

2012/1001A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

ヒトiPS細胞を用いた有用な医薬品等
創出のための基盤技術開発研究

平成24年度

総括研究報告書

研究代表者 川端 健二

平成25（2013）年4月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

ヒトiPS細胞を用いた有用な医薬品等
創出のための基盤技術開発研究

平成24年度 研究報告書

研究代表者 川端 健二

平成25（2013）年4月

目 次

I. 総括研究報告

ヒトiPS細胞を用いた有用な医薬品等創出のための基盤技術開発研究	-----	1
川端 健二 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)		

II. 分担研究報告

ヒト iPS 細胞から各種血液細胞および血管内皮細胞への分化誘導法の開発	-----	5
川端 健二 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)		

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および神経細胞を用いた <i>in vitro</i> 血液脳関門モデルの開発および脳内移行性を包括した神経毒性評価系の構築	-----	22
関野 祐子 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

ヒト iPS 細胞を用いた有用な医薬品等創出のための基盤技術開発研究

研究代表者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

ヒト iPS 細胞は再生医療だけでなく、創薬への応用も強く期待されている。医薬品の開発初期段階において免疫毒性や神経毒性等の薬物毒性を精度高く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらす、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。しかしながら、薬物毒性を *in vitro* で簡便にスクリーニング可能な評価系は確立されていない。そこで、ヒト iPS 細胞を用いて、薬物免疫毒性評価系および薬物神経毒性評価系を新たに構築することを目指す。

本年度は、マウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いた薬物毒性評価系構築に関する基礎的検討、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞および血管内皮細胞への分化誘導法の確立、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の構築、*in vitro* 血液脳関門 (BBB) モデルの改良を試み、以下の結果を得た。

- (1) マウス iPS 細胞から得られたマスト細胞は、アレルギーを惹起する薬物 (バンコマイシン等) に対して感度良く脱顆粒応答を示した。
- (2) ヒト iPS 細胞と支持細胞を VEGF 存在下で共培養することにより、血液前駆細胞への分化誘導法が確立された。
- (3) ヒト iPS 細胞から形成させた胚様体 (embryoid body; EB) に BMP4 や VEGF を作用させることにより、血管内皮細胞を効率よく分化誘導できた。
- (4) ヒト iPS 細胞由来神経細胞で機能する伝達物質受容体を調べるための細胞内カルシウムイメージング系を確立した。また、ミクログリア を従来型血液脳関門 (BBB) モデルに添加しバリア機能の定量的解析を行ったところ、バリア機能が増強することを見出した。

分担研究者

関野祐子 国立医薬品食品衛生研究所

薬物毒性であるが、医薬品の開発プロセスの早期に薬物毒性を簡便に確度良く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらす、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の

A. 研究目的

新薬開発過程でしばしば問題となるのが

国際競争力向上に繋がると期待される。現在ではヒト初代培養細胞が用いられているものの、安定供給、継続性の観点からその利用には限界がある為、より安定かつ容易に使用できる *in vitro* 毒性評価系の確立が望まれている。

そこで本研究では、以下の研究を行う。

- ① ヒト iPS 細胞由来免疫担当細胞を用いた薬物免疫毒性評価系の構築
- ② ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導法の開発
- ③ 神経細胞とグリア細胞が共存するオールインワン型の新規 *in vitro* 血液脳関門モデルの確立 (ラット由来細胞による構築)

B. 研究方法

本研究は、研究代表者川端、分担研究者関野の計 2 名で遂行した。当該年度においては、主に、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞、血管内皮細胞への分化誘導法の確立、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の構築、*in vitro* 血液脳関門 (BBB) モデルの改良を試みた。

C. 研究結果

1. マウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いた薬物毒性評価系構築に関する基礎的検討

OP9 細胞や Swiss3T3 線維芽細胞を支持細胞として用いることで、マウス iPS 細胞から毒性評価系へ応用可能な成熟度の高いマスト細胞を誘導可能であることを明らかにし、この iPS 細胞由来マスト細胞はアレ

ルギーを惹起する薬物に対して感度良く脱顆粒することが示された。

2. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞からマスト細胞等の血液細胞を分化誘導するには、血液前駆細胞を得る必要がある。そこで、ヒト iPS 細胞を VEGF 存在下で支持細胞と共培養することにより、血液前駆細胞への分化を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞株である 201B7 から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞が得られた。

3. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立

胚様体 (embryoid body; EB) 形成法によりヒト iPS 細胞から血管内皮細胞の分化誘導法の確立を試みた。その結果、Tic 株と 201B7 株の両細胞株において分化誘導 6 日目以降において血管内皮細胞のマーカーである CD34 を発現する細胞が検出された。さらに、CD34 陽性細胞は CD31、CD144、KDR を発現していることも観察され、血管内皮細胞が誘導されていることが示唆された。

4. 神経細胞とグリア細胞が共存するオールインワン型の新規 *in vitro* 血液脳関門モデルの確立 (ラット由来細胞による構築)

ヒト iPS 細胞由来神経細胞で機能する伝達物質受容体を調べるための細胞内カルシウムイメージング系を確立した。また、ミクログリアを従来型血液脳関門 (BBB) モデルに添加しバリア機能の定量的解析を行ったところ、バリア機能が増強すること

を見出した。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、薬物免疫毒性評価系および薬物神経毒性評価系を新たに構築することを目指す。そこで本研究では、まずマウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いた薬物毒性評価系構築に関する基礎的検討を行った。これまでにアナフィラキシー症状を引き起こすことが報告されているバンコマイシンに対する脱顆粒応答能について評価した結果、マウス iPS 細胞由来マスト細胞では濃度依存的な脱顆粒が観察された。したがって、マスト細胞を用いることにより、薬物免疫毒性評価系を構築できる可能性が示された。今後、ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞にバンコマイシン等のアレルギーを引き起こす複数の薬物を作用後、それらの薬物に対する脱顆粒応答能について評価する。

ヒト iPS 細胞からマスト細胞等の各種血液・免疫担当細胞の作製に向け、今年度はヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の検討を行った。その結果、VEGF 存在下で C3H10T1/2 細胞と共培養することで、ヒト iPS 細胞から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞が得られ、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法が確立された。今後、本手法を用いて iPS 細胞から誘導した血液前駆細胞を用いてマスト細胞を含む様々な血液・免疫細胞への分化誘導法を確立し、薬物毒性評価系への応用を試みる。

脳特異的血管内皮細胞の作製に向け、今年度はヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への

分化誘導法の検討を行った。その結果、BMP4 や VEGF を作用させることで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。今後、得られた細胞の機能の評価を行う予定である。また、ヒト iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞とアストロサイト様細胞株等との共培養により、脳血管内皮細胞が高発現しているタイトジャンクション蛋白質・トランスポーター蛋白質等の発現が上昇するかどうか検討を進めることで、脳特異的血管内皮細胞の作製を試みる予定である。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の構築のため、(1) 神経細胞死評価法の構築、(2) シナプス機能障害評価法の構築を試みた。神経細胞死評価法の構築は、DNA の二重らせん構造に *intercalate* することにより特有の赤色蛍光 (620 nm) が増強される PI を用いて行い、今年度の研究成果として、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の生細胞と死細胞の可視化、および定量化を達成した。また、カルシウムイメージング手法を応用し、シナプスを介した神経回路機能に対する障害の定量法を確立した。さらに、現在、カルシウムイメージング以外にも細胞骨格タンパク質ドレブリンをバイオマーカーとしてシナプス機能への影響を評価する手法を立ち上げている。アクチン結合蛋白質であるドレブリンはシナプス機能が正常な時は、後シナプス部位であるスパインに集積しているが、シナプス機能に異常が現れると局在が樹状突起に分散する。従って、ドレブリンのスパイン集積度をシナプス機能障害のパラメーターとして応用することができる。

内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト

により構成される従来の *in vitro* BBB モデルにその他の中枢神経系細胞成分（ミクログリアなど）を添加しバリア機能の定量的解析を行ったところ、バリア機能が増強することを見出した。分子レベルでの詳細な解析は今後進める予定であるが、我々は生後初期の神経新生、グリア新生をミクログリアが複数のサイトカインを介して促進することを見出している（投稿中）。従って、同様のメカニズムにより、内皮細胞の機能分化を促進している可能性も考えられる。我々が構築しているモデル系は従来のモデル系より生体内の脳に近いことから、薬物や障害に対する反応性に関してこれまでのモデルとの比較データをとる必要があると考えられる。また、実際薬物を服用するのは炎症等の症状がすでに現れた患者であることを鑑みると、病態時の BBB がどのような状態であるのか、という点についても検討の必要がある。そこで、炎症誘発モデルとして汎用されている lipopolysaccharide 適用に対する BBB バリア機能の変化についても我々のモデルと従来のモデルとの比較検討を現在行っている。さらに、ミクログリアはマクロファージと形状および機能が非常に似ているため、前述したヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からミクログリアを分化誘導できる可能性がある。ヒト iPS 細胞からミクログリアが分化誘導可能となれば、全てヒト細胞から成る *in vitro* BBB モデルの作製へと繋がるであろう。

E. 結論

ヒト ES/iPS 細胞から支持細胞との共培

養法あるいは EB 形成法を介して CD34 陽性の血液前駆細胞への分化誘導法が確立された。また、適切なサイトカインを作用することで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。これらの結果は、薬物毒性スクリーニングに応用可能な細胞を作製するための基盤技術となることが期待される。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系として、神経細胞死評価法、シナプス機能障害評価法を確立した。さらに、従来の *in vitro* BBB モデルにミクログリアを添加することにより、BBB のバリア機能が亢進することを明らかにした。

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞から各種血液細胞および血管内皮細胞への分化誘導法の開発

研究代表者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

本研究では、(1) ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 薬物毒性評価系を新規に構築するために、iPS 細胞由来免疫担当細胞を用いて薬物免疫毒性評価系を構築すること、(2) 血液脳関門モデルの開発とそれを利用した脳内移行性を包括した神経毒性評価系を構築すること、を目的とする。マスト細胞を用いた薬物免疫毒性評価系の構築には、成熟度の高いマスト細胞が必要である。平成 24 年度は、OP9 細胞や Swiss3T3 細胞を支持細胞として用いることによりマウス iPS 細胞から成熟度の高いマスト細胞を分化誘導可能であること、iPS 細胞から誘導したマスト細胞はアレルギーを惹起する薬物に対して感度良く脱顆粒応答を示すことを明らかにし、*in vitro* 薬物免疫毒性評価系の基盤偽十を構築することに成功した。また、ヒトマスト細胞を用いて同様の免疫毒性評価系を構築するため、ヒト iPS 細胞から CD34 陽性血液前駆細胞への分化誘導法を確立した。現在、本方法により誘導した CD34 陽性血液前駆細胞を用いてマスト細胞への分化誘導条件の検討を行っている。

ヒト細胞で構成された *in vitro* 血液脳関門モデル (BBB) の構築には、ヒト iPS 細胞から脳特異的血管内皮細胞を分化誘導する必要がある。そこで、まず、脳特異的血管内皮細胞への作製の前段階として、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導条件を検討した。その結果、ヒト iPS 細胞を BMP4 や VEGF を含む培地で培養することにより、VE-cadherin 陽性の血管内皮細胞を誘導できた。なお、血管内皮細胞への分化効率にはヒト iPS 細胞株間で大きく異なっていたことから、血管内皮細胞を高効率に作製するには、ヒト iPS 細胞株の選択が重要であることが示唆された。

研究協力者

田代克久 (独)医薬基盤研究所

山口朋子 (独)医薬基盤研究所

stem cells ; ヒト ES 細胞) およびヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells ; ヒト iPS 細胞) は自己複製能と分化多能性を有しており、ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導された細胞は創薬研究などへの応用が期待されている。医薬品の開発初期段階において免疫毒性や神経毒性等の

A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞 (human embryonic

薬物毒性を精度高く予測することは、創薬コスト削減・期間短縮・創薬シーズのヒット率の向上をもたらし、我が国の基幹産業のひとつである製薬産業の国際競争力向上に繋がると期待される。しかしながら、上述した薬物毒性を *in vitro* で簡便にスクリーニング可能な評価系は確立されていない。そこで本研究では、(1) ヒト iPS 細胞由来血液・免疫細胞を用いた免疫毒性評価系の構築、(2) ヒト細胞で構成された *in vitro* 血液脳関門 (BBB) モデルの構築を目的とした、ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導法の開発を行う。平成 24 年度は、ヒト iPS 細胞からマスト細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞への分化誘導法の確立へ向け、まずは血液前駆細胞への分化誘導法の確立を行った。また、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立を目指し、分化誘導条件の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導

マウス iPS 細胞株 38C2 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は mES Complete Medium (Millipore 社) を用いてマイトマイシン C 処理したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) 上で培養した。

マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導は以下の方法で行った。3 日前に骨髓ストロマ細胞株である OP9 細胞を培養皿に播種し、フィーダー細胞として用いた。マウス iPS 細胞を 0.25% Trypsin-EDTA (invitrogen 社) を用いて単一に分離し、37°C で 30 分間静置した後、上清を回収し iPS 細胞と MEF を分離した。その後、iPS 細胞のみを 1×10^3 個/10 cm 培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。培養 7 日までは播きなおしをせず、培地を 24 時間後と 4 日後に全量交換した。培養 7 日目に 0.25% trypsin-EDTA (invitrogen) で細胞を回収し、37°C で 30 分間静置した後、上清を回収することで iPS 細胞由来中胚葉系細胞と OP9 細胞を分離した。中胚葉系細胞を回収し、30 ng/ml IL-3、100 ng/ml Stem Cell Factor (SCF) (Peprotech 社) を含む α -MEM 培地 (Sigma 社) に懸濁後、OP9 細胞上に播種したのち、7 日間培養した。さらに、7 日後および 14 日後に浮遊細胞のみを回収し、30 ng/ml IL-3、100 ng/ml SCF を含む α -MEM 培地に懸濁後、新しく播種しなおした OP9 細胞上で培養した。

B-2. 脱顆粒応答能の評価

B-1. の方法により分化誘導したマウス iPS 細胞由来マスト細胞およびマウス骨髓

細胞より誘導したマスト細胞 (BMMC) を回収し、 1×10^5 個/ウェルで播種した。次に、10 μ g/ml compound48/80 (Sigma 社)、100 μ M サブスタンス P (Sigma 社)、2 mg/ml あるいは 5 mg/ml バンコマイシン (和光純薬社) を加え、37°C で 30 分間細胞を刺激した。なお、抗原刺激の場合は、1 μ g/ml モノクローナル抗 DNP-IgE 抗体 (Sigma 社) を培養液に加え、24 時間培養することによって細胞を感作した。その後、感作した細胞に 100 ng/ml 抗原 (DNP-HSA, Biosearch Technologies 社) を加え、37°C で 30 分間細胞を刺激した。遠心後上清を回収し、96 穴プレートに移し、0.1 M citrate buffer に溶解した 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminidase を加えて混和後 37°C で 2 時間反応させた。反応溶液に stop buffer を加え混和し、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定し、遊離率を求めた。なお、細胞内全 β -hexosaminidase の測定には、0.1% Triton (Sigma 社) 含有 HEPES で懸濁し、氷上で 10 分反応後に遠心した上清を用いた。

B-3. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は 5 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む霊長類 ES 細胞用培地「ReproStem」 (ReproCell 社) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Tic (JCRB Cellbank から供与; JCRB Number: JCRB1331)、Toe (国立成育医療センター、梅澤明弘先生から供与) は 10ng/ml bFGF を含む「ReproStem」

を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。5 から 7 日ごとに 0.1 mg/ml ディスパーゼ (Roche 社) を用いてヒト iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

B-4. Sac を介したヒト iPS 細胞から血液前駆細胞の分化誘導

分化誘導開始の前日に 50 Gy 放射線照射し増殖を止めた C3H10T1/2 細胞株をゼラチンコートした 10 cm 培養皿に 7×10^5 個で播種し、フィーダー細胞として用いた。iPS 細胞は、 $5 \cdot 10 \times 10^4$ 個/10 cm 培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。細胞の播き直しをば行わず、50 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF) (Peprtech 社) 含有培地を 9 日目までは 3 日毎、9 日目から 15 日目までは 2 日毎に交換することにより血液前駆細胞の誘導を行った。

B-5. マトリゲルを用いた接着培養による血管内皮細胞への分化誘導

マトリゲルを用いた血管内皮細胞への分化誘導は以下の方法で行った。まず、分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Cell Science & Technology Institute 社) で培地交換した。次に、Accutase を用いてヒト iPS 細胞を回収後、100 ng/ml Activin A (R&D systems) 及び 10 ng/ml の bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地 (6 因子 [10 µg/ml human recombinant insulin、5 µg/ml human apotransferrin、10 µM 2-mercaptoethanol、10 µM ethanolamine、10 µM sodium selenite、0.5 mg/ml fatty acid free bovine albumin (全て Sigma

社)]を含む hESF-DIF 培地 [Cell Science & Technology Institute]) に懸濁後、Matrigel (BD Biosciences) でコーティングした細胞培養用 12 ウェルプレートの各ウェルに 1×10^5 個/ウェル播種したのち、2 日間培養した。その後、50 ng/ml BMP4、10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地にて 4 日間培養した。分化誘導 6 日目に細胞を回収し、付属のサプリメントを加えた EGM-2 培地 (Lonza 社) にてその後の培養を行った。

B-6. 胚葉体 (embryoid body : EB) 形成による血管内皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞を Accutase (Millipore 社) により培養ディッシュから剥離し、10 µM Y27632 (Wako 社) を含む EB 用培地 [50 µg/ml アスコルビン酸 (Sigma 社) と 450 µM Monothioglycerol (Sigma 社)、付属のサプリメントを加えた StemPro34 medium (ライフテクノロジーズ社)] 中でピペッティングすることにより単細胞に解離した。その後、2 ng/ml ActivinA (R&D Systeme 社)、2 ng/ml bone morphogenic protein 4 (BMP4) (R&D System 社)、10 µM Y27632 を含む EB 培地に懸濁し、 2×10^4 個/ウェル (100 µl) でリピデュアコート 96 ウェルプレートへ播種した。2 日後 (Day 2)、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF を含む EB 培地に置き換えた。その 2 日後 (Day 4)、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 µM SB431542 (和光純薬社) を含む EB 培地を 100 µl 加え、更に 2 日培養した (SB431542 の終濃度は 5 µM)。分化誘導から 6 日目の EB を各ウェルから回収し、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、20 ng/ml

SCF、20 ng/ml Thrombopoietin (TPO) (Peprotech 社)を含む EB 培地へ懸濁し、60 mm ペトリディッシュへ播種した。2 日後に半分培地交換を行い、分化誘導 10 日目以降は 5 ng/ml VEGF、20 ng/ml SCF、20 ng/ml TPO を含む EB 培地中で培養することにより血液前駆細胞、血管内皮細胞の誘導を行った。

B-7. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析

B-4.の方法により分化誘導した細胞は、ピペッティングを繰り返すことで機械的に囊状構造体を崩し、40 μm セルストレイナーを通して、囊状構造体内部の血液細胞のみを回収した。その後、allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD34 抗体 (clone 581、BioLegend 社) および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD43 抗体 (clone 1G10、BD Biosciences 社) を氷上、遮光で 30 分間反応させた。抗原陽性細胞の割合はフローサイトメーター (LSRFortessa : BD Bioscience 社) を用いて解析した。

B-5.および B-6.の方法により分化誘導した細胞に cell dissociation buffer (ライフテクノロジーズ社) を作用させ、その後ピペッティングすることにより単細胞に解離した。その後、FITC、phycoerythrin (PE)、APC、PE-Cy7 で標識した各種抗体と 4°C で 30 分反応させた。用いた抗体は、抗ヒト CD31 抗体 (clone WM59)、抗ヒト CD34 抗体 (clone 581)、抗ヒト CD43 抗体 (clone 1G10)、抗ヒト CD45 抗体 (clone HI30)、抗ヒト CD144 抗体 (clone 16B1)、抗ヒト KDR 抗体 (clone 89106) であり、BD

Bioscience 社、e-Bioscience 社、R&D System 社から購入した。染色後、フローサイトメーターにて表面抗原の解析を行った。

B-8. in vitro 管腔形成能の評価

マトリゲル (BD Bioscience 社) を 24 ウェルプレートへ 100 μl 添加し、37°C で 1 時間静置した。その後、ヒト iPS 細胞由来分化細胞 (5×10^4 個~ 1×10^5 個) を 500 μl に懸濁し、マトリゲル上へ播種した。播種して 10~16 時間後に顕微鏡にて観察した。

B-9. セルソーターによる細胞分離

B-4.の方法により分化誘導した細胞は、B-7.の方法を用いて回収し、APC 標識抗ヒト CD34 抗体および FITC 標識抗ヒト CD43 抗体を氷上、遮光で 30 分間反応させた。その後、セルソーター (BD FACSAria : BD Bioscience 社) を用いて CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞を分離した。分離後、CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞が 90%以上の純度で得られていることを確認した。

B-10. コロニーアッセイ

B-4.の方法により分化誘導後、B-9.の方法により CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞を回収した。その後、MethoCult H4435 メチルセルロース培地 (rhSCF; rhGM-CSF; rhG-CSF; rhIL-3; rhIL-6; rhEPO を含む) (Stem Cell 社) に CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞を懸濁し、35mm 培養皿に播種した。37°C、5% CO₂ インキ

ユベーターで 14 日間培養を行い、顕微鏡下で形態学的に識別しコロニー形成細胞 (colony-forming cell; CFC) を分類・計数・観察した。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いて薬物毒性評価系を構築する前に、マウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いて機能評価を行った。成熟マスト細胞でのみ脱顆粒を惹起することが知られている compound 48/80 およびサブスタンス P に対する脱顆粒応答能を検討した結果、マウス iPS 細胞由来マスト細胞では骨髓由来マスト細胞と比較しより高い脱顆粒応答性を示した (Figure 1a)。通常、アレルゲンは、高親和性 IgE 受容体である FcεRI を介して、マスト細胞の表面に結合している IgE を架橋することによって有効に働く (IgE 依存性の脱顆粒応答)。これまでに、ラット腹腔マスト細胞はリゾフォスファチジルセリン (Lyso-PS) 存在下でのみ IgE 依存性の脱顆粒応答を惹起することが報告されている。そこで次に、マウス iPS 細胞由来マスト細胞を用いて、Lyso-PS 存在下における IgE 依存性の脱顆粒応答能について検討した。その結果、骨髓由来マスト細胞と比較しマウス iPS 細胞由来マスト細胞では、より高い脱顆粒応答性を示した (Figure 1b)。さらに、薬物アレルギー評価系の構築に向け、これまでにアナフィラキシー症状を引き起こすことが報告されているバンコマイシンに対する脱顆粒応答能についても評価した。その結果、骨髓由来マスト細胞では脱顆粒を惹起しないのに対し、マウス iPS 細胞由来マスト細胞では濃度依存的な脱顆粒が観察された (Figure 1c)。したがって、骨髓ストロマ細胞株である OP9 細胞などの支持細胞を用いることにより、マウス iPS 細胞から毒性評価系へ応用可能な成熟度の高いマスト細胞を誘

導可能であることを明らかにした。

ヒト iPS 細胞から血液・免疫細胞を誘導するには、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する必要がある。ヒト ES 細胞あるいは iPS 細胞から血液前駆細胞を得る方法として、骨髓ストロマ細胞株である OP9 細胞などの支持細胞との共培養法や胚葉体 (embryoid body : EB) 形成法などが汎用されている。そこで今年度は、まず、VEGF 存在下でヒト iPS 細胞と放射線照射した C3H10T1/2 細胞 (支持細胞) との共培養することで血液前駆細胞への分化誘導を試みた (Figure 2a)。その結果、共培養 15 日頃からヒト iPS 細胞株 201B7 由来のコロニーが隆起してできた嚢状構造の内部に血球様の球状細胞が出てくるのが確認された (Figure 2b)。この血球様細胞は、血液前駆細胞のマーカーである CD34 や CD43 を発現するような細胞であることがフローサイトメトリー解析により確認された (Figure 3a)。そこで、CD34 陽性 CD43 陰性細胞、CD34 陽性 CD43 陽性細胞をそれぞれセルソーターにて回収後、コロニーアッセイを行った。その結果、CD34 陽性 CD43 陰性細胞からはコロニーが得られなかったが、CD34 陽性 CD43 陽性細胞からは多くのコロニーが得られた (Figure 3b)。以上の結果から、201B7 株から血液前駆細胞を分化誘導可能であることが示された。

次に、株間での比較を行うため、ヒト iPS 細胞株 201B7 株、Toe 株、Tic 株を用いて同様の検討を行った。その結果、Toe を用いた場合では嚢状構造が観察されなかった (data not shown)。以上の結果から、細胞株により血液前駆細胞への分化誘導法 (共培養、EB 形成法など) を選択する必要

があることが示唆された。現在、ヒト iPS 細胞由来 CD34 陽性 CD43 陽性細胞を用いてマスト細胞をはじめとする各種血液細胞への分化誘導法を確立している。

脳特異的血管内皮細胞の作製の前段階として、まずヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の検討を行った。血管内皮細胞は中胚葉由来の細胞であり、これまでの研究からヒト ES/iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化には BMP4 や VEGF のシグナルが重要であることが報告されている。そこで、これらのサイトカインを作用させて血管内皮細胞の誘導を試みた。まず、マトリゲルを用いた単層培養法による誘導を行った (Figure 4a)。その結果、ヒト iPS 細胞株 Tic を用いた場合、分化誘導 5~6 日目において KDR を発現する中胚葉細胞が 30~40% 得られることが明らかとなった (Figure 4b)。その後、血管内皮細胞用培地 (EGM-2) 中で培養したところ、内皮細胞の特徴である敷石状の細胞が得られた (Figure 4c)。また、これらの細胞のうち 70% は CD31 陽性、40% は CD144 陽性であり、内皮細胞が得られていることが確認された (Figure 4d)。次に、マトリゲルを用いて、得られた細胞の管腔形成能を評価したところ、Figure 4e に示すようにヒト iPS 細胞株 Tic から誘導した細胞は管腔形成能を有していることが明らかとなった。しかしながら、ヒト iPS 細胞株 201B7 では、本手法で内皮細胞を得ることはできなかった。また、Tic を使用した際にも安定的に内皮細胞を誘導することができず、プロトコールを検討する必要があると考えられた。そこで次に、EB 形成法によりヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法を試み

た (Figure 5)。その結果、Tic 株と 201B7 株の両細胞株において分化誘導 6 日目以降において血管内皮細胞のマーカである CD34 を発現する細胞が検出された。さらに、ヒト iPS 細胞から CD34 陽性細胞は CD31、CD144、KDR を発現していることも観察され、血管内皮細胞が誘導されていることが示唆された。CD34 陽性細胞は未熟な血液細胞のマーカでもあるため、血液細胞のマーカである CD43、CD45 も併せて解析したところ、Tic 株、201B7 株の両細胞株とも CD34 陽性細胞の一部は CD43 や CD45 を発現する血液細胞であることが明らかとなり、本手法では血液細胞と血管内皮細胞の双方が誘導可能であることが示された (Figure 5)。今後、本手法で誘導した血管内皮細胞が機能を持った細胞かどうか検討を進める予定である。

D. 考察

各種血液細胞の作製に向け、今年度はヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の検討を行った。その結果、VEGF 存在下で C3H10T1/2 細胞と共培養することで、ヒト iPS 細胞から CD34 陽性 CD43 陽性細胞を得ることが可能となった。さらに、CD34 陽性 CD43 陽性細胞からは多くの血液コロニーが得られた。また、ヒト iPS 細胞の株によっては、VEGF 存在下で C3H10T1/2 細胞と共培養するだけでは血液前駆細胞が得られないことが示唆された。今後、本手法によって得られたヒト iPS 細胞由来 CD34 陽性 CD43 陽性細胞を用いて、各種血液細胞への分化誘導法を確立する。

脳特異的血管内皮細胞の作製に向け、今年度はヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の検討を行った。その結果、BMP4 や VEGF を作用させることで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。今後、得られた細胞の機能の評価を行う予定である。また、ヒト iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞とアストロサイト様細胞株等との共培養により、脳血管内皮細胞が高発現しているタイトジャンクション蛋白質・トランスポーター蛋白質等の発現が上昇するかどうか検討を進めることで、脳特異的血管内皮細胞の作製を試みる予定である。さらに、BBB を構成する細胞として、ニューロン、血管内皮細胞、アストロサイト以外にもミクログリアが知られている。このうち、ミクログリアはマクロファージと形状および機能が非常に似ているため、前述したヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からミクログリアを分化誘導できる可能性がある。ヒト

iPS 細胞からミクログリアが分化誘導可能となれば、全てヒト細胞から成る *in vitro* BBB モデルの作製へと繋がると考えられる。

E. 結論

ヒト ES/iPS 細胞から支持細胞との共培養法あるいは EB 形成法を介して CD34 陽性の血液前駆細胞への分化誘導法が確立された。また、適切なサイトカインを作用することで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。これらの結果は、薬物毒性スクリーニングに応用可能な細胞を作製するための基盤技術となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., **Kawabata K.** Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)
- 2) Tashiro K., Omori M., **Kawabata K.**, Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H. Inhibition of Lnk in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Hematopoietic Cell Generation. *Stem Cells Dev.*, 21, 3381-3390 (2012)
- 3) Tashiro K., **Kawabata K.**, Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.*, 8, 300-311 (2012)
- 4) Takayama K., **Kawabata K.**, Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
- 5) Takayama K., Inamura M., **Kawabata K.**,

- Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- 6) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., **Kawabata K.**, Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
- 7) Takayama K., Inamura M., **Kawabata K.**, Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012)
- 8) **Kawabata K.**, Takayama K., Nagamoto Y., Saldon MM., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. (Review) *J. Stem Cell Res. Ther.*, S10, 002 (2012)
- 9) **Kawabata K.**, Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. (Review) *Methods Mol. Biol.*, 826, 115-124 (2012)
- 10) 水口裕之、高山和雄、長基康人、**川端健二**：ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用；医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、43、982-987 (2012)
- 11) 高山和雄、**川端健二**、水口裕之：ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその創薬応用；最新医学、68、141-144 (2013)
- 12) **川端健二**、高山和雄、水口裕之：ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発；バイオインダストリー、30、19-24 (2013)

2. 学会発表

【国内学会】

1. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: マウス iPS 細胞から成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
2. 田代克久、大森美幸、川端健二、平田信恵、山口朋子、櫻井文教、高木智、水口裕之: アダプター蛋白質 Lnk の抑制はマウス ES/iPS 細胞から血液前駆細胞への分化を促進する; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
3. 森崎悠太、古川智久、樋口麻衣子、田代克久、高山和雄、大高真奈美、西村健、立花雅史、櫻井文教、川端健二、中西真人、水口裕之: 創薬応用を目指したヒト初代培養凍結肝細胞由来 iPS 細胞の樹立; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
4. 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: Nanopillar プレートを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用; 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年 3 月 21-23 日
5. 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之: 転写因子 HEX によるヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化機構の解明; 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年 3 月 21-23 日
6. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関する新規液性因子の同定; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
7. 田代克久、平田信恵、山口朋子、水口裕之、川端健二: タイトジャンクション蛋白質 CAR の発現を指標にしたマウス ES 細胞から血液細胞、心筋細胞の単離; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
8. 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子 HEX の機能解明; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
9. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue KM., Mizuguchi H.: GENERATION OF MATURE HEPATOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS BY FOXA2 AND HNF1 α TRANSDUCTION; 第 27 回日本薬物動態学会年会、千葉、2012 年 11 月 20-22 日
10. 山中靖貴、山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二: iPS 細胞から T 細胞への分化誘導法に開発; 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2012 年 10 月 20 日
11. 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子 HEX の機能解明—HEX 標的遺伝子の同定および機能解析—; 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2012 年 10 月 20 日
12. 高山和雄、稲村充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: FOXA2 および HNF1 α 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導; 第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月 17-19 日
13. 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之: ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下における成熟化・促進 機構の解析; 第 19 回大会肝細胞研究会、札幌、2012 年 6 月 29-30 日
14. 高山和雄、川端健二、稲村充、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: c/EBP α および c/EBP β 遺伝子による TGFBR2 遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定; 第 19 回大会肝細胞研究会、札幌、2012 年 6 月 29-30 日
15. 高山和雄、稲村充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導; 第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月 17-18 日
16. 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之: Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析; 第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月 17-18 日

【国際学会】

1. **Kenji Kawabata**, Hiroyuki Mizuguchi.
Differentiation of hepatocyte-like cells from human ES and iPS cells and its application in drug screening., 2012 World Stem Cell Summit, West Palm Beach, Florida, USA, Dec 2012,
2. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, **Kenji Kawabata**.
Characterization of mast cells generated by differentiation from mouse induced pluripotent stem cells., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012
3. Katsuhisa Tashiro, Aki nonaka, Tomoko Yamaguchi, Mizuguchi Hiroyuki, **Kenji Kawabata**.
Kawabata. Mobilization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by vascular endothelial growth factor is mediated by reduction of mesenchymal stromal cells in bone marrow., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012
4. Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, **Kenji Kawabata**, Michiko Sugawara, Kiyomi Kikuchi, Maiko Higuchi, Yasuhito Nagamoto, Hitoshi Watanabe, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi.
GENERATION OF METABOLICALLY FUNCTIONING HEPATOCYTES FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY TRANSDUCTION OF FOXA2 AND HNF1 α ., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012
5. Yasuhito Nagamoto, Katsuhisa Tashiro, Kazuo Takayama, Kazuo Ohashi, **Kenji Kawabata**, Masashi Tachibana, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi. Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. , International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
川寄敏祐、川寄伸子、古江美保、川端健二
標的細胞障害活性を有する iPS/ES 細胞特異的抗体及びその用途
出願番号：特願 2012-280259
出願日：平成 24 年 12 月 21 日
2. 実用新案登録
3. その他

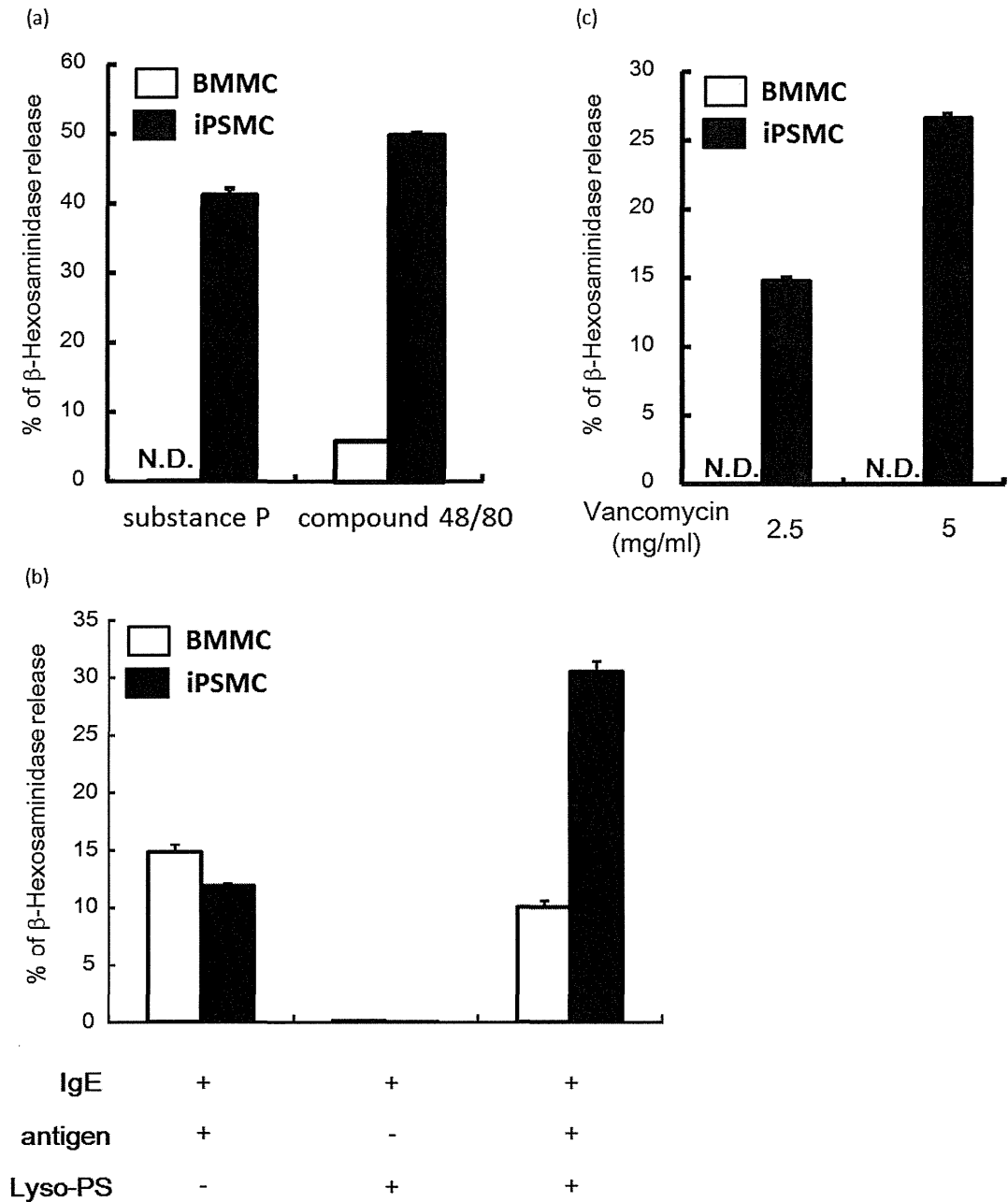


Figure 1 β -hexosaminidase release from iPSMCs after stimulation with IgE/antigen, compound 48/80, substance P, and vancomycin.

(a) The exocytotic response was determined by measuring the release of β -hexosaminidase. BMMCs (open bar) and the iPSMCs that were co-cultured with OP9 cells (closed bar) were sensitized with anti-DNP IgE and stimulated with DNP-HSA in the presence or absence of Lyso-PS as described in the Materials and Methods. β -hexosaminidase enzymatic activity was measured in supernatants and cell pellets solubilized with 0.5% Triton X-100 in HEPES buffer. (b) BMMCs (open bar) and the iPSMCs that were co-cultured with OP9 cells (closed bar) were stimulated with compound 48/80 or substance P. (c) BMMCs (open bar) and the iPSMCs that were co-cultured with OP9 cells (closed bar) were stimulated with vancomycin. All data represent the means \pm S.D. (n=3).