

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/005229 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/079 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/0793 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023479

(22) 国際出願日: 2024年6月28日(28.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-108777 2023年6月30日(30.06.2023) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小林 速人 (KOBAYASHI Hayato); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 遠藤 摂 (ENDO Setsu); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 加藤 寛 (KATO Hiroshi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

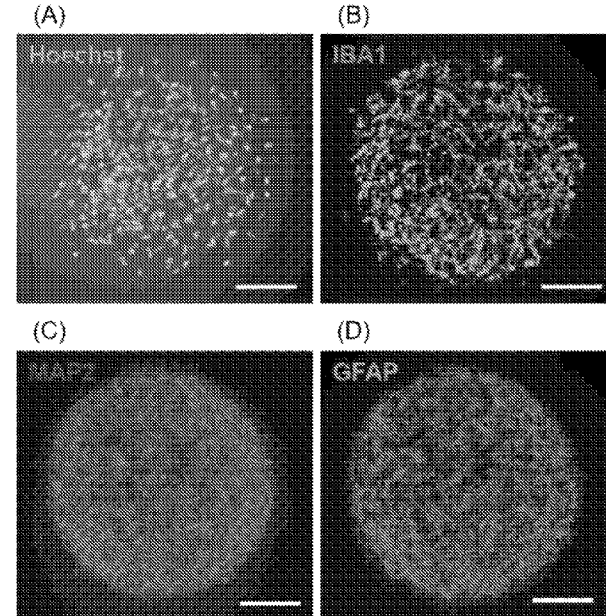
(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE, METHOD FOR CULTURING THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE, THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE, AND METHOD FOR EVALUATING TEST SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 三次元細胞培養物の製造方法、三次元細胞培養物の培養方法、三次元細胞培養物、および被験物質の評価方法

[図1]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a method for producing a three-dimensional cell culture including human-derived neurons, astrocytes, and microglia that can mimic the function of a human brain, and a method for culturing for said three-dimensional cell culture; a three-dimensional cell culture including human-de-

[続葉有]



WO 2025/005229 A1

CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

rived neurons, astrocytes, and microglia that can mimic the function of a human brain; and a method for evaluating a test substance using the three-dimensional cell culture. The present invention provides a method for producing a three-dimensional cell culture, the method including: a step for adding human-derived astrocytes, human-derived neurons, and human-derived microglia to a culturing container prior to co-culturing of the cells; and a step for co-culturing the astrocytes, the neurons, and the microglia in the culturing container, wherein the proportion of the astrocytes to all cells added to the culturing container is 30% or more.

(57) 要約: 本発明の課題は、ヒト脳の機能を模倣可能なヒト由来の神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアを含む三次元細胞培養物の製造方法および培養方法; ヒト脳の機能を模倣可能なヒト由来の神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアを含む三次元細胞培養物; 並びに上記三次元細胞培養物を用いた被験物質の評価方法を提供することである。本発明によれば、細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記アストロサイトと、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、三次元細胞培養物の製造方法であって、培養容器に添加された全細胞中に占める上記アストロサイトの割合が30%以上である、三次元細胞培養物の製造方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：

三次元細胞培養物の製造方法、三次元細胞培養物の培養方法、三次元細胞培養物、および被験物質の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、アストロサイトと神経細胞とミクログリアとを用いた、三次元細胞培養物の製造方法および三次元細胞培養物の培養方法に関する。さらに本発明は、アストロサイトと神経細胞とミクログリアとを含む三次元細胞培養物に関する。さらに本発明は、上記三次元細胞培養物を用いる被験物質の評価方法に関する。

背景技術

[0002] 中枢神経系は神経細胞とグリア細胞（アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト）から構成されており、それらの細胞は相互に影響することで脳の正常な機能を発揮している（非特許文献１）。例えば、神経細胞はシナプス間隙にグルタミン酸を放出することで他の神経細胞に情報伝達を行うが、アストロサイトはグルタミン酸の取り込みを行うことで神経細胞の情報伝達を調節する役割を担っている（非特許文献２）。また、ミクログリアは老化や炎症により活性化してアストロサイトに影響を与え、さらにはそのアストロサイトが神経細胞に傷害を与えることが報告されている（非特許文献３および４）。そのため、中枢神経系の研究を行う上で、神経細胞とグリア細胞の細胞間相互作用を評価できる共培養系は大変有用である。

[0003] また、近年はヒト脳の複雑な構造を模倣するために、種々の三次元培養系が報告されている（非特許文献５）。さらには、神経細胞やグリア細胞には種差があることも知られており（非特許文献６および７）、ヒト脳を再現するためにはヒト細胞を用いることが非常に重要である。

[0004] 特許文献１には、ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト、神経細胞およびミクログリアを含む三次元共培養物が記載されている。特許文献２には、ヒ

ト i P S 細胞由来の神経細胞およびグリアを含む、三次元オルガノイドが記載されている。特許文献3には、ヒト i P S 細胞由来の神経細胞およびグリアを含む三次元（スフェロイド）共培養物が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開WO2023/039567号公報

特許文献2：国際公開WO2022/183015号公報

特許文献3：国際公開WO2022/178395号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Francesca Cerbairà、P L o S O n e、7 巻、論文番号 e 4 5 2 5 0、2012年

非特許文献2：Jens V Andersenら、Neuropharmacology、14巻、論文番号108719、2021年

非特許文献3：Shane A Liddelowら、Nature、541 巻、481－487頁、2017年

非特許文献4：Laura E Clarkeら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、115巻、E1896－E1905頁、2018年

非特許文献5：Eduarda G Z Centenoら、Molecular Neurodegeneration、13巻、論文番号27、2018年

非特許文献6：Anke M Tukkerら、Toxicological Sciences、178巻、71－87頁、2020年

非特許文献7：Leonid Tarassishinら、Glia、62巻、999－1013頁、2014年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ヒト脳の機能を模倣可能なヒト由来の神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアを含む三次元細胞培養物の製造方法、およびヒト脳の機能を模倣可能なヒト由来の神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアを含む三次元細胞培養物の培養方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、ヒト脳の機能を模倣可能なヒト由来の神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアを含む三次元細胞培養物を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記三次元細胞培養物を用いた被験物質の評価方法を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に、培養容器に添加された全細胞中に占めるアストロサイトの割合が30%以上となるように添加し、次いで培養容器中で共培養を行うことによって、ヒト脳の機能を模倣可能な三次元細胞培養物を製造できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

[0009] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

<1> 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記アストロサイトと、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、三次元細胞培養物の製造方法であって、培養容器に添加された全細胞中に占める上記アストロサイトの割合が30%以上である、三次元細胞培養物の製造方法。

<2> 上記アストロサイトと、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを同時に培養容器に添加する、<1>に記載の製造方法。

<3> 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程が、ヒ

ト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養培地に懸濁する工程、および上記により得られた上記アストロサイト、上記神経細胞および上記ミクログリアを含む培養培地を同時に培養容器に添加する工程を含む、＜1＞又は＜2＞に記載の製造方法。

＜4＞ 上記アストロサイト、上記神経細胞、および上記ミクログリアが、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである、＜1＞から＜3＞の何れかーに記載の製造方法。

＜5＞ 上記ヒト由来の多能性幹細胞が、ヒト i P S 細胞である、＜4＞に記載の製造方法。

＜6＞ 培養容器に添加された全細胞中に占める上記ミクログリアの割合が50%以下である、＜1＞から＜5＞の何れかーに記載の製造方法。

＜7＞ 培養容器に添加された全細胞中に占める上記神経細胞の割合が10%以上である、＜1＞から＜6＞の何れかーに記載の製造方法。

＜8＞ 上記三次元細胞培養物が、スフェロイド形状である、＜1＞から＜7＞の何れかーに記載の製造方法。

＜9＞ 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記アストロサイトと、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、三次元細胞培養物の培養方法であって、培養容器に添加された全細胞中に占める上記アストロサイトの割合が30%以上である、三次元細胞培養物の培養方法。

＜10＞ 上記アストロサイトと、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを同時に培養容器に添加する、＜9＞に記載の培養方法。

＜11＞ 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程が、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養培地に懸濁する工程、および上記により得られた上記アストロサイト、上記神経細胞および上記ミクログリアを含む培養培地を同時に培養

容器に添加する工程を含む、＜９＞または＜１０＞に記載の培養方法。

＜１２＞ 上記アストロサイト、上記神経細胞、および上記ミクログリアが、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである、＜９＞から＜１１＞の何れかーに記載の培養方法。

＜１３＞ 上記ヒト由来の多能性幹細胞が、ヒト i P S 細胞である、＜１２＞に記載の培養方法。

＜１４＞ 培養容器に添加された全細胞中に占める上記ミクログリアの割合が５０％以下である、＜９＞から＜１３＞の何れかーに記載の培養方法。

＜１５＞ 培養容器に添加された全細胞中に占める上記神経細胞の割合が１０％以上である、＜９＞から＜１４＞の何れかーに記載の培養方法。

＜１６＞ 上記三次元細胞培養物が、スフェロイド形状である、＜９＞から＜１５＞の何れかーに記載の培養方法。

＜１７＞ ＜１＞から＜８＞の何れかーに記載の製造方法により得られる、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む三次元細胞培養物。

＜１８＞ ＜１７＞に記載の三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法。

＜１９＞ ＜１＞から＜８＞の何れかーに記載の製造方法により三次元細胞培養物を製造すること、および上記三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法。

発明の効果

[0010] 本発明の方法で製造される三次元細胞培養物は、ヒト脳を模倣した培養系であり、正常な脳機能における神経細胞とグリア細胞の細胞間相互作用や病態メカニズムの研究に有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、三次元共培養物の免疫染色の結果を示す。

[図2]図２は、三次元共培養物においてカルシウムイメージングを実施した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0013] 本発明の三次元細胞培養物の製造方法ならびに本発明の三次元細胞培養物の培養方法は、細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記アストロサイトと、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む方法であり、培養容器に添加された全細胞中に占める上記アストロサイトの割合が30%以上である。

[0014] 「細胞の共培養に先立って」とは、1種または2種の細胞を添加してから、例えば1～24時間以内であれば、共培養が開始されているとは見なさない。

容器に添加された全細胞中に占めるアストロサイトの割合と、三次元細胞培養物におけるアストロサイトの割合は、実質的に同じである。容器に添加された全細胞中に占める神経細胞の割合と、三次元細胞培養物における神経細胞の割合は、実質的に同じである。容器に添加された全細胞中に占めるミクログリアの割合と、三次元細胞培養物におけるミクログリアの割合は、実質的に同じである。

[0015] 本発明においては、好ましくは、アストロサイトと、神経細胞と、ミクログリアとを同時に培養容器に添加することができる。

具体的には、例えば、上記の3種の細胞を1つの容器に入れて培養培地に懸濁および混合したものを培養容器に添加してもよい。この場合には、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程は、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養培地に懸濁する工程、および上記により得られた上記アストロサイト、上記神経細胞および上記ミクログリアを含む培養培地を同時に培養容器に添加する工程を含む。

[0016] あるいは、上記の3種の細胞の各々を、それぞれ別々の培養培地に懸濁したものを、同一の培養容器に同時に添加してもよい。あるいは、それぞれ別

々に凍結保存されていた3種の凍結細胞をそれぞれ融解したものを、同一の培養容器に同時に添加してもよい。

ただし、アストロサイトと、神経細胞と、ミクログリアとを同時に培養容器に添加する態様は、上記に限定されるものではない。

[0017] 本発明においては、3種の細胞（アストロサイト、神経細胞、およびミクログリア）を同時に播種することで任意の割合において共培養することができる。また、3種の細胞（アストロサイト、神経細胞、およびミクログリア）を三次元にて培養することで、従来の培養系よりもよりヒト脳を反映および模倣することができ、脳本来の機能や病態形成メカニズムを研究する上において有用である。本発明においては、3種の細胞を使用するため、脳機能や病態形成における細胞間相互作用を評価することができる。

[0018] 3種の細胞の三次元培養により3週間の培養で神経活動評価が可能である。3種の細胞の二次元の共培養では神経活動評価を行うには4週間の培養が必要なことから、三次元培養にすることで神経細胞のネットワーク構築を促進している可能性がある。

[0019] また、3種の細胞を同時に播種することにより、神経細胞がネットワークを構築する過程や成熟する過程におけるグリア細胞の影響を評価することができる。

[0020] アストロサイト、神経細胞、およびミクログリアは、好ましくは、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである。

[0021] ヒト由来の多能性幹細胞としては、ヒトiPS細胞（human induced pluripotent stem cells）、ヒトES細胞（human embryonic stem cells）、ヒト間葉系幹細胞などを挙げることができる。ヒトiPS細胞が好ましいが、特に限定されない。ヒトiPS細胞とは、ヒト細胞から作製されたiPS細胞である。

[0022] ヒト由来の多能性幹細胞としては、神経系疾患の原因となる疾患関連遺伝子に変異がない検体由来の多能性幹細胞、神経系疾患を有しない健康なヒト

(健常者)から採取した検体由来の多能性幹細胞、疾患を有する患者から採取した検体由来の多能性幹細胞、または疾患関連遺伝子に変異がある検体由来の多能性幹細胞などが挙げられる。「疾患関連遺伝子に変異がない」とは、神経系疾患の原因となるような疾患関連遺伝子の変異を有しないことを意味する。即ち、遺伝子に変異があっても、疾患の原因とならないような変異である場合には、疾患関連遺伝子に変異がないと解釈するものとする。また、「疾患関連遺伝子に変異がある」場合、その変異は患者が元々有する内因性の遺伝子変異であっても、人為的に遺伝子変異を導入した外因性の遺伝子変異であってもよい。疾患を有する患者から採取した検体由来の多能性幹細胞、または疾患関連遺伝子に変異がある検体由来の多能性幹細胞を用いて本発明の三次元細胞培養物を製造することで、検体由来の疾患や疾患関連遺伝子の変異に起因する疾患の病態を模倣し得ることが想定される。

[0023] ES細胞は、例えば、着床以前の初期胚、上記の初期胚を構成する内部細胞塊、単一割球などを培養することによって樹立することができる (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994、Thomson, J. A. et al: Science, 282, 1145-1147, 1998)。初期胚として、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を用いてもよい (Wilmut et al: Nature, 385, 810, 1997、Cibelli et al: Science, 280, 1256, 1998、入谷明ら: 蛋白質核酸酵素, 44, 892, 1999、Baguisi et al: Nature Biotechnology, 17, 456, 1999、Wakayama et al: Nature, 394, 369, 1998; Nature Genetics, 22, 127, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984, 1999、Rideout III et al: Nature Genetics, 24, 109, 2000、

Tachibana et al: Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell, 2013, in press)。初期胚として、単為発生胚を用いてもよい(Kim et al: Science, 315, 482-486, 2007、Nakajima et al: Stem Cells, 25, 983-985, 2007、Kim et al: Cell Stem Cell, 1, 346-352, 2007、Revazova et al: Cloning Stem Cells, 9, 432-449, 2007、Revazova et al: Cloning Stem Cells, 10, 11-24, 2008)。上掲の論文の他、ES細胞の作製についてはStrelchenko N, et al: Reprod Biomed Online. 9:623-629, 2004、Klimanskaya I, et al: Nature 444:481-485, 2006、Chung Y, et al: Cell Stem Cell 2:113-117, 2008、Zhang X, et al: Stem Cells 24:2669-2676, 2006、Wassarman, P. M. et al: Methods in Enzymology, Vol. 365, 2003、などが参考になる。なお、ES細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合ES細胞も、本発明の方法に用いられる胚性幹細胞に含まれる。

[0024] ES細胞の中には、保存機関から入手可能なもの、あるいは市販されているものもある。例えば、ヒトES細胞については京都大学再生医科学研究所(例えばKhES-1、KhES-2およびKhES-3)、WiCell Research Institute、ESI BIOなどから入手可能である。

[0025] iPS細胞は、初期化因子の導入により体細胞を初期化(リプログラミング)することによって作製される、多能性(多分化能)と増殖能を有する細胞を意味する。iPS細胞はES細胞に近い性質を示す。iPS細胞の作製

に使用する体細胞は特に限定されず、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。iPS細胞は、公知の方法などにより作製することができる。また、今後開発されるiPS細胞作製法を適用することも当然に想定される。

[0026] iPS細胞の作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるOct 3/4、Sox 2、Klf 4およびc-Mycの4因子を、ウイルスを利用して細胞へ導入する方法である (Takahashi K, Yamanaka S : Cell 126 (4), 663-676, 2006、Takahashi K, et al : Cell 131 (5), 861-72, 2007)。ヒトiPS細胞についてはOct 4、Sox 2、Lin 28およびNanogの4因子の導入による樹立の報告がある (Yu J, et al : Science 318 (5858), 1917-1920, 2007)。c-Mycを除く3因子 (Nakagawa M, et al : Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008)、Oct 3/4およびKlf 4の2因子 (Kim J B, et al : Nature 454 (7204), 646-650, 2008)、あるいはOct 3/4のみ (Kim J B, et al : Cell 136 (3), 411-419, 2009) の導入によるiPS細胞の樹立も報告されている。また、遺伝子の発現産物であるタンパク質を細胞に導入する手法 (Zhou H, Wu S, Joo JY, et al : Cell Stem Cell 4, 381-384, 2009; Kim D, Kim CH, Moon JI, et al : Cell Stem Cell 4, 472-476, 2009) も報告されている。一方、ヒストンメチル基転移酵素G9aに対する阻害剤BIX-01294やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸 (VPA) あるいはBayK 8644などを使用することによって作製効率の向上や導入する因子の低減などが可能であるとの報告もある (Huangfu D, et al : Nat. Biotechnol. 26 (7), 795-797, 2008; Huangfu D, et al : Nat. Biot

technol. 26 (11), 1269–1275, 2008; Silva J, et al: PLoS. Biol. 6 (10), e253, 2008)。遺伝子導入法についても検討が進められ、レトロウイルスの他、レンチウイルス (Yu J, et al: Science 318 (5858), 1917–1920, 2007)、アデノウイルス (Stadtfield M, et al: Science 322 (5903), 945–949, 2008)、プラスミド (Okita K, et al: Science 322 (5903), 949–953, 2008)、トランスポゾンベクター (Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al: Nature 458, 766–770, 2009; Kaji K, Norrby K, Paca A, et al: Nature 458, 771–775, 2009; Yusa K, Rad R, Takeda J, et al: Nat Methods 6, 363–369, 2009)、あるいはエピソーマルベクター (Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al: Science 324, 797–801, 2009) を遺伝子導入に利用した技術が開発されている。

[0027] iPS細胞への形質転換、即ち初期化（リプログラミング）が生じた細胞はFbxo15、Nanog、Oct3/4、Fgf-4、Esg-1およびCrip1などの多能性幹細胞マーカー（未分化マーカー）の発現などを指標として選択することができる。選択された細胞をiPS細胞として回収することができる。

[0028] iPS細胞の作製法として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加などにより体細胞からiPS細胞を誘導することもできる (Hou P, et al: Science 341 (6146), 651–654, 2013)。

[0029] iPS細胞は、例えば、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. (FCDI)、国立大学法人京都大学、または独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから提供を受けることもできる。

[0030] ヒト由来のアストロサイトとしては、アストロサイト前駆細胞（X C e l l Science, XCS-AP-001-1Vなど）から分化誘導したアストロサイト、i C e l l（登録商標）アストロサイト（F U J I F I L M Cellular Dynamics, C1037）などが挙げられ、アストロサイト前駆細胞から分化誘導したアストロサイトが好ましい。アストロサイト前駆細胞からアストロサイトに分化誘導する場合、血清非存在下で分化誘導することが好ましい。

[0031] ヒト由来の神経細胞の入手方法としては、例えば、神経系疾患の原因となる疾患関連遺伝子の変異や神経系疾患を有しない健康なヒト（健常者）から採取した体細胞、または神経系疾患を有する患者から採取した体細胞より作製したヒト i P S 細胞から誘導すること、株化されたヒト i P S 細胞から誘導することなどにより入手することが挙げられる。

[0032] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞は、特に限定されないが、好ましくは、運動神経細胞、大脳皮質興奮神経細胞または黒質神経細胞である。

[0033] ヒト由来の多能性幹細胞から神経細胞を分化誘導するための方法としては、特に限定されないが、低分子化合物処置などを用いて多能性幹細胞から神経幹細胞を作製後、神経細胞へ誘導する方法と、遺伝子発現などにより神経細胞へ直接誘導する方法がある。

[0034] 多能性幹細胞から神経細胞を分化誘導するための方法としては、例えば、
（１）無血清培地中で培養して胚様体（神経前駆細胞を含む細胞塊）を形成させて分化させる方法（S F E B 法：W a t a n a b e K, et al, Nat. Neurosci., 8:288-296, 2005; S F E B q 法：W a t a y a T, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105:11796-11801, 2008）；
（２）ストローマ細胞上で培養して分化させる方法（S D I A 法：K a w a s a k i H, et al, Neuron, 28:31-40, 2000）；

(3) 薬剤を添加したマトリゲル上で培養して分化させる方法 (Chambers S. M, et al, Nat. Biotechnol., 27:275-280, 2009) ;

(4) サイトカインの代替物として低分子化合物を含む培地中で培養して分化する方法 (米国特許第5,843,780号) ;

(5) 多能性幹細胞に神経誘導因子 (Neurogenin2 (NGN2) タンパク質をコードする遺伝子など) を導入し発現させることで分化させる方法 (WO2014/148646 ; および Zhang Y., et al, Neuron, 78:785-98, 2013) ;

(6) 多能性幹細胞に miR-9/9*-124 を導入し発現させることで分化させる方法 ;

およびこれらの方法の組み合わせなどが挙げられる。

[0035] 上記のうち、(5) 多能性幹細胞に NGN2 タンパク質をコードする遺伝子を導入して発現させる方法は、短期間かつ高効率で成熟した神経細胞が得られることから好ましい。

[0036] ヒト由来の神経細胞としては、NGN2の強制発現による iPS 細胞から分化した誘導神経細胞、iCell (登録商標) グルタミン酸作動性神経 (FUJIFILM Cellular Dynamics, C1033)、iCell (登録商標) GABA 作動性神経 (FUJIFILM Cellular Dynamics, C1008)、iCell (登録商標) ドーパミン神経 (FUJIFILM Cellular Dynamics, C1028)、iCell (登録商標) 運動神経 (FUJIFILM Cellular Dynamics, C1048) などが挙げられ、NGN2の強制発現による iPS 細胞から分化した誘導神経細胞および iCell (登録商標) グルタミン酸作動性神経が好ましい。

[0037] ヒト由来のミクログリアとしては、iCell (登録商標) ミクログリア (FUJIFILM Cellular Dynamics, C1110)、ミクログリア (Axol Bioscience, AX0664) などが

挙げられ、i C e l l（登録商標）ミクログリアが好ましい。

[0038] アストロサイトは、G F A P (glial fibrillary acidic protein)、S 1 0 0 β (S100 calcium binding protein B)、K C N J 1 0 (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 10)、A Q P 4 (Aquaporin -4)、S L C 1 A 3 (solute carrier family 1 member 3) からなるアストロサイトに特異的なマーカー遺伝子を少なくとも1以上発現する細胞である。

[0039] 神経細胞は、好ましくは、 β -t u b u l i n、NeuN、N-C A M (neural cell adhesion molecule)、M A P 2 (microtubule-associated protein 2) からなる神経細胞に特異的なマーカー遺伝子を少なくとも1以上発現し、かつ、 β -t u b u l i n陽性の突起（以降、神経突起と呼ぶ）を有する細胞である。

[0040] ミクログリアは、I B A 1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)、C D 3 3、C D 4 5、T R E M 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2)、P 2 R Y 1 2 (purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12)、T M E M 1 1 9 (Transmembrane Protein 119)、C X 3 C R 1 (CX3C-chemokine receptor 1) からなるミクログリアに特異的なマーカー遺伝子を少なくとも1以上発現する細胞である。

[0041] マーカー遺伝子の発現レベルは、通常、遺伝子に対応する転写産物の産生量、またはその翻訳産物の産生量、活性などにより解析することができる。発現レベルの測定は、遺伝子の転写産物であるm R N Aや遺伝子の翻訳産物であるタンパク質の測定により行うことができるが、m R N Aまたはその逆転写産物であるc D N Aの測定により行うことが好ましい。翻訳産物（タンパク質）の発現の検出または測定は、抗体を用いて細胞内のタンパク質を検出する免疫細胞染色により行うことができる。

[0042] 本発明においては、培養容器に添加された全細胞中に占める上記アストロサイトの割合が30%以上であり、好ましくは35%以上であり、より好ましくは40%以上であり、さらに好ましくは45%以上である。培養容器に

添加された全細胞中に占める上記アストロサイトの割合の上限は特に限定されないが、一般的には80%以下であり、好ましくは70%以下である。

[0043] 培養容器に添加された全細胞中に占めるアストロサイトの割合を30%以上とすることにより、神経細胞の成熟化を促進し、カルシウムイメージングなどによる神経活動評価において、神経細胞の成熟化やネットワーク構築の指標であるカルシウムオシレーションを安定して明瞭に検出できる。

[0044] 培養容器に添加された全細胞中に占めるミクログリアの割合は、好ましくは50%以下であり、より好ましくは40%以下であり、さらに好ましくは30%以下である。培養容器に添加された全細胞中に占めるミクログリアの割合の下限は特に限定されないが、一般的には0.1%以上であり、好ましくは1%以上であり、さらに好ましくは10%以上である。

[0045] ミクログリアの割合を0.1%以上とすることにより、神経炎症によって活性化したミクログリアが他の細胞に影響を与えることが確認できており、神経炎症時の細胞間相互作用の評価が可能である。

[0046] 培養容器に添加された全細胞中に占める神経細胞の割合は、好ましくは10%以上であり、より好ましくは15%以上であり、さらに好ましくは20%以上、特に好ましくは25%以上である。神経細胞の割合の上限は特に限定されないが、一般的には65%以下であり、好ましくは60%以下である。

[0047] 神経細胞の割合を10%以上とすることにより、カルシウムイメージングによってカルシウムオシレーションが明確に検出でき、神経活動評価に有用である。また、本発明では神経細胞、アストロサイト、ミクログリアが長期間培養できていることを免疫染色により確認できており、神経活動へのグリア細胞の影響を評価できる。

[0048] 本発明においては、アストロサイトと、神経細胞と、ミクログリアとを培養容器中で共培養する。

培養容器としては、ウェルを有するプレート、ディッシュ、セルカルチャーインサート、または細胞培養用フラスコなどを使用することができ、ウェ

ルを有するプレートが好ましい。具体的には、Prime Surface（登録商標）プレート（住友ベークライト）、セルリペレント・プレート（Greiner Bio one）などが挙げられ、Prime Surface プレート（住友ベークライト）が好ましい。

[0049] 培養容器の形状としては、丸底、U字底、またはV字底などが挙げられるが、特に限定されない。

[0050] 容器内の培地が接触する表面の性質としては、細胞非接着性であることが好ましい。これにより、細胞が浮遊状態で培養されることになり、スフェロイドを形成しやすくなる。あるいは、容器内部の表面のある部位のみ細胞接着性とし、それ以外の部位を細胞非接着性としてもよい。この場合には、細胞接着性の部位に、細胞が集まり、スフェロイドを形成することができる。

[0051] 96ウェルプレートへの播種時の細胞数（細胞数とは、3種類の細胞の合計の細胞数である。以下も同様）の下限値は、特に制限されないが、例えば、 0.7×10^4 細胞/ウェル以上であることが好ましく、 1.0×10^4 細胞/ウェル以上であることがより好ましく、 1.2×10^4 細胞/ウェル以上であることがさらに好ましく、 1.4×10^4 細胞/ウェル以上であることがよりさらに好ましく、 1.6×10^4 細胞/ウェル以上であることが特に好ましく、 1.8×10^4 細胞/ウェル以上であることが最も好ましい。培養容器への播種時の細胞密度の上限値は、特に限定されないが、例えば、 8.0×10^4 細胞/ウェル以下であってもよく、 8.0×10^4 細胞/ウェル未満が好ましく、 5.0×10^4 細胞/ウェル以下がより好ましく、 3.0×10^4 細胞/ウェル以下がさらに好ましく、 2.5×10^4 細胞/ウェル以下がよりさらに好ましく、 2.3×10^4 細胞/ウェル以下が特に好ましい。

[0052] 96ウェルプレートへの播種時の細胞数は、好ましくは 1.0×10^4 細胞/ウェル以上 8.0×10^4 細胞/ウェル以下であり、より好ましくは 1.2×10^4 細胞/ウェル以上 5.0×10^4 細胞/ウェル以下であり、さらに好ましくは 1.4×10^4 細胞/ウェル以上 3.0×10^4 細胞/ウェル以下であり、よりさらに好ましくは 1.6×10^4 細胞/ウェル以上 2.5×10^4

細胞／ウェル以下であり、特に好ましくは 1.8×10^4 細胞／ウェル以上 2.3×10^4 細胞／ウェル以下である。

[0053] 培地は、公知の培地または市販の培地から選択することができる。培養に用いる培地は、基礎培地へ添加剤を加えて用いることができる。ここで、基礎培地は、例えば、DMEM、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）／F12、BrainPhys（登録商標）Neuronal Medium、Neurobasal（商標）Medium-A、Neurobasal（商標）Medium、Neural Progenitor Basal Medium、NS-A Basal Medium、Basal Medium Eagle（BME）、BGJb Medium、CMRL 1066 Medium、Glasgow Minimum Essential Medium（MEM）、Improved MEM Zinc Option、Iscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM）、Medium 199、Eagle MEM、 α MEM、Ham's F12 Medium、RPMI 1640 Medium、およびFischer's Mediumなどが挙げられる。また、培地は、単一の培地を用いてもよく、2種以上の培地を組み合わせ用いてもよい。

[0054] 培地に添加することができる添加剤として、具体的には血清、レチノイン酸、Wnt、BMP（bone morphogenetic protein）（BMP-4など）、CNTF（ciliary neurotrophic factor）、BDNF（brain-derived neurotrophic factor）、GDNF（glial cell line-derived neurotrophic factor）、bFGF（basic fibroblast growth factor）、EGF（epidermal growth factor）、HGF（hepatocyte growth factor）、SHH（sonic hedgehog）、IGF-1（insulin-like growth factor 1）、Activin A、Heregulin β -1、インターロイキン類、8-Br-cAMP、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン、プロゲステロン、セレナイト、B-27（登録商標）サプリメント、N2

Supplement with Transferrin (Apo)、N₂ Supplement with Transferrin、GlutaMAX (商標)、L (+) -アスコルビン酸、ITS-サプリメント、MEM Non-Essential Amino Acid、GlutaMAX (商標) supplementなどが挙げられるが、特に限定されない。さらに、抗生物質 (Penicillin、Streptomycin など) を添加してもよい。

[0055] 培養条件としては、一般的な細胞培養の条件を選択すればよい。37℃、5%CO₂の条件などが例示される。培養中は適切な間隔 (好ましくは1日から7日に1回、より好ましくは2日から3日に1回) で培地交換をしてもよいが、培養期間中に培地交換をしなくてもよい。

[0056] 本発明において製造される三次元細胞培養物は、好ましくはスフェロイド形状である。アストロサイトと、神経細胞と、ミクログリアとを培養容器中で共培養することによってスフェロイドを形成することができる。あるいは、アストロサイトと、神経細胞と、ミクログリアとを培養容器中でゲル化する培養液中において共培養し、共培養後に培養液をゲル化することによって三次元細胞培養物を製造することもできる。

[0057] 本発明によれば、上記した本発明の三次元細胞培養物の製造方法により得られる、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む三次元細胞培養物が提供される。本発明においては細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加していることから、本発明の三次元細胞培養物では、アストロサイト、神経細胞およびミクログリアが、三次元細胞培養物のコアおよび表面の全体に分布して存在していることが想定される。

[0058] 本発明の三次元細胞培養物は、3種の細胞 (アストロサイト、神経細胞、およびミクログリア) を三次元にて培養したものであることから、ヒト脳を反映および模倣することができ、例えば、神経変性疾患に有用な新たな薬剤

のスクリーニングなどに利用可能である。神経変性疾患としては、アルツハイマー病（A D）、脊髄小脳変性症、前頭側頭葉変性症（F T L D）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、レビー小体病、ハンチントン病、およびニーマンピック病などを挙げることができる。

[0059] 即ち、本発明によれば、上記した本発明の三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法が提供される。本発明によればさらに、本発明の製造方法により三次元細胞培養物を製造すること、および上記三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法が提供される。

[0060] より具体的には、本発明によればさらに、

- （１）本発明の三次元細胞培養物と被験物質とを接触させる工程、
 - （２）上記工程（１）で上記被験物質と接触させた三次元細胞培養物、および上記被験物質を接触させなかった対照の本発明の三次元細胞培養物を培養する工程、
 - （３）上記三次元細胞培養物の機能（例えば、グルタミン取り込み、カルシウムオシレーションなど）を測定する工程、および
 - （４）被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記の機能を変化させる被験物質を、候補薬剤として選択する工程、
- を含む、薬剤のスクリーニング方法が提供される。

[0061] 被験物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸（遺伝子発現ベクター、s i R N A、m i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、m R N Aなど）、ウイルスベクター（A A V、レンチウイルス、アデノウイルスなど）、非ペプチド性化合物、合成化合物、合成低分子化合物、天然化合物、細胞抽出物、細胞外小胞、植物抽出物、動物組織抽出物、血漿、海洋生物由来の抽出物、細胞培養上清、および微生物発酵産物などが挙げられる。

[0062] また、被験物質は、（１）生物学的ライブラリー法、（２）デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、（３）１ビーズ１化合物（o n e

bead one-compound) ライブラリー法、および (4) アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他のアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる (Lam (1997) *Anti-cancer Drug Des.* 12:145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る (DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-13; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-6; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303-5; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液 (Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-21を参照のこと) またはビーズ (Lam (1991) *Nature* 354:82-4)、チップ (Fodor (1993) *Nature* 364:555-6)、細菌 (米国特許第5, 223, 409号)、孢子 (米国特許第5, 571, 698号、同第5, 403, 484号、および同第5, 223, 409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-9) もしくはファージ (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-90; Devlin (1990) *Science* 249:404-6;

C w i r l a e t a l . (1 9 9 0) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 6 3 7 8 - 8 2 ; F e l i c i (1 9 9 1) J . M o l . B i o l . 2 2 2 : 3 0 1 - 1 0 ; 米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 0 2 / 0 1 0 3 3 6 0 号) と し て 作 製 さ れ 得 る。

[0063] 三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることは、三次元細胞培養物の培養液へ被験物質を添加することで行ってもよい。接触は、指標の変化が確認できる時間であれば、特に限定されないが、例えば、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上である。添加される被験物質の濃度は化合物の特性（溶解性、毒性など）によって適宜調節可能である。

[0064] 三次元細胞培養物と被験物質とを接触させる際に用いる、三次元細胞培養物の培養液は、三次元細胞培養物を培養できる培地であれば、特に限定されない。

[0065] 被験物質と三次元細胞培養物を接触させる際の培養温度は、特に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2～5%である。

[0066] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

実施例

[0067] <三次元共培養物の作製>

マトリゲル基底膜マトリックス (C o r n i n g , 3 5 4 2 3 4) にてコーティングしたフラスコに、ヒト i P S 細胞由来アストロサイト前駆細胞 (X C e l l S c i e n c e , X C S - A P - 0 0 1 - 1 V) を播種し、分化誘導培地を用いて5日間培養 (3 7 ℃、5 % C O ₂) することでアストロサイトへと分化誘導した。

[0068]

[表1]

分化誘導培地

試薬名	メーカー・型番	終濃度
N2 Supplement with Transferrin (Apo) (×100)	富士フイルム和光純薬, 141-09041	×1
GlutaMAX (商標)	Thermo Fisher Scientific, 35050-061	1%
MEM Non-Essential Amino Acid	Thermo Fisher Scientific, 11140-050	1%
Penicillin-Streptomycin Solution (×100)	富士フイルム和光純薬, 168-23191	×0.5
Heparin Sodium	富士フイルム和光純薬, 085-00134	0.5U/mL
Animal-Free Recombinant Human CNTF	PeproTech, AF-450-13	10ng/mL
Animal-Free Recombinant Human BMP-4	PeproTech, AF-120-05ET	10ng/mL

- [0069] 分化誘導したアストロサイトは、TrypLE (商標) Select (Thermo Fisher Scientific, 12563-029) にて剥離し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1mLの共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。
- [0070] iPS細胞からNgn2遺伝子を強制発現 (WO2014/148646; およびZhang Y, et al, Neuron, 78:785-98, 2013) することにより作製した神経細胞は、37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を共培養培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1mLの共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。
- [0071] iPS細胞由来ミクログリア (iCell (登録商標) ミクログリア, FCDI, C1110) は、37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を共培養培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1mLの共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

[0072] アストロサイト、神経細胞およびミクログリアは、10:6:3 (53%:32%:16%) の細胞数の割合で混合し、 1.9×10^4 cells/well となるように96ウェルプレート (PrimeSurface (登録商標) プレート96U、住友ベークライト、MS-9096U) に播種した。37℃、5%CO₂条件下で培養し、週3回、半量を培地交換した。

[0073] [表2]

共培養培地

試薬名	メーカー・型番	終濃度
N2 Supplement with Transferrin (Apo) (×100)	富士フイルム和光純薬, 141-09041	×1
GlutaMAX (商標)	Thermo Fisher Scientific, 35050-061	1%
MEM Non-Essential Amino Acid	Thermo Fisher Scientific, 11140-050	1%
Penicillin-Streptomycin Solution (×100)	富士フイルム和光純薬, 168-23191	×0.5
Animal-Free Recombinant Human CNTF	PeptideTech, AF-450-13	10ng/mL
Animal-Free Recombinant Human BMP-4	PeptideTech, AF-120-05ET	10ng/mL
8-Br-cAMP	Sigma Aldrich, B7880	1μmol/L
Animal-Free Recombinant Human/Murine/Rat BDNF	PeptideTech, AF-450-02	20ng/mL
Recombinant Human GDNF	PeptideTech, 450-10	20ng/mL
L (+)-Ascorbic Acid	富士フイルム和光純薬, 012-04802	20nmol/L
Laminin	Sigma Aldrich, L2020	1μg/mL
B-27 (登録商標) Supplement (50X), serum free	Thermo Fisher Scientific, 17504044	×0.5

[0074] <細胞固定および免疫染色>

3週間培養した三次元共培養物は、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩

衝液（富士フイルム和光純薬，161-20141）で30分間処理することにより固定した。PBS（－）にて洗浄後、PBS（－）で0.4％に希釈したTriton（登録商標）X-100溶液（BioVision，2104-100）を15分処理することで透過処理を行った。透過処理後、PBS（－）で4％の濃度に調整したBSA溶液（Sigma Aldrich，A416）を30分処理し、ブロッキングを行った。その後、一次抗体反応として600倍希釈した抗MAP2抗体（Novus，NB300-213）、600倍希釈した抗IBA1抗体（富士フイルム和光純薬，019-19741）、および3000倍希釈した抗GFAP抗体（Merck，MAB3402）を処理し、4℃で一晩静置した。

[0075] 翌日、PBS（－）で洗浄後、二次抗体反応として1000倍希釈したGoat anti-rabbit Alexa Fluor（登録商標）488（Thermo fisher scientific，A11008）、1000倍希釈したGoat anti-Chicken Alexa Fluor（登録商標）594（Thermo fisher scientific，A11042）、1000倍希釈したGoat anti-Mouse Alexa Fluor（登録商標）647（Thermo fisher scientific，A32728）、および1000倍希釈したHoechst（登録商標）33342 solution（Dojindo，H342）を処理し、室温で60分間静置した。PBS（－）にて洗浄後、共焦点定量イメージサイトメーターCQ1（横河電機株式会社、CellVoyager（登録商標）CQ1）にて撮影し、画像を取得した。図1に取得した画像を示す。（A）は核（Hoechst）、（B）はミクログリア（IBA1）、（C）は神経細胞（MAP2）、（D）はアストロサイト（GFAP）を染色したもので、いずれの細胞もシグナルを検出することができた。また、アストロサイト、神経細胞およびミクログリアが、三次元共培養物のコアおよび表面の全体に分布して存在していることが確認できた。

[0076] <神経活動評価>

下記に従い、Working溶液、およびRecording溶液を調製した。

[0077] [表3]

Working溶液

試薬名	メーカー・型番	終濃度
HBSS (−) without Phenol Red	富士フイルム和光純薬, 085-09355	×1
Calcium Chloride Dihydrate	富士フイルム和光純薬, 036-19731	2.5mmol/L
Calbryte (商標) 520 AM	AAT Bioquest, 20651	4μmol/L
Pluronic F-127 (20% Solution in DMSO)	Thermo Fisher Scientific, P3000MP	0.04%
HEPES Buffer Solution	Dojindo, GB60	10mmol/L
Hoechst (登録商標) 33342 solution	Dojindo, H342	×1000

[0078] [表4]

Recording溶液

試薬名	メーカー・型番	終濃度
HBSS (−) without Phenol Red	富士フイルム和光純薬, 085-09355	×1
Calcium Chloride Dihydrate	富士フイルム和光純薬, 036-19731	2.5mmol/L
HEPES Buffer Solution	Dojindo, GB60	10mmol/L

[0079] 神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの割合を5 : 85 : 10、80 : 10 : 10、もしくは60 : 30 : 10として作製した三次元共培養物を3週間培養後、培養培地と等量のWorking溶液を加え、37℃で1時間インキュベートした。その後、PBS (−) にて洗浄し、PBS (−) と等量のRecording溶液を加えた。その後、共焦点定量イメージサイトメーターCQ1にてCalbryte (商標) 520 AMの緑色蛍光画像を取得した (3画像/秒、2分間)。その後、ImageJ (NIH,

version, 1.50i)にて経時的に蛍光強度を定量した。結果を図2に示す。神経細胞の割合が5%の三次元共培養物では(図2A)、神経活動の指標であるカルシウムオシレーション(繰り返しの同調的なカルシウムイオンの流入)の強度が弱く不明瞭である。一方、神経細胞の割合が80%、アストロサイトの割合が10%の三次元共培養では(図2B)、明瞭なカルシウムオシレーションが確認できるが間隔が不規則である。神経細胞の割合が60%、アストロサイトの割合が30%の三次元共培養では(図2C)規則的かつ明瞭なカルシウムオシレーションが確認できた。このことから、カルシウムオシレーションの強度や頻度を評価するためには、神経細胞の割合が10%以上、およびアストロサイトの割合が30%以上の三次元共培養が適していることが明らかになった。

[0080] <神経炎症時の細胞間相互作用>

3週間培養した三次元共培養物は、終濃度が100ng/mLとなるようにLipopolysaccharide (LPS), from E. coli O127 (富士フイルム和光純薬, 124-05151)で処理し、0、0.5、1、3、6、および24時間後に4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(富士フイルム和光純薬, 161-20141)で30分処理することにより固定する。PBS(-)にて洗浄後、PBS(-)で0.4%に希釈したTriton(登録商標)X-100溶液(BioVision, 2104-100)で15分間処理することで透過処理を行う。透過処理後、PBS(-)で4%の濃度に調整したBSA溶液(Sigma Aldrich, A416)で30分処理し、ブロッキングを行う。その後、一次抗体反応として1000倍希釈した抗IBA1抗体(富士フイルム和光純薬, 011-27991)、および800倍希釈した抗NF- κ B p65抗体(Cell Signaling, 8242)で処理し、4℃で一晩静置する。

翌日、PBS(-)で洗浄後、二次抗体反応として1000倍希釈したDonkey anti-goat Alexa Fluor(登録商標)

488 (Thermo fisher scientific, A11055)、1000倍希釈したDonkey anti-rabbit Alexa Fluor (登録商標) 594 (Thermo fisher scientific, A32754)、および1000倍希釈したHoechst (登録商標) 33342 solution (Dojindo, H342) で処理し、室温で60分間静置する。PBS (－) にて洗浄後、共焦点定量イメージサイトメーターCQ1 (横河電機株式会社、Cell Voyager (登録商標) CQ1) にて撮影し、画像を取得する。

[0081] LPS処理後のNF- κ Bの核内局在の変化を観察することで、ミクログリアの活性化がその他の細胞に影響を与えること、すなわち細胞間相互作用が生じることが確認できる。

請求の範囲

- [請求項1] 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および前記アストロサイトと、前記神経細胞と、前記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、三次元細胞培養物の製造方法であって、培養容器に添加された全細胞中に占める前記アストロサイトの割合が30%以上である、三次元細胞培養物の製造方法。
- [請求項2] 前記アストロサイトと、前記神経細胞と、前記ミクログリアとを同時に培養容器に添加する、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程が、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養培地に懸濁する工程、および上記により得られた前記アストロサイト、前記神経細胞および前記ミクログリアを含む培養培地を同時に培養容器に添加する工程を含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記アストロサイト、前記神経細胞、および前記ミクログリアが、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記ヒト由来の多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、請求項4に記載の製造方法。
- [請求項6] 培養容器に添加された全細胞中に占める前記ミクログリアの割合が50%以下である、請求項1から5の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項7] 培養容器に添加された全細胞中に占める前記神経細胞の割合が10%以上である、請求項1から5の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記三次元細胞培養物が、スフェロイド形状である、請求項1から5の何れか一項に記載の製造方法。
- [請求項9] 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来

の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および前記アストロサイトと、前記神経細胞と、前記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、三次元細胞培養物の培養方法であって、培養容器に添加された全細胞中に占める前記アストロサイトの割合が30%以上である、三次元細胞培養物の培養方法。

[請求項10] 前記アストロサイトと、前記神経細胞と、前記ミクログリアとを同時に培養容器に添加する、請求項9に記載の培養方法。

[請求項11] 細胞の共培養に先立って、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程が、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養培地に懸濁する工程、および上記により得られた前記アストロサイト、前記神経細胞および前記ミクログリアを含む培養培地を同時に培養容器に添加する工程を含む、請求項9に記載の培養方法。

[請求項12] 前記アストロサイト、前記神経細胞、および前記ミクログリアが、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである、請求項9に記載の培養方法。

[請求項13] 前記ヒト由来の多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、請求項12に記載の培養方法。

[請求項14] 培養容器に添加された全細胞中に占める前記ミクログリアの割合が50%以下である、請求項9から13の何れか一項に記載の培養方法。

[請求項15] 培養容器に添加された全細胞中に占める前記神経細胞の割合が10%以上である、請求項9から13の何れか一項に記載の培養方法。

[請求項16] 前記三次元細胞培養物が、スフェロイド形状である、請求項9から13の何れか一項に記載の培養方法。

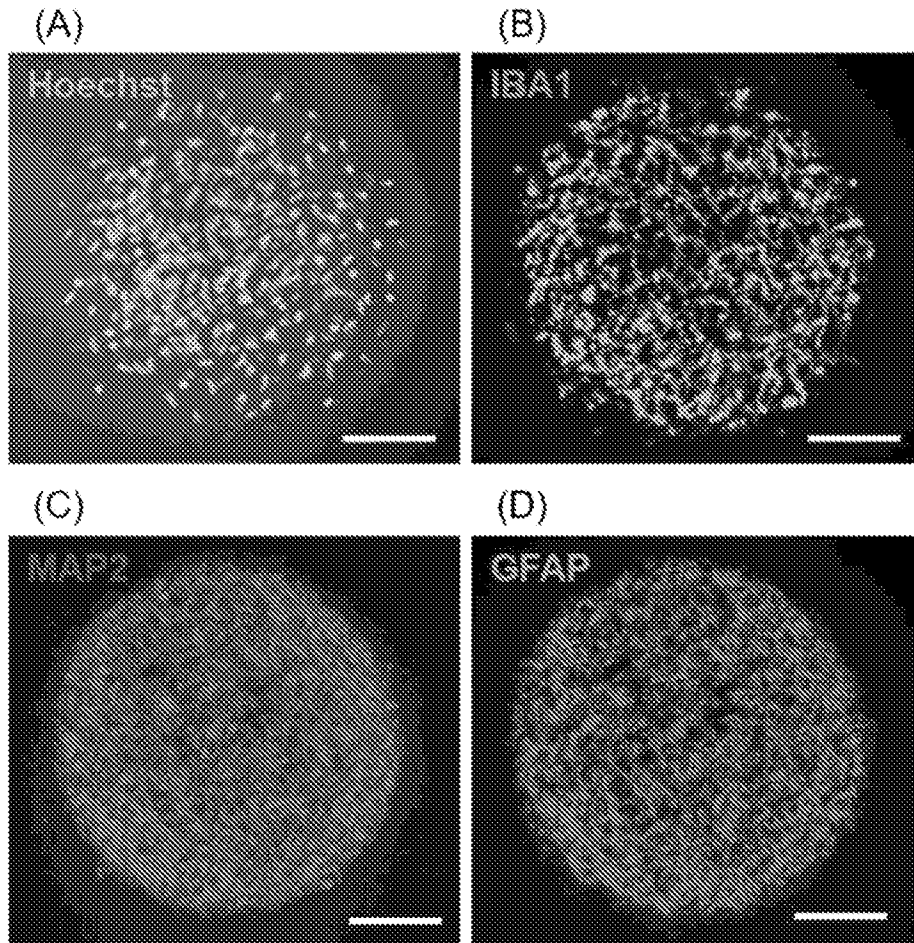
[請求項17] 請求項1から5の何れか一項に記載の製造方法により得られる、ヒト由来のアストロサイトと、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミク

ログリアとを含む三次元細胞培養物。

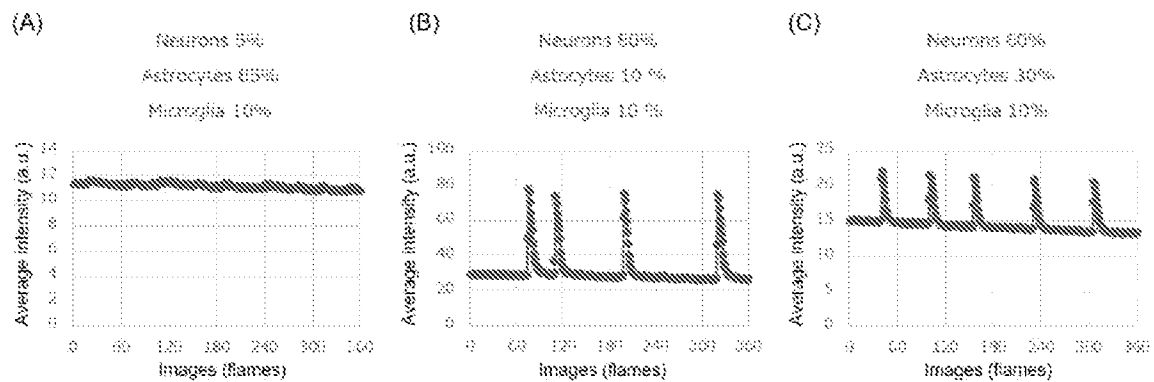
[請求項18] 請求項17に記載の三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法。

[請求項19] 請求項1から5の何れか一項に記載の製造方法により三次元細胞培養物を製造すること、および前記三次元細胞培養物と被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法。

[图1]



[图2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 5/079*(2010.01)i; *C12N 5/0793*(2010.01)i; *C12N 5/10*(2006.01)i; *C12Q 1/02*(2006.01)i

FI: C12N5/079; C12N5/0793; C12N5/10; C12Q1/02

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)

C12N5/079; C12N5/0793; C12N5/10; C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024

Registered utility model specifications of Japan 1996-2024

Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/183015 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01 September 2022 (2022-09-01) claims 36, 46, 54	1-19
A	CN 114480284 A (LYU, T.) 13 May 2022 (2022-05-13) whole document	1-19
A	LUCHENA, Celia et al., A Neuron, Microglia, and Astrocyte Triple Co-culture Model to Study Alzheimer's Disease, Frontiers in Aging Neuroscience, 14 April 2022, vol. 14, Article no. 844534, DOI: 10.3389/fnagi.2022.844534 whole document	1-19
A	XU, Ranjie et al., Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable microglia ratio for modeling brain development and pathology, Stem Cell Reports, 10 August 2021, vol. 16, pp. 1923-1937, DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.06.011 whole document	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

05 August 2024

Date of mailing of the international search report

20 August 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOSHI, Noah et al., A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation, Journal of Neuroinflammation, 11 May 2020, vol. 17, Article no. 155, DOI: 10.1186/s12974-020-01819-z whole document	1-19
A	JENSEN, Gregory et al., 3D tissueengineering,anemergingtechniquefor pharmaceutical research, Acta Pharmaceutica SinicaB, September 2018, vol. 8, Issue 5, pp. 756-766, DOI: 10.1016/j.apsb.2018.03.006 whole document	1-19
A	ZHANG, Wendiao et al., Microglia-containing human brain organoids for the study of brain development and pathology, Molecular Psychiatry, 6 December 2022, vol. 28, pp. 96-107, DOI: 10.1038/s41380-022-01892-1 whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023479

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022/183015	A1	01 September 2022	EP 4288519 A1 claims 36, 46, 54	
CN	114480284	A	13 May 2022	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 5/079(2010.01)i; C12N 5/0793(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i

FI: C12N5/079; C12N5/0793; C12N5/10; C12Q1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N5/079; C12N5/0793; C12N5/10; C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922 - 1996年

日本国公開実用新案公報

1971 - 2024年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN); PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2022/183015 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01.09.2022 (2022 - 09 - 01) Claims 36,46,54	1-19
A	CN 114480284 A (LYU TIANMING) 13.05.2022 (2022 - 05 - 13) Whole Document	1-19
A	LUCHENA, Celia et al., A Neuron, Microglia, and Astrocyte Triple Co-culture Model to Study Alzheimer' s Disease, Frontiers in Aging Neuroscience, 2022.04.14, Vol. 14, Article No. 844534, DOI: 10.3389/fnagi.2022.844534 Whole Document	1-19
A	XU, Ranjie et al., Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable microglia ratio for modeling brain development and pathology, Stem Cell Reports, 2021.08.10, Vol. 16, pp. 1923-1937, DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.06.011 Whole Document	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.08.2024

国際調査報告の発送日

20.08.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

大西 隆史 4N 1149

電話番号 03-3581-1101 内線 3891

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	GOSHI, Noah et al., A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation, Journal of Neuroinflammation, 2020.05.11, Vol. 17, Article No. 155, DOI: 10.1186/s12974-020-01819-z Whole Document	1-19
A	JENSEN, Gregory et al., 3D tissueengineering, anemergingtechniquefor pharmaceutical research, Acta Pharmaceutica SinicaB, 2018.09, Vol. 8, Issue 5, pp. 756-766, DOI: 10.1016/j.apsb.2018.03.006 Whole Document	1-19
A	ZHANG, Wendiao et al., Microglia-containing human brain organoids for the study of brain development and pathology, Molecular Psychiatry, 2022.12.06, Vol. 28, pp. 96-107, DOI: 10.1038/s41380-022-01892-1 Whole Document	1-19

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023479

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2022/183015	A1	01.09.2022	EP	4288519	A1	
				Claims 36, 46, 54			
CN	114480284	A	13.05.2022	(ファミリーなし)			