、実質的に100%、若しくは100%と等しい、約それらである、少なくともそれらである、少なくとも約それらである、それら以下である、又は約それら以下であるもの（又は前述の値を含む及び／又はまたがる範囲）から分離されてもよい。いくつかの実施形態では、単離された薬剤は、80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、実質的に100%、又は100%純粋である、約それらである、少なくともそれらである、少なくとも約それらである、それら以下である、又は約それら以下（又は前述の値を含む及び／又はまたがる範囲）である。本明細書で使用される場合、「単離され

40

50

た」物質は、「純粋」であってもよい（例えば、他の成分を実質的に含まない）。本明細書で使用される場合、「単離された細胞」という用語は、多細胞生物又は組織に含まれない細胞を指してもよい。

【0037】

本明細書で使用される場合、「インビボ」は、本明細書に照らして理解される用語の明白かつ通常の意味を与えられ、組織抽出物又は死んだ生物とは対照的に、生きている生物、通常は動物、ヒトを含む哺乳動物、及び植物内での方法の実施を指す。

【0038】

本明細書で使用される場合、「エクスビボ」は、本明細書に照らして理解される用語の明白かつ通常の意味を与えられ、自然条件をほとんど変化させない生体外での方法の実施を指す。

【0039】

本明細書で使用される場合、「インビトロ」は、本明細書に照らして理解される用語の明白かつ通常の意味を与えられ、生物学的条件以外、例えばペトリ皿又は試験管内での方法の実施を指す。

【0040】

本明細書で使用される「核酸」又は「核酸分子」という用語は、本明細書に照らして理解される明白かつ通常の意味を有し、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）等のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、自然に細胞内に現れるもの、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成されたフラグメント、及びライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、及びエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって産生されたフラグメントを指す。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド（DNA及びRNA等）であるモノマー、又は天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドのエナンチオマー形態）、又は両方の組み合わせから構成されることができる。修飾ヌクレオチドは、糖部分及び／又はピリミジン若しくはプリン塩基部分に変化を有することができる。糖修飾には、例えば、1つ以上のヒドロキシル基のハロゲン、アルキル基、アミン、及びアジド基による置換が含まれるか、又は糖をエーテル若しくはエステルとして官能化することができる。更に、糖部分全体を、アザ糖及び炭素環式糖類似体等の立体的並びに電子的に類似した構造に置き換えることができる。塩基部分の修飾の例としては、アルキル化プリン及びピリミジン、アシル化プリン若しくはピリミジン、又は他の周知の複素環式置換基が挙げられる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合又はそのような結合の類似体によって結合することができる。ホスホジエステル結合の類似体としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、又はホスホルアミデートが挙げられる。「核酸分子」という用語はまた、いわゆる「ペプチド核酸」を含み、これは、ポリアミド骨格に結合した天然に存在する又は修飾された核酸塩基を含む。核酸は一本鎖又は二本鎖のいずれかとすることができる。「オリゴヌクレオチド」は、核酸と互換的に使用することができる、二本鎖若しくは一本鎖のDNA又はRNAのいずれかを指すことができる。核酸（複数可）は、様々な生物学的システムにおける核酸（複数可）の増幅及び／又は発現に使用することができる核酸ベクター又は核酸構築物（例えば、プラスミド、ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、バクテリオファージ、コスミド、フォスミド、ファージミド、細菌人工染色体（bacterial artificial chromosome、BAC）、酵母人工染色体（yeast artificial chromosome、YAC）、又はヒト人工染色体（human artificial chromosome、HAC））中に含有され得る。典型的には、ベクター又は構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、インデューサー、リボソーム結合部位、翻訳開始部位、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、複製起点、クローニング部位、多重クローニング部位、制限酵素部位、エピトープ、レポーター遺伝子、選択マーカー、抗生物質選択マーカー、標的化配列、ペプチド精製タグ、若しくはアクセサリ遺伝子、又はこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されないエレメントも含有するであろう。

10

20

30

40

50

【0041】

核酸又は核酸分子は、異なるペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質をコードする1つ以上の配列を含むことができる。これらの1つ以上の配列は、同じ核酸若しくは核酸分子内で隣接して、又は例えばリンカー、リピート、若しくは制限酵素部位間の余分な核酸と、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、若しくは300個の塩基長であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下であるか、又は前述の長さのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さである任意の他の配列と結合することができる。本明細書で使用される核酸に関する「下流」という用語は、本明細書に照らして理解される明白かつ通常の意味を有し、核酸が二本鎖である場合、コード化配列（センス鎖）を含有する鎖上の前の配列の3'末端の後にある配列を指す。本明細書で使用される核酸に関する「上流」という用語は、本明細書に照らして理解される明白かつ通常の意味を有し、核酸が二本鎖である場合、コード化配列（センス鎖）を含有する鎖上の後続の配列の5'末端の前にある配列を指す。本明細書で使用される核酸に関する「グループ化」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、直接、又は例えばリンカー、リピート、若しくは制限酵素部位間の余分な核酸、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、若しくは300個の塩基長であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下であるか、又は前述の長さのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さである任意の他の配列とのいずれかで近接して生じるが、一般に、機能性若しくは触媒的ポリペプチド、タンパク質、又はタンパク質ドメインをコードする、間にある配列とは生じない2つ以上の配列を指す。

【0042】

本明細書に記載の核酸は、核酸塩基を含む。主要な、標準的な、天然の、又は未修飾の延期は、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシルである。他の核酸塩基としては、プリン、ピリミジン、修飾核酸塩基、5-メチルシトシン、シュードウリジン、ジヒドロウリジン、イノシン、7-メチルグアノシン、ヒポキサンチン、キサンチン、5,6-ジヒドロウラシル、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ブロモウラシル、イソグアニン、イソシトシン、アミノアリル塩基、色素標識塩基、蛍光塩基、又はビオチン標識塩基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

本明細書で使用される「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書に照らして理解されるそれらの明白かつ通常の意味を有し、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸から構成される高分子を指す。ペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質の多くの機能は当技術分野で知られており、酵素、構造、輸送、防御、ホルモン、又はシグナル伝達が生じるが、これらに限定されない。ペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質は、常にではないが、多くの場合、核酸テンプレートを使用してリボソーム複合体によって生物学的に産生されるが、化学合成も利用できる。核酸テンプレートを操作することにより、2つ以上のペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質の置換、欠失、短縮、付加、複製、又は融合等のペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質変異を実行することができる。2つ以上のペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質のこれらの融合は、同じ分子内で隣接して、あるいは、例えばリンカー、リピート、エピトープ、若しくはタグ間の余分なアミノ酸、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、若しくは300個の塩基長であるか、約それらであるか、少なくともそれらで

あるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下であるか、又は前述の長さのうちのいずれか2つによって定義される範囲内の任意の長さである任意の他の配列と結合することができる。本明細書で使用されるポリペプチドに関する「下流」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、配列が前の配列のC末端の後ろにあることを指す。本明細書で使用されるポリペプチドに関する「上流」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、配列が後続の配列のN末端の前にあることを指す。

【0044】

本明細書で使用される任意の所与の物質、化合物、又は材料の「純度」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、予想される存在量に対する物質、化合物、又は材料の実際の存在量を指す。例えば、物質、化合物、又は材料は、少なくとも80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%純粋であってもよく、その間の全ての小数を含む。純度は、核酸、DNA、RNA、ヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、脂質、細胞膜、細胞破片、小分子、分解産物、溶媒、担体、ビヒクル、若しくは夾雑物、又はそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない望ましくない不純物によって影響されてもよい。いくつかの実施形態では、物質、化合物、又は材料は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞核酸、プラスミドDNA、汚染ウイルス、プロテアソーム、宿主細胞培養成分、プロセス関連成分、マイコプラズマ、発熱物質、細菌内毒素、及び外来性因子を実質的に含まない。純度は、電気泳動、SDS-PAGE、キャピラリー電気泳動、PCR、rtPCR、qPCR、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、分光法、UV-可視分光法、赤外分光法、質量分析法、核磁気共鳴、重量測定、若しくは滴定、又はこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない技術を使用して測定することができる。

【0045】

本明細書で使用される任意の所与の物質、化合物、又は材料の「収率」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、予想される総量に対する物質、化合物、又は材料の実際の総量を指す。例えば、物質、化合物、又は材料の収率は、予想される総量の80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、又は約それら以下であり、その間の全ての小数を含む。収率は、反応又はプロセスの効率、望ましくない副反応、分解、投入物質、化合物、若しくは材料の品質、又は製造の任意のステップ中での所望の物質、化合物、若しくは材料の損失によって影響を受けてもよい。

【0046】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、使用される投与量及び濃度で曝露される細胞又は哺乳動物に対して無毒であるか、又は許容されるレベルの毒性を有する担体、賦形剤、及び／又は安定剤を指す。本明細書で使用される「薬学的に許容される」「希釈剤」「賦形剤」、及び／又は「担体」は、本明細書に照らして理解されるようなそれらの明白かつ通常の意味を有し、ヒト、ネコ、イヌ、又は他の脊椎動物宿主への投与と適合する、任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含むことを意図する。典型的には、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、及び／又は担体は、ヒト並びにネコ及びイヌなどの非ヒト哺乳動物を含む動物で使用するために、連邦政府、州政府の規制当局、若しくは他の規制当局によって承認されるか、又は米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に列挙されている。希釈剤、賦形剤、及び／又は「担体」という用語は、医薬組成物が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指すことができる。そのような医薬希釈剤、賦形剤、及び／又は担体は、石油、動物、植物又は合成由来のものを含む、水及び油等の無菌液体とすることができる。水、

生理食塩水、並びにデキストロース及びグリセロールの水溶液は、特に注射可能な溶液のために、液体希釈剤、賦形剤、及び／又は担体として用いることができる。好適な医薬希釈剤及び／又は賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョコ、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含む。生理学的に許容される担体の非限定的な例は、pH緩衝水溶液である。生理学的に許容される担体はまた、アスコルビン酸等の抗酸化剤、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、アミノ酸、グルコース、マンノース、デキストリン等の炭水化物、EDTA等のキレート剤、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、ナトリウム等の塩形成対イオン、TWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）等の非イオン性界面活性剤の1つ以上を含んでもよい。組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤、増量剤、乳化剤、又はpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、徐放性製剤等の形態をとることができる。製剤は、投与様式に好適であるべきである。

10

【0047】

抗凍結剤は、大きな氷の結晶の形成を防ぐことにより、低温凍結保存の効率及び収率を向上させるための細胞組成添加剤である。抗凍結剤には、DMSO、エチレングリコール、グリセロール、プロピレングリコール、トレハロース、ホルムアミド、メチルホルムアミド、ジメチルホルムアミド、グリセロール3-リン酸、プロリン、ソルビトール、ジエチルグリコール、スクロース、トリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、又はヒドロキシエチルスターチが含まれるが、これらに限定されない。抗凍結剤は、細胞の解凍後の生存率を高めるための栄養素（例えば、アルブミン、血清、ウシ血清、ウシ胎児血清〔FCS〕）などの他の成分を含む凍結保存培地の一部として使用され得る。これらの凍結保存培地において、少なくとも1つの抗凍結剤は、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、若しくは90%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、又は約それら以下である濃度、あるいは前述の数のいずれか2つによって定義される範囲内の任意のパーセンテージで見出され得る。

20

30

【0048】

望ましい特性を有する追加の賦形剤には、保存剤、アジュバント、安定剤、溶媒、緩衝液、希釈剤、可溶化剤、洗浄剤、界面活性剤、キレート剤、抗酸化剤、アルコール、ケトン、アルデヒド、エチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid、EDTA）、クエン酸、塩、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化カリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム糖、デキストロース、フルクトース、マンノース、ラクトース、ガラクトース、スクロース、ソルビトール、セルロース、血清、アミノ酸、ポリソルベート20、ポリソルベート80、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、オクチルフェノールエトキシレート、塩化ベンゼトニウム、チメロサル、ゼラチン、エステル、エーテル、2-フェノキシエタノール、尿素、又はビタミン、又はそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの賦形剤は、血清、アルブミン、オボアルブミン、抗生物質、不活性化剤、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、 β -プロピオラクトン、ゼラチン、細胞破片、核酸、ペプチド、アミノ酸、又は成長培地成分又はそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない、製造プロセスからの残留量又は汚染物質であり得る。賦形剤の量は、0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40

40

50

%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% w/wであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下であるパーセンテージ、又は前述の数のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の重量パーセンテージで組成物中に見られてもよい。

【0049】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、鎮痛剤、治療剤、他の材料等を含むがこれらに限定されない、組成物又は賦形剤の比較的非毒性の無機及び有機酸又は塩基付加塩を含む。薬学的に許容される塩の例には、塩酸及び硫酸等の鉱酸に由来するもの、及びエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸に由来するものが含まれる。塩の形成に好適な無機塩基の例としては、アンモニア、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、亜鉛等の水酸化物、炭酸塩、及び重炭酸塩が挙げられる。塩はまた、非毒性であり、そのような塩を形成するのに十分に強いものを含む適切な有機塩基を用いて形成されてもよい。例えば、このような有機塩基のクラスとしては、メチルアミン、ジメチルアミン、及びトリエチルアミンを含むモノー、ジー、及びトリアルキルアミン、モノー、ジー、及びトリエタノールアミンを含むモノー、ジー、又はトリヒドロキシアルキルアミン、が挙げられてもよいが、これらに限定されない。グリシン、アルギニン、及びリジンを含む、アミノ酸、グアニジン、N-メチルグルコサミン、N-メチルグルカミン、L-グルタミン、N-メチルピペラジン、モルホリン、エチレンジアミン、N-ベンジルフェネチルアミン、トリヒドロキシメチルアミノエタンが含まれ得るが、これらに限定されない。

10

20

【0050】

適切な製剤は、選択した投与経路によって異なる。本明細書に記載の化合物の製剤及び投与のための技術は、当業者に知られている。化合物を投与する複数の技術が、経腸、経口、直腸、局所、舌下、口腔、耳内、硬膜外、皮内、エアロゾル、非経口送達（筋肉内、皮下、動脈内、静脈内を含む）、門脈内、関節内、皮内、腹膜、髄内注射、髄腔内、直接脳室内、腹腔内、鼻腔内又は眼内注射を含む当技術分野に存在し、これらに限定されない。医薬組成物は、一般に、特定の意図された投与経路に合わせて調整されるであろう。

【0051】

本明細書で使用される場合、「担体」は、本明細書に照らして理解されるようなその明白かつ通常の意味を有し、細胞、組織及び／又は身体器官への化合物の通過、送達、及び／又は取り込みを容易にする化合物、粒子、固体、半固体、液体、又は希釈剤を指す。

30

【0052】

本明細書で使用される場合、「希釈剤」は、本明細書に照らして理解されるようなその明白かつ通常の意味を有し、薬理学的活性を欠くが薬学的に必要又は望ましくてもよい医薬組成物中の成分を指す。例えば、希釈剤を使用して、その質量が製造及び／又は投与するには小さすぎる強力な薬物のバルクを増加させることができる。それはまた、注射、摂取又は吸入によって投与される薬物の溶解のための液体であり得る。当技術分野における希釈剤の一般的な形態は、ヒトの血液の組成を模倣するリン酸緩衝生理食塩水等であるが、これに限定されない緩衝水溶液である。

40

【0053】

本明細書で使用される「基底膜マトリックス」又は「細胞外マトリックス」という用語は、本明細書に照らしてその明白かつ通常の意味を有し、細胞接着及び／又は増殖を増強する任意の生物学的又は合成化合物、物質、又は組成物を指す。当技術分野で知られている任意の細胞外マトリックス、並びにその模倣体又は誘導体を、本明細書に開示される方法に使用することができる。細胞外マトリックス、又はその模倣体若しくは誘導体のいくつかの例としては、細胞ベースのフィーダー層、ポリマー、タンパク質、ポリペプチド、核酸、糖、脂質、ポリリジン、ポリオルニチン、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、エラスチン、テネイシン、硫酸ヘパラン、エンタクチン、ニドゲン、オステオポンチン、基底膜、マトリゲル、ヒドロゲル、PEI、WGA、若

50

しくはヒアルロン酸、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

肝臓の微視的構造は、「肝小葉」と呼ばれる多角形構造から構成されている。古典的には、これらの小葉は六角形構造をとるが、組織の仕様に応じて他の幾何学的形状が観察される。各小葉単位は、内部中心静脈を取り囲み、門脈、肝動脈、及び胆管から構成される門脈三管と呼ばれる血管の束によって封入された肝細胞のプレート又は層を含む。肝活性は、血液が末梢の門脈三管から肝細胞を横切って中心静脈に流れて循環系に戻るときに生じる。これらの小葉の非対称組織化により、肝細胞の層は3つのゾーンに分けられる。「門脈周囲ゾーン」（ゾーン1）内の細胞は、門脈三管に最も近く、最も酸素化された血液を受け取り、中心周囲ゾーン（ゾーン3）内の細胞は、中心静脈に最も近く、したがって、最小量の酸素化された血液を受け取り、遷移ゾーン（ゾーン2）は、ゾーン1とゾーン3との間にある。この分離により、肝細胞の各ゾーンは異なる活性を示す。例えば、ゾーン1の肝細胞は、糖新生及び脂肪酸の酸化代謝等の酸化的肝機能に関与し、ゾーン3の肝細胞は、解糖、脂質生成、及びシトクロムP 450媒介性解毒に関与する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される肝臓オルガノイドは、門脈周囲ゾーンの機能性及び細胞マーカー特徴を含む、肝小葉の門脈周囲ゾーンに見られる組織に類似する門脈周囲様同一性を示す。

10

【0055】

本明細書で使用される「ビリルビン」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、ヘムの正常な異化分解によって生成される天然に存在する代謝産物を指す。ビリルビンは、ビリベルジンレダクターゼによるビリベルジンの触媒作用から生じる。肝臓では、ビリルビンは、UDT-グルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）と呼ばれる酵素のファミリーによってグルクロン酸と抱合される。この抱合はビリルビンを水溶性にし、胆汁中で小腸及び結腸に運ばれることを可能にし、それによって更に代謝されて老廃物になる。特にビリルビンの抱合を妨げるUGTの異常機能によるビリルビン代謝の機能不全は、ビリルビンの蓄積をもたらす、高ビリルビン血症を特徴とする様々な疾患に関連する。しかしながら、注目すべきことに、過剰なビリルビンは有害であるが、ビリルビンは抗酸化能も有し、したがって細胞の酸化的損傷を低減するのに有益な効果を有してもよい。

20

30

【0056】

本明細書で使用される「L-グルノラクトンオキシダーゼ」及び「GULO」という用語は、本明細書に照らして理解されるようなその明白かつ通常の意味を有し、L-グルノラクトンを触媒してL-キシローヘキサ-3-グルノラクトン及び過酸化水素を生成する酵素を指す。次いで、L-キシローヘキサ-3-グルノラクトンは自発的にアスコルビン酸（ビタミンC）に変換する。したがって、この酵素は、いくつかの重要な酵素の補因子として及び抗酸化剤としての使用等の多くの生物学的機能に関与する必須栄養素であるビタミンCの生合成に関与する。注目すべきことに、ヒト、並びに他の直鼻亜目霊長類、特定の種のコウモリ及びモルモットは、非機能性GULO遺伝子を保有するように進化してきた。したがって、これらの生物は、アスコルビン酸を合成することができず、食餌又はサプリメントからのビタミンC摂取を必要とし、ビタミンCの欠乏は壊血病をもたらすことができる。本明細書の開示に適用される場合、「機能性GULOタンパク質」は、アスコルビン酸の産生をもたらすL-グルノラクトン触媒活性を有するGULOタンパク質である。逆に、「不活性」GULOタンパク質又は「非機能性」GULOタンパク質は、アスコルビン酸を産生する触媒活性を有しないものである。ヒト及びヒト由来の細胞は、非機能性GULOタンパク質を含み、アスコルビン酸を合成する能力を有さない。しかしながら、本明細書に開示されるように、ヒト細胞は、アスコルビン酸合成能力を可能にするために機能性GULOタンパク質を発現するよう操作されてもよい。これらの機能性GULOタンパク質は、ヒト細胞（又は通常はアスコルビン酸を合成することができない他の細胞）において、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子配列を有するように細胞

40

50

を遺伝子操作するなどの従来のクローニング方法によって発現されてもよい。

【0057】

本明細書で使用される「%w/w」又は「%wt/wt」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、組成物の全重量に対する成分又は薬剤の重量に関して100を掛けて表されたパーセンテージを指す。本明細書で使用される「%v/v」又は「%vol/vol」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、組成物の全液体体積に対する化合物、物質、成分又は薬剤の液体体積に関して100を掛けて表されたパーセンテージを指す。

【0058】

幹細胞

本明細書で使用される場合、「全能性 (totipotent) 幹細胞」(全能性 (omnipotent) 幹細胞としても知られている) という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、胚性及び胚外細胞型に分化することができる幹細胞である。そのような細胞は、完全で生存可能な生物を構築することができる。これらの細胞は、卵子及び精子細胞の融合から産生される。受精卵の最初の数分割によって産生される細胞も全能性である。

【0059】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞 (ESC)」という用語は、一般にES細胞とも略され、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、多能性であり、初期胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞を指す。本開示の目的のために、「ESC」という用語は、胚性生殖細胞を包含するために広義で使用される場合がある。

【0060】

本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞 (PSC)」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、体のほぼ全ての細胞型、すなわち、内胚葉 (胃内壁、胃腸管、肺)、中胚葉 (筋肉、骨、血液、泌尿生殖器)、及び外胚葉 (表皮組織及び神経系) を含む3つの胚葉 (胚上皮) のいずれかに由来する細胞に分化することができる任意の細胞を包含する。PSCは、着床前胚盤胞の内部細胞塊細胞の子孫とすることができ、又は特定の遺伝子の発現を強制することによって、非多能性幹細胞、例えば成体体細胞の誘導によって得られてもよい。多能性幹細胞は、任意の好適な供給源に由来し得る。多能性幹細胞の供給源の例は、ヒト、げっ歯類、ブタ、及びウシを含む哺乳動物の供給源を含む。

【0061】

本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞 (iPSC)」という用語は、一般にiPS細胞とも略され、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、特定の遺伝子の「強制」発現を誘導することにより、成人体細胞等の通常は非多能性細胞から人工的に誘導された多能性幹細胞の一種を指す。hiPSCはヒトiPSCを指す。当技術分野で公知のいくつかの方法では、iPSCは特定の幹細胞関連遺伝子の、成体線維芽細胞等の非多能性細胞内へのトランスフェクションによって、誘導されてもよい。トランスフェクションは、レトロウイルス又はレンチウイルス等のウイルスを使用してウイルス形質導入によって達成され得る。トランスフェクトされた遺伝子は、マスター転写調節因子Oct-3/4 (POU5F1) 及びSox2を含み得るが、他の遺伝子も誘導の効率を向上させる。3~4週間後、少数のトランスフェクトされた細胞は、形態学的及び生化学的に多能性幹細胞と同様になり始め、典型的には、形態学的選択、倍加時間、又はレポーター遺伝子及び抗生物質性選択によって単離される。本明細書で使用される場合、iPSCは、第一世代iPSC、マウスの第二世代iPSC、及びヒト人工多能性幹細胞を含む。いくつかの方法では、レトロウイルス系を使用して、4つの重要な遺伝子: Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycを使用してヒト線維芽細胞を多能性幹細胞に形質転換する。他の方法では、レンチウイルス系を使用して、体細胞をOCT4、SOX2、NANOG、及びLIN28で形質転換する。iPSCにおいて発現が誘導される遺伝子としては、Oct-3/4 (POU5F1)、Sox遺伝子ファミリーの特定の

10

20

30

40

50

メンバー（例えば、Sox1、Sox2、Sox3、及びSox15）、Klfファミリーの特定のメンバー（例えば、Klf1、Klf2、Klf4、及びKlf5）、Mycファミリーの特定のメンバー（例えば、C-myc、L-myc、及びN-myc）、Nanog、LIN28、Tert、Fbx15、ERas、ECAT15-1、ECAT15-2、Tcl1、 β -カテニン、ECAT1、Esg1、Dnmt3L、ECAT8、Gdf3、Fthl17、Sal14、Rex1、UTF1、Stella、Stat3、Grb2、Prdm14、Nr5a1、Nr5a2、若しくはE-カドヘリン、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これに限定されない。

【0062】

本明細書で使用される「前駆細胞」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、本明細書に記載の方法で 사용할 ことができる任意の細胞を包含し、それを通じて、1つ以上の前駆細胞は、それ自体を再生するか、1つ以上の特殊化された細胞型に分化する能力を獲得する。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、多能性であるか、又は多能性になる能力を有する。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、多能性を獲得するために外部因子（例えば、成長因子）の処理に供される。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、全能性（totipotent）（又は全能性（omnipotent））幹細胞、多能性幹細胞（人工又は非人工）、多分化能性（multipotent）幹細胞、少能性（oligopotent）幹細胞、及び単能性幹細胞であり得る。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、胚、乳児、小児、又は成人由来であり得る。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、遺伝子操作又はタンパク質／ペプチド処理を介して多能性が付与されるような処理に供される体細胞であり得る。前駆細胞には、胚性幹細胞（ESC）、胚性癌細胞（embryonic carcinoma cell、EC）、及び胚盤葉上層幹細胞（epiblast stem cell、EpiSC）が含まれる。

【0063】

いくつかの実施形態では、1つのステップは、多能性であるか、又は多能性になるように誘導されることができ る幹細胞を得ることである。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞に由来し、胚性幹細胞は、哺乳動物初期胚の全能性細胞に由来し、インビトロで無制限の未分化増殖が可能である。胚性幹細胞は、初期段階の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞である。胚盤胞から胚性幹細胞を誘導するための方法は、当技術分野で周知である。本明細書に記載の方法及び系は、任意の幹細胞に適用可能であることが当業者によって理解されるであろう。

【0064】

本開示による実施形態において使用されることができ る追加の幹細胞としては、National Stem Cell Bank（NSCB）、Human Embryonic Stem Cell Research Center at the University of California, San Francisco（UCSF）、WiCell Research InstituteのWISCセルバンク、University of Wisconsin Stem Cell and Regenerative Medicine Center（UW-SCRMC）、Novocell, Inc.（San Diego, Calif.）、Cellartis AB（Goteborg, Sweden）、ES Cell International Pte Ltd（Singapore）、Israel Institute of Technologyのテクニオン（Haifa, Israel）、及びPrinceton University及びthe University of Pennsylvaniaが保有するStem Cell Databaseによって提供されるものか、それらが保有するデータベースに記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。本開示による実施形態において使用することができる例示的な胚性幹細胞としては、SA01（SA001）、SA02（SA002）、ES01（HES-1）、ES02（HES-2）、ES03（HES-3）、ES04（HES-4）、ES05（HES-5）、ES06（HES-6）、BG01（BGN-01）、BG02（BGN-02）、

B G 0 3 (B G N - 0 3) 、 T E 0 3 (1 3) 、 T E 0 4 (1 4) 、 T E 0 6 (1 6) 、 U C 0 1 (H S F 1) 、 U C 0 6 (H S F 6) 、 W A 0 1 (H I) 、 W A 0 7 (H 7) 、 W A 0 9 (H 9) 、 W A 1 3 (H 1 3) 、 W A 1 4 (H 1 4) が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヒト多能性細胞株としては、T k D A 3 - 4 、 1 2 3 1 A 3 、 3 1 7 - D 6 、 3 1 7 - A 4 、 C D H 1 、 5 - T - 3 、 3 - 3 4 - 1 、 N A F L D 2 7 、 N A F L D 7 7 、 N A F L D 1 5 0 、 W D 9 0 、 W D 9 1 、 W D 9 2 、 L 2 0 0 1 2 、 C 2 1 3 、 1 3 8 3 D 6 、 F F 、又は3 1 7 - 1 2 細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

発生生物学では、細胞分化は、より専門化されていない細胞がより専門化された細胞型になるプロセスである。本明細書で使用される場合、「有向分化」という用語は、あまり特殊化されていない細胞が特定の特殊化された標的細胞型になるプロセスを記載する。特殊化された標的細胞型の特殊性を、初期細胞の運命を定義又は変更するために使用することができる任意の適用可能な方法によって決定することができる。例示的な方法には、遺伝子操作、化学処理、タンパク質処理、及び核酸処理が含まれるが、これらに限定されない。

【0066】

いくつかの実施形態において、アデノウイルスを使用して、必要な4つの遺伝子を輸送し、胚性幹細胞と実質的に同一のi P S Cをもたらすことができる。アデノウイルスは、それ自体の遺伝子を標的の宿主のうちのいずれとも組み合わせないため、腫瘍を創出する危険性が排除される。いくつかの実施形態において、i P S Cを生成するために非ウイルススペースの技術が用いられる。いくつかの実施形態において、非常に低い効率ではあるが、いずれのウイルストランスフェクション系も全く使用せずに、プラスミドを介して再プログラミングを達成することができる。他の実施形態において、タンパク質の直接送達を使用してi P S Cを生成し、そのようにしてウイルス又は遺伝子修飾の必要性を排除する。いくつかの実施形態において、マウスi P S Cの生成は、同様の方法論を使用して可能である。ポリアルギニンアンカーを介して細胞に運ばれる特定のタンパク質による細胞の反復処理は、多能性を誘導するのに十分であった。いくつかの実施形態において、低酸素条件下で体細胞をF G F 2で処理することによって多能性誘導遺伝子の発現を増加させることもできる。

【0067】

本明細書で使用される「フィーダー細胞」という用語は、本明細書に照らして理解されるその明白かつ通常の意味を有し、成長因子を培地に分泌するか、又は細胞表面に呈示すること等によって、多能性幹細胞の成長をサポートする細胞を指す。フィーダー細胞は一般に付着細胞であり、成長を停止させてもよい。例えば、フィーダー細胞は、照射（例えば、ガンマ線）、マイトマイシン-C処理、電気パルス、又は穏やかな化学固定（例えば、ホルムアルデヒド又はグルタルアルデヒドによる）によって成長が停止される。ただし、フィーダー細胞は必ずしも成長を停止するとは限らない。フィーダー細胞は、成長因子の分泌、細胞表面への成長因子の表示、培養培地の無害化、又は細胞外マトリックスタンパク質の合成等の目的に役立ち得る。いくつかの実施形態において、フィーダー細胞は、支持された標的幹細胞に対して同種又は異種であり、これは、下流の用途に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態において、フィーダー細胞はマウス細胞である。いくつかの実施形態において、フィーダー細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、フィーダー細胞は、マウス線維芽細胞、マウス胚性線維芽細胞、マウスS T O細胞、マウス3 T 3細胞、マウスS N L 7 6 / 7細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト前皮線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト脂肪間葉細胞、ヒト骨髓間葉細胞、ヒト羊膜間葉細胞、ヒト羊膜上皮細胞、ヒト臍帯間葉細胞、ヒト胎児筋細胞、ヒト胎児線維芽細胞、又はヒト成人ファロピウス管上皮細胞である。いくつかの実施形態において、フィーダー細胞から調製された馴化培地は、フィーダー細胞共培養の代わりに、又はフィーダー細胞共培養と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、フィーダー細胞は、標的幹細胞の成長中には

使用されない。

【0068】

PSCの分化

多能性細胞（例えば、iPSC又はESC）から胚体内胚葉を産生するための既知の方法は、本明細書に記載の方法に適用可能である。いくつかの実施形態では、多能性細胞は桑実胚に由来する。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞は幹細胞である。これらの方法で使用される幹細胞としては、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞を挙げることができるが、これらに限定されない。胚性幹細胞は、胚の内部細胞塊又は胚の性腺隆起に由来することができる。胚性幹細胞又は生殖細胞は、ヒトを含む種々な哺乳動物種を含むがこれらに限定されない様々な動物種から生じ得る。いくつかの実施形態において、ヒト胚性幹細胞を使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、ヒト胚性生殖細胞を使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、iPSCを使用して胚体内胚葉を産生する。いくつかの実施形態において、ヒトiPSC（human iPSC、hiPSC）を使用して胚体内胚葉を産生する。

10

【0069】

いくつかの実施形態では、ESC及びiPSCなどのPSCは、胚性胚葉細胞、器官組織前駆細胞への、次いで肝組織又は他の任意の生物学的組織などの組織への有向分化（directed differentiation）を受ける。いくつかの実施形態では、分化が進行するにつれて分子（例えば成長因子、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト）が順次添加される、分化した細胞型の各々を得るために、有向分化が段階的に行われる。いくつかの実施形態では、有向分化は、分子（例えば成長因子、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト）が同時に添加される非段階的な方法で行われる。いくつかの実施形態において、有向分化は、PSC又は任意の下流の細胞における特定のシグナル伝達経路を選択的に活性化することによって達成される。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、胚性幹細胞又は生殖細胞又はiPSCは、6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、120時間、150時間、180時間、240時間、300時間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である時間、又は前述の時間のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の時間、例えば、6時間～300時間、24時間～120時間、48時間～96時間、6時間～72時間、若しくは24時間～300時間にわたって、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子で処理される。いくつかの実施形態では、2つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子が添加される。これらの場合、2つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子は、同時に又は別々に添加することができる。

30

【0071】

いくつかの実施形態では、胚性幹細胞又は生殖細胞又はiPSCは、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、75 ng/mL、100 ng/mL、120 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、1200 ng/mL、1500 ng/mL、2000 ng/mL、5000 ng/mL、7000 ng/mL、10000 ng/mL、若しくは15000 ng/mLの濃度であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である濃度、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内にある任意の濃度、例えば、10 ng/mL～15000 ng/mL、100 ng/mL～5000 ng/mL、500 ng/mL～2000 ng/mL、10 ng/mL～2000 ng/mL、若しくは1000 ng/mL～15000 ng/mLの1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子で処理される。いくつかの実施形態では、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子の濃度は、治療を通して一定レベルに維持される。いくつかの実施形態において、1つ以上の

40

50

小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子の濃度は、治療の過程で変化する。いくつかの実施形態において、2つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子が添加される。これらの場合、2つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子の濃度が異なる可能性がある。

【0072】

いくつかの実施形態では、ESC若しくはiPSC、又はESC、生殖細胞、又はiPSCは、幹細胞の成長をサポートする成長培地で培養される。いくつかの実施形態では、ESC若しくはiPSC、又はESC、生殖細胞、又はiPSCは、幹細胞成長培地で培養される。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、RPMI 1640、DMEM、DMEM/F12、又はAdvanced DMEM/F12である。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、ウシ胎児血清(FBS)を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、若しくは20%であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である濃度、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の割合、例えば、0%~20%、0.2%~1.0%、2%~5%、0%~5%、又は2%~20%でFBSを含む。いくつかの実施形態では、幹細胞成長培地は、異種成分を含有しない。いくつかの実施形態において、成長培地は、1つ以上の小分子化合物、活性化因子、阻害剤、又は成長因子を含む。

10

20

【0073】

いくつかの実施形態において、胚体内胚葉細胞が濃縮された細胞の集団が使用される。いくつかの実施形態において、胚体内胚葉細胞は、単離されるか、又は実質的に精製される。いくつかの実施形態では、単離された又は実質的に精製された胚体内胚葉細胞は、SOX17、FOXA2、又はCXRC4マーカーのうちの1つ以上(例えば、少なくとも1つ、3つ)を、OCT4、AFP、TM、SPARC、又はSOX7マーカーのうちの1つ以上(例えば、少なくとも1つ、3つ、5つ)よりも多く発現する。

【0074】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、体細胞から調製される。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、生検から得られた生体組織から調製される。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は凍結保存される。いくつかの実施形態では、体細胞は凍結保存される。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、PBMCから調製される。いくつかの実施形態では、ヒトPSCはヒトPBMCから調製される。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、凍結保存されたPBMCから調製される。いくつかの実施形態では、PBMCはフィーダー細胞基質上で成長する。いくつかの実施形態では、PBMCは、マウス胚性線維芽細胞(MEF)フィーダー細胞基質上で増殖される。いくつかの実施形態では、PBMCは、照射されたMEFフィーダー細胞基質上で増殖される。

30

【0075】

いくつかの実施形態では、幹細胞を1つ以上の成長因子で処理して、胚体内胚葉細胞に分化させる。そのような成長因子は、TGF-ベータスーパーファミリーからの成長因子を含むことができる。いくつかの実施形態において、1つ以上の成長因子は、成長因子のTGF-ベータスーパーファミリーのNodal/アクチビン及び/又はBMPサブグループを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の成長因子は、ノーダル、アクチビンA、アクチビンB、BMP4、Wnt3a、又はこれらの成長因子のいずれかの組み合わせから成る群から選択される。いくつかの実施形態では、幹細胞をアクチビンAと接触させる。いくつかの実施形態では、幹細胞をアクチビンA及びBMP4と接触させる。

40

【0076】

いくつかの実施形態では、アクチビン誘導胚体内胚葉(DE)は、FGF、Wnt若しくはレチノイン酸、又はそれらの任意の組み合わせ、又はFGF、Wnt、BMP、若し

50

くはレチノイン酸、又はそれらの任意の組み合わせ、並びに肝臓成長、形態形成、及び細胞分化を促進する肝臓培養系に依存して、前方内胚葉パターン形成、前腸特定化、及び形態形成を更に受けることができる。いくつかの実施形態では、ヒトPSCは、効率的に、肝臓上皮及び間葉にインビトロで分化するように指向される。成長因子などの分子は、特定の種類の肝組織形成を促進するために任意の発達期に添加されることができ、ことが理解されるだろう。

【0077】

1つ以上のFGFタンパク質の濃度、発現、又は機能を変更することと組み合わせ、1つ以上のWntシグナル伝達タンパク質の濃度、発現、又は機能を変更することは、本開示による有向分化を生じさせることができることが、当業者によって理解されるだろう。いくつかの実施形態では、FGF、Wnt、若しくはレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路、又はFGF、Wnt、BMP、若しくはレチノイン酸(RA)シグナル伝達経路に関連する細胞成分、例えば、経路の天然の阻害剤、アンタゴニスト、活性化因子、又はアゴニストを使用して、FGF、Wnt、若しくはレチノイン酸シグナル伝達経路、又はFGF、Wnt、BMP、若しくはレチノイン酸シグナル伝達経路の阻害又は活性化をもたらすことができる。いくつかの実施形態では、FGF、Wnt、若しくはレチノイン酸シグナル伝達経路、又はFGF、Wnt、BMP、若しくはレチノイン酸シグナル伝達経路に関連する細胞成分を標的とするsiRNA及び／又はshRNAは、これらの経路を阻害又は活性化するために使用される。

【0078】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞、胚体内胚葉、後部前腸スフェロイド、又は下流肝細胞型を、Wntシグナル伝達経路活性化因子又はWntシグナル伝達経路阻害剤と接触させる。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、Wntタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、Wntタンパク質は組換えWntタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16、BML284、IQ-1、WAY262611、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、GSK3シグナル伝達経路阻害物質を含む。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、CHIR.99021、CHJR98014、AZD2858、BIO、AR-A014418、SB216763、SB415286、アロイシン、インジルビン、アルスターパウロン、ケンパウロン、塩化リチウム、TDZD8、若しくはTWS119、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路阻害剤は、C59、PNU74654、KY-02111、PRI-724、FH-535、DIF-1、若しくはXAV939、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、Wntシグナル伝達経路活性化因子又はWntシグナル伝達経路阻害物質で処理されていない。本明細書で提供されるWntシグナル伝達経路活性化因子又はWntシグナル伝達経路阻害物質は、本明細書で提供される他の成長因子、シグナル伝達経路活性化因子、又はシグナル伝達経路阻害物質のうちのいずれかと組み合わせで使用されてもよい。

【0079】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞、胚体内胚葉、後部前腸スフェロイド、又は下流肝細胞型を、FGFシグナル伝達経路活性化因子と接触させる。いくつかの実施形態では、FGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGFタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、FGFタンパク質は組換えFGFタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、FGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15 (FGF19、FGF15／FGF19)、FGF16、FGF17、FGF18、FGF20、FGF21、

F G F 2 2、又はF G F 2 3のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、F G Fシグナル伝達経路活性化因子で処理されていない。本明細書で提供されるF G Fシグナル伝達経路活性化因子は、本明細書で提供される他の成長因子、シグナル伝達経路活性化因子、又はシグナル伝達経路阻害剤のいずれかと組み合わせて使用されてもよい。

【0080】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞、胚体内胚葉、後部前腸スフェロイド、又は下流肝細胞型を、レチノイン酸シグナル伝達経路活性化因子又はレチノイン酸シグナル伝達経路阻害剤と接触させる。いくつかの実施形態では、レチノイン酸シグナル伝達経路活性化因子は、レチノイン酸、オールトランスレチノイン酸、9-シスレチノイン酸、C D 4 3 7、E C 2 3、B S 4 9 3、T T N P B、若しくはA M 5 8 0、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、レチノイン酸シグナル伝達経路阻害物質は、ググルステロンを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、レチノイン酸シグナル伝達経路活性化因子又はレチノイン酸シグナル伝達経路阻害物質で処理されていない。本明細書で提供されるレチノイン酸シグナル伝達経路活性化因子又はレチノイン酸シグナル伝達経路阻害物質は、本明細書で提供される他の成長因子、シグナル伝達経路活性化因子、又はシグナル伝達経路阻害物質のうちのいずれかと組み合わせて使用されてもよい。

10

【0081】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、「1つのステップ」プロセスによって肝細胞型に変換される。例えば、多能性幹細胞をD E培養物に分化させることができる1つ以上の分子（例えば、アクチビンA）を、D E培養物の有向分化を促進することができる追加の分子（例えば、F G F 4、C H I R 9 9 0 2 1、R A、又は例えば、F G F 4、W n t、N o g g i n、R A）と組み合わせて、多能性幹細胞を直接処理する。

20

【0082】

いくつかの実施形態において、i P S Cは、細胞培養において拡大される。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は基底膜マトリックス中で増殖される。いくつかの実施形態では、i P S Cは、マトリゲル中で増殖される。いくつかの実施形態では、i P S Cは、R O C K阻害剤（例えば、Y-27632）を含む細胞培地中で増殖される。いくつかの実施形態において、i P S Cは、胚体内胚葉細胞に分化する。i P S Cでは、i P S CをアクチビンA、B M P 4、又は両方と接触させることにより、胚体内胚葉細胞に分化させる。いくつかの実施形態では、i P S Cを、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、若しくは200 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である濃度、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、10~200 ng/mL、10~100 ng/mL、100~200 ng/mL、又は50~150 ng/mLのアクチビンAと接触させる。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞を100 ng/mL又は約100 ng/mLの濃度のアクチビンAと接触させる。いくつかの実施形態では、i P S Cを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、若しくは200 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下の濃度、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度のB M P 4、例えば、1~200 ng/mL、1~100 ng/mL、25~200 ng/mL、1~80 ng/mL、又は25~100 ng/mLの濃度のB M P 4と接触させる。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞を、50 ng/mL又は約50 ng/mLの濃度のB M P 4と接触させる。

30

40

【0083】

いくつかの実施形態において、P S Cは、胚体内胚葉細胞に分化される。いくつかの実施形態では、P S Cは、後部前腸細胞に分化される。いくつかの実施形態において、P S Cは肝臓オルガノイドに分化される。

50

【0084】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される細胞のうちのいずれかを、後に使用するために凍結保存することができる。細胞は、当技術分野で一般的に知られている方法に従って凍結保存することができる。

【0085】

遺伝子編集

いくつかの実施形態では、iPSC、胚体内胚葉細胞、後部前腸スフェロイド、又はオルガノイドは、当技術分野で既知の方法に従って遺伝子改変又は編集される。例えば、Cas9等のCRISPRヌクレアーゼを使用した遺伝子編集は、PCT公開第WO2013/176772号、同第WO2014/093595号、同第WO2014/093622号、同第WO2014/093655号、同第WO2014/093712号、同第WO2014/093661号、同第WO2014/204728号、同第WO2014/204729号、同第WO2015/071474号、同第WO2016/115326号、同第WO2016/141224号、同第WO2017/023803号、及び同第WO2017/070633において検討されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【0086】

胎児様肝臓オルガノイドの作製方法

肝臓オルガノイドの産生方法は、例えば、Ouchi et al. 「Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids」Cell Metabolism (2019) 30 (2) : 374-384、Shinozawa et al. 「High-Fidelity Drug-Induced Liver Injury Screen Using Human Pluripotent Stem Cell Derived Organoids」Gastroenterology (2021) 160 (3) : 831-846、PCT公開第WO2018/085615号、同第WO2018/191673号、同第WO2018/226267号、同第WO2019/126626号、同第WO2020/023245号、同第WO2020/069285号、同第WO2020/243613号、同第WO2021/030373号、及び同第WO2021/262676号において以前に調査されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。肝臓オルガノイド組成物及びその作製方法の開示は、本明細書に記載のヒト肝臓オルガノイド（HLO）に適用可能である。これらの以前に記載された方法は一般に、発生初期の肝組織の特徴を示す「胎児様」肝臓オルガノイドをもたらす。例えば、これらの胎児様肝臓オルガノイドは、アルファヘトプロテイン（AFP）、ホメオボックスタンパク質NANOG、及び尾側型ホメオボックス2（CDX2）等の未成熟又は胎児肝臓マーカーを発現する。

【0087】

胎児様肝臓オルガノイドの産生方法の実施形態が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、a) 第1の期間、胚体内胚葉細胞（DE）をFGFシグナル伝達経路活性化因子及びWntシグナル伝達経路活性化因子と接触させるステップ、b) ステップa)の細胞を、FGFシグナル伝達経路活性化因子、Wntシグナル伝達経路活性化因子、及びレチノイン酸（RA）シグナル伝達経路活性化因子と第2の期間接触させ、それによってDEを後部前腸細胞に分化させるステップ、及びc) 後部前腸細胞を基底膜マトリックスに埋め込み、後部前腸スフェロイドを第3の期間培養して、後部前腸細胞を胎児様肝臓オルガノイドに分化させるステップを含む。いくつかの実施形態では、DEは、多能性幹細胞に由来している。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞及び／又は人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、第1の期間は、0.5、1、2、3、又は4日間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲、例えば、0.5～4、1～4、0.5～2、

又は3～4日間である。いくつかの実施形態では、第2の期間は、0.5、1、又は2日間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、約それら以下である。いくつかの実施形態では、第3の期間は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、若しくは30日間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である期間、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲、例えば4～30、10～30、20～30、4～17、4～12、又は10～25日間である。いくつかの実施形態では、基底膜マトリックスは、マトリゲルである。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイド、DE及び／又は多能性幹細胞は、患者に由来する。

10

【0088】

胎児様肝臓オルガノイドの作製方法のいくつかの実施形態では、FGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、及びFGF23から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、FGFシグナル伝達経路活性化因子は、FGF4である。いくつかの実施形態では、FGFシグナル伝達経路活性化因子は、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、若しくは1000 ng/mLであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である濃度、又は100～1000 ng/mL、100～500 ng/mL、500～1000 ng/mL、250～750 ng/mL、又は400～600 ng/mLを含む、前述の濃度のいずれか2つで定義される範囲内の任意の濃度で接触される。いくつかの実施形態では、FGFシグナル伝達経路活性化因子は、500 ng/mL又は約500 ng/mLの濃度で接触される。

20

【0089】

胎児様肝臓オルガノイドの作製方法のいくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16、BML284、IQ-1、WAY262611、CHIR99021、CHIR98014、AZD2858、BIO、AR-A014418、SB216763、SB415286、アロイシン、インジルピン、アルスターパウロン、ケンパウロン、塩化リチウム、TDZD8、及びTWS119から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、CHIR99021である。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、若しくは3.5 µMであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、又は約それら以下である濃度、又は0.5～3.5 µM、0.5～2 µM、2～3.5 µM、1～3 µM、又は1.5～2.5 µMを含む、前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度である濃度で接触される。いくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達経路活性化因子は、2 µM又は約2 µMの濃度で接触される。

30

40

【0090】

胎児様肝臓オルガノイドの作製方法のいくつかの実施形態では、RAシグナル伝達経路活性化因子は、レチノイン酸、オールトランスレチノイン酸、9-シスレチノイン酸、CD437、EC23、BS493、TTNPB、及びAM580から成る群から選択され

50

る。いくつかの実施形態では、RAシグナル伝達経路活性化因子は、RAである。いくつかの実施形態では、RAシグナル伝達経路活性化因子は、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.9、又は3 μ Mであるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、少なくとも約それらであるか、それら以下であるか、若しくは約それら以下である濃度、又は1～3 μ M、1～2 μ M、2～3 μ M、又は1.5～2.5 μ Mを含む、前述の濃度のいずれかの2つで定義される範囲内の任意の濃度で接触される。いくつかの実施形態では、RAシグナル伝達経路活性化因子は、2 μ M又は約2 μ Mの濃度で接触される。

【0091】

肝臓オルガノイドの成熟

以前の方法を使用して多能性幹細胞から調製された肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓状態に類似している。いくつかの実施形態では、この胎児様肝臓オルガノイドは、アルファヘトプロテイン（AFP）及び尾側型ホメオボックス2（CDX2）等の未成熟肝臓タンパク質マーカーの発現を特徴とする。

【0092】

本明細書には、胎児様肝臓オルガノイドを低／第1濃度のビリルビンと接触させ、それによって胎児様オルガノイドを成熟肝臓オルガノイドに成熟させることによって、胎児様肝臓オルガノイドを成熟させる方法が開示される。いくつかの実施形態では、ビリルビンの低／第1濃度は、ビリルビンのヒト胎児生理学的濃度である。いくつかの実施形態では、ビリルビンの低／第1濃度は、0.1～1 mg/L、0.5～1 mg/L、又は1 mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、又は約それら未満である。いくつかの実施形態では、ビリルビンの低／第1濃度は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、又は1 mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、若しくは約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、0.1～1 mg/L、0.1～0.5 mg/L、0.5～1 mg/L、0.3～0.7 mg/L、又は0.4～0.6 mg/Lである。いくつかの実施形態では、ビリルビンの低／第1濃度は、0.1～3 mg/L、0.5～3 mg/L、又は3 mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、又は約それら未満である。いくつかの実施形態では、ビリルビンの低／第1濃度は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75又は3.0 mg/Lであるか、約それらであるか、それら未満であるか、若しくは約それら未満である、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、0.1～3 mg/L、0.5～2.0 mg/L、0.5～1.5 mg/L、0.3～2.5 mg/L、又は0.5～1.75 mg/Lである。いくつかの実施形態では、胎児様肝臓オルガノイドは、12、13、14、15、16、17、18、19又は20日の期間にわたって行われる培養プロセスに従って多能性幹細胞（iPSC又はESC等）から分化される。いくつかの実施形態では、胎児様肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される方法において使用される場合、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20日齢であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、若しくは少なくとも約それらである、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲、例えば、12～20、14～16、若しくは15～18日齢である。いくつかの実施形態では、胎児様肝臓オルガノイドを、低／第1濃度のビリルビンと、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20日間であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、若しくは少なくとも約それらである期間、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲、例えば12～20、14～16、若しくは15～18日間の期間にわたって接触させて成熟肝臓オルガノイドに成熟させる。

【0093】

いくつかの実施形態では、得られた成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイド

10

20

30

40

50

よりも小さい及び／又は円形でない。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、毛細胆管に類似する管腔突起を示す。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのAFP、CDX2、NANOG、又はそれらの任意の組み合わせを発現する。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのALB、SLC4A2、若しくはHO-1、又はそれらの任意の組み合わせを発現する。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、CYP2E1、CYP7A1、PROX1、MRP3、MRP3、若しくはOATP2、又はそれらの任意の組み合わせを発現する。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイドと比較して増加したCYP3A4及びCYP1A2活性を示す。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質を発現するように操作されてもよく、これは、本明細書に開示されるオルガノイドの生存率及び機能を改善する。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって成熟肝臓オルガノイドはアスコルビン酸を合成することができる。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質は、マウスGULO(mGULO)である。しかしながら、機能性GULOは代替的に、機能性GULOタンパク質を含む任意の他の動物種に由来してもよい。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子は、条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、遺伝子は、テトラサイクリン誘導系又は当技術分野において一般的に知られている条件付き発現のための任意の他の系を用いて条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、CRISPR又は当技術分野において一般的に知られている遺伝子操作の任意の他の方法を用いて、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子で操作される。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方は、トランスフェクションによって成熟肝臓オルガノイドに導入される。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのNRF2を発現する。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養した場合に、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのIL1B、IL6、若しくはTNFα、又はそれらの任意の組み合わせを発現する。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合に、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、低減したカスパーゼ-3活性を示す。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのALBを発現する。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、門脈周囲肝組織に類似しており、門脈周囲肝臓マーカーを発現する。いくつかの実施形態では、門脈周囲マーカーが、FAH、ALB、PAH、CPS1、HGD、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、増加したCYP3A4及びCYP1A2活性を示す。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して増加したビリルビン抱合活性を示す。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む成熟肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイド又は機能性GULOタンパク質を含まない成熟肝臓オルガノイドと比較して、培養において生存率の増加を示す。

20

30

40

50

【0095】

いくつかの実施形態では、胎児様肝臓オルガノイドを、肝細胞培養培地中で低／第1濃度のビリルビンと接触させる。これらの肝細胞培養培地（すなわち、肝組織を支持するように設計された増殖培地）の組成物は、当技術分野で一般的に公知である。いくつかの実施形態では、肝細胞培養培地は、肝細胞増殖因子、オンコスタチンM、デキサメタゾン、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドはヒトである。いくつかの実施形態では、成熟肝臓オルガノイドは、不活性UGT1A1遺伝子を含み、成熟肝臓オルガノイドはクリグラール・ナジャー症候群のモデルである。いくつかの実施形態では、胎児様肝臓オルガノイドは、多能性幹細胞から分化されている。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって多能性幹細胞がアスコルビン酸を合成することができる。多能性幹細胞から肝臓オルガノイドを産生するための例示的な方法は、本明細書に開示されており、そうでなければ当技術分野で一般的に公知である。いくつかの実施形態では、胎児様肝臓オルガノイドは、a) 第1の期間、胚体内胚葉細胞（DE）をFGFシグナル伝達経路活性化因子及びWntシグナル伝達経路活性化因子と接触させるステップ、b) ステップa)の細胞を、FGFシグナル伝達経路活性化因子、Wntシグナル伝達経路活性化因子、及びレチノイン酸（RA）シグナル伝達経路活性化因子と第2の期間接触させ、それによってDEを後部前腸細胞に分化させるステップ、及びc) 後部前腸細胞を基底膜マトリックスに埋め込み、後部前腸スフェロイドを第3の期間培養して、後部前腸細胞を胎児様肝臓オルガノイドに分化させるステップに従って作製される。

【0097】

本明細書では、本明細書で提供される胎児様肝臓オルガノイドも開示される。また、本明細書では、本明細書で提供される成熟肝臓オルガノイドも開示される。

【0098】

高ビリルビン血症肝臓オルガノイド

本明細書に開示されるように、高ビリルビン血症の特徴を示すモデル肝臓オルガノイドを調製することができる。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを産生する方法であって、方法は、肝臓オルガノイドを高／第2濃度のビリルビンと接触させ、それによって高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを形成することを含む、方法である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、胎児様肝臓オルガノイドである。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、成熟肝臓オルガノイド（例えば、低／第1濃度のビリルビンと接触させることによって調製された本明細書に開示されるもののいずれか1つ）である。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される方法で使用される場合、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、若しくは35日齢であるか、約それらであるか、少なくともそれらであるか、又は少なくとも約それらである、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲、例えば18～35、18～30、20～25、若しくは18～25日齢である。いくつかの実施形態では、ビリルビンの高／第2の濃度は、2～10mg/L、5～10mg/L、10mg/L、又は20mg/Lであるか、約それらであるか、それら超であるか、又は約それら超である。いくつかの実施形態では、ビリルビンの高／第2の濃度は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20mg/Lであるか、約それらであるか、それら超であるか、若しくは約それら超である、又は前述の濃度のいずれか2つによって定義される範囲内の任意の濃度、例えば、2～20mg/L、2～10mg/L、10～20mg/L、5～15mg/L、又は8～12mg/Lである。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドを、高／第2濃度のビリルビンと1、2、3、4、5、6、

7、8、9、若しくは10日間、又は前述の値のいずれか2つによって定義される範囲、例えば1～10、1～5、3～8、5～10、若しくは7～10日間接触させて、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを形成する。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドが、高／第2濃度のビリルビンで処理されていない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのUGT1A1若しくはNRF2、又はその両方を発現する。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドをグルココルチコイドアンタゴニストと更に接触させて、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症を低減する。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドをグルココルチコイドアンタゴニストと接触させることが、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドにおけるUGT1A1及びNRF2の発現を増加させ、ビリルビン抱合活性を増加させる。いくつかの実施形態では、グルココルチコイドアンタゴニストが、ケトコナゾール、ミフェプリストン、メチラポン、アミノグルテチミド、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドがアスコルビン酸を合成することができる。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質は、mGULOである。しかしながら、機能性GULOは代替的に、機能性GULOタンパク質を含む任意の他の動物種に由来してもよい。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子は、条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、遺伝子は、テトラサイクリン誘導系又は当技術分野において一般的に知られている条件付き発現のための任意の他の系を用いて条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは不活性UGT1A1遺伝子を含み、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドはクリグラー・ナジャー症候群のモデルである。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される胎児様肝臓オルガノイドの実施形態に由来する。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される肝臓オルガノイドの実施形態に由来する。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは、本明細書に開示されるか又は当技術分野で一般的に公知の肝臓オルガノイドの産生方法から産生される。

10

20

30

40

50

【0099】

また、本明細書では、本明細書で提供される高ビリルビン血症肝臓オルガノイドも開示される。

【0100】

外因性GULOを発現する肝臓オルガノイド及び細胞

また、本明細書では、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによってアスコルビン酸を合成することができる肝臓オルガノイドが開示される。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質は、mGULOである。しかしながら、機能性GULOは代替的に、機能性GULOタンパク質を含む任意の他の動物種に由来してもよい。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子は、条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、遺伝子は、テトラサイクリン誘導系又は当技術分野において一般的に知られている条件付き発現のための任意の他の系を用いて条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、CRISPR又は当技術分野において一般的に知られている遺伝子操作の任意の他の方法を用いて、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子で操作される。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方は、トランスフェクションによって成熟肝臓オルガノイドに導入される。

【0101】

いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのNRF2を発現する。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドは

、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養した場合に、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、低レベルのIL1B、IL6、若しくはTNFa、又はそれらの任意の組み合わせを発現する。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、任意選択でアスコルビン酸枯渇培地中で培養された場合、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して減少したカスパーゼ3活性を示す。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドが、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、高レベルのALBを発現する。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドは、門脈周囲肝組織に類似し、門脈周囲肝臓マーカーを発現する。いくつかの実施形態では、門脈周囲マーカーは、FAH、ALB、PAR、CPS1、HGD、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、増加したCYP3A4及びCYP1A2活性を示す。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、増加したビリルビン抱合活性を示す。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質を含む肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質を含まない肝臓オルガノイドと比較して、培養において増加した生存率を示す。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドはヒトである。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、不活性UGT1A1遺伝子を含み、肝臓オルガノイドはクリグラー・ナジャー症候群のモデルである。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイドは、多能性幹細胞から分化されている。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方で操作されており、それによって多能性幹細胞がアスコルビン酸を合成することができる。

20

【0103】

また、本明細書では、本明細書で提供される機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含む肝臓オルガノイドが開示される。

30

【0104】

また、本明細書では、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含み、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができる肝細胞が開示される。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質は、mGULOである。しかしながら、機能性GULOは代替的に、機能性GULOタンパク質を含む任意の他の動物種に由来してもよい。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子は、条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、遺伝子は、テトラサイクリン誘導系又は当技術分野において一般的に知られている条件付き発現のための任意の他の系を用いて条件付きで発現される。いくつかの実施形態では、肝細胞は、CRISPR又は当技術分野において一般的に知られている遺伝子操作の任意の他の方法を使用して、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子で操作される。いくつかの実施形態では、機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方は、トランスフェクションによって肝細胞に導入される。

40

【0105】

また、本明細書では、本明細書で提供される機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含む肝細胞が開示される。

【0106】

50

また、本明細書では、肝細胞におけるビリルビン抱合及び代謝を増加させる方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、機能性GULOタンパク質、及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を発現することを含み、それによって肝細胞がアスコルビン酸を合成することができる。いくつかの実施形態では、肝細胞は、本明細書に開示される肝臓オルガノイド（本明細書で提供される胎児様肝臓オルガノイド、成熟肝臓オルガノイド、及び高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの実施形態を含む）のいずれか等の肝臓オルガノイドの一部であってもよい。

【0107】

使用方法及び治療方法

本明細書では、それを必要とする対象において高ビリルビン血症を治療する方法が開示される。いくつかの実施形態では、方法は、グルココルチコイドアンタゴニストを、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、グルココルチコイドアンタゴニストは、ケトコナゾール、ミフェプリストン、メチラポン、アミノグルテチミド、又はそれらの任意の組み合わせである。

【0108】

本明細書では、高ビリルビン血症の治療のための化合物又は組成物をスクリーニングする方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドを化合物又は組成物と接触させること、及び高ビリルビン血症肝臓オルガノイドの高ビリルビン血症の改善を検出することを含む。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは、本明細書に開示される高ビリルビン血症肝臓オルガノイドのいずれかである。いくつかの実施形態では、高ビリルビン血症肝臓オルガノイドは、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含む。いくつかの実施形態では、改善を検出することは、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、UGT1A1若しくはNRF2、又はその両方の発現の増加を検出することを含む。いくつかの実施形態では、改善を検出することは、未処理の高ビリルビン血症肝臓オルガノイドと比較して、非抱合型ビリルビンに対する抱合型ビリルビンの相対的増加を検出することを含む。

【0109】

本明細書では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害を有する対象を治療する方法も開示される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に開示される肝臓オルガノイド又は肝細胞のいずれかを投与することを含む。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイド又は肝細胞は、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含む。いくつかの実施形態では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害は、高ビリルビン血症、黄疸、クリグラー・ナジャー症候群、ジルベール症候群、デュビン・ジョンソン症候群、又はローター症候群である。

【0110】

本明細書では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療のための薬物の製造における使用のための、本明細書に開示される肝臓オルガノイド又は肝細胞が開示される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイド又は肝細胞は、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA、又はその両方を含む。いくつかの実施形態では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害は、高ビリルビン血症、黄疸、クリグラー・ナジャー症候群、ジルベール症候群、デュビン・ジョンソン症候群、又はローター症候群である。

【0111】

また、本明細書では、それを必要とする対象におけるビリルビン代謝に関連する疾患又は障害の治療に使用するための本明細書に開示される肝臓オルガノイド又は肝細胞も開示される。いくつかの実施形態では、肝臓オルガノイド又は肝細胞は、機能性GULOタンパク質及び／又は機能性GULOタンパク質をコードする遺伝子若しくはmRNA又はその両方を含む。いくつかの実施形態では、ビリルビン代謝に関連する疾患又は障害は、高ビリルビン血症、黄疸、クリグラー・ナジャー症候群、ジルベール症候群、デュビン・ジ

ョンソン症候群、又はローター症候群である。

【実施例】

【0112】

実施例1. 材料及び方法動物

全ての動物実験は、治験審査委員会及び動物実験委員会の承認を得て行った。成体 Gunn (Gunn

Ug t l a l j / B l u H s d R r r c) ラット (繁殖ペア、9~12週齢) を Rat Resource & Research Center (RRRC, Columbia, MO) から入手した。ラットを、12時間:12時間の明暗サイクル下で、20~24℃の温度及び45~55%の相対的湿度に維持した、木材チップの床敷を備えた標準的なラットケージに収容した。全ての動物には、試験前に標準的な固形飼料 (Cincinnati Lab Supply, Cincinnati, OH) を自由に摂取させた。全ての動物を、施設のガイドライン及び規則に従って処置した。

【0113】

PSCの維持

ヒト iPSC 株、72.3 (RRID: CVCL_ALBW) を、CN. Mayhew 及び JM. Wells が共同管理する Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC) Pluripotent Stem Cell Facility から入手した。未分化 hiPSC を、ラミニン-511 E8 断片 (Nippi) でコーティングしたディッシュ上で、100 ng/mL の塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF; R&D Systems) を含む StemFit 培地 (Ajinomoto Company) 中、37℃、5% CO₂、95% 空気下で培養した。

【0114】

ヒト肝臓オルガノイド (HLO) 生成

多能性幹細胞を、ラミニン iMatrix 511 Silk でコーティングした 24 ウェルプレート上に 2×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し、Y-27632 を含む StemFit 培地で維持した。2 日目に、培地を新鮮な StemFit 培地と交換した。翌日、細胞をアクチビン A 及び BMP4 と混合した RPMI 培地で処理して、胚体内胚葉を生成した。4 日目に、培地を RPMI、アクチビン A 及び 0.2% dFBS と交換し、5 日目に 2% dFBS に変更した。6~8 日目から、細胞に、Advanced DMEM (B27、N2、10 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、及びゲンタマイシン-アンホテリシンを補充) 中の FGF4 及び CHIR99021 を供給して、後部前腸を誘導した。9 日目に、Accutase 処理を使用して細胞を単一細胞懸濁液に解離させた。次いで、この単一細胞懸濁液を 50% マトリゲル及び 50% EP 培地 (Advanced DMEM/F12、B27/N2/HEPES/Glutamax、5 ng/mL FGF2、10 ng/mL VEGF、3 μ M CHIR99021、500 nM A83-01、及び 50 μ g/mL アスコルビン酸) と混合し、6 ウェルプレートに 50 μ L の液滴として播種した。これらの細胞に EP 培地を 48 時間毎に 4 日間供給して、オルガノイドを生成した。次いで、これらのオルガノイドを、Advanced DMEM 及びレチノイン酸 (RA) で 48 時間毎に 4 日間処理して、肝系統を特定した。次いで、オルガノイドに、肝細胞培養培地 (HCM)、肝細胞増殖因子 (HGF)、オンコスタチン M、及びデキサメタゾンを 3~4 日毎に供給して、HLO を生成した。

【0115】

低用量ビリルビンによる HLO の成熟

HLO の成熟誘導のために、15 日目のオルガノイドに、低用量ビリルビン (1 mg/L) に加えてサプリメントを含む完全 HCM を供給した。この処理を、オルガノイドを回収する 30 日目まで続けた。明視野画像を KEYENCE BZ-X710 蛍光顕微鏡 (Keyence) で捕捉し、画像を ImageJ suite を使用して分析した。RNA を RNeasy ミニキット (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し

て単離した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を製造業者のプロトコルに従って使用して、逆転写を行った。qPCRは、Quant Studio 5リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific Inc.) でTaqMan遺伝子発現マスターミックス (Applied Biosystems) を使用して行った。各標的遺伝子の全てのプライマー及びプローブ情報を、Universal ProbeLibrary Assay Design Centerウェブサイト (World Wide Webのlifescience.roche.com/en_us/brands/universal-probe-library.htmlで利用可能) から得た。ホールマウント免疫染色のために、オルガノイドを4% PFAで固定し、0.1% PBSTで透過処理し、0.1% PBST中5%正常口バ血清でブロックし、適切な一次及び二次抗体で染色した。画像は、Nikon A1倒立共焦点顕微鏡で捕捉した。

10

20

30

40

50

【0116】

ビリルビン及び薬物処理

27日目に、成熟オルガノイドをビリルビン (1~10mg/L)、ドキシサイクリン (100ng/mL; 遺伝子発現を活性化する3日前に添加) 及び/又は更にヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、ケトコナゾール及びミフェプリストン (各々1~2μM) 等の薬物で5日間処理し、次いで下流アッセイのために採取した。ビリルビンアッセイを、比色キット (Abeam製のab235627) を使用して行った。RNeasyミニキット (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して、RNAを単離した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を製造業者のプロトコルに従って使用して、逆転写を行った。qPCRを、Quant Studio 5リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher) で、TaqMan遺伝子発現マスターミックス (Applied Biosystems) を使用して行った。各標的遺伝子の全てのプライマー及びプローブ情報は、Universal ProbeLibrary Assay Design Center (World Wide Webのlifescience.roche.com/en_us/brands/universal-probe-library.htmlから利用可能) から得た。画像は、KEYENCE BZ-X710蛍光顕微鏡 (Keyence) で捕捉した。

【0117】

門脈へのオルガノイド移植

HLOを27日目に採取し、反復ピペッティングによってオルガノイド断片に解離させ、PBSで洗浄し、2% FBS及びCEPTカクテル (50nMクロマン1、5μMエムリカサン、1:1000ポリアミン、及び7μMトランス-ISRIB) を含有するHCMで再懸濁させて生存率を増加させた。レシピエントラットを、移植の4日前に単回用量のレトリルシン (5mg/kg) 及びタクロリムス (0.8mg/kg) で処置した。正中切開を行い、腸を片側に押し、32gの1インチ針を使用して、出血を制御するために門脈を後方にクランプすることによって、門脈に200μL注入で 3×10^3 オルガノイド (およそ 5×10^5 細胞) を注入した。過剰な失血は、SURGICEL SNow Absorbable Hemostat (Ethicon) の適用によって防止した。次いで、動物を5-0 ビクリルコーティング外科用縫合糸 (Ethicon) 及びGL Uture (Zoetis Inc.) で閉じ、ブプレノルフィン (0.1mg/kg) を鎮痛剤として投与した。次いで、動物を、採取日まで3~4日毎にドキシサイクリン (2mg/kg) 及びタクロリムス注射で維持した。血液を、必要に応じて後眼窩法によって定期的に採取した。

【0118】

生細胞イメージング及び機能性アッセイ

オルガノイドのライブイメージングのために、CellDiscoverer 7 (Z

e i s s) を使用して、30分毎に7日間画像化した。ビリルビン抱合の可視化を、5 μ Mの蛍光UnaGを用いて達成し、これをHLO培地と共にインキュベートし、2日間撮像した。

【0119】

RNA配列決定及び解析

RNAを、RNeasyミニキット (Qiagen) を使用して単離した。逆転写を、RT-PCR用のHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を製造業者のプロトコルに従って使用して行った。qPCRは、QuantStudio 5リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) 上でTaqMan遺伝子発現マスターミックス (Applied Biosystems) を使用して行った。全ての試料をTaqMan遺伝子発現アッセイで増幅し、18S rRNA内在性対照で正規化した。RNA配列決定のために、抽出されたRNAの品質をAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) で評価した。TruSeq Stranded mRNAキット (Illumina) を使用して配列ライブラリーを調製し、NovaSeq 6000 (Illumina) を使用して配列決定した。リードをヒトゲノムアセンブリhg38に整列させ、疑似マッパーSalmon (v1.8.0) を使用して定量化した。遺伝子発現解析は、R BioconductorパッケージDESeq2 (v1.36.0) を用いて行った。読みだされたカウント行列をサイズ因子によって正規化し、分散安定化変換 (VST) を正規化された発現データに適用した。clusterProfiler (v.4.4.1) 及びpheatmap (v1.0.12) パッケージを使用してデータを可視化した。

10

20

【0120】

あるいは、HLO (ビリルビンで処理したもの及びミフェプリストンで処理したものを含む) の全トランスクリプトームRNA配列決定を、Illumina NovaSeqプラットフォーム上でNovogene Co, Ltd. (Beijing, China) のサービスを使用して、単離された全RNAから行った。RNA配列決定パラメータは、試料当たり20Mリードの深さでの150bpペアエンド配列決定だった。各試料のFastqリードファイルを取得し、次いで、RNA-seqデータを使用して転写物を整列及び定量化する疑似マッピングツールであるSalmonを使用して整列させた。生の転写産物カウント及び100万個あたりの正規化された転写産物 (TPM) 値を取得して、DESeq2を用いて差次的発現について分析した。差次的発現については、統計的及び生物学的有意性を、 $P < 0.05$ 、 $FDR < 0.05$ 、 $\log$ 変化倍数 > 1 に設定し、6つの試料のうちの3つの試料の3つの転写物カウントの最低を用いた。ヒートマップ視覚化及び階層的クラスタリング分析については、hclust及びpheatmapをそれぞれ使用した。最後に、Rバージョン4.0.3のbiomaRt及びorg.Hs.eg.dbを使用して経路分析を行った。

30

【0121】

mGULO編集

【0169】マウスGULO (L-グルノラクトンオキシダーゼ) (mGULO) cDNA配列をNCBIから検索した。5'リンカー及びKozak配列を配列の最初に付加し、HAタグを配列の最後に付加した。更に、P2A-mCherryをHAタグの後に付加し、3'リンカーを最後まで付加した。次いで、カスタム遺伝子を合成し、制限部位AflII及びAgeIを使用してpAAVS1-ND1-CRISPR1 (Gen1) PCSF #117ベクターにクローニングした。ベクターはTEtON系を有し、次いで、Gateway技術を用いてNeo^r選択マーカーを挿入した。

40

【0122】

mGULO iPSC生成及び維持

次いで、改変GULO配列を有するPCSF #117ベクターを、レンチウイルス媒介CRISPR/Cas9を使用して、72.3 iPSC細胞株のAAVS1遺伝子座

50

に挿入した。次いで、G418を使用して正しいクローンを選択した。次いで、生存クローンを、PCRを使用して、正確な挿入、ランダムな挿入及びコピー数について検証し、DNA配列決定によって検証した。次いで、編集されたiPSCを、ラミニンiMatrix-511Silkコーティング細胞培養プレート上に播種し、Y-27632を含むStemFit Basic04完全型培地で維持した。細胞を、継代40(p40)までAccutaseを用いて4~7日毎に継代した。本明細書に記載のHLO生成プロトコルに従って、mGULO HLOを生成した。mGULOタンパク質発現を、GLUO ELISAキット(MyBioSource, San Diego, カリフォルニア州製のMBS2890737)を用いて検証した。

【0123】

ビリルビンによるmGULO HLO処理及びビリルビン可視化

24日目に、mGULO HLOをドキシサイクリン(Dox)(100ng/mL)で処理して、mGULO発現を誘導した。続いて、27日目に、成熟オルガノイドをビリルビン及びDoxで5日間処理し、次いで下流アッセイのために採取した。比色キット(ab235627)及びビリルビンの結合時にのみ蛍光を発する緑色から暗色への光スイッチング蛍光タンパク質であるUnaGを使用して、ビリルビンアッセイを行って、非抱合型及び抱合型ビリルビンを測定し、可視化した。画像は、KEYENCE BZ-X710蛍光顕微鏡(Keyence)で捕捉した。

【0124】

ChIP-PCR及びChIP-qPCR

ChIP実験は、High Sensitivity ChIP Kit(Abeam)を使用して行った。簡潔には、オルガノイドをPFAで固定し、次いで、全クロマチンを調製し、300bpの最適サイズに超音波処理し、これをゲル電気泳動によって確認した。クロマチンを、EP300抗体又はIgG1アイソタイプ対照のいずれかとの免疫沈降に使用した。PCR及びqPCR用のカスタムプライマーを使用してDNA断片を増幅し、濃縮倍率データをIgG対照からの免疫沈降に対して正規化した。

【0125】

タンパク質発現アッセイ

アルブミン分泌を、HCM中で培養し、使用まで-80℃で保存したHLOから200µLの上清を回収することによって、測定した。上清は、製造業者の指示に従って、Human Albumin ELISA Quantitation Setキット(Bethyl Laboratories)を用いてアッセイした。

【0126】

マウスGULO発現アッセイについては、オルガノイドを解離させ、PBSで洗浄した。次いで、細胞をRIPA溶解抽出緩衝液及びHalt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail(Thermo Scientific)で溶解して総タンパク質を抽出し、製造業者の指示に従ってマウスGULO/レグロノラクトンオキシダーゼELISAキット(MyBioSource.com)を用いてアッセイした。

【0127】

代謝産物アッセイ

ビリルビンレベルは、ビリルビンで処理したHLOの上清及びラットの血清を回収することによって測定した。上清及び血清を、製造業者の説明書に従ってビリルビンアッセイキット(Total and Direct, Colorimetric)(abeam)及びビリルビンアッセイキット(Sigma-Aldrich)でアッセイした。

【0128】

細胞抗酸化剤レベルを、HLOを回収し、PBS中で洗浄し、それらを96ウェルアッセイプレートにプレーティングすることによって測定した。次いで、製造業者の指示に従ってCellular Antioxidant Assay Kit(abeam)を使用して、レベルを定量した。

10

20

30

40

50

【0129】

活性アッセイ

CYP3A4及びCYP1A2アッセイは、HLOを回収し、PBS中で洗浄し、それらを96ウェルアッセイプレートにプレーティングし、それらをそれぞれリファンピシン及びオメブラゾールで24時間処理することによって行った。次いで、P450-Glo CYP3A4及びCYP1A2アッセイ(Promega)を使用してアッセイを行い、製造業者の指示に従ってCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assayを使用して正規化した。

【0130】

アポトーシスアッセイは、HLOを溶解し、製造業者の指示に従ってCaspase-3 Assay Kit (Colorimetric) (abeam)で溶解物をアッセイすることによって行った。

【0131】

ラット血清を、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性アッセイキット及びアラントランスアミナーゼ(ALT)活性アッセイキット(Sigma-Aldrich)でアッセイした。

【0132】

定量化及び統計解析

統計解析は主に、独立両側スチューデントt検定、Dunn-Holland-Wolfe検定、又はウェルチ検定を用いてR software v4.2.0を使用して行った。剛性測定のための統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル-ウォリス検定及び事後Dunn-Holland-Wolfe検定を使用して行った。2つの独立群間の比較のために、群が独立しており、分散が等しくない場合、別段の記載がない限り、ノンパラメトリックブルナー-マンゼル検定を行った。P値<0.05を統計的に有意とみなした。N値は生物学的に独立した反復を指す。画像分析は非盲検だった。

【0133】

実施例2. 低用量は胎児様肝臓オルガノイドの成熟を促進する

肝臓発生に対するビリルビンの役割を、ヒト肝臓オルガノイドモデルを使用して調査した。図1Aは、ヒト胎児生理学的濃度に類似する低濃度のビリルビン(例えば、1mg/L)で処理した肝臓オルガノイドを調製するための例示的な概略図を示す(成人の生理学的濃度の約10倍低い)。ビリルビン、肝系統に分化した初期オルガノイドに添加する。肝臓オルガノイドを産生する例示的な方法は、例えば、PCT公開第WO2018/085615号、同第WO2018/191673号、同第WO2018/226267号、同第WO2019/126626号、同第WO2020/023245号、同第WO2020/069285号、同第WO2020/243613号、同第WO2021/030373号、及び同第WO2021/262676号において以前に調査されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。これらの例示的な方法に基づいて、低濃度のビリルビン、後部前腸内胚葉のレチノイン酸誘導後に形成される肝臓オルガノイドに添加した。肝臓オルガノイドは、標準的な肝細胞培養培地(HCM)中でビリルビンと共に培養することができる。例えば、肝細胞培養培地には、限定されないが、肝細胞増殖因子(HGF)、オンコスタチンM、及び/又はデキサメタゾンを含む肝細胞増殖因子を補充してもよい。肝臓オルガノイドを、1mg/Lビリルビンを含む増殖培地と少なくとも5~10日間接触させて、肝臓オルガノイド成熟を促進した。

【0134】

図1Bは、1mg/Lビリルビンで成熟させた肝臓オルガノイドが、肝組織に見られる天然構造である毛細胆管に類似する管腔突起を示したことを示す。得られた成熟肝臓オルガノイドは、ビリルビンで処理しなかった対照肝臓オルガノイドの管腔と比較して、より小さいサイズ及び減少した円形度を有する管腔を示す図1C。

【0135】

ビリルビン処理肝臓オルガノイドのRT-qPCRによる遺伝子発現定量により、これらのオルガノイドが、未処理オルガノイドと比較して、アルブミン（ALB）、溶質輸送体ファミリー4メンバー2（SLC4A2）、及びヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）等の成熟肝臓マーカーの発現の増加、並びにアルファフェトプロテイン（AFP）、ホメオボックスタンパク質NANOG、及び尾側型ホメオボックス2（CDX2）等の未熟又は胎児肝臓マーカーの発現の減少を示すことが明らかになった図1D。

【0136】

ビリルビン処理オルガノイドの薬物代謝能力を、リファンピシン及びオメプラゾールによる処理後にシトクロムP450 3A4（CYP3A4）及びシトクロムP450 1A2（CYP1A2）活性を測定することによって評価した。ビリルビン処理オルガノイドは、対照未処理オルガノイドと比較して増加したシトクロム活性を示した図1E。

10

【0137】

免疫蛍光顕微鏡法により、ビリルビン処理オルガノイドは、シトクロムP450 2E1（CYP2E1）、シトクロムP450 7A1（CYP7A1）、多剤耐性タンパク質1（MPR1）、多剤耐性関連タンパク質3（MRP3）、プロスポホメオボックス1（PROX1）及び有機アニオン輸送ポリペプチド2（OATP2）を含む成熟肝酵素及び輸送タンパク質を発現することが示された（図1F～H）。

【0138】

したがって、生理学的条件に類似する低濃度のビリルビンの使用は、培養において肝臓オルガノイドの成熟を誘導する。

20

【0139】

実施例3．アスコルビン酸は、肝臓オルガノイド生存率を促進し、GULOは門脈周囲様同一性を誘導する

肝臓発生に対するアスコルビン酸の役割を、ヒト肝臓オルガノイドモデルを使用して調査した。アスコルビン酸を欠く培地中で培養された肝臓オルガノイドは、生存率の喪失及びアポトーシスを示した（図2A）。アスコルビン酸は、非機能性L-グルロノラクトンオキシダーゼ（GULO）酵素のためにヒト細胞が天然に合成することができない必須栄養素であるため、この結果は予想された。

【0140】

ヒト及びモルモット等のいくつかの他の哺乳動物とは異なり、多くの他の哺乳動物は、機能性GULO遺伝子を有し、アスコルビン酸を酵素的に合成することができる。アスコルビン酸は肝臓発生に重要であるので、肝臓オルガノイド中で外因性GULOを発現させると、培養において成長及び成熟が改善されると仮定された。

30

【0141】

図2Bは、CRISPR/Cas9を使用するTetOn条件的発現系によって駆動されるGULO発現構築物を用いてヒト多能性幹細胞を遺伝子操作するための例示的な概略図を示す。GULOを細胞に外因的に導入する代替的な方法を使用してもよいことが想定される。更に、本明細書ではマウス由来のGULO遺伝子（mGULO）を使用したか、他の哺乳動物由来の類似の機能性GULO遺伝子を使用してもよい。図2Cは、可視化のためのmCherry蛍光レポーターに作動可能に連結されたGULO遺伝子の実施形態、及び使用したpAAVSL-NDI-CRISPRi（Gen 1）ベクターを示す。

40

【0142】

多能性幹細胞を、従来のアプローチによってmGULO条件的発現構築物で操作し、これらのmGULO幹細胞を、以前に記載された方法によって肝臓オルガノイドに分化させた（図2D）。本明細書に提供されるように、これらの肝臓オルガノイドは、肝臓オルガノイドの成熟を促進するために低用量のビリルビンと共に培養されてもよい。図2Eは、mGULO構築物を発現する肝臓オルガノイド（「mGULOオルガノイド」）の明視野及び蛍光顕微鏡画像を示し、mCherry発現は、ドキシサイクリン（Dox）を適用してTetOn発現を誘導した場合にのみ観察され、肝臓オルガノイドにおけるmGULOの共発現を示唆している。アスコルビン酸枯渇培地で増殖させると、mGULOオルガ

50

ノイドは重度のアポトーシスを受けるが、ドキシサイクリンを添加してmGULO発現を誘導すると生存性がレスキューされ、これにより肝臓オルガノイドがそれら自体のアスコルビン酸を合成することが可能になる（図2F）。mGULOオルガノイドは、Dox濃度とELISAによって決定されるGULO発現との間及び細胞抗酸化アッセイキット（abeam）を使用した抗酸化レベルとの間の用量依存的相関を示し、アスコルビン酸の合成を示唆している（図2G）。

【0143】

酸化ストレス応答及び炎症に関与する遺伝子の発現レベルを、100 ng/mLのDoxを添加した又は添加していないアスコルビン酸枯渇培地で培養したmGULOオルガノイドにおいてRT-qPCRによって調査した（図2H）。細胞保護タンパク質調節因子核因子赤血球系2関連因子2（NRF2）のアスコルビン酸媒介性発現は、Doxで処理したmGULOオルガノイドでは、対照及びDoxで処理しなかったmGULOオルガノイドと比較して上昇していた。炎症性サイトカインであるインターロイキン1ベータ（IL1B）、インターロイキン6（IL6）、及び腫瘍壊死因子アルファ（TNFa）は、アスコルビン酸飢餓オルガノイドにおいて上昇し、有意な酸化的ストレスを示唆したが、炎症因子のこの発現は、Doxで処理したmGULOオルガノイドにおいては対照と類似するようレスキューされた。同様に、カスパーゼ-3活性はアスコルビン酸欠乏mGULOオルガノイドにおいて増加し、アポトーシスの増加を示唆したが、Doxへの曝露時にベースラインに戻った（図2I）。

【0144】

Doxで処理したmGULO肝臓オルガノイドのRNA配列決定（RNA-seq）は、肝臓成熟及び／又は肝臓の門脈周囲ゾーンに関連するマーカーの発現増加を明らかにした（図2J）。mGULOオルガノイドでの発現増加は、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ（FAH）、アルブミン（ALB）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）、シトクロムP450 3A4（CYP3A4）、カルバモイル-リン酸シンターゼ1（CPS1）、及びホモゲンチジン酸オキシダーゼ（HGD）で観察された。一般に、門脈周囲経路に関連する遺伝子の発現は、Doxで処理したmGULOオルガノイドにおいて観察された（図2K）。

【0145】

Dox及び1 mg/Lのビリルビンで処理したmGULOオルガノイドの顕微鏡観察は、ビリルビンを含まない対照オルガノイド及びビリルビン処理オルガノイド（mGULOを発現していない）と比較して、ますます複雑かつ不規則な管腔形状を示した（図2L）。図2Mは、対照と比較した、ビリルビン有り又は無しのmGULOオルガノイドの管腔の相対的なサイズ及び円形度を示す。更に、ビリルビンで処理したmGULOオルガノイドではアルブミン分泌が有意に増加する（図2N）。mGULOオルガノイドは、様々な濃度のDox（10、100、1000 ng/mL）で処理した場合に、肉眼的形態を維持する。（図2O）。Dox及び低用量ビリルビンで処理したmGULOオルガノイドはまた、非mGULOオルガノイド又は対照と比較して、リファンピシン又はオメプラゾール傷害に応答して増加したCYP3A4及びCYP1A2活性を示す（図2P）。

【0146】

タンパク質UnaGは、非抱合型ビリルビンに高度に特異的に結合して、蛍光を発するアポタンパク質を形成する。抱合型ビリルビン、ビリベルジン、又はウロビリンを含む他のビリルビン関連化合物は、UnaG蛍光を発する同一の能力を有さない（図2Q）。したがって、UnaGを使用して、ビリルビン抱合活性を、Dox有り又は無しのmGULOオルガノイドにおいて測定した。非誘導と比較して、Dox誘導mGULOオルガノイドにおいてUnaG蛍光の減少が観察され、抱合活性のために、より少ないビリルビンがUnaGに結合していることが示された（図2R）。UnaGについての更なる情報は、Kumagaiら、Abilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. Cell (2013) 153 (7) : 1602-11に見出すことができ、その全体は、参照することにより本明細書

10

20

30

40

50

中で明示的に援用される。

【0147】

UnaGアッセイを使用してビリルビンを抱合したオルガノイドの総百分率並びにオルガノイド生存率を定量化すると、抱合活性及び生存率が、適用したDoxの濃度によって表されるmGULO発現と共に増加することが示された(図2S)。全体として、これは、GULO発現で強化された場合、ヒト肝臓オルガノイドにおいて有意な成熟及び形態学的特定が起こることを示唆している。したがって、細胞内アスコルビン酸は胎児様肝臓オルガノイドの成熟を促進し、外因性GULOの導入は、任意選択で低用量ビリルビンと併せて、肝臓オルガノイドの生存率を改善するために使用することができる。

【0148】

実施例4. 高ビリルビン血症肝臓オルガノイドモデル

(0196) 肝臓オルガノイドを培養において様々な濃度のビリルビンで処理して、高ビリルビン血症表現型を誘導した。図3Aは、多能性幹細胞から分化した肝臓オルガノイドにビリルビンを1、2、5、又は10mg/Lで適用した、このプロセスの概略図を示す。肝臓オルガノイドは、増加する濃度のビリルビンへの曝露時に有意な形態学的変化及びビリルビンの細胞内蓄積を示し、これらのオルガノイドが高ビリルビン血症のモデルとして使用されてもよいことを示した(図3B)。RT-qPCRにより、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼファミリー1メンバーA1(UGT1A1)及びNRF2の発現が、ビリルビン用量に対応して増加したことが明らかになった(図3C)。UGT1A1は、肝臓で生じるビリルビンのグルクロン酸抱合に関与する酵素であり、このことは排出のためにビリルビンを水溶性にするために必要とされる。

【0149】

ビリルビんクリアランスにおけるUGT1A1の関与及びビリルビン機能不全に関連する疾患のモデルのための肝臓オルガノイドの使用を更に調査するために、体内からビリルビン除去することができないことを特徴とする遺伝的障害であるクリグラー・ナジャー症候群と診断された患者から細胞を得た図30。患者の細胞の遺伝子配列決定により、UGT1A1遺伝子におけるc.858C>A(p.Cys280X)ナンセンス突然変異が明らかになった。

【0150】

従来によって患者の細胞から生成された人工多能性幹細胞は、標準的な多能性マーカーSox2及びOct4を発現することが確認された(図3E)。これらのiPSCを、以前に記載された方法に従って、胚体内胚葉に、更に肝臓オルガノイドに首尾よく分化させ(図3F)、それによってクリグラー・ナジャー症候群肝臓オルガノイド(「CNSオルガノイド」又は「CNS HLO」)をもたらした。これらのCNS HLOの機能性肝臓表現型は、AFPの発現によって確認された。(図3G)

【0151】

不活性UGT1A1遺伝子のため、ビリルビンを抱合することができないこれらのCNS HLOの処置は、10mg/Lビリルビンで処理した場合に肝臓オルガノイド毒性をもたらした(図3H)。しかしながら、ビリルビンによるこの毒性は、外因性UGT1A1 mRNAをCNS HLOにトランスフェクトした場合に一時的に救済することができた(図3I)。非抱合型ビリルビン(UCB)及び抱合型ビリルビン(CB)のアッセイ定量化は、CNS HLOはビリルビンを抱合することができなかったが、mRNA送達によるUGT1A1の異所性発現が、あるレベルのビリルビン抱合を可能にしたことを示した(図3J)。同様に、正常なHLOにおけるmGULO発現もビリルビン抱合を増加させた(図3K)。

【0152】

したがって、ビリルビンはUGT1A1によって抱合され、クリグラー・ナジャー症候群の肝臓オルガノイドモデルにおける機能性UGT1A1の発現は、ビリルビン抱合機能を回復させ、肝臓オルガノイドの生存率を改善した。このことは、これらの肝臓オルガノイドがビリルビン機能不全を研究するために使用されてもよいことを示唆している。

10

20

30

40

50

【0153】

実施例5．UGT1A1は、グルココルチコイドシグナル伝達によって負に調節される。

グルココルチコイドは、ヒトにおける血清ビリルビンレベルの増加に関与している。したがって、グルココルチコイドシグナル伝達調節の効果を、肝臓オルガノイドモデルを使用して調査した。

【0154】

通常の肝臓オルガノイド（条件付きで発現したmGULOではない）を10mg／Lビリルビン中で培養して高ビリルビン血症表現型を誘導し、グルココルチコイドアゴニストであるヒドロコルチゾン又はデキサメタゾンで処理したが、これは更なるオルガノイド毒性（図4A）及びビリルビン抱合能の低下（図4B）を引き起こした。逆に、グルココルチコイドアンタゴニストケトコナゾール及びミフェプリストンで処置した高ビリルビン血症オルガノイドは、正常なオルガノイド形態を示し（図4C）、ビリルビン抱合を増加させた（図4D）。RT-qPCRは、UGT1A1発現が、ヒドロコルチゾン又はデキサメタゾンでの処置時に抑制され、ケトコナゾール又はミフェプリストンでの処置時に上昇することを明らかにした（図4E）。NRF2発現は、ケトコナゾール又はミフェプリストン処置によっても改善された。したがって、グルココルチコイド経路は、肝臓オルガノイドにおけるビリルビン代謝及びクリアランスにおいてある役割を有することが示された。

【0155】

RNA配列決定及び対照オルガノイドとミフェプリストンで処置したオルガノイドとの間の遺伝子発現の比較は、肝機能に関与する多くの遺伝子の濃縮を示した（図4F）。これらの濃縮遺伝子を、酸化的ストレス及び／又は異物代謝に関与する遺伝子のいずれかとして更に分類した（図4G）。

【0156】

ミフェプリストン又はデキサメタゾンで処置された高ビリルビン血症オルガノイドのChIP-PCR及びChIP-qPCRは、メチルCpG結合タンパク質2（MECP2）がUGT1A1遺伝子のサイレンシングに関与し、ミフェプリストンでの処置がこのサイレンシングを逆転させることを示した（図4H）。

【0157】

実施例6．HLOの同所移植はげっ歯類における高ビリルビン血症を軽減する。

インビボ高ビリルビン血症ラットモデルへの肝臓オルガノイド組成物投与の効果を調査した。ビリルビン抱合酵素のUGT1Aファミリーの全てのメンバーが欠損しているGunnラットは、生涯にわたって非抱合型高ビリルビン血症を示す。図5Aは、ヒト肝臓オルガノイド組成物を使用してGunnラットモデルに対するビリルビン抱合能を回復させる例示的な概略図（実施例1にも記載されている）を示す。

【0158】

図5Bは、HLOを移植したGunnラットにおけるアルブミン産生の上昇を示し、肝機能の増加を示唆する。図5Cは、HLO移植ラットにおける血性ビリルビン濃度の減少を示し、ビリルビン抱合及びクリアランスの改善を示唆する。図5Dは、HLO移植ラットにおけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の血清濃度の減少を示し、高レベルのAST及びALTは肝損傷を示し、HLO移植ラットがより健康な肝機能を示すことを示唆している。

【0159】

前述した実施形態の少なくともいくつかでは、実施形態で使用される1つ以上の要素は、そのような置き換えが技術的に実現可能でない場合を除いて、別の実施形態で互換的に使用することができる。当業者は、特許請求される主題の範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法及び構造に対して、他の様々な省略、付加、及び改変を行うことができることを理解されよう。そのような全ての改変及び変更は、添付の特許請求の範囲によって規定されるように、主題の範囲内に含まれることが意図されている。

【0160】

本明細書における実質的に全ての複数及び／又は単数の用語の使用に関して、当業者は、文脈及び／又は用途に適切であるように、複数から単数へと、及び／又は単数から複数へと言い換えることができる。明確にするために、様々な単数／複数の置き換えを本明細書において明確に説明することができる。

【0161】

一般に、本明細書で使用される用語、特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）で使用される用語は、一般に「非限定」用語として意図される（例えば、「含む」という用語は、「含むがこれに限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む」という用語は、「含むがこれに限定されない」と解釈されるべきであるなど）ことが当業者によって理解されるであろう。導入される請求項の詳述の具体的な数が意図されている場合には、そのような意図は、この請求項で明示的に詳述され、そのような詳述が存在しない場合にはそのような意図は存在しないことを当業者は更に理解するであろう。例えば、理解の補助として、下記の添付された特許請求の範囲は、請求項の詳述を導入するために、導入的語句「少なくとも1つ」及び「1つ以上」の使用を含む場合がある。しかしながら、そのような句の使用は、同じ請求が導入句「1つ以上」又は「少なくとも1つ」及び「a」又は「an」などの不定冠詞を含む場合であっても、不定冠詞「a」又は「an」による請求の記載の導入が、そのような導入された請求の記載を含む任意の特定の請求を、1つのみのそのような記載を含む実施形態に限定することを暗示するように解釈されるべきではない（例えば、「a」及び／又は「an」は、「少なくとも1つ」又は「1つ以上」を意味するように解釈されるべきである）。同じことが、請求項の詳述を導入するために使用される定冠詞の使用にも当てはまる。加えて、導入される請求の記載の特定の数が明示的に記載されている場合であっても、当業者は、そのような記載が少なくとも記載された数を意味すると解釈されるべきであることを認識するであろう（例えば、他の修飾語句を伴わない「2つの記載」という明白な記載は、少なくとも2つの記載、又は2つ以上の記載を意味する）。更に、「A、B、及びCの少なくとも1つ等」に類似する慣習が使用される場合では、通常、そのような構文は、当業者がこの慣習を理解するであろう意味が意図されている（例えば、「A、B、及びCの少なくとも1つを有するシステム」には、Aのみ、Bのみ、Cのみ、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、並びに／又はA、B、及びCと一緒に有するシステム等が含まれるがこれらに限定されないであろう）。A、B、又はCの少なくとも1つ等」に類似する慣習が使用されている場合では、通常、そのような構文は、当業者がこの慣習を理解するであろう意味が意図されている（例えば、「A、B、又はCの少なくとも1つを有するシステム」には、Aのみ、Bのみ、Cのみ、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、並びに／又はA、B、及びCと一緒に有するシステム等が含まれるがこれらに限定されないであろう）。2つ以上の代替用語を提示する実質的に任意の選言的単語及び／又は句は、説明、特許請求の範囲、又は図面にかかわらず、用語のうちの1つ、用語のいずれか、又は両方の用語を含む可能性を企図すると理解されるべきであることが、当業者によって更に理解されるであろう。例えば、語句「A又はB」は、「A」又は「B」又は「A及びB」の可能性を含むと理解されるであろう。

【0162】

加えて、本開示の特徴又は態様がマーカッシュグループによって説明されている場合、これにより、本開示は、マーカッシュグループの任意の個々のメンバー又はメンバーのサブグループによっても説明されることを当業者は認識するであろう。

【0163】

当業者に理解され得るように、文書として記述するという観点等のあらゆる目的のために、本明細書で開示されている全ての範囲は、あらゆる可能な部分範囲及びこれらの部分範囲の組み合わせも包含する。列挙されているあらゆる範囲を、少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分等に分解される同じ範囲を十分に説明して可能にすると容

10

20

30

40

50

易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で考察される各範囲を、下3分の1、中3分の1及び上3分の1等に容易に分解することができる。当業者にも理解され得るように、「最大」、「少なくとも」、「超」、「未満」等の全ての言葉は、詳述される数を含み、本明細書で考察されるように後に部分的範囲に分解され得る範囲を指す。最後に、当業者に理解されるように、範囲は各個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3つの項目を有するグループは、1、2、又は3つの項目を有するグループを指す。同様に、1～5つの項目を有するグループは、1、2、3、4、又は5つの項目を有するグループを指し、以下同様である。

【0164】

本明細書では様々な態様及び実施形態が開示されているが、当業者にはその他の態様及び実施形態が明らかであるであろう。本明細書で開示されている様々な態様及び実施形態は説明を目的としており、限定していることを意図されておらず、真の範囲及び趣旨は下記の特許請求の範囲で示される。

【0165】

公開及び未公開の出願、特許、及び文献の参照を含むがこれらに限定されない、本明細書で引用される全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、本明細書の一部となる。参照により組み込まれる刊行物及び特許又は特許出願が明細書に含まれる開示と矛盾する範囲まで、明細書は、そのような矛盾する資料に優先する、及び／又は優先することを意図している。

【0166】

参考文献

Ang, Lay Teng, et al. A roadmap for human liver differentiation from pluripotent stem cells. Cell reports (2018) 22 (8) : 2190–2205.

Brosch et al. Epigenomic map of human liver reveals principles of zonated morphogenic and metabolic control. Nat. Comm. (2018) 9 (1) : 4150.

Buning et al. Higher hydrocortisone dose increases bilirubin in hypopituitary patients—results from an RCT. Eur. J. Clin. Invest. (2016) 46 (5) 475–80.

Creeden et al Bilirubin as a metabolic hormone: the physiological relevance of low levels. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2021) 320 (2) : E191–E207.

Harrison et al. Liver Organoids: Recent Developments, Limitations and Potential. Front. Med. (Lausanne) (2021) 8 : 574047.

Steeg et al Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. J. Clin. Invest. (2012) 122 (2) : 519–28.

Strauss et al. Crigler–Najjar Syndrome Type 1: Pathophysiology, Natural History, and Therapeutic Frontier. Hepatology (2020) 71 (6) : 1923–1939.

Teixeira et al. Neonatal Vitamin C and C

10

20

30

40

50

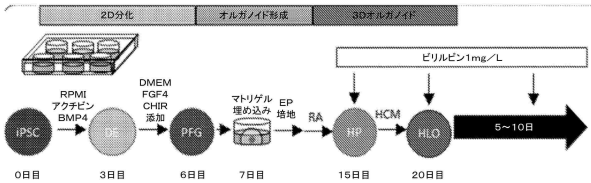
ysteine Deficiencies Program Adult Hepatic Glutathione and Specific Activities of Glucokinase, Phosphofructokinase, and Acetyl-CoA Carboxylase in Guinea Pigs' Livers. Antioxidants (Basel) (2021) 10 (6) : 953.

Traber & Stevens. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. Free Radic. Biol. Med. (2011) 51 (5) : 1000-13.

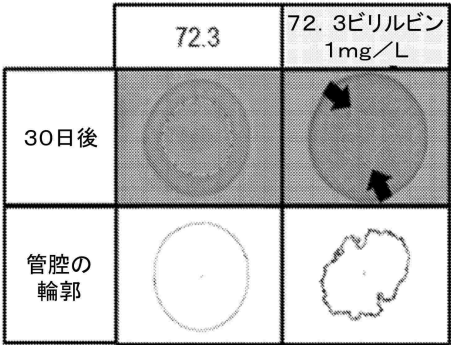
Zhang et al. Human iPSC-Derived Posterior Gut Progenitors Are Expandable and Capable of Forming Gut and Liver Organoids. Stem Cell Reports (2018) 10 (3) : 780-793.

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

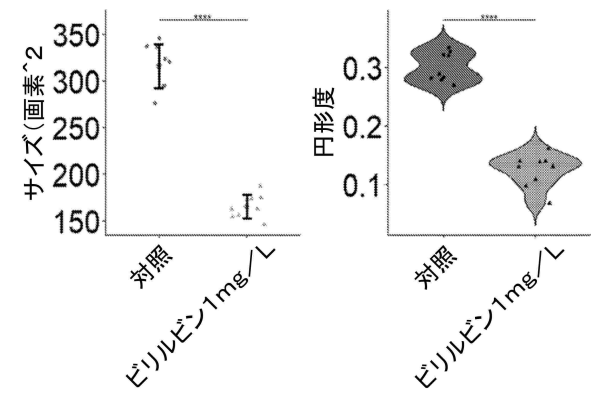
20

30

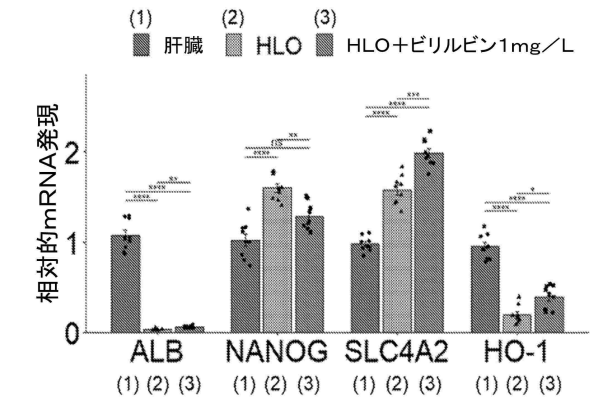
40

50

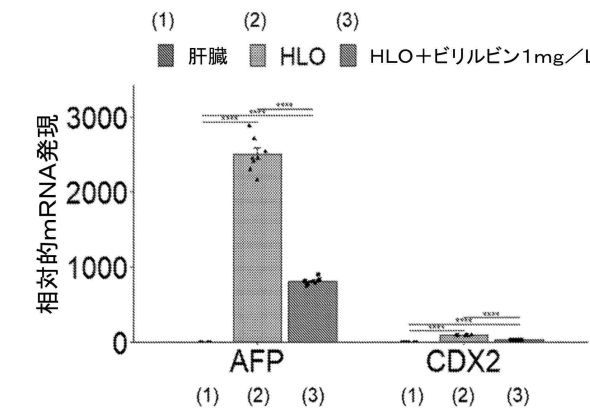
【図 1 C】



【図 1 D】

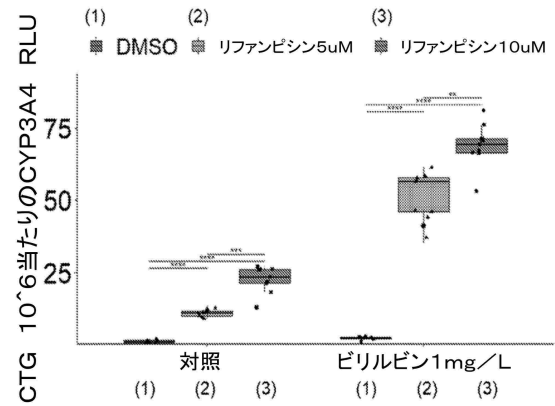


10

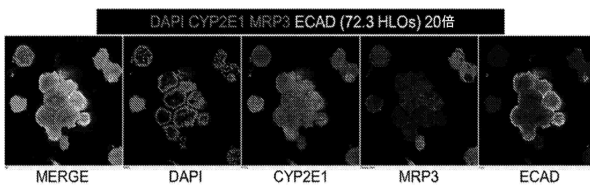


20

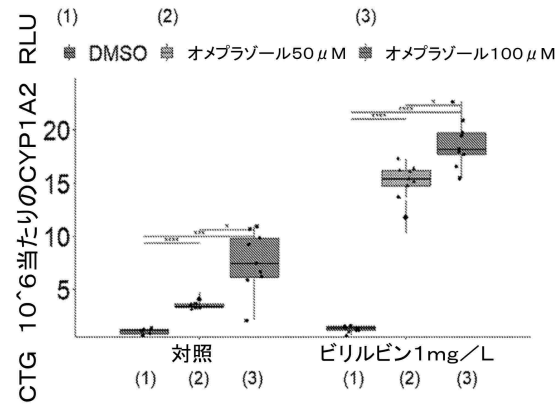
【図 1 E】



【図 1 F】



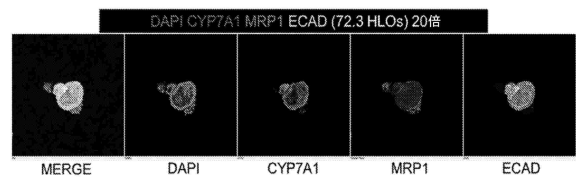
30



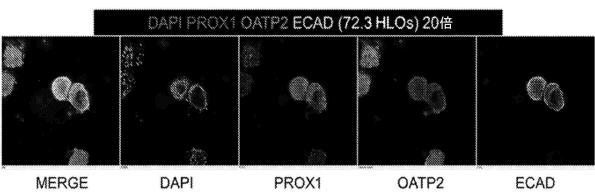
40

50

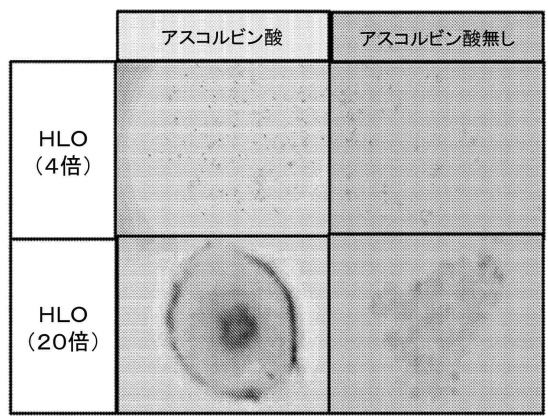
【図 1 G】



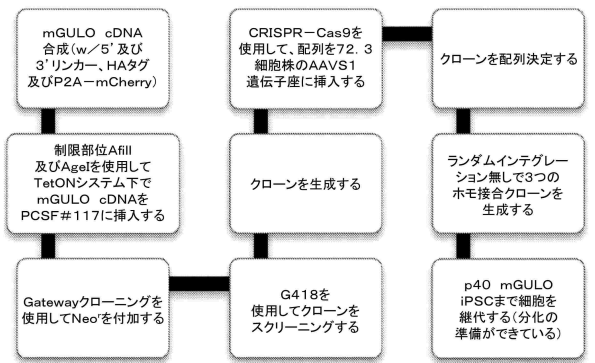
【図 1 H】



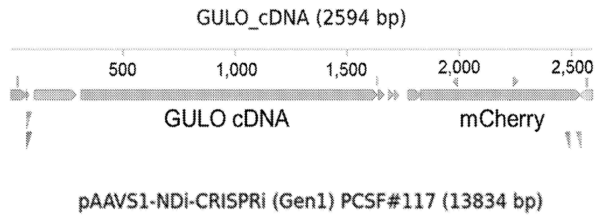
【図 2 A】



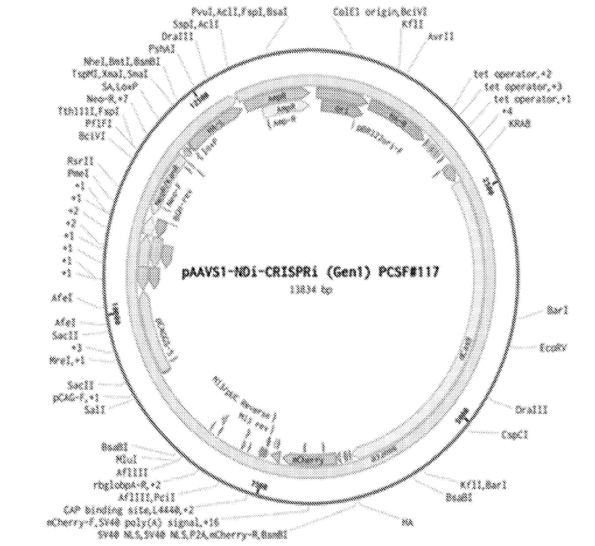
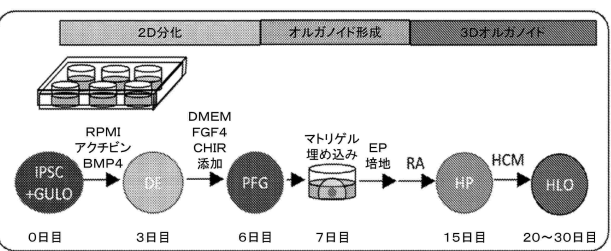
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

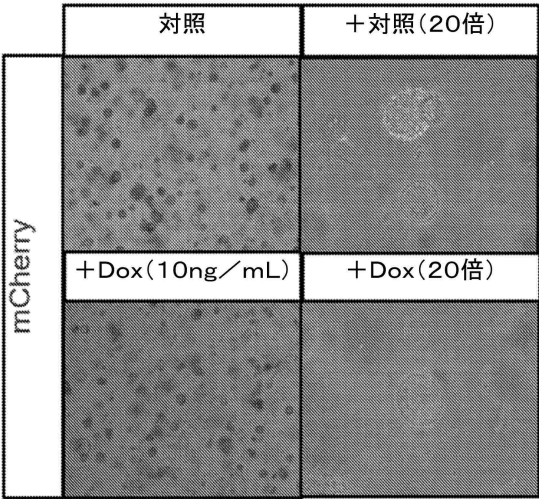
20

30

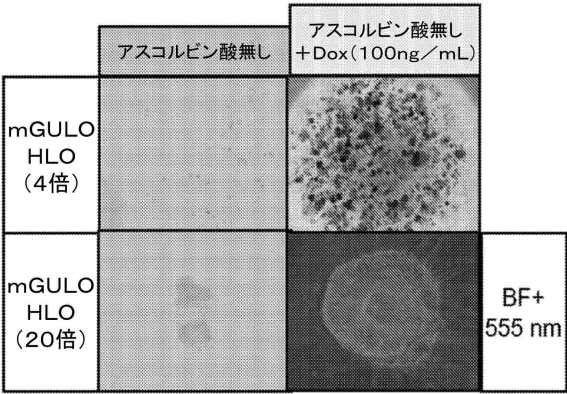
40

50

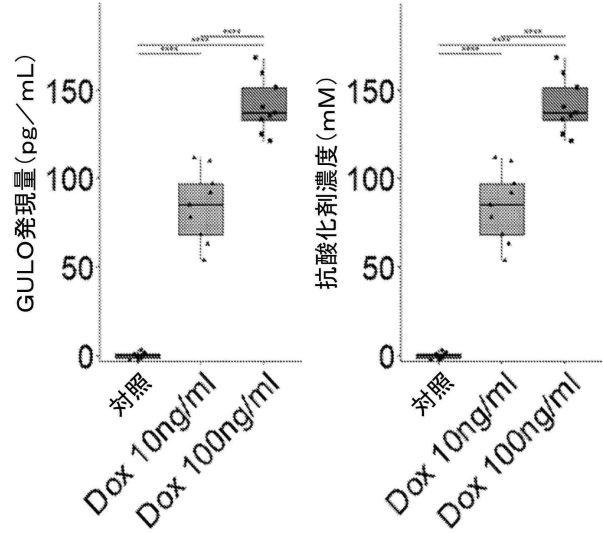
【図 2 E】



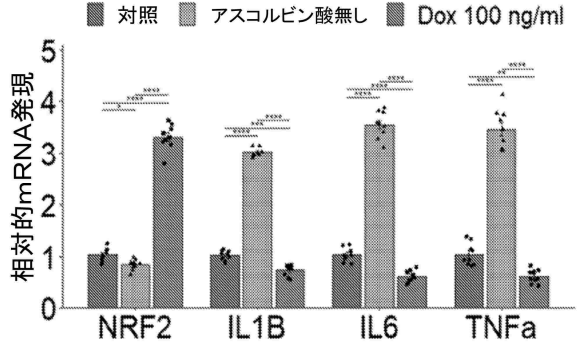
【図 2 F】



【図 2 G】



【図 2 H】



10

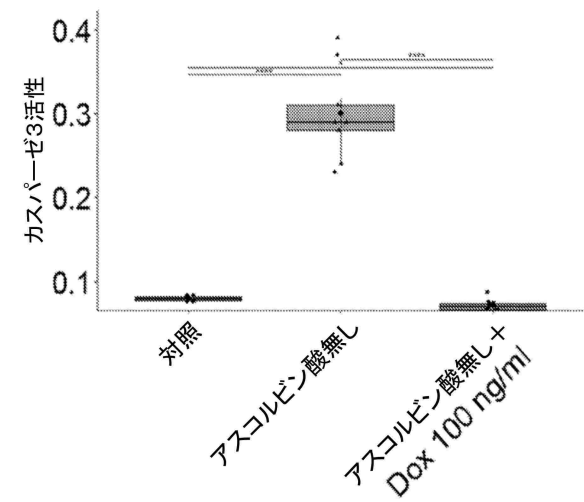
20

30

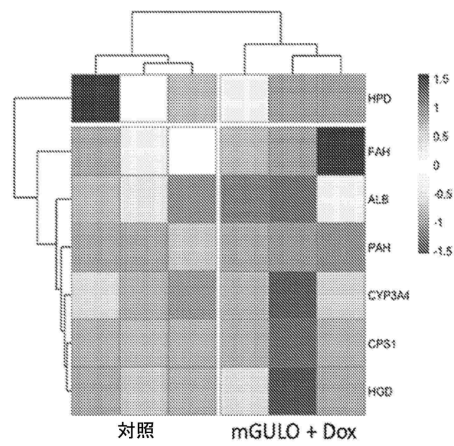
40

50

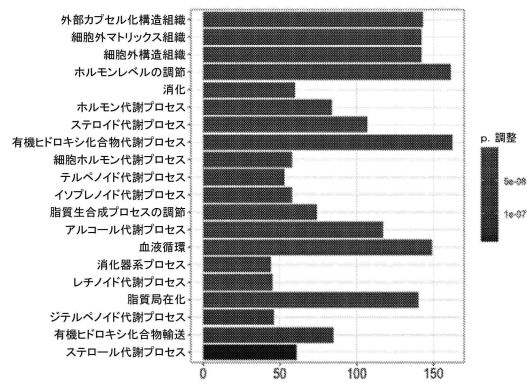
【図 2 I】



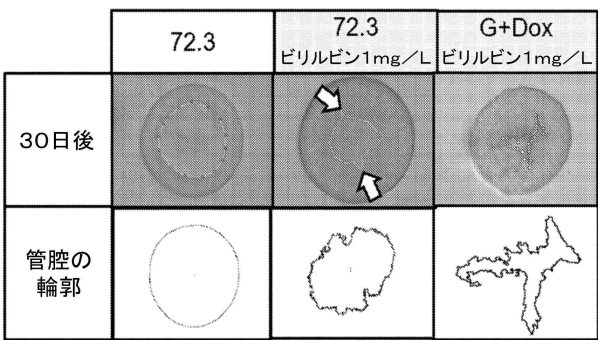
【図 2 J】



【図 2 K】



【図 2 L】



10

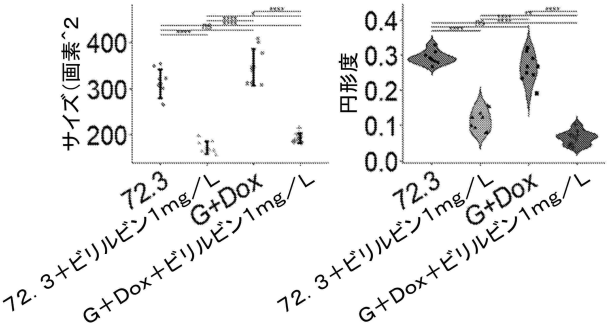
20

30

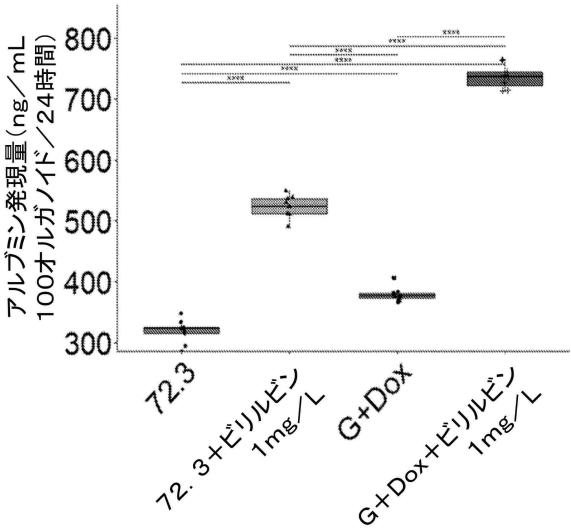
40

50

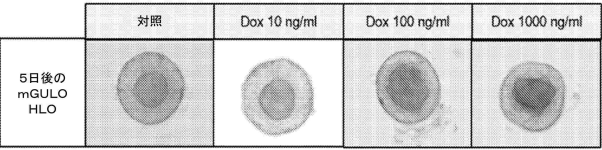
【図 2 M】



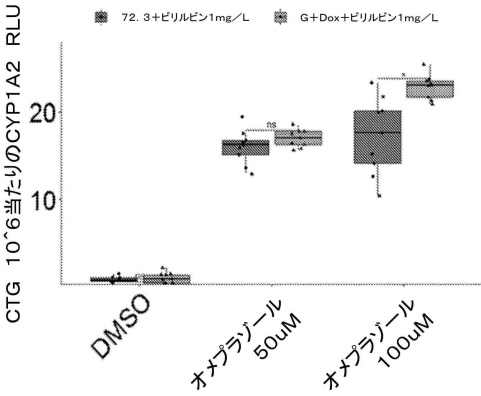
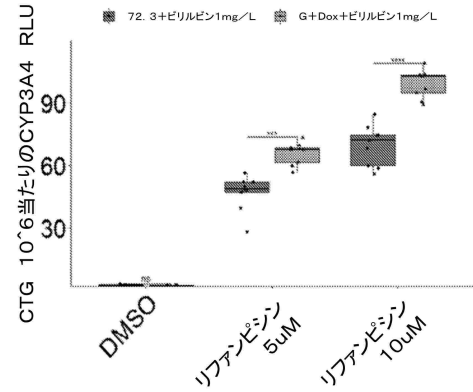
【図 2 N】



【図 2 O】



【図 2 P】



10

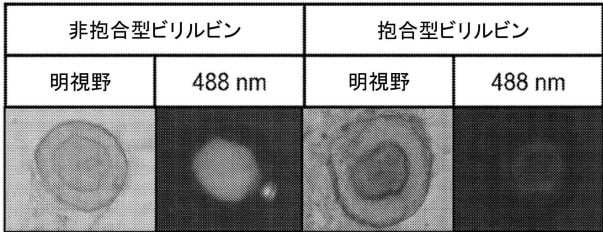
20

30

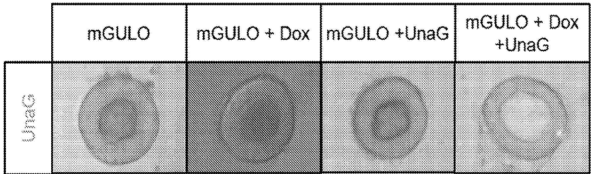
40

50

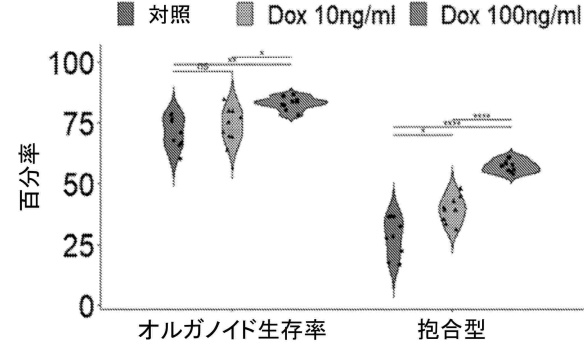
【図 2 Q】



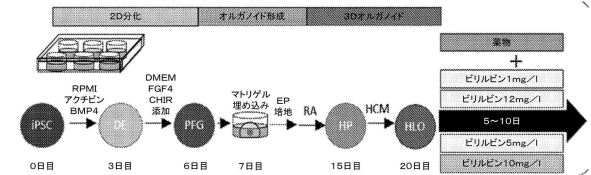
【図 2 R】



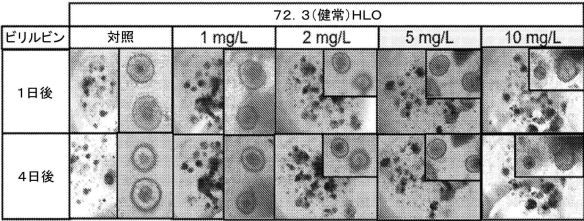
【図 2 S】



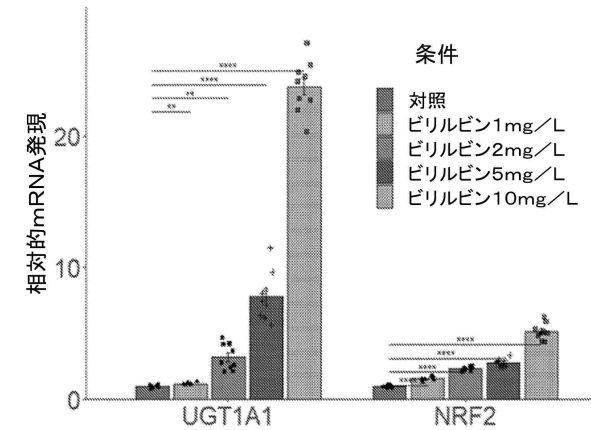
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 3 C】



10

20

30

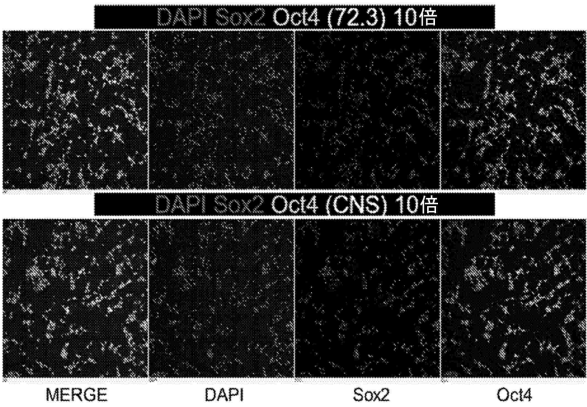
40

50

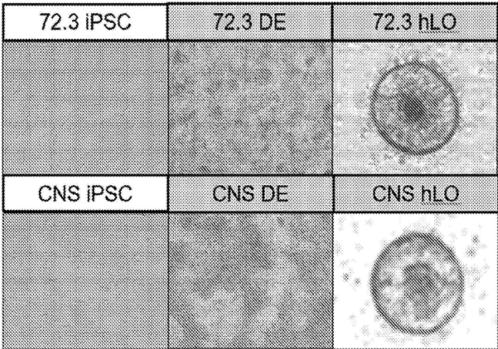
【図 3 D】

CNS患者プロフィール	
民族性	日本人
疾患	CNS1型、黄疸(総ビリルビン:20mg／dL)、成長遅延
処理	光線療法に非応答性、フェノバルビタール
突然変異	UGT1A1エクソン1点変異

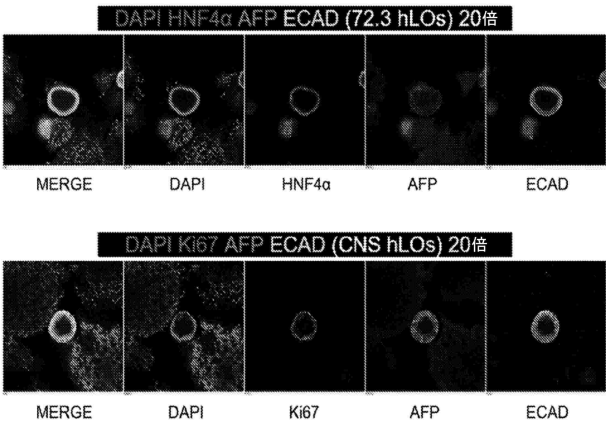
【図 3 E】



【図 3 F】



【図 3 G】



10

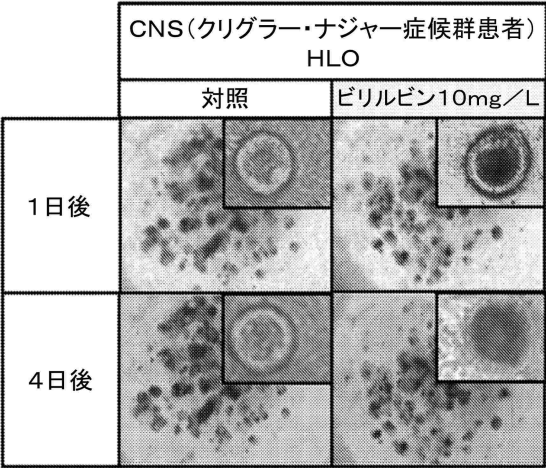
20

30

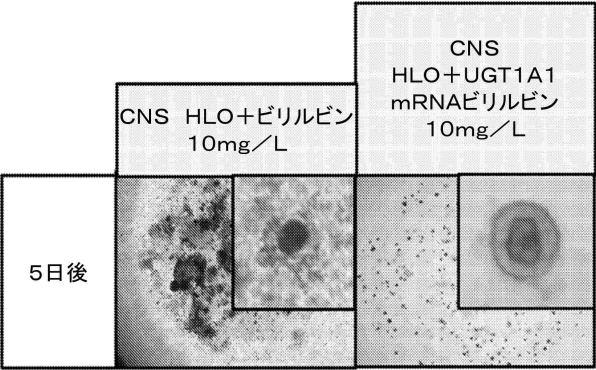
40

50

【図 3 H】

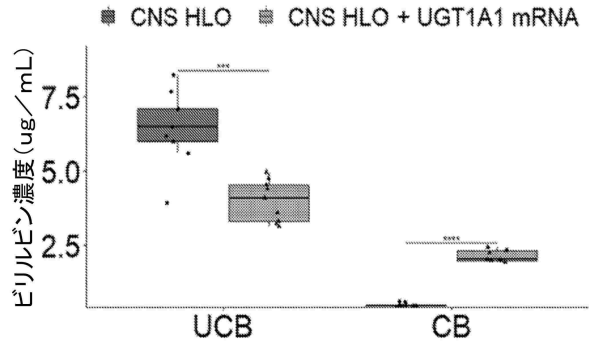


【図 3 I】

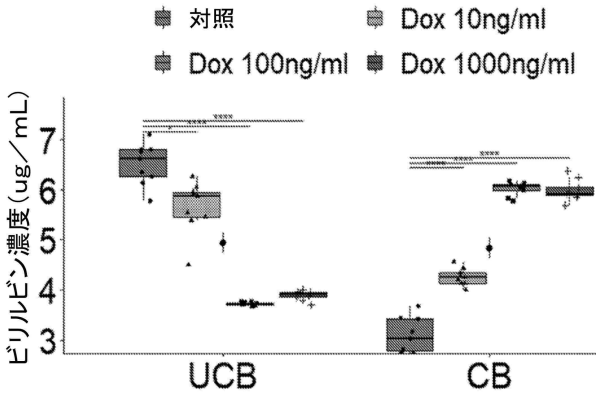


10

【図 3 J】



【図 3 K】



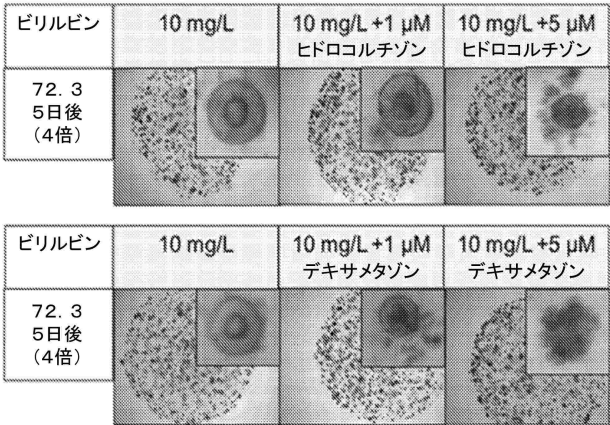
20

30

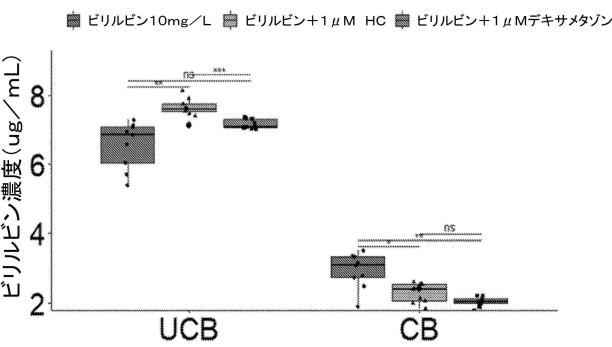
40

50

【図 4 A】

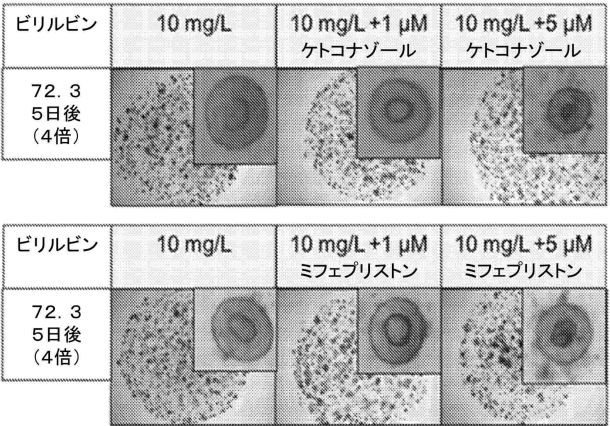


【図 4 B】

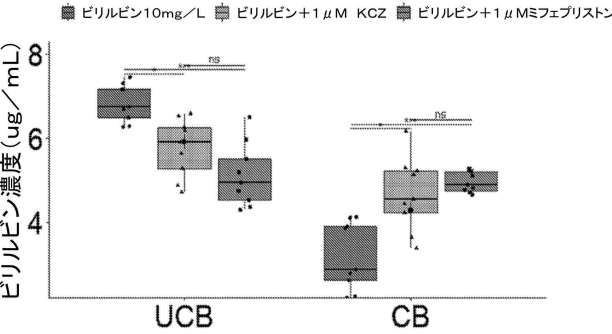


10

【図 4 C】



【図 4 D】



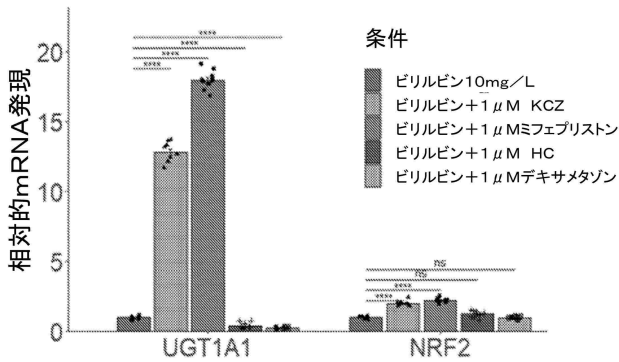
20

30

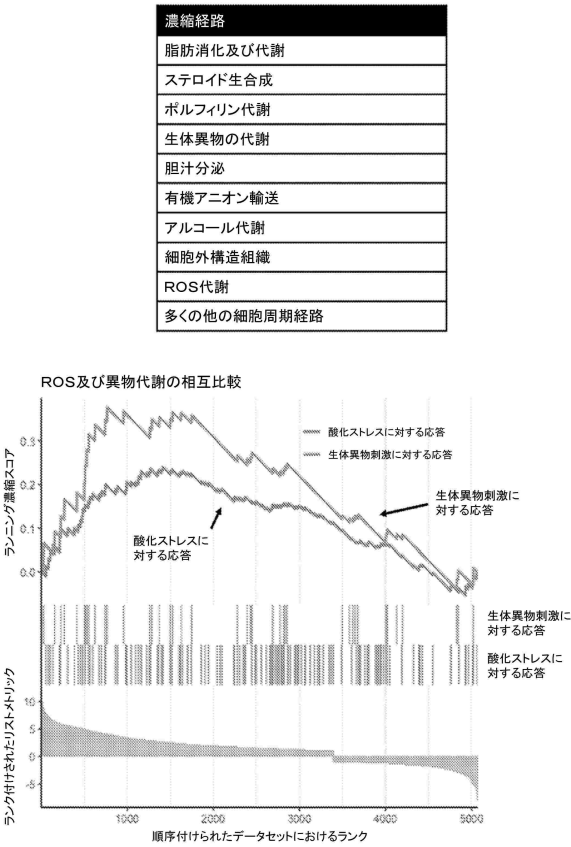
40

50

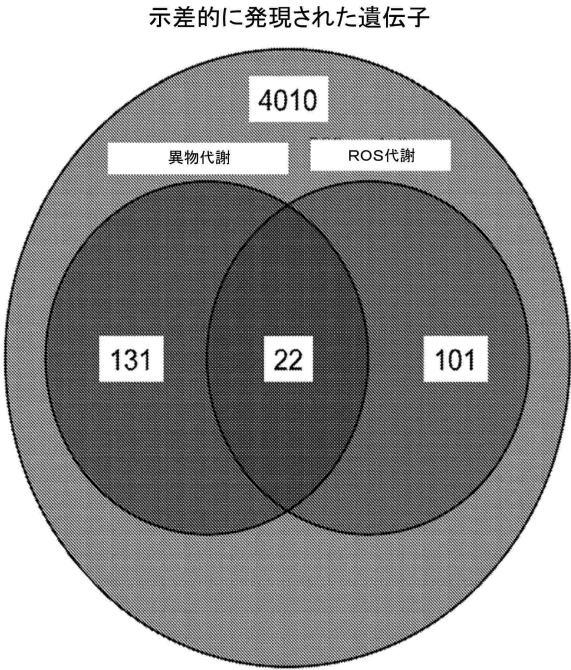
【図 4 E】



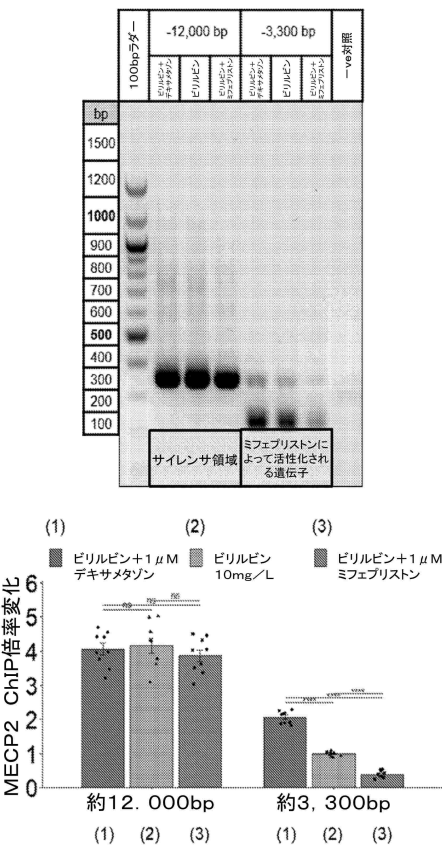
【図 4 F】



【図 4 G】



【図 4 H】



10

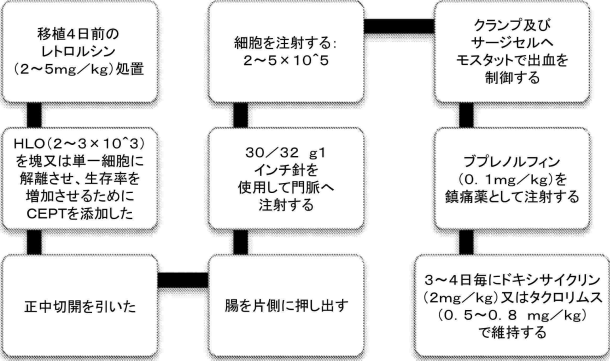
20

30

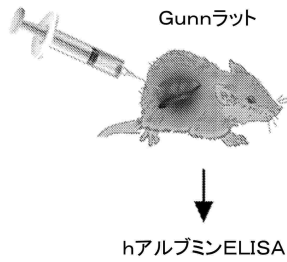
40

50

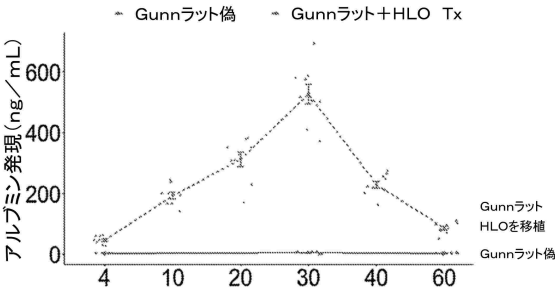
【図 5 A】



HLOを門脈に
注射する

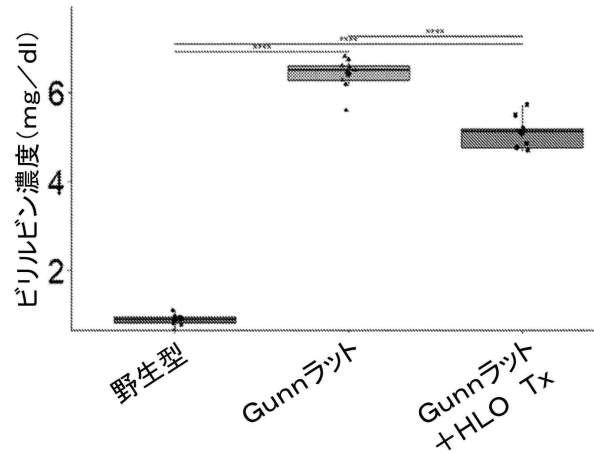


【図 5 B】

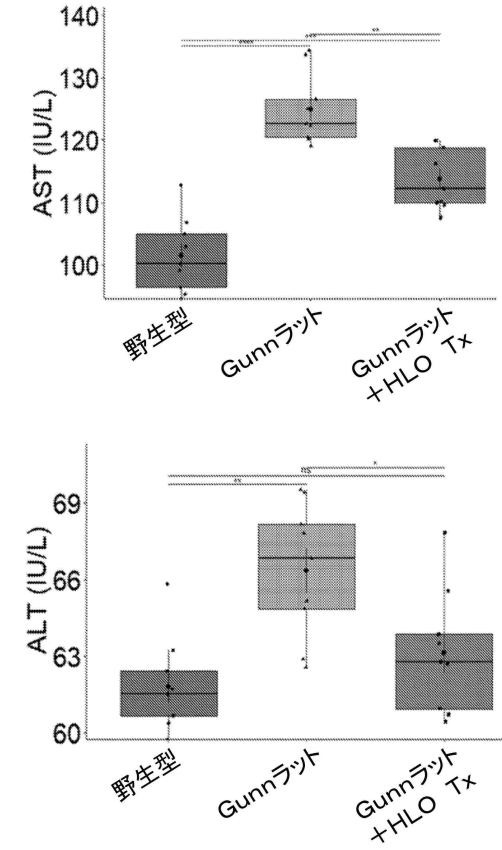


10

【図 5 C】



【図 5 D】



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/33066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 5/071 (2022.01)

ADD.

CPC - INV. C12N 5/0871

ADD.

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.
A	US 2020/0199537 A1 (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 25 June 2020; [0044], [0066]	1-3, 30-32
A	WO 2020/069285 A1 (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 02 April 2020; [0027], [0038]	1-3, 30-32
A	TANIMIZU. "Generation of functional liver organoids on combining hepatocytes and cholangiocytes with hepatobiliary connections ex vivo" 1-12. Nature Communications. Web. 07 June 0021; Page 10; DOI: 10.1038/s41467-021-23575-1	1-3, 30-32
A	WO 2020/227711 A1 (FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC.) 12 November 2020; [0005]	1-3
A	RICE. "A New Animal Model of Hemolytic Hyperbilirubinemia-Induced Bilirubin Encephalopathy 'Kernicterus'" 265-269, PEDIATRIC RESEARCH. . 03 November 2008; Page 265; DOI: 0031-3998/08/6403-0265	30-32

☐ 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

04 October 2022 (04.10.2022)

Date of mailing of the international search report

JAN 12 2023

Name and mailing address of the ISA/US

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

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/33086

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

An Invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing and to Pay, Where Applicable, Late Furnishing Fee ("ISA/225") was mailed on 29 June 2022 (29.06.2022). The response to the ISA/225 was filed with the ISA/US on 02 August 2022 (02.08.2022), wherein, the applicant asserts that the application does not disclose a nucleic acid or amino acid sequence that would require recitation in a sequence listing. Therefore, the international search was carried out only to the extent possible without a sequence listing.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/33066

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.: 4-29, 33-39, 41-42, 46-60, 64-65, 68-74
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:
-***Please See Supplemental Page-***

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.:
Group I, claims 1-3 & 30-32

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/33066

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

Group I, claims 1-3 & 30-32, is directed to methods of maturing a fetal-like liver organoid and producing a hyperbilirubinemia liver organoid, comprising contact with various concentrations of bilirubin.

Group II, claim 40, is directed to a method of treating hyperbilirubinemia by administering a glucocorticoid antagonist to the subject in need thereof, optionally wherein the glucocorticoid antagonist is ketoconazole, mifepristone, or both, or is ketoconazole, mifepristone, metyrapone, aminoglutethimide, or any combination thereof.

Group III, claims 43-45, 61-63, & 66, is directed to a liver organoid that synthesizes ascorbate acid and method of increasing bilirubin conjugation and metabolism in a liver cell, both involving a functional GULO protein and/or a gene or mRNA, or both, that encodes for the functional GULO protein.

Group IV, claim 67, is directed to a method of screening for a compound or composition for the treatment of hyperbilirubinemia, comprising: contacting a hyperbilirubinemia liver organoid with the compound or composition; and detecting an improvement in the hyperbilirubinemia of the hyperbilirubinemia liver organoid.

The inventions listed as Group I, Group II, Group III, and Group IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include methods of maturing a fetal-like liver organoid, and of producing a hyperbilirubinemia liver organoid, not present in Group II, Group III, nor Group IV; the special technical feature of Group II includes a method of treating hyperbilirubinemia by administering a glucocorticoid antagonist to the subject in need thereof, optionally wherein the glucocorticoid antagonist is ketoconazole, mifepristone, or both, or is ketoconazole, mifepristone, metyrapone, aminoglutethimide, or any combination thereof, not present in Group I, Group III, nor Group IV; the special technical features of Group III include a functional GULO protein and/or a gene or mRNA, or both, that encodes for the functional GULO protein, not present in Group I, Group II, nor Group IV; and the special technical features of Group IV include methods of screening and detecting, not present in Group I, Group II, nor Group III.

Groups I-IV are considered to share the technical features including: the liver.

Groups I, II, and IV further share the following technical features: hyperbilirubinemia.

Groups I, III, and IV further share the following technical features: a liver organoid.

Groups I and IV further share the following technical features: contacting a liver organoid with a compound.

Groups II and IV further share the following technical features: treatment of hyperbilirubinemia with a compound.

These shared technical features are previously disclosed by the publication entitled "Transplantable Liver Organoids, Too Many Cell Types to Choose: a Need for Scientific Self Organization" by Baptista, et al. (hereinafter "Baptista").

Baptista discloses that one of the very few studies in rats was a transplantation of IPS-derived hepatic stem cells into Gunn rats and upon maturation of the transplanted stem cells in the recipient Gunn rats, hyperbilirubinemia was severely reduced. Baptista further discloses that which can be expanded in culture under growth conditions with active Wnt signaling and can be driven into a hepatocyte-like phenotype under differentiation conditions. (page 3 of 6); Transplantations with Hepatocytes from Non-adult-Hepatocyte Sources). Since Baptista discloses liver organoids and hyperbilirubinemia, as well as liver organoids as treatment for hyperbilirubinemia and because culturing under active Wnt signaling implies contacting with a compound; it anticipates the shared technical features of a liver organoid, contacting a liver organoid with a compound, the liver, hyperbilirubinemia, and treatment of hyperbilirubinemia with a compound in the instant application.

Since no special technical feature of the Group I, Group II, Group III, and Group IV Inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Baptista reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 K 35/407 (2015.01)	A 6 1 K 35/407	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 31/569 (2006.01)	A 6 1 K 31/569	
A 6 1 K 31/444 (2006.01)	A 6 1 K 31/444	
A 6 1 K 31/451 (2006.01)	A 6 1 K 31/451	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

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,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,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

アメリカ合衆国、4 5 2 2 9 - 3 0 3 9 オハイオ州、シンシナティ、3 3 3 3 バーネット アベ
ニュー、エムエルシー 7 0 3 2、シー／オー チルドレンズ ホスpital メディカル センター

F ターム (参考)	4B063	QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QR72 QR77 QR80 QS25 QS34 QS36 QS38 QX01
	4B065	AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 BB05 BB13 BB19 BC50 CA04 CA24 CA44 CA46
	4C086	AA01 AA02 BC17 BC22 BC50 DA09 GA02 GA07 GA08 GA12 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA51 ZA76 ZC21 ZC75
	4C087	AA01 AA02 AA03 BB52 CA04 DA32 NA14 ZA51 ZA76 ZC21