

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6889467号  
(P6889467)

(45) 発行日 令和3年6月18日(2021.6.18)

(24) 登録日 令和3年5月25日(2021.5.25)

(51) Int. Cl. F 1  
**C 1 2 N** 5/071 (2010.01) C 1 2 N 5/071  
**C 1 2 Q** 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

請求項の数 4 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2017-7181 (P2017-7181)                  (22) 出願日 平成29年1月19日 (2017.1.19)                  (65) 公開番号 特開2018-113914 (P2018-113914A)                  (43) 公開日 平成30年7月26日 (2018.7.26)                  審査請求日 令和2年1月10日 (2020.1.10)</p>	<p>(73) 特許権者 598096991                  学校法人東京農業大学                  東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号                  (74) 代理人 100122574                  弁理士 吉永 貴大                  (72) 発明者 岩槻 健                  東京都世田谷区桜丘一丁目1番1号 東京                  農業大学内                  (72) 発明者 大石 祐一                  東京都世田谷区桜丘一丁目1番1号 東京                  農業大学内                  審査官 高山 敏充</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 霊長類由来の味蕾オルガノイドの培養方法及び該味蕾オルガノイドを用いた呈味物質のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法であって、  
 霊長類の有郭乳頭の細胞を破碎することにより有郭乳頭破碎細胞を調製する工程と、  
 有郭乳頭破碎細胞をプロテアーゼ含有溶液でインキュベートすることにより有郭乳頭破碎細胞から味幹細胞を遊離する工程と、  
 味幹細胞を基底膜マトリックスを含有する基本培地で培養することにより味蕾細胞の細胞塊を作製する工程と、  
 細胞塊をプロテアーゼ含有溶液で分散した後、味蕾細胞を回収し前記基本培地で培養する工程と、  
 を有することを特徴とする、霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法であって、前記基本培地が、ニコチンアミドと、N-アセチルシス테인と、A-83-01と、SB202190と、ガストリンと、CHIR99021と、チアゾピピンとを含有する、霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法。

【請求項2】

前記有郭乳頭の細胞が、有郭乳頭の上皮細胞とその直下にある真皮細胞とからなる、請求項1に記載の霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法。

【請求項3】

前記プロテアーゼが、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼからなる群から選択された少なくとも1種類である、請求項1又は2に記載の霊長類由来の味蕾オルガノイドの

作製方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法により作成された味蕾オルガノイドを使用して呈味物質のスクリーニングを行うことを特徴とする呈味物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、霊長類由来の味蕾オルガノイドの培養方法及び該味蕾オルガノイドを用いた呈味物質のスクリーニング方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

本発明者らはこれまでマウスからの味蕾オルガノイドの作成に成功している（非特許文献 1）。

【0003】

また、味蕾オルガノイドの培養についてはこれまでいくつかの方法が提案されており、例えば、特開 2002 - 165590 号公報には、非ヒト細胞（ラット）の味蕾から単離され、培地中において少なくとも 3 日間生存する培養味細胞、及びこれを含有する味蕾細胞培養系が開示されている。また、従来 1 日以上培養することが不可能であった味蕾細胞を 1 週間以上生細胞状態に維持することが可能になり、また味蕾細胞中にわずかに 10% 程度しか存在しないとされる味細胞を分子レベルで特定し、単離取得することが可能になったことが開示されている（特許文献 1）。

20

【0004】

特開 2003 - 102470 号公報には、ヒトを除く哺乳類の有郭乳頭付近の舌上皮細胞より、インテグリン 1 を発現する細胞を磁気カラムを用いて選抜すること、および、前記で選抜した細胞を、塩基性繊維芽細胞成長因子を含みカルシウム濃度が 3.0 ~ 7.0 mg/ml である培地で培養する舌上皮前駆細胞の単離増殖方法が開示されている（特許文献 2）。

【0005】

特表 2008 - 516604 号公報には、a. 哺乳動物の有郭乳頭から単離した舌上皮組織をタンパク質分解酵素と接触させること、b. 哺乳動物の有郭乳頭から単離した舌上皮組織を、15 ~ 20% MCD B153 培地、5 ~ 20% FBS、10 ng/ml インシュリンおよび抗生物質を添加したイスコープ培地を含む細胞培養培地中、コラーゲンでコートされた細胞培養容器にて培養すること、および c. 24 ~ 48 時間後に培地を交換し、次いで 5 ~ 10 日毎に交換すること、を含むマウスの味覚受容体細胞の培養物の培養方法が開示されている（特許文献 3）。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開 2002 - 165590 号公報

【特許文献 2】特開 2003 - 102470 号公報

【特許文献 3】特表 2008 - 516604 号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】Ren W et al., Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells ex vivo, Proceedings of the National Academy of Sciences, 111, No.46, 16401-16406, 2014

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

50

これまで、味覚及び消化管感覚の研究は、マウスやラットなどのげっ歯類を主なモデル動物として用いてきた。しかしながら、行動学実験やin vitroの味覚受容実験の結果などから、げっ歯類の味覚は必ずしもヒトやサルなどの霊長類と同じではないことがわかってきた。特に、受容体レベルでのうま味や甘味の感受性はげっ歯類とヒトでは大きく異なる。例えば、ヒトのうま味受容体は20種類のアミノ酸のうちわずか2種類としか反応しないが、げっ歯類のうま味受容体は約半分のアミノ酸と反応する。

【0009】

また、げっ歯類は35種類もの苦味受容体を発現するのに対し、ヒトでは25種類しか発現しない。つまり、げっ歯類では、呈味物質のスペクトルがヒトよりも広いことを示唆している。

【0010】

これらのことから、味覚研究において、げっ歯類はヒトのモデル動物としては適切とはいえない事情があった。その一方で、ヒトやサルなどの霊長類から味蕾細胞を採取するのは入手や規制が厳しく、現実的には困難であるという問題があった。そのため霊長類由来の味蕾オルガノイドを人工的に培養する方法を開発することが望まれていた。

【0011】

従って本発明の目的は、霊長類由来の味蕾オルガノイドの培養技術及び該味蕾オルガノイドを用いたスクリーニング方法を用いた呈味物質アッセイ系を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは上記課題を解決するため、サル由来の味蕾オルガノイドの培養技術について鋭意検討したところ、mRNAレベルで相同性が高いヒトの増殖因子やサイトカインを組み合わせ最適な幹細胞培養条件を構築することにより、味蕾オルガノイドの培養が可能になるとの知見を得た。

【0013】

本発明は係る知見に基づきなされたものであり、霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法であって、霊長類の有郭乳頭の細胞を破碎することにより有郭乳頭破碎細胞を調製する工程と、有郭乳頭破碎細胞をプロテアーゼ含有溶液でインキュベートすることにより有郭乳頭破碎細胞から味幹細胞を遊離する工程と、味幹細胞を基底膜マトリックスを含有する基本培地で培養することにより味蕾細胞の細胞塊を作製する工程と、細胞塊をプロテアーゼ含有溶液で分散した後、味蕾細胞を回収し前記基本培地で培養する工程と、を有することを特徴とする、霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明の味蕾オルガノイドの作製方法によれば、再生を繰り返す幹細胞の培養系であるとともに、最終分化した味細胞を含有する培養系でもあるため、動物実験を回避しつつこれまで困難であった霊長類味細胞の性状解析を可能とすることができる。また、げっ歯類を用いた実験では分かり得なかった霊長類味細胞の味応答特性をin vitroにおいて詳細に調べることができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】培養後3週間後のサル味蕾オルガノイドの全体像を示す写真である。

【図2】培養開始から21日後の味蕾オルガノイドの免疫染色の結果を示す写真である。

【図3】培養した味蕾オルガノイドにうま味物質として6 mM MSG、苦味物質として50  $\mu$ M キニーネを単回投与した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の実施形態に係る霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製方法は、霊長類の有郭乳頭の細胞を破碎することにより有郭乳頭破碎細胞を調製する工程と、有郭乳頭破碎細胞をプロテアーゼ含有溶液で培養することにより有郭乳頭破碎細胞から味幹細胞を遊離する工

10

20

30

40

50

程と、味幹細胞を基底膜マトリックスを含有する基本培地で培養することにより味蕾細胞の細胞塊を作製する工程と、細胞塊をプロテアーゼ含有溶液で分散した後、味蕾細胞を回収し前記基本培地で培養する工程と、を有することを特徴とする。

【0017】

本実施形態において「霊長類」とは、動物分類学上での霊長目 (Primates) に相当し、原猿類、新世界ザル、旧世界ザル、類人猿、ヒトなどを含み、現存するものは約200種知られている。具体的には、メガネザル類、クモザル類、オマキザル類、マーモセット類、オナガザル類、コロブス類、類人猿及びヒトである。

【0018】

有郭乳頭は、舌の表面に存在する4種類の舌乳頭の内の1つである。舌乳頭はその形状や存在部位によって、糸状乳頭、茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭の4つに分類されているが、本実施形態においては有郭乳頭の細胞を利用する。

【0019】

有郭乳頭の細胞の中でも、味蕾オルガノイドの作製には有郭乳頭周辺の上皮(表皮)細胞とその直下にある真皮細胞を同時に取り出す事が好ましい。幹細胞は有郭乳頭の奥底(トレンチ)に存在するため(Yee KK, Li Y, Redding KM, Iwatsuki K, Margolskee RF, Jiang P. Lgr5-EGFP Marks Taste Bud Stem/Progenitor Cells in Posterior Tongue. Stem Cells, 31, 992-1000 (2013))、幹細胞が採取できる方法であれば特に限定はないが、真皮細胞も含めて採取した方が効率がよい。

【0020】

上皮細胞と真皮細胞は、例えば、解剖用鉗を用いて丁寧に有郭乳頭周辺を切り出すことにより採取することができる。

【0021】

有郭乳頭周辺の細胞は採取後、PBS(4 )内でミンスし、1~4 mm角の細胞塊とする。有郭乳頭周辺細胞はその後プロテアーゼ含有溶液でインキュベートする。プロテアーゼの濃度は、その種類に応じて適宜変更されるが、例えば、0.05~0.25% Trypsin/1mM EDTAであることが好ましい。温度は、25~40 であることが好ましく、30~38 であることがより好ましく、35~37 であることがさらに好ましい。時間は、30分以下であることが好ましい。この処理により有郭乳頭破碎細胞から味幹細胞を遊離することができる。

【0022】

プロテアーゼとしては、上述したトリプシンの他、コラゲナーゼ、ディスパーゼからなる群から選択された少なくとも1種類を選択することが好ましい。

【0023】

味幹細胞はその後、基底膜マトリックスを含有する基本培地で培養する。基底膜マトリックスは、ラミニン(主成分)、IV型コラーゲン、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン/ニドゲンおよび数々の成長因子を含むECMタンパク質が豊富なEngelbreth-Holm-Swarm (EHS)マウス肉腫から抽出した、可溶化基底膜調製品である。基底膜マトリックスは市販されているものを使用することができ、例えば、コーニング社製のCorning(登録商標) Matrigel(登録商標)基底膜マトリックスマトリジェル等を挙げることができる。

【0024】

基本培地はAdvanced DMEM/F12培地に以下の試薬をそれぞれの濃度にて添加したものである。なお、Wnt3aはATCC (American Type Culture Collection)などから入手可能である。

【0025】

10

20

30

40

【表 1】

	終濃度
Human R-Spondin1	1 µg/mL
Human Noggin	100 ng/mL
HEPES	10 mM
GlutaMax	2 mM
N2 supplement	1 x
B27 supplement	1 x
Human EGF	50 ng/mL
Wnt3a conditioned medium	50% of total volume
Gentamicin	10 g/ml
Amphotericin B	0.25 g/ml
BSA (fraction V) ロットチェック必要	1 %

## 【 0 0 2 6 】

ここで、GentamicinとAmphotericinはPenicillin G (100 units/ml)およびStreptomycin (100 µg /ml)に代替できる。また、味蕾幹細胞の成長をさらに進めたい場合は下記の試薬も記載の濃度にて添加する。

## 【 0 0 2 7 】

【表 2】

	終濃度
Nicotinamide	10 mM
N-Acethyl cysteine	1 mM
A-83-01	500nM
SB202190	10 µM
Gastrin	10 nM
CHIR99021	2.5 µM
Thiazovivin	2.5 µM

## 【 0 0 2 8 】

培地は少なくとも4日に一度、より好ましくは3日1一度、最も好ましくは2日に一度交換する。培養開始から約6日後に味蕾細胞の細胞塊が出現する。なお、最初は真皮も上皮も一緒に培養されるが、培養中に真皮は消失する。 30

## 【 0 0 2 9 】

得られた細胞塊を採取し、先述したプロテアーゼ含有溶液に分散した後、味蕾細胞を回収し前記基本培地で培養する。培養後8日後に再度継代培養を行ない、所望の味蕾オルガノイドを得る。得られた味蕾オルガノイドは4ヶ月以上経過しても増殖を続けており、通常の生体での味蕾の平均寿命(約2週間)よりも大幅に寿命が長いといえる。そのため培養した味蕾オルガノイドをアッセイ系に利用する場合にもその点が優位に働く。

## 【 0 0 3 0 】

培養した味蕾オルガノイドをアッセイ系に利用する場合は、HEK293細胞を用いた味覚受容体と呈味物質の関係を調べる際に多用されるCaアッセイを用いる。同アッセイは細胞内のカルシウム濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡にて検出するもので、呈味物質がその受容体に結合した際に細胞内で起こるカルシウム濃度の変化をFluo-4やFura-2などのカルシウム指示薬の発する蛍光強度の変化として捉える。本方法は、味細胞を含む舌上皮のスライス切片や、マウスオルガノイドでの呈味物質による味細胞の応答などで実績があり、霊長類由来の味蕾オルガノイドでも同様に有用なアッセイ法である。 40

## 【 0 0 3 1 】

これまで、味覚および消化管感覚の研究は、げっ歯類がモデル動物として用いられてきた。しかしながら、行動学実験やin vitroにおける味覚受容体実験の結果などより、げっ歯類の味覚は必ずしもヒトやサルなどの霊長類と同じでない事が分かってきた。特に、うま味や甘味の受容体反応特性はげっ歯類とヒトでは大きく違う。例えば、ヒトのうま味受 50

容体は20種類のアミノ酸のうちわずか2種類としか反応しないが、げっ歯類のうま味受容体は約半分のアミノ酸と反応する。また、げっ歯類（マウス）は35種類もの苦味受容体を発現するのに対し、ヒトでは25種類しか発現しない。つまり、げっ歯類では、呈味物質のスペクトルがヒトよりも広い事を示唆している。これらの事から、味覚研究において、げっ歯類はヒトのモデル動物としては不適切といえる。

#### 【0032】

今回、霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製に成功した。この味蕾オルガノイドは、通常の培養細胞と同じように継代でき増やすことができる他、凍結保存も可能であることから利便性も高い。将来、動物実験の代替法として重要な細胞となるに違いない。現在までに下記の利用方法が考えられる。但し、本発明は下記の用途に限定されるものではない。

1) 甘味料のスクリーニングや開発（アスパラテームなどは、げっ歯類では感じられない）

2) 苦味阻害剤のスクリーニングや開発

3) うま味物質のスクリーニングや開発

4) 酸味物質のスクリーニングや開発

5) 塩味代替物のスクリーニングや開発

6) 単一味物質ではなく混合物の味覚測定系の開発

7) 同じ霊長類であるヒトから味蕾オルガノイドを作製し、再生医療（移植医療）の味細胞ソースとして利用

8) オルガノイドへの遺伝子導入あるいはノックダウンにより、特定の形質が付与されたり欠失するモデル味細胞の構築

9) 上記8)の細胞を呈味物質のスクリーニングや移植医療に活用

#### 【実施例】

#### 【0033】

1. 霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製

(1) 培養方法

有郭乳頭の上皮とその直下にある真皮を切り取り、細かくミンスした後トリプシン溶液（0.25% Trypsin/1mM EDTA）にて37℃でインキュベートし、味幹細胞を遊離させた上で5%基底膜マトリックスを含む基本培地で培養した。

#### 【0034】

mRNAレベルで相同性が高いヒトの増殖因子やサイトカインを組み合わせ最適な幹細胞培養条件を構築した。

#### 【0035】

6日後に細胞塊が出願したため、再びトリプシン溶液に分散し、継代し、8日後に再び継代した。上記のように継代を繰り返し、約4ヶ月間培養を行った。

#### 【0036】

(2) 免疫染色

培養を開始してから21日後の味蕾オルガノイドを4%PFAにて固定しブロッキングした後、一次抗体（抗PLCβ2）に続き二次抗体（緑色蛍光付）を反応させ蛍光顕微鏡にて味細胞マーカーが発現しているか確認した。

#### 【0037】

(3) 細胞アッセイ（Caイメージング）

14日間培養した味蕾オルガノイドをPoly-L-lysineとラミニンでコートした培養皿に播き接着させた。1~2日後にCa<sup>2+</sup>蛍光プローブであるFluo-4-AMあるいはFura-2AMを細胞に取り込ませ、共焦点レーザー顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡にて種々の呈味物質を添加し細胞内Ca濃度の変化を測定することで、呈味物質に反応したか否かを判断した。

#### 【0038】

2. 結果

(1) 霊長類由来の味蕾オルガノイドの作製

図1は培養後3週間後のサル味蕾オルガノイドの全体像を示す写真である。オルガノイ

10

20

30

40

50

ドが結合し、大きな塊となった。継代を繰り返しても増殖を続けることが判明した。

【 0 0 3 9 】

( 2 ) 免疫染色

図 2 は培養開始から 21 日後の免疫染色の結果を示す写真である。抗 PLCbeta2 抗体に陽性の細胞 ( 緑 : II 型味細胞 ) は、味細胞の特徴である紡錘形の形をしている ( 図 2 )。抗 PLCbeta2 抗体が猿組織と交差するかは有郭乳頭を用いた免疫組織化学染色にて確認した。

【 0 0 4 0 】

( 3 ) 細胞アッセイ ( Ca イメージング )

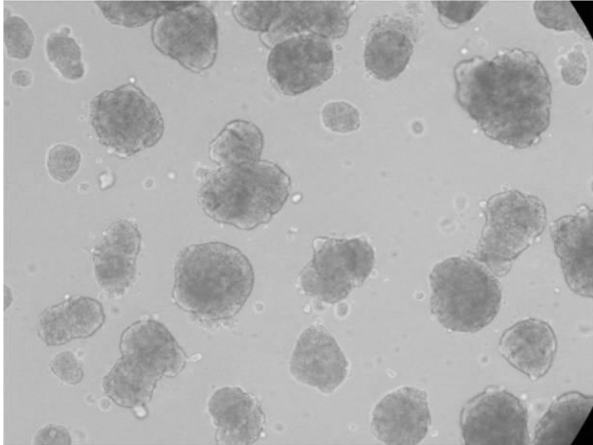
図 3 は培養した味蕾オルガノイドにうま味物質として 6 mM MSG、苦味物質として 50  $\mu$ M キニーネを単回投与した結果を示す図である。着目した細胞は MSG には反応したがキニーネには反応しないことが判明した。

【 0 0 4 1 】

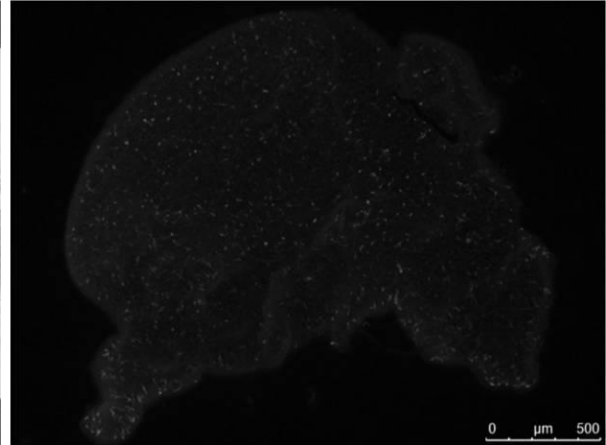
3 . 結論

以上の結果から、今回培養に成功したのは、霊長類の味蕾オルガノイドであることが明らかとなった。本培養細胞は、様々な意味物質にも反応することから、これまでになかったヒトの *in vitro* アッセイ系のモデルとなることが期待される。

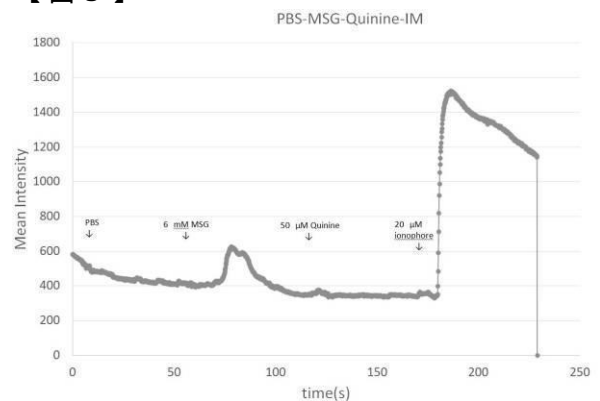
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0309703(US, A1)

PNAS, 2014年, vol. 111, no. 46, pp.16401-16406

Stem Cells, 2013年, Vol. 31, pp.992-1000

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)