

明 細 書

発明の名称：

ヒトアストロサイト細胞集団、細胞集団培養物、ヒトアストロサイト細胞集団の製造方法、および被験物質の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトアストロサイト細胞集団、細胞集団培養物およびヒトアストロサイト細胞集団の製造方法に関する。さらに本発明は、製造したヒトアストロサイト細胞集団を用いた被験物質の評価方法に関する。さらに本発明は、製造したヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む、共培養物の製造方法および共培養物に関する。

背景技術

[0002] 脳を構成するグリア細胞の一種であるアストロサイトは、ニューロンへの栄養供給、シナプス形成や除去等、中枢神経系の恒常性を維持する様々な役割を果たしており、疾病のメカニズム解明や創薬の観点から注目を集めている。

[0003] 神経細胞やグリア細胞から構成される中枢神経系の細胞はヒト脳から取得することが難しく、中枢神経系の研究の多くにおいてはラットやマウスの細胞が使われていた。しかし近年は i P S 細胞の発明によりヒトの神経細胞やグリア細胞を比較的容易に取得できるようになり、これらの細胞はヒトの神経変性疾患の研究に大変有用である（非特許文献 1～3）。

[0004] 神経変性疾患の研究を行う上では、疾患の最大リスクファクターである加齢に関連した細胞老化の影響を考慮することが非常に重要である（非特許文献 4）。アストロサイトの細胞老化についても神経変性疾患に関与することが知られており（非特許文献 5～7）、老化アストロサイトを再現する研究がなされている（非特許文献 8）。しかしながら、i P S 細胞ではリプログラムにより老化がリセットされてしまうことから（非特許文献 9～10）

、老化の再現は困難であると考えられている。

[0005] 非特許文献11には、iPS細胞由来アストロサイトについて、疾患関連遺伝子に変異のある患者由来iPS細胞からアストロサイトを作製することで老化を再現する研究がなされている。しかしながら、非特許文献11の方法ではアストロサイトに完全に分化誘導した後に長期間培養しているため、老化アストロサイトが得られるかどうか不明である。

[0006] また、アストロサイトの細胞培養方法は血清を含む培地にて培養することが一般的であるが、最近ではアストロサイトへの血清の暴露が不可逆的な活性化を引き起こすことが知られている（非特許文献12）。脳内のアストロサイトは血液脳関門の存在により血清に暴露していない状態にあり（非特許文献13）、アストロサイトの機能を研究する上で血清を含まない条件にて培養することが重要であると考えられている（非特許文献14）。

[0007] 特許文献1および特許文献2には、血清を含まない条件でアストロサイトを培養する方法が記載されている。しかしながら、特許文献1の方法ではアストロサイト以外のニューロンやオリゴデンドロサイトにも分化することが記載されており、さらに分化したアストロサイトが老化しているかどうかは不明である。また、特許文献2の方法では神経傷害性を有するA1アストロサイトが得られることが記載されているが、神経傷害性を有さない老化アストロサイトが得られるかどうかは不明である。

[0008] 特許文献3には、ヒト細胞からアストロサイト様細胞を調製する方法が記載されている。しかしながら、特許文献3の方法では短い期間でアストロサイトに分化させていることから、老化アストロサイトが得られるかどうかは不明である。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2021/045217号パンフレット

特許文献2：国際公開第2019/235576号パンフレット

特許文献3：国際公開第2017/057523号パンフレット

非特許文献

- [0010] 非特許文献1: Okanoら、Molecular Brain、7巻、22号、1～12頁、2014年
- 非特許文献2: Valadez-Barbaraら、Regenerative Therapy、15巻、332～339頁、2020年
- 非特許文献3: Zengら、STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE、3巻、1418～1428頁、2014年
- 非特許文献4: Kritsilisら、International Journal of Molecular Sciences、19巻、10号、2937、1～37頁、2018年
- 非特許文献5: Turnquistら、Cell Death and Differentiation、23巻、1515～1528頁、2016年
- 非特許文献6: Hanら、Frontiers in Aging Neuroscience、12巻、148号、2020年
- 非特許文献7: Vazquez-Villasenorら、Neuropathology and Applied Neurobiology、46巻、171～185頁、2020年
- 非特許文献8: Simmnacherら、Experimental Neurology、334巻、113466号、1～13頁、2020年
- 非特許文献9: Lapassetら、GENES & DEVELOPMENT、25巻、21号、2248～2253頁、2011年
- 非特許文献10: Millerら、Cell Stem Cell、13巻、6号、691～705頁、2013年
- 非特許文献11: Birgerら、EBioMedicine、50巻、274～289頁、2019年
- 非特許文献12: Fooら、Neuron、71巻、5号、799～811頁、2011年
- 非特許文献13: Stokumら、Neurochemical Research

rch、40巻、317～328頁、2015年

非特許文献14: Jiaら、Journal of Neuroscience Methods、307巻、240～247頁、2018年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] ヒトの老化アストロサイトは創薬研究の面から価値が大きく、ヒトの老化アストロサイトを容易に入手するための方法が求められている。上記の通り、アストロサイトへの分化誘導に関して一定の成果が得られているが、ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞から老化したヒトアストロサイトへ確実に誘導するための方法は見出されていない。

[0012] したがって、本発明は、ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞から誘導した老化したヒトアストロサイトを含む、ヒトアストロサイト細胞集団を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記したヒトアストロサイト細胞集団を含む細胞集団培養物、および上記したヒトアストロサイト細胞集団の製造方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記したヒトアストロサイト細胞集団を用いた、被験物質の評価方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記したヒトアストロ細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む、共培養物の製造方法および共培養物を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞を増殖条件下で老化させることによって、上記ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞を老化したヒトアストロサイトに誘導できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

[0014] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

<1> ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞から分化誘導された

ヒトアストロサイト細胞集団であって、

上記ヒトアストロサイト細胞集団が少なくとも90%のヒトアストロサイトを含み、

上記ヒトアストロサイトは、

- a) CDKN2Aが陽性であり；
- b) IGFBP5、NNMT、HLA-DRB1およびHLA-DRB5からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であり；
- c) 参照遺伝子のGAPDHで規格化したC3の発現量が0.05 copies/copies以下である、

ヒトアストロサイト細胞集団。

<2> 上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したCDKN2Aの発現量が0.004 copies/copies以上である、<1>に記載のヒトアストロサイト細胞集団。

<3> 上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したIGFBP5の発現量が0.1 copies/copies以上である、<1>または<2>に記載のヒトアストロサイト細胞集団。

<4> 上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したNNMTの発現量が0.005 copies/copies以上である、<1>または<2>に記載のヒトアストロサイト細胞集団。

<5> 上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したHLA-DRB5の発現量が0.1 copies/copies以上である、<1>または<2>に記載のヒトアストロサイト細胞集団。

<6> γ H2AXおよびSA- β -GALからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性である、<1>~<5>に記載のヒトアストロサイト細胞集団。

<7> 上記ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞が、健常者由来のヒトiPS細胞から作製したアストロサイト前駆細胞である、<1>~<6>のいずれか1つに記載の細胞集団。

<8> <1>~<7>のいずれか1つに記載のヒトアストロサイト細胞集団と、実質的に血清を含まない培地とを含む、細胞集団培養物。

<9> BMP4（骨形成因子）およびCNTF（毛様体神経栄養因子）からなる群より選択される少なくとも1つの因子をさらに含む、<8>に記載の細胞集団培養物。

<10> ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞を増殖させることと、

増殖させたヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞を分化誘導させることを含む、

<1>~<7>のいずれか1つに記載のアストロサイト細胞集団の製造方法。

<11> <1>~<7>のいずれか1つに記載のヒトアストロサイト細胞集団と、被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法。

<12> <1>~<7>のいずれか1つに記載のヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記ヒトアストロサイト細胞集団と、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、共培養物の製造方法。

<13> 上記神経細胞、および上記ミクログリアが、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである、<12>に記載の製造方法。

<14> 上記ヒト由来の多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、<12>または<13>に記載の製造方法。

<15> 上記共培養物が、二次元培養物または三次元培養物である、<12>~<14>のいずれか1つに記載の製造方法。

<16> <12>から<15>のいずれか1つに記載の製造方法により得られる、<1>~<7>のいずれか1つに記載のヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む共培養物。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞から老化したヒトアストロサイト細胞集団を製造することができる。本発明のヒトアストロサイト細胞集団および本発明の被験物質の評価方法は、創薬研究等において有用である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 図1は老化したヒトアストロサイトを抗GFAP抗体にて蛍光免疫染色した画像を示す。

[図2] 図2はフローサイトメーターを用いて老化したヒトアストロサイトのGFAP陽性率を定量した結果を示す。

[図3] 図3は老化したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイトの老化関連マーカー発現量をデジタルPCRを用いて定量した結果を示す。

[図4] 図4は老化したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイトのC3発現量をデジタルPCRを用いて定量した結果を示す。

[図5] 図5は老化したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイトについて、抗 γ H2AX抗体にて蛍光免疫染色した結果を示す。

[図6] 図6は老化したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイトのSA- β -GALを染色した結果を示す。

[図7] 図7は老化していないヒトアストロサイト、老化していないヒトアストロサイトを長期間培養したもの、および老化したヒトアストロサイトのCDKN2A発現量をデジタルPCRを用いて定量した結果を示す。三角は、アストロサイト前駆細胞を前駆細胞培地にて43日間培養し、その後分化誘導培地に置換してアストロサイトへと分化誘導したもの（（1））を示す。四角は、老化していないアストロサイトを42日間培養した細胞（（2））を示す。丸は、アストロサイト前駆細胞を前駆細胞培地にて85日間培養し、その後分化誘導培地に置換してアストロサイトへと分化誘導したもの（（3））を示す。

[図8] 図8は老化したヒトアストロサイト、神経細胞、およびミクログリアを

用いて作製した二次元共培養物を蛍光免疫染色した画像を示す。

[図9]図9は老化したヒトアストロサイト、神経細胞、およびミクログリアを用いて作製した三次元共培養物を蛍光免疫染色した画像を示す。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0018] CDKN2Aは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) を示す。

IGFBP5は、インスリン様増殖因子結合タンパク質5 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5) を示す。

NNMTは、ニコチンアミド-N-メチル基転移酵素 (Nicotinamide N-Methyltransferase) を示す。

HLA-DRB1は、ヒト白血球抗原-DRB1 (Human Leukocyte Antigen-DRB1) を示す。

HLA-DRB5は、ヒト白血球抗原-DRB5 (Human Leukocyte Antigen-DRB5) を示す。

C3は、補体分子C3を示す。

GAPDHは、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を示す。

BMP4は、骨形成因子4 (Bone Morphogenetic Protein 4) を示す。

CNTFは、毛様体神経栄養因子 (Ciliary Neurotrophic Factor) を示す。

GFApは、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (Glial fibrillary acidic protein) を示す。

γ H2AXは、リン酸化ヒストンH2AXを示す。

SA- β -GALは、老化関連 β -ガラクトシダーゼ (Senescence-associated beta-galactosidase) を示す。

[0019] 本発明は、ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞から分化誘導されたヒトアストロサイト細胞集団に関する。

[0020] 本発明のヒトアストロ細胞集団は、少なくとも90%のヒトアストロサイトを含み、上記ヒトアストロサイトは、

- a) CDKN2Aが陽性であり；
- b) IGFBP5、NNMT、HLA-DRB1およびHLA-DRB5からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であり；
- c) 参照遺伝子のGAPDHで規格化したC3の発現量が0.05 copies/copies以下である、ヒトアストロサイト細胞集団である。

[0021] <ヒトiPS細胞>

「ヒトiPS細胞」とは、ヒト細胞から作製された人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem cell）である。

[0022] 本明細書において「iPS細胞」とは、初期化因子の導入により体細胞を初期化（リプログラミング）することによって作製される、多能性（多分化能）と増殖能を有する細胞を意味する。iPS細胞はES細胞（Embryonic Stem cells）に近い性質を示す。iPS細胞の作製に使用する体細胞は特に限定されず、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。また、その由来も特に限定されないが、哺乳動物（例えば、ヒトやチンパンジー等の霊長類、マウスやラット等のげっ歯類）の体細胞を用いることが好ましく、ヒトの体細胞を用いることがより好ましい。iPS細胞は、公知の方法等により作製することができる。また、今後開発されるiPS細胞作製法を適用することも当然に想定される。

[0023] iPS細胞作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycの4因子を、ウイルスを利用して細胞へ導入する方法である（Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126 (4), 663-676, 2006; Takahashi, K, et al: Cell 131 (5), 861-72, 2007）。ヒトiPS細胞についてはOct4、Sox2、Lin28およびNanogの4因子の導入による樹立の報告がある（Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007）。c-Mycを除く3因子（Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008）、Oct3/4およびKlf4の2因子（Kim JB,

et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008)、あるいはOct 3/4のみ (Kim J B, et al: Cell 136 (3), 411-419, 2009) の導入による i P S細胞の樹立も報告されている。また、遺伝子の発現産物であるタンパク質を細胞に導入する手法 (Zhou H, Wu S, Joo JY, et al: Cell Stem Cell 4, 381-384, 2009; Kim D, Kim CH, Moon JI, et al: Cell Stem Cell 4, 472-476, 2009) も報告されている。

[0024] i P S細胞の作製法として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加等により体細胞から i P S細胞を誘導することもできる (Hou P et al: Science 341(6146), 651-654, 2013)。

[0025] また、株化された人工多能性幹細胞を入手することも可能であり、例えば、国立大学法人京都大学、i P Sアカデミアジャパン株式会社、または独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから提供を受けることもできる。

[0026] i P S細胞への形質転換、すなわち初期化が生じた細胞はN a n o g、O c t /4、F g f -4、E s g -1およびC r i p t等の多能性幹細胞マーカー (未分化マーカー) の発現等を指標として選択することができ、選択された細胞を i P S細胞として回収することができる。

[0027] <ヒト i P S細胞由来のアストロサイト前駆細胞>

「ヒト i P S細胞由来のアストロサイト前駆細胞」とは、ヒト i P S細胞から作製されたアストロサイト前駆細胞である。

[0028] 本明細書において「アストロサイト前駆細胞」とは、アストロサイトへ分化する能力を有する細胞を意味する。アストロサイト前駆細胞の存在は、アストロサイト前駆細胞において、有意に発現が認められるマーカーによって特定することができる。アストロサイト前駆細胞のマーカーとしては、例えば、N F I A、N F I B、S O X 9、H E Y 1、H E Y 2、F A B P 7およびZ B T B 2 0等が挙げられる。

本発明で用いる「アストロサイト前駆細胞」の入手方法としては、例えば、患者から外科的に取得した大脳皮質や脊髄等から分離すること、ヒトアス

トロサイトに分化できる細胞から誘導すること、ヒト多能性幹細胞から誘導すること等により入手することが挙げられる。これらのアストロサイト前駆細胞はいずれも、本発明の方法における「アストロサイト前駆細胞」として使用することができる。

本発明で用いる「アストロサイト前駆細胞」としては、ヒト多能性幹細胞から誘導したヒトアストロサイト前駆細胞を使用することが好ましい。

ヒト多能性幹細胞としては、ヒト i P S 細胞 (human induced pluripotent stem cells)、ヒト E S 細胞 (human embryonic stem cells)、ヒト間葉系幹細胞等を挙げることができ、特に限定されないが、ヒト i P S 細胞を使用することが好ましい。

即ち、本発明によれば、アストロサイト前駆細胞から分化誘導されたヒトアストロサイト細胞集団であって、

上記ヒトアストロサイト細胞集団が少なくとも 90% のヒトアストロサイトを含み、

上記ヒトアストロサイトは、

- a) C D K N 2 A が陽性であり；
- b) I G F B P 5、N N M T、H L A - D R B 1 および H L A - D R B 5 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーが陽性であり；
- c) 参照遺伝子の G A P D H で規格化した C 3 の発現量が 0.05 copies/copies 以下である、

ヒトアストロサイト細胞集団が提供される。

[0029] 「ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞」の入手方法としては、例えば、神経系疾患の原因となる疾患関連遺伝子の変異や神経系疾患を有しない健康なヒト（健常者）から採取した体細胞または神経系疾患を有する患者から採取した体細胞より作製したヒト i P S 細胞から誘導すること、株化されたヒト i P S 細胞から誘導すること等により入手することが挙げられる。上記の神経系疾患としては、特に限定されないが、例えば、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症（A L S）、パーキンソン病、自閉症、アレキサ

ンダー病、レット症候群等が挙げられる。

これらのヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞はいずれも、本発明における出発細胞である「ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞」として使用することができる。

本発明で用いる「ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞」としては、健常者由来のヒト i P S 細胞から誘導したアストロサイト前駆細胞、株化されたヒト i P S 細胞から誘導されたアストロサイト前駆細胞、または疾患由来の遺伝子変異を有さないヒト i P S 細胞から誘導したアストロサイト前駆細胞を使用することが好ましく、健常者由来のヒト i P S 細胞から作製したアストロサイト前駆細胞を使用することがより好ましい。

[0030] ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞は、単離した状態でも、他の細胞と混ざった状態でも、本発明において使用することができる。また、ヒト i P S 細胞からアストロサイト前駆細胞への分化誘導と、アストロサイト前駆細胞からヒトアストロサイトへの分化誘導を連続的に行うことも想定することができる。

[0031] <ヒトアストロサイト>

「ヒトアストロサイト」とは、ヒトのアストロサイトである。

[0032] 本明細書において「アストロサイト」とは、中枢神経系に存在するグリア細胞の一種であり、ニューロンを構造的に支える機能や、神経伝達物質やエネルギーおよび細胞外イオンを調節することにより、神経伝達の調節に寄与していると考えられている。また、同じくグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトに対して、ミエリン形成を促進する物質を供給すると考えられており、神経組織において、ニューロンおよびオリゴデンドロサイトとともに重要な機能を担う細胞である。アストロサイトに特異的に発現するマーカーによって同定することができ、当該マーカーとしては、例えば、G F A P、S 1 0 0 B (S100 calcium binding protein B)、K C N J 1 0 (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 10)、A Q P 4 (Aquaporin-4) および S L C 1 A 3 (solute carrier family 1 member 3、G L

A S TもしくはE A A T Iともいう)等が知られている。例えば、免疫組織学的手法を用いて分析することによって、上記m R N A、糖鎖もしくはタンパク質のうち少なくとも1種類を発現する細胞をアストロサイトとして判別することが可能である。

[0033] <ヒトアストロサイト細胞集団>

「ヒトアストロサイト細胞集団」とは、ヒトアストロサイトを含む細胞の集団である。

[0034] 本明細書において「細胞集団」とは、少なくとも1種類の細胞を含む集団であり、2種類以上の任意の細胞を含んでいてもよい。また、細胞集団は、培地等の媒体中に分散（浮遊）した状態、培養容器の底面に接着した状態、複数の細胞が凝集した細胞凝集体（スフェア状細胞集団）の状態、および、層状の細胞集団であってもよく、特に限定されない。

[0035] 本発明の「ヒトアストロサイト細胞集団」は、少なくとも90%のヒトアストロサイトを含むことが好ましく、少なくとも95%のヒトアストロサイトを含むことがより好ましく、少なくとも99%のヒトアストロサイトを含むことがさらに好ましく、100%のヒトアストロサイトを含むことが特に好ましい。

ヒトアストロサイト細胞集団におけるヒトアストロサイトの割合は、例えば、ヒトアストロサイトを特異的に認識する抗体として抗G F A P抗体を用いてG F A P陽性率をフローサイトメーターにより定量することにより求めることができる。

本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイト以外の細胞としては、アストロサイト前駆細胞、神経幹細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞、神経細胞、オリゴデンドロサイト等が挙げられるが、特に限定されない。

[0036] <老化したヒトアストロサイト>

「老化したヒトアストロサイト（ヒト老化アストロサイト）」とは、細胞老化に特徴的な老化関連マーカーの発現が陽性となるヒトアストロサイトで

ある。

老化関連マーカーとしては、例えば、特に限定されないが、DNA損傷応答（DDR）マーカーとして知られている γ H2AX；腫瘍抑制因子や細胞周期調節因子として知られているCDKN2A（p16INK4aおよびp14ARF）、p21、p53；リソソーム関連タンパク質として知られている老化関連 β -ガラクトシダーゼ（SA- β -GAL）；細胞老化関連分泌現象（SASP、Senescence-Associated Secretory Phenotype）マーカーとして知られている炎症性サイトカインのIL-6、IL-8、血管内皮細胞増殖因子（VEGF、Vascular endothelial growth factor）等が挙げられる。

本明細書において「老化したヒトアストロサイト」とは、例えば、老化関連マーカーであるCDKN2A、 γ H2AX、SA- β -GAL、およびSASPマーカーからなる群より選択される少なくとも1つが陽性であることが好ましく、CDKN2A、 γ H2AX、およびSA- β -GALからなる群より選択される少なくとも1つが陽性であることがより好ましく、CDKN2Aが陽性であることがさらに好ましい。

[0037] 本明細書において「マーカー」とは、細胞に存在する物質であって、その存在や存在量に基づいて、当該細胞の種類もしくは性質等を同定または判別することができる物質を意味する。マーカーとして、具体的には、mRNA、当該mRNAによりコードされるタンパク質および糖鎖、ならびにこれらの断片が挙げられる。

本明細書において「マーカーが陽性」とは、出発細胞における上記マーカーの発現レベルと比較して、最終物である本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトにおける上記マーカーの発現レベルが高いことを示す。

[0038] マーカーが遺伝子である場合、マーカーの発現レベルは、遺伝子の発現レベル（発現量）を意味し、通常、遺伝子に対応する転写産物の産生量、またはその翻訳産物の産生量、活性等により解析することができる。発現レベル

の測定は、遺伝子の転写産物である mRNA や遺伝子の翻訳産物であるタンパク質の測定により行うことができるが、mRNA またはその逆転写産物である cDNA の測定より行うことが好ましい。翻訳産物（タンパク質）の発現の検出または測定は、抗体を用いて細胞内のタンパク質を検出する免疫細胞染色により行うことができる。

[0039] 各遺伝子の NCBI accession Number を表 1 に示す。以下の NCBI accession Number に基づいて、各遺伝子の配列情報を取得し、遺伝子の発現レベルを測定することができる。

[0040] [表1]

遺伝子名	NCBI accession Number
CDKN2A	NM_000077、NM_058197、NM_058195、NM_001195132、NM_001363763
IGFBP5	NM_000599
NNMT	NM_006169、NM_001372045、NM_001372046、NM_001372047
HLA-DRB1	NM_002124、NM_001243965、NM_001359193、NM_001359194
HLA-DRB5	NM_002125
C3	NM_000064

[0041] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトが発現する遺伝子の発現レベルの測定方法は特に限定されないが、例えば、定量的 RT-PCR により測定を行うことができる。RT-PCR は、測定対象となる mRNA を鋳型として cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として PCR により増幅する方法である。定量的 RT-PCR としては、例えば、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素が結合されたプライマーを用いて PCR を行って各サイクル毎に増幅産物量を定量し、検出される蛍光強度が急激に増大するサイクル数から、試料中の鋳型 DNA 量を測定する方法（リアルタイム PCR）、限界希釈したサンプル DNA を微小区画内に分散させて PCR 増殖を行い、ターゲット遺伝子を含む微小区画の数を直接カウントすることでサンプル中のターゲット遺伝子濃度を絶対的に定量する方法（デジタル PCR）等を挙げることができる。デジタル PCR にてサンプル DNA を微小区画に分散する方法として、ドロップレットを作製する方法や、

チップ上に分散する方法等を挙げることができるが、特に限定されない。定量的R T - P C Rの手法は本技術分野において周知であり、市販のキットを使用して実施することもできる。定量的R T - P C Rによれば、遺伝子の発現量またはコピー数を、対照となる参照遺伝子（例えば、G A P D H遺伝子）の発現量またはコピー数に対する相対値として測定することができる。なお、遺伝子のm R N Aの測定は、通常のR T - P C R等によりm R N Aの増幅を行うことにより得た増幅産物をゲル電気泳動にかけ、染色後、バンド強度を測定することによっても行うことができる。あるいは、D N Aチップを用いて遺伝子のm R N Aまたはc D N Aを検出または定量することもできる。ヒトアストロサイトが発現する遺伝子の発現レベルの測定は、次世代シーケンサーを用いて行うこともできる。なお、測定対象となる細胞は培養工程からの一部抜き取りによって得ることができる。

[0042] 発現レベルを示す数値としては、例えば、リアルタイムP C Rによって発現量を測定する場合、C t (Cycle threshold) 値を用いることができる。C t 値とは、P C R増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数である。横軸に増幅のサイクル数、縦軸にP C R産物量をプロットして、増幅曲線を作成し、P C R産物量の値に閾値 (T h r e s h o l d) を設定したときに閾値と増幅曲線が交わる点のサイクル数がC t 値となる。蛍光標識したプローブを用いて発現量を測定する場合は、蛍光強度を用いることもできる。

デジタルP C Rによって発現量を測定する場合、コピー数 (c o p i e s / μ L) を用いることができる。ターゲット遺伝子を含む微小区画（ポジティブ）、およびターゲット遺伝子を含まない微小区画（ネガティブ）の数を数え、ネガティブの割合からコピー数を算出する。ポジティブに含まれるターゲット遺伝子の数はポアソン分布を用いることで算出でき、コピー数を補正することができる。

[0043] <C D K N 2 A>

「C D K N 2 A」は、サイクリン依存性キナーゼ阻害2 A (Cyclin dependent kinase inhibitor 2A)とも呼ばれ、p 1 6 I N K 4 a (p 1 6) と p 1 4

ARF (p14) をコードするがん抑制遺伝子である。

[0044] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、CDKN2Aが陽性であることが好ましい。

本発明においてCDKN2Aが陽性である場合、上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したCDKN2Aの発現量が0.002copies/copies以上であることが好ましく、0.003copies/copies以上であることがより好ましく、0.004copies/copies以上であることがさらに好ましく、0.005copies/copies以上であることがよりさらに好ましく、0.006copies/copies以上であることが特に好ましい。

上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したCDKN2Aの発現量の上限は特に限定されず、その発現量が高いほど、本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは老化していることが想定される。

[0045] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、上記CDKN2Aが陽性であることに加え、IGFBP5、NNMT、HLA-DRB1およびHLA-DRB5からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であってもよく、IGFBP5、NNMT、HLA-DRB1およびHLA-DRB5からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であることが好ましく、IGFBP5、NNMTおよびHLA-DRB5からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であることがより好ましく、IGFBP5およびNNMTからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であることがさらに好ましく、IGFBP5が陽性であることがよりさらに好ましい。

[0046] <IGFBP5>

「IGFBP5」は、インスリン様増殖因子結合タンパク質5 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5) とも呼ばれ、血中や組織中のインスリン様増殖因子 (IGF) に結合して存在するタンパク質の1つである。I

IGFはインスリン様増殖因子結合タンパク質（IGFBP）に結合することでレセプターへの親和性、分布（局所的な放出）、代謝（安定化・分解）の調節がなされと考えられている。IGFBPsは、体液中を循環しているIGF-IおよびIGF-IIに結合して活性（促進・抑制）、分布（局所的な放出）および代謝（安定化・分解）を調節する。IGFsに対する親和性が高いIGF-BPsの他、構造・機能的に類似性があるものの親和性が低いIGFBPrP（IGF-BP related Protein）が同定されている。IGFBP5は主に血管平滑筋細胞で産生され、骨組織に局在して平滑筋細胞、線維芽細胞や骨芽細胞へのIGF-Iの作用を促進させる。また、IGFBP3と同様にALC（Acidic-labile subunit）と三量体を形成することが知られている。また、細胞老化関連分泌現象（SASP）調整因子として知られている。

[0047] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、IGFBP5が陽性であってもよく、IGFBP5が陽性であることが好ましい。

本発明においてIGFBP5が陽性である場合、上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したIGFBP5の発現量が0.08copies/copies以上であることが好ましく、0.09copies/copies以上であることがより好ましく、0.1copies/copies以上であることがさらに好ましく、0.15copies/copies以上であることがよりさらに好ましく、0.2copies/copies以上であることが特に好ましい。

上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したIGFBP5の発現量の上限は特に限定されず、その発現量が高いほど、本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは老化していることが想定される。

[0048] <NNMT>

「NNMT」は、ニコチンアミド-N-メチル基転移酵素（Nicotinamide

N-Methyltransferase) と呼ばれ、メチル供与体である S-アデノシルメチオニンを使用してニコチンアミドおよび類似化合物のメチル化を触媒し、S-アデノシル-L-ホモシステインおよび 1-メチルニコチンアミドを生成する酵素である。また、老化、細胞ストレス応答および体重増加の調節を含む、様々な代謝プロセス、およびエピジェネティックプロセスに必須の寄与因子であることが知られている。

[0049] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、NNMT が陽性であってもよく、NNMT が陽性であることが好ましい。

本発明において NNMT が陽性である場合、上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の GAPDH で規格化した NNMT の発現量が 0.003 copies/copies 以上であることが好ましく、0.004 copies/copies 以上であることがより好ましく、0.005 copies/copies 以上であることがさらに好ましく、0.01 copies/copies 以上であることがよりさらに好ましく、0.015 copies/copies 以上であることが特に好ましい。

上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の GAPDH で規格化した NNMT の発現量の上限は特に限定されず、その発現量が高いほど、本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは老化していることが想定される。

[0050] <HLA-DRB1 および HLA-DRB5>

「HLA-DRB1」は、ヒト白血球抗原-DRB1 (Human Leukocyte Antigen-DRB1)、主要組織適合複合体クラス II DRβ1 と呼ばれ、組織適合性抗原として機能することが知られているヒト白血球抗原 (HLA、Human Leukocyte Antigen) のハプロタイプの 1 つである。HLA-DRB1 は第 6 染色体短腕上の HLA クラス II 領域に位置するタンパク質コーディング遺伝子である。HLA クラス II 分子は、アルファ (DRA) 鎖とベータ (DRB) 鎖からなるヘテロダイマーであり、どちらも膜に固定され、細胞外タンパク質由来のペプチドを提示することにより、免疫系で中心的な役割

を果たすことが知られている。

H L A - D R B 1 に関連する疾患には、多発性硬化症やサルコイドーシス 1 等が知られており、関連する経路には、ヘルパー T 細胞における D 2 8 シグナル伝達等がある。また、H L A - D R B 1 の遺伝子の重要なパラログとして、H L A - D R B 5 が知られている。

「H L A - D R B 5」は、ヒト白血球抗原 - D R B 5 (Human Leukocyte Antigen-DRB5)、主要組織適合複合体クラス II D R β 5 とも呼ばれ、H L A - D R B 1 と同様に H L A のハプロタイプの 1 つである。

H L A - D R B 5 に関連する疾患には、若年成人によくみられる皮膚の炎症性角化症（鱗屑性発疹）であるバラ色秕糠疹やコラーゲン 9 の異常による多発性骨端異形成等が知られており、関連する経路には、ヘルパー T 細胞における C D 2 8 シグナル伝達等がある。また、H L A - D R B 5 の遺伝子の重要なパラログとして、H L A - D R B 1 が知られている。

[0051] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、H L A - D R B 1 および H L A - D R B 5 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーが陽性であってもよく、H L A - D R B 1 および H L A - D R B 5 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーが陽性であることが好ましく、H L A - D R B 5 が陽性であることがより好ましい。

本発明において H L A - D R B 5 が陽性である場合、上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の G A P D H で規格化した H L A - D R B 5 の発現量が 0.08 c o p i e s / c o p i e s 以上であることが好ましく、0.09 c o p i e s / c o p i e s 以上であることがより好ましく、0.1 c o p i e s / c o p i e s 以上であることがさらに好ましく、0.15 c o p i e s / c o p i e s 以上であることがよりさらに好ましく、0.2 c o p i e s / c o p i e s 以上であることが特に好ましく、0.25 c o p i e s / c o p i e s 以上であることがより特に好ましい。

上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の G A P D H で規格化した H L A - D R B 5 の発現量の上限は特に限定されず、その発現量が高いほ

ど、本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは老化していることが想定される。

[0052] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、上記CDKN2Aが陽性であることに加え、C3が陰性であってもよく、参照遺伝子のGAPDHで規格化したC3の発現量が0.05copies/copies以下であってもよい。

[0053] <C3>

「C3」は、補体分子C3とも呼ばれ、哺乳動物の血清中に存在する補体の1つである。神経傷害性を示すヒトA1アストロサイトの特異的なマーカーとしても知られている。ヒトA1アストロサイトの特異的なマーカーとしては、GBP2、SERPING1およびC3等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0054] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、C3が陰性であることが好ましい。

本発明においてC3が陰性である場合、上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したC3の発現量が0.05copies/copies以下であり、0.02copies/copies以下であることがより好ましく、0.01copies/copies以下であることがさらに好ましく、0.001copies/copies以下であることがよりさらに好ましく、0.0001copies/copies以下であることが特に好ましく、検出限界以下であることが最も好ましい。

上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子のGAPDHで規格化したC3の発現量の下限は特に限定されず、その発現量が高いほど、本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトと異なる性質を有する細胞であることが想定される。

[0055] 本発明のヒトアストロサイト細胞集団に含まれるヒトアストロサイトは、 γ H2AXおよびSA- β -GALからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であってもよく、 γ H2AXおよびSA- β -GALが

らなる群より選択される少なくとも1つのマーカーが陽性であることが好ましい。

[0056] < γ H2AX>

「 γ H2AX」は、リン酸化ヒストンH2AXとも呼ばれ、DNAダメージのマーカーの1つとして知られている。DNAダメージにより二重鎖切断が生じると、ヒストンタンパク質の一種であるH2AXが速やかかつ広範囲にわたってリン酸化される。 γ H2AXは化学物質や活性酸素、紫外線や放射線等の遺伝毒性および発がん性評価だけでなく、近年では細胞老化を評価する指標としても知られている。

[0057] <SA- β -GAL>

「SA- β -GAL」は、老化関連 β -ガラクトシダーゼ (Senescence-associated beta-galactosidase) ととも呼ばれる酵素の1つである。弱酸性条件下 (pH6) でX-galを基質として β -ガラクトシダーゼを染色すると、老化した細胞が青く染まるのに対し、増殖中の細胞は染色されないことから、簡便に細胞老化を起こした老化細胞を検出できるマーカーとして広く用いられている。

[0058] 別の態様として、本発明は、ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞から分化誘導されたヒトアストロサイト細胞集団を含む、細胞集団培養物に関する。

[0059] <細胞集団培養物>

「細胞集団培養物」とは、細胞集団を含む培養物である。

[0060] 本明細書において「細胞集団培養物」とは、少なくとも1種類の細胞を含む細胞集団と、培地等の任意の成分とを含んでも良い。

[0061] <ヒトアストロサイトの培養>

本発明におけるヒトアストロサイトの培養は、使用するヒトアストロサイトの由来および状態に応じた培地、温度、その他の条件を選択して実施すればよい。本発明におけるヒトアストロサイトの培養を妨害しない限り、培地中には培養の目的に合った因子等の任意の成分が含まれていてもよい。培地

は、公知の培地または市販の培地から選択することができる。例えば、一般的な培地であるMEM（最少必須培地）、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）、DMEM/F12、またはこれらを改変した培地に、適切な成分（血清、タンパク質、アミノ酸、糖類、ビタミン類、脂肪酸類、抗生物質等）を添加して使用することができる。

[0062] 本発明に用いる培地としては、脳内のアストロサイトが血液脳関門の存在により血清に暴露していない状態にあり、アストロサイトの機能を研究する上で生体内により近い環境とする目的から、実質的に血清を含まない培地（無血清培地）を使用することが好ましい。

本発明において、「無血清培地」とは、無調整または未精製の血清を含まない培地を意味する。本明細書において、精製された血液由来成分、または、動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混合している培地であっても、無調整または未精製の血清を含まない限り、無血清培地に含まれる。

本発明における細胞集団培養物は、ヒト老化アストロサイトを含むヒトアストロサイト細胞集団と、実質的に血清を含まない培地とを含むことが好ましい。

[0063] 本発明に用いる培地としては、ヒトアストロサイト前駆細胞からヒトアストロサイトへ分化誘導するために必要な因子等の任意の成分が含まれていてもよい。

本発明における細胞集団培養物は、ヒトアストロサイト前駆細胞からヒトアストロサイトへ効率的に分化する目的で、BMP4（骨形成因子4）およびCNTF（毛様体神経栄養因子）からなる群より選択される少なくとも1つの因子をさらに含むことが好ましい。

[0064] <ヒトアストロサイト細胞集団の製造方法>

別の態様として、老化したヒトアストロサイトを含む細胞集団の製造方法に関する。

[0065] 本発明によれば、ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞を増殖させることと、増殖させたヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞を分化誘導させることを含む、ヒトアストロサイト細胞集団の製造方法が提供さ

れる。

[0066] 本発明の製造方法における培養条件としては、一般的な細胞培養の条件を選択すればよい。37℃、5%CO₂の条件等が例示される。培養中は適切な間隔（好ましくは1日から7日に1回、より好ましくは2日から3日に1回）で培地を交換することが好ましい。iPS細胞由来のヒトアストロサイト前駆細胞を材料として本発明の細胞集団を作製する場合、50日以上増殖条件下で培養した後にヒトアストロサイトへと分化誘導することでヒト老化アストロサイトを作製することができる。増殖条件下で培養する期間としては、50日以上が好ましく、70日以上がより好ましく、80日以上がさらに好ましい。

[0067] また、老化を誘導するストレスを与える観点から、ヒトアストロサイト前駆細胞は、二次元培養することが好ましい。

[0068] 細胞の培養には、プレート、ディッシュ、セルカルチャーインサート、細胞培養用フラスコ、細胞培養用バッグ等の細胞培養容器を使用することができる。なお、細胞培養用バッグとしては、ガス透過性を有するものが好適である。大量の細胞を必要とする場合には、大型培養槽を使用してもよい。培養は開放系または閉鎖系のどちらでも実施することができる。

[0069] <ヒトアストロサイト細胞集団およびそれを用いた被験物質の評価方法>

本発明によれば、老化したヒトアストロサイトを含む細胞集団が提供される。

本発明のヒトアストロサイト細胞集団は、ヒト老化アストロサイトに作用する医薬候補化合物のスクリーニングや医薬候補化合物の安全性評価のために使用することもできる。

[0070] 本発明によれば、本発明のヒトアストロサイトを含む細胞集団と被験物質を接触させることを含む、被験物質の評価方法が提供される。例えば、アストロサイト前駆細胞を長期間培養して老化させる工程において被験物質と接触させることにより、抗老化作用の評価が可能となる。また、例えば本発明のヒトアストロサイトを含む細胞集団と被験物質を接触させることで細胞老

化関連分泌現象（SASP、Senescence-Associated Secretory Phenotype）の抑制作用等、老化の悪影響を制御する被験物質の評価が可能となる。さらには、老化細胞の若返り作用を示す被験物質の探索も可能となる。

[0071] ＜ヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む共培養物の製造方法＞

本発明によれば、上記ヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記ヒトアストロサイト細胞集団と、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、共培養物の製造方法が提供される。

[0072] 本発明において、共培養物は、二次元培養物または三次元培養物のいずれでもよい。三次元培養物としては、スフェロイド形状でもよい。

[0073] 本発明において、本発明のヒトアストロサイト細胞集団と、神経細胞と、ミクログリアを培養容器に添加する場合、それぞれの細胞を添加するタイミングは同時であっても、別々であってもよい。

[0074] 本発明において、二次元共培養物を作製する場合、好ましくは、上記ヒトアストロサイト細胞集団を培養容器内であらかじめ培養し、培養した上記ヒトアストロサイト細胞集団を含む培養容器に、神経細胞とミクログリアを添加することができる。

[0075] 本発明において、三次元培養物を作製する場合、好ましくは、細胞の共培養に先立って、上記ヒトアストロサイト細胞集団と、神経細胞と、ミクログリアとを同時に培養容器に添加することができる。

[0076] 「細胞の共培養に先立って」とは、1種または2種の細胞を添加してから、例えば1～24時間以内であれば、共培養が開始されているとは見なさない。

[0077] 具体的には、例えば、三次元培養物を作製する場合、上記の3種の細胞を1つの容器に入れて培養培地に懸濁および混合したものを培養容器に添加してもよい。この場合には、上記ヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程は、上記

ヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養培地に懸濁する工程、および上記により得られた上記ヒトアストロサイト細胞集団、上記神経細胞および上記ミクログリアを含む培養培地を同時に培養容器に添加する工程を含む。

[0078] あるいは、上記の3種の細胞の各々を、それぞれ別々の培養培地に懸濁したものを、同一の培養容器に同時に添加してもよい。あるいは、それぞれ別々に凍結保存されていた3種の凍結細胞をそれぞれ融解したものを、同一の培養容器に同時に添加してもよい。

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

[0079] 本発明においては、3種の細胞（アストロサイト、神経細胞、およびミクログリア）を任意の割合において共培養することができる。また、3種の細胞（アストロサイト、神経細胞、およびミクログリア）を共培養することで、従来の培養系よりもよりヒト脳を反映および模倣することができ、脳本来の機能や病態形成メカニズムを研究する上において有用である。本発明においては、3種の細胞を使用するため、脳機能や病態形成における細胞間相互作用を評価することができる。

[0080] 上記ヒトアストロサイト細胞集団との共培養に用いる神経細胞、およびミクログリアは、好ましくは、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである。

[0081] ヒト由来の多能性幹細胞としては、ヒトiPS細胞、ヒトES細胞、ヒト間葉系幹細胞などを挙げることができる。ヒトiPS細胞が好ましいが、特に限定されない。ヒトiPS細胞とは、ヒト細胞から作製されたiPS細胞である。

[0082] ヒト由来の多能性幹細胞としては、疾患関連遺伝子に変異がない検体由来の多能性幹細胞、または疾患関連遺伝子に変異がある検体由来の多能性幹細胞が挙げられ、特に限定されないが、例えば、疾患関連遺伝子に変異がない検体由来の多能性幹細胞であることが好ましい。「疾患関連遺伝子に変異が

ない」とは、神経系疾患の原因となるような疾患関連遺伝子の変異を有しないことを意味する。即ち、遺伝子に変異があっても、疾患の原因とならないような変異である場合には、疾患関連遺伝子に変異がないと解釈するものとする。

[0083] E S細胞は、例えば、着床以前の初期胚、上記の初期胚を構成する内部細胞塊、単一割球などを培養することによって樹立することができる (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994、Thomson, J.A. et al: Science, 282, 1145-1147, 1998)。初期胚として、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を用いてもよい (Wilmut et al: Nature, 385, 810, 1997、Cibelli et al: Science, 280, 1256, 1998、入谷明ら: 蛋白質核酸酵素, 44, 892, 1999、Baguisi et al: Nature Biotechnology, 17, 456, 1999、Wakayama et al: Nature, 394, 369, 1998; Nature Genetics, 22, 127, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984, 1999、Rideout III et al: Nature Genetics, 24, 109, 2000、Tachibana et al: Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell, 2013, in press)。初期胚として、単為発生胚を用いてもよい (Kim et al: Science, 315, 482-486, 2007、Nakajima et al: Stem Cells, 25, 983-985, 2007、Kim et al: Cell Stem Cell, 1, 346-352, 2007、Revazova et al: Cloning Stem Cells, 9, 432-449, 2007、Revazova et al: Cloning Stem Cells, 10, 11-24, 2008)。上掲の論文の他、E S細胞の作製については Strelchenko N, et al: Reprod Biomed Online, 9, 623-629, 2004、Klimanskaya I, et al: Nature 444, 481-485, 2006、Chung Y, et al: Cell Stem Cell, 2, 113-117, 2008、Zhang X, et al: Stem Cells, 24, 2669-2676, 2006、Wassarman, P.M. et al: Methods in Enzymology, Vol. 365, 2003、などが参考になる。なお、E S細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合E S細胞も、本発明の方法に用いられる胚性幹細胞に含まれる。

[0084] E S細胞の中には、保存機関から入手可能なもの、或いは市販されている

ものもある。例えば、ヒトES細胞については京都大学再生医科学研究所（例えばKHES-1、KHES-2およびKHES-3）、WiCell Research Institute、ESIBIOなどから入手可能である。

[0085] ヒト由来の神経細胞の入手方法としては、例えば、神経系疾患の原因となる疾患関連遺伝子の変異や神経系疾患を有しない健康なヒト（健常者）から採取した体細胞、または神経系疾患の原因となる疾患関連遺伝子の変異や神経系疾患を有する患者から採取した体細胞より作製したヒトiPS細胞から誘導すること、株化されたヒトiPS細胞から誘導することなどにより入手することが挙げられる。

[0086] ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導した神経細胞は、特に限定されないが、好ましくは、運動神経細胞、大脳皮質興奮神経細胞または黒質神経細胞である。

[0087] ヒト由来の多能性幹細胞から神経細胞を分化誘導するための方法としては、特に限定されないが、低分子化合物処置などを用いて多能性幹細胞から神経幹細胞を作製後、神経細胞へ誘導する方法と、遺伝子発現などにより神経細胞へ直接誘導する方法がある。

[0088] 多能性幹細胞から神経細胞を分化誘導するための方法としては、例えば、
（１）無血清培地中で培養して胚様体（神経前駆細胞を含む細胞塊）を形成させて分化させる方法（SFE B法：Watanabe K, et al, Nat.Neurosci., 8, 288-296, 2005; SFE B q法：Wataya T, et al, Proc.Natl.Acad.Sci.US A, 105, 11796-11801, 2008）；
（２）ストローマ細胞上で培養して分化させる方法（SDI A法：Kawasaki H, et al, Neuron, 28, 31-40, 2000）；
（３）薬剤を添加したマトリゲル上で培養して分化させる方法（Chambers S. M, et al, Nat.Biotechnol., 27, 275-280, 2009）；
（４）サイトカインの代替物として低分子化合物を含む培地中で培養して分化する方法（米国特許第5,843,780号）；

(5) 多能性幹細胞に神経誘導因子 (N g n 2、Neurogenin 2など) を導入し発現させることで分化させる方法 (W02014/148646 ; およびZhang Y, et al , Neuron, 78, 785-98, 2013) ;

(6) 多能性幹細胞にm i R - 9 / 9 * - 1 2 4を導入し発現させることで分化させる方法 ;

およびこれらの方法の組み合わせなどが挙げられる。

[0089] 上記のうち、(5) 多能性幹細胞にN g n 2を導入して発現させる方法は、短期間かつ高効率で成熟した神経細胞が得られることから好ましい。

[0090] ヒト由来の神経細胞としては、N g n 2の強制発現によるi P S細胞から分化した誘導神経細胞、i C e l l グルタミン酸作動性神経 (F U J I F I L M C e l l u l a r D y n a m i c s, C 1 0 3 3)、i C e l l G A B A作動性神経 (F U J I F I L M C e l l u l a r D y n a m i c s, C 1 0 0 8)、i C e l l ドーパミン神経 (F U J I F I L M C e l l u l a r D y n a m i c s, C 1 0 2 8)、i C e l l 運動神経 (F U J I F I L M C e l l u l a r D y n a m i c s, C 1 0 4 8) 等が挙げられ、N g n 2の強制発現によるi P S細胞から分化した誘導神経細胞およびi C e l l グルタミン酸作動性神経が好ましい。

[0091] ヒト由来のミクログリアとしては、i C e l l ミクログリア (F U J I F I L M C e l l u l a r D y n a m i c s, C 1 1 1 0)、ミクログリア (A x o l B i o s c i e n c e, A X 0 6 6 4) 等が挙げられ、i C e l l ミクログリアが好ましい。

[0092] 神経細胞は、好ましくは、 β -I I I t u b u l i n、NeuN、N - C A M (neural cell adhesion molecule)、M A P 2 (microtubule-associated protein 2) からなる神経細胞に特異的なマーカー遺伝子を少なくとも1以上発現し、かつ、 β -I I I t u b u l i n陽性の突起（以降、神経突起と呼ぶ）を有する細胞である。

[0093] ミクログリアは、I B A 1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)、C D 3 3、C D 4 5、T R E M 2 (triggering receptor expressed on

myeloid cells 2)、P2RY12 (purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12)、TMEM119 (Transmembrane Protein 119)、CX3CR1 (CX3C-chemokine receptor 1) からなるミクログリアに特異的なマーカー遺伝子を少なくとも1以上発現する細胞である。

[0094] 本発明においては、上記した細胞を培養容器中で共培養する。

培養容器としては、ウェルを有するプレート、ディッシュ、セルカルチャーインサート、または細胞培養用フラスコなどを使用することができ、ウェルを有するプレートが好ましい。具体的には、ViewPlate (PerkinElmer)、96ウェルマイクロプレート (Greiner)、96ウェルポリスチレン製マイクロプレート (Corning)、PrimeSurface (商標) プレート (住友ベークライト)、セルリペレント・プレート (Greiner Bio one) などが挙げられ、ViewPlate (PerkinElmer)、PrimeSurface (商標) プレート (住友ベークライト) が好ましい。

[0095] 培養容器の形状としては、平底、丸底、U字底、またはV字底などが挙げられるが、特に限定されない。

[0096] 共培養物が三次元培養物である場合、容器内の培地が接触する表面の性質としては、細胞非接着性であることが好ましい。これにより、細胞が浮遊状態で培養されることになり、スフェロイドを形成しやすくなる。あるいは、容器内部の表面のある部位のみ細胞接着性とし、それ以外の部位を細胞非接着性としてもよい。この場合には、細胞接着性の部位に、細胞が集まり、スフェロイドを形成することができる。

[0097] 共培養物が二次元培養物である場合、培養容器への播種時の細胞密度 (細胞密度とは、使用する2以上の細胞の合計の細胞密度である。以下も同様) の下限値は、特に制限されないが、例えば、 2.5×10^4 細胞/cm²以上であることが好ましく、 5.0×10^4 細胞/cm²以上であることがより好ましく、 10.0×10^4 細胞/cm²以上であることがさらに好ましく、 15.0×10^4 細胞/cm²以上であることがよりさらに好ましく、 20.0

$\times 10^4$ 細胞/ cm^2 以上であることが特に好ましく、 25.0×10^4 細胞/ cm^2 以上であることが最も好ましい。培養容器への播種時の細胞密度の上限値は、特に限定されないが、例えば、 60.0×10^4 細胞/ cm^2 以下であってもよく、 55.0×10^4 細胞/ cm^2 未満が好ましく、 50.0×10^4 細胞/ cm^2 以下がより好ましく、 45.0×10^4 細胞/ cm^2 以下がさらに好ましく、 40.0×10^4 細胞/ cm^2 以下がよりさらに好ましく、 35.0×10^4 細胞/ cm^2 以下が特に好ましい。

[0098] 共培養物が二次元培養物である場合、培養容器への播種時の細胞密度は、好ましくは 5.0×10^4 細胞/ cm^2 以上 55.0×10^4 細胞/ cm^2 以下であり、より好ましくは 10.0×10^4 細胞/ cm^2 以上 50.0×10^4 細胞/ cm^2 以下であり、さらに好ましくは 15.0×10^4 細胞/ cm^2 以上 45.0×10^4 細胞/ cm^2 以下であり、よりさらに好ましくは 20.0×10^4 細胞/ cm^2 以上 40.0×10^4 細胞/ cm^2 以下であり、特に好ましくは 25.0×10^4 細胞/ cm^2 以上 35.0×10^4 細胞/ cm^2 以下である。

[0099] 共培養物が三次元培養物である場合、96ウェルプレートへの播種時の細胞数（細胞数とは、3種類の細胞の合計の細胞数である。以下も同様）の下限値は、特に制限されないが、例えば、 0.7×10^4 細胞/ウェル以上であることが好ましく、 1.0×10^4 細胞/ウェル以上であることがより好ましく、 1.2×10^4 細胞/ウェル以上であることがさらに好ましく、 1.4×10^4 細胞/ウェル以上であることがよりさらに好ましく、 1.6×10^4 細胞/ウェル以上であることが特に好ましく、 1.8×10^4 細胞/ウェル以上であることが最も好ましい。培養容器への播種時の細胞密度の上限値は、特に限定されないが、例えば、 8.0×10^4 細胞/ウェル以下であってもよく、 8.0×10^4 細胞/ウェル未満が好ましく、 5.0×10^4 細胞/ウェル以下がより好ましく、 3.0×10^4 細胞/ウェル以下がさらに好ましく、 2.5×10^4 細胞/ウェル以下がよりさらに好ましく、 2.3×10^4 細胞/ウェル以下が特に好ましい。

[0100] 共培養物が三次元培養物である場合、96ウェルプレートへの播種時の細胞数は、好ましくは 1.0×10^4 細胞/ウェル以上 8.0×10^4 細胞/ウェル以下であり、より好ましくは 1.2×10^4 細胞/ウェル以上 5.0×10^4 細胞/ウェル以下であり、さらに好ましくは 1.4×10^4 細胞/ウェル以上 3.0×10^4 細胞/ウェル以下であり、よりさらに好ましくは 1.6×10^4 細胞/ウェル以上 2.5×10^4 細胞/ウェル以下であり、特に好ましくは 1.8×10^4 細胞/ウェル以上 2.3×10^4 細胞/ウェル以下である。

[0101] 培地は、公知の培地または市販の培地から選択することができる。培養に用いる培地は、基礎培地へ添加剤を加えて用いることができる。ここで、基礎培地は、例えば、DMEM、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）/F12、BrainPhys Neuronal Medium、Neurobasal Medium-A、Neurobasal Medium、Neural Progenitor Basal Medium、NS-A Basal Medium、Basal Medium Eagle（BME）、BGJb Medium、CMRL 1066 Medium、Glasgow Minimum Essential Medium（MEM）、Improved MEM Zinc Option、Iscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM）、Medium 199、Eagle MEM、 α MEM、Ham's F12 Medium、RPMI 1640 Medium、およびFischer's Mediumなどが挙げられる。また、培地は、単一の培地を用いてもよく、2種以上の培地を組み合わせ用いてもよい。

[0102] 培地に添加することができる添加剤として、具体的には血清、レチノイン酸、Wnt、BMP（BMP-4など）、CNTF、GDNF（Glial cell line-derived neurotrophic factor）、bFGF（basic fibroblast growth factor）、EGF（Epidermal growth factor）、HGF（Hepatocyte growth factor）、SHH（Sonic hedgehog）、IGF-1（Insulin-like Grow

th Factor 1)、Activin A、Heregulin β -1、インターロイキン類、8-Br-cAMP、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン、プロゲステロン、セレナイト、B-27（商標）サプリメント、N2 Supplement with Transferrin (Apo)、N2 Supplement with Transferrin、GlutaMAX、L (+) -アスコルビン酸、ITS-サプリメント、MEM Non-Essential Amino Acidなどが挙げられるが、特に限定されない。さらに、抗生物質（Penicillin、Streptomycinなど）を添加してもよい。

[0103] 本発明によれば、上記した本発明の共培養物の製造方法により得られる、上記ヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む共培養物が提供される。

[0104] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

実施例

[0105] 試験例1：ヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞からヒト老化アストロサイトへの誘導

(1) アストロサイト前駆細胞の長期培養による老化誘導

ヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞はAxol Bioscience (ax0083)、Applied Stem Cell (ASE-9322P)、もしくはXCell Science (XCS-AP-001-1V) から購入して使用した。

PBS (-) (富士フイルム和光純薬, 166-23555) で167倍希釈したiMatrix-511 silk (Matrixome, 892021) をフラスコ (CELLCOAT (登録商標), PDL, 650ml, フラスコ, フィルターキャップ, Greiner Bio One, 661940) に15mL添加し、4℃に静置した。24時間後、以下の前駆細胞培地に置換して使用した。

[0106] 前駆細胞培地の組成

DMEM/F12 (Life technologies, 11320-033) に表2に示す試薬を添加した。

[0107] [表2]

試薬名	メーカー・型番	最終濃度
N2 Supplement with Transferrin (Apo) ($\times 100$)	富士フイルム和光純薬, 141-09041	$\times 1$
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, 35050-061	1%
MEM Non-Essential Amino Acid	Thermo Fisher Scientific, 11140-050	1%
Penicillin-Streptomycin Solution ($\times 100$)	富士フイルム和光純薬, 168-23191	$\times 0.5$
Heparin Sodium	富士フイルム和光純薬, 085-00134	0.5 U/mL
Animal-Free Recombinant Human FGF-basic	PeproTech, AF-100-18B	10 ng/mL
Animal-Free Recombinant Human EGF	PeproTech, AF-100-15	10 ng/mL

[0108] ヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞を前駆細胞培地に懸濁し、フラスコに 30×10^4 cells/flaskの密度で播種し、37℃、5% CO₂条件下で培養した。2週間おきに継代を行い、84日間培養を続けた。

[0109] (2) ヒト老化アストロサイトへの分化誘導

DMEM/F12 (Life technologies, 11320-033) で120倍希釈したMatrigel基底膜マトリックス (Corning, 356234) を6ウェルプレートに1.5 mL/wellにて添加し、4℃に静置した。24時間後、前駆細胞培地に置換して使用した。

[0110] 84日間培養したヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞をTrypLE Select (Thermo Fisher Scientific, 12563-029) にて剥離し、6ウェルプレートに 30×10^4 cells/wellの密度で播種し、37℃、5% CO₂条件下で培養した。翌日、以下の分化誘導培地に置換し、さらに5日間培養してヒト老化アストロサイ

トへと分化誘導した。

[0111] 分化誘導培地の組成

DMEM/F12 (Life technologies, 11320-033) に表3に示す試薬を添加した。

[0112] [表3]

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

[0113] (3) アストロサイトマーカー発現

免疫染色によりアストロサイトのマーカーであるGFAPの発現を確認した。老化したヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトは、PBS (-) (富士フイルム和光純薬, 166-23555) で10倍希釈したホルムアルデヒド液 (富士フイルム和光純薬, 061-00416) を添加し、室温で30分間静置して固定した。PBS (-) で3回洗浄後、PBS (-) に1%のウシ血清アルブミン (BSA) を加えたもの (1%BSA) を加えてブロッッキングした。ブロッッキング液を除去し、一次抗体 (Millipore, MAB3402) を1%BSAに3000倍希釈したものを添加し、4℃で一晩静置した。PBS (-) で3回洗浄後、

二次抗体 (Thermo Fisher Scientific、A11005) を 1% BSA に 1000 倍希釈したものを添加し、室温で 1 時間処置した。PBS (−) で 3 回洗浄後、Incucyte (登録商標) S3 (Essen BioScience, 4647) を用いて撮影し画像を取得した。結果を図 1 に示す。

[0114] (4) フローサイトメーターによるヒトアストロサイトの細胞数の定量

老化したヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトについて、GFAP 陽性率をフローサイトメーターにより定量した。生細胞、および死細胞は LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, L34957) を添付文書に従い使用して標識した。細胞に 2% ホルムアルデヒド液 (富士フイルム和光純薬, 061-00416) を添加し、15 分間静置して固定した。Perm/Wash Buffer (BD Bioscience, 554723) にて洗浄後、GFAP Monoclonal Antibody (131-17719), Alexa Fluor (登録商標) 488 (Thermo Fisher Scientific, A-21294)、もしくは Alexa Fluor (登録商標) 488 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody (Biolegend, 400129) にて標識後、Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて、LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain のシグナルを指標に生細胞のみを選択し、488 nm レーザーを照射した際の蛍光シグナル強度とそのシグナル強度を持つ細胞の数 (count) を求めた (図 2)。GFAP Monoclonal Antibody, Alexa Fluor 488 で処置した細胞について、特定の内在性抗原に反応しない陰性コントロール Alexa Fluor 488 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody 処置時の蛍光シグナル強度よ

りも強い蛍光を示すものをGFAP陽性とし、全生細胞数に対するGFAP陽性細胞の割合をGFAP陽性率として算出した。

老化したヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトは99%がGFAP陽性であった。

[0115] (5) デジタルPCRによるマーカー発現の定量

ヒト老化アストロサイトからTotal RNAを抽出した。Total RNAの抽出にはRNeasy (登録商標) Plus Mini Kit (Qiagen, 74136) を添付文書に従い使用した。Total RNAからのcDNAの合成にはPrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara Bio, RR047A) を添付文書に従い使用した。

マーカーの定量にはドロップレット方式のデジタルPCRであるddPCR EvaGreen Supermix (Bio Rad, 1864034) を使用した。表4に示した組成でサンプルを調製し、QX200 AutoDG Droplet Digital PCRシステム (Bio Rad, 1864100J3) を用いてマーカー発現量を絶対定量した。

[0116] [表4]

試薬名	最終濃度
2× QX200 ddPCR EvaGreen Supermix	1×
Forward primer	136 nM
Reverse primer	136 nM
DNA template	9.1 ng (For CDKN2A) 0.45 ng (For GAPDH)

[0117] プライマーは以下の表5に記載したものを使用した。

[0118]

[表5]

遺伝子名	配列	メーカー
GAPDH	Fw: 非公開	Takara Bio, HA067812
	Rv: 非公開	
CDKN2A	Fw: CACATTCATGTGGGCA TTTC (配列番号1)	Takara Bio
	Rv: AGCTTTGGTTCTGCCA TTTGCTA (配列番号2)	
IGFBP5	Fw: TTGCCTCAACGAAAAG AGCT (配列番号3)	Fasmac
	Rv: CGGTCCTTCTTCACTG CTTC (配列番号4)	
NNMT	Fw: TGGCCCCACTATCTAT CAGC (配列番号5)	Fasmac
	Rv: TGGACCCCTTGACTCTG TTCC (配列番号6)	
HLA-DR B5	Fw: GTGAGACTTGCCCTGCT CCTC (配列番号7)	Fasmac
	Rv: CGTCCCGTTGAAGAAA TGAC (配列番号8)	
C3	Fw: GTGGAAATCCGAGCC GTTCTCT (配列番号9)	Fasmac
	Rv: GATGGTTACGGTCTG CTGGTGA (配列番号10)	

[0119] 以下の表6の条件にてPCR反応を行い、発現量はGAPDHの発現量当たりの発現量 (copies/copies) にて算出した。

[0120] [表6]

ステップ	温度 (°C)	時間	ランプ レート	サイクル 数
Enzyme activation	95	5 min	2°C/ sec	1
Denaturation	95	30 sec		40
Annealing/ex tension	60	1 min		40
Signal stab ilization	4	5 min		1
	90	5 min		1
Hold	4	infinite		1

[0121] 結果を図3および図4に示す。CDKN2A、IGFBP5、NNMTおよびHLA-DRB5が老化したヒトアストロサイトでは老化していないヒトアストロサイトに対して高い発現量であることが確認できた。また、老化したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイトはヒトA1アストロサイトと比べC3をほとんど発現していないことが確認できた。

。老化していないヒトアストロサイトは6例中全てにおいてC3を検出できなかった。老化したヒトアストロサイトは7例中5例でC3を検出できなかった。すなわち、老化したヒトアストロサイト、および老化していないヒトアストロサイトはヒトA1アストロサイトではないことが確認できた。

[0122] (6) 老化マーカー (γ H2AX) の染色

免疫染色により老化マーカーの一つである γ H2AXのフォーカス形成を評価した。老化したヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイト、および、老化していないヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトに、PBS(−) (富士フイルム和光純薬, 166-23555) で10倍希釈したホルムアルデヒド液 (富士フイルム和光純薬, 061-00416) を添加し、室温で30分間静置して固定した。PBS(−) で3回洗浄後、PBS(−) に1%のBSAを加えたもの (1%BSA) を加えてブロッキングし、一次抗体 (Millipore, 05-636-1) を1%BSAに3000倍希釈したものを添加し、4℃で一晩静置した。PBS(−) で3回洗浄後、二次抗体 (Thermo Fisher Scientific, A11029) を1%BSAに1000倍希釈したものを添加し、室温で1時間処置した。PBS(−) で3回洗浄後、Incucyte (登録商標) S3 (Essen BioScience, 4647) を用いて撮影し画像を取得した。フォーサイ (ドット状のシグナル) の数はImageJを用いて定量した。蛍光シグナルを二値化し (閾値: 70)、「Analyze Particles」によりフォーサイ (ドット) の数を定量した。結果を図5に示す。

老化したヒトアストロサイトでは老化していないヒトアストロサイトに比べ、老化マーカーの一つである γ H2AXのフォーサイが多く形成されていることが確認できた。

[0123] (7) 老化マーカー (SA- β -GAL) の染色

老化マーカーの一つであるSA- β -GALの発現を評価した。老化したヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイト、および、老

化していないヒトアストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトは、PBS（－）（富士フイルム和光純薬，166－23555）で10倍希釈したホルムアルデヒド液（富士フイルム和光純薬，061－00416）を添加し、室温で30分間静置して固定した。SA- β -GALの発現はCellular Senescence Detection Kit－SPIDER- β Gal（同仁化学研究所，SG03）を添付文書に従い使用した。Incucyte（登録商標）S3（Essen BioScience，4647）を用いて撮影し画像を取得し、Basic Analysis softwareを用いて陽性面積（Total area）および蛍光強度（Total integrated intensity）を定量した。結果を図6に示す。

老化したヒトアストロサイトでは、老化していないヒトアストロサイトに比べSA- β -GALが強く発現していることが確認できた。

[0124] 試験例2：ヒトアストロサイト前駆細胞とヒトアストロサイトの長期培養における老化マーカーの比較

Axol Bioscience（ax0083）、Applied Stem Cell（ASE－9322P）、もしくはXCell Science（XCS－AP－001－1V）から購入したヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞を使用した。

ヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞を前駆細胞培地にて43日間培養し、その後分化誘導培地に置換してヒトアストロサイトへと分化誘導した（図7の（1））。さらに（1）で得られた細胞を42日間培養したもの（図7の（2））、および、ヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞を前駆細胞培地にて85日間培養し、その後分化誘導培地に置換してヒトアストロサイトへと分化誘導したもの（図7の（3））をRNeasy（登録商標）Plus Mini Kit（Qiagen，74136）を添付文書に従い使用してTotal RNAを抽出した。試験例1の（5）デジタルPCRによるマーカー発現の定量と同様の方法にて老化マーカーであるCD

KN2Aの発現を絶対定量した。結果を図7に示す。

85日間培養したヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトはCDKN2Aの発現量が0.0109copies/copiesであったのに対し、43日間培養したヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞から作製したヒトアストロサイトをさらに42日間培養したものではCDKN2Aの発現量が0.0025copies/copiesであった。このことから、老化したヒトアストロサイトを作製するためにはアストロサイト前駆細胞の状態で長期間培養することが重要であることが分かった。

[0125] 試験例3：老化アストロサイト、神経細胞、およびミクログリアの二次元共培養物の作製

(1) アストロサイト前駆細胞の長期培養による老化誘導およびヒト老化アストロサイトへの分化誘導

ヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞はAxol Bioscience (ax0083)、Applied Stem Cell (ASE-9322P)、もしくはXCell Science (XCS-AP-001-1V) から購入して使用した。

DMEM/F12 (Life technologies, 11320-033) で120倍希釈したMatrigel基底膜マトリックス (Corning, 356234) を96well plateに65μL/wellにて添加し、4℃に静置した。24時間後、前駆細胞培地に置換して使用した。なお、前駆細胞培地は試験例1の表2と同一の組成で調製した。

[0126] 84日間培養したヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞を96well plateに 5×10^4 cells/wellの密度で播種し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。翌日、分化誘導培地に置換し、さらに5日間培養して老化アストロサイトへと分化誘導した。なお、分化誘導培地は試験例1の表3と同一の組成で調製した。

[0127] (2) 二次元共培養物の作製

神経細胞は、i P S細胞からN g n 2 遺伝子を強制発現 (Chao Wang, et al , Stem Cell Reports., 9: 1221-1233, 2017) することにより作製し、凍結保存した神経細胞を使用した。凍結保存した細胞を3 7℃の温浴で解凍し、融解後、細胞を共培養培地に添加し、6 0 0×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1 m Lの共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

[0128] 共培養培地の組成

DMEM／F 1 2 (L i f e t e c h n o l o g i e s, 1 1 3 2 0－0 3 3) に表 7 に示す試薬を添加した。

[0129] [表7]

試薬名	メーカー・型番	終濃度
N 2 S u p p l e m e n t w i t h T r a n s f e r r i n (A p o) (× 1 0 0)	富士フイルム和光純薬, 1 4 1－0 9 0 4 1	× 1
G l u t a M A X	T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, 3 5 0 5 0－0 6 1	1 %
M E M N o n－E s s e n t i a l A m i n o A c i d	T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, 1 1 1 4 0－0 5 0	1 %
P e n i c i l l i n－S t r e p t o m y c i n S o l u t i o n (× 1 0 0)	富士フイルム和光純薬, 1 6 8－2 3 1 9 1	× 0. 5
A n i m a l－F r e e R e c o m b i n a n t H u m a n C N T F	P e p r o T e c h, A F－4 5 0－1 3	1 0 n g / m L
A n i m a l－F r e e R e c o m b i n a n t H u m a n B M P－4	P e p r o T e c h, A F－1 2 0－0 5 E T	1 0 n g / m L

[0130] ミクログリアは、i P S細胞由来ミクログリア (i C e l lミクログリア , F C D I, C 1 1 1 0) を使用した。凍結保存した細胞を3 7℃の温浴で解凍し、融解後、細胞を共培養培地に添加し、6 0 0×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1 m Lの共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

神経細胞、ミクログリアはそれぞれ3×1 0⁴ c e l l s / w e l l となるように老化アストロサイトの上に播種した。3 7℃、5 % C O₂ 条件下で培養し、週3回、半量を培地交換した。

[0131] (3) 細胞固定

3週間培養した二次元共培養物は、PBS（－）（富士フイルム和光純薬，166-23555）で10倍希釈したホルムアルデヒド液（富士フイルム和光純薬，061-00416）を30分処理することで固定した。

[0132] (4) 免疫染色

固定した細胞は、PBS（－）にて洗浄後、BSA（Sigma Aldrich，A4161）、及びTriton X-100（BioVision，2104-100）をPBS（－）で1%、及び0.2%に希釈した溶液（1%BSA／0.2%Triton X-100）に30分処理することでブロッキング、及び透過処理を行った。その後、一次抗体反応として1%BSA／0.2%Triton X-100にて800倍希釈した抗MAP2抗体（Novus Biologicals，NB300-213）、3000倍希釈した抗GFAP抗体（Millipore，MAB3402）、800倍希釈した抗IBA抗体（富士フイルム和光純薬，011-27991）を処理し、4℃で一晩静置した。

翌日、PBS（－）で洗浄後二次抗体反応として1000倍希釈したGoat anti-rabbit Alexa Fluor 488（Thermo fisher scientific，A11008）、1000倍希釈したGoat anti-chicken Alexa Fluor 594（Thermo fisher scientific，A11042）、1000倍希釈したGoat anti-mouse Alexa Fluor 647（Thermo fisher scientific，A32728）、および1000倍希釈したHoechst 33342（Dojindo，346-07951）を処理し、室温で60分間静置した。PBS（－）にて洗浄後、蛍光顕微鏡（Nikon，ECLIPSE Ti）にて撮影し、画像を取得した。図8に取得した画像を示す。（A）は核（Hoechst）、（B）はミクログリア（IBA1）、（C）は神経細胞（MAP2）、（D）はアストロサイトを染色したもので、い

れの細胞もシグナルを検出することができた。

[0133] 試験例4：老化アストロサイト、神経細胞、およびミクログリアの三次元共培養物の作製

(1) アストロサイト前駆細胞の長期培養による老化誘導およびヒト老化アストロサイトへの分化誘導

マトリゲル基底膜マトリックス (Corning、354234) にてコーティングしたフラスコに、84日間培養したヒトiPS細胞由来アストロサイト前駆細胞 (XCell Science、XCS-AP-001-1V) を播種し、分化誘導培地を用いて5日間培養 (37℃、5%CO₂) することでアストロサイトへと分化誘導した。なお、分化誘導培地は試験例1の表3と同一の組成で調製した。

[0134] (2) 三次元共培養物の作製

分化誘導したアストロサイトは、TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific、12563-029) にて剥離し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1mLの3D共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

試験例3と同様の方法でiPS細胞からNgn2遺伝子を強制発現することにより作製した神経細胞は、37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を3D共培養培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1mLの3D共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

iPS細胞由来ミクログリア (iCellミクログリア、FCDI, C1110) は、37℃の温浴で解凍した。融解後、細胞を3D共培養培地に添加し、600×g、室温で5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を1mLの3D共培養培地にて懸濁し、細胞数を計数した。

アストロサイト、神経細胞、およびミクログリアは10:6:3の割合で混合し、 $1.9 \times 10^4 \text{ cells/well}$ となるように96ウェルプレート (PrimeSurface (商標) プレート96U, 住友ベークライト, MS-9096U) に播種した。37℃、5%CO₂条件下で培養し、週

3回、半量を培地交換した。

[0135] 3D共培養培地の組成

DMEM/F12 (Life technologies, 11320-033) に表8に示す試薬を添加した。

[0136] [表8]

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

[0137] (3) 細胞固定、免疫染色

3週間培養した三次元共培養物は、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（富士フイルム和光純薬, 161-20141）を30分処理することで固定した。PBS（-）にて洗浄後、PBS（-）で0.4%に希釈したTriton X-100（BioVision, 2104-100）を15分処理することで透過処理を行った。透過処理後、PBS（-）で4%の

濃度に調製したBSA溶液 (Sigma Aldrich, A416) を30分処理し、ブロッキングを行った。その後、一次抗体反応として600倍希釈した抗MAP2抗体 (Novus, NB300-213)、600倍希釈した抗IBA1抗体 (富士フイルム和光純薬, 019-19741)、および3000倍希釈した抗GFAP抗体 (Merck, MAB3402) を処理し、4℃で一晩静置した。

翌日、PBS (-) で洗浄後二次抗体反応として1000倍希釈したGoat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Thermo fisher scientific, A11008)、1000倍希釈したGoat anti-Chicken Alexa Fluor 594 (Thermo fisher scientific, A11042)、1000倍希釈したGoat anti-Mouse Alexa Fluor 647 (Thermo fisher scientific, A32728)、および1000倍希釈したHoechst 33342 solution (Dojindo, H342) を処理し、室温で60分間静置した。PBS (-) にて洗浄後、共焦点定量イメージサイトメーターCQ1 (横河電機株式会社、CellVoyager CQ1) にて撮影し、画像を取得した。図9に取得した画像を示す。(A) は核 (Hoechst)、(B) はミクログリア (IBA1)、(C) は神経細胞 (MAP2)、(D) はアストロサイトを染色したもので、いずれのシグナルも検出することができた。

請求の範囲

- [請求項1] ヒト i P S 細胞由来のアストロサイト前駆細胞から分化誘導されたヒトアストロサイト細胞集団であって、
前記ヒトアストロサイト細胞集団が少なくとも 90% のヒトアストロサイトを含み、
前記ヒトアストロサイトは、
a) C D K N 2 A が陽性であり；
b) I G F B P 5、N N M T、H L A - D R B 1 および H L A - D R B 5 からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子マーカーが陽性であり；
c) 参照遺伝子の G A P D H で規格化した C 3 の発現量が 0.05 c o p i e s / c o p i e s 以下である、
ヒトアストロサイト細胞集団。
- [請求項2] 前記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の G A P D H で規格化した C D K N 2 A の発現量が 0.004 c o p i e s / c o p i e s 以上である、請求項 1 に記載のヒトアストロサイト細胞集団。
- [請求項3] 前記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の G A P D H で規格化した I G F B P 5 の発現量が 0.1 c o p i e s / c o p i e s 以上である、請求項 1 または 2 に記載のヒトアストロサイト細胞集団。
- [請求項4] 前記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の G A P D H で規格化した N N M T の発現量が 0.005 c o p i e s / c o p i e s 以上である、請求項 1 または 2 に記載のヒトアストロサイト細胞集団。
- [請求項5] 上記ヒトアストロサイト中において、参照遺伝子の G A P D H で規格化した H L A - D R B 5 の発現量が 0.1 c o p i e s / c o p i e s 以上である、請求項 1 または 2 に記載のヒトアストロサイト細胞集団。

- [請求項6] さらに、 γ H2AXおよびSA- β -GALからなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子マーカーが陽性である、請求項1または2に記載のヒトアストロサイト細胞集団。
- [請求項7] 前記ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞が、健常人由来のヒトiPS細胞から作製したアストロサイト前駆細胞である、請求項1または2に記載の細胞集団。
- [請求項8] 請求項1または2に記載のヒトアストロサイト細胞集団と、実質的に血清を含まない培地とを含む、細胞集団培養物。
- [請求項9] BMP4およびCNTFからなる群より選択される少なくとも1つの因子をさらに含む、請求項8に記載の細胞集団培養物。
- [請求項10] ヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞を増殖させることと、
、
増殖させたヒトiPS細胞由来のアストロサイト前駆細胞を分化誘導させることを含む、請求項1または2に記載のアストロサイト細胞集団の製造方法。
- [請求項11] 請求項1または2に記載のヒトアストロサイト細胞集団と、被験物質とを接触させることを含む、被験物質の評価方法。
- [請求項12] 請求項1または2に記載のヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを培養容器に添加する工程、および上記ヒトアストロサイト細胞集団と、上記神経細胞と、上記ミクログリアとを培養容器中で共培養する工程を含む、共培養物の製造方法。
- [請求項13] 上記神経細胞、および上記ミクログリアが、ヒト由来の多能性幹細胞から分化誘導したものである、請求項12に記載の製造方法。
- [請求項14] 上記ヒト由来の多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、請求項12または13に記載の製造方法。
- [請求項15] 上記共培養物が、二次元培養物または三次元培養物である、請求項12または13に記載の製造方法。

[請求項16] 請求項12または13記載の製造方法により得られる、請求項1または2に記載のヒトアストロサイト細胞集団と、ヒト由来の神経細胞と、ヒト由来のミクログリアとを含む共培養物。