

明 細 書

発明の名称：神経突起伸長促進用キット及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、神経突起伸長促進用キット及びその使用に関する。より詳細には、本発明は、神経突起伸長促進用キット、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの製造方法、脊髄損傷治療用ニューロスフェア、及び、神経突起伸長促進剤のスクリーニング方法に関する。本願は、2021年5月27日に、日本に出願された特願2021-089367号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 脊髄損傷は壊滅的な傷害であり、麻痺、感覚障害、神経疼痛及び腸一膀胱機能障害を引き起こす。脊髄損傷の治療に神経幹細胞又は神経前駆細胞を移植する研究が多数報告されているが、移植のための最適な時間枠は脊髄損傷後の亜急性期であると考えられている。そして、慢性期の脊髄損傷を治療することは、グリア瘢痕や空洞の形成等の骨髄内環境の変化のために困難であると考えられている（例えば、非特許文献1を参照。）。しかしながら、ほとんどの脊髄損傷患者は慢性期にあるため、慢性期の脊髄損傷にも適用可能な治療技術の開発が求められている。

[0003] 発明者らは、以前に、ニューロスフェアにDAPT（CAS番号：208255-80-5）を作用させた後に脊髄損傷部位に移植することにより、慢性期の脊髄損傷を治療することができることを明らかにした（例えば、非特許文献2を参照。）。また、DAPTを作用させたニューロスフェアから分化誘導した神経細胞は、神経突起伸長が促進されていること、p38 MAPKのリン酸化が増加していることを明らかにした。（例えば、非特許文献2を参照。）

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Keirstead H. S., et al., Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury, J. Neurosci., 25 (19), 4694-4705, 2005.

非特許文献2: Okubo T., et al., Treatment with a Gamma-Secretase Inhibitor Promotes Functional Recovery in Human iPSC-Derived Transplants for Chronic Spinal Cord Injury, Stem Cell Reports. 11 (6), 1416-1432, 2018.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、多能性幹細胞由来神経細胞の神経突起伸長を促進する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の態様を含む。

[1] γ セクレターゼ阻害剤又は G A D D 4 5 G の発現ベクターを含み、ニューロスフェアに作用させて前記ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導することにより、前記神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させるための、神経突起伸長促進用キット。

[2] 前記 γ セクレターゼ阻害剤が、Compound 34 又は D A P T である、[1] に記載の神経突起伸長促進用キット。

[3] リン酸化 p 3 8 M A P K の脱リン酸化阻害剤を更に含む、[1] 又は [2] に記載の神経突起伸長促進用キット。

[4] 前記リン酸化 p 3 8 M A P K の脱リン酸化阻害剤が、R K - 6 8 2 である、[3] に記載の神経突起伸長促進用キット。

[5] 多能性幹細胞由来ニューロスフェアに、[1] ~ [4] のいずれかに記載の神経突起伸長促進用キットを作用させる工程を含む、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの製造方法。

[6] 対照と比較して、G A D D 4 5 G の発現量又はリン酸化 C D C 2 5 B

の存在量が増加している、脊髄損傷治療用ニューロスフェア。

[7] ニューロスフェアにおけるGADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量を測定する工程を含み、測定された前記GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量が、対照と比較して増加していることが、前記ニューロスフェアが脊髄損傷治療に適していることを示す、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの選別方法。

[8] ニューロスフェアを被験物質の存在下で培養する工程と、前記ニューロスフェアの、GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量を測定する工程と、を含み、前記GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量が、前記被験物質の非存在下と比較して上昇したことが、前記被験物質が神経突起伸長促進剤であることを示す、神経突起伸長促進剤のスクリーニング方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、多能性幹細胞由来神経細胞の神経突起伸長を促進する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1(a)～(g)は、実験例1においてβIIIチューブリンを免疫染色した結果を示す代表的な蛍光顕微鏡写真である。

[図2]図2は、図1(a)～(g)の結果を定量化したグラフである。

[図3]図3は、実験例2において、GADD45Gの発現量を定量した結果を示すグラフである。

[図4]図4(a)～(c)は、実験例3におけるリン酸化p38の免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図5]図5は、実験例3において、リン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図6]図6は、実験例3において、p38の発現量を定量した結果を示すグラフである。

[図7]図7(a)～(c)は、実験例4におけるリン酸化CDC25Bの代表

的な免疫染色の結果を示す写真である。

[図8]図8は、実験例4において、リン酸化CDC25Bの存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図9]図9は、実験例4において、CDC25Bの発現量を定量化した結果を示すグラフである。

[図10]図10は、神経突起伸長に関わるシグナルカスケードを示す図である。

[図11]図11(a)及び(b)は、実験例5におけるリン酸化p38の免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図11(c)は、実験例5において、リン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図12]図12(a)及び(b)は、実験例6におけるリン酸化CDC25Bの免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図12(c)は、実験例6において、リン酸化CDC25Bの存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図13]図13(a)及び(b)は、実験例7における β IIIチューブリンの免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図13(c)は、実験例7において、神経細胞の神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。

[図14]図14(a)及び(b)は、実験例8における β IIIチューブリンの免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図14(c)は、実験例8において、神経細胞の神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。

[図15]図15(a)及び(b)は、実験例9におけるリン酸化p38の免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図15(c)は、実験例9において、リン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図16]図16(a)及び(b)は、実験例9におけるリン酸化CDC25B

の免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図16(c)は、実験例9において、リン酸化CDC25Bの存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図17]図17(a)及び(b)は、実験例10における β IIIチューブリンの免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図17(c)は、実験例10において、神経細胞の神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。

[図18]図18は、実験例11におけるRNA-seq解析により得られた、変動した全遺伝子のクラスター解析図である。

[図19]図19(a)及び(b)は、実験例11において、神経幹細胞及び神経前駆細胞のマーカー遺伝子の発現パターンを解析した結果を示す図である。

[図20]図20(a)～(f)は、実験例12における免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図21]図21(a)は、実験例13において、201B7細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化p38の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図21(b)は、実験例13において、201B7細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図22]図22(a)は、実験例13において、201B7細胞由来のニューロスフェアについて、p38の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図22(b)は、実験例13において、201B7細胞由来のニューロスフェアについて、p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図23]図23(a)は、実験例13において、414C2細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化p38の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図23(b)は、実験例13において、414C2細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化p38の存在量を定量化

した結果を示すグラフである。

[図24]図24(a)は、実験例13において、414C2細胞由来のニューロスフェアについて、p38の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図24(b)は、実験例13において、414C2細胞由来のニューロスフェアについて、p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。

[図25]図25(a)は、実験例14において、201B7細胞由来の神経細胞について、Tauタンパク質の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図25(b)は、実験例14において、201B7細胞由来の神経細胞について、神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。

[図26]図26(a)は、実験例14において、414C2細胞由来の神経細胞について、Tauタンパク質の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図26(b)は、実験例14において、414C2細胞由来の神経細胞について、神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] [神経突起伸長促進用キット]

1実施形態において、本発明は、 γ セクレターゼ阻害剤又はGADD45Gの発現ベクターを含み、ニューロスフェアに作用させて前記ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導することにより、前記神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させるための、神経突起伸長促進用キットを提供する。本実施形態の神経突起伸長促進用キットは、 γ セクレターゼ阻害剤又はGADD45Gの発現ベクターを含み、ニューロスフェアに作用させて前記ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導することにより、前記神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させるための、神経突起伸長促進剤であるということもできる。

[0010] 本明細書において、ニューロスフェアとは、神経幹細胞又は神経前駆細胞

の浮遊増殖培養によって形成される球状の細胞凝集塊を意味する。神経幹細胞とは、自己複製能と神経前駆細胞への分化能を持つ細胞を意味する。また、神経前駆細胞とは、未分化ではあるが神経幹細胞から一段階分化した細胞であり、自身の自己増殖を行い、最終的には神経細胞に分化する細胞のことである。

- [0011] 神経幹細胞又は神経前駆細胞は、多能性幹細胞から分化誘導して得られたものであることが好ましい。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等が挙げられる。多能性幹細胞はヒトの細胞であることが好ましい。
- [0012] 多能性幹細胞を神経幹細胞又は神経前駆細胞に分化誘導する方法は、特に限定されず、通常行われる方法であってよい。例えば、多能性幹細胞を Basic fibroblast growth factor (bFGF) 及び Epidermal Growth Factor (EGF) の少なくとも1種を含有する培地中で浮遊培養することによりニューロスフェアを得ることができる。また、得られたニューロスフェアを単一細胞に解離させて再びbFGFを含有する培地中で浮遊培養し、再びニューロスフェアを形成することを複数回繰り返してもよい。
- [0013] 実施例において後述するように、ニューロスフェアに γ セクレターゼ阻害剤を作用させ、神経細胞に分化誘導すると、神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させることができる。
- [0014] また、実施例において後述するように、ニューロスフェアにGADD45Gの発現ベクターを導入し、GADD45Gを過剰発現させて神経細胞に分化誘導すると、神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させることができる。したがって、ニューロスフェアにGADD45Gの発現ベクターを作用させるとは、ニューロスフェアにGADD45Gの発現ベクターを導入することを意味する。発現ベクターは、ウイルスベクターであってもよいし、プラスミドベクターであってもよいし、トランスポゾンベクターであってもよい。

- [0015] 本実施形態において、対照としては、 γ セクレターゼ阻害剤を作用させていないニューロスフェアから分化誘導した神経細胞、GADD45Gの発現ベクターを導入していないニューロスフェアから分化誘導した神経細胞等が挙げられる。
- [0016] 本明細書において、神経突起伸長が促進されているとは、ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導した場合の神経細胞の神経突起の数が対照と比較して増加していること、及び／又は、神経突起の長さが対照と比較して長いことをいう。
- [0017] γ セクレターゼ阻害剤としては、Compound 34 (CAS番号: 564462-36-8)、DAPT (CAS番号: 208255-80-5) 等が挙げられる。なかでも、Compound 34はDAPTよりも低濃度で神経突起伸長促進効果が得られる点で好ましい。
- [0018] 本実施形態の神経突起伸長促進用キットは、リン酸化p38 MAPKの脱リン酸化阻害剤を更に含むことが好ましい。
- [0019] 実施例において後述するように、発明者らは、Compound 34又はDAPTをニューロスフェアに作用させるとGADD45Gの発現量が上昇し、p38 MAPK (以下、「p38」という場合がある。)のリン酸化が亢進し、更にCDC25Bのリン酸化が亢進することを明らかにした。発明者らは更に、リン酸化p38の脱リン酸化を阻害することにより、p38のリン酸化状態を維持し、リン酸化CDC25Bの存在量を有意に増加させ、神経突起伸長を有意に促進することができることを明らかにした。
- [0020] したがって、 γ セクレターゼ阻害剤とリン酸化p38の脱リン酸化阻害剤を併用することにより、神経細胞の神経突起伸長促進効果を更に向上させることができる。
- [0021] リン酸化p38の脱リン酸化阻害剤としては、RK-682 (CAS番号: 150627-37-5) が挙げられる。
- [0022] 本実施形態の神経突起伸長促進用キットが γ セクレターゼ阻害剤及びp38の脱リン酸化阻害剤を含む場合、両者は別々の容器に収容されていてもよ

く、混合されて同一の容器に収容されていてもよい。γセクレターゼ阻害剤及びp38の脱リン酸化阻害剤が混合されて組成物を形成している場合、本実施形態の神経突起伸長促進用キットは、γセクレターゼ阻害剤及びp38の脱リン酸化阻害剤を含み、ニューロスフェアに作用させて前記ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導することにより、前記神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させるための、神経突起伸長促進用組成物であることができる。

[0023] [脊髄損傷治療用ニューロスフェアの製造方法]

1実施形態において、本発明は、多能性幹細胞由来ニューロスフェアに、上述した神経突起伸長促進用キットを作用させる工程を含む、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの製造方法を提供する。

[0024] 本実施形態の製造方法により、脊髄損傷治療用ニューロスフェアを製造することができる。本実施形態の製造方法において、多能性幹細胞、ニューロスフェア、神経突起伸長促進用キットについては上述したものと同様である。

[0025] 本実施形態の製造方法において、γセクレターゼ阻害剤は、ニューロスフェアの培地に添加した場合にニューロスフェアの細胞分裂を効果的に抑制し、ニューロスフェアに顕著な細胞毒性を示さず、また、培地中で沈殿を形成しない濃度で作用させることが好ましい。

[0026] 例えば、γセクレターゼ阻害剤としてDAPTを用いる場合、ニューロスフェアの培地中のDAPTの終濃度は、10～100μMであることが好ましく、10μM程度であることが更に好ましい。

[0027] また、γセクレターゼ阻害剤としてCompound 34を用いる場合、ニューロスフェアの培地中のCompound 34の終濃度は、1～10μMであることが好ましく、1μM程度であることが更に好ましい。

[0028] ニューロスフェアにγセクレターゼ阻害剤を作用させる期間としては、8～72時間であってもよく、12～48時間であってもよく、20～24時間であってもよい。

- [0029] また、リン酸化 p 3 8 の脱リン酸化阻害剤として R K - 6 8 2 を用いる場合、ニューロスフェアの培地中の R K - 6 8 2 の終濃度は、1 0 ~ 2 0 μ M であることが好ましく、1 0 μ M 程度であることが更に好ましい。
- [0030] ニューロスフェアにリン酸化 p 3 8 の脱リン酸化阻害剤を作用させる期間としては、1 0 ~ 1 0 0 時間が好ましく、2 0 ~ 2 4 時間がより好ましい。
- [0031] γ セクレターゼ阻害剤とリン酸化 p 3 8 の脱リン酸化阻害剤は、同時にニューロスフェアに作用させてもよいし、 γ セクレターゼ阻害剤をニューロスフェアに作用させた後にリン酸化 p 3 8 の脱リン酸化阻害剤を作用させてもよい。
- [0032] [脊髄損傷治療用ニューロスフェア]
- 1 実施形態において、本発明は、対照と比較して、G A D D 4 5 G の発現量又はリン酸化 C D C 2 5 B の存在量が増加している、脊髄損傷治療用ニューロスフェアを提供する。ここで、対照としては、 γ セクレターゼ阻害剤を作用させていないニューロスフェアが挙げられる。
- [0033] 実施例において後述するように、発明者らは、Compound 34 又は D A P T で処理したニューロスフェアは、Compound 34 又は D A P T で処理していないニューロスフェアと比較して、G A D D 4 5 G の発現量が有意に増加しており、リン酸化 p 3 8 の存在量が有意に増加しており、リン酸化 C D C 2 5 B の存在量が有意に増加していることを明らかにした。したがって、本実施形態のニューロスフェアは、神経細胞に分化誘導した場合の神経突起伸長が促進されている。
- [0034] 発明者らはまた、G A D D 4 5 G を過剰発現したニューロスフェアは、リン酸化 p 3 8 の存在量が有意に増加しており、神経細胞に分化誘導した場合の神経突起伸長が有意に促進されることを明らかにした。
- [0035] したがって、本実施形態のニューロスフェアを慢性期脊髄損傷患者の脊髄損傷部位に移植することにより、脊髄損傷を効果的に治療することができる。
- [0036] G A D D 4 5 G の発現量は、m R N A レベルで測定してもよいし、タンパ

ク質レベルで測定してもよい。G A D D 4 5 G の m R N A の発現量は、定量的 R T - P C R 等により測定することができる。G A D D 4 5 G タンパク質の発現量は、細胞の免疫染色、ウエスタンブロッティング等により測定することができる。また、リン酸化 C D C 2 5 B の存在量は、細胞の免疫染色、ウエスタンブロッティング等により測定することができる。

[0037] 本実施形態のニューロスフェアは、上述した脊髄損傷治療用ニューロスフェアの製造方法により製造されたものであることが好ましい。

[0038] [脊髄損傷治療用ニューロスフェアの選別方法]

1 実施形態において、本発明は、ニューロスフェアにおける G A D D 4 5 G の発現量又はリン酸化 C D C 2 5 B の存在量を測定する工程を含み、測定された前記 G A D D 4 5 G の発現量又はリン酸化 C D C 2 5 B の存在量が、対照と比較して増加していることが、前記ニューロスフェアが脊髄損傷治療に適していることを示す、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの選別方法を提供する。ここで、対照としては、 γ セクレターゼ阻害剤を作用させていないニューロスフェアが挙げられる。

[0039] 本実施形態の選別方法により、脊髄損傷治療に適していることが示されたニューロスフェアを、慢性期脊髄損傷患者の脊髄損傷部位に移植することにより、脊髄損傷を効果的に治療することができる。G A D D 4 5 G の発現量の測定方法、リン酸化 C D C 2 5 B の存在量の測定方法については上述したものと同様である。

[0040] [神経突起伸長促進剤のスクリーニング方法]

1 実施形態において、本発明は、ニューロスフェアを被験物質の存在下で培養する工程と、前記ニューロスフェアの、G A D D 4 5 G の発現量又はリン酸化 C D C 2 5 B の存在量を測定する工程と、を含み、前記 G A D D 4 5 G の発現量又はリン酸化 C D C 2 5 B の存在量が、前記被験物質の非存在下と比較して上昇したことが、前記被験物質が神経突起伸長促進剤であることを示す、神経突起伸長促進剤のスクリーニング方法を提供する。

[0041] 実施例において後述するように、発明者らは、G A D D 4 5 G の発現量又

はリン酸化CDC25Bの存在量が増加したニューロスフェアを神経細胞に分化誘導すると、神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させることができることを明らかにした。ここで、対照としては、 γ セクレターゼ阻害剤を作用させていないニューロスフェアから分化誘導した神経細胞が挙げられる。

[0042] したがって、ニューロスフェアを被験物質の存在下で培養した場合に、ニューロスフェアにおけるGADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量を増加させる被験物質は、神経突起伸長促進剤であるということが出来る。

[0043] GADD45Gの発現量の測定方法、リン酸化CDC25Bの存在量の測定方法については上述したものと同様である。

[0044] 被験物質としては特に制限されず、例えば、天然化合物ライブラリ、合成化合物ライブラリ、既存薬ライブラリ、代謝物ライブラリ等が挙げられる。

[0045] 被験物質は、ニューロスフェアに作用させてもよいし、ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導する工程の少なくとも一部で作用させてもよいし、ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導する工程の全部で作用させてもよい。被験物質は、例えば、20～24時間作用させるとよい。

実施例

[0046] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0047] [実験例1]

(γ セクレターゼ阻害剤による神経突起伸長促進効果の検討)

ヒトiPS細胞由来ニューロスフェアに様々な γ セクレターゼ阻害剤を作用させた。続いて、各ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導し、神経突起伸長を検討した。 γ セクレターゼ阻害剤としては、DAPT (CAS番号: 208255-80-5)、Compound 34 (CAS番号: 564462-36-8)、L-685,458 (CAS番号: 292632-98-5)、LY411575 (CAS番号: 209984-57-6)、Su

lindac (CAS番号: 38194-50-2、抗炎症薬でもある。)
、Compound E (CAS番号: 209986-17-4) を使用し
た。

[0048] まず、ヒト iPS 細胞株である 201B7 細胞をニューロスフェアに分化
させた。201B7 細胞の培地に、3 μ M SB431542 (Tocris
社、カタログ番号「301836-41-9」) 及び 150 nM LDN
193189 (StemRD 社、カタログ番号「1062368-24-4
」) を添加し、6 日間処理した。

[0049] 続いて、細胞を解離させ、神経誘導培地中、 1×10^5 個/mL の細胞密度
で細胞培養ディッシュ (製品名「ultralow-attachment
culture dish」、コーニング社) に播種し、低酸素及び湿潤
環境下 (4% O₂、5% CO₂) で 6 日間培養し、ニューロスフェアに分化さ
せた。

[0050] 神経誘導培地としては、下記表 1 に組成を示す MHM 培地に、2% B27
サプリメント (ビタミン A 不含、サーモフィッシャーサイエンティフィック
社、カタログ番号「17504-044」)、20 ng/mL FGF2 (ペ
プロテック社)、10 μ M Y27632 (シグマアルドリッチ社、カ
タログ番号「146986-50-7」)、1 μ M レチノイン酸 (RA、シ
グマ社、カタログ番号「R2625-1G」)、3 μ M CHIR 990
21 (リプロセル社、カタログ番号「04-0004」) 及び 10 μ M S
B431542 (カルбиоケム社、カタログ番号「301836-41-9
」) を添加した培地を使用した。

[0051]

[表1]

Media Hormone Mix(MHM)培地

10×DMEM/F12	50 mL
10×Hormone mix	50 mL
200mM L-Glutamine	5 mL
ペニシリン・ストレプトマイシン	(終濃度0.5%) 5 mL
30% Glucose	10 mL
7.5% NaHCO ₃	7.5 mL
1M HEPES	2.5 mL
水	375 mL
合計	500 mL

10×Hormone Mix

水	652 mL
10×DMEM/F12	80 mL
30% Glucose	16 mL
7.5% NaHCO ₃	12 mL
1M HEPES	4 mL
トランスフェリン	800mg
ブトレン	77mg
インスリン	200mg
2mM プロゲステロン	80 μL
3mM 亜セレン酸ナトリウム	80 μL
合計	764 mL

[0052] 続いて、形成されたニューロスフェアを単一細胞に解離させて、改変した神経誘導培地中で継代し、低酸素環境下（4% O₂）で6日間培養した。改変した神経誘導培地としては、上記表1に組成を示すMHM培地に、2% B27サプリメント（ビタミンA不含、カタログ番号「17504-044」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）、20 ng/mL FGF2（ペプロテック社）、10 μM Y27632（カタログ番号「146986-50-7」、シグマアルドリッチ社）及び1 μM レチノイン酸（RA、カタログ番号「R2625-1G」、シグマ社）を添加した培地を使用した。

[0053] 続いて、ニューロスフェアを各γセクレターゼ阻害剤の存在下で24時間培養した。DAPTは10 μM、Compound 34は1 μM、L-685,458は10 μM、LY411575は10 μM、Sulindacは10 μM、Compound Eは5 μMの終濃度となるようにニューロスフェアの培地に添加した。また、γセクレターゼ阻害剤の非存在下で培養し

た対照群も用意した。

- [0054] 続いて、各ニューロスフェアをポリーＬーオルニチン／フィブロネクチンコートされた４８ウェルチャンバースライド（イワキ社）に播種し、増殖因子を含まない培地中で３７℃、５％ＣＯ₂、９５％空気環境下で１４日間培養し、神経細胞に分化させた。
- [0055] 続いて、得られた各神経細胞を０．１Ｍ ＰＢＳ中、４％パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞マーカーであるβ１１１ーチューブリン、及び、軸索に多く分布するＴαｕタンパク質をそれぞれ免疫染色し、神経突起の長さを測定した。
- [0056] 図１（ａ）～（ｇ）は、β１１１ーチューブリンを免疫染色した各神経細胞の代表的な蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは１００μｍである。図１（ａ）は対照の神経細胞の写真であり、図１（ｂ）はＤＡＰＴ処理したニューロスフェアを分化誘導した神経細胞の写真であり、図１（ｃ）はＣｏｍｐｏｕｎｄ ３４処理したニューロスフェアを分化誘導した神経細胞の写真であり、図１（ｄ）はＬー６８５，４５８処理したニューロスフェアを分化誘導した神経細胞の写真であり、図１（ｅ）はＬＹ４１１５７５処理したニューロスフェアを分化誘導した神経細胞の写真であり、図１（ｆ）はＳｕｌｉｎｄａｃ処理したニューロスフェアを分化誘導した神経細胞の写真であり、図１（ｇ）はＣｏｍｐｏｕｎｄ Ｅ処理したニューロスフェアを分化誘導した神経細胞の写真である。
- [0057] 図２は、図１（ａ）～（ｇ）の結果を定量化したグラフである。図２中、「Ｃｔ １」は対照の結果であることを示し、「ＤＡＰＴ」はＤＡＰＴ処理した結果であることを示し、「Ｃ．３４」はＣｏｍｐｏｕｎｄ ３４処理した結果であることを示し、「Ｌー６８５」はＬー６８５，４５８処理した結果であることを示し、「ＬＹ」はＬＹ４１１５７５処理した結果であることを示し、「Ｓｕｌ ｉ」はＳｕｌ ｉｎｄａｃ処理した結果であることを示し、「Ｃｏｍ．Ｅ」はＣｏｍｐｏｕｎｄ Ｅ処理した結果であることを示す。また、「**」は $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「*」は $p < 0$

、0.5で有意差が存在することを示し、「NS」は有意差が存在しないことを示す。

[0058] その結果、 γ セクレターゼ阻害剤のなかでもDAPT及びCompound 34処理した群で特に神経突起伸長が促進されたことが明らかとなった。

[0059] Tauタンパク質の免疫染色においても、 β IIIチューブリンの免疫染色と同様の結果が得られ、DAPT及びCompound 34処理した群で特に神経突起伸長が促進されたことが明らかとなった。

[0060] [実験例2]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検討1)

《GADD45Gの発現量の検討》

実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェアを作製した。

[0061] また、次の方法により、ヒトiPS細胞株である414C2細胞由来のニューロスフェアを作製した。まず、414C2細胞を、マウス胎児由来線維芽細胞と共に12日間接着培養した。続いて、30日間浮遊培養して胚葉体を形成させた。続いて、凝集した細胞を解離させ、上記表1に組成を示すMHM培地に20 ng/mLのFGF2（ペプロテック社）を添加した培地中で培養し、ニューロスフェアに分化させた。

[0062] 続いて、各iPS細胞由来のニューロスフェアを、DAPT及びCompound 34でそれぞれ処理した。続いて、各群のニューロスフェアから、直径約100 μ mのニューロスフェア1個ずつを選択し、RNA-seq解析を行った。

[0063] 図3は、201B7細胞由来のニューロスフェアをDAPT及びCompound 34でそれぞれ処理してRNA-seq解析を行い、トランスクリプトームデータに基づいてGADD45Gの発現量を定量した結果を示すグラフである。図3中、「Ctl」は対照の結果であることを示し、「DAPT」はDAPT処理した結果であることを示し、「C. 34」はCompound

ound 34 処理した結果であることを示す。また、「***」は $p < 0.001$ で有意差が存在することを示す。

[0064] その結果、DAPT 処理、及び、Compound 34 処理のいずれにおいても GADD45G の発現が有意に上昇したことが明らかとなった。414C2 細胞由来のニューロスフェアについても同様の結果が得られた。

[0065] [実験例 3]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検討 2)

《リン酸化 p38 の検討》

実験例 1 と同様にして、201B7 細胞由来のニューロスフェアを様々な γ セクレターゼ阻害剤で処理した。 γ セクレターゼ阻害剤としては、DAPT、Compound 34、L-685,458、LY411575、Sulindac、Compound E を、実験例 1 と同濃度で使用した。続いて、各ニューロスフェアをパラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化 p38 を免疫染色した。

[0066] 図 4 (a) ~ (c) は、免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 4 (a) は対照の結果であり、図 4 (b) は DAPT 処理した結果であり、図 4 (c) は Compound 34 処理した結果である。図 4 (a) ~ (c) 中、「P-p38」はリン酸化 p38 を示す。また、スケールバーは $100 \mu\text{m}$ である。

[0067] 図 5 は、各 γ セクレターゼ阻害剤で処理したニューロスフェアにおける、リン酸化 p38 の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図 5 中、「Ctl」は対照の結果であることを示し、「DAPT」は DAPT 処理した結果であることを示し、「C. 34」は Compound 34 処理した結果であることを示し、「L-685」は L-685,458 処理した結果であることを示し、「LY」は LY411575 処理した結果であることを示し、「Suli」は Sulindac 処理した結果であることを示し、「Com. E」は Compound E 処理した結果であることを示す。また、「**」は $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「NS」は有意差

が存在しないことを示す。

[0068] 図6は、201B7細胞由来のニューロスフェアをDAPT及びCompound 34でそれぞれ処理してRNA-seq解析を行い、トランスクリプトームデータに基づいてp38の発現量を定量した結果を示すグラフである。図6中、「Ctl」は対照の結果であることを示し、「DAPT」はDAPT処理した結果であることを示し、「C. 34」はCompound 34処理した結果であることを示す。また、「NS」は有意差が存在しないことを示す。

[0069] その結果、DAPT処理又はCompound 34処理により、ニューロスフェアにおけるリン酸化p38の存在量が有意に増加しており、かつ、p38の発現量は増加しないことが明らかとなった。

[0070] [実験例4]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検討3)

《リン酸化CDC25Bの検討》

実験例1と同様にして、201B7細胞由来のニューロスフェアを、様々なγセクレターゼ阻害剤で処理した。γセクレターゼ阻害剤としては、DAPT、Compound 34、L-685,458、LY411575、Sulindac、Compound Eを、実験例1と同濃度で使用した。続いて、各ニューロスフェアをパラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化CDC25Bを免疫染色した。

[0071] 図7(a)～(c)は、DAPT処理及びCompound 34処理した代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図7(a)は対照の結果であり、図7(b)はDAPT処理の結果であり、図7(c)はCompound 34処理の結果である。図7(a)～(c)中、「P-CDC25B」はリン酸化CDC25Bを示す。また、スケールバーは100μmである。

[0072] 図8は、各γセクレターゼ阻害剤で処理したニューロスフェアにおける、リン酸化CDC25Bの存在量を定量化した結果を示すグラフである。図8中、「Ctl」は対照の結果であることを示し、「DAPT」はDAPT処

理した結果であることを示し、「C. 34」はCompound 34 処理した結果であることを示し、「L-685」はL-685, 458 処理した結果であることを示し、「LY」はLY411575 処理した結果であることを示し、「Suli」はSulindac 処理した結果であることを示し、「Com. E」はCompound E 処理した結果であることを示す。また、「*」は $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「**」は $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「NS」は有意差が存在しないことを示す。

[0073] 図9は、201B7細胞由来のニューロスフェアをDAPT及びCompound 34でそれぞれ処理してRNA-seq解析を行い、トランスクリプトームデータに基づいてCDC25Bの発現量を定量した結果を示すグラフである。図9中、「Ctl」は対照の結果であることを示し、「DAPT」はDAPT処理した結果であることを示し、「C. 34」はCompound 34 処理した結果であることを示す。また、「***」は $p < 0.001$ で有意差が存在することを示す。

[0074] その結果、DAPT処理又はCompound 34 処理により、ニューロスフェアにおけるリン酸化CDC25Bの存在量が有意に増加したことが明らかとなった。また、CDC25Bの発現量も若干増加したことが明らかとなった。

[0075] 以上の結果から、発明者らは、図10に示すシグナルカスケードが神経突起伸長に関わっていると仮説を立てた。

[0076] [実験例5]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証1)

《GADD45Gのノックダウン》

図10に示すシグナルカスケードが、実際に神経突起伸長に関わっているか否かを検証した。まず、実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアにGADD45Gに対するsiRNA（カタログ番号「4392420

」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を導入した。s i R N A の導入には、市販のキット(製品名「H i P e r F e c t T r a n s f e c t i o n R e a g e n t」、カタログ番号「301705」、キアゲン社)を使用した。また、対照としてコントロールs i R N A (カタログ番号「4390844」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を導入した群も用意した。

[0077] 続いて、各ニューロスフェアを、D A P T 及びC o m p o u n d 34の存在下でそれぞれ24時間培養した。D A P T 及びC o m p o u n d 34は、実験例1と同濃度で使用した。

[0078] 続いて、各ニューロスフェアをパラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化p38を免疫染色した。図11(a)及び(b)は、免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図11(a)はコントロールs i R N A を導入したうえでD A P T 処理を行った対照の結果であり、図11(b)はG A D D 4 5 G に対するs i R N A を導入したうえでD A P T 処理を行った結果である。スケールバーは100 μ mである。図11(a)及び(b)中、「P-p38」はリン酸化p38を示す。

[0079] 図11(c)は、各群のリン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図11(c)中、「D A P T」はコントロールs i R N A を導入したうえでD A P T 処理を行った対照の結果であることを示し、「D A P T + s i R N A (G A D D 4 5 G)」はG A D D 4 5 G に対するs i R N A を導入したうえでD A P T 処理を行った結果であることを示す。また、「**」は $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。

[0080] その結果、G A D D 4 5 G に対するs i R N A を導入したうえでD A P T 処理を行うと、ニューロスフェアにおけるリン酸化p38の存在量の増加が有意に抑制されたことが明らかとなった。また、C o m p o u n d 34を用いた場合においてもD A P T を用いた場合と同様の結果が得られた。すなわち、G A D D 4 5 G に対するs i R N A を導入したうえでC o m p o u n d 34処理を行うと、ニューロスフェアにおけるリン酸化p38の存在量

の増加が有意に抑制されたことが明らかとなった。

[0081] [実験例 6]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証 2)

《SB203580の添加がCDC25Bのリン酸化に及ぼす影響の検討》

実験例 1 と同様にして、ヒト iPS 細胞株である 201B7 細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアを、DAPT 及び Compound 34 の存在下でそれぞれ 24 時間培養した。DAPT 及び Compound 34 は、実験例 1 と同濃度で使用した。また、この時に、p38 阻害剤である SB203580 (CAS 番号: 152121-47-6) を終濃度 20 μ M で培地に添加した。また、対照として SB203580 を添加しない群も用意した。続いて、各ニューロスフェアをパラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化 CDC25B を免疫染色した。

[0082] 図 12 (a) 及び (b) は、免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 12 (a) は SB203580 の非存在下で DAPT 処理を行った対照の結果であり、図 12 (b) は SB203580 の存在下で DAPT 処理を行った結果である。スケールバーは 100 μ m である。図 12 (a) 及び (b) 中、「P-CDC25B」はリン酸化 CDC25B を示す。

[0083] 図 12 (c) は、各群のリン酸化 CDC25B の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図 12 (c) 中、「DAPT」は SB203580 の非存在下で DAPT 処理を行った対照の結果であることを示し、「DAPT + SB203580」は SB203580 の存在下で DAPT 処理を行った結果であることを示す。また、「*」は $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0084] その結果、SB203580 の存在下で DAPT 処理を行うと、ニューロスフェアにおけるリン酸化 CDC25B の存在量の増加が有意に抑制されたことが明らかとなった。また、Compound 34 を用いた場合においても DAPT を用いた場合と同様の結果が得られた。すなわち、SB203580 の存在下 Compound 34 処理を行うと、ニューロスフェアに

おけるリン酸化CDC25Bの存在量の増加が有意に抑制されたことが明らかとなった。

[0085] [実験例7]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証3)

《SB203580の添加が神経突起伸長に及ぼす影響の検討》

実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアを、DAPT及びCompound 34の存在下でそれぞれ24時間培養した。DAPT及びCompound 34は、実験例1と同濃度で使用した。また、この時に、p38阻害剤であるSB203580(CAS番号:152121-47-6)を終濃度20 μ Mで培地に添加した。また、対照としてSB203580を添加しない群も用意した。

[0086] 続いて、各ニューロスフェアをポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンコートされた48ウェルチャンバースライド(イワキ社)に播種し、増殖因子を含まない培地中で37℃、5%CO₂、95%空気環境下で14日間培養し、神経細胞に分化させた。

[0087] 続いて、得られた各神経細胞を0.1M PBS中、4%パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞マーカーである β III-チューブリン、及び、軸索に多く分布するTauタンパク質をそれぞれ免疫染色し、神経突起の長さを測定した。

[0088] 図13(a)及び(b)は、 β III-チューブリンの免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図13(a)はSB203580の非存在下でDAPT処理を行った対照の結果であり、図13(b)はSB203580の存在下でDAPT処理を行った結果である。スケールバーは100 μ mである。

[0089] 図13(c)は、各群の神経細胞の神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。図13(c)中、「DAPT」はSB203580の非存在下でDAPT処理を行った対照の結果であることを示し、「DAPT+SB2

03580」はSB203580の存在下でDAPT処理を行った結果であることを示す。また、「*」は $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0090] その結果、SB203580の存在下でDAPT処理を行うと、神経突起伸長が有意に抑制されたことが明らかとなった。また、Compound 34を用いた場合においてもDAPTを用いた場合と同様の結果が得られた。すなわち、SB203580の存在下でCompound 34処理を行うと、神経突起伸長が有意に抑制されたことが明らかとなった。

[0091] [実験例8]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証4)

《CDC25Bのノックダウン》

実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアにCDC25Bに対するsiRNA（カタログ番号「4390824」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を導入した。siRNAの導入には、市販のキット（製品名「HiPerFect Transfection Reagent」、カタログ番号「301705」、キアゲン社）を使用した。また、対照としてコントロールsiRNA（カタログ番号「4390844」、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を導入した群も用意した。

[0092] 続いて、各ニューロスフェアを、DAPT及びCompound 34の存在下でそれぞれ24時間培養した。DAPT及びCompound 34は、実験例1と同濃度で使用した。

[0093] 続いて、各ニューロスフェアをポリ-L-オルニチン／フィブロネクチンコートされた48ウェルチャンバースライド（イワキ社）に播種し、増殖因子を含まない培地中で37℃、5%CO₂、95%空気環境下で14日間培養し、神経細胞に分化させた。

[0094] 続いて、得られた各神経細胞を、4%パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞マーカーであるβIII-チューブリン、及び、軸索に多く分布するT

a u タンパク質をそれぞれ免疫染色し、神経突起の長さを測定した。

[0095] 図14(a)及び(b)は、免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図14(a)はコントロール s i R N A を導入したうえで D A P T 処理を行った対照の結果であり、図14(b)は C D C 2 5 B に対する s i R N A を導入したうえで D A P T 処理を行った結果である。スケールバーは $100\mu\text{m}$ である。

[0096] 図14(c)は、各群の神経細胞の神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。図14(c)中、「D A P T + s i R N A (c o n t r o l)」はコントロール s i R N A を導入したうえで D A P T 処理を行った対照の結果であることを示し、「D A P T + s i R N A (C D C 2 5 B)」は C D C 2 5 B に対する s i R N A を導入したうえで D A P T 処理を行った結果であることを示す。また、「*」は $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0097] その結果、C D C 2 5 B に対する s i R N A を導入したうえで D A P T 処理を行うと、神経突起伸長が有意に抑制されたことが明らかとなった。また、T a u タンパク質の免疫染色においても、 β I I I - チュブリンの免疫染色と同様の結果が得られ、C D C 2 5 B に対する s i R N A を導入したうえで D A P T 処理を行うと、神経突起伸長が有意に抑制されたことが明らかとなった。

[0098] また、 β I I I - チュブリン及び T a u タンパク質の免疫染色の結果から、C D C 2 5 B をノックダウンすると、神経細胞への分化は阻害されていないが、神経突起伸長が阻害されていることが明らかとなった。

[0099] また、C o m p o u n d 34 を用いた場合においても D A P T を用いた場合と同様の結果が得られた。すなわち、C D C 2 5 B に対する s i R N A を導入したうえで C o m p o u n d 34 処理を行うと、神経突起伸長が有意に抑制されたことが明らかとなった。

[0100] また、D A P T を用いた場合においても、C o m p o u n d 34 を用いた場合においても、C D C 2 5 B のノックダウンにより神経突起伸長が約 7

5%抑制された。この結果は、CDC25Bが神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの最下流のエフェクターであることが考えられた。

[0101] [実験例9]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証5)

《RK-682がp38及びCDC25Bのリン酸化に及ぼす影響の検討》

p38のリン酸化を維持、促進することでCDC25Bのリン酸化が上方制御されるか否かを検討した。RK-682 (CAS番号: 150627-37-5) はストレプトマイセス属細菌から単離されたチロシンリン酸化の脱リン酸化阻害剤である。RK-682は、リン酸化p38の脱リン酸化を抑制することにより、p38を活性化された状態に維持する作用を有する。また、RK-682にはCDC25Bの脱リン酸化阻害効果はないとされている。

[0102] 実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアを、終濃度20 μ MのRK-682の存在下で24時間培養した。また、対照としてRK-682を添加しない群も用意した。続いて、各ニューロスフェアをパラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化p38及びリン酸化CDC25Bをそれぞれ免疫染色した。

[0103] 図15(a)及び(b)は、リン酸化p38の免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図15(a)は対照の結果であり、図15(b)はRK-682処理を行った結果である。スケールバーは100 μ mである。図15(a)及び(b)中、「P-p38」はリン酸化p38を示す。

[0104] 図15(c)は、各群のリン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図15(c)中、「Control」はRK-682処理を行っていない対照の結果であることを示し、「RK-682」はRK-682処理を行った結果であることを示す。また、「*」は $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0105] その結果、RK-682処理を行うと、ニューロスフェアにおけるリン酸

化 p 3 8 の存在量が有意に増加したことが明らかとなった。

[0106] また、図 1 6 (a) 及び (b) は、リン酸化 CDC 2 5 B の免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図 1 6 (a) は対照の結果であり、図 1 6 (b) は RK - 6 8 2 処理を行った結果である。スケールバーは 1 0 0 μ m である。図 1 6 (a) 及び (b) 中、「P - CDC 2 5 B」はリン酸化 CDC 2 5 B を示す。

[0107] 図 1 6 (c) は、各群のリン酸化 CDC 2 5 B の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図 1 6 (c) 中、「Control」は RK - 6 8 2 処理を行っていない対照の結果であることを示し、「RK - 6 8 2」は RK - 6 8 2 処理を行った結果であることを示す。また、「*」は $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0108] その結果、RK - 6 8 2 処理を行うと、ニューロスフェアにおけるリン酸化 CDC 2 5 B の存在量が有意に増加したことが明らかとなった。

[0109] [実験例 1 0]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証 6)

《RK - 6 8 2 が神経突起伸長に及ぼす影響の検討》

実験例 1 と同様にして、ヒト i P S 細胞株である 2 0 1 B 7 細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアを、終濃度 2 0 μ M の RK - 6 8 2 の存在下で 2 4 時間培養した。また、対照として RK - 6 8 2 を添加しない群も用意した。

[0110] 続いて、各ニューロスフェアをポリー L - オルニチン / フィブロネクチンコートされた 4 8 ウェルチャンバースライド (イワキ社) に播種し、増殖因子を含まない培地中で 3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ 、 9 5 % 空気環境下で 1 4 日間培養し、神経細胞に分化させた。

[0111] 続いて、得られた各神経細胞を 0.1 M P B S 中、4 % パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞マーカーである β 1 1 1 - チュブリン、及び、軸索に多く分布する Tau タンパク質をそれぞれ免疫染色し、神経突起の長さを測定した。

[0112] 図17(a)及び(b)は、 β III-チューブリンの免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。図17(a)は対照の結果であり、図17(b)はRK-682処理を行った結果である。スケールバーは100 μ mである。

[0113] 図17(c)は、各群の神経細胞の神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。図17(c)中、「Control」はRK-682処理を行っていない対照の結果であることを示し、「RK-682」はRK-682処理を行った結果であることを示す。また、「**」は $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。

[0114] その結果、RK-682処理を行うと、神経突起伸長が有意に促進されたことが明らかとなった。また、Tauタンパク質の免疫染色においても、 β III-チューブリンの免疫染色と同様の結果が得られ、神経突起伸長が有意に促進されたことが明らかとなった。

[0115] 実験例5～9の結果から、図10に示す神経突起伸長に関わるシグナルカスケードが正しいことが実証された。また、RK-682は図10に示すシグナルカスケードを利用して神経突起伸長を促進する化合物であることが示された。

[0116] [実験例11]

(遺伝子発現パターンの解析)

上述したように、発明者らは、DAPT又はCompound 34をニューロスフェアに作用させ、神経細胞に分化誘導した場合の神経突起伸長促進に関わるシグナルカスケードを実証した。

[0117] そこで、DAPT及びCompound 34の両化合物間で、ニューロスフェアに作用させた場合の網羅的な遺伝子の転写レベルの変動を、RNA-seq解析により検討した。

[0118] 実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェア、及び、ヒトiPS細胞株である414C2細胞由来のニューロスフェアをそれぞれ作製した。続いて、各iPS細胞由来のニューロス

フェアを、DAPT及びCompound 34でそれぞれ処理した。続いて、各群のニューロスフェアから、直径約100 μ mのニューロスフェア1個ずつを選択し、RNA-seq解析を行った。

[0119] 図18は、RNA-seq解析により得られた、変動した全遺伝子のクラスター解析図である。図18中、「B7」は201B7細胞由来のニューロスフェアの結果であることを示し、「414C2」は414C2細胞由来のニューロスフェアの結果であることを示し、「Control」はDAPTもCompound 34も作用させていない対照の結果であることを示し、「DAPT」はDAPTを作用させた結果であることを示し、「C34」はCompound 34を作用させた結果であることを示す。

[0120] その結果、201B7細胞由来のニューロスフェア及び414C2細胞由来のニューロスフェアのいずれにおいても、DAPT処理後の遺伝子発現変動パターンと、Compound 34処理後の遺伝子発現変動パターンは、クラスターとして相同な関係であることが明らかとなった。

[0121] 図19(a)及び(b)は、201B7細胞由来のニューロスフェアについて、神経幹細胞及び神経前駆細胞のマーカー遺伝子である、NESTIN、MUSASHI1、HES1、SOX2、SOX3、PAX6、FABP7及びID1の発現パターンを解析した結果を示す図である。図19中、「B7」は201B7細胞由来のニューロスフェアの結果であることを示し、「Control」はDAPTもCompound 34も作用させていない対照の結果であることを示し、「DAPT」はDAPTを作用させた結果であることを示し、「C34」はCompound 34を作用させた結果であることを示す。

[0122] その結果、上記遺伝子について、DAPT処理後の遺伝子発現変動パターンと、Compound 34処理後の遺伝子発現変動パターンは、クラスターとして相同な関係であることが明らかとなった。また、414C2細胞由来のニューロスフェアについても同様の結果が得られた。

[0123] [実験例12]

(神経細胞におけるリン酸化CDC25Bの発現の検討)

ニューロスフェアをDAPT又はCompound 34で処理し、神経細胞に分化誘導した後におけるリン酸化CDC25Bの存在量を検討した。

[0124] 実験例1と同様にして、ヒトiPS細胞株である201B7細胞由来のニューロスフェアを作製した。続いて、ニューロスフェアを、DAPT及びCompound 34の存在下でそれぞれ24時間培養した。DAPT及びCompound 34は、実験例1と同濃度で使用した。

[0125] 続いて、各ニューロスフェアをポリーレーオルニチン／フィブロネクチンコートされた48ウェルチャンバースライド（イワキ社）に播種し、増殖因子を含まない培地中で37℃、5%CO₂、95%空気環境下で14日間培養し、神経細胞に分化させた。

[0126] 続いて、得られた各神経細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞マーカーであるβIII-チューブリン、及び、リン酸化CDC25Bをそれぞれ免疫染色した。

[0127] 図20(a)～(f)は、免疫染色の代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは100μmである。図20(a)及び(b)はDAPT処理もCompound 34処理も行っていない対照の結果であり、図20(c)及び(d)はDAPT処理を行った結果であり、図20(e)及び(f)はCompound 34処理を行った結果である。また、図20(a)、(c)、(e)はβIII-チューブリンの免疫染色の結果であり、図20(b)、(d)、(f)はリン酸化CDC25Bの免疫染色の結果である。

[0128] その結果、ニューロスフェアをDAPT又はCompound 34で処理すると、非処理の場合と比較して、神経細胞に分化誘導した後においてもリン酸化CDC25Bの存在量が上昇したことが明らかとなった。

[0129] [実験例13]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証7)

《GADD45Gの過剰発現がp38のリン酸化に及ぼす影響の検討》

レンチウイルスベクターを用いて、ヒト i P S 細胞株である、201B7 細胞及び 414C2 細胞由来のニューロスフェアに GADD45G を過剰発現させ、p38 のリン酸化に及ぼす影響を検討した。

[0130] まず、実験例 1 と同様にして、201B7 細胞由来のニューロスフェア、及び、414C2 細胞由来のニューロスフェアをそれぞれ作製した。続いて、レンチウイルスベクターを用いて、各群のニューロスフェアに GADD45G 発現用コンストラクトを導入し、GADD45G を過剰発現させた。また、対照として空のレンチウイルスベクターを導入した群も用意した。続いて、各ニューロスフェアをパラホルムアルデヒドで固定し、リン酸化 p38 及び p38 を免疫染色した。

[0131] 図 21 (a) は、201B7 細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化 p38 の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 100 μ m である。図 21 (a) 中、「Control」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」は GADD45G を過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示し、「Phospho-p38」はリン酸化 p38 を検出した結果であることを示す。「Venus」を空のレンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。また、「EGFP」を GADD45G 発現用レンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。

[0132] 図 21 (b) は、各群の 201B7 細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化 p38 の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図 21 (b) 中、「Ctl」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」は GADD45G を過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示す。また、「***」は $p < 0.001$ で有意差が存在することを示す ($n = 3$)。

[0133] 図 22 (a) は、201B7 細胞由来のニューロスフェアについて、p38 の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは 100 μ m である。図 22 (a) 中、「Control」は対照のニ

ニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示し、「p38」はp38を検出した結果であることを示す。「Venus」を空のレンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。また、「EGFP」をGADD45G発現用レンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。

[0134] 図22(b)は、各群の201B7細胞由来のニューロスフェアについて、p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図22(b)中、「Ctl」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示す。また、「NS」は有意差がないことを示す($n=3$)。

[0135] 図23(a)は、414C2細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化p38の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは100 μ mである。図23(a)中、「Control」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示し、「Phospho-p38」はリン酸化p38を検出した結果であることを示す。「Venus」を空のレンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。また、「EGFP」をGADD45G発現用レンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。

[0136] 図23(b)は、各群の414C2細胞由来のニューロスフェアについて、リン酸化p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図23(b)中、「Ctl」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示す。また、「**」は $p<0.01$ で有意差が存在することを示す($n=3$)。

[0137] 図24(a)は、414C2細胞由来のニューロスフェアについて、p38の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケール

バーは100 μ mである。図24(a)中、「Control」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示し、「p38」はp38を検出した結果であることを示す。「Venus」を空のレンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。また、「EGFP」をGADD45G発現用レンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。

[0138] 図24(b)は、各群の414C2細胞由来のニューロスフェアについて、p38の存在量を定量化した結果を示すグラフである。図24(b)中、「Ctl」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示す。また、「NS」は有意差がないことを示す(n=3)。

[0139] その結果、GADD45Gを過剰発現により、ニューロスフェアにおけるリン酸化p38の存在量が有意に増加し、かつ、p38の発現量は増加しないことが明らかとなった。

[0140] [実験例14]

(神経突起伸長に関わるシグナルカスケードの検証8)

《GADD45Gの過剰発現が神経突起伸長に及ぼす影響の検討》

レンチウイルスベクターを用いて、ヒトiPS細胞株である、201B7細胞及び414C2細胞由来のニューロスフェアにGADD45Gを過剰発現させ、神経突起伸長に及ぼす影響を検討した。

[0141] まず、実験例1と同様にして、201B7細胞由来のニューロスフェア、及び、414C2細胞由来のニューロスフェアをそれぞれ作製した。続いて、レンチウイルスベクターを用いて、各群のニューロスフェアにGADD45G発現用コンストラクトを導入し、GADD45Gを過剰発現させた。また、対照として空のレンチウイルスベクターを導入した群も用意した。

[0142] 続いて、各ニューロスフェアをポリーレーオルニチン／フィブロネクチンコートされた48ウェルチャンバースライド(イワキ社)に播種し、増殖因

子を含まない培地中で37℃、5%CO₂、95%空気環境下で14日間培養し、神経細胞に分化させた。

[0143] 続いて、得られた各神経細胞を0.1M PBS中、4%パラホルムアルデヒドで固定し、Tauタンパク質を免疫染色し、神経突起の長さを測定した。

[0144] 図25(a)は、201B7細胞由来の神経細胞について、Tauタンパク質の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは100μmである。図25(a)中、「Control」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示す。「Venus」を空のレンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。また、「EGFP」をGADD45G発現用レンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。

[0145] 図25(b)は、各群の201B7細胞由来の神経細胞について、神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。図25(b)中、「Ctl」は対照の神経細胞の結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現した神経細胞の結果であることを示す。また、「**」はp<0.01で有意差が存在することを示す(n=3)。

[0146] 図26(a)は、414C2細胞由来の神経細胞について、Tauタンパク質の免疫染色を行った代表的な結果を示す蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは100μmである。図26(a)中、「Control」は対照のニューロスフェアの結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現したニューロスフェアの結果であることを示す。「Venus」を空のレンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。また、「EGFP」をGADD45G発現用レンチウイルスベクターのレポーターとして使用した。

[0147] 図26(b)は、各群の414C2細胞由来の神経細胞について、神経突起長を定量化した結果を示すグラフである。図26(b)中、「Ctl」は

対照の神経細胞の結果であることを示し、「GADD45G OE」はGADD45Gを過剰発現した神経細胞の結果であることを示す。また、「**」は $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す($n = 3$)。

[0148] その結果、ニューロスフェアにGADD45Gを過剰発現させると、神経細胞に分化誘導した場合の神経突起伸長が有意に促進されたことが明らかとなった。

[0149] 実験例9及び10において、ニューロスフェアにRK-682を投与することにより、p38/CDC25Bのシグナルが増強され、神経突起伸長が促進されたことが確認された。本実験例により、より上流のGADD45Gの発現をレンチウイルスで増加させても同様の結果が得られることが明らかとなった。

[0150] 以上の結果から、化合物投与によっても、遺伝子工学的にも、図10に示すシグナルカスケードが正しいことが確認された。

産業上の利用可能性

[0151] 本発明によれば、多能性幹細胞由来神経細胞の神経突起伸長を促進する技術を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] γ セクレターゼ阻害剤又はGADD45Gの発現ベクターを含み、ニューロスフェアに作用させて前記ニューロスフェアを神経細胞に分化誘導することにより、前記神経細胞の神経突起伸長を、対照と比較して促進させるための、神経突起伸長促進用キット。
- [請求項2] 前記 γ セクレターゼ阻害剤が、Compound 34又はDAPTである、請求項1に記載の神経突起伸長促進用キット。
- [請求項3] リン酸化p38 MAPKの脱リン酸化阻害剤を更に含む、請求項1に記載の神経突起伸長促進用キット。
- [請求項4] 前記リン酸化p38 MAPKの脱リン酸化阻害剤が、RK-682である、請求項3に記載の神経突起伸長促進用キット。
- [請求項5] 多能性幹細胞由来ニューロスフェアに、請求項1～4のいずれか一項に記載の神経突起伸長促進用キットを作用させる工程を含む、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの製造方法。
- [請求項6] 対照と比較して、GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量が増加している、脊髄損傷治療用ニューロスフェア。
- [請求項7] ニューロスフェアにおけるGADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量を測定する工程を含み、測定された前記GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量が、対照と比較して増加していることが、前記ニューロスフェアが脊髄損傷治療に適していることを示す、脊髄損傷治療用ニューロスフェアの選別方法。
- [請求項8] ニューロスフェアを被験物質の存在下で培養する工程と、
前記ニューロスフェアの、GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量を測定する工程と、を含み、
前記GADD45Gの発現量又はリン酸化CDC25Bの存在量が、前記被験物質の非存在下と比較して上昇したことが、前記被験物質が神経突起伸長促進剤であることを示す、神経突起伸長促進剤のスクリーニング方法。