

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-198033

(P2016-198033A)

(43) 公開日 平成28年12月1日(2016.12.1)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
<b>C 12 N 5/078</b> (2010.01)	C 12 N 5/00	202 J	4 B 065	
<b>C 12 N 5/071</b> (2010.01)	C 12 N 5/00	202 A	4 C 087	
<b>C 12 N 5/10</b> (2006.01)	C 12 N 5/00	102		
A 61 K 35/17 (2015.01)	A 61 K 35/17	Z		
A 61 K 35/38 (2015.01)	A 61 K 35/38			

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-79953 (P2015-79953)	(71) 出願人	504179255
(22) 出願日	平成27年4月9日 (2015.4.9)		国立大学法人 東京医科歯科大学

(出願人による申告) 平成26年度、厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業）、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
(74) 代理人	100188352 弁理士 松田 一弘
(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真
(74) 代理人	100150902 弁理士 山内 正子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法

## (57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法や、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法や、該製造方法により製造される、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド等を提供することにある。

【解決手段】(A) 単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程A：及び、(B) 前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程B：を含むことを特徴とする。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(A) 単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程 A：及び、

(B) 前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程 B：

を含むことを特徴とする、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法。

**【請求項 2】**

(A) 単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程 A：及び、

(B) 前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程 B：

を含むことを特徴とする、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法。

**【請求項 3】**

腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、IL-2、IL-7 及び IL-15 から選択される 1 種又は 2 種以上を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

腸陰窩オルガノイドが小腸陰窩オルガノイドである場合は、小腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、分裂促進増殖因子、Wnt アゴニスト及び BMP 阻害物質を含む培養液であり、腸陰窩オルガノイドが大腸陰窩オルガノイドである場合は、大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、血清アルブミン、Wnt3a、及び、R-スpongin 1 を含有し、かつ、血清を含有しない培養液であることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5】**

分裂促進増殖因子が EGF であり、Wnt アゴニストが R-スpongin 1 及び / 又は Wnt-3a であり、BMP 阻害物質が Noggin であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、上皮細胞増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、及び、Noggin からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上をさらに含有することを特徴とする請求項 4 又は 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

腸陰窩オルガノイドが小腸陰窩オルガノイドである場合は、細胞外マトリクスが、マトリゲルであり、腸陰窩オルガノイドが大腸陰窩オルガノイドである場合は、細胞外マトリクスがコラーゲンであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8】**

請求項 2～7 のいずれかに記載の製造方法により製造される、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法や、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法や、該製造方法により製造される、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド等に関する。

**【背景技術】****【0002】**

腸内において、最も内側の表面を覆う上皮層は、物質通過の部位としてだけでなく、宿主防御の最前線を構成する免疫応答の活性部位としても機能する。上皮は、陰窩上皮構造

10

20

30

40

50

の底部に存在する成人幹細胞から生じる異なる種類の腸上皮細胞（IEC）から構成されている。腸上皮組織には、異なる系統の細胞の豊富な集団である、腸上皮間リンパ球（IEL）も存在している。IELは、例えば小腸で、IEC 5～10個あたり、IEL 1個の密度で分散しており、IECの基底側の表面と密接に接触している。IELは、不均一な（heterogeneous）T細胞であり、他の末梢T細胞区画よりも多くのd+T細胞レセプター（TCR）T細胞を含んでいる。IELは、それらの表面マーカー発現に基づいて、タイプaとタイプbのサブセットに分類され、TIELは、タイプbのIELの主要な分画を構成する。TIELは、上皮バリア機能（非特許文献1及び2）及び粘膜恒常性（非特許文献3）において重要な役割を有することが知られている。TIELは、不均一な集団を依然として代表しているものの、宿主防御機構にも貢献している（非特許文献4）。 10

#### 【0003】

IELは、単離されると、アポトーシスに対する感受性が非常に高くなり（非特許文献5）、それまでの通常のインビトロ培養法では2～3日間くらいしか維持することができなかったため、IELの機能に関するインビトロ研究は、長い間妨げられていた。そこで、IELをインビトロで維持・増殖できる方法の開発が試みられてきた。例えば、前述の非特許文献5には、単離されたIELをインビトロで培養する際の培養液に、IL-2又はIL-15を添加して培養を行ったところ、IL-15を添加した場合の方が、より多くのIELが得られた旨が記載されている。さらに非特許文献5には、単離されたIELを、IL-15を添加した培養液で培養したところ、該IELが6日目まで増殖した旨が記載されている（非特許文献5の図5A）。しかし、培養から6日目を超えると、生きたIEL数は減少すると共に（非特許文献5の図5A）、アポトーシス率（%）はさらに高くなることから（非特許文献5の図5C）、その後は生きたIEL数が急速に低下していくことが予想される点で、まだ十分実用的とは言えなかつた。また、非特許文献5の方法では、IELは増殖させることができるもの、IELは増殖させることができない（非特許文献5の図1B）。加えて、IELの遊走のインビオ解析ではIELが腸上皮間などを活発に遊走していることが知られているところ（非特許文献6）、非特許文献5の方法で増殖して得られたIELは、そのような活発な遊走を示さないと考えられる。一方、例えば、非特許文献7には、マウス由来の単離IELを、マウス角化細胞株と共に培養することによって、該IELを維持する方法が開示されている。しかし、非特許文献7の方法では、IELを維持できるのはせいぜいDay 6くらいまでであり、また、IELを増殖させることもできていない（非特許文献7の図4等）。また、非特許文献7では、マウス由来の単離IELをマウス腸上皮細胞株と共に培養したり、IL-2、IL-7及びIL-15を含有する上皮細胞培養液でマウス由来IELを培養する等しているが、いずれの培養でも、IELを7日以上維持できていはない。このように、非特許文献7の方法では、実用レベルでIELを維持・増殖することはできなかつた。 20

#### 【0004】

一方、近年の技術の進展により、小腸及び大腸の上皮幹細胞の長期培養が可能になった（非特許文献8～10及び特許文献1及び2）。例えば、かかる技術により、マウス小腸のIECは、絨毛様区画により並んだ中央内腔（central lumen）を取り囲む陰窩様隆起領域を含む三次元腸内オルガノイドとして、ほぼ永遠に増殖させることができる（非特許文献8）。この方法により増殖したIECは、同系マウスに戻し移植したときに、通常の小腸上皮を再構成することができる事が示され、このことから、かかる培養工程が小腸上皮細胞本来の特徴の維持に有害でないことが示された（非特許文献11）。 40

#### 【0005】

また、前述のように小腸陰窩オルガノイドや大腸陰窩オルガノイドは知られていたが、これらの腸陰窩オルガノイドをIELの維持や増殖に利用することや、IELが増加した腸陰窩オルガノイドについては、これまでに報告はなされていなかつた。

#### 【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2012-254081号公報

【特許文献2】国際公開第2013/061608号パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Boismenu, R., and W.L. Havran. 1994. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* 266: 1253-1255

【非特許文献2】Chen, Y., K. Chou, E. Fuchs, W.L. Havran, and R. Boismenu. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14338-14343

【非特許文献3】Ismail, A.S., C.L. Behrendt, and L.V. Hooper. 2009. Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* 182:3047-3054

【非特許文献4】Muller, S., M. Buhler-Jungo, and C. Mueller. 2000. Intestinal intraepithelial lymphocytes exert potent protective cytotoxic activity during an acute virus infection. *J Immunol* 164:1986-1994

【非特許文献5】Chu, C.L., S.S. Chen, T.S. Wu, S.C. Kuo, and N.S. Liao. 1999. Differential effects of IL-2 and IL-15 on the death and survival of activated TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 162:1896-1903

【非特許文献6】Edelblum, K.L., L. Shen, C.R. Weber, A.M. Marchiando, B.S. Clay, Y. Wang, I. Prinz, B. Malissen, A.I. Sperling, and J.R. Turner. 2012. Dynamic migration of intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7097-7102

【非特許文献7】Chennupati, Y., T. Worbs, X. Liu, F.H. Malinarich, S. Schmitz, J.D. Haas, B. Malissen, R. Forster, and I. Prinz. 2010. Intra- and intercompartmental movement of gammadelta T cells: intestinal intraepithelial and peripheral gammadelta T cells represent exclusive nonoverlapping populations with distinct migration characteristics. *J Immunol* 185:5160-5168

【非特許文献8】Sato, T., R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, and H. Clevers. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262-265

【非特許文献9】Sato, T., D.E. Stange, M. Ferrante, R.G. Vries, J.H. Van Es, S. Van den Brink, W.J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P.D. Siersema, and H. Clevers. 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141:1762-1772

【非特許文献10】Yui, S., T. Nakamura, T. Sato, Y. Nemoto, T. Mizutani, X. Zeng, S. Ichinose, T. Nagaishi, R. Okamoto, K. Tsuchiya, H. Clevers, and M. Watanabe. 2012. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med* 18:618-623

【非特許文献11】Fukuda, M., T. Mizutani, W. Mochizuki, T. Matsumoto, K. Nozaki, Y. Sakamaki, S. Ichinose, Y. Okada, T. Tanaka, M. Watanabe, and T. Nakamura. 2014. Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev* 28:1752-1757

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法や、腸上皮間リンパ

10

20

30

40

50

球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法や、該製造方法により製造される、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド等を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

背景技術に記載されているように、単離されたIELをインビトロで維持・増殖させる（維持及び／又は増殖させる）方法には、不十分な点があった。本発明者らは、上記の背景技術の状況下で鋭意研究を行った結果、以下の（H）～（L）などの知見を見いだし、本発明を完成させるにいたった。

（H）単離したIELを、小腸陰窩オルガノイドと共に細胞外マトリクスに包埋し、次いで、該小腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で共培養すると、IL-2やIL-7やIL-15を用いない従来の方法と比較して、IELをより長い期間維持することができる。かかる共培養において、培養液中にIL-7及びIL-15のいずれかを添加すると、IL-2やIL-7やIL-15を用いない従来の方法と比較して、IELをより長い期間維持する、又は、IELをより多く増殖させることができること。特に、かかる共培養において、培養液中にIL-2（好ましくはIL-2、IL-7及びIL-15のすべて）を添加すると、IL-2やIL-7やIL-15を用いる従来の方法と比較しても、IELをより長い期間維持する、又は、IELをより多く増殖させることができること。

（I）上記（H）の共培養方法は、共培養の始めに用いたIELと同様の多様性（　型と　型の割合など）をおおむね維持しつつ、IELを維持及び／又は増殖させることができること。

（J）単離したIELを、大腸陰窩オルガノイドと共に細胞外マトリクスに包埋し、次いで、該大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液（但し、IL-2、IL-7及びIL-15を含む）中で共培養すると、IELの増加の程度は小腸陰窩オルガノイドと共培養した場合と比較して若干劣るもの、依然として、IELを培養・維持するための優れた方法であること。

（K）上記（H）の共培養方法により得られたIELについてイメージング解析を行ったところ、IELの遊走のインビオ解析に関する非特許文献6に報告されていたように、活発な遊走を示したこと。すなわち、上記（H）の共培養方法によれば、従来の方法により得られたIELよりも、インビオにおけるIELにより近い動態を示すIELを維持・増殖させることができること。

（L）上記（H）や（J）の共培養方法によれば、IELが増加した小腸陰窩オルガノイドや大腸陰窩オルガノイドを製造することができること。

【0010】

すなわち、本発明は、

（1）（A）単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程A：及び、（B）前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程B：を含むことを特徴とする、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法や、

（2）（A）単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程A：及び、（B）前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程B：を含むことを特徴とする、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法や、

（3）腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、IL-2、IL-7及びIL-15から選択される1種又は2種以上を含む、上記（1）又は（2）に記載の方法や、

（4）腸陰窩オルガノイドが小腸陰窩オルガノイドである場合は、小腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、分裂促進増殖因子、Wntアゴニスト及びBMP阻害物質を含む培養液であり、腸陰窩オルガノイドが大腸陰窩オルガノイドである場合は、大腸陰窩オル

10

20

30

40

50

ガノイドを増殖し得る培養液が、血清アルブミン、Wnt3a、及び、R-スpongin 1を含有し、かつ、血清を含有しない培養液であることを特徴とする、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法や、

(5) 分裂促進増殖因子がEGFであり、WntアゴニストがR-スpongin 1及び/又はWnt-3aであり、BMP阻害物質がNogginであることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の方法や、

(6) 大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液が、上皮細胞増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、及び、Nogginからなる群から選択される1種又は2種以上をさらに含有することを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の方法や、

(7) 腸陰窩オルガノイドが小腸陰窩オルガノイドである場合は、細胞外マトリクスが、マトリゲルであり、腸陰窩オルガノイドが大腸陰窩オルガノイドである場合は、細胞外マトリクスがコラーゲンであることを特徴とする上記(1)～(6)のいずれかに記載の方法や、

(8) 上記(2)～(7)のいずれかに記載の製造方法により製造される、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドに関する。

#### 【発明の効果】

#### 【0011】

本発明によれば、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させることができる。本発明の方法は、L-2やIL-7やIL-15を用いない従来の方法又はL-2やIL-7やIL-15を用いる従来の方法と比較して、IELをより長期間維持すること又はIELをより多く増殖させることができる。また、本発明によれば、IELだけでなく、IELも増殖させることができる。さらに、本発明によれば、IELが増加した腸陰窩オルガノイドを製造することができる。かかる腸陰窩オルガノイドは、腸上皮間リンパ球の運動性に与える影響を評価する方法に利用することができる。本発明によれば、従来のインビトロ培養法で維持・増殖させるよりも、インビボにおけるIELにより近い動態を示すIELを維持・増殖させることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】図1Aには、小腸陰窩オルガノイドの培養後1日目におけるCdhl1(カドヘリン)とCD3(上皮間リンパ球[IEL; Intraepithelial Lymphocytes])のz軸スライス蛍光画像3枚を示す。スケールバーは50μmを示す。図1Bの上段には、IELを小腸陰窩オルガノイドと共に培養後3日目におけるCD3(IEL)とDAPI(細胞核)のz軸スライス蛍光画像3枚を示し、図1Bの下段には、IELを小腸陰窩オルガノイドと共に培養後3日目におけるEGFP(IEL)とDAPI(細胞核)のz軸スライス蛍光画像3枚を示す。なお、図1Bの上段のパネルとその真下の下段のパネルは、同一サンプルの同一のz軸スライス画像において、取得する蛍光シグナルのみが異なる。また、図1A及びB中の蛍光画像における矢頭は、小腸陰窩オルガノイドに組み込まれたIELを示し、図1B中の蛍光画像における矢印は、小腸陰窩オルガノイドの外側に存在するIELを示す。スケールバーは50μmを示す。

【図2】図2Aの上段には、IELを、IL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後1日目、3日目、及び7日目におけるEGFP(IEL)の蛍光画像を示し、図2Aの中段には、図2Aの上段の蛍光画像と、それに対応する位相差画像(PC)とを重ね合わせた画像を示し、図2Aの下段には、図2Aの中段の画像における点線で囲った領域の拡大画像を示す。図2Bの上段には、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後7日目におけるCD3(IEL)とDAPI(細胞核)のz軸スライス蛍光画像を示し、図2Bの下段には、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後7日目におけるEGFP(IEL)とDAPI(細胞核)のz軸スライス蛍光画像3枚を示す。なお、図2Bの上段のパネルとその真下の下段のパネルは、同一サンプルの同一のz軸スライス画像において、取得する蛍光シグナルのみが異なる。また、図2Cの左上に

は、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後14日目におけるEGFP(IEL)の蛍光画像を示し、図2Cの右上には、左上図における点線で囲った領域の拡大画像を示し、図2Cの左下には、左上図に位相差画像(PC)を重ね合わせた画像を示し、図2Cの右下には、左下図における点線で囲った領域の拡大画像を示す。

【図3】図3Aは、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後1日目、7日目、及び14日目におけるIEL数を測定した結果を示す図である。棒グラフは、平均値±標準偏差(SEM)で表す。図3Bは、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後1日目及び7日目におけるTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団の比率を測定した結果を示す図である。図3Cは、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後1日目及び7日目におけるTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団について、Ki-67の発現レベルを解析した結果を示す図である。図3Dは、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後14日目におけるTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団の比率を測定した結果を示す図である。図3Eは、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養後14日目におけるTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団について、Ki-67の発現レベルを解析した結果を示す図である。

【図4】図4Aは、IELをIL-2、IL-7又はIL-15存在下、又は、これら3種のILの存在下で、小腸陰窩オルガノイドと共に培養後1日目及び7日目におけるIEL数を測定した結果を示す図である。棒グラフは、平均値±標準偏差(SEM)で表す。図4Bは、IELを、IL-2、IL-7及びIL-15存在下で、大腸陰窩オルガノイドと共に培養後1日目及び7日目におけるIEL数を測定した結果を示す図である。棒グラフは、平均値±標準偏差(SEM)で表す。

【図5】小腸陰窩オルガノイドと共に培養したIELの運動解析の結果を示す図である。図5Aには、EGFP-tgマウス由来のIELと、野生型マウス由来の小腸陰窩オルガノイドとを共培養後3日目に、タイムラプス蛍光イメージング(Time-lapse fluorescent imaging)により解析した結果を示す。上皮細胞単層の基底側に沿った活発な動きを示す代表的なIELの画像(図5A上段)、及び小腸陰窩オルガノイド内部と外部への遊走を示すIELの画像(図5A下段)を示す。スケールバーは10μmを示す。図5Bには、R26-H2B-EGFPマウス由来のIELと、野生型マウス由来の小腸陰窩オルガノイドとを共培養後3日目に、タイムラプス蛍光イメージングにより解析した結果を示す。上皮細胞単層に沿って遊走するIELの画像(図5B上段)、及び小腸陰窩オルガノイド内側と外側への遊走を示すIELの画像(図5B下段)を示す。スケールバーは10μmを示す。なお、図5A、Bの各蛍光画像の右下の数値表示は、イメージングの開始からの経過時間を示す。図5Cには、R26-H2B-EGFPマウス由来のIELと、野生型マウス由来の小腸陰窩オルガノイドとを共培養後3日目に、IEL運動解析した結果を示す。代表的なデータセットの初期(図5C上左図)及び最後(図5C上右図)の静止画像において、IELの細胞核(白色の小さい球)及びその軌跡を4Dイメージで示す。点線で囲った領域の拡大画像を下段に示す。スケールバーは50μmを示す。図5Dには、H2B-EGFPレポーターマウスからTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団をそれぞれ独立して単離し、野生型マウス由来の小腸陰窩オルガノイドと共に培養後3日目に、5μM PD184352で前処理をし(図5D上段)、又は前処理せず(図5D下段)に、IEL運動解析した結果を示す。スケールバーは10μmを示す。図5Eには、H2B-EGFPレポーターマウスからTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団をそれぞれ独立して単離し、野生型マウス由来の小腸陰窩オルガノイドと共に培養後3日目に、IEL内におけるリン酸化ERKタンパク質(phospho-ERK)の発現をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

10

20

30

40

50

## &lt; 1 . 腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法 &gt;

本発明の「腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法」（以下、単に「本発明の維持・増殖方法」とも表示する。）としては、

(A) 単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程 A：及び、

(B) 前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程 B：  
を含んでいる限り特に制限されない。

## 【 0 0 1 4 】

## ( 単離された腸上皮間リンパ球 )

10

上記工程 A における「単離された腸上皮間リンパ球」としては、哺乳動物の腸上皮間リンパ球であって、かつ、単離された腸上皮間リンパ球である限り特に制限されず、哺乳動物の腸の上皮から直接単離された腸上皮間リンパ球であってもよいし、かかる腸上皮間リンパ球を維持又は増殖することにより得られた腸上皮間リンパ球であってもよい。また、本発明における「単離された腸上皮間リンパ球」とは、腸上皮間リンパ球を含むそのままの生体組織ではないことを意味し、腸上皮間リンパ球のみから構成され、他の種類の細胞を一切含まない状態の他、腸上皮間リンパ球が生体組織の状態よりも濃縮された細胞混合物も含まれる。かかる細胞混合物としては、腸上皮間リンパ球の含有比率（細胞の個数の割合）が 10 % 以上、20 % 以上、30 % 以上、40 % 以上、50 % 以上、60 % 以上、80 % 以上のものを例示することができる。

20

## 【 0 0 1 5 】

本明細書における「腸上皮間リンパ球」としては、小腸上皮間リンパ球、大腸上皮間リンパ球が挙げられ、小腸上皮間リンパ球が好ましく挙げられる。本明細書において「哺乳動物」としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等が好適に挙げられ、中でもヒトがより好適に挙げられる。

## 【 0 0 1 6 】

腸上皮間リンパ球は、哺乳動物の大腸組織や小腸組織から、公知の方法（例えば、Kohyama et al., Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96:7451-7455）により単離することができる。より具体的には以下の単離方法が挙げられる。

30

哺乳動物から採取した腸組織を PBS 等の緩衝液で洗い流し、パイエル板を除去した後、薄い（例えば 5 mm 程度の）切片に切断する。その後、Ca、Mg を含まないハンクス平衡塩液に 2 ~ 8 mM（好ましくは 5 mM）のエチレン - ジニトリロ四酢酸（EDTA）及び 0.3 ~ 2 mM（好ましくは 1 mM）の 1,4-ジチオ - D - トレイクトール（DTT）を含む容器中で 20 ~ 40（好ましくは 37）、10 分間 ~ 1 時間（好ましくは 30 分間）、50 ~ 250 rpm（好ましくは 150 rpm）で振盪しながらインキュベートする。次いで、容器内の内容物を、目開き 100 ~ 500 μm（好ましくは 300 μm）のナイロンメッシュフィルター及びグラスウールのカラムに通した後、回収された細胞を 20 ~ 40 %（好ましくは 30 %）パーコールに懸濁し、10 ~ 30 分間（好ましくは 20 分間）、600 ~ 1000 g（好ましくは 800 g）で遠心分離する。IEL は、30 分間 800 g、40 / 70 % パーコール勾配の遠心分離で単離できる。単離した IEL は、洗浄し、細胞を計数した後、アッセイに用いてよい。

40

## 【 0 0 1 7 】

上記工程 A に用いる「単離された腸上皮間リンパ球」の数や、「腸陰窩オルガノイド」の数としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されず、前述の「単離された腸上皮間リンパ球」の数としては例えば  $1.0 \times 10^2$  個 ~  $1.0 \times 10^8$  個の範囲内、 $1.0 \times 10^3$  個 ~  $1.0 \times 10^7$  個の範囲内、 $1.0 \times 10^4$  個 ~  $1.0 \times 10^6$  個の範囲内が好ましく挙げられ、前述の「腸陰窩オルガノイド」の数としては例えば 10 ~ 10000 個の範囲内、50 ~ 200 個の範囲内、70 ~ 150 個の範囲内が好ましく挙げられる。また、上記工程 A に用いる「単離され

50

た腸上皮間リンパ球」の数と、「腸陰窩オルガノイド」の数との比率としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、腸陰窩オルガノイド1個に対して、IELを10個～10万個の範囲内、100個～1万個の範囲内、500～2000個の範囲内が好ましく挙げられる。

## 【0018】

## (腸陰窩オルガノイド)

上記工程Aにおける「腸陰窩オルガノイド」としては、哺乳動物の腸陰窩オルガノイドである限り特に制限されない。本明細書において「腸陰窩オルガノイド」とは、腸上皮により内面が覆われている中心内腔、及び、外面に突出する複数の陰窩様部位を有する組織構造体を意味する。本明細書における「腸陰窩オルガノイド」として、具体的には、小腸陰窩オルガノイド、大腸陰窩オルガノイドが挙げられ、小腸陰窩オルガノイドが好ましく挙げられる。

10

## 【0019】

腸陰窩オルガノイドは、公知の方法により作製することができる。小腸陰窩オルガノイドの作製方法は例えば特許文献1（特開2012-254081号公報）に詳細に記載されており、大腸陰窩オルガノイドの作製方法は例えば特許文献2（国際公開第2013/061608号パンフレット）に詳細に記載されている。

## 【0020】

小腸陰窩オルガノイドの作製方法は、前述のように、例えば特許文献1に詳細に記載されているが、以下に簡単に説明する。哺乳動物の小腸から、鉗子等を利用して、陰窩を含む小腸組織を採取する。かかる小腸組織から、公知の方法にしたがって、陰窩を単離することができる。例えば、キレート剤（基底膜および間質細胞型とのそれらのカルシウムおよびマグネシウム依存性相互作用から細胞を解放する）と、採取した小腸組織を恒温放置することによって、陰窩を単離することができる。この小腸組織を洗浄した後、硝子スライドで上皮細胞層を粘膜下層から剥離し、細切する。この後、続いて、トリプシンまたは、より好ましくはEDTAおよび/またはEGTA中で恒温放置し、例えばろ過および/または遠心段階を用いて、未消化の小腸組織断片と陰窩由来の単一細胞とを分離する。トリプシンの代わりに、その他のタンパク質分解酵素、例えばコラゲナーゼおよび/またはディスパーゼIを使用することができる。

20

## 【0021】

分離して得られた、小腸陰窩由来の複数種の単一細胞を含む細胞集団は、小腸上皮幹細胞を含んでいる。かかる細胞集団を培養することにより、小腸陰窩オルガノイドを作製することができるが、より効率良く小腸陰窩オルガノイドを作製する観点から、前述の細胞集団から単離した小腸上皮幹細胞を培養することが好ましい。かかる小腸上皮幹細胞は、腸の成体幹細胞のマーカーであるLgr5及び/Lgr6を指標に単離することができる。

30

## 【0022】

小腸上皮幹細胞又は、該小腸上皮幹細胞を含む細胞集団は、細胞外マトリクスに包埋して、3次元的に培養することが好ましい。かかる細胞外マトリクスとしては、後述の工程Aにおいて、腸上皮間リンパ球として小腸上皮間リンパ球を用い、腸陰窩オルガノイドとして小腸陰窩オルガノイドを用いる場合に利用する細胞外マトリクスと同様のものが好ましく挙げられる。また、細胞外マトリクスへの包埋方法は、後述の工程Aにおける包埋方法と同様の方法を用いることができる。

40

## 【0023】

小腸陰窩オルガノイドを作製する際の培養液としては、後述の工程Bに用いる培養液のうち、「小腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液」が好ましく挙げられる。ただし、小腸陰窩オルガノイドを作製する際の培養液は、後述の「さらなる任意成分」を含んでいてもよいが、含んでいなくてもよく、製造コストの観点から、含んでいない方が好ましい。

## 【0024】

小腸陰窩オルガノイドを作製する際の培養条件としては、小腸陰窩オルガノイドを作製

50

し得る限り特に制限されないが、培養温度として、例えば30～40の範囲内、好ましくは36～38の範囲内、より好ましくは37を好適に例示することができる。また、培養期間としては例えば4～12日間が挙げられ、5～10日間が好ましく挙げられ、6～7日間がより好ましく挙げられる。培養液の交換は適当な時期に行うことが好ましい。培養液の交換頻度としては、小腸陰窩オルガノイドを作製し得る限り特に制限されないが、例えば1～5日間経過毎、好ましくは2～3日間経過毎とすることができます。

#### 【0025】

一方、大腸陰窩オルガノイドの作製方法は、前述のように、例えば特許文献2に詳細に記載されているが、以下に簡単に説明する。哺乳動物の大腸から、鉗子等を利用して、陰窩を含む大腸組織を採取する。かかる大腸組織から、公知の方法にしたがって、陰窩を単離することができる。例えば、キレート剤（基底膜および間質細胞型とのそれらのカルシウムおよびマグネシウム依存性相互作用から細胞を解放する）と、採取した大腸組織を恒温放置することによって、陰窩を単離することができる。この大腸組織を洗浄した後、硝子スライドで上皮細胞層を粘膜下層から剥離し、細切する。この後、続いて、トリプシンまたは、より好ましくはEDTAおよび/またはEGTA中で恒温放置し、例えば過酸化水素/または遠心段階を用いて、未消化の大腸組織断片と陰窩由来の単一細胞とを分離する。トリプシンの代わりに、その他のタンパク質分解酵素、例えばコラゲナーゼおよび/またはディスパーゼIを使用することができます。

10

#### 【0026】

分離して得られた、大腸陰窩由来の複数種の単一細胞を含む細胞集団は、大腸上皮幹細胞を含んでいる。かかる細胞集団を培養することにより、大腸陰窩オルガノイドを作製することができるが、より効率良く大腸陰窩オルガノイドを作製する観点から、前述の細胞集団から単離した大腸上皮幹細胞を培養することが好ましい。かかる大腸上皮幹細胞は、腸の成体幹細胞のマーカーであるLgr5及び/Lgr6を指標に単離することができる。

20

#### 【0027】

大腸上皮幹細胞又は、該大腸上皮幹細胞を含む細胞集団は、細胞外マトリクスに包埋して、3次元的に培養することが好ましい。かかる細胞外マトリクスとしては、後述の工程Aにおいて、腸上皮間リンパ球として大腸上皮間リンパ球を用い、腸陰窩オルガノイドとして大腸陰窩オルガノイドを用いる場合に利用する細胞外マトリクスと同様のものが好ましく挙げられる。また、細胞外マトリクスへの包埋方法は、後述の工程Aにおける包埋方法と同様の方法を用いることができる。

30

#### 【0028】

大腸陰窩オルガノイドを作製する際の培養液としては、後述の工程Bに用いる培養液のうち、「大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液」が好ましく挙げられる。ただし、大腸陰窩オルガノイドを作製する際の培養液は、後述の、IL-2、IL-7及びIL-15から選択される1種又は2種又は3種を含んでいてもよいが、含んでいなくてもよく、製造コストの観点から、含んでいない方が好ましい。

40

#### 【0029】

大腸陰窩オルガノイドを作製する際の培養条件としては、大腸陰窩オルガノイドを作製し得る限り特に制限されないが、培養温度として、例えば30～40の範囲内、好ましくは36～38の範囲内、より好ましくは37を好適に例示することができる。また、培養期間としては例えば4～12日間が挙げられ、5～10日間が好ましく挙げられ、6～7日間がより好ましく挙げられる。培養液の交換は適当な時期に行うことが好ましい。培養液の交換頻度としては、大腸陰窩オルガノイドを作製し得る限り特に制限されないが、例えば1～5日間経過毎、好ましくは2～3日間経過毎とすることができます。

#### 【0030】

本発明に用いる腸陰窩オルガノイドは、初代培養により得られる腸陰窩オルガノイドであってもよいし、初代培養の培養物（例えば腸陰窩オルガノイド）から採取した細胞を継代培養して得られる腸陰窩オルガノイドであってもよいし、継代培養の培養物（例えば腸

50

陰窩オルガノイド)から採取した細胞を継代培養して得られる腸陰窩オルガノイドであってもよい。継代の時期や頻度としては、腸陰窩オルガノイドを作製し得る限り特に制限されないが、腸上皮幹細胞等の集団(好ましくは腸陰窩オルガノイド)が大きくなってきたタイミングで適宜行うことができ、例えば、4~12日間経過後又は経過毎、好ましくは6~10日間経過後又は経過毎とすることができます。継代の方法としては、腸上皮幹細胞等を維持又は増幅し得る限り特に制限されず、細胞外基質から分離した腸上皮幹細胞等(例えば腸陰窩)を、新たな細胞外基質と共に存させる方法を例示することができ、中でも、半固体化した細胞外基質(好ましくはマトリケルやコラーゲン)を分解酵素(好ましくはコラゲナーゼなど)等により分解又は冷却により解重合して分離して得られた腸上皮幹細胞等(例えば腸陰窩)を、新たな細胞外基質に包埋させる方法を好適に例示することができる。

10

### 【0031】

#### (本発明における工程A)

本発明における工程Aとしては、単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程である限り特に制限されず、例えば、ウェル等の培養容器内において、単離された腸上皮間リンパ球、腸陰窩オルガノイド及び細胞外マトリクスを共存させつつ、細胞外マトリクスを重合させる方法が好ましく挙げられ、中でも、単離された腸上皮間リンパ球と腸陰窩オルガノイドの混合物を、ウェル等の培養容器内に入れた後、該培養容器内に細胞外マトリクスを添加し、該細胞外マトリクスを重合させる方法がより好ましく挙げられる。

20

### 【0032】

好ましい態様として、上記工程Aより前に、単離された腸上皮間リンパ球と、腸陰窩オルガノイドとを、腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液(好ましくはD M E M 培養液)中で10分間~2時間、好ましくは20分間~1時間、培養することが好ましい。

### 【0033】

#### (本発明における工程B)

本発明における工程Bとしては、腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、「細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイド」を共培養する工程である限り特に制限されない。

30

### 【0034】

本発明の工程Bにおける共培養の培養条件としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、培養温度として、例えば30~40の範囲内、好ましくは36~38の範囲内、より好ましくは37を好適に例示することができる。また、培養期間としては特に制限されないが、例えば4~14日間が挙げられ、腸上皮間リンパ球を増殖させる場合は、より多くの腸上皮間リンパ球を得る観点から7~14日間が好ましく挙げられ、8~13日間がより好ましく挙げられる。また、後述するように、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドを製造する場合は、工程Bの培養期間として3~7日間が好ましく挙げられ、5~7日間がより好ましく挙げられる。

40

### 【0035】

本発明の工程Bにおける共培養において、培養液の交換は適当な時期に行うことができる。培養液の交換頻度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば1~5日間経過毎、好ましくは2~3日間経過毎とすることができます。

### 【0036】

本発明の工程Bにおける共培養において、腸陰窩オルガノイドは交換しなくてもよいが、腸上皮間リンパ球をより長期間維持し又はより多く増殖させる観点から、あるいは、腸上皮間リンパ球がより多く増加した腸陰窩オルガノイドを得る観点から、適当な時期に交換することが好ましい。腸陰窩オルガノイドの交換頻度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば5~

50

8日間毎、好ましくは6～7日間毎とすることができます。

#### 【0037】

腸陰窩オルガノイドを交換する方法としては特に制限されないが、例えば、共培養物中のIELを単離した後、かかるIELを、別途培養した腸陰窩オルガノイドと共に細胞外マトリクスに包埋して、腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で共培養を継続する方法が挙げられる。なお、共培養物中のIELを単離する方法としては以下のような方法が挙げられる。共培養中の「細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイド」を培養液中から取りだした後、細胞外マトリクスを冷却やコラゲナーゼ等で解重合や分解などして、腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを分取する。遠心分離後、上清画分（画分1）を回収する。また、沈殿物を氷上の緩衝液中でインキュベートし、しばらく静置した後、上清画分（画分2）を回収する。さらに、その沈殿物を激しいピペット操作などで破壊し、メッシュフィルター（例えば目開き40μm）を通過させたものを画分3とする。画分1～3はいずれもIELを含む懸濁液である。画分1～3のいずれかを用いてもよいが、画分1～3を合わせることにより、共培養物中からIELをより効率良く単離することができる。10

#### 【0038】

##### （工程Bの培養液）

本発明の工程Bにおける培養液（以下、単に「工程Bの培養液」とも表示する。）としては、腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液である限り特に制限されない。工程Bにおける培養液は血清を含有していてもよいし、含有していないなくてもよいが、含有していないことが好ましい。本発明によれば、血清を用いずとも、IELを長期間維持でき、又はIELをより多く増殖することができる。20

#### 【0039】

工程Bの培養液は、基本培養液成分（糖類などの炭素源、アミノ酸などの窒素源、無機塩）に加えて、以下の必須成分を含む。かかる必須成分は、腸陰窩オルガノイドが小腸陰窩オルガノイドである場合は、分裂促進増殖因子、Wntアゴニスト及びBMP阻害物質（以下、これら3成分をまとめて、単に「小腸必須3成分」とも表示する。）であり、腸陰窩オルガノイドが大腸陰窩オルガノイドである場合は、血清アルブミン、Wnt3a、及び、R-スpongin1（以下、これら3成分をまとめて、単に「大腸必須3成分」とも表示する。）である。30

#### 【0040】

上記の基本培養液成分としては、培養する腸上皮間リンパ球や腸陰窩オルガノイドが同化し得る糖類等の炭素源や、かかる腸上皮間リンパ球や腸陰窩オルガノイドが消化し得るアミノ酸等の窒素源や、無機塩などを好適に例示することができる。かかる基本培養液成分は当業者に公知のものや、市販のもの（例えば、Invitrogen社製のもの）を使用することができ、具体的には、MEM（Minimum Essential Medium）、BME（Basal Medium Eagle）、D MEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）、EMEM（Eagle's minimal essential medium）、IMDM（Iscove's Modified Dulbecco's Medium）、GMEM（Glasgow's MEM）、F12（Ham's F12 Medium）、D MEM / F12、RPMI 1640、BMO C-3（Brinster's BMOC-3 Medium）、CMRL-1066、L-15（Leibovitz's L-15 medium）、McCoy's 5A、Media 199、MEM Media、MCDB105、MCDB131、MCDB153、MCDB201、Williams' medium E、Advanced MEM、Advanced D MEM、Advanced D MEM / F-12、Advanced RPMI 1640、などの培養液を用いることができる。本発明においては、Advanced D MEM / F-12（Invitrogen社製）などを好適に例示することができる。また、上記のアミノ酸としては、グルタミンを好適に例示することができる。40

#### 【0041】

##### （小腸必須3成分）

腸上皮間リンパ球（すなわち、小腸上皮間リンパ球又は大腸上皮間リンパ球、好ましく

10

20

30

40

50

は小腸上皮間リンパ球)と小腸陰窩オルガノイドを共培養する場合、工程Bの培養液は、小腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液である。小腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液は、小腸必須3成分(分裂促進増殖因子、Wntアゴニスト及びBMP阻害物質)を含有する。

#### 【0042】

小腸必須3成分のうちの1つである上記の分裂促進増殖因子としては、上皮増殖因子(EGF)、形質転換増殖因子-(TGF-)、纖維芽細胞増殖因子(FGF)、及び、脳由来神経栄養因子(BDNF)からなる群から選択される1種又は2種以上の分裂促進増殖因子が好ましく挙げられ、中でも、EGFやFGFがより好ましく挙げられ、中でも、EGFが最も好ましく挙げられる。なお、FGFとしては、FGF2(bFGF)、FGF7(ケラチン生成細胞増殖因子(KGF)とも呼ばれる)及びFGF10から選択される1種又は2種以上が好ましく挙げられ、FGF7及び/又はFGF10がより好ましく挙げられる。分裂促進増殖因子の好ましい組合せとしては、「EGF単独」や、「EGF及びFGF7」や、「EGF及びFGF10」が挙げられる。10

#### 【0043】

腸上皮間リンパ球と小腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程Bの培養液における分裂促進増殖因子の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、EGFの場合、例えば、5~500ng/mLの範囲内、好ましくは10~250ng/mLの範囲内、より好ましくは20~125ng/mLの範囲内、さらに好ましくは30~70ng/mLの範囲内が挙げられる。同様の濃度をFGF(好ましくはFGF10やFGF7)に対して適用することができる。複数種のFGFを使用する場合は、FGFの前述の濃度範囲は、使用するFGFの総濃度を示す。上記工程Bの培養中、1~3日ごと(好ましくは2日ごと)に分裂促進増殖因子を培養液に添加することが好ましい。20

#### 【0044】

小腸必須3成分のうちの1つである上記のWntアゴニストとは、細胞内でTCF/L-EF介在性の転写を活性化する物質を意味する。Wntシグナル伝達経路は、Wntタンパク質がFrizzled受容体ファミリーの細胞表面受容体に結合し、該受容体にDishevelledファミリータンパク質を放出させることで始まる。Dishevelledファミリータンパク質は通常、-カテニンシグナル分子を促進するアキシン(Axin)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3(GSK-3)及びAPC(Adenomatous polyposis coli)タンパク質を含む分子の複合体を抑制する。この複合体が抑制されると-カテニンが安定化して核へ入ることが可能となり、核へ入った該-カテニンはTCF/L-EFファミリー転写因子によって転写を促進する。よって、上記のWntアゴニストとしては、Wntファミリータンパク質のありとあらゆるものを持むFrizzled受容体ファミリーメンバーに結合し、活性化する作用を有する物質(狭義のWntアゴニスト)、細胞内-カテニン分解の阻害物質、及び、TCF/L-EFの活性化物質からなる群から選択される1種又は2種以上のWntアゴニストが挙げられる。Wntアゴニストが細胞においてWnt活性を向上させる程度としては特に制限されないが、そのWntアゴニストの存在下でのWnt活性のレベルが、そのWntアゴニストの非存在下でのWnt活性のレベルに対して、割合として10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは100%以上の向上であることが好適に挙げられる。Wnt活性は、公知の方法により測定することができ、例えばpTOPFLASH及びpFOPFLASH Tcfルシフェラーゼレポーターコンストラクトによって、Wntの転写活性を測定することにより調べることができる(Korinek et al., 1997. Science 275:1784-1787)。30

#### 【0045】

上記のWntアゴニストとしては、Wnt-1/Int-1; Wnt-2/Irp(Int-1関連タンパク質); Wnt-2b/13、Wnt-3/Int-4; Wnt-3a(例えばR&D systems社製); Wnt-4; Wnt-5a; Wnt-5b

1020304050

; Wnt - 6 (Kirikoshi H et al. 2001. Biochem Biophys Res Com 283:798-805) ; Wnt - 7a (R&D systems社製) ; Wnt - 7b ; Wnt - 8a / 8d ; Wnt - 8b ; Wnt - 9a / 14 ; Wnt - 9b / 14b / 15 ; Wnt - 10a ; Wnt - 10b / 12 ; Wnt - 11 及び Wnt - 16 からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の Wnt タンパク質が挙げられる。Wnt タンパク質は、分泌糖タンパク質である。ヒト Wnt タンパク質の概要については、「THE WNT FAMILY OF SECRETED PROTEINS」、R&D Systems Catalog、2004) で提供される。さらに、Wnt アゴニストは、分泌タンパク質の R - スポンジン (R-Spondin) ファミリー (これは、Wnt シグナル伝達経路の活性化および制御に関わり、4 種類のメンバー (R - スポンジン 1 (NU206, Nuvelo, San Carlos, CA)、R - スポンジン 2 ((R&D systems社製)、R - スポンジン 3 および R - スポンジン - 4 ) からなる) 及び、高親和性で Frizzled-4 受容体に結合し、Wnt シグナル伝達経路の活性化を誘導するという点で Wnt タンパク質のように機能する分泌性制御タンパク質であるノリン (Norrin、ノリー病タンパク質 (Norrie Disease Protein) 又は N D P とも呼ばれる) (R&D systems社製) を含む (Kestutis Planutis et al. (2007) BMC Cell Biol. 8:12)。Wnt シグナル伝達経路の小分子アゴニスト、アミノピリミジン誘導体が最近同定されたが、これもまた Wnt アゴニストとして明確に含まれる (Liu et al. (2005) Angew Chem Int Ed Engl. 44, 1987-90)。

10

## 【0046】

GSK - 3 阻害活性を有する既知の物質としては、低分子干渉 RNA (siRNA、Cell Signaling)、リチウム (Sigma社製)、ケンパウロン (Biomol International ; Leost, M et al. (2000) Eur J Biochem. 267, 5983-5994)、6 - ブロモインジルビン - 3' - アセトキシム (Meijer, L et al. (2003) Chem Biol. 10, 1255-1266)、SB216763 及び SB415286 (Sigma-Aldrich社製)、及び、「FRAT - ファミリーメンバー及びアキシンとの GSK - 3 の相互作用を阻止する FRAT 由来ペプチド」が挙げられる。概要是、Meijer et al. (2004) Trends in Pharmacological Sciences 25, 471-480 により提供される。GSK - 3 阻害活性のレベルを調べるための方法及びアッセイは当業者にとって公知であり、例えば、Liao et al. 2004, Endocrinology, 145 (6) :2941-9) に記載のような方法およびアッセイが挙げられる。

20

## 【0047】

好ましい態様において、Wnt アゴニストとしては、Wnt ファミリーのタンパク質、R - スポンジン 1 ~ 4、ノリン及び GSK - 3 阻害物質からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上が挙げられる。さらに好ましい態様において、Wnt アゴニストは、R - スポンジン 1 を含むか、又は、R - スпонジン 1 からなる。腸上皮間リンパ球と小腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程 B の培養液における R - スпонジン 1 の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、50 ~ 5000 ng / mL の範囲内、好ましくは 100 ~ 2500 ng / mL の範囲内、より好ましくは 200 ~ 1250 ng / mL の範囲内、さらに好ましくは 300 ~ 850 ng / mL の範囲内、より好ましくは 400 ~ 625 ng / mL、さらに好ましくは 450 ~ 550 ng / mL の範囲内、最も好ましくは 500 ng / mL が挙げられる。上記工程 B の培養中、好ましくは 2 日ごとに Wnt ファミリーのタンパク質を培養液に添加し、また、好ましくは 4 日ごとに培養液を新鮮なものに交換する。

30

## 【0048】

好ましい態様において、Wnt アゴニストは、R - スпонジン (好ましくは R - スпонジン 1)、Wnt - 3a 及び Wnt - 6 からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上であり、さらに好ましくは R - スпонジン (好ましくは R - スпонジン 1) 及び Wnt - 3a の両者が挙げられる。この組み合わせは、驚くべきことにオルガノイド形成に対して相乗効果を有するので、特に好ましい。腸上皮間リンパ球と小腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程 B の培養液における R - スпонジン (好ましくは R - スпонジン 1) の好ましい濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、50 ~ 5000 ng / mL の範囲内、好ましくは

40

50

100～2500 ng / mL の範囲内、より好ましくは 200～1250 ng / mL の範囲内、さらに好ましくは 300～850 ng / mL の範囲内、より好ましくは 400～625 ng / mL、さらに好ましくは 450～550 ng / mL の範囲内、最も好ましくは 500 ng / mL が挙げられる。また、工程 B の培養液における Wnt-3a の好ましい濃度としては、10～1000 ng / mL の範囲内、好ましくは 20～500 ng / mL の範囲内、より好ましくは 40～250 ng / mL の範囲内、さらに好ましくは 60～170 ng / mL の範囲内、より好ましくは 80～125 ng / mL、さらに好ましくは 90～110 ng / mL の範囲内、最も好ましくは 100 ng / mL が挙げられる。

#### 【0049】

小腸必須 3 成分のうちの 1 つである上記の BMP 阻害物質は、二量体リガンドとして 2 種類の異なる受容体セリン / スレオニンキナーゼ、I 型及び II 型受容体からなる受容体複合体に結合する。II 型受容体は I 型受容体をリン酸化し、その結果、この受容体キナーゼが活性化される。この I 型受容体は、続いて特異的な受容体基質 (SMAD) をリン酸化し、その結果、シグナル伝達経路によって転写活性が導かれる。

10

#### 【0050】

BMP 阻害物質には、BMP 分子に結合して複合体を形成することによって、BMP 分子の BMP 受容体への結合を阻止又は阻害する物質や、BMP 受容体に結合することによって、BMP 分子の BMP 受容体への結合を阻止又は阻害する物質が含まれる。後者の阻害物質には、BMP 受容体のアンタゴニストやインバースアゴニストが含まれ、より具体的には、BMP 受容体に結合することによって、BMP 分子の BMP 受容体への結合を阻止又は阻害する抗体が挙げられる。

20

#### 【0051】

上記の BMP 阻害物質が細胞において BMP 活性を阻害する程度としては特に制限されないが、その BMP 阻害物質の存在下での BMP 活性のレベルが、その BMP 阻害物質の非存在下での BMP 活性のレベルに対して、割合として 90% 以下、好ましくは 80% 以下、より好ましくは 70% 以下、さらに好ましくは 50% 以下、より好ましくは 30% 以下、さらに好ましくは 10% 以下、最も好ましくは 0% までの阻害であることが好適に挙げられる。BMP 活性は、公知の方法により測定することができ、例えば Zilberberg et al., 2007. BMC Cell Biol. 8:41 に記載されているように、BMP の転写活性を測定することによって、BMP 活性を調べることができる。

30

#### 【0052】

BMP 阻害物質としては、ノギン (Noggin) (Peprotech 社製)、コーディン (Chordin)、コーディンドメインを含むコーディン様タンパク質 (R&D systems 社製)、ホリスタチン (Follistatin)、ホリスタチンドメインを含むホリスタチン関連タンパク質 (R&D systems 社製)、DAN タンパク質、DAN システイン - ノットドメイン (DAN cysteine-knot domain) を含む DAN 様タンパク質 (R&D systems 社製)、スクレロスチン / SOST (R&D systems 社製)、デコリン (R&D systems)、及び、-2 マクログロブリン (R&D systems 社製) からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上が挙げられ、中でも、ノギン、DAN タンパク質、及び、DAN 様タンパク質 (サーベラス (Cerberus) 及び グレムリン (Gremelin) (R&D systems) を含む) からなる群から選択される 1 程又は 2 程以上が好ましく挙げられ、ノギンがより好ましく挙げられる。これらの BMP 阻害物質は、BMP リガンドに結合することによって、BMP リガンドがシグナル伝達物質受容体へ結合することを阻害することができる。

40

#### 【0053】

腸上皮間リンパ球と小腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程 B の培養液における BMP 阻害物質の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、BMP 阻害物質がノギンである場合、例えば、例えば、1 ng / mL ~ 10 μg / mL の範囲内、好ましくは 10 ~ 1000 ng / mL の範囲内、より好ましくは 30 ~ 300 ng / mL の範囲内、さらに好ましくは 50 ~ 200 ng / mL の範囲内、より好ましくは 70 ~ 130 ng / mL の範囲内が挙げられ

50

る。上記工程 B の培養中、好ましくは 2 日ごとに B M P 阻害物質（好ましくはノギン）を培養液に添加し、また、好ましくは 4 日ごとに培養液を新鮮なものに交換する。

#### 【 0 0 5 4 】

##### (大腸必須 3 成分)

腸上皮間リンパ球（すなわち、小腸上皮間リンパ球又は大腸上皮間リンパ球、好ましくは大腸上皮間リンパ球）と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合、工程 B の培養液は、大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液である。大腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液は、大腸必須 3 成分（血清アルブミン、W n t 3 a、及び、R - スポンジン 1）を含有する。

#### 【 0 0 5 5 】

大腸必須 3 成分のうちの 1 つである上記の血清アルブミンは、哺乳動物の血清に含まれるアルブミンである限り特に制限されず、かかる血清アルブミンとしては、哺乳動物の血清から精製したもの、化学的あるいは生化学的に合成したもの、市販のもの（例えば Sigma 社製の B S A）のいずれを用いてもよい。血清アルブミンの由来としては、哺乳動物である限り特に制限されないが、ヒト血清アルブミン（human serum albumin；H S A）や、ウシ血清アルブミン（B S A）を好適に例示することができ、中でも B S A をより好適に例示することができる。また、培養する腸上皮間リンパ球や大腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種の哺乳動物に由来する血清アルブミンを用いることも好ましい。

#### 【 0 0 5 6 】

腸上皮間リンパ球と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程 B の培養液における血清アルブミンの濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程 B の培養液において、上限として、30重量%以下（例えば 20重量%以下、10重量%以下、5重量%以下など）が挙げられ、下限として、0.01重量%以上（例えば 0.05重量%以上、0.1重量%以上、0.3%以上）が挙げられる。より好ましい濃度としては、0.3%以上 3%以下の範囲を挙げることができる。

#### 【 0 0 5 7 】

大腸必須 3 成分のうちの 1 つである上記の W n t 3 a は、哺乳動物の W N T 3 A 遺伝子によりコードされるタンパク質である限り特に制限されず、かかる W n t 3 a としては、例えばパネート細胞などの W n t 3 産生細胞が産生するものを用いてもよいし、遺伝子工学的に作成した当該遺伝子発現細胞が産生するものを用いてもよいし、化学的あるいは生化学的に合成したもの、市販のもの（例えば、R&D Systems 社製の W n t 3 a）のいずれを用いてもよい。W n t 3 a の由来としては、哺乳動物である限り特に制限されないが、ヒト W n t 3 a（h W n t 3 a）や、マウス W n t 3 a（m W n t 3 a）を好適に例示することができ、中でも、m W n t 3 a をより好適に例示することができる。また、培養する腸上皮間リンパ球や大腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種の哺乳動物種と同じ W n t 3 a を用いることも好ましい。

#### 【 0 0 5 8 】

腸上皮間リンパ球と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程 B の培養液における W n t 3 a の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程 B の培養液において、上限として、3 mg / mL 以下（例えば、500 μg / mL 以下、100 μg / mL 以下、30 μg / mL 以下、3 μg / mL 以下、1 μg / mL 以下など）が挙げられ、下限として、300 pg / mL 以上（例えば、1 ng / mL 以上、3 ng / mL 以上、10 ng / mL 以上、30 ng / mL 以上）が挙げられる。より好ましい最終濃度としては、30 ng / mL 以上を挙げることができる。

#### 【 0 0 5 9 】

大腸必須 3 成分のうちの 1 つである上記の R - スポンジン 1 は、哺乳動物の R S P O 1 遺伝子によりコードされるタンパク質である限り特に制限されず、かかる R s p o 1 としては、遺伝子工学的に作成した当該遺伝子発現細胞などの R s p o 1 産生細胞が産生する

10

20

30

40

50

ものを用いてもよいし、化学的あるいは生化学的に合成したもの、市販のもの（例えば、R&D Systems社製のR-Spondin1）のいずれを用いてもよい。R s p o 1の由来としては、哺乳動物である限り特に制限されないが、ヒトR s p o 1(h R s p o 1)や、マウスR s p o 1(m R s p o 1)を好適に例示することができ、中でも、m R s p o 1をより好適に例示することができる。また、培養する腸上皮間リンパ球や大腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種の哺乳動物に由来するR - スポンジン1を用いることも好ましい。

#### 【0060】

腸上皮間リンパ球と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程Bの培養液におけるR - スポンジン1の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程Bの培養液において、上限として、5 mg / mL以下（例えば、1 mg / mL以下、200 µg / mL以下、40 µg / mL以下、5 µg / mL以下、1 µg / mL以下など）であることが挙げられ、下限として、500 pg / mL以上（例えば、5 ng / mL以上、50 ng / mL以上、250 ng / mL以上）であることが挙げられる。10

#### 【0061】

##### (大腸任意3成分)

腸上皮間リンパ球（すなわち、小腸上皮間リンパ球又は大腸上皮間リンパ球、好ましくは小腸上皮間リンパ球）と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合、工程Bの培養液は、基本培養液成分、及び、大腸必須3成分のみを含んでいてもよいが、それらの成分に加えて、上皮細胞増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、及び、ノギン(Noggin)からなる群から選択される1種、好ましくは2種、より好ましくは3種の成分（以下、かかる3成分を「大腸任意3成分」とも表示する。）をさらに含有することを好適に例示することができる。20

#### 【0062】

大腸任意3成分のうちの1つである上記のEGFとしては、哺乳動物のEGF遺伝子によりコードされるタンパク質である限り特に制限されず、かかるEGFとしては、遺伝子工学的に作成した当該遺伝子発現細胞などのEGF産生細胞が産生するものを用いてもよいし、化学的あるいは生化学的に合成したもの、市販のもの（例えば、Peprotech社製のEGF）のいずれを用いてもよい。EGFの由来としては、哺乳動物である限り特に制限されないが、ヒトEGF(hEGF)や、マウスEGF(mEGF)を好適に例示することができ、中でも、mEGFをより好適に例示することができる。また、培養する腸上皮間リンパ球や大腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種の哺乳動物に由来するEGFを用いることも好ましい。30

#### 【0063】

腸上皮間リンパ球と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程Bの培養液におけるEGFの濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程Bの培養液において、上限として、200 µg / mL以下（例えば、40 µg / mL以下、8 µg / mL以下、2 µg / mL以下、200 ng / mL以下、40 ng / mL以下など）であることが挙げられ、下限として、1 pg / mL以上（例えば、8 pg / mL以上、100 pg / mL以上、1 ng / mL以上、10 ng / mL以上）であることが挙げられる。また、EGFのより好ましい濃度としては、1 ng / mL以上40 ng / mL以下の範囲が挙げられる。40

#### 【0064】

大腸任意3成分のうちの1つである上記のHGFとしては、哺乳動物のHGF遺伝子によりコードされるタンパク質である限り特に制限されず、かかるHGFとしては、遺伝子工学的に作成した当該遺伝子発現細胞などのHGF産生細胞が産生するものを用いてもよいし、化学的あるいは生化学的に合成したもの、市販のもの（例えば、R&D Systems社製のHGF）のいずれを用いてもよい。HGFの由来としては、哺乳動物である限り特に制限されないが、ヒトHGF(hHGF)や、マウスHGF(mHGF)を好適に例示する50

ことができ、中でも、m H G F をより好適に例示することができる。また、培養する腸上皮間リンパ球や大腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種の哺乳動物に由来する H G F を用いることも好ましい。

#### 【0065】

腸上皮間リンパ球と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程Bの培養液における H G F の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程Bの培養液において、上限として、 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下（例えば、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $500 \text{ng}/\text{mL}$ 以下、 $100 \text{ng}/\text{mL}$ 以下など）であることが挙げられ、下限として、 $50 \text{pg}/\text{mL}$ 以上（例えば、 $500 \text{pg}/\text{mL}$ 以上、 $5 \text{ng}/\text{mL}$ 以上、 $25 \text{ng}/\text{mL}$ 以上）であることが挙げられる。また、H G F のより好ましい濃度としては、 $5 \text{ng}/\text{mL}$ 以上 $100 \text{ng}/\text{mL}$ 以下の範囲が挙げられる。10

#### 【0066】

大腸任意3成分のうちの1つである上記のノギンとしては、哺乳動物のN O G 遺伝子によりコードされるタンパク質である限り特に制限されず、かかるノギンとしては、遺伝子工学的に作成した当該遺伝子発現細胞などのノギン産生細胞が產生するものを用いてもよいし、化学的あるいは生化学的に合成したもの、市販のもの（例えば、R&D Systems社製のN o g g i n）のいずれを用いてもよい。ノギンの由来としては、哺乳動物である限り特に制限されないが、ヒトノギン（h N o g g i n）や、マウスノギン（m N o g g i n）を好適に例示することができ、中でも、マウスノギンをより好適に例示することができる。また、培養する腸上皮間リンパ球や大腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種の哺乳動物に由来するノギンを用いることも好ましい。20

#### 【0067】

腸上皮間リンパ球と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合の工程Bの培養液におけるノギンの濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程Bの培養液において、上限として、 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下（例えば、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $500 \text{ng}/\text{mL}$ 以下、 $100 \text{ng}/\text{mL}$ 以下など）であることが挙げられ、下限として、 $50 \text{pg}/\text{mL}$ 以上（例えば、 $500 \text{pg}/\text{mL}$ 以上、 $5 \text{ng}/\text{mL}$ 以上、 $25 \text{ng}/\text{mL}$ 以上）であることが挙げられる。また、ノギンのより好ましい濃度としては、 $5 \text{ng}/\text{mL}$ 以上 $100 \text{ng}/\text{mL}$ 以下の範囲を挙げることができる。30

#### 【0068】

##### (さらなる任意成分)

工程Bの培養液は、腸上皮間リンパ球（すなわち、小腸上皮間リンパ球又は大腸上皮間リンパ球、好ましくは小腸上皮間リンパ球）と小腸陰窩オルガノイドを共培養する場合であっても、腸上皮間リンパ球（すなわち、大腸上皮間リンパ球又は小腸上皮間リンパ球、好ましくは大腸上皮間リンパ球）と大腸陰窩オルガノイドを共培養する場合であっても、さらなる任意成分を含まなくてもよいが、腸上皮間リンパ球をより長期間維持し又はより多く増殖させる観点から、あるいは、腸上皮間リンパ球がより多く増加した腸陰窩オルガノイドを得る観点から、さらなる任意成分を含むことが好ましい。さらなる任意成分としては、I L - 2、I L - 7、I L - 15、R h o キナーゼ阻害物質、Notchアゴニスト、抗生物質から選択される1種又は2種以上が挙げられ、中でも、I L - 2、I L - 7 及び I L - 15 から選択される1種又は2種以上（好ましくは3種）が好ましく挙げられ、中でも、「I L - 2」、「I L - 2 及び I L - 7」、「I L - 2 及び I L - 15」及び「I L - 2、I L - 7 及び I L - 15」から選択されるいずれかがより好ましく挙げられ、「I L - 2、I L - 7 及び I L - 15」が最も好ましく挙げられる。特に、I L - 2 は、腸上皮間リンパ球をより長期間維持し又はより多く増殖させる点や、腸陰窩オルガノイドにおける腸上皮間リンパ球をより多く増加させる点できわめて優れているため、工程Bの培養液は、任意成分として、少なくともI L - 2 を含むことが特に好ましく挙げられる。また、上記のR h o キナーゼ阻害物質や、上記のNotchアゴニストは、細胞の生存率や増殖40

10

20

30

40

50

効率を改善する点で好ましい。

【0069】

上記のIL-2(インターロイキン2)としては、哺乳動物のIL-2である限り特に制限されないが、培養する腸上皮間リンパ球や腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種のIL-2が好ましく挙げられる。かかる哺乳動物のIL-2としては、市販されているIL-2(例えば、Rocher社製)を用いてもよいし、GenBank等の配列データベースに開示されているIL-2遺伝子のヌクレオチド配列やアミノ酸配列に基づいて化学的に合成したIL-2を用いてもよいし、前述の配列に基づき、遺伝子組換え技術を利用して作製したIL-2を用いてもよい。

10

【0070】

工程Bの培養液におけるIL-2の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、1~1万U/mLの範囲内、好ましくは10~1000U/mLの範囲内、より好ましくは30~300U/mLの範囲内、さらに好ましくは50~200U/mLの範囲内、より好ましくは70~130U/mLの範囲内が挙げられる。

20

【0071】

上記のIL-7(インターロイキン7)としては、哺乳動物のIL-7である限り特に制限されないが、培養する腸上皮間リンパ球や腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種のIL-7が好ましく挙げられる。かかる哺乳動物のIL-7としては、市販されているIL-7(例えば、Peprotech社製)を用いてもよいし、GenBank等の配列データベースに開示されているIL-7遺伝子のヌクレオチド配列やアミノ酸配列に基づいて化学的に合成したIL-7を用いてもよいし、前述の配列に基づき、遺伝子組換え技術を利用して作製したIL-7を用いてもよい。

20

【0072】

工程Bの培養液におけるIL-7の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、0.1~100ng/mLの範囲内、好ましくは1~100ng/mLの範囲内、より好ましくは3~30ng/mLの範囲内、さらに好ましくは5~20ng/mLの範囲内、より好ましくは7~13ng/mLの範囲内が挙げられる。

30

【0073】

上記のIL-15(インターロイキン15)としては、哺乳動物のIL-15である限り特に制限されないが、培養する腸上皮間リンパ球や腸陰窩オルガノイドが由来する哺乳動物種と同種のIL-15が好ましく挙げられる。かかる哺乳動物のIL-15としては、市販されているIL-15(例えば、Peprotech社製)を用いてもよいし、GenBank等の配列データベースに開示されているIL-15遺伝子のヌクレオチド配列やアミノ酸配列に基づいて化学的に合成したIL-15を用いてもよいし、前述の配列に基づき、遺伝子組換え技術を利用して作製したIL-15を用いてもよい。

30

【0074】

工程Bの培養液におけるIL-15の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、0.1~1000ng/mLの範囲内、好ましくは1~100ng/mLの範囲内、より好ましくは3~30ng/mLの範囲内、さらに好ましくは5~20ng/mLの範囲内、より好ましくは7~13ng/mLの範囲内が挙げられる。

40

【0075】

上記工程Bの培養液として、IL-2、IL-7及びIL-15から選択される1種又は2種以上(好ましくは3種)を含む培養液を用いる場合、かかるインターロイキンを1~3日ごと(好ましくは2日ごと)に培養液に添加することが好ましい。

50

【0076】

さらなる任意成分の1つである上記のRhôキナーゼ阻害物質としては、Sigma-Aldrich社製のY-27632((R)-(+)-trans-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサンカ

ルボキサミドニ塩酸塩 一水和物) や、Tocris Bioscience社製のH 1152 dihydrochloride ((S)-(+)-2-Methyl-1-[ (4-methyl-5-isoquinolinyl)sulfonyl]-hexahydro-1H-1,4-diazepine dihydrochloride) が挙げられ、中でもY-27632が好ましく挙げられる。工程Bの培養液におけるRhoキナーゼ阻害物質の濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程Bの培養液において、2～50 μMの範囲内、好ましくは5～20 μMの範囲内が挙げられる。

#### 【0077】

さらなる任意成分の1つである上記のNotchアゴニストとしては、Jagged 1タンパク質、Delta 1タンパク質、DSLペプチド(Dontu et al., 2004, Breast Cancer Res 6:R605-R615)などが挙げられ、中でも、DSLペプチドが好ましく挙げられる。工程Bの培養液におけるNotchアゴニストの濃度としては、「本発明の維持・増殖方法」や、後述の「本発明の製造方法」に用い得る限り特に制限されないが、例えば、前述の工程Bの培養液において、10～100 μMの範囲内が挙げられる。

10

#### 【0078】

さらなる任意成分の1つである上記の抗生物質としては、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシンなどが挙げられる。

#### 【0079】

上記工程Bの培養液として、Rhoキナーゼ阻害物質、Notchアゴニスト、抗生物質から選択される1種又は2種以上を含む培養液を用いる場合、それ又はそれらを1～3日ごと(好ましくは2日ごと)に培養液に添加することが好ましい。

20

#### 【0080】

上記工程Bの培養液の調製方法としては、上記の基本培養液成分及び必須3成分(小腸必須3成分又は大腸必須3成分)の他、必要に応じて、大腸任意3成分及び/又はさらなる任意成分を、水やPBSなどの液体溶媒に配合させる方法や、基本培養液成分を含む培養液に、上記の必須3成分(小腸必須3成分又は大腸必須3成分)の他、必要に応じて、大腸任意3成分及び/又はさらなる任意成分を配合させる方法を例示することができる。

#### 【0081】

##### (共培養物からのIELの単離)

本発明の維持・増殖方法は、工程Bにより得られた共培養物からIELを単離する工程をさらに含んでいなくてもよいが、該工程を含んでいることが好ましい。共培養物からIELを単離する方法としては以下のような方法が挙げられる。共培養中の「細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイド」を培養液中から取りだした後、細胞外マトリクスを冷却やコラゲナーゼ等で解重合や分解などして、腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを分取する。遠心分離後、上清画分(画分1)を回収する。また、沈殿物を氷上の緩衝液中でインキュベートし、しばらく静置した後、上清画分(画分2)を回収する。さらに、その沈殿物を激しいピペット操作などで破壊し、メッシュフィルター(例えば目開き40 μm)を通過させたものを画分3とする。画分1～3はいずれもIELを含む懸濁液である。画分1～3のいずれかを用いてもよいが、画分1～3を合わせることにより、共培養物中からIELをより効率良く単離することができる。

30

#### 【0082】

##### (本発明の維持・増殖方法により得られる腸上皮間リンパ球)

本発明の維持・増殖方法により得られる「腸上皮間リンパ球」(小腸上皮間リンパ球又は大腸上皮間リンパ球)は、哺乳動物の小腸や大腸の上皮内や、該上皮と粘膜固有層との間などに投与することによって、腸上皮のバリア機能の向上、腸粘膜の恒常性の向上、腸における宿主(哺乳動物)防御機構の向上を図ることができると考えられる。なお、腸上皮のバリア機能の向上や、腸粘膜の恒常性の向上は、腸上皮間リンパ球のうち、主にTIELの投与により実現することができ、腸における宿主防御機構は、主にTIELの投与により実現することができる。

40

#### 【0083】

50

## &lt; 2 . 腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法 &gt;

本発明の「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法」(本明細書において、単に「本発明の製造方法」とも表示する。)としては、

(A) 単離された腸上皮間リンパ球を、腸陰窩オルガノイドと共に、細胞外マトリクスに包埋する工程 A : 及び、

(B) 前記腸陰窩オルガノイドを増殖し得る培養液中で、前記細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを共培養する工程 B :  
を含んでいる限り特に制限されない。

## 【 0 0 8 4 】

本発明の製造方法における上記工程 A 及び工程 B は、特に言及がない限り、前述の本発明の維持・増殖方法における上記工程 A 及び工程 B とそれぞれ同じ工程である。本発明の製造方法により、「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」をインビトロで製造することができる。 10

## 【 0 0 8 5 】

本発明の製造方法は、工程 B により得られた共培養物から「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」を単離する工程をさらに含んでいなくてもよいが、該工程を含んでいることが好ましい。共培養物から「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」を単離する方法としては特に制限されないが、共培養中の「細胞外マトリクスに包埋した腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイド」を培養液中から取りだした後、細胞外マトリクスを冷却やコラゲナーゼ等で解重合や分解などして、腸上皮間リンパ球及び腸陰窩オルガノイドを分取する方法を挙げることができる。 20

## 【 0 0 8 6 】

## &lt; 3 . 腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド &gt;

本発明の「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」(以下、単に「本発明の腸陰窩オルガノイド」とも表示する。)としては、本発明の製造方法により製造される「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」である限り特に制限されない。本明細書において、「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」とは、単離された腸上皮間リンパ球を用いないこと以外は本発明の製造方法と同じ方法で製造した腸陰窩オルガノイドと比較して、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドであることを意味する。かかる「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」として具体的には、工程 B の培養開始から 3 日目において、腸陰窩オルガノイド 1 個あたりの腸上皮間リンパ球の数が、腸上皮間リンパ球と共に培養しない場合の腸陰窩オルガノイド 1 個あたりの腸上皮間リンパ球の数に対して、割合で好ましくは 8 倍以上、より好ましくは 16 倍以上、さらに好ましくは 32 倍以上に増加している腸陰窩オルガノイドを好適に挙げることができる。なお、これらの割合の上限は特に制限されないが、例えば 200 倍以下、100 倍以下などが挙げられる。また、本明細書における「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」には、工程 B の培養開始から 3 日目において、腸陰窩オルガノイド 1 個あたりの腸上皮間リンパ球の数が、好ましくは 2 個以上、より好ましくは 4 個以上、さらに好ましくは 6 個以上である腸陰窩オルガノイドを好適に挙げることができる。なお、腸陰窩オルガノイド 1 個あたりの腸上皮間リンパ球の数の上限は特に制限されないが、例えば 36 個以下、18 個以下などが挙げられる。 30

## 【 0 0 8 7 】

腸陰窩オルガノイド中の腸上皮間リンパ球の数は、例えば、蛍光標識した抗リンパ球抗体を用いた免疫組織化学染色法によって測定することができる。標識した蛍光の検出は、市販の蛍光イメージング装置を用いて行うことができる。

## 【 0 0 8 8 】

また、本発明の製造方法により製造される「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」は、哺乳動物(好ましくはヒト)の腸(小腸又は大腸)に移植して用いる腸疾患の予防・治療剤(予防及び/又は治療剤)として利用することができる。本発明の「腸疾患の予防・治療剤」(以下、単に「本発明の予防・治療剤」とも表示する。)としては、 40

10

20

30

40

50

本発明の製造方法で製造される「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」を含有している限り特に制限されない。

【0089】

かかる腸疾患として具体的には、潰瘍性大腸炎、クローン病などの炎症性腸疾患や、化学療法による腸管傷害や、放射線腸炎等を例示することができる。かかる本発明の予防・治療剤を投与すると、「腸（小腸又は大腸）上皮間リンパ球が増加した腸（小腸又は大腸）陰窩オルガノイド」が腸（小腸又は大腸）上皮に生着し、腸（小腸又は大腸）上皮の傷害を予防・治療することができる。

【0090】

本明細書における「腸疾患の予防・治療効果」とは、腸（小腸又は大腸）疾患の予防効果、若しくは、腸（小腸又は大腸）疾患の治療効果、又は、腸（小腸又は大腸）疾患の予防及び治療効果を含み、腸（小腸又は大腸）疾患の予防効果としては、腸（小腸又は大腸）疾患の発症を予防する効果や、腸（小腸又は大腸）疾患の発症を遅延する効果などを含み、腸（小腸又は大腸）疾患の治療効果としては、腸（小腸又は大腸）疾患の症状を改善する効果や、腸（小腸又は大腸）疾患の症状の悪化を防止若しくは遅延する効果などを含む。なお、本発明の「腸疾患の予防・治療剤」における「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」は、通常の腸陰窩オルガノイドとは異なり、腸上皮間リンパ球が増加しているため、通常の腸陰窩オルガノイド（例えば、特許文献2における通常の大腸陰窩オルガノイド）を用いた場合と比較して、腸上皮のバリア機能、腸粘膜の恒常性、及び、腸における宿主（哺乳動物）防御機構から選択される1種又は2種以上（好ましくは3種）の点について向上を図ることができると考えられる。10

【0091】

本発明の予防・治療剤の投与対象としては、哺乳動物である限り特に制限されず、中でもヒトをより好適に例示することができる。本発明の予防・治療剤に含有させる「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」が由来する哺乳動物種は、投与対象の哺乳動物種と同種であることが好ましい。20

【0092】

本発明の予防・治療剤の投与方法としては、腸疾患を予防・治療し得る限り特に制限されないが、経腸投与、経静脈投与などを例示することができ、中でも、小腸や大腸への経肛門的注腸投与を好適に例示することができる。本発明の予防・治療剤の投与量としては、腸疾患の種類、症状の度合い、投与対象の体重、年齢等にもよるが、 $1 \times 10 \sim 1 \times 10^1 / kg$  の細胞（1～複数回に分けて投与してもよい）を挙げることができる。30

【0093】

本発明の予防・治療剤の調製方法としては、特に制限されず、本発明の製造方法により製造される「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」に、薬学的に許容される通常の担体、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、生理的食塩水等の水溶性溶剤、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等の等張化剤、ヒト血清アルブミン等の安定化剤、メチルパラベン等の保存剤、ベンジルアルコール等の局麻剤などの各種調剤用配合成分を配合する方法を例示することができる。また、本発明の予防・治療剤には、投与対象の腸（小腸又は大腸）上皮への生着効率を向上させる観点から、I型～VIII型の各種コラーゲンやマトリケルといった細胞外基質成分を、より好ましくはマトリケルを、配合することが好ましい。この他、本発明の予防・治療剤には、本発明の製造方法により得られる「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」の他に、他の腸疾患の予防・治療剤を併用することもできる。40

【0094】

<4. 腸上皮間リンパ球の運動性に与える影響を評価する方法>

本発明の「腸上皮間リンパ球の運動性に与える影響を評価する方法」（以下、単に「本発明の評価方法」とも表示する。）としては、

（P）本発明の製造方法により製造される「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」（好ましくは小腸陰窩オルガノイド）に被検物質を接触させる工程P：

10

20

30

40

50

(Q) 工程 P の後に、前記腸陰窩オルガノイドにおける前記腸上皮間リンパ球の運動性を解析する工程 Q :

(R) 工程 Q の解析で得られた運動性を、被検物質を接触させなかった場合の腸陰窩オルガノイドにおける腸上皮間リンパ球の運動性と比較する工程 R :

(S) 工程 R の比較の結果、工程 Q の解析で得られた運動性の方が高い場合は、その被検物質を、腸上皮間リンパ球の運動性を向上させる活性を有する物質であると評価し、工程 Q の解析で得られた運動性の方が低い場合は、その被検物質を、腸上皮間リンパ球の運動性を低下させる活性を有する物質であると評価する工程 S :

を含んでいる限り特に制限されない。

【0095】

上記工程 P としては、本発明の製造方法により製造される「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」に被検物質を接触させる工程である限り特に制限されず、例えば、該腸陰窩オルガノイドを培養する培養液に被検物質を添加する方法が挙げられる。

【0096】

上記工程 Q としては、工程 P の後に、前記腸陰窩オルガノイドにおける前記腸上皮間リンパ球の運動性を解析する工程である限り特に制限されず、例えば、市販の蛍光イメージングにより、腸上皮間リンパ球の運動性を解析する方法が挙げられる。

【0097】

上記工程 R としては、工程 Q の解析で得られた運動性を、被検物質を接触させなかった場合の腸陰窩オルガノイドにおける腸上皮間リンパ球の運動性と比較する工程である限り特に制限されない。

【0098】

上記工程 S としては、工程 R の比較の結果、工程 Q の解析で得られた運動性の方が高い場合は、その被検物質を、腸上皮間リンパ球の運動性を向上させる活性を有する物質であると評価し、工程 Q の解析で得られた運動性の方が低い場合は、その被検物質を、腸上皮間リンパ球の運動性を低下させる活性を有する物質であると評価する工程である限り特に制限されない。

【0099】

腸上皮間リンパ球の運動性を向上させる活性を有する物質は、例えば、腸内の宿主防御機構を活性化させる可能性のある物質等と評価することができ、腸上皮間リンパ球の運動性を低下させる活性を有する物質は、例えば、腸内の宿主防御機構を不活性化させる可能性のある物質等と評価することができる。また、本発明の評価方法は、腸上皮と、腸上皮間リンパ球との動的相互作用（腸上皮と、腸上皮間リンパ球との相互作用であって、かつ、腸上皮間リンパ球の運動性に影響を与える相互作用）を解析するためにも用いることができる。

【0100】

（本発明のその他の態様）

本発明には、「腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドを、哺乳動物に投与することを特徴とする、腸疾患の予防及び／又は治療方法」、「腸疾患の予防及び／又は治療のための、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイド」、「腸疾患の予防及び／又は治療剤の製造における、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの使用」も含まれる。

【0101】

以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例において、インビトロで培養を開始した日にちを、培養後 1 日目とする。

【実施例 1】

【0102】

1. 材料と方法

1 - 1 実験マウス

10

20

30

40

50

EGFPがニワトリ - アクチンプロモーター及びサイトメガロウイルスエンハンサーの制御下で恒常に発現するEGFP組換えC57BL6マウス(EGFP-tgマウス)(文献「Okabe et al., FEBS Lett 1997, 407:313-319.」参照)は、大阪大学から提供された。また、ROSA26遺伝子座内のヒストンH2BのC末端側に融合したEGFPタンパク質をコードする遺伝子が挿入されたR26-H2B-EGFPマウス(文献「Abe et al., Genesis 2011, 49:579-590.」参照)は、理化学研究所(RIKEN)から提供された(アクセション番号CDB0203K)。C57BL6バックグラウンドのマウス及び野生型C57BL6マウスは、東京医科歯科大学(TMDU)の動物施設で飼育、維持された。全ての動物実験は、東京医科歯科大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

## 【0103】

10

## 1-2 小腸陰窩オルガノイドの調製

小腸陰窩を、非特許文献9記載の方法にしたがって10~15週齢の野生型C57BL6マウスから単離し、R-spo1(R-スポンジン1)、EGF及びNogginの存在下で培養した。すなわち、約300個の小腸陰窩を、30 μLマトリゲル(BD Biosciences社製)に懸濁し、24ウェルプレートに置き、室温でマトリゲルを重合させた後、500ng/mL mRspo1(R&D Systems社製)、20ng/ml mEGF(Peprotech社製)及び100ng/ml mNoggin(R&D Systems社製)を含む500μL Advanced DMEM/F12培養液(Life Technologies社製)(以下、「小腸陰窩オルガノイド培養用培養液」と表示する。)を加えた。なお、培養液は、以下の実験で使用する直前まで2日毎に新しい培養液と交換した。

20

## 【0104】

## 1-3 小腸由来のIELの単離

小腸由来IELは、文献(Kohyama et al., Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96:7451-7455)に記載の方法にしたがって単離した。すなわち、10~15週齢のEGFP-tgマウス、又はR26-H2B-EGFPマウスの小腸を、PBSで洗い流し、パイエル板を除去した後5mmの切片に切断した後、Ca、Mgを含まないハンクス平衡塩液に5mMのエチレン-ジニトリロ四酢酸(EDTA)及び1mMの1,4-ジチオ-D-トレオトール(DTT)を含む50mLコニカルチューブ中で37、30分間、150rpmで振盪しながらインキュベートし、目開き300μmナイロンメッシュフィルター及びグラスウールのカラムに通した後、回収された細胞を30%パーコールに懸濁し、20分間800gで遠心分離した。IELは、30分間800g、40/70%パーコール勾配の遠心分離で単離した。単離したIELは、洗浄し、細胞を計数した後、アッセイに用いた。なお、マウス1個体当たり、5~10×10<sup>6</sup>個の生存IELが得られた。また、TCR<sup>+</sup>のIEL集団と、TCR<sup>+</sup>のIEL集団は、単離した全IELを抗マウスTCR-PE抗体(BioLegend社製)、抗マウスTCR-PE Cy7抗体(BioLegend社製)及び抗マウスCD3-APC抗体(Becton Dickinson社製)で染色した後、FACS ARIA II(Becton Dickinson社製)にてソートすることにより調製した(純度>99%)。

30

## 【0105】

30

## 1-4 小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養

40

上記「1-2 小腸陰窩オルガノイドの調製」の項目に記載の方法にしたがって調製した小腸陰窩オルガノイドを2日間培養した後、Cell Recovery Solution(Corning社製)を添加し、氷上で30分間インキュベートすることにより全マトリゲルを解重合させ、小腸陰窩オルガノイドをマトリゲルから回収し、洗浄した後、小腸陰窩オルガノイド100個と、上記「1-3 小腸由来のIELの単離」の項目に記載の方法にしたがって単離したIEL 1.0×10<sup>5</sup>個とを、24ウェルプレート上の400μL DMEM培養液中で混合した。37で30分間インキュベートした後、前記混合物を回収し、1分間200gで遠心分離した後、沈殿物(ペレット)を30μLのマトリゲルに懸濁し、24ウェルプレート上に移した。室温でマトリゲルを重合させた後、小腸陰窩オルガノイド培養用培養液500μL、又は100U/ml 組換えヒトIL-2(Roche社製)、10ng/

50

mL マウスIL-7 (Peprotech社製) 及び 10ng/mL マウスIL-15 (Peprotech社製) を含有する小腸陰窩オルガノイド培養用培養液（以下、「+IL-2/IL-7/IL-15 小腸陰窩オルガノイド培養用培養液」と表示する。）500μLをウェルに加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で7日間培養を行った。なお、培養液は、2日毎に新しい培養液と交換した。

#### 【0106】

##### 1 - 5 小腸陰窩オルガノイドとIELとの共培養物からのIELの単離

上記「1 - 4 小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養」の項目に記載の方法にしたがって小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養を行った後、Cell Recovery Solution (Corning社製) を添加し、氷上で30分間インキュベートすることにより全マトリゲルを解重合させ、小腸陰窩オルガノイドをマトリゲルから回収した後、500gで5分間の遠心分離後、上清画分（画分1）を回収した。また、沈殿画分中に含まれるIELを回収するために、沈殿物を10分間氷上で5mM EDTA / PBS中でインキュベートし、さらに1分間静置することにより沈殿物を堆積させた後、上清画分（画分2）を回史した。さらに、その後に得られた沈殿画分中に含まれるIELを回史するために、沈殿物を激しいピペット操作を行って機械的に破壊し、その後40μmのナイロンメッシュフィルターを通過させたものを画分3とした。画分1～3を合わせたものをIEL懸濁液とした。なお、7日目以降のIELの培養は、7日目のIEL懸濁液中に含まれるEGFP陽性(+)のIELを、血球計により計数した後、上記「1 - 4 小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養」の項目に記載の方法にしたがって小腸陰窩オルガノイドと共に培養することにより行った。

#### 【0107】

##### 1 - 6 免疫組織染色及び小腸陰窩オルガノイドの三次元イメージング解析

上記「1 - 4 小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養」の項目に記載の方法等にしたがって得られた小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養物を、4%パラホルムアルデヒド溶液中で40分間固定処理し、0.2% Triton-X含有PBS溶液中で30分間透過処理した後、2%BSA及び0.2% Triton-Xを含むPBS溶液中で40分間ブロッキング処理を行った（全て室温で処理した）。一次抗体（マウス抗CD3抗体 [Becton Dickinson社製]、及びマウス抗CD4抗体 [Santa Cruz Biotechnology社製]）を一晩4度インキュベートし、一次抗体を認識する蛍光物質で標識した二次抗体（抗マウスAlexa Fluor 488抗体、及び抗マウスAlexa Fluor 594抗体 [すべてLife Technologies社製]）による抗体反応処理を1.5時間室温で行った。細胞核は、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドールジヒドロクロリド（DAPI）で染色し、免疫染色試料はその後Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories社製) で封入し、顕微鏡により観察した。小腸陰窩オルガノイドの三次元イメージング解析は、室温でFluoview FV10iシステム(Olympus社製)で行い、蛍光画像は、0.85μmのzステップでOlympus 60x対物レンズ(1.35N.A.)を用いて取得した。なお、観察できる最大の深さは250μmであったので、培養又は共培養の開始後2日間培養したオルガノイド全体をカバーするのに十分であった。また、z-スタック画像は、必要に応じてAdobe Photoshopソフトウェアで加工した。

#### 【0108】

##### 1 - 7 フローサイトメトリー

上記「1 - 3 小腸由来のIELの単離」及び「1 - 5 小腸陰窩オルガノイドとIELとの共培養物からのIELの単離」の項目に記載の方法にしたがって単離したIELを、0.2% FCS含有PBS溶液中に5×10<sup>5</sup>細胞の濃度で懸濁し、室温で10分間、0.2% FCS含有PBS溶液に1:100で希釈した抗CD16/CD32抗体(BioLegend社製) 中でFcRブロッキング処理を行った後、FACS Canto II (BD Biosciences社製) によるフローサイトメトリー解析を行った。前方散乱光(FSC)及び側方散乱光(SSC)の環境(setting)を用いて、サイズ及び粒度に基づいたリンパ球(IEL)と腸上皮細胞(IEC)の分離を行った。また、TCR<sup>+</sup>のIEL集団(

10

20

30

40

50

サブセット)と、T C R + の I E L サブセットを定義するために、抗 T C R - - P E 抗体及び抗 T C R - - P E C y 7 抗体を、最適濃度で使用した。

#### 【0109】

また、細胞内染色は、4% パラホルムアルデヒド溶液中で細胞を固定処理し、Perm II 試薬 (Becton Dickinson社製) で透過処理した後、抗 Ki-67-660 eFluor抗体 (eBio science社製) 又は抗ホスホ-E R K - Alexa 647 抗体 (Cell Signaling社製) 存在下で1時間、室温で抗体反応処理を行った。なお、細胞表面染色の場合は、上記抗体反応処理は、4°で20分間行った。

#### 【0110】

##### 1-8 タイムラプス (Time-lapse) 蛍光イメージング

タイムラプス蛍光イメージングは、Insight SSI光源を有する蛍光顕微鏡IX-71 (Olympus社製) が組み込まれたDeltaVisionシステム (Applied Precision社製) を用いて行った。すなわち、タイムラプス蛍光イメージングは、細胞を含むガラスボトムディッシュ (glass-bottom culture dish) を、チャンバーで覆われた上記顕微鏡のステージ上に置き、5% CO<sub>2</sub> 及び 95% air からなる加湿した既混合ガスが注入され、かつ 37°で温度制御された条件下で行った。イメージングを開始する前に、細胞核を 30 分間、1 μg / mL Hoechst 33342 (Nacalai Tesque社製) で染色した。また、5 μM P D 184 352 は、イメージングを開始する 1 時間前に培養液に添加した。核及び E G F P の蛍光画像は、CoolSnap ES2デジタルカメラ (Roper Scientific社製) 上のUplansApo 20x 対物レンズ (0.75 N.A.) により取得した。単一面イメージングは、2時間、20秒間隔で行った。多面イメージングは、10分間、30秒間隔で行い、一度に 5 μm ステップで z スタックを取得した。これらの z スタックの最大強度の投影データを得るために Soft Worx ソフトウェア (Applied Precision社製) を使用した。

#### 【0111】

##### 1-9 I E L 運動解析

イメージングデータを Imaris 7.5 (Bitplane社製) ソフトウェアにインポートした。IEL の核は、その後 Imaris のスポット追跡特徴 (spot tracking feature) を使用して個別に判定し、サイズ予測 (size estimate) は 10 μm であった。核の遊走は、ソフトウェアの「自己回帰運動」追跡アルゴリズムによって分析した。1つのトラック (track : 軌跡) が、期間全体を通して同じ核に続くことを確認するために、トラックを視覚的に確認した。データセットは、3D マトリゲル領域 (データ獲得スペース) から得た情報からなるものであるが、スポット (核) の判定は、このデータ獲得スペースの表面に達するために十分に近い場合に不正確であることが多かった。このような周辺効果を避けるために、Imaris のフィルタリング機能を使用して外側データ獲得空間よりも 10 μm 短い x y z 方向に沿ったエッジを有するより小さい直方体 (内側直方体 ; inner cuboid) を規定した。観察期間の 80% を超えてこの Inner cuboid 内に留まった核のみを統計分析に使用した。平均速度 (Mean Speed)、最大速度 (Max Speed)、トラックの長さ (track length)、及び核の転位 (Displacement of nuclei) の計算は、Imaris ソフトウェアを使用して行った。

#### 【0112】

##### 1-10 大腸陰窩オルガノイドの調製

大腸陰窩を、特許文献 2 (国際公開第 2013 / 061608 号パンフレット) 記載の方法にしたがって、7~9 週齢の野生型 E G F P - t g マウスから単離し、血清アルブミン (B S A)、W n t 3 a、R - スポンジン 1、上皮細胞増殖因子 (E G F)、肝細胞増殖因子 (H G F)、及び、ノギン (N o g g i n) の存在下で培養した。すなわち、2000 個の大腸陰窩を I 型コラーゲン溶液 (Nitta Gelatin Inc. 社製) 200 μl に懸濁し、48 ウェルプレートに載置した。コラーゲンの重合後、各ウェルに、1% B S A (Sigma社製)、30 ng / mL の m W n t 3 a (R&D Systems社製)、500 ng / mL のマウス (m) R s p o 1 (R&D Systems社製)、20 ng / mL の m E G F (Peprotech社製)、50 ng / mL の m H G F (R&D Systems社製) 及び 50 ng / mL の m N o g g i n

10

20

30

40

50

(R&D Systems社製)を含有する $500\mu\text{l}$ のアドバンストD MEM/F 1 2を加えた(以下、「T M D U 培養液」とも表示する。)。この培養液を2日毎に交換した。継代を行うため、X I型コラゲナーゼを含有するD MEMにおいて全ゲルを37で5分間消化し、回収した大腸陰窩オルガノイドをB S A含有P B Sで洗浄した。この大腸陰窩オルガノイド沈殿物を2mMのE D T A及び0.5%B S Aを含有するP B Sに懸濁し、激しく振盪した。これにより脱凝集した大腸陰窩オルガノイド小塊をI型コラーゲン溶液と混合して継代培養に使用した。単一細胞から複数細胞による細胞塊までの継代培養に用いる細胞塊の大きさは、顕微鏡下で観察しながらE D T A処理時間を調節した。細胞増殖後の最初の2日間、R h oキナーゼ阻害剤Y - 2 7 6 3 2を $10\mu\text{M}$ となるように培養液に加えた。杯細胞の分化を誘導する場合には、-セクレターゼ阻害剤L Y - 4 1 1 , 5 7 5( $100\text{nM}$ )で大腸オルガノイドを所定期間にわたり処理した。

10

## 【0 1 1 3】

## 1 - 1 1 大腸陰窩オルガノイドとI E Lの共培養

上記「1 - 1 0 大腸陰窩オルガノイドの調製」の項目に記載の方法にしたがって調製した大腸陰窩オルガノイドを2日間培養した後、X I型コラゲナーゼを培養液に添加して全ゲルを37で5分間消化し、大腸陰窩オルガノイドをコラーゲンから回収した。大腸陰窩オルガノイドをB S A含有P B Sで洗浄した後、かかる大腸陰窩オルガノイド100個と、上記「1 - 3 小腸由来のI E Lの単離」の項目に記載の方法にしたがって単離したI E L $1.0 \times 10^5$ 個とを、24ウェルプレート上の $400\mu\text{l}$  D MEM培養液中で混合した。37で30分間インキュベートした後、前記混合物を回収し、1分間200gで遠心分離した後、沈殿物(ペレット)をI型コラーゲン溶液(Nitta Gelatin Inc.社製) $200\mu\text{l}$ に懸濁し、24ウェルプレート上に移し、コラーゲンが重合するまで静置した。前述のT M D U 培養液にI L - 2、I L - 7及びI L - 1 5を添加して、 $100\text{U}/\text{mL}$ 組換えヒトI L - 2(Roche社製)、 $10\text{ng}/\text{mL}$ マウスI L - 7(Peprotech社製)及び $10\text{ng}/\text{mL}$ マウスI L - 1 5(Peprotech社製)を含有するT M D U 培養液(以下、「+I L - 2 / I L - 7 / I L - 1 5 T M D U 培養液」とも表示する。)を調製した。前述のコラーゲンが重合した後、24ウェルプレートの各ウェルに、「+I L - 2 / I L - 7 / I L - 1 5 T M D U 培養液」を $500\mu\text{l}$ ずつに加え、37、5%CO<sub>2</sub>条件下で7日間培養を行った。なお、培養液は、2日毎に新しい培養液と交換した。

20

## 【0 1 1 4】

## 1 - 1 2 大腸陰窩オルガノイドとI E Lの共培養物からのI E Lの単離

上記「1 - 1 1 大腸陰窩オルガノイドとI E Lの共培養」の項目に記載の方法にしたがって大腸陰窩オルガノイドとI E Lの共培養を行った後、X I型コラゲナーゼを培養液に添加して全ゲルを37で5分間消化し、大腸陰窩オルガノイドをコラーゲンから回収した。この後のI E Lの単離処理及び計数処理は、上記「1 - 5 小腸陰窩オルガノイドとI E Lとの共培養物からのI E Lの単離」の項目に記載の方法にしたがって行った。このようにして、大腸陰窩オルガノイドとI E Lの共培養物からI E Lを単離し、及び、I E Lを計数した。

30

## 【0 1 1 5】

## 2 . 結果及び考察

## 2 - 1 小腸陰窩オルガノイド中に存在するI E Lのインビトロ培養

小腸陰窩オルガノイド存在下で、I E Lをインビトロで培養・維持する方法の開発を行うために、本発明者らは先ず、従来の小腸陰窩オルガノイドの培養方法によって、該小腸陰窩オルガノイドに存在するI E Lを培養・維持できるかどうかを確認した。上記「1 - 2 小腸陰窩オルガノイドの調製」の項目に記載の方法にしたがって小腸陰窩オルガノイドを単離・培養し、上記「1 - 6 免疫組織染色及び小腸陰窩オルガノイドの三次元イメージング解析」の項目に記載の方法にしたがって免疫組織染色を行ったところ、培養後1日目の小腸陰窩オルガノイドにおいてCD3<sup>+</sup>T細胞(I E L)が検出された(図1Aの矢頭参照)。小腸陰窩オルガノイドにおけるI E L数を計測したところ、小腸陰窩オルガノイド1個当たりのI E L数は $0.21 \pm 0.06$ (n = 90)であり、I E Lが検出さ

40

50

れた小腸陰窩オルガノイドの割合は 16% (n = 90) であった。一方、培養後 3 日目及び 7 日目についても同様に解析したが、小腸陰窩オルガノイドにおいて CD3<sup>+</sup>T 細胞 (IEL) は検出されなかった。これらの結果は、従来の小腸陰窩オルガノイドの培養方法では、小腸陰窩オルガノイドに存在する IEL を中長期的に培養・維持することはできないことが示された。したがって、通常の当業者であれば、小腸陰窩オルガノイドを、IEL の培養・維持に用いるという発想は持つことができなかつた。しかし、本発明者らは、通常の当業者の発想にはとらわれずに自由な発想で検討を重ねた結果、小腸組織から IEL を単離し、該 IEL を小腸陰窩オルガノイドと共に培養するなどすれば、IEL を中長期的に培養・維持できる可能性があるのではないかと考えた。

【0116】

10

## 2 - 2 小腸陰窩オルガノイドと IEL との共培養

小腸組織から IEL を単離し、小腸陰窩オルガノイドと共に培養した場合に、IEL を培養・維持できるかどうか検討した。上記「1 - 4 小腸陰窩オルガノイドと IEL の共培養」の項目に記載の方法にしたがって小腸陰窩オルガノイドと IEL の共培養を小腸陰窩オルガノイド培養用培養液中で行い、培養後 3 日目において上記「1 - 6 免疫組織染色及び小腸陰窩オルガノイドの三次元イメージング解析」の項目に記載の方法にしたがって免疫組織染色を行ったところ、EGFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 細胞 (IEL) が検出された (図 1B の矢頭及び矢印参照)。また、小腸陰窩オルガノイド 1 個当たりの IEL 数は 6.9 ± 0.8 (n = 24) であり、IEL が検出された小腸陰窩オルガノイドの割合は 100% (n = 24) であった。この結果は、単離した IEL を小腸陰窩オルガノイドと共に培養すると、培養後少なくとも 3 日目までは効率よく IEL を培養・維持できることを示している。また、興味深いことに、EGFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 細胞 (IEL) は、小腸陰窩オルガノイド内部だけでなく、小腸陰窩オルガノイドと接触しない状態で小腸陰窩オルガノイド外部に存在していた (図 1B の矢印参照)。一方で、単離した IEL のインビトロでの生存期間は、サイトカインの補充や TCR 刺激がない条件下では、48 時間未満の期間に制限されることが報告されている (「Brunner et al., Cell Death Differ 2001, 8:706-714」、及び「Lai et al., J Immunol 1999, 163:5843-5850」参照)。かかる報告と、上記本実施例の結果 (培養後少なくとも 3 日目までは効率よく IEL を培養・維持することができた) を総合的に考慮すると、単離した IEL を小腸陰窩オルガノイドと共に培養する方法は、IL-2 や IL-7 や IL-15 を用いない従来の方法と比較して、IEL をより長い期間維持することができる事が示された。また、小腸陰窩オルガノイド外部でも IEL が生存・維持できることから、一見接觸しては見えないこれら IEL も、同一培養内に共存する小腸陰窩オルガノイドから生存・維持に関与する作用を受けている可能性が考えられる。

20

【0117】

30

小腸陰窩オルガノイドと IEL の共培養をその後 7 日目まで行ったものの、検出される IEL の割合は減少した。一方、様々なサイトカインが IEL の生存及び増殖に関与することが報告されており、特に、TCR<sup>+</sup> の IEL 集団、及び TCR<sup>+</sup> の IEL 集団を IL-2、IL-7 及び IL-15 の存在下で培養すると、様々なメカニズムを介してこれら IEL 集団の生存期間が延びることが報告されている (非特許文献 5、「Inagaki-Ohara et al., Eur J Immunol 1997, 27:2885-2891」、「Lai et al., J Immunol 1999, 163:5843-5850」、「Yada et al., Cell Immunol 2001, 208:88-95」参照)。そこで、IL-2、IL-7 及び IL-15 存在下で IEL と小腸陰窩オルガノイドの共培養を行った場合に、IEL の生存期間が延びるかどうか検討した。上記「1 - 4 小腸陰窩オルガノイドと IEL の共培養」の項目に記載の方法、及び、上記「1 - 5 小腸陰窩オルガノイドと IEL との共培養物からの IEL の単離」の項目に記載の方法にしたがって小腸陰窩オルガノイドと IEL の共培養を 14 日目まで「+ IL-2 / IL-7 / IL-15 小腸陰窩オルガノイド培養用培養液」中で行い、培養後 1 ~ 14 日において上記「1 - 6 免疫組織染色及び小腸陰窩オルガノイドの三次元イメージング解析」の項目に記載の方法にしたがって免疫組織染色を行ったところ、少なくとも 7 日目又は 14 日目まで EGFP

40

50

P<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T細胞（IEL）集団の割合は増加したことが示された（図2A～C参照）。例えば図2Aには、1日目、3日目、7日目と、培養日数が経過するにつれて、IELのEGFP蛍光（図2Aの白い小さな白っぽい点）が増加したことが示されている。また、図2Bには、7日目において、CD3の蛍光（図2B上段）とEGFPの蛍光（図2B下段）の位置が一致しており、IELが、オルガノイドの上皮の細胞間などに存在していることが示されている。また、図2Cには、培養後14日目において、IELのEGFP蛍光（図2Cの白い小さな白っぽい点）が増加したことが示されている。なお、7日目的小腸陰窩オルガノイドは、三次元イメージング解析するには大きすぎたので、上記「1-5 小腸陰窩オルガノイドとIELとの共培養物からのIELの単離」の項目に記載の方法にしたがってIELを単離し、上記「1-7 フローサイトメトリー」の項目に記載の方法にしたがってEGFP<sup>+</sup>T細胞（IEL）数を測定したところ、6～7日間でIELの数が約2倍となることが明らかとなつた（図3A参照）。この結果は、IELをIL-2、IL-7、及びIL-15存在下で小腸陰窩オルガノイドと共に培養すると、少なくとも14日間は、IELが増殖・維持されることを示すとともに、小腸陰窩オルガノイドとの共培養開始後14日目でIELの数を約4倍まで増殖できることを示している。

10

#### 【0118】

次に、小腸陰窩オルガノイドとの共培養により、IEL集団に含まれる特定の細胞集団ではなく、IEL集団全体が増殖することを確認するために、TCR<sup>+</sup>のIEL集団と、TCR<sup>+</sup>のIEL集団の増殖を解析した。上記「1-7 フローサイトメトリー」の項目に記載の方法にしたがって、小腸陰窩オルガノイドとの共培養後1日目及び7日目におけるTCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団の比率を測定したところ、1日目と、7日目及び14日目において、これらIEL集団の比率に大きな変化は認められなかつた（図3B及びD参照）。また、TCR<sup>+</sup>及びTCR<sup>+</sup>のIEL集団において、細胞増殖マーカーであるKi-67の発現を解析したところ、いずれのIEL集団においてもその大部分がKi-67陽性であった（図3C及びE参照）。これらの結果は、小腸陰窩オルガノイドとの共培養により、IEL集団に含まれる特定の細胞集団ではなく、IEL集団全体が増殖することを示している。

20

#### 【0119】

以上の結果は、IEL集団の多様性に影響を及ぼすことなく、IEL集団をインビトロで増殖・維持できる新規培養システムが開発されたことを示している。

30

#### 【0120】

次に、単離したIELを小腸陰窩オルガノイドと共に培養して、IELを培養・維持する際に用いるIL-2、IL-7及びIL-15のうち、IELの培養・維持にいずれが必須かを検討した。上記「1-4 小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養」の項目に記載の方法にしたがって小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養を小腸陰窩オルガノイド培養用培養液中で行った。ただし、3種のILのうち、いずれか1種のILを用いた実験や、いずれのILも用いない実験も行った。これらの実験におけるILの濃度は、上記「1-4 小腸陰窩オルガノイドとIELの共培養」の項目に記載の方法における濃度にしたがつた。培養後1日目及び7日目において、上記「1-7 フローサイトメトリー」の項目に記載の方法にしたがってEGFP<sup>+</sup>T細胞（IEL）数を測定した。その結果を図4Aに示す。

40

#### 【0121】

図4Aの結果から分かるように、3種のILのうち、IL-7やIL-15を単独で用いた場合は、培養後7日目（Day7）でIEL数はDay1より減少するものの、3種のILのいずれをも添加しない場合にIELが全く生存できないのと比べ、生存IEL数の改善が見られた。また、3種のILのうち、IL-2を単独で用いた場合は、培養後7日目のIEL数が、培養後1日目のIEL数に対して、約1.8倍にまで増加した。この結果から、3種のILとともにIELの生存や増殖を促進する作用を有し、中でもIL-2にこの作用が強いことが示された（図4A）。実際に、3種のIL（IL-2、IL-7及びIL-15）を併用した場合は、培養後7日目のIEL数が、培養後1日目のIEL

50

数に対して、約3倍にまで増加した(図4A)。すなわち、3種のIL(IL-2、IL-7及びIL-15)を併用した場合は、IL-2を単独で用いた場合に対して、培養後7日目のIEL数が、約1.7倍にまで増加した(図4A)。これらの結果から、単離したIELを小腸陰窩オルガノイドと共に培養して、IELを培養・維持すること等のために、3種のILのうち、少なくともIL-2を用いることが特に好ましく、IL-2に加えてさらにIL-7及びIL-15を併用すると、IELの増殖効率の点で顕著な効果が得られることが示された。

## 【0122】

## 2-3 大腸陰窩オルガノイドとIELとの共培養

小腸組織から単離したIEL(すなわち、小腸上皮間リンパ球)を、小腸陰窩オルガノイドと共に培養した場合だけでなく、大腸陰窩オルガノイドと共に培養した場合であっても、IELを培養・維持できるかどうか検討した。

## 【0123】

上記「1-11 大腸陰窩オルガノイドとIELの共培養」の項目に記載の方法にしたがって大腸陰窩オルガノイドとIELの共培養を「+IL-2/IL-7/IL-15TMDU培養液」中で行った。培養後1日目及び7日目にそれぞれ、上記「1-12 大腸陰窩オルガノイドとIELの共培養物からのIELの単離」の項目に記載の方法にしたがってIELを単離し、上記「1-7 フローサイトメトリー」の項目に記載の方法と同様の方法にしたがってEGFP<sup>+</sup>T細胞(IEL)数を測定した。その結果を図4Bに示す。意外なことに、小腸上皮間リンパ球は、大腸陰窩オルガノイドと共に培養した場合であっても、培養・維持できることが示された。6~7日間でIELの数が約1.86倍となることが明らかとなった(図4B)。IEL数のこの増加の程度は、小腸陰窩オルガノイドと共に培養した場合(図3Aの7日目)と比較すると若干劣るもの、かかる方法は、IELを培養・維持するための優れた方法であることが示された。

## 【0124】

## 2-4 小腸陰窩オルガノイドにおけるIELの運動性解析

次に、上記「1-8 タイムラプス(Time-lapse)蛍光イメージング」及び「1-9 IEL運動解析」の項目に記載の方法にしたがって共培養後3日目におけるIELと小腸陰窩オルガノイド間の動的相互作用について解析したところ、大部分のEGFP<sup>+</sup>T細胞(IEL)は、高い運動性を有することが示された(図5A参照)。この單一面イメージングでは、正確な三次元的情報を取得することはできなかったものの、焦点が合った画像でも焦点が外れた状態でも移動を示したことから、多くのEGFP<sup>+</sup>T細胞(IEL)がz軸に沿って遊走することが示された。また、小腸陰窩オルガノイドに接触するIELは、上皮单分子層の基底側に沿ってランダム方向に、その細胞形状を連続的かつ大規模に変化させながら遊走することが示された(図5Aの上段参照)。これらのIELは、その細胞質突起又は構造全体を、上皮細胞間に挿入し、上皮細胞の外側面との接触を可能にした(図5Aの上段参照)。また、小腸陰窩オルガノイドの外側にとどまるIELも運動性を有することが示された。これらのIELのいくつかが、小腸陰窩オルガノイドに向かって遊走し、小腸陰窩オルガノイドと直接接触し、その中に一時的にとどまり、その後出ていく様子が観察された(図5Aの下段参照)。これらの結果は、本発明者らが開発した共培養システムにおいて、IELは、高い運動性を有し、多くのIECと接触することを示している。さらに、IELが、この共培養システムにおいて、小腸陰窩オルガノイドに進入し及び小腸陰窩オルガノイドから退出することができ、IECとの接触状況を変化させることができた。これは、IELとIECの接触が、IELの生存期間を伸ばしたり、IELの増殖を刺激したりすることにより、IELの全体的な増殖を導くことに関与していることが考えられる。

## 【0125】

次に、IELの遊走活動を定量的に解析した。EGFP-tgマウス由来のEGFP<sup>+</sup>T細胞(IEL)を用いた場合には、かかるEGFP<sup>+</sup>T細胞の非対称で変形した形状、及び量の多さは、特に2つのEGFP<sup>+</sup>T細胞が極めて接近したときに、適切に個別の細

10

20

30

40

50

胞の中心を定義することができなかった。このため、融合パートナーヒストンH2Bが局在している核だけがEGFPで標識されるR26-H2B-EGFPマウスに由来するEGFP<sup>+</sup>T細胞(IEL)を用いて、IELと小腸陰窩オルガノイド間の動的相互作用について解析を行うことにした(図5B参照)。その結果、H2B-EGFP<sup>+</sup>T細胞(IEL)を野生型オルガノイドと共に培養し、10分間、30秒間隔でイメージングを行い、一度に約20枚のzスタック画像を取得したところ、zスタック画像の最大値投影(maximum intensity projection)により、個々の細胞核はこの方法で明確に検出できることが示された(図5C参照)。その結果、小腸陰窩オルガノイドの上皮層に沿って遊走するIELを観察でき、小腸陰窩オルガノイド内や外へと動的に遊走するIELも観察できた。

## 【0126】

10

三次元データを復元して、画像処理ソフトウェアを使用してIELの遊走パラメーターを測定した。実際には、空間の表面に達した核の正確でない追跡を避けるために、より小さい空間を定義し、観察期間の80%を超える間その中にとどまつた細胞だけを分析した。その結果を図5Bに示す。図5BにおけるIELの遊走の平均速度は5.07±0.27μm/分であり、最大速度は9.67±0.60μm/分であった(図5C、及び表1参照)。

## 【0127】

## 【表1】

IEL		平均速度(μm/分) (Mean Speed)	最大速度(μm/分) (Max Speed)	トラック長(μm) (Track Length)	転位(μm) (Displacement)	直線度 (Straightness)
全IEL	(n=85)	5.07±0.27	9.67±0.60	49.57±2.65	18.74±1.47	0.37±0.02
TCRαβ <sup>+</sup> IEL	(n=112)	5.72±0.23	10.69±0.46	56.45±2.33	21.22±1.33	0.37±0.02
TCRαβ <sup>+</sup> IEL + PD184352	(n=185)	4.51±0.18*	8.43±0.36*	44.55±1.74*	15.57±0.91*	0.35±0.01
TCRγδ <sup>+</sup> IEL	(n=154)	5.29±0.19	10.05±0.33	51.96±1.86	17.57±0.95	0.33±0.02
TCRγδ <sup>+</sup> IEL + PD184352	(n=176)	5.06±0.15	9.64±0.30	49.53±1.49	16.02±0.80	0.32±0.01

20

30

表中の数値は、平均値±標準偏差(SEM)を示す。

表中「\*」は、PD184352未処理のTCRαβ<sup>+</sup>IELに対するunpaired two-tailed Student's t testを用いて、統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

## 【0128】

一方、共焦点顕微鏡を用いてTCR<sup>+</sup>のIELの運動性パラメーターをインビボで評価したところ、平均速度及び最大速度はそれぞれ3.8±0.1μm/分及び7.7μm/分であることが報告されている(非特許文献6)。本実施例で得られた結果は、上記インビトロでの結果を支持することが示された。また、TCR<sup>+</sup>のIELと、TCR<sup>+</sup>

40

のIELの遊走について両者を比較して解析したところ、両者に顕著な違いは認められなかった(図5Dの上段、及び表1参照)。この結果は、TCR<sup>+</sup>のIELが、本質的にTCR<sup>+</sup>のIELと同等の運動性を有することを示している。

## 【0129】

IELとIECの相互作用に影響を与える因子や要因については、依然として不明な点が多い。インビボ実験において、TNF-<sup>-</sup>の投与が、TCR<sup>+</sup>のIELの遊走や上皮組織内における滞留を変更することが報告されている(非特許文献6)。TNF-<sup>-</sup>(10ng/ml)で前処理し、IELの運動解析を行ったところ、IELの動態に変化は認められなかった。一方、MEK1/MEK2の阻害剤であるPD184352で前処理した上で、IELの運動解析を行ったところ、TCR<sup>+</sup>のIELの遊走は約20%減

50

少したのに対して、 $\text{TCR}^+$ のIELの遊走については変化が認められなかった（図5Dの下段、及び表1参照）。興味深いことに、フローサイトメトリーによる解析から、ERKのリン酸化は、 $\text{TCR}^+$ のIELと、 $\text{TCR}^+$ のIELの両方のサブセットで同レベルで生じることが示された（図5E参照）。これらの結果は、MEK1/MEK2が同様に全IEL集団で活性化されても、MEK1/MEK2-ERKカスケードが、細胞間遊走活性に関与しているかどうかは、細胞の種類に依存することを示唆している。このように、本発明者らが開発した共培養システムは、IELとIECのインビトロの相互作用を制御するメカニズムを解析するための有用なツールとなることが期待される。

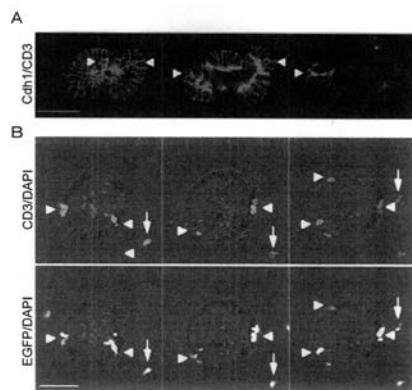
#### 【産業上の利用可能性】

10

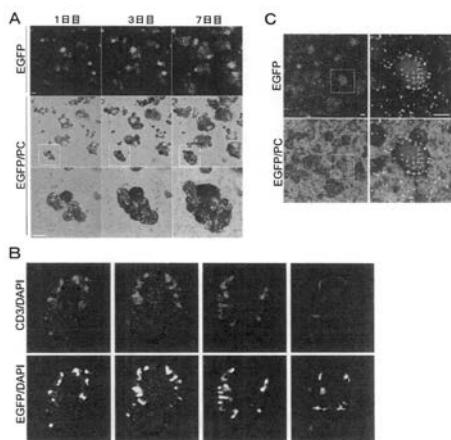
#### 【0130】

本発明は、腸上皮間リンパ球をインビトロで維持・増殖させる方法や、腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドの製造方法や、該製造方法により製造される腸上皮間リンパ球が増加した腸陰窩オルガノイドを提供することができる。

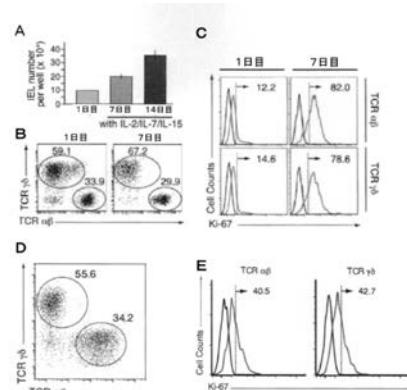
【図1】



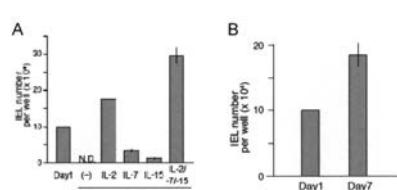
【図2】



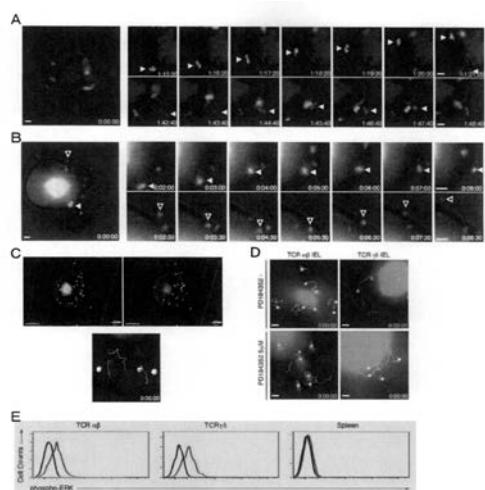
【図3】



【図4】



【図5】



---

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 1/04 (2006.01) A 6 1 P 1/04

(74)代理人 100141391  
弁理士 園元 修一  
(74)代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕  
(72)発明者 渡辺 守  
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内  
(72)発明者 中村 哲也  
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内  
(72)発明者 野崎 賢吾  
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内  
F ターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC20 BB19 BB25 BC03 BC07 BD45  
4C087 AA01 AA03 BB37 BB50 CA04 NA20 ZA66