

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-528682

(P2019-528682A)

(43) 公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 M	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/09	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-500616 (P2019-500616)
 (86) (22) 出願日 平成29年7月11日 (2017.7.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年3月6日 (2019.3.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/041500
 (87) 国際公開番号 W02018/013542
 (87) 国際公開日 平成30年1月18日 (2018.1.18)
 (31) 優先権主張番号 62/361,306
 (32) 優先日 平成28年7月12日 (2016.7.12)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/460,056
 (32) 優先日 平成29年2月16日 (2017.2.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 518304328
 ザ・ユニバーシティ・オブ・ノース・カロ
 ライナ・アット・チャペル・ヒル
 アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・2
 7517、チャペル・ヒル、ヨーロッパ・
 ドライブ・100、スイート・430
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100173185
 弁理士 森田 裕
 (74) 代理人 100162503
 弁理士 今野 智介

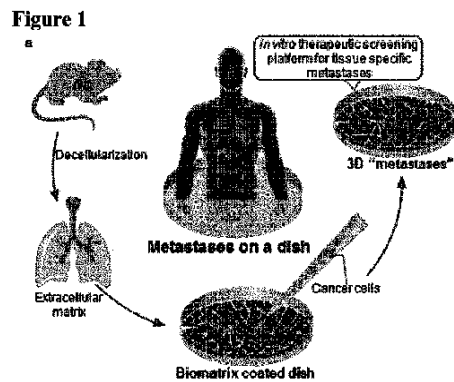
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんの診断およびモデル化において使用するためのバイオマトリックス足場

(57) 【要約】

新規な脱細胞化ストラテジーによって作製された臓器特異的なマトリックス抽出物である、肝臓および肺バイオマトリックス足場の基層上にあるときのヒト結腸直腸がん細胞の挙動によって示されるように、臓器特異性の生物学的様相を再現する *in vitro* がん転移モデルが本明細書において記載されている。腫瘍細胞は、組織像、バイオロジーならびに遺伝子形質および他の表現型形質に関して *in vivo* 転移巣を模倣するコロニーを自然発生的に形成した。理論に拘束されるものではないが、放射線または化学療法剤に対する腫瘍の反応は、使用されるマトリックス基層に依存することを証明したと想定される。よって、足場は、がん研究および診断のための強力なツールを提供すると考えられる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

がんまたは腫瘍と診断された患者内のがんまたは腫瘍が転移する可能性を判定する方法であって、

1つまたは複数のバイオマトリックス足場に、腫瘍生検材料のまたはがんもしくは腫瘍と診断された患者から採取されたサンプルの細胞を播種するステップ、ここで、1つまたは複数のバイオマトリックス足場のそれぞれが、人体の1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来する、と、

成長中の細胞のコロニーを形成する能力について前記細胞を分析するステップと、
を含み、

各バイオマトリックス足場が、それが由来する前記臓器または組織の生物学的様相を再現し、

前記細胞が、前記1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場において成長中の細胞のコロニーを形成する場合、前記1つまたは複数の所定の組織または臓器への *in vivo* での転移が予測される、方法。

【請求項 2】

前記細胞が、前記1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場の基層において成長中の細胞のコロニーを形成する場合、前記1つまたは複数の所定の組織または臓器への転移が予測される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

1つまたは複数の所定の組織または臓器に由来する前記1つまたは複数のバイオマトリックス足場のそれぞれが、バイオマトリックス足場の凍結切片、凍結粉碎されたバイオマトリックス足場、およびインタクトなバイオマトリックス足場から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記コロニーを、その組織像、エクソソーム産生、マイクロRNA産生、間葉系細胞との相互作用、および/または遺伝子発現プロファイルに基づいて特徴付けるステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤に対する反応性に関して前記コロニーをスクリーニングするステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記がん療法および/または化学療法剤が、前記コロニーの組織像、エクソソーム産生、マイクロRNA産生、間葉系細胞との相互作用、および/または遺伝子発現プロファイルに基づいて選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤が、1回もしくは複数回の放射線療法ならびに/またはアントラサイクリン、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、および有糸分裂阻害剤などの1つもしくは複数の化学療法から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

前記1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤が、放射線療法、免疫療法、内分泌療法、および分子療法から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

がんまたは腫瘍と診断された患者におけるがんまたは腫瘍に適切な処置を決定する方法であって、

1つまたは複数のバイオマトリックス足場に、(1)腫瘍生検材料のまたはがんもしくは腫瘍と診断された前記患者から採取されたサンプルの細胞、あるいは(2)前記患者と

10

20

30

40

50

同じがんまたは腫瘍の種類、細胞株の細胞を播種するステップ、ここで、1つまたは複数のバイオマトリックス足場のそれぞれが、人体の1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来し、前記細胞が、前記バイオマトリックス足場において成長中の細胞のコロニーを形成する、と、

前記コロニーを、1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤で処置するステップを含み、

前記バイオマトリックス足場が、それが由来する前記組織または臓器の生物学的様相を再現し、

前記患者に適切な処置が、前記1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤を用いた処置に対する前記コロニーの反応性に基づいて選択される、方法。

10

【請求項10】

前記がん療法および/または化学療法剤が、3次元コロニーの組織像または遺伝子発現プロファイルに基づいて選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤が、1回もしくは複数回の放射線療法ならびに/またはアントラサイクリン、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、および有糸分裂阻害剤などの1つもしくは複数の化学療法から選択される、請求項9に記載の方法。

20

【請求項12】

前記1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤が、放射線療法、免疫療法、内分泌療法、および分子療法から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

前記免疫療法が、樹状細胞療法、抗体依存性療法、T細胞依存性療法、またはNK細胞依存性療法から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記分子療法が、1つまたは複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

人体の1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場と、前記1つまたは複数のバイオマトリックス足場に細胞を播種するための指示書と、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法を実施するための指示書とを含むキット。

30

【請求項16】

人体の1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場と、前記1つまたは複数のバイオマトリックス足場に細胞を播種するための指示書と、請求項9から14のいずれか一項に記載の方法を実施するための指示書とを含むキット。

【請求項17】

1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤をさらに含む、請求項16に記載のキット。

40

【請求項18】

人体の1つまたは複数の所定の組織または臓器に特異的な、人工的な腫瘍または転移モデルであって、

1つまたは複数のバイオマトリックス足場に、(1)腫瘍生検材料のまたはがんもしくは腫瘍と診断された患者から採取されたサンプルの細胞、あるいは(2)前記患者と同じがんまたは腫瘍の種類、細胞株の細胞を播種すること、ここで、1つまたは複数のバイオマトリックス足場のそれぞれが、人体の1つまたは複数の所定の組織または臓器にそれぞれ由来する、

によって作製され、

50

前記細胞が、前記バイオマトリックス足場において成長中の細胞のコロニーを形成し、前記バイオマトリックス足場が、それが由来する前記組織または臓器の生物学的様相を再現する、人工的な腫瘍または転移モデル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許法第119条(e)の下で2016年7月12日に出願された米国特許出願第62/361,306号、および2017年2月16日に出願された米国特許出願第62/460,056号に対する優先権を主張する。

10

【背景技術】

【0002】

転移は、がんの罹患率および死亡率の主原因である。がん研究における主な問題は、特に臓器特異性という転移の重要な特徴に関して、がん転移のバイオロジーを再現する *ex vivo* または *in vitro* モデルがないことであった。したがって、がん研究および治療薬を開発するためのより良好なツールは、転移成長のより良好なモデルを必要とする。

【0003】

20

腫瘍細胞はある特定の臓器に転移し易いことが知られているため、臓器特異性は、がん転移の重要な特質である。さらに、転移巣の治療反応は、同一患者内であっても、転移巣が発生する臓器に依存することがある。しかしながら、既存の *in vitro* / *ex vivo* のモデル系は、おそらくこれらの腫瘍モデルには臓器微小環境における可変要素が存在しないために、そのような臓器特異性を反映していない。遺伝子工学的に作製された *in vivo* マウスモデルは臓器特異性を有するものの、研究することが難しく、また非常に高価である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

30

臨床では、どの腫瘍が転移するのか、およびどの組織または臓器に転移するのかを予測するツールが存在しないことが問題であった。転移部位を予測できるアッセイは、臨床的に非常に価値があり、がん管理に変化をもたらす可能性がある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の態様は、がんまたは腫瘍の診断および/または特徴付けに関連する方法、キット、および組成物に関する。本明細書でがんまたは腫瘍に関して記載されている実施形態のいずれにおいても、がんまたは腫瘍は悪性であってもよい。ある特定の実施形態では、がんまたは腫瘍は、それが特異的な組織に転移する可能性ならびに/または本明細書で下に記載されている1つもしくは複数のがん療法および/もしくは化学療法剤に反応するそのような転移の1つもしくは複数の反応性によって特徴付けることができる。

40

【0006】

本明細書において開示されている方法実施形態は、1つまたは複数のバイオマトリックス足場に腫瘍またはがんの細胞を播種するステップを含む。

【0007】

こうした方法実施形態の一部において、細胞は、(1)腫瘍生検材料のまたはがんもしくは腫瘍と診断された患者から採取されたサンプルの細胞、あるいは(2)該患者と同じがんまたは腫瘍の種類、細胞株の細胞のものであり得る。こうした方法実施形態の一部において、細胞は、成長中の細胞のコロニーを形成する能力に関して分析される。一部の実施形態では、コロニーは、バイオマトリックス足場の基層上にある。こうした方法実施形

50

態の一部において、細胞はコロニーを形成する。こうした方法実施形態の一部において、細胞は、3次元コロニーとなる能力に関して分析される。こうした方法実施形態の一部において、細胞は3次元コロニーを形成する。理論に拘束されるものではないが、そのような3次元コロニー形成は、それぞれのバイオマトリックス足場の基層の化学的性質に影響を受け得ると考えられる。こうした方法実施形態の一部において、細胞は、それらの遺伝子発現能力またはタンパク質もしくは別の因子を分泌する能力に関して分析される。こうした遺伝子の非限定的な例として以下が挙げられる：多能性遺伝子（例えば、OCT4、SOX2、KLF4、KLF5、SALL4、NANOG、Bmi-1）、幹細胞遺伝子（例えば、EpCAM、LGR5/LGR6、CXCR4、ヒアルロンタン受容体をコードしている遺伝子のCD44ファミリーの多くのバリエーションのうちの一つまたは複数、多剤耐性遺伝子（例えば、mdr遺伝子ファミリー、P糖タンパク質）、細胞外マトリックス成分（例えばヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、エラスターゼ、マトリックス分解メタロプロテイナーゼ）を溶解する酵素をコードしている遺伝子；こうしたタンパク質の非限定的な例として以下が挙げられる：上記遺伝子によってコードされているタンパク質（例えばCD44、P糖タンパク質、マトリックス分解酵素）；この分析に関連する別の因子の非限定的な例として、エクソソーム産生、マイクロRNA、および間葉系フィーダー細胞からのパラ分泌シグナル伝達からの質的または量的独立性に関連するものが挙げられる。これらの方法実施形態の一部の実施形態では、細胞が1つまたは複数のバイオマトリックス足場に播種され付着したら、この分析が行われ得る。これらの方法実施形態の一部の実施形態では、細胞を、1つまたは複数のバイオマトリックス足場の組織特異的な形態の基層に付着させ得る。

10

20

【0008】

こうした方法実施形態の一部において、1つまたは複数のバイオマトリックス足場は、人体の1つまたは複数の所定の臓器にそれぞれ由来する。さらなる実施形態では、所定の臓器は、例えばその種類のがんまたは腫瘍の転移と関連することが既知である臓器を含むように、またはそのがんまたは腫瘍が認められた臓器を含むように、患者のがんまたは腫瘍の種類に基づいて選択される。すべての方法実施形態において、それぞれのバイオマトリックス足場は、その由来となった組織の生物学的様相（biological facet）を再現する。

【0009】

播種方法は、がんまたは腫瘍と診断された患者内で腫瘍が転移する可能性を判定するために任意に使用されてもよい。例えば、腫瘍またはがん細胞がバイオマトリックス足場上で成長中の細胞のコロニーを形成する場合、臓器への転移が予測され得る。予測された転移は、前記足場の由来となった臓器に位置しているとさらに判定され得る。よって、一部の実施形態では、1つまたは複数の所定の臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場上で細胞が成長中の細胞のコロニーを形成する場合、それらの臓器への転移が*in vivo*で予測される。

30

【0010】

この播種方法を使用して、がんまたは腫瘍と診断された患者において腫瘍に適切な処置を決定することもできる。これは、腫瘍が転移する可能性を判定することに加えて、またはそれとは独立に行ってもよい。

40

【0011】

上記の開示された方法実施形態はいずれも、コロニーを、その組織像、エクソソーム産生、マイクロRNA産生、間葉系細胞との相互作用、および/または遺伝子発現プロファイルに基づいて特徴付けるステップをさらに含んでもよい。

【0012】

上記の開示された方法実施形態はいずれも、1つもしくは複数のがん療法および/もしくは化学療法剤に対する反応性に関してコロニーをスクリーニングするステップ、または1つもしくは複数のがん療法および/もしくは化学療法剤でコロニーを処置するステップをさらに含んでもよい。そのようながん療法および/または化学療法剤は、1回もしくは

50

複数回の放射線療法、免疫療法、内分泌療法、分子療法、および/または例えばアントラサイクリン、アルキル化剤、白金製剤 (platinum-based agent)、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、もしくは有糸分裂阻害剤などの1つもしくは複数の種類の化学療法を含むが、これらに限定されない。そのようながん療法および/または化学療法剤は、任意に、患者のがんまたは腫瘍の種類に基づいて選択することができる。ある特定の実施形態では、臓器中での *in vivo* での1つまたは複数の療法および/または作用物質に対するがんまたは腫瘍の反応性は、その臓器から調製されたバイオマトリックス足場上に播種された場合の、1つまたは複数の療法または作用物質に対するがんまたは腫瘍細胞の反応性と相関し得る。

【0013】

本開示の態様はまた、人体の1つまたは複数の所定の臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場と、本明細書において上記で開示されている方法の1つまたは複数を行うための指示書とを含むキットにも関する。さらなる実施形態は、1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤；腫瘍生検材料のまたはがんもしくは腫瘍と診断された患者から採取されたサンプルの細胞を得るためのツールまたは指示書；特定のがんまたは腫瘍の種類、細胞株の細胞；ならびに/あるいは上記の開示されている方法を行うために必要とされる任意の試薬、培地、または別の成分をさらに含むキットを企図する。

【0014】

本開示のさらなる態様は、本明細書において上記で開示されている播種方法によって作製される、人体の1つまたは複数の所定の臓器に特異的な、人工的な腫瘍または転移モデルを企図する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】バイオマトリックス足場 (BMS) が、*in vivo* で認められる組織特異的な微小環境を再現することを示す図である。(a) *in vitro* での転移性疾患の研究に使用される手法を示す概略図。(b) 肺および肝臓 BMS の走査型電子顕微鏡写真。スケールバー、100 nm。(c) 脱細胞化の前後に肺組織中に存在する成長因子およびサイトカインの分析 ($n = 4$)。シグナル伝達分子の相対的存在量の差は、対応がある *t* 検定を使用して決定した。データは、平均 \pm S.E.M. を表す；* $p < 0.001$ ；(d) 肝臓および肺 BMS 中に存在するタンパク質の組成および相対的存在量を比較するヒートマップ ($n = 4$)。階層的クラスタリングは、*z* スコア正規化されたラベルフリー一定量強度を使用して行った。

【図2】結腸直腸がん細胞が、肝臓および肺 BMS 上で培養された場合に、3D人工転移を自然発生的に形成することを示す図である。(a) プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓 BMS、および肺 BMS 上で成長させた HT-29 (左)、SW480 (中央)、および Caco2 (右) 細胞の走査型電子顕微鏡写真。スケールバー、50 μ m。(b) 播種効率、および (c) プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓 BMS、および肺 BMS 上に播種された HT-29 (左)、SW480 (中央)、および Caco2 (右) 細胞の成長速度 ($n = 3$)。データは、平均 \pm S.E.M. を表す。播種効率および成長速度の差異は、Tukey の多重比較事後検定を用いた一元配置分散分析を使用して決定した。統計学的有意性は上の文字で示す ($P < 0.05$)。同じ文字を共有する群は、有意な差はない。

【図3】人工肝臓転移が、*in vivo* で認められる肝臓転移と同等であることを示す図である。(a) 人工 HT-29 肝臓転移 (左パネル)、HT-29 細胞の脾臓内注射後に形成された肝臓転移 (中央パネル)、および末期のヒト結腸直腸がん患者から生検で採取された肝臓転移 (右パネル) はすべて、胃腸由来の肝臓転移の典型的な組織学的特徴を示す。スケールバー、20 μ m。(b) プラスチック (「プラスチック」)、Matrigel (「Matrigel」)、肝臓 BMS (「人工肝臓転移」) 上で成長させた HT-29 細胞、および HT-29 細胞の脾臓内注射により得られた *in vivo* 肝臓転移

10

20

30

40

50

(「*in vivo* 肝臓転移」)により示される平均的な網羅的遺伝子発現パターンの階層的クラスター分析 ($n = 4$)。

【図4】人工転移が、*in vivo*で転移する可能性の増加を示したことを示す図である。(a、c)プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMSから単離されたHT-29-luc2細胞を(a)直接の肝臓注射または(c)尾静脈注射してから30日後の動物の生物発光イメージ。(b、d)HT-29-luc2細胞の(b)直接の肝臓注射または(d)尾静脈注射の後に肝臓および肺転移を発症した動物数をまとめた表。

【図5】異なる基層上で成長させたCRC細胞が化学療法薬および放射線療法に対して異なる反応を示すことを示す図である。(a)プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS上で成長させたCRC細胞の、化学療法薬に対する反応 ($n = 6$)。データは、平均 \pm S.E.M.を表す。治療反応の差異は、Tukeyの多重比較事後検定を用いた一元配置分散分析を使用して決定した。統計学的有意性は上の文字で示す ($P < 0.05$)。同じ文字を共有する群は、有意な差はない。(b)プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS上で成長させたCRC細胞の、放射線療法に対する反応 ($n = 3$)。データは、平均 \pm S.E.M.を表す。

【図6】肺および肝臓組織の脱細胞化により、組織特異的なシグナル伝達分子を含有するBMSが生成されることを示す図である。(a)脱細胞化前後の肺(左)および肝臓(右)の肉眼的およびH&E画像。スケールバー、 $130\mu\text{m}$ 。(b)脱細胞化前後の肺および肝臓に存在するDNA含有量のアセスメント ($n = 3$)。データは、平均 \pm S.E.M.を表す。DNA含有量の差異は、t検定を使用して決定した。(* * * * $P < 0.0001$)。(c)肺および肝臓BMSに存在する成長因子およびサイトカインの分析 ($n = 4$)。肝臓BMSに存在するシグナル伝達分子の平均ピクセル強度値は、以前の研究から得た。

【図7】細胞外マトリックス成分の組成が肝臓BMSと肺BMSで異なることを示す図である。肝臓および肺BMSにおいて示差的に発現されるコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、およびラミニンの相対的存在量を比較したヒートマップ ($n = 4$)。階層的クラスタリングは、zスコア正規化されたラベルフリー定量強度を使用して行った。

【図8】(a)コロニーとバイオマトリックス足場との境界面、(b)細胞間のタイトジャンクション、および(c)壊死領域を表す人工肝臓転移の透過型電子顕微鏡写真である。(a~b)スケールバー、 $2\mu\text{m}$ 。(c)スケールバー、 $10\mu\text{m}$ 。左パネルにおいてバイオマトリックス足場は「B」で示す。中央パネルにおいてタイトジャンクションは点線の四角で示す。右パネルにおいて壊死領域は「N」で示す。

【図9】人工転移が、増殖速度の低下のために比較的ゆっくりと成長することを示す図である。(a)フローサイトメトリーを使用した、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS上で成長させたCRC培養物中の、アポトーシスを起こしている切断型カスパーゼ3陽性の細胞の定量 ($n = 3$)。(b)フローサイトメトリーでアセスメントした、4時間の標識化期間にわたって異なる基層上で培養された、S期を経たEdU陽性の細胞の数の定量 ($n = 3$)。データは、平均 \pm S.E.M.を表す。アポトーシスおよび増殖速度の差異は、Tukeyの多重比較事後検定を用いた一元配置分散分析を使用してアセスメントした。統計学的有意性は上の文字で示す ($P < 0.05$)。同じ文字を共有する群は、有意な差はない。

【図10】プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMSおよび肺BMS上で成長させたHT-29(左)、SW480(中央)、およびCaco2(右)細胞の代表的な画像である。スケールバー、 $20\mu\text{m}$ 。

【図11】人工肝臓転移および*in vivo*転移が、同等の遺伝子シグネチャーを示すことを示す図である。(a)*in vivo*でのHT-29肝臓転移の、および(b)人工肝臓転移の、網羅的遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ分析によってアセスメントした ($n = 4$)。(a)において肝臓転移は白い矢印で示す。スケールバー、 $100\mu\text{m}$ 。(c)プラスチック上で成長させた細胞と比較した場合に、Matrigel培養物

10

20

30

40

50

、人工転移、および *in vivo* 肝臓転移において上方制御された遺伝子の数を示すベン図。遺伝子オントロジー分析によれば、共通して上方制御されている遺伝子の多くが、血管新生、細胞接着、および薬物代謝と関連していることが分かる。(d)リアルタイム qPCR によってアセスメントした、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓および肺 BMS 上で成長させた HT-29、SW480、および Caco2 細胞における Timp1 遺伝子発現 ($n = 4$)。データは、平均 \pm S.E.M. を表す。Timp1 発現の差異は、Tukey の多重比較事後検定を用いた一元配置分散分析を使用して決定した。統計学的有意性は上の文字で示す ($P < 0.05$)。同じ文字を共有する群は、有意な差はない。

【図 12】全臓器 (whole organ) *ex vivo* 生物発光イメージングを示す図であり、組織学的分析を使用して、HT29-luc2 細胞の尾静脈注射 (a) または直接の肝臓注射 (b) の後の動物個体全身 (whole animal) の生物発光イメージに基づいて特定された転移巣の存在を確認した。組織学的検査によって特定された代表的な肝臓および肺転移は、矢印で示す。スケールバー、 $20 \mu\text{m}$ 。

【図 13】低酸素プレコンディショニングは、プラスチック上で成長させた HT-29 細胞の転移可能性を高めないことを示す図である。(a) 通常条件および低酸素条件下で培養された HT-29-luc2 細胞の尾静脈注射の 30 日後の動物の生物発光イメージ。(b) 肺転移を発症した動物の数をまとめた表。

【図 14】異なる培養基層上で成長させた CRC 細胞により示される、アノキスに対する相対的感受性および浸潤能の特徴付けを示す図である。(a) ハイドロゲルコートプレート上での培養後の、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓 BMS、および肺 BMS 上で成長させた HT-29、SW480、および Caco2 細胞の、アノキスを起こすことに対する相対的耐性 ($n = 3$)。(b) トランスウェル浸潤アッセイを使用して決定した、異なる基層上で成長させた CRC 細胞の浸潤能 ($n = 3$)。データは、平均 \pm S.E.M. を表す。生存および浸潤の差異は、Tukey の多重比較事後検定を用いた一元配置分散分析を使用して決定した。統計学的有意性は上の文字で示す ($P < 0.05$)。同じ文字を共有する群は、有意な差はない。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示による実施形態を、下記により完全に記載する。しかしながら、本開示の態様は、異なる形態で具現化されてもよく、本明細書に記載されている実施形態に限定されると解釈されるべきではない。そうではなく、この開示が、徹底的で完全なものとなり、かつ本発明の範囲を当業者に完全に伝えるように、これらの実施形態は記載されている。本明細書において説明で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図していない。本明細書でおよび本出願の全体にわたって言及されるすべての参考文献は、参照により組み込まれる。

【0017】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての用語 (技術用語および科学用語を含む) は、本発明が属する技術分野の当業者により理解されるものと同じ意味を有する。一般に使用される辞書で定義されているものなどの用語は、本出願および関連技術との関連におけるそれらの意味と一致する意味を有すると解釈されるべきであり、本明細書で明確にそのように定義されていない限り、理想化されたまたは過度に形式的な意味で解釈されるべきではないことがさらに理解される。下記では明示的に定義されていないが、そのような用語は、それらの一般的な意味に従って解釈されるべきである。

【0018】

本明細書において説明で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、本発明を限定することを意図していない。本明細書で言及されているすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

【0019】

10

20

30

40

50

本発明技術の実施には、別途示されない限り、当業者の技能範囲内である組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組み換えDNAの従来技術を用いる。例えば、SambrookおよびRussell編(2001)Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版; Ausubelら編(2007)Current Protocols in Molecular Biologyシリーズ; Methods in Enzymologyシリーズ(Academic Press, Inc., N.Y.); MacPhersonら(1991)PCR 1: A Practical Approach(IRL Press at Oxford University Press); MacPhersonら(1995)PCR 2: A Practical Approach; HarlowおよびLane編(1999)Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney(2005)Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第5版; Gait編(1984)Oligonucleotide Synthesis; 米国特許第4,683,195号; HamesおよびHiggins編(1984)Nucleic Acid Hybridization; Anderson(1999)Nucleic Acid Hybridization; HamesおよびHiggins編(1984)Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press(1986)); Perbal(1984)A Practical Guide to Molecular Cloning; MillerおよびCalos編(1987)Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides編(2003)Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; MayerおよびWalker編(1987)Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press、ロンドン); ならびにHerzenbergら編(1996)Weir's Handbook of Experimental Immunologyを参照されたい。

【0020】

文脈により特に示されない限り、本明細書に記載されている本発明の様々な特徴は、任意の組み合わせで使用できることが明確に意図される。さらに、本開示はまた、一部の実施形態において、本明細書に記載されている任意の特徴または特徴の組み合わせを排除または除外できることを企図する。説明するために、もし明細書に、ある複合体が成分A、BおよびCを含むと記述されていれば、A、BもしくはC、またはそれらの組み合わせのいずれも、単独でまたは任意の組み合わせで、除外および排除することができることが明確に意図される。

【0021】

範囲を含むすべての数字による呼称、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は、適宜1.0もしくは0.1ずつ、または代替として+/-15%、もしくは代替として10%、もしくは代替として5%、もしくは代替として2%の変動分で(+)または(-)に変わる近似値である。必ずしも明示的に記述されとは限らないが、すべての数字による呼称の前には「約」という用語が付いていることが理解されるべきである。必ずしも明示的に記述されとは限らないが、本明細書に記載されている試薬は例示にすぎないこと、および前述の試薬の等価物は当技術分野において知られていることもまた理解されるべきである。

【0022】

定義

本発明の明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」という単数形は、文脈により明らかに別段示さ

れない限り、複数形もまた含むことを意図する。

【0023】

測定可能な値に関する場合の本明細書で使用される「約」という用語、例えば、量または濃度（例えば、バイオマトリックス足場における全タンパク質中のコラーゲンのパーセンテージ）などは、明記されている量の20%、10%、5%、1%、0.5%、またはさらには0.1%の変動分を包含することを意味する。

【0024】

「許容できる」、「有効な」、または「十分な」という用語は、本明細書で開示されている任意の成分、範囲、投与形態などの選択を記述するために使用される場合、前記成分、範囲、投与形態などが開示されている目的に好適であることを意図する。

10

【0025】

また本明細書で使用される場合、「および/または」は、関連する列挙された項目のうちの一つまたは複数のあらゆる可能な組み合わせ、ならびに択一的に（「または」）解釈された場合は組み合わせを含まないことを指し、かつこれらを包含する。

【0026】

「バッファー」および/または「すすぎ培地」という用語は、バイオマトリックス足場の調製に使用される試薬を指すために本明細書で使用される。

【0027】

本明細書で使用される場合、「細胞」という用語は、真核細胞を指す。一部の実施形態では、この細胞は動物由来であり、幹細胞または体細胞であり得る。「細胞集団」という用語は、同じまたは異なる由来を有する同じまたは異なる細胞タイプの一つまたは複数の細胞の群を指す。一部の実施形態では、この細胞集団は細胞株から得ることができ、一部の実施形態では、この細胞集団は、臓器または組織のサンプルから得ることができる。

20

【0028】

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」という用語は、組成物および方法が、列挙されている要素を含むが他の要素を除外しないことを意味するように意図されている。本明細書で使用される場合、「本質的に~からなる」という移行句（および文法的変形）は、列挙されている実施形態の列挙されている材料またはステップ「および基本的かつ新規な特徴に実質的な影響を及ぼさないもの」を包含すると解釈されるべきである。In *re Herz*, 537 F.2d 549, 551~52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (C.C.P.A. 1976) (原文では強調)を参照されたい; MPEP § 2111.03.もまた参照されたい。よって、本明細書で使用される「本質的に~からなる」という用語は、「含む (comprising)」と等価であるとは解釈されるべきでない。「~からなる (consisting of)」は、他の成分の微量を超える要素および本明細書で開示されている組成物を投与するための実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行用語のそれぞれによって定義される態様は、本開示の範囲内である。

30

【0029】

「培養」または「細胞培養」という用語は、一部の実施形態では接着細胞（例えば単層培養）としてまたはスフェロイドもしくはオルガノイドの浮遊凝集塊培養としての、人工的な *in vitro* または *ex vivo* の2次元（2D、単層）または3次元の（3D）環境（ある特定の形態のマトリックス上にある場合または浮遊している場合は、細胞の極性化した形状）における細胞の維持を意味する。「スフェロイド」という用語は、すべて同じ細胞タイプの細胞の浮遊凝集塊（例えば、ある細胞株由来の凝集塊）を示し、「オルガノイド」は、複数の細胞タイプで構成される細胞の浮遊凝集塊である。一部の実施形態では、オルガノイドは、上皮と、内皮および/または間質細胞もしくは星状細胞を含む1種または複数の間葉系細胞タイプとの凝集塊であり得る。「細胞培養系」は、細胞集団が生存または成長し得る培養条件を指すために本明細書で使用される。

40

【0030】

「培養培地」は、細胞の培養、成長、または増殖のための栄養液を指すために本明細書

50

で使用される。一部の実施形態では、培養培地は、アミノ酸、ビタミン、塩、脂質、ミネラル、微量元素のうちの一つまたは複数を含み、間質液の化学的構成成分を模倣している。培養培地は、細胞を成熟させるために、場合によっては特に幹/前駆体細胞を特定の系統の細胞に分化させるのを促進するために、特定の状態（例えば、多能性状態、静止状態など）に細胞を維持する能力などであるがこれらに限定されない、機能特性によって特徴付けることができる。幹/前駆体を使用される培養培地の非限定的な例は、Kubota's Mediumであり、これは本明細書において下記でさらに定義されている。一部の実施形態では、培地は、細胞を所与の環境中に提示または導入するために使用される「播種培地」であってもよい。

【0031】

より詳細には、「基礎培地」は、細胞周囲の間質液の化学的構成成分を模倣する組成物中のアミノ酸、糖、脂質、ビタミン、ミネラル、塩、微量元素および様々な栄養素で構成されるバッファーである。そのような培地は任意選択で、生物学的プロセス（例えば、増殖、分化）を進めさせるために必要とされる必須シグナル伝達分子（ホルモン、成長因子）を提供するために、または細胞懸濁液の調製において通常使用される酵素に対する阻害剤の供給源として、血清を添加してもよい。血清は、培養で使用される細胞タイプの自己由来であってもよいが、最も一般的には、農業または食糧目的のために定期的に屠殺される動物の血清、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマなどの血清である。血清を添加した培地は、場合により血清添加培地（SSM）と称される。

【0032】

本明細書で使用される場合、「分化」は、特定の条件により、細胞が、成熟特異的遺伝子産物を産生する成熟細胞タイプに成熟することを意味する。

【0033】

「等価物」または「生物学的等価物」という用語は、特定の分子、生体物質または細胞物質に関する場合、同義で使用され、所望の構造または機能性を依然として維持しながら最低限の相同性を有するものを意図する。

【0034】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織サンプル中のmRNAまたはタンパク質の量を測定することによって決定することができ、さらに、複数の遺伝子の発現レベルを決定して、特定のサンプルに関する発現プロファイルを確立することができる。

【0035】

本明細書で使用される場合、「機能的」という用語を使用して、任意の分子、生体物質または細胞物質を修飾して、それが特定の明記されている作用を実現することを意図することができる。

【0036】

本明細書において使用される「遺伝子」という用語は、RNAがコーディング（例えば、mRNA）であるかまたはノンコーディング（例えば、ncRNA）であるかにかかわらず、RNA分子に転写される任意の核酸配列を含むことを広く意味する。

【0037】

本明細書で使用される場合、「作製する（generate）」という用語およびその等価物（例えば、作製すること、作製された、など）は、特定のモデルコロニー、臓器、またはオルガノイドが得られる方法ステップに関する場合、「生成する（produce）」およびその等価物と同義で使用される。

【0038】

本明細書において使用される「単離された」という用語は、分子または生体物質または細胞物質が他の物質を実質的に含まないことを指す。

10

20

30

40

50

【0039】

本明細書で使用される「Kubota's Medium」は、内胚葉幹細胞用に設計され、それらが自己複製型の分裂でクローン形成により拡大することを可能にする（特に、ヒアルロンン基層上または3Dヒアルロンンヒドロゲル中にある場合）、無血清完全限定培地を指す。Kubota's Mediumは、銅非含有、カルシウム低含有（ $< 0.5 \text{ mM}$ ）で、インスリン、トランスフェリン/Fe、精製アルブミンと結合した精製遊離脂肪酸のミックス、および場合により高密度リポタンパク質もまた含有する、任意の基礎培地を指す場合もある。Kubota's Mediumまたはその等価物は、特に内胚葉幹細胞のための培養選択において無血清で使用され、精製されたシグナルの規定のミックス（インスリン、トランスフェリン/Fe）、脂質、および栄養素だけを含有する。一部の実施形態では、この培地は、細胞をマトリックス足場中に導入する播種プロセスのために、および細胞懸濁液の調製に使用される酵素を不活性化するために、低レベル（典型的には5%以下）の血清を使用したSSMとして一時的に使用することができ、可能な限り迅速に（例えば5～6時間以内）無血清Kubota's Mediumに切り替えることが最適である。

10

【0040】

ある特定の実施形態では、この培地は、銅非含有、カルシウム低含有（ $< 0.5 \text{ mM}$ ）の、インスリン（ $5 \mu\text{g/mL}$ ）、トランスフェリン/Fe（ $5 \mu\text{g/mL}$ ）、高密度リポタンパク質（ $10 \mu\text{g/mL}$ ）、セレン（ 10^{-10} M ）、亜鉛（ 10^{-12} M ）、ニコチンアミド（ $5 \mu\text{g/mL}$ ）、および精製アルブミンの形態と結合した精製遊離脂肪酸の混合物を添加した、無血清基礎培地（例えば、RPMI 1640またはDME/F12）で構成される。この培地の調製に関する非限定的な例示的な方法は、他で、例えば、それらの開示が参照により本明細書に組み込まれる、Kubota H、Reid LM、Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 2000; 97: 12132～12137、Y. Wang、H. L. Yao、C. B. Cuiら Hepatology. 2010; 52(4): 1443～54、Turnerら; Journal of Biomedical Biomaterials. 2000; 82(1): 156～168ページ; Y. Wang、H. L. Yao、C. B. Cuiら Hepatology. 2010 Oct 52(4): 1443～54で公開されている。無血清条件下での拡大を可能にするさらなる因子およびサプリメントを提供することによって、Kubota's Mediumの変形物のある特定の細胞タイプに使用することができる。例えば、Kubota's Mediumは、一過性増殖細胞（transit amplifying cell）または分化決定した前駆細胞（committed progenitor）（例えば肝芽細胞）および幹細胞集団より後の他の成熟系統段階が、無血清条件下でex vivoで生存および拡大できるように変更してもよい。この一例は、肝芽細胞およびそれらの子孫である分化決定した前駆細胞がex vivoで拡大できるように変更されたKubota's Mediumであり、すなわち、無血清Kubota's Mediumは、肝細胞成長因子（HGF）、上皮成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、および場合によっては血管内皮成長因子（VEGF）をさらに添加される。得られる細胞拡大は、（もしあれば）最低限の自己複製とともに起こる。細胞がIV型コラーゲンおよびラミニンの基層上にある、または50%超のIV型コラーゲンおよびラミニンを含有する3Dヒドロゲル中に包埋されている場合、この培地は特に有効である。

20

30

40

【0041】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、同義で使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体のいずれかである、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは任意の3次元構造を有することができ、既知または未知の任意の機能を果たし得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プロンプ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャ

50

ーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブおよびプライマー。

【0042】

ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含むことができる。存在する場合、ポリヌクレオチドのアセンブリの前または後に、ヌクレオチド構造に対する修飾を付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されていてもよい。ポリヌクレオチドは、標識化成分とのコンジュゲーションなどによって、重合後にさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。別途明記されているかまたは必要とされない限り、ポリヌクレオチドであるこの技術の任意の態様は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが知られているまたは予測される2つの相補的な一本鎖形態の各鎖との両方を包含する。

10

【0043】

本明細書で使用される場合、「臓器」という用語は、個体生物のある特定の機能が局所的に果たされ、かつ形態学的に独立している、その個体生物の特定の部分である構造を指す。臓器の非限定的な例としては、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、膵臓、および脳が挙げられる。臓器は、組織供給源として使用されてもよく、例えば、胎児、新生児、小児（子供）、または成人の臓器を使用して、本明細書で開示されている使用のための対象とする細胞集団を得てもよい。「組織」という用語は、生きているもしくは死亡した生物の組織、または生きているもしくは死亡した生物から得られるもしくはそれを模倣するように設計された任意の組織を指すために本明細書で使用される。組織は、健康なもの、罹患したものおよび/または遺伝子変異を有するものでもよい。本明細書で使用される「天然組織」または「生体組織」という用語およびそれらの変形は、その天然なまたは生物から得られたときから変更されていない状態で存在するままの生体組織を指す。「マイクロ臓器」は、「天然組織」を模倣する「バイオ人工 (bioengineered) 組織」のセグメントを指す。

20

【0044】

生体組織は、任意の単一組織（例えば、相互接続していてもよい細胞の集合体）または生物の体の臓器もしくは部分もしくは領域を構成している組織の群を含み得る。組織は、均質な細胞物質を含んでもよく、または組織は、例えば肺組織、骨格組織、および/または筋組織を含み得る胸部を含めた体の領域において見られるものなどの複合構造であってもよい。例示的な組織は、それらの任意の組み合わせを含めて、肝臓、肺、甲状腺、皮膚、膵臓、血管、膀胱、腎臓、脳、胆管、十二指腸、腹部大動脈、腸骨静脈、心臓および腸から得られるものを含むがこれらに限定されない。

30

【0045】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、同義で使用され、それらの最も広い意味で、2つ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸類似体またはペプチド模倣体の化合物を指す。サブユニットはペプチド結合によって連結されていてもよい。別の態様では、サブユニットは、別の結合、例えば、エステル、エーテルなどによって連結されていてもよい。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を含み得るアミノ酸の最大数は限定されない。本明細書で使用される場合「アミノ酸」という用語は、グリシンならびにDおよびL光学異性体の両方、アミノ酸類似体ならびにペプチド模倣体を含む天然および/または非天然または合成のアミノ酸を指す。

40

【0046】

本明細書で使用される「播種」という用語は、細胞をあるもの、例えば、バイオマトリックス足場上に導入する方法を指す。播種は、プレートおよび/またはバイオリクターを含むがこれらに限定されない様々な容器において行うことができる。

50

【0047】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意の動物を意味することが意図されている。一部の実施形態では、対象は哺乳動物であってもよく、さらなる実施形態では、対象は、ヒト、マウス、またはラットであってもよい。

【0048】

本明細書で使用される場合、対象において疾患を「処置すること (treating)」または「処置 (treatment)」は、(1) 疾患にかかりやすい、もしくは疾患の症状をまだ示していない対象において症状もしくは疾患が発生するのを予防すること；(2) 疾患を抑制することもしくはその発症を阻止すること；または(3) 疾患もしくは疾患の症状を改善もしくは後退させることを指す。当技術分野において理解されているように、「処置」は、有益なまたは所望の臨床結果を含む結果を得るための手法である。本発明の技術の目的のために、有益なまたは所望の結果は、検出可能であるかまたは検出不能であるかにかかわらず、1つまたは複数の症状の軽減または改善、状態（疾患を含む）の程度の縮小、状態（疾患を含む）の安定した（すなわち、悪化していない）状況、状態（疾患を含む）の進行が遅れるまたは緩徐になること、状態（疾患を含む）の改善または一時的緩和、寛解の状況（部分的か完全かにかかわらず）のうちの一つまたは複数を含むことができるがこれらに限定されない。

10

【0049】

バイオマトリックス足場および細胞外マトリックス

本明細書において使用される「細胞外マトリックス、」または「ECM」という用語は、細胞により分泌される様々な生物活性分子で構成され、1つまたは複数の細胞表面に隣接し、かつ細胞およびそれらで構成される組織または臓器の構造的および/または機能的支持体に関与する複雑な足場を指す。多くの細胞タイプに共有されるマトリックス成分があるが、ECMの化学組成は組織特異的である。特異的なマトリックス成分およびその濃度は、特定の組織の種類、組織学的構造、臓器、および他の超細胞構造に関連し得る。本開示に関連する細胞外マトリックスの成分は、コラーゲン、コラーゲン関連マトリックス成分（例えばフィブロネクチン、ラミニン、ナイドジェン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン）、およびシグナル伝達分子（成長因子、サイトカイン）を含むがこれらに限定されない。

20

【0050】

一部の実施形態では、バイオマトリックス足場を単離するための戦略は、組織のすべてのコラーゲン分子を不溶性に保つように主として設計されるため、主な検討事項はコラーゲンおよびそれらに結合している因子である。一般に、コラーゲン分子は、既知のコラーゲンの種類のそれぞれに特有のアミノ酸化学的性質を有する。現在のところ、既知の29種類のコラーゲンが存在する。すべての既知のコラーゲン分子は、分子の中央に棒状ドメイン、および両端に球状ドメインを有する、ひものような「編まれた (woven)」3つのアミノ酸鎖で構成される（このように、コラーゲン分子は「ダンベル」状の形状を有する）。棒状ドメインには、アミノ酸の3つ組 [グリシン - プロリン - X]（ここで、Xは任意のアミノ酸であり得る）の反復が優位を占めている。球状ドメインは、各コラーゲンの種類に特有のアミノ酸配列で構成される。

30

40

【0051】

コラーゲンは細胞から分泌され、その後、この分子の一方または両方の球状端部が特定のペプチダーゼによって除去され、続いて複数のコラーゲン分子が凝集してコラーゲン原線維を形成する。例外は、球状ドメインを保持し、そして端部同士で凝集して「亀甲金網 (chicken-wire)」状構造を有するコラーゲン分子のネットワークを形成する、「網目状コラーゲン」（例えばIV型またはVI型）である。

【0052】

原線維またはネットワークに凝集した後、コラーゲンは、コラーゲン分子間で（およびエラスチン分子間でも）共有結合を生じる、細胞外銅依存性酵素であるリシルオキシダーゼの作用により架橋されて、非常に安定なコラーゲン分子凝集塊を構成する架橋形態を生

50

成する。原線維のコラーゲンにおける原線維1つ当たりのコラーゲン分子の数、または網目状コラーゲンにおける連結パターンは、具体的なコラーゲンの種類の正確なアミノ酸化学的性質によって規定される。

【0053】

その細胞外マトリックスを単離するための組織の抽出は、不溶性形態の組織のコラーゲンを単離することに重点をおいた戦略によって実現可能である。コラーゲンは、非コラーゲン性マトリックス成分が付着する足場材であることが知られており、シグナル伝達分子は、マトリックス結合成分の多くに結合する。細胞外マトリックス成分の複合体の自己集合は、架橋コラーゲンだけでなく非架橋コラーゲンでも起こる。よって、不溶性形態の組織のコラーゲンのすべてを回収する戦略は、マトリックスの既知の成分の大部分を回収するために理想的な戦略である。

10

【0054】

マトリックスの単離は、中性pHで塩濃度が1M以上であるバッファーを利用することによって達成することができる。架橋コラーゲンは、蒸留水を用いても単離および保存できるが、非架橋コラーゲンを不溶性として保存するために必要とされる塩の正確な濃度は、コラーゲンの種類に左右される。例えば、皮膚において豊富に見出されるI型およびII型コラーゲンは、不溶性のままであるために約1Mの塩を必要とする。対称的に、高レベルのV型コラーゲンを含む羊膜中のコラーゲンは、3.5~4.5Mの塩を必要とする。肝臓中の非架橋コラーゲンならびに架橋コラーゲンは、不溶性のままであるために約3.4~3.5Mの塩を必要とする。

20

【0055】

細胞外マトリックス中の濃縮された抽出物を調製する大部分の方法は、非架橋コラーゲンおよび関連する成分の、すべてではないが大部分を失う条件を使用する。マトリックス足場単離における最も一般的な戦略は、非架橋コラーゲンおよびそれらに結合した任意の因子を溶解させる、a)マトリックス成分を分解する酵素、および/またはb)低塩もしくは無塩バッファー(例えば蒸留水)の使用、のいずれかを用いる。そのため、架橋コラーゲンおよびそれらの架橋コラーゲンに結合した任意の因子を含有するが、非架橋コラーゲンおよびそれらの関連成分を含まないかまたはその最小限の量を有する、マトリックス足場のための脱細胞化された組織抽出物の複数の形態が存在する。

30

【0056】

「バイオマトリックス足場」(BMS)という用語は、組織のコラーゲンのすべてを不溶性形態に保つ戦略によって生成される細胞外マトリックスの単離抽出物を指す。BMS抽出物は、それらの化学的性質およびそれらの作用に関して組織特異的である。本明細書に記載されている通り、BMSは、生体組織において天然に見出されるコラーゲンおよび/またはコラーゲン結合因子の一部を、任意選択で大部分を、保持する。一部の実施形態では、BMSは、すべてバイオマトリックス足場の一部である(例えば、バイオマトリックス足場という用語に包含される)、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ナイドジェン/エンタクチン、エラスチン、インテグリン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン(硫酸化および非硫酸化、ヒアルロナンを含む)およびこれらの任意の組み合わせを含み、これらからなり、または本質的にこれらからなる。

40

【0057】

一部の実施形態では、BMSは、(i)新生(新しく形成された)コラーゲン、(ii)凝集しているが架橋されていないコラーゲン分子(コラーゲン原線維)、(iii)架橋コラーゲン、(iv)コラーゲンに結合した非コラーゲン性マトリックス成分(例えばラミニン、フィブロネクチン、ナイドジェン/エンタクチン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン)、(v)これらの様々な形態のコラーゲンおよび/またはコラーゲンに結合した非コラーゲン性因子に結合したシグナル伝達分子を含む、組織のコラーゲンを含む。一部の実施形態では、架橋および非架橋ネイティブコラーゲンの両方の大多数が、非コラーゲン性マトリックス分子およびこれらのコラーゲンに結合したシグナル伝達分子と一緒に、組織中に見出される。一部の実施形態では、BMSは、1つまたは

50

複数のコラーゲン関連マトリックス成分、例えば、ラミニン、ナイドジェン、エラスチン、プロテオグリカン、ヒアルロン、非硫酸化グリコサミノグリカンおよび硫酸化グリコサミノグリカン、ならびにマトリックス成分に付随する成長因子およびサイトカインを含む。

【0058】

一部の実施形態では、BMSは、*in vivo*で見出されるマトリックス結合シグナル伝達分子の50%超を含む。一部の実施形態では、マトリックス結合シグナル伝達分子は、上皮成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、肝細胞成長因子(HGF)、インスリン様成長因子(IGF)、骨形成因子(BMF)、トランスフォーミング成長因子(TGF)、インターロイキン(IL)、神経成長因子(NGF)、神経栄養因子、白血球抑制因子(LIF)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、幹細胞因子(SCF)、コロニー刺激因子(CSF)、GM-CSF、エリスロポエチン、トロポポエチン、ヘパリン結合性成長因子、IGF結合タンパク質、胎盤成長因子、およびWntシグナルであり得る。

10

【0059】

一部の実施形態では、本明細書で開示されているBMSは、架橋および非架橋コラーゲンの両方を保存するために、低イオン強度バッファーを避けて調製される。一部の実施形態では、BMSは、検出可能な量の特定のコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ナイドジェン/エンタクチン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンおよび/またはこれらの任意の組み合わせを含まなくてもよい。一部の実施形態では、コラーゲンおよびコラーゲン結合因子の本質的にすべてが保持される。別の実施形態では、BMSは、組織中にあることが知られているコラーゲンのすべてを含む。

20

【0060】

BMSは、天然の生体組織において見出される、任意の組み合わせのコラーゲン、コラーゲン関連マトリックス成分および/またはマトリックス結合シグナル伝達分子(例えば、成長因子、ホルモンおよび/またはサイトカイン)の、少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%または100%を含み得る。一部の実施形態では、BMSは、生体組織のコラーゲンの少なくとも95%、ならびにコラーゲン関連マトリックス成分およびマトリックス結合シグナル伝達分子の大部分を含む。本明細書に記載のコラーゲンは、凝集して原線維を形成しているがまだ架橋されていない新生(新しく形成された)コラーゲンであってもよく、一部は、これらの架橋された形態であってもよい。例示的なコラーゲンおよびその抽出方法は、本明細書において下記で簡潔に記載されている。

30

【0061】

一部の実施形態では、本明細書で開示されているバイオマトリックス足場は、新生(新しく形成された)コラーゲン、架橋前に自己集合して原線維を形成している凝集したコラーゲン分子、加えて架橋コラーゲンを含むコラーゲンの本質的にすべてを含有する。加えて、バイオマトリックス足場は、他のマトリックス成分に加えてこれらのコラーゲンにまたは結合したマトリックス成分に結合したシグナル伝達分子を任意に含んでもよい。一部の実施形態では、バイオマトリックス足場中のコラーゲンの比率は、バイオマトリックス足場が得られる組織中の比率とほぼ同等または同一である。元の組織を模倣するための好適な新生コラーゲンおよび凝集した非架橋コラーゲンのパーセンテージの非限定的な例は、少なくとも約0.05%、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%を含むがこれらに限定されない。

40

【0062】

本明細書に記載されているように、生体組織のコラーゲン関連マトリックス成分ならびにマトリックスに結合した成長因子、ホルモンおよび/またはサイトカインの大部分は、天然の(例えば、未処理の)生体組織において見出されるコラーゲン関連マトリックス成分ならびにマトリックスに結合した成長因子、ホルモンおよび/またはサイトカインの約

50

50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%または100%を保持するバイオマトリックス足場を指す。「粉末化された」または「微粉碎された」という用語は、本明細書において同義で使用されて、粉碎されて粉末になったバイオマトリックス足場を表す。「3次元バイオマトリックス足場」という用語は、そのネイティブな3次元構造を保持する脱細胞化された足場を指す。そのような3次元足場は、足場全体(whole scaffold)またはその凍結切片のいずれであってもよい。いくつかの目的のために、足場は液体窒素温度で微粉碎することができる(凍結粉碎と呼ばれるプロセス)。

【0063】

例示的なコラーゲンは、I型~XXIX型コラーゲンと現在同定されているものなどであるがこれらに限定されない、よってさらに他の種類のコラーゲンが将来認識されることを考慮した、すべての種類のコラーゲンを含む。バイオマトリックス足場は、少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上の、ネイティブな生体組織において見出されるコラーゲンの1つまたは複数を含み得る。一部の実施形態では、コラーゲンは架橋および/または非架橋である。バイオマトリックス足場中のコラーゲンの量は、ヒドロキシプロリン含有量の決定などであるがこれらに限定されない、当技術分野で知られており、本明細書に記載されている様々な方法によって決定することができる。その溶解特性の観察に依拠するものなどの、コラーゲンの架橋または非架橋特徴のどちらかを判定する例示的な方法もまた存在する。例えば、D. R. Eyre、* M. WeissおよびJ. Wu、Advances in collagen cross-link analysis Methods、2009; 45(1): 65~74(コラーゲン化学の分野での標準的な方法による架橋の分析を記載している)を参照されたい。例えば、コラーゲンは、1M以下の塩濃度のバッファー中に溶解するかどうかに基づいて、架橋されていると判定することができる。

10

20

30

40

50

【0064】

例示的なコラーゲン関連マトリックス成分は、接着分子(フィブロネクチンおよびラミニンのファミリー); LおよびPセレクトイン; ヘパリン結合成長関連分子(HB-GAM); トロンボスポンジタイプIリピート(TSR); アミロイドP(AP); ナイドジェン/エンタクチン; エラスチン; ビメンチン; プロテオグリカン(PG); コンドロイチン硫酸PG(CS-PG); デルマトン硫酸-PG(DS-PG); スモールロイシンリッチプロテオグリカン(SLRP)ファミリーのメンバー、例えばバイグリカンおよびデコリンなど; ヘパリン-PG(HP-PG); ヘパラン硫酸-PG(HS-PG)、例えばグリピカン、シンデカン、およびパールカンなど; ならびにグリコサミノグリカン(GAG)、例えばヒアルロン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、およびヘパリンなどを含むがこれらに限定されない。

【0065】

一部の実施形態では、バイオマトリックス足場は、様々なマトリックス成分に結合した、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ナイドジェン/エンタクチン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン(GAG)、成長因子、ホルモン、およびサイトカイン(任意の組み合わせで)を含むか、これらからなるか、または本質的にこれらからなる。バイオマトリックス足場は、少なくとも約50%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上の、天然の生体組織において見出されるコラーゲン関連マトリックス成分、ホルモンおよび/またはサイトカインの1つまたは複数を含んでもよく、かつ/または天然の生体組織において見出される濃度の少なくとも約50%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上の濃度で存在するこれらの成分の1つまたは複数を含んでもよい。

【0066】

一部の実施形態では、バイオマトリックス足場は、組織中にあることが知られているコ

ラーゲン関連マトリックス成分、ホルモンおよび/またはサイトカインのすべてまたは大部分を含む。別の実施形態では、バイオマトリックス足場は、天然の生体組織において見出される濃度に近い濃度（例えば、天然組織において見出される濃度の約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または100%）の、ラーゲン関連マトリックス成分、ホルモンおよび/またはサイトカインの1つまたは複数を含むか、本質的にこれらからなるか、またはこれらからなる。

【0067】

例示的なマトリックス結合シグナル伝達分子は、骨形成タンパク質（BMP）、上皮成長因子（EGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF）、神経成長因子（NGF）、神経栄養因子、白血病抑制因子（LIF）、血管内皮細胞成長因子（VEGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、幹細胞因子（SCF）、コロニー刺激因子（CSF）、GM-CSF、エリスロポエチン、トロポポエチン、ヘパリン結合性成長因子、IGF結合タンパク質、胎盤成長因子、Wntシグナルを含むがこれらに限定されない。

10

【0068】

例示的なサイトカインは、インターロイキン、リンホカイン、モノカイン、コロニー刺激因子、ケモカイン、インターフェロンおよび腫瘍壊死因子（TNF）を含むがこれらに限定されない。バイオマトリックス足場は、少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、100%またはそれ以上の（任意の組み合わせで）、天然の生体組織において見出されるマトリックス結合成長因子および/またはサイトカインの1つまたは複数を含んでもよく、かつ/または天然の生体組織において見出される濃度の少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、100%またはそれ以上の濃度で存在する、これらの成長因子および/またはサイトカイン（任意の組み合わせで）の1つまたは複数を含んでもよい。

20

【0069】

一部の実施形態では、バイオマトリックス足場は、生理的レベルまたはほぼ生理的レベルの、天然組織中にあり、かつ/または組織中で検出されることが知られている、マトリックスに結合した成長因子、ホルモンおよび/またはサイトカインの多くまたは大部分を含み、別の実施形態では、バイオマトリックス足場は、天然の生体組織において見出されるそれらの生理的濃度に近い（例えば、比較すると約30%、25%、20%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%以下の差で異なる）濃度の、マトリックスに結合した成長因子、ホルモンおよび/またはサイトカインの1つまたは複数を含む。バイオマトリックス足場中に存在する成長因子またはサイトカインの量または濃度は、様々な抗体アッセイおよび成長因子アッセイなどであるがこれらに限定されない、当技術分野で知られており、本明細書に記載されている様々な方法によって決定することができる。

30

【0070】

バイオマトリックス足場およびその単離に関する方法および組成物は、例えば、米国特許第8,802,081号、米国特許第9,102,913号、米国特許第7,456,017号、および米国特許仮出願第62/335,013号において論じられている。

40

【0071】

本明細書で開示されているバイオマトリックス足場は、バイオマトリックス足場の凍結切片、凍結粉碎されたバイオマトリックス足場、またはインタクトなバイオマトリックス足場を含むがこれらに限定されない、様々な形態で使用することができる。

【0072】

がんおよび腫瘍

本明細書で使用される場合、「がん」という用語は、体の任意の部分または任意の細胞タイプに由来するがんを指す。この用語は、癌腫、肉腫、血管腫、リンパ腫、白血病、胚細胞性腫瘍、および芽細胞種を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、がん

50

は、体の特定の場所または特定の疾患に関連する。本明細書で使用される場合、「腫瘍」という用語は、良性または悪性の任意のタイプの腫瘍組織を指す。ある特定の腫瘍を処置するためにがん療法および/または化学療法剤を使用することができることが十分に理解される。

【0073】

一般に、がんは、組織/臓器内の細胞同士の関係に影響を及ぼす遺伝的および/またはエピジェネティックな異常を伴う、組織の疾患である。最も一般的なものの1つは、後生動物、組織で構成される生物、細胞の組織化されたコミュニティ内の基礎的な細胞間の関係を構成する上皮-間葉系細胞の関係の異常である。すべての正常な組織は、間葉系細胞の成熟系統と、および成熟過程において互いに同等な系統と組になった上皮細胞の成熟系統で構成される。上皮-間葉系の関係は、細胞外マトリックス複合体とシグナル伝達分子との動的および相乗的な相互作用からなるパラ分泌シグナル伝達によって仲介される。先天性の遺伝的欠陥によって、または放射線によって、または環境有害物質(化学物質)によって引き起こされる細胞の1つまたは複数の変異により、上皮細胞は間葉系細胞から質的または量的に独立し得る。癌腫は上皮の悪性腫瘍であり、肉腫は間葉系細胞の悪性腫瘍であり、血管腫は内皮の悪性腫瘍であり、白血病およびリンパ腫は血液細胞の悪性腫瘍の代表であるなど、悪性細胞はあらゆる年齢のドナーにおいてあらゆる組織で生じる可能性があり、悪性腫瘍が最初に発生する部位である原発部位において破壊を引き起こす可能性がある。悪性腫瘍は拡散し、すなわち体内の他の部位に転移し、遠位部位において破壊を引き起こす可能性がある。一部の実施形態では、がんは、体の特定の場所または特定の疾患に関連する。

10

20

【0074】

細胞の悪性転換には、細胞における1つまたは複数の遺伝的および/またはエピジェネティックな変化が伴い、これは、特定の腫瘍の種類に特異的である。悪性腫瘍における、特に転移可能性における既知の遺伝的およびエピジェネティックな変化についての考察は、非常に多くの最近の総説において記載されている。例えば、Turajlic S、Swanton C. *Metastasis as an evolutionary process*. *Science*. 2016年4月8日; 352(6282): 169~75. Review; Suva ML、Riggi N、Bernstein BE. *Epigenetic reprogramming in cancer*. *Science*. 2013年3月29日; 339(6127): 1567~70. Review; Vanharanta S、Massague J. *Origins of metastatic traits*. *Cancer Cell*. 2013年10月14日; 24(4): 410~21. Review; Vogelstein B1、Papadopoulos N、Velculescu VE、Zhou S、Diaz LA Jr、Kinzler KW. *Cancer genome landscapes*. *Science*. 2013年3月29日; 339(6127): 1546~58. Review; Marquardt JU、Factor VM、Thorgerirsson SS. *Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications*. *Journal of Hepatology*. 2010年9月; 53(3): 568~77. Reviewを参照されたい。

30

40

【0075】

悪性転換を起こさせる1つまたは複数の遺伝的またはエピジェネティックな変化の存在は、悪性細胞と近傍の細胞との相互作用に変化をもたらす可能性がある。通常は組織の細胞コミュニティの活性と連係して働くパラ分泌シグナルに対する、悪性細胞の依存度が低くなる可能性がある。近年、こうした変化の一部が、悪性細胞から放出される、細胞膜に包まれた球体である「エクソソーム」に関与することが分かった。エクソソームは、間質液中に、血液中に、および/または近傍の細胞からなる微小環境中に放出され得る。エクソソームは、悪性細胞の細胞質成分、マイクロRNA、および酵素活性の部分を含むし、

50

近傍の細胞の細胞膜と融合することができ、そのためエクソソームの内容物を近傍の細胞に送達することができる。このプロセスは、近傍の細胞の生物学的活性を変え得る。エクソソームはまた、リンパ管または血流を介して原発性腫瘍部位から遠位の部位に分散され、それらの部位の細胞と融合し、それらの遠位部位における細胞の生物学的活性を変える可能性がある。実際に、近傍の細胞または遠位部位の細胞のこの変更は、浸潤または転移の前段階であることがある。

【0076】

大部分の悪性腫瘍の致死的な側面は、それらの転移する能力である。腫瘍が遠位部位に拡散する能力は、細胞がどこに向かうかに関してパターンを示すと長い間理解されてきた。乳がんおよび前立腺がんは骨、肝臓、肺および脳に転移し、結腸がんは肝臓、肺および腹膜に転移し、甲状腺がんは肝臓、肺および骨に拡散するなどである。転移の初期段階では、限られた一連の組織が転移巣を有するが、がんの後期段階では全身にわたって拡散する。

10

【0077】

転移のプロセスに大きな影響力を持つ可変要素としては、腫瘍細胞による酵素の産生が挙げられ、これは細胞外マトリックスの成分を溶解させることができ、遠位部位への腫瘍細胞の浸潤および分散を可能にする。酵素のレパートリーは、様々な分類の腫瘍において特異である。例えば、肉腫は、腫瘍細胞が血管中に迅速に拡散し、そのため血行性（血管）経路によって腫瘍が他の部位に容易に拡散することを可能にする酵素を産生する。対称的に、癌腫は、典型的には、腫瘍細胞がリンパ管路の中に、および後期段階においてのみ血管路の中に、拡散することを可能にする酵素を産生する。

20

【0078】

拡散または転移の経路（例えば、血行性経路に対するリンパ管経路）により、二次的に、多様な組織中に腫瘍細胞が播種されることになる。腫瘍細胞がある組織に拡散している、および付着していることが分かっている場合であっても、それらの腫瘍細胞は必ずしもその組織において成長およびコロニー形成するわけではない。がんにおける初期および中期段階において、腫瘍はある特定の遠位部位においてのみ、優先的に成長またはコロニー形成する。対称的に、がんの後期段階では、腫瘍細胞は通常、ほとんどの組織において見出され得、存在するいかなる「バリア」も破ってそれらの組織内で腫瘍細胞は成長する。

30

【0079】

この転移の臓器部位特異性は、「種と土壌」説として、この現象に言及した Stephen Page t によって1889年に記載されていた。これにより、Page t 博士は、「種」（腫瘍細胞）および「土壌」（組織の微小環境）において可変要素が存在すると述べた。Isaiah Fidler 博士による最近の総説（The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nature Reviews Cancer 2003; 3, 453~458）に概説されているように、これは100年以上にわたって研究の対象となっている。

【0080】

所与の腫瘍により産生される酵素のレパートリーは、拡散経路における、およびある程度は所与の組織にコロニー形成する能力においても、可変要素であることが知られているが、この酵素のレパートリーは、転移の臓器部位特異性という現象を説明するには不十分である。出願人は、以下の実験において、別の可変要素の組が、組織特異的な形態の細胞外マトリックスの化学的性質の中に存在することを示す。マトリックスの化学的性質は、それぞれの組織に特有であり、組織の微小環境中で腫瘍細胞が生存および成長する能力を規定する。理論に拘束されるものではないが、出願人は、Page t が「土壌」のものとした可変要素のいくつかは、細胞外マトリックスに起因し得るものであると仮定する。疾患の初期から中期段階において、マトリックスの化学的性質による調節により、腫瘍細胞が生存および成長するかどうかを支配および規定することができる。また、後期段階において、腫瘍細胞は非常に多量の（および非常に多数の）酵素を産生するため、マトリ

40

50

ックス内の可変要素および腫瘍細胞成長の制御は弱まるかまたは消滅し、腫瘍細胞が大部分の組織において成長する能力をもたらす。

【0081】

がん療法および化学療法剤

本明細書で使用される場合、「がん療法」という用語は、寒冷療法、温熱療法、光線力学的療法、レーザー療法、放射線療法、がん特異的抗体療法、化学療法、養子細胞移植、サイトカイン療法、免疫療法、ワクチン接種、カルメット-ゲラン菌 (*Bacillus Calmette-Guérin*) (BCG)、CAR細胞療法、内分泌療法(ホルモン療法としても知られている)、幹細胞療法(自家、同種異系、または同系)、および他の種類の標的または非標的療法を含むがこれらに限定されない、がんを使用される任意の既知の処置レジメンを意図する。www.cancer.govの米国国立がん研究所ウェブサイト(最終訪問日2016年5月6日)を参照されたい。

10

【0082】

本明細書で使用される場合、「化学療法剤」という用語は、がんを処置するために使用される小分子化合物などのがんを処置するために有用な部分を指し、すべての剤形、製剤、およびがんを処置するために有用な多数の既知の作用物質を包含する。化学療法剤の非限定的な例としては、アントラサイクリン、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン、パルルビシン、またはこれらの誘導体など; 抗生物質、例えば、アクチノマイシンD、プレオマイシン、マイトマイシンC、またはこれらの誘導体など; アルキル化剤、例えば、シクロホスファミド、メコールレタミン (*mechlorethamine*)、ウラムスチン、メルファラン、クロラムブシル、イホスファミド、ベンダムスチン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ブスルファン、ダカルバジン、テモゾロミド、チオテパ、アルトレタミン、またはこれらの誘導体など; 白金製剤、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、四硝酸トリプラチン、またはこれらの誘導体など; 代謝拮抗物質、例えば、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、カペシタビン、クラドリビン、クロファラビン、シスタルビン (*cystarbine*)、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキセート、ペメトレキセド、ペントスタチン、チオグアニン (*thioguanin*)、またはこれらの誘導体など; トポイソメラーゼ阻害剤、例えば、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン、エトポシド、テニポシド、ミトキサントロン、またはこれらの誘導体など; 有糸分裂阻害剤、例えば、バクリタキセル、ドセタキセル、イザベピロン (*izabepilone*)、ピンラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、ピノレルビン、エストラムスチン、またはこれらの誘導体などが挙げられる。

20

30

【0083】

細胞減少剤、例えば、細胞増殖を減少させるように作用する作用物質などは、当技術分野において知られており、広く使用されている。それらが分裂しているときにだけが細胞を死滅させる作用物質は、「細胞周期特異的」と呼ばれ、S期において作用する作用物質(例えば、トポイソメラーゼ阻害剤および代謝拮抗物質)を含む。

【0084】

トポイソメラーゼ (*topoisomerase*) 阻害剤は、トポイソメラーゼ酵素 (トポイソメラーゼIおよびII) の作用を妨げる薬物である。化学治療のプロセスの間、トポイソメラーゼ酵素は、複製に必要なDNA構造の操作を制御しており、よって細胞周期特異的である。トポイソメラーゼI阻害剤の例は、上記で列挙されたカンプトテカン (*camptothecin*) 類似体、イリノテカンおよびトポテカンを含む。トポイソメラーゼII阻害剤の例は、アムサクリン、エトポシド、エトポシドリン酸塩、およびテニポシドを含む。

40

【0085】

代謝拮抗物質は一般に、染色体複製に関与するプロセスをしばしば妨げる、通常の代謝基質の類似体である。これらの代謝拮抗物質は、周期中の非常に特殊な局面で細胞を攻撃

50

する。代謝拮抗物質は、葉酸拮抗薬、例えば、メトトレキサート；ピリミジン拮抗薬、例えば、5 - フルオロウラシル、フォクスウリジン (foxuridine)、シタラビン、カペシタビン、およびゲムシタビン；プリン拮抗薬、例えば、6 - メルカプトプリンおよび6 - チオグアニン；アデノシンデアミナーゼ阻害剤、例えば、クラドリビン、フルダラビン、ネララビンおよびペントスタチン；などを含む。

【0086】

植物アルカロイドは、ある特定の種類の植物から得られる。ピンカアルカロイドはニチニチソウ植物 (Catharanthus rosea) から作られる。タキサンは、タイハイヨウイチイ樹木 (イチイ属植物) の樹皮から作られる。ピンカアルカロイドおよびタキサンは、抗微小管剤としても知られている。ポドフィロトキシンは、メイアップル (ポドフィルム) 植物から得られる。カンプトテカン類似体は、アジアの「カンレンボク (キジュ)」 (Camptotheca acuminata) から得られる。ポドフィロトキシンおよびカンプトテカン類似体は、トポイソメラーゼ阻害剤にも分類される。植物アルカロイドは一般に、細胞周期特異的である。

10

【0087】

これらの作用物質の例としては、ピンカアルカロイド、例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびピノレルビン；タキサン、例えば、バクリタキセルおよびドセタキセル；ポドフィロトキシン、例えば、エトポシドおよびテニソピド (tenisopide)；ならびにカンプトテカン類似体、例えば、イリノテカンおよびトポテカンが挙げられる。

20

【0088】

本明細書で使用される場合、「内分泌療法」という用語は、内分泌療法のすべての方法、すなわち、ホルモンを追加、遮断または除去する処置を指す。ある特定の状態 (糖尿病または更年期障害など) では、ホルモンを投与して低いホルモンレベルを調整する。ある特定の状態では、ある特定のがん (前立腺および乳がん) の成長を緩徐にするまたは停止させるために、合成ホルモンまたは別の薬物を投与して体の天然のホルモンを遮断することができる。NCI Dictionary of Cancer Termsを参照されたい。

【0089】

本明細書で使用される場合、「免疫療法」という用語は、免疫系を刺激または抑制して体のがん、感染、および他の疾患と闘うのを助ける物質を使用する生物学的療法の種類を指す。いくつかの種類の免疫療法は、免疫系のある特定の細胞だけを標的化する。別の免疫療法は、全般的に免疫系に影響を及ぼす。免疫療法の非限定的な例としては、サイトカイン、ワクチン、カルメット - ゲラン菌 (BCG)、およびいくつかのモノクローナル抗体が挙げられる。NCI Dictionary of Cancer Termsを参照されたい。一部の実施形態では、免疫療法は、樹状細胞療法、抗体依存性療法、T細胞依存的療法、またはNK細胞依存的療法であってもよい。

30

【0090】

本明細書で使用される場合、「分子療法」という用語は、がん成長を進ませる特有の分子異常を中断することによってがんを処置するように設計された個別化療法を指す。阻害性またはアンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、任意のタイプの干渉RNA、ロッキング核酸 (LNA) など) などであるがこれらに限定されない薬物および/または分子剤を、特定のがんの発症、成長、および拡散の中心となる特定の生化学的経路を妨げるように設計された標的療法において使用することができる。

40

【0091】

本明細書で使用される場合、「放射線療法」という用語は、外照射放射線療法、密封放射線源療法 (sealed source radiation therapy)、および全身的放射性同位体療法を含む放射線療法のすべての方法を指す。一部の実施形態では、放射線を、腫瘍部位などの標的部位に局所的に集中させる。一部の実施形態では、放射線療法は、プロドラッグコンジュゲートの投与前に行われる。放射線療法を使用する任意の実

50

施形態では、放射線療法は、ガンナイフ放射線、サイバーナイフ放射線、および/または高密度焦点式超音波放射線を含み得る。

【0092】

「ファーストライン」または「セカンドライン」または「サードライン」という語句は、患者が受ける処置の順序を指す。ファーストライン療法レジメンは、最初に行われる処置であり、一方、セカンドまたはサードライン療法はそれぞれ、ファーストライン療法の後、またはセカンドライン療法の後に行われる。米国国立がん研究所は、ファーストライン療法を、「疾患または状態の最初の処置」と定義している。がん患者において、一次治療は、手術、化学療法、放射線療法、またはこれらの療法の組み合わせであり得る。ファーストライン療法は、当業者に「一次療法および一次治療」とも呼ばれている。www.cancer.govの米国国立がん研究所ウェブサイト（最終訪問日2016年5月6日）を参照されたい。典型的には、患者がファーストライン療法に対して陽性の臨床的または準臨床的反応を示さなかった、またはファーストライン療法が中止されたという理由から、患者はその次の化学療法レジメンを受ける。

10

【0093】

略語

以下の略語が、本開示の全体にわたって出現する。

【0094】

以下は本明細書で使用される略語の非限定的なリストであり、成長因子およびサイトカインに関して使用されるものとは無関係である。頭字語が因子を示し、イタリック体で示されている場合、これは、遺伝子を指す。標準フォントの場合、これは、その遺伝子によってコードされているタンパク質を示す。頭字語が細胞集団に関するものである場合、細胞が得られた種は、頭字語の前の小文字で示されている。例えば、m = マウスの（マウス）；r = ラット；h = ヒト。

20

【0095】

BMS、バイオマトリックス足場、細胞外マトリックス中の濃縮された組織特異的抽出物；Caco-2、Jorgen Fogh博士（Sloan-Kettering Cancer Institute、NYC、NY）によって確立された上皮結腸直腸-腺癌細胞株（これは、別個の条件下で、この細胞株が培養条件に応じて小腸様細胞か大腸（結腸）細胞かのいずれかに系統制限できるようにする腸管幹細胞特性を有する）；CD、共通の決定因子；CD34、造血幹/前駆体細胞抗原；CD45、大部分の造血細胞亜集団において見出される共通白血球抗原；CRC、結腸直腸がん；CYP、薬物代謝ならびに/またはコレステロール、ステロイドおよび脂質の合成に関連する多くの反応を触媒する、シトクロムP450モノオキシゲナーゼ；CK、サイトケラチン；CK7、胆管細胞に関連するサイトケラチン；CK8およびCK18、すべての上皮に関連するサイトケラチン；EpCAM、上皮細胞接着分子；FBS、ウシ胎児血清；GAG、グリコサミノグリカン、二量体（ウロン酸およびアミノ糖）のポリマーである糖鎖、それらの大部分が、シグナル伝達プロセスにおいてタンパク質と協調して多様な役割を果たす特定の硫酸化パターンを有する；HDL、高密度リポタンパク質；HDM、特定の細胞タイプの維持または分化に使用される無血清のホルモン添加限定培地（*hormonally defined medium*）；H&E、ヘマトキシリンおよびエオシン；HT-29、ある条件下では未分化細胞として挙動する一方、分化条件下では極性形態を有する細胞を生じる、結腸直腸腺癌細胞株、膜抗原の再分布および頂端刷子縁膜の発生によって特徴付けられる；KM、Kubota's Medium、内胚葉幹細胞用に設計された無血清培地であり、一部を変更すれば肝芽細胞などの幹細胞の成熟子孫または分化決定した前駆細胞（*committed progenitor*）にも使用することができる；LGR5、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体5、腸、肝臓および膵臓における重要な幹細胞マーカー；MMP、マトリックスメタロプロテイナーゼ（またはペプチダーゼ）；MMP2、マトリックスメタロプロテイナーゼ-2、72kDaのIV型コラゲナーゼまたはゼラチナーゼA（GELA）；92kDaのIV型コラゲナーゼまたはゼラチナ

30

40

50

ーゼ B (G E L B) としても知られている、M M P 9、マトリックスメタロペプチダーゼ 9 は、細胞外マトリックスの分解に関する亜鉛メタロプロテイナーゼファミリーの酵素のクラスであるマトリキシンである；P A S、過ヨウ素酸シッフ；S D C、デオキシコール酸ナトリウム；S E M、走査型電子顕微鏡；S W 4 8 0、転移巣（疾患：デュークス分類 B）から得られるヒト結腸直腸腺癌細胞株；T E M、透過型電子顕微鏡。

【 0 0 9 6 】

シグナル（成長因子、ホルモン、サイトカイン）に関する頭字語

B M P、骨形成タンパク質は、トランスフォーミング成長因子（ T G F - ）スーパーファミリーに属する多機能成長因子である；b F G F、塩基性線維芽細胞成長因子；E G F、上皮成長因子；E G F R、上皮成長因子受容体；F G F、線維芽細胞成長因子（例えば F G F - 4、F G F - 6、F G F - 7）；F G F - 4、線維芽細胞成長因子 - 4；F G F - 6、線維芽細胞成長因子 - 6；F G F - 7、線維芽細胞成長因子 - 7；G C S F、顆粒球コロニー刺激因子；G D N F、グリア由来神経栄養因子；G M - C S F、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；h G H、ヒト成長ホルモン；H G F、肝細胞成長因子；H B - E G F、ヘパリン結合上皮成長因子；I G F B P - 1、インスリン様成長因子結合タンパク質 1；I G F B P - 3、インスリン様成長因子結合タンパク質 3；I G F B P - 4、インスリン様成長因子結合タンパク質 4；I G F B P - 6、インスリン様成長因子結合タンパク質 6；I G F - I、インスリン様成長因子 I；I G F - 1 S R、インスリン様成長因子 I 受容体；I G F - I I、インスリン様成長因子 I I；I L、インターロイキン（例えば I L - 6、I L - 1 1）；M - C S F、マクロファージコロニー刺激因子；M - C S F R、マクロファージコロニー刺激因子受容体；N T - 3、ニューロトロフィン - 3；N T - 4、ニューロトロフィン - 4；P D G F R a、血小板由来成長因子受容体；P D G F R b、血小板由来成長因子受容体；P D G F - A A、血小板由来成長因子 A A；P D G F - A B、血小板由来成長因子 A B；P D G F - B B、血小板由来成長因子 B B；P I G F、ホスファチジルイノシトールグリカンアンカー生合成クラス F；S C F、間質細胞由来因子 - 1；S C F R、間質細胞由来因子受容体；T G F - 、トランスフォーミング成長因子；T G F - 、トランスフォーミング成長因子；T G F - 2、トランスフォーミング成長因子 2；T G F - 3、トランスフォーミング成長因子 3；V E G F、血管内皮成長因子；V E G F R 2、血管内皮成長因子受容体 2；V E G F R 3、血管内皮成長因子受容体 3；V E G F - D、血管内皮成長因子受容体 D。

10

20

30

【 0 0 9 7 】

本開示を実施するための方法

本発明の態様は、がんまたは腫瘍の診断および/または特徴付けに関連する方法、キット、および組成物に関する。本明細書でがんまたは腫瘍に関して記載されている実施形態のいずれにおいても、がんまたは腫瘍は悪性であってもよい。ある特定の実施形態では、がんまたは腫瘍は、それが特異的な組織に転移する可能性および/または本明細書で下記に記載されている 1 つもしくは複数のがん療法および/もしくは化学療法剤に反応するそのような転移の 1 つもしくは複数の反応性によって特徴付けることができる。

【 0 0 9 8 】

本明細書において開示されている方法実施形態は、1 つまたは複数のバイオマトリック足場に腫瘍またはがんの細胞を播種するステップを含む。

40

【 0 0 9 9 】

こうした方法実施形態の一部において、細胞は、（ 1 ）腫瘍生検材料のまたはがんもしくは腫瘍と診断された患者から採取されたサンプルの細胞、または（ 2 ）患者のものと同一がんまたは腫瘍の種類細胞株の細胞のものであってもよい。こうした方法実施形態の一部において、細胞は、成長中の細胞のコロニーを形成する能力に関して分析される。一部の実施形態では、コロニーは、バイオマトリック足場の基層上にある。こうした方法実施形態の一部において、細胞はコロニーを形成する。こうした方法実施形態の一部において、細胞は、成長中の細胞の 3 次元コロニーとなる能力に関して分析される。こうした方法実施形態の一部において、細胞は、成長中の細胞の 3 次元コロニーを形成する。こ

50

した方法実施形態の一部において、細胞は、それらの遺伝子発現能力またはタンパク質もしくは別の因子を分泌する能力に関して分析される。こうした遺伝子の非限定的な例として以下が挙げられる：多能性遺伝子（例えば、OCT4、SOX2、KLF4、KLF5、SALL4、NANOG、Bmi-1）、幹細胞遺伝子（例えば、EpCAM、LGR5/LGR6、CXCR4、ヒアルロン受容体をコードしている遺伝子のCD44ファミリーの多くのバリエーションのうちの一つまたは複数、多剤耐性遺伝子（例えば、mdr遺伝子ファミリー、P糖タンパク質）、細胞外マトリックス成分を溶解させる酵素（例えば、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、エラスターゼ、マトリックス分解性メタロプロテイナーゼ）をコードしている遺伝子；こうしたタンパク質の非限定的な例として以下が挙げられる：上記遺伝子によってコードされているタンパク質（例えば、CD44、P糖タンパク質、マトリックス分解酵素）；この分析に関連する別の因子の非限定的な例としては、エクソソーム産生、マイクロRNA、間葉系フィーダー細胞からのパラ分泌シグナル伝達からの質的または量的独立性が挙げられる。これらの方法実施形態の一部の実施形態では、細胞が一つまたは複数のバイオマトリックス足場に播種され付着したら、この分析が行われ得る。これらの方法実施形態の一部の実施形態では、細胞を、一つまたは複数のバイオマトリックス足場の組織特異的な形態の基層に付着させ得る。

10

【0100】

こうした方法実施形態の一部において、一つまたは複数のバイオマトリックス足場は、人体の一つまたは複数の所定の臓器にそれぞれ由来する。さらなる実施形態では、所定の臓器は、例えばその種類のがんまたは腫瘍の転移と関連することが既知である臓器を含むように、またはそのがんまたは腫瘍が認められた臓器を含むように、患者のがんまたは腫瘍の種類に基づいて選択される。すべての方法実施形態において、それぞれのバイオマトリックス足場は、その由来となった組織の生物学的様相を再現する。

20

【0101】

播種方法は、がんまたは腫瘍と診断された患者内で腫瘍が転移する可能性を判定するために任意に使用されてもよい。例えば、腫瘍またはがん細胞がバイオマトリックス足場上で成長中の細胞のコロニーを形成する場合、臓器への転移が予測され得る。予測された転移は、前記足場の由来となった臓器に位置しているとさらに判定され得る。よって、一部の実施形態では、一つまたは複数の所定の臓器にそれぞれ由来する一つまたは複数のバイオマトリックス足場上で細胞が成長中細胞のコロニーを形成する場合、それらの臓器への転移が *in vivo* で予測される。

30

【0102】

この播種方法を使用して、がんまたは腫瘍と診断された患者において腫瘍に適切な処置を決定することもできる。これは、腫瘍が転移する可能性を判定することに加えて、またはそれとは独立に行ってもよい。

【0103】

上記の開示された方法実施形態はいずれも、コロニーを、その組織像、エクソソーム産生、マイクロRNA産生、間葉系細胞との相互作用、および/または遺伝子発現プロファイルに基づいて特徴付けるステップをさらに含んでもよい。

【0104】

上記の開示された方法実施形態はいずれも、一つもしくは複数のがん療法および/もしくは化学療法剤に対する反応性に関してコロニーをスクリーニングするステップ、または一つもしくは複数のがん療法および/もしくは化学療法剤でコロニーを処置するステップをさらに含んでもよい。そのようながん療法および/または化学療法剤は、一回もしくは複数回の放射線療法、免疫療法、内分泌療法、分子療法、および/またはアントラサイクリン、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、もしくは有糸分裂阻害剤のうちの一つもしくは複数を含むが、これらに限定されない。そのようながん療法および/または化学療法剤は、任意に、患者のがんまたは腫瘍の種類に基づいて選択することができる。ある特定の実施形態では、臓器中での *in vivo* での一つまたは複数の療法および/または作用物質に対するがんまたは腫瘍の反応性は、その臓器のバイ

40

50

オマトリックス足場上に播種された場合の、1つまたは複数の療法または作用物質に対する前記がんまたは腫瘍細胞の反応性と相関し得る。

【0105】

本開示の態様はまた、人体の1つまたは複数の所定の臓器にそれぞれ由来する1つまたは複数のバイオマトリックス足場と、本明細書において上記で開示されている方法の1つまたは複数を行うための指示書とを含むキットにも関する。さらなる実施形態は、1つまたは複数のがん療法および/または化学療法剤；腫瘍生検材料またはがんもしくは腫瘍と診断された患者から採取されたサンプルの細胞を得るためのツールまたは指示書；特定のがんまたは腫瘍の種類、細胞株の細胞；ならびに/あるいは上記の開示されている方法を行うために必要とされる任意の試薬、培地、または別の成分をさらに含むキットを企図する。

10

【0106】

本開示のさらなる態様は、本明細書において上記で開示されている播種方法によって作製される、人体の1つまたは複数の所定の臓器に特異的な、人工的な腫瘍または転移モデルを企図する。

【0107】

実施例

以下の実施例は非限定的なものであり、本開示を実施する際の様々な場合において使用できる手順を例示するものである。加えて、下記の本明細書に開示されているすべての参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

20

【実施例1】

【0108】

バイオマトリックス足場の作製および特徴付け

すべての動物実験は、ノースカロライナ大学動物実験委員会 (University of North Carolina Institutional Animal Care and Use Committee) に定められたガイドラインに従った。

【0109】

組織脱細胞化方法、特に灌流プロトコールによって行われるものによって調製される細胞外マトリックス抽出物を使用することは、組織工学の分野での飛躍的進歩であった。脱細胞化プロトコールは、臓器または組織からその細胞を化学的に取り除き、*in vivo*での化学組成とほぼ同等の化学組成を有する細胞外マトリックス抽出物を残すものである。重要なことに、脱細胞化は、細胞外マトリックスの複雑な組成、さらには合成技術を使用して再現するのはほぼ不可能であろう、正常な臓器において認められるそれらの解剖学的特徴を保つ。出願人は、脱細胞化された組織からのマトリックス抽出物を使用して、がん「転移」を人工的に作製するための組織特異的な *in vitro* 培養プラットフォームを作ることができるという仮説を立てた (図1a)。以前の研究は、様々な方法を使用して、組織を脱細胞化することならびに肝臓および肺を含む複雑な臓器を人工的に作製することに成功してきたが、これらの方法を使用して細胞シグナル伝達分子がどの程度保存されるのかは、ほとんど不明のままである⁷。例外が1つあり、「バイオマトリックス足場」を調製するためのプロトコールは、生理的レベルの、肝臓組織において認められるすべての既知のシグナル伝達分子を保持することが示された^{1 2}。しかしながら、そのようなバイオマトリックス足場において保存されているシグナル伝達分子の組が組織特異的であるかどうかは不明であった。出願人は、組織のマトリックス成分の98%超を保持し、かつ生理的レベルのマトリックス結合成長因子およびサイトカインを保存する、バイオマトリックス足場 (BMS) を調製するためのプロトコールを利用した。概念実証として、出願人は、この培養プラットフォームを使用して転移CRC細胞を研究した。CRC患者において肝臓および肺が最も一般的な転移部位であることからして、出願人は、肝臓および肺転移を *in vitro* で人工的に作製することを目的とした。

30

40

【0110】

肝臓および肺の灌流に基づく脱細胞化によって調製されるバイオマトリックス足場

50

Sprague-Dawleyラット(雄、250~300g)を使用して、以前に確立されたプロトコルを使用して肝臓および肺バイオマトリックス足場を生成した。脱細胞化試薬を用いて灌流するために、門脈(肝臓BMS)または下大静脈(肺BMS)にカニューレ挿入することによって、バイオマトリックス足場(BMS)を調製した。血液が排出されるまで血管系を基礎培地(例えば無血清DMEM/F12)で灌流し、次いで36単位/Lのホスホリパーゼを含有する1%デオキシコール酸ナトリウム(SDC)250mLで灌流した。次に、臓器を無血清基礎培地ですすぎ、次いで、吸光度(OD280)でアセスメントしたタンパク質に関して灌流液が陰性になるまで、3.5MのNaCl(調製された基礎培地)で灌流した。最後に、BMSサンプルを基礎培地ですすぎ、急速凍結した。冷凍粉砕機(Spex Sample Prep 6770、Metuchen、NJ)を使用して、凍結したBMSサンプルを微粉砕して微粉末にした。処理したBMS粉末を-80℃で保存した。

【0111】

バイオマトリックス足場粉末でコートした組織培養プレートの調製

BMSサンプルを、4MのグアニジンHCl、50mMの酢酸ナトリウム(pH5.8)、および25mMのEDTAで構成され、プロテイナーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテルを含有する溶液中に溶解させた。次いでBCAアッセイを実施して全タンパク質濃度を決定した。BMSサンプルを含有する培地(DMEM/F12)を、組織培養プレートに、またはNunc Thermanoxカバーガラス(ThermoFisher Scientific、Waltham、MA)上に添加し、終夜乾燥させた。プレートを、100Gyの外部照射(Precision X-Ray, Inc、North Branford、CT)を使用して滅菌した。

【0112】

成長因子抗体アレイ

組織(肺、肝臓)およびそれらの組織のBMSサンプルを、RayBiotech(Norcross、GA)に送り、そこでそれら进行处理し成長因子アレイ分析に供した。詳細には、RayBio Human Growth Factor Antibody Array G-Series 1(Cat#AAH-GF-G1-8)によって、成長因子およびサイトカインの相対レベルを定量した。データは、正規化されたシグナル強度で表した。

【0113】

質量分析

肺BMS(n=4)および肝臓BMS(n=4)を微粉砕し、以前に記述されている22のようにタンパク質を抽出および精製した。各サンプル(50μg)を5mMのDTTで還元し、15mMのヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシン(Promega、Madison、WI)で37℃で終夜消化した。C18スピンカラム(Pierce)を使用してペプチドサンプルを脱塩した。QExactiv HF質量分析計(Thermo Scientific、Waltham、MA)に接続したEasy nLC 1000を用いたLC/MS/MSによってペプチドサンプル(1μg)を分析し、2時間の方法にわたって分離した。分離のための勾配は、250nL/minの流速で5~32%の移動相Bからなり、移動相Aは水中の0.1%ギ酸であり、移動相BはACN中の0.1%ギ酸からなっていた。QExactiv HFをデータ依存的に作動させ、上位15位までの強度の前駆体をその後の断片化のために選択した。前駆体スキャン(m/z400~1600)のための分解能は120,000に設定し、目標値は 3×10^6 イオンであった。MS/MSスキャン分解能は15,000に設定し、目標値は 5×10^4 イオンであった。正規化された衝突エネルギーは、HCDに関して27%に設定した。ペプチドマッチはプリファード(preferred)に設定し、電荷が不明な、または電荷状態が1および7以上である前駆体は除外した。

【0114】

生データファイルは、MaxQuant version 1.5.3.17を使用し

て処理し、MaxQuant内のAndromedaを使用して、UniProtラットデータベース(2016年12月ダウンロード、29,795エントリを含む)に対して検索をかけた。酵素特異性はトリプシンとし、最大で2個のミスクリーページサイト(missed cleavage site)を許容し、Cysのカルボアミドメチル化を固定修飾(fixed modification)として設定し、Metの酸化を可変修飾(variable modification)として設定した。1%の偽発見率(FDR)を使用してすべてのデータをフィルタリングした。剃刀+ユニークペプチド(unique peptide)および試験間のマッチ(1minのタイムウィンドウ)を使用したラベルフリー定量が可能であった。定量には、タンパク質1個当たり最低で3個のユニークペプチドが必要であった。欠測値が60%を超えるタンパク質は除去した。統計分析は、ANOVAを使用してPerseus version 1.5.6.0において実施し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。有意なタンパク質のzスコア正規化されたLFQ強度を使用した階層的クラスタリングを実施した。

10

【0115】

細胞培養

ヒト結腸直腸がん細胞株(HT-29、Caco2およびSW480)は、UNCのTissue Culture Facilityから取得した。ルシフェラーゼ発現細胞株であるHT-29-luc2は、Caliper Life Sciences(Hopkinton, MA)から購入した。細胞株はショートタンデムリピートを用いて確認し、マイコプラズマ汚染に関して試験した。HT-29、HT-29-luc2、およびSW480細胞は、10%ウシ胎児血清(Gibco)およびペニシリン/ストレプトマイシン(Mediatech, Manassas, VA)を添加したDMEM/F12(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA)中で培養した。Caco2細胞は、20%ウシ胎児血清(Gibco)およびペニシリン/ストレプトマイシン(Mediatech)を添加したDMEM/F12(Gibco)中で培養した。標準的な組織培養プレート、またはコラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)をコートした組織培養プレートにおいて細胞を継代した。

20

【0116】

細胞播種効率

CRC細胞を、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)をコートしたプレートにおいて播種した。24時間後に、培養物をPBSで洗浄し、500 μL のDNA溶解液中に溶解した。DNA濃度は、Qubit dsDNA BR Assay Kitを使用してアセスメントした。

30

【0117】

細胞成長速度

CRC細胞を、6ウェルプレートにおいてプラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、または肺BMS($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)上で成長させた。播種後の様々な時点で細胞を回収し、DNA溶解液に入れた。DNA濃度は、Qubit dsDNA BR Assay Kitを使用してアセスメントした。経時的な成長速度は、播種効率に基づいて標準化した。

40

【0118】

in vitroでの増殖およびアポトーシスのアセスメント

増殖アッセイのために、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、または肺BMS($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)上で成長させたCRC細胞を10 μM の5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)と一緒に4時間インキュベートした。次いで細胞をPBSで洗浄し、TrypLEを用いて処理して単一細胞にし、製造業者の使用説明書に従ってフローサイトメトリー用Click-iT Plus EdU Assay Kit(カタログ番号C10646)を使用してEdUについて染色した。次いで細胞を、10%FBSを含有するPBS中で3回洗浄し、フローサイトメトリー分析に出した。

【0119】

50

アポトーシスアッセイのために、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、または肺BMS ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 上で成長させたCRC細胞を回収し、処理して単一細胞にし、4%パラホルムアルデヒド中で室温で10分間、固定化した。細胞懸濁液を、Dakoブロック(cat)において終夜ブロッキングした。次いで細胞を、一次コンジュゲートした切断型カスパーゼ3 (1:100) で室温で2時間にわたって染色し、10%FBSを含有するPBSで3回洗浄し、フローサイトメトリー分析に出した。すべてのフローサイトメトリー分析は、Beckman Coulter CyAn ADPを使用して行い、ソフトウェアSummit 5.2を使用して分析した。

【0120】

アノキスアッセイ

プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMSまたは肺BMS上で成長させたCRC細胞を、Anchorage Resistance Plate (接着妨害プレート) (Cell Biolabs) または対照96ウェル細胞培養プレートに、 1×10^4 /ウェルで播種した。細胞を48時間培養させた。生細胞をカルセインAMで検出し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光発光を読み取った。

【0121】

浸潤アッセイ

無血清培地においてプラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、または肺BMS上で成長させたCRC細胞を、Matrigelでコートされたインサート (Corning) の上部チャンバー内に入れた。下部チャンバーには、10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F12が入っていた。16時間の培養後、非浸潤細胞をコットンスワブで除去し、膜の下部表面上の細胞を100%メタノールで固定化し、1%トルイジンブルーで染色した。倒立顕微鏡を用いて5つの視野で細胞を計数した。

【0122】

走査型電子顕微鏡 (SEM)

カバーガラスを、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMSまたは肺BMSでコートした。これらの基層上で成長させた培養物を、3%グルタルアルデヒドを含有する0.15Mのリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.4) 溶液中で、4で終夜、固定化した。サンプルをPBSで3回すすぎ、次いで、次第に濃縮されるエタノール溶液 (30%、50%、75% ~ 100%) 中で、それぞれ10分間ずつ、連続的にインキュベーションして脱水した。カバーガラスをSamdri-795臨界点乾燥器に移し、移行溶媒としてCO₂を用いて乾燥した (Tousimis Research Corporation、Rockville、MD)。次いで、両面炭素接着タブを有し、10nmの金パラジウム合金 (60Au:40Pd、Hummer X Sputter Coater、Anatech USA、Union City、CA) でスパッタコーティングされた13mmのアルミニウムサンプル台に、カバーガラスをのせた。5kV、作動距離5mm、および絞り10 μm で作動するZeiss Supra 25 FESEM (Carl Zeiss Microscopy、Pleasanton、CA) を用いて、画像を取得した。

【0123】

透過型電子顕微鏡 (TEM)

細胞コロニーを、3%グルタルアルデヒドを含有する0.15Mのリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.4) 溶液中で、室温で1時間、固定化した。次いでサンプルをPBSですすぎ、1%四酸化オスミウム / 1.25%フェロシアン化カリウム / 0.15M PBSで1時間、後固定した。後固定に続いて、サンプルを脱イオン水ですすぎ、次第に濃縮されるエタノール溶液 (30%、50%、75% ~ 100%) 中で連続的にインキュベーションして、それぞれ (30%、50%、75%、~100%) 10分間、脱水した。次いでサンプルを、プロピレンオキシド / Polybed 812エポキシ樹脂 (Polysciences, Inc.、Warrington、PA) の1:1混合物中で終夜、続いて100%樹脂で24時間、インキュベートした。次いでサンプルを新しいPol

10

20

30

40

50

ybed 812エポキシ樹脂中に置き、ダイヤモンドナイフおよびLeica Ultracut UCTマイクロトーム (Leica Microsystems) を使用して70nmで横方向に切断した。切片を銅メッシュグリッドに載せ、4%酢酸ウラニル水溶液およびReynoldのクエン酸鉛で染色した。LEO EM910透過型電子顕微鏡 (Carl Zeiss SMT, LLC) を使用して80kVでグリッドを観察した。Digital Micrograph 3.11.0ソフトウェア (Pleasanton, CA) とともにGatan Orius SC 1000 CCDカメラを使用して画像を取得した。

【0124】

組織学的検査

細胞コロニーを、4%パラホルムアルデヒド中で室温で1時間、固定化しパラフィン包埋し、4 μ mの切片に切断した。ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で切片を染色した。

【0125】

脾臓内注射

無胸腺Nu/Nuマウス (雄、8~10週齢) を、UNCの動物繁殖施設から得た。ケタミン (100mg/kg) およびデクスドミトール (1mg/kg) の腹腔内注射でマウスに麻酔をかけた。腹部の左側において切開を行って脾臓を露出させた。次いでマウス1匹当たり50 μ lのPBS懸濁液中5 \times 10⁶のHT-29またはHT-29-luc2細胞を脾臓内注射した。すべての動物実験は、UNC施設内動物実験委員会 (Animal Care and Use Committee) により承認された。

【0126】

遺伝子発現マイクロアレイ

製造業者の指示に従ってRNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して、プラスチック、Matrigel、および肝臓BMS上で成長させたHT-29細胞から全RNAを抽出した。RNAはまた、HT-29細胞の脾臓内注射の後に作製された肝臓転移からも単離した。各条件下で成長させた細胞の4つの生物学的反復 (biological replicate) を使用した。RNAの質は、Agilent Bioanalyzer 2100によって評価した。チャペルヒルのノースカロライナ大学のLineberger Comprehensive Cancer Center Genomics CoreにRNAサンプルを送った。Agilent SurePrint G3 Unrestricted Gene Expression 8x60K Microarray (ヒトG4858A) を使用してサンプルを分析した。ハイブリダイゼーションの前にcDNAをCy3-CTPで標識した。

【0127】

マイクロアレイデータ分析は、GeneSpring 12.6 GXソフトウェアを使用して行った。未加工のシグナル値を分位数正規化 (quantile normalized) し、フラグ値に基づいてプローブセットをフィルタリングした。正規化された強度値はユークリッド距離を使用した階層的クラスタリング分析を行ってエンティティおよびサンプルの両方を選別する。統計学的 (一元配置分散分析 $p < 0.05$) および変化倍率 (4) 閾値に基づいて、異なって発現される遺伝子を選択した。人工肝臓転移およびin vivo転移の両方において上方制御される遺伝子、遺伝子オンロジーを用いて分析した。データは、Gene Expression Omnibusデータベースに提出されている (アクセッション番号GSE76180)。

【0128】

リアルタイムPCR

RNeasyミニキット (Qiagen, Valencia, CA) を使用して、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、および肝臓BMS上で成長させたCRC細胞から全RNAを単離した。Quantitek cDNA合成キット (Qiagen) を使用して、全RNAをcDNAに逆転写した。Timp1転写産物の定量は、 - アクチ

10

20

30

40

50

ンをノーマライザーとして使用した 2^{-Ct} 法によって行った。Timp1遺伝子発現に使用したプライマーの配列は以下の通りであった：フォワードプライマー5'-AGACCTACACTGTTGGCTGTGAG-3'；リバースプライマー5'-GACTGGAAGCCCTTTTCAGAG-3'。

【0129】

薬物反応アッセイ

コラーゲン、Matrigel、肝臓BMSおよび肺BMS(100 μ g/cm²)でコートした96ウェルプレートにおいて、 2×10^4 細胞/ウェルでCRC細胞を播種した。播種の1日後、細胞を化学療法薬で24時間処置した。次いで化学療法薬を除去し、細胞は、標準的な培養培地中でさらに24時間、培養を続けた。CellTiter 96(登録商標)Aqueous One Solution Cell Proliferationアッセイキット(Promega, Madison, WI)を使用して、MTS[(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)]細胞増殖アッセイによって細胞生存可能性を決定した。各培養条件に対する処置反応を、未処理の培養物に対して標準化した。

【0130】

クローン原性アッセイ

各細胞株のコロニー形成率(plating efficiency)(PE)を決定した。プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS上で成長させた細胞を、0、2、4、6、および8Gyで照射した。照射後、100~250,000の範囲の密度で25mLフラスコ中に細胞をプレーティングした。細胞を14日間インキュベートし、固定化し、次いで、4%ホルムアルデヒド、80%メタノール、および0.25%クリスタルバイオレットで構成される溶液で染色した。30以上の細胞を含むコロニーだけを計数した。生存率(SF)は、式：(形成したコロニーの数)/(プレーティングした細胞の数)(コロニー形成率)を用いて計算した。SFは、対数目盛りで放射線量に対してプロットした。線形二次式 $SF = e^{(-D - D^2)}$ を使用して、Rパッケージ「CFAssay」を用いて生存曲線を作成した。

【0131】

転移可能性のin vivoアセスメント

プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、または肺BMS上で成長させたHT-29-luc2細胞をトリプシン処理し、回収し、処理して単一細胞懸濁液とした。低酸素細胞培養のために、37 $^{\circ}$ Cで1%O₂および5%CO₂を含む低酸素インキュベーターチャンパー中で24時間、HT-29-luc2細胞を培養した。細胞をPBS中に懸濁し、尾静脈注射(1×10^6 /マウス)によってまたは直接の肝臓注射(2×10^3 /マウス)によって、無胸腺Nu/Nuマウス(雄、8~10週齢)に投与した。IVISイメージングシステム(Caliper)を使用して、週に1回、生物発光を測定した。マウスをランダムに群に割り当てた。細胞注入および生物発光イメージングは、研究者らに対して割り当てが明らかにされた。統計分析から除外された動物はなかった。各時点でのルシフェラーゼ強度は、0日目でのそれぞれの強度値に対して正規化した。屠殺されたマウスから肺および肝臓を取り出し、ex vivo生物発光によって検査した。

【0132】

統計分析

GraphPad Prism 6(GraphPad, La Jolla, CA)またはR統計ソフトウェアのいずれかを使用して、データ分析を行った。一元配置分散分析、続いてTukey's Honestly Significant Difference事後検定によって、細胞成長速度、播種効率、MTS、フローサイトメトリー、アノキスアッセイ、浸潤アッセイおよびリアルタイムPCRによる結果を分析した。クローン原性アッセイでは、Rパッケージ「CFAssay」を使用して線形二次細胞生存曲線

を分析した。サンプルサイズを事前に決めるための統計学的方法は使用しなかった。2つの分散が等しいことを検定するためにF検定を使用した。0.05未満のP値を有意であるとみなした。

【0133】

データ利用可能性

マイクロアレイデータは、Gene Expression Omnibusにおいてこの試験に関するアクセッション番号で利用可能である：ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=sdmluyaqplgvтуz&acc=GSE76180

【0134】

考察

転移は、がん患者において罹患率および死亡率の主な原因であり、転移のバイオロジーを理解することは、がん治療における大きな改善をもたらす可能性がある。がん転移の特質の1つは臓器特異性である。どの種類のがんも、臓器が近接していることまたは血流に規定される部位であることによって完全に説明できない転移拡散の特有のパターンを有する。正常な組織微小環境が、転移の成長および発生を調節するのに重要な役割を果たすことは一般に受け入れられているが、この相互作用の根底にあるバイオロジーの理解は不十分である²。これは、主として、簡便で、がん転移における臓器特異性のバイオロジーを完全に再現する実験モデルがないためである。既存の*in vitro/ex vivo*モデル系は、臓器微小環境中に存在する成分が存在しないために、臓器特異性を有さない。コラーゲンおよびMatrigelを使用して部分的に3次元の(3D)培養基層を提供することができるが、これらの基層の組成は、*in vivo*での、転移が遭遇する組織特異的な微小環境とは大きく異なったものである。*in vivo*で転移を発症する遺伝子工学的に作製された動物モデルを使用して、組織特異的に転移がんを研究することができるが、それらのモデルは費用がかかり、かつ使いにくい。先の研究により転移の処置反応は転移部位間で異なり得ることが確定されたため、転移と、転移が存在する組織微小環境との間の相互作用の根底にあるバイオロジーを理解することは、転移がん患者のためのより有効ながん治療につながる可能性がある。

【0135】

したがって、がん転移の*in vivo*でのバイオロジーを再現できる*in vitro*モデルが強く必要とされている。そのようなモデルは、がん転移に対する有効な療法の開発を容易にすることができる。転移の処置反応は、転移部位間で異なることが知られており、また原発性腫瘍の処置反応とは異なり得ることを考えれば、このことは特に重要である²⁻⁵。したがって、本発明者らは、臓器特異性を有する新規な*in vitro*がん転移モデルを開発することを目的とした。

【0136】

臓器微小環境は、臓器特異的転移モデルの開発に組み込むための不可欠な構成要素であると仮定する。脱細胞化プロセスによって調製されたマトリックス抽出物が、複雑な臓器を生物工学的に作製するために利用されてきたということからして、既存のプロトコールのいずれかによって生成されるこれらのマトリックス抽出物は、がん転移を人工的に作製するための優れた基層をもたらすことを証明し得る⁶⁻⁸という学説を立てた(図1a)。しかしながら、化学組成に関してならびに機能的に組織特異性を保持する組織脱細胞化のための唯一の方法は、「バイオマトリックス」と称されるマトリックス抽出物である、RojkindおよびReidによって記載されているものである。

【0137】

臓器特異的バイオマトリックス足場は*in vivo*での生化学的環境を再現する

Rojkind-Reidプロトコールの大幅改良型が、Wangらによって開発され、組織のコラーゲンおよびコラーゲン関連マトリックス成分(例えば、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチン、プロテオグリカンなど)の98%超を保持する、「バイオマトリックス足場」と称されるマトリックス抽出物をもたらすことが示された。加えて、バイ

10

20

30

40

50

オマトリックス足場は、組織のマトリックス成分のいずれかと結合した、*in vivo*で認められるものとほぼ同等のレベルの、すべての既知のシグナル伝達分子（成長因子、サイトカイン）を含有することが示されている。マトリックス成分および結合したシグナルは、組織学的に正確な場所に保持されていることが示された。バイオマトリックス足場は、Wangらのプロトコルを使用してラット肝臓から調製した。同様のプロトコルを用いて、肺バイオマトリックス足場を調製した。

【0138】

脱細胞化試薬を注入するためにラットの下大静脈（IVC）にカニューレ挿入し、血管クリップを使用して上大静脈（SVC）をクランプした。流出用にラットの頸動脈に開口部を作った。ラット肺の色の変化（白色からほぼ透明まで）により、脱細胞化が成功するという予備的な徴候が得られた（図6a）。脱細胞化試薬を注入するために肝門脈にカニューレ挿入することによって、脱細胞化された肝臓BMSを調製した（図6b）。組織学的に、およびBMS材料の核酸含有量をアセスメントすることによって、完全な脱細胞化を裏付けた（補足図1a、b）。注目すべきことに、これらのBMSは、組織培養プレートを完全に被覆する、繊維状タンパク質および炭水化物の網目構造を天然に形成した（図1b）。

10

【0139】

肺BMSが、*in vivo*での肺微小環境内に存在するシグナル伝達分子を含有するかどうかをアセスメントするために、本発明者らは、半定量的ELISAを使用して、脱細胞化後に本発明者らの肝臓BMSが保持する成長因子およびサイトカインの相対的存在量を評価した。細胞外マトリックス結合シグナル伝達分子は肝臓脱細胞化後に保持されることを示す以前のデータ^{1,2}と一致して、肺バイオマトリックス足場は、ほぼ生理学的レベルにおいて分析された成長因子およびサイトカインのほとんどすべて（93%）を保持した（図1c）。これらのシグナル伝達分子の相対的存在量は、それらの組織特異的な性質と一致して、肝臓BMSと肺BMSとで変わることに留意されたい（図6c）。

20

【0140】

肝臓BMSと肺BMSとの間の存在する分子の差異をさらに評価するために、本発明者らは、質量分光分析を行った。細胞外マトリックス結合成長因子およびサイトカインと同様に、本発明者らは、細胞外マトリックス自体の相対組成もまた肝臓BMSと肺BMSとの間で異なることを見出した（図1d；図7）。

30

【0141】

CRC細胞株は*in vitro*で肝臓および肺「転移」を形成する

組織特異的なCRCがん転移を人工的に作製するために、本発明者らは、肝臓および肺BMSでコートした組織培養皿においてCRC細胞株（HT-29、SW480、およびCaco2）を培養した。興味深いことに、3つすべてのCRC細胞株が、タイトジャンクションを介して一緒に結合した腫瘍細胞で構成される3次元（3D）スフェロイドコロニーを、自然発生的に形成した（図2a；図7a、b）。これらの「転移」は規模が比較的大きく、最大で1ミリメートルの直径に達する。500マイクロメートルより大きい直径に達する腫瘍スフェロイドは、酸素および栄養素を一般に利用できないため、ならびに細胞毒性代謝産物の内部蓄積のために、壊死コアを含有する。この観察結果と一致して、BMS上で人工的に作製された転移もまた、*in vivo*転移において認められる低酸素および壊死領域と類似した壊死領域を含む（図7c）。

40

【0142】

本発明者らの人工転移の挙動を特徴付けるために、本発明者らは、肝臓および肺BMS上で成長させたCRC細胞の播種効率および成長速度を、プラスチック、コラーゲン、およびMatrigel上で成長させた細胞のものと比較した。出願人らは、プラスチック上で成長させた細胞と比較した場合に、CRC細胞はコラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMSにおいて播種効率の減少を示すことを見出した（図2b）。さらに、出願人らは、コラーゲン、肝臓BMS、および肺BMS上で成長させた細胞が、プラスチックおよびMatrigel上で成長させた細胞よりも成長が遅いことを見出した

50

(図2c)。人工転移において観察されるより遅い成長速度は、*in vivo*での転移がん細胞の挙動と一致する。

【0143】

次に出願人は、肝臓および肺の人工転移によって示された比較的遅い成長速度が、アポトーシス速度の増加または増殖速度の低下によるものであるかどうかを判定しようと試みた。異なる基層上で成長させたがん細胞におけるアポトーシスを特徴付けるために、出願人は、フローサイトメトリーを使用して、アポトーシスのマーカーである切断型カスパーゼ3の発現をアセスメントした。出願人は、すべての培養条件におけるCRC細胞が同等のアポトーシス速度を示すことを見出した(図9a)。異なる基層上で成長させたがん細胞の相対的増殖速度をアセスメントするために、本発明者は、EdU細胞増殖アッセイを行った。出願人は、細胞がS期に入るときにDNA中に組み込まれるチミジン類似体であるEdUと一緒に培養物を4時間インキュベートした。続いて、出願人は、フローサイトメトリーを使用して、S期を経た(EdU陽性)細胞の数を定量した。出願人は、肝臓および肺バイオマトリクス足場上で成長させた腫瘍細胞が、3つすべての細胞株にわたって、試験したすべての培養条件のうちで最も遅い増殖速度を示すことを見出した(図8b)。累積的に、これらのデータにより、BMS上に播種されたCRC細胞は、別の培養プラットフォームによって生成される培養物よりも*in vivo*転移と同等の、比較的大きなゆっくりと成長する培養物を作製することが示される。

10

【0144】

人工肝臓転移は*in vivo*で認められる転移と酷似している

20

BMSおよび従来基層上で成長させたがん細胞が共有する、*in vivo*転移との類似度をさらにアセスメントするために、出願人は組織病理学的分析を行った。プラスチック、コラーゲン、Matrigel、および肝臓バイオマトリクス上で成長させた細胞の組織学的検査を、ヌードマウスに存在する*in vivo*肝臓転移および転移性CRCがんを有する患者の肝臓転移と比較した。*in vivo*で認められる胃腸由来の肝臓転移の典型的な組織学的特徴は以下を含む：(1)印環細胞、(2)奇異な有糸分裂像、(3)壊死性破片(好酸球および核破片の細胞外蓄積)、(4)細胞の大きさおよび形状の多形性、ならびに(5)多核細胞。出願人は、HT-29、SW480、およびCaco2 CRC細胞から作製された人工肝臓転移においてこれらの特徴のすべてを特定することができた(図3a;図8)。対照的に、コラーゲンおよびMatrigel上で成長させたCRC細胞は、奇異な有糸分裂像および多核細胞を示しただけであり、標準的なプラスチック培養皿上で成長させたCRC細胞は、これらの組織学的特徴を1つも含まなかった(図3a;図8)。印環細胞は、*ex vivo*モデル系で報告されることがない、*in vivo*での病理所見である。これらのデータにより、人工転移は、*in vivo*肝臓転移において認められる同じ病理学的特徴を含むことが示される。

30

【0145】

【表 1】

		印環細胞	奇異な有糸分裂像	壊死性破片	多形性	多核細胞
HT-29	プラスチック		X			X
	コラーゲン		X			X
	Matrigel		X			X
	肝臓 μ マトリックス	X	X	X	X	X
	肺 μ マトリックス	X		X	X	X
SW480	プラスチック					X
	コラーゲン					X
	Matrigel					X
	肝臓 μ マトリックス	X	X	X	X	X
	肺 μ マトリックス	X		X	X	X
Caco2	プラスチック		X		X	
	コラーゲン		X		X	X
	Matrigel		X		X	
	肝臓 μ マトリックス	X	X	X		X
	肺 μ マトリックス	X	X	X		X

10

20

【0146】

異なる基層上で成長させたがん細胞と *in vivo* 転移とに共有されている組織学的特性の調査に加えて、出願人はまた、それらのそれぞれのトランスクリプトーム間の類似度を調べようと試みた。詳細には、出願人は、プラスチック、Matrigel、および肝臓 BMS 上で培養した HT-29 細胞の網羅的遺伝子発現プロファイル、HT-29 細胞の脾臓注射によって形成された *in vivo* 肝臓転移と比較した (図 9 a、b)。階層的クラスタリング分析により、本発明者らの人工肝臓転移の遺伝子発現シグネチャーは、プラスチックまたは Matrigel 上で成長させた HT-29 細胞よりも、*in vivo* 肝臓転移と同等であることが明らかとなった (図 3 b)。人工転移および Matrigel 上で成長させた CRC 細胞の遺伝子発現プロファイルを、プラスチック上で成長させた細胞と比較することによって、人工転移と *in vivo* 転移とに共有されている比較的高い類似度をさらにアセスメントした。

30

【0147】

プラスチック上で成長させた細胞と比較した場合、合計で 791 の遺伝子が、バイオ人工転移および *in vivo* 肝臓転移の両方において上方制御されることが観察された。これらの共通して上方制御される遺伝子の多くは、酸化ストレスおよび低酸素に対する生物学的反応に関与することが分かった。

【0148】

プラスチックおよび Matrigel 上で成長させた細胞と比較した場合、合計で 619 の遺伝子が、人工転移および *in vivo* 肝臓転移において個別的に上方制御されることが観察された (図 11 c)。共通して上方制御される遺伝子は、血管新生、細胞接着、および薬物代謝の機能に関連することが分かった (図 11 c)。

40

【0149】

出願人はまた、*in vivo* および人工肝臓 CRC 転移は、Matrigel およびプラスチック上で培養された CRC 細胞より高いレベルの Timp1 を発現することを観察した (補足図 5 d)。この所見は、CRC 患者の原発性腫瘍と比較して肝臓転移においてより高度な TIMP1 発現を示す以前の研究と一致する。まとめると、これらのデータにより、人工転移は、*in vivo* 転移を表現型および生物学的に厳密に模倣していることが示される。

【0150】

50

人工転移は *in vivo* での転移可能性の増加を示す

出願人らは、人工転移が共有する *in vivo* 転移との組織学的および分子類似性が、機能において、それぞれの *in vivo* での組織内で成長する能力の増加へと転換されるかどうかを判定しようと試みた。すなわち、出願人らは、BMSが組織特異的な微小環境を再現するなら、BMS上で成長させた細胞はそれらの対応する *in vivo* での微小環境において生存および成長することができるであろうと仮定した。例えば、肝臓BMS上で成長させた細胞は、肝臓組織においてより成長しやすいはずである。この仮説を試験するために、出願人らは、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMS、および肺BMS上で成長させたHT-29-Luc2細胞をホストの肝臓および肺に送達し、その後、生物発光イメージングを使用して、それらの *in vivo* で転移を形成する能力をアセスメントした(図4a、c; 図12)。人工肝臓転移が肝臓組織において成長する相対的能力を決定するために、出願人らは、直接の肝臓注射を使用して、異なる培養条件で成長させたCRC細胞を肝臓に送達し、人工肝臓転移から単離した細胞は、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、または肺BMS上で成長させた細胞よりも *in vivo* で肝臓転移をより形成可能であることを見出した(図4a、b、図11)。

10

【0151】

人工肺転移が肺組織において成長する相対的能力をアセスメントするために、本発明者らは、尾静脈注射を使用して、異なる基層上で成長させたCRC細胞を肺に送達した。出願人らは、肺BMSで成長させた細胞が、すべての従来の培養基層上で成長させた細胞よりも高い肺転移形成能力を示すことを見出した(図4c、d; 図12)。予想外に、出願人らは、肝臓BMS上で成長させた細胞は肺転移も形成できることを見出した。さらに、出願人らは、肝臓BMSからの細胞、およびより少ない程度であるが肺BMSが、尾静脈注射後に肝臓転移を形成することを見出した(図4a、b; 図12)。

20

【0152】

低酸素条件に曝露させたがん細胞は、生存およびアポトーシスを起こすことに対する耐性の向上を示し得る。人工転移によって示される肺転移可能性の増加が低酸素細胞の存在に起因するかどうかを判定するために、出願人らは、低酸素条件においてプラスチック上で成長させた細胞を、尾静脈注射を使用して肺に送達した。出願人らは、プラスチック上で成長させたCRC細胞の低酸素プレコンディショニングは、それらの肺転移形成能力を向上させないことを見出した(図13)。加えて、尾静脈注射を使用して送達された細胞は、アノキスを回避し、かつ肺組織にコロニー形成した後に肺転移を発症するはずである。重要なことに、出願人らは、肝臓および肺BMS上で成長させたHT-29細胞により示された肺転移可能性の増加は、アノキスに対する耐性の増加または浸潤能力の増強のいずれにも起因しないことを見出した(図14a、b)。まとめると、これらのデータにより、人工転移は、従来の基層上で成長させた培養物よりも、それらの対応する *in vivo* での微小環境においてより成長可能であることが示される。

30

【0153】

人工転移は臓器特異的な治療反応を示す

同一患者の異なる臓器における転移は、同じ治療レジメンに対して異なる反応をすることがあるため、組織特異的に転移を処置するために有効な処置レジメンの特定は、依然として興味深い活発な領域である。CRC細胞を成長させる基層が処置反応に影響を及ぼすかどうかを判定するために、本発明者らは、プラスチック、コラーゲン、Matrigel、肝臓BMSおよび肺BMS上で成長させたCRC細胞を、標準的なCRC化学療法レジメンならびに放射線療法で処置した。転移性CRCのために一般に使用される4つの化学療法処置レジメンを調査した：イリノテカン単独、イリノテカン+5-フルオロウラシル(5-FU)、オキサリプラチン単独、およびオキサリプラチン+5-FU。出願人らは、化学療法および放射線療法に対するCRC細胞株の反応は、それらの *in vitro* 微小環境に強く影響を受けることを見出した(図5a)。例えば、人工Caco2肺転移は一樣に、人工Caco2肝臓転移よりも、化学療法レジメンに対してより感受性であ

40

50

る(図5a)。加えて、出願人らは、放射線療法に対するCRC細胞培養物の反応が、それらの培養基層に依存的であることを見出した(図5b)。重要なことに、出願人らは、人工肝臓および肺転移の処置反応が異なることを観察した。これらの結果により、CRC細胞の処置反応は、それらが培養される細胞外マトリックスの臓器特異的な組成に影響を受けることが示される。

【0154】

転移の挙動は、それらが存在する組織特異的な微小環境に強い影響を受ける。この相互作用の重要性を認識していたことから、出願人らは、組織特異的に転移性疾患を研究するために、脱細胞化された臓器のマトリックス抽出物を使用して、新規な3D *in vitro* 培養プラットフォームを開発した。原理証明として、出願人らは、CRC細胞株から肝臓および肺転移を人工的に作製した。腫瘍微小環境を再構築するために共培養を使用する研究もあるが、このデータにより、出願人らは、無細胞の生化学的環境を再現することによって、組織学的特徴を有する転移および *in vivo* で転移巣において存在するものに類似した遺伝子発現プロファイルを人工的に作製することが可能であることが実証されている。例えば、出願人らは、人工肝臓転移において印環細胞を特定したが、この観察結果は、いずれの *ex vivo* がんモデル系においてもこれまで報告されたことがないものである。重要なことに、人工転移は、従来の培養基層上で成長させた細胞と比較した場合、それらのそれぞれの *in vivo* での組織特異的な微小環境において成長するようにより適合されていることが、出願人らにより示されている。人工肝臓転移が肺において転移を形成可能であることもまた出願人らにより観察された。この観察結果についての可能性がある解釈は、肺は一般に肝臓よりも「許容的な」環境であるというものの、または肝臓微小環境において成長させた腫瘍細胞は、それらの肺内で成長する能力を促進する特性を発達させるというもののいずれかである。

10

20

【0155】

このデータにより、標準的な処置レジメンに対するCRC細胞の治療反応は、*in vitro* でそれらが曝露される組織特異的な微小環境に依存することが実証される。肺BMSで成長させた細胞は一般に、肝臓BMS上で成長させた細胞よりも処置に対して感受性であることは興味深い。このデータは、肝臓および肺転移はともにこの疾患状況において一般的であるが、肝臓転移は転移性CRC患者における罹患率および死亡率の主な原因であるという臨床的観察結果と一致する。

30

【0156】

理論に拘束されるものではないが、*in vitro* で転移を人工的に作製できるこの培養プラットフォームは、組織特異的に転移がんのバイオロジーを研究するための強力なツールとなると出願人らは考える。そのような評価は新規な治療標的を明らかにし得るため、さらなる研究では、がん細胞挙動に影響を及ぼす特異的なECM成分を特定するであろう。このモデルはまた、転移の組織特異的な処置反応の研究にも有用である。注目すべきことに、このモデルは、転移性疾患のための新たに開発された治療薬を試験するための薬物スクリーニングアッセイに利用することができる。重要なことに、これは、臓器特異的に転移を処置するように設計された治療薬を特定することを目的とした、ハイスループットスクリーニングアッセイを可能にする唯一の系である。

40

【0157】

がん細胞と臓器特異的な環境との相互作用は、がん細胞が臓器にコロニー形成し、その後転移に成長する能力を調節するために重要な役割を果たすと考えられる(「種と土壌」説²)。微小環境である「土壌」の重要性を認識していたため、組織特異的なバイオマトリックス足場を使用し、*in vivo* 転移を挙動的に、組織学的に、および生物学的に厳密に模倣した。加えて、治療的処置に対する人工転移の反応は、腫瘍細胞が成長する臓器特異的なマトリックスの化学的性質に依存的であった。重要なことに、バイオマトリックス足場において細胞を培養することにより、がん細胞の転移可能性は増加し、組織特異的な組織コロニー形成傾向が付与され得る。これらの知見は、転移がん患者のための新規な予後および治療ストラテジーを開発する可能性を意味し、また、*ex vivo* で臓器

50

特異的な微小環境を再現する現在利用可能な唯一の培養系であるということを考えると、類がないものである。

【 0 1 5 8 】

参考文献

- 1 Fidler, I. J. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 70, 498-505, doi: doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700904.x (2002).
- 2 Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S. & Searson, P. C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. (Review). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4, 12, doi:doi:10.3389/fbioe.2016.00012 (2016). 10
- 3 Higashiyama, M. et al. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: In vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST). *Journal of Thoracic Disease* 4, 30-47, doi:doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2011.05.02 (2012).
- 4 Bandyopadhyay, A. et al. Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor. *Cancer research* 66, 6714-6721, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3565 (2006).
- 5 Higashiyama, M. et al. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: In vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST). *J Thorac Dis* 4, 30-47, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2011.05.02 (2012). 20
- 6 Badylak, S. F., Taylor, D. & Uygun, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. Review. *Annual Review of Biomedical Engineering* 13, 27-53, doi: doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124743 (2011).
- 7 Ott, H. C. et al. Perfusion-decellularize matrix using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine* 14, 213-221 (2008).
- 8 Baptista, P. M. et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 53, 604-617 (2011). 30
- 9 Uygun, B. et al. Organ re-engineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature Medicine* 16, 814-820 (2010).
- 10 Soto-Gutierrez, A. et al. Engineering of an hepatic organoid to develop liver assist devices. *Cell Transplantation* 19, 815-822, doi:doi: 10.3727/096368910X508933. (2010).
- 11 Petersen, T. H. et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 329 538-541, doi:doi: 10.1126/science.1189345. (2010).
- 12 Wang, Y. et al. Lineage restriction of hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* 53, 293-305 (2011). 40
- 13 Crapo, P. M., Gilbert, T. W. & Badylak, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32, 3233-3243, doi:doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057 (2011).
- 14 Flatmark, K., Maelandsmo, G. M., Martinsen, M., Rasmussen, H. & Fodstad, O. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *European Journal of Cancer* 40, 1593-1598, doi:doi:10.1016/j.ejca.2004.02.023 (2004).
- 15 Vinci, M. et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation 50

n. BMC Biology 10, 29, doi:doi: 10.1186/1741-7007-10-29. (2012).

16 Schelter, F. et al. Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10. *Clinical & experimental metastasis* 28, 793-802, doi:10.1007/s10585-011-9410-z (2011).

17 Weidle, U. H., Birzele, F. & Kruger, A. Molecular targets and pathways involved in liver metastasis of colorectal cancer. *Clinical & experimental metastasis* 32, 623-635, doi:10.1007/s10585-015-9732-3 (2015).

18 Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2, 563-572, doi:10.1038/nrc865 (2002).

19 Ring, B. Z. & Ross, D. T. Predicting the sites of metastases. *Genome Biol* 6, doi:Artn 24110.1186/Gb-2005-6-12-241 (2005).

20 Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews-Cancer* 3, 1-7 (2002).

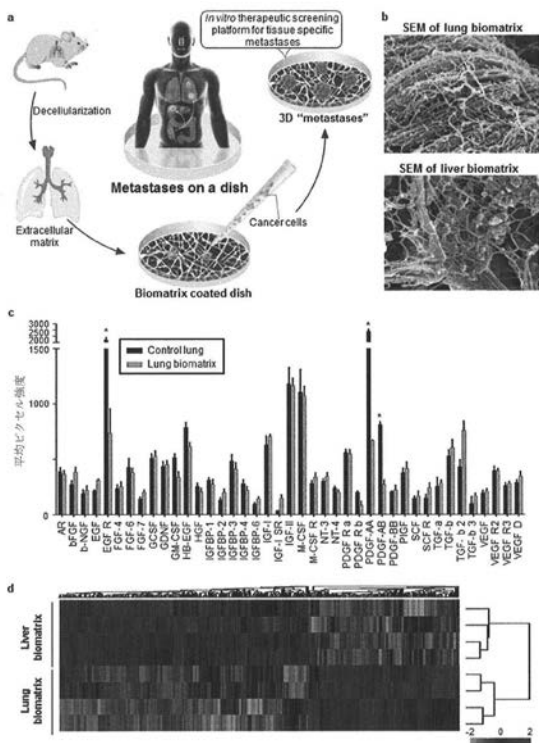
21 Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S. & Searson, P. C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 4, 12, doi:10.3389/fbioe.2016.00012 (2016).

22 Klaas, M. et al. The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Sci Rep-Uk* 6, doi:Artn 27398 10.1038/Srep27398 (2016).

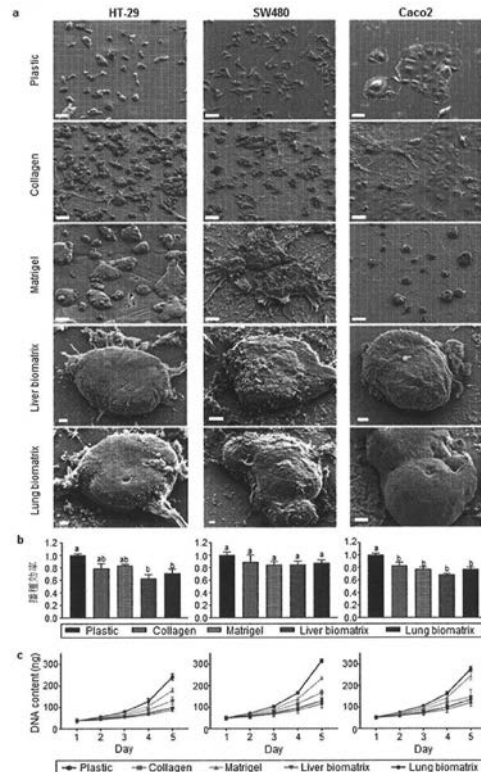
10

20

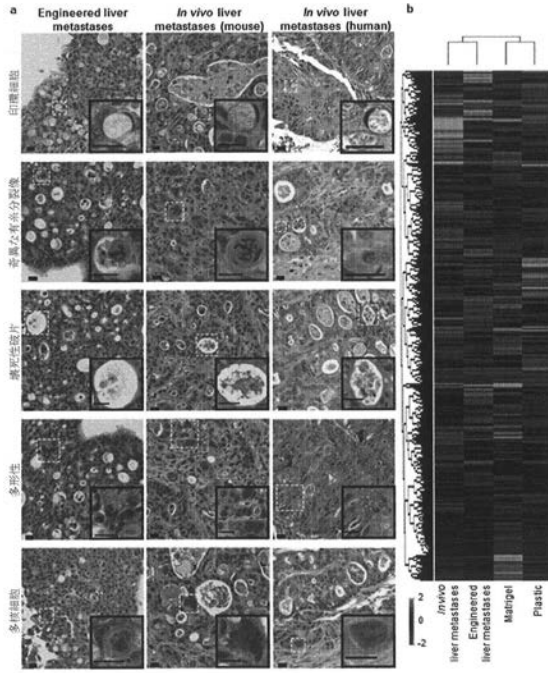
【 図 1 】



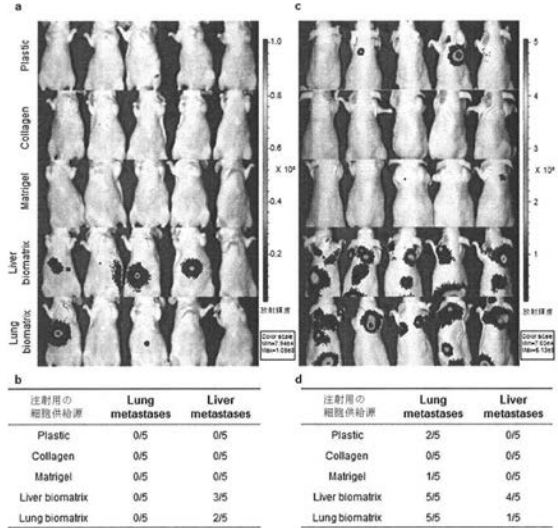
【 図 2 】



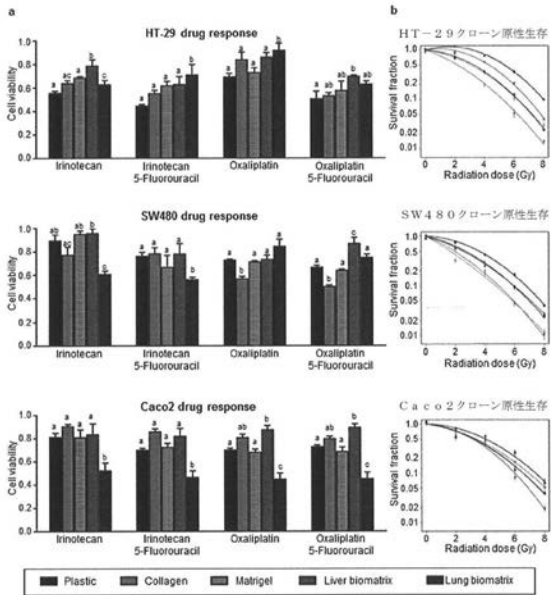
【 図 3 】



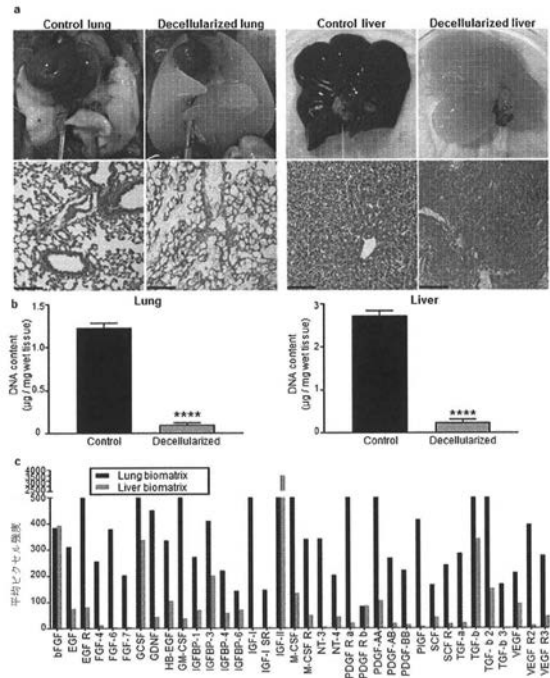
【 図 4 】



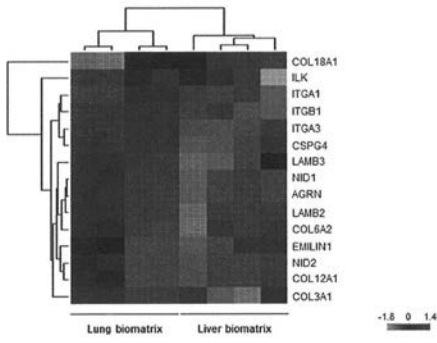
【 図 5 】



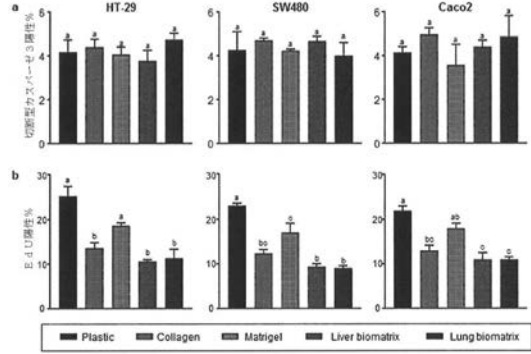
【 図 6 】



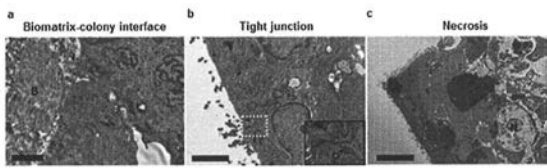
【 図 7 】



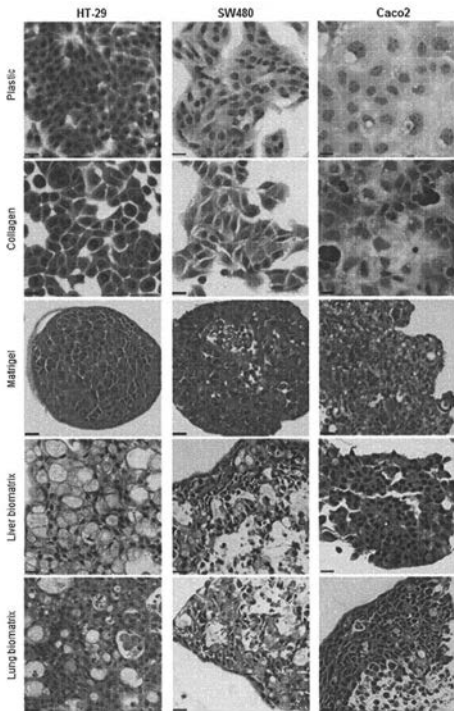
【 図 9 】



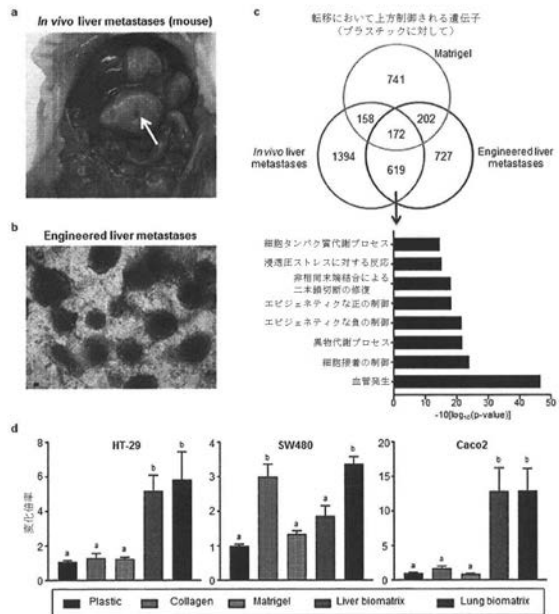
【 図 8 】



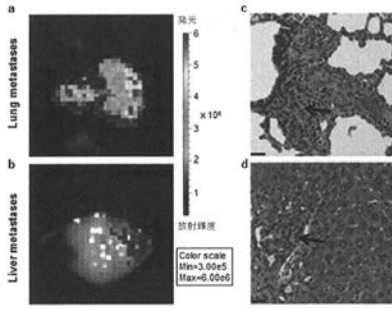
【 図 10 】



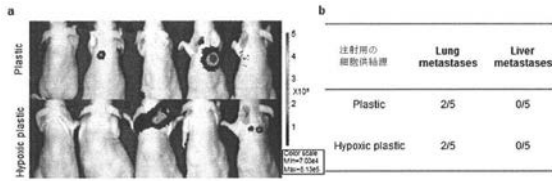
【 図 11 】



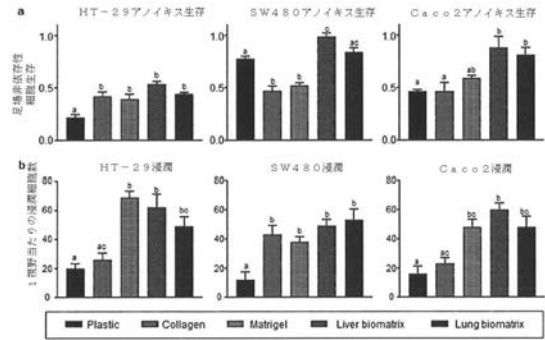
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2019528682000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/041500
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 35/12; C12Q 1/00; G01N 33/00; G01N 33/574 (2017.01) CPC - A61K 35/12; C12M 25/14; C12N 2533/54; C12N 2533/90; C12Q 1/00; G01N 33/5011; G01N 2500/10 (2017.08)		
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 USPC - 424/484; 424/520; 435/4; 435/325; 435/375; 435/395 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0195811 A1 (WANG et al) 01 August 2013 (01.08.2013) entire document	1-13, 15-18
Y		14
Y	US 2008/0255066 A1 (KOROPATNICK et al) 16 October 2008 (16.10.2008) entire document	14
A	WQ 2014/140933 A2 (FUNDACIO PRIVADA INSTITUT DE RECERCA BIOMEDICA et al) 18 September 2014 (18.09.2014) entire document	1-18
A	US 2013/0344490 A1 (KIM) 26 December 2013 (26.12.2013) entire document	1-18
A	US 2013/0196349 A1 (MARTIN et al) 01 August 2013 (01.08.2013) entire document	1-18
A	US 2007/0283453 A1 (RODRIGUEZ CIMADEVILLA et al) 06 December 2007 (06.12.2007) entire document	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "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 25 September 2017		Date of mailing of the international search report 18 OCT 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7714

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 7
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	Z
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, 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, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 ワン, アンドリュー ジュアン

アメリカ合衆国 2 7 7 1 3 ノース カロライナ州, ダーラム, ターナー リッジ ロード 1 3 6

(72)発明者 ティエン, シー

アメリカ合衆国 2 7 5 9 9 ノース カロライナ州, チャペル ヒル, メイソン ファーム ロード 1 2 5, マルシコ ホール 2 2 3 6

(72)発明者 リード, ローラ エム.

アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノース カロライナ州, チャペル ヒル, スウィーテン クリーク ロード 3 6 2 1

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 FA16 FA19 FB02 FB04

4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QR72 QR77 QX01 QX02

4B065 AA90X AC12 AC20 BC41 CA46

4C084 AA13 AA17 NA05 ZB021 ZB022 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZC022

4C085 AA13 AA14 BB01 CC23 EE01

4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA05 ZB26

4C087 AA01 BB37 CA04 NA05 ZB26

专利名称(译)	用于癌症诊断和建模的生物基质支架		
公开(公告)号	JP2019528682A	公开(公告)日	2019-10-17
申请号	JP2019500616	申请日	2017-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校		
申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学教堂山分校		
发明人	ワン,アンドリュー ジュアン テイエン,シー リード,ローラ エム.		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/53 C12N5/09 C12N15/113 A61P35/00 A61P37/04 A61K45/00 A61K48/00 A61K35/15 A61K35/17 A61K31/7088 A61K39/395		
CPC分类号	A61K35/00 A61P35/00 A61P35/04 A61K35/12 G01N33/5011 G01N33/5088 G01N2800/52 C12N5/0068 G01N33/5005 G01N2800/50 A61K45/06 C12N5/0693 C12N2533/54 C12N2533/90 G01N33/574 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/48.M G01N33/53.M C12N5/09 C12N15/113.Z A61P35/00 A61P37/04 A61K45/00 A61K48/00 A61K35/15.Z A61K35/17.Z A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB02 2G045/FB04 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AC12 4B065/AC20 4B065/BC41 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB021 4C084/ZB022 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/BB37 4C087/CA04 4C087/NA05 4C087/ZB26		
代理人(译)	松任谷裕子 森田 裕 Nobuto 滤纸冲		
优先权	62/361306 2016-07-12 US 62/460056 2017-02-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

人类结直肠癌细胞在肝和肺生物基质支架基质上的行为证明了器官特异性，这是一种通过新型脱细胞策略产生的器官特异性基质提取物 本文描述了模仿其生物学方面的癌症转移的体外模型。肿瘤细胞自发形成集落，模仿组织学，生物学，遗传和其他表型特征的体内转移。不希望受到理论的束缚，据信已经证明肿瘤对放射或化学治疗剂的反应取决于所用的基质。因此，据信支架为癌症研究和诊断提供了强大的工具。[选型图]图1

Figure 1

