

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6335117号
(P6335117)

(45) 発行日 平成30年5月30日(2018.5.30)

(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)

| (51) Int.Cl. | | F I | |
|----------------|--------------|------------------|-----------------------|
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| C 1 2 Q | 1/34 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/34 |
| G O 1 N | 33/15 | (2006.01) | G O 1 N 33/15 Z |
| G O 1 N | 33/50 | (2006.01) | G O 1 N 33/50 Z |
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) | C 1 2 N 5/10 |

請求項の数 16 (全 33 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|---|-----------|-----------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2014-506090 (P2014-506090) | (73) 特許権者 | 504132272 |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年2月20日 (2013.2.20) | | 国立大学法人京都大学 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2013/054199 | | 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 |
| (87) 国際公開番号 | W02013/140927 | (74) 代理人 | 100100549 |
| (87) 国際公開日 | 平成25年9月26日 (2013.9.26) | | 弁理士 川口 嘉之 |
| 審査請求日 | 平成28年2月19日 (2016.2.19) | (74) 代理人 | 100126505 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2012-64094 (P2012-64094) | | 弁理士 佐貫 伸一 |
| (32) 優先日 | 平成24年3月21日 (2012.3.21) | (74) 代理人 | 100131392 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | 弁理士 丹羽 武司 |
| | (出願人による申告)平成21年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願 | (72) 発明者 | 井上 治久 |
| | | | 日本国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 |
| | | (72) 発明者 | 高橋 良輔 |
| | | | 日本国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 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) 下記工程(1)～(4)によってアルツハイマー病患者の体細胞から作製された人工多能性幹(iPS)細胞からアストロサイトを調製する工程、

(1) アルツハイマー病患者の体細胞から作製されたiPS細胞から神経前駆細胞を製造する工程、

(2) 工程(1)で得られた神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養する工程、

(3) 工程(2)で得られた細胞を解離させる工程、および

(4) 工程(3)で得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いて神経栄養因子を含有する培養液中で接着培養する工程、

(b) 候補物質を、前記工程(a)で得られたアストロサイトと接触させる工程、

(c) 前記アストロサイト内のA オリゴマーの量を測定する工程、および

(d) 前記A オリゴマーの量が候補物質と接触させなかった場合と比較して減少した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程、を含む、方法。

【請求項2】

前記工程(a)はさらに、下記工程(5)および(6)を含む、請求項1に記載の方法

。 (5) (4) の工程で得られた細胞を解離させる工程、および (6) (5) の工程で得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いてグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF) およびニューロトロフィン-3 (NT-3) を含有しない培養液中で接着培養する工程。

【請求項 3】

前記アストロサイトが、A オリゴマーを蓄積するアストロサイトである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アルツハイマー病患者の体細胞が、APP の 693 のグルタミン酸の欠損変異を有する体細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) 下記工程 (1) ~ (4) によってアルツハイマー病患者の体細胞から作製された人工多能性幹 (iPS) 細胞からアストロサイトを調製する工程、

(1) アルツハイマー病患者の体細胞から作製された iPS 細胞から神経前駆細胞を製造する工程、

(2) 工程 (1) で得られた神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養する工程、

(3) 工程 (2) で得られた細胞を解離させる工程、および

(4) 工程 (3) で得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いて神経栄養因子を含有する培養液中で接着培養する工程、

(b) 候補物質を、前記工程 (a) で得られたアストロサイトと接触させる工程、

(c) 前記アストロサイト内の ER ストレス量、カスパーゼ 4 活性、Transgelin 量 および酸化ストレス量から成る群から選択される少なくとも一つの指標を測定する工程、および

(d) 前記量又は活性が候補物質と接触させなかった場合と比較して減少した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程、を含む、方法。

【請求項 6】

前記工程 (a) はさらに、下記工程 (5) および (6) を含む、請求項 5 に記載の方法

。 (5) (4) の工程で得られた細胞を解離させる工程、および

(6) (5) の工程で得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いて GDNF、BDNF および NT-3 を含有しない培養液中で接着培養する工程。

【請求項 7】

前記 ER ストレス量の測定が、ER ストレスマーカー量の測定により行われる、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 ER ストレスマーカーが、免疫グロブリン結合タンパク質 (BiP) である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記カスパーゼ 4 の活性の測定が、切断カスパーゼ 4 の量を測定することにより行われる、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記酸化ストレス量の測定が、PRDX4 または活性酸素種の量を測定することにより行われる、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アストロサイトが、A オリゴマーを蓄積するアストロサイトである、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記アルツハイマー病患者の体細胞が、APPの693のグルタミン酸の欠損変異を有する体細胞である、請求項5～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) 下記工程(1)～(4)によってアルツハイマー病患者の体細胞から作製された人工多能性幹(iPS)細胞からアストロサイトを調製する工程、

(1) アルツハイマー病患者の体細胞から作製されたiPS細胞から神経前駆細胞を製造する工程、

(2) 工程(1)で得られた神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養する工程、

(3) 工程(2)で得られた細胞を解離させる工程、および

(4) 工程(3)で得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いて神経栄養因子を含有する培養液中で接着培養する工程、

(b) 前記工程(a)で得られたアストロサイトを、神経栄養因子を含まない培養液中で候補物質と接触させる工程、

(c) 前記アストロサイトの生細胞数またはその代替値を測定する工程、および

(d) 前記生細胞数またはその代替値が候補物質と接触させなかった場合と比較して増加した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程、を含む、方法。

【請求項14】

前記工程(a)はさらに、下記工程(5)および(6)を含む、請求項13に記載の方法。

(5) (4)の工程で得られた細胞を解離させる工程、および

(6) (5)の工程で得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いてGDNF、BDNFおよびNT-3を含有しない培養液中で接着培養する工程。

【請求項15】

前記アストロサイトが、Aオリゴマーを蓄積するアストロサイトである、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記アルツハイマー病患者の体細胞が、APPの693のグルタミン酸の欠損変異を有する体細胞である、請求項13～15のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法およびそのためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病は、アミロイドタンパク質(A)が脳内に沈着するタンパク質ミスフォールディング病の一種であり、A沈着による細胞毒性により引き起こされる神経変性疾患として知られている(非特許文献1)。アルツハイマー病は、可能な限り早期に治療を開始することが効果的な治療に繋がることから、早期診断法の開発が高齢化社会における重要な課題となっている。

【0003】

現在、アルツハイマー病の臨床診断基準としてNINCDS-ADRDA、DSM-IVが用いられている。この規準では、認知症の陽性を診断することには優れているものの、発病初期の段階では陰性と診断される可能性は否定できず、確定診断には至らない。ましてや、発症前に診断を下すことも不可能である。また、アルツハイマー病はAの蓄積が発症の原因となることが明らかにされていることから、従来のアルツハイマー病の診断は、脳脊髄液中のA

10

20

30

40

50

42/A 40比の減少とリン酸化タウタンパク質(p-tau)の上昇、さらにこれらを組み合わせたp-tau/(A 42/A 40)を指標として行われてきた。しかしながら、これらの診断指標においては、その値が上昇している時期には神経細胞死がすでに進行していることが多い。したがって、これらの指標を用いた場合においても早期診断や発病予測を行うことは極めて困難な状況である。現時点では、アルツハイマー病の治療薬については、アリセプトなどのいくつかの薬剤が存在するものの、いずれも病状の進行を遅らせる効果を有するのみであるため、早期診断方法や根本的な治療薬の開発が求められていた。

【0004】

一方、再生医療の分野等では、生体材料として利便性のある細胞から所望の細胞型へ転換する技術が望まれており、最近においては、マウスおよびヒトの人工多能性幹細胞(iPS細胞)が相次いで樹立された。Yamanakaらは、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にOct3/4, Sox 2, Klf4及びc-Mycの4遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した(特許文献1および非特許文献2)。このようにして得られるiPS細胞は、治療対象となる患者由来の細胞を用いて作製された後、各組織の細胞へと分化させることができるため、in vitroで病態を再現することが可能と考えられている。実際、上記の方法で、プレセニリンに変異を有する家族性アルツハイマー病患者由来のiPS細胞が作製され、神経細胞への分化誘導に成功し、この神経細胞からのA₄₂の細胞外分泌が亢進していることが報告されている(非特許文献3)。

【0005】

一方、免疫応答を利用して細胞外A₄₂を取り除く臨床研究が実施され、細胞外A₄₂は減少したが、臨床症状の改善は見られなかったとの結果が得られている(非特許文献4)。本結果には様々な議論があるが、いずれの診断指標が治療効果を示す薬剤のスクリーニングに有用であるかは不明である。

【0006】

近年、アミロイド前駆体タンパク質(APP)内に変異(E693)を有する家族性アルツハイマー病が日本で報告されているが、アミロイド親和性化合物をプローブとして用いた陽電子放射型断層撮影法(PET)では患者脳内のA₄₂沈着が確認されていない(非特許文献5)。このことから、老人斑形成のようなA₄₂の沈着がアルツハイマー病の発症を引き起こすか否かについては疑問の余地が残る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO 2007/069666

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Bucciantini M, et al., Nature. 416:507-511 (2002)

【非特許文献2】Takahashi, K, et al., Cell. 131:861-872 (2007)

【非特許文献3】Yagi, T, et al., Hum Mol Genet. 20:4530-4539 (2011)

【非特許文献4】Holmes, C, et al., Lancet 372:16-223 (2008)

【非特許文献5】Tomiya, T, et al., Ann. Neurol. 63, 377-387 (2008)

【発明の概要】

【0009】

本発明の課題は、アルツハイマー病の治療薬または予防薬をスクリーニングする新規の方法およびそのためのキットを提供することにある。

【0010】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞またはアストロサイトにおいて、アルツハイマー病の病態を再現することに成功した。すなわち、分化誘導された神経細胞またはアストロサイトでは、細胞内におけるA₄₂オリゴマーの蓄積、ERストレス量および活性酸素種の産生などの酸化ストレスの増加などの所見が見出された。さらに、既存のアルツ

10

20

30

40

50

ハイマー病の治療薬または予防薬とされている薬剤を添加することでこれらの指標が減少することを見出し本発明の完成に至った。

【0011】

すなわち、本発明は：

[1] アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) 候補物質を、アルツハイマー病患者の体細胞から作製された人工多能性幹(iPS)細胞または693のグルタミン酸の欠損変異APPを導入したiPS細胞由来の神経細胞もしくはアストロサイトと接触させる工程、

(b) 前記神経細胞内またはアストロサイト内のAオリゴマーの量を測定する工程、および

(c) 前記Aオリゴマーの量が候補物質と接触させなかった場合と比較して減少した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程、を含む、方法。

[2]

前記神経細胞またはアストロサイトが、Aオリゴマーを蓄積する細胞である、[1]に記載の方法。

[3] 前記アルツハイマー病患者の体細胞が、APPの693のグルタミン酸の欠損変異を有する体細胞である、[1]または[2]に記載の方法。

[4] アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) 候補物質を、アルツハイマー病患者の体細胞から作製されたiPS細胞または693のグルタミン酸の欠損変異APPを導入したiPS細胞由来の神経細胞またはアストロサイトと接触させる工程、

(b) 前記神経細胞内またはアストロサイト内のERストレス量、カスパーゼ4活性、Transgelin量および酸化ストレス量から成る群から選択される少なくとも一つの指標を測定する工程、および

(c) 前記量または活性が候補物質と接触させなかった場合と比較して減少した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程、を含む、方法。

[5] 前記ERストレス量の測定が、ERストレスマーカー量の測定により行われる、[4]に記載の方法。

[6] 前記ERストレスマーカーが、免疫グロブリン結合タンパク質(BiP)である、[5]に記載の方法。

[7] 前記カスパーゼ4活性の測定が、切断カスパーゼ4の量を測定することにより行われる、[4]に記載の方法。

[8] 前記酸化ストレス量の測定が、PRDX4または活性酸素種の量を測定することにより行われる、[4]に記載の方法。

[9] 前記神経細胞またはアストロサイトが、Aオリゴマーを蓄積する細胞である、[4]に記載の方法。

[10] 前記アルツハイマー病患者の体細胞が、APPの693のグルタミン酸の欠損変異を有する体細胞である、[4]~[9]のいずれかに記載の方法。

[11] アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) 候補物質を、アルツハイマー病患者の体細胞から作製された人工多能性幹(iPS)細胞または693のグルタミン酸の欠損変異APPを導入したiPS細胞由来の神経細胞と接触させる工程、

(b) 前記神経細胞の生細胞数またはその代替値を測定する工程、および

(c) 前記生細胞数またはその代替値が候補物質と接触させなかった場合と比較して増加した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程。

10

20

30

40

50

[1 2] 前記iPS細胞由来の神経細胞が、A オリゴマーを蓄積する細胞である、[1 1]に記載の方法。

[1 3] 前記アルツハイマー病患者の体細胞が、APPの693のグルタミン酸の欠損変異を有する体細胞である、[1 1]または[1 2]に記載の方法。

[1 4] 変異型APPを有するiPS細胞由来の神経細胞および/またはアストロサイトを含む、アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングするためのキット。

[1 5] A オリゴマー、BiP、切断カスパーゼ4、Transgelin、PRDX4および活性酸素種からなる群から選択される少なくとも一つの指標を測定するための試薬さらに含む、[1 4]に記載のキット。

[1 6] 前記APPの変異が、693番目のグルタミン酸の欠損変異である、[1 4]または[1 5]に記載のキット。

を提供するものである。

【 0 0 1 2 】

本発明により、新規のツールを用いたアルツハイマー病の治療薬および/または予防薬のスクリーニングが可能となる。したがって、本発明は、アルツハイマー病の早期治療または予防のために極めて有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 図1は、作製された対照 (control) およびAD(E693)-iPSCsの評価および大脳皮質ニューロンへの分化誘導の結果を示す。(A)アルツハイマー病患者 (E693) の体細胞から樹立されたiPS細胞の形態(位相画像)、ならびに多能性幹細胞マーカーであるNANOG (緑色) およびTRA1-60 (赤色) の発現を示す写真。(B)対照iPS細胞 (Control) とアルツハイマー病(AD(E693))患者の体細胞から樹立されたiPS細胞のゲノムDNA配列の比較を示す。アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞においては、E693がホモ接合型で欠損している (E693) 。(C)樹立されたiPS細胞のin vivoにおける三胚葉への分化 (テラトーマ) を示す写真。中胚葉は軟骨を示し、内胚葉は腸管様上皮を示し、外胚葉は神経管様組織を示す。(D)樹立されたiPS細胞のin vitroにおける三胚葉への分化を示す写真。平滑筋アクチンは中胚葉を示し、SOX17は内胚葉を示し、Tuj1は外胚葉を示す。(E)樹立された各iPS細胞のin vitroにおける大脳皮質ニューロンへの分化を示す写真。神経細胞マーカー (Tuj1) は緑色を示し、大脳皮質転写マーカー (CTIP2、SATB2またはTBR1) は赤色を示す。(F) 対照 (control) およびAD(E693)-iPSCsから分化誘導された大脳皮質ニューロンにおける神経細胞マーカーと大脳皮質転写マーカーのmRNA相対的発現量を示す。発現レベルは、iPS細胞の発現レベルで標準化されている。

【 図 2 】 図 2 は、作製されたAD(V717L)-iPSCsおよび孤発性アルツハイマー病 (AD(sporadic))-iPSCsの評価および神経細胞への分化誘導の結果を示す。(A)アルツハイマー病患者 (V717Lおよび孤発性) の体細胞から樹立されたiPS細胞の形態(位相画像)、ならびに多能性幹細胞マーカーであるNANOG (緑色) およびTRA1-60 (赤色) の発現を示す写真。(B)対照iPS細胞 (Control) とアルツハイマー病(AD(V717L))患者の体細胞から樹立されたiPS細胞のゲノムDNA配列の比較を示す。アルツハイマー病患者 (AD(V717L)) の体細胞由来のiPS細胞においては、APPのV717がヘテロの変異を起こしている (V717L) 。(C) 対照 (control) 、AD(E693)、AD(V717L)および孤発性 (sporadic) のiPSCsから分化誘導された大脳皮質ニューロンにおける神経細胞マーカー (Tuj1) と大脳皮質転写マーカー (TBR1およびSATB2) のタンパク質の相対的発現量を示す。グラフは、核 (DAPI) の数に対する各マーカーの陽性細胞数の比で表す。

【 図 3 】 図 3 は、対照 (control) 、AD(E693)、AD(V717L)および孤発性 (sporadic) のiPSCsから分化誘導された神経細胞またはアストロサイトからの各A の細胞外分泌量を示す。(A)神経細胞のA₄₀およびA₄₂の細胞外分泌量ならびにA₄₂/A₄₀の比を表す。各細胞はBSI添加 (+) および非添加 (-) 条件での結果を示す。データは mean ± S.D. (n = 3) で示し、*は、p < 0.006 (A₄₀およびA₄₂) またはp < 0.001 (A₄₂/ A₄₀) での他のアストロサイトに対して統計学的な有意差を示す。(B)アストロサイトのA₄₀およ

10

20

30

40

50

びA₄₂の細胞外分泌量ならびにA₄₂/A₄₀の比を表す。データは mean ± S.D. (n = 3) で示し、*は、p < 0.006 (A₄₀およびA₄₂) またはp < 0.001 (A₄₂/A₄₀) での他のアストロサイトに対して統計学的な有意差を示す。

【図4】図4は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞(AD(E693))から分化誘導された神経細胞におけるAオリゴマーの蓄積を示す。(A) iPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照またはAD(E693))におけるAオリゴマーの局在を示す写真。iPS細胞から分化誘導された神経細胞(MAP2陽性細胞)は赤色を示し、Aオリゴマー特異的抗体であるNU-1モノクローナル抗体で検出されたAオリゴマーは緑色を示す。Aオリゴマーの蓄積は、AD患者(AD(E693))由来の神経細胞において多いが、対照の神経細胞においてはわずかである。また、 β -セクレターゼ阻害剤(BSI)は、AD患者由来の神経細胞(AD(E693))におけるAオリゴマーの蓄積を減少させる。(B) MAP2陽性領域内におけるNU-1陽性領域(%)として定量化されたAオリゴマーの蓄積を示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。(C) NU-1抗体を用いたドットプロット解析の像を示す写真。(D) 得られた像を定量化したグラフを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。BSIは、AD患者由来(AD(E693))の神経細胞におけるAオリゴマーを減少させる。*は、p < 0.05での統計学的な有意を示す。

【図5】図5は、Aオリゴマーの蓄積量を示す。(A) BSIの添加条件(+)および非添加条件(-)でのiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照(control)、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))におけるAオリゴマーの蓄積量のグラフを示す。蓄積量は、NU1抗体を用いたドットプロット解析結果を定量化して得られた。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。*は、他の神経細胞に対してp < 0.005での統計的な有意差を有することを示し、#は、BSI非添加の対応する神経細胞に対してp < 0.005での統計的な有意差を有することを示す。(B) BSIの添加条件(+)および非添加条件(-)でのiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))におけるAオリゴマーの蓄積量のグラフを示す。蓄積量は、11A1抗体を用いたドットプロット解析結果を定量化して得られた。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。*は、他の神経細胞に対してp < 0.005での統計的な有意差を有することを示す。(C) iPS細胞から分化誘導されたアストロサイト(対照、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))におけるAオリゴマーの蓄積量のグラフを示す。蓄積量は、NU1抗体を用いたドットプロット解析結果を定量化して得られた。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。*は、他のアストロサイトに対してp < 0.001での統計的な有意差を有することを示す。(D) 野生型APPをレンチウイルスで発現させた神経細胞およびAPP-E693をレンチウイルスで発現させた神経細胞におけるAオリゴマーの局在を示す写真。iPS細胞から分化誘導された神経細胞(MAP2陽性細胞)は赤色を示し、Aオリゴマー特異的抗体であるNU-1抗体で検出されたAオリゴマーは緑色を示す。

【図6】図6は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞(AD(E693))におけるAオリゴマーの蓄積およびERストレス応答を示す。(A) 細胞内小器官(赤色)におけるAオリゴマー(緑色)の局在を示す写真。BiPはERを示し、EEA1は初期エンドソームを示し、LAMP2は後期エンドソーム/リソソームを示す。Aオリゴマーは、NU-1モノクローナル抗体により検出されたものを示す。(B) BSIの存在下および非存在下でのiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照およびAD(E693))におけるERストレスマーカー(BiPおよび活性型カスパーゼ4)のウエスタンプロット解析の結果を示す写真。(C) BiPの定量化データを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。(D) 活性型(切断型)カスパーゼ4の定量化データを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、p < 0.05および**は、p < 0.01 (Tukey検定)を意味する。

【図7】図7は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞(AD(E693))における他のマーカーの解析結果を示す。(A) Transgelinのウエスタンプロット解析の結果を示す写真。(B) 遺伝子オンロジー解析における過酸化活性関連遺伝子の対照に対するADの発現量を示す。(C) BSIの存在下および非存在下でのiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照およびAD(E693))におけるperoxiredoxin-4のウエス

10

20

30

40

50

タンブロット解析の結果を示す写真。(D) peroxiredoxin-4の定量化データを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、 $p < 0.05$ および**は、 $p < 0.01$ (Tukey検定)を意味する。(E) 活性酸素種(reactive oxygen species, ROS) (緑色)とHoechst33342 (青色)の染色像の典型例を示す写真。(F) DAPI観測数に対するROS陽性領域値として定量化した結果のグラフを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、 $p < 0.05$ および**は、 $p < 0.01$ (Tukey検定)を意味する。

【図8】図8は、BSIの存在下および非存在下でのアルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))におけるERストレスマーカー遺伝子(BiPおよび活性型カスパーゼ4)および酸化ストレスマーカー遺伝子(peroxiredoxin-4)のウエスタンブロット解析の結果を示す写真。BiPおよびPeroxi-redoxin-4では、BSI非存在下のAD(E693)-1、AD(E693)-2、AD(E693)-3およびAD(sporadic)-2において有意に発現が高いことが確認された(** $p < 0.005$)。活性型カスパーゼ4では、BSI非存在下のAD(E693)-1、AD(E693)-2、AD(E693)-3において有意に発現が高いことが確認された(** $p < 0.005$)。

【図9】図9は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導されたアストロサイト(対照、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))におけるERストレスマーカー遺伝子(BiPおよび活性型カスパーゼ4)および酸化ストレスマーカー遺伝子(peroxiredoxin-4)のウエスタンブロット解析の結果を示す写真。BiPおよびPeroxi-redoxin-4では、BSI非存在下のAD(E693)-1、AD(E693)-2、AD(E693)-3およびAD(sporadic)-2において有意に発現が高いことが確認された。活性型カスパーゼ4では、BSI非存在下のAD(E693)-1、AD(E693)-2、AD(E693)-3において有意に発現が高いことが確認された。

【図10】図10は、BSIの存在下および非存在下でのアルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))における活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の量を測定した結果を示す。(A)各神経細胞(対照、AD(E693)およびAD(sporadic))における3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF)による染色(緑色)、CellROXによる染色(赤色)ならびにDAPIの染色(青色)の典型例を示す写真。(B) HPFにより検出したROS陽性領域値をDAPI観測数に対して定量化した結果のグラフを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中**は、 $p < 0.001$ を意味する。(C) CellROXにより検出したROS陽性領域値をDAPI観測数に対して定量化した結果のグラフを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中**は、 $p < 0.001$ を意味する。

【図11】図11は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導されたアストロサイト(対照、AD(E693)、AD(V717L)およびAD(sporadic))における活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の量を測定した結果を示す。(A)各アストロサイト(対照、AD(E693)およびAD(sporadic))におけるCellROXによる染色(白色)およびDAPIの染色(青色)の典型例を示す写真。(B) CellROXにより検出したROS陽性領域値を定量化した結果のグラフを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。

【図12】図12は、Docosahexaenoic acid (DHA)によるAオリゴマーによるERストレスの軽減を観察したデータを示す。(A)各濃度(1 μ M、5 μ Mまたは15 μ M)のDHAまたは溶媒としてのDMSOを培地中へ添加した後の各iPS細胞由来の神経細胞(対照およびAD(E693))のライセートにおけるBiP、活性型カスパーゼ4およびperoxiredoxin-4のウエスタンブロット解析の結果を示す写真。(B)BiPのウエスタンブロット解析の結果をデンシドメトリーを用いて定量化したデータを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、 $p < 0.05$ および**は、 $p < 0.01$ (Tukey検定)を意味する。(C)活性型カスパーゼ4のウエスタンブロット解析の結果をデンシドメトリーを用いて定量化したデータを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中**は、 $p < 0.01$ (Tukey検定)を意味する。(D) peroxiredoxin-4のウエスタンブロット解析の結果をデンシドメトリーを用いて定量化したデータを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、 $p < 0.05$ および**は、 $p < 0.01$ (Tukey検定)を意味する。(E) DHA添加後のreactive oxygen species (ROS) (緑色)とHoechst33342 (青色)の染色像の典型例を示す写真。(F) DAPI観測数に対するROS陽性領域

10

20

30

40

50

値として定量化した結果のグラフを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、p<0.05および**は、p<0.01 (Tukey検定)を意味する。

【図13】図13は、アルツハイマー病患者のiPS細胞から分化誘導された神経細胞へDHAを添加した結果を示す。(A) 5µMまたは15µMのDHAもしくは溶媒としてのDMSOを培地中へ添加した後の各iPS細胞由来の神経細胞(対照およびAD(sporadic)-2)のライセートにおけるBiP、活性型カスパーゼ4およびperoxiredoxin-4のウエスタンブロット解析の結果を示す写真。(B)ウエスタンブロット解析の結果をデンシトメトリーを用いて定量化したデータを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、p<0.005を意味する。(C)AオリゴマーをNU1抗体を用いてドットブロット解析した結果をデンシトメトリーを用いて定量化したデータを示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。

10

【図14】図14は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞(対照、AD(E693)およびAD(sporadic))の細胞生存率を示す。(A) DHAの存在下および非存在下でのcontrolおよびAD神経細胞の細胞生存率を示す。シナプシンIプロモーターで誘導されたEGFPが陽性である細胞数から算出した。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、p<0.001を意味する。(B)各神経細胞(対照、AD(E693)およびAD(sporadic))におけるシナプシンIプロモーターで誘導されたEGFP(緑色)を有する神経細胞に対する蛍光像の典型例を示す写真。(C) DHA処理16日後の各神経細胞(対照、AD(E693)およびAD(sporadic))におけるLDH活性量を示す。データは、平均±SDを示す(n = 3/群)。図中*は、p<0.05を意味する。

【発明を実施するための形態】

20

【0014】

本発明は、候補物質を、アルツハイマー病患者の体細胞から作製された人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来の神経細胞またはアストロサイトと接触させる工程を含む、アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬をスクリーニングする方法、ならびに、キットを提供する。

【0015】

iPS細胞の製造方法

本発明において、iPS細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することまたは薬剤によって当該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現を上昇させ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、M. Nakagawa et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 101-106、国際公開WO 2007/069666および国際公開WO 2010/068955)。核初期化物質は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子もしくはその遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, Esrrb, EsrrgまたはGlis1が例示される。これらの初期化物質は、iPS細胞樹立の際には、組み合わせられて使用されてもよい。例えば、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。

30

40

【0016】

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNAのヌクレオチド配列並びに当該cDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照すること、またL-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、EsrrgおよびGlis1のマウスおよびヒトのcDNA配列およびアミノ酸配列情報については、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。当業者は、当該cDNA配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

遺伝子名 マウス ヒト

50

| | | |
|--------|--------------|--------------|
| L-Myc | NM_008506 | NM_001033081 |
| Lin28 | NM_145833 | NM_024674 |
| Lin28b | NM_001031772 | NM_001004317 |
| Esrrb | NM_011934 | NM_004452 |
| Esrrg | NM_011935 | NM_001438 |
| Glis1 | NM_147221 | NM_147193 |

【 0 0 1 7 】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、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し、あるいは、DNAの形態で、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（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009）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に、プロモーター、エンハンサー、リポソーム結合配列、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。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1プロモーター、CAGプロモーター、SRプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SRプロモーターなどが挙げられる。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）、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、核初期化物質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核初期化物質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。別の好ましい実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる（Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771-775, Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766-770, WO 2010/012077）。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソーム的存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス（lymphotropic herpes virus）、BKウイルスおよび牛乳頭腫（Bovine papillomavirus）の起点とその複製に係る配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1およびoriPもしくはLarge TおよびSV40ori配列を含むことが挙げられる（WO 2009/115295、WO 2009/157201およびWO 2009/149233）。また、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、IRESまたは口蹄病ウイルス（FMDV）2Aコード領域により結合されていてもよい（Science, 322:949-953, 2008およびWO 2009/092042 2009/152529）。

【 0 0 1 8 】

核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤[例えば、バルプロ酸（VPA）（Nat. Biotechnol.,

10

20

30

40

50

26(7): 795-797 (2008))、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]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば5'-azacytidine)(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤[例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNA AおよびshRNA(例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等)等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist(例えばBayk8644)(Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤(例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling activator(例えばsoluble Wnt3a)(Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIFまたはbFGFなどの増殖因子、ALK5阻害剤(例えば、SB431542)(Nat. Methods, 6: 805-8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signalling阻害剤、glycogen synthase kinase-3阻害剤(PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA(R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27: 459-461 (2009))、等を使用することができる。

10

【0019】

薬剤によって核初期化物質の内在性のタンパク質の発現を上昇させる方法における薬剤としては、6-bromoindirubin-3'-oxime、indirubin-5-nitro-3'-oxime、valproic acid、2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naphthyridine、1-(4-methylphenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone HBr(pifithrin-alpha)、prostaglandin J2および prostaglandin E2等が例示される(WO 2010/068955)。

20

【0020】

iPS細胞誘導のための培養培地としては、例えば(1) 10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培地(これらの培地にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、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。)、(2) bFGFまたはSCFを含有するES細胞培養用培地、例えばマウスES細胞培養用培地(例えばTX-WES培地、トロンボX社)または霊長類ES細胞培養用培地(例えば霊長類(ヒト&サル)ES細胞用培地(リプロセル、京都、日本)、mTeSR-1)、などが含まれる。

【0021】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDME/F12培地中で体細胞と核初期化物質(DNAまたはタンパク質)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、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培地で培養し、該接触から約30~約45日またはそれ以上ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5-10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

30

【0022】

あるいは、その代替培養法として、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培地(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日またはそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

40

【0023】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培地と培地交換を行う。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100cm²あたり約5×10³~約5×10⁶細胞の範囲である。

【0024】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地(選択培地)で培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することがで

50

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、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

【0025】

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の年齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、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）が挙げられる。

【0026】

本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

【0027】

本発明において用いるiPS細胞は、アルツハイマー病の罹患が既知である患者から体細胞を採取して作製されることが望ましい。より好ましくは、当該アルツハイマー病の罹患が既知である患者から得られた体細胞からiPS細胞を作製し、このiPS細胞から神経細胞またはアストロサイトへと誘導した際にAオリゴマーを蓄積する細胞を得られる患者の体細胞よりiPS細胞を作製することである。

【0028】

本発明において、Aとは、アミロイドタンパク質を意味し、アミロイド前駆体タンパク質（APP）から β -及び γ -セクレターゼにより切断されて産生する断片である。また、Aオリゴマーとは、Aの二量体（ダイマー）、三量体（トリマー）、四量体（テトラマー）またはそれ以上の重合体を意味する。また、本発明で用いるAは、40アミノ酸長（A₄₀）または42アミノ酸長（A₄₂）で構成されるタンパク質のいずれのアミノ酸長であってもよい。ただし、693のグルタミン酸の欠損変異したAPPから産生される場合は、A₄₀は、39アミノ酸長であり、A₄₂は、41アミノ酸長を意味する。また、Aオリゴマーを蓄積するとは、これらのAオリゴマーが細胞内で凝集していることであり、この蓄積は、Aオリゴマーに対する抗体（例えば、NU1または11A1）で細胞を観察することによって検出できる。

【0029】

本発明において、アルツハイマー病の罹患が既知である患者とは、特に限定されないが、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を有する者が例示される。当該原因遺伝子としては、21番染色体のアミロイド前駆体蛋白遺伝子（APP）、14番染色体のプレセニリン1遺伝子、1番染色体のプレセニリン2遺伝子の変異型、または19番染色体のアポリポ蛋白E遺伝子 ϵ 4アリルが例示される。本発明では、アルツハイマー病の罹患が既知である患者の体細胞として、APPの693番目のグルタミン酸が欠損しているAPP（E693 Δ ）を有する体細胞を用いてもよい。本発明においてAPPは、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_000484の遺伝子またはこの遺伝子によってコードされるタンパク質である。

【0030】

本発明においては、アルツハイマー病の罹患が既知である患者から体細胞から作製したiPS細胞の代わりに、APPの693番目のグルタミン酸が欠損しているAPP（E693）を導入したiPS細胞を用いてもよい。変異型APPの導入においては、前述した核初期化物質の体細胞内への導入方法と同一の方法を用いて行うことができる。変異型APPの導入は、iPS細胞で行われても良く、または後述する分化誘導後の神経細胞またはアストロサイトにおいて行われても良い。

【0031】

神経細胞の分化誘導法

前述のiPS細胞から、神経幹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で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、WO2001/088100、WO/2003/042384）、浮遊培養による分化誘導法（SFEB法）（WO2005/123902）およびその組み合わせによる方法を利用することができる。

10

【0032】

神経細胞の他の態様として、前述の方法で誘導されたiPS細胞を、任意の方法で分離し、胚葉体（EB）を形成させた後、任意の培地中コーティング処理された培養皿で接着培養することで、神経細胞の誘導を行うことができる。好ましくは、神経細胞は、大脳皮質ニューロンである。

【0033】

本発明において、神経細胞は、BF1、IIIチューブリン、TuJ1、NeuN、160kDaの神経フィラメントタンパク質、MAP2ab、グルタメート、シナプトフィジン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）、チロシンヒドロキシラーゼ、GABA、セロトニン、TBR1、CTIP2およびSATB2からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を発現している細胞であり、好ましくは、TBR1、CTIP2およびSATB2からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を発現している細胞である。

20

【0034】

本発明において、分離の方法としては、力学的もしくはプロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)が挙げられる）を用いてもよい。

【0035】

分離は、iPS細胞を単一細胞まで分離させることが好ましいが、小塊または小塊と単一細胞の混合物の形態であってもよい。

30

【0036】

EBの形成は、通常、浮遊培養により行われるがこれに限定されない。

【0037】

浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態では培養することであり、特に限定されないが、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）、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマーまたはPluronic F-127（Gibco）によるコーティング処理）したものを使用して行うことができる。好ましくは、浮遊培養のために、Pluronic F-127コーティングされた培養皿が使用され得る。

40

【0038】

接着培養に用いる培養皿のコーティング剤としては、例えば、マトリゲル（Becton Dickinson）、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、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

【0039】

本発明において、培養に用いる培地は、基本培地へ添加剤を加えて用いることができる。ここで、基本培地は、例えば、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、NS-A

50

培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Optio n培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、MEM培地、DMEM培地、DMEM/F12培地、ハム培地、RPMI 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。好ましくは、Neurobasal培地およびDMEM/F12の混合物である。ここで、添加剤は、血清、レチノイン酸、Wnt、BMP、bFGF、EGF、HGF、Sonic hedgehog (Shh)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、インスリン様増殖因子1 (IGF 1)、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 (Gibco)、B27-サプリメント (ビタミンA不含) (Gibco)、N2-サプリメント (Gibco)、ITS-サプリメント、抗生物質、AMPKおよびBMPシグナルの阻害剤 (例えば、Doromorphin)、ALK5阻害剤 (例えば、SB431542)、Knockout Serum Replacement (KSR) が挙げられる。好ましい添加剤は、N2-サプリメント、Doromorphin、SB431542、B27-サプリメント (ビタミンA不含)、BDNF、GDNF、NT-3および KSRである。これらの添加剤は、段階的に変化させてもよく、例えば、KSR、DoromorphinおよびSB431542を組み合わせた添加剤、N2-サプリメント、DoromorphinおよびSB431542を組み合わせた添加剤またはB27-サプリメント (ビタミンA不含)、BDNF、GDNFおよびNT-3を組み合わせた添加剤を適宜変化させて用いることができる。

10

【0040】

培地および培養条件のより好ましい態様としては、次の3段階に分けて行う条件を挙げることができるがこれらに限定されない：

20

(段階1) MPCポリマーによるコーティング処理した培養皿上で、 $2\mu\text{M}$ dorsomorphin、SB431542および5% KSRを含有するDMEM/Ham's F12で、EBを形成させる、

(段階2) マトリゲルをコーティングした培養皿上で、 $2\mu\text{M}$ dorsomorphin、SB431542およびN2-サプリメントを含有するDMEM/Ham's F12で、接着培養する、

(段階3) Accutaseにより細胞を分離し、マトリゲルをコーティングした培養皿上で、B27-サプリメント (ビタミンA不含)、 10 ng/ml BDNF、 10 ng/ml GDNFおよび 10 ng/ml NT-3を含有するneurobasal培地中で培養する。

【0041】

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、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/ml、好ましくは、 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mlである。

30

【0042】

培養温度、 CO_2 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 $30 \sim 40$ 、好ましくは約 37 である。また、 CO_2 濃度は、例えば約 $1 \sim 10\%$ 、好ましくは約 5% である。 O_2 濃度は、 $1 \sim 20\%$ である。また、 O_2 濃度は、 $1 \sim 10\%$ であってもよい。

【0043】

分化誘導の培養時間は、特に限定されないが、28日以上84日以下であり、上記の段階に分けて分化誘導を行う場合、好ましくは、段階1は、4日以上12日以下であり、好ましくは、8日間である。段階2は、8日以上24日以下であり、好ましくは、16日間である。段階3は、16日以上56日以下であり、好ましくは、32日間または48日間である。

40

【0044】

アストロサイトの分化誘導法

本発明において、iPS細胞から、アストロサイトを分化誘導する方法として、(1) iPS細胞から神経前駆細胞を製造する工程、(2) 得られた神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養する工程、(3) 得られた細胞を解離させる工程、および(4) 得られた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いて神経栄養因子を含有する培養液中で接着培養する工程を含む方法が例示される。

【0045】

50

本発明において、神経前駆細胞とは、ニューロンおよびグリア細胞へ分化する細胞を意味し、Nestin またはNCAMが発現している細胞である。本明細書において神経前駆細胞は、神経幹細胞と同等の細胞を意味し、特別の断りがなければ、この2つの細胞を区別しない。さらに、グリア細胞とは、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト等を意味する。

【0046】

また本発明において、アストロサイトとは、GFAPまたはS100 を発現する細胞であり、好ましくはGFAPを発現する細胞である。GFAPは、NCBI のAccession番号NM_001131019、NM_001242376またはNM_002055において示される配列を有する遺伝子である。

【0047】

< 神経前駆細胞の製造 >

本発明において、iPS細胞から神経前駆細胞への分化誘導は、当業者に周知の方法を用いてもよく、特に限定されないが、例えば、(1) 無血清培地中で胚様体を形成させて分化させる方法 (SFEB法) (Watanabe K, et al. Nat Neurosci. 8:288-96, 2005)、(2) ストローマ細胞上でES細胞を培養して分化させる方法 (SDIA法) (Kawasaki H, et al. Neuron. 28:31-40, 2000)、(3) マトリゲル上に薬剤を添加して培養する方法 (Chambers SM, et al. Nat Biotechnol. 27:275-80, 2009) などが挙げられる。iPS細胞から神経前駆細胞への好ましい分化誘導方法は、iPS細胞をBMP阻害剤およびTGF 阻害剤を含む培養液中で培養する工程を含む方法を用いることができる。

【0048】

本発明の好ましいiPS細胞から神経前駆細胞への分化誘導法として、iPS細胞を、任意の方法で分離し、浮遊培養により培養してもよく、あるいはコーティング処理された培養容器を用いて接着培養してもよい。好ましくは、浮遊培養の後に接着培養させることが好ましい。ここで、ヒトiPS細胞の分離方法としては、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液 (例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)など) またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液 (特に好ましくは、Accutase(TM)) を用いてヒト多能性幹細胞を解離し、力学的に細かく単一細胞へ分散する方法が用いられる。ここで、使用されるヒトiPS細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーであることが好ましい。

【0049】

本工程における浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態では培養することであり、特に限定はされないが、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) されていない培養容器、若しくは、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) または非イオン性の界面活性ポリオール (Pluronic F-127等) によるコーティング処理) した培養容器を使用して行うことができる。

【0050】

また、接着培養においては、コーティング処理された培養容器にて、任意の培地中で培養する。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

【0051】

本工程における培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジー) およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEM培地とHam's F12培地とを等量ずつ混合させたDMEM/F12培地である。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トラ

10

20

30

40

50

ンスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましくは、KSR、アミノ酸およびL-グルタミンを含有するDMEM/F12培地またはN2サプリメント、KSR、アミノ酸およびL-グルタミンを含有するDMEM/F12培地である。

【 0 0 5 2 】

本工程では、培地にBMP阻害剤およびTGF 阻害剤をさらに添加することが好ましい。ここで、BMP阻害剤とは、BMP (bone morphogenetic protein) とBMP受容体 (I型又はII型) との結合を介するBMPシグナル伝達 (BMP signaling) の阻害に關与する低分子阻害剤であり、天然の阻害剤であるNoggin、chordin、follistatinなどのタンパク質性阻害剤とは異なる。この阻害剤は、多能性幹細胞を神経前駆細胞へ分化誘導する作用を有しているべきである。このような性質をもつ低分子BMP阻害剤には、転写因子SMAD1、SMAD5又はSMAD8を活性化する能力をもつBMP2、BMP4、BMP6又はBMP7を阻害する化合物である、例えばDorsomorphin (すなわち、6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine) 及びその誘導体が包含される (P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116:11_60; P.B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4:33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE (www.plozone.org), 3(8):e2904)。Dorsomorphinは市販されており、例えばSigma-Aldrichなどから入手可能である。Dorsomorphinは、BMP受容体へのBMPの結合を阻害することによって上記のBMPシグナル伝達を阻害する生物活性を有する。この他にも、BMP I型受容体キナーゼ阻害剤としてLDN-193189 (すなわち、4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline) 及びその誘導体が例示される (Yu PB et al. Nat Med, 14: 1363-9, 2008)。LDN-193189は市販されており、例えばStemgent社などから入手可能である。

【 0 0 5 3 】

例えば、BMP阻害剤がDorsomorphinである場合、培地中の濃度は、0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、100mMが例示される。好ましくは、2mMである。

【 0 0 5 4 】

さらに、TGF 阻害剤とは、TGF ファミリーのシグナル伝達に干渉する低分子阻害剤であり、例えばSB431542、SB202190 (以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20(2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories) などが包含され、SB431542が好ましい。

【 0 0 5 5 】

例えば、TGF 阻害剤がSB431542である場合、培地中の濃度は、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mMが例示される。好ましくは、10mMである。

【 0 0 5 6 】

培養温度は、以下に限定されないが、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る。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは5%である。培養時間は、少なくとも20日以上であり、例えば21日、24日、27日、30日、33日、36日、39日または42日が挙げられる。好ましくは24日である。

【 0 0 5 7 】

< 神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養する工程 >

本発明の神経前駆細胞を培養する工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbec

10

20

30

40

50

co's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's 培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、Neurobasal Mediumである。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましい培地は、B27サプリメントおよびGlutamaxを含有するNeurobasal Mediumである。

10

【0058】

本発明において、神経前駆細胞を培養する工程において用いる培養液は、神経栄養因子を含有していることが望ましい。ここで、神経栄養因子とは、運動ニューロンの生存と機能維持に重要な役割を果たしている膜受容体へのリガンドであり、例えば、Nerve Growth Factor (NGF)、Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)、Neurotrophin 3 (NT-3)、Neurotrophin 4/5 (NT-4/5)、Neurotrophin 6 (NT-6)、basic FGF、acidic FGF、FGF-5、Epidermal Growth Factor (EGF)、Hepatocyte Growth Factor (HGF)、Insulin、Insulin Like Growth Factor 1 (IGF 1)、Insulin Like Growth Factor 2 (IGF 2)、Glia cell line-derived Neurotrophic Factor (GDNF)、TGF- β 2、TGF- β 3、Interleukin 6 (IL-6)、Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) およびLIFなどが挙げられる。本発明において好ましい神経栄養因子は、GDNF、BDNFおよびNT-3から成るグループより選択される因子である。

20

【0059】

また、神経前駆細胞を培養する工程において、コーティング処理された培養容器を用いて培養してもよい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。

【0060】

培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、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。

30

【0061】

培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、20日以上、30日以上、40日以上、50日以上、60日以上、70日以上、80日以上、90日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、66日以上である。

【0062】

上記に示した添加する神経栄養因子の濃度については、当業者がその効力により適宜選択して用いてよく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、15ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。好ましくは、10ng/mlである。

40

【0063】

<細胞を解離させる工程>

細胞を解離させる工程においては、互いに接着して集団を形成している細胞を個々の細胞に解離 (分離) させる。細胞を解離させる方法としては、例えば、力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液 (例えば、Accutase(TM) およびAccumax(TM) など) またはコラゲナーゼ活性のみを有する解離溶液を用いた解離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液 (特に好ましくは、Accutase(TM)) を用いて細胞を解離する方法が用いられる。

【0064】

<解離させた細胞をコーティング処理されていない培養容器を用いて神経栄養因子を含有

50

する培養液中で接着培養する工程>

コーティング処理されていない培養容器とは、当業者が汎用的に用いている細胞培養用ディッシュ、プレートまたはフラスコを意味し、その形状は特に限定されない容器であり、培養に際して、別途コーティング剤による処理工程を経ていない容器である。好ましくは、ポリスチレン製の培養容器である。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチンが挙げられ、本工程では、少なくともこれらのコーティング剤にて処理を行わない培養容器を用いることが好ましい。

【0065】

細胞を解離後の培養においては、上記と同様の神経栄養因子を含有する培養液を用いることができる。培養期間は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、5日以上、10日以上、15日以上、20日以上、25日以上、30日以上、35日以上、40日以上、45日以上、50日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、30日以上である。

10

【0066】

<追加工程>

本発明では、アストロサイトを製造するにあたり、さらに得られた細胞を解離させ、コーティング処理されていない培養容器を用いてGDNF、BDNFおよびNT-3から成るグループより選択される因子を含有しない培養液中で接着培養しても良い。細胞の解離は、上記と同様の方法を用いて行うことができ、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液を用いて行うことが望ましい。

20

【0067】

本発明において、GDNF、BDNFおよびNT-3から成るグループより選択される因子を含有しない培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジー)およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、Neurobasal Mediumである。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルピン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。好ましいGDNF、BDNFおよびNT-3から成るグループより選択される因子を含有しない培養液は、N2サプリメントおよびGlutamaxを含有するDMEM/F12または血清およびGlutamaxを含有するDMEM/F12である。

30

【0068】

本工程は、長期の培養により特段の問題が起きないため、特に限定されないが、5日以上、10日以上、15日以上、20日以上、25日以上、30日以上、35日以上、40日以上、45日以上、50日以上、またはそれ以上の日数が挙げられる。好ましくは、20日以上または30日以上である。

40

【0069】

本工程の培養条件について、培養温度は、以下に限定されないが、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。

【0070】

本細胞の解離と培養を行う工程は、アストロサイトの取得効率をより高めるため、少なくとも1回以上行われることが好ましい。例えば、2回以上、3回以上、4回以上または

50

5回以上が挙げられる。より好ましくは3回である。

【0071】

<アストロサイトの選択方法>

上述した神経前駆細胞を神経栄養因子を含有する培養液中で培養する工程後には、アストロサイトに加えニューロンも同時に製造され得る。しかしながら、アストロサイトはニューロンなどと比較して、コーティング処理されていない培養容器に接着しやすいので、この方法を用いると、アストロサイトとニューロンが混在する細胞群から高効率でアストロサイトを選択的に得ることができる。詳細には、上述した細胞を分離する工程およびコーティング処理されていない培養容器を用いて培養する工程を含む方法である。

【0072】

アルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング方法

本発明は、前述のように得られたiPS細胞由来の神経系細胞（神経細胞またはアストロサイト）と試験物質とを接触させ、各指標を用いて、アルツハイマー病の予防および治療薬の候補物質をスクリーニングする方法を提供する。本発明において使用される、好ましいiPS細胞は、アルツハイマー病患者由来のiPS細胞または外来性の変異型APPを導入されたiPS細胞であり、APPの変異または変異型APPとは、APPの693のグルタミン酸の欠損変異を有するiPS細胞である。

【0073】

他の態様として、本発明において使用されるiPS細胞としては、当該iPS細胞から作製された神経系細胞においてAオリゴマーの蓄積が確認されるiPS細胞であることが望ましい。本発明では、このようなiPS細胞として、孤発型アルツハイマー患者由来のiPS細胞、内在性のAPPに変異を有するiPS細胞または外来性の変異APPを導入されたiPS細胞が例示される。

【0074】

本発明の一つの態様として、指標としてAの量を用いる場合、次の工程を含む方法によってアルツハイマー病の治療薬または予防薬をスクリーニングすることができる；

(a) 候補物質を、iPS細胞由来の神経系細胞（神経細胞またはアストロサイト）と接触させる工程、

(b) 前記神経細胞内のAオリゴマーの量を測定する工程、および

(c) 前記量が候補物質と接触させなかった場合と比較して減少した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程。

【0075】

神経細胞内のAオリゴマーの量を測定する方法として、得られた細胞を洗浄後、任意の溶解液を用いて得られた細胞溶解液を用いて測定する方法が例示される。この時、免疫学的測定法を用いて測定することができる。免疫学的測定法は、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、免疫沈降、スロットもしくはドットブロットアッセイ、免疫組織染色、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光イムノアッセイ、アビジン-ビオチンまたはストレプトアビジン-ビオチン系を用いるイムノアッセイなどを含むがこれらに限定されない。好ましくは、ELISAであり、例えば、sandwich ELISAである。他の神経細胞内のAオリゴマーの量を測定する方法として、得られた細胞をAオリゴマーに対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、染色領域を細胞画像解析装置を用いて測定する方法が例示される。細胞画像解析装置として、例えばインセルアナライザーが挙げられる。

【0076】

本発明のスクリーニング方法においては、任意の試験物質を候補物質として用いることができ、いかなる公知化合物および新規化合物であってもよく、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、精製タンパク質または粗タンパク質、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。本発明において、試験物質はまた、(1)生物学的ライブラリー法、(2)デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、(3)「1ビーズ1化合物(one-bead one-compound)」ライブラリー法、及び(4)アフィニティークロマトグラフィ選別を使用する合

10

20

30

40

50

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。アフィニティークロマトグラフィ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4つ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、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; 米国特許出願第2002103360号) として作製され得る。

【0077】

スクリーニングの方法は、一つの態様において、試験物質と接触させない場合の神経系細胞内のA オリゴマーの量と、試験物質と接触させた場合の神経系細胞内のA オリゴマーの量とを比較して、接触時のA オリゴマーの量がより減少した場合に、試験物質をアルツハイマー病の予防および治療薬の候補物質として選択する方法である。

【0078】

本発明の他の態様において、指標としてERストレス量、カスパーゼ4の活性、Transgelin および酸化ストレス量から成る群から選択される少なくとも一つの指標を用いる場合、次の工程を含む方法によってアルツハイマー病の治療薬または予防薬をスクリーニングすることができる；

(a) 候補物質を、iPS細胞由来の神経系細胞 (神経細胞またはアストロサイト) と接触させる工程、

(b) 前記神経系細胞内のERストレス量、カスパーゼ4の活性、Transgelin量 および酸化ストレス量から成る群から選択される少なくとも一つの指標を測定する工程、および

(c) 前記量が候補物質と接触させなかった場合と比較して減少した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程。

【0079】

本発明において、小胞体 (ER) ストレスとは、正常な折りたたみ構造を有していない変性タンパク質が小胞体に蓄積することにより引き起こされる悪影響を意味し、ERストレス量は、小胞体ストレス応答の程度を測定することによって行われ得る。ここで、小胞体ストレス応答とは、変性タンパク質の原因となるタンパク質の発現を低下させること、または分子シャペロンの量を増加させることなどを意味する。従って、ERストレス量の測定は、例えば、分子シャペロンなどのERストレスマーカー量を測定することにより行われる。ここで、ERストレスマーカーは、例えば、BiP (Binding Immunoglobulin Protein)、XBP-1 (X Box-binding Protein 1)、eIF2A (Eukaryotic translation Initiation Factor 2 A)、XIAP (X-chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis)、ATF4 (Activating Transcription Factor 4)、IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1)、PERK (PKR-Like ER Kinase) およびATF6 (Activating Transcription Factor 6) を含むがこれらに限定されない。好ましくは、ERストレスマーカーは、BiPである。

【0080】

ERストレス量は、例えば、免疫学的測定法を用いて測定することができる。免疫学的測定法は、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、免疫沈降、スロットもしくはドットプロ

10

20

30

40

50

ットアッセイ、免疫組織染色、ラジオイムノアッセイ (R I A)、蛍光イムノアッセイ、アビジン - ビオチンまたはストレプトアビジン - ビオチン系を用いるイムノアッセイなどを含むがこれらに限定されない。好ましくは、ELISAであり、例えば、sandwich ELISAである。

【 0 0 8 1 】

他のERストレス量を測定する方法として、得られた細胞をERストレスマーカーに対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、染色領域を細胞画像解析装置を用いて測定する方法が例示される。細胞画像解析装置として、例えばインセルアナライザーが挙げられる。

【 0 0 8 2 】

このようにして、スクリーニングされた試験物質は、アルツハイマー病の予防および治療薬として使用し得る。

【 0 0 8 3 】

本発明において、カスパーゼ 4 の活性とは、活性型のカスパーゼ 4 の量を測定することで定量できる。ここで、活性型のカスパーゼ 4 は、切断されシステインプロテアーゼ活性を有する。活性型カスパーゼ 4 の測定には、切断部位特異抗体を用いて免疫学的測定法を用いて測定することができる。この他にも、市販されている蛍光カスパーゼ基質を用いてその活性を測定することができる。

【 0 0 8 4 】

本発明において、Transgelinとは、NCBIのAccession NO. NM_001001522またはNM_003186で表される遺伝子であり、mRNAまたはタンパク質の形態にてその量を認識することができる。またこの時、遺伝子の一部のみで認識される量であってもよく、mRNAの場合、ORF配列において連続した少なくとも15塩基長の塩基配列を有する配列もしくはその相補鎖を認識することで良く、タンパク質の場合、連続した少なくとも3から6アミノ酸長を有する配列を認識することで良い。

【 0 0 8 5 】

本発明のTransgelinの量をmRNAの形態で測定する場合、ノーザンブロット法、サザンブロット法、定量的RT-PCR法、リアルタイムPCR法、in situハイブリダーゼーション法などといった、特定の遺伝子、mRNAおよびcDNAを特異的に認識し、また検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用して行うことができる。さらに、Transgelinの量をタンパク質の形態で測定する場合、免疫学的測定法を用いて測定

【 0 0 8 6 】

本発明において、酸化ストレスとは、活性酸素種 (ROS) または活性窒素種 (RNS) によりタンパク質、脂質またはDNAが障害される現象を意味し、酸化ストレス量は、酸化修飾された基質量、発現亢進した酸化ストレス除去酵素の量、RNSまたはROSの量を測定することで定量できる。ここで、酸化修飾とは、リン酸化、水酸化、ニトロ化およびカルボニル化などが例示される。また、酸化ストレス除去酵素とは、酸化ストレスに対して細胞を保護する働きを有する酵素で、オキシドレダクターゼ、ペルオキシダーゼおよびペルオキシレドキシニン活性を有するタンパク質が例示される。酸化ストレス量の測定は、例えば、DNA切断量、8-ヒドロキシグアノシン、マロンジアルデヒド、4-ヒドロキシノネナール、8-イソプロスタン、PRDX1 (NCBIのAccession NO. NM_002574)、PRDX4 (NCBIのAccession NO. NM_006406)、PRDX5 (NCBIのAccession NO. NM_012094)、PXDN (NCBIのAccession NO. NM_012293)、MGST3 (NCBIのAccession NO. NM_004528)、MED31 (NCBIのAccession NO. NM_016060)、RNS (例えば、一酸化窒素) およびROS (例えば、過酸化水素、スーパーオキシドアニオンラジカルまたはヒドロキシラジカル) などの量を当業者に周知の方法を用いて測定する事によって成し得る。

【 0 0 8 7 】

本発明の他の態様において、指標としてiPS細胞由来の神経細胞の数を用いる場合、次の工程を含む方法によってアルツハイマー病の治療薬または予防薬をスクリーニングすることができる；

10

20

30

40

50

- (a) 候補物質を、iPS細胞由来の神経細胞と接触させる工程、
 (b) 前記神経細胞の生細胞数またはその代替値を測定する工程、および
 (c) 前記生細胞数またはその代替値が候補物質と接触させなかった場合と比較して増加した場合、前記候補物質をアルツハイマー病の治療薬または予防薬として選出する工程。

【 0 0 8 8 】

本発明において、神経細胞数の減少を顕著に検出するため、当該神経細胞を神経栄養因子を含まない培養液で培養した後、神経細胞数を測定しても良い。他の態様として、過酸化水素を培養液に添加して培養した後、神経細胞数を測定しても良い。この時用いる過酸化水素として、例えば、50 μ Mから500 μ Mの濃度であってもよく、好ましくは100 μ Mから400 μ Mであり、より好ましくは、200 μ Mである。

10

【 0 0 8 9 】

本発明において、神経細胞のみを対象として測定するために、神経細胞を特異的に染色してから計測してもよく、例えば、BF1、IIIチューブリン、TuJ1、NeuN、160kDaの神経フィラメントタンパク質、MAP2ab、グルタメート、シナプトフィジン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD)、チロシンヒドロキシラーゼ、GABA、セロトニン、Synapsin I、TRBR1、CTIP2およびSATB2からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子によって染色しても良い。また、これらの遺伝子を直接染色させず、これらの遺伝子を発現するプロモーターによって誘導されるマーカー遺伝子によって染色されても良い。マーカー遺伝子としては、GFP、RFP、YFP等の蛍光を呈するタンパク質をコードする遺伝子が例示される。

【 0 0 9 0 】

20

本発明において、生細胞数を測定する方法としては、工程 (a) にて得られた神経細胞を顕微鏡等を用いて目視にて計測することによっても行われてもよく、細胞は、MTTなど当業者に周知の方法によって生細胞を染色して計測してもよい。また、細胞自動カウント装置などを用いてもよい。また、LDHやトリパンブルーなど死細胞数等の逆数を生細胞数の代替値として用いてもよい。

【 0 0 9 1 】

アルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング用キット

本発明に係るアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング用キットは、
 (a) 変異型APPを有するiPS細胞由来の神経細胞またはアストロサイト、および/または
 (b) A β オリゴマー、ADAM17、BACE1、BiP、切断カスパーゼ4、PRDX4および活性酸素種
 からなる群から選択される少なくとも一つの指標を測定するための試薬を含む。

30

【 0 0 9 2 】

また他の態様において、本発明に係るアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング用キットは、(a) 変異型APPを有するiPS細胞、(b) 神経系細胞 (神経細胞またはアストロサイト) を分化誘導するための試薬、および (c) A β の量および/またはERストレス量および/またはTransgelinの量および/または神経細胞数を測定するための試薬を含む。

【 0 0 9 3 】

さらなる態様において、本発明に係るアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング用キットは、(a) 変異型APPを有する体細胞、(b) iPS細胞を製造するための初期化物質、(c) 神経系細胞 (神経細胞またはアストロサイト) を分化誘導するための試薬、および (d) A β の量および/またはERストレス量および/またはTransgelinの量および/または神経細胞数を測定するための試薬を含む。

40

【 0 0 9 4 】

本発明において、APPの変異は、アルツハイマー病の原因となり得る変異であり、例えば、E693 変異である。

【 0 0 9 5 】

iPS細胞を製造するための初期化物質は、上述のiPS細胞の製造方法の初期化物質を用いることができる。核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、他の因子を含んでもよい。好ましくは、初期化物質は、OCTファミリー、MYCファミリー、KLFファミリ

50

ーおよびSOXファミリーからなる群から選択される因子を少なくとも一つ含む。

【0096】

神経細胞またはアストロサイトを分化誘導するための試薬は、上述の分化誘導法に記載した試薬を用いることができる。

【0097】

A オリゴマー、BiP、切断カスパーゼ4、PRDX4またはROSの量を測定するための試薬は、各測定方法において用いられる指標を認識し得る物質であれば何でもよく、例えば、当該試薬は、対象がタンパク質の場合では、特異的な抗体であり、ROSの場合では、活性酸素種を捕捉する蛍光プローブが例示される。

【0098】

アルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング用キットには、上記の任意の試験物質を含むこともできる。

【0099】

アルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング用キットには、さらに、iPS細胞の製造手順、分化誘導の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

【実施例】

【0100】

本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

【0101】

実施例1

iPS細胞(iPSCs)の樹立

APP内にE698の欠損型変異(E693)を有するアルツハイマー病患者、717番目のバリンがロイシンへ置換された変異(V717L)を有するアルツハイマー病患者および2名の孤発性アルツハイマー病患者より同意を得て3mmの皮膚生検で得られた外植片から皮膚線維芽細胞(HDF)を作製した。1-2週間後、外植片から増殖させた線維芽細胞を継代した。次いで、エピソーマルベクターを用いて、初期化因子としてのヒトcDNAs(SOX2、KLF4、OCT4、L-MYC、LIN28)およびp53についてのshRNAをHDFに導入した(Okita et al., Nat Methods. May; 8(5):409-12.2011)。導入の数日後、線維芽細胞を回収し、SNLフィーダー細胞層上に再播種した。翌日、培地を4 ng/ml bFGF (Wako Chemicals, Osaka, Japan)を補充した霊長類胚性幹細胞用培地(Reprocell, Kanagawa, Japan)で置換した。一日おきに培地を交換した。導入の30日後、iPS細胞コロニーを取り出した(それぞれ、AD(E693)-1、AD(E693)-2、AD(E693)-3、AD(V717L)-1、AD(V717L)-2、AD(V717L)-3、AD(sporadic)-1およびAD(sporadic)-2と称す)。

【0102】

本発明で用いたAPP遺伝子に突然変異を有さない3種の対照iPSC株のうち1種の株は、これまでに作製されたiPS細胞を用い(Control-3(409B2))(Okita et al., Nat Methods. May; 8(5):409-12.2011)、2種については上記と同様の方法にて非AD者より同意を得て作製した(Control-1および2)。これらのiPS細胞の性質は、下記に示す方法により確認した。

【0103】

免疫細胞化学による解析

4%パラホルムアルデヒド(pH 7.4)中、室温で30分間細胞を固定し、PBSで洗浄した。0.2% Triton X-100を含むPBS中、室温で10分間細胞を透過処理し、PBSで洗浄した。10%ロバ血清を含むPBSを用いて、室温で60分間非特異的結合をブロックした。一次抗体を用いて、4℃で一晩細胞をインキュベートし、次いで、適当な蛍光タグ化二次抗体で標識した。核を標識するために、DAPI (Life Technologies)を用いた。FV1000共焦点レーザー顕微鏡(OLYMPUS, Tokyo, Japan)、LSM710顕微鏡(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)またはDelta Vision (Applied Precision, Issaquah, WA)により蛍光像を得た。この時、一次抗体として、抗NANOG抗体(1:10; R&D Systems)を用いた。その結果、対照およびAD患者由来

10

20

30

40

50

のiPSCsはいずれも内因性の多能性マーカーを発現していることが確認された(図1Aおよび図2A)。

【0104】

核型分析および遺伝子型解析

核型分析は、以前に示された方法により行われた。その結果、いずれのiPSCsも正常な核型を示した。一方、APP単一ヌクレオチド突然変異の遺伝子型解析は、ゲノムDNAのPCR増幅により行われ、直接塩基配列を決定することで行われた(3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies, CA)。その結果、AD患者由来の2種類のiPSCsにおいて、APP内に変異(E693 およびV717L)を有していることが確認された(図1Bおよび図2B)。

10

【0105】

テラトーマ形成アッセイ

未分化なiPSCsをCTK溶液により解離させ回収し、沈殿物をDMEM/F12に懸濁した。細胞をNOGマウス(Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan)の皮下に移植した。移植の8週間後、腫瘍を切り出し、4%ホルムアルデヒドを含むPBSで固定した。パラフィン包埋組織を薄切し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。その結果、本実施例で用いたiPSCsはいずれも三胚葉への分化(テラトーマ)を示し、多能性において区別できない程類似していた(一部の結果を図1Cに示す)。

【0106】

in vitro分化

誘導された対照iPSCsおよびAD-iPSCsをCTK溶液により解離させ回収し、細胞塊を、20%ノックアウト血清代替物(KSR, Life Technologies)、2 mM L-グルタミン、0.1M非必須アミノ酸、0.1 M 2-メルカプトエタノール(Life Technologies)、ならびに0.5%ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するDMEM/F12の入ったペトリ皿に移し、胚葉体(EB)を形成させた。この時、一日おきに培地を交換した。8日間培養後、分化を進行させるために、ゼラチン被覆カバーガラス上へ播種し、さらに8日間、DMEM + 10%ウシ胎児血清中で培養した。その結果、本実施例で用いたiPSCsはいずれも三胚葉への分化を示し、多能性において区別できない程類似していた(一部の結果を図1Dに示す)。

20

【0107】

バイサルファイトゲノムシーケンシング(Bisulfite Genomic Sequencing)

重亜硫酸塩修飾のためiPSCからのゲノムDNA (1 μg)を、EZ DNAメチル化Gold Kit (Zymo research, Irvine, CA)を用いて処理した。続いて、Oct-4プロモーター中に保存された1つのCpG領域およびNanogプロモーター中に保存された1つのCpG領域をExTaq Hot start version (TaKaRa BIO, Shiga, Japan)を用いてPCRにより増幅した。得られたPCR産物をpCR4ベクター(Life Technologies)にサブクローン化し、各10個のクローンを、Sp6ユニバーサルプライマーを用いて塩基配列決定を行うことにより確認した。その結果、本実施例で用いたiPSCsは、測定されたOct-4およびNanogプロモーターの各領域において高度に脱メチル化されていることが確認された。

30

【0108】

実施例2

大脳皮質ニューロン(神経細胞)への分化誘導

iPS細胞由来大脳皮質ニューロンを得るために、以前に報告された方法(Nat Biotechnol. 2009;27:275-280およびPLoS One. 2009;4:e6722)の変法を用いた。簡潔には、次の方法である。上記の方法で得られたiPSCsを単一細胞まで解離させ、Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich)をコーティングしたU型96ウェルプレート(Greiner bio-one)にて、2 μM dorso morphinおよびSB431542を含有する5% DFK培地(DMEM/Ham's F12 (Gibco), 5% KSR (Gibco), NEAA (Invitrogen), L-glutamine (Sigma-Aldrich), 0.1 M 2-mercaptoethanol (Invitrogen))中で再凝集させることで胚様体(EB)形成させた(神経誘導段階(P1): 0 dayから8 day)。

40

続いて、得られたEBをマトリゲル(Becton Dickinson)をコーティングした6ウェルブ

50

レートへ移し、2 μ M dorsomorphin、SB431542およびN2 supplement (Invitrogen) を含有するDF培地 (DMEM/Ham's F12, NEAA, L-glutamine, 0.1 M 2-mercaptoethanol) 中で培養した (パターンニング段階(P2) : 8 dayから24 day)。この時、多くの神経前駆細胞 (Nestin陽性細胞) が確認された。さらに、Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc.) を用いて分離し、マトリゲルをコーティングした24ウェルプレートへ移し、B27 (Vitamin A不含) (Gibco)、10 ng/ml BDNF、10 ng/ml GDNFおよび10 ng/ml NT-3を含有するneurobasal (Gibco) 培地中で、培養した (神経成熟段階(P3) : 24 dayから56 dayまたは24 dayから72 day)。

56日間培養した結果、対照およびAD (E693) 患者由来のiPSCsから分化誘導された大脳皮質ニューロン (以下、神経細胞という場合がある) において、大脳皮質ニューロンサブタイプマーカーであるTBR1、CTIP2およびSATB2の発現が観察され、各iPSCsから大脳皮質ニューロンに分化していることが確認された (図1EおよびF)。

同様に、72日間培養した結果、対照、AD (E693) 患者、AD (V717L) 患者由来および孤発性AD患者のiPSCsから分化誘導された神経細胞において、TBR1、およびSATB2の発現が観察され、各iPSCsから同程度に大脳皮質ニューロンに分化していることが確認された (図2C)。

【 0 1 0 9 】

実施例 3

アストロサイトへの分化誘導

(1) 神経前駆細胞の誘導

上記の方法で得られたiPSCsをAccutase (Innovative Cell Technologies) により解離した。解離したiPSCsを、2 μ M Dorsomorphin (Sigma-Aldrich) および10 μ M SB431542 (Cayman Chemical) を添加したDFK5%培地 (5%KSR (Invitrogen)、L-glutamine (Sigma-Aldrich) および0.1M 2-mercaptoethanol (Invitrogen) を添加したDMEM/Ham's F12 (Gibco)) に懸濁、さらに2% Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) ethanol溶液でコートしたU-bottom 96-wellプレートに播種し胚様体 (EB) を形成させ、浮遊培養により8日間培養した。続いて、得られたEBをマトリゲル (BD) でコートした6-wellプレートへ移し、1x N2 supplement (Invitrogen)、2 μ M Dorsomorphinおよび10 μ M SB431542を添加したDFK5%培地にて接着培養により16日間培養し (通算24日間)、神経前駆細胞を得た。

【 0 1 1 0 】

(2) アストロサイトの誘導

得られた神経前駆細胞をAccutase (Innovative Cell Technologies) により解離させ、マトリゲルコートした12-wellプレートを用いて、1x B27 without Vitamin A (Invitrogen)、1x Glutamax (Invitrogen)、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNFおよび10ng/ml NT-3を添加したNeurobasal medium (Invitrogen) にて接着培養により66日間培養した (通算90日間)。続いて、得られた細胞をAccutaseを用いて解離させ、何もコートしていない6-cmディッシュへ移し、1x B27 without Vitamin A、1x Glutamax、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNFおよび10ng/ml NT-3を添加したNeurobasal mediumにて接着培養により30日間培養した (通算120日間)。この時、接着しなかった細胞はアノキスにより死滅した。この接着した細胞をAccutaseにより解離させ、何もコートしていない6-cmディッシュへ移し、1x N2 supplementを添加したDMEM/F12、Glutamax (Invitrogen) にて、接着培養により30日間培養した (通算150日間)。さらに、2度得られた細胞を解離させ同様の条件にて30日間培養し、GFAP陽性のアストロサイトを得た (通算200日間)。

【 0 1 1 1 】

実施例 4

AD-iPSCs由来の神経細胞におけるA₄₀ 分泌

細胞外A₄₀ がAD-iPSCs由来の神経細胞において減少し得るという以前の仮説を検証するために、神経細胞およびアストロサイトの細胞外のA₄₀およびA₄₂の量を解析した。細胞外のA₄₀およびA₄₂の量は、以前に記載されたとおり (Yahata et al., PLoS One. 6(9):e25788. 2011)、2日間培養した培養上清を回収し、A₄₀ の中間点に特異的なモノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体とA₄₀もしくはA₄₂のC末端に特異的なモノクローナル抗体の組み合わせを用いて、サンプル上清をサンドウィッチELISA(Wako)により測定された。この結果、細胞外のA₄₀およびA₄₂の量は共に、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトにおいて有意に減少することが確認された(図3AおよびB)。この時のA₄₂/A₄₀の値を算出したところ、神経細胞においては変化が見られず、アストロサイトにおいてはAD(E693)-iPSCs由来の神経細胞において減少していた。一方、AD(V717L)-iPSCs由来の神経細胞では、A₄₂の分泌量が有意に上昇することが確認された。さらに、この神経細胞において1 μMの - Secretase inhibitor IV (BSI)を添加してA₄₀の分泌量の変化を確認したところ、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞からのA₄₀およびA₄₂の分泌量に変化は見られなかったが、対照iPSCs、AD(V717L)-iPSCsおよび孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞ではA₄₀およびA₄₂の分泌量が減少した。

10

【 0 1 1 2 】

実施例 5

AD-iPS細胞由来の神経細胞およびアストロサイトにおけるA₄₀オリゴマーの蓄積

AD-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトがA₄₀オリゴマーを内包するか否かを調べるために、A₄₀オリゴマー特異的抗体であるNU-1 (Gong Y et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100:10417-22.2003)または11A1を用いて、iPSC由来の神経細胞およびアストロサイトの免疫細胞化学解析を行ったところ、A₄₀オリゴマーが点状存在し、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞において著しく増加していることが見出された(図4A)。これらの点状構造は、AD-iPSCs由来のアストロサイトにおいても確認されたが、由来となった線維芽細胞においてはほとんど見出されなかった。さらに、MAP2陽性細胞におけるA₄₀オリゴマーを特異的に染色し定量的に解析を行ったところ、A₄₀オリゴマー陽性の点状構造が、対照の神経細胞と比較してAD-iPSCs由来の神経細胞培養物において有意に増加していることが明らかとなった(図4B)。A₄₀に対する他の抗体である11A1を用いた場合にも同様の結果が得られた。続いて、ドットプロット解析を行ったところ、同様にAD(E693)-iPSCs由来の神経細胞内に蓄積したA₄₀オリゴマーが増加していることが観察された(図4CおよびD)。このAD-iPSCs由来の神経細胞におけるA₄₀オリゴマーの増加はBSIで処理することにより対照と同等量まで抑制されることが示された。

20

さらに、対照iPSCs、AD(E693)-iPSCs、AD(V717L)-iPSCsおよび孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトにおいて同様にドットプロット解析を行ったところ、全てのAD(E693)-iPSCsおよび1例の孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトにおいて、有意にA₄₀オリゴマー量が増加することが確認できた(図5A、5Bおよび5C)。また、これらの増加はBSIで処理することにより対照と同等量まで抑制されることが示された。

30

続いて、対照iPSCs由来の神経細胞において変異型APPであるE693型を強制発現させたところ、強制発現しなかったiPSCs由来の神経細胞と比べてA₄₀オリゴマー陽性の点状構造が多いことが確認された(図5D)。このことから、APP-E693変異により、A₄₀オリゴマーの細胞内での蓄積が引き起こされることが示唆された。

【 0 1 1 3 】

実施例 6

他のアルツハイマー病の特異的マーカーの探索

-および -セクレターゼ活性によるAPPプロセッシングは、主に小胞エンドソーム画分内で進むことが知られている。そこで、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞中の細胞内小器官および小胞画分におけるA₄₀オリゴマー陽性点状構造の存在を確認したところ、A₄₀オリゴマー陽性点状構造は、小胞体(ER)マーカーであるBiP、初期エンドソームマーカーであるEEA1およびリソソームマーカーであるLAMP2と共染色された(図6A)。さらに、ERストレスマーカーであるBiPまたは活性型カスパーゼ4のタンパク質の発現量を確認したところ、BiPおよび活性型カスパーゼ4は、対照よりもAD(E693)-iPSCs由来の神経細胞において高発現していた(図6B、6C、6Dおよび図8)。

40

一方、A₄₀の産生を抑制する -セクレターゼ阻害剤(BSI)により処理したところ、AD-

50

iPSCs由来の神経細胞においてこれらのERストレスマーカーの発現が抑制された(図6B、6Cおよび図8)。以上より、APP-E693 型の変異A によりERストレスが引き起こされていると考えられる。

【0114】

実施例7

DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

APP-E693 型の神経細胞で発現が変化している分子を探索するためDNAマイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。その結果、Transglinの発現量がAD(E693)-iPSCsで上昇していることが見出された(図7A)。さらに、遺伝子オンロジー解析によりペルオキシレドキシン活性、オキシドレダクターゼ活性およびペルオキシダーゼ活性を含む酸化ストレス関連のカテゴリーがAD(E693)-iPSCs由来の神経細胞で亢進していることが明らかになった。一方、グリコシル化関連カテゴリーは減退しており、小胞体/ゴルジ体の機能がアルツハイマー病の神経細胞で不安定になっていることを示唆された。ここで、ペルオキシレドキシン活性に関与するPRDX4 (peroxiredoxin-4)の発現は、対照と比較してAD-iPSCs由来の神経細胞において高発現していた(図7B)。ウエスタンブロット法によりPRDX4の発現量を測定したところ、AD-iPSCs由来の神経細胞において3倍増加していた(図7C、7Dおよび図8)。この増加は、BSI添加により減弱したことから、酸化ストレスは、A オリゴマーの形成により引き起こされると考えられる。

同様に、AD(V717L)-iPSCsおよび孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトにおいて調べたところ、1例の孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞では、BiPおよびperoxiredoxin-4の発現がAD(E693)-iPSCs由来の神経細胞と同様に増加することが確認された(図8)。また、AD(E693)-iPSCsおよび1例の孤発性AD-iPSCs由来のアストロサイトにおいて、BiP、活性型カスパーゼ4およびperoxiredoxin-4の発現に同神経細胞と同じような傾向が見られた(図9)。

続いて、AD(E693)-iPSCs、AD(V717L)-iPSCsおよび孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトにおいて活性酸素種(ROS)の量を蛍光染色法(HPF法(Sekisui Medical)およびCellROX法(Invitrogen))により測定したところ、AD(E693)-iPSCs由来および1例の孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞およびアストロサイトで増加していることが確認された(図7E、7F、図10A、10B、10Cおよび図11)。このROS量の増加もBSIの添加により減弱したことから、ROSの産生も、A オリゴマーの形成により引き起こされていると考えられる。

【0115】

実施例8

DHAの効果について

ドコサヘキサエン酸(DHA)(Nacalai)を1 μ M、5 μ Mおよび15 μ Mの濃度で培地に添加した後、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞におけるBiPタンパク質、活性型カスパーゼ4およびPRDX4の発現量を確認したところ、無添加群(DMSO)と比較してその発現量が減少していることが確認された(図12A、12B、12Cおよび12D)。さらに、5 μ MのDHAをiPSCs由来の神経細胞に添加して培養したところ、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞においてROSの発現が減少していることが確認された(図12Eおよび12F)。

同様に、1例の孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞においてもDHAの効果を確認したところ、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞と同様に有意にERストレスマーカー(BiPおよびperoxiredoxin-4)の発現量が抑制されることが確認された(図13Aおよび13B)。

一方、DHAの添加では神経細胞におけるA オリゴマーの蓄積量は変化しなかった(図13C)。

そこで、DHAの効果を探るため、AD(E693)-iPSCsおよび1例の孤発性AD-iPSCs由来の神経細胞に対する細胞生存率を検討した。細胞生存率の測定は、誘導後65日目の神経細胞において、Synapsin IプロモーターによりEGFP(Synapsin::EGFP)が発現するベクターをレンチウイルスを用いて導入したEGFP陽性神経細胞を測定することによって行われた。簡潔には、Synapsin Iプロモーターにより誘導されるEGFP(Synapsin::EGFP)を有するiPSC

s由来の神経細胞をマトリゲルコート上に移した5日後に、B27および神経栄養因子（BDNF、GDNFおよびNT-3）を除いたDHA含有または非含有培地へ交換し、48時間後から各時間において、EGFP陽性神経細胞の数をIN CELL Analyzer 2000を用いて測定した（図14Aおよび14B）。この時、神経細胞死は、EGFPの消失、細胞膜破壊、小疱形成等により決定され得る。神経細胞生存率は、最初の計測数に対する比によって算出した。さらに、細胞生存の検討は、Lactate dehydrogenase (LDH)法でも行った。LDH法は、Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Diagnostics)を用いて細胞培養液中のLDH量を計測することによって行われた（図14C）。LDH法では、細胞死数をControl-1に対する割合にて評価した。その結果、AD(E693)-iPSCs由来の神経細胞は、神経栄養因子不在により引き起こされる細胞死がDHAによって抑制されることが確認された。この他にも、過酸化水素により惹起される細胞死に対してもDHAは有効であることが確認された。

10

以上の結果を下記表1にまとめる。

【表1】

表1

| 候補薬剤 | A β oligomer | ERストレスマーカー (BiPおよびPeroxisredoxin-4等) |
|---------------------------------------|--------------------|---|
| β -Secretase inhibitor IV (BSI) | 減少 | 減少 |
| Docosahexaenoic (DHA) | 不変 | 減少 |

20

つまり、Aオリゴマーを指標とした場合、DHAを選出することはできないが、少なくともBSIは薬剤候補として選出することができる。

以上より、アルツハイマー病の治療薬および/または予防薬として可能性のあるBSIまたはDHAを、Aオリゴマー量、ERストレスマーカーであるBiPまたは活性型カスパーゼ4、ペルオキシドキシシン活性関連遺伝子であるPRDX4または細胞中のROSを指標とすること見出されることが確認された。

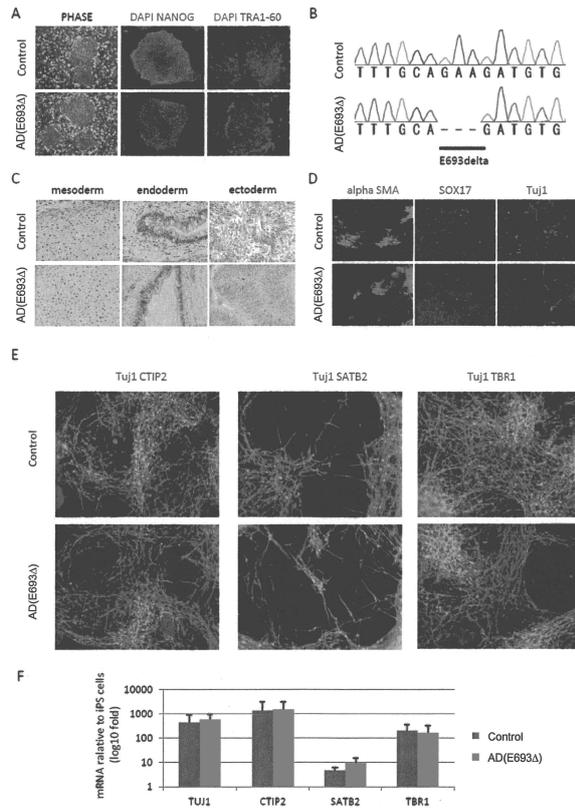
【産業上の利用可能性】

【0116】

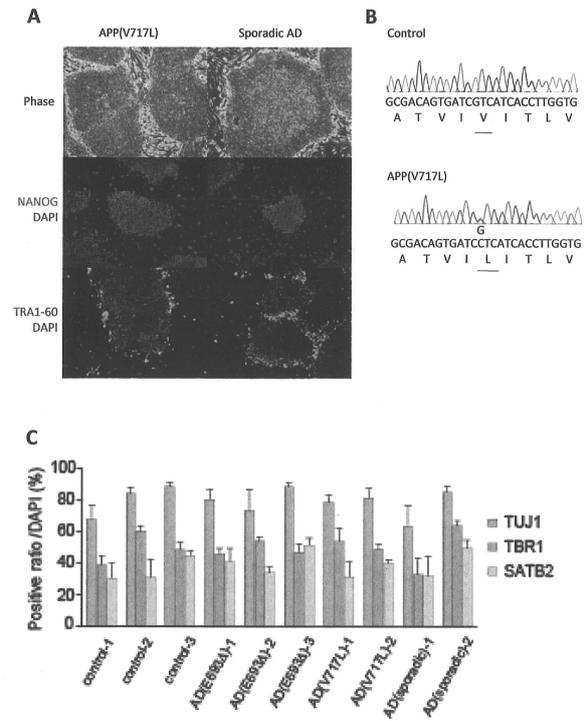
本発明は、アルツハイマー病患者の体細胞由来のiPS細胞から分化誘導された神経細胞において、アルツハイマー病の病態を再現できたことに基づくものである。したがって、当該細胞を用いてアルツハイマー病の治療薬または予防薬のスクリーニングを行うことが可能である。

30

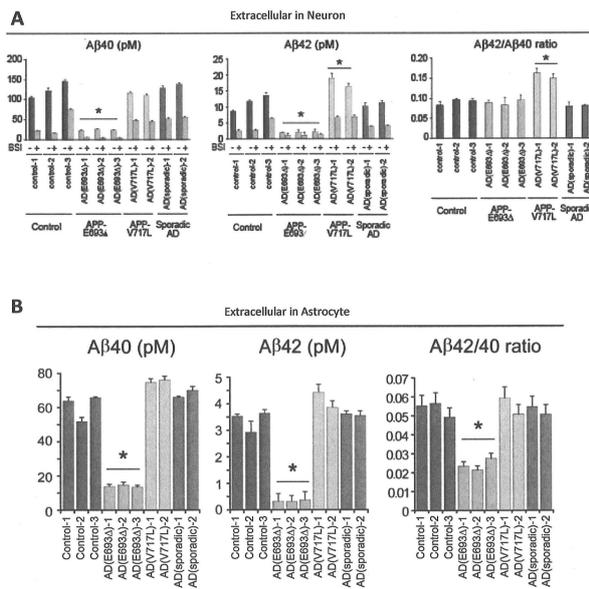
【 1 】



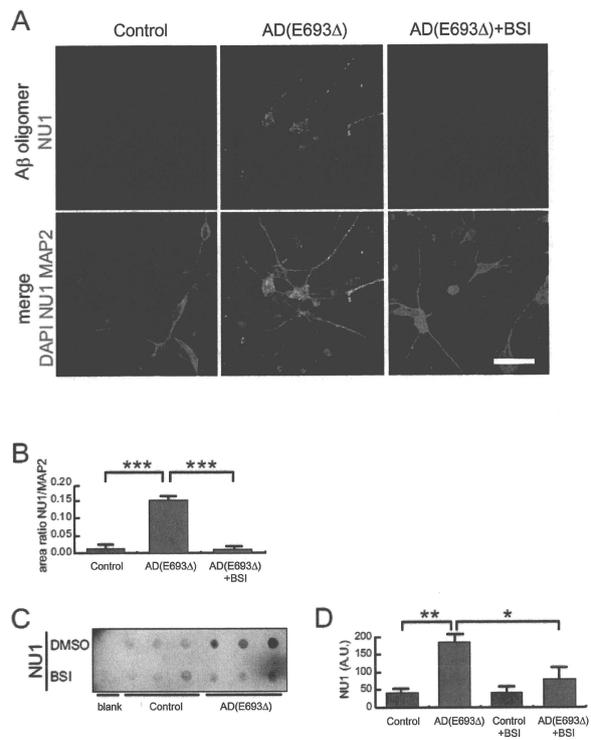
【 2 】



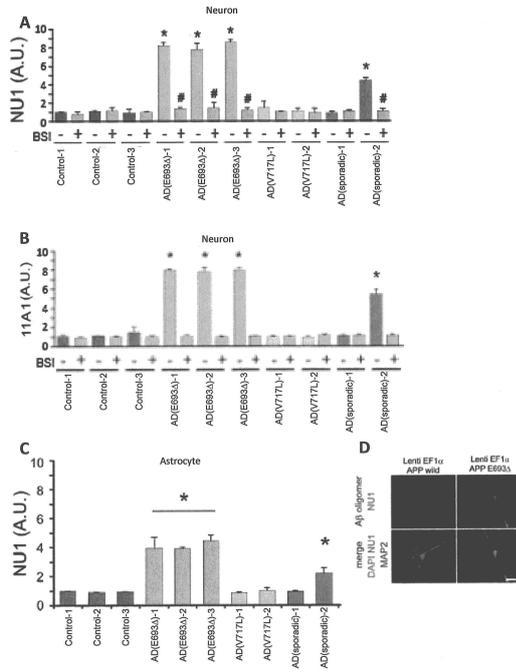
【 3 】



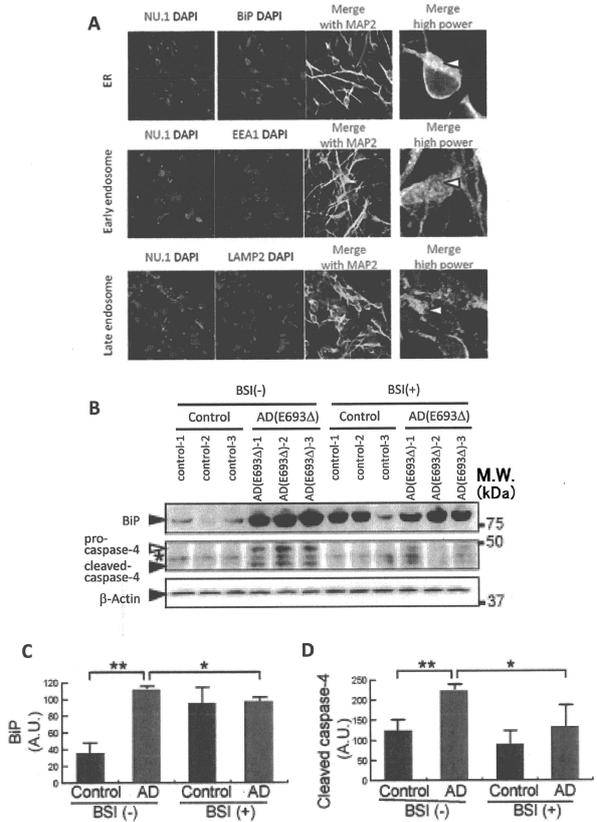
【 4 】



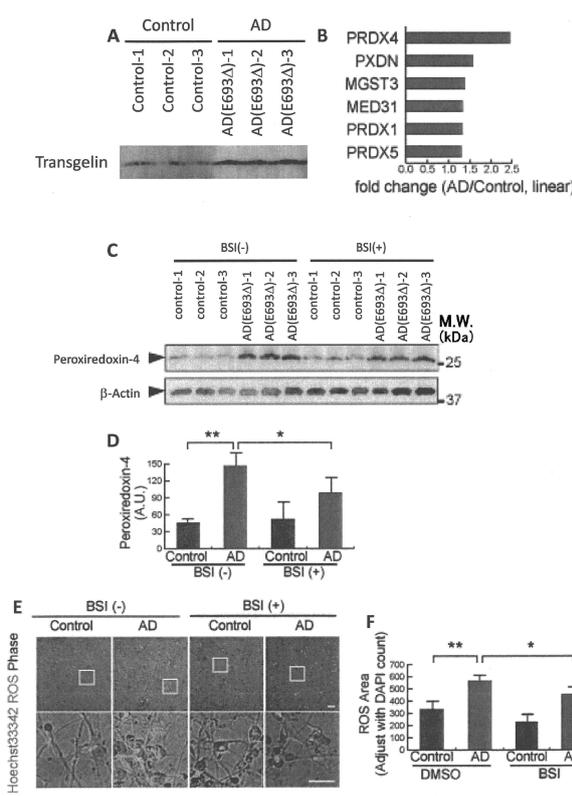
【 5 】



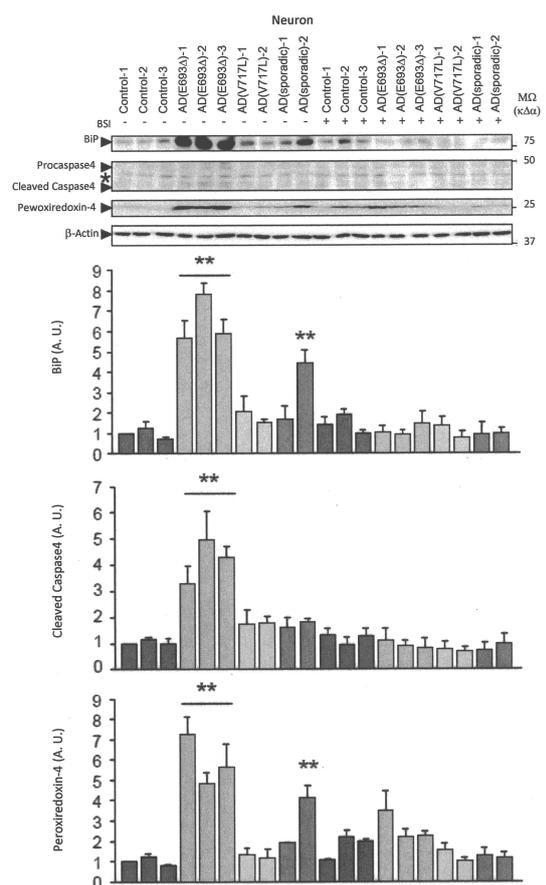
【 6 】



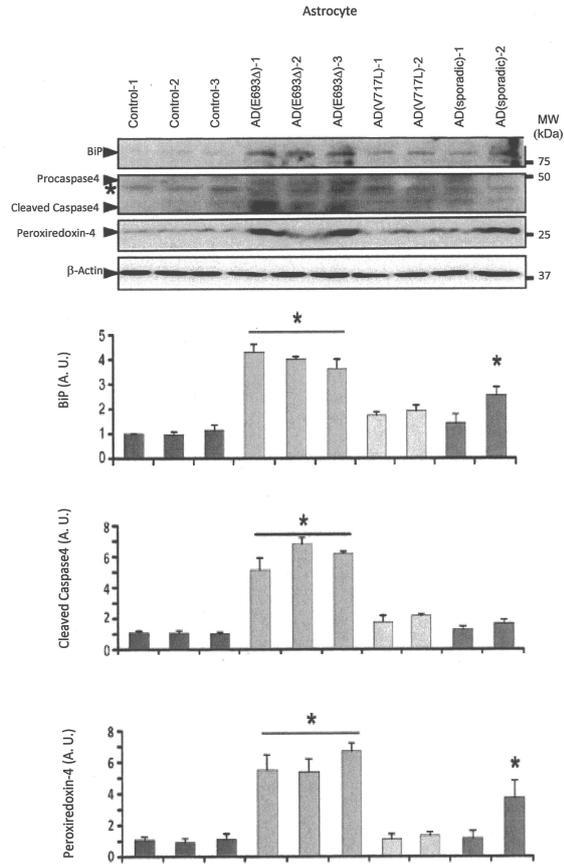
【 7 】



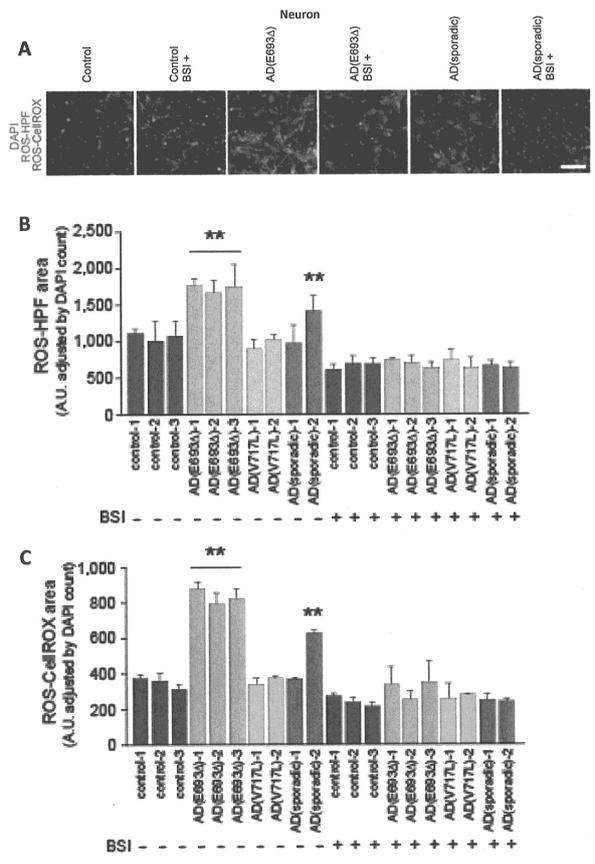
【 8 】



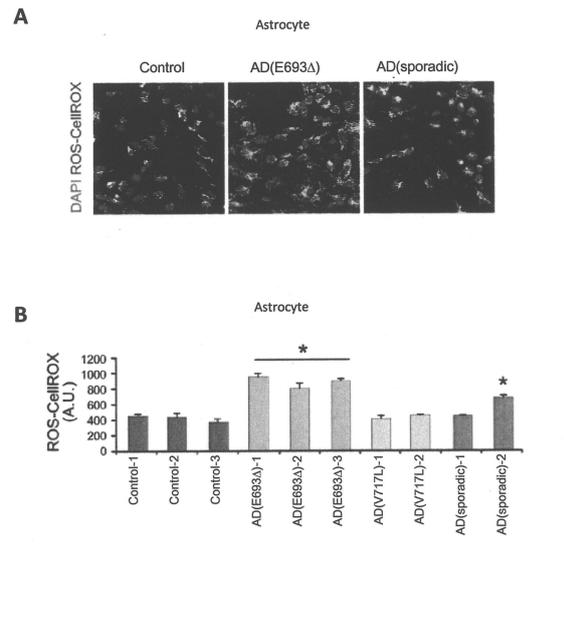
【 9 】



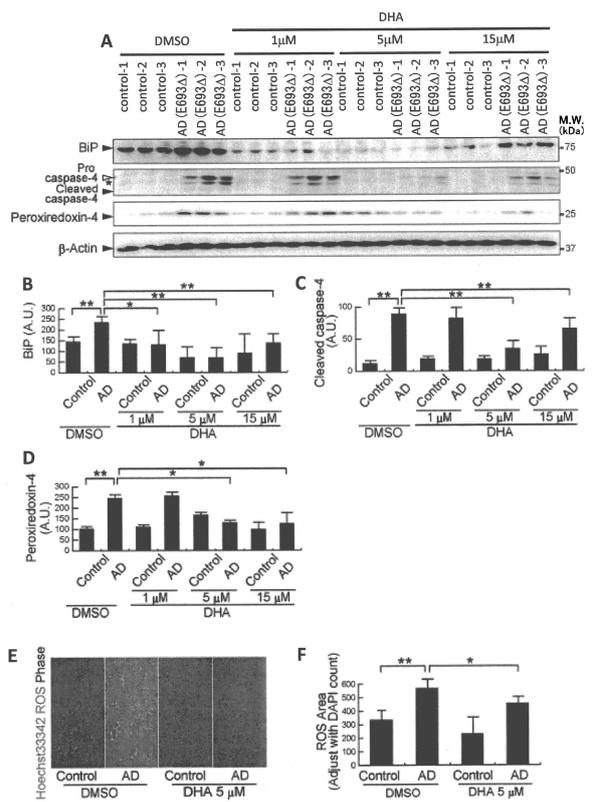
【 10 】



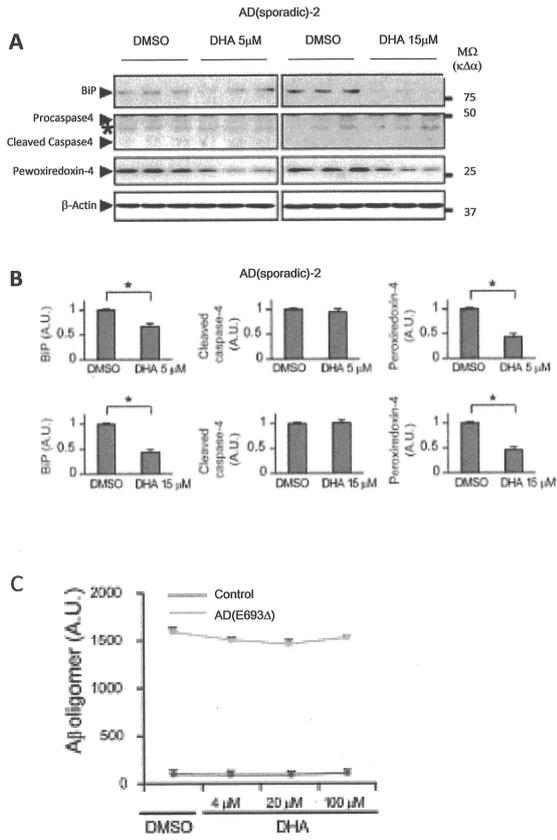
【 11 】



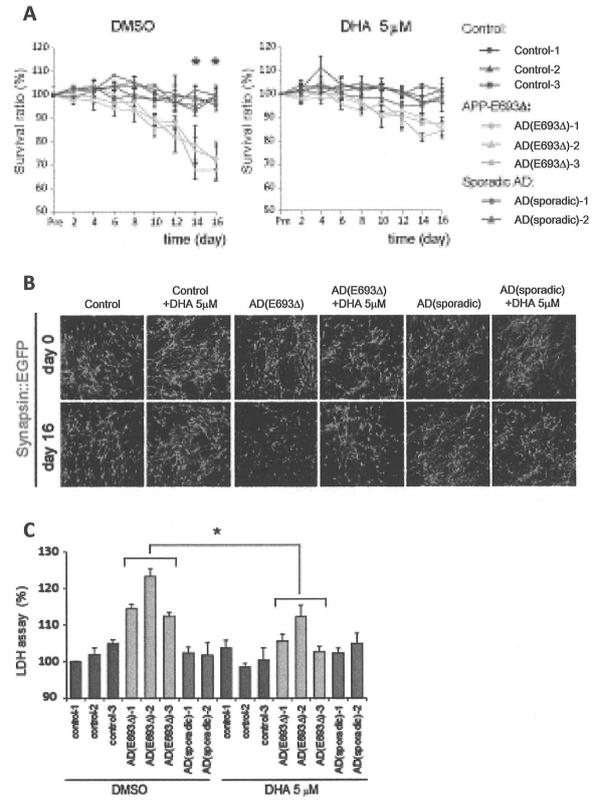
【 12 】



【 1 3 】



【 1 4 】



フロントページの続き

| | | | | |
|-------------|-------|-----------|---------|--------|
| (51)Int.Cl. | | F I | | |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2018.01) | C 1 2 Q | 1/68 A |
| C 0 7 K | 14/47 | (2006.01) | C 0 7 K | 14/47 |

(72)発明者 近藤 孝之
 日本国京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 岩田 修永
 日本国長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 浅井 将
 日本国長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内

審査官 中村 勇介

(56)参考文献 国際公開第2007/127273(WO,A1)
 特開2006-314242(JP,A)
 特開2011-121949(JP,A)
 CHOI S.H. et al., iPSCs to the rescue in Alzheimer's research., Cell Stem Cell., 2012年 3月 2日, Vol.10, No.3, p.235-236
 TOMIYAMA T. et al., A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, J Neurosci., 2011年, Vol.30, No.14, p.4845-4856
 富山貴美, APP E693 変異とA β オリゴマー仮説, 生化学, 2009年, 抄録CD, p.3S7a-2
 NISHITSUJI K. et al., The E693Delta mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid, Am J Pathol, 2009年, Vol.174, No.3, p.957-969
 Robert G.Nagele, Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains, Brain Research, 2003年, Vol.971, p.197-209
 ISRAEL M.A. et al., Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells., Nature, 2012年 1月25日, Vol.482, No.7384, p.216-220

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 U n i P r o t / G e n e S e q
 P u b M e d
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q