

201306016A

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25年度 研究報告書

研究代表者 川端 健二

平成26（2014）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25年度 研究報告書

研究代表者 川端 健二

平成26（2014）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	-----	8
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	-----	34
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	-----	45
---------------------	-------	----

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、前年度分化誘導法を確立したヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞を用いて、血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。また、ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導法の確立、*in vitro* 血液脳関門 (BBB) モデルのさらなる改良とそれに寄与するメカニズムの解明、*in vitro* 細胞毒性評価プロトコルのヒト iPS 細胞由来神経細胞への最適化、神経特異的細胞死 (興奮毒性) の定量評価試行、シナプス機能障害の定量評価法の確立を行い、以下の結論を得た。

- (1) ヒト iPS 細胞から肺や腸粘膜に多く存在する MC_T (tryptase のみを含むマスト細胞) を分化誘導できた。
- (2) ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は、単独培養と比較し、強固なタイトジャンクションを形成することを明らかにした。
- (3) PI/calcein イメージング、LDH/MTT 同時測定法の細胞毒性評価プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した。
- (4) NMDA 受容体を発現していなければ興奮毒性評価は困難であり、そのためのヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の選別が重要であることを明らかにした。
- (5) シナプス機能障害定量評価法として、アクチン結合タンパク質ドレブリンの局在変化を指標とできることを見いだした。

分担研究者

関野祐子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

新薬開発過程でしばしば問題となるのが薬物毒性であるが、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 細胞からマスト細胞および脳特異的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* 毒性評価系の最適化を試みた。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導

H24 年度、EB 形成法あるいは 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) と共培養することで血液前駆細胞へ分化誘導可能であることを確認した。そこで H25 年度は、メチルセルロース法を用いて、iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。その結果、2 週間後には好中球や単球様のコロニーが出現した。5-6 週間後には、好中球のコロニーは死滅し、新たなコロニーが出現した。コロニーを顕微鏡下で採取し、メイ・ギムザ染色を行った結果、細胞内に顆粒を有することが示されたことから、出現したコロニーがマスト細胞様細胞であることが示された。また、免疫抗体染色法により、これらの細胞はマスト細胞特異的酵素である *chymase* の発現は弱く、*tryptase* を強く発現していることも明らかとなった。以上の結果から、本培養法によりヒト iPS 細胞からマスト細胞が分化誘導可能であることが示された。

2. ヒト iPS 細胞から脳特異的血管内皮細胞への分化誘導法の確立

細胞株を用いた予備実験により、C6 細胞は *b.End3* マウス血管内皮細胞のタイトジャンクション形成を促進することを確認した。そこで、C6 細胞はヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞のタイトジャンクション形成能も促進できるのではないかと考えた。この可能性を検証するため、C6 細胞との共培養系がヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞のタイトジャンクション形成に与える影響について解析した。その結果、C6 細胞との共培養によりヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞のタイトジャンクション形成が促進されている

ことが明らかとなり、脳特異的血管内皮細胞に分化したことが示された。

3. ヒト iPS 細胞由来神経細胞による in vitro 神経毒性評価系の完成

PI/Calcein イメージング、LDH/MTT 同時測定法によって得られる複数パラメータに基づき、細胞毒性の評価を試みることにした。ヒト iPS 細胞由来神経細胞はこれまで in vitro 毒性評価試験に用いられてきた初代培養齧歯類神経細胞と比較して、非常にはがれやすいことから、プロトコルの最適化を行った。また、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体を発現していなければ興奮毒性評価は困難であり、そのためのヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の選別が重要であることが明らかとなった。さらに、シナプス機能障害定量評価法として、アクチン結合タンパク質ドレブリンの局在変化を指標とできることを見出した。

D. 考察

D-1. ヒト iPS 細胞から各種血液細胞への分化誘導法の確立

本年度はヒト iPS 細胞を用いた in vitro 薬物毒性評価系の構築に向け、ヒト iPS 細胞由来 CD34+CD43+血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。得られた細胞は、RNA レベルではあるが、IgE 高親和性受容体 (FcεRI) やマスト細胞特異的酵素であるカルボキシペプチダーゼなどの酵素が発現していることが確認された。ヒトマスト細胞はプロテアーゼの

発現の違いから、肺や腸粘膜に多く存在する MC_T (tryptase のみを含むマスト細胞) と皮膚や腸粘膜下組織に多く存在する MC_{Tc} (tryptase、chymase、CPA および Cathepsin G 様プロテアーゼを含むマスト細胞) の2つのサブタイプに分類されている。マウス粘膜型マスト細胞 (MMC) が MC_T、結合組織型マスト細胞 (CTMC) が MC_{Tc} にそれぞれ概ね対応すると考えられている。免疫抗体染色法により、本手法によって得られたマスト細胞は、タンパク質レベルでマスト細胞特異的酵素である tryptase を発現していることが示された。一方、chymase の発現量が低かったことから、本研究により分化誘導されたマスト細胞は MC_T 型マスト細胞である可能性がある。MC_T 型マスト細胞は肺などに多く存在することから、喘息を含む肺に存在するマスト細胞が関与する疾患、慢性閉塞性肺疾患などに対する治療薬の開発にヒト iPS 細胞由来 MC_T 型マスト細胞が有用であると考えられる。一方、皮膚に存在するマスト細胞は、tryptase だけでなく chymase も発現していることから、アトピー性皮膚炎などの治療薬の開発に向け、今後、支持細胞との共培養法などを用いて ES/iPS 細胞から MC_{Tc} 型マスト細胞への分化誘導法の確立が必要であると考えられる。

マスト細胞は、FcεRI+c-kit+細胞として知られている。フローサイトメーターを用いた解析により、本手法により誘導された

細胞では $Fc\epsilon RI$ の発現が検出出来なかった。ヒト臍帯血由来マスト細胞では、 $IL-4$ を作用することで $Fc\epsilon RI$ の発現量が増加することが報告されている。したがって、今後は本年度確立した分化誘導系に $IL-4$ を加えることで、 $Fc\epsilon RI+c-kit+$ マスト細胞を分化誘導可能であると考えられる。

現在のマスト細胞活性化阻害薬は齧歯類のマスト細胞の活性化は抑制するが、ヒトマスト細胞の活性化に対する抑制効果はないことが知られている。唯一、ヒト化された抗ヒト IgE 抗体は IgE と $Fc\epsilon RI$ との結合を阻害し、ヒトマスト細胞の活性化を阻害するが、極めて高価である。今後、本手法により誘導したヒトマスト細胞を用いた、新規抗アレルギー薬の開発が期待される。

D-2. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立

本年度は脳特異的血管内皮細胞の作製に向け、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の最適化を行い、安定的に血管内皮細胞を取得可能なプロトコルの確立に成功した。無血清・無フィーダー細胞条件下での誘導法を確立できたことは、分化誘導の再現性・安定性の向上につながるため、非常に重要な知見であるといえる。

また本年度は、ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は、単独培養と比較し、強固なタイトジャンクションを形成するこ

とを明らかにした。また、得られた細胞は各種トランスポーターの発現量も増加しており、特に P-gp に関しては排出トランスポーターとして機能していることも確認された。したがって、C6 細胞との共培養により、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は脳特異的血管内皮細胞へと成熟化していることが示された。C6 細胞はアストロサイト様の性質を有しており、これまでに C6 細胞との共培養系によりヒト脳血管内皮細胞の性質が維持されることが報告されている。しかし、C6 細胞との共培養系によってナイーブなヒト血管内皮細胞が脳血管内皮細胞へと分化・成熟するという事実は、本研究において初めて見出した C6 細胞の機能であり、非常に興味深い知見である。一方で、C6 細胞は HUVEC のタイトジャンクション形成にほとんど影響を及ぼしていなかった。これは、HUVEC が成熟血管内皮細胞として機能していた臍帯静脈から単離された細胞であるため、C6 細胞との共培養系においても、強固なタイトジャンクションを形成する脳血管内皮細胞への分化転換は生じなかったものと考えられる。つまり、これらの結果から、ヒト脳特異的血管内皮細胞の作製には、運命決定されていない（組織特異性を獲得していない）血管内皮細胞が、BBB 構成細胞からのシグナルを受けることが必要であると考えられる。ヒトの脳組織から大量の血管内皮細胞を採取することは困難であること、そして、他の組織・臓器から

血管内皮細胞を単離したとしても、脳特異的血管内皮細胞への性質転換が困難であることを考慮すると、特定の環境刺激を与えずに作製可能なヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は、ヒト脳特異的血管内皮細胞作製のための有用な細胞ソースであると考えられる。

本年度の研究により、C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞が脳血管内皮細胞様の性質を獲得することを明らかにできた。しかし、共培養系による細胞の性質変換は、共培養に用いる細胞の状態に大きく依存する実験系であるため、安定的に脳血管内皮細胞を得られないことも懸念される。したがって、今後は C6 細胞の培養上清を用いるなど、より簡便な誘導法を開発する必要があると考えられる。また、各種トランスポーターの発現量は依然として低いなどの課題も残されている。来年度は、機能的な脳特異的血管内皮細胞の作製に向け、さらに実験系を改良していく予定である。

D-3. in vitro BBB モデルのさらなる改良—ミクログリア共存による BBB 機能向上とその裏付け

今回、検討したタイトジャンクション (ZO-1, claudin 5, occludin) は、BBB においてそれぞれ異なる機能を持ったタンパク質である。ZO-1 は膜の裏打ちタンパク質である。Occludin はタイトジャンクションの代表的な構造であるタイトジャンクションストランドを構成する主要なタンパク質として同定されたが、ロックアウトしてもタイトジャンクション構造が破綻することはない。Occludin と同じく、タイトジャン

クションストランドを構成する蛋白 Claudin5 は、ロックアウトすることにより、タイトジャンクションストランド構造が破綻することから、タイトジャンクション形成を運命づける最も重要な構成タンパク質であると考えられている。今回我々は、ミクログリアによって Claudin 5 の発現のみが上昇することを見いだした。ミクログリアがタイトジャンクション形成に最も重要なタンパク質選択的に発現制御をしている点は、ミクログリアによる BBB バリア機能調節の重要性を示唆している。本実験系において、内皮細胞とミクログリアは直接の接触をしていないため、ミクログリアからの液性因子がこれらの蛋白発現を制御していることが示唆される。これまでの研究から、BBB バリア機能はアストロサイト、ペリサイトから産生される Ang-1, TGF- β , VEGF, bFGF によって制御されることが示されており、特に、bFGF は Claudin5 発現を増大することが報告されている。ミクログリアから bFGF、もしくは未知の因子が産生され、BBB の Claudin5 発現を増大している可能性が示唆される。

一方、BBB に L-Glu 能動的排出機能があることも確認した。脳血管内皮細胞における L-Glu トランスポーターの発現は知られていたが、その排出能力の程度についてあまり知られていなかった。我々の結果では 5 日間の培養期間で脳側の L-Glu がほぼ 0 となり、血管側の L-Glu 濃度が上昇していた。ミクログリアを添加すると、L-Glu トランスポーターである GLAST, GLT-1 の発現が促進された。脳血管内皮細胞の L-Glu トランスポーターの発現制御に関して報告はほとんどない。今後、ミクログリアから産生される液性因子の解明を行う。また、ミクログリア添加自体によ

て、脳内 L-Glu 濃度上昇が引き起こされている可能性についても確認する必要がある。

D-4. ヒト iPS 細胞由来神経細胞による in vitro 神経毒性評価系の完成

従来の齧歯類初代培養神経細胞に用いられてきた細胞毒性評価プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞用に最適化した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞は齧歯類初代培養細胞と比較し、非常にはがれやすい。また、結果は示していないが、従来のプロトコルでは PI 暴露時間が 24 時間となっており、同じ条件でヒト iPS 細胞由来神経細胞を染色したところ、PI 暴露のみでほとんどの細胞が死滅してしまった。PI 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。生細胞と死細胞が共存している条件では、細胞膜が侵襲をうけている死細胞のみにとりこまれ、蛍光を発するとされている。これまで、PI 自体に毒性が報告された例はなく、そのメカニズムは不明であるが、ヒト iPS 細胞の細胞毒性を評価する際には、齧歯類初代培養神経細胞で用いられている検出系の条件をマイルドにする必要があると考えた。条件検討を繰り返し、ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した細胞毒性プロトコルを確定した。

中枢神経系において、神経細胞同士はシナプスという構造で接合している。シナプスは、特定条件で興奮性神経伝達物質グルタミン酸の放出確率が上昇するといった、伝達効率の変化＝シナプス可塑性を生み出すマシナリーがあり、記憶や学習といった高次中枢神経機能の基盤となっている。その一方で、シナプス可塑性に関わる NMDA 型グルタミン酸受容体が、過剰なグルタミン酸刺激によって引き起こされる興奮毒性の原因となっている。興奮毒性は

神経特異的な毒性メカニズムであり、実は非常に多くの神経障害共通のメカニズムとなっている。今回我々は、L-Glu に対するカルシウム応答に NMDA 型受容体成分が含まれない 253G1 由来神経細胞標本では興奮毒性が再現できず、NMDA 成分が含まれる iNeuron では興奮毒性を再現できた。これらの結果は、医薬品等が興奮毒性を引き起こすかどうかの評価ではカルシウムイメージング等で機能的 NMDA 型受容体発現が保証された標本を選別して使用する必要があることを示唆する重要なデータである。

これまで医薬品の中枢神経機能への有害影響については、ほとんど丸ごと動物を用いた in vivo 評価が用いられてきた。しかし、中枢神経研究の進歩により高次機能の変化と相関のある細胞レベルでの変化が数々見いだされている。その一つがシナプス機能を反映した、シナプス後部のスパイン形態の変化とスパインにクラスターするアクチン結合タンパク質ドレブリンの分布である (Takahashi et al., J Neurosci 23, 6586-6595, 2009)。我々は今回、ドレブリンのスパイン-樹状突起分布を SDR という指標を設定することにより定量化することに成功した (Mizui et al., PLOS ONE 9(1) e85367, 2014)。また、この SDR がシナプス機能に影響を与える条件の L-Glu 刺激によって低下することも確認した。これらの結果は高次機能への有害影響を、SDR を用いて予測できる可能性を示している。今後はすでに中枢影響が明らかな種々の実験条件や医薬品等を用いて、SDR の高次機能への影響予測性についてデータを集積する必要がある。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞における SDR 算出にも取り組む。

E. 結論

- ・ヒト iPS 細胞から肺や腸粘膜に多く存在する MC_T (tryptase のみを含むマスト細胞) を分化誘導できた。
- ・ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は、単独培養と比較し、強固なタイトジャンクションを形成することを明らかにした。
- ・PI/calcein イメージング、LDH/MTT 同時測定法の細胞毒性評価プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した。
- ・NMDA 型受容体を発現していなければ興奮毒性評価は困難であり、そのためのヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の選別が重要であることを明らかにした。
- ・シナプス機能障害定量評価法として、アクチン結合タンパク質ドレブリンの局在変化を指標とできることを見いだした。

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。平成 25 年度は、前年度分化誘導法を確立したヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞を用いて、血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞から肺や腸粘膜に多く存在する MC_T (tryptase のみを含むマスト細胞) を分化誘導できた。

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法を確立した。その結果、安定的に血管内皮細胞を取得可能なプロトコールの確立に成功した。また本年度は、ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は、単独培養と比較し、強固なタイトジャンクションを形成することを明らかにした。

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

A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞 (human embryonic 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 25 年度は、ヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。また、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法を確立し、血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への分化誘導条件の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. ヒト iPS 細胞から各種血液細胞への分化誘導法の確立

B-1-1. 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; 片山工業化学) を含む霊長類 ES 細胞用培地「ReproStem」 (ReproCell) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。4-5 日ごとに 0.1 mg/ml dispase (Roche) 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-1-2. 胚様体 (embryoid body : EB) 形成による血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞を Accutase (Millipore) により培養ディッシュから剥離し、10 μ M Y27632 (Wako) を含む EB 形成培地 [50 μ g/ml アスコルビン酸 (Sigma) と 450 μ M Monothioglycerol (Sigma)、付属のサプリメントを加えた mTeSR (Stem Cell)] 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、 1×10^6 個の iPS 細胞と前日放射線処理した 6×10^5 個 C3H10T1/2 細胞を 2 ng/ml ActivinA (R&D Systeme)、2 ng/ml bone morphogenic protein 4 (BMP4) (R&D System)、10 μ M Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632; Wako) を含む EB 形成培地に懸濁し、ペトリディッシュに播種した。2 日後 (Day 2)、2 ng/ml BMP4、

5 ng/ml VEGF を含む EB 分化培地 [50 μ g/ml アスコルビン酸 (Sigma) と 450 μ M Monothioglycerol (Sigma 社)、2 mM L-グルタミン (Life Technologies)、インスリン トランスフェリン (Life Technologies) を加えた IMDM (Sigma)] に置き換えた。その 2 日後 (Day 4)、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 μ M SB431542 (Wako) を含む EB 分化培地で半分培地を交換し、更に 2 日培養した (SB431542 の終濃度は 5 μ M)。分化誘導から 6 日目 (Day 6) に、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、20 ng/ml stem cell factor (SCF; Pepotech)、20 ng/ml Thrombopoietin (TPO; Peprotech) を含む EB 分化培地に培地を交換した。2 日後 (Day 8) に半分培地交換を行い、血液前駆細胞の誘導を行った。

B-1-3. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

培養 8-10 日目の EB を回収し、Cell dissociation buffer (Life Technologies) を加えて 37°C で 15 分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離した。その後、allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD34 抗体 (clone 581、BioLegend) および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD43 抗体 (clone 1G10、BD Biosciences) を氷上、遮光で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、セルソーター (SONY SH-800) にて CD34+CD43+ 細胞を分離した。

B-1-4. メチルセルロース法を用いた CD34+CD43+ 細胞からマスト細胞の分化誘導

CD34+CD43+ 血液前駆細胞を 200 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6、5 ng/ml IL-3 含有培地の懸濁後、MethoCult H4236 メチルセルロース培地 (Stem Cell) と混和し、low binding 24 well プレート (Nunc) に播種した (Week 1)。2 週間後 (Week 3)、200 ng/ml SCF および 50 ng/ml IL-6 含有 IMDM と MethoCult H4236 メチルセルロース培地を混和し重層した。その 2 週間後 (Week 5)、200 ng/ml SCF および 50 ng/ml IL-6 含有 IMDM をさらに重層した。メチルセルロース中での培養 6 週間目 (Week 7) に、顕微鏡下でコロニー形成細胞ピックアップし、以降の検討に用いた。

B-1-5. メイ・ギムザ染色

培養細胞・浮遊細胞を直接スライドグラスに接着させ単層標本を作製することができる集細胞遠心装置であるサイトスピン (Shandon Cytospin 4) を用いて、ヒト iPS 細胞由来分化細胞の単層標本を作製した。その後、メイ・グリュンワルド染色液で 3 分浸水し、希釈したギムザ溶液に 20 分浸水させ染色した。風乾後、封入剤を用いて封入し細胞の形態を顕微鏡にて観察した。

B-1-6. 遺伝子発現解析

ヒト iPS 細胞ならびにヒト iPS 細胞由来分化細胞から NucleoSpin RNA XS (TaKaRa) あるいは RNAiso Plus (TaKaRa) を用いて Total RNA を抽出した。各 Total RNA を RNase-free DNase I (New England Biolabs) で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。その後、cDNA を Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies) にて増幅し定量した (StepOne Plus ; Life Technologies)。

B-1-7. 免疫抗体染色

ヒト iPS 細胞由来分化細胞を 4 %パラホルムアルデヒド (PFA; Wako) を用いて固定した後、Permeabilization Buffer (eBioscience) で透過処理を行った。その後、抗ヒト Tryptase 抗体 (clone G3、Millipore) あるいは抗ヒト Chymase 抗体 (clone B7、Millipore) を室温で作用させた。続いて、Alexa Fluor 488 で標識された 2 次抗体 (Life Technologies) を室温で作用させた。2 次抗体反応後に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 入り封入剤 (Life Technologies) を用いて核染色を行い蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000 ; キーエンス) にて観察した。

B-2. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立

B-2-1. 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 の fibroblast growth factor 2 (FGF2) を含む ReproStem 培地 (ReproCELL) を用いて、マイトマイシン C 処理済のマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast) 上で培養した。ヒト iPS 細胞株は 4-5 日ごとに 0.1 mg/ml dispase (Roche) を用いて継代した。

B-2-2. 胚様体 (embryoid body : EB) 形成による血管内皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導は以下の方法で行った。細胞剥離液である Accutase (Millipore) を用いてヒト iPS 細胞を回収後、20 ng/mL bone morphogenetic protein 4 (BMP4 ; R&D Systems) 、 2 ng/ml activin A (R&D Systems) 、 10 μ M Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632 ; Wako) を含む StemPro-34 培地 (StemPro-34 Nutrient Supplement (Life Technologies) 、 50 μ g/ml Ascorbic acid (Sigma) 、 450 μ M 1-thioglycerol (MTG ; Sigma) 、 2 mM L-Glutamine (Life Technologies) 、 120 μ g/ml streptomycin および 200 μ g/ml

penicillin を含む StemPro-34 Serum Free Medium (Life Technologies)) に懸濁後、96 穴 Lipidure-coat プレート (Thermo Scientific) の各ウェルに 2×10^4 個の細胞を播種し EB を形成させた。2 日間培養後、中胚葉へと分化させるために 20 ng/mL BMP4 および 5 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF ; Peprotech) を含む StemPro-34 培地に置換してさらに 2 日間培養し、培養 4 日目に 20 ng/mL BMP4、5 ng/ml VEGF および 5 μ M transforming growth factor (TGF) β inhibitor (SB431542 ; Wako) を含む StemPro-34 培地で 2 日間培養した。培養 6 日目に EB を回収し、20 ng/ml VEGF、2 ng/ml FGF2 および 5 μ M SB431542 を含む StemPro-34 培地で置換し、3 日間 (培養 9 日間まで) ペトリディッシュ上で培養した後、目的の細胞集団をセルソーターにより分離した。分離した細胞は、100 ng/ml Endothelial cells growth supplement (ECGS ; Sigma) 、 100 ng/ml heparin (Sigma; H3149) および 20 ng/ml FGF2 を含む StemPro34 培地 (ECGS+Heparin 培地) に懸濁し、 5×10^4 cells/well (48 well) の密度で 20 μ g/cm² の濃度でフィブロネクチンをコートしたプレートに播種した。その後、2 日おきに培地を置換しながら接着培養を行い、血管内皮細胞を誘導・増幅した。

B-2-3. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

培養6日目および9日目のEBを回収し、Cell dissociation buffer (Life Technologies) を加えて 37°C で 15 分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離させた。その後、allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD34 抗体 (clone 581; BioLegend) および phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト VE-Cadherin 抗体 (clone 16B1; eBioscience) を 4°C、遮光で 40 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、フローサイトメーター (BD LSRFortessa II; BD Bioscience) を用いて CD34 発現 (+) VE-Cadherin+ 細胞の割合を解析した。セルソーターにて細胞分離作業を行う場合は、0.25% trypsin/EDTA (Life Technologies) により EB を単細胞に解離した後に、APC 標識抗ヒト CD34 抗体を反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、セルソーター (SONY SH-800) にて CD34+ 細胞および CD34 陰性 (-) 細胞を分離した。

B-2-4. 遺伝子発現解析

ヒト iPS 細胞ならびにヒト iPS 細胞由来分化細胞から ISOGEN (Nippon Gene) あるいは RNAiso Plus (TaKaRa) を用いて Total RNA を抽出した。各 Total RNA を RNase-free DNase I (New England Biolabs) で処理した後、Superscript VILO

cDNA synthesis kit (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。その後、定量的 PCR を行う場合は、cDNA を Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies) にて増幅し定量した (StepOne Plus; Life Technologies) 。半定量的 PCR 法の場合には、合成した cDNA を Takara ExTaq HS polymerase にて増幅した。

B-2-5. マトリゲルを用いた管腔形成能の評価

48 well プレートに 100 μ l のマトリゲル (Matrigel Matrix 2270588; BD Bioscience) 溶液を加えて 37°C、1 時間静置することにより、プレートをコーティングした。接着培養して増幅させた CD34+ 細胞、あるいは CD34- 細胞を 0.25 % trypsin/EDTA にて回収し、10 ng/ml VEGF を含む ECGS + Heparin 培地に懸濁し、 1×10^5 cells /well の細胞数で播種した。37°C、16 時間培養後に顕微鏡下で細胞を観察した。

B-2-6. アセチル化 LDL の取り込み能の評価

接着培養した CD34+ 細胞および CD34- 細胞の培地を、終濃度 10 μ g/ml AlexaFluor 488 acetylated LDL (Life Technologies) を含む ECGS + Heparin 培地で置換し、37°C、4 時間培養後に蛍光顕微鏡

(BIOREVO BZ-9000 ; キーエンス) にて観察した。

B-2-7. 免疫抗体染色

48 well プレートに播種して増殖させた CD34⁺ 細胞または CD34⁻ 細胞を 4 % パラホルムアルデヒド (PFA : Wako) を用いて固定した後、2 % bovine serum albumin (BSA) -PBS 溶液でブロッキングした。その後、抗ヒト CD31 抗体 (Dako : 原液で使用)、抗ヒト vWF 抗体 (Dako : 200 倍希釈)、抗ヒト VE-Cadherin 抗体 (R&D Systems : 20 倍希釈) を 4°C で作用させた。続いて、Alexa Fluor 488 あるいは Alexa Fluor 594 で標識された 2 次抗体 (Life Technologies) を室温で作用させた。2 次抗体反応後に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; Sigma) を用いて核染色を行い、4 % PFA にて固定した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

B-2-8. 各種細胞株の培養

b.End3 細胞 (ATCC) はピルビン酸含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (High Glucose) (DMEM-HP ; Wako) を用いて培養した。4-5 日ごとに 0.25 % trypsin/EDTA を用いて継代した。A1 細胞 (JCRB 細胞バンクから供与) は DMEM High Glucose (DMEM-H) を用いて培養した。3 日ごとに 0.25 % trypsin /EDTA を用いて継代し

た。MG5 細胞 (JCRB 細胞バンクから供与) は DMEM-H と A1 細胞の培養上清を 3 : 7 で混合した培地を用いて培養した。7 日ごとに cold PBS を用いてピペッティングにより継代した。RAW264.7 細胞は DMEM Low Glucose 培地を用いて培養した。4 日ごとに cold PBS を用いてピペッティングにより継代した。J774.1 細胞は RPMI1640 培地を用いて培養した。4 日ごとに cold PBS を用いてピペッティングにより継代した。以上の細胞の培地には全て 10 % fetal bovine serum (FBS) を加えて使用した。C6 細胞 (JCRB 細胞バンクから供与) は 15 % の horse serum (ニチレイバイオサイエンス)、2.5 % の FBS を含む Ham's F10 培地 (Life Technologies) を用いて培養した。4-5 日ごとに 0.25 % trypsin /EDTA を用いて継代した。なお、上記全て培地に 120 µg/ml streptomycin および 200 µg/ml penicillin を加え、培養に使用した。

B-2-9. インサートを用いた b.End3 細胞と各種細胞株の共培養

セルカルチャーインサート (pore size 0.4 µm、Membrane area 0.3 cm² (BD Bioscience)) に、b.End3 細胞を 1×10⁵ cells /300 µl/well で播種した。プレート (CORNING) 側には共培養する細胞を 1×10³ cells 播種した。24 時間後、b.End3 細胞がコンフルエントになっているのを確認した後、プレート側の細胞の培地を

b.End3 細胞の培地で置換し、b.End3 細胞を播種したインサートを、細胞株を播種したプレートに設置し共培養を開始した(day 0)。インサートおよびプレートに播種した細胞の培地交換は全て b.End3 細胞の培地で二日おきに培地交換した。

B-2-10. 電気抵抗値 (Trans Endothelial Electric Resistance ; TEER) の測定

Millicell ERS-2 (millipore) を用いてインサートの内側と外側の培地に電極を 10 秒間浸し、電気抵抗値 (R sample) を測定した。なお、TEER は下記の計算式に従い算出した。

$$\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \text{R sample } (\Omega) \times \text{Membrane area } (\text{cm}^2)$$

B-2-11. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養

HUVEC (Lonza) は HUVEC 維持培地 EGM-2 (内皮細胞基本培地に内皮細胞添加因子を添加した培地。どちらも Lonza より購入) で培養した。3 日ごとに 0.25 % trypsin/EDTA を用いて継代をした。

B-2-12. CD34+細胞と C6 細胞の共培養

セルカルチャーインサートをフィブロネクチンにてコートし、セルソーターにより単離して ECGS + Heparin 培地に懸濁した 5×10^4 個の 201B7 株由来 CD34+ 細胞をセルカルチャーインサートへ播種した。プ

レート側の培地はそれぞれのインサートに播種した細胞と同じ培地 (ECGS + Heparin 培地) を加えた。細胞は 2 日おきに培地交換し、コンフルエントに達した時点をも day 0 として経日的に TEER を測定した (上記の密度でセルカルチャーインサートへ CD34+ 細胞を播種した場合、通常は 4 日後にコンフルエントに達することを確認している)。C6 細胞と共培養を行う場合、CD34+ 細胞をインサートへ播種して 3 日後 (共培養開始前日) に C6 細胞を 5×10^3 cells/well でプレート側に播種した。翌日に ECGS+Heparin 培地に置換した後、コンフルエントの CD34+細胞が接着しているインサートを C6 細胞のウェルへ移動させ、共培養を開始した。その後、経日的に TEER を測定した。インサートに HUVEC を播種した場合も、CD34+ 細胞と同様の条件で実験を実施した。

B-2-13. Dextran を用いた物質透過性の評価

0.1 % FBS/ 内皮細胞基本培地 (EBM-PRF、無血清、フェノールレッド 不含 ; Lonza) で標識した Fluorescein-dextran (FD ; 分子量 3000 ; Life Technologies) を 100 $\mu\text{g/ml}$ に調製した。インサート内の培地を 100 $\mu\text{g/ml}$ の FD 溶液にて置換し、プレート側の培地を FD 不含の 0.1 %FBS EBM-PRF にて置換した。15 時間培養後、プレート側の培地を懸濁し

た後に回収し、インサートからプレート側へ移行した FD 量を蛍光強度計 GENIOS (Spectro FLUOR plus) を用いて測定した (励起波長 ; 494 nm、蛍光波長 ; 521 nm)。FD 溶液の段階希釈により検量線を作成して濃度を算出した。そして、得られた濃度を用いて透過係数 (P_{sample}) を算出した。透過係数の計算式は下記従った。

- ・インサートからプレート側へ通過した FD 容積の算出

$$V = (A_A \times V_A) / A_L$$

- ・見かけ上の透過係数の算出

$$P = (dV/dt) / S$$

- ・各サンプルの透過係数の算出

$$1/P_{\text{sample}} = 1/P_{\text{total}} - 1/P_{\text{non}}$$

A_A : ある時間におけるプレート側の FD 濃度

A_L : インサート内の FD 初濃度

V_A : プレート側の well の培地の容積

S : インサートのメンブレン面積

P_{sample} : サンプルの透過係数

P_{total} : サンプルの測定値から得られる見かけ上の透過係数

P_{non} : 無細胞時の透過係数

B-2-14. ローダミンを用いた P-gp の機能解析

MDR-1 にコードされる糖タンパク質 P-glycoprotein (P-gp) の機能解析を行っ

た。C6 細胞培養と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞に、5 μM cyclosporin A (CSA : Wako) または 10 μM MK571 (Sigma) を 37°C で 1 時間作用させた。その後、PBS を用いてインサート上の細胞を洗浄し、10 μM ローダミン 123 (Sigma) を添加し、遮光で 37°C、1 時間作用させた。その後、プレート側の培地を懸濁して回収し、GENIOS を用いて移行したローダミンを検出した (励起波長 ; 485、蛍光波長 ; 530)。なお、阻害剤を作用させていないヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の Rhodamin 123 の移行量を用いて 1 として各群の値を補正した。また、本実験の培地は全て EBM-PRF を用いた。

C. 研究結果

C-1. ヒト iPS 細胞から各種血液細胞への分化誘導法の確立

C-1-1. ヒト iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血液・免疫細胞を誘導するには、まずヒト iPS 細胞から血液前駆細胞を分化誘導する必要がある。H24 年度、EB 形成法あるいは VEGF 存在下でヒト iPS 細胞を放射線照射した C3H10T1/2 細胞（支持細胞）と共培養することで血液前駆細胞へ分化誘導可能であることを確認した。そこで H25 年度は、iPS 細胞由来血液前駆細胞をからマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。ヒト iPS 細胞から、EB 形成法あるいは C3H10T1/2 細胞との共培養法を介して分化誘導した CD34+CD43+ 血液前駆細胞をセルソーターにて回収した。その後、(1) 浮遊培養、(2) OP9 細胞や C3H10T1/2 細胞などの支持細胞との共培養法、および (3) メチルセルロース法を用いることで、血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導を試みた。

まず、得られた血液前駆細胞を IL-6 および SCF 含有 IMDM 培地で培養する浮遊培養法を試みたが、培養 7 日以内にほとんど全ての細胞が死滅した (data not shown)。

次に、血液前駆細胞と支持細胞（OP9 細胞、C3H10T1/2 細胞）との共培養法を試みた。その結果、OP9 細胞上で血液細胞の増

幅が観察された。一部細胞を採取し、メイ・ギムザ染色を行った結果、多くが分葉核球であったことから、好中球へと分化していることが明らかとなった。また、これらの細胞は共培養 4 週間後には死滅した。なお、支持細胞として C3H10T1/2 細胞を用いた場合も同様の結果が得られた。

次に、血液前駆細胞を IL-6 および SCF 含有メチルセルロース中で培養する事を試みた (Fig. 1a)。その結果、2 週間後には好中球や単球様のコロニーが出現した。5-6 週間後には、好中球のコロニーは死滅し、新たなコロニーが出現した (Fig. 1b)。コロニーを顕微鏡下で採取し、メイ・ギムザ染色を行った結果、細胞内に顆粒を有することが示された (data not shown) ことから、出現したコロニーがマスト細胞様細胞であることが示された。次に、ヒト iPS 細胞 (week 0)、ヒト iPS 細胞由来 CD34+CD43+ 血液前駆細胞 (week 1)、ヒト iPS 細胞由来マスト細胞様細胞 (week 7) における未分化マーカー (Nanog、Oct3/4)、血液マーカー (SCL、GATA2、Runx1)、マスト細胞マーカー (FcεRI、tryptase、CPA) の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した (Fig. 2)。その結果、未分化マーカーは iPS 細胞で高く、iPS 細胞由来 CD34+CD43+ 血液前駆細胞および iPS 細胞由来マスト細胞様細胞では発現が低下していた (Fig. 2)。一方、血液マーカーは、iPS 細胞では発現はみとめられなかったが、