

(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
2024年9月19日(19.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/190850 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/0793 (2010.01) C12N 5/079 (2010.01)
C12N 1/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12Q 1/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/009911

(22) 国際出願日: 2024年3月14日(14.03.2024)

(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 2023-039576 2023年3月14日(14.03.2023) JP
特願 2024-012581 2024年1月31日(31.01.2024) 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: 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). 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). 申 義庚 (SHIN Euikyung); 〒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). 田邊 寛和 (TANABE Hirokazu); 〒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). 増山 仁 (MASUYAMA Hitoshi); 〒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, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING NERVE CELLS DAMAGED BY OXIDATION STRESS AND APPLICATION THEREOF

(54) 発明の名称: 酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法およびその応用

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a method for producing, from human-derived pluripotent stem cells, nerve cells damaged by oxidation stress; a cell culture method for producing, from human-derived pluripotent stem cells, nerve cells damaged by oxidation stress; nerve cells damaged by oxidation stress; and a method for evaluating an analyte, a method for screening a prophylactic and/or therapeutic medicine for neurodegenerative diseases, a method for screening a necrosis inhibitor, and a method for screening a ferroptosis inhibitor, the methods using said nerve cells. The present invention provides a method for producing cells damaged by oxidization stress, the method comprising: a step a in which nerve cells that have been differentiation-induced from human-derived pluripotent stem cells are seeded in a culture medium that substantially does not contain an antioxidant agent and substantially does not contain an oxidation agent, at a cell density of 20.0×10^4 cells/cm² or less; and a step b in which a culture medium that substantially does not contain an antioxidant agent and substantially does not contain an oxidation agent is used to perform culture.

(57) 要約: 本発明は、ヒト由来の多能性幹細胞から酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造する方法; ヒト由来の多能性幹細胞から酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造することができる細胞の培養方法; 酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞; 上記神経細胞を用いた、被験物質の評価方法、神経変性疾患の予防および/または治療薬のスクリーニング方法、ネクロトーシス阻害剤のスクリーニング方法、およびフェロトーシス阻害剤のスクリーニング方法; を提供することを課題とする。本発明によれば、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 20.0×10^4 細胞/cm² 以下の細胞密度で播種する工程 a と、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養する工程 b とを含む、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法が提供される。

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))

明 細 書

発明の名称：

酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法およびその応用

技術分野

[0001] 本発明は、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法、および細胞の培養方法に関する。本発明はさらに、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞に関する。本発明はさらに、上記神経細胞を用いた、被験物質の評価方法、神経変性疾患の予防および／または治療薬のスクリーニング方法、ネクロトーシス阻害剤のスクリーニング方法、およびフェロトーシス阻害剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病（A D）や筋萎縮性側索硬化症（A L S）などの神経変性疾患は神経細胞が徐々に傷害を受けて脱落する疾患であり（非特許文献1および2）、その病態メカニズムには酸化ストレスが大きく関与することが知られている（非特許文献3および4）。ヒト神経変性疾患の *i n v i t r o* 研究は、ヒトの中枢神経系細胞の取得が難しかったことから、従来はラットやマウスの細胞が使われていた。しかし近年は人工多能性幹細胞（i P S細胞）の発明以降、神経細胞を含めたヒトの中枢神経系細胞を比較的容易に取得できるようになり、ヒト神経変性疾患の研究に大きく役立っている（非特許文献5～7）。

[0003] i P S細胞由来の神経細胞を用いて、神経変性疾患への酸化ストレスの影響が研究されている。例えばF e n g - L a n C h i uらの研究では、i P S細胞由来の神経細胞に過酸化水素を6時間処理することで酸化ストレスを与え、神経変性疾患の神経細胞傷害を再現している（非特許文献8）。また、特許文献1には、家族性A L S患者由来のi P S細胞から作製した運動神経をアルセナイトにて16時間処理することで傷害が惹起されることが記載されている。特許文献2には、ヒト由来i P S細胞から作製した運動神経

細胞が、過酸化水素の一過性処理により細胞傷害を起こすことが記載されている。しかし、神経変性疾患は長い時間をかけて徐々に神経細胞が脱落する疾患であるのに対し、過酸化水素などの酸化剤を使用する条件では短時間の酸化ストレス刺激により神経傷害が惹起されることから、生体で実際に生じる神経変性疾患の病態を再現できていない可能性がある。

[0004] そこで、弱い酸化ストレスを慢性的に与えることで神経変性疾患の神経細胞傷害を再現した研究がある（非特許文献9）。この研究では、弱い酸化ストレスを与え、かつ疾患に関連する遺伝子をノックアウトした場合にのみ神経傷害が惹起されることから、家族性の神経変性疾患を再現していると考えられる。また、特許文献3および非特許文献10においては、家族性AD患者由来のiPS細胞から作製した大脳皮質神経細胞は、抗酸化剤を含まない培地で培養することで酸化ストレスが亢進し、神経細胞傷害が惹起されることが記載されている。

[0005] しかしながら神経変性疾患は、例えばADは95%が孤発性（非特許文献11）、ALSでは90%が孤発性であることが知られており（非特許文献12）、疾患関連遺伝子に変異の無い患者が大部分である。そのため、孤発性の神経変性疾患の病態を簡便に再現可能な評価系が求められているが、十分な成果は得られていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表2015-506905号公報

特許文献2：特開2019-037245号公報

特許文献3：国際公開WO2013/140327号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Brittany N Duggerら、Cold Spring Harbor Perspectives in Biology、9巻、Article 番号a028035、2017年

非特許文献2：Hao Chiら、International Journal

al of Molecular Sciences、19巻、Article 番号3082、2018年

非特許文献3: Giovanna Ceniniら、Oxidative Medicine and Cellular Longevity、2019巻、Article 番号2105607、2019年

非特許文献4: Vanessa Castelliら、Frontiers in Molecular Neuroscience、12巻、Article 番号132、2019年

非特許文献5: Okanoら、Molecular Brain、7巻、22号、1～12頁、2014年

非特許文献6: Valadez-Barbaraら、Regenerative Therapy、15巻、332～339頁、2020年

非特許文献7: Zengら、STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE、3巻、1418～1428頁、2014年

非特許文献8: Feng-Lan Chiuら、Human Molecular Genetics、24巻、6066～6079頁、2015年

非特許文献9: Ruilin Tianら、Nature Neuroscience、24巻、1020～1034頁、2021年

非特許文献10: Kondoら、Cell Stem Cell、12巻、487～496頁、2013年

非特許文献11: Jitin Baliら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、109巻、15307～15311頁、2012年

非特許文献12: Francois Gros-Louisら、Biochimica et Biophysica Acta、1762巻、956～972頁、2006年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、ヒト由来の多能性幹細胞から酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造する方法、並びにヒト由来の多能性幹細胞から酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造することができる、細胞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、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞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、上記神経細胞を用いた、被験物質の評価方法、神経変性疾患の予防および／または治療薬のスクリーニング方法、ネクローシス阻害剤のスクリーニング方法、およびフェロトーシス阻害剤のスクリーニング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

[0009] 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、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 20.0×10^4 細胞 / cm^2 以下の細胞密度で播種し、さらに抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養することによって、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞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。

[0010] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

<1> ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 20.0×10^4 細胞 / cm^2 以下の細胞密度で播種する工程 a と、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養する工程 b とを含む、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法。

<2> 細胞密度が、 0.2×10^4 細胞 / cm^2 以上 20.0×10^4 細胞 / cm^2 以下である、<1>に記載の製造方法。

<3> ヒト由来の多能性幹細胞が、疾患関連遺伝子に変異がない多能性幹細胞である、<1>または<2>に記載の製造方法。

<4> 上記神経細胞が、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、<1>～<3>のいずれか1つに記載の製造方法。

<5> 酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞が、以下の(i)～(iv)：

- (i) 酸化ストレスに関連するマーカーが陽性である；
- (ii) 神経突起が退縮している；
- (iii) ネクロトーシスが誘導されている；および
- (iv) フェロトーシスが誘導されている；

のうちの少なくとも一以上を満たす、<1>～<4>のいずれか1つに記載の製造方法。

<6> ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 20.0×10^4 細胞/cm²以下の細胞密度で播種する工程aと、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養する工程bとを含む、細胞の培養方法。

<7> 上記細胞密度が、 0.2×10^4 細胞/cm²以上 20.0×10^4 細胞/cm²以下である、<6>に記載の培養方法。

<8> ヒト由来の多能性幹細胞が、疾患関連遺伝子に変異がない多能性幹細胞である、<6>または<7>に記載の培養方法。

<9> 上記神経細胞が、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、<6>～<8>のいずれか1つに記載の培養方法。

<10> <1>に記載の製造方法により得られる、以下の(i)～(iv)：

- (i) 酸化ストレスに関連するマーカーが陽性である；
- (ii) 神経突起の長さが退縮している；
- (iii) ネクロトーシスが誘導されている；および
- (iv) フェロトーシスが誘導されている；

のうちの少なくとも一以上を満たす、神経細胞。

<11> 上記神経細胞が、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、＜10＞に記載の細胞。

＜12＞ ＜10＞に記載の神経細胞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。

＜13＞ ＜1＞に記載の方法により＜10＞に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、上記神経細胞と被験物質とを接触させる、＜12＞に記載の被験物質の評価方法。

＜14＞ ＜10＞に記載の神経細胞と被験物質とを接触させることを含む、神経変性疾患の予防および／または治療薬のスクリーニング方法。

＜15＞ ＜1＞に記載の方法により＜10＞に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、上記神経細胞と被験物質とを接触させる、＜14＞に記載のスクリーニング方法。

＜16＞ 上記神経変性疾患が、アルツハイマー病（AD）、脊髄小脳変性症、前頭側頭葉変性症（FTLD）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、レビー小体病、ハンチントン病、ニーマンピック病からなる群から選択される、＜14＞に記載のスクリーニング方法。

＜17＞ ＜10＞に記載の神経細胞と被験物質とを接触させた後に、

（A）上記被験物質と接触させた神経細胞、および上記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞とを培養する工程、

（B）上記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および

（C）被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記神経傷害を抑制する被験物質を、神経変性疾患の予防および／または治療薬の候補として選択する工程、

を含む、＜14＞に記載のスクリーニング方法。

＜18＞ 上記工程（B）が、上記工程（A）で得られた神経細胞の細胞数および／または神経突起長を測定する工程である、＜17＞に記載のスクリーニング方法。

＜19＞ 上記工程（C）が、上記被験物質と接触させた神経細胞の細胞数および／または神経突起長が、対照よりも高値であった被験物質を、神経変

性疾患の予防および／または治療薬の候補として選択する工程である、＜17＞または＜18＞に記載の方法。

＜20＞ （1）＜10＞に記載の神経細胞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神経細胞、および上記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞を培養する工程、

（3）上記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および

（4）被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記神経傷害を抑制する被験物質を、ネクロトーシス阻害剤の候補として選択する工程、を含む、ネクロトーシス阻害剤のスクリーニング方法。

＜21＞ ＜1＞に記載の方法により＜10＞に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、上記神経細胞と被験物質とを接触させる、＜20＞に記載のスクリーニング方法。

＜22＞ （1）＜10＞に記載の神経細胞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神経細胞、および上記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞を培養する工程、

（3）上記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および

（4）被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記神経傷害を抑制する被験物質を、フェロトーシス阻害剤の候補として選択する工程、を含む、フェロトーシス阻害剤のスクリーニング方法。

＜23＞ ＜1＞に記載の方法により＜10＞に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、上記神経細胞と被験物質とを接触させる、＜22＞に記載のスクリーニング方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、ヒト由来の多能性幹細胞から酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、培養48時間後に培地交換した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図2]図2は、培養72時間後に培地交換した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図3]図3は、培養96時間後に培地交換した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図4]図4は、細胞播種密度を $0.3 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ にて播種した際の神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図5]図5は、細胞播種密度を $0.9 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ にて播種した際の神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図6]図6は、細胞播種密度を $1.9 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ にて播種した際の神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図7]図7は、細胞播種密度を $4.7 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ にて播種した際の神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図8]図8は、細胞播種密度を $9.4 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ にて播種した際の神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図9]図9は、細胞播種密度を $12.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ にて播種した際の神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図10]図10は、基礎培地としてBrainPhys培地を使用して培養した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図11]図11は、基礎培地としてNeurobasal培地を使用して培養した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図12]図12は、培養3日目から6日目までの培地中のLDH量を定量した結果を示す。

[図13]図13は、培養6日後の神経細胞の細胞内のROSを定量した結果を示す。

[図14]図14は、ネクロトーシス阻害剤（ネクロスタチン-1）を処理した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果、および代表的な細胞の画像を

示す。(A) 神経突起長の経時変化、(B～D) 培養6日目の画像、(B) Stress (－)、(C) Stress (＋)、(D) $20\mu\text{M}$ Necrostatin-1

[図15]図15は、フェロトシス阻害剤（フェロスタチン-1）を処理した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図16]図16は、フェロトシス阻害剤（リプロキシスタチン-1）を処理した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図17]図17は、フェロトシス阻害剤（UAMC-3203）を処理した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

[図18]図18は、化合物ライブラリーの各種化合物を処理した神経細胞の神経突起長の14日間の経時的な曲線から曲線下面積（AUC）を算出した結果を示す。

[図19]図19は、ALS治療薬（エダラボン）を処理した神経細胞の神経突起長を経時的に定量した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0014] 本発明は、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 20.0×10^4 細胞/cm²以下の細胞密度で播種する工程aと、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養する工程bとを含む、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法に関する。即ち、本発明においては、ヒト由来の多能性幹細胞から製造した神経細胞に弱い酸化ストレスを慢性的に与えることにより、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造することができる。

[0015] 本発明はさらに、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 20.0×10^4 細胞/cm²以下の細胞密度で播種する工程aと、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養

m^2 以上 1.2×10^4 細胞/ cm^2 以下であり、特に好ましくは 4.0×10^4 細胞/ cm^2 以上 1.0×10^4 細胞/ cm^2 以下である。

[0018] 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。

[0019] ヒト由来の多能性幹細胞としては、疾患関連遺伝子に変異がない多能性幹細胞であることが好ましい。「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。

[0020] 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、E S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、E S細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合E S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。

[0021] E S細胞の中には、保存機関から入手可能なもの、或いは市販されているものもある。例えば、ヒトE S細胞については京都大学再生医科学研究所（例えばK h E S - 1、K h E S - 2およびK h E S - 3）、W i C e l l R e s e a r c h I n s t i t u t e、E S I B I Oなどから入手可能である。

[0022] i P S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。i P S細胞はE S細胞に近い性質を示す。i P S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。i P S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i P S細胞作製法を適用することも当然に想定される。

[0023] i P S細胞の作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるO c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4およびc - M y c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i P S細胞についてはO c t 4、S o x 2、L i n 2 8およびN o n o g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 - M y cを除く3因子（Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008）、O c t 3 / 4およびK l f 4の2因子（Kim

J B, et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008)、或いは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) 或いはBay K 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. Biotechnol. 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, Pacifica A, et al: Nature 458, 771-775, 2009; Yusa K, Rad R, Takeda J, et al: Nat. Methods 6, 363-369, 2009)、或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。

[0024] 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、Oct 3/4、Fgf-4、Esrr1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。

[0025] 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)。

[0026] i P S細胞は、例えば、F U J I F I L M C e l l u l a r D y n a m i c s, I n c. (F C D I)、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。

[0027] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した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。

[0028] 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り、特に好ましくは、運動神経細胞または大脳皮質興奮神経細胞である。

[0029] 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。

[0030] 多能性幹細胞から神経細胞を分化誘導方法としては、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：Watanabe K., et al, Nat.Neurosci., 8: 288-296, 2005；S F E B q法：Wataya T., et al Proc.Natl.Acad.Sci.U S A., 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：Kawasaki 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（N g n 2）など）を導入し発現させることで分化させる方法（W02014/148646；およびZhang Y., et al, Neuron, 78: 785-98, 2013）；

（６）多能性幹細胞にm i R - 9 / 9 * - 1 2 4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。

[0031] 上記のうち、（５）多能性幹細胞にn e u r o g e n i n 2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。

[0032] N e u r o g e n i n 2タンパク質は発生期において神経細胞への分化を促進することが知られる転写因子であり、そのアミノ酸配列はヒトではNP__076924、マウスではNP__033848で例示される。n e u r o g e n i n 2遺伝子（Official full name: n e u r o g e n i n 2、Official symbol: N E U R O G 2、N g n 2遺伝子とも呼ばれる）はN e u r o g e n i n 2タンパク質をコードするDNAのことであり、例えば、標準配列として登録されているNM__009718（マウス）もしくはNM__024019（ヒト）、またはそれらの転写派生体（transcript variant）のヌクレオチド配列を有するDNAが挙げられる。

また、上記標準配列および転写派生体の配列を有する核酸に、ストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補性を有するDNAであってもよい。

[0033] ヒトi P S細胞から分化誘導した大脳皮質興奮神経細胞としては、ヒトi P S細胞からN g n 2遺伝子を強制発現することにより作製した細胞を使用することが好ましい。

[0034] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞としては、市販の神経細胞を使用してもよく、例えば、i C e l l（商標）運動神経細胞（F C D 1, C 1 0 5 0、C 1 0 4 8）などを使用してもよい。

- [0035] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した黒質神経細胞としては、市販の神経細胞を使用してもよく、例えば、iCell（商標）ドーパミン神経細胞（FCDI, C1087、C1028）などを使用してもよい。
- [0036] 神経細胞は、好ましくは、 β -tubulin、NeuN、NCAM (neural cell adhesion molecule)、MAP2 (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 -tubulin陽性の突起（以降、神経突起と呼ぶ）を有する細胞である。
- [0037] 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mRNA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、mRNAまたはその逆転写産物であるcDNA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。
- [0038] 本発明における神経細胞の培養は、使用する神経細胞に応じた培地、温度、その他の条件を選択して実施すればよい。
- [0039] 本発明においては、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を使用する。
- [0040] 抗酸化剤としては、ビタミンA、グルタチオン、ビタミンEまたはその誘導体、スーパーオキシドジスムターゼ (Super Oxide Dismutase、SOD)、およびカタラーゼなどが挙げられる。
- [0041] 酸化剤としては、過酸化水素、アルセナイト、およびニトロプルシドナトリウムなどが挙げられる。
- [0042] 「実質的に含まない」とは、抗酸化剤または酸化剤が、その機能を発揮する量では含まれていないことを意味する。
- [0043] 神経細胞の培養を妨害しない限り、培養培地中には培養の目的に合った因子などの任意の成分や添加剤が含まれていてもよい。

[0044] 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 Neuronal Medium、Neurobasal Medium-A、Neurobasal 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。DMEM／F12またはBrainPhys Neuronal Mediumが好ましく、DMEM／F12がより好ましい。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。

[0045] 添加剤は、実質的に抗酸化作用を示さないもの、および実質的に抗酸化作用を示さない濃度ならば添加してもよい。具体的には血清、レチノイン酸、Wnt、BMP、bFGF、EGF、HGF、Sonic hedgehog（Shh）、インターロイキン類、ヘパリン、ヘパラン硫酸、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（商標）サプリメント（酸化防止剤不含）、ITS-サプリメントなどが挙げられるが、特に限定されない。好ましい添加剤は、B-27（商標）サプリメント（酸化防止剤不含）である。

[0046] 神経細胞の培養条件としては、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いことが好ましい。

[0047] 神経細胞は、二次元培養することが好ましい。細胞の培養には、プレート、ディッシュ、セルカルチャーインサート、細胞培養用フラスコなどの細胞培養容器を使用することができる。

[0048] 本発明による神経細胞の製造方法により製造される、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞は、好ましくは以下の (i) ~ (iv) :

(i) 酸化ストレスに関連するマーカーが陽性である ;

(ii) 神経突起が退縮している ;

(iii) ネクロトーシスが誘導されている ; および

(iv) フェロトーシスが誘導されている :

のうちの少なくとも一以上（好ましくは二つ、より好ましくは三つ全て）を満たす。本発明によれば、本発明による神経細胞の製造方法により製造される上記の (i) ~ (iv) のうちの少なくとも一以上を満たす、神経細胞が提供される。本発明の神経細胞は、特には限定されないが、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り、より好ましくは、運動神経細胞または大脳皮質興奮神経細胞である。

[0049] 酸化ストレスに関連するマーカーとしては、酸化ストレスマーカー、および酸化ストレスに起因する二次的なマーカーが挙げられる。

酸化ストレスマーカーとしては、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species、ROS)、活性酸素によって生じた生体内産物、抗酸化酵素、および抗酸化物質などが挙げられる。ROSとしては、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot -}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2)、一酸化窒素 ($NO\cdot$)、二酸化窒素 ($NO_2\cdot$)、オゾン (O_3)、および過酸化脂質 (LOOH) などが挙げられる。活性酸素によって生じた生体内産物としては、hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)、8-hydroxyguanosine (8-OHG)、および過酸化脂質などが挙げられる。抗酸化酵素としては、SOD、カタラーゼ、およびGPxなどが挙げられる。抗酸化物質としては、グルタチオン (GSH/GSSG)、ビリルビン、お

よびビタミン類などが挙げられる。

酸化ストレスに起因する二次的なマーカーとしては、TAR DNA結合タンパク質43 (TDP-43) タンパク質、アミロイド β タンパク質、タウタンパク質、および α シヌクレインのリン酸化、蓄積、凝集などが挙げられる。

酸化ストレスに関連するマーカーとしては、ROS、8-OHdG、8-OHG、過酸化脂質、グルタチオン、TDP-43タンパク質、アミロイド β タンパク質、タウタンパク質または α シヌクレインが好ましく、ROSがより好ましい。

[0050] 活性酸素種 (ROS) が陽性であるとは、抗酸化剤を含む培養培地を用いて培養した細胞におけるROSのレベルと比較して、ROSのレベルが高いことを示す。細胞内のROSのレベルの定量は、CellROX (商標) Green Reagent, for oxidative stress detection (Thermo Fisher Scientific, C10444) などの市販試薬を用いて行うことができる。

[0051] 神経突起が退縮していることは、神経突起長を測定することにより確認することができる。例えば、神経突起長はIncucyte S3のNeurotrackソフトウェア (Sartorius, 9600-0010) を用いて定量することができる。

[0052] ネクロトーシスが誘導されているかどうかは、例えば、ネクロトーシス阻害剤 (例えば、ネクロスタチン-1) で細胞を処理した場合と、ネクロトーシス阻害剤 (例えば、ネクロスタチン-1) で細胞を処理しない場合とについて、酸化ストレスによる傷害の程度を評価し、ネクロトーシス阻害剤 (例えば、ネクロスタチン-1) で細胞を処理した場合に傷害の程度が減少した場合には、ネクロトーシスが誘導されていると判定することができる。また、ネクロトーシスに関連するマーカーとして知られているreceptor interacting protein kinase 1 (RIPK1)、receptor interacting protein kinase 3 (RIPK3)、およびMixed lineage kinase domain-like protein (

MLKL)などのリン酸化を定量することでもネクロトーシスが誘導されているかどうか判定することができる。

[0053] フェロトーシスが誘導されているかどうかは、例えば、フェロトーシス阻害剤（例えば、フェロスタチン-1、リプロキスタチン-1、または、UAMC-3203など）で細胞を処理した場合と、フェロトーシス阻害剤（例えば、フェロスタチン-1、リプロキスタチン-1、または、UAMC-3203など）で細胞を処理しない場合とについて、酸化ストレスによる傷害の程度を評価し、フェロトーシス阻害剤（例えば、フェロスタチン-1、リプロキスタチン-1、または、UAMC-3203など）で細胞を処理した場合に傷害の程度が減少した場合には、フェロトーシスが誘導されていると判定することができる。また、フェロトーシスに関連するマーカーとして知られている細胞内の二価鉄量や、脂質過酸化物（4-ヒドロキシノネナルやマロンジアルデヒド）を定量することでもフェロトーシスが誘導されているかどうか判定することができる。

[0054] 本発明によれば、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞を製造することができる。酸化ストレスによる神経傷害を受けているかどうかの評価は、細胞死（神経細胞の細胞数）を評価すること、酸化ストレスに関連するマーカーを測定すること、細胞傷害を評価すること、神経傷害に関連するマーカーを測定すること、または神経突起長を測定することにより行うことができるが、特に限定されない。上記の中でも、細胞死（神経細胞の細胞数）を評価すること、または神経突起長を測定することが好ましい。

[0055] 細胞死は、Cell Titer Glo（プロメガ）やCell counting kit-8（同仁堂）などの生細胞検出試薬を使用するか、Propidium iodideやNucGreen Dead（Thermo Fisher Scientific）などの細胞死検出試薬を使用して検出することができる。

[0056] 細胞傷害は、LDHアッセイ、WSTアッセイ、またはATPアッセイなどの評価方法を利用して評価することができる。例えば、LDHアッセイに

はCytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH) (Sigma aldrich)などのキットを使用することができる。

[0057] 神経傷害に関するマーカーとしては、Enolase 2 (Neuron-Specific Enolase) などが挙げられ、ELISA法を利用して測定することができる。

[0058] 本発明による酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞は、酸化ストレスが発症および進行に大きく関与することが知られている神経変性疾患に有用な新たな薬剤のスクリーニングに利用可能である。本発明による酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞は、特に、孤発性の慢性神経変性疾患の研究や、その治療薬開発、疾患バイオマーカー同定や診断薬開発に有用である。本発明においては、好ましくは疾患関連遺伝子に変異がない多能性幹細胞から製造した神経細胞を用いること、そして抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を使用して弱い酸化ストレスを慢性的に細胞に付与することにより、孤発性の慢性神経変性疾患を評価することが可能である。

本発明においては、培養開始後2日以降に細胞死がみられるため、2週間程度までに薬剤の評価が可能である。さらに、本発明においては、ネクロトーシスによる細胞死が再現可能であることから、ネクロトーシス阻害剤のスクリーニングが可能である。さらに、本発明においては、フェロトーシスによる細胞死が再現可能であることから、フェロトーシス阻害剤のスクリーニングが可能である。

[0059] 即ち、本発明によれば、本発明による酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞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、本発明による神経細胞と被験物質とを接触させることを含む、神経変性疾患の予防および／または治療薬のスクリーニング方法が提供される。

[0060] 本発明によればさらに、

- (1) 本発明による神経細胞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神経細胞、および上記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞を培養する工程、
 - (3) 上記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および
 - (4) 被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記神経傷害を抑制する被験物質を、ネクローシス阻害剤の候補として選択する工程、
- を含む、ネクローシス阻害剤のスクリーニング方法が提供される。

[0061] 本発明によればさらに、

- (1) 本発明による神経細胞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神経細胞、および上記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞を培養する工程、
 - (3) 上記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および
 - (4) 被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記神経傷害を抑制する被験物質を、フェロトーシス阻害剤の候補として選択する工程、
- を含む、フェロトーシス阻害剤のスクリーニング方法が提供される。

[0062] 上記の被験物質の評価方法、神経変性疾患の予防および／または治療薬のスクリーニング方法、ネクローシス阻害剤のスクリーニング方法、およびフェロトーシス阻害剤のスクリーニング方法においては、本発明による酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法により、本発明の神経細胞を製造することをさらに含んでもよい。

[0063] 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、*siRNA*、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*mRNA*）、ウイルスベクター（*AAV*、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。

[0064] また、被験物質は、(1) 生物学的ライブラリー法、(2) デコンヴォル

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 (one-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) *Anticancer 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; Cwirla et al. (1990) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 6378-82; Felici (1991) *J.Mol.Biol.* 222: 301-10; 米国特許出願公開第2002/0103360号) として作製され得る。

[0065] 神経細胞と被験物質とを接触させることは、神経細胞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種類 (溶解性、毒性など) によって適宜調節可能である。

- [0066] 神経細胞と被験物質とを接触させる際に用いる、神経細胞の培養液は、神経細胞を培養できる培地であれば、特に限定されない。
- [0067] 被験物質と神経細胞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。
- [0068] 神経変性疾患としては、アルツハイマー病（AD）、脊髄小脳変性症、前頭側頭葉変性症（FTLD）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、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。神経変性疾患としては、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病またはニーマンピック病が好ましく、筋萎縮性側索硬化症（ALS）がより好ましい。
- [0069] ネクロトーシスが関与する疾患としては、神経変性疾患、急性腎障害、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪肝炎、急性肺障害、急性呼吸促迫症候群、全身性炎症反応症候群、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、心不全、動脈硬化症、大動脈瘤、乾癬、関節リウマチ、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、卵巣がん、結腸がん、子宮頸癌、悪性黒色腫、膠芽腫、肺癌、乳癌、膵癌などを挙げることができる。ネクロトーシスが関与する疾患としては、神経変性疾患が好ましく、多発性硬化症（MS）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）が好ましく、筋萎縮性側索硬化症（ALS）がより好ましい。
- [0070] フェロトーシスが関与する疾患としては、神経変性疾患、加齢黄斑変性、フックス角膜内日ジストロフィー、慢性閉塞性肺疾患、放射線肺障害、急性肺障害、喘息、肺線維症、結核、緑膿菌感染、パラコート中毒、虚血性再灌流障害、アルコール性肝障害、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アセトアミノフェン誘導性肝障害、肝線維症、肝移植、急性膵炎、糖尿病、膵島移植、ヘモクロマトーシス、輸血関連免疫修飾、溶血性貧血、放射線誘発造血障害、脳室周囲白質軟化症、出血性／虚血性脳卒中、出血性認知症、

外傷性脳損傷、てんかん、虚血再灌流障害、ドキソルビン心筋症、鉄過負荷心筋症、心筋梗塞／線維症、アテローム性動脈硬化症、心移植、急性腎障害、多発性嚢胞腎、腎移植、クローン病、潰瘍性大腸炎、妊娠高血圧腎症、子宮内膜症、不妊症、神経芽腫、膠芽腫、大腸癌、肺癌、頭頸部癌、胃癌、膵管腺癌、乳癌、卵巣がん、肝細胞癌、腎細胞癌、バーキットリンパ腫などを挙げることができる。フェロトシスが関与する疾患としては、神経変性疾患が好ましく、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病またはニーマンピック病が好ましく、筋萎縮性側索硬化症（ALS）がより好ましい。

[0071] 本発明の一態様においては、

本発明による神経細胞と被験物質とを接触させた後に、

（A）被験物質と接触させた神経細胞、および上記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞とを培養する工程、

（B）上記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および

（C）被験物質と接触させなかった対照と比較して、上記神経傷害を抑制する被験物質を、神経変性疾患の予防および／または治療薬の候補として選択する工程、

を行うことができる。

[0072] 好ましくは、工程（B）は、工程（A）で得られた神経細胞の細胞数および／または神経突起長を測定する工程である。

好ましくは、工程（C）は、上記被験物質と接触させた神経細胞の細胞数および／または神経突起長が、対照よりも高値であった被験物質を、神経変性疾患の予防および／または治療薬の候補として選択する工程である。

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

[0073] 試験例 1：細胞播種時から抗酸化剤を含まない培地にて培養した神経細胞、および細胞播種後に培地交換により抗酸化剤を含まない培地に置換して培養

した神経細胞の神経突起長評価

<プレートコーティング>

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) をPBS (リン酸緩衝生理食塩水) にて16.7倍希釈したものを、PDL (ポリ-D-リジン) コーティングされた96ウェルプレート (Corning, 356461) に70 μ L/well加え、3時間から72時間37℃にてインキュベートした。

[0074] <培地の準備>

抗酸化剤を含む培地には、+AO培地にDMSO (ジメチルスルホキシド) が0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (-))、抗酸化剤を含まない培地には-AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (+)) を使用した。

[0075] [表1]

+AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0076] <細胞播種>

iPS細胞からNg2遺伝子 (Neurogenin2遺伝子) を強制発現 (Chao Wang, et al, Stem Cell Reports., 9: 1221-1233, 2017) することにより作製した神経細胞 (大脳皮質興奮神経細胞であると考えられる) を37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

。その後、細胞を培地にて希釈し、 $200\mu\text{L}/\text{well}$ ($9.4\times 10^4\text{cells}/\text{cm}^2$) にて播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下にて培養した。6時間ごとにIncucyte S3 (Sartorius, Incucyte S3) にて撮影し、画像を取得した。培養後、48、72、または96時間後に培地交換を実施した。

[0077] <突起長の評価>

神経突起長はIncucyte S3のNeurotrackソフトウェア (Sartorius, 9600-0010) を用いて定量した。培養14日後までに、抗酸化剤を含まない培地で培養したStress (+) の条件にて、突起退縮後のいずれかの時間の神経突起長 (面積当たりの神経突起長の総和) が、抗酸化剤を含む培地で培養したStress (-) 群の神経突起長の最大値の半分以下になっている場合、突起が退縮していると判断した。神経突起長を定量した結果を図1～図3に示す。

[0078] 図1は培養48時間後に培地交換した神経細胞の神経突起長を定量した結果である。縦軸は面積当たりの神経突起長の総和、横軸は培養日数を示す。その結果、初めから抗酸化剤を含まない培地で培養したStress (+) 群 (▲) では培養4日後以降に神経突起の退縮 (神経傷害) が確認できた。一方で、初めから抗酸化剤を含む培地で培養したStress (-) 群 (■)、初めは抗酸化剤を含む培地で培養し、48時間後に同じ抗酸化剤を含む培地で培地交換した群 (◆)、および初めは抗酸化剤を含む培地で培養し、48時間後に抗酸化剤を含まない培地で培地交換した群 (▼) では神経突起の退縮 (神経傷害) は確認されなかった。培養72時間後 (図2)、または96時間後に培地交換した細胞 (図3) のいずれにおいても、初めから抗酸化剤を含まない培地で培養したStress (+) 群 (▲) でのみ培養4日後以降に神経突起の退縮 (神経傷害) が確認できたが、初めから抗酸化剤を含む培地で培養したStress (-) 群 (■)、初めは抗酸化剤を含む培地で培養し、同じ培地で培地交換した群 (◆)、および初めは抗酸化剤を含む培地で培養し、抗酸化剤を含まない培地で培地交換した群 (▼) では神経

突起の退縮（神経傷害）は確認されなかった。これらのことから、弱い酸化ストレス（抗酸化剤を含まない培地にて培養すること）で神経傷害を誘導するためには、細胞播種時から抗酸化剤を含まない培地にて培養することが重要であることが示された。

[0079] 試験例 2：酸化ストレス誘発神経細胞傷害に対する細胞播種密度の影響評価
＜プレートコーティング＞

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) を PBS にて 16.7 倍希釈したものを、PDL コーティングされた 96 ウェルプレート (Corning, 356461) に $70 \mu\text{L}/\text{well}$ 加え、3 時間から 72 時間 37°C にてインキュベートした。

[0080] ＜培地の準備＞

抗酸化剤を含む培地には、+AO 培地に DMSO が 0.1 容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (-))、抗酸化剤を含まない培地には -AO 培地に DMSO が 0.1 容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (+)) を使用した。

[0081] [表2]

+AO 培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO 培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0082] ＜細胞播種＞

試験例 1 と同様の方法で iPS 細胞から Ng2 遺伝子を強制発現することにより作製した神経細胞（大脳皮質興奮神経細胞であると考えられる）を

37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、200μL/well (0.3~37.5×10⁴ cells/cm²) にて播種し、37℃、5%CO₂条件下にて培養した。培養後、6時間ごとにIncucyte S3 (Sartorius, Incucyte S3) にて撮影し、画像を取得した。

[0083] <突起長の評価>

神経突起長はIncucyte S3のNeurotrackソフトウェア (Sartorius, 9600-0010) を用いて定量した。神経突起長を定量した結果を図4~図9に、および細胞播種密度と神経細胞の傷害検出の可否をまとめたものを表3に示す。なお、神経細胞の傷害検出の可否は、試験例1と同様の判断基準で神経突起長が退縮しているかどうかを評価し、退縮していると判断できた場合を傷害検出可とした。

[0084] [表3]

細胞播種密度 (×10 ⁴ cells/cm ²)	傷害検出の可否
0.3	傷害検出可
0.9	傷害検出可
1.9	傷害検出可
3.1	傷害検出可
4.7	傷害検出可
9.4	傷害検出可
10.9	傷害検出可
12.5	傷害検出可
25.0	傷害検出不可
37.5	傷害検出不可

[0085] 細胞播種密度を0.3、0.9、1.9、4.7、9.4、または12.5×10⁴ cells/cm²にて播種した際の神経突起長の経時変化を図4から図9に示す。縦軸は面積当たりの神経突起長の総和、横軸は培養日数を示す。その結果、細胞播種密度が0.3~12.5 cells/cm²では抗

酸化剤を含まない培地にて培養した *Stress* (+) 群 (▲) で神経突起の退縮 (神経傷害) が確認できた。 $0.3 \sim 37.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の播種密度で播種した実験結果は表 3 に示す。播種密度が $25.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 以上になると、細胞密度が濃すぎるため神経突起の退縮 (神経傷害) を検出できなかった。このことから $20.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 以下の細胞密度で細胞を播種し、培養することが重要であることが明らかとなった。

[0086] 試験例 3 : 酸化ストレス誘発神経細胞傷害に対する基礎培地の影響評価
＜プレートコーティング＞

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) を PBS にて 16.7 倍希釈したものを、PDL コーティングされた 96 ウェルプレート (Corning, 356461) に $70 \mu\text{L/well}$ 加え、3 時間から 72 時間 37°C にてインキュベートした。

[0087] ＜培地の準備＞

抗酸化剤を含む培地には、+AO 培地に DMSO が 0.1 容量% (v/v) となるように加えたもの (*Stress* (-))、抗酸化剤を含まない培地には -AO 培地に DMSO が 0.1 容量% (v/v) となるように加えたもの (*Stress* (+)) を使用した。

[0088]

[表4]

+AO培地

	mL
BrainPhys培地 (Stemcell technologies, 05790)、もしくはNeurobasal培地 (Thermo Fisher Scientific, 21103049)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO培地

	mL
BrainPhys培地 (Stemcell technologies, 05790)、もしくはNeurobasal培地 (Thermo Fisher Scientific, 21103049)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0089] <細胞播種>

試験例1と同様の方法でiPS細胞からNgn2遺伝子を強制発現することにより作製した神経細胞（大脳皮質興奮神経細胞であると考えられる）を37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、200μL/well（ $4.7 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ ）にて播種し、37℃、5%CO₂条件下にて培養した。培養後、6時間ごとにIncucyte S3 (Sartorius, Incucyte S3)にて撮影し、画像を取得した。

[0090] <突起長の評価>

神経突起長はIncucyte S3のNeurotrackソフトウェア (Sartorius, 9600-0010)を用いて定量した。神経突起長を定量した結果を図10および図11に示す。神経突起の退縮は、試験例1と同様の判断基準で評価した。

[0091] 縦軸は面積当たりの神経突起長の総和、横軸は培養日数を示す。その結果、BrainPhys培地（図10）、およびNeurobasal培地（図11）のいずれの培地においても抗酸化剤を含まない培地にて培養したS

t r e s s (+) 群 (▲) で神経突起の退縮 (神経傷害) が確認でき、抗酸化剤を含む培地にて培養した S t r e s s (−) 群 (■) では神経突起の退縮は確認されなかった。このことから B r a i n P h y s 培地や N e u r o b a s a l 培地においても抗酸化剤を含まない培地にて培養することで神経傷害を誘導できることが示された。

[0092] 試験例 4 : 酸化ストレス誘発神経細胞傷害の定量評価

<プレートコーティング>

i M a t r i x - 5 1 1 s i l k (M a t r i x o m e, 8 9 2 0 2 1) を P B S にて 1 6 . 7 倍希釈したものを、P D L コーティングされたフラスコ (G r e i n e r B i o - o n e, 6 6 1 9 4 0) に 2 0 m L / f l a s k 加え、3 時間から 7 2 時間 3 7 °C にてインキュベートした。

[0093] <培地の準備>

抗酸化剤を含む培地には、+ A O 培地に D M S O が 0 . 1 容量% (v / v) となるように加えたもの (S t r e s s (−))、抗酸化剤を含まない培地には − A O 培地に D M S O が 0 . 1 容量% (v / v) となるように加えたもの (S t r e s s (+)) を使用した。

[0094] [表5]

+AO 培地

	mL
DMEM / F 1 2 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, 1 1 3 2 0 - 0 3 3)	4 . 9
B - 2 7 S u p p l e m e n t (5 0 X), s e r u m f r e e (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, 1 7 5 0 4 - 0 4 4)	0 . 1

−AO 培地

	mL
DMEM / F 1 2 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, 1 1 3 2 0 - 0 3 3)	2 9 . 4
B - 2 7 S u p p l e m e n t (5 0 X), m i n u s a n t i o x i d a n t s (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, 1 0 8 8 9 - 0 3 8)	0 . 6

[0095] <細胞播種>

試験例 1 と同様の方法で i P S 細胞から N g n 2 遺伝子を強制発現するこ

とにより作製した神経細胞（大脳皮質興奮神経細胞であると考えられる）を 37°C の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、 $600\times g$ 、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を 1 mL の培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、 $6.9\times 10^4\text{ cells}/\text{cm}^2$ の密度になるように播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下にて培養した。培養後3日目、4日目、5日目、6日目に培地を回収した。

[0096] <LDHアッセイ>

LDHの定量にはCytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH) (Sigma aldrich, 4744934001)を使用した。添付文書に従い実施し、培養3日目から6日目までの培地中のLDHの定量を行った。定量の結果を図12に示す。

[0097] 抗酸化剤を含まない培地で培養したStress (+) 群の神経細胞の培地 (▲) では、抗酸化剤を含む培地で培養したStress (-) 群の神経細胞の培地 (■) に比べ培養5日目、および6日目にLDH量が多く、Stress (+) 群にて細胞傷害が起きていることが確認できた。

[0098] 試験例5：ROSシグナルの定量

<プレートコーティング>

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) をPBSにて16.7倍希釈したものを、PDLコーティングされた96ウェルプレート (Corning, 356640) に $70\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、3時間から72時間 37°C にてインキュベートした。

[0099] <培地の準備>

抗酸化剤を含む培地には、+AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (-))、抗酸化剤を含まない培地には-AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (+)) を使用した。

[0100]

[表6]

+AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0101] <細胞播種>

凍結細胞 (iCell 運動神経細胞, FCDI, C1048) を 37℃ の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、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の培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、200μL/well (4.7×10⁴ cells/cm²) にて播種し、37℃、5%CO₂条件下にて6日間培養した。

[0102] <ROSシグナルの定量>

ROSシグナルの定量にはCellROX (商標) Green Reagent, for oxidative stress detection (Thermo Fisher Scientific, C10444) を使用した。添付文書に従い実施し、培養6日後の神経細胞の細胞内のROSシグナルを、共焦点定量イメージサイトメーター (CQ1, 横河電機) を用いて定量した。核領域の蛍光強度の平均を定量した結果を図13に示す。

[0103] 抗酸化剤を含まない培地で培養した神経細胞 (Stress (+) 群) では、抗酸化剤を含む培地で培養した神経細胞 (Stress (-) 群) に比べ強いシグナルのROSを検出した。

[0104] 試験例6：酸化ストレス誘発神経細胞傷害に対する化合物評価 (ネクロトー

シス阻害剤)

<プレートコーティング>

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) をPBSにて16.7倍希釈したものを、PDLコーティングされた96ウェルプレート (Corning, 356461) に70 μ L/well加え、3時間から72時間37℃にてインキュベートした。

[0105] <アッセイプレートの準備>

抗酸化剤を含む培地には、+AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (-))、抗酸化剤を含まない培地には-AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (+))、薬剤評価の群の培地には-AO培地にDMSO溶解化合物を0.1容量% (v/v) の濃度で添加したもの (0.01~20 μ M) を使用した。

[0106] [表7]

+AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0107] <細胞播種>

凍結細胞 (iCell運動神経細胞, FCDI, C1048) を37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、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の培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、200 μ L/well (4.

$7 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) にて播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下にて培養した。培養後、6時間ごとに IncuCyte S3 (Sartorius, Incucyte S3) にて撮影し、画像を取得した。

[0108] <突起長評価>

神経突起長は IncuCyte S3 の NeuroTrack ソフトウェア (Sartorius, 9600-0010) を用いて定量した。神経突起長を定量した結果、および代表的な細胞の画像を図 14 に示す。

[0109] 抗酸化剤を含まない培地で培養した神経細胞 (Stress (+) 群) (▲) は培養 4 日を過ぎたあたりから傷害を受け神経突起長の総和が減少した。一方で、ネクロトーシス阻害剤として知られるネクロスタチン-1 を処理した群 (●) は、神経突起長の総和の減少を濃度依存的に抑制した。このことから本評価系の神経傷害はネクロトーシスにより起きていることが示された。

[0110] 試験例 7 : 酸化ストレス誘発神経細胞傷害に対する化合物評価 (フェロトーシス阻害剤)

<プレートコーティング>

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) を PBS にて 16.7 倍希釈したものを、PDL コーティングされた 96 ウェルプレート (Corning, 356461) に $70 \mu\text{L}/\text{well}$ 加え、3 時間から 72 時間 37°C にてインキュベートした。

[0111] <アッセイプレートの準備>

抗酸化剤を含む培地には、+AO 培地に DMSO が 0.1 容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (-))、抗酸化剤を含まない培地には -AO 培地に DMSO が 0.1 容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (+))、薬剤評価の群の培地には -AO 培地に DMSO 溶解化合物を 0.1 容量% (v/v) の濃度で添加したもの ($0.004 \sim 20 \mu\text{M}$) を使用した。

[0112]

[表8]

+AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0113] <細胞播種>

iPS細胞からNgn2遺伝子を強制発現することにより作製した神経細胞（大脳皮質興奮神経細胞であると考えられる）を37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、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の培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、200μL/well (4.7×10^4 cells/cm²) にて播種し、37℃、5%CO₂条件下にて培養した。培養後、6時間ごとにIncucyte S3 (Sartorius, Incucyte S3) にて撮影し、画像を取得した。

[0114] <突起長評価>

神経突起長はIncucyte S3のNeurotrackソフトウェア (Sartorius, 9600-0010) を用いて定量した。神経突起長を定量した結果を図15～17に示す。

抗酸化剤を含まない培地で培養した神経細胞 (Stress (+) 群) (▲) は培養1日を過ぎたあたりから傷害を受け神経突起長の総和が減少した。一方で、フェロトシス阻害剤を処理した群 (●) は、いずれの化合物も神経突起長の総和の減少を濃度依存的に抑制した。これらのことから本評価系の神経傷害はフェロトシスにより起きていることが示された。

[0115] 試験例8：酸化ストレス誘発神経細胞傷害評価系を用いた化合物スクリーニング

<プレートコーティング>

iMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) をPBSにて16.7倍希釈したものを、PDLコーティングされた96ウェルプレート (Corning, 356461) に70 μ L/well加え、3時間から72時間37℃にてインキュベートした。

[0116] <アッセイプレートの準備>

化合物ライブラリーはStemSelect Library compounds (Merck, 569774) を使用した。抗酸化剤を含む培地には、+AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (-))、抗酸化剤を含まない培地には-AO培地にDMSOが0.1容量% (v/v) となるように加えたもの (Stress (+))、薬剤評価の群の培地には-AO培地にDMSO溶解化合物を0.1容量% (v/v) の濃度で添加したものを使用した。

[0117] [表9]

+AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	4.9
B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher Scientific, 17504-044)	0.1

-AO培地

	mL
DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, 11320-033)	9.8
B-27 Supplement (50X), minus antioxidants (Thermo Fisher Scientific, 10889-038)	0.2

[0118] <細胞播種>

凍結細胞 (iCell運動神経細胞, FCDI, C1048) を37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を培地に添加し、600 $\times$ g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1 mLの培地にて懸濁し、細胞数を計数した。その後、細胞を培地にて希釈し、200 μ L/well (4.7 $\times 10^4$ cells/cm²) にて播種し、37℃、5%CO₂条件下にて培養した。培養後、6時間ごとにIncucyte S3 (Sartorius

s, IncuCyte S3) にて撮影し、画像を取得した。

[0119] <突起長評価>

神経突起長は IncuCyte S3 の NeuroTrack ソフトウェア (Sartorius, 9600-0010) を用いて定量した。14 日間の突起長の経時的な曲線から曲線下面積 (AUC) を算出し、薬剤の効果を比較した。すなわち、AUC が大きいものは突起の退縮を抑制 (神経傷害を抑制) していることを示す。各化合物と AUC の値を図 18 に示す。抗酸化剤を含まない培地で培養した神経細胞 (Stress (+) 群) (▲) は抗酸化剤を含む培地で培養した神経細胞 (Stress (-) 群) (■) と比較して AUC が減少した。化合物を処理した群 (○) は、CD437/AHPN、Simvastatin、Mevastatin、Reversine、KB-R7943、Licochalcone-A、Telomerase Inhibitor IX、Purmorphamine、LXR α/β Agonist、Mifepristone、AY 9944、 γ -Secretase Inhibitor XXI、ATRA-BA Hybrid、及び Mn-cpx 3 が強く AUC の減少を抑制した。

[0120] 試験例 9：酸化ストレス誘発神経細胞傷害に対する ALS 治療薬 (エダラボン) の評価

試験例 7 と同様の方法にて、ALS の治療薬として使用されているエダラボンの酸化ストレス誘発神経細胞傷害に対する効果を評価した。神経突起長を定量した結果を図 19 に示す。抗酸化剤を含まない培地で培養した神経細胞 (Stress (+) 群) (▲) は培養 4 日を過ぎたあたりから傷害を受け神経突起長の総和が減少した。エダラボンを処理した群 (●) では、神経突起長の総和の減少を濃度依存的に抑制した。このことから、本評価系にて ALS の治療薬候補をスクリーニングできることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 2.0×10^4 細胞/cm²以下の細胞密度で播種する工程 a と、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養する工程 b とを含む、酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞の製造方法。
- [請求項2] 細胞密度が、 0.2×10^4 細胞/cm²以上 2.0×10^4 細胞/cm²以下である、請求項 1 に記載の製造方法。
- [請求項3] ヒト由来の多能性幹細胞が、疾患関連遺伝子に変異がない多能性幹細胞である、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記神経細胞が、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、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。
- [請求項5] 酸化ストレスによる傷害を受けた神経細胞が、以下の (i) ~ (iv) :
- (i) 酸化ストレスに関連するマーカーが陽性である；
 - (ii) 神経突起が退縮している；
 - (iii) ネクロトーシスが誘導されている；および
 - (iv) フェロトーシスが誘導されている；
- のうちの少なくとも一以上を満たす、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。
- [請求項6] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞を、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて 2.0×10^4 細胞/cm²以下の細胞密度で播種する工程 a と、抗酸化剤を実質的に含まず、かつ酸化剤を実質的に含まない培養培地を用いて培養する工程 b とを含む、細胞の培養方法。
- [請求項7] 前記細胞密度が、 0.2×10^4 細胞/cm²以上 2.0×10^4 細胞/cm²以下である、請求項 6 に記載の培養方法。

- [請求項8] ヒト由来の多能性幹細胞が、疾患関連遺伝子に変異がない多能性幹細胞である、請求項6または7に記載の培養方法。
- [請求項9] 前記神経細胞が、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、請求項6または7に記載の培養方法。
- [請求項10] 請求項1に記載の製造方法により得られる、以下の(i)～(iv)：
(i) 酸化ストレスに関連するマーカーが陽性である；
(ii) 神経突起の長さが退縮している；
(iii) ネクロトーシスが誘導されている；および
(iv) フェロトーシスが誘導されている；
のうちの少なくとも一以上を満たす、神経細胞。
- [請求項11] 前記神経細胞が、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、請求項10に記載の細胞。
- [請求項12] 請求項10に記載の神経細胞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13] 請求項1に記載の方法により請求項10に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、前記神経細胞と被験物質とを接触させる、請求項12に記載の被験物質の評価方法。
- [請求項14] 請求項10に記載の神経細胞と被験物質とを接触させることを含む、神経変性疾患の予防および／または治療薬のスクリーニング方法。
- [請求項15] 請求項1に記載の方法により請求項10に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、前記神経細胞と被験物質とを接触させる、請求項14に記載のスクリーニング方法。
- [請求項16] 前記神経変性疾患が、アルツハイマー病（AD）、脊髄小脳変性症、前頭側頭葉変性症（FTLD）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、レビー小体病、ハンチントン病、ニーマンピック病からなる群から選択される、請求項14に記載のスクリーニング方法。
- [請求項17] 請求項10に記載の神経細胞と被験物質とを接触させた後に、
(A) 前記被験物質と接触させた神経細胞、および前記被験物質を接

触させなかった対照の神経細胞とを培養する工程、

(B) 前記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および

(C) 被験物質と接触させなかった対照と比較して、前記神経傷害を抑制する被験物質を、神経変性疾患の予防および／または治療薬の候補として選択する工程、

を含む、請求項 14 に記載のスクリーニング方法。

[請求項18] 前記工程 (B) が、前記工程 (A) で得られた神経細胞の細胞数および／または神経突起長を測定する工程である、請求項 17 に記載のスクリーニング方法。

[請求項19] 前記工程 (C) が、前記被験物質と接触させた神経細胞の細胞数および／または神経突起長が、対照よりも高値であった被験物質を、神経変性疾患の予防および／または治療薬の候補として選択する工程である、請求項 17 または 18 に記載の方法。

[請求項20] (1) 請求項 10 に記載の神経細胞と被験物質とを接触させる工程、
(2) 前記工程 (1) で前記被験物質と接触させた神経細胞、および前記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞を培養する工程、
(3) 前記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および
(4) 被験物質と接触させなかった対照と比較して、前記神経傷害を抑制する被験物質を、ネクロトーシス阻害剤の候補として選択する工程、
を含む、ネクロトーシス阻害剤のスクリーニング方法。

[請求項21] 請求項 1 に記載の方法により請求項 10 に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、前記神経細胞と被験物質とを接触させる、請求項 20 に記載のスクリーニング方法。

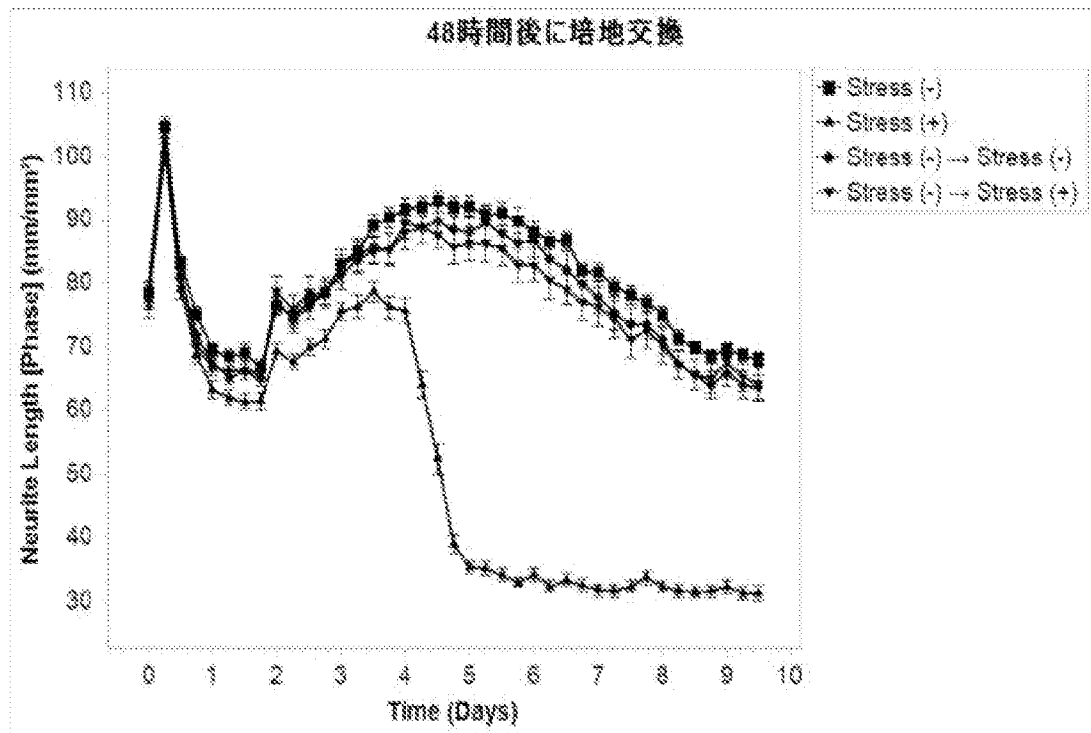
[請求項22] (1) 請求項 10 に記載の神経細胞と被験物質とを接触させる工程、
(2) 前記工程 (1) で前記被験物質と接触させた神経細胞、および前記被験物質を接触させなかった対照の神経細胞を培養する工程、
(3) 前記神経細胞における神経傷害を測定する工程、および

(4) 被験物質と接触させなかった対照と比較して、前記神経傷害を抑制する被験物質を、フェロトキシス阻害剤の候補として選択する工程、

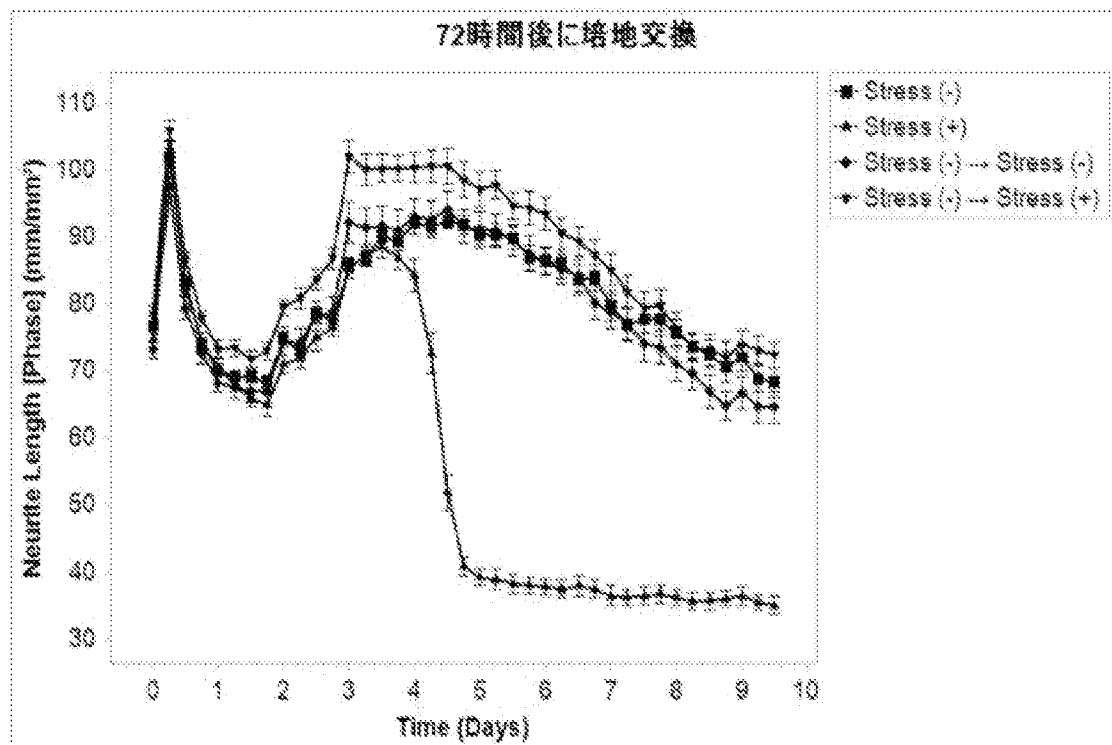
を含む、フェロトキシス阻害剤のスクリーニング方法。

[請求項23] 請求項1に記載の方法により請求項10に記載の神経細胞を製造することをさらに含み、前記神経細胞と被験物質とを接触させる、請求項22に記載のスクリーニング方法。

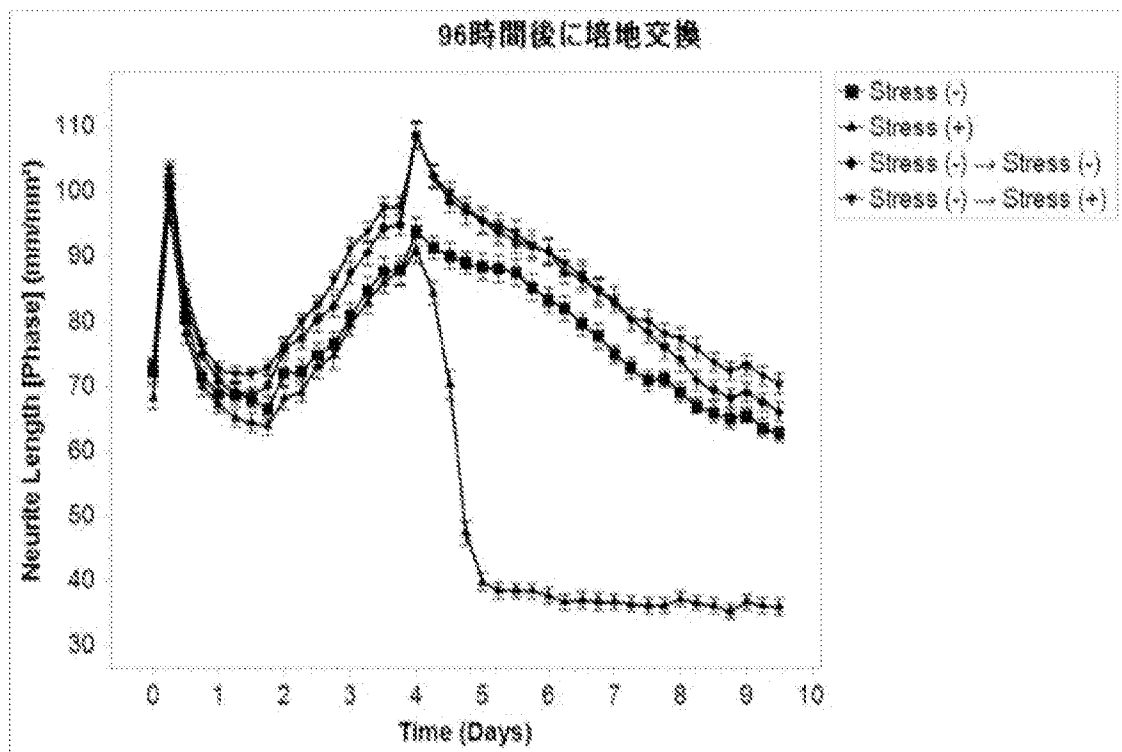
[図1]



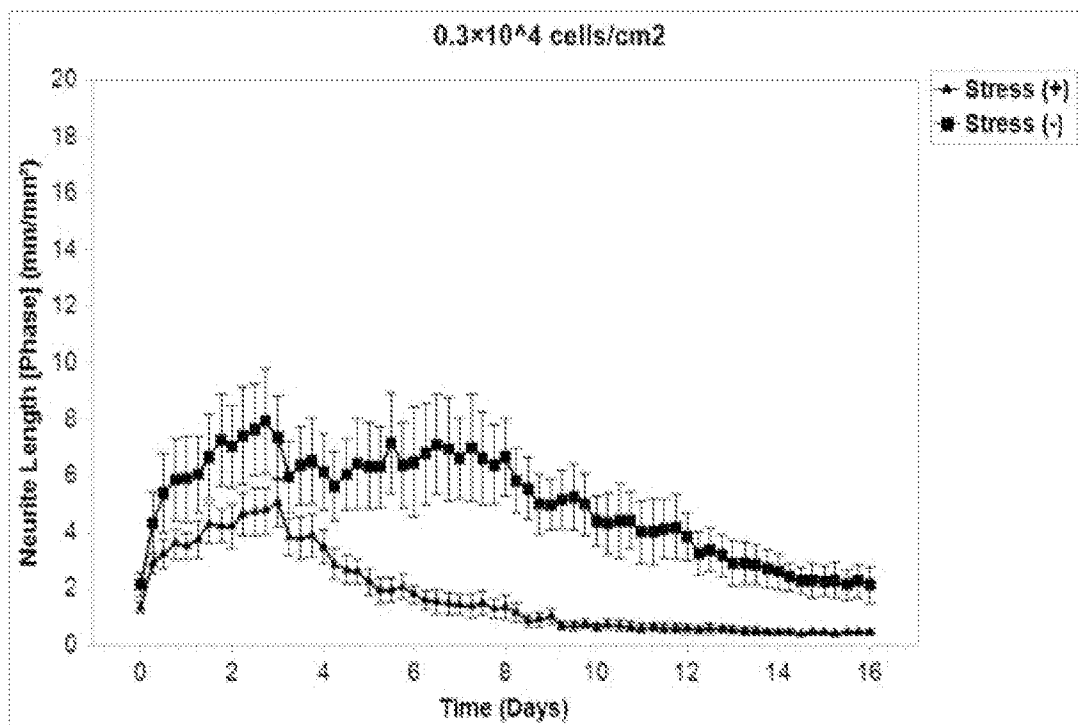
[図2]



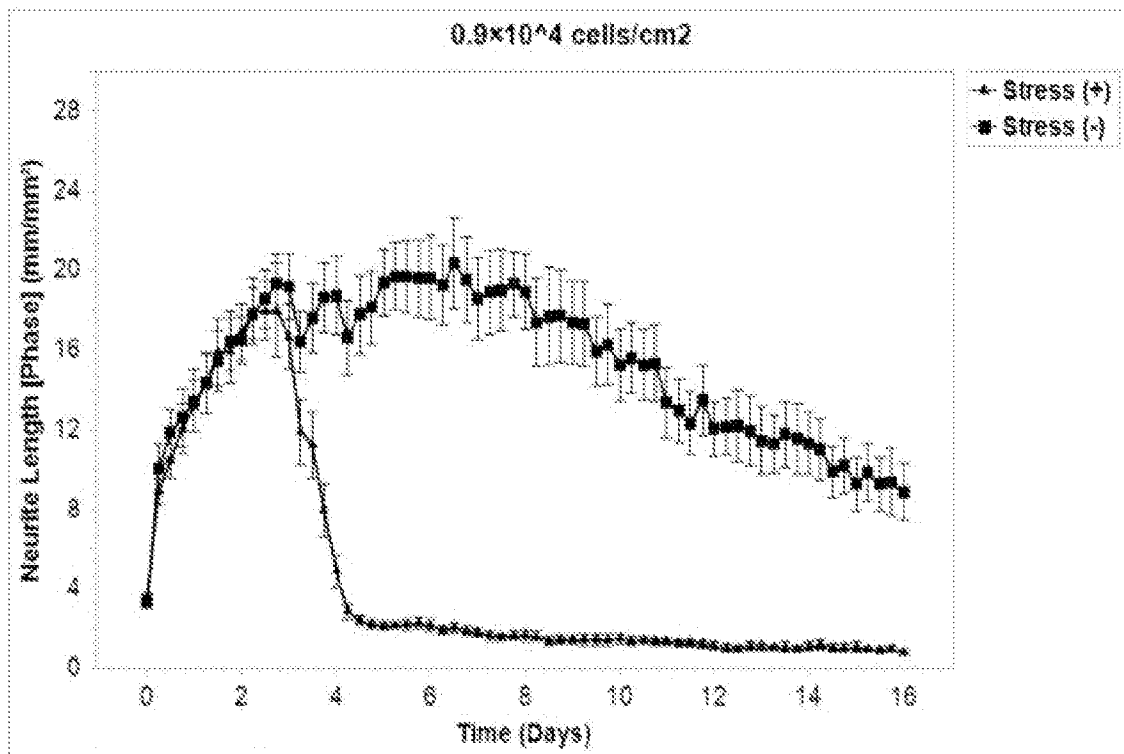
[図3]



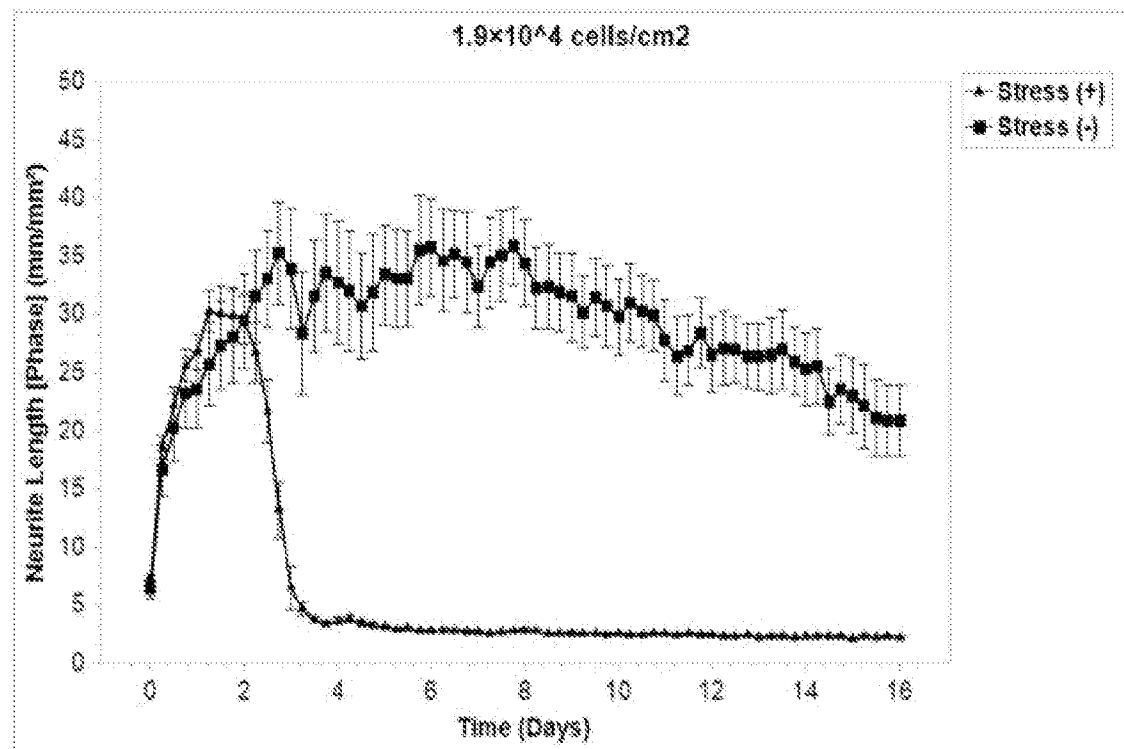
[図4]



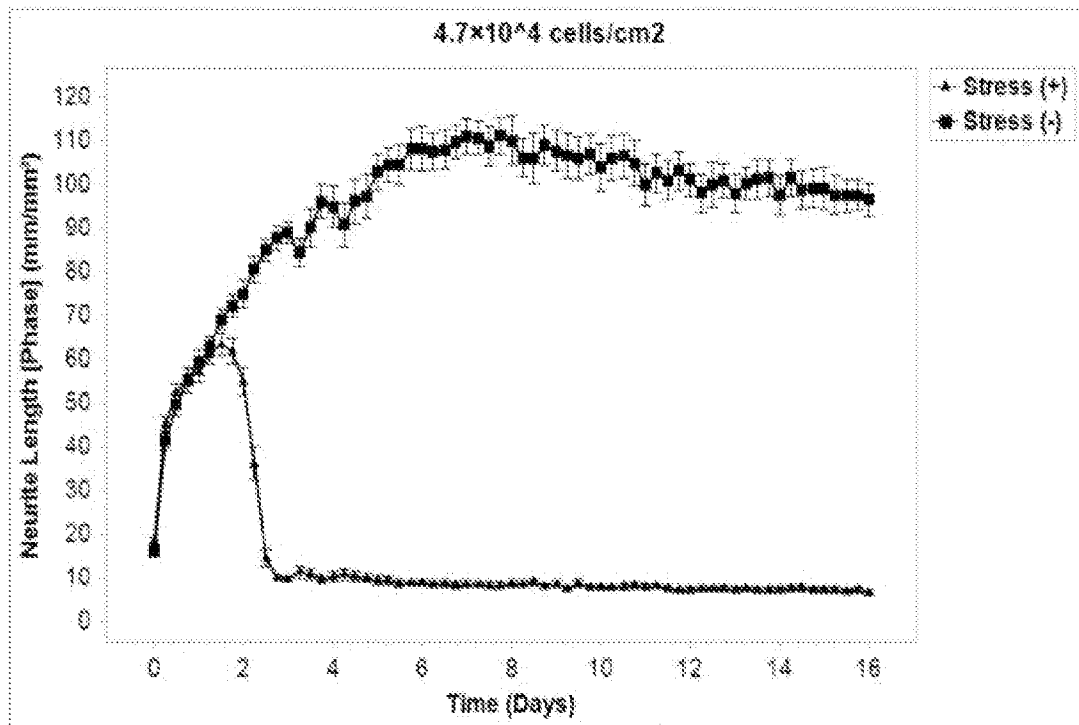
[図5]



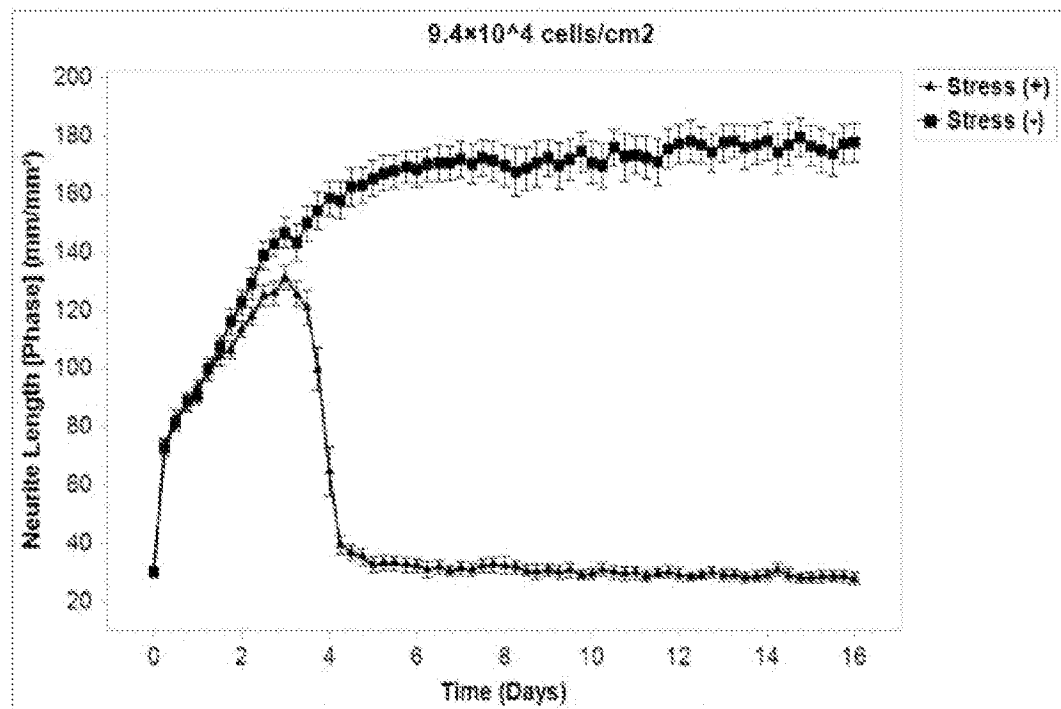
[図6]



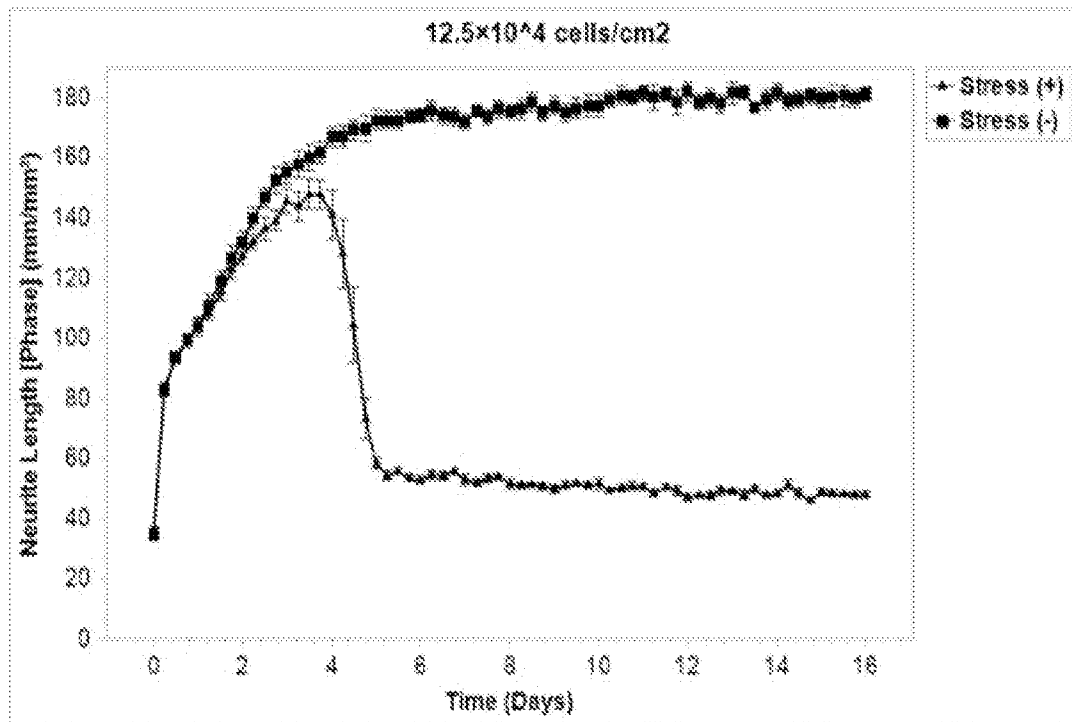
[図7]



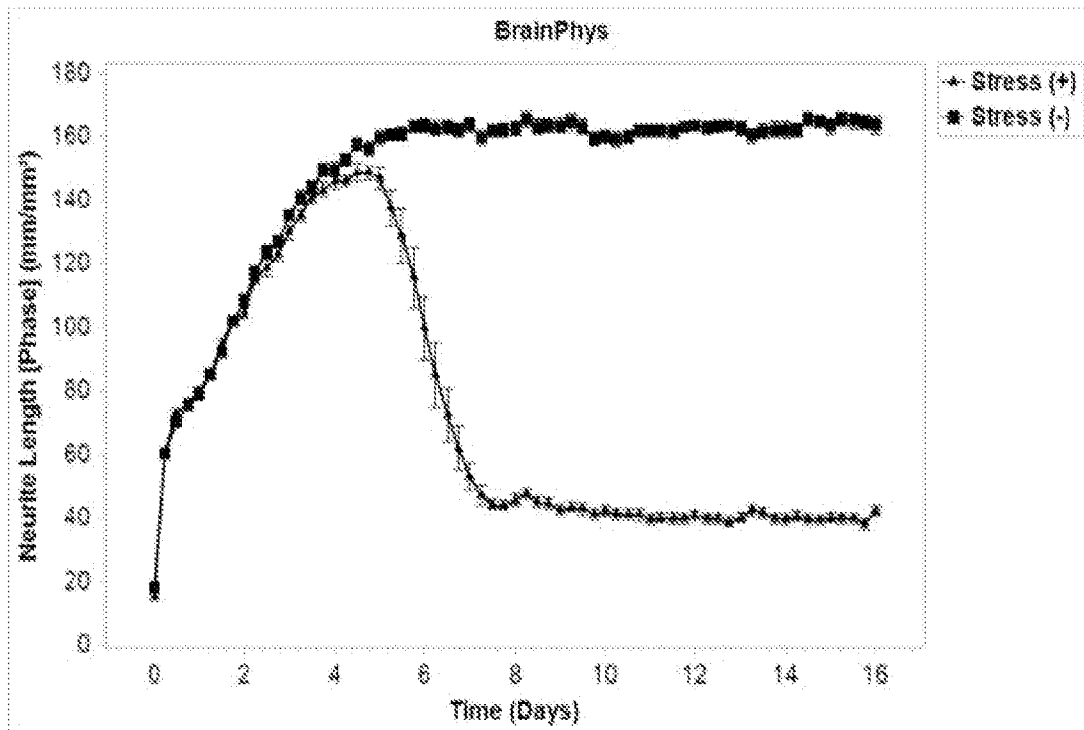
[図8]



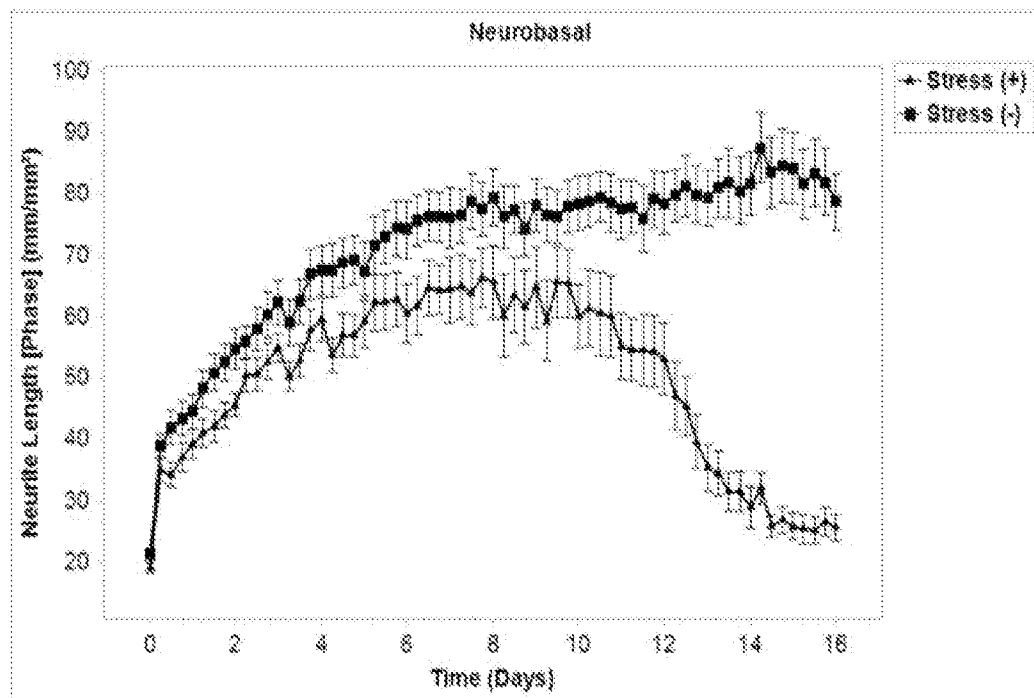
[図9]



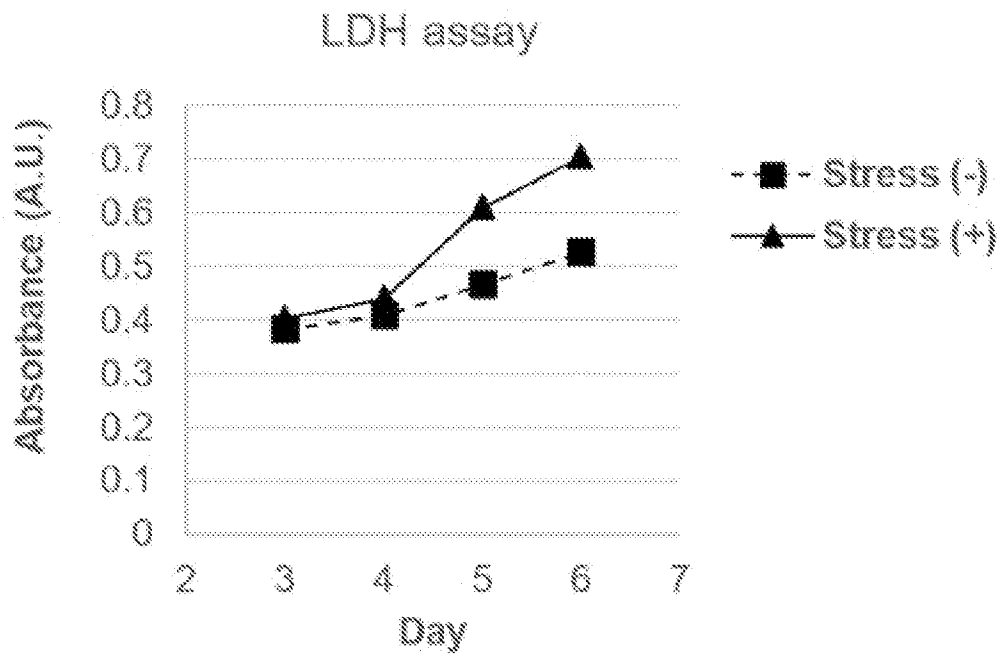
[図10]



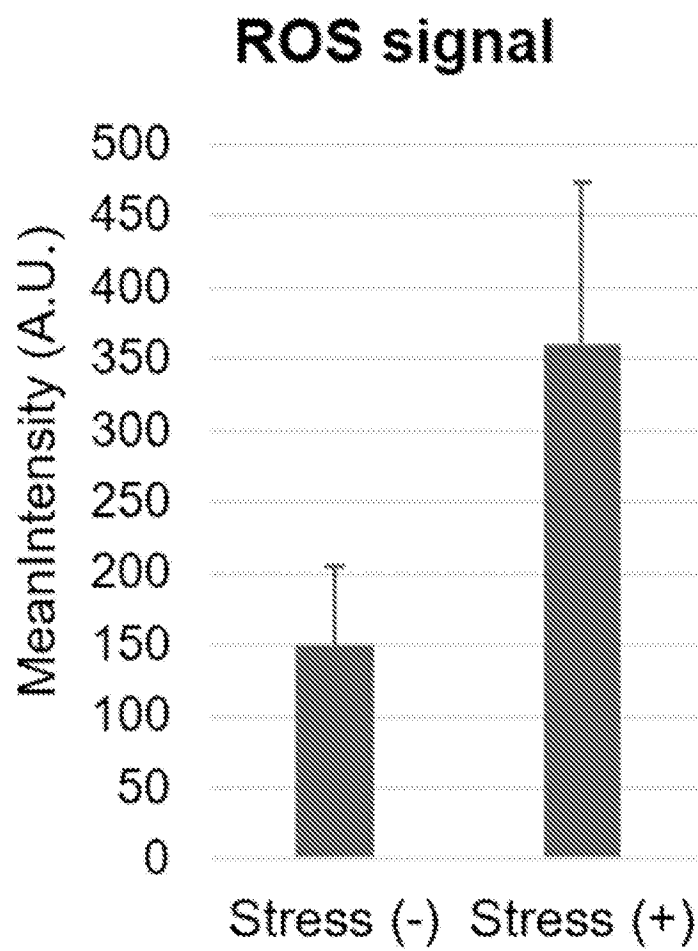
[図11]



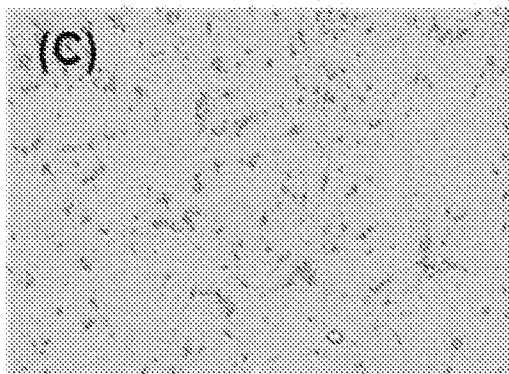
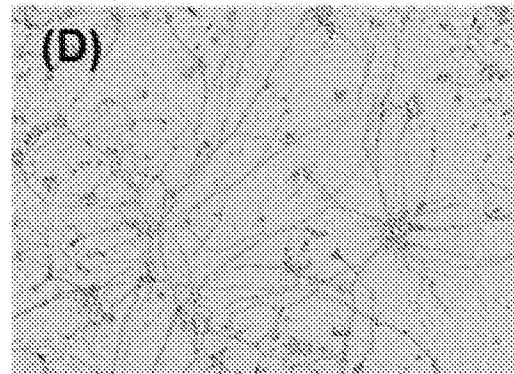
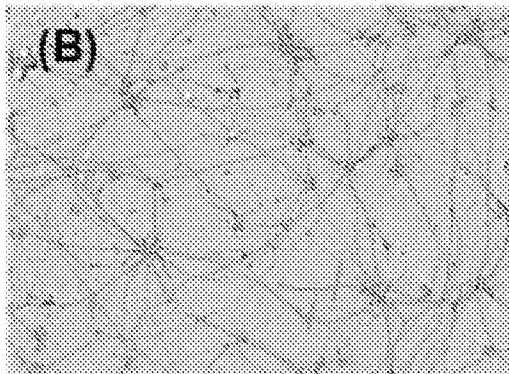
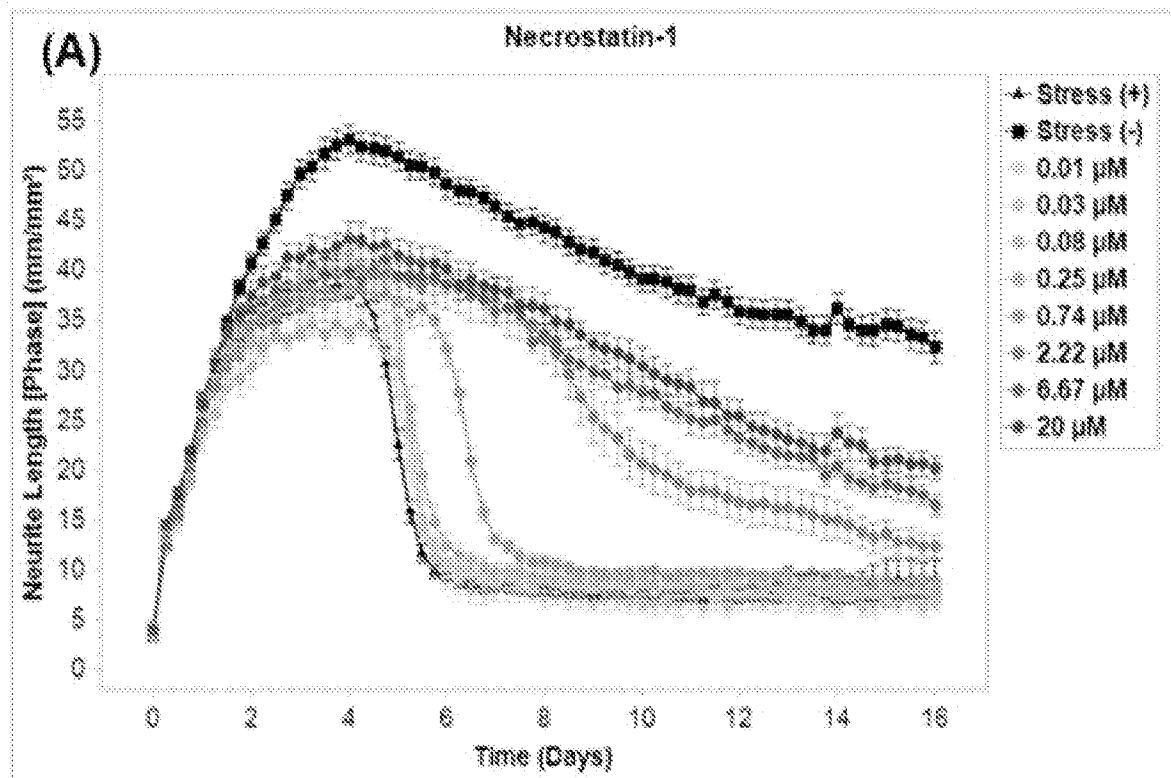
[図12]

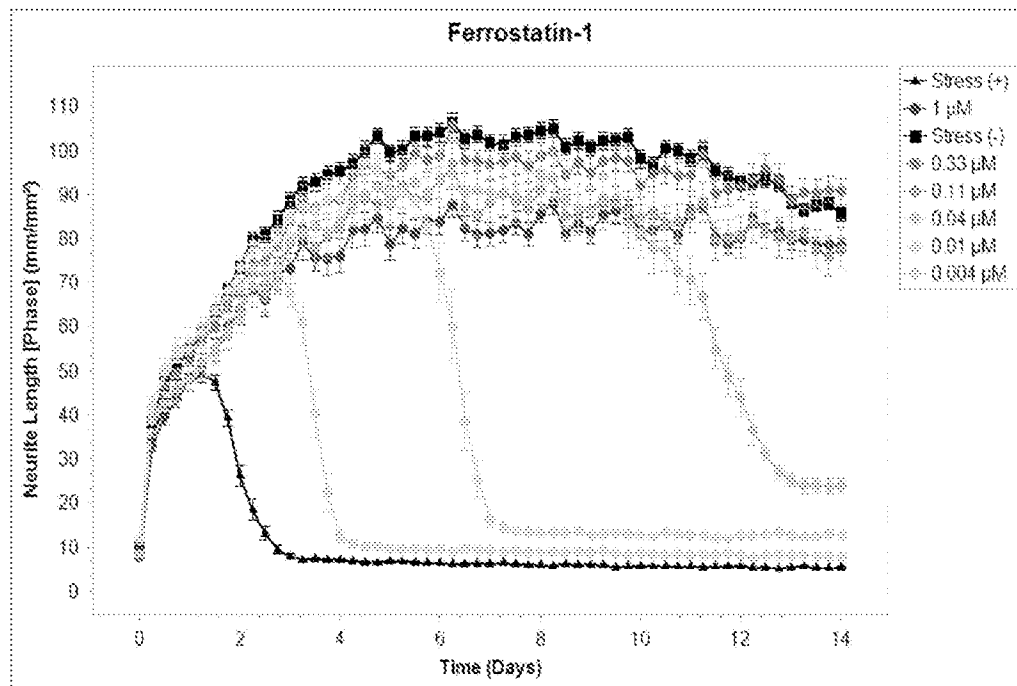
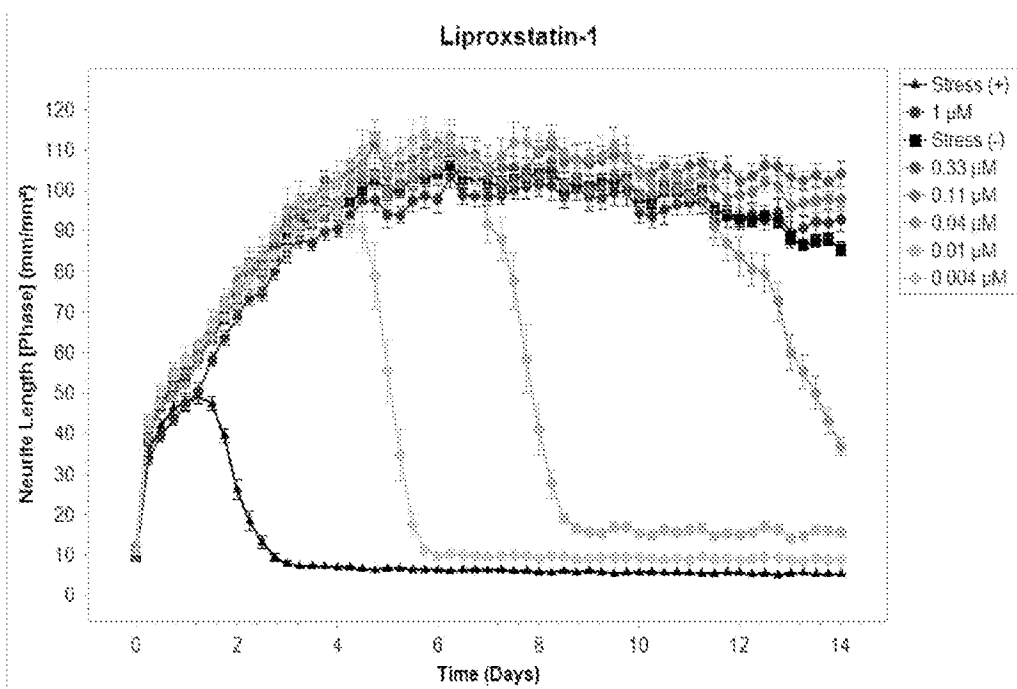


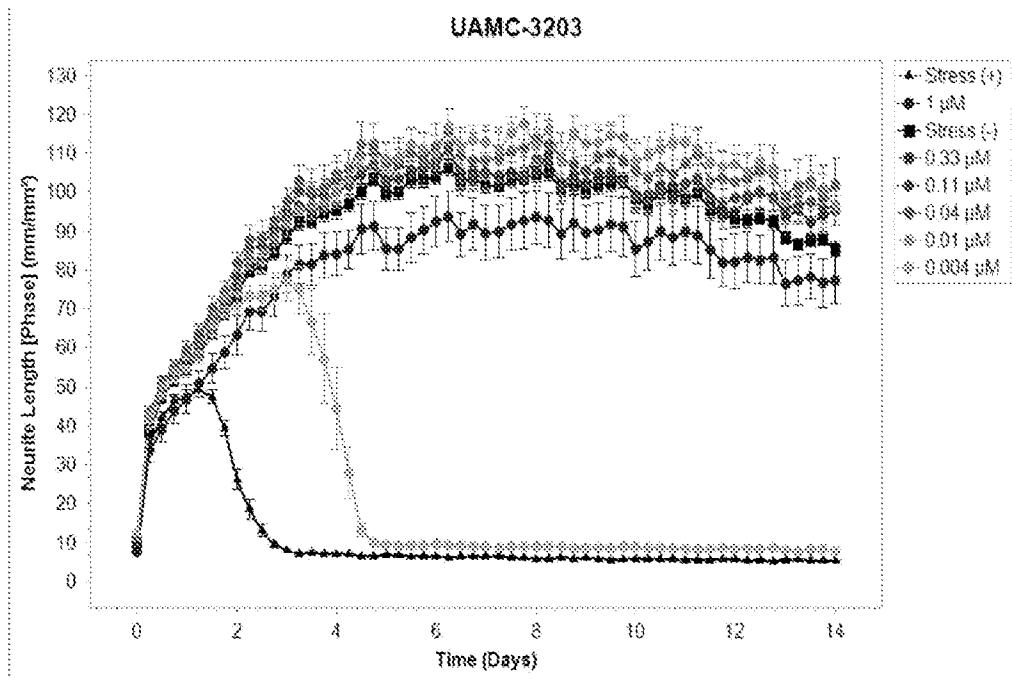
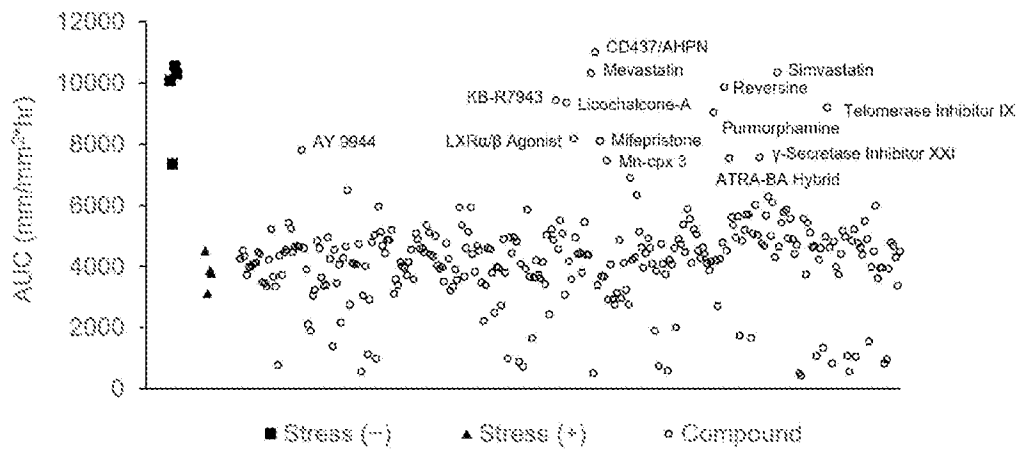
[図13]



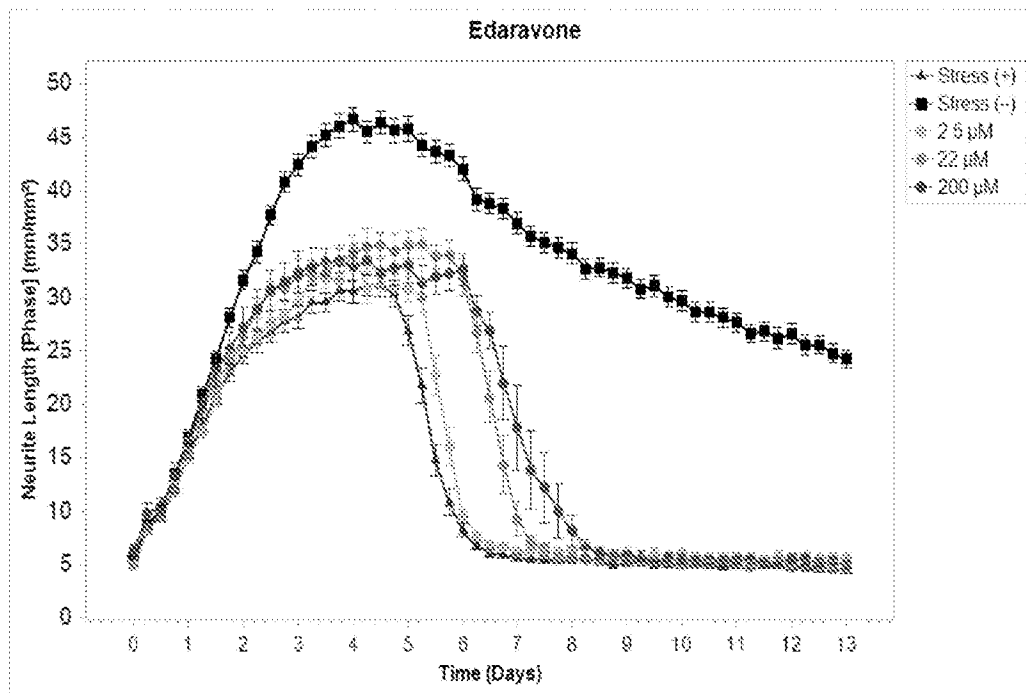
[図14]



[15][16]

[17][18]

[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/009911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 5/0793</i> (2010.01)i; <i>C12N 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/079</i> (2010.01)i; <i>C12Q 1/02</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/06</i> (2006.01)i FI: C12N5/0793; C12Q1/06; C12N5/10; C12Q1/02; C12N1/00 B; C12N5/079 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) C12N5/0793; C12N1/00; C12N5/10; C12N5/079; C12Q1/02; C12Q1/06 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); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/187696 A1 (THE FOUNDATION FOR THE PROMOTION OF INDUSTRIAL SCIENCE) 02 November 2017 (2017-11-02) paragraphs [0065], [0076]-[0078], fig. 23	10-12
Y	paragraphs [0065], [0076]-[0078], fig. 23	1-23
Y	JP 2006-254814 A (FUKUOKA PREFECTURE) 28 September 2006 (2006-09-28) paragraphs [0079]-[0082], [0127], fig. 8	1-23
Y	LEON, Julio et al., 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neuritogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions, SCIENTIFIC REPORTS, 2016, vol. 6:22086, pp. 1-15 abstract, p. 2, paragraphs 7-9, fig. 4, 6, 8, p. 12, second paragraph	1-23
Y	WO 2006/059423 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 08 June 2006 (2006-06-08) claims	1-23
☒ 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 04 June 2024		Date of mailing of the international search report 18 June 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/009911

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2020-531440 A (XW LABORATORIES, INC.) 05 November 2020 (2020-11-05) paragraphs [0001]-[0006]	1-23
A	WO 2013/140927 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 26 September 2013 (2013-09-26) claims	1-23
A	JP 2009-538121 A (NEURO PROFILE GMBH) 05 November 2009 (2009-11-05) paragraphs [0019]-[0021]	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/009911

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017/187696	A1	02 November 2017	US	2019/0127672	A1	
				paragraphs [0094], [0105]-[0107], fig. 23			
				EP	3450540	A1	
				CN	109219655	A	

JP	2006-254814	A	28 September 2006	(Family: none)			

WO	2006/059423	A1	08 June 2006	EP	1818063	A1	
				claims			

JP	2020-531440	A	05 November 2020	WO	2019/033330	A1	
				paragraphs [0001]-[0007]			
				US	2020/0181194	A1	
				EP	3668837	A1	
				CN	111278807	A	

WO	2013/140927	A1	26 September 2013	US	2015/0064734	A1	
				claims			
				EP	2829605	A1	

JP	2009-538121	A	05 November 2009	US	2009/0222938	A1	
				paragraphs [0019]-[0021]			
				WO	2007/121721	A2	
				CN	101420971	A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 5/0793(2010.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/079(2010.01)i;
C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i
FI: C12N5/0793; C12Q1/06; C12N5/10; C12Q1/02; C12N1/00 B; C12N5/079

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））
C12N5/0793; C12N1/00; C12N5/10; C12N5/079; C12Q1/02; C12Q1/06

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); CAlus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)

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 2017/187696 A1（一般財団法人生産技術研究奨励会）02.11.2017（2017 - 11 - 02） [0065]、[0076] - [0078]、図23	10-12
Y	[0065]、[0076] - [0078]、図23	1-23
Y	JP 2006-254814 A（福岡県）28.09.2006（2006 - 09 - 28） [0079] - [0082]、[0127]、図8	1-23
Y	LEON, Julio et al., 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neuritogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions, SCIENTIFIC REPORTS, 2016, Vol.6:22086, p.1-15 Abstract, p.2 第7-9段落, Fig.4, Fig.6, Fig.8, p.12 第2段落	1-23
Y	WO 2006/059423 A1（独立行政法人科学技術振興機構）08.06.2006（2006 - 06 - 08） 特許請求の範囲	1-23

☒ 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、一般的技术水準を示すもの

“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

04.06.2024

国際調査報告の発送日

18.06.2024

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）

吉門 沙央里 4N 5081

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
Y	JP 2020-531440 A (エックスダブリュー ラボラトリーズ, インコーポレイテッド) 05.11.2020 (2020 - 11 - 05) [0 0 0 1] - [0 0 0 6]	1-23
A	W0 2013/140927 A1 (国立大学法人京都大学) 26.09.2013 (2013 - 09 - 26) 請求の範囲	1-23
A	JP 2009-538121 A (ニューロプロファイル ゲーエムベアハー) 05.11.2009 (2009 - 11 - 05) [0 0 1 9] - [0 0 2 1]	1-23

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/JP2024/009911

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2017/187696	A1	02.11.2017	US 2019/0127672 A1 [0094], [0105]-[0107], FIG. 23 EP 3450540 A1 CN 109219655 A	
JP	2006-254814	A	28.09.2006	(ファミリーなし)	
WO	2006/059423	A1	08.06.2006	EP 1818063 A1 Claims	
JP	2020-531440	A	05.11.2020	WO 2019/033330 A1 [0001]-[0007] US 2020/0181194 A1 EP 3668837 A1 CN 111278807 A	
WO	2013/140927	A1	26.09.2013	US 2015/0064734 A1 Claims EP 2829605 A1	
JP	2009-538121	A	05.11.2009	US 2009/0222938 A1 [0019]-[0021] WO 2007/121721 A2 CN 101420971 A	