

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-513404  
(P2015-513404A)

(43) 公表日 平成27年5月14日(2015.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G054
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	Y 2G060
GO1N 27/02 (2006.01)	GO1N 27/02	D 4B029
GO1N 21/78 (2006.01)	GO1N 21/78	C 4B063
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2014-560506 (P2014-560506)  
 (86) (22) 出願日 平成25年3月7日 (2013.3.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月24日 (2014.10.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/051804  
 (87) 国際公開番号 WO2013/132455  
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)  
 (31) 優先権主張番号 T02012A000197  
 (32) 優先日 平成24年3月7日 (2012.3.7)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 510121547  
 フォンダツィオーネ・イステイトゥート・  
 イタリアーノ・ディ・テクノロジャ  
 FONDAZIONE ISTITUTO  
 ITALIANO DI TECNOLOGIA  
 イタリア、イー16163ジェノヴァ、ウ  
 ィア・モレゴ30番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100101454  
 弁理士 山田 卓二  
 (74) 代理人 100156122  
 弁理士 佐藤 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経細胞連結性および/または形態における変化を決定するための方法およびデバイス

(57) 【要約】

以下の作業： - 神経突起伸長の形成を支持する条件下での所定のインキュベーション期間の後に、アッセイに付した一対の離れた単一の神経細胞が、相互連結する神経突起伸長を相互にいまだに形成することができる距離に対応する臨界距離を同定し、

ここに、該単一の神経細胞の各々は、該神経細胞の接着を促進する物質のそれぞれのスポットに接着し、該スポットは神経細胞の接着を阻害する基体上に互いに対して間隔をあけて沈着しており、ついで

- 同定した臨界距離と、同一条件下で参照細胞について決定した臨界距離とを比較し、

ここに、参照細胞の臨界距離と比較した、アッセイに付した神経細胞の臨界距離の減少が、神経細胞の連結性および/または形態における変化を示していることを特徴とする、

ことを含む、神経細胞の連結性および/または形態における変化を決定するためのバイオアッセイ法。

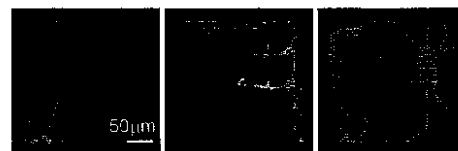
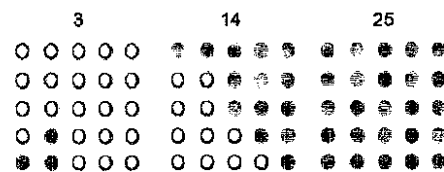


FIG. 1a

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

神経細胞の連結性および/または形態における変化を決定するためのバイオアッセイ法であって：

- 神経突起伸長の形成を支持する条件下での所定のインキュベーション期間の後に、アッセイに付した一对の離れた単一の神経細胞が、相互連結する神経突起伸長を相互にいまだに形成することができる距離に対応する臨界距離を同定し、

ここに、該単一の神経細胞の各々は、該神経細胞の接着を促進する物質のそれぞれのスポットに接着し、該スポットは神経細胞の接着を阻害する基体上に互いに対して間隔をあげて沈着しており、ついで

- 同定した臨界距離と、同一条件下で参照細胞について決定した臨界距離とを比較し、ここに、参照細胞の臨界距離と比較した、アッセイに付した神経細胞の臨界距離の減少が、神経細胞の連結性および/または形態における変化を示していることを特徴とする、該バイオアッセイ法。

**【請求項 2】**

a) 神経細胞の接着を阻害する基体上に、該神経細胞の接着を促進する物質の複数の対のスポットを製造し、ここに該スポットの各々は他のスポットから分離し、他のスポットとは異なり、ここに該対の少なくとも 2 はスポット間の異なる距離を示し；

b) アッセイに付した単一の神経細胞を該スポットの各々に平板し、対応させて接着させ；

c) 所定のインキュベーション期間の後に、該対のスポットに接着した、隣接する神経細胞の間を相互連結する神経突起伸長の可能な形成を検出し；ついで

d) 異なる距離のスポットの対の間の神経突起伸長挙動を比較することによって、相互連結する神経突起伸長の形成が生じる距離に対応する該対のスポット間の最大距離を決定する

作業を含むことを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

接着促進物質のスポットが、連続するスポットの間で増大する距離のステップを有する少なくとも 1 のパターンに従って該基体上に沈着することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

複数のパターンを該基体に沈着させ、その各々が複数の等しく離れたスポットを含み、ここに各パターンが他のパターンの等しく離れたステップとは異なる等しく離れたステップを示すことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

該伸長の形成が検出されるまたは検出されない距離に対応する臨界距離を決定するために、各反復において、該スポットの間の等しく離れたステップの増大または減少を有する等しく離れたスポットの少なくとも 1 のパターンを示す基体を使用して、同一条件下で、a)、b) および c) の作業を繰り返す工程を含むことを特徴する、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

該対のスポット間の距離が  $5\ \mu\text{m}$  ~  $200\ \mu\text{m}$  の範囲であることを特徴とする、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

接着阻害物質が、 $40\ \mu\text{m}$  未満の厚さを有するアガロースまたはポリエチレングリコールの層であることを特徴とする、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

接着促進物質が、露出したアミノ基を有するポリペプチド、またはイミノ基を含むポリマー、または細胞接着のための部位を提供するナノ粒子であることを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9】

該神経突起伸長の形成を検出する工程を、免疫蛍光アッセイあるいは基体に埋め込まれた電極または基体に埋め込まれた光学素子上でのインピーダンス測定のような光学的または電気的な方法に基づくアッセイによって行うことを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

野生型動物の神経細胞および遺伝子改変した同じ動物の神経細胞の臨界相互連結距離を決定するために順次にまたは平行して適用する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

細胞再プログラミングによって得た（非 - 胚性）幹細胞由来の培養物中のヒト神経細胞の神経突起伸長の成長における変化を決定するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

外因性剤または毒素的剤の作用に付したかまたは付していない神経細胞の間の臨界相互連結距離間の比較を含む、薬剤のような外因性剤または毒素的剤の神経細胞に対する効果を決定するための、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法を行うためのキットであって、少なくとも 1 のパターンまたは複数のパターンを含む 1 またはそれを超える固形支持体を含み、各パターンは該支持体のコーティングとして沈着した、該神経細胞の接着を阻害する物質の基体上に沈着した、神経細胞の接着を促進する物質の複数の離れたスポットによって形成され、ここに少なくとも 1 のパターンは徐々に増大するステップによって離されたスポットによって形成され、または該複数のパターンの各々は互いに等距離のスポットによって形成され、ここに各パターンは他のパターンのステップと異なるスポット間のステップを示し、および所望により該スポット間の相互連結する神経突起伸長の免疫アッセイによる検出のための試薬を含み、ここに該スポットが該スポットの各々に阿智する単一の神経細胞の接着を平均して許容するような最大サイズを示すことを特徴とする、該キット。

## 【請求項 14】

接着を阻害する該基体が、好ましくは 40nm の厚さを有する、アガロースまたはポリエチレングリコールの層であることを特徴とする、請求項 13 記載のキット。

## 【請求項 15】

該接着促進物質が、露出したアミノ基を有するポリペプチドまたはアミン基を含むポリマーであることを特徴とする、請求項 13 または 14 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、神経細胞が神経突起伸長を形成し、および / または他の神経細胞に連結する神経細胞の能力を決定および / または定量するアッセイを行うためのバイオアッセイ法およびデバイスに関する。

## 【0002】

本発明の主題である方法およびデバイスは、特に神経細胞の機能特性の研究のための動物モデルに適用する研究ツールとして、また、動物モデルからの細胞または非 - 胚性ヒト細胞に対する神経細胞連結性および / または形態の望ましくない変化に関連する神経細胞または神経の変性疾患の診断におけるツールとしても有用である。

## 【背景技術】

## 【0003】

神経細胞の相互作用 / 相互関係における、すなわち、軸索および先端部成長円錐を介した神経細胞の電気的コミュニケーションにおける神経細胞の生理状態に関する研究においては、例えば格子のようなよく決められた位置に利用できる神経細胞を有すること、それ

10

20

30

40

50

らの各々の連結に優勢な影響を発揮し得ることが重要であることが知られている。

【0004】

物質の標準的なパターンニングの技術は、マイクロエレクトロニクス産業において典型的なフォトリソグラフィーおよび電子線リソグラフィー技術に基づき、過去50年間に発展した個々の技術からの利点を得ている。

【0005】

しかしながら、これらの技術は、剛直な有機材料（シリコンウェーハ）に適用し、方法ステージの間に損傷を引き起こし、侵襲的な有機溶媒の使用を含む電磁線に基づく点において、バイオサイエンスに典型的な有機的および生物学的で、感受性が高く繊細な材料と組み合わせるのが困難である。

【0006】

光線リソグラフィーの技術の別法として、いわゆるソフトリソグラフィーの技術も知られており、それは、いずれか望ましい配置により細胞の接着/反発シグナルのモデルを得ることを可能にする。

【0007】

これらの技術は一般的に決まったスタンプ（マスター）をインプリンティングし、有機/生物/ナノ粒子の目的物の「インク」によって細胞増殖について目的の基体上にモデルを構成することをベースとしている。

【0008】

しかしながら、その名称にもかかわらず、これらの最近の技術も、前記したスタンプを製作するために前記したリソグラフィーの標準的な方法（光線ベースの）に基づき、通常それはケイ素または剛直なクウォーツウェーハのマスク上で行われ、必要な場合は、その後のみ「ソフト」レプリカ（通常、PDMS）で再生される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、平行なソフトリソグラフィーの調製は等しく高価であり、時間の観点で費用がかかり、前記したスタンプを創製する必要性のために大きな寸法および非常に費用がかかる装置を必要とし、したがって、問題のパターンの初期特性がよく決まっていない場合に必要となり得るプロトタイプの迅速な製造に容易に適用することができない。

【0010】

また、標準的なパターンニングの技術は、形態的なニューロンバイオアッセイを許容しないし、または実際に神経突起伸長の定量化および相互連結する神経細胞の能力を許容しない。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、形態およびトポロジーに関する挙動の観点からよく特徴付けられた神経細胞のネットワークを創製する課題を解決する。さらに本発明は、浸漬ペン先チップを使用する単純な物理的（機械的）接触法で柔軟な有機材料をベースとする神経細胞のパターンを製造する技術を提供する課題を解決する。

【0012】

本発明に使用するパターンを調製するための技術が物理-化学的特性（すなわち、化学的アフィニティー、接触剛性、電荷または表面電位）からパターンのトポロジー（形態）的特徴を切り離すことができることも示された。

【0013】

本発明のもう1の目的は、視覚的技術およびShoII解析のようなその後の画像解析に基づくために現在は時間の観点から困難であり費用がかかる、神経細胞の分岐の形態的評価を単純にするアッセイを提供することにある。

【図面の簡単な説明】

【0014】

10

20

30

40

50

添付する図面において

【図1a】 - 図1aは、同一のマトリクス上のイン・ビトロ(in vitro) (DIV) で21日後の3の異なる神経細胞で得た免疫蛍光像を示し、ここにxおよびy方向で50 $\mu$ mのステップで分離された5x5スポットからなるPDL (0.5mg/mL) のスポットが創製されている；

【図1b】 - 図1bは、連結が認められるものに対応する50 $\mu$ m未満の、および連結性が妨げられるものに対応する70 $\mu$ mよりも大きい距離のスポット間の距離についてのPDLのスポット間の距離の関数としての連結性の経験上のパラメータを示す図である；

【図2】 - 図2は、神経細胞培養条件下、空間によって分離されたPDLの一連のY-型パターンのスポットを図示する免疫蛍光像であり、それは底部に向けてターンしたY-型パターンのアームにおいてのみの選択的な神経細胞の成長を示し、PDLのスポットは60 $\mu$ m未満の距離で分離されており、一方、80 $\mu$ mよりも大きいスポット間の距離を有する上部アームについて連結は見出されない。

【図3】 - 図3は、同一パターンの接着タンパク質のスポットで修飾した基体上の野生型マウスおよび遺伝子改変マウスからの海馬神経細胞の成長および連結の間の比較を示す免疫蛍光像である。野生型マウスからの神経細胞は50 $\mu$ mまで分離されたスポットを連結する分岐を成長させるが、遺伝子改変マウスからの神経細胞は40 $\mu$ mまでの距離で分離されたスポットを連結した。

【0015】

前記した目的および課題に鑑み、バイオアッセイ法およびそれを行うための対応するデバイスは、本願明細書の全体部分をなし、本発明の主題をなす下記の特許請求の範囲に規定する特徴を有する。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明にかかるバイオアッセイは、神経細胞接着の阻害特性を有する連続する基体（例えばアガロース）に規定する神経細胞の接着促進部位（例えばポリリシン）の不連続パターン（例えば、スポット）が、神経細胞伸長および該部位間の距離に依存する物理学的連結の形成を安定化および方向付けすることができるという事実の発見に基づく。

【0017】

さらに、本発明の範囲内において、互いに感知し、相互に物理学的接続を伸長させる神経細胞の能力に影響する、接着部位（スポット）間に臨界距離が存在することを見出した。この臨界距離は健全な（野生型）動物からの神経細胞培養物と疾患の動物モデルからの培養物との間で変化する場合がある。

【0018】

これらの知見に基づき、本発明に係るバイオアッセイは以下の作業を提供する。

【0019】

A) 該神経細胞の接着促進物質の複数の互いに離れたスポットの神経細胞の接着を阻害する基体への沈積；この手法は、市販のナノマトリクス（「ナノアレイ」）を製造するための装置を用いて行うことができる。

【0020】

前記した基体は、一般的には、その透明性を考慮して標準的な光学顕微鏡との一体性が容易なためにバイオサイエンスに優先的に選択される材料である平面の固形支持体、典型的にはガラスに沈着する。

【0021】

神経細胞の接着を阻害する基体は、典型的にはアガロースまたはポリエチレングリコールのようなハイドロゲルを形成する物質から形成され、それは、均一で、均質で制御された厚さを得ることを可能にする、好ましくはスピン-コーティング技術によって支持体に沈積される。阻害する基体の厚さは、好ましくは100nm未満、より好ましくは40nm未満である。基体としてアガロースを用いる場合は10nm~20nm位の厚さが特に有利であることが見出され、その場合に良好な神経細胞の生命力が観察され、接着促進物質（本発明の場合は、ポリリシン、PDL）が神経細胞の接着部位を提供できるのみならず、その物質のスポ

10

20

30

40

50

ットの間のモデルの表面をカバーするように伸長する制限されたネットワークの伸長も許容する。

【0022】

したがって、厚さの最小限度が一般的に沈着技術（スピン・コーティング）および連続的な基体を得る必要のみによって規定される、均一かつ均質の特徴を有する入手可能な非常に薄い基体を有することが有利である。

【0023】

神経細胞用の接着促進物質は、一般的に、露出したアミノ基を有するタンパク質の性質またはポリペプチド；例えばポリエチレンイミン（PEI）のような露出したアミノ基を含むポリマー、または接着部位として作用し得る、例えばカーボンナノチューブのようなナノ材料も用いることができる。

10

【0024】

互いに離れ、接着阻害基体材料によって囲まれる前記したスポットは、好ましくは5ないし40  $\mu\text{m}$ 位の、より好ましくは5ないし25  $\mu\text{m}$ 位の最大サイズを示す。

【0025】

B) アッセイに付した神経細胞は、接着促進物質でパターン化した領域に対応して平板および接着させ、次いで、神経突起伸長の成長を助けるのに好適な培養条件下のインキュベーションで維持する。個々のスポットの最大サイズは、少なくとも統計学的には、接着相において単一の細胞体に順応するようなものである（増殖相においては、細胞はシフトすることができ、おそらく互いに融合し得る）。

20

【0026】

C) スポット間の神経突起伸長の形成は、各々個々の隣接したスポットに接着した個々の神経細胞の間のかかる相互連結する神経突起伸長の形成を検出することによって適当なインキュベーション期間の後に決定する。神経突起伸長の検出は、好ましくは免疫蛍光によって行い得るが、基体に埋め込んだ回路上の電気的測定（例えば、インピーダンスの測定）または光学的方法によっても行い得る。

【0027】

免疫・蛍光によって神経突起伸長の形成を検出するために、チューブリンおよびしたがって細胞骨格のマーカー抗体（例えば抗- $\beta$ -III Tub）および神経膠細胞のマーカー抗体を含むブロッキング用溶液を添加しつつ、細胞を固定し得る（例えば、パラホルムアルデヒドで）。チューブリンのマーカー抗体は、デンドライトおよび軸索を際立たせるために重要である。トランスフェクションまたはインフェクション技術は、検査下の細胞中の蛍光タンパク質の発現を引き起こすことによって「生命」検出のために用い得る。

30

【0028】

神経膠細胞マーカー（抗-GFAP）は、神経膠から神経細胞を区別するのに有用である。連結の測定には、光学的技術（顕微鏡または導波管の使用を結合したもの）またはインピーダンス測定または微小電極を用いた機能技術のような電気的および/または電気化学的技術の使用が含まれ得る。微小電極を用いた測定により、物理的神経突起の接続をチェックすることも可能になる。

【0029】

D) したがって、本発明にかかるバイオアッセイは、相互連結する神経突起伸長をまだ形成することができる一対の離れた個々の神経細胞に対応するスポット間の臨界または最大距離の決定を把握する。その距離の決定は、異なる距離で離れた個々のスポットに粘着した個々の神経細胞の間の神経突起伸長の形成をチェックすることによって行い得る。

40

アッセイは距離のステップ変動を有する複数のスポット対の前配置を必要とするため、臨界距離は絶対的な意味において最大距離と一致し得ない。

【0030】

この目的のために、アッセイを行うデバイス、または対応するキットは種々の実施形態を提供し得る。

【0031】

50

複数の支持体、その各々は少なくとも1のそれぞれのパターンを示し、例えばそれは等しく離れた接着スポットのマトリクス配置を有し、そこで、各パターンが、例えば調和して一定の増分で、他のパターンのステップと比較して異なるスポット間のステップを示す、を含むアッセイを行うためのキットを提供することができる。この場合、スポット間の臨界距離は、同一条件下で、より多くの支持体を用いて平行してまたは連続してアッセイを行うことによって測定する。

【0032】

別法として、複数のパターンを示す1の単一の支持体を想定することができ、ここに各パターンは、第1の所定のステップに従って等しく離れた複数のスポットから形成され、かつ異なる等しく離れたステップ、例えば他のパターンと比較して増大する様式で離れたステップを示す。

10

【0033】

例えば各々が隣接するスポット間に1つのステップを有し、段階的な様式で線状の連続を有する、1またはそれを超えるパターンに従う複数のスポットの支持体上の創製も想定することができる。典型的には、行った試験に基づいて、決まったパターンのスポット間のステップまたは距離は10 $\mu$ m~200 $\mu$ mとすることができ、幾つかの異なるパターンを、例えばマトリクスにおいて創製し得る場合、パターン間のステップの増分は前記に示した範囲をカバーするような増分で変化させることができる。

【0034】

パターンの構造の形状は特に重要ではなく、線状に連続する（例えば、直線に進む）、またはすでに示したように、例えば六角形または四角形のマトリクスを有するパターンを含むことができる。

20

【0035】

本発明に係るアッセイにおいては、相互連結する神経突起伸長の形成がかつて観察されたことに対応する臨界距離が決定され、第1の型の神経細胞について決定された、前記した臨界距離の比較の作業は、比較のためにまたは参照神経細胞（例えば、野生型細胞とトランスジェニック細胞との間の比較によって）のために同一条件下で決定した臨界距離を提供することができる。参照細胞は健康な細胞とすることができる。

【0036】

本願明細書中で用いる「複数のスポット」、「複数のスポット対」および「複数のパターン」なる用語には、好ましくは2を超える、例えば、3、4、5...10の数が含まれる。

30

【0037】

バイオアッセイの適用例

1. 培養物中の神経細胞の神経突起伸長の成長の変化の定量化および野生型動物からのおよびトランスジェニック動物（例えば、マウス）からの調製物間の比較

有利な点：

A. バイオアッセイにより、（従来の形態分析技術を用いて必要であったような）個々の神経細胞を視覚化する必要なしに、神経突起伸長における変化を定量化することが可能となる。

B. バイオアッセイは、詳細な形態分析を行う前の迅速なプレ-スクリーニング法として使用することができる。

40

使用例：神経細胞（一次またはセルライン）はスポットの配置で機能化した基体上に沈着し、それによって神経突起伸長によって達成された（または達成されない）スポット間の距離を顕微鏡で読むことが可能になる。かかる試料は、野生型神経細胞または遺伝子改変した動物からの神経細胞のいずれかを用いて調製する。試料は適当な周囲条件下のインキュベーター中で数日（1~20）伸長させる。光学（例えば、蛍光）顕微鏡によって、例えば神経突起伸長によって達せられた最大距離を定量化し、その距離を培養した神経細胞の異なるトポロジー間で得られた結果と比較する。

【0038】

2. 細胞再プログラミング（例えば、ヒトiPSC-由来神経細胞）による非-胚性幹細胞由

50

来の培養物中のヒト神経細胞の神経突起伸長の成長における変化の定量化ならびに健康および罹患対象からの調製物間の比較

有利な点：

hiPSCの分野においては、項目1に示した有利な点のほか、この方法を用いて、ヒト対象からの再プログラム化した細胞試料の有意性を定量化するための予備の結果を得ることができる。

【0039】

3. 薬理学的および/または毒素的物質によって誘導された培養物中の神経細胞（再プログラム化による動物またはヒトモデルからの）の神経突起伸長の成長における変化の定量化

有利な点：

項目1に引用した利点に加えて、本願においては、バイオアッセイは化学生成物の効果を評価することが可能となり、とりわけ、薬剤によって誘導された正常な神経突起伸長の回復の活動、または毒素生成物（すなわち、化学またはナノ粒子）によって誘導された変化の活動の詳細な様式を評価することができる。

使用例：アッセイは、薬理学的に作用する（例えば、単一の投与または一定の投与）以外是一群の試料に対して適用して、同一起源の神経細胞間の神経突起成長の程度の差を評価し得るが、外因性の剤の作用下においてである。

本発明の範囲には、ヒト胚性幹細胞の使用は含まれない。

【0040】

アッセイを行うための方法およびデバイスまたはキットのさらなる特徴は、以下に記載する実施例にならう。

【実施例】

【0041】

実施例1：デバイスの調製

デバイスを調製するために、アガロースゲルの層をガラス支持体、例えばスライドガラス上に沈着させる。ついで、アガロース（Sigma）の0.15%w/w水溶液を、Milli-Q水にアガロース粉を溶解し、電子レンジで沸点とすることにより調製する。溶液は使用する直前に調製し、T=80 のホットプレート上に維持してアガロースを液体状態に維持する。制御された厚さを有するアガロースの沈着は、スピン-コーティング（800rpm、30秒）によって得る。スライドガラスはUV/オゾンチャンパー中で20分間前処理して表面を親水性とし、アガロースの拡散を容易にする。アガロース層は常温で少なくとも6時間風乾させる。得られる層の厚さはプロフィルメータを用いて測定した。スピンコーティングによって得た薄層は約10nmの厚さを有していた。

【0042】

アガロースゲル層を調製した後、接着タンパク質をナノアレイヤーによってその上に沈着した。選択したタンパク質はポリ-D-リシン（PDL）、MW 70,000（Sigma）である。PDLを1mg/mLの濃度でMilli-Q水に溶解し；25マイクロリットルのアリコート进行凍し、-20 に維持した。1のアリコートをMilli-Q水で希釈して、0.3、0.5または0.7mg/mLの最終濃度とした。小容積の液滴を沈着させるために、少量のグリセリン（5%w/w）を溶液に添加する。

【0043】

タンパク質の微小調剤：PDLの微液滴のマトリクスは、SPT C30 Sカンチレバーを備えたナノアレイヤーNanoEnabler（Bioforce）を使用することによって製造する。チャンパー中の相対湿度は $50 \pm 5\%$ に維持する。接触力および後退距離（withdrawal distance）は、各々0.002nNおよび40  $\mu\text{m}$ である。

【0044】

乾燥および湿条件下で沈着したスポットの形態をチェックするために、蛍光標識（ポリ-L-リシン）PLL（0.5mg/mL）を用いた。風乾した試料のスポットと1週間塩水環境下で保存した試料の同一のスポットとの比較は、PDLの使用に関連したスポットのサイズお

10

20

30

40

50

よび形態における差異を示さなかった。また、湿試料では、スポット間のPDLの拡散のシグナルは観察されず、PLLの沈着のゾーンは湿条件下の寸法の観点で局在化し安定したままであった。

#### 【 0 0 4 5 】

デバイスの表面は、MFP - 3D (Asylum Research, USA) を使用する原子間力顕微鏡 (AFM) 技術によって特徴付けした。行った解析からアガロース領域およびPDLのスポットがPDLの濃度から独立して同様の粗さを示すことが明らかになり、溶液の液滴によって放出されたPDLがアガロースの多孔性マトリクスによって完全に吸収されることを示している。異なる濃度のタンパク質の効果を査定するために、PDLのスポットで査定した接触剛性 ( $K_{PDL}$ ) と周囲のアガロースで測定したものの ( $K_{agar}$ ) との間の比 (剛直係数 (stiffening coefficient)  $S=K_{PDL} / K_{agar}$  を与える) を測定した。結果は、0.1mg/mLのPDLについて、剛直効果は検出測定の感度閾値に非常に近く; 0.3mg/mLの中間の濃度についてはほぼその値が倍になるまでSは迅速に増大し、最終的に高濃度 (0.5および0.7mg/mL) でプラトーに達することを示した。これらの基体上では、標準的な細胞培養および固定化プロトコールを行うことが可能であり、必要な場合は蛍光標識で結合して得られる細胞培養物の形態の顕微鏡解析を可能ならしめる。

タンパク質を沈着した後、基体は神経細胞の培養物を調製するつぎの相のために30分間UV照射して滅菌した。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 実施例2: アッセイの実施

スポット間の距離が20 - 120  $\mu\text{m}$  の範囲で変化し、異なるマトリクス形態を用いる実験を行った。詳細には、5x5スポットからなるPDLのパターンの四角形マトリクス (図1a) を調製し、一次海馬細胞培養物用の基体として用いた。培養物は、妊娠18日目のSprague - Dawleyラットの皮質から得た。胚性ラットの大脳皮質を切除し、解離した。得られた組織は2%のB - 27および1%のGlutamax - 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加えたNeuro basal培地に再懸濁し、細胞を70細胞/ $\text{mm}^2$ の密度でアガロース/PDLに平板した。培養物は5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、37  $^{\circ}\text{C}$  に維持し、培地を取り替えるため以外は取り出さなかった。低密度の調製物の成長を支えるために、培養培地を含有するマルチウェルプレート (Corning, Lowell, MA, USA) 中のスライドガラス上で培養物を調製した。各ウェルは0.1mg/mLのPDLでコートし、パラフィンの液滴を用いてスライドガラスを保持した。ウェルの底部に150細胞/ $\text{mm}^2$ の密度で海馬培養物を蒔いた。蒔いた後、スライドガラスを無菌鉗子を用いてウェルまで移動し、細胞培養物の側面を培地に向けてパラフィンの液滴上に置いた。培養培地は毎週取り替えた。

#### 【 0 0 4 7 】

細胞は、パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した。固定した試料に、1XPBS 中の0.1% (v/v) のTriton X - 100を15分間透過させた。ブロッキング用溶液 (1XPBS, 1% BSA, 5% FBS) を常温にて45分間加えて非特異的な反応をブロックした。その試料を、ブロッキング用溶液に希釈した一次モノクローナル抗体 (mAb) ウサギ抗 - マウス III Tubおよび抗 - GFAP (Millipore, Billerica, MA, USA) と常温にて3時間インキュベートした。次に、その試料を洗浄し、Alexa488で標識したヤギ抗 - ウサギの二次抗体またはAlexa546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で標識したモノクローナル抗体ヤギ抗 - マウスと常温にて45分間インキュベートした。次いで、その試料を、DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含有する退色防止試薬Prolongを用いてマウントし、4  $^{\circ}\text{C}$  にて保存した。試料は、BX51 Olympus顕微鏡に装着したイメージング・システムNeuroLucida (Bioscience mbf, Williston, VT, USA) を用いた広視野蛍光顕微鏡によって視覚化した。画像は、ImageJで解析し、Adobe Photoshop CS3 Suite (Adobe, San Jose, CA, USA) で処理した。

#### 【 0 0 4 8 】

14および21DIVに発達した神経ネットワークの形態を分析した。免疫蛍光像から、10 - 20nmのアガロースの薄層を有する基体上で良好な神経細胞の活力が観察されること、神経細胞の接着部位を提供する沈着したPDLの液滴がモデルの表面上で神経細胞の成長を制限

することが確認された。バイオプリントした表面上のネットワークの異なる程度の発達を比較するための参照パラメータを有するように、神経細胞間の物理的レンス蹴るが起きているスポットの数を分析した(図1a)。他のスポットに存在する神経細胞に向けての伸長を示さない神経細胞でカバーされたスポットは、連結したとして考慮しなかった。このようにして、連結したスポット/全スポットの比を得、これをマトリクスを創製するために使用した異なるステップについて比較した。ステップは、隣接するスポット間の中心-中心の距離として提示する。すべてのデータは、OriginPro (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA) を用いて分析した。連結値の統計学的有意性は、ANOVA分散テストによって判定した。

#### 【0049】

PDLのスポット間の神経細胞の物理的連結の発達を促進または強調するバイオ-パターンニング条件で情報を得るために、パターンの形状上の制約を変化させ、スポット間神経細胞連結性に対する効果を調べた。詳細には、接着スポット間の距離を徐々に増大してゆく過程で、スポット間の連結を伸長する神経細胞の能力における限界を観察した。これらの実験データを定量化するために、経験的連結性パラメータを導入した。ネットワークはそれ自体を異なって伸長させて、例えばマトリクス中の異なる数の接着点を連結することによって、パターン化した表面をカバーするために、これは必要である。例えば、図1aは3つの異なる発達状況を表す3つの神経細胞パターンを示し、すべて同一パターンのPDL上の21DIVのものである。これらの結果を定量化し、それをポイント間の距離に関連付けるために、マトリクス自体中のスポットの合計数に対して標準化した、マトリクス中で神経突起によって連続して連結された隣接する接着スポットの数として経験的連結性パラメータ $c$ を規定した。例えば、図1aの上段は、図示する各マトリクスと関連する連結性数を示す。

#### 【0050】

連結性閾値 $c > 0.25$ を考慮して、厚さ $t < 20\text{nm}$ のアガロースの層である好ましいインターフェースの場合を考慮しながら統計分析を行った。基準を満足するマトリクスの集団上の平均連結性値の結果を、スポット間距離の関数として(図1b)のようにプロットする。分析は、異なる動物に由来する15の異なる一次神経細胞培養物に属する試料上で $n = 48$  (ステップ $d = 30\ \mu\text{m}$ ) の最小値から $n = 120$  (ステップ $d = 40, 50, 60$ および $70\ \mu\text{m}$ ) の最大値の範囲の試料の数 $n$ に対して分析を行った。図1bから、 $50\ \mu\text{m}$ 未満のスポット間の分離は神経細胞連結性を許容するが、 $70\ \mu\text{m}$ を超える距離まで増大すると神経細胞間の連結は損なわれることが明らかに出ている。これらの2の状況の間には、不確定の領域が観察される。神経細胞伸長の発達を指示するように2のレベルでこれらのインターフェースを設計できることを示すために、神経細胞培養物を単純なY-型のパターンで、不均一な配置でPDLのスポットを用いて培養した。上部アームでは、スポットは連結性距離閾値を超える距離で存在し、一方下部アームではスポットは閾値未満の距離で存在する。これらの構造物で培養した神経細胞の代表的な像を図2に示す。

#### 【0051】

予想されるように、全てのY-型モデルにおいて、神経突起は下部アーム上で発達し、連結性距離閾値未満のステップを有する。また、それがPDLのスポットに接着する場合、神経細胞は神経突起伸長を示さず、21DIVまで生存しない。

#### 【0052】

以前に記載しかつ添付する特許請求の範囲に規定する配置に従う、神経細胞の1またはそれを超える接着スポットをその上に創製した1またはそれを超える固形支持体を含むデバイスまたはキットを提供することによって、本発明に係るバイオアッセイを実施することができる。バイオアッセイを行う間、その上にアッセイに付した神経細胞が接着することができる。

#### 【0053】

必要な場合、キットにはインキュベーション期間後に形成されたスポット間の神経突起伸長の間の連結の免疫アッセイによる、特に免疫蛍光による検出のための試薬を含ませる

10

20

30

40

50

ことができる。

【0054】

本発明により得られた結果は、接着した神経細胞のマトリクスまたはパターンをベースとするバイオアッセイが、ネットワークの適応性 (plasticity)、再生および動力学のようなトポロジーに依存する機能特性の研究に寄与することについて、イン・ビボ (in vivo) の研究と比較して容易にされ、単純化された実験モデルを表していることを示している。この領域における最近の研究においては、かかる変化を調べるためにトランスジェニック動物に基づくモデルのシステムが用いられている。

【0055】

この目的のために、野生型動物および遺伝子改変動物ならびにDiGeorge症候群のキャリアからの神経培養物を比較する試験を行った。この疾患は神経細胞の成長、特に樹状分岐の発達に機能障害を導入することが知られている。前記した技術によりアガロースでコーティングし、ポリ-D-リシンのパターンで修飾した基体に細胞を平板し、14DIVまで増殖させ；予め選択したパターンを等距離の5パネルの列を一連のものとし；各列には30にのぼるスポットを含め、スポット間の距離は異なり、特に列から列にかけて距離は30 μm、40 μm、50 μmおよび70 μmで徐々に増大する。

【0056】

図3は2の典型的な同一パターン上の2のタイプの動物に属する神経細胞から得た免疫蛍光像を示す。野生型マウスに属する神経細胞 (図3a) はそれが50 μmの距離をカバーするまでデンドライトを増殖させ、スポットを連結した。遺伝子改変した動物の神経細胞の分岐は、40 μmの距離をカバーすることのみ管理した (図3b)。

【0057】

バイオアッセイの1つの実施形態において、必要な場合、連結性のみならず形成した神経接続の機能活性をも定性する目的で、スポットに対応する電極を挿入することができる。

10

20

【図1b】

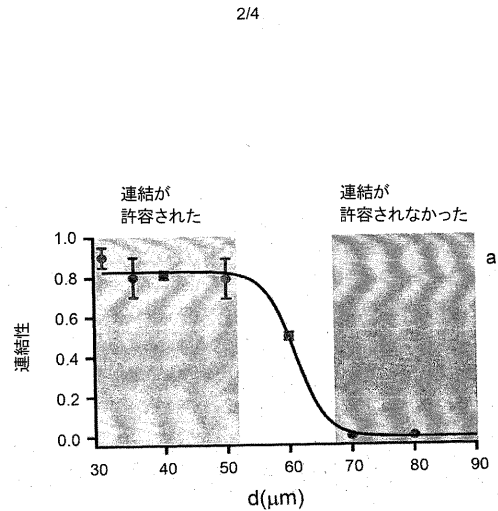
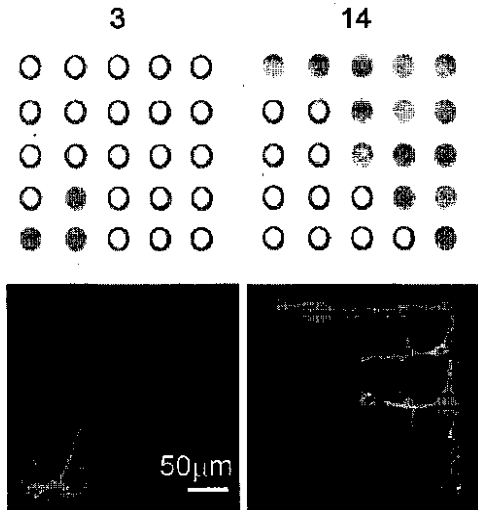


FIG. 1b

【 図 2 】

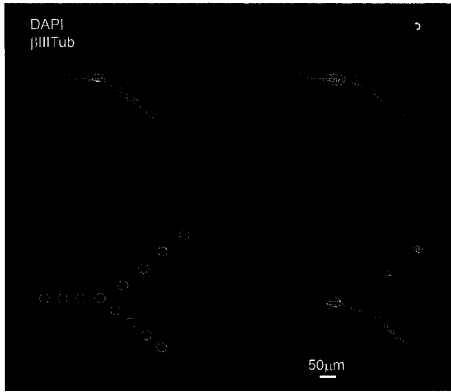


FIG. 2

【 図 3 】

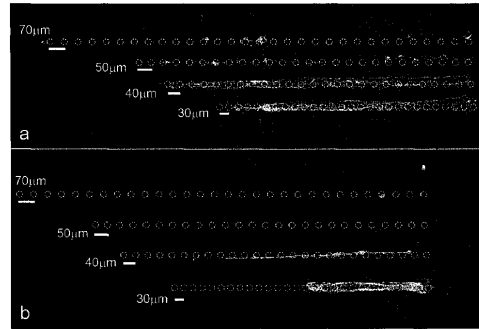


FIG. 3

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/051804
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOUROVSKAIA A ET AL: "Micropatterns of chemisorbed cell adhesion-repellent films using oxygen plasma etching and elastomeric masks", LANGMUIR, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, NEW YORK, NY; US, vol. 19, no. 11, 27 May 2003 (2003-05-27), pages 4754-4764, XP002367767, ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/LA0267948 abstract; figures 1,2 Experimental Section ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 July 2013		17/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mulder, Lonneke

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/051804
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LI ET AL: "Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 311, no. 2, 10 December 2005 (2005-12-10), pages 307-316, XP005166109, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/J.YEXCR.2005.10.007 abstract; figure 1 section materials and methods section "axon guidance...cues"; page 309 reference 29</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
X	<p>YONG HEE KIM ET AL: "Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly--lysine", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 202, no. 1, 23 August 2011 (2011-08-23), pages 38-44, XP028308287, ISSN: 0165-0270, DOI: 10.1016/J.JNEUMETH.2011.08.036 [retrieved on 2011-08-31] abstract; figures 5,6 scheme 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-6,8,9,13,15
X	<p>MESSA M ET AL: "Growth Cone 3-D Morphology is Modified by Distinct Micropatterned Adhesion Substrates", IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE, IEEE SERVICE CENTER, PISCATAWAY, NY, US, vol. 8, no. 2, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 161-168, XP011268211, ISSN: 1536-1241, DOI: 10.1109/TNB.2009.2019109 abstract; figures 1, 2 section II, materials and methods</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,6,8,9,13,15
X	<p>MARCO SALERNO ET AL: "AFM measurement of the stiffness of layers of agarose gel patterned with polylysine", MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE, 1 January 2010 (2010-01-01), pages NA-NA, XP055038833, ISSN: 1059-910X, DOI: 10.1002/jemt.20838 abstract materials and methods</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	13-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/051804
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SALERNO M ET AL: "Local increase in stiffness of agarose gel layer by patterning with polylysine measured via atomic force microscopy", JOURNAL OF THE MECHANICAL BEHAVIOR OF BIOMEDICAL MATERIALS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 3, no. 6, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 425-435, XP027113308, ISSN: 1751-6161 [retrieved on 2010-06-29] abstract materials and methods -----</p>	13-15
A	<p>DOWELL-MESFIN N M ET AL: "Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons; Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons", JOURNAL OF NEURAL ENGINEERING, INSTITUTE OF PHYSICS PUBLISHING, BRISTOL, GB, vol. 1, no. 2, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 78-90, XP020082864, ISSN: 1741-2552, DOI: 10.1088/1741-2560/1/2/003 abstract; figures 1,6 -----</p>	1-15
T	<p>EMANUELE MARCONI ET AL: "Emergent Functional Properties of Neuronal Networks with Controlled Topology", PLOS ONE, vol. 7, no. 4, 6 April 2012 (2012-04-06), page e34648, XP055038830, DOI: 10.1371/journal.pone.0034648 abstract; figures 1,2 section materials and methods -----</p>	1-15
T	<p>YUZO TAKAYAMA ET AL: "Formation of one-way-structured cultured neuronal networks in microfluidic devices combining with micropatterning techniques", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 114, no. 1, 24 April 2012 (2012-04-24), pages 92-95, XP055038903, ISSN: 1389-1723, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.011 abstract; figure 1 page 93 -----</p>	1-15

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ルカ・ベルドンディーニ

イタリア、イ - 1 6 1 2 8 ジェノヴァ、ヴィーコ・デル・フィーコ 9 / 2 番

(72) 発明者 シルヴィア・ダンテ

イタリア、イ - 1 7 0 4 7 ヴァード・リーグレ(サヴォナ)、ヴィア・サバーツィア 1 3 - 4 番

(72) 発明者 エマヌエーレ・マルコーニ

イタリア、イ - 1 6 1 6 3 ジェノヴァ、ヴィア・モレゴ 3 0 番

(72) 発明者 マルコ・サレルノ

イタリア、イ - 1 9 0 2 5 ラ・スペツィア、ヴィア・カステッラーナ・センツァ・ヌメロ・チヴィコ

(72) 発明者 ダヴィデ・デ・ピエトリ・トネッリ

イタリア、イ - 1 6 0 1 1 アレンツァーノ(ジェノヴァ)、ヴィア・ジ・カプローニ 1 1 8 / 2 番

F ターム(参考) 2G054 AA08 AB04 CE02 EA03

2G060 AA15 AD06 AF06 AG08 AG10

4B029 AA07 AA08 BB11 CC02 FA15

4B063 QA01 QA18 QQ08 QR77 QS33 QS39 QX02

专利名称(译)	用于确定神经元连通性和/或形态变化的方法和设备		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015513404A</a>	公开(公告)日	2015-05-14
申请号	JP2014560506	申请日	2013-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	意大利学院科技基金会		
申请(专利权)人(译)	方达梓Ohnet, 因诺琴蒂基金会意大利语双涡轮增压器技术		
[标]发明人	ルカベルドンディーニ シルヴィアダンテ エマヌエーレマルコーニ マルコサレルノ ダヴィデデピエトリトネッリ		
发明人	ルカ・ベルドンディーニ シルヴィア・ダンテ エマヌエーレ・マルコーニ マルコ・サレルノ ダヴィデ・デ・ピエトリ・トネッリ		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N27/02 G01N21/78 C12M1/34		
CPC分类号	G01N33/5029 G01N33/5032 G01N33/5058 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N27/02.D G01N21/78.C C12M1/34.B		
F-TERM分类号	2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G060/AA15 2G060/AD06 2G060/AF06 2G060/AG08 2G060/AG10 4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	田中, 三夫 山田卓司 佐藤 剛		
优先权	102012902029676 2012-03-07 IT		
其他公开文献	JP6190394B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 研究工作：-在有利于神经突产物形成的条件下，经过预定的潜伏期后，接受该测定的一对遥远的单个神经元仍相互形成相互连接的神经突产物。标识与可以达到的距离相对应的临界距离 在此，每个单个神经细胞粘附在促进神经细胞粘附的物质的相应斑点上，这些斑点在抑制神经细胞粘附的基质上彼此隔开。存入，然后 -将识别出的临界距离与在相同条件下为参考电池确定的临界距离进行比较，在此，与参考细胞的临界距离相比，待测神经元的临界距离减少的特征在于神经元连接性和/或形态的改变，一种确定神经细胞连通性和/或形态变化的生物测定方法，包括：

