

明 細 書

発明の名称：

肺上皮細胞又は肺がん細胞からのオルガノイドの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、肺上皮細胞由来のオルガノイドの製造方法に関する。また、本発明は、肺がん細胞由来のオルガノイドの製造方法にも関する。本発明は、さらに、肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイド、肺上皮細胞由来のオルガノイドを含む再生医療用組成物、及び肺がんを処置するための物質をスクリーニングする方法にも関する。

背景技術

[0002] 組織幹細胞は、ホメオスタシス下において、分化細胞の適切なターンオーバーに寄与する。組織幹細胞は、臓器が損傷を受けた場合、分化細胞を供給することによって、損傷からの再生に中心的な役割を担う。肺には、複数の組織幹細胞が存在する。様々な組織幹細胞についてのオルガノイド培養方法が確立され、幹細胞研究及び再生医療を目指した応用研究に利用されている。オルガノイド培養方法としては、フィーダー細胞を用いた培養方法が広く用いられている（特許文献1）。近年、フィーダー細胞を用いない、オルガノイド培養方法についても検討が進められている（特許文献2、非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特表2016-513469

特許文献2：特表2018-503360

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Biochemical and Biophysical Research Communications、Volume 515, Issue 4, 6 August 2019, Pages 579-585

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本開示は、肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイドの新規製造方法を提供することを主たる目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本開示は、肺上皮細胞又は肺がん細胞からオルガノイドを製造する方法であって、前記方法は、肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を培養培地中で培養することを含み、前記培養培地は、0～10% v/v の細胞外マトリクスを含み、及びケラチノサイト成長因子（KGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）10及び肝細胞成長因子（HGF）からなる群より選択される少なくとも1種と、骨形成タンパク質（BMP）阻害剤と、TGFβ阻害剤との組合せを含み、並びに、前記培養培地はフィーダー細胞を実質的に含まない、方法を提供する。

[0007] 本開示は、さらに、前記方法で製造された肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイドを提供する。本開示は、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含む、肺上皮細胞由来のオルガノイドを提供する。

[0008] 本開示は、さらに、前記方法で製造された肺上皮細胞由来のオルガノイドを含む、再生医療用組成物を提供する。

[0009] 本開示は、さらに、肺がんを処置するための物質をスクリーニングする方法であって、前記方法で製造された肺がん細胞由来のオルガノイドと、被験物質とを接触させること、前記被験物質との接触後のオルガノイドを測定すること、及び前記被験物質との接触後のオルガノイドの測定値と対照値とを比較することを含む、方法を提供する。

[0010] 本開示は、さらに、肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を培養培地中で培養することを含む、肺上皮細胞又は肺がん細胞からオルガノイドを製造する方法であって、前記培養培地は、0～10% v/v の細胞外マトリクスを含み、及び以下の組合せ： Wnt シグナル活性化剤と、骨形成タンパク質（BMP）阻害剤と、TGFβ阻害剤と、肝細胞成長因子（HGF）とを含む組合せ； ケラチノサイト成長因子（KGF）及び線維芽細胞増殖因子（

FGF) 10のいずれか一方又は両方と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤と、HGFとを含む組合せ；又はKGF及びFGF 10のいずれか一方又は両方と、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤と、HGFとを含む組合せ、を含み、前記培養培地はフィーダー細胞を実質的に含まない、方法を提供する。

[0011] 本開示は、下記発明を提供する：

[項1] 肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を培養培地中で培養することを含む、肺上皮細胞又は肺がん細胞からオルガノイドを製造する方法であって、前記培養培地は、0～10%v/vの細胞外マトリクスを含み、及びケラチノサイト成長因子(KGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF) 10及び肝細胞成長因子(HGF) からなる群より選択される少なくとも1種と、骨形成タンパク質(BMP) 阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せを含み、並びに前記培養培地はフィーダー細胞を実質的に含まない、方法。

[項2] 前記組合せが、Wntシグナル活性化剤及びRhoキナーゼ(ROCK) 阻害剤のいずれか一方又は両方をさらに含む、項1に記載の方法。

[項3] 前記組合せが、KGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；KGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；FGF 10と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；FGF 10と、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；HGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；HGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；KGFと、FGF 10と、HGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；KGFと、FGF 10と、HGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；ROCK阻害剤と、KGFと、FGF 10と、HGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；又はROCK阻害剤と、KGFと、FGF 10と、HGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ

である、項2に記載の方法。

[項4] 前記BMP阻害剤が、Nogginであり、及び／又は前記TGF β 阻害剤が、SB431542である、項1～3のいずれか一項に記載の方法。

[項5] 前記Wntシグナル活性化剤が、CHIR99021であり、及び／又は前記ROCK阻害剤が、Y-27632である、項2～4のいずれか一項に記載の方法。

[項6] 前記試料に含まれる肺上皮幹細胞が、基底細胞、クラブ細胞、気管支肺胞上皮幹細胞及び肺胞上皮細胞からなる群から選択される少なくとも1つの細胞種を含む、項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[項7] 前記試料に含まれる肺上皮細胞が、2型肺胞上皮細胞（以下「AT2細胞」ともいう）から本質的になる；クラブ細胞から本質的になる；又は基底細胞及びクラブ細胞の組合せから本質的になる、項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[項8] 前記試料に含まれる肺上皮細胞が、2型肺胞上皮細胞から本質的になる；又はクラブ細胞から本質的になる、項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[項9] 前記試料を前記培養培地中で培養する前に、クラブ細胞－Ⅰ、AT2細胞及びクラブ細胞－Ⅱそれぞれについて表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、前記試料からクラブ細胞－Ⅰ、AT2細胞又はクラブ細胞－Ⅱを選択することを含む、項1～8のいずれか一項に記載の方法：

表A

クラブ細胞－I	AT2細胞	クラブ細胞－II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Ly2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Ly2	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elavl1	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[項10] 前記組合せを含む前記培養培地中で培養した前記細胞を、前記組合せを含まない培養培地でさらに培養することを含む、項1～9のいずれか一項に記載の方法。

[項11] 項1～10のいずれか一項に記載の方法で製造された肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイド。

[項12] 内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含む、肺上皮細胞由来のオルガノイドであって、前記肺上皮細胞が、肺胞細胞であり、前記細胞層が、AT2細胞から本質的になり；AT2細胞と、AT2細胞マーカー及び気管支上皮マーカーを発現する細胞との組合せから本質的になり；又は気管支

上皮マーカーを発現する細胞から本質的になり；或いは前記肺上皮細胞が気道細胞であり、前記細胞層が基底細胞と、基底細胞マーカー及び気管支上皮マーカーを発現する細胞との組合せから本質的になる、オルガノイド。

〔項 13〕 前記肺上皮細胞が肺胞細胞であり、前記細胞層が A T 2 細胞から本質的になり、前記 A T 2 細胞が H T 2 - 2 8 0 及び S F T P C のいずれか一方又は両方を発現し、及び前記 H T 2 - 2 8 0 が前記 A T 2 細胞において前記内腔に面する細胞膜に若しくはその近傍に局在している、項 12 に記載のオルガノイド。

〔項 14〕 前記 A T 2 細胞マーカーが H T 2 - 2 8 0 及び S F T P C のいずれか一方又は両方であり、前記気管支上皮マーカーが S O X 2 であり、及び／又は前記基底細胞マーカーが K R T 5 である、項 12 に記載のオルガノイド。

〔項 15〕 項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法で製造された肺上皮細胞由来のオルガノイド、項 12 ～ 14 のいずれか一項に記載の肺上皮細胞由来のオルガノイド、及び／又は、前記オルガノイドの細胞を含む、再生医療用組成物。

〔項 16〕 表 A に列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも 1 種を発現するクラブ細胞 - I、A T 2 細胞又はクラブ細胞 - I I から本質的になる肺上皮細胞を含む、再生医療用組成物：

表A

クラブ細胞－I	AT2細胞	クラブ細胞－II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Lyze2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Lyze1	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gsto1
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elavl1	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[項17] 肺がんを処置するための物質をスクリーニングする方法であって、項1～10のいずれか一項に記載の方法で製造された肺がん細胞由来のオルガノイドと、被験物質とを接触させること、前記被験物質との接触後のオルガノイドを測定すること、及び前記被験物質との接触後のオルガノイドの測定値と対照値とを比較することを含む、方法。

[項18] クラブ細胞－IIについて表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、肺上皮細胞を含む試料から選択されたクラブ細胞－IIから本質的になる肺上皮細胞、及び肺損傷若しくは肺疾患を処置するための薬剤を含む、医薬組成物。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、SFTPC-GFPマウス由来の肺上皮幹細胞からの緑色蛍光タンパク質（GFP）蛍光強度に基づく、前記肺上皮幹細胞の散布図である。

[図2]図2は、足場として細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFP^{hi}分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。

[図3]図3は、足場として細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFP^{hi}分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの長径を示す棒グラフである。

[図4]図4は、足場として細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFP^{lo}分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。

[図5]図5は、足場として細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFP^{lo}分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの長径を示す棒グラフである。

[図6]図6は、分散成分として細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。

[図7]図7は、肺がん細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。

[図8]図8は、SFTPC-GFPマウス由来の肺上皮幹細胞からのGFP蛍光強度に基づく、前記肺上皮幹細胞の散布図である。

[図9]図9は、各GFP分画における各マーカー遺伝子の発現量を示す棒グラフである。

[図10]図10は、GFP^{neg}分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの蛍光画像である。

[図11]図11は、GFP^{lo}分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの蛍光画像である。

[図12]図12は、GFPHi分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの蛍光画像である。

[図13]図13Aは、足場としての細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFPHi分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。図13Bは、足場としての細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFPHi分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの長径を示すグラフである。

[図14]図14Aは、足場としての細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFPlow分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。図14Bは、足場としての細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFPlow分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの長径を示すグラフである。

[図15]図15Aは、足場としての細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFNeg分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。図15Bは、足場としての細胞外マトリクスを含む培養培地中で形成された、GFNeg分画中の肺上皮幹細胞由来のオルガノイドの長径を示すグラフである。

[図16]図16Aは、実施例3で用いたドナーマウス及びレシピエントマウスの模式図である。図16Bは、実施例3のスキーム図である。図16Cは、オルガノイド由来の細胞を投与されたマウスの肺の凍結切片の蛍光画像である。図16Dは、図16Cの白四角で囲った領域を拡大した蛍光画像である。

[図17]図17Aは、ヒト肺胞細胞から形成されたオルガノイドの顕微鏡画像である。図17Bは、ヒト気道細胞から形成されたオルガノイドの顕微鏡画像である。

[図18]図18Aは、ヒト肺胞細胞から形成された肺胞タイプのオルガノイドの蛍光画像である。図18Bは、ヒト肺胞細胞から形成された気管支肺胞タイプのオルガノイドの蛍光画像である。図18Cは、ヒト肺胞細胞から形成

された気管支タイプのオルガノイドの蛍光画像である。

[図19]図19Aは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の面積を示すグラフである。図19Bは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の周囲の長さを示すグラフである。図19Cは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の長径を示すグラフである。図19Dは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の短径を示すグラフである。図19Eは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の真球度を示すグラフである。図19Fは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞のグレー値（平均）を示すグラフである。図19Gは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞のグレー値（最頻値）を示すグラフである。図19Hは、細胞集団で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の重心を示すグラフである。

[図20]図20Aは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の面積を示すグラフである。図20Bは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の周囲の長さを示すグラフである。図20Cは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の長径を示すグラフである。図20Dは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の短径を示すグラフである。図20Eは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の真球度を示すグラフである。図20Fは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞のグレー値（平均）を示すグラフである。図20Gは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞のグレー値（最頻値）を示すグラフである。図20Hは、一細胞で培養した場合の、オルガノイドを形成した細胞の重心を示すグラフである。

[図21]図21Aは、各クラスターにおけるScgb1a1の発現レベルを示す散布図である。図21Bは、各クラスターにおけるSftpcの発現レベルを示す散布図である。図21Cは、各クラスターの細胞種を示す散布図である。図21Dは、各クラスターの面積を示すグラフである。

[図22]図22は、クラスター2に対応する細胞で強く発現される9種の細胞表面マーカーを示すグラフである。

[図23]図23Aは、CD14⁺/-細胞におけるマーカー遺伝子の発現レベルを示す棒グラフである。図23Bは、CD14⁺/-細胞の面積を示すグラフである。

[図24]図24Aは、培養9日目のCD14⁺/-細胞を示す顕微鏡画像である。図24Bは、CD14⁺/-細胞由来のオルガノイドの形成割合を示す棒グラフである。

[図25]図25は、CD14⁺/-細胞由来のオルガノイドにおけるマーカー遺伝子の発現量を示す棒グラフである。

[図26]図26Aは、CD14⁺細胞の培養9日目のオルガノイドにおける免疫染色の蛍光画像である。図26Bは、CD14⁺細胞の培養12日目のオルガノイドにおける免疫染色の蛍光画像である。

[図27]図27Aは、CD14⁺/-細胞が投与された肺で観察されたクラスターの数を示す棒グラフである。図27Bは、CD14⁺/-細胞が投与された肺で観察されたクラスターに含まれる細胞数を示すグラフである。

[図28]図28は、ブレオマイシン傷害を受けた肺に投与されたCD14⁺細胞が1型肺胞上皮細胞（以下「AT1細胞」ともいう）又は2型肺胞上皮細胞（以下「AT2細胞」ともいう）に分化したことを示す蛍光画像である。

[図29]図29は、ブレオマイシン傷害を受けた肺に投与されたCD14⁺細胞がCiliated細胞に分化したことを示す蛍光画像である。

発明を実施するための形態

[0013] [肺上皮細胞又は肺がん細胞からのオルガノイドの製造方法]

本開示の1つの態様は、肺上皮細胞又は肺がん細胞からオルガノイドを製造する方法を提供する。前記方法は、肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を培養培地中で培養することを含み、前記培養培地は、0～10% v/vの細胞外マトリクスを含み、及び本開示に係る添加剤を含み、前記培養培地はフィーダー細胞を実質的に含まない。

[0014] 本明細書における用語「オルガノイド」は、試験管内（*in vitro*）で形成された3次元的な生体組織類似の細胞集合体を意味する。オルガノイドの文脈において、「生体組織類似」又は「生体組織に類似する」は、オルガノイドの解剖学的構造と生体組織の解剖学的構造とが類似することを意味する。オルガノイドを構成する細胞は、例えば、そのほとんどが分化能及び増殖能を有する細胞である。オルガノイドを構成する培養細胞は、公知の方法に従って、様々な細胞タイプに分化させることができる。オルガノイドを構成する培養細胞は、例えば、培養培地に添加剤を含めること又は除くことにより、複数の細胞タイプに分化させることができる。オルガノイドを構成する培養細胞は、例えば、本開示に係る添加剤を含まない培養培地中で培養することによって、分化誘導され得る。オルガノイドは、分化した細胞又は分化能を有さない細胞の一部を含んでよい。オルガノイドは、例えば、公知の細胞培養方法に従って、製造することができる。オルガノイドは、例えば、本開示に係る添加剤を含む培養培地中の所定の細胞を、細胞培養装置中で維持することにより製造することができる。1つの実施形態において、オルガノイドは、肺上皮幹細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイドである。

[0015] 1つの実施形態において、オルガノイドは、顕微鏡下で観察した場合に、その直径が少なくとも50 μm の培養細胞の集合体である。培養細胞の集合体が楕円形の場合、直径は長辺の長さである。培養細胞の集合体が複雑な形状の場合、直径は、前記細胞集合体の外接円の直径である。オルガノイドの形成の効率（CFE: Colony Forming Efficiency）は、肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を培養培地中で6日間培養した後の培養物中の直径50 μm 以上の細胞塊の数を、前記培養培地を含めた肺上皮細胞又は肺がん細胞の細胞数で除して得られた割合[%]で示される。

[0016] 本明細書における用語「幹細胞」は、自ら増殖する能力（「増殖能」ともいう）と、特定の細胞タイプに分化する能力（「分化能」ともいう）とを有

する細胞を意味する。幹細胞は、例えば、上皮幹細胞に分化することができる。幹細胞は、例えば、公知の方法に従って、その分化能を維持させたまま、増殖させることができる。幹細胞はまた、公知の方法に従って、特定の細胞タイプに分化させつつ、増殖させることができる。

[0017] 本明細書における用語「肺上皮細胞」は、肺の上皮組織を構成する細胞を意味する。肺上皮細胞は、例えば、クラブ細胞 (Club cell)、Ciliated細胞 (Ciliated cell)、神経内分泌細胞、基底細胞 (Basal cell)、杯細胞、又は肺胞上皮細胞、若しくは前記細胞に分化する能力を備えた肺上皮幹細胞であってよい。肺胞上皮細胞は、例えば、1型肺胞上皮細胞 (Type I alveolar epithelial cell: AT1細胞) 及び2型肺胞上皮細胞 (AT2細胞) のいずれか一方又は両方であってよい。本明細書における用語「肺上皮幹細胞」は、肺組織中に存在し、増殖能と、特定の肺上皮細胞に分化する能力とを有する細胞を意味する。肺組織は、例えば、気管、気管支、細気管支及び肺胞を含む。

[0018] 肺上皮幹細胞は、例えば、基底細胞、クラブ細胞、及び2型肺胞上皮細胞からなる群より選択される少なくとも1つの細胞種に分化する能力を有する。肺上皮幹細胞は、例えば、気管支肺胞上皮幹細胞 (Bronchioalveolar stem cell: BASCs) であってよい。肺上皮幹細胞は、公知の方法 (例えば、特許文献2に記載の方法) に従って、調製することができる。

[0019] 基底細胞は、ホメオスタシス下、気管傷害再生時にクラブ細胞およびCiliated細胞へ分化する能力を有する。クラブ細胞は、ホメオスタシス下、気管支傷害再生時にはCiliated細胞へ分化する能力を有するが、重症な肺胞傷害時には、AT2細胞およびAT1細胞へ分化する。AT2細胞は、ホメオスタシス下、肺胞傷害時にはAT1細胞へ分化する能力を有する。

[0020] 本明細書における用語「肺胞細胞」は、肺胞組織から得られる細胞を意味

する。肺胞細胞は、公知の方法に従って、肺胞組織から調製することができる。肺胞細胞は、商業的に入手可能である。肺胞細胞は、例えば肺胞上皮細胞を含む。1つの例において、肺胞細胞は、A T 1 細胞及びA T 2 細胞のいずれか一方又は両方を含む。本明細書における用語「気道細胞」は、気道組織から得られる細胞を意味する。気道細胞は、公知の方法に従って、気道組織から調製することができる。気道細胞は、商業的に入手可能である。

[0021] 本明細書における用語「肺上皮細胞を含む試料」は、例えば、哺乳動物の肺組織から調製することができる。肺上皮細胞を含む試料は、例えば、哺乳動物の肺組織から、所定の細胞マーカー（例えば、細胞膜表面上の特定のタンパク質）を指標にして調製することができる。所定の細胞マーカーは、例えば、E P C A Mであってよい。また、肺上皮細胞を含む試料から、所望の肺上皮細胞種を含む試料を調製してもよい。所望の肺上皮細胞種を含む試料を調製する際、基底細胞は、例えば、神経成長因子受容体（N G F R）を細胞マーカーとしてよく（P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , v o l . 1 0 6 (3 1) : 1 2 7 7 1 - 1 2 7 7 5 , 2 0 0 9）、A T 2 細胞は、例えば、A T 2 - 2 8 0 を細胞マーカーとしてよい（J o u r n a l o f H i s t o c h e m i s t r y & C y t o c h e m i s t r y , v o l . 5 8 (1 0) : 8 9 1 - 9 0 1 , 2 0 1 0）。所定の細胞マーカーは、生細胞内に存在する特定のRNA標的であってよい。RNA標的は、例えば、E P C A M、S f t p c、K R T - 5、又はS c g b 1 a 1であってよい。

[0022] 所定の細胞マーカーとして細胞膜表面上の特定のタンパク質を利用する場合、前記タンパク質に対する蛍光物質が結合された抗体を用い、その蛍光物質からの蛍光を指標としてもよい。細胞マーカーを指標にした細胞の調製のために、公知の装置（例えば、F A C S）を用いることができる。また、所定の細胞マーカーとしてRNA標的を利用する場合、肺上皮細胞を含む試料を、特定の条件下で、F A C Sにより分画し、得られた各分画の部分標本に含まれる細胞種をRNA標的（例えばR T - P C R）に基づいて特定するこ

とを含んでよい。

[0023] 肺上皮細胞を含む試料は、例えば、哺乳動物の肺組織を細切りにし、前記肺組織片をプロテアーゼ（例えば、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、エラスターゼまたはトリプシン）で処理した後、所定の溶液（例えば、基本培地）に移して、懸濁することにより調製することができる。前記のように調製した細胞懸濁液を濾過及び／又は遠心分離を行って、組織片などの夾雑物を除去してもよい。1つの実施形態において、肺上皮細胞を含む試料は、哺乳動物の成体、幼体、新生児又は小児の肺組織から調製することができる。1つの実施形態において、肺上皮細胞を含む試料は、哺乳動物の肺組織から調製した後に、所望の特徴を有するように遺伝子改変（但し、多能性を付与するような改変は含まない）が施された肺上皮細胞を含んでよい。

[0024] 1つの実施形態において、前記試料に含まれる肺上皮細胞は、基底細胞、クラブ細胞、気管支肺胞上皮幹細胞及び肺胞上皮細胞（例えばA T 1細胞及びA T 2細胞のいずれか一方又は両方）からなる群から選択される少なくとも1つの細胞種を含む。肺上皮細胞を含む試料は、商業的に入手することができる。肺上皮細胞を含む試料は、例えばヒト肺胞細胞を含む試料、又はヒト気道細胞を含む試料であってよい。1つの実施形態において、前記試料に含まれる肺上皮細胞は、基底細胞、クラブ細胞、気管支肺胞上皮幹細胞及び肺胞上皮細胞からなる群より選択される少なくとも1種、少なくとも2種又は少なくとも3種の細胞から本質的になる。1つの実施形態において、前記試料に含まれる肺上皮細胞は、2型肺胞上皮細胞から本質的になる。1つの実施形態において、前記試料に含まれる肺上皮細胞は、クラブ細胞から本質的になる。1つの実施形態において、前記試料に含まれる肺上皮細胞は、基底細胞及びクラブ細胞の組合せから本質的になる。肺上皮細胞の文脈における「から本質的になる」は、「のみからなる」を排除しない。1つの実施形態において、前記試料に含まれる肺上皮細胞は、特定の細胞種のみからなる。前記試料に含まれる肺上皮細胞は、例えば、特定の細胞種を80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上

含む。

[0025] 1つの実施形態において、本態様に係る方法は、哺乳動物の肺組織から、前記肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を調製することをさらに含む。前記試料の調製は、本明細書に開示した方法又は公知の方法に従って、実施することができる。本明細書における用語「肺がん細胞」は、例えば、肺の腫瘍に由来する腫瘍細胞である。肺がん細胞は、例えば、血液中を循環している腫瘍細胞であってよく、又は循環していない腫瘍細胞であってよい。肺癌細胞は、例えば、商業的に入手可能であるか、又は腫瘍細胞を含む肺組織から公知の方法に従って調製することができる。肺がん細胞は、例えば、肺腺癌細胞である。

[0026] 本明細書における用語「肺がん細胞を含む試料」は、例えば、肺がんを患う哺乳動物の肺組織から、肺がん細胞マーカーを指標にして、分取することができる。肺がん細胞マーカーは、例えば、SOX2、CD24、CD44、CD133、CD166、及びESAのいずれか又はそれらの組合せであってよい。肺がん細胞は、例えば、肺がん細胞マーカーを指標として、FACSを利用して分取することができる。肺癌細胞を含む試料は、例えば、商業的に入手した肺がん細胞を培養して増殖させた細胞を、所定の溶液中に懸濁することによって調製することができる。肺がん細胞を含む試料は、例えば、肺上皮細胞を含む試料について述べた方法に従って、調製することができる。肺がん細胞を含む試料は、例えば、正常な肺上皮細胞を含んでいてもよい。

[0027] 本明細書における用語「哺乳動物」は、例えば、ヒト、ヒト以外の哺乳動物である。ヒト以外の哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどのげっ歯類、チンパンジーなどの非ヒト霊長類、牛、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目、ウマなどの奇蹄目、ウサギ、イヌ、ネコなどの愛玩動物であってよい。1つの実施形態において、哺乳動物は、げっ歯類又は非ヒト霊長類である。1つの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

[0028] 本明細書における用語「肺上皮細胞由来のオルガノイド」又は「肺がん細胞

胞由来のオルガノイド」は、試験管内（*in vitro*）で形成された肺上皮細胞又は肺がん細胞由来の3次元的な生体組織類似体を意味する。1つの実施形態において、肺上皮細胞由来のオルガノイド又は肺がん細胞由来のオルガノイドは、本開示に係る添加剤を含む培養培地中で肺上皮細胞又は肺がん細胞を培養することで形成されたオルガノイドである。1つの実施形態において、肺上皮細胞由来のオルガノイドは、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含む。

[0029] 本明細書における用語「培養培地」は、細胞培養に必要な成分を含む液体を意味する。培養培地は、例えば、基本培地及び本開示に係る添加剤を含む。培養培地は、例えば、基本培地と、本開示に係る添加剤とを組み合わせることにより調製することができる。培養培地は、例えば、基本培地を調製するための所定量の各成分（固体）と、所定量の本開示に係る添加剤（固体）とを混合した混合物と、所定濃度となる量の純水とを混合することにより調製することができる。培養培地は、細胞外マトリクス及び幹細胞の増殖を補助するフィーダー細胞のいずれか一方又は両方をさらに含んでもよい。培養培地は、例えば、基本培地と、本開示に係る添加剤とを混合した混合物に、細胞外マトリクス及び幹細胞の増殖を補助するフィーダー細胞のいずれか一方又は両方を添加することにより調製することができる。

[0030] 本明細書における用語「基本培地」は、公知の細胞培養用の培地であってよく、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、基本培地イーグル（BME）、又はDMEM/F12であってよい。1つの実施形態において、基本培地は、DMEM/F12である。

[0031] 本開示に係る「添加剤」は、肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイド形成の効率に影響を及ぼす2種以上の物質の組合せを意味する。添加剤は、例えば、肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイド形成の効率を向上させる2種以上の物質の組合せであってよい。添加剤は、例えば、形成されるオルガノイドを構成する細胞の分化能を維持する又は特定の細胞種への分化を誘導する物質を含んでよい。

- [0032] 1つの実施形態において、添加剤は、ケラチノサイト成長因子（KGF）、肝細胞成長因子（HGF）及び線維芽細胞増殖因子（FGF）10からなる群より選択される少なくとも1つと、骨形成タンパク質（BMP）阻害剤（例えばNoggin）と、TGF β 阻害剤（例えばSB431542）と、を含む組合せ又はからなる組合せであってよい。AT2のオルガノイドの効率的な形成の観点から、前記組合せは、Wntシグナル活性化剤（例えばCHIR99021）をさらに含むことが好ましい。前記組合せは、Rock阻害剤（例えばY-27632）をさらに含んでよい。
- [0033] 効率的なオルガノイド形成の観点から、添加剤は、Wntシグナル活性化剤（例えばCHIR99021）と、BMP阻害剤（例えばNoggin）と、TGF β 阻害剤（例えばSB431542）と、HGFと、を含む組合せ又はからなる組合せである。前記組合せは、Rock阻害剤をさらに含んでよい。
- [0034] より効率的なオルガノイド形成の観点から、添加剤は、KGF及びFGF10のいずれか一方又は両方と、BMP阻害剤（例えばNoggin）と、TGF β 阻害剤（例えばSB431542）と、HGFと、を含む組合せ又はからなる組合せである。1つの実施形態において、添加剤は、KGFと、FGF10と、BMP阻害剤（例えばNoggin）と、TGF β 阻害剤（例えばSB431542）と、HGFと、を含む組合せ又はからなる組合せである。AT2のオルガノイドの効率的な形成の観点から、前記組合せは、Wntシグナル活性化剤（例えばCHIR99021）をさらに含むことが好ましい。前記組合せは、Rock阻害剤をさらに含んでよい。
- [0035] さらに効率的なオルガノイド形成の観点から、添加剤は、KGFと、FGF10と、Wntシグナル活性化剤（例えばCHIR99021）と、BMP阻害剤（例えばNoggin）と、TGF β 阻害剤（例えばSB431542）と、HGFと、FGF10と、を含む組合せ又はからなる組合せである。添加剤は、例えば、KGFと、FGF10と、Wntシグナル活性化剤（例えばCHIR99021）と、BMP阻害剤（例えばNoggin）と

、TGF β 阻害剤（例えばSB431542）と、HGFと、FGF10と、Rock阻害剤と、を含む組合せ又はからなる組合せである。

[0036] 本明細書における用語「ケラチノサイト成長因子（KGF）」は、皮膚表面、口腔、胃及び腸管などの粘膜を構成する上皮細胞の増殖を刺激する物質を意味する。KGFは、例えば、商業的に入手可能である。KGFは、培養培地中に存在する場合、例えば、10～250 ng/mL、20～100 ng/mL、30～70 ng/mL、好ましくは50 ng/mLの濃度である。KGFは、本明細書において「K」と略されることがある。

[0037] 本明細書における用語「肝細胞成長因子（HGF）」は、肝細胞の最も強力な増殖因子として知られているサイトカインを意味する。HGFは、一般に、分子量約6万の重鎖と約3.5万の軽鎖とがジスルフィド結合したヘテロダイマーの構造を有する。HGFは、例えば、商業的に入手可能である。HGFは、培養培地中に存在する場合、例えば、5～150 ng/mL、10～75 ng/mL、20～40 ng/mL、好ましくは30 ng/mLの濃度である。HGFは、本明細書において「H」と略されることがある。

[0038] 本明細書における用語「線維芽細胞成長因子（FGF）10」は、上皮細胞の増殖、移動及び分化を刺激することで、損傷を受けた皮膚又は粘膜組織の修復を促進するシグナル因子を意味する。FGF10は、例えば、商業的に入手可能である。FGF10は、培養培地中に存在する場合、例えば、10～250 ng/mL、20～100 ng/mL、30～70 ng/mL、好ましくは50 ng/mLの濃度である。FGF10は、本明細書において「F10」と略されることがある。

[0039] 本明細書における用語「Wntシグナル活性化剤」は、細胞内でT細胞転写因子（TCF/LEF）を介した転写を活性化する物質を意味する。Wntシグナル活性化剤は、Wntアゴニストとも称される。Wntシグナル活性化剤は、例えば、セリンとスレオニンのアミノ酸残基へのリン酸分子の付加を媒介するセリン・スレオニンプロテインキナーゼであるGSK-3の作用を阻害する物質（「GSK-3阻害剤」ともいう）、Wntファミリータ

ンパク質、又は β -カテニン分解阻害剤であってよく、又はこれらの2種以上の組合せであってよい。Wntシグナル活性化剤は、例えば、商業的に入手可能である。

[0040] Wntシグナル活性化剤は、例えば、GSK-3阻害剤であってよい。GSK-3阻害剤は、例えば、SB216763 (Chemscene社)、CHIR-99021 (Abcam)、TWS119 (Cayman Chemical社)、又はCHIR99021 (SIGMA)であってよく、又はこれらの2種以上の組合せであってよい。Wntシグナル活性化剤は、例えば、Wntファミリータンパク質(「Wntリガンド」とも称される)であってよい。Wntファミリータンパク質は、例えば、当該分野で公知の19種類のWnt遺伝子由来のタンパク質のいずれか1種又は2種以上の組合せであってよい。Wntファミリータンパク質は、例えば、Wnt1、2、3a、6、7a、7b、8a、9a、10a、又は16であってよく、又はこれらの2種以上の組合せであってよい。Wntファミリータンパク質は、例えば、Wnt1であってよい。Wntシグナル活性化剤は、例えば、 β -カテニン分解阻害剤であってよい。 β -カテニン分解阻害剤は、例えば、 β -カテニンのリン酸化を阻害する物質(例えばUBE1-41)であってよい。

[0041] 1つの実施形態において、Wntシグナル活性化剤は、GSK-3阻害剤である。GSK-3阻害剤は、好ましくはCHIR99021である。Wntシグナル活性化剤は、培養培地中に存在する場合、例えば、0.5~15 μ M、1~7 μ M、2~5 μ M、好ましくは3 μ MのCHIR99021が示す阻害作用に相当する阻害作用を示す量である。CHIR99021は、本明細書において「C」と略されることがある。

[0042] 本明細書における用語「BMP阻害剤」は、BMP分子に結合して複合体を形成する物質を意味する。BMP阻害剤は、例えば、低分子化合物、タンパク質(例えば抗体)、DNA、RNA、低分子干渉RNA、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。BMP阻害剤は、例えば、商業的に

入手可能である。BMP阻害剤は、例えば、Noggin (Bmp inhibitor)、コーディン若しくはそのドメインを含むコーディン様タンパク質 (R&D systems)、フォリスタチン若しくはそのドメインを含むフォリスタチン関連タンパク質 (R&D systems)、DAN若しくはDANシステイン-knotドメインを含むDAN様タンパク質 (R&D systems)、スクレロスタチン/SOST (R&D systems)、デコリン (R&D systems)、又は α -2マクログロブリン (R&D systems) であってよく、又はこれらの2種以上の組合せであってよい。1つの実施形態において、BMP阻害剤は、Nogginである。BMP阻害剤は、培養培地中に存在する場合、例えば、20~500 ng/ml、40~250 ng/ml、80~125 ng/ml、好ましくは100 ng/mlのNogginが示す阻害作用に相当する阻害作用を示す量である。Nogginは、本明細書において「N」と略されることがある。

[0043] 本明細書における用語「TGF β 阻害剤」は、TGF β シグナル伝達を阻害する物質を意味する。TGF β 阻害剤は、例えば、TGF β が結合して活性化したタイプI受容体 (ALK5) のセリン・スレオニンキナーゼによる、Smad2/3タンパク質のリン酸化を介した細胞内シグナル伝達を阻害する物質を意味する。TGF β 阻害剤は、例えば、低分子化合物、タンパク質 (例えば抗体)、DNA、RNA、低分子干渉RNA、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。TGF β 阻害剤は、A83-01 (Abcam)、SB-431542 (Calbiochem)、SB-505124 (R&D systems)、SB-525334 (Chemscene LLC)、LY364947 (Sigma-Aldrich)、SD-208 (Sigma-Aldrich)、又はSJN2511 (R&D systems) であってよく、又はこれらの2種以上の組合せであってよい。1つの実施形態において、TGF β 阻害剤は、SB431542である。TGF β 阻害剤は、培養培地中に存在する場合、例えば、2~50 μ M

、4～25 μM 、8～12 μM 、好ましくは10 μM のSB431542が示す阻害作用に相当する阻害作用を示す量である。SB431542は、本明細書において「S」と略されることがある。

[0044] 本明細書における用語「上皮細胞成長因子（EGF）」は、細胞表面に存在する上皮成長因子受容体（EGFR）に結合し、細胞の成長及び増殖の調節を担うタンパク質を意味する。EGFは、一般に53アミノ酸残基及び3つの分子内ジスルフィド結合を有する約6,000ダルトンの分子量を有する。EGFは、例えば、商業的に入手可能である（例えば、Corning社）。EGFは、培養培地中に存在する場合、例えば、5～125 ng/ml、10～60 ng/ml、20～30 ng/ml、好ましくは25 ng/mlである。EGFは、本明細書において「E」と略されることがある。

[0045] 本明細書における用語「Rhoキナーゼ（ROCK）阻害剤」は、例えば、R-(+)-trans-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサンカルボキサミド二塩酸塩一水和物（Y-27632、Sigma-Aldrich）、5-(1,4-ジアゼパン-1-イルスルホニル)イソキノリン（ファスジルまたはHA1077, Cayman Chemical社）、又は（S）-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]-ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン二塩酸塩（H-1152, Tocris Bioscience）である。ROCK阻害剤は、例えば、商業的に入手可能である。1つの態様において、ROCK阻害剤は、Y-27632である。Rock阻害剤は、培養培地中に存在する場合、例えば、2～50 μM 、4～25 μM 、8～12 μM 、好ましくは10 μM のY-27632が示す阻害作用に相当する阻害作用を示す量である。Y-27632は、本明細書において「Y」と略されることがある。

[0046] 1つの実施形態において、本開示に係る添加剤は、KGF、FGF10及びHGFからなる群より選択される少なくとも1種と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せであってよい。前記添加剤は、Wntシグナル活性

化剤及びROCK阻害剤のいずれか一方又は両方をさらに含んでよい。1つの実施形態において、前記添加剤は、例えば、KGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；KGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；FGF10と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；FGF10と、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；HGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；HGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；KGFと、FGF10と、HGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；KGFと、FGF10と、HGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；ROCK阻害剤と、KGFと、FGF10と、HGFと、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せ；又はROCK阻害剤と、KGFと、FGF10と、HGFと、Wntシグナル活性化剤と、BMP阻害剤と、TGF β 阻害剤との組合せであってよい。前記した添加剤において、前記BMP阻害剤はNogginであってよく、前記TGF β 阻害剤はSB431542であってよく、前記Wntシグナル活性化剤はCHIR99021であってよく、及び／又は前記ROCK阻害剤はY-27632であってよい。

[0047] 1つの実施形態において、培養培地は「細胞外マトリクス」を含む。細胞外マトリクス（ECM）は、限定するものではないが、水、多糖、エラスチン、インテグリン、及び糖タンパク質を含む。糖タンパク質は、例えば、コラーゲン、エンタクチン（ナイドジェン）、フィブロネクチン、およびラミニンを含む。ECMは、例えば、試験管内でECM産生細胞（例えば、上皮細胞、内皮細胞、壁内胚葉様細胞、又は線維芽細胞）を培養した後に、前記ECM細胞を除去することによって調製することができる。ECM産生細胞は、例えば、主としてコラーゲン及びプロテオグリカンを生産する軟骨細胞、主としてI型コラーゲン、ラミニン、間質プロコラーゲン、及びフィブロネクチンを生産する線維芽細胞、並びに主にコラーゲン（I型、III型、およびV型）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヒアルロン酸、フ

ィブロネクチン、及びテネイシン-Cを産生する結腸筋線維芽細胞であってよい。ECMは、商業的に入手可能である。商業的に入手できる細胞外マトリクスは、例えば、細胞外マトリクスタンパク質 (Invitrogen)、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫細胞からの基底膜調製物 (例えば、Cultrex (登録商標) Basement Membrane Extract (Trevigen, Inc.))、またはMatrigel (登録商標) (Corning社)) であってよい。ECMは、合成細胞外マトリクス (例えば、ProNectin (Sigma Z378666)) であってよい。細胞外マトリクスは、1種であってよく、又は2種以上の混合物であってよい。1つの実施形態において、ECMは、Matrigelである。1つの実施形態において、培養培地は細胞外マトリクスを含まない。

[0048] 細胞外マトリクスは、培養培地中に存在する場合、「分散成分」として存在し得る。分散成分としての細胞外マトリクスは、限定するものではないが、細胞外マトリクス成分が培養培地中に分散又は溶解している状態である。分散成分としての細胞外マトリクスは、例えば、培養培地の容積あたり前記細胞外マトリクスが10% v/v以下、7% v/v以下、5% v/v以下、例えば、2.5% v/vの分量で存在する。1つの実施形態において、培養培地は、0~10% v/v、0~7% v/v、0~5% v/v、0.1~10% v/v、0.1~7% v/v、0.1~5% v/v、1~10% v/v、1~7% v/v、1~5% v/v、1~2.5% v/v、2~10% v/v、2~7% v/v、2~5% v/v、又は2~2.5% v/vの分量で細胞外マトリクスを含む。細胞外マトリクスが生体由来の生成物 (例えば、マウス肉腫細胞からの基底膜調製物) を含む場合、培養培地中の細胞外マトリクスの含有濃度は、製造するオルガノイドの汚染防止又は低減の観点から、低濃度であることが好ましい。

[0049] 細胞外マトリクスは、培養培地中に存在する場合、「足場」として存在し得る。足場としての細胞外マトリクスは、限定するものではないが、細胞が

天然に存在する細胞ニッチを少なくとも部分的に模倣する微小環境を提供する形態である。足場としての細胞外マトリクスは、例えば、ゲルの形態であってよい。足場としての細胞外マトリクスは、例えば10%v/v超、20%v/v以上、30%v/v以上、50%v/v以上、又は70%v/v以上の濃度にて形成されたゲルであってよい。

[0050] 本明細書における用語「フィーダー細胞」は、幹細胞の増殖を補助するために用いられる細胞種を意味する。フィーダー細胞は、一般的に、目的の細胞と共培養され、目的の細胞の増殖を補助するのに適した表面を提供するために用いられる。フィーダー細胞は、特定の細胞種（例えば、プライマリー成獣マウス繊維芽細胞、マウス繊維芽細胞株（MLg）、ヒト胎児繊維芽細胞株：MRC-5）そのもの、または予め死なない程度に抗生物質を投与すること、又はガンマ線を照射することによって調製される。フィーダー細胞の使用は、目的の細胞の継代操作を複雑にするため、望ましくない。1つの実施形態において、培養培地はフィーダー細胞を実質的に含まない。本明細書における用語「実質的に含まない」は、「完全に含まない」を排除しない。1つの実施形態において、実質的にフィーダー細胞を含まない培養培地は、フィーダー細胞を完全に含まない。1つの実施形態において、実質的にフィーダー細胞を含まない培養培地は、培養する肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む培養細胞の数に対して、3%未満、2%未満、1%未満、又は0.5%未満のフィーダー細胞を含んでよい。好ましくは、培養する肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む培養培地は、フィーダー細胞を含まない。

[0051] 肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を培養培地中で「培養」するための方法としては、特許文献2に開示される方法を用いることができる。前記培養は、例えば、肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料を、培養容器中の培養培地に添加し、前記培養培地を、37℃で5%CO₂下にて、維持することを含んでよい。培養する温度は、37℃に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知の温度を適宜用いることができる。CO₂濃度は、5%に限定されるものではなく、細胞培養分野において公知のCO₂濃度を適宜用いる

ことができる。前記培養培地は、任意の間隔で、例えば、1～14日ごとに、2～12日ごとに、又は3～10日ごとに新たな培養培地に交換することができる。培養培地は、例えば培養する細胞が肺上皮細胞の場合、3～7日ごと、3～5日ごと、又は3日ごとに交換してもよい。培養培地は、例えば培養する細胞が肺がん上皮幹細胞の場合、3～14日ごと、5～10日ごと、又は10日ごとに交換してもよい。

[0052] 前記培養によって形成された「肺上皮細胞由来のオルガノイド」又は「肺がん細胞由来のオルガノイド」は、培養培地中から単離してもよい。単離は、例えば、そのサイズに基づいて細胞を分取して、細胞塊を形成していない細胞と、オルガノイドを分けることを含んでよい。単離は、例えばCELL HANDLER (Yamaha社) を用いて行うことが可能である。

[0053] 1つの実施形態において、本態様に係る方法は、哺乳動物の肺組織から調製された肺上皮細胞を含む試料を本開示に係る添加剤を含む培養培地中で培養する前に、クラブ細胞-Ⅰ、AT2細胞及びクラブ細胞-Ⅱそれぞれについて表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、前記試料からクラブ細胞-Ⅰ、AT2細胞又はクラブ細胞-Ⅱを選択することを含む：

[表1]

表A

クラブ細胞ー I	AT2細胞	クラブ細胞ー I I
C b r 2	L a m p 3	T f f 2
H p	L y z 2	R e g 3 g
C y p 2 f 2	N a p s a	B p i f b 1
P r d x 6	S l c 3 4 a 2	M u c 5 b
S c g b 1 a 1	L y z 1	S u l t 1 d 1
L d h b	R n a s e 4	F x y d 3
C e s 1 d	H c	S c g b 3 a 1
C c k a r	C d 7 4	L y p d 2
S e l e n b p 1	S c d 1	C h a d
G s t m 2	S f t p c	S 1 0 0 a 6
S c n n 1 b	L g i 3	P g l y r p 1
S c g b 1 c 1	C l d n 1 8	A l d h 3 a 1
P l p p 3	E t v 5	B p i f a 1
E p h x 1	C x c l 1 5	G s t o 1
D c x r	S 1 0 0 g	L g a l s 3
A l a s 1	E l o v 1 1	P i g r
R e t n l a	F a s	S c g b 3 a 2
S e c 1 4 l 3	H 2 - A a	L t f
P t g r 1	F a b p 5	Q s o x 1
K r t a p 1 7 - 1	R n 4.5 s	C y p 2 a 5
		C p d
		L y 6 a
		P e r p
		K c n e 3
		I l l 3 r a 1
		S l c 1 5 a 2
		C d 1 4

[0054] 1つの実施形態において、前記方法は、クラブ細胞ー I について表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、前記試料からクラブ細胞ー I を選択することを含む。1つの実施形態において、前記方法は、AT2細胞について表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、前記試料からAT2細胞を選択することを含む。1つの実施形態において、前記方法は、クラブ細胞ー I I について表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、前記試料からクラブ細胞ー I I を選択することを含む。

含む。

[0055] 本明細書において用語「クラブ細胞－Ⅰ」は、クラブ細胞であって、表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログのうち少なくとも1種を発現する細胞を意味する。クラブ細胞－Ⅰは、例えば、本開示に係る添加剤を含む培養培地中でオルガノイドを形成する。クラブ細胞－Ⅰは、例えばCbr2、Hp、Cyp2f2、Prdx6、Scgb1a1、Ldhb、Ces1d、Cckar、Selenbp1、Gstm2、Scnn1b、Scgb1c1、Plpp3、Ephx1、Dcxr、Alas1、Retn1a、Sec14l3、Ptgr1、及びKrtap17-1並びにそれらのホモログからなる群より選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、又は少なくとも4種の細胞マーカーを発現する。

[0056] 本明細書において用語「クラブ細胞－Ⅱ」は、クラブ細胞であって、表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログのうち少なくとも1種を発現する細胞を意味する。クラブ細胞－Ⅱは、例えば、本開示に係る添加剤を含む培養培地中でオルガノイドを形成する。クラブ細胞－Ⅱは、例えばクラブ細胞－Ⅰに比べて、オルガノイドを形成する傾向が高い。クラブ細胞－Ⅱは、例えばTff2、Reg3g、Bpifb1、Muc5b、Sult1d1、Fxyd3、Scgb3a1、Lypd2、Chad、S100a6、Pglyrp1、Aldh3a1、Bpifa1、Gsto1、Lgals3、Pigr、Scgb3a2、Ltf、Qsox1、Cyp2a5、Cpd、Ly6a、Perp、Kcne3、Il13ra1、Slc15a2、及びCd14並びにそれらのホモログからなる群より選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、又は少なくとも4種の細胞マーカーを発現する。クラブ細胞－Ⅱは、例えばFxyd3、Pigr、Cpd、Ly6a、Perp、Kcne3、Il13ra1、Slc15a2、及びCd14並びにそれらのホモログからなる群より選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、又は少なくとも4種の細胞マーカーを発現する。

[0057] 細胞マーカーに基づいて所定の細胞を選択する実施形態における用語「AT2細胞」又は「2型肺胞上皮細胞」は、表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログのうち少なくとも1種を発現するAT2細胞を意味する。前記AT2細胞は、例えば、本開示に係る添加剤を含む培養培地中でオルガノイドを形成する。前記AT2細胞は、例えばLamp3、Lyz2、Napsa、Slc34a2、Lyz1、Rnase4、Hc、Cd74、Scd1、Sftpc、Lgi3、Clcn18、Etv5、Cxc115、S100g、Elavl1、Fas、H2-Aa、Fabp5、及びRn4.5s並びにそれらのホモログからなる群より選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、又は少なくとも4種の細胞マーカーを発現する。

[0058] 本明細書において所定の細胞を「選択する」は、複数種の細胞を含む試料から、所定の細胞を選ぶことを意味する。所定の細胞を選択することは、例えば、種々の細胞を含む試料から、所定の細胞マーカー（例えば、表Aに記載の細胞マーカー）の発現を測定し、その測定結果に基づいて前記所定の細胞マーカーを発現する細胞を所定の細胞として分取することによって実施することができる。所定の細胞の選択は、例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS）によって実施することができる。FACSは、例えば、所定の細胞マーカーに結合するプローブ（例えば抗体）に蛍光物質をコンジュケートした蛍光プローブを用い、商業的に入手可能なFACS装置にて実施することができる。1つの例において、被検細胞における所定の細胞マーカーの発現レベルが、陰性対照における前記所定の細胞マーカーの発現レベルよりも高い場合に、前記被検細胞を所定の細胞として選択することができる。蛍光物質は、例えば、公知の方法に従って調製可能であり、又は商業的に入手可能である。所定の細胞マーカーに結合するプローブ、例えば抗体は、公知の方法に従って調製可能であり、又は商業的に入手可能である。前記プローブへの蛍光物質のコンジュゲーションは、例えば公知の方法に従って実施することができる。1つの実施形態において、所定の肺上皮細胞の選択は、

表Aに記載の細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種の発現に基づいて実施することができる。

[0059] 本明細書において用語「ホモログ」は、同種または異種の生物間において、その配列及び機能が類似している遺伝子またはタンパク質を意味する。本明細書においてホモログは、オルソログ、パラログ及びゼノログを含む。特定の遺伝子又はタンパク質の「ホモログ」は、例えば、前記特定の遺伝子又はタンパク質の配列に対して、少なくとも75%、80%、85%または90%の相同性を有し、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有する。相同性は、当業者に周知のアラインメントアルゴリズムを用いて2つの遺伝子又はタンパク質の配列を整列させた後に、これら2つの配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を意味する。相同性は、例えば公知の方法又は公的に入手可能なコンピュータプログラム（例えば、BLAST又はFASTA）を用いて実行することができる。

[0060] 本明細書において用語「Cbr2」はカルボニルレダクターゼ2を指し、NADPHの合成に関与する。

本明細書において用語「Hp」は、ハプトグロビンを指し、ヘモグロビン結合タンパク質である。

本明細書において用語「Cyp2f2」は、シトクロムP450（CYP）2f2を指し、小胞体膜に局在するマウス特異的な膜結合タンパク質である。マウス以外の哺乳動物におけるCyp2f2のホモログは公知であり、例えばそのヒトホモログはCYO2F1である。

本明細書において用語「Prdx6」は、ペルオキシレドキシンー6を指し、抗酸化酵素のペルオキシレドキシンファミリーに属するタンパク質である。ヒトではPDRX6遺伝子にコードされている。

本明細書において用語「Scgb1a1」はセクレトグロブリンファミリー1Aメンバー1を指し、抗炎症性機能を有する。

[0061] 本明細書において用語「Ldhb」は、乳酸デヒドロゲナーゼBを指し、

L D H B 遺伝子にコードされている L D H 酵素のモノマーである。

本明細書において用語「C e s 1 d」は、カルボキシルエステラーゼ 1 d を指す。

本明細書において用語「C c k a r」は、コレシストキニン A 受容体を指し、C c k a r は、ペプチドホルモンに結合する G タンパク質共役型受容体の 2 つの異なるサブタイプのうちサブタイプ A である。

[0062] 本明細書において用語「S e l e n b p 1」は、セレン結合タンパク質 1 を指し、セレン結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質である。S e l e n b p 1 は、ヒトでは、S E L E N B P 1 遺伝子にコードされている。

本明細書において用語「G s t m 2」は、グルタチオン S-トランスフェラーゼ M u 2 を指し、ヒトでは G S T M 2 遺伝子にコードされている酵素である。

本明細書において用語「S c n n 1 b」は、ナトリウムチャンネルサブユニットベータ 1 を指し、ヒトでは S C N 1 B 遺伝子にコードされているタンパク質である。

[0063] 本明細書において用語「S c g b 1 c 1」は、セクレトグロビン 1 C 1 を指し、リガンド結合タンパク質 R Y D 5 としても知られている。S c g b 1 c 1 は、セクレトグロビン 1 C 1 遺伝子にコードされている。

本明細書において用語「P l p p 3」は、リン脂質ホスファターゼ 3 を指し、ホスファチジン酸ホスファターゼ 2 B 型としても知られている。P l p p 3 は、ヒトでは第 1 染色体上の P P A P 2 B 遺伝子にコードされている酵素である。

本明細書において用語「E p h x 1」は、エポキシド加水分解酵素 1 を指し、ヒトでは E P H X 1 遺伝子にコードされている酵素である。

[0064] 本明細書において用語「D c x r」は、ジカルボニル L-キシルロースレダクターゼを指し、種々の生理学的システムにおける様々なタンパク質相互作用プロセスに関与する多機能タンパク質である。

本明細書において用語「A l a s 1」は、デルタアミノレブリン酸シント

ーゼ1としても知られるタンパク質であり、ヒトではALAS1遺伝子にコードされている。

本明細書において用語「Retnla」は、レジスチン様分子アルファ (Resistin-like molecule alpha) を指し、スモール・システインリッチ・分泌タンパク質のファミリーに属するタンパク質である。

[0065] 本明細書において用語「Sec14l3」は、SEC14-like3を指し、トコフェロール関連タンパク質2としても知られている、ゴルジ由来の輸送小胞の生合成に重要な役割を果たすホスファチジルイノシトール転移タンパク質である。

本明細書において用語「Ptgr1」は、プロスタグランジンレダクターゼー1を指し、エイコサノイドの異化作用及び4-ヒドロキシノネナールなどの脂質過酸化に関与するタンパク質である。

本明細書において用語「Krtap17-1」は、ケラチン関連タンパク質17-1を指し、ケラチン関連タンパク質 (KAP) ファミリーに属するタンパク質である。

[0066] 本明細書において用語「Tff2」は、トレフォイル・ファクター2を指し、ヒトではTFF2遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「Reg3g」は、Regenerating islet-derivedプロテイン3ガンマを指し、ヒトではREG3G遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「Bpifb1」は、BPI Fold ContainingファミリーBメンバー1を指し、ヒトではBP1FB1遺伝子にコードされているタンパク質である。

[0067] 本明細書において用語「Muc5b」は、ムチン5サブタイプBを指し、ヒトではMUC5B遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「Sult1d1」はサルフトランスフェラーゼ1Dメンバー1を指し、ホルモン、ニューロトランスミッターに硫酸基を転

移する。ヒトの場合は変異によって偽遺伝子化していることが知られている。

本明細書において用語「F x y d 3」は、FXYDドメイン含有イオン輸送レギュレーター3を指し、ヒトではFXYD3遺伝子にコードされているタンパク質である。

[0068] 本明細書において用語「S c g b 3 a 1」は、セクレトグロビンファミリー3Aメンバー1を指し、ヒトではSCGB3A1遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「L y p d 2」は、Ly6/PLAURドメイン含有プロテイン2を指し、ヒトではLYPD1遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「C h a d」は、カドヘリンを指し、動物細胞間の接着に関与する膜貫通型糖タンパク質である。

[0069] 本明細書において用語「S 1 0 0 a 6」は、S100カルシウム結合タンパク質A6を指し、ヒトではS100A6遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「P g l y r p 1」は、ペプチドグリカン認識タンパク質1を指し、ヒトではPGLYRP1遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「A l d h 3 a 1」は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ3ファミリー・メンバーA1を指し、ヒトではALDH3A1遺伝子にコードされているタンパク質である。

[0070] 本明細書において用語「B p i f a 1」は、P a l a t e , l u n g , a n d n a s a l e p i t h e l i u m c l o n e p r o t e i n (P L U N C) とも称され、B P I F A 1 (B a c t e r i c i d a l / p e r m e a b i l i t y - i n c r e a s i n g f o l d - c o n t a i n i n g f a m i l y A 1) 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「G s t o 1」は、グルタチオンS-トランスフェラーゼオメガー1を指し、ヒトではGSTO1遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「L g a l s 3」は、ガレクチン-3を指し、ヒトではLGALS3遺伝子にコードされている、レクチンファミリーに属するタンパク質である。

[0071] 本明細書において用語「P i g r」は、高分子免疫グロブリン受容体を指し、ヒトではPIGR遺伝子にコードされている膜貫通タンパク質である。

本明細書において用語「S c g b 3 a 2」は、セクレトグロビンファミリー-3Aメンバー2を指し、ヒトではSCGB3A2遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「L t f」は、ラクトフェリンを指し、哺乳動物では主として乳汁に存在する鉄結合性の糖タンパク質である。

[0072] 本明細書において用語「Q s o x 1」は、スルフヒドリルオキシダーゼ1を指し、ヒトではQSOX1遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「C y p 2 a 5」は、シトクロムP450 (CYP) 2A5を指し、マウスでは肝臓及び鼻腔の嗅上皮で発現するタンパク質である。マウス以外の哺乳動物におけるCyp2a5のホモログ又はオルソログは公知であり、例えばそのヒトオルソログはCYP2A6/13であり、ラットオルソログはCYP2A3である。

[0073] 本明細書において用語「C p d」は、カルボキシペプチダーゼDを指し、ヒトではCPD遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「L y 6 a」は、リンパ球抗原6コンプレックス、ローカスAを指し、Sca-1とも称される、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質である。

本明細書において用語「P e r p」は、PMP-22に関連するp53アポトーシスエフェクターを指し、ヒトではPERP遺伝子にコードされる膜タンパク質である。

[0074] 本明細書において用語「K c n e 3」は、カリウム・ボルテージ・ゲートチャンネル, I s k 関連ファミリー, メンバー3を指し、M i n K 関連ペプチド2 (M i R P 2) とも称される。K c n e 3 は、ヒトではK C N E 3 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「I l l 3 r a 1」は、インターロイキン13受容体サブユニットアルファ1を指し、インターロイキン4受容体アルファとヘテロダイマーを構成することによって、インターロイキン13の受容体として働く。

本明細書において用語「S l c 1 5 a 2」は、ソリュート・キャリア・ファミリー15, メンバー2を指し、プロトン結合ペプチドトランスポーターとして機能する。

[0075] 本明細書において用語「C d 1 4」は、C D 1 4 タンパク質を指し、自然免疫系の構成用途として機能する。C D 1 4 は、例えば、膜結合型タンパク質であるm C D 1 4 であってよく、又は可溶性タンパク質であるs C D 1 4 であってよい。クラブ細胞- I I 細胞を選択する文脈において、C D 1 4 は、例えばm C D 1 4 である。

本明細書において用語「L a m p 3」は、リゾソーム関連膜糖タンパク質3を指し、ヒトではL A M P 3 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「L y z 2」は、リゾチームC-2を指す。

[0076] 本明細書において用語「N a p s a」は、ナプシンAを指し、ヒトではN A P S A 遺伝子にコードされているアスパラギン酸プロテイナーゼである。

本明細書において用語「S l c 3 4 a 2」は、ナトリウム依存性リン酸輸送タンパク質2B (N a P i 2 b) を指し、ヒトではS L C 3 4 A 2 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「L y z 1」は、リゾチームC-1を指す。

[0077] 本明細書において用語「R n a s e 4」は、リボヌクレアーゼ4を指し、ヒトではR N A S E 4 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「Hc」は、Hemolytic complementを指す。自然免疫における補体システムの構成要素である。

本明細書において用語「Cd74」は、HLAクラスII組織適合性抗原ガンマ鎖を指し、ヒトではCD74遺伝子にコードされているタンパク質である。

[0078] 本明細書において用語「Scd1」は、ステアロイル-CoAデサチュラーゼ1を指し、脂肪酸代謝に重要な酵素である。

本明細書において用語「Sftpc」は、サーファクタントプロテインC (SP-C)を指し、肺サーファクタントプロテインの1つである。Sftpcは、ヒトではSFTPC遺伝子にコードされている。

本明細書において用語「Lgi3」は、ロイシンリッチ・グリオーマ・インアクチベィティッド3を指し、LGIファミリーに属する脊椎動物における分泌タンパク質である。

[0079] 本明細書において用語「Cldn18」は、クローディン18を指し、ヒトではCLDN18遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「Etv5」は、Etsバリエント5を指し、ERM転写因子とも称される。Etv5は、ヒトではETV5遺伝子にコードされている転写因子である。

本明細書において用語「Cxc115」は、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド15を指し、CXCKケモカインファミリーに属するサイトカインである。

[0080] 本明細書において用語「S100g」は、S100カルシウム結合タンパク質Gを指し、ヒトではS100G遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「Elov11」は、脂肪酸伸長酵素1を指し、飽和及び一価不飽和極長鎖脂肪酸の産生において重要な役割を果たす酵素である。

本明細書において用語「Fas」は、脂肪酸シンターゼを指し、ヒトでは

F A S N 遺伝子にコードされている酵素である。

[0081] 本明細書において用語「H 2 - A a」は、ヒストン H 2 A タイプ 1 - A を指し、ヒトでは H 1 S T 1 H 2 A A 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「F a b p 5」は、表皮型脂肪酸結合タンパク質を指し、ヒトでは F A B P 5 遺伝子にコードされているタンパク質である。

本明細書において用語「R n 4 . 5 s」は 4 . 5 S R N A を指す。

[0082] 1 つの実施形態において、本態様に係る方法は、本開示に係る添加剤を含む培養培地中で培養した肺上皮細胞を、前記添加剤を含まない培養培地でさらに培養することを含む。この実施形態において、培養培地中で培養した前記肺上皮細胞は、オルガノイドを形成していてもよく、又は直径が 5 0 μ m 未満の細胞集合体であってよい。培養培地中で培養した塩基肺上皮細胞は、好ましくはオルガノイドを形成している。本開示に係る添加剤を含む培養培地中で培養した肺上皮細胞を、前記添加剤を含まない培養培地でさらに培養することで、培養された肺上皮細胞の分化、例えばクラブ細胞から肺胞細胞（例えば A T 2 細胞、A T 1 細胞）への分化が誘導され得る。

[0083] 本開示に係る添加剤を含まない培養培地は、例えば基本培地であってよい。前記添加剤を含む培養培地での前記細胞の培養は、例えば、培養した細胞を継代することを含んでもよい。前記添加剤を含まない培養培地での前記細胞の培養は、例えば、培養した細胞を継代することを含んでもよい。培養培地で前記細胞を培養する日数は、特に限定されない。培養培地での前記細胞の培養は、例えば 1 ～ 3 0 日、1 ～ 2 5 日、又は 1 ～ 2 0 日であってよい。

[0084] 肺上皮細胞由来のオルガノイドは、例えば、肺上皮組織の基本的な生理機能を模倣し得る。このため、肺上皮細胞由来のオルガノイドは、再生医療において有用である。また、肺がん細胞由来のオルガノイドは、肺がんを処置するための物質のスクリーニングに有用である（N A T U R E C O M M U N I C A T I O N S 2 0 1 9 1 0 3 9 9 1）。

[0085] [肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイド]

本開示の１つの態様は、肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイドを提供する。前記オルガノイドは、本開示に係るオルガノイドの製造方法に従って、肺上皮細胞又は肺がん細胞を含む試料から製造することができる。製造された肺上皮細胞又は肺がん細胞由来のオルガノイドは、例えば、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含む。

[0086] １つ実施形態において、肺上皮細胞由来のオルガノイドは、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含む。前記オルガノイドは、肺上皮細胞由来のオルガノイドであってよく、又は気道細胞由来のオルガノイドであってよい。１つの例において、肺上皮細胞由来のオルガノイドは、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含み、前記細胞層は、ＡＴ２細胞から本質的になる。前記例において、ＡＴ２細胞は、例えば、ＨＴ２－２８０及びＳＦＴＰＣのいずれか一方又は両方を発現し、及び前記ＨＴ２－２８０が前記ＡＴ２細胞において前記内腔に面する細胞膜に若しくはその近傍に局在している。

[0087] 他の例において、肺上皮細胞由来のオルガノイドは、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含み、前記細胞層は、ＡＴ２細胞と、ＡＴ２細胞マーカー及び気管支上皮マーカーを発現する細胞との組合せから本質的になる。他の例において、肺上皮細胞由来のオルガノイドは、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含み、前記細胞層は、気管支上皮マーカーを発現する細胞から本質的になる。１つの例において、気道細胞由来のオルガノイドは、内腔、及び前記内腔に面する細胞層を含み、前記細胞層は、基底細胞と、基底細胞マーカー及び気管支上皮マーカーを発現する細胞との組合せから本質的になる。

[0088] 前記ＡＴ２細胞マーカーは、特に限定されず、公知のＡＴ２細胞マーカーを用いることができる。ＡＴ２細胞マーカーは、例えば、ＨＴ２－２８０及びＳＦＴＰＣのいずれか一方又は両方であってよい。前記気管支上皮マーカーは、特に限定されず、公知の気管支上皮マーカーを用いることができる。気管支上皮マーカーは、例えば、ＳＯＸ２であってよい。前記基底細胞マーカーは、特に限定されず、公知の前記基底細胞マーカーを用いることができ

る。基底細胞マーカーは、例えば、K R T 5であってよい。

[0089] 本明細書における用語「H T 2 - 2 8 0」は、2型肺胞上皮細胞に発現される280～300 k D aのタンパク質である。本明細書における用語「S F T P C」は、肺サーファクタントタンパク質Cを意味する。S F T P Cは、26個のアミノ酸からなる疎水性の α ヘリックス構造に9個の親水性アミノ酸がつながった構造を有する。本明細書における用語「S O X 2」は、S R Y - b o x c o n t a i n i n g g e n e 2を意味する。S O X 2は、DNA結合部位であるHMG (h i g h m o b i l i t y g r o u p) ドメインとそのC末端側の転写活性化ドメインから構成される。HMGドメインは2つの核移行シグナル配列を含むため、S O X 2は主に核内に局在する。本明細書における用語「K R T 5」は、中間径フィラメントタンパク質であり、ヒトではK R T 5遺伝子によってコードされる。

[0090] [再生医療用組成物]

本開示の1つの態様は、再生医療用組成物を提供する。1つの実施形態において、前記再生医療用組成物は、本開示に係る肺上皮細胞由来のオルガノイド、及び／又は前記オルガノイドの細胞を含む。1つの実施形態において、前記再生医療用組成物は、表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種を発現するクラブ細胞-Ⅰ、A T 2細胞又はクラブ細胞-Ⅱから本質的になる肺上皮細胞を含む：

[表2]

表A

クラブ細胞－I	AT2細胞	クラブ細胞－II
Cbr2	Lamp3	Tff2
Hp	Ly2	Reg3g
Cyp2f2	Napsa	Bpifb1
Prdx6	Slc34a2	Muc5b
Scgb1a1	Ly2	Sult1d1
Ldhb	Rnase4	Fxyd3
Ces1d	Hc	Scgb3a1
Cckar	Cd74	Lypd2
Selenbp1	Scd1	Chad
Gstm2	Sftpc	S100a6
Scnn1b	Lgi3	Pglyrp1
Scgb1c1	Cldn18	Aldh3a1
Plpp3	Etv5	Bpifa1
Ephx1	Cxcl15	Gstol
Dcxr	S100g	Lgals3
Alas1	Elovl1	Pigr
Retnla	Fas	Scgb3a2
Sec14l3	H2-Aa	Ltf
Ptgr1	Fabp5	Qsox1
Krtap17-1	Rn4.5s	Cyp2a5
		Cpd
		Ly6a
		Perp
		Kcne3
		Il13ra1
		Slc15a2
		Cd14

[0091] 再生医療用組成物は、例えば、肺損傷又は肺疾患を修復するための医薬組成物であってよい。1つの実施形態において、前記した少なくとも1種の細胞マーカーを発現するクラブ細胞－I、AT2細胞又はクラブ細胞－IIから本質的になる肺上皮細胞を含む再生医療用組成物は、本開示に係る添加剤を含む。1つの例において、クラブ細胞－Iを含む又はから本質的になる肺上皮細胞を含む再生医療用組成物は、前記クラブ細胞－Iが送達された肺で炎症などの悪影響を引き起こさず、オルガノイドを形成する能力を有し、並びに肺胞及び気管支系統の細胞に分化する能力を有し得るため、肺損傷又は

肺疾患を修復するための再生医療用組成物として有用である。1つの例において、クラブ細胞－ⅠⅠを含む又はから本質的になる肺上皮細胞を含む再生医療用組成物は、前記クラブ細胞－ⅠⅠが送達された肺で効率的にオルガノイドを形成する能力を有し、並びに肺胞及び気管支系統の細胞に分化する能力を有するため、肺損傷又は肺疾患を修復するための再生医療用組成物として有用である。

[0092] 1つの例において、クラブ細胞－ⅠⅠを含む又はから本質的になる肺上皮細胞を含む再生医療用組成物は、クラブ細胞－ⅠⅠを損傷した肺又は疾患に罹患した肺を処置するための薬剤（例えば、有機化合物、遺伝子又はタンパク質）を運搬するためのキャリアとして用いることで、肺損傷又は肺疾患を処置するための医薬組成物として有用である。従って、本発明に係る1つの態様は、クラブ細胞－ⅠⅠについて表Aに列記された細胞マーカー並びにそれらのホモログの少なくとも1種に基づいて、哺乳動物の肺組織から調製された肺上皮細胞を含む試料から選択されたクラブ細胞－ⅠⅠから本質的になる肺上皮細胞、及び肺損傷若しくは肺疾患を処置するための薬剤を含む、医薬組成物を提供する。

[0093] 再生医療用組成物は、例えば、医薬上許容される担体を適宜含んでよい。再生医療用組成物は、公知の方法に従って適宜製造することができる。再生医療用組成物は、例えば、肺上皮細胞由来のオルガノイド及び／又は前記オルガノイドの細胞と、医薬上許容される担体とを混合することにより製造することができる。「医薬上許容される担体」は、哺乳動物において安全性が高く、アレルギー反応性が小さい、本開示に係る肺上皮細胞由来のオルガノイド以外の任意の成分を意味する。医薬上許容される担体は、例えば、医薬投与に適した水性若しくは非水性溶媒、溶液（例えば生理食塩水、基本培地又は細胞懸濁保存液）、凍結防止剤（例えばグリセロール）、水溶性高分子（例えばデキストラン）、又は緩衝剤（例えばリン酸緩衝液）を含む。

[0094] 前記肺上皮細胞由来のオルガノイドは、本開示の製造方法に従って調製することができる。前記肺上皮細胞由来のオルガノイドは、例えば、内腔、及

び前記内腔に面する細胞層を含む。「肺上皮細胞由来のオルガノイドの細胞」は、肺上皮細胞由来のオルガノイドを構成する細胞塊の形態であってよく、及び／又は肺上皮細胞由来のオルガノイドから分離された個々の細胞の形態であってよい。肺上皮細胞由来のオルガノイドから分離された個々の状態の細胞は、例えば、前記オルガノイドを、プロテアーゼ（例えば、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、エラスターゼまたはトリプシン）で処理した後、所定の溶液（例えば、基本培地）に懸濁することにより調製することができる。再生医療用組成物が、肺上皮細胞由来のオルガノイドの細胞塊の形態の細胞を含む場合、前記再生医療用組成物中の細胞塊は、例えば、その必要のなる哺乳動物への投与前に、個々の状態の細胞にするために処理されてよい。

[0095] 再生医療用組成物は、例えば、外科的手法により所定の部位に移植することによって、又は注射によって所定の部位に注入することによって、その必要のある哺乳動物に投与される。再生医療用組成物が投与される哺乳動物と、当該オルガノイドの肺上皮細胞を提供した哺乳動物とは、移植片拒絶反応の軽減の観点から、同一種であることが好ましく、同一個体であることがさらに好ましい。再生医療用組成物の文脈において、哺乳動物は、例えば、ヒトである。

[0096] 本明細書における用語「肺損傷」又は「肺疾患」は、例えば、病原性疾患、肺がん（例えば小細胞肺がん又は非小細胞肺がん（例えば、腺がん、扁平細胞がん若しくは大細胞がん））、間質性肺疾患、肺炎（例えば器質化肺炎）、結核、嚢胞線維症、気管支炎、肺線維症、類肉腫症、ⅠⅠ型過形成、慢性閉塞性肺疾患、気腫、喘息、肺浮腫、急性呼吸促迫症候群、喘鳴、気管支拡張症、ハンタウイルス肺症候群、中東呼吸器症候群（MERS）、重症急性呼吸器症候群（SARS）及び塵肺が挙げられる。病原性疾患は、例えば、アデノウイルス、コロナウイルス（例えば、COVID-19、SARS-CoV、SARS-CoV-2又はMERS-CoV、若しくはそれらの変異株）、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ライノウイルス、ハンタウイ

ルス、エンテロウイルス（例えば、エンテロウイルスD68：EV-D68）、百日咳菌、クラミドフィラ・ニューモニエ、ジフテリア菌、コクシエラ・ブルネッティ、インフルエンザ菌、レジオネラ・ニューモフィラ、モラクセラ・カタラーリス、結核菌、肺炎マイコプラズマ、黄色ブドウ球菌、肺炎連鎖球菌、または化膿性連鎖球菌によって引き起こされる疾患であってよい。

[0097] [肺がんを処置するための物質のスクリーニング方法]

本開示の1つの態様は、肺がんを処置するための物質のスクリーニング方法を提供する。前記スクリーニング方法は、本開示により製造された肺がん細胞由来のオルガノイドと被験物質とを接触させること、前記被験物質との接触後のオルガノイドを測定すること、及び前記被験物質との接触後のオルガノイドの測定値と対照値とを比較することを含む。1つの実施形態において、前記方法は、比較の結果に基づいて、前記被験物質が、肺がんを処置できる物質であるかを判定することを含む。

[0098] 本明細書における用語「肺がん」は、限定するものではないが、小細胞肺がん又は非小細胞肺がん（例えば、腺がん、扁平細胞がん若しくは大細胞がん）であってよい。

[0099] 本明細書における用語「被験物質」は、例えば、低分子化合物、タンパク質（例えば抗体）、DNA、RNA、低分子干渉RNA、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。被験物質は、例えば、肺がん以外の疾患又はがんを治療するための薬剤であってよい。被験物質は、例えば、1種であってもよく、又は2種以上の混合物であってもよい。被験物質は、好ましくは1種類の物質である。

[0100] 本開示に係る肺がん細胞由来のオルガノイドと被験物質とを「接触させる」ことは、前記オルガノイドと、被験物質とを接触可能な状況下に置くことを意味する。前記オルガノイドと被験物質との接触は、例えば、前記オルガノイドを含む溶液中に、被験物質を添加することであってよい。

[0101] 本明細書における用語「オルガノイドを測定する」は、例えば、オルガノ

イドのサイズを測定すること、又はオルガノイドを構成する細胞のマーカータンパク質の発現を測定することであってよい。オルガノイドのサイズは、例えば、公知の装置（例えば顕微鏡又はFACS）を用いて測定できる。オルガノイドを構成する細胞のマーカータンパク質の発現は、公知の装置（例えば顕微鏡又はFACS）及び公知の試薬（例えば蛍光物質で標識化された抗体）を用いて測定できる。オルガノイドのサイズは、例えば、オルガノイドの周囲の長さ、直径（例えば長径、及び短径）又は面積であってよい。オルガノイドを構成する細胞のマーカータンパク質の発現は、例えば、オルガノイドの面積当たりの、マーカータンパク質の発現量に対応する蛍光強度であってよい。測定するマーカータンパク質は、1種であってもよく、又は2種以上の組合せであってもよい。測定するマーカータンパク質は、好ましくは2種以上の組合せである。

[0102] 本明細書における用語「オルガノイドの測定値」は、例えば、1回の測定の1つの測定値であってもよく、複数回の測定の平均値であってもよく、複数のオルガノイドの測定値の平均値であってよい。オルガノイドの測定値は、例えば、被験物質を接触させる前後の変化の値（例えば差分又は倍数）であってもよい。

[0103] 本明細書における用語「対照値」は、例えば、肺がん細胞を処置用の薬剤を対照物質として用いた場合の測定値であってよい。対照値は、例えば、被験物質を接触させた後の値をオルガノイドの測定値とする場合、前記被験物質を接触させる前又は前記被験物質を接触させない対照オルガノイドの測定値を対照値としてよい。

[0104] 被験物質が、肺がんを処置できる物質であるかの「判定」は、例えば、測定値がオルガノイドのサイズである場合、対照値よりも、被験物質を接触させたオルガノイドのサイズの測定値が小さい場合（即ち、オルガノイドのサイズの増加の程度が低下、又はサイズが縮小した場合）、前記被験物質を、肺がんを処置できる物質と判定することを含んでよい。

[0105] [培養培地]

本開示の1つの態様は、肺上皮細胞又は肺がん細胞からオルガノイドを製造するための培養培地を提供する。前記培養培地は、0～10% v/vの細胞外マトリクスを含み、及びケラチノサイト成長因子(KGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF) 10及び肝細胞成長因子(HGF) からなる群より選択される少なくとも1種と、骨形成タンパク質(BMP) 阻害剤と、TGFβ阻害剤との組合せを含む。

[0106] 前記培養培地は、例えば、各成分が所望の濃度となるように配合された液体の形態であってよい。前記培養培地は、例えば、所定量の純水を混合することで、各成分が所望の濃度となるように配合された固体の形態であってよい。

[0107] 本開示により提供される用語及び実施形態の説明は、特に言及がない限り、本開示により提供する態様及び実施形態の間で適宜適用される。

[0108] 以下、具体的な実施例を記載するが、それらは本発明の好ましい実施形態を示すものであり、添付する特許請求の範囲に記載の発明をいかようにも限定するものではない。

実施例

[0109] [調製例1]

(肺上皮幹細胞を含む懸濁液の調製)

ヒト肺サーファクタントタンパク質C (SFTPC) プロモーターの制御下に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子を有し、Sftpcの発現に伴ってGFPを発現するSFTPC-GFPマウス (J Immunol 2008; 180: 881-888、及びRapid Communications: L349-L356) を準備した。SFTPC-GFPマウスの肺末梢領域の組織切片において、Sftpc及びScgb1a1 (別名CC10またはCCSP) に対する免疫染色を行った。

[0110] Scgb1a1は、クラブ細胞の細胞マーカーとして知られている。前記免疫染色は、肺泡領域にSftpcとGFPとを発現するAT2細胞が存在すること、並びに気管支の末梢にSftpcとGFPとScgb1a1とを

発現する気管支肺胞上皮幹細胞 (BASCs)、及びSftpcとGFPとを弱く発現し、且つScgb1a1を発現するクラブ細胞 (別名variant club cell) が存在することを示した。肺末梢領域におけるGFPの発現パターンは、STEM CELLS 2012; 30: 1948-1960において報告された発現パターンと同様であった。この免疫染色の結果は、その発現がSFTPCプロモーターの制御下にあるGFPを指標とすることで、SFTPC-GFPマウスの肺組織に含まれる様々な細胞の中から、肺上皮幹細胞であるAT2細胞、BASCs及びクラブ細胞を識別できることを示唆する。

[0111] 二酸化炭素によりSFTPC-GFPマウスを安楽死させ、血液を除去した。胸骨を取り除き、肺及び気管を露出させた。気管からサーフローを挿入し、それを通じて前記肺及び気管に1.5 mLのプロテアーゼ溶液を注入した。肺をSFTPC-GFPマウスから切り出し、2.5 mLのプロテアーゼ溶液を注いだシャーレに移した。切り出した肺を前記シャーレ中で細切りにし、ピペティング操作により肺組織懸濁液を得た。前記肺組織懸濁液を4℃の遠心分離(400g×5分)にかけ、沈殿物と上清とに分離させ、前記上清を破棄した。前記沈殿物に、3% FBSを含有するPBSを加えて懸濁し、肺上皮幹細胞を含む懸濁液を得た。

[0112] 前記肺上皮幹細胞を含む懸濁液に、蛍光物質で標識化した抗EpCAM抗体を添加した。EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) は、上皮細胞に特異的な細胞間細胞接着分子として知られるI型膜貫通糖タンパク質である。FACS Aria II (BD社) を用い、抗EpCAM抗体に由来する蛍光強度に基づいて、肺上皮幹細胞を特定した。更に、GFP由来の蛍光強度に基づいて、特定された肺上皮幹細胞を3つの分画(P17、P18、P19)に分けた(図1)。

[0113] [試験例1]

マーカー遺伝子の発現パターンを調べることにより、各分画に含まれる細胞種を特定した。マーカー遺伝子の発現パターンは、qPCRにより各マ-

カー遺伝子を増幅させて調べた。その結果、P17分画はクラブ細胞、Ciliated細胞、AT1細胞 (Type I alveolar epithelial cell) 及び基底細胞を主として含むことが示された。同様に、P18分画はバリアント・クラブ (distal club) 細胞を、P19分画はAT2細胞及びBASCsを含むことが示された。

[0114] (基本培地)

図1中のP19分画の肺上皮幹細胞を含む懸濁液、P18分画の肺上皮幹細胞を含む懸濁液、及びP17分画の肺上皮幹細胞を含む懸濁液を、Feeder細胞を用いずに培養し、オルガノイドを形成させた。培養には、MTEC/B27を基本培地として用いた。MTEC/B27の成分を以下に示す。

[表3]

成分	販売業者	分量 (mL)
DMEM/F12 NO PHENOL RED	Lifetechnologies	500
1M HEPES	ナカライテスク	7.5
7.5% NaHCO ₃	ナカライテスク	2
B27 (登録商標) Supplement (×50) serum free	GIBCO	10
FBS (終濃度5%)	SIGMA	25
fungizone (終濃度250 ng/mL)	ThermoFisher	500 [μ L]
Penicillin/streptomycin (終濃度100 U/mL、100 μ g/mL)	Nacalai	5

[0115] (添加剤)

前記基本培地に以下の添加剤を適宜組合せて、培養培地とした。

[表4]

略記号	名称	販売業者	終濃度	備考
K	KGF/Fgf7 mouse recombinant	R & D	50 ng/mL	Fgf7, Fgf ligand
C	CHIR99021	SIGMA	3 μ M	GSK-3 inhibitor (Wnt activator)
N	Recombinant murine Noggin	PeptideTech	100 ng/mL	Bmp inhibitor
S	TGF-BETA RI KINASE INHIBITOR VI SB431542	Calbiochem	10 μ M	ALK4,5 inhibitor (Tgf β signal in hibitor)
H	HGF mouse recombinant	R & D	30 ng/mL	Met ligand
F10	Recombinant Human FGF-10	PEPROTECH	50 ng/mL	Fgf ligand
E	EGF	Corning	25 ng/mL	Egf ligand
X	XAV939	SIGMA	10 μ M	Tankyrase inhibi tor (Wnt/ β cateni n inhibitor)
Y	Y-27632, Dihydrochloride Salt	LC Laborato ries	10 μ M	Rock inhibitor

[0116] (肺上皮幹細胞のオルガノイド形成)

肺上皮幹細胞を含む懸濁液を、遠心分離 (400 g、10分、4℃) にか
け、沈殿物をMTEC/B27に懸濁した。所定数の肺上皮幹細胞を、50
%又は75%のMatrigel (登録商標) (Matrigel Mat
rix basement membrane growth facto
r reduced (Corning社)) と混合した。得られた混合液2
0 μ Lを、37℃に加温した48well plateの各ウェルに滴下し
、前記プレートを37℃で20分間維持して、各ウェルにゲルを形成させた
。Hgfと、Fgf10と、KGFと、Nogginと、SB431542
との組合せを前記基本培地に添加した培養培地250 μ Lを、形成したゲル
上に適用し、前記プレートを37℃、5%CO₂下で6日間培養を行った。培
養培地は、3日に一度交換した。

[0117] P17分画～P19分画の肺上皮幹細胞を含む懸濁液をそれぞれ上記のよ
うに培養した結果、顕微鏡下で直径50 μ m以上の細胞塊が観察された。培
養物に対して免疫組織染色を行った。免疫組織染色は、P19分画において
観察された細胞塊が、AT2細胞を主とするSftpcを発現するオルガノ
イドであることを示した。P18分画において観察された細胞塊は、バリア

ント・クラブ細胞のように *S f t p c* と *S c g b 1 a 1* とを発現する細胞を主とするオルガノイドであることが示された。P 1 7 分画において観察された細胞塊は、クラブ細胞に由来すると考えられる *S c g b 1 a 1* を強く発現するオルガノイドと基底細胞に由来すると考えられる *K r t 5* を発現するオルガノイドとがそれぞれ形成されることが示された。

[0118] [試験例 2]

調製例 1 にて記載したように、6 匹の *S F T P C* - *G F P* マウスから、肺上皮幹細胞を含む懸濁液をそれぞれ調製した ($n = 6$)。図 1 で示される *G F P* 蛍光強度に基づいた、肺上皮幹細胞の散布図において、P 1 9 分画に相当する分画を、以下、*G F P^{hi}* 分画と称する。同様に、P 1 9 分画に対応する *G F P* 強度よりも低い *G F P* 蛍光強度に対応する P 1 8 分画に相当する分画を、*G F P^{lo}* 分画と称し、P 1 8 分画に対応する *G F P* 強度よりも低い *G F P* 蛍光強度に対応する P 1 7 分画に相当する分画を、*G F P^{neg}* 分画と称する。

[0119] (*G F P^{hi}* 分画)

G F P^{hi} 分画の肺上皮幹細胞の懸濁液を試験例 1 と同様に培養した。ただし、試験例 2 では、試験例 1 とは異なり、培養培地には以下の添加剤の組合せを添加し、1 つの肺上皮幹細胞を含む懸濁液を 4 ウェルで、1 ウェルあたり 5, 0 0 0 細胞となるようにして培養した。

[表5]

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

＋： 添加剤として用いた

－： 添加剤として用いなかった

[0120] 6 日間の培養後、顕微鏡を用いて培養物を撮像し、ソフトウェアを用いて

直径 $50\ \mu\text{m}$ 以上の細胞塊を計数した。各ウェル中の細胞塊の数を、添加した細胞数で除して得られた割合である C F E [%] を、オルガノイド形成の効率の指標として用いた。C F E ($n = 6$) の平均値及びその標準偏差は、6 匹のマウスで得られた C F E から算出した (図 2)。また、長径 [μm] ($n = 6$) の平均及びその標準偏差は、6 匹のマウスで得られたオルガノイドの長径より算出した (図 3)。

[0121] ・ 4 種の添加剤の組合せ

図 2 及び図 3 は、4 種の添加剤の組合せ「K C N S」が、約 0.18% の C F E、及び約 $136\ \mu\text{m}$ の長径であったことをそれぞれ示す。K C N S における添加剤 K を H に置き換えた添加剤の組合せ「H C N S」を用いた場合の C F E 及び長径は、K C N S を用いた場合の C F E および長径とそれぞれ同等であった。この結果は、4 種の添加剤の組合せ K C N S において、添加剤「K」と「H」とが、効率的なオルガノイド形成に関して代替可能であることを示す。

[0122] 「K C N S」における添加剤 K を F 1 O に置き換えた添加剤の組合せ「F 1 O C N S」の C F E および長径は、「K C N S」の C F E および長径とそれぞれ同等であった。この結果は、4 種の添加剤の組合せ「K C N S」において、添加剤「K」と「F 1 O」とが、効率的なオルガノイド形成に関して代替可能であることを示す。「K C N S」における添加剤「K」を「E」に置き換えた添加剤の組合せ「E C N S」の C F E は、「K C N S」の C F E よりも有意に小さかった (T u k e y 検定、* : $P < 0.05$)。

[0123] ・ 3 種の添加剤の組合せ

4 種の添加剤の組合せ「K C N S」において、添加剤「H」又は「F 1 O」と代替可能な添加剤「K」を除いた 3 種の添加剤の効率的なオルガノイド形成 (高い C F E) 及び長径における重要性を検討する。「K C N S」から添加剤「N」を除いた添加剤の組合せ「K C S」の C F E 及び長径は、「K C N S」の C F E 及び長径よりもそれぞれ有意に小さかった (T u k e y 検定、* : $P < 0.05$)。「K C N S」から添加剤「S」を除いた添加剤の

組合せ「K C N」のC F Eは、「K C N S」のC F Eよりも優位差は無かったが低い傾向にあった。これらの結果は、4種の添加剤の組合せ「K C N S」において、添加剤「N」及び「S」が効率的なオルガノイド形成に関して重要であることを示す。

[0124] 「K C N S」から添加剤「C」を除いた添加剤の組合せ「K N S」のC F Eは、「K C N S」のC F Eおよび長径と有意差がなかった。この結果は、4種の添加剤の組合せ「K C N S」において、添加剤「C」は効率的なオルガノイド形成に関して重要ではないことを示す。しかし、試験例3で述べるように、添加剤「C」は、細胞塊を構成する肺上皮幹細胞の分化転換を引き起こすことが示唆される。

[0125] ・ 6種の添加剤の組合せ

図2及び図3は、6種の添加剤の組合せ「K F 1 0 H C N S」が約0.87%のC F E、及び約113 μ mの長径であったことをそれぞれ示す。「K F 1 0 H C N S」のC F Eは、4種の添加剤の組合せ「K C N S」および「F 1 0 C N S」よりも有意に大きかった（T u k e y検定、* : P < 0.05）。「K F 1 0 H C N S」を用いた場合の長径は、4種の添加剤の組合せの中で、最も大きい長径を示した「K C N S」と同等であった。この結果は、6種の添加剤の組合せ「K F 1 0 H C N S」が、効率的なオルガノイド形成に関して好ましいことを示す。

[0126] ・ 5種の添加剤の組合せ

6種の添加剤の組合せ「K F 1 0 H C N S」における添加剤「C」は、上述のとおり、効率的なオルガノイド形成に関して重要ではないことが示された。従って、「K F 1 0 H C N S」において添加剤「C」を除いた5種の添加剤の組合せ「H F 1 0 K N S」が、効率的なオルガノイド形成に関して好ましいことが示唆される。

[0127] (G F P^{hi}分画)

上記したG F P^{hi}分画の肺上皮幹細胞の懸濁液と同様、G F P^{lo}分画の肺上皮幹細胞の懸濁液についても、試験例1と同様に培養し、C F E [%]を

算出した。ただし、GFP^{hi}分画とは異なり、1 ウェルあたり150細胞となるようにして培養した。CFE (n=6) の平均値及び標準偏差を算出した(図4)。さらにオルガノイドの長径(n=6)の平均値及び標準偏差を算出した(図5)

[0128] ・ 4 種の添加剤の組合せ

図4及び図5は、4種の添加剤の組合せ「KCNS」が約8.0%のCFE、約127 μ mの長径であったことをそれぞれ示す。「KCNS」における添加剤「K」を、「H」又は「F10」に置き換えた添加剤の組合せ「HCNS」又は「F10CNS」のCFEおよび長径は、「KCNS」のCFEと有意差はなかった。この結果は、4種の添加剤の組合せ「KCNS」において、添加剤「K」と「H」又は「F10」とが、効率的なオルガノイド形成に関して代替可能であることを示す。「KCNS」における添加剤「K」を「E」に置き換えた添加剤の組合せ「ECNS」のCFEは、「KCNS」のCFEよりも有意に小さかった(Tukey検定、*: P<0.05)。

[0129] ・ 3 種類の添加剤の組合せ

GFP^{hi}分画に対して行ったように、GFP^{lo}分画に対しても、4種の添加剤の組合せ「KCNS」から添加剤「C」、「N」、又は「H」を除いた3種類の添加剤の組合せ「KNS」、「KCS」、又は「KCN」のCFEおよび長径を調べた。「KCS」は、「KCNS」のCFE及び長径よりも有意に小さかった(Tukey検定、*: P<0.05)。「KNS」のCFEは「KCNS」のCFEおよび長径と有意差はないものの、低い傾向を示した。「KCNS」から添加剤「C」を除いた添加剤の組合せ「KNS」のCFEおよび長径は、「KCNS」のCFEと有意差がなかった。これらの結果は、GFP^{hi}分画に対する結果と同じであった。

[0130] ・ 6 種の添加剤の組合せ、及び5種類の添加剤の組合せ

図4及び図5は、6種の添加剤の組合せ「KF10HCNS」が、効率的なオルガノイド形成に関して、4種の添加剤の組合せ「KCNS」と有意差

は無いが、大きい傾向があったことを示す。「KF10HCNS」は、効率的なオルガノイド形成に関して、4種の添加剤の組合せ「HCNS」及び「F10CNS」と有意差は無かった。6種の添加剤の組合せ「KF10HCNS」における添加剤「C」は、上述のとおり、効率的なオルガノイド形成に関して重要ではないから、5種の添加剤の組合せ「HF10KNS」は、GFPI⁺分画においても効率的なオルガノイド形成に関して、好ましい添加剤の組合せであることが示唆される。

[0131] (GFPI^{neg}分画)

上記したGFPI^{hi}分画の肺上皮幹細胞の懸濁液と同様、GFPI^{neg}分画の肺上皮幹細胞の懸濁液についても、CFE [%]を算出した。3種類の添加剤の組合せ「KNS」のCFEは、0.75%であった。

[0132] 試験例2は、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤KGF (K)、HGF (H) 及びFGF10 (F10) からなる群より選択される少なくとも1つと、Noggin (N) などのBMP阻害剤と、SB431542 (S) などのTGFβ阻害剤とからなる組合せが好ましく、より効率的なオルガノイド形成に関しては、CHIR99021 (C) と「N」と「S」と「H」とからなる組合せがより好ましく、「K」と「N」と「S」と「H」と「F10」とからなる組合せ又は「K」と「C」と「N」と「S」と「H」と「F10」とからなる組合せがさらに好ましいことを示唆した。AT2のオルガノイドの効率的な形成に関しては、試験例3で示されるように、「C」を含むことが好ましい。

[0133] [試験例3]

試験例2は、CHIR99021 (Wntシグナル活性化剤) を添加しても、オルガノイド形成の効率に変化がないことを示した。試験例3は、CHIR99021 (C) による肺上皮幹細胞の分化転換に対する影響を検討する。Canonical Wnt阻害剤であるXAV939 (X) を用いた。GFPI^{hi}分画及びGFPI⁺分画の肺上皮幹細胞を含む懸濁液を、試験例2と同様にして培養し、オルガノイドを形成させた。4種類の添加剤の組合せ

「KCNS」又は「KXNS」を基本培地MTEC/B27に添加して、培養培地とした。培養後、形成されたオルガノイドのパラフィン切片を作製した。前記パラフィン切片中のオルガノイドについて、Sftpcに対する抗体及び気管支上皮細胞マーカーであるSox2に対する抗体を用いた組織免疫染色を行った。

[0134] GFPhⁱ分画に関し、オルガノイドにおけるSox2の発現は、Wntシグナル活性化剤であるCHIR99021(C)を含む添加剤の組合せKCNSでは一部のオルガノイドに弱く発現が認められた。Wnt/ β カテニン阻害剤である10 μ MのXAV939(X)を含む添加剤の組合せ「KXNS」では、一部のオルガノイドにおいてSox2の発現が強く認められた。Sftpcの発現は、添加剤の組合せ「KCNS」では、添加剤の組合せ「KXNS」と比べて、強い傾向があった。試験例1で示されたように、GFPhⁱ分画には、主としてAT2を含み、一部にBASCsを含む。従って、これらの結果は、GFPhⁱ分画の懸濁液中に一部存在するBASCsが、Wntシグナル活性化剤の存在下で、AT2に分化転換され、その結果、AT2のオルガノイドが形成されたこと、及びWnt阻害剤の存在下では、一部存在したBASCsのオルガノイドと、主として存在したAT2のオルガノイドとを含む少なくとも2種類のオルガノイドが形成されたと推察された。

[0135] GFP^{lo}分画に関し、オルガノイドにおけるSox2の発現は、Wntシグナル活性化剤を含む添加剤の組合せ「KCNS」では弱かったのに対して、Wnt阻害剤を含む添加剤の組合せ「KXNS」では、Sox2の発現は強かった。Sftpcの発現は、「KCNS」では、「KXNS」と比べて、強い傾向があった。GFP^{lo}分画における結果は、GFPhⁱ分画における結果と同様の傾向を示した。

[0136] 試験例3は、Wntシグナル活性化剤（例えばCHIR99021）の存在下で、肺上皮幹細胞のオルガノイドを形成させると、AT2細胞以外の細胞種からAT2のオルガノイド形成を誘導できることを示唆する。

[0137] [実施例1] 肺上皮幹細胞からのオルガノイド形成

GFP^{hi}分画の肺上皮幹細胞を、96穴の超低吸着プレート (cell repellent 96well plate) に、1ウェルあたり2,500細胞となるように播種した。氷上で冷却した基本培地MTEC/B27に7種類の添加剤Y-27632 (Y) とHGF (H) とFgf10 (F10) とKGF (K) とCHIR99021 (C) とCHIR99021 (N) とSB431542 (S) との組合せを添加した培養培地に、2.5%のMatrigelを添加した培養培地を用いて、試験例2と同様、6日間培養し、CFEを算出した (図6)。前記同様、GFP^{lo}分画の肺上皮幹細胞を、1ウェルあたり200細胞となるように播種し、6日間培養した後、CFEを算出した (図6)。

[0138] 図6は、2.5%という低濃度のMatrigelを含む培養培地中で、肺上皮幹細胞を培養することによって、肺上皮幹細胞のオルガノイドが形成されること、並びにそのオルガノイド形成の効率は、GFP^{hi}分画で約1.4%であり、GFP^{lo}分画で約6.4%であったことを示す。この結果は、50%又は75%Matrigelによるゲルを含む培養培地中での肺上皮幹細胞のオルガノイド形成の効率は、GFP^{hi}分画での0.86%及びGFP^{lo}分画での12%と同程度であったことを示す。

[0139] 実施例1は、本開示に係る添加剤の存在下であれば、足場としての細胞外マトリクスのゲル (例えば、50%又は75%Matrigel) を含む培養培地中での培養であっても、分散成分として細胞外マトリクス (例えば、2.5%Matrigel) を含む培養培地中での培養であっても、肺上皮幹細胞のオルガノイドを形成可能であることを示す。

[0140] [試験例4]

形成したオルガノイドが分化能を有するかを調べた。GFP^{hi}分画の肺上皮幹細胞を、試験例2と同様にして、基本培地MTEC/B27に4種の添加剤の組合せ「KCNS」を添加した培養培地中で8日間培養した。2つの培養物のうち1つは、前記培養培地中でさらに4日間培養した。もう1つは、基本培地中でさらに4日間培養した。培養12日目に、基本培地での培養

で形成されたオルガノイドにおいて、肺胞の分化細胞であるAT1細胞の細胞マーカーであるHopxが強く発現されていることが示された。試験例4は、本開示に係る添加剤の存在下で形成されるオルガノイドが、分化能を有することを示す。

[0141] [調製例2]

(肺腺癌細胞を含む懸濁液の調製)

マウスB6.129S-Sftpc^{tm1}(cre/ERT2)Blh/J(以下「Sftpc-CreERT2」)(Jackson Lab, StockNo. 028054)と、マウスB6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato, -EGFP)Luo/J(以下「Rosa26-mTmG」)(Jackson Lab, StockNo. 007676)と、マウスB6N.Cg-Kras^{tm4}Tyj/CjDswJ(以下Kras^{LSLG12D})(Jackson Lab, StockNo. 019104)との3種のマウスを掛け合わせた、Sftpc-CreERT2;Kras^{LSLG12D};Rosa26-mTmGマウスを準備した。Sftpc-CreERT2;Kras^{LSLG12D};Rosa26-mTmGマウスにおいて、Krasが活性化された細胞は、細胞膜がEGFPに由来する緑色蛍光を発する。

[0142] Sftpc-CreERT2では、tamoxifenの投与なしに、Cre遺伝子組み換え酵素が活性化し、約5-10%の細胞に組換えが生じる(Barkauskas CE. et al., J Clin Invest. 2013;123(7):3025-36.)。Sftpc-CreERT2;Kras^{LSLG12D};Rosa26-mTmGマウスの肺において、多数のノジュールが確認され、がん化された細胞が前記マウスの肺に存在することが示唆された。

[0143] 調製例1と同様にして、Sftpc-CreERT2;Kras^{LSLG12D};Rosa26-mTmGマウスから、肺上皮細胞を含む懸濁液を調製した。調製例1と同様、調製した肺上皮細胞を含む懸濁液から、蛍光物質

で標識化した抗E p C A M抗体由来の蛍光、及びG F P由来の蛍光に基づいて、K r a sが活性化された肺腺癌細胞を含む懸濁液を得た。

[0144] [実施例2] 肺腺癌細胞からのオルガノイド形成

上記で得られた肺腺癌細胞を、96穴の超低吸着プレート(c e l l r e p e l l a n t 96w e l l p l a t e)に、1ウェルあたり2,500細胞となるように播種した。氷上で冷却した基本培地M T E C / B 2 7に7種類の添加剤Y-27632(Y)とHGF(H)とFgf10(F10)とKGF(K)とCHIR99021(C)とCHIR99021(N)とSB431542(S)との組合せを添加した培養培地に、2.5%のMatrigelを添加した培養培地を用いて、試験例2と同様、6日間培養し、CFEを算出した(図7)。前記同様、上記で得られた肺腺癌細胞を、基本培地M T E C / B 2 7と2.5%のMatrigelとを含む培養培地中で6日間培養した後、CFEを算出した(図7)。

[0145] 図7に示されるように、前記添加剤の存在下(図7中「+」)、肺腺癌細胞を培養することによって、オルガノイドが形成され、そのCFEは約1.7%であった。前記添加剤が存在しない場合(図7中「-」)、肺腺癌細胞のオルガノイド形成は観察されなかった。

[0146] 実施例2は、本開示に係る添加剤の存在下であれば、足場を用いない培養培地中での培養であっても、肺腺癌細胞のオルガノイドを形成させることができることを示す。

[0147] [調製例3]

調製例1と同様にして、SFTPC-GFPマウスの肺から、肺上皮幹細胞を含む懸濁液を得て、FACS Aria II(BD社)を用い、GFP由来の蛍光強度に基づいて、特定された肺上皮幹細胞を3つの分画(GFP^{hi}、GFP^{lo}、及びGFP^{neg})に分けた(図8)。GFP^{hi}分画は、試験例2のP19分画に相当する。GFP^{lo}分画は、試験例2のP18分画に相当する。GFP^{neg}分画は、試験例2のP17分画に相当する。

[0148] [試験例5]

試験例 1 と同様にして、マーカー遺伝子の発現パターンを q P C R により各マーカー遺伝子を増幅させて調べて、その発現パターンから各分画に含まれる細胞種を推定した（図 9）。その結果、G F P^{neg}分画は、K r t 5 陽性細胞である基底細胞と、S c g b 1 a 1 及び S c g b 3 a 2 が陽性のクラブ細胞を主として含むことが示された。G F P^{neg}分画は、試験例 1 の P 1 7 分画と同様、C i l i a t e d 細胞及び A T 1 細胞も含んだ。G F P^{lo}分画は、S c g b 1 a 1 及び S c g b 3 a 2 が陽性のクラブ細胞を主として含むことが示された。G F P^{hi}分画は、S f t p c 及び A b c a 3 が陽性の A T 2 細胞を主として含むことが示され、一部 B A S C を含むことが示唆された。

[0149] [試験例 6]

G F P^{hi}分画、G F P^{lo}分画、及び G F P^{neg}分画の細胞をそれぞれ、基本培地 M T E C / B 2 7 に H G F (H) 、 F G F 1 0 (F 1 0) 、 K G F (K) 、 N O G G I N (N) 、 S B 4 3 1 5 4 2 (S) 及び C H I R 9 9 0 2 1 (C) を表 2 に記載の終濃度となるように添加した増殖培地（5 0 % M a t r i g e l を含む）中で、F e e d e r 細胞を用いずに培養した。基本培地に添加した C H I R 9 9 0 2 1 (C) は、オルガノイド形成に必須ではないが、クラブ細胞の A T 2 細胞への分化に関与している可能性があるため添加した。培養 9 日目に、前記増殖培地を基本培地 M T E C / B 2 7 に交換し、さらに 3 日間培養して、分化を促進されたオルガノイドを形成させた。

[0150] 分化促進前後に形成されたオルガノイドにおけるマーカータンパク質の発現を、以下の試薬を用いた免疫染色により調べた。

[表6]

名称	型番	販売業者	備考
CC10(B6)	sc-390313	Santa cruz	Host: mouse 1:500-1000
Prosurfactant ProteinC(proSP-C)	AB3786	Millipore	Host: rabbit 1:300
Human/Mouse/Rat SOX2 Antibody	14-9965-82	R&D	Host: goat 1:200
Cytokeratin5 antibody(EP1601Y)(rabbit)	ab52635	Abcam	Host: rabbit 1:500
Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin antibody produced in mouse	T7541	Sigma	Host: mouse 1:1000
anti-m/rRAGE purified Rat monoclonal IgG clone175410	MAB1179	R&D	Host: rat1:200
Anti-HOPX antibody produced in rabbit	HPA030180	Sigma	Host: rabbit1:200
Anti HT2-280	TB-27AHT2-280	TERRACE BIOTECH	Host: mouse 1:50
トリプシン、ブタ膵臓由来細胞生物学用	T4799-5G	Sigma	
Antigen Unmasking solution	H-3300	Vector	
Antigen Unmasking solution (high pH)	H-3301	Vector	
M.O.M.(mouse on mouse) immunodetection kit	BMK-2202	Vector	

[0151] GFP^{neg}分画の細胞を培養することで、少なくとも2種類のオルガノイドが形成された(図10)。一種のオルガノイドは、分化前(d9)にはKrt5陽性(基底細胞マーカー)の基底細胞及びSCGB1A1陽性(クラブ細胞マーカー)のクラブ細胞を含む細胞集団で構成された。試験例6の分化条件で形成された前記オルガノイドを構成する細胞は、Ciliated細胞まで分化しなかった。もう一種のオルガノイドは、分化前(d9)にはSCGB1A1陽性(クラブ細胞マーカー)のクラブ細胞を含む細胞集団で構成され、分化後(d12)にはACTUB陽性(Ciliated細胞マーカー)となったクラブ細胞を含む細胞集団で構成された。

[0152] GFP⁺分画の細胞を培養することで、少なくとも2種類のオルガノイドが形成された(図11)。一種のオルガノイドは、分化前(d9)にはSCGB1A1陽性(クラブ細胞マーカー)のクラブ細胞、SOX2陽性(気管支上皮マーカー)の細胞及びSFTPC陽性(AT2細胞マーカー)の細胞

を含む細胞集団で構成され、分化後（d 1 2）にはA G E R陽性（A T 1細胞マーカー）となった肺胞系統（l i n e a g e）の細胞を含む細胞集団で構成された。もう一種のオルガノイドは、分化前（d 9）にはS O X 2陽性（気管支上皮マーカー）であり、かつS F T P C陽性（A T 2細胞マーカー）の細胞集団で構成され、分化後（d 1 2）にはA G E R陽性（A T 1細胞マーカー）となった肺胞系統の細胞を含む細胞集団で構成された。

[0153] G F P^{hi}分画の細胞を培養することで、少なくとも1種のオルガノイドが形成された（図1 2）。前記オルガノイドは、分化前（d 9）にはS F T P C陽性（A T 2細胞マーカー）の細胞を含む細胞集団で構成され、分化後（d 1 2）にはA G E R陽性（A T 1細胞マーカー）のA T 2細胞を含む細胞集団で構成された。

[0154] [試験例7]

S F T P C-G F Pマウス由来のG F P^{hi}分画、G F P^{lo}分画及びG F P^{neg}分画の細胞を対象細胞として用い、効率的なオルガノイド形成に有用な添加剤の組合せを検討する。5 0 %又は7 5 %のM a t r i g e l（登録商標）を用い、試験例2と同様にして、前記細胞を含むゲルを形成させ、培養を行った。オルガノイド形成の効率は、C F E [%] 及びオルガノイドの長径の値に基づいて評価した。試験例7では、6匹のS F T P C-G F Pマウスを使用し、G F P^{hi}分画、G F P^{lo}分画及びG F P^{neg}分画の細胞を合計でそれぞれ1 2 0, 0 0 0細胞、3, 6 0 0細胞及び2 4, 0 0 0細胞を用いた（n = 6）。

[0155] (G F P^{hi}分画)

G F P^{hi}分画の肺上皮幹細胞を、以下の添加剤の組合せを添加した培養培地中で、試験例2と同様にして、培養してオルガノイドを形成させた。前記培養では、1ウェルあたり5, 0 0 0細胞となるように播種して培養した。試験例2と同様の方法にて、C F E [%] 及び長径[μm]を測定した（図1 3）。

[表7]

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

＋： 添加剤として用いた

－： 添加剤として用いなかった

[0156] 3種の添加剤の組合せ「CNS」のCFEに比べて、「KCNS」、「KNS」、「F10CNS」、「HCNS」、又は「KF10HCNS」のCFEは、大きな値を示した（図13A）。いずれの添加剤の組合せを用いた場合でも、オルガノイドの長径に有意差は見られなかった（図13B）。

[0157] ・ 6種の添加剤の組合せ

6種の添加剤の組合せ「KF10HCNS」を用いた場合に、試験例2の結果と同様、最も大きいCFEが得られた（図13A）。例えば、「KF10HCNS」を用いた場合のCFEは、3種の添加剤の組合せ「CNS」、前記3種の添加剤の組合せに1種のReceptor tyrosine kinase活性化因子をさらに組合せた4種の添加剤の組合せ「KCNS」、「ECNS」又は「F10CNS」を用いた場合のCFEよりも有意に大きかった。

[0158] ・ 4種の添加剤の組合せ

4種の添加剤の組合せ「HCNS」のCFEは、「CNS」又は「ECNS」のCFEによりも有意に大きかった（図13A）。4種の添加剤の組合せ「KCNS」、「F10CNS」及び「HCNS」がそれぞれ、同等のCFEが得られた（図13A）。この結果は、試験例2の結果と同様、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤「K」と「F10」と「H」とが代替可能であることを示す。

[0159] ・ 3種の添加剤の組合せ

4種の添加剤の組合せ「KCNS」から、添加剤「N」を除いた3種の添加剤の組合せ「KCS」又は添加剤Sを除いた3種の添加剤の組合せ「KCN」のCFEはそれぞれ、「KCNS」のCFEに比べて低い傾向にあった。(図13A) この結果は、試験例2の結果と同様、4種の添加剤「KCNS」において、添加剤「N」及び「S」が効率的なオルガノイド形成に関して重要であることを示す。

[0160] KCNSから添加剤Cを除いた添加剤の組合せ「KNS」のCFEは、「KCNS」のCFEと有意差がなかった(図13A)。この結果は、試験例2の結果と同様、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤「C」は重要ではないことを示す。しかし、試験例3で示されるように、添加剤「C」は、細胞塊を構成する肺上皮幹細胞の分化転換を引き起こすことが示唆される。

[0161] (GFPI⁺分画)

GFPI⁺分画の肺上皮幹細胞についても、上記したGFPh⁺分画の肺上皮幹細胞と同様にして、CFE [%]を算出した。ただし、GFPh⁺分画とは異なり、1ウェルあたり150細胞となるようにして培養した。CFE (n = 6)の平均値及び標準偏差を算出した(図14A)。さらにオルガノイドの長径 (n = 6)の平均値及び標準偏差を算出した(図14B)。

3種の添加剤の組合せ「CNS」のCFEに比べて、「KCNS」、「KNS」、「F10CNS」、「HCNS」、又は「KF10HCNS」のCFEは、大きな値を示した(図14A)。

[0162] ・ 6種の添加剤の組合せ

6種の添加剤の組合せ「KF10HCNS」を用いた場合、試験例2の結果と同様、最も大きいCFE及び長径が得られた(図14A及びB)。例えば、「KF10HCNS」のCFEは、3種の添加剤の組合せ「CNS」のCFE、又は前記3種の添加剤の組合せにEGF (E)をさらに組合せた4種の添加剤の組合せ「ECNS」のCFEよりも有意に大きかった(図14A)。「KF10HCNS」における長径は、「ECNS」における長径よ

りも有意に大きかった（図14B）。

[0163] ・ 4種の添加剤の組合せ

4種の添加剤の組合せ「F10CNS」又は「HCNS」のCFEは、3種の添加剤の組合せ「CNS」のCFEよりも有意に大きかった（図14A）。4種の添加剤の組合せ「KCNS」、「F10CNS」及び「HCNS」がそれぞれ、同等のCFEを示した（図14A）。この結果は、試験例2の結果と同様、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤「K」と「F10」と「H」とが代替可能であることを示す。「KCNS」における添加剤「K」に代えて添加剤「E」を用いた4種の添加剤の組合せ「ECNS」は、KCNSよりも有意に小さいCFE及び長径を示した（図14A及びB）。これらの結果は、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤「E」は、添加剤「K」、「F10」又は「H」と代替できないことを示す。

[0164] ・ 3種の添加剤の組合せ

4種の添加剤の組合せ「KCNS」から、添加剤「N」又は「K」を除いた3種の添加剤の組合せ「KCS」又は「CNS」のCFEはそれぞれ、「KCNS」のCFEに比べて有意に低かった（図14A）。「KCNS」を用いた場合の長径は、「KCS」を用いた場合の長径よりも有意に小さかった（図14B）。また、「KCNS」から、添加剤Sを除いた3種の添加剤の組合せ「KCN」のCFEは、「KCNS」のCFEに比べて低い傾向にあった（図14A）。これらの結果は、試験例2の結果と同様、4種の添加剤「KCNS」において、添加剤「N」及び「S」が効率的なオルガノイド形成に関して重要であることを示す。

[0165] 「KCNS」から添加剤「C」を除いた添加剤の組合せ「KNS」のCFEは、「KCNS」のCFEと有意差がなかった（図14A）。この結果は、試験例2の結果と同様、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤「C」は重要ではないことを示す。

[0166] (GF P^{neg}分画)

GF P^{neg}分画の肺上皮幹細胞についても、上記したGF P^{hi}分画の肺上皮

幹細胞と同様にして、CFE [%] を算出した。ただし、GFP^{hi}分画とは異なり、1 ウェルあたり 1, 000 細胞となるようにして培養した。CFE (n = 6) の平均値及び標準偏差を算出した (図 15 A)。さらにオルガノイドの長径 (n = 6) の平均値及び標準偏差を算出した (図 15 B)。

3 種の添加剤の組合せ「CNS」のCFEに比べて、「KCNS」、「KNS」、「F10CNS」、「HCNS」、又は「KF10HCNS」のCFEは、大きな値を示した (図 15 A)。これらの添加剤の組合せは、「N」及び「C」を含み、さらに「K」、「H」及び「F10」からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む。

[0167] ・ 6 種の添加剤の組合せ

6 種の添加剤の組合せ「KF10HCNS」を用いた場合、最も大きいCFE及び長径が得られた (図 15 A 及び B)。例えば、「KF10HCNS」のCFEは、Receptor tyrosine kinase 活性化因子を含まない 3 種の添加剤の組合せ「CNS」のCFEよりも有意に大きかった (図 15 A)。

[0168] 3 種の添加剤の組合せCNSに1種のReceptor tyrosine kinase 活性化因子をさらに組合せた 4 種の添加剤の組合せ「KCNS」、「ECNS」、「F10CNS」又は「HCNS」を用いた場合の長径は、前記 3 種の添加剤の組合せCNSを用いた場合の長径よりの有意に大きかった (図 15 B)。この結果は、オルガノイド形成に関して、4 種の Receptor tyrosine kinase 活性化因子「K」、「E」、「F10」及び「H」のいずれか 1 種を、3 種の添加剤の組合せ「CNS」に組合せることが重要であることを示す。

[0169] オルガノイド形成に関して、GFP^{neg}分画の細胞では、GFP^{hi}/lo分画の細胞とは異なり、ECNSを用いた場合でも、CNSを用いた場合よりも有意な差が見られた (図 13 A、図 14 A 及び図 15 B)。この結果は、Feeder細胞を用いずに基底細胞を培養する際に、EGFが用いられることと一致する (Proc Natl Acad Sci U S A, 20

09 Aug 4 ; 106 (31) : 12771-5)。

[0170] 試験例7は、効率的なオルガノイド形成に関して、添加剤KGF (K)、HGF (H) 及びFGF10 (F10) からなる群より選択される少なくとも1つと、Noggin (N) などのBMP阻害剤と、SB431542 (S) などのTGF β 阻害剤とからなる組合せが好ましく、より効率的なオルガノイド形成に関しては、CHIR99021 (C) と「N」と「S」と「H」とからなる組合せがより好ましく、「K」と「N」と「S」と「H」と「F10」とからなる組合せ又は「K」と「C」と「N」と「S」と「H」と「F10」とからなる組合せがさらに好ましいことを示唆した。

[0171] [実施例3] クラブ細胞由来オルガノイドの肺傷害マウスへの移植

遺伝子組換えマウスrShh-Cre; Rosa26-CAG-LSL-H2B-mCherry; SFTPC-GFPマウスを準備した(図16A、ドナーマウス)。前記遺伝子組換えマウスは、マウスB6.Cg-Shh^{tm1}(EGFP/cre)Cjt/J(本明細書中「Shh-Cre」と略する)(Jackson Lab. Stock No. 005602)と、マウスB6;129S-Gt(ROSA)26Sortm1.1Ksv0/J(本明細書中「ROSA26-mCherry」と略する)(Jackson Lab. Stock No. 023139)と、SFTPC-GFPマウスとの3種のマウスを掛け合わせて作出された。

[0172] 前記遺伝子組換えマウスから、調製例1と同様の方法にて、GFP⁺の細胞集団(クラブ細胞)を取得した。取得された細胞の核は、mCherryにより染色される。前記細胞がAT2細胞となった場合、GFPが強く発現される。

[0173] 前記遺伝子組換えマウスから取得した前記細胞から、以下の方法に従って、オルガノイドを形成させ、前記オルガノイド由来の細胞を肺傷害マウスに投与した(図16B)。前記遺伝子組換えマウスから取得した前記細胞を培地(MTEC/B27+YHF10KCNS+2.5%Matrigel 2mL)中に含む細胞懸濁液を、6穴プレートに1ウェルあたり 1×10^4 細胞

胞となるように播種した。3日に一度Matrigelを含まない前記培地1 mLを前記ウェルに添加して、計9日間培養した。培養9日目にオルガノイドを含む培養液を遠心分離にかけ(400 G、3分、4℃)、オルガノイドを回収した。回収したオルガノイドに、あらかじめ37℃に温めたプロテアーゼ溶液10 mL(アキュターゼ、Collagenase type I (450 U/mL、Worthington)、DNase (0.1 mg/mL、SIGMA))を添加し、37℃にて20分間、ローテーターを用いて穏やかに攪拌した。前記溶液をピペティングして細胞懸濁液を得て、それを遠心分離にかけ(400 G、5分、4℃)、細胞塊を回収した。回収した細胞塊に0.25%トリプシン5 mL(Gibco、0.1 mg/mLのDNaseを含む)を添加して、37℃にて10分間、ローテーターを用いて穏やかに攪拌した。前記溶液をピペティングして細胞懸濁液を得て、プロテアーゼの反応を停止させるために前記細胞懸濁液にDMEM/F12 10 mL(10% FBS含)を添加した。前記細胞懸濁液を遠心分離にかけ(400 G、5分、4℃)、回収した細胞を、培地75 μ Lあたり生細胞 4×10^5 となるように、90 μ Lの培地(MTEC/B27+「YHF10 KNS」)中に懸濁した。

[0174] 肺傷害マウスは、オルガノイド由来の前記細胞を投与する9日前に、ヌードマウスをイソフルラン(ファイザー)で麻酔し、3 mg/Kg容量のブレオマイシン溶液(日本化薬)を経鼻的に投与することで、調製した。

[0175] オルガノイド由来の前記細胞を投与する日に、前記肺傷害マウスをイソフルラン(ファイザー)で麻酔し、前記マウスに以上で調製した細胞懸濁液を気管から投与した。細胞投与の2週間後に、前記肺傷害マウスを解剖して、肺の凍結切片を作製した。前記凍結切片におけるmCherryおよびGFP由来の蛍光を蛍光顕微鏡で撮影し、投与した前記細胞の肺組織への接着及び生存を調べた(図16C及びD)。

[0176] 肺切片に、核からmCherry由来の蛍光を発する細胞が観察された(図16C)。この結果は、ドナーである遺伝子組換えマウスから取得したク

ラブ細胞からオルガノイドを形成させた後に得られたクラブ細胞が、レシピエントである肺傷害マウスの肺組織に接着及び生存したことを示す。核から mCherry 由来の蛍光を発する細胞のうち、いくつかの細胞が GFP 由来の蛍光を発していた（図 16D）。この結果は、クラブ細胞から AT2 細胞に分化した細胞が肺傷害マウスの肺組織に接着及び生存していたことを示す。

[0177] [実施例 4] ヒト初代細胞からのオルガノイド形成

以下のヒト肺胞細胞 (Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells: HPAEpiC) 及びヒト気道細胞 (Human Small Airway Epithelial Cells: HPSAEpiC) を購入した。

[表8]

名称	型番	販売業者	Lot.
Human Small Airway Epithelial Cells (HPSAEpiC)	3230	ScienCell	28775
Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells (HPAEpiC)	3200	ScienCell	28699

[0178] 購入した凍結ヒト初代細胞を 37℃にて融解し、融解液 100 μ l を培養培地 (MTEC/B27 + 「YHF10KCNS」 + 5% Matrigel) 2 mL 中に懸濁し、細胞懸濁液を 6 穴の撥水プレート (repellent plate) に播種した。HPAEpiC は 1 ウェルあたり 1.44×10^5 細胞となるように播種した。HPSAEpiC は 1 ウェルあたり 5.6×10^4 細胞となるように播種した。培養 3 日目に前記培養培地 1 mL を加えた。培養 6 日目に、培養細胞を 1 ウェルあたり 2×10^5 細胞となるように継代した。以降 12 日ごとに培養細胞を継代した。

[0179] ヒト初代細胞の培養 6 日目に継代した細胞の培養 12 日目に、培養細胞を観察した（図 17）。ヒト肺胞細胞及びヒト気道細胞を培養したウェルにおいてオルガノイドがそれぞれ観察された（図 17A 及び B）。形成されたオルガノイドにおけるマーカータンパク質の発現を、試験例 6 の表 4 に示した試薬を用いた免疫染色により調べた（図 18）。免疫染色は、オルガノイド

のパラフィン切片を用いて行った。その結果、ヒト肺胞細胞から3つのタイプのオルガノイドが形成されたこと（図18A～C）、並びにヒト気道細胞からは1つのタイプのオルガノイドが形成されたことが示された（図18D）。

[0180] 図18Aは、ヒト肺胞細胞から形成されたオルガノイドがヒト特異的AT2細胞マーカー（HT2-280）及びマウスと共通するAT2細胞マーカー（SFTPC）を発現する肺胞タイプであることを示す。図18Bは、ヒト肺胞細胞から形成されたオルガノイドが、前記した2つのマーカータンパク質HT2-280及びSFTPCを発現し、且つ気管支上皮マーカーであるSOX2を発現する気管支肺胞タイプであることを示す。図18Cは、ヒト肺胞細胞から形成されたオルガノイドが気管支上皮マーカーであるSOX2のみを発現する気管支タイプであることを示す。実施例4では、ヒト肺胞細胞から3つのタイプのオルガノイドが形成された。この結果は、購入したヒト肺胞細胞に末梢気道の細胞が混入していたことが1つの原因と考えられる。

[0181] 図18Dは、ヒト気道細胞から形成されたオルガノイドが、基底細胞マーカー（KRT5）及び気管支上皮マーカー（SOX2）を発現する基底細胞から形成されたことを示す。

[0182] 実施例4は、本明細書に開示した添加剤の組合せを含む培養培地中で、ヒト肺初代細胞を培養することでオルガノイドを形成させることができることを示す。

[0183] [実施例5] 細胞集団培養でのオルガノイド形成のイメージング

肺上皮細胞を、遺伝子組換えマウスScgb1a1-CreER; Rosa26-mTmGから調製した。前記遺伝子組み換えマウスにタモキシフェンを投与すると、Scgb1a1がCreリコンビナーゼによってRosa26遺伝子座に組み込まれる。その結果、Scgb1a1の発現が細胞膜局在型GFP（mGFP）由来の蛍光によって検出できるようになる。

[0184] 前記遺伝子組換えマウスにタモキシフェンを5回投与した。タモキシフェ

ンを投与した3週間後に、気管を切除した肺を摘出した。摘出した肺から、調製例1と同様にして、細胞懸濁液を調製した。前記細胞懸濁液に次の抗体：抗EPCAM-PE-Cy7（#25-5791-80、eBioscience）、抗CD24-APC（#25-0242-80、Invitrogen）、抗CD45-biotin（#13-0451、eBioscience）、抗CD31-biotin（#13-0311、eBioscience）を添加し、20分間氷上にて反応させた。前記反応液を、500 μ LのDPBS（-）／3%FBSに懸濁した後、遠心分離にかけ（400g、3分、4℃）、沈殿細胞を100 μ LのDPBS（-）／3%FBS中に再懸濁した。細胞懸濁液に 1×10^6 細胞当たり0.25 μ LのストレプトアビジンAPC-Cy7を添加し、10分間氷上にて反応させた。前記細胞を500 μ LのDPBS（-）／3%FBSに懸濁した後、遠心分離にかけ（400g、3分、4℃）、沈殿細胞を500 μ LのDPBS（-）／3%FBS中に再懸濁した。細胞懸濁液に 1×10^6 細胞当たり5 μ Lの7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD）を添加し、20分間氷上にて反応させた。前記反応液から、40 μ mのセルストレーナーを用いて細胞塊を除去した後、FACSに供した。

[0185] FACSを行うことで、調製した前記細胞懸濁液から7-AADで染色された死細胞を除去し、抗CD31で染色された内皮細胞を除去し、更に抗CD45抗体で染色された血球系細胞を除去した。残った細胞集団から抗EPCAM抗体で染色された上皮細胞を集め、GFP由来の蛍光を発するScg b1a1陽性細胞（主としてクラブ細胞）を集め、更に抗CD24抗体で染色された組織幹細胞／progenitor細胞を集めた（CD24^{lo}）。得られた細胞を遠心分離にかけ（400g、5分、4℃）、沈殿細胞を培養培地（MTEC／B27+5%FBS+「YHF10KNS」）中に懸濁した後、培養培地（MTEC／B27+5%FBS+「YHF10KNS」+2.5%Matrigel）を加えて250 μ Lあたり300細胞を含む細胞懸濁液を調製した。前記細胞懸濁液を、超低吸着96穴プレート（CELL

STAR、#655970、Greiner)へ播種し、前記96穴プレートインキュベーター一体型顕微鏡であるCell Discoverer 7 (Zeiss)に設置した。前記細胞を10日間培養しつつ、所定の間隔で明視野にて培養細胞を撮影した。初日(0日目)は4時間毎に撮影し、1~10日目は一日あたり1回の間隔で撮影した。対物レンズの倍率は10倍を用いた。Z幅45 μm にて17枚撮影を行った。従って、撮影した画像ファイルは、各タイミングでZ軸方向に17枚の画像データを含んだ。

[0186] (画像解析方法)

撮影した画像ファイルを、画像解析ソフトZEN 3.0 (blue edition)を用いてTiffファイルに変換し、次いで、画像解析ソフトImageJ (ver. 1.52n)を用いて解析した。0日目から10日目までの画像ファイルを通じて、一細胞からオルガノイドが形成されるまでの過程を追跡した。細胞塊の長径が50 μm 以上となった場合に、オルガノイドが形成されたと判断した。オルガノイド形成の追跡において、フォーカスが外れている細胞、タイリングの端に位置して全体像が見えない細胞、他の細胞と接触している細胞、及び何らかの理由で培養6日目までに追跡が不可能になった細胞(例えば成長したオルガノイドと重なった細胞)は解析から除外した。0日目の画像データにおいて一細胞からオルガノイド形成の過程が観察できた細胞を含む領域を切り抜いた画像ファイルを作成した。切り抜かれた画像ファイルのZ軸方向の画像データを、ImageJのpluginであるStackReg (<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/>)を用いて統合した。統合した画像データにおける三次元構築された細胞の形態を計測した。形態計測は、面積 (Area)、周囲の長さ (Perimeter)、長径 (Major axis)、短径 (Minor axis)、真球値 (Circularity)、グレイ値 (Gray value)及び重心 (Centroid)の項目について行った。

[0187] (結果)

3匹のマウスから得られた細胞懸濁液中の1,056細胞の細胞集団を培

養し、その細胞集団内の個々の細胞についてのオルガノイド形成の過程を観察した。1, 056細胞のうち、235細胞がオルガノイドを形成し、821細胞はオルガノイドを形成しなかった。オルガノイドを形成した細胞、及びオルガノイドを形成しなかった細胞それぞれの形態を計測した（図19）。図19Aは、オルガノイドを形成した細胞はオルガノイドを形成しなかった細胞に比べて、面積が有意に大きかったことを示す。図19B～図19Dは、オルガノイドを形成した細胞はオルガノイドを形成しなかった細胞と比べて、周囲の長さ、長径及び短径が有意に大きかったことをそれぞれ示す。図19E～図19Hは、真球度、グレー値（平均、最頻値）及び重心には、オルガノイドを形成した細胞とオルガノイドを形成しなかった細胞との間に有意な差がなかったことを示す。

[0188] 実施例5は、マウスから得られた肺上皮細胞の中で、比較的大きい細胞、具体的にはその面積、周囲の長さ、長径、及び／又は短径が大きい細胞が、オルガノイドを形成する傾向が高いことを示す。

[0189] [実施例6] 一細胞培養でのオルガノイド形成のイメージング

実施例5のように、細胞を集団で培養して、その集団内の個々の細胞の培養経過を観察した場合、時間経過に伴ってある細胞が他の細胞と一緒になって細胞塊を形成する等して、その細胞のオルガノイド形成過程を追跡できなくなることがあった。実施例6では、1ウェルに一細胞を播種して培養することで、より正確に、オルガノイドを形成しやすい細胞の形態的特徴を調べた。

[0190] 実施例5と同様にして、マウスから肺上皮細胞の細胞懸濁液を調製し、次いで、前記細胞懸濁液をFACSに供してクラブ細胞を集めた。前記クラブ細胞を培養培地（MTEC／B27＋5％FBS＋「YHF10KNS」）中に懸濁し、培養培地1mlあたり2,500～5,000細胞を含む細胞懸濁液を調製した。前記細胞懸濁液2mlを、Biosurfine AW P-MRH（6％aq）（東洋合成）を用いて非接着化したElplasia 6穴プレート（Corning 4444）へ播種し、前記プレートを3

0分間静置した。その後、細胞ピッキング&イメージングシステムであるCell handler (Yamaha) を用いて、前記プレートのウェルの明視野 (BF) の画像及びヨウ化プロピジウム (PI、#130-093-233、Miltényi Biotech) の蛍光画像を取得し、PI陰性であった生細胞を一個ずつ、384セル・プレート (CELLSTAR、#655892、Greiner) の1ウェル中の50 μ Lの培養液 (MTEC/B27+5% FBS+「YHF10KNS」+2.5% Matrigel) に添加した。各ウェル中の細胞を37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下にて10日間培養し、オルガノイドを形成させた。細胞塊の長径が50 μ m以上となった場合に、オルガノイドが形成されたと判断した。実施例5と同様の時間間隔で、一細胞からのオルガノイド形成過程を撮影した。取得した画像データは、ImageJ (ver. 1.52n) を用いて、実施例5と同様にして、細胞形態の項目を計測した。

[0191] (結果)

3匹のマウスから得られた1,053細胞をそれぞれ個別のウェル中で培養し、一細胞からオルガノイドを形成する過程を観察した。1,053細胞のうち、307細胞がオルガノイドを形成し、746細胞はオルガノイドを形成しなかった。オルガノイドを形成した細胞、及びオルガノイドを形成しなかった細胞それぞれの形態を計測した (図20)。オルガノイドを形成した細胞は、オルガノイドを形成しなかった細胞に比べて、面積、周囲の長さ、長径及び短径が有意に大きかった (図20A~図20D)。真球度、グレイ値 (平均、最頻値) 及び重心には、オルガノイドを形成した細胞とオルガノイドを形成しなかった細胞との間に有意な差がなかった (図20E~図20H)。

[0192] 実施例6は、実施例5と同様、マウスから得られた肺上皮細胞の中で、比較的大きい細胞、具体的にはその面積、周囲の長さ、長径、及び／又は短径が大きい細胞が、オルガノイドを形成する傾向が高いことを示す。

[0193] [実施例7] 一細胞での細胞形態の計測及びRNA配列決定の組合せ

実施例5及び6で示された形態的特徴を有する細胞における遺伝子発現パターンを調べるために、一分子の細胞の形態計測データと一分子RNA配列決定データとを組合せて分析する。

実施例6と同様にして、マウスから得られた肺上皮細胞からクラブ細胞を回収し、前記クラブ細胞を培養培地（MTEC/B27+5%FBS+「Y」）中に懸濁し培養培地1mlあたり2,500~5,000細胞を含む細胞懸濁液を調製した。前記細胞懸濁液2mlを、Biosurfine AWP-MRH（6%aq）（東洋合成）を用いて非接着化したElplasia6穴プレート（Corning 4444）へ播種し、前記プレートを30分間静置した。その後、Cellhandler（Yamaha）を用いて、前記プレートのウェルのBF画像及びPI画像を取得し、PI陰性であった生細胞を1個ずつ、96穴のPCRプレートの1つのウェル中のRNaseインヒビター溶液2 μ L（RNasin plus 0.2 μ L、5xMaxima H-buffer 0.4 μ L、RNase free water 1.4 μ L）に加えた。前記した各細胞についてRNA配列決定を行い、一細胞RNA配列決定データを取得した。また、ImageJ（ver. 1.52n）を用いて、実施例5と同様にして、各細胞についての画像データから細胞形態の項目を計測した。計測した細胞形態に関する画像解析データと一細胞RNA配列決定データとを、解析ソフトSeurat（ver. 3）を用いて統合した。

[0194] （結果）

一細胞での細胞形態に関する画像解析データと一細胞RNA配列決定データとを組合せ、クラスタリング解析を行った結果、測定した細胞が主として3つのクラスターに分類された（図21）。図21A~Cにおいて、右上に示されるクラスターを「クラスター0」と称し、右下に示されるクラスターを「クラスター1」と称し、及び左下に示されるクラスターを「クラスター2」と称する。図21Aは、各クラスターにおけるクラブ細胞マーカーであるScgb1a1の発現レベルを示し、クラスター0及び2がScgb1a1

1 を強く発現していたことを示す。この結果は、クラスター 0 及び 2 に対応する細胞がクラブ細胞であることを示唆する（図 2 1 C）。図 2 1 B は、各クラスターにおける A T 2 細胞マーカーである S f t p c の発現レベルを示し、クラスター 1 が S f t p c を強く発現していたことを示す。この結果は、クラスター 1 に対応する細胞が A T 2 細胞であることを示す（図 2 1 C）。

[0195] 図 2 1 D は、各クラスターに対応する細胞の面積を示す。図 2 1 D は、クラスター 2 に対応するクラブ細胞が（図 2 1 D の右側）、クラスター 0 に対応するクラブ細胞よりも（図 2 1 D の左側）、細胞の面積が大きいことを示す。実施例 4 及び 5 の結果を考慮すると、クラスター 2 に対応する比較的大きいクラブ細胞が、オルガノイドを形成する傾向が高い細胞であることが示唆される。

[0196] 細胞形態に関する画像解析データと一細胞 R N A 配列決定データを統合することで、各クラスターに対応する細胞が特定の遺伝子を強く発現することが明らかとなった。以下の表は、各クラスターで強く発現された遺伝子の上位 2 0 の遺伝子をそれぞれ示す。

[表9]

発現レベル T o p	クラスター 0	クラスター 1	クラスター 2
1	C b r 2	L a m p 3	T f f 2
2	H p	L y z 2	R e g 3 g
3	C y p 2 f 2	N a p s a	B p i f b 1
4	P r d x 6	S l c 3 4 a 2	M u c 5 b
5	S c g b 1 a 1	L y z 1	S u l t 1 d 1
6	L d h b	R n a s e 4	F x y d 3
7	C e s 1 d	H c	S c g b 3 a 1
8	C c k a r	C d 7 4	L y p d 2
9	S e l e n b p 1	S c d 1	C h a d
10	G s t m 2	S f t p c	S 100 a 6
11	S c n n 1 b	L g i 3	P g l y r p 1
12	S c g b 1 c 1	C l d n 1 8	A l d h 3 a 1
13	P l p p 3	E t v 5	B p i f a 1
14	E p h x 1	C x c l 1 5	G s t o 1
15	D c x r	S 100 g	L g a l s 3
16	A l a s 1	E l o v 1 1	P i g r
17	R e t n l a	F a s	S c g b 3 a 2
18	S e c 1 4 l 3	H 2 - A a	L t f
19	P t g r 1	F a b p 5	Q s o x 1
20	K r t a p 1 7 - 1	R n 4.5 s	C y p 2 a 5

[0197] 他のクラスターに対応する細胞に比べて、クラスター 2 に対応する細胞で強く発現する細胞表面タンパク質に対応する遺伝子の転写レベルを調べた（図 22）。その結果、F x y d 3、P i g r、C p d、L y 6 a、P e r p、K c n e 3、I l 1 3 r a 1、S l c 1 5 a 2、及び C d 1 4 が、クラスター 2 で比較的強く発現されることが明らかとなった。

[0198] 実施例 5～7 は、実施例 7 で見いだされたマーカーを発現する肺上皮細胞を選択することで、オルガノイドを形成する傾向が高い肺上皮細胞を選択することができることを示す。

[0199] [実施例 8] C D 1 4 + のクラブ細胞のオルガノイド形成

実施例 7 で見いだされたマーカーのうち C D 1 4 を用いて、肺上皮細胞から C D 1 4 を発現する C D 1 4 + 細胞（クラスター 2 に対応する細胞）を分取し、C D 1 4 + 細胞がオルガノイドを形成する傾向が高いかを調べた。

次の抗体：抗 C D 1 4 - A P C（# 1 7 - 1 4 0 1 - 8 1、i n v i t r

ogen)、抗MHC class 2-eFluoro450 (#48-5321、eBioscience)、抗CD24-PEcy7 (#25-0242-80、invitrogen)、抗CD45-biotin (#13-0451、eBioscience)、抗CD31-biotin (#13-0311、eBioscience)を用いたことを除いて、実施例5と同様にして、FACSに供するための細胞懸濁液を調製した。

[0200] (CD14⁺細胞の分取)

FACSを行うことで、調製した細胞懸濁液から7-AADで染色された死細胞を除去し、抗CD31で染色された内皮細胞を除去し、抗CD45抗体で染色された血球系細胞を除去し、更に抗MHC class 2抗体で染色されたAT2細胞(クラスター1に対応する細胞)を除去した。残った細胞集団からGFP由来の蛍光を発するScgb1a1陽性細胞(主としてクラブ細胞)を集め、抗CD24抗体で染色された組織幹細胞/progenitor細胞を集めた(CD24^{lo})。これにより、クラスター0及びクラスター2に対する細胞が選択される。次いで、抗CD14抗体で染色されたCD14⁺細胞と染色されなかったCD14⁻細胞とをそれぞれ分取した。FACSによるCD14⁺細胞とCD14⁻細胞との分取は、以下のようにして行った。まず、アイソタイプ抗体を用いた細胞懸濁液をFACSに供し、得られた細胞分布が収まるようにゲートを設定した。次に、抗CD14抗体を用いた細胞懸濁液をFACSに供し、得られた細胞分布のうち、設定したゲート範囲を超えた細胞をCD14⁺細胞として分取し、そのゲート内の細胞をCD14⁻細胞として分取した。

[0201] CD14⁺細胞が、クラスター2に対応するクラブ細胞であるかを調べるために、クラスター2に対応する細胞で強く発現されることが見いだされた遺伝子、Muc5b、Scgb3a1及びTff2の発現レベルをqPCRにより調べた(図23A)。図23Aは、CD14⁺細胞では、クラスター2に対応する細胞で強く発現されるマーカー遺伝子であるMuc5b、Scgb3a1及びTff2の発現レベルが高かったことを示す。この結果は、CD

14⁺細胞が、クラスター2に対応するクラブ細胞であることを示唆する。

[0202] さらに、CD14⁺細胞が、オルガノイドを形成する傾向が高い比較的大きな細胞であるかを調べた(図23B)。上記したように得られたCD14^{+/−}細胞を遠心分離にかけ(400G、5分、4℃)、250μLの基本培地中に再懸濁し、5μLのPIを添加し、黒色のガラスボトム96穴プレート(Sensoplate、Greiner#655892)に分注し、前記96穴プレートを30分静置した。その後、前記ウェルの各ウェルについて明視野(BF)画像及びGFP/PIの蛍光画像を取得した。PIで染色された死細胞を以後の解析から除外した。また、フォーカスが合っていない細胞、タイリングの端に位置して全体像が見えない細胞、他の細胞と接触している細胞についても、以後の解析から除外した。GFP由来の蛍光を発するClub細胞について、細胞形態を計測した。細胞形態の計測は、BF画像データについて実施例5と同様、ImageJを用いて行った(図23B)。図23Bは、CD14⁺細胞がCD14[−]細胞に比べて、細胞の面積が有意に大きいことを示す。

これらの結果は、クラスター2を選択するための上記した細胞マーカーの少なくとも1種(例えばCD14⁺)に基づいて細胞を選択することで、細胞面積が比較的大きなクラスター2に対応する細胞を得ることができることを示す。

[0203] (CD14⁺細胞のオルガノイドを形成)

上記のようにして得られたCD14⁺細胞がオルガノイドを形成する傾向が高いかを調べた。CD14^{+/−}細胞を、実施例3と同様にして、培養培地(MTEC/B27+「YHF10KNS」+2.5%Matrigel 2mL)中に含む細胞懸濁液を、1ウェルあたり300細胞となるように播種して9日間培養し、オルガノイドを形成させた(図24A)。図24Aは、CD14[−]細胞に比べて、CD14⁺細胞がより大きなオルガノイドをより多く形成したことを示す。CD14^{+/−}細胞を培養して形成される細胞塊の割合(CFE [%])もCD14[−]細胞に比べて、CD14⁺細胞が有意にオルガノ

イドを形成する傾向が高いことを裏付けている（図24B）。

[0204] 培養9日目のCD14^{+/−}細胞由来のオルガノイドにおいて、クラスター2に対応するクラブ細胞がどの程度分化しているかを調べた（図25）。図25は、CD14⁺細胞及びCD14[−]細胞がともにAlveolar系統のマーカ遺伝子、具体的にはSftpc、Ager及びHopxの発現について有意差がないことを示した。他方、Bronchiolar系統のマーカ遺伝子、具体的にはSox2（気管支上皮細胞マーカ）の発現については、CD14⁺細胞に比べて、CD14[−]細胞が有意に小さかった。また、Scgb1a1（クラブ細胞マーカ）及びFoxj1（繊毛細胞マーカ）の発現については、CD14⁺細胞に比べて、CD14[−]細胞が小さい傾向を示した。これらの結果は、クラスター0に対応するCD14[−]細胞がクラブ細胞から肺胞細胞へと分化する傾向が高いことを示す。

[0205] 上記したCD14^{+/−}細胞の培養9日目及び12日目（分化を誘導するために培養9日目に培養培地を基本培地に置き換え、3日間培養した）のオルガノイドに対して、免疫染色を行った（図26）。図26Aは、培養9日目のオルガノイドが、クラブ細胞マーカであるSCGB1A1及びAT2細胞マーカであるSFTPCの両方を共発現する細胞を含むことを示す。図26Bは、培養9日目のオルガノイドがAT1マーカであるAGER及びHOPXの両方を共発現することを示す。これらの結果は、クラスター2に対応するCD14⁺細胞が、前記細胞に由来するオルガノイドにおいて肺胞系統の細胞に分化する傾向が高いことを示す。

[0206] [実施例9] 初代肺上皮細胞の肺傷害モデルマウスへの移植

CD14^{+/−}細胞が肺傷害からの回復過程の肺で増殖可能か又は肺胞細胞に分化可能かを調べた。

遺伝子組み換えマウスScgb1a1-CreER; Rosa26-mTmGから、実施例8と同様にして、CD14^{+/−}細胞を回収し、前記CD14[−]細胞及びCD14⁺細胞をそれぞれ培養培地（MTEC/B27+5%FBS+「YHF10KNS」）中に懸濁し、培養培地75μLあたり7,00

O細胞を含むCD14⁺/−細胞懸濁液を調製した。前記細胞懸濁液を投与する1週間前に、胸腺及びT細胞機能が欠如したヌードマウスBALB/cSlc-nu/nu（10週齢、25g以上）へ3mg/Kgとなるようにブレオマイシンを経鼻的に注入し、肺傷害モデルマウスを準備した。前記肺傷害モデルマウスの肺に、前記細胞懸濁液を気管を通じて投与した。

[0207] 前記細胞懸濁液を投与した2週間後に、前記肺傷害モデルマウスを解剖して、投与した前記細胞の肺での生存及び増殖を調べた（図27）。前記調査には前記マウスの左肺を用いた。左肺を用いて凍結ブロックを作製し、前記ブロックをミクロトームを用いて厚み8μmの組織切片とした。組織切片ごとの間隔は約100μmであった。マウス一匹あたり40枚の組織切片において、GFP由来の蛍光を観察した。投与した細胞の前記肺での生存能力は、前記肺で確認されるクラスターの数（図27A）及び1つのクラスターに含まれる細胞の数（図27B）に基づいて評価した。実施例9では、GFP由来の蛍光を発する細胞間の距離が100μm以下の細胞の集まりを1つのクラスターと定義した。

[0208] 図27Aは、CD14⁺細胞及びCD14[−]細胞がそれぞれブレオマイシン傷害を受けた肺で生存可能であったことを示す。図27Aは、CD14[−]細胞に比べて、有意に多くのCD14⁺細胞が前記肺で生存していたことを示す。図27Bは、CD14[−]細胞由来のクラスターに比べてCD14⁺細胞由来のクラスターが有意に多くの細胞から構成されたことを示す。CD14⁺細胞を投与したマウスの肺では、炎症に由来すると考えられる線維化が観察された。他方、CD14[−]細胞を投与したマウスの肺では、CD14⁺細胞を投与したマウスの肺で観察された線維化に比べて、軽度の線維化が観察された。

[0209] 投与した細胞の前記肺での分化能は、前記肺においてGFP由来の蛍光を発する細胞での細胞マーカーの発現を調べることによって行った。前記調査には前記マウスの右肺を用いた。凍結した右肺からパラフィンブロックを作製し、前記ブロックから厚み6μmの組織切片を調製した。前記組織切片について免疫染色を行った。前記免疫染色は、CD14⁺細胞を投与した肺に、

GFPを発現し、且つAT2細胞マーカーであるSFTPCを発現するAT2細胞、及びGFPを発現し、且つAT1細胞マーカーであるPDPNを発現するAT1細胞が存在することを示した。前記肺には、繊毛細胞マーカーであるAcTubを発現する繊毛細胞、及び基底細胞マーカーAcTubを発現する細胞は観察されなかった。これらの結果は、投与したCD14⁺細胞（GFP陽性細胞）が、肺胞系統の細胞であるAT2細胞及びAT1細胞に分化したことを示す（図28）。また、前記免疫染色は、CD14⁺細胞を投与した肺に、GFPを発現し、且つクラブ細胞マーカーであるSCGB1A1を発現するクラブ細胞、及びGFPを発現し、且つ繊毛細胞マーカーであるAcTubを発現するCiliated細胞が存在することを示した。この結果は、投与したCD14⁺細胞（GFP陽性細胞）が、クラブ細胞マーカーであるSCGB1A1と、繊毛細胞マーカーであるAcTUBとを共発現していたことから、気管支系統の細胞であるCiliated細胞にも分化したことを示す（図29）。

[0210] 実施例9は、クラスター0に対応する細胞（例えばCD14⁺細胞）が送達された肺で炎症などの悪影響を引き起こさず、オルガノイドを形成する能力を有し、並びに肺胞及び気管支系統の細胞に分化する能力を有し得るため、肺損傷又は肺疾患を修復するための再生医療用組成物として有用であることを示唆する。また、実施例9は、クラスター2に対応する細胞（例えばCD14⁺細胞）が、効率的にオルガノイドを形成する能力を有し、並びに肺胞及び気管支系統の細胞に分化する能力を有するため、肺損傷又は肺疾患を修復するための再生医療用組成物として有用であることを示唆する。また、クラスター2に対応する細胞（例えばCD14⁺細胞）は、損傷した肺又は疾患に罹患した肺を修復するための薬剤（例えば、有機化合物、遺伝子又はタンパク質）を運搬するためのキャリアとして有用であることを示唆する。