

(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

2018年11月15日(15.11.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/207789 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/48 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国際出願番号 :

PCT/JP2018/017828

(22) 国際出願日 :

2018年5月8日(08.05.2018)

(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 2017-093450 2017年5月9日(09.05.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 井上治久 (INOUE, Haruhisa); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 今村恵子 (IMAMURA, Keiko); 〒6068501 京都

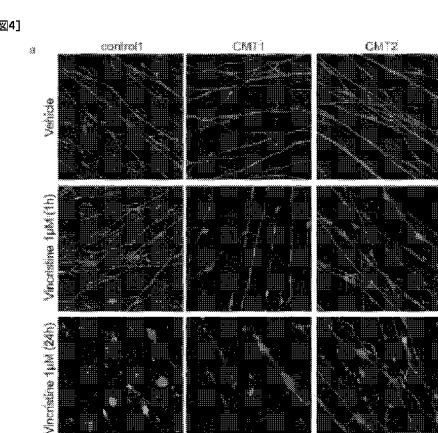
府 京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島一, 外 (TAKASHIMA, Hajime et al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: NEUROTOXICITY EVALUATION MODEL SYSTEM USING DISEASED iPS CELL, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 疾患iPS細胞を用いた神経毒性評価モデル系及びその使用



(57) **Abstract:** The present invention provides a method for evaluating the neurotoxicity of a compound to a human body, said method including steps (1) to (3): (1) bringing a nerve cell (CMT-N) differentiated and induced from an iPS cell from a human body suffering from CMT into contact with each of test compounds; (2) assessing at least one phenotype selected from the group consisting of (a) the state of a mitochondrion in a neurite, (b) an ATP level in a neurite and (c) an MFN2 protein level in the nerve cell; and (3) selecting a test compound that worsens the phenotype in (2) compared with a control in which the nerve cell is not contacted with any one of the test compounds as a compound capable of causing neurotoxicity to a human body.

(57) 要約: 本発明は、以下の(1)～(3)の工程を含む、化合物のヒトに対する神経毒性の評価方法を提供する。(1) CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞(CMT-N)と試験化合物とを接触させる工程(2)当該神経細胞における、以下の(a)～(c):(a)神経突起中のミトコンドリアの状態(b)神経突起中のATPレベル(c)MFN2タンパク質レベルからなる群より選択される1以上の表現型を検定する工程(3)試験化合物と接触させなかった対照と比較して、(2)の表現型を増悪させた試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がある化合物として選択する工程



(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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

規則4.17に規定する申立て :

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称 :

疾患 iPS細胞を用いた神経毒性評価モデル系及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、シャルコー・マリー・トゥース病（CMT）患者由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）から誘導した神経細胞を用いた、薬剤の神経毒性評価モデル系、並びに当該モデル系を用いた薬剤の神経毒性評価方法に関する。

背景技術

[0002] 医薬品の開発において、候補薬の毒性予測は不可欠のステップである。実際には、動物実験などを経て、ヒトを対象とした臨床試験で候補薬の安全性や有効性を検証するが、動物とヒトで薬剤の作用が異なる場合があり、臨床研究まで進んだ候補薬の約40%が予期せぬ副作用により開発中止を余儀なくされているのが現実である。

そこで近年では、開発の早い段階で、iPS細胞から作製したヒト細胞を用いて候補薬を調べることにより毒性を予測し、創薬開発をより効率的かつ低コストで行えるようにしようとする研究が注目されており、これまでに、iPS細胞由来の心筋細胞や肝細胞を用いた毒性評価系が報告されている。

神経毒性は心毒性や肝毒性と並び、創薬において評価すべき重要な項目である。例えば、薬剤誘導性の神経毒性において主要な型である軸索変性症は、ある種の抗がん剤によって引き起こされるが、*in vitro*モデルを用いて抗がん剤誘導性の神経毒性を試験したことが報告されている（非特許文献1）。しかしながら、iPS細胞由来の神経細胞を用いたどのような評価系が実際の臨床的副作用を反映した評価系なのかは未だ明らかになっていない。数多ある細胞アッセイ系と表現型の中から、臨床症状をよく反映する神経細胞の表現型を、ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた細胞アッセイにより同定することが、神経毒性評価モデル系を確立するために切望されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1 : Nakamura, H. et al. J Pharmacol Sci. 128, 170–178 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 従って、本発明の課題は、薬剤による神経毒性の臨床的副作用をよく反映するヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた細胞アッセイ系及び評価の指標となる細胞の表現型を同定し、*in vitro*の神経毒性評価モデル系を確立することであり、当該モデル系を用いて、高確度に医薬品候補薬剤のヒト神経毒性を予測する手段を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、上記課題を達成するために、抗がん剤に対して高感受性で、副作用として神経障害を示しやすいCMT患者から作製したiPS細胞を使用した。CMTは、最も一般的な遺伝性の末梢神経疾患であり、世界中で2,500人のうち約1人が罹患している。CMTは、徐々に進行する筋萎縮、衰弱、感覚障害および足変形を引き起こす。本発明者らは、ミトコンドリアタンパク質のMitofusin-2 (MFN2) をコードする遺伝子に変異を有するCMT患者からiPS細胞を作製し、運動神経を含む神経細胞に分化させて、神経毒性評価モデルを作製した。

[0006] 次いで、本発明者らは、CMT患者iPS細胞由来神経細胞 (CMT-N) と健常人iPS細胞由来神経細胞（対照）との間で表現型を比較分析し、CMT-Nでは、対照に比べて、神経突起におけるミトコンドリアが形態的に短く、移動性が低いことを見出した。また、ニューロスフェア・アッセイにおいて、神経毒性を引き起こすことが知られている抗がん剤を投与すると、CMT-Nと対照の両方で、神経突起内でATP欠乏を伴うミトコンドリアの凝集が生じたが、CMT-Nでより顕著であることが明らかとなった。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、本細胞モデルが新規な神経毒性評価系として有用であると結論し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下の（1）～（3）の工程を含む、化合物のヒトに対する神経毒性の評価方法。

（1）CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞と試験化合物とを接触させる工程

（2）当該神経細胞における、以下の（a）～（c）：

（a）神経突起中のミトコンドリアの状態

（b）神経突起中のATPレベル

（c）MFN2タンパク質レベル

からなる群より選択される1以上の表現型を検定する工程

（3）試験化合物と接触させなかった対照と比較して、（2）の表現型を増悪させた試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がある化合物として選択する工程

[2] 工程（2）において検定される表現型が、（a）及び／又は（b）の表現型である、[1]記載の方法。

[3] 神経突起中のミトコンドリアの状態が、ミトコンドリア長、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアの凝集、ミトコンドリアの移動性、ミトコンドリア数から選択される、[1]又は[2]記載の方法。

[4] 神経細胞が、神経突起を伸長させた付着性ニューロスフェアである、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞の代わりに、健常人のiPS細胞から分化誘導された対照神経細胞を用いて、（1）及び（2）の工程をさらに行い、該対照神経細胞に比べて、CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞において、（2）の表現型が増悪傾向を示した試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がより高い化合物として選択することを含む、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] CMTがMFN2遺伝子に変異を有するものである、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

- [7] MFN2遺伝子の変異がH128Y又はR94Qである、[6]記載の方法。
- [8] 神経毒性が軸索変性症である、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、薬剤による神経毒性の臨床的副作用をよく反映する*in vitro*の神経毒性評価モデルが提供される。よって、当該モデルを用いた細胞アッセイ系にて医薬品候補薬剤の毒性評価を実施することにより、従来よりも高確度に、候補薬のヒト神経毒性を予測することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]MFN2遺伝子変異を有するCMT患者からのiPS細胞の作製を示す図である。

(a) MFN2遺伝子変異を有するCMT患者から作製したiPS細胞及び健康な対照細胞は、ES細胞様の形態を示し（位相差顕微鏡像）、多能性幹細胞マーカーのNanogとSSEA4を発現していた。スケールバーは100 μm。 (b) CMT細胞株は、H128Y又はR94QのMFN2遺伝子変異を有していた。 (c、d) 分化した神経細胞を神経細胞マーカーのβ IIIチューブリン、および運動神経細胞マーカーのSMI32で染色した。スケールバーは100 μm。分化における特徴は対照細胞株とCMT細胞株の間で異なることはなかった (n=6)。

[図2]ミトコンドリア形態と、CMT患者から作製したiPS細胞に由来する運動神経細胞の神経突起中でのミトコンドリアの移動性に変化が見られたことを示す図である。 (a、b) MFNタンパク質レベルがCMT神経細胞で増加していることをウェスタンブロット分析で確認した (n=3, one-way ANOVA; p<0.05, post-hoc test; *p<0.05)。 (c、d) 電子顕微鏡によって分析した精製したCMT運動神経細胞の神経突起中のミトコンドリア長。スケールバーは500nm。CMT神経細胞のミトコンドリア長は、対照神経細胞と比べると短かった (1つの細胞株当たりn=38～67ミトコンドリア, one-way ANOVA; p<0.05, post-hoc test; *p<0.05)。矢印は異常なミトコンドリアを示す。 (e、f) 低速度撮影によって測定した神経突起におけるミトコンドリアの移動度。ミトコンドリア・ターゲティング配列に融合させたHB9::turbo RFPで運動神経細胞をラ

ベルし、分析した。キモグラフの典型的データを（e）に示す。CMT神経細胞の移動しているミトコンドリア数は、対照神経細胞と比べると減少していた（1つの細胞株当たりn=20～44, one-way ANOVA; p<0.05, post-hoc test; *p<0.05）。

[図3]CMT神経細胞の神経突起において、ATP欠乏を伴うミトコンドリア数の減少が起きていることを示す図である。（a）ニューロスフェアは、60日目に生じた。スケールバーは100 μm。（b）接着性ニューロスフェアから神経突起が伸長した（ β IIIチューブリンで染色）。神経突起中のミトコンドリアを評価した。スケールバーは100 μm。（c、d）Mitotrackerでミトコンドリアを染色した。スケールバーは15 μm。 β IIIチューブリン陽性神経突起中の非凝集ミトコンドリア数を計数した。CMT神経細胞の神経突起においては、対照神経細胞と比べ、ミトコンドリア数が減少していた（n=12～18フィールド, one-way ANOVA; p<0.05, post-hoc test; *p<0.05）。（e）CMT神経細胞の神経突起においては、対照神経細胞と比べ、ATPレベルが減少していた（n=6, one-way ANOVA; p<0.05, post-hoc test; *p<0.05）。

[図4]神経障害の原因となる薬剤による神経突起中のミトコンドリア凝集体形成を示す図である。（a、b）1 μMのビンクリスチンに1時間曝したことで、CMT神経細胞にミトコンドリアの凝集体が生じた。1 μMのビンクリスチンに24時間曝したことで、CMT神経細胞と対照神経細胞にミトコンドリアの凝集体が生じた。赤：Mitotrackerで染色したミトコンドリア、青： β IIIチューブリンで染色した神経突起。スケールバーは15 μm（n=36フィールド, two-way ANOVA; p<0.05, post-hoc test; *p<0.05）。

[図5]パクリタキセルによる神経突起中のミトコンドリア凝集体形成を示す図である。（a、b）1 μM パクリタキセルに24時間曝露すると、対照神経細胞に比べて、CMT神経細胞においてミトコンドリアの凝集が増大した。図5 a中、赤色はMitotrackerで染色されたミトコンドリアを、青色は β III-チューブリン陽性の神経突起を示す。スケールバー = 15 μm (n = 36 視野, one-way ANOVA; p < 0.05, post hoc test; * p < 0.05)。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、CMTのヒトiPS細胞、好ましくは、MFN-2遺伝子に変異を有するCMT患者由来のiPS細胞を分化誘導して得られた神経細胞を用いて、試験化合物の神経毒性を評価する方法を提供する。

尚、本明細書において「CMTのヒトiPS細胞」とは、CMT患者由来の体細胞から樹立されたiPS細胞だけでなく、当該疾患と相関する遺伝子変異を有するCMT未発症のヒト由来の体細胞から樹立されたiPS細胞をも包含する意味で用いられる。

[0011] 本発明において、体細胞を採取する由来となるCMT個体は、CMT患者又はCMTと相関する遺伝子変異を有する未発症のヒト個体であれば特に制限されない。CMTの臨床においては、脱髓型（1型CMT）及び軸索型（2型CMT）に分けられるが、いずれの患者由来の体細胞も用いることができる。好ましくは、MFN2遺伝子に変異を有するヒトであり、より好ましくは、MFN2のコーディング領域に変異を有するヒトである。MFN2はミトコンドリアの融合及びミトコンドリアの軸索輸送と関連する。MFN2遺伝子の変異として、例えば、MFN2のアミノ酸配列における128番目のヒスチジンが変換される変異、好ましくは128番目のヒスチジンが他のアミノ酸、好ましくはチロシンに置換される変異（H128Y）、あるいは94番目のアルギニンが変換される変異、好ましくは94番目のアルギニンが他のアミノ酸、好ましくはグルタミンに置換される変異（R94Q）が挙げられるが、それらに限定されない。

[0012] 本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆるヒト細胞をいう。体細胞には、非限定的に、胎児の体細胞、新生児の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細

胞、腸細胞、脾細胞、臍細胞（臍外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0013] I. iPS細胞の製造方法

iPS細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008) ; 国際公開WO 2007/069666) 。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells, 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y

, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010) , Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720 、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

- [0014] 上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など] 、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901) 、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021) 、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine) 、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294 等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など) 、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01) 、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA) 、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA) 、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling活性化剤 (例えばsoluble Wnt3a) 、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2) 、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これら

の樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

[0015] 初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

[0016] 一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp. 663-676, 2006; Cell, 131, pp. 861-872, 2007; Science, 318, pp. 1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なよう、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質（GFP）、 β グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にloxP配列を有してもよい。

[0017] また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクシ

ヨンなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5'-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies) を取り込ませたRNAを用いても良い (Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。

- [0018] iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10～15% FBSを含有するDME M、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液〔例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、靈長類ES細胞培養用培養液（靈長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology社）〕などが含まれる。
- [0019] 培養法の例としては、たとえば、37°C、5% CO₂存在下にて、10% FBS含有DME M又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有靈長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上のうちにiPS様コロニーを生じさせることができる。
- [0020] あるいは、37°C、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上で10% FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日又はそれ以上のうちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはW02010/137746)、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5 (W02009/123349) およびマトリケル (BD社)）を用いる方法が例示される。
- [0021] この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さ

らに、樹立効率を上げるため、低酸素条件（0.1%以上、15%以下の酸素濃度）によりiPS細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはW02010/013845）。

[0022] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100 cm²あたり約5×10³～約5×10⁶細胞の範囲である。

[0023] iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct3/4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

[0024] II. 神経細胞の分化誘導法

本発明において、神経細胞とは、少なくともβIII-チューブリン及び／又はMAP2の神経細胞マーカーを発現している細胞を言い、好ましくはさらにSMI-32及び／又はIsl1を発現する運動神経細胞である。

[0025] 前述のiPS細胞から、神経細胞を分化誘導する方法として、特に限定されないが、線維芽細胞フィーダー層上の高密度培養による分化誘導法（特開2008-201792）、ストローマ細胞との共培養による分化誘導法（SDIA法）（例えば、W02001/088100、W0/2003/042384）、浮遊培養による分化誘導法（SFE法）（W02005/123902）およびそれらの組み合わせによる方法を利用することができる。

[0026] 他の態様として、コーティング処理された培養皿にiPS細胞を接着させて、任意の培地内で適宜添加物を変えて培養する接着培養法が例示される。

[0027] 当該接着培養法で用いるコーティング剤としては、例えば、マトリゲル、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、フィブロネク

チン、ラミニンおよびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、ポリ-L-リジンとラミニンの組み合わせである。

[0028] 当該接着培養法で用いる培地としては、基本培地へ添加剤を適宜加えたものを挙げることができる。基本培地としては、例えば、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、NS-A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、DMEM/F12培地、ハム培地、RPM I 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地であれば特に限定されない。より好ましくは、Neurobasal培地およびDMEM/F12の混合物である。添加剤として、血清、血清代替物（KSR）（Invitrogen）、レチノイン酸（RA）、BMP阻害剤、TGF β ファミリー阻害剤、Sonic Hedgehog（SHH）、bFGF（FGF-2）、EGF-8、EGF、HGF、LIF、BDNF、GDNF、NT-3、アミノ酸、ビタミン類、インターロイキン類、インスリン、トランスフェリン、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、B27-サプリメント、N2-サプリメント、ITS-サプリメント、抗生物質、メルカプトエタノールが挙げられる。

ここで、BMP阻害剤として、Noggin、chordin、follistatinおよびDorsomorphin LDN-193189などが例示される。また、TGF β ファミリー阻害剤として、SB431542、SB202190、SB505124、NPC30345、SD093、SD908、SD208、LY2109761、LY364947、LY580276およびA-83-01などが例示される。これらの添加剤は、適宜組み合わせて用いることができる。好まし添加剤の組み合わせとしては、（1）NogginおよびSB431542、（2）Noggin、B27-サプリメントおよびN2-サプリメント、（3）レチノイン酸、Sonic Hedgehog、B27-サプリメントおよびN2-サプリメントまたは（4）BDNF、GDNF、NT-3、B27-サプリメントおよびN2-サプリメントが挙げられる。これらの組み合わせを、さらに組み合わせて用いることもできる。

[0029] 培養開始時のiPS細胞の濃度は、効率的に神経細胞を形成させるように適宜設定できる。培養開始時のiPS細胞の濃度は、特に限定されないが、例えば、

約 1×10^3 ～約 1×10^6 細胞/ml、好ましくは約 1×10^4 ～約 5×10^5 細胞/mlである。

- [0030] 培養温度、CO₂濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約30～40℃、好ましくは約37℃である。また、CO₂濃度は、例えば約1～10%、好ましくは約5%である。
- [0031] 他の態様として、ニューロスフェアの形成後コーティング処理された培養皿に接着させて、任意の培地中で適宜添加物を変えて培養する改変SFEbq法が例示される。当該改変SFEbq法でのニューロスフェアの形成においては、細胞非接着性の培養器を用いることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていないもの、もしくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA））またはLipidure（NOF）によるコーティング処理したものを使用できる。好ましくは、コーティング剤は、Lipidureである。
- [0032] 当該改変SFEbq法においてニューロスフェアを形成させるために、上記の基本培地ならびに添加剤を用いて培養することができる。好ましい培地として、DMEM/F12の混合物またはNeurobasal培地が挙げられる。また、好ましい添加剤の組み合わせとして、（1）DorsomorphinおよびSB431542または（2）レチノイン酸、Sonic Hedgehog、FGF-2およびB27-サプリメントが挙げられる。これらの組み合わせを、さらに組み合わせて用いることもできる。
- [0033] ニューロスフェアの形成開始時の細胞濃度は、効率的にニューロスフェアを形成させるように適宜設定できる。培養開始時の細胞の濃度は、特に限定されないが、例えば、約 1×10^4 ～約 5×10^6 細胞/ml、好ましくは約 5×10^5 ～約 2×10^6 細胞/mlである。
- [0034] 当該改変SFEbq法において得られたニューロスフェアを培養皿へ接着させるためには、上述したいずれのコーティング剤も用いることができるが、好ましくは、マトリゲルである。
- [0035] また、当該改変SFEbq法において接着培養を行う場合、上述した基本培地ならびに添加剤を用いて培養することができる。好ましい培地として、Neuroba

sal培地が挙げられる。また、好ましい添加剤の組み合わせとして、BDNF、GDNFおよびNT-3が挙げられる。

[0036] 当該改変SFEBq法において、温度、CO₂濃度等の他の培養条件は適宜設定できる。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約30～40°C、好ましくは約37°Cである。また、CO₂濃度は、例えば約1～10%、好ましくは約5%である。

[0037] このように誘導された神経細胞は、例えば、β III-チューブリン、MAP2等の神経細胞マーカー、あるいは、SMI-32、Islet1等の運動神経細胞マーカーに対する抗体を用いて、単離精製することができる。

[0038] III. 薬剤による神経毒性の評価方法

本発明は、前述の方法によって得られたCMTのヒトiPS細胞由来の神経細胞と試験化合物とを接触させ、各指標を用いることで該試験化合物の神経毒性を評価する方法（本発明の評価方法）を提供する。

[0039] 一実施態様において、本発明の評価方法は以下の（1）～（3）の工程を含む。

（1）CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞（CMT-N）と試験化合物とを接触させる工程

（2）当該神経細胞における、以下の（a）～（c）：

（a）神経突起中のミトコンドリアの状態

（b）神経突起中のATPレベル

（c）MFN2タンパク質レベル

からなる群より選択される1以上の表現型を検定する工程

（3）試験化合物と接触させなかった対照と比較して、（2）の表現型を増悪させた試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がある化合物として選択する工程

[0040] 工程（1）におけるCMT-Nと試験化合物との接触は、例えば、CMT-Nの維持培地中に試験化合物を添加することにより行うことができる。

試験化合物としては、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産

物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質又は粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、天然化合物等が挙げられる。好ましくは、医薬品候補化合物である。

- [0041] 試験化合物はまた、(1)生物学的ライブラリー、(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、及び(4)アフィニティクロマトグラフィ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、又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) 又はビーズ (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)、胞子 (米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、及び同第5,223,409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-9) 若しくはファージ (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。

- [0042] 試験化合物の添加濃度は、化合物の種類に応じて適宜選択され得るが、医

薬品候補化合物の場合、目的の薬効が十分に発揮され得る濃度を目安にして選択することができる。

[0043] CMT-Nを試験化合物に接触させる時間は特に制限されないが、好ましくは、健常人iPS細胞由来神経細胞（対照）に比べて、工程（2）において神経毒性の指標となる各種表現型が顕著となる時間が挙げられる。例えば、試験化合物がビンクリスチンやパクリタキセル等の場合には、約10分～約6時間、好ましくは約20分～約3時間、より好ましくは約30分～約2時間（例えば、約1時間）を例示することができる。

この意味において、本発明の評価方法の好ましい一実施態様においては、健常人iPS細胞由来神経細胞（対照）について、同様に前記工程（1）及び（2）を行い、CMT-Nにおいて、対照に比べて、神経毒性を示す表現型がより顕著である場合か否かを神経毒性のさらなる評価指標とすることができる。

[0044] 工程（2）において、神経毒性の指標となる神経細胞の表現型としては、（a）神経突起中のミトコンドリアの状態、（b）神経突起中のATPレベル、及び（c）MFN2タンパク質レベルが挙げられる。好ましくは、（a）又は（b）の表現型が指標として用いられる。

ここで「神経突起中のミトコンドリアの状態」としては、例えば、ミトコンドリア長、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアの凝集、ミトコンドリアの移動性、ミトコンドリア数が挙げられる。ミトコンドリアの長さや形態は、電子顕微鏡観察により検定することができる。また、ミトコンドリアの凝集、ミトコンドリアの移動性は、例えば、運動神経細胞特異的プロモーター（例：HB9プロモーター）の制御下にある蛍光タンパク質遺伝子にミトコンドリア移行シグナル配列を連結したコンストラクトを、神経細胞に導入し、ミトコンドリアを可視化して観察することにより実施することができる。ミトコンドリア数は、Mitotracker等でミトコンドリアを染色して計数することができる。

神経突起中のATPレベルの測定や神経細胞中のMFN2タンパク質レベルの測定は、常法により行うことができる。

- [0045] 神経突起中のミトコンドリアの状態やATPレベルを測定する場合、神経体中のミトコンドリアを除外するために、分化した神経細胞からニューロスフェアを作製し、これを細胞外マトリクス（例えば、ラミニン、マトリゲル、フィブロネクチン、レトロネクチン等、好ましくはラミニン）でコーティングした培養容器に播種して付着性ニューロスフェアから神経突起の伸長が認められるまで培養し、必要に応じて、ピペッティング等によりニューロスフェアのコアを除去した後、実施することが好ましい。
- [0046] 工程（3）において、工程（2）で検定した試験化合物と接触させた場合のCMT-Nの表現型を、該化合物を接触させなかった場合の該表現型と比較する。比較の結果、試験化合物と接触させた場合に、接触させなかった場合に比べて、神経突起中のミトコンドリア長が短い、神経突起中のミトコンドリアの形態が異常である、神経突起中のミトコンドリアの凝集度が高い、神経突起中でミトコンドリアの移動性が低下している、神経突起中のミトコンドリア数が減少している、神経突起中のATPレベルが低下している、神経細胞中のMFN2タンパク質レベルが高い場合、該試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性があるか、その可能性が高い化合物として選択することができる。試験化合物が医薬品候補化合物である場合、当該選択された化合物を、開発候補から除外することができる。言い換えれば、試験化合物と接触させた場合に、接触させなかった場合と比べて、上記の表現型に有意な差がない場合、該試験化合物は、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がないか、可能性が低いと判定し、開発候補として創薬研究を継続することができる。
- [0047] 神経毒性は、損傷を生じる部位によって、軸索変性症、神経細胞損傷、及び髄鞘障害に分類することができるが、本発明の評価方法は、軸索変性症の評価モデル系である。
- [0048] 医薬候補化合物の毒性評価系としての用途を強調して記載したが、本発明のCMT-Nは、既存の医薬品化合物の、個々の患者（あるいは同じ原因遺伝子変異を有する患者群）における感受性の評価（患者群の分類（例、レスポンダ

ーと非レスポンダー)) にも使用可能である。さらに、分類された患者群間における網羅的遺伝子発現解析結果を比較することにより、薬剤感受性マーカー遺伝子を同定するのにも応用可能である。

[0049] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されることは言うまでもない。

実施例

[0050] <材料及び方法>

iPS細胞の作製と細胞培養

既報の方法に従って、OCT3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28、ドミナントネガティブp53、又はOCT3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28、p53-shRNAを有するエピソーマルベクターを用いて、MFN2遺伝子変異を有するCMT患者（CMT1及びCMT2）及びMFN2に変異を有しない健常人（control 1及びcontrol 2）由来の末梢血単核細胞（PBMC）またはTリンパ球からヒトiPS細胞を作製した（表1）。4ng/mlのベーシック線維芽細胞増殖因子（FGF；Wako Chemicals、Osaka、Japan）およびペニシリン/ストレプトマイシンを含んだヒトiPS細胞培地（靈長類胚性幹細胞培地；ReproCELL、Yokohama、Japan）を用いて、SNLフィーダー層上で細胞を培養した。

[0051] [表1]

iPSC クローンのリスト				
	control 1	control 2	CMT1	CMT2
組織内での クローン名	1210A2	1039A1	CMT8EL7	CMT13EL3
性別	女性	男性	女性	男性
生検年齢	29	50	35	41
MFN2 変異	N. A.	N. A.	R94Q	H128Y
由来 リプログラミ ング	PBMC エピソーマル	T リンパ球 エピソーマル	PBMC エピソーマル	PBMC エピソーマル
N. A. : ない				
PBMC：末梢血単核細胞				

[0052] ジェノタイピング

ゲノムDNAのPCR増幅およびダイレクトシーケンシング (3500xL Genetic Analyzer、Applied Biosystems、Waltham、MA) によってMFN2遺伝子における一塩基変異のジェノタイピングを行った。

[0053] 急速胚様体凝集法 (SFEBg) による運動神経細胞の誘導

ヒトiPS細胞を単細胞に解離し、100%エタノールで2%濃度に調整したPluronic (シグマ・アルドリッヂ、St. Louis、MO) で予め被覆した再懸濁培養用のU底96穴プレート (Greiner Bio-One、Frickenhausen、Germany) で、急速に再凝集させた。胚様体の凝集塊は、5%DFK培地 (Dulbecco's 改変Eagle's 培地/Ham's F12；サーモフィッシュシャーサイエンティフィック、Pittsburgh、PA) 、5%KSR (サーモフィッシュシャーサイエンティフィック) 、NEAA (サーモフィッシュシャーサイエンティフィック) 、L-グルタミン (シグマアルドリッヂ) 、0.1Mの2-ME (サーモフィッシュシャーサイエンティフィック) 、2mMのドルソモルフィンと共に、神経細胞誘導段階 (P1) で12日間培養した。ビタミンAを含まない2%B27 (サーモフィッシュシャーサイエンティフィック) 、1mMレチノイン酸、Smoothenedアゴニスト (Sonic Hedgehogシグナル活性化剤) (100ng/ml) 、およびFGF 2 (12.5ng/ml) (サーモフィッシュシャーサイエンティフィック) を添加したニューロベーサル培地 (サーモフィッシュシャーサイエンティフィック) でパターニングを行った後、凝集塊を22日目にMatrigel (コーニング、Tewksbury、MA) でコーティングした培養容器に付着させた。

[0054] 接着性の胚様体を、脳由来神経栄養因子 (BDNF) (10ng/ml) 、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) (10ng/ml) およびNT-3 (10ng/ml) を添加したニューロベーサル培地で、P2段階の培養を行った。それらをアキュターゼ (Innovative Cell Technologies、San Diego、CA) によって培養容器から剥がし、小さな塊または単一細胞に解離させた。P3成熟期においては、35日目にMatrigelでコーティングした24穴培養容器で、1穴あたり500,000細胞となるようにして培養した。

[0055] ウェスタンプロットティング

iPS細胞由来神経細胞に関して、分化した細胞をシトシン・アラビノシド（Ara C）（シグマアルドリッヂ）で処理した。Ara Cを除去して3日後、細胞を回収し、溶解した。

細胞（iPS細胞由来神経細胞）を、1%トライトンX-100を含む、TS緩衝液（50mM Tris-HCl, pH7.5、0.15M NaCl、5mMエチレンジアミンテトラ酢酸、5mMエチレングリコール・ビス（ β -アミノエチルエーテル）-N,N,N,N-テトラ酢酸、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル（ロシュ、Basel、Switzerland））中で、10分間氷上で溶解した。試料を4°Cで10,000×gで15分間遠心分離し、上清を保存した。上清のタンパク質濃度は、ビシンコニン酸タンパク質アッセイキット（サーモフィッシューサイエンティフィック）を用いて測定した。それぞれの等量のタンパク質を各レーンにロードし、SDS-PAGE（10-20%ポリアクリルアミドゲル、BIO CRAFT、Tokyo、Japan）で電気泳動し、ポリビニリデン・ジフルオライド（PVDF）膜（ミリポア、Billerica、MA）に転写した。当該膜を室温で1時間、5%BSAでブロックし、一次抗体を添加して一晩インキュベートした後、適切な二次抗体を加えた。ECL Prime試薬（GEヘルスケア、Chicago、IL）を検出に使用した。画像はLAS 4000（GEヘルスケア）で取得した。このアッセイで使用した一次抗体は、MFN2（Abcam、Cambridge、UK、1:1,000）および β -アクチン（シグマアルドリッヂ、1:5,000）であった。

[0056] 軸索ミトコンドリア移動性のライブイメージング

50日目に生細胞の画像を取得した。HB9::Turbo RFP-mito陽性神経細胞を選択し、低速度撮影によって神経突起におけるミトコンドリアの移動性を観察した。生細胞は、x60レンズとインキュベーションチャンバーを備えたCarl Zeiss LSM710顕微鏡を用いて撮影した。撮影の間、細胞を37°C、5%CO₂に保った。核酸導入された細胞を選択し、低速度撮影によって神経突起におけるミトコンドリアの移動性を観察した。5分間3秒毎に画像を撮り、キモグラフ分析を行った。キモグラフは、Meta Morph Software（Molecular Device、Sunnyvale、CA）を用いて作成した。移動しているミトコンドリアを、2μmの移動があったかどうかに基づいて、移動または静止のいずれかとして分類した。各

キモグラフにおいて、移動しているミトコンドリアを計数した。

[0057] 電子顕微鏡観察

既報の方法に従って、フローサイトメトリーにより運動神経細胞を精製した。全ての選別手順は、FACS AriaII (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を用いて行った。HB9::GFPレンチウイルスで感染させた後、50日目に、分化した細胞を細胞選別のためにアキュターゼ (Innovative Cell Technologies) により単一細胞に解離させた。HB9::GFP陽性細胞 (全選別細胞の約2%) を選別し、マトリゲルでコートした96穴プレート上に、1穴当たり20,000~30,000細胞となるように播種した。翌日、精製された運動神経細胞を室温でPBSで4%に調整したパラホルマリン (PFA) および2%グルタルアルデヒドで固定し、4°Cで一晩インキュベートした。超薄切片解析は、透過型電子顕微鏡 (日立、東京、日本、H7650) で80kVで行った。神経突起中のミトコンドリア長は、ImageJを用いて7枚のランダムな画像で測定した。

[0058] ニューロスフェア・アッセイの開発と神経突起中のミトコンドリア解析

神経体のミトコンドリアを除外して、神経突起中のミトコンドリアを効率的に評価するために、ニューロスフェア・アッセイを導入した。60日目の神経細胞をアキュターゼを用いて解離させ、U底96穴プレートに1穴当たり25,000細胞を集め、10ng/mlのBDNF、10ng/mlのGDNF、および10ng/mlのNT-3を含むニューロベーサル培地で培養した。ニューロスフェアは24時間後に形成され、7日間培養した。形成されたニューロスフェアをラミニンでコートした培養容器上に播種し、付着性ニューロスフェアに由来する神経突起を3日間伸長させた。ミトコンドリアを染色するために、細胞を37°Cで500nMのMitotrackerと共に30分間インキュベートした。PBSで洗浄した後、細胞を4%PFAで固定し、抗β IIIチューブリン抗体で免疫染色した。IN Cell Analyzer 6000 (GEヘルスケア) を使用して、細胞画像を撮影した。IN Cell Developerツールボックス・ソフトウェア1.92 (GEヘルスケア) を用いて、ニューロスフェア領域を除いた後に、β IIIチューブリン染色された神経突起と共に局在するMitotracker染色された斑点を計数することによって、ミトコンドリア数を評価し

た。非凝集ミトコンドリアの評価においては、 $10 \mu\text{m}^2$ 以下の小さい斑点数をプログラムされたプロトコールによって自動計数し、神経突起の面積で補正した。神経毒性試験の分析では、 $10 \mu\text{m}^2$ よりも大きい斑点数を凝集ミトコンドリアとしてプログラムされたプロトコールによって自動計数し、神経突起の面積で補正した。

[0059] 神経突起におけるATP測定

1穴あたり10個のニューロスフェアとなるように24穴プレートに播種し、7日間培養した。ピペットで吸引することによってニューロスフェアのコアを除去した後、培地をウェルから除き、神経突起におけるATPレベルをCellTiter-Glo蛍光細胞生存アッセイ (Promega, Fitchburg, WI) を用いて測定した。ATP測定に用いた細胞溶解物中のタンパク質濃度をBCAアッセイによって測定し、それによってATPレベルを補正した。

[0060] 統計分析

全てのデータは平均±標準誤差で示している。群の比較は、一元配置又は二元配置のANOVAを用いて行い、続いてScheffeの多重比較検定によって、事後検定を行った。p<0.05を統計的に有意とみなした。

[0061] <結果>

CMT患者から作製したiPS細胞

MFN2遺伝子にH128Y又はR94Qの変異を有する2人のCMT患者、及び2人の健常者からiPS細胞を作製した（図1a、表1）。次にiPS細胞から運動神経細胞を作製した。CMT患者由来のiPS細胞及びそれから作製した運動神経細胞は、MFN2遺伝子に変異を有していた（図1b）。

[0062] CMT患者から作製したiPS細胞に由来する運動神経細胞において、神経突起中のミトコンドリア形態及び移動性に異常が見られた

CMT患者のiPS細胞に由来する運動神経細胞を含む神経細胞群において、MFN2の生化学的特性を、ウェスタンブロット分析によって調べた。CMT患者のiPS細胞に由来する神経細胞群においては、MFN2の増加が見られた（図2a, b）。このことは、MFN2をコードする遺伝子の変異によって、MFN2タンパク質の生

化学的性質が変化していることを示す。

- [0063] MFN2は、ミトコンドリアの融合において機能することが知られている。CMT患者のふくらはぎ神経の生検では、軸索内においてミトコンドリアが小さく、丸く、そして凝集しているなどの異常が見られたことは、既に報告されている。そのため、MFN2遺伝子に変異を有するCMT患者は運動神経細胞における障害を示すことが知られていたことから、精製したCMT運動神経細胞の神経突起におけるミトコンドリア長を調べた。CMT神経細胞の神経突起におけるミトコンドリア長は、健常者のものと比べて短く、盛り上がった部分を欠く異常なミトコンドリアと共に、神経突起内で明らかに凝集していた（図2c, d）。これらのデータから、CMT神経細胞ではミトコンドリアの融合が起こらず、CMT患者の生検サンプルで見られた病的特徴を再現していることが示唆された。
- [0064] 次に、低速度撮影によって、CMT神経細胞の神経突起においてミトコンドリアの移動が損なわれているかを調べた。生きた運動神経細胞においてミトコンドリアを可視化するために、分化36日目において赤色蛍光タンパク質（turbo RFP）を発現するレンチウイルスを、運動神経細胞に導入した。turbo RFPは、HB9プロモーターの制御下にあるミトコンドリア・ターゲティング配列に融合させた（HB9::turbo RFP）。そして50日目に、低速度撮影を行った。5分間、3秒ごとにイメージを撮影した。運動神経細胞のミトコンドリアの代表的なキモグラフは、CMT神経細胞においては、移動しているミトコンドリア数が、対照と比べて、有意に減少していることを示していた（図2e）。定量分析によって、CMT神経細胞においては、対照と比べて、移動しているミトコンドリアの割合が、有意に少ないことが示された。対照神経細胞では移動しているミトコンドリアが40-50%を占めるのに対し、CMT神経細胞では約20%であった（図2f）。
- [0065] 更には、ニューロスフェアのアッセイ系を確立し、神経突起中のミトコンドリア数を分析した。このアッセイ系によって、神経体のミトコンドリアを除外して、神経突起中のミトコンドリアを効率的に評価することが可能となった。神経体から神経突起を分けるために、60日目の分化した神経細胞から

ニューロスフェアを作製し、ラミニンでコートした培養容器に播種し、3日間培養した。それに引き続いて、神経体の僅かな移動を伴って、ニューロスフェアから神経突起の伸長が起こった（図3b）。神経突起内で、Mitotrackerで染色したミトコンドリア数を、多機能分析装置によって分析した。それによつて、対照神経と比べて、CMT神経細胞では神経突起の染色された斑点数が減少していることが分かった（図3c、d）。また、ニューロスフェアのコアを除去した後に集めた、神経突起におけるATPレベルを評価した。対照神経細胞と比べて、CMT神経細胞ではATPレベルの低下が見られた（図3e）。これらの結果から、CMT神経細胞は神経突起中のミトコンドリアの機能不全を呈していることが示唆される。

[0066] 神経障害を起こすことが知られている薬剤による神経突起中のミトコンドリア凝集体形成

CMT患者は、抗癌剤の投与後、深刻な薬剤性の神経障害を起こす。抗癌剤ビンクリスチンがCMT神経細胞に及ぼす影響を調べた。ニューロスフェアに由来する神経突起を、 $1\mu M$ のビンクリスチンに曝し、ミトコンドリアを染色することでその影響を評価した。長時間ビンクリスチンに曝露した場合、CMT神経細胞と対照神経細胞の両方において、神経突起中のミトコンドリア凝集体が見られた。しかし、短時間の曝露においては、CMT神経細胞は対照神経細胞に比べて、その毒性に対する、より高い感受性を示した（図4a、b）。 $1\mu M$ のパクリタキセルも、対照神経細胞に比べて、CMT神経細胞においてミトコンドリア凝集体を増加させた（図5a、5b）。多機能分析システムによって、興味の対象を認識することができ、自動でそれらの大きさを分析することができる。そのシステムを凝集ミトコンドリアの評価にも用いた。

[0067] これらの結果は、遺伝子的な影響の受けやすさが、薬剤性の神経障害という形で、神経突起中のミトコンドリア異常を促進することを示唆している。そして、CMT患者と健常者間で、薬剤毒性に対する感受性の違いが見られることが、このアイデアを支持している。細胞の多数の表現型の中でも、神経突起内でみられたミトコンドリアの異常は、適切な細胞アッセイ系であり、ヒ

トiPS細胞を用いた医薬品の神経毒性を予測するための表現型を代表するものである。

- [0068] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。よって、本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。即ち、本発明は添付の「請求の範囲」の精神及び範囲に包含されるすべての変更を含むものである。
- [0069] ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれる。

産業上の利用可能性

- [0070] 本発明の評価方法は、CMT患者のiPS細胞由来神経細胞を用いた細胞アッセイを行い、神経突起中のミトコンドリアの異常を指標とすることにより、薬剤による神経毒性の臨床症状をよく反映する評価モデル系として有用である。

- [0071] (関連出願の表示)

本出願は、2017年5月9日付で日本国に出願された特願2017-93450を基礎としており、ここで言及することによりそれらの内容は全て本明細書に包含される。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（1）～（3）の工程を含む、化合物のヒトに対する神経毒性の評価方法。

（1）CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞と試験化合物とを接触させる工程

（2）当該神経細胞における、以下の（a）～（c）：

（a）神経突起中のミトコンドリアの状態

（b）神経突起中のATPレベル

（c）MFN2タンパク質レベル

からなる群より選択される1以上の表現型を検定する工程

（3）試験化合物と接触させなかった対照と比較して、（2）の表現型を増悪させた試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がある化合物として選択する工程

[請求項2] 工程（2）において検定される表現型が、（a）及び／又は（b）の表現型である、請求項1記載の方法。

[請求項3] 神経突起中のミトコンドリアの状態が、ミトコンドリア長、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアの凝集、ミトコンドリアの移動性、ミトコンドリア数から選択される、請求項1又は2記載の方法。

[請求項4] 神経細胞が、神経突起を伸長させた付着性ニューロスフェアである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[請求項5] CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞の代わりに、健常人のiPS細胞から分化誘導された対照神経細胞を用いて、（1）及び（2）の工程をさらに行い、該対照神経細胞に比べて、CMTのヒトiPS細胞から分化誘導された神経細胞において、（2）の表現型が増悪傾向を示した試験化合物を、ヒトに対して神経毒性を引き起こす可能性がより高い化合物として選択することを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

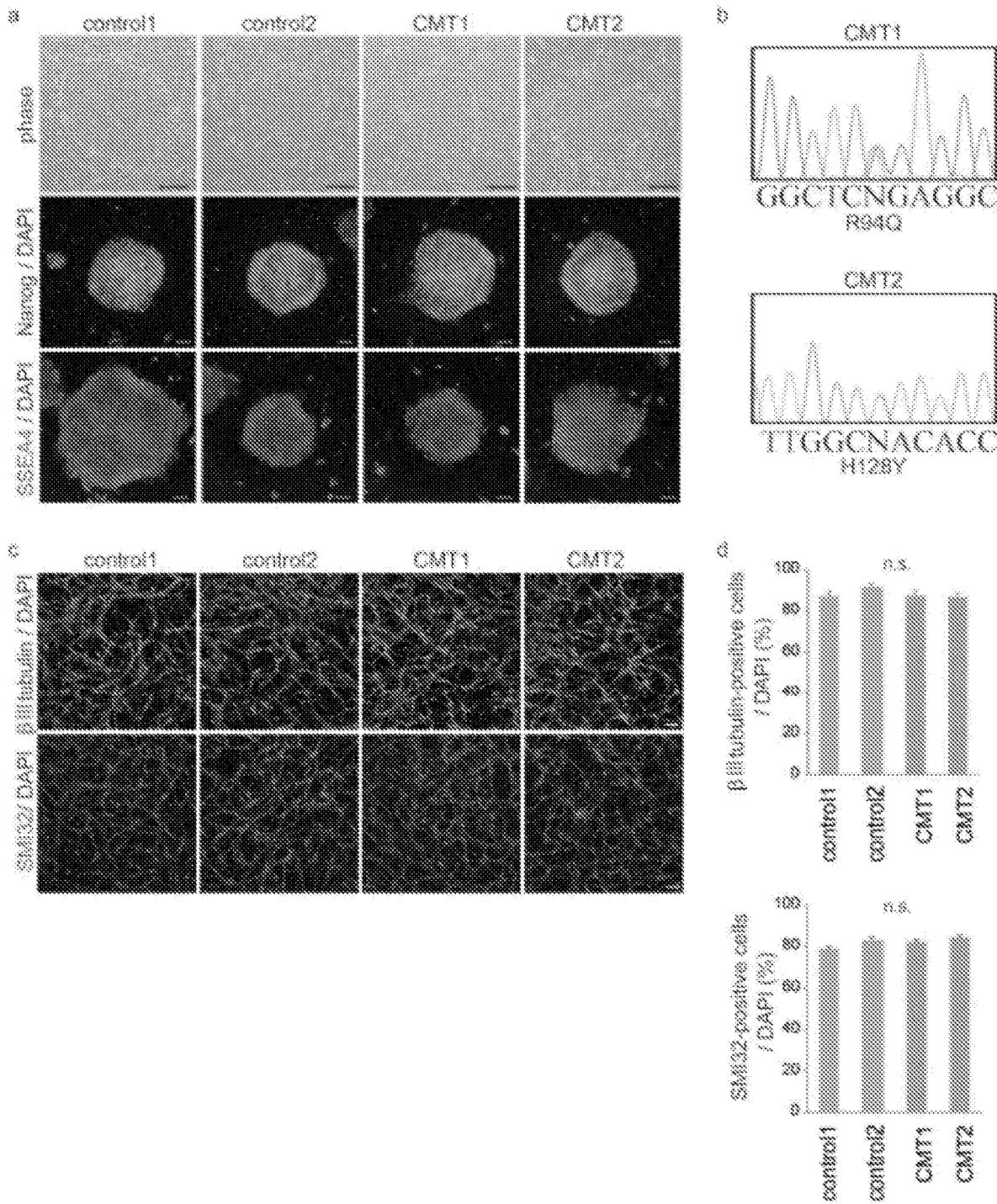
[請求項6] CMTがMFN2遺伝子に変異を有するものである、請求項1～5のいず

れか 1 項に記載の方法。

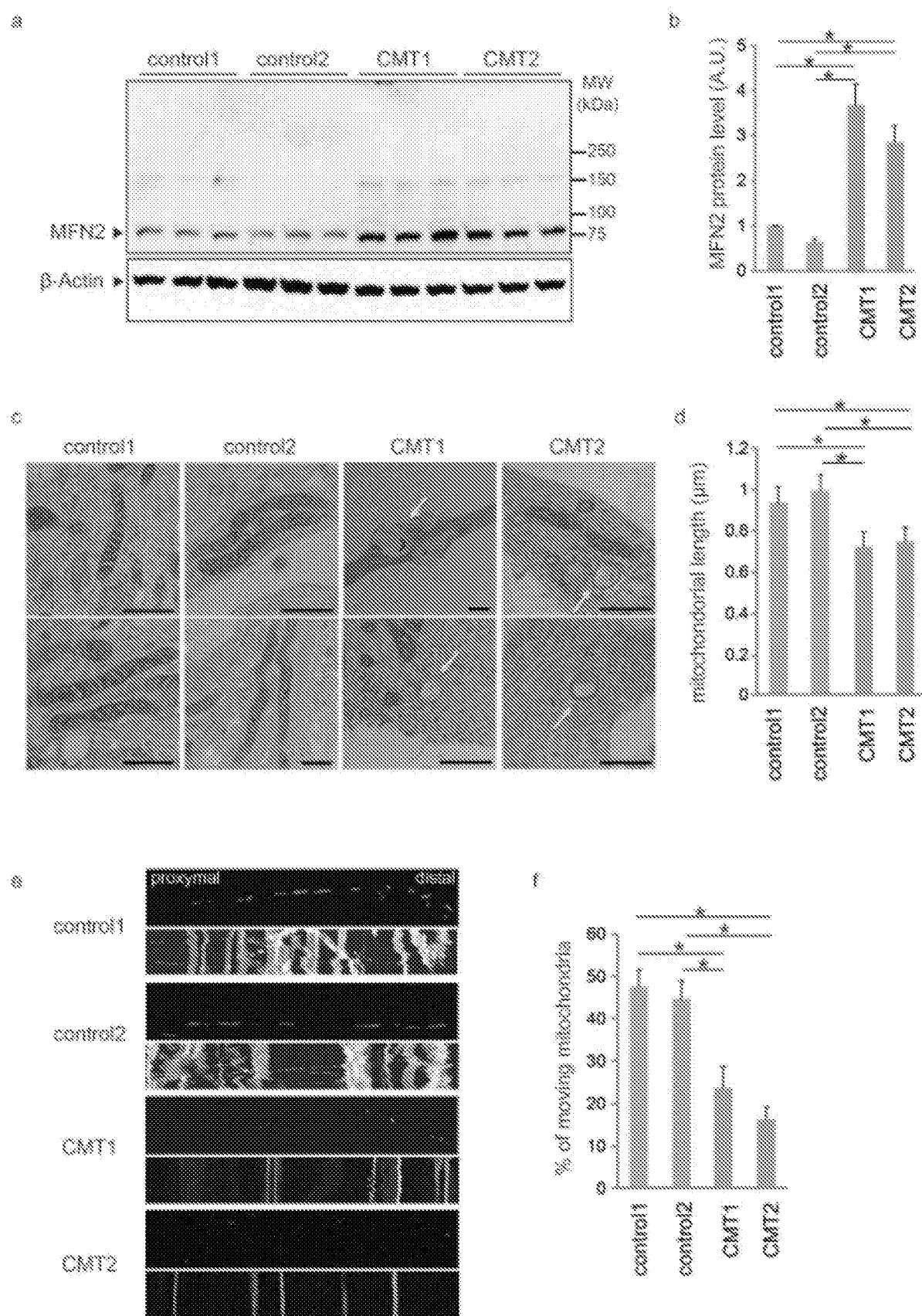
[請求項7] MFN2遺伝子の変異がH128Y又はR94Qである、請求項 6 記載の方法。

[請求項8] 神経毒性が軸索変性症である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載
の方法。

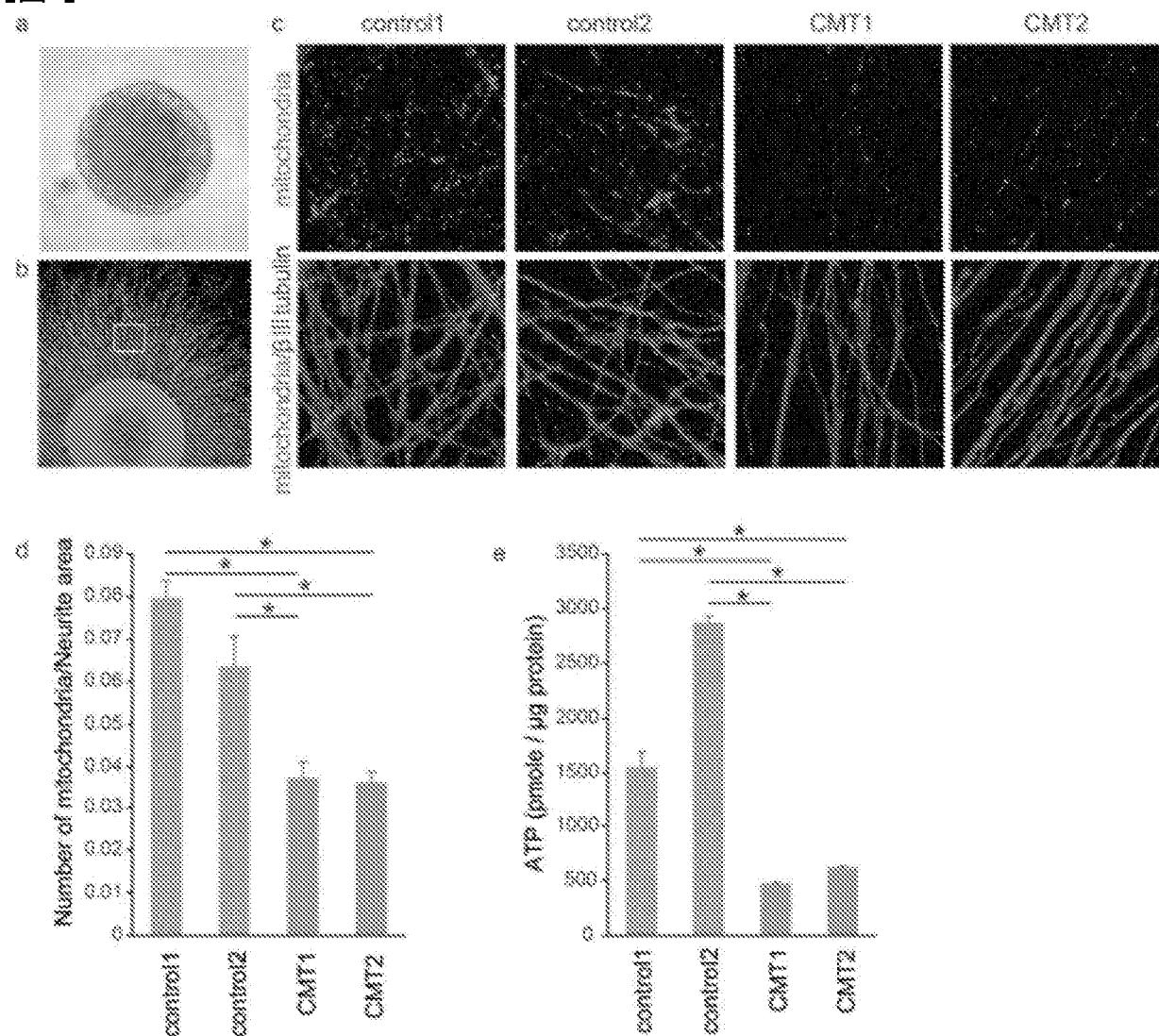
[図1]



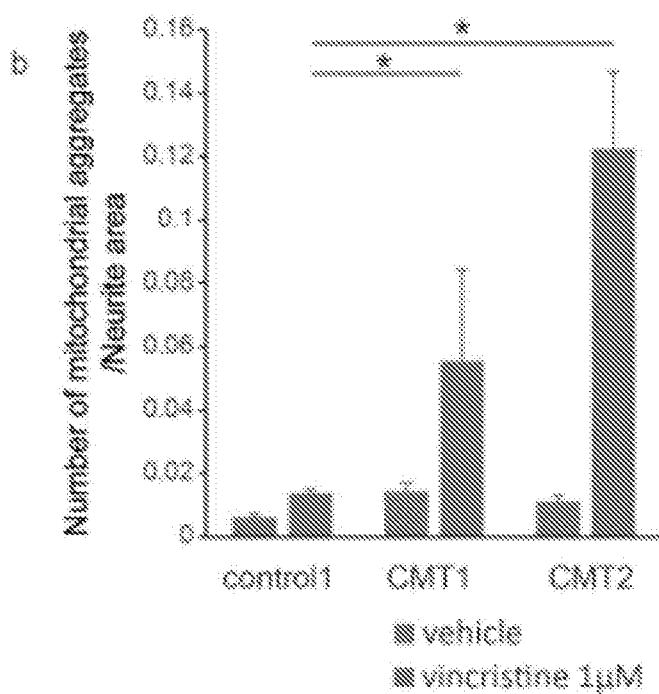
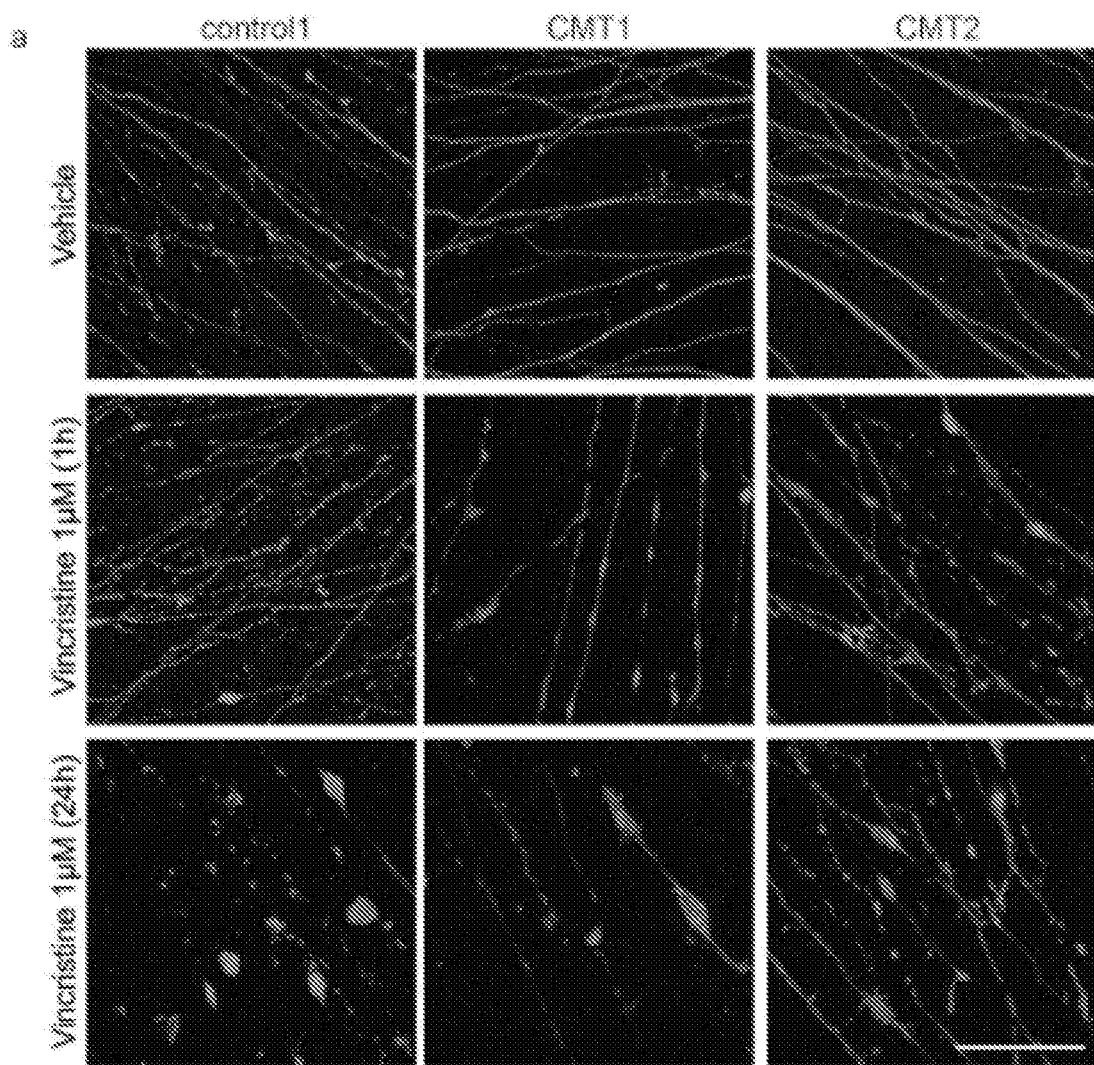
[図2]



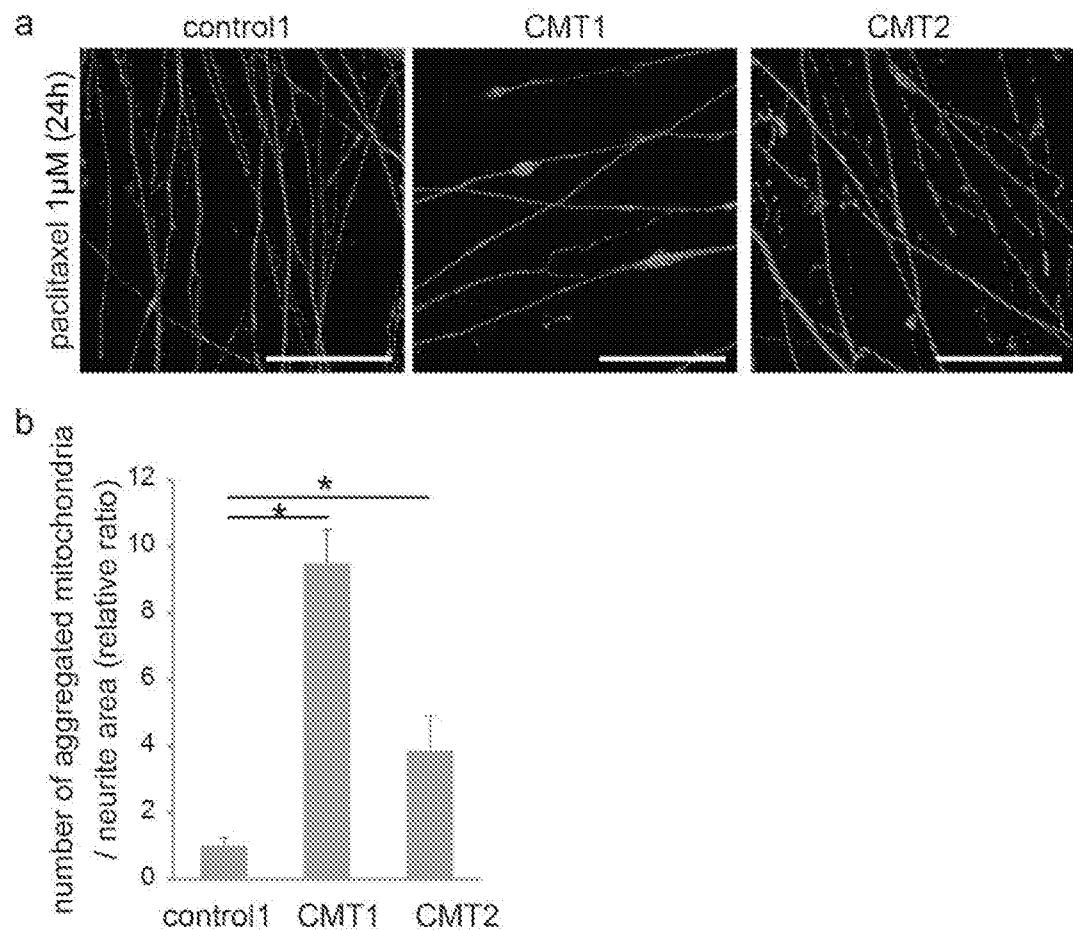
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/017828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/48 (2006.01) i, C12Q1/02 (2006.01) i, G01N33/15 (2006.01) i,
G01N33/50 (2006.01) i, G01N33/68 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) n

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)

Int.Cl. G01N33/48, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/68, C12N5/10

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 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	今村恵子, 薬剤副作用検出のためのiPS細胞を用いた神経系毒性評価モデルについて, 日本薬学会年会要旨集, March 2017, vol. 137th, p. ROMEUNNO.S15-3, non-official translation (IMAMURA, Keiko, "Regrading neurotoxicity test model for side effects of medicine using iPS cells", The pharmaceutical society of japan)	1-8
A	大原亮, 患者iPS細胞を用いたCharcot-Marie-Tooth病モデルの確立, 末梢神経, 01 December 2015, vol. 26, no. 2, p. 289, non-official translation (OHARA, Ryo, "Establishment of Charcot-Marie-Tooth disease model using patient's iPS cells", Peripheral Nerve)	1-8



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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 July 2018 (18.07.2018)

Date of mailing of the international search report
31 July 2018 (31.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/017828

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	今村恵子, iPS 細胞を用いた認知症モデルの可能性 : iPS 細胞モデルとマウスモデルについて, Dementia Japan, 15 October 2016, vol. 30, no. 4, p. 525, symposium 26, non-official translation (IMAMURA, Keiko, Potential of dementia model using iPS cells: Regrading iPS cell model and mouse model)	1-8
A	今村恵子, iPS 細胞を用いた認知症の解明と治療への応用, 最新医学, 10 November 2016, vol. 71, no. 11, pp. 2146-2149, future prospects, (IMAMURA, Keiko, "The Research of Dementia Using iPS Cells", The medical frontline)	1-8
A	井上治久, iPS 細胞を用いた既存薬再評価による神経変性疾患新規創薬標的の同定, 臨床薬理の進歩, 25 June 2015, no. 36, pp. 126-135, method, results, non-official translation (INOUE, Haruhisa, "Identification of drug-development target for neurodegenerative disease by reassessment of existing drugs using iPS cells", Recent advances in clinical pharmacology)	1-8
A	KASHYAP, Mahendra P., "Differentiating neurons derived from human umbilical cord blood stem cells work as a test system for developmental neurotoxicity", Mol Neurobiol, 2015, vol. 51, no. 2, pp. 791-807, published online: 24 May 2014	1-8
A	WILSON, Melinda S., "Multiparametric High Content Analysis for assessment of neurotoxicity in differentiated neuronal cell lines and human embryonic stem cell-derived neurons", Neurotoxicology, 2014, vol. 42, pp. 33-48, available online 03 April 2014	1-8
A	WO 2008/149807 A1 (KUMAMOTO UNIVERSITY) 11 December 2008, claim 7 & US 2012/0058491 A1 (claim 7) & EP 2169051 A1	1-8
A	JP 2017-501743 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 19 January 2017, claim 21 & WO 2015/069192 A1 (claim 21) & US 2016/0281062 A1 & EP 3068871 A1 & CN 106029872 A	1-8
A	WO 2011/133661 A2 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 27 October 2011, abstract & US 2013/0149717 A1	1-8
A	WO 2016/109813 A2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 07 July 2016, abstract & JP 2018-506963 A & US 2016/0186146 A1 & US 2016/0186146 A1 & EP 3240891 A2	1-8
A	US 2016/0271182 A1 (FOOD INDUSTRY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE) 22 September 2016, abstract & CN 105985933 A	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/017828

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0186137 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 30 June 2016, abstract (Family: none)	1-8
A	US 2015/0153325 A1 (MCNUTT, Patrick) 04 June 2015, abstract & WO 2013/170206 A1	1-8
A	JP 2017-29116 A (KYOTO UNIVERSITY) 09 February 2017, abstract & WO 2017/022854 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,
G01N33/68(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n

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））

Int.Cl. G01N33/48, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/68, C12N5/10

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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), CAplus/MEDLINE/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
A	今村恵子, 薬剤副作用検出のための iPS 細胞を用いた神経系毒性評価モデルについて, 日本薬学会年会要旨集, 2017.03, Vol. 137th, Page. ROMBUNNO. S15-3	1-8
A	大原亮, 患者 iPS 細胞を用いた Charcot-Marie-Tooth 病モデルの確立, 末梢神経, 2015.12.01, Vol. 26 No. 2, Page. 289	1-8

□ 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
- 「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矛盾するものではなく、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 18. 07. 2018	国際調査報告の発送日 31. 07. 2018
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 三木 隆 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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	今村恵子, iPS 細胞を用いた認知症モデルの可能性 : iPS 細胞モデルとマウスモデルについて, Dementia Japan, 2016. 10. 15, Vol. 30 No. 4, Page. 525 シンポジウム 26	1-8
A	今村恵子, iPS 細胞を用いた認知症の解明と治療への応用, 最新医学, 2016. 11. 10, Vol. 71 No. 11, Page. 2146-2149, 今後の展望	1-8
A	井上治久, iPS 細胞を用いた既存薬再評価による神経変性疾患新規創薬標的の同定, 臨床薬理の進歩, 2015. 06. 25, No. 36, Page. 126-135, 方法、結果	1-8
A	KASHYAP Mahendra P, Differentiating neurons derived from human umbilical cord blood stem cells work as a test system for developmental neurotoxicity, Mol Neurobiol, 2015, Vol. 51 No. 2, Page. 791-807, Published online: 24 May 2014	1-8
A	WILSON Melinda S, Multiparametric High Content Analysis for assessment of neurotoxicity in differentiated neuronal cell lines and human embryonic stem cell-derived neurons, Neurotoxicology, 2014, Vol. 42, Page. 33-48, Available online 3 April 2014	1-8
A	WO 2008/149807 A1 (国立大学法人 熊本大学) 2008. 12. 11, 請求項 7 & US 2012/0058491 A1(Claim7) & EP 2169051 A1	1-8
A	JP 2017-501743 A (エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ) 2017. 01. 19, 請求項 21 & WO 2015/069192 A1(Claim21) & US 2016/0281062 A1 & EP 3068871 A1 & CN 106029872 A	1-8
A	WO 2011/133661 A2 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 2011. 10. 27, ABSTRACT & US 2013/0149717 A1	1-8
A	WO 2016/109813 A2 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 2016. 07. 07, ABSTRACT & JP 2018-506963 A & US 2016/0186146 A1 & US 2016/0186146 A1 & EP 3240891 A2	1-8
A	US 2016/0271182 A1 (FOOD INDUSTRY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE) 2016. 09. 22, ABSTRACT & CN 105985933 A	1-8

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求項の番号
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	
A	US 2016/0186137 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 2016. 06. 30, ABSTRACT (ファミリーなし)	1-8
A	US 2015/0153325 A1 (MCNUTT Patrick) 2015. 06. 04, ABSTRACT & WO 2013/170206 A1	1-8
A	JP 2017-29116 A (国立大学法人京都大学) 2017. 02. 09, 要約 & WO 2017/022854 A1	1-8