

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<sub>T</sub> (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、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  $\mu$ M Y27632 (Wako) を含む EB 形成培地 [ 50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸 (Sigma) と 450  $\mu$ 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、 $1 \times 10^6$  個の iPS 細胞と前日放射線処理した  $6 \times 10^5$  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  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml アスコルビン酸 (Sigma) と 450  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $^{\circ}$ 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<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> 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作製した。その後、メイ・グリユンワルド染色液で 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml Ascorbic acid (Sigma)、450  $\mu$ M 1-thioglycerol (MTG ; Sigma)、2 mM L-Glutamine (Life Technologies)、120  $\mu$ g/ml streptomycin および 200  $\mu$ 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  $2 \times 10^4$  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  $\mu$ M transforming growth factor (TGF)  $\beta$  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  $\mu$ 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、 $5 \times 10^4$  cells/well (48 well) の密度で 20  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> 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℃で15分反応させた後、ピペ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℃、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 µlのマトリゲル(Matrigel Matrix 2270588; BD Bioscience)溶液を加えて37℃、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、 $1 \times 10^5$  cells/wellの細胞数で播種した。37℃、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 µg/ml AlexaFluor 488 acetylated LDL(Life Technologies)を含むECGS + Heparin培地で置換し、37℃、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<sup>+</sup> 細胞または CD34<sup>-</sup> 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 時間で作用させた。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 cm<sup>2</sup> (BD Bioscience)) に、b.End3 細胞を 1×10<sup>5</sup> 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 1×10<sup>3</sup> 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。

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

#### **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  $5 \times 10^4$  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目安として経日的に 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  $5 \times 10^3$  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 ( $P_{\text{sample}}$ ) 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

$P_{\text{sample}}$  : サンプルの透過係数

$P_{\text{total}}$  : サンプルの測定値から得られる  
見かけ上の透過係数

$P_{\text{non}}$  : 無細胞時の透過係数

由来血管内皮細胞に、5  $\mu\text{M}$  cyclosporin A (CSA : Wako) または 10  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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。

## 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

## 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、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。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、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、

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、分化誘導プロトコールの更なる最適化を行った。Fig. 4a に示すプロトコールにてヒト 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  $20.1 \pm 3.3$  /cm<sup>2</sup>であった TEER は共培養 3 日目には  $30.4 \pm 3.5$  /cm<sup>2</sup>、そして共培養 5 日目には  $52.3 \pm 5.1$  /cm<sup>2</sup> 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  $27.6 \pm 2.3$  /cm<sup>2</sup> 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<sub>T</sub> (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<sub>TC</sub> (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<sub>T</sub>、結合組織型マスト細胞 (CTMC) が MC<sub>TC</sub> 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<sub>T</sub> 型マスト細胞である可能性がある。MC<sub>T</sub> 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<sub>T</sub> 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<sub>TC</sub> 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, Gfi1 and Gfi1b, 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

- 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

## 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

### 2. 実用新案登録

### 3. その他