

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観察された (Fig. 2)。さらに、iPS 細胞由来マスト細胞様細胞におけるマスト細胞マーカーの発現量は iPS 細胞由来 CD34+CD43+血液前駆細胞と比較して上昇していた (Fig. 3)。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 (Fig. 3)。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。

C-2. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立

C-2-1. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導

昨年度、胚様体 (EB) 形成法により、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞マーカーである CD34 や VE-cadherin を発現する細胞を誘導できることを報告した。そこで本年度はまず、分化誘導プロトコルの更なる最適化を行った。Fig. 4a に示すプロトコルにてヒト iPS 細胞由来 EB を培養したところ、培養 6 日目には 10%、培養 9 日目には 30% の CD34/VE-Cadherin 両発現細胞 (CD34+VE-Cadherin+細胞) を誘導可能であること、そして培養 9 日目でこれらの細胞の割合は最大になることが明らかとな

った (Fig. 4b)。また、遺伝子発現解析からも、培養 9 日目において各種血管内皮細胞マーカーの上昇していることが観察された (Fig. 4c)。CD34+細胞は、VE-Cadherin +細胞と同一であったため (Fig. 4b)、次に CD34+細胞をセルソーターにて単離し、血管内皮細胞への分化誘導・増幅を試みた。フィブロネクチンにてコートしたプレート上で 4 日間接着培養を行った結果、CD34+細胞から血管内皮細胞様の形態を示す均一の細胞が増殖していた (Fig. 5a)。また、これらの細胞は血管内皮細胞のマーカー分子である CD31 や VE-Cadherin、von Willebrand Factor (vWF)、VE-Cadherin を発現していることも明らかとなった (Fig. 5b)。さらに CD34+ 細胞由来の細胞は、アセチル化 LDL の取り込み能やマトリゲル中での管腔形成能を有していることも示された (Fig. 5c)。以上の結果から、本培養法によりヒト iPS 細胞から機能的な血管内皮細胞が誘導可能であることが示された。

C-2-2. b.End3 細胞と各種細胞株の共培養

生体組織に存在する血管内皮細胞は各組織特有の物質透過性を有している。また、BBB を構成する脳血管内皮細胞は特異的なトランスポーターを発現していることも知られている。興味深いことに、このような血管内皮細胞の組織特異性は環境要因により制御されていることを示唆する報告が最近なされた。したがって、ヒト iPS 細胞

由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化には、脳に存在する細胞種、厳密には BBB 構築に関わる細胞種との共培養が重要ではないかと考えた。そこで本研究ではまず、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞と共培養する細胞種を決定するため、b.End3 細胞（マウス脳血管内皮細胞株）を用いて細胞のスクリーニングを行うこととした。

b.End3 細胞はタイトジャンクションを形成する細胞である。共培養により、この細胞のタイトジャンクションをさらに強固にする細胞は、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞からタイトジャンクション形成能を有する脳血管内皮細胞への誘導に有効ではないかと考えた。そこで A1 細胞（マウスアストロサイト）、C6 細胞（ラットグリオーマ）、MG5 細胞（マウスミクログリア）、RAW264.7 細胞および J774.1 細胞（マウスマクロファージ）の 5 種類の細胞を b.End3 細胞と共培養することで、b.End3 細胞のタイトジャンクション形成を促進可能な細胞株の選定を行った。TEER を測定することにより、b.End3 細胞のタイトジャンクションを強固にする細胞株について検討した結果、C6 細胞と共培養した場合に TEER が有意に上昇することが明らかとなった（Fig. 6）。したがって、C6 細胞は血管内皮細胞のタイトジャンクション形成を促進させる作用を有していることが示唆された。この結果を踏まえ、ヒト iPS 細胞由

来血管内皮細胞と C6 細胞を共培養し、タイトジャンクション形成能を持つ脳特異的血管内皮細胞への成熟化を試みることにした。

C-2-3. ヒト iPS 細胞と C6 細胞の共培養

b.End3 細胞を用いた検討により、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。また、HUVEC もヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞と同様に C6 細胞と共培養した。なお、コントロールとして、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞または HUVEC を単独培養するインサートを用いた。

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞をインサートに播種し、コンフルエントになった時点（播種後 4 日）に共培養を開始した（day 0）。C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞（iPSEC-C6）の TEER を測定したところ、day 0 において $20.1 \pm 3.3 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ であった TEER は共培養 3 日目には $30.4 \pm 3.5 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ 、そして共培養 5 日目には $52.3 \pm 5.1 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ にまで上昇していた。一方、ヒト iPS 由来血管内皮細胞を単独培養した場合（iPSEC-mono）、5 日目においても $27.6 \pm 2.3 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ であり、C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細

胞と比較すると有意に低いものであった (Fig. 7a)。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のタイトジャンクション形成が促進されていることが示された。そこで次に、インサートで培養しているヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の物質透過性を評価するため、Fluorescein にて蛍光標識した dextran (FD: 分子量 3,000) の透過性を解析した。共培養開始時 (day 0) ならびに培養 5 日目の単独培養 (iPSEC-mono)、共培養 (iPSEC-C6) における FD の透過性を解析した結果、培養開始時と比較し、iPSEC-mono においては FD の透過量が減少しているものの、iPSEC-C6 の FD 透過量は、iPSEC-mono と比較してもさらに有意に減少していることが明らかとなった (Fig. 7b)。これらの結果を支持するように、iPSEC-C6 は、iPSEC-mono と比較してタイトジャンクション関連遺伝子 (Claudin-5、Occludin、Zonula Occludin-1 (ZO-1)) の発現も有意に上昇していた (Fig. 7c)。以上の結果から、C6 細胞と共培養することにより、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞は強固なタイトジャンクションを形成することが示された。

なお、HUVEC をインサートへ播種して同様の実験を実施したが、C6 細胞と共培養した HUVEC (HUVEC-C6) における TEER や FD 透過量、タイトジャンクション関連遺伝子の発現は、単独培養した

HUVEC (HUVEC-mono) と同程度であった (Fig. 7a-7c)。

脳特異的血管内皮細胞は強固なタイトジャンクションを形成し、かつ種々の薬物排出トランスポーターを発現していることを特徴としている。また、脳のエネルギー源であるグルコースを取り込むグルコーストランスポーター Glut1 を発現していることも知られている。そこで、共培養開始時のヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞 (day 0)、5 日間単独培養または C6 細胞と共培養したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞 (hiPSEC-mono、hiPSEC-C6) における排出トランスポーター MDR-1、BCRP (breast cancer resistance protein)、MRP-4 (multidrug resistance-associated protein 4) および Glut1 の発現を半定量的 PCR 法にて解析した (Fig. 8a)。その結果、培養開始時のヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞において各トランスポーターの発現はみとめられなかったが、共培養開始 5 日目の iPSEC-mono では各トランスポーターの発現が観察された。さらに、培養 5 日目の iPSEC-C6 におけるトランスポーターの発現量は iPSEC-mono と比較して上昇していた (Fig. 8a)。また、ローダミンは排出トランスポーター P-gp の基質であることが知られている。そこで P-gp の阻害剤シクロスポリン A (CSA) を用いて、iPSEC-C6 が発現している P-gp の機能を評価した。その結果、CSA を作用させた細胞では、ロー

ダミンのプレート側への移行量が、わずかではあるが、有意に上昇していたことから (Fig. 8b)、iPSEC-C6 は機能的な P-gp を発現していることが示された。なお、ローダミンは排出トランスポーターMRP-1 の基質ではないことが知られているため、MRP-1 の阻害剤を作用させた場合にはローダミンの移行量に変化はみとめられなかった (Fig. 8b)。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来血管内細胞は、C6 細胞と共培養することによりにおいて、排出トランスポーター並びに Glut1 を高発現する脳血管内皮細胞へ成熟化していることが示唆された。

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 (Fig. 3)。

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 FcεRI 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 FcεRI 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、FcεRI+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しての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 FcεRI 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ールの確立に成功した (Fig. 4 and 5)。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 (Fig. 7)。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 (Fig. 8)。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 (Fig. 7)。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。

E. 結論

本手法により、ヒト iPS 細胞由来血液前駆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。また、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。さらに、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、緻密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。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製作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. Taura A., Furuta K., Yamaguchi T., **Kawabata K.**, Tanaka S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfil and Gfilb, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, in press

3. 山口朋子、川端健二、iPS 細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、*Biophilia 電子版*、2、21-25 (2013)

2. 学会発表

- 1 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: *In vitro* 血液脳関門モデルの構築を目的としたヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 2 平林玲子、山口朋子、田代克久、池田由美、水口裕之、川端健二: メチルセルロース法を用いたヒト ES/iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 3 山口朋子、田代克久、池田由美、田中智之、水口裕之、川端健二: Wnt シグナルによるマスト細胞の成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 4 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling; 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日
- 5 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: 血液脳関門モデルの構築

を目指したヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日

出願番号：特願 2014-038105

出願日：平成 26 年 2 月 28 日

- 6 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二：マスト細胞の成熟化に関する新規因子の同定; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 7 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二：ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の作製に関する基礎的検討; 第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、東京、2013 年 6 月 1 日
- 8 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells: 第 11 回幹細胞シンポジウム、東京、2013 年 5 月 17-18 日

2. 実用新案登録

3. その他

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

川端健二、山口朋子

成熟マスト細胞の作製方法及び得られた成熟マスト細胞

出願番号：特願 2013-103582

出願日：平成 25 年 5 月 15 日

川端 健二、田代 克久

多能性幹細胞から脳血管内皮細胞を製造する方法

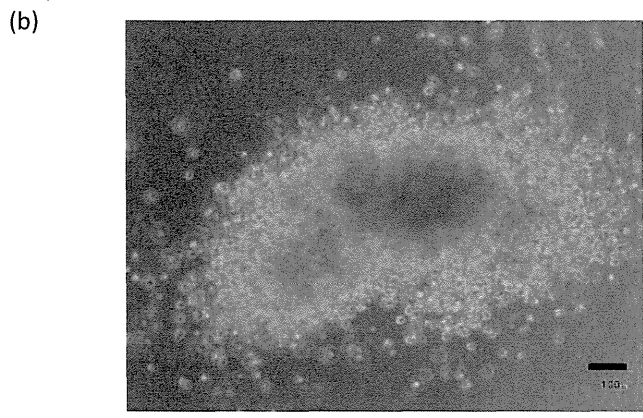
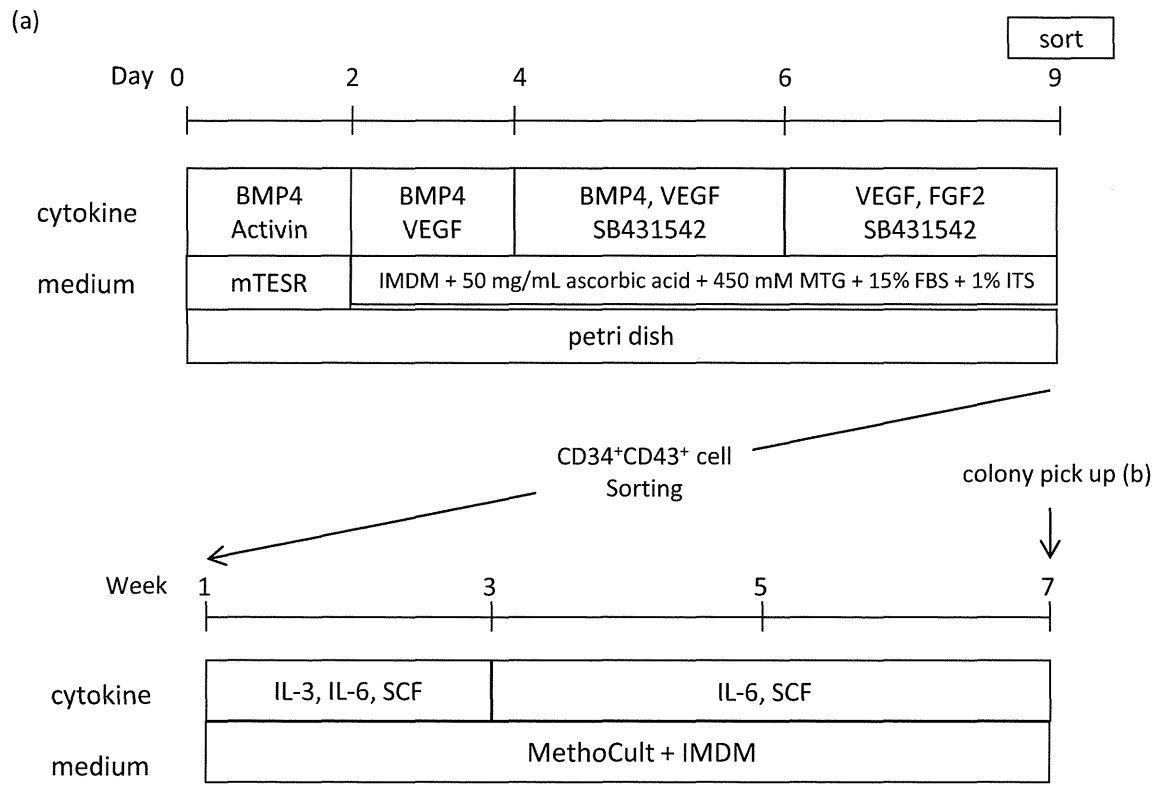


Figure 1 Differentiation of mast cell cells from human iPS cell-derived hematopoietic progenitors. (a) Schema of the culture protocol for generation of human iPS derived-mast cells. (b) A typical mast cell colony grown at 6 weeks of culture from iPS-derived CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitor cells (week 7).

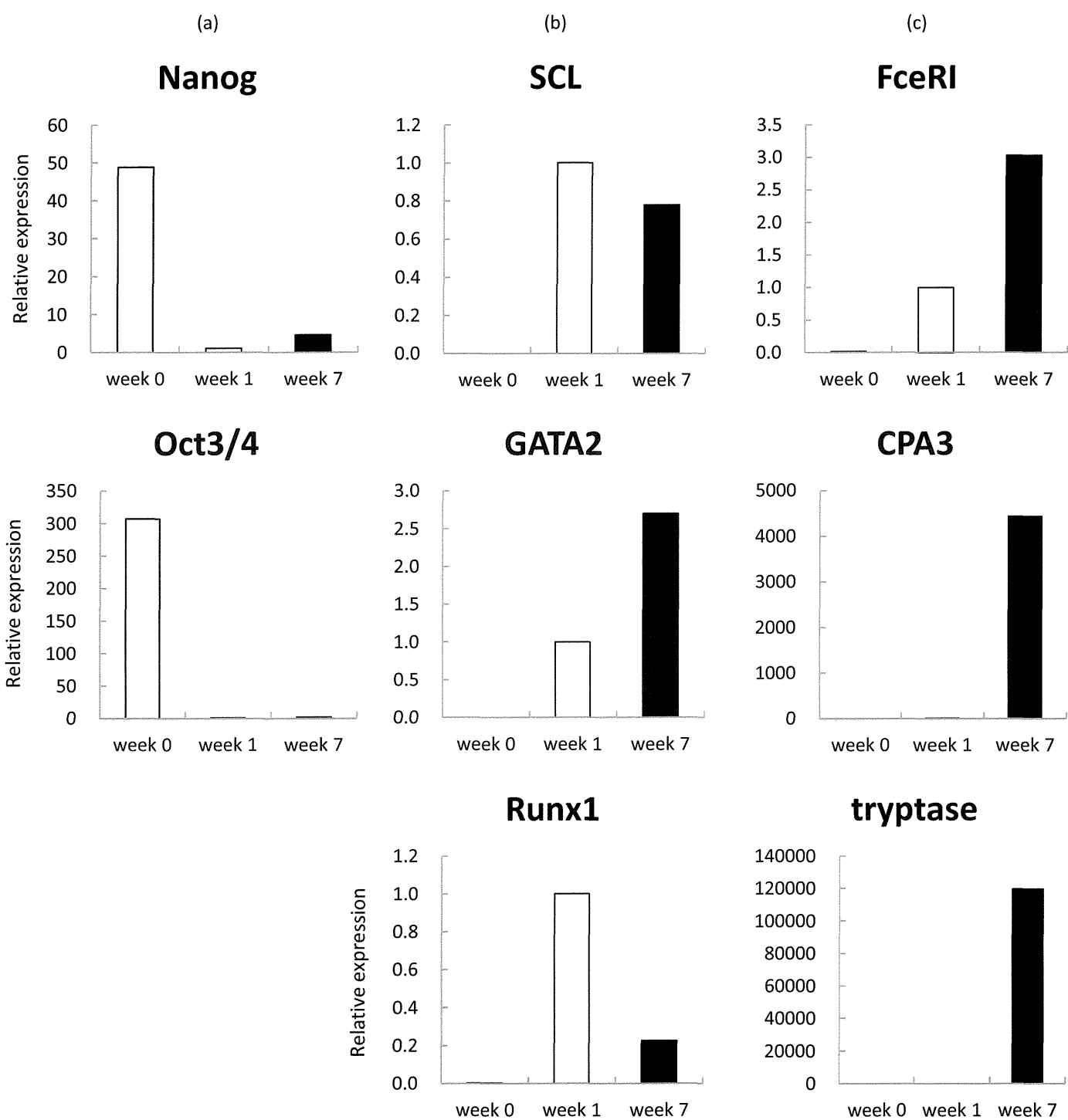


Figure 2 Characterization of human iPS-derived CD34⁺CD43⁺ cells and iPS-derived mast cell-like cells. The gene expression levels of (a) pluripotent marker genes (such as NANOG and Oct3/4), (b) hematopoietic marker genes (such as SCL, GATA2, and RUNX1), and (c) mast cell marker genes (such as FceRI, CPA3, and tryptase) were examined by real-time PCR in undifferentiated iPS cells (week 0), iPS-derived CD34⁺CD43⁺ cells (week 1), and iPS-derived mast cell-like cells (week 7). Bars represent standard deviation of the mean of three independent experiments. The expression levels of iPS-derived CD34⁺CD43⁺ cells were defined 1.0.

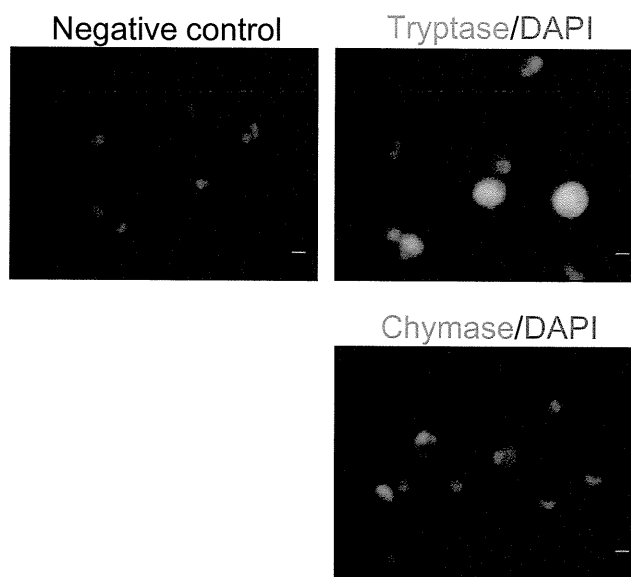


Figure 3 Phenotype of mast cell-like cells from human iPS cells by methylcellulose culture. Cytoentrifuged preparations of iPS-derived mast cells were stained with anti-tryptase antibody and anti-chymase antibody.

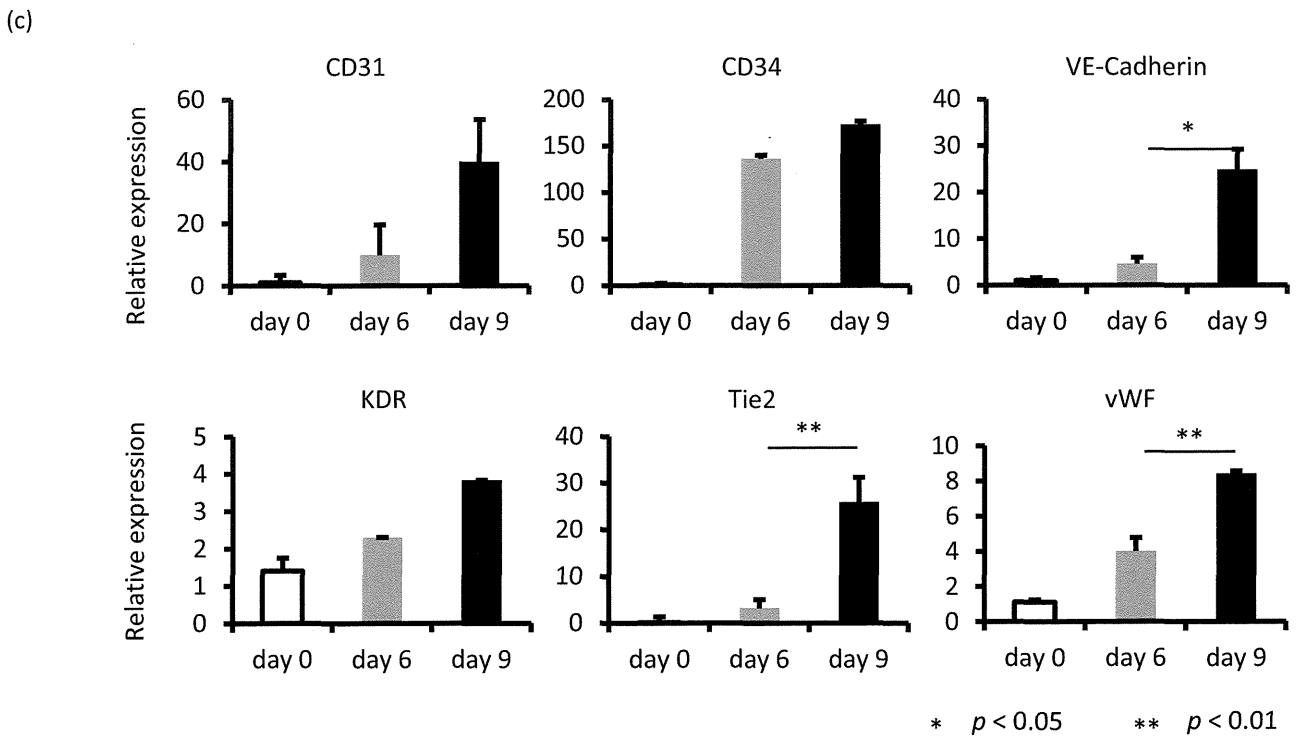
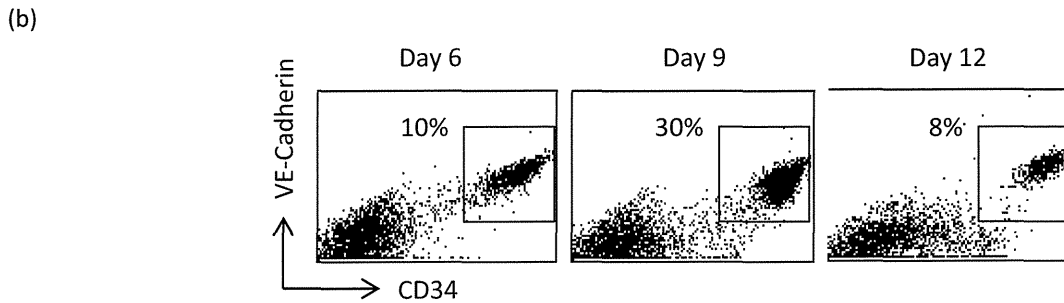
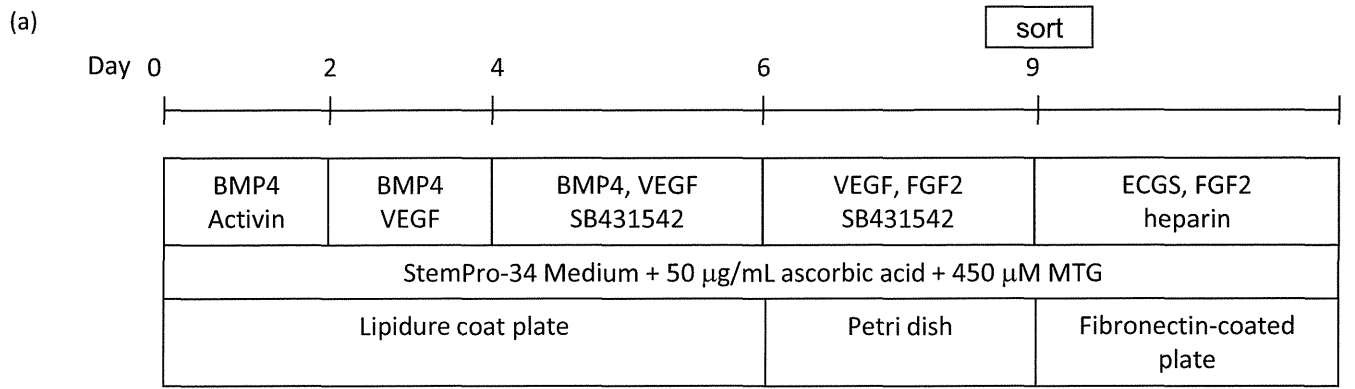


Figure 4 Differentiation of CD34+VE-Cadherin+ cells from human iPS cells by EB formation. (a) Differentiation protocols. (b) The proportion of CD34+VE-Cadherin+ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry. (c) The expression of genes characteristic of endothelial cells in EB cells was investigated by quantitative PCR analysis.

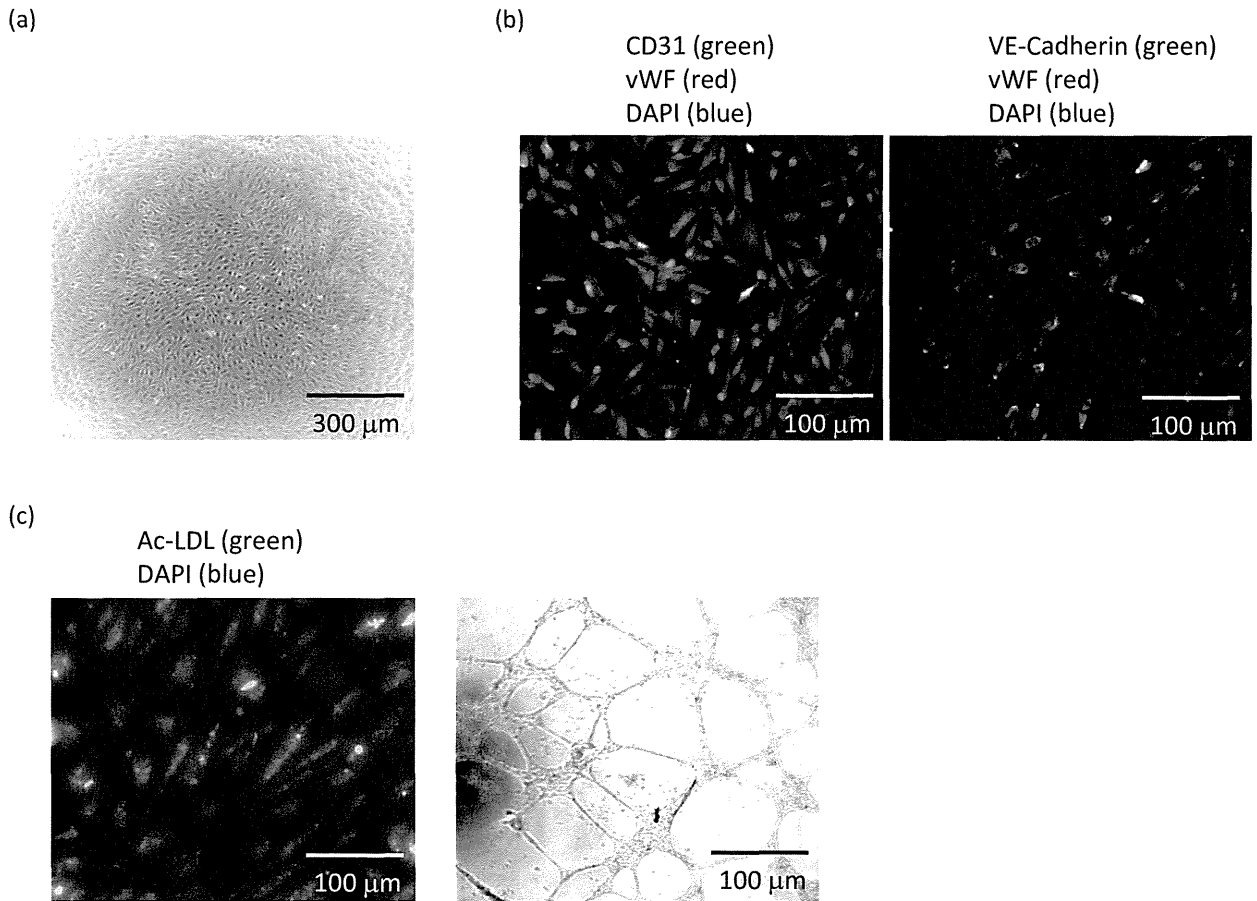


Figure 5 Characterization of human iPS cell-derived endothelial cells. (a) Morphology of human iPS cell-derived endothelial cells. (b) The expression of endothelial marker was examined by immunostaining. (c) Ac-LDL uptake assay (left) and Matrigel tube formation assay (right) were performed.

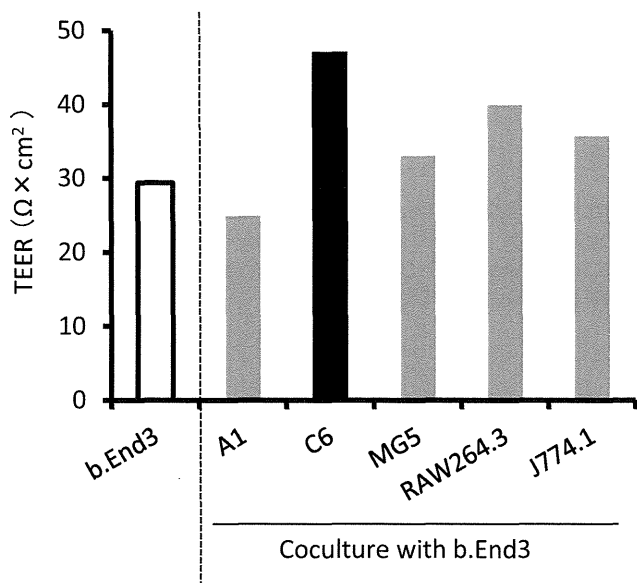


Figure 6 Increased TEER of b.End3 cells by coculturing with C6 cells.

After b.End3 cells were cultured with various types of cell lines, TEER of b.End3 cells was measured.

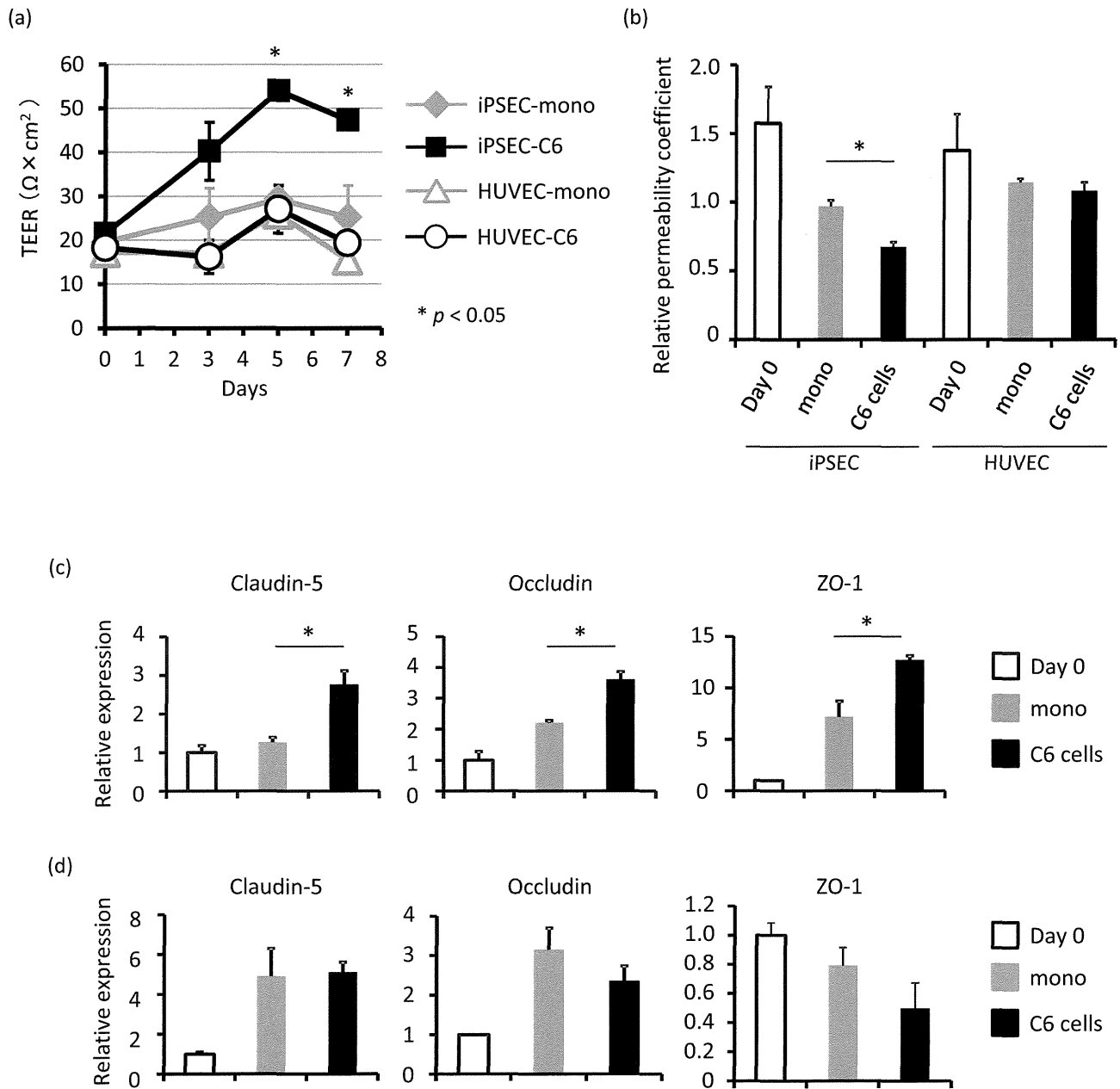


Figure 7 Enhanced barrier function of human iPS cell-derived endothelial cells by coculturing with C6 cells. (a, b) TEER (a) and permeability (b) of human iPS cell-derived endothelial cells and HUVEC was measured after coculturing with or without C6 cells. (c, d) The expression of genes associated with tight junction complexes in human iPS cell-derived endothelial cells (c) or HUVEC (d) was investigated by quantitative PCR analysis.

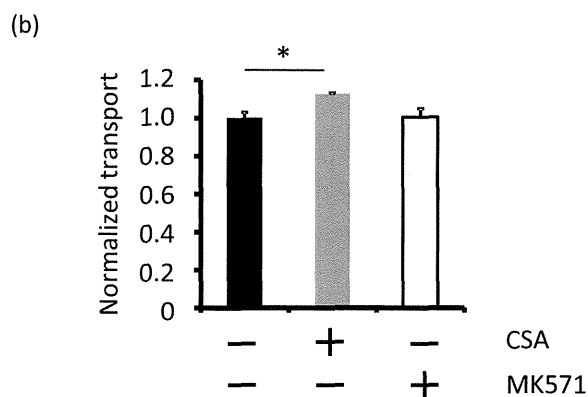
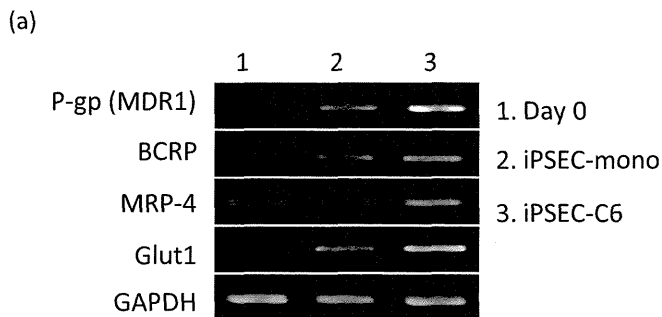


Figure 8 Coculture of Human iPSC cell-derived endothelial cells with C6 cells led to the elevation of transporter gene expression.

(a) The expression of transporter genes in the cells were examined by semi-quantitative PCR analysis. (b) The amount of rhodamin123 in the lower chamber was measured in the presence or in the absence of cyclosporin A (CSA) and MK571. Rhodamin123 is known as a substrate for P-gp. To examine the functionality of p-gp, we used CSA and MK571, each of which is a specific inhibitor P-gp and MRP-1, respectively.

Table 1 List of primers used in this study

Species	Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Assay
Human	GAPDH	GGTGGTCCTCCTGACTTCAACA	GTGGTCGTTGAGGGCAATG	qPCR
Human	CD31	GAGTATTACTGCACAGCCTTCA	AACCACTGCAATAAGTCCTTTC	qPCR
Human	CD34	CTACAACACCTAGTACCCTTGGA	GGTGAACACTGTGCTGATTACA	qPCR
Human	KDR	ACTTTGGAAGACAGAACCAAATTATCTC	TGGGCACCATTCCACCA	qPCR
Human	VE-Cadherin	TCACGATAACACGGCCAACA	TGGCATCCCATTGTCTGAGA	qPCR
Human	Tie2	GCTAGAGTCAACCAAGGCC	TCCAAGAAATCACAGCTGAGGA	qPCR
Human	vWF	AGTGCAGACCCAACTTACC	GTGGGGACTCTTTTGCAC	qPCR
Human	Caludin-5	CTTCCAGAATGGCAAGAGAGTGA	ACCACTGTTCTCCACTGCTCAGA	qPCR
Human	Occudin	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT	qPCR
Human	ZO-1	TGATCATTCCAGGCACTCG	CTTTCATCTCTACTCCGGAGACT	qPCR
Human	GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TAAACCACCTGTTGCTGTA	conventional PCR
Human	MDR-1	GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACAAAAATT	CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGACT	conventional PCR
Human	BCRP	TTATCCGTGGTGTGTCTGGA	CCTGCTTGAAGGCTCTATG	conventional PCR
Human	MRP-4	CCATTGAAGATCTTCTCTGG	GGTGTCAATCTGTGTGC	conventional PCR
Human	Glut-1	CCTGCAGGAGATGAAGGAAG	TGAAGAGTTCAGCCACGATG	conventional PCR

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および神経細胞を用いた *in vitro* 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

分担研究者 関野 祐子
国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

本研究では、ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた脳内移行性を包括した神経毒性評価系の構築を目指している。今年度は *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った。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

佐藤 薫

最上 由香里

干川 和枝

A. 研究目的

薬物の中枢神経への作用を考えるうえでは、血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) と神経細胞、グリア細胞をユニットとしてとらえる必要があり (Fig. 1A)、脳毛細血管、ペリサイト、アストサイト、ミクログリア、神経細胞など、関連する細胞成分を包括するオールインワン型のモデルが必要である。さらに、このオールインワン型モデルをヒト細胞に置き換え、脳内移行性を考慮した *in vitro* 神経毒性評価系を構築することで、*in vitro* 実験系における薬物の有効濃度、毒性濃度のヒト予測性が向上することが期待される。本研究では、ヒト細胞として ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞由

来分化細胞の実用を試みる。本年度は、1. *in vitro* BBB モデルのさらなる改良、2. *in vitro* 神経毒性評価系について、①ヒト iPS 細胞由来神経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、②ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた時の神経細胞特異的細胞毒性＝興奮毒性の検出能力の検証、③シナプス機能障害の定量評価法の確立を行う。これらを組み合わせることにより、ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた脳内移行性を包括した神経毒性評価系の構築が可能となる (Fig. 1B)。

B. 研究方法

1. *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
培養方法

実験にはファーマコセル株式会社のラット *in vitro* BBB キット (RBC-12, ファーマコセル社) を用いた。本キットは内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 種類の細胞で構成されている。24 well plate にトラ

ンスウェルが静置されており、トランスウェルの内面に内皮細胞、外面（24 ウェル側）にペリサイト、プレートにアストロサイトが存在し（Fig. 1B）、培養に伴い内皮細胞が BBB 様の血管内皮細胞へと成熟する。つまりトランスウェル内が血管側、プレートの well 側が脳側となる。培養方法はファーマコセル社のプロトコルに従った。ラット初代培養マイクログリア (1×10^5 cells / well) は、培養 1 日目のメディウムチェンジの際、アストロサイト（脳側）に添加し、4 日間静置培養した。BBB 機能解析はすべて培養 5 日目に行った。

TEER (Transendthelial electrical resistance) の測定法

BBB キット培養後、5 日目の TEER を Endohm 抵抗値測定装置 (World Precision Instruments) を用いて測定した。培養 5 日目のトランスウェルを Endohm 抵抗値測定装置に設置し、数値がほぼ安定する 10 秒後の電気抵抗値を記録した。

Sodium Fluorescein (Na-F)、Evans Blue Albumine (EBA) 透過実験

Na-F の移行量は細胞間隙輸送の指標、EBA の移行量は系細胞性輸送の指標とされている。血管側に Na-F および EBA を添加し、37°C、30 分間インキュベートし脳側に移行した Na-F および EBA の濃度を測定した。Na-F 濃度は Em 494 nm、Ex 521nm の蛍光値を、EBA 濃度は 570 nm の吸光度に基づいて算出した。

Tight Junction proteins (TJs)、Glutamate (L-Glu) transporter の Western Blotting

透過性試験後の BBB トランスウェルの内皮細胞をサンプルバッファ中にて溶解した。作製したサンプルを SDS-PAGE で泳動分離し、PVDF メンブレンへ転写し ZO-1, Occludin, Claudin5, GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), β -actin 選択

的 1 次抗体と共に一晩インキュベートした。HRP 標識した 2 次抗体で処置した後、LAS3000 (富士フイルム) を用いて化学発光シグナルを検出した。

L-glutamate (L-Glu) 濃度測定

5 日間培養した BBB キットの血管側・脳側の細胞培養液を回収し、Glutamate dehydrogenase (GDH) (20 U/ml), β nicotinamide adenine dinucleotide (β NAD) (2.5 mg/ml), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide yellow tetrazole (MTT) (0.25 mg/ml), Methylphenazinium methylsulfate (MPMS) (100 μ M) を含むアッセイバッファと 1 対 1 で反応させ、Stop Solution で反応停止させた後、570 nm の吸光度を測定し、既知濃度の L-Glu 溶液で作成したスタンダードカーブに基づき L-Glu 濃度を求めた。

2. 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

ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した毒性評価プロトコルの確立

細胞毒性は Propidium iodide (PI) (死細胞にとりこまれて赤色蛍光を発する色素) / Calcein (生細胞にとりこまれて緑色蛍光を発する色素) イメージング、LDH/MTT 同時測定法 (Abe and Matsuki, Neurosci Res, 38(4) 325-9, 2000) によって得られる複数パラメーターに基づき評価した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞が初代培養齧歯類神経細胞に比較して非常にはがれやすいことから、プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞の興奮毒性検出能力の検証

ヒト iPS 細胞 (253G1 株) 由来神経幹細胞塊を単一細胞に分散したのち 20 日間神経細胞に分化誘導した。iNeuron (CDI

社) を CDI 社プロトコルに従って解凍、14 日間培養した。これらのヒト iPS 細胞由来神経細胞に fura2-AM をとりこませ、AQUACOSMOS システム (Hamamatsu photonics) を用いて L-Glu に対するカルシウム応答性、および L-Glu への応答に NMDA 受容体を介した成分が含まれているかどうかについて、NMDA 受容体特異的阻害剤 AP-5 と L-Glu との共添加により検討した。同じ実験バッチのヒト iPS 細胞由来神経細胞を、齧歯類初代培養神経細胞では必ず神経細胞死を引き起こす条件である 100 μ M L-Glu に 1 時間暴露し、24 時間後に細胞毒性試験 (PI/calcein imaging、LDH/MTT 同時測定) を行った。

シナプス機能障害の定量評価化法の確立

胎生 18 日齢ウイスターラットから海馬を取り出し、既報に従い初代培養を行った (Takahashi et al., J Neurosci 23, 6586-6595, 2009)。培養 21 日目にドレブリンの免疫染色および f-actin のファロイジン染色を行った。蛍光像を CCD カメラで撮影し、定量評価法を開発した。また、グルタミン酸暴露 (100 μ M, 10 min) 後のドレブリン、アクチンのスパイン-樹状突起スパイン起始部の分布について定量評価を試みた。

C. 研究結果

1. 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

in vitro BBB モデルの成熟期間中、脳側のアストロサイトにミクログリアを 1×10^5 cells / well の密度で添加したところ、TEER の優位な上昇が起こった (Fig. 2A)。NA-F や EBA の透過性には有意な変化は認められなかった。本モデルの内皮細胞の TJs (ZO-1、Occludin、Claudin5) の発現を解析した結果、ミクログリアを添

加した BBB モデルでは、Claudin5 の発現が有意に増大することが明らかになった (Fig. 2B)。

In vitro BBB モデル指定の培地には 50 μ M の L-Glu が含有されている。培養スタート時には脳側と血管側とで同じ濃度の L-Glu が 5 日間培養後には、血管側 >> 脳側の濃度勾配ができていたことを見いだした (Fig. 2C-c1)。上記のようにミクログリアをアストロサイトに添加し、L-Glu 濃度勾配について検討したところ、血管側の L-Glu 濃度がさらに有意に上昇した (Fig. 2C-c2)。脳側濃度は変化がなかった。ミクログリア添加によってこの L-Glu 能動的排出機能が亢進された可能性がある。脳血管内皮には L-Glu トランスポーターが発現していることが報告されている (Cohen-Kashi-Malina et al., J Cereb Blood Flow Metab 32, 177-189, 2012)。そこで、本モデルの内皮細胞についても L-Glu トランスポーターである GLAST (ヒトでは EAAT1)、GLT-1 (ヒトでは EAAT2) のコントロール群での発現、およびミクログリア添加の影響についてウェスタンブロッティングで検討した。コントロール群ですでに GLAST, GLT-1 は発現しており、ミクログリアを添加することにより、その発現量が有意に上昇することが明らかとなった (Fig. 2C-c3)。

2. 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

2-1. ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した毒性評価プロトコルの確立

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 細胞由来神経細胞がこれまで 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に比較して、

非常にはがれやすいことから、プロトコルを最適化した (Fig. 3A)。細胞死評価の結果については事項参照。

2-2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の興奮毒性検出能力検証 (Fig. 3B)

Fig. 3B にしめすように、253G1 由来神経細胞は L-Glu に対して非常に弱いカルシウム応答性を示したが、NMDA 受容体成分は検出されなかった。一方、iNeuron は総じて L-Glu に対して鋭いピークを持つカルシウム応答を示したが、NMDA 受容体成分が検出されるチューブと検出されないチューブがあった (双方ともに同ロット)。NMDA 受容体成分が検出される場合は、L-Glu 応答の約 50% が NMDA 受容体成分であった。253G1 由来神経細胞に、L-Glu を適用したところ (100 μ M, 1 hr)、PI/Calcein イメージング、LDH/MTT 測定法のいずれのパラメーターでも毒性が検出されなかった。一方、NMDA 受容体成分が検出された iNeuron は上記いずれのパラメーターでも有意な細胞毒性が検出された。

2-3. シナプス機能障害の定量評価化法

樹状突起において、スパインとその起始部の樹状突起のドレブリン分布比を Fig. 4A で示す様にスパインー樹状突起比 (spine-dendrite retion: SDR) として算出することに成功した。また、L-Glu 100 μ M を 10 分間適用すると、SDR の有意な低下が見いだされ、シナプス機能障害の SDR による定量化が可能であることが示された (Fig. 4B) (Mizui et al., PLOS ONE 9(1) e85367, 2014 より抜粋)。

D. 考察

1. 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 TJs (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 TJ の代表的な構造である TJ ス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 TJ 構造が破綻することはない。Occludin と同じく、TJ ス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、TJ スランド構造が破綻することから、TJ 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 TJ 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