

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、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プ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。

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

ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導法の開発

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 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 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っ

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。