

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6430680号  
(P6430680)

(45) 発行日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日(2018.11.9)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	Z
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)	C 1 2 N 5/0793	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
請求項の数 17 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-514120 (P2018-514120)  
 (86) (22) 出願日 平成29年2月1日(2017.2.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2017/003653  
 (87) 国際公開番号 W02017/187696  
 (87) 国際公開日 平成29年11月2日(2017.11.2)  
 審査請求日 平成30年4月2日(2018.4.2)  
 (31) 優先権主張番号 62/328,905  
 (32) 優先日 平成28年4月28日(2016.4.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 801000049  
 一般財団法人生産技術研究奨励会  
 東京都目黒区駒場四丁目6番1号  
 (74) 代理人 100116207  
 弁理士 青木 俊明  
 (72) 発明者 藤井 輝夫  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大  
 学法人東京大学内  
 (72) 発明者 池内 与志穂  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大  
 学法人東京大学内  
 (72) 発明者 金田 祥平  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大  
 学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経細胞を培養する装置、神経細胞を培養する方法、培養された神経細胞、軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法並びに神経細胞の使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞体と軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる1つの軸索束とを有する神経細胞の密集体を培養する装置であって、

培養プレート(10)と、

該培養プレート(10)内に配置された複数のモジュール(11)であって、各モジュール(11)は、神経細胞の細胞体を受容可能な第1チャンバー(12a)を1つ、第2チャンバー(12b)を1つ、及び、細胞体から延びた軸索束を受容可能なチャンネル(13)であって前記第1チャンバー(12a)と第2チャンバー(12b)とを接続するチャンネル(13)を1つ含むモジュール(11)と、

10

を備え、  
 前記第1チャンバー(12a)、第2チャンバー(12b)及びチャンネル(13)の下端が閉止され、前記第1チャンバー(12a)及び第2チャンバー(12b)の上端が開放され、前記チャンネル(13)は、幅100~150[μm]及び高さ100~200[μm]であり、長さ1[mm]以上である装置。

【請求項2】

前記第2チャンバー(12b)は骨格筋を受容可能であり、これにより、細胞体から延びた軸索束が骨格筋に接合する請求項1に記載の装置。

【請求項3】

20

細胞体と軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる1つの軸索束とを有する神経細胞の密集体を培養する方法であって、

1つの第1チャンバー(12a)、1つの第2チャンバー(12b)、及び、前記第1チャンバー(12a)と第2チャンバー(12b)とを接続する長さ1〔mm〕以上、幅100～150〔μm〕及び高さ100～200〔μm〕の1つのチャンネル(13)に培養液を供給するステップであって、前記第1チャンバー(12a)、第2チャンバー(12b)及びチャンネル(13)は培養プレート(10)内に配置されたモジュール(11)の1つに含まれているステップと、

前記第1チャンバー(12a)内に1つのスフェロイドを播種するステップと、

前記神経細胞を培養し、これにより、前記1つのスフェロイドから1つの軸索束が成長して前記チャンネル(13)内を延びるステップと、  
を備える方法。

【請求項4】

前記第2チャンバー(12b)に骨格筋が播種され、これにより、前記スフェロイドから延びた軸索束が骨格筋に接合する請求項3に記載の方法。

【請求項5】

細胞体と軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる1つの軸索束とを有する神経細胞の密集体における前記軸索束内の純度を確認する方法であって、

請求項3に記載の方法により、1つの軸索束が成長して1つのスフェロイドから伸展するように神経細胞を培養して、該神経細胞の密集体が、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる長さ1〔mm〕以上の1つの軸索束とを有する状態にするステップと、

前記軸索束を対象にプロテインを解析及び同定し、該プロテインの解析及び同定により、前記軸索束が、ウェスタンブロッティングによる細胞体の存在を示すマーカーがネガティブであることに相当する程度に細胞体が不存在な状態であることを確認するステップと、

を備える方法。

【請求項6】

前記マーカーは、マップ2(Map2)及びヌクレオポリン(Nucleoporin)である請求項5に記載の方法。

【請求項7】

細胞体と軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる1つの軸索束とを有する神経細胞の密集体における前記軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法であって、

請求項3に記載の方法により、1つの軸索束が成長して1つのスフェロイドから伸展するように神経細胞を培養するステップと、

前記軸索束をスライスするステップと、

前記軸索束内に存在するプロテインを解析及び同定するステップと、を備える方法。

【請求項8】

細胞体と軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる1つの軸索束とを有する神経細胞の密集体を使用する方法であって、

請求項3に記載の方法により、1つの軸索束が成長して1つのスフェロイドから伸展するように神経細胞を培養するステップと、

前記神経細胞に蛍光処理を施すステップと、

前記神経細胞を刺激するステップと、

を備える方法。

【請求項9】

10

20

30

40

50

前記神経細胞に蛍光処理を施すステップが、前記神経細胞にカルシウム応答性蛍光色素を取り込ませるステップである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記神経細胞を刺激するステップが、電気生理学的活動を観察するために前記神経細胞に K C I を付与するステップである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞体と軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる1つの軸索束とを有する神経細胞の密集体における前記軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法であって、

請求項 3 に記載の方法により、1つの軸索束が成長して1つのスフェロイドから伸展するように神経細胞を培養するステップと、

前記軸索束をスライスするステップと、

免疫染色法によって、前記軸索束内に存在するプロテインを解析及び同定するステップと、

を備える方法。

【請求項 12】

ヒト i P S 細胞由来の細胞体と該細胞体から延びた軸索とを有する複数の神経細胞から成る神経細胞の密集体であって、

該神経細胞の密集体は、1つのスフェロイドと、該スフェロイドから1方向に延びる長さ 1 [mm] 以上の1つの軸索束とを有し、

前記スフェロイドは複数の細胞体の密集体であり、

前記軸索束は複数の軸索の束であって、前記軸索束内では、ウェスタンブロッティングによる細胞体の存在を示すマーカーがネガティブであることに相当する程度に細胞体が不存在な状態を示す、

神経細胞の密集体。

【請求項 13】

前記軸索束が 4 . 5 [mm] 以上の長さを有する請求項 12 に記載の神経細胞の密集体

【請求項 14】

前記スフェロイドがグリア細胞を含む請求項 12 又は 13 に記載の神経細胞の密集体。

【請求項 15】

前記神経細胞の密集体は単離されている請求項 12 ~ 14 のいずれか1項に記載の神経細胞の密集体。

【請求項 16】

前記神経細胞の密集体は運動神経細胞である請求項 12 ~ 15 のいずれか1項に記載の神経細胞の密集体。

【請求項 17】

前記軸索束は軸索末端において骨格筋細胞と接合する請求項 16 に記載の神経細胞の密集体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、神経細胞を培養する装置、神経細胞を培養する方法、培養された神経細胞、軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法並びに神経細胞の使用方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

神経疾患に効果のある薬剤を迅速に開発するためには、in vitro (体外) で神経細胞及び軸索を培養する必要がある。従来、神経細胞及び軸索を培養するための装置がいくつか提案されている (例えば、非特許文献 1 及び特許文献 1 参照)。これらの装置は、複数

10

20

30

40

50

の区画室を備えるマイクロ流体プラットフォームであって、軸索を成長させて分離することができる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Taylor, Anne M et al. “A Microfluidic Culture Platform for CNS Axonal Injury, Regeneration and Transport ” Nature methods 2.8 (2005):599-605. PMC. Web. 8 Mar. 2016.

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願公開第2004/0106192号公報(A1)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、前記従来技術は、十分なものではなかった。ドラッグスクリーニング等において神経組織を評価するためには、細胞体、軸索、及び、細胞体と軸索との接合部をそれぞれ評価する必要があるが、前述の方法では、それぞれの部位を空間的に分け、評価することができない。

【0006】

本開示の利点の1つは、in vitroで神経細胞から延びる軸索束を迅速に成長させる神経細胞を培養する装置を提供することができることである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

そのために、装置においては、軸索を有する神経細胞を培養する装置であって、培養プレートと、該培養プレート内に配置された複数のモジュールであって、各モジュールは、神経細胞の細胞体を受容可能な第1チャンバーを少なくとも1つ、第2チャンバーを少なくとも1つ、及び、細胞体から延びた軸索束を受容可能なチャンネルであって前記第1チャンバーと第2チャンバーとを接続するチャンネルを少なくとも1つ含むモジュールと、を備え、前記第1チャンバー、第2チャンバー及びチャンネルの下端が閉止され、前記第1チャンバー及び第2チャンバーの上端が開放されている。

【0008】

他の装置においては、さらに、前記第1チャンバー、第2チャンバー及びチャンネル内に培養液が入れられ、前記第2チャンバーの上端が少なくとも1つのシール部材によって閉止される。

【0009】

更に他の装置においては、さらに、前記第2チャンバーは骨格筋を受容可能であり、これにより、細胞体から延びた軸索束が骨格筋に接合する。

【0010】

更に他の装置においては、さらに、前記チャンネルは、幅100~150[μm]及び高さ100~200[μm]である。

【0011】

方法においては、軸索を有する神経細胞を培養する方法であって、第1チャンバーの少なくとも1つ、第2チャンバーの少なくとも1つ、及び、前記第1チャンバーと第2チャンバーとを接続するチャンネルの少なくとも1つに培養液を供給するステップであって、前記第1チャンバー、第2チャンバー及びチャンネルは培養プレート内に配置されたモジュールの少なくとも1つに含まれているステップと、前記第1チャンバー内に神経細胞を播種するステップと、前記神経細胞を培養し、これにより、軸索束が成長して各チャンネル内を延びるステップと、を備える。

【0012】

他の方法においては、さらに、前記第2チャンバーの少なくとも1つに骨格筋が播種さ

10

20

30

40

50

れ、これにより、神経細胞から延びた軸索束が骨格筋に接合する。

【0013】

神経細胞においては、培養液内に播種することによって培養された複数の神経細胞であって、細胞体と、該細胞体から所定の方向に延びた少なくとも1つの軸索束とを備える。

【0014】

他の神経細胞においては、さらに、前記細胞体、軸索束及び軸索末端は、空間的に分離されている。

【0015】

更に他の神経細胞においては、さらに、前記神経細胞はスフェロイド状であり、前記軸索束は伸展可能である。

10

【0016】

更に他の神経細胞においては、さらに、前記軸索束は骨格筋に接合する。

【0017】

更に他の神経細胞においては、さらに、培養液内に播種することによって培養された複数の神経細胞であって、細胞体と、該細胞体から所定の方向に延びた少なくとも1つの軸索束とを備え、該軸索束は細胞体を含んでいない。

【0018】

方法においては、軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法であって、軸索束の少なくとも1つが成長して神経細胞の細胞体から伸展するように神経細胞を培養するステップと、ウェスタンブロットングによって、前記軸索束内では、前記細胞体の存在を示すマーカーがネガティブであることを確認するステップと、を備える。

20

【0019】

他の方法においては、さらに、前記マーカーは、マップ2 (Map 2) 及びヌクレオポリン (Nucleoporin) である。

【0020】

更に他の方法においては、軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法であって、軸索束の少なくとも1つが成長して神経細胞の細胞体から伸展するように神経細胞を培養するステップと、前記軸索束をスライスするステップと、前記軸索束内に存在するプロテインを解析及び同定するステップと、を備える。

【0021】

更に他の方法においては、軸索束を含む神経細胞を使用する方法であって、軸索束の少なくとも1つが成長して神経細胞の細胞体から伸展するように神経細胞を培養するステップと、前記神経細胞に蛍光処理を施すステップと、電気生理学的活動を観察するために前記細胞体にKClを付与するステップと、を備える。

30

【発明の効果】

【0022】

本開示によれば、in vitroで神経細胞から延びる軸索束を迅速に成長させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本実施の形態における背景を示す模式図である。

【図2】本実施の形態における概念を示す図である。

【図3】本実施の形態における培養プレートを示す図である。

【図4】本実施の形態における培養プレート内の培養モジュールを示す図である。

【図5】本実施の形態におけるシールを備えた培養モジュールを示す図である。

【図6】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索を示す写真である。

【図6A】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索を示す他の写真である。

【図7】本実施の形態における培養プレートから抽出した軸索を示す写真である。

40

50

【図 8】本実施の形態における 409B2 細胞株由来の運動神経細胞の軸索と実験室マウスの骨格筋とを接合する実験を示す図である。

【図 9】本実施の形態における 409B2 細胞株由来の運動神経細胞の軸索と実験室マウスの骨格筋とを接合する長期間の実験を示す図である。

【図 10】本実施の形態における 409B2 細胞株由来の運動神経細胞の軸索と C2C12 細胞株由来の骨格筋とを接合する実験を示す図である。

【図 11】本実施の形態におけるタンパク質の観察に使用した軸索束の写真である。

【図 12】本実施の形態における伸展に使用した軸索束の写真である。

【図 13】本実施の形態におけるカルシウムイメージングに使用した運動神経細胞の写真である。

10

【図 14】本実施の形態における培養モジュールの種々の例を示す模式図である。

【図 15】本実施の形態における軸索を細胞体から分離する工程を示す図である。

【図 16】ALS の原因を示す模式図である。

【図 17】本実施の形態におけるストレステストの結果を示す写真である。

【図 17A】本実施の形態におけるストレステストの軸索の配向性評価結果を示す図である。

【図 18】本実施の形態におけるグリア細胞との共培養の結果を示す写真である。

【図 19】本実施の形態におけるグリア細胞があるとき及びないときに細胞体のスフェロイドから伸びた軸索束の写真である。

【図 20】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束を観察した結果を示す図である。

20

【図 20A】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束を含む神経細胞の断面を示す写真である。

【図 20B】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束を含む神経細胞の断面を示す他の写真である。

【図 21】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束の表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果を示す写真である。

【図 22】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内でストレスをかけたときの軸索束を示す写真である。

【図 23】本実施の形態における培養プレートのチャンネル内でストレスをかけたときの軸索束の形態変化の実験結果を示すグラフである。

30

【図 24】本実施の形態における培養プレートのモジュールでの軸索のミエリン化を示す図である。

【図 25】本実施の形態における装置の適用可能分野を示す模式図である。

【図 26】本実施の形態における装置の他の適用可能分野を示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本実施の形態について図面を参照しながら詳細に説明する。

【0025】

図 1 は本実施の形態における背景を示す模式図、図 2 は本実施の形態における概念を示す図である。なお、図 2 において、(a) は神経細胞の模式図、(b) は従来の培養の結果を示す図、(c) は本実施の形態の概念を示す図である。

40

【0026】

本実施の形態は、軸索を備える神経細胞を培養する新しいプロセス、培養に適した新しい装置及び培養された軸索束を備える神経細胞の密集体を提案する。神経疾患に有効な薬剤を迅速に探索するためには、体内と類似した環境で神経細胞を培養することが重要である。図 2 に示されるように、神経細胞 (neuron) は、細胞体 (cell body) と軸索末端 (axon) を有する軸索 (axon terminal) とを具備する。そして、図 1 に示されるように、体内において、運動神経 (motoneuron) の軸索は束になり、軸索末端は複数の骨格筋 (skeletal muscle) の細胞に接合している。したがって、in vitro の培養によって、図 2 (c

50

)に示されるように、細胞体、軸索及び軸索末端が互いに空間的に分離した状態で、束(bundle)になった軸索を有する細胞体の密集体、すなわち、細胞体のスフェロイド(spheroid)を生成することが望ましい。薬剤の効果を適確に確認するためには、薬剤を、評価対象である細胞体、軸索束、軸索末端等の各部位に付与し、各部位における薬剤の効果を評価することが必要である。しかしながら、従来の培養方法では、図2(b)に示されるように、細胞体と軸索とが空間的に混ざったランダムな状態の軸索付きの細胞体しか提供することができなかった。

#### 【0027】

次に、本実施の形態において使用される装置の構成について説明する。

#### 【0028】

図3は本実施の形態における培養プレートを示す図、図4は本実施の形態における培養プレート内の培養モジュールを示す図、図5は本実施の形態におけるシールを備えた培養モジュールを示す図である。なお、図3において、(a)は平面図、(b)は(a)における培養モジュールの拡大側断面図であり、図4において、(a)は培養プレートの写真、(b)は培養モジュールの模式側断面図、(c)~(e)の各々は培養モジュールの模式平面図であり、図5において、(a)はシールを備えた培養モジュールの模式側断面図、(b)はシールを備えた培養モジュールの写真、(c)はシール及び細胞を備えた培養モジュールの模式側断面図、(d)はシール及び細胞体のスフェロイドを備えた培養モジュールの模式側断面図、(e)はシールを備えない培養モジュールの模式側断面図である。

#### 【0029】

本実施の形態においては、培養プレート10を使用する。図3(a)及び4(a)に示されるように、培養プレート10は、矩形形状の板状部材であり、行方向及び列方向に並んで配置された複数のモジュール11を含んでいる。そして、培養プレート10は、透明なガラス板であるカバースリップから成る基板15と、該基板15の表面に取り付けられた上板16とを含んでいる。該上板16には複数のモジュール11が形成されている。図3及び4に示されるように、各モジュール11は、平面視においてダンベルのような形状を有し、全体として、U字のような形状の断面形状を有し、第1チャンバー12aと、第2チャンバー12bと、第1及び第2チャンバー12a、12bの底部を連結するチャンネル13とを含んでいる。

#### 【0030】

上板16は、PDMS(poly-dimethyl-siloxane)シートであってもよく、公知のフォトリソグラフィ技術を使用して作成することができる(例えば、非特許文献1及び特許文献1参照)。なお、上板16は、例えば、Pyrex(登録商標)等の他のポリマー又はガラスから成る板状部材であってもよく、例えば、ホットエンボス加工、穴開け加工等の方法を使用して作成されたものであってもよい。

#### 【0031】

第1及び第2チャンバー12a、12bの各々は、円筒状の凹部であって、底面が基板15によって閉止され、上面が開口する井戸状の窪みとして作成されている。チャンネル13の一端は第1チャンバー12aの側壁の下端に開口し、その他端は第2チャンバー12bの側壁の下端に開口する。チャンネル13の幅は、好適には100~150[ $\mu\text{m}$ ]であり、その高さは、好適には100~200[ $\mu\text{m}$ ]であるが、これらの寸法は係る数値に限定されるものでなく、必要に応じて調整することができる。そして、第1及び第2チャンバー12a、12b並びにチャンネル13の内部には、培養液18が充填される。モジュール11の構成が簡素なので、培養液18はモジュール11内にスムーズに流入可能である。また、チャンネル13のサイズが、従来の装置におけるもの(例えば、非特許文献1及び特許文献1参照)と比較して大きいので、第1及び第2チャンバー12a、12b内の培養液18は自然に混ざることができる。第1及び第2チャンバー12a、12bの各々の平面形状は、図4(e)に示されるように、円形であることが望ましいが、円形に限定されるものでなく、必要に応じて変化させることができる。図3(a)、4(c)及び

10

20

30

40

50

4 (d) に示される例では、チャンネル 13 の入口部 13 a がテーパの付いた平面形状となっているので、第 1 チャンバー 12 a の平面形状は完全な円形でなく変形しているが、一方、第 2 チャンバー 12 b の平面形状は、チャンネル 13 の入口部 13 a が直線的形状なので、ほぼ完全な円形になっている。入口部 13 a がテーパの付いた平面形状となっていると、軸索はチャンネル 13 内に効果的に導かれる。入口部 13 a が直線的形状であっても、軸索はチャンネル 13 内で束を形成することができる。

#### 【0032】

第 1 及び第 2 チャンバー 12 a、12 b のうちの一方の内部には、神経細胞の細胞体が入れられる、すなわち、播種される。細胞体が播種されるチャンパーとしては、第 1 及び第 2 チャンバー 12 a、12 b のうちのいずれをも選択することもできるが、本実施の形態においては、便宜上、第 1 チャンバー 12 a を細胞体が播種されるチャンパーとする。図 4 (c) に示される例においては、複数の神経細胞体が、別々で、すなわち、解離 (dissociated) 細胞状態で、播種されている。また、図 4 (d) 及び (e) に示される例においては、複数の神経細胞体が、密集して、すなわち、スフェロイドの状態で、播種されている。そして、しばらく培養した後には、神経細胞の軸索がチャンネル 13 内を第 2 チャンバー 12 b にまで伸びて、チャンネル 13 内で束を形成する。チャンネル 13 の内径は、神経細胞の軸索束を収容するのに十分な大きさであることが望ましい。

#### 【0033】

図 5 (a) 及び (b) に示されるように、中に神経細胞体が播種されていない第 2 チャンバー 12 b の開放端を閉止するために、第 2 チャンバー 12 b の上にシール部材 17 を載置することが望ましい。該シール部材 17 は、好適には PCR (Polymerase Chain Reaction) のシーリング板又はシーリングフィルムから成るものであるが、必ずしもこれに限定されるものでなく、シーリングに適した材料であれば、いかなる材料から成るものであってもよい。図 5 (c) 及び (d) に示されるように、第 2 チャンバー 12 b の開放端がシール部材 17 によって閉止されていると、培養液が第 2 チャンバー 12 b に流れ込むことが防止されるので、神経細胞体を第 1 チャンバー 12 a 内に播種して保っておくことが容易になる。図 5 (e) に示されるように、第 2 チャンバー 12 b の開放端が開放されたままであると、第 1 チャンバー 12 a 内に入れられた神経細胞体は、培養液とともに、第 2 チャンバー 12 b 内に流入しがちである。神経細胞体をスフェロイドの状態で第 1 チャンバー 12 a 内に播種するのであれば、細胞体のスフェロイドは大き過ぎてチャンネル 13 内を流れないので、シール部材 17 を省略することができる。

#### 【0034】

次に、本実施の形態による培養プレート 10 を使用して発明者が行った軸索を成長させる実験の結果を説明する。

#### 【0035】

図 6 は本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索を示す写真、図 6 A は本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索を示す他の写真、図 7 は本実施の形態における培養プレートから抽出した軸索を示す写真である。なお、図 6 において、(a) は培養プレートの一部の写真、(b) は (a) に示されるモジュールのうちの 1 つの軸索の写真であり、図 6 A において、(a) は軸索の長さが 4.5 [mm] の例を示す写真、(b) は軸索の長さが 9 [mm] の例を示す写真であり、図 7 において、(a) は神経組織の拡大写真、(b) は細胞核の蛍光写真 (マーカー-Hoechst を使用)、(c) は神経全体の蛍光写真 (マーカー-Tuj 1 を使用) である。

#### 【0036】

本実験においては、ヒト iPS 細胞 (409B2 細胞株) 由来の運動神経細胞を使用した。運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを、第 1 チャンバー 12 a 内に播種して培養した。ウェルプレートすなわち皿を使用して、ヒト iPS 細胞から運動神経細胞を取得した。そして、非接着性の培養プレートを使用して細胞体のスフェロイドを得た。なお、培養は、37 [°C]、O<sub>2</sub> : 20 [%]、CO<sub>2</sub> : 5 [%] の環境下で行われた。すると、図 6 に示されるように、チャンネル 13 内で軸索が成長して第 2 チャンバー 12 b にまで伸び

10

20

30

40

50

た。培養後、運動神経細胞の集合体を、培養プレート10のモジュール11から抽出した、すなわち、取り出した。モジュール11から抽出した運動神経細胞の集合体は、図7(a)に示されるように、細胞体の集合体から延在する大きな軸索束を備える。図7(b)に示されるように、細胞体内に存在し、マーカーであるHoechstによって染色された細胞核が、運動神経細胞の集合体内に観られた。また、図7(c)に示されるように、マーカーであるTuj1によって染色された運動神経細胞の集合体が、観られた。軸索束は、細胞体の集合体から延在していることが、明瞭に認識された。なお、チャンネル13の長さや内径を変更することによって、種々の大きさの軸索束を得ることができる。例えば、図6A(a)に示される例においては軸索の長さが4.5〔mm〕であり、図6A(b)に示される例においては軸索の長さが9〔mm〕である。観察や実験に使用するためには、軸索の長さは、1〔mm〕以上であることが望ましい。また、軸索束の幅は、例えば、100〔μm〕にすることができる。この場合、後述する図20(c)に示されるような軸索束の断面のTEM画像で観察すると、約5500本の軸索が含まれていることが分かる。

#### 【0037】

前述のように、本実施の形態によれば、培養プレート10の各モジュール11内での培養によって軸索束を得ることができる。したがって、各モジュール11内の軸索束に薬剤を付与することによって、薬剤のスクリーニングを迅速に行うことができる。さらに、各モジュール11内において軸索束が細胞体から分離されているので、各モジュール11内の軸索束に薬剤を正確に付与することによって、神経疾患に有効な薬剤をスクリーニングすることができ、また、軸索束のどの部分に、例えば、遠位端や近位端に、薬剤が効くのかを確認することができる。

#### 【0038】

次に、本実施の形態による培養プレート10を使用して発明者が行った軸索と骨格筋とを接合する実験の結果を説明する。

#### 【0039】

図8は本実施の形態における409B2細胞株由来の運動神経細胞の軸索と実験室マウスの骨格筋とを接合する実験を示す図、図9は本実施の形態における409B2細胞株由来の運動神経細胞の軸索と実験室マウスの骨格筋とを接合する長期間の実験を示す図、図10は本実施の形態における409B2細胞株由来の運動神経細胞の軸索とC2C12細胞株由来の骨格筋とを接合する実験を示す図である。なお、図8及び9において、(a)は実験室マウスの筋管の写真、(b)はモジュールの模式平面図、(c)は筋管がない場合の軸索の拡大写真、(d)は筋管がある場合の軸索の拡大写真であり、図10において、(a)はモジュールの模式平面図、(b)は接合部分の拡大写真である。

#### 【0040】

第1の実験においては、神経細胞としてヒトiPS細胞(409B2細胞株)由来の運動神経細胞を使用し、骨格筋として(図8(a)に示される)実験室マウスの筋管を使用した。運動神経細胞及び細胞体のスフェロイドは、前述の方法と同様の方法で得た。また、それらの培養も前述の方法と同様の方法で行った。図8(b)に示されるように、神経細胞を第1チャンバー12a内に播種し、骨格筋を第2チャンバー12b内に播種して、神経細胞及び骨格筋の共培養を行った。骨格筋を第2チャンバー12b内に播種した場合、そうでない場合よりも、軸索の成長速度が高く、軸索束が成長して厚くなるのが早いことが分かった。図8(c)及び(d)は、それぞれ、筋管が第2チャンバー12b内に播種されない場合、及び、筋管が第2チャンバー12b内に播種された場合の、培養28日後におけるチャンネル13内の軸索の成長状態を示している。第2の実験においては、第1の実験(28日)よりも長期間(43日)に亘って、しかし、図9(a)及び(b)に示されるように、第1の実験と同様のモジュール11並びに同様の運動神経細胞及び筋管を同様に使用し、共培養を行った。筋管が第2チャンバー12b内に播種されない場合には、軸索束の形態が変性することが分かった。図9(c)及び(d)は、それぞれ、筋管が第2チャンバー12b内に播種されない場合、及び、筋管が第2チャンバー12b内に播種された場合の、培養43日後におけるチャンネル13内の軸索の成長状態を示している。

## 【 0 0 4 1 】

第3の実験においては、神経細胞としてヒト i P S 細胞 ( 4 0 9 B 2 細胞株 ) 由来の運動神経細胞を使用し、骨格筋としてマウス筋原細胞 ( C 2 C 1 2 細胞株 ) 由来の横紋筋を使用した。図 1 0 ( a ) に示されるように、神経細胞を第 1 チャンバー 1 2 a 内に播種し、骨格筋を第 2 チャンバー 1 2 b 内に播種して、神経細胞及び骨格筋の共培養を行った。そして、軸索と骨格筋とが接合した部分を -Bungarotoxin によって染色し、軸索を Tuj 1 によって染色した。図 1 0 ( b ) に示されるように、軸索と骨格筋との接合が観られた。

## 【 0 0 4 2 】

前述のように、本実施の形態によれば、軸索末端を、細胞体が存在する第 1 チャンバー 1 2 a から離れた第 2 チャンバー 1 2 b 内において、骨格筋に接合することができる。換言すると、本実施の形態は、体内と類似した状況を提供することができる。したがって、各モジュール 1 1 内の軸索束と骨格筋との接合部分に薬剤を正確に付与することによって、神経疾患に有効な薬剤をスクリーニングすることができる。

10

## 【 0 0 4 3 】

次に、本実施の形態による培養プレート 1 0 を使用して発明者が行った軸索を成長させ、成長させた軸索をスライスして内部のタンパク質 ( プロテイン ) を観察する実験の結果を説明する。

## 【 0 0 4 4 】

図 1 1 は本実施の形態におけるタンパク質の観察に使用した軸索束の写真である。なお、図において、( a ) は培養プレートの外に抽出された軸索束を備える細胞体のスフェロイドの写真、( b ) は ( a ) に示されるスフェロイド内での軸索 ( マーカー Tau 1 を使用 ) の存在を示す写真、( c ) は ( b ) に示されるスフェロイド内での細胞核の蛍光写真 ( マーカー Hoechst を使用 ) 、( d ) は ( a ) に示される軸索束の薄片内での軸索の存在を示す写真、( e ) は軸索束の薄片内での細胞核の不存在を示す蛍光写真である。

20

## 【 0 0 4 5 】

本実験においては、ヒト i P S 細胞 ( 4 0 9 B 2 細胞株 ) 由来の運動神経細胞を使用した。運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを、第 1 チャンバー 1 2 a 内に播種して培養した。運動神経細胞及び細胞体のスフェロイドは、前述の方法と同様の方法で得た。また、それらの培養も前述の方法と同様の方法で行った。図 1 1 ( a ) に示されるように、1 0 日間の培養後、大きく成長して長く伸びた軸索束を含む運動神経細胞の 1 つを培養プレート 1 0 のモジュール 1 1 から抽出した、すなわち、取り出した。そして、軸索束をスライスし、内部に存在するタンパク質の観察に適するような軸索束の薄片を得た。図 1 1 ( d ) に示されるように、軸索束の内部にタンパク質が観察されることを確認した。また、図 1 1 ( e ) に示されるように、軸索束の内部には細胞核が存在しないことを確認し、軸索束は軸索の純粋な集合であることを確認した。

30

## 【 0 0 4 6 】

前述のように、本実施の形態によれば、培養プレート 1 0 の各モジュール 1 1 から、軸索束と一体となった細胞体のスフェロイドを取り出すことができる。したがって、軸索束をスライスしてその内部のタンパク質を観察することによって、軸索束に存在するタンパク質の解析及び同定を行うことができ、また、神経疾患のスクリーニング及び同定を行うことができ、さらに、神経疾患に有効な薬剤のスクリーニングを行うことができる。これに対して、従来の運動神経を培養する方法では、細胞体の集合及び軸索束が統合された細胞組織を得ることができず、従来の培養装置の外で細胞体及び軸索束のそれぞれの内部を観察することが困難であった。

40

## 【 0 0 4 7 】

次に、本実施の形態による培養プレート 1 0 を使用して発明者が行った成長させた軸索を伸展させる実験の結果を説明する。

## 【 0 0 4 8 】

図 1 2 は本実施の形態における伸展に使用した軸索束の写真である。なお、図において

50

、(a)は培養プレートの外における伸展前の軸索束を備えるスフェロイドの写真、(b)は培養プレートの外における伸展後の軸索束を備えるスフェロイドの写真である。

【0049】

本実験においては、ヒトiPS細胞(409B2細胞株)由来の運動神経細胞を使用した。運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを、第1チャンバー12a内に播種して培養した。運動神経細胞及び細胞体のスフェロイドは、前述の方法と同様の方法で得た。また、それらの培養も前述の方法と同様の方法で行った。図12(a)に示されるように、培養後、細胞体のスフェロイド及び大きく成長して長く伸びた軸索束を含む運動神経細胞の1つを培養プレート10のモジュール11の外へ取り出した。その全長は3.1[m]であった。そして、軸索束の近位端及び遠位端をピンセットでつまんで引っ張ると、図12

10

【0050】

前述のように、本実施の形態によれば、細胞体のスフェロイドと一体となった軸索束は、培養プレート10の各モジュール11から抽出する、すなわち、取り出すことができる。そして、前述の実験で確認されたように、軸索束を機械的に伸展させることができる。したがって、軸索束と一体となった所望の種類運動神経細胞を事前に培養することによって、運動神経細胞の軸索束の移植を行うことができる。体内の軸索束の物理的特性を試験し、評価することが困難であったところ、本実施の形態によってミリメートル以上の軸索束を得ることができるので、軸索束の伸展のような様々な実験を行うことができる。

20

【0051】

次に、本実施の形態による培養プレート10を使用して発明者が行った成長させた軸索のカルシウムイメージング実験の結果を説明する。

【0052】

図13は本実施の形態におけるカルシウムイメージングに使用した運動神経細胞の写真である。なお、図において、(a)は培養プレートの外におけるカルシウム付与前の軸索束を備えるスフェロイドの写真、(b)は培養プレートの外におけるカルシウム付与後の軸索束を備えるスフェロイドの写真である。

【0053】

本実験においては、ヒトiPS細胞(409B2細胞株)由来の運動神経細胞を使用した。運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを、第1チャンバー12a内に播種して培養した。運動神経細胞及び細胞体のスフェロイドは、前述の方法と同様の方法で得た。また、それらの培養も前述の方法と同様の方法で行った。培養後、大きく成長して長く伸びた軸索束を含む運動神経細胞の1つを培養プレート10のモジュール11から抽出した、すなわち、取り出した。そして、図13(a)に示されるように、細胞体のスフェロイド及び軸索束を含む運動神経細胞に蛍光処理を施した。続いて、細胞体のスフェロイドに1[mol]のKClを付与すると、図13(b)に示されるように、KClの刺激によって誘発された電気生理学的活動の結果により、蛍光が強くなった。KClを付与することによって、細胞体のスフェロイド及び軸索束を含む運動神経細胞が電気生理学的に活発になる

30

40

【0054】

前述のように、本実施の形態によれば、細胞体のスフェロイド及び軸索束を含む運動神経細胞は培養プレート10の各モジュール11から取り出すことができる。そして、前述の実験で確認されたように、運動神経細胞をカルシウムイメージングに使用することができる。したがって、軸索束に対する電気生理学的活動の体外における評価が困難であったところ、軸索束と一体となった所望の種類運動神経細胞を事前に培養することによって、細胞体に与えられた刺激が軸索を通過してどのように伝わるのかを観察することができ、神経補綴技術の開発に応用することができる。

【0055】

50

次に、本実施の形態におけるモジュール 11 のチャンパー 12 a、12 b 及びチャンネル 13 の配置の種々の例について説明する。

【0056】

図 14 は本実施の形態における培養モジュールの種々の例を示す模式図である。なお、図において、(a) ~ (g) は、各々、チャンパー及びチャンネルの配置の異なるタイプを示す図である。

【0057】

本実施の形態において、モジュール 11 におけるチャンパー 12 a、12 b 及びチャンネル 13 の配置は、必ずしも、図 3 及び 4 に示されるように、チャンネル 13 によって連結された一対のチャンパー 12 a、12 b を含むものに限定されるものではない。図 14 (a) に示される例によれば、モジュール 11 は、各々に細胞体のスフェロイドが播種される 2 つの第 1 チャンパー 12 a と、1 つの第 2 チャンパー 12 b と、各々が第 1 チャンパー 12 a の 1 つと第 2 チャンパー 12 b とを接続する 2 つのチャンネル 13 とを含んでいる。図 14 (b) に示される例によれば、モジュール 11 は、細胞体のスフェロイドが播種される 1 つの第 1 チャンパー 12 a と、2 つの第 2 チャンパー 12 b と、各々が第 1 チャンパー 12 a と第 2 チャンパー 12 b の 1 つとを接続する 2 つのチャンネル 13 とを含んでいる。図 14 (c) に示される例によれば、モジュール 11 は、各々に細胞体のスフェロイドが播種される 2 つの第 1 チャンパー 12 a と、1 つの第 2 チャンパー 12 b と、2 つの第 1 チャンパー 12 a と第 2 チャンパー 12 b とを接続するように途中で 2 つに分岐した 1 つのチャンネル 13 とを含んでいる。図 14 (d) に示される例によれば、モジュール 11 は、細胞体のスフェロイドが播種される 1 つの第 1 チャンパー 12 a と、2 つの第 2 チャンパー 12 b と、第 1 チャンパー 12 a と 2 つの第 2 チャンパー 12 b とを接続するように途中で 2 つに分岐した 1 つのチャンネル 13 とを含んでいる。図 14 (e) に示される例によれば、モジュール 11 は、細胞体のスフェロイドが播種される 1 つの第 1 チャンパー 12 a と、4 つの第 2 チャンパー 12 b と、各々が第 1 チャンパー 12 a と第 2 チャンパー 12 b の 1 つとを接続する 4 つのチャンネル 13 とを含んでいる。

【0058】

前述のように、本実施の形態によれば、神経細胞が第 1 チャンパー 12 a 内に播種されて培養されると、軸索はチャンネル 13 内で成長して第 2 チャンパー 12 b に向けて延び、さらに、骨格筋が第 2 チャンパー 12 b 内に播種されると、軸索の遠位端と骨格筋とが第 2 チャンパー 12 b 内で接合する。さらに、図 14 (f) に示されるように、細胞体のスフェロイドを第 1 チャンパー 12 a 及び第 2 チャンパー 12 b の両方の内部に播種することによって、中枢神経モデルに応用することができる。また、図 14 (g) に示されるように、下位運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを第 1 チャンパー 12 a 内に播種し、上位運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを第 2 チャンパー 12 b 内に播種し、骨格筋を他の第 2 チャンパー 12 b 内に播種することによって、下位運動神経、上位運動神経及び骨格筋を含む系に応用することができる。したがって、種々の培養モジュール 11 を用意すれば、神経細胞、軸索及び骨格筋の間の種々の形態の接合関係を *in vitro* で得ることができ、神経疾患に有効な薬剤の種々の実験や研究に使用することができる。

【0059】

次に、本実施の形態における培養プレート 10 のモジュール 11 内で軸索を細胞体から分離して軸索と細胞体とを別々に抽出する方法について説明する。

【0060】

図 15 は本実施の形態における軸索を細胞体から分離する工程を示す図である。なお、図において、(a-1) ~ (a-5) の各々はモジュールの上側を示す写真、(b-1) ~ (b-5) の各々は (a-1) ~ (a-5) にそれぞれ対応するモジュールの模式断面図である。

【0061】

本実施の形態によれば、図 11 ~ 13 に示されるように、細胞体及び軸索束を含む運動神経細胞を全体として抽出することができるだけでなく、モジュール 11 内で軸索束を細

10

20

30

40

50

胞体から分離してそれらを別々に抽出することができる。まず、図15(a-1)及び(b-1)に示されるように、運動神経細胞の細胞体がモジュール11の第1チャンパー12a内に播種されて培養され、それにより、軸索束が成長し、チャンネル13を通過して第1チャンパー12aから第2チャンパー12bにまで延びる。続いて、図15(a-2)及び(b-2)に示されるように、カッター21によって軸索束が細胞体から分離される。この場合、少なくとも上板16が好適にはPDMSのような軟らかい材料から成るので、カッター21は、上板16とともに軸索束をスムーズに切断することができる。続いて、図15(a-3)及び(b-3)に示されるように、ピペット22を使用して吸い出すことによって、第1チャンパー12aから細胞体を取り出される、すなわち、つまみ上げられる。続いて、図15(a-4)及び(b-4)に示されるように、ピペット22を使用して吹き付けることによって発生した培養液18の流れとともに、残留していた軸索束がチャンネル13から第2チャンパー12b内に追い出される。最後に、図15(a-5)及び(b-5)に示されるように、ピペット22を使用して吸い出すことによって、第2チャンパー12bから軸索束を取り出される、すなわち、つまみ上げられる。

10

**【0062】**

前述のように、本実施の形態によれば、モジュール11内で軸索束を細胞体から分離して軸索束だけを抽出することができる。これにより、軸索束内だけに存在するタンパク質やRNAの解析を行うことができる。このような解析は、神経疾患を分析するための重要なプロセスである。

**【0063】**

20

次に、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に有効な薬剤の開発のための本実施の形態における装置の有用性について説明する。

**【0064】**

図16はALSの原因を示す模式図、図17は本実施の形態におけるストレステストの結果を示す写真、図17Aは本実施の形態におけるストレステストの軸索の配向性評価結果を示す図、図18は本実施の形態におけるグリア細胞との共培養の結果を示す写真、図19は本実施の形態におけるグリア細胞があるとき及びないときに細胞体のスフェロイドから延びた軸索束の写真である。なお、図17において、(a)はストレスがないときの軸索束の写真、(b)はERストレスがあるときの軸索束の写真であり、図18において、(a)はグリア細胞があるときの細胞体のスフェロイドの写真、(b)はグリア細胞がないときの細胞体のスフェロイドの写真であり、図19において、(a)はグリア細胞があるときの軸索束のスフェロイドの写真、(b)はグリア細胞がないときの軸索束のスフェロイドの写真である。

30

**【0065】**

図16に示されるように、ALSの疾患は、グルタミン酸過剰(toxicity of glutamate)、過興奮(hyperexcitability)、グリア毒性(glial toxicity)、ミトコンドリア障害(mitochondria dysfunction)、軸索輸送障害(disruption of axonal transport)、物理的ダメージ(physical damage)、酸化ストレス(oxidative stress)、小胞体(ER: endoplasmic reticulum)ストレス、封入体形成(inclusion bodies)などが原因であると考えられている。これらの原因の1つでも人工的に再現することができれば、ALSに有効な薬剤の発見につながると考えられる。これらの原因を再現するために、本実施の形態による培養プレート10を使用して、発明者はいくつかの実験を行った。

40

**【0066】**

タプシガルジン(thapsigargin)を使用して、運動神経に対するERストレスの効果を確認するために、第1の実験を行った。第1の実験においては、ヒトiPS細胞(409B2細胞株)由来の運動神経細胞を使用した。運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを第1チャンパー12a内に播種して培養した。運動神経細胞及び細胞体のスフェロイドは、前述の方法と同様の方法で得た。また、培養も前述の方法と同様の方法で行った。培養後、十分に成長して延びた軸索束を備える運動神経細胞を、1.5[mol]のタプシガルジンを含む培養液で5時間処理した。そして、6日後に、図17(b)に示されるような

50

軸索束の形態の評価を、図17(a)に示されるようなタプシガルジンで処理されなかった運動神経細胞の軸索束の形態と比較して、行った。また、図17Aに示されるように、軸索の配向性の評価を行った。ストレスをかけると、配向性が低くなる、すなわち、軸索が変性している、と言える。ERストレスを受けた運動神経では形態が変化することを確認した。

#### 【0067】

特定の遺伝子の変異に起因するグリア細胞のALSに関する毒性が議論されているので、本実施の形態による培養プレート10を使用して運動神経細胞をグリア細胞と共培養することができることを確認するために、第2の実験を行った。第2の実験においては、ヒトiPS細胞(409B2細胞株)由来の運動神経細胞を使用した。第1チャンバー12a内で培養することによって得た運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを、グリア細胞を混ぜた後、培養した。続いて、運動神経細胞をマーカーであるHoechst、Tuj1及びGFAP(Glia Fibrillary Acidic Protein)によって染色した。図18(a)はグリア細胞を混ぜた運動神経細胞を示し、図18(b)はグリア細胞を混ぜなかった運動神経細胞を示している。GFAPはグリア細胞を識別するためのマーカーなので、グリア細胞が細胞体のスフェロイド内に一様に分布していることを確認した。さらに、10日間の培養後、図19(a)に示されるような運動神経細胞にグリア細胞を混ぜた場合であっても、図19(b)に示されるような運動神経細胞にグリア細胞を混ぜなかった場合と同様に、軸索束は、成長して細胞体のスフェロイドからチャンネル13内に延びた。このように、グリア細胞との共培養系を得ることができることを確認したので、グリア細胞との共培養系をグリア毒性による神経変性の再現及びALSに有効な薬剤開発のための薬剤スクリーニングへの応用を期待することができる。

#### 【0068】

次に、本実施の形態による培養プレート10を使用して成長させた軸索束を細胞体と比較して観察した結果について説明する。

#### 【0069】

図20は本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束を観察した結果を示す図、図20Aは本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束を含む神経細胞の断面を示す写真、図20Bは本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束を含む神経細胞の断面を示す他の写真である。なお、図20において、(a-1)~(a-3)は各種のマーカーによって染色した細胞体の断面を示す写真、(b-1)~(b-3)の各々は(a-1)~(a-3)にそれぞれ対応する軸索束の断面を示す写真、(c)は軸索束の断面の透過型電子顕微鏡写真、(d)は細胞体及び軸索束のタンパク質解析の結果を示す図であり、図20Aにおいて、(a-1)及び(a-2)は各種のマーカーによって染色した細胞体の断面を示す写真、(b-1)及び(b-2)の各々は(a-1)及び(a-2)にそれぞれ対応する軸索束の断面を示す写真であり、図20Bにおいて、(a-1)~(a-3)の各々は各種のマーカーによって染色した細胞体の断面を示す写真、(b-1)~(b-3)の各々は(a-1)~(a-3)にそれぞれ対応する軸索束の断面を示す写真である。

#### 【0070】

ここでは、ヒトiPS細胞(409B2細胞株)由来の運動神経細胞を使用した。運動神経細胞の細胞体のスフェロイドを、第1チャンバー12a内に播種して培養した。運動神経細胞及び細胞体のスフェロイドは、前述の方法と同様の方法で得た。また、それらの培養も前述の方法と同様の方法で行った。培養後、大きく成長して長く延びた軸索束を含む運動神経細胞の1つを培養プレート10のモジュール11から抽出した、すなわち、取り出した。そして、細胞体のスフェロイド及び軸索束をマーカーであるHoechst、Tau1、Synapsin1及びMap2によって染色した。図20(a-1)~(a-3)は、それぞれ、Hoechst及びTau1によって染色した細胞体の断面、Hoechst、Tau1及びSynapsin1によって染色した細胞体の断面、Hoechst、Map2及びSynapsin1によって染色した細胞体の断面であり、図20(b-1)~(b-3)は、それぞれ、図20(a-1)~(a

- 3 ) に対応するように染色した軸索束の断面である。また、図 2 0 A ( a - 1 ) 及び ( a - 2 ) は、それぞれ、Tau 1 によって染色した細胞体の断面とHoechst 及びTau 1 によって染色した細胞体の断面であり、図 2 0 A ( b - 1 ) 及び ( b - 2 ) は、それぞれ、図 2 0 A ( a - 1 ) 及び ( a - 2 ) に対応するように染色した軸索束の断面である。さらに、図 2 0 B ( a - 1 ) ~ ( a - 3 ) は、それぞれ、Hoechst によって染色した細胞体の断面、Map 2 によって染色した細胞体の断面、Synapsin 1 によって染色した細胞体の断面であり、図 2 0 B ( b - 1 ) ~ ( b - 3 ) は、それぞれ、図 2 0 B ( a - 1 ) ~ ( a - 3 ) に対応するように染色した軸索束の断面である。軸索が束になっているので、軸索の断面を容易に免疫染色で観察することができる。

【 0 0 7 1 】

また、図 2 0 ( c ) は、軸索束の断面の T E M 画像、すなわち、透過型電子顕微鏡によって撮像した写真である。軸索が束になっているので、複数の軸索の断面を容易に透過型電子顕微鏡で観察することができる。これにより、軸索内のミトコンドリア、シナプス、微小管の状態を観察することができ、薬剤の効果の評価に利用することができる。

【 0 0 7 2 】

さらに、図 2 0 ( d ) は、公知のウェスタンブロッティング ( Western blotting ) すなわちウェスタンブロット方法 ( Western blot analysis ) により、マーカであるMap 2 、 Nucleoporin 、 Tau 1 、 Synapsin 1 及びSynaptophysin によって染色した細胞体のスフェロイド及び軸索束のタンパク質解析の結果を示している。なお、 [ k D a ] は、単位キロドルトンを示している。軸索が束になっているので、効率的に軸索だけのサンプルを回収することができ、軸索の特異的なタンパク質の解析を行うことができる。図 2 0 ( d ) において、細胞体のスフェロイドのサンプルと軸索束のサンプルとを比較すると、軸索束のサンプルでは、細胞体のマーカであるMap 2 及びNucleoporin がネガティブであることが分かる。したがって、軸索束のサンプルには細胞体が含まれていないこと、すなわち、軸索束のサンプルは軸索の純度が高いことが分かる。なお、このことは、図 2 0 ( b - 1 ) ~ ( b - 3 ) 、図 2 0 A ( b - 1 ) 及び ( b - 2 ) 並びに図 2 0 B ( b - 1 ) ~ ( b - 3 ) に示される免疫染色において、軸索束のサンプルでは、細胞体のマーカであるMap 2 及び核染色のHoechst がネガティブであることから、分かる。なお、Synapsin 1 は、神経全体に存在しているので、軸索束にも細胞体にも観察される。

【 0 0 7 3 】

次に、本実施の形態による培養プレート 1 0 を使用して成長させた軸索束を走査型電子顕微鏡で観察した結果について説明する。

【 0 0 7 4 】

図 2 1 は本実施の形態における培養プレートのチャンネル内で成長した軸索束の表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果を示す写真である。なお、図において、 ( a - 1 ) 及び ( a - 2 ) はストレスをかけなかったときの低倍率及び高倍率の写真、 ( b - 1 ) 及び ( b - 2 ) の各々は ( a - 1 ) 及び ( a - 2 ) にそれぞれ対応するストレスをかけたときの写真である。

【 0 0 7 5 】

軸索束は、図 2 0 に示される観察で使用したものと、同様のものである。軸索が束になっているので、軸索束の表面を容易に走査型電子顕微鏡で観察することができる。また、軸索は、束になっていて同じ方向に延びているので、例えば、ストレス ( 図 2 1 ( b - 1 ) 及び ( b - 2 ) に示される例は、酸化ストレス ) をかけたときの変化が明確である。

【 0 0 7 6 】

次に、本実施の形態による培養プレート 1 0 を使用して成長させた軸索束にストレスをかけたときの形態変化について説明する。

【 0 0 7 7 】

図 2 2 は本実施の形態における培養プレートのチャンネル内でストレスをかけたときの軸索束を示す写真、図 2 3 は本実施の形態における培養プレートのチャンネル内でストレスをかけたときの軸索束の形態変化の実験結果を示すグラフである。なお、図 2 2 において、

10

20

30

40

50

( a ) はストレスをかけないときの写真、( b ) は酸化ストレスをかけたときの写真、( c ) は酸化ストレス及び抗酸化剤を付与したときの写真である。

【 0 0 7 8 】

ここでは、ヒト i P S 細胞 ( 4 0 9 B 2 細胞株 ) 由来の運動神経細胞を非接着性の培養プレート 1 0 に播種して細胞体のスフェロイドを作製した。続いて、細胞体のスフェロイドを 1 0 日間培養した後、培養プレート 1 0 のモジュール 1 1 の第 1 チャンバー 1 2 a 内に播種した。そして、培養 3 0 日目に、以下の ( 1 ) ~ ( 3 ) の条件の処理を行った。

( 1 ) control PBS (Phosphate Buffered Saline) washing>>>culture medium

( 2 ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3hour treatment>>>PBS washing>>>culture medium

( 3 ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3hour treatment>>>PBS washing>>>culture medium containing Edaravone

処理を行ってから 2 日後に、マーカーである Tau 1 で免疫染色した後、評価を行った。なお、評価項目は、Directionality：軸索の方向性である。具体的には、図 2 2 内のオブジェクトの方向性を計測した。この場合、0 度が流路 ( チャンネル 1 3 ) 方向である。軸索は、束になっていて同じ方向に延びているので、チャンネル 1 3 内で、例えば、図 2 2 ( b ) に示されるように、酸化ストレスを付与したときや、図 2 2 ( c ) に示されるように、酸化ストレスと、神経疾患の薬剤として用いられる抗酸化剤 ( Edaravone ) とを同時に付与したときの形態変化を比較することができる。そして、図 2 3 に示されるような評価実験の結果は、酸化ストレスを付与すると、軸索方向に伸展する軸索が変性するので、流路方向 ( 0 度 ) への方向性が減少し複雑な形状に変化することを示している。形態変化の評価として、図 2 3 に示されるオブジェクトの配向性 ( Directionality ) を調べると、負荷を

【 0 0 7 9 】

次に、本実施の形態による培養プレート 1 0 を使用して成長させた軸索束のミエリン化について説明する。

【 0 0 8 0 】

図 2 4 は本実施の形態における培養プレートのモジュールでの軸索のミエリン化を示す図である。なお、図において、( a ) はモジュール内の神経細胞のミエリン化を説明する模式図、( b ) はシュワン細胞がないときの軸索の写真、( c ) はシュワン細胞があるときの軸索の写真である。

【 0 0 8 1 】

体内のミエリン ( 髄鞘 ) を in vitro で再現する際、従来の方法では、神経細胞の細胞体とシュワン細胞やオリゴデロンサイトの細胞体とが混ざっているので、評価が複雑であった ( それぞれの細胞体を識別することが困難であった。 ) 。これに対して、本実施の形態における培養プレート 1 0 を使用すると、図 2 4 ( a ) に示されるように、モジュール 1 1 のチャンネル 1 3 内及び反対側にある第 2 チャンバー 1 2 b 内に神経細胞の細胞体が存在しないので軸索とミエリン化する細胞とがどのように振る舞うのかを容易に観察することができる。具体的には、I M S 3 2 細胞株を第 1 チャンバー 1 2 a 内に播種して培養し、軸索が束になった後に、ミエリン化する細胞であるシュワン細胞を播種した。シュワン細胞が存在しない図 2 4 ( b ) に示される例と比較すると、シュワン細胞が存在する図 2 4 ( c ) に示される例では、ミエリン化を容易に観察することができる。

【 0 0 8 2 】

次に、本実施の形態における装置の適応性について説明する。

【 0 0 8 3 】

図 2 5 は本実施の形態における装置の適用可能分野を示す模式図、図 2 6 は本実施の形態における装置の他の適用可能分野を示す模式図である。なお、図 2 5 において、( a ) は薬剤スクリーニングへの応用を示す図、( b ) は表現型 ( phenotype ) 装置への応用を示す図である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 4 】

本実施の形態による培養プレート10を使用することによって、図25(a)に示されるように、太い軸索束を備える神経組織すなわち神経細胞と他の組織との共培養系に対してのスクリーニングを行うことができる。また、図25(b)に示されるように、患者由来の組織を使用することによって、表現型を網羅的に調べることができる。培養プレート10は、表現型解析による診断薬の開発に応用することができる。図26に示されるように、本実施の形態による培養プレート10を使用して培養された太い軸索束を備える神経組織は、ペーシングシステムのような医用器具の開発や試験に使用することができる。また、移植への利用も期待することができる。

## 【 0 0 8 5 】

なお、本明細書の開示は、好適で例示的な実施の形態に関する特徴を述べたものである。ここに添付された特許請求の範囲内及びその趣旨内における種々の他の実施の形態、修正及び変形は、当業者であれば、本明細書の開示を総覧することによって、当然に考え付くことである。

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 8 6 】

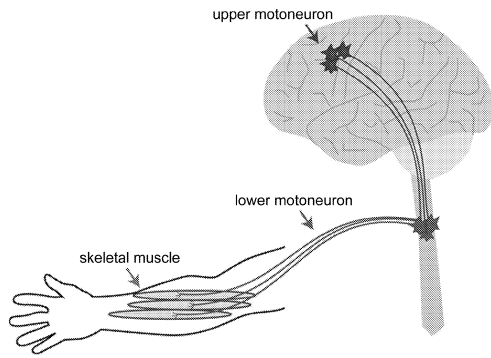
本開示は、神経細胞の培養に適した装置及び方法に適用することができる。

## 【 符号の説明 】

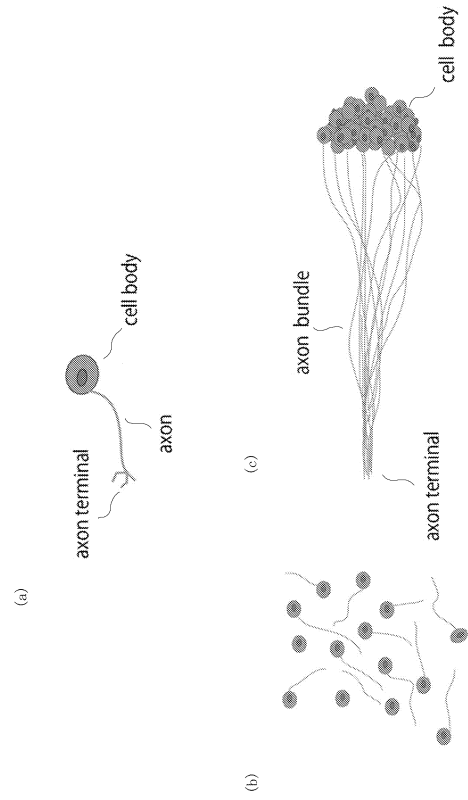
## 【 0 0 8 7 】

10	培養プレート	20
11	モジュール	
12 a	第1チャンバー	
12 b	第2チャンバー	
13	チャンネル	
15	基板	
16	上板	
17	シール部材	
18	培養液	
21	カッター	
22	ピペット	30

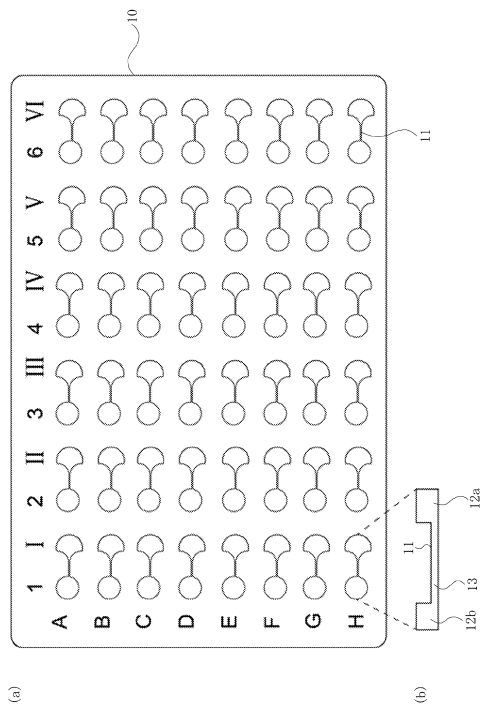
【 図 1 】



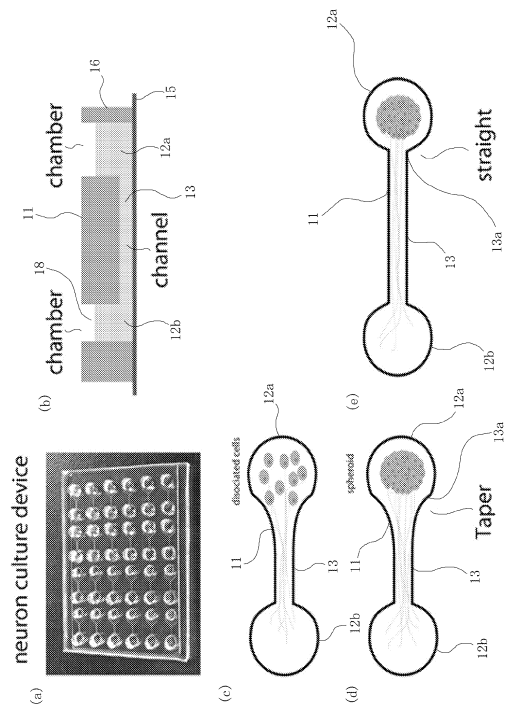
【 図 2 】



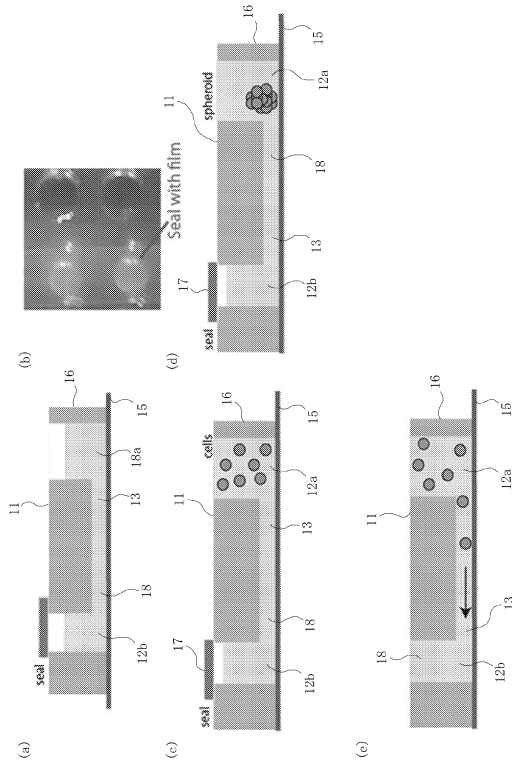
【 図 3 】



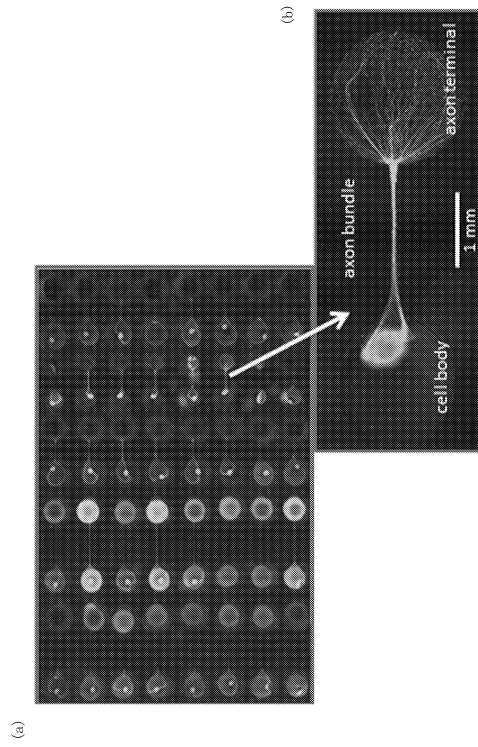
【 図 4 】



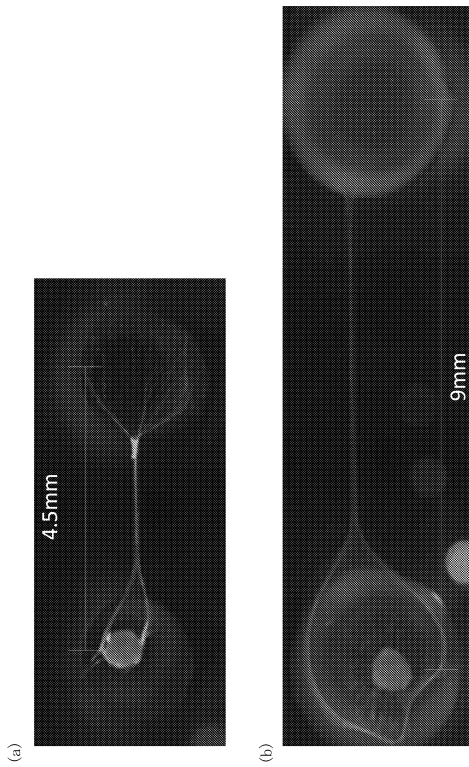
【 図 5 】



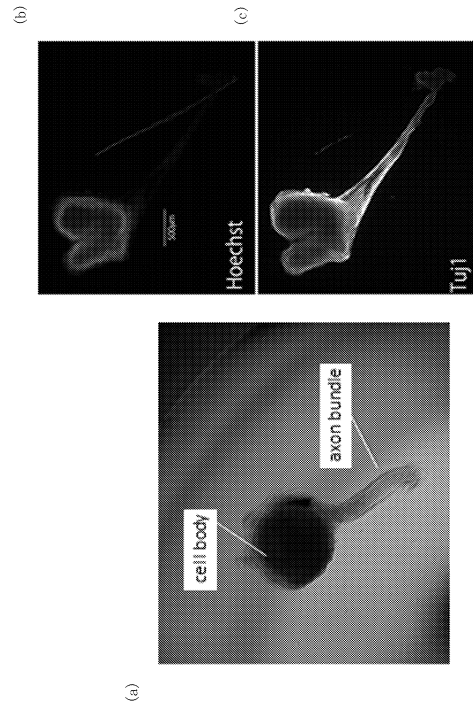
【 図 6 】



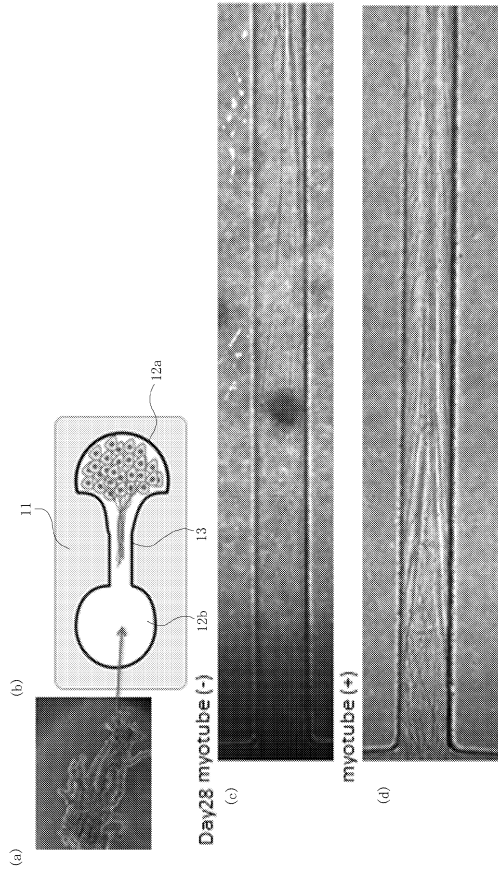
【 図 6 A 】



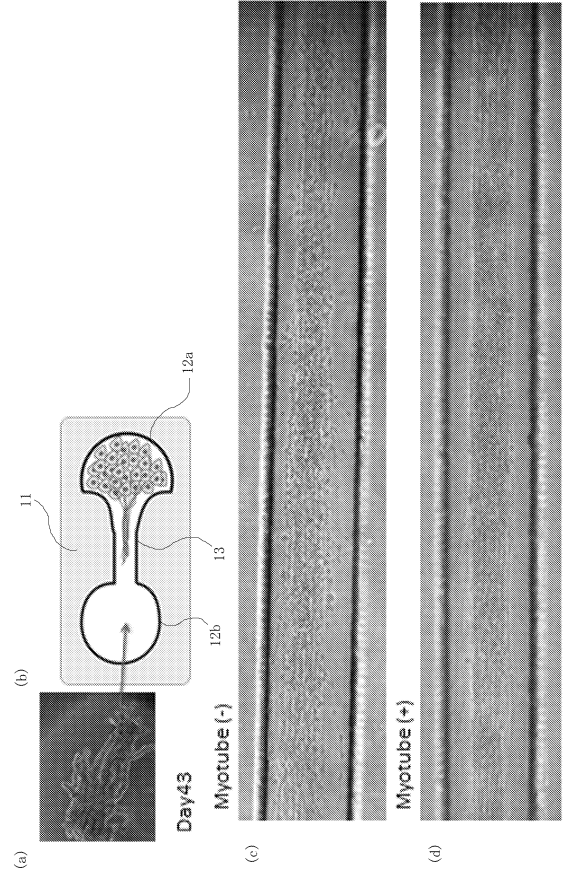
【 図 7 】



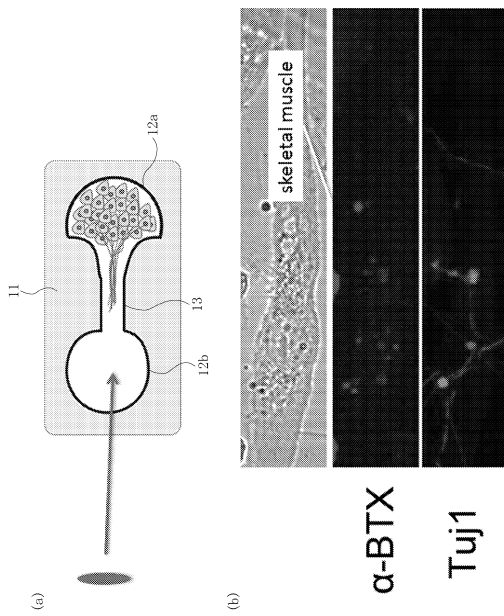
【 図 8 】



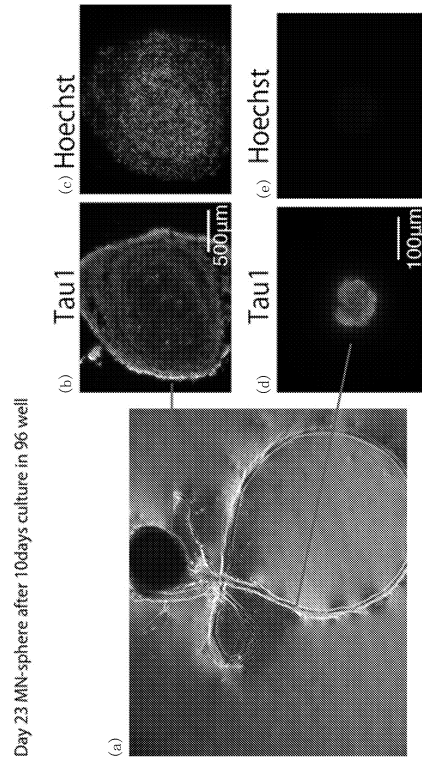
【 図 9 】



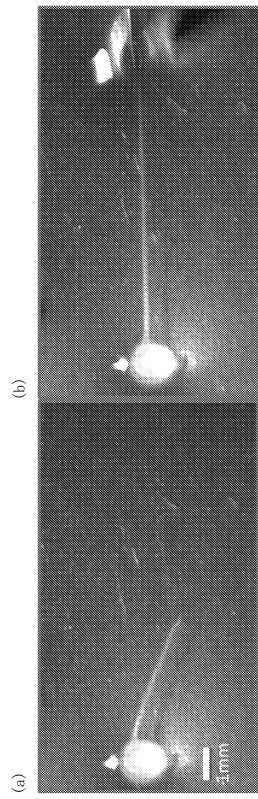
【 図 10 】



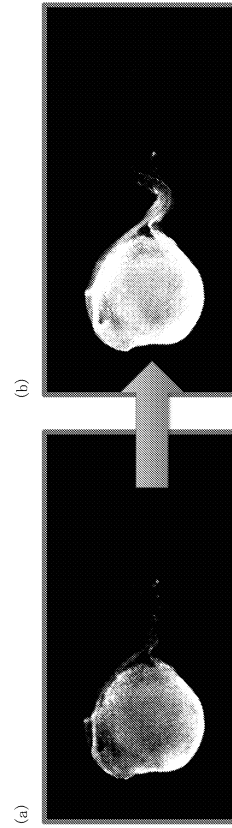
【 図 11 】



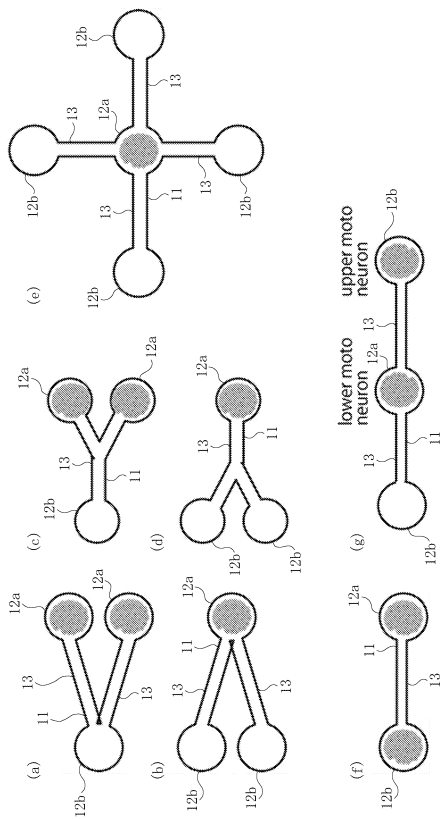
【 図 1 2 】



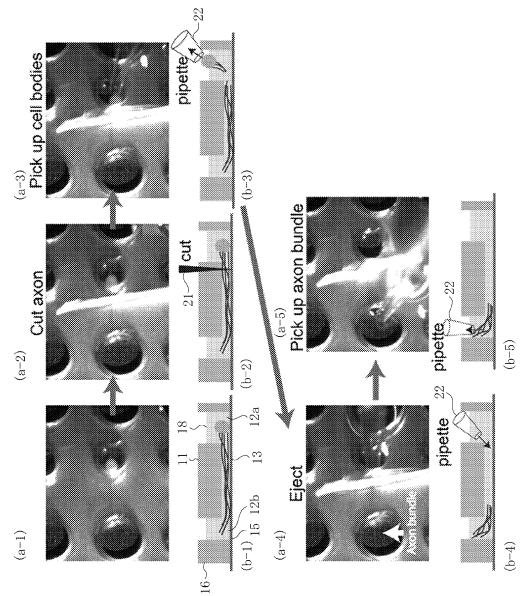
【 図 1 3 】



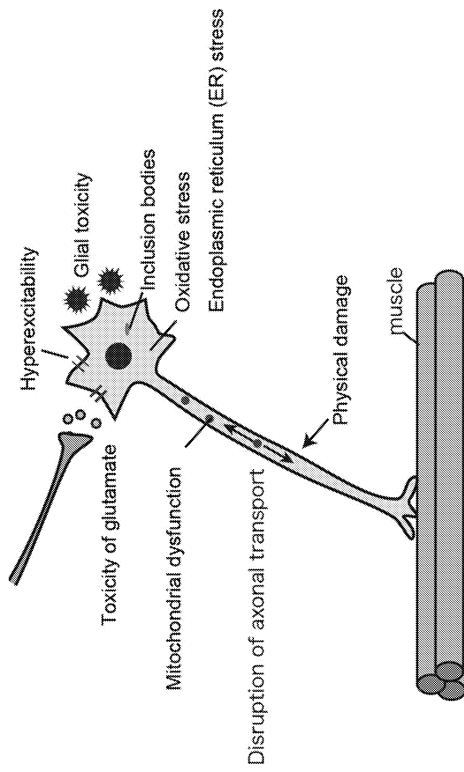
【 図 1 4 】



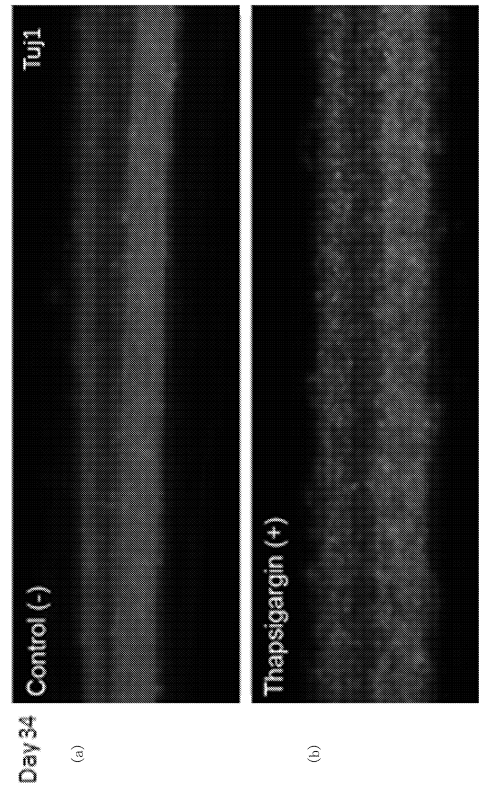
【 図 1 5 】



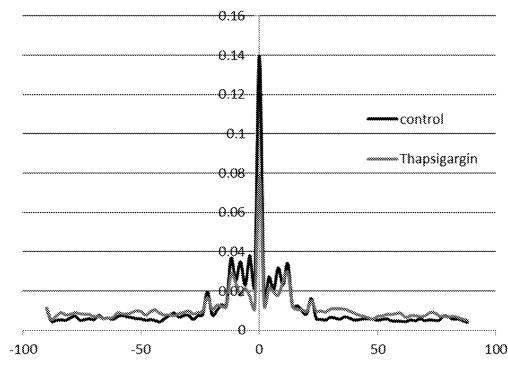
【 図 1 6 】



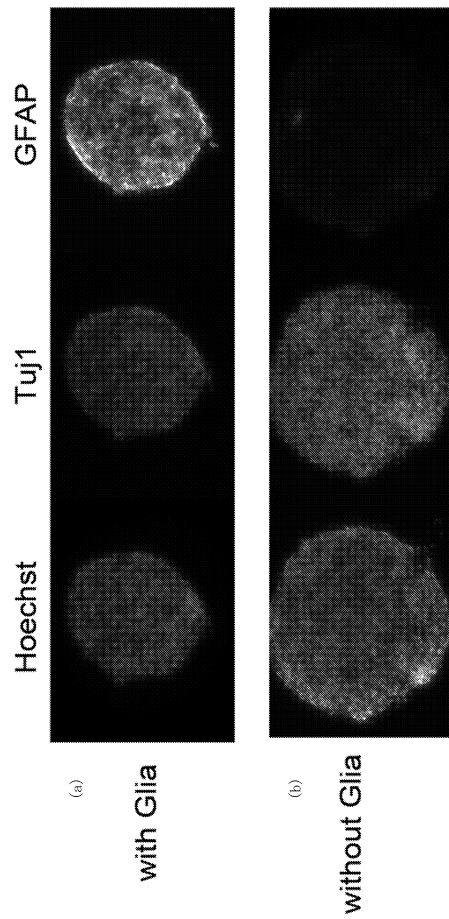
【 図 1 7 】



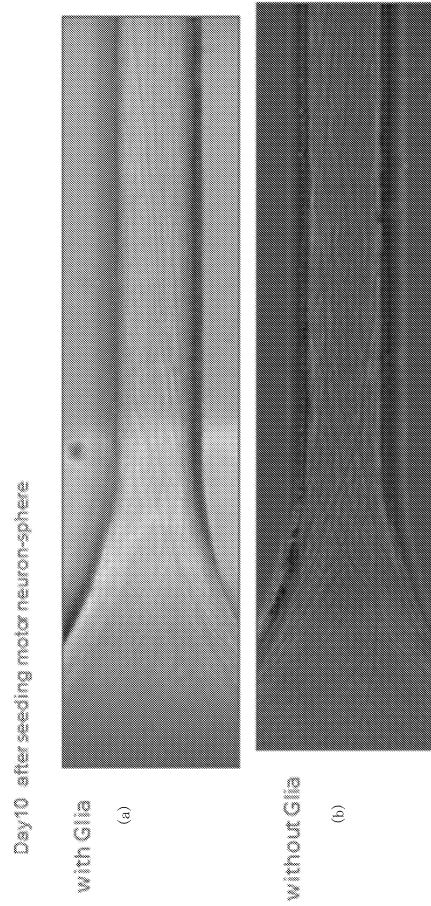
【 図 1 7 A 】



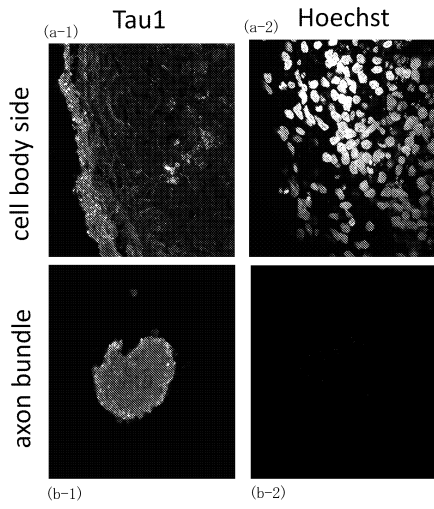
【 図 1 8 】



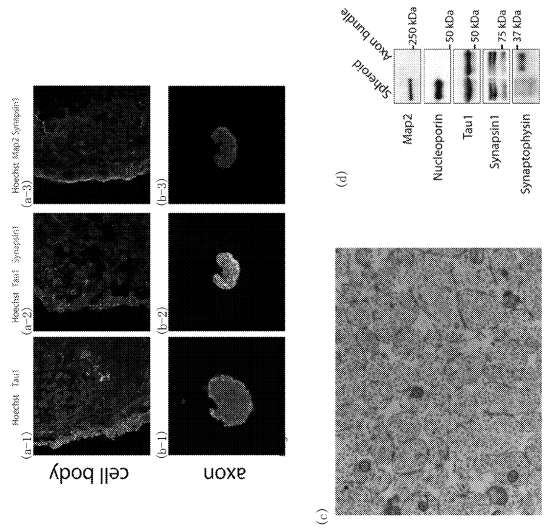
【 19 】



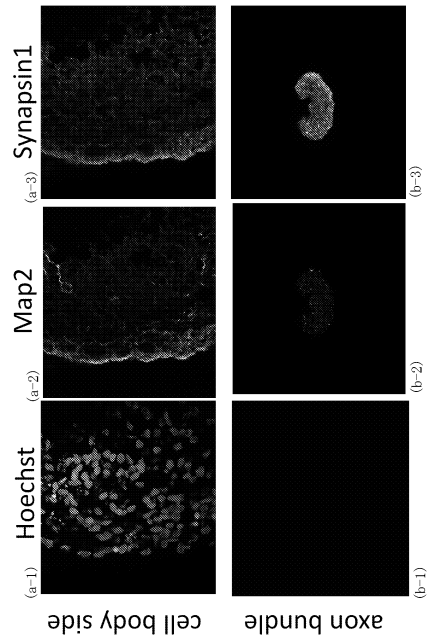
【 20 A 】



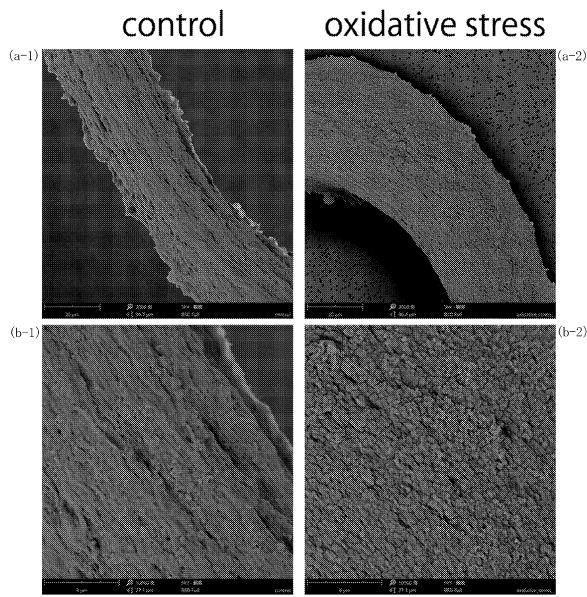
【 20 】



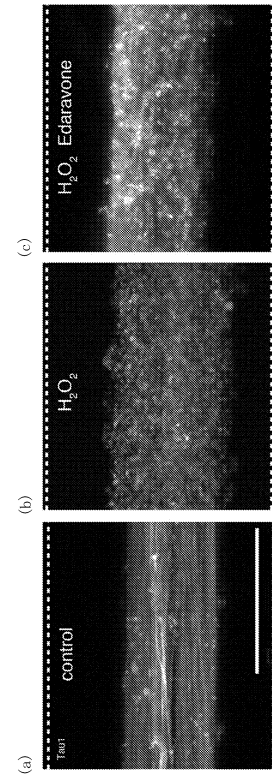
【 20 B 】



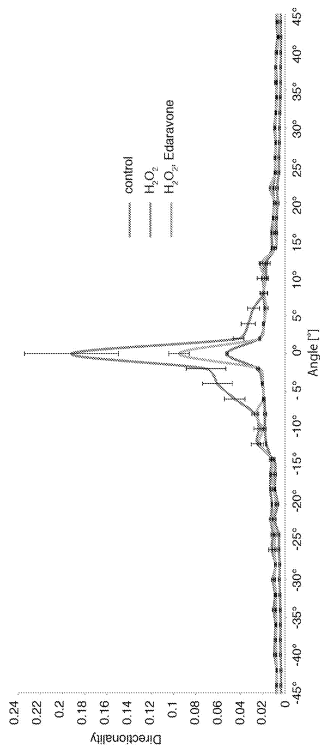
【 図 2 1 】



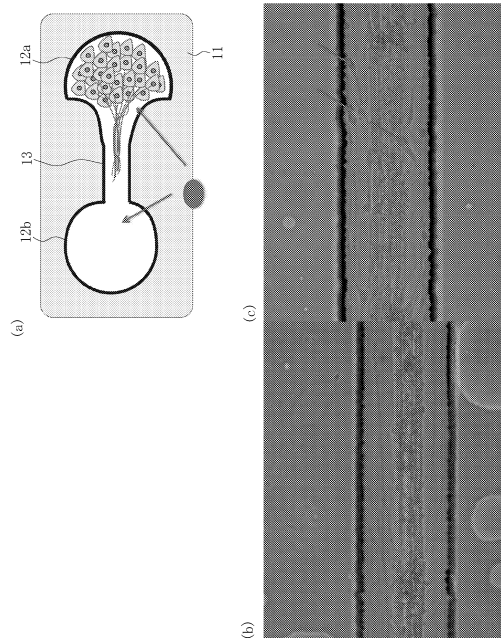
【 図 2 2 】



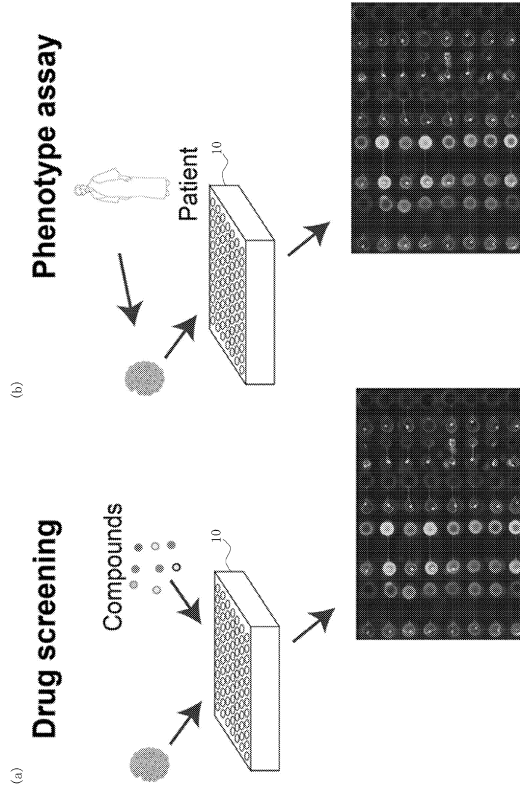
【 図 2 3 】



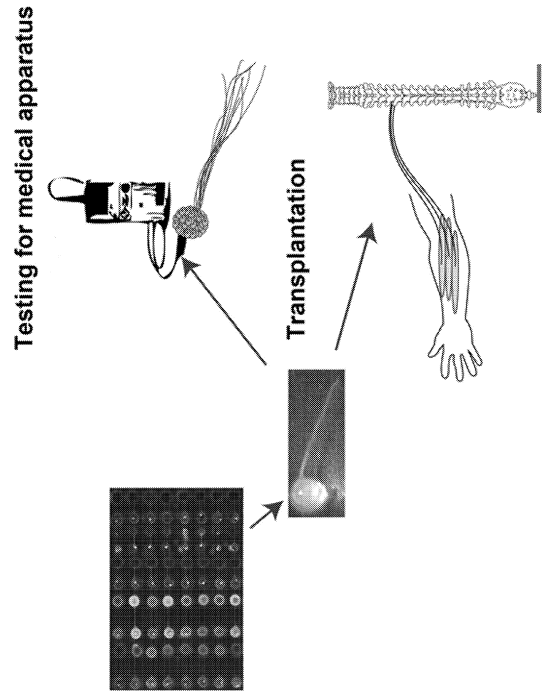
【 図 2 4 】



【 2 5 】



【 2 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/53 Y

(72)発明者 川田 治良  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開2014-110804(JP,A)  
特表2015-524674(JP,A)  
国際公開第2016/040961(WO,A1)  
米国特許出願公開第2011/0065645(US,A1)  
JEONG G.S. et al., Networked neural spheroid by neuro-bundle mimicking nervous system created by topology effect., Molecular Brain, 2015, Vol.8, No.17, pp.1-11, DOI: 10.1186/s13041-015-0109-y  
SRINIVASAN A. et al., Microchannel-based regenerative scaffold for chronic peripheral nerve interfacing in amputees., Biomaterials, 2015, Vol.41, pp.151-165  
KATO-NEGISHI M. et al., A neurospheroid network-stamping method for neural transplantation to the brain., Biomaterials, 2010, Vol.31, pp.8939-8945

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 M 3 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

C 1 2 M 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

P u b M e d

J a p i o - G P G / F X

专利名称(译)	装置用于培养神经细胞，方法用于培养神经细胞，使用培养的神经细胞中，用于分析和识别 Jikusakutabanai和神经元的蛋白质的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6430680B2</a>	公开(公告)日	2018-11-28
申请号	JP2018514120	申请日	2017-02-01
申请(专利权)人(译)	一般基础生产技术研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	一般基础生产技术研究基金会		
[标]发明人	藤井輝夫 池内与志穂 金田祥平 川田治良		
发明人	藤井 輝夫 池内 与志穂 金田 祥平 川田 治良		
IPC分类号	C12M3/00 C12N5/0793 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C12M21/08 C12M23/12 C12M23/16 C12M23/34 C12M35/08 C12Q1/02 C12M23/44 C12M37/04 C12N5/0619 C12N5/0658 G01N33/5005		
FI分类号	C12M3/00.Z C12N5/0793 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.Y		
代理人(译)	青木俊明		
优先权	62/328905 2016-04-28 US		
其他公开文献	JPWO2017187696A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

使轴突束快速从神经元延伸。因此，用于培养神经元细胞与轴突的装置，和培养板，布置在培养板中的多个模块，可接受的神经元中的每个模块的第一细胞体至少一个腔室，至少一个第二腔室和能够接收从细胞体延伸的轴突束的通道，并且包括至少一个连接第一腔室和第二腔室的通道的模块，其中第一腔室的下端，第二腔室和通道关闭，第一腔室的上端和第二腔室是开放的。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6430680号 (P6430680)
(45) 発行日 平成30年11月28日 (2018.11.28)	(24) 登録日 平成30年11月9日 (2018.11.9)	
(51) Int. Cl. F I		
C 1 2 M 3 / 0 0 (2006.01)	C 1 2 M 3 / 0 0 Z	
C 1 2 N 5 / 0 7 9 3 (2010.01)	C 1 2 N 5 / 0 7 9 3	
C 1 2 N 5 / 1 0 (2006.01)	C 1 2 N 5 / 1 0	
C 1 2 Q 1 / 0 2 (2006.01)	C 1 2 Q 1 / 0 2	
G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006.01)	G 0 1 N 3 3 / 5 3 D	
請求項の数 17 (全 26 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2018-514120 (P2018-514120)	(73) 特許権者 801000049	
(86) (22) 出願日 平成28年2月1日 (2017.2.1)	一般財団法人生産技術研究奨励会	
(87) 国際出願番号 PCT/JP2017/003653	東京都目黒区駒場四丁目G番1号	
(87) 国際公開番号 W02017/187696	100116207	
(87) 国際公開日 平成28年11月2日 (2017.11.2)	(74) 代理人 弁理士 青木 俊明	
審査請求日 平成30年4月2日 (2018.4.2)	藤井 輝夫	
(31) 優先権主張番号 62/328,905	池内 与志穂	
(32) 優先日 平成28年4月28日 (2016.4.28)	東京大学大学院工学系研究科	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	工学系研究科	
早期審査対象出願	工学系研究科	
	(72) 発明者 藤井 輝夫	
	池内 与志穂	
	金田 祥平	
	川田 治良	
	(72) 発明者 藤井 輝夫	
	池内 与志穂	
	金田 祥平	
	川田 治良	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 神経細胞を培養する装置、神経細胞を培養する方法、培養された神経細胞、軸索束内のプロテインを解析及び同定する方法並びに神経細胞の使用方法		