

明 細 書

発明の名称：大腸上皮細胞の長期間培養

技術分野

[0001] 本発明は、大腸上皮細胞由来の細胞外小胞の調製方法及び大腸上皮細胞の長期間培養方法に関する。

背景技術

[0002] R h o - a s s o c i a t e d k i n a s e (R O C K) 阻害剤は、ヒト胚性幹細胞の生存に寄与することが報告されている（非特許文献1）。また、R O C K の生体幹細胞培養における作用について、P A K 1 - R O C K - M y o s i n I I 及びT G F - β シグナリグを阻害することにより、上皮幹細胞を i n v i t r o で長期間増殖させることができること（非特許文献2）、R O C K 阻害と細胞外C a ²⁺濃度の調節により、鼻粘膜上皮細胞の増殖が可能であること（非特許文献3）、R O C K 阻害剤の存在下で羊膜上皮細胞由来生体幹細胞を培養すること（特許文献1）が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2009/061024号

非特許文献

[0004] 非特許文献1：N a t B i o t e c h n o l 25, 681-686 (2007) .

非特許文献2：C E L L R E P O R T S 25, 598-610 (2018) .

非特許文献3：S c i R e p 10, 16853 (2020) .

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、従来大腸上皮細胞を長期間培養することは難しかった。このため、大腸上皮細胞の異常を原因とする疾患や疾病について i n v i t r o で

細胞を用いた試験を行う場合には、試験するごとに細胞を作成する必要がある。また、長期間にわたる大腸上皮細胞への薬剤の効果や作用を試験することができないという問題があった。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、大腸上皮細胞を長期間培養することが可能な方法について探索した結果、ROCK阻害剤の存在下で大腸上皮細胞を培養することにより、長期間培養することができることを見出し、本発明を完成させた。

発明の効果

[0007] 本発明の方法により、大腸上皮細胞を長期間培養することが可能である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] (A) 各被験化合物存在下での細胞培養時の細胞数を示すグラフである。縦軸は細胞数を示す。Y存在下での培養によって長期培養が可能であり、形態の変化も認められなかった。(B) 細胞培養開始から1日目(Day 1)、21日目(Day 21)、35日目(Day 35)、56日目(Day 56)、及び72日目(Day 72)における、薬剤非存在下(Y(-))及びY存在下(Y(+))の細胞を撮影した写真である。

[図2]細胞培養開始から28日目(Day 28)、35日目(Day 35)、及び72日目(Day 72)における薬剤非存在下(Y(-))又はY存在下(Y(+))で培養された培養上清中の粒子数濃度(particles/mL)を示すグラフである。縦軸は粒子濃度(粒子/mL)、横軸は粒子径(nm)を表す。「P」はpassage、その後に続く数字は細胞の継代数を表す。Y存在下であっても放出される小胞の粒子径に変化は認められない。

[図3]細胞培養開始から28日目(Day 28)、35日目(Day 35)、及び72日目(Day 72)における薬剤非存在下(Y(-))又はY存在下(Y(+))で培養された培養上清中の粒子数濃度(particles/mL)を示すグラフである。「P」はpassage、その後に続く数字は細胞の継代数を表す。

[図4]培養上清中のCD9 (+) エクソソーム及びCD63 (+) エクソソームに基づくシグナル強度を示すグラフである。縦軸はシグナル強度を示す。

「P」はpassage、その後に続く数字は細胞の継代数を表す。

発明を実施するための形態

[0009] 腸管上皮は3～4日ごとに再生を繰り返すダイナミックな組織である。腸管上皮の原動力となっている、永続的な自己複製能と全ての腸管上皮細胞への分化能を有するLgr5陽性の腸管上皮幹細胞から分化した細胞のことを大腸上皮細胞という。腸管上皮細胞は、主として、4種類の腸管上皮細胞、吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞に分類される。その中で特に大腸に存在する腸管上皮細胞は、本発明において、大腸上皮細胞として用いることができる。腸管上皮細胞は、好ましくは、本発明で用いられる大腸上皮細胞は、上皮細胞マーカーのE-cadherin等の分子を特徴的に発現している。好ましくは、大腸上皮細胞は、抗原を処理してT細胞に提示することができ、かつ／又はin vivoで刺激によりHLAクラスI及び細胞間接着分子を発現する。また、大腸上皮細胞は、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 及び $\beta 4$ インテグリンを発現することにより特徴づけられていてもよい。更に、本発明において、大腸上皮細胞として、初代培養細胞でも細胞株のいずれを用いてもよい。

[0010] 本明細書において、「ROCK阻害剤」とは、Rho-associated kinase (ROCK) と直接結合してその機能を阻害する薬剤を意味する。Rho-associated kinaseは分子量約160 kDaのセリンスレオニンリン酸化酵素であり、Rho kinase α / ROCK α / ROCK2とRho kinase β / ROCK β / ROCK1のアイソフォームが存在する。本明細書におけるROCKは、これらのいずれか又は両方であってもよい。ROCK阻害剤としては、ROCK2阻害剤であっても、ROCK1阻害剤であっても、ROCK1及びROCK2のDUAL阻害剤であってもよく、例えば、
4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-pyridin-4-

ylcyclohexane-1-carboxamide (Y-27632)

5-(1,4-Diazepane-1-sulfonyl)isoquinoline (ファスジル塩酸塩 (HA-1077 hydrochloride))

N-benzyl-2-(pyrimidin-4-ylamino)thiazole-4-carboxamide (Thiazovivin)

N-(6-fluoro-1H-indazol-5-yl)-2-methyl-6-oxo-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1,4,5,6-tetrahydropyridine-3-carboxamide (GSK429286A)

N-[(3-hydroxyphenyl)methyl]-N'-[4-(4-pyridinyl)-2-thiazolyl]-urea (RKI-1447)

(S)-4-methyl-5-[[2-methyl-1,4-diazepan-1-yl]sulfonyl]-isoquinoline dihydrochloride (H-1152 dihydrochloride)、及び

6-chloro-N⁴-[3,5-difluoro-4-[(3-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)oxy]phenyl]-2,4-pyrimidinediamine (Azaindole 1 (TC-S 7001))等が挙げられる。

[0011] 本明細書において、「細胞外小胞」とは、細胞が放出する小胞の総称であり、Ectosome (エクトソーム)、Microparticle (マイクロパーティクル)、Shedding microvesicle (分泌マイクロベシクル)、Exosomes (エクソソーム)、Microvesicles (MV; 微小小胞体)、Apoptotic Bodies (アポトーシス小体)等を含む。

- [0012] 「エクソソーム」とは、様々な細胞からエンドサイトーシス・パスウェイにより放出される、タンパク質及び／又は核酸（mRNA、miRNA、ノン・コーディング RNA）を含む細胞外小胞である。エクソソームは、細胞間通信、抗原提示、タンパク質並びに mRNA 及び miRNA 等の核酸の輸送をはじめとする様々な細胞間コミュニケーション機能を有し、通常は直径約 20～200 nm 又は 50～150 nm の細胞外小胞である。エクソソームのマーカーとしては、Alix、Tsg101、tetraspans（CD81、CD63、CD9）、flotillin が知られており、好ましくは、エクソソームは、CD9 及び CD63 を表面に有する。
- [0013] 一態様において、本発明は、大腸上皮細胞の長期間培養方法であって、ROCK 阻害剤の存在下で大腸上皮細胞を培養することを含む方法に関する。
- 大腸上皮細胞の培養は、ROCK 阻害剤を含有する培地中、特に限定されないが、例えば、37℃、5%CO₂環境下で大腸上皮細胞を培養することにより行うことができる。
- 本発明の方法により、大腸上皮細胞を長期間培養することが可能である。
- 本発明の方法により、以下に記載するように、大腸上皮細胞を長期間培養し、増殖させた細胞からエクソソーム又は細胞外小胞を回収することが可能である他、長期間にわたる大腸上皮細胞への効果や作用を試験することが可能となる。
- 本発明においては、ROCK 阻害剤は、特に限定されないが、実施例においても詳述するとおり、Y-27632 を用いることが好適である。
- [0014] 本発明の方法における培養は、ROCK 阻害剤以外にも大腸上皮細胞に作用して長期間培養可能とする物質の存在下で行うこともできるし、ROCK 阻害剤以外には、大腸上皮細胞に作用して長期間培養可能とする物質を実質的に含まない条件下で行うこともできる。例えば、本発明においては、ALK5／7／4 選択的阻害剤及び／又は GSK-3 阻害剤の非存在下で培養を行ってもよい。
- [0015] 培養に用いる培地としては、大腸上皮細胞の培養に適した培地であれば特

に限定されないが、例えば、Colonial Epithelial Cell Medium (CoEpiCM、SCR) 等が挙げられる。

培地中に添加する添加物としては、特に限定されないが、例えば、Colonial Epithelial Cell Growth Supplement (CoEpiCGS、SCR) 及び／又は抗生物質（例えば、Penicillin/streptomycin）等が挙げられる。

本発明における培養においては、実施において詳述するような完全培地中で大腸上皮細胞を培養してもよい。

[0016] 本発明において、大腸上皮細胞の培養は、好ましくは、コーティングされた培養器の表面上に細胞を担持することにより行われる。このようなコーティングとしては、特に限定されないが、例えば、生物学的コーティング（ECMタンパク質によるコーティング）や化学的コーティング（ポリリジンによるコーティング）等が挙げられる。

[0017] 長期間培養の培養期間は、10日以上、20日以上、21日以上、30日以上、36日以上、40日以上、45日以上、56日以上、60日以上、70日以上、72日以上、80日以上とすることができる。また、長期間培養の培養期間は、14日以上、21日以上、28日以上、35日以上、42日以上、49日以上、56日以上、72日以上としてもよい。培養期間は、28日以上であってよく、35日以上であってよく、40日以上が好ましい。好ましい40日以上としては、45日以上、56日以上、60日以上、70日以上、72日以上、80日以上であってよく、42日以上、49日以上、56日以上、72日以上であってよい。

[0018] 更に別の態様において、本発明は大腸上皮細胞由来の細胞外小胞の調製方法であって、ROCK阻害剤の存在下で大腸上皮細胞を培養すること、前記培養後の培養上清を回収すること、及び培養上清から細胞外小胞を回収することを含む方法に関する。

[0019] 本方法における大腸上皮細胞の培養は、上述の大腸上皮細胞の長期間培養方法に準じて行うことができる。

[0020] 細胞外小胞やエクソソームの回収は、培養終了後の培養上清を用いて任意の公知の方法を使用して行うことができる。例えば、サンプルからの細胞外小胞の回収に用いられる方法としては、特に限定されないが、例えば、超遠心分離法（例えば、Thery C., Curr. Protoc. Cell Biol. (2006) Chapter 3: Unit 3.22.）、ポリマー沈殿法、免疫沈降法、FACS法、限外濾過法、ゲル濾過法、HPLC法、及び抗体やレクチンを利用してビーズ等の担体に吸着させる方法等が挙げられる。また、市販のキットを用いて、細胞外小胞やエクソソームを回収してもよい。

[0021] 細胞外小胞の回収に抗体を用いる場合、例えば、エクソソームの場合を例示して説明すると、エクソソーム表面のCD9とCD63を利用して、抗CD9抗体及び抗CD63抗体が結合した担体を用いて回収してもよい。

エクソソームの回収ステップは、例えば、培養上清と抗CD9抗体及び抗CD63抗体が結合した担体とを混合すること、エクソソームが結合した担体を回収することを含んでいてもよい。また、このステップにおいて、エクソソームが結合した担体を洗浄する工程や担体からエクソソームを解離させる工程等を含んでいてもよい。

[0022] 超遠心分離法を用いて回収する場合、特に限定されないが、例えば、50,000×g以上、100,000×g以上、又は150,000×g以上、及び／又は、300,000×g以下、250,000×g以下、又は200,000×g以下で遠心してもよい。遠心時間は、特に限定されないが、例えば、30～120分間、60～90分間、又は70～80分間とすることができる。また、遠心分離前に、必要に応じて、フィルター濾過及び／又はより低い遠心力での遠心分離を行うことにより、夾雑物を除去又は低減してもよい。

[0023] 細胞外小胞やエクソソームが回収されたこと、又はエクソソームの物性の確認は、公知の方法に従って行うことができ、例えば電子顕微鏡により視覚的に確認してもよく、又はNTA (Nano Tracking Anal

y s i s) 技術を用いてエクソソームの粒子径及び粒子数を計測してもよい。あるいは、エクソソームのマーカーとなり得るタンパク質及び／又は遺伝子の発現を確認することにより、エクソソームの存在を確認してもよい。

[0024] 細胞外小胞やエクソソームの調製に用いるサンプルは、ROCK阻害剤の存在下で培養された大腸上皮細胞の培養上清であれば特に限定されないが、好ましくは、72日以上培養された大腸上皮細胞の培養上清である。

大腸上皮細胞の培養上清は、10日以上、20日以上、21日以上、30日以上、36日以上、40日以上、45日以上、56日以上、60日以上、70日以上、72日以上、80日以上培養された大腸上皮細胞の培養上清であってもよく、14日以上、21日以上、28日以上、35日以上、42日以上、49日以上、56日以上、72日以上培養された大腸上皮細胞の培養上清であってもよい。培養上清を得るための大腸上皮細胞の培養期間は、28日以上であってよく、35日以上であってよく、40日以上が好ましい。好ましい40日以上としては、45日以上、56日以上、60日以上、70日以上、72日以上、80日以上であってもよく、42日以上、49日以上、56日以上、72日以上であってもよい。

培養上清の回収は、従来公知の方法により行えばよい。

実施例

[0025] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。なお、本願明細書全体を通じて引用する文献は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

[0026] (実施例1) Rock阻害剤の大腸上皮細胞からのエクソソーム放出への影響

(1) 材料

(細胞)

Primary human colonic epithelial cells (HCoEpiC) は、ScienCell Research Laboratories (SCR (Carlsbad, CA, USA))

）よりLot 17030を購入して使用した。

[0027] (培地)

培地としては、Basal mediumであるColonic Epithelial Cell Medium (CoEpiCM、SCR) 500mLに、Colonic Epithelial Cell Growth Supplement (CoEpiCGS、SCR) 5mLとPenicillin/streptomycin (P/S、SCR) 5mLを加えたComplete mediumを使用した。

[0028] (低分子化合物)

エクソソームの放出への影響を調べるため、 $10\mu\text{M}$ Y-27632 (Wako) (ROCK阻害剤)、 $0.5\mu\text{M}$ A-83-01 (Wako) (ALK5/7/4選択的阻害剤)、 $3\mu\text{M}$ CHIR99021 (Axon Medchem, Reston, VA) (GSK-3阻害剤)を用いた。

[0029] (2) 培養

37°C のwater bathで細胞を完全に溶解し、poly-L-lysine (poly-Llysine $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、SCR) でコートされた10cm dish中のcomplete medium 10mLに、 $2.5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{dish}$ になるように播種した。翌日、新鮮なcomplete mediumに交換した。70% confluencyになるまでは3-4日おきに、70%~90% confluencyの間は1日おきにcomplete mediumと交換した。

[0030] 90% confluencyになった細胞をtrypsin/EDTA solution、0.05% (T/E、SCR) で剥がし、12 well plate (Tissue culture Plate 12 wells、Flat Bottom、fisherbrand) に $2 \times 10^4 \text{ cells}/\text{well}$ となるように播種した。24時間後、Y-27632 ($10\mu\text{M}$) の含有又は非含有のcomplete mediumに交換し

、以降90% *confluency* になるまで1日おきに*medium* を交換した。90% *confluency* になったら、再度*passage* を行い前述同様の操作を72日間続けた。

[0031] (3) 粒子の解析

前記培養における培養上清を回収し、ナノ粒子解析システム*Nanosight* (*Malvern Panalytical*、NS300) を用いて粒子径及び粒子数の測定を行った。また、回収した培養上清について、エクソソームマーカーであるCD9、CD63のシグナル強度をエクソスクリーン法により測定した。

[0032] (4) 結果

(低分子化合物による上皮形態の維持と生存期間の延長)

低分子化合物であるY-27632 (Y)、A-83-01 (A)、又はCHIR99021 (C)、あるいは、Y-27632とA-83-01 (YA) との組み合わせ、又はY-27632とCHIR99021 (YC) との組み合わせの存在下で培養されたHCoEpICのうち、Y-27632を単独で添加した群においてその増殖が最も長期間に渡り続くことが明らかになった(図1A)。また、Y-27632を単独添加群では、72日間培養後もその形態が変化することなく、増殖を続けていることが確認された(図1B)。

すなわち、ROCK阻害剤である(1R, 4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamide (Y-27632) の存在下で大腸上皮細胞を培養することにより、大腸上皮細胞の長期間培養できることが確認された。

[0033] (Y-27632添加培地で培養したHCoEpICからのエクソソーム分泌)

Nanosight による粒子数濃度測定により、培養72日目における、培地中の粒子数濃度は、Y-27632非存在下の方が高かったが、エク

ソスクリーン法によるCD9及びCD63マーカーの検出の結果、Y-27632の存在下で培養されたHCoEpICの培養上清中により多いエクソソームが検出された（図4）。

また、Y-27632存在下ではパッセージ数を重ねてもCD9（+）エクソソームが1／3程の低下でとどまるが、Y-27632非存在下では2／3以上低下してしまうことが確認された。

請求の範囲

- [請求項1] 大腸上皮細胞の長期間培養方法であって、
ROCK阻害剤の存在下で大腸上皮細胞を培養することを含む方法
。
- [請求項2] ROCK阻害剤が(1R, 4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamideである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 培養期間が40日以上である、請求項1又は請求項2に記載の方法
。
- [請求項4] 大腸上皮細胞由来の細胞外小胞の調製方法であって、
ROCK阻害剤の存在下で大腸上皮細胞を培養すること、
前記培養後の培養上清を回収すること、及び
培養上清から細胞外小胞を回収することを含む方法。
- [請求項5] ROCK阻害剤が(1R, 4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamideである、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 細胞外小胞がエクソソームである、請求項4に記載の方法。
- [請求項7] 培養期間が28日以上である、請求項4～請求項6のいずれか1項
に記載の方法。