

201406037A

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26年度 研究報告書

研究代表者 川端 健二

平成27（2015）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26年度 研究報告書

研究代表者 川端 健二

平成27（2015）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	-----	7
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	-----	32
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	-----	49
---------------------	-------	----

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、前年度までに確立した分化誘導法により得られたマスト細胞が機能的な細胞であることを確認した。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、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す、以下の結論を得た。

- (1) ヒト iPS 細胞から、脱顆粒応答能を有するマスト細胞が分化誘導可能であることが示された。
- (2) ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞の培養上清に脳血管内皮細胞への成熟化作用があることを見出し、前年度に確立したヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞の作製法をより簡便かつ安定的なものへと改良した。
- (3) 脳血管内皮細胞への成熟化作用の一部が Canonical-Wnt シグナルを介することが明らかとなった。
- (4) *in vitro* BBB モデルにミクログリアを添加することで、*in vitro* BBB モデルの成熟がより促進し、生体内に近づくこと、病態脳（脳内炎症時）の BBB 機能も反映できるようになることが明らかとなった。

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。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

皮膚由来 iPS 細胞よりも血液由来 iPS 細胞の方が血液細胞への分化能が高く、ヒト

iPS 細胞が由来する元細胞の情報を記憶していることを確認した。また、マスト細胞前駆細胞は、CD34⁺CD43⁺血液前駆細胞分画だけでなく CD34⁺CD43⁻分画にも含まれていることを示した。さらに、本分化誘導法により得られたマスト細胞は、脱顆粒応答能を有していたことから、機能的な細胞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

前年度、ラットグリオーマ細胞 (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を脳血管内皮細胞へと成熟化できることを見出した。今年度の研究において、C6 細胞の培養上清を用いて培養した場合でも、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の脳血管内皮細胞への成熟化を誘導できることが明らかとなった。この成果により、全ての工程を無血清・無フィーダー細胞条件下でヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製可能となり、作製効率と再現性に影響を与える要因をほぼ取り除くことに成功した。

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

In vitro BBB モデルにミクログリアを添加することで、*in vitro* BBB モデルの成熟がより促進し、生体内に近づくこと、病態脳

(脳内炎症時)の BBB 機能も反映できるようになることが明らかとなった。また、ミクログリアによる barrier function の制御にサイトカインとケモカインが関与していることが示された。

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

これまでに、iPS 細胞が由来する元細胞の情報を記憶しているとの報告があることから、本年度は、皮膚由来 iPS 細胞 (201B7) と血液細胞由来 iPS 細胞 (NEPB#22) を用いて、血液前駆細胞やマスト細胞への分化能の違いについて検討した。その結果、血液細胞由来 iPS 細胞を用いた方が、効率良く血液前駆細胞やマスト細胞へと分化した。以上の結果より、iPS 細胞が由来する元細胞の情報を記憶していることが本研究でも示された。

次に、ヒト iPS 細胞から EB 形成法を介して、血液前駆細胞を分化誘導した場合、CD34⁻CD43⁻、CD34⁺CD43⁻、CD34⁺CD43⁺、CD34⁻CD43⁺の 4 分画が生じることが知られている。そこで、マスト細胞前駆細胞がどの分画に含まれるのか検討した。その結果、CD34⁻CD43⁻分画や CD34⁻CD43⁺分画からは、マスト細胞は得られなかった。CD34⁻CD43⁻は非血液細胞集団、CD34⁻CD43⁺は赤芽球集団と考えられているため、このような結果がえられたものと

推測される。また、CD34⁺CD43⁺は血液前駆細胞が含まれる分画と考えられており、実際、CD34⁺CD43⁺分画からはマスト細胞が多く得られた。さらに、CD34⁺CD43⁻分画からもマスト細胞コロニーが出現した。CD34⁺CD43⁻分画には血管内皮細胞と血液細胞の共通の前駆細胞分画であるヘマンジオブラストが含まれているため、CD34⁺CD43⁻分画からもマスト細胞様コロニーが生じたと考えられる。

ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 薬物毒性評価系の構築に向け、本年度は、iPS 細胞由来マスト細胞の脱顆粒応答能について検討した。その結果、iPS 細胞由来マスト細胞は IgE 架橋により脱顆粒応答性を示したことから、本分化誘導法により得られたマスト細胞は機能的なマスト細胞であることが示された。今後は、*in vitro* 薬物毒性評価系の構築に向け、iPS 細胞由来マスト細胞を用いて、毒性を有する薬物を作用することで、脱顆粒応答が生じるか否か検討していく必要がある。

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

前年度に確立したヒト iPS 細胞由来の脳血管内皮細胞の作製法は、C6 細胞との共培養により hiPSECs を脳血管内皮細胞へと成熟化させる方法であるため、脳血管内皮細胞の作製効率が C6 細胞の状態に影響されるという問題が残されていた。今年度の研究成果より、C6CM を用いて培養した場合でも、C6 細胞との共培養した場合と同様に hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化を誘導できることが示され、hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化が C6 細胞の状態に左右されるという懸念が解決されただけでなく、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製にあたり、全ての工程を無血清・無フィーダー細胞条件下で行うことが可能となり、脳血管内皮細胞の作製効率と再現性に影響を与える要因がほぼ取り除くことに成功した。現在知られているヒト由来脳血管内皮細胞は、量的確保が困難である、あるいは作製効率が不安定という問題を抱えており、それがヒト血液—脳関門モデル等の創薬基盤として重要な培養モデル作製の障害であった。本研究により確立されたヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製法は、上記問題点が全て解決された方法であり、今後の創薬研究における高い汎用性と幅広い応用性が期待される。

hiPSECs から脳血管内皮細胞への成熟化が、C6CM を用いた培養でも確認された

ことから、C6 細胞由来の液性因子がヒト脳血管内皮細胞の成熟化を促進することが示された。今年度の研究では、ヒト脳血管内皮細胞の成熟化を制御する分子基盤の解明ならびにヒト脳血管内皮細胞の高効率作製法の開発を目指すため、さらに、C6 細胞由来の成熟化促進因子の探索を行った。これまでに Wnt-7a および Wnt-7b による Canonical-Wnt 経路の活性化がマウス脳内における血管形成に極めて重要であることが報告されているが、ヒト脳血管内皮細胞の成熟化にも関与するのかは不明なままであった。本研究により、脳血管内皮細胞の成熟化において、Canonical-Wnt シグナルがヒトでも機能していることが明らかとなった。一方で、阻害物質存在下でも C6CM による脳血管内皮細胞への成熟化作用が顕著にみとめられたことから、本作用では中核的ではなく補助的に働いていることが示唆された。また、Wnt-5a による Non-canonical Wnt 経路の活性化がヒト脳血管内皮細胞株におけるタイトジャンクション形成の亢進に関与することが報告されていたため、Wnt-5a を hiPSECs へ作用させたが、タイトジャンクション形成能の亢進はみられなかった。この結果は、C6CM による脳血管内皮細胞の成熟化作用に Non-canonical-Wnt シグナルは関与しないことを示している。近年、マウスやラットを用いた実験から、脳血管内皮細胞の成熟化に関与する液性因子として、Shh、TGF- β

などが報告されたが、これら液性因子もヒトで同等の機能を有するのかは不明である。今後、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の高効率作製法の開発のため、それら因子の成熟化への関与の検証ならびに C6 細胞由来液性因子の同定を行う必要がある。

本研究で確立されたヒト iPS 細胞由来の脳血管内皮細胞の作製法は、生体内における脳血管内皮細胞の発生過程を模倣したシンプルかつ安定的な方法であることから、今後のヒト由来脳血管内皮細胞作製のプラットフォームとなり得る。その裏では、脳血管内皮細胞の作製効率が低い、成熟化した脳血管内皮細胞の長期的な維持が困難である、といった問題がまだ残されている。本研究では、アストロサイト様の性質を有する C6 細胞のみに着目して研究を行ってきた。しかし、脳内の血管内皮細胞の周囲にはアストロサイトの他に、ペリサイト、ミクログリア、神経細胞など多種の細胞が近接して存在している。今後、上記の問題を解決するため、C6 細胞に加えてそれら脳構成細胞を混合して培養することも必要であると考えられる。

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

本実験では、既存の in vitro BBB キットを基盤とし、in vitro BBB モデルの脳側にミクログリアを添加することにより、より

生体内に近い in vitro BBB モデルの構築を目指した。これまでに、LPS で刺激をしたミクログリアは BBB 機能を抑制し、血管内皮細胞に発現しているグルタミン酸トランスporter機能を低下させること、LPS 等で刺激をしていないミクログリアが BBB 成熟を促進し、グルタミン酸トランスporter機能を増大させることを見いだした。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 BBB バリア機能を制御していることが示唆される。そこで、本モデルの脳側培養上清を採取し、網羅的サイトカイン・ケモカイン解析（27 種類）を行った。LPS 刺激をしたミクログリアが含まれた BBB キットの脳側のメディウムでは、16 種のサイトカイン・ケモカインの産生が有意に増大していることが明らかになった。これらのサイトカイン、ケモカインのうち、L-1 alpha, IL-1beta, IL-17a, MIP-2 IL-6, MCP-1, IP-10, GRO KC CINC-1, RANTES については、BBB のバリア機能を低下させるという多くの報告があり、LPS で活性化したミクログリアからこれらの炎症性サイトカイン、ケモカインが産生された結果、BBB のバリア機能が低下したと考えられる。

一方、LPS 等で刺激をしていないミクログリアが含まれた BBB キットの脳側のメディウムにおいて、IL-5, MCP-1, IP-10, VEGF, GRO KC CINC, LIX, MIP-2 の産生が

増大し、一方、Fractalkine の産生が抑制していた。VEGF はペリサイトやアストロサイトから産生され、血管新生を制御することがよく知られており、今後、ミクログリアを添加したことによる VEGF の産生メカニズムおよび、BBB バリア機能の増大との関連性を検討する必要がある。IL-17a, MCP-1, IP-10, CXCL-1, RANTES については BBB のバリア機能を低下するという報告があるが、ミクログリア添加により増大した濃度が少ないことから、低濃度領域におけるこれらのサイトカイン・ケモカインは、BBB のバリア機能を促進する可能性も考えられる。Fractalkine の濃度が刺激をしていないミクログリア添加群で有意に減少することが明らかになった。Fractalkine の受容体 CX3CR1 は中枢神経系においてミクログリアにのみ特異的に発現していることから、Fractalkine の濃度調節にミクログリアが関与している可能性が高い。また、刺激をしていないミクログリア添加による barrier function の変化と Fractalkine の濃度変化との関連に興味を持たれる。

また、これらのサイトカイン・ケモカインの濃度変化が L-Glu トランスポーター発現に及ぼす影響についても今後検討の必要がある。

以上の結果から、in vitro BBB モデルにミクログリアを添加することで、in vitro BBB モデルの成熟がより促進し、生体内に近づくこと、病態脳（脳内炎症時）の BBB 機

能も反映できるようになることがわかった。さらに、このミクログリアの影響はそれぞれの条件において異なる組み合わせ・濃度のサイトカイン・ケモカインが関与していることが示された。従って、本モデルが、健常脳から病態脳まで網羅したモデルとなり得ることが示唆された。

E. 結論

- ・ ヒト iPS 細胞から、脱顆粒応答能を有するマスト細胞が分化誘導可能であることが示された。
- ・ ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞の培養上清に脳血管内皮細胞への成熟化作用があることを見出し、前年度に確立したヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞の作製法をより簡便かつ安定的なものへと改良した。
- ・ 脳血管内皮細胞への成熟化作用の一部が Canonical-Wnt シグナルを介することが明らかとなった。
- ・ in vitro BBB モデルにミクログリアを添加することで健常脳から病態脳まで網羅したモデルとなり得ることが示唆された。また、ミクログリアによる barrier function の制御にサイトカイン、ケモカインが関与していることが示された。

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、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、(1) 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 26 年度は、皮膚由来 iPS 細胞よりも血液由来 iPS 細胞の方が血液細胞への分化能が高く、ヒト iPS 細胞が由来する元細胞の情報を記憶していることを確認した。また、マスト細胞前駆細胞は、CD34⁺CD43⁺血液前駆細胞分画だけでなく CD34⁺CD43⁻分画にも含まれていることを示した。さらに、本分化誘導法により得られたマスト細胞は、脱顆粒応答能を有していたことから、機能的な細胞であることが示された。

ヒト細胞で構成された *in vitro* 血液脳関門モデル (BBB) の構築へ向け、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製法の開発を進めている。前年度、ラットグリオーマ細胞 (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を脳血管内皮細胞へと成熟化できることを見出した。今年度の研究において、C6 細胞の培養上清を用いて培養した場合でも、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の脳血管内皮細胞への成熟化を誘導できることが明らかとなった。この成果により、全ての工程を無血清・無フィーダー細胞条件下でヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製可能となり、作製効率と再現性に影響を与える要因をほぼ取り除くことに成功した。

研究協力者

岡田淳雅 (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 26 年度は、ヒト iPS 細胞由来マスト細胞の機能評価および皮膚あるいは血液由来ヒト iPS 細胞を用いて、マスト細胞への分化効率について検討した。また、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製では、前年度に確立したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳血管内皮細胞へ分化誘導条件をさらに検討し、より簡便かつ安定な作製法の確立を試みた。

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) およびヒト末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞である NEPB#22 (筑波大学、須磨崎亮教授から供与) 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 処理済みのマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF, Millipore) 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 Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632; 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 Systems)、10 ng/ml bone morphogenic protein 4 (BMP4) (R&D Systems)、10 μ M ROCK inhibitor 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)、10 ng/ml BMP4 および 5 ng/ml vascular endothelial growth factor (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)、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 μ M transforming growth factor (TGF) β inhibitor (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、10 ng/ml stem cell factor (SCF; Peprotech)、10 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 (Fig. 1a)。

B-1-3. セルソーターを用いた細胞分離

培養 8-10 日目の EB を回収し、0.25% trypsin/EDTA (Life Technologies) を加えて 37°C で 5 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 4°C、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 (Fig. 1a)。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 (Fig. 1b) をピックアップし、以降の検討に用いた。

B-1-5. 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-1-6. 脱顆粒応答

iPS 細胞由来マスト細胞に 1 µg/ml HumanIgE purified (Millipore) を 24 時間作用した。その後、細胞を回収し、HEPES Buffer で洗浄後、0 µg/ml、1 µg/ml または 3 µg/ml Polyclonal rabbit anti-Human IgE antibody (Dako) を 37 °C で 30 分間反応させた。培養上清を空のチューブに回収後、細胞に Lysis Buffer (HEPES / 0.5% Triton X-100) を添加し氷上で 10 分間静置して細胞溶解液を得た。培養上清あるいは細胞溶解液に基質溶液 (0.04M クエン酸緩衝液 (pH 4.5)) を加え、37 °C で 60 分間反応させた。反応溶液に Stop Buffer (0.4M Glycine (pH 10.7)) を加えて反応停止後、655 nm の吸光度を参考波長として 405 nm の吸光度をプレートリーダー (マイクロプレート

リーダー ; Tecan) で測定した。IgE の架橋 (≡ 抗原刺激) により遊離した β -hexosaminidase の遊離率は以下の計算式で算出した。

$$\beta\text{-hexaminidase 遊離率 (\%)} \\ = (\text{刺激により遊離した } \beta\text{-hexaminidase 量} \cdot \text{自然遊離量}) / (\text{細胞内全 } \beta\text{-hexaminidase 量} \cdot \text{自然遊離率}) \times 100$$

B-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

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 bFGF を含む ReproStem 培地 (ReproCELL) を用いて、Mitomycin C 処理済の MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株は 4-5 日ごとに、コロニーピックアップ、または dispase 処理 (0.1 mg/ml, Roche) により継代した。

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次の方法で行った。細胞剥離液である Accutase を用いて単一細胞へ解離したヒト iPS 細胞を、BMP4 (20 ng/mL)、Activin A (2 ng/mL)、ROCK inhibitor (10 μ M)、を含む StemPro-34 培地に懸濁後、Lipidure-Coat U-bottom 96-well plate (Thermo Scientific) に 2×10^4 cells/well

の密度で細胞を播種し EB を形成させた。なお、StemPro-34 培地の組成は、StemPro-34 Nutrient Supplement (Life Technologies)、Ascorbic acid (50 μ g/mL, Sigma)、MTG (450 μ M)、L-Glutamine (2 mM)、streptomycin (120 μ g/ml, Life Technologies) および penicillin (200 μ g/ml, Life Technologies) を含む StemPro-34 SFM (Life Technologies) である。2 日間培養後、中胚葉へと分化させるために BMP4 (20 ng/mL) および VEGF (5 ng/mL) を含む StemPro-34 培地に置換しさらに 2 日間培養し、培養 4 日目に BMP4 (20 ng/mL)、VEGF (5 ng/mL) および SB431542 (5 μ M) 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、VEGF (20 ng/mL)、FGF2 (2 ng/mL) および SB431542 (5 mM) を含む StemPro-34 培地で置換し、3 日間 (培養 9 日間まで) petri dish 上で培養した後、CD34 陽性な血管内皮細胞をセルソーター (SH800, SONY) により分離した。

B-2-3. C6 細胞の培養および C6 細胞培養上清の調製

C6 細胞 (JCRB 細胞バンクから供与) は horse serum (15%, ニチレイバイオサイエンス)、fetal bovine serum (FBS; 2.5%, Life Technologies) 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

solution (Life Technologies) を用いて継代した。なお、上記培地には streptomycin および penicillin を加えてある。C6 細胞の培養上清は次の方法で調製した。C6 細胞を 100 mm 培養 dish へ播種し、80%コンフルエントまで増殖させ、その後 StemPro-34 培地 (8 mL/dish) で置換した。24 時間後に上清を回収し、フィルター濾過後 (0.22 μ m)、使用時まで -80°C で保存した。なお、凍結した培地を使用直前に解凍し、C6 細胞培養上清として用いた。

B-2-4. ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞の脳血管内皮細胞への成熟化

セルソーターにより CD34 陽性細胞として分離したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞 (hiPSECs) を Endothelial cells growth supplement (ECGS; 100 ng/mL, Sigma)、Heparin (100 ng/mL, Sigma) および FGF2 (20 ng/mL) を含む StemPro-34 培地 (ECGS + Heparin 培地) に懸濁後、Fibronectin (20 μ g/cm², BD) をコートした cell culture insert (pore size 0.4 μ m, Membrane area 0.3 cm², BD) に、5 x 10⁴ cells/insert の細胞密度で播種した。plate 側の培地は、各 insert に播種した細胞と同じ培地 (ECGS + Heparin 培地) を加えた。その後、2 日ごとに培地を置換しながら接着培養を行い、hiPSECs をコンフルエントになるまで増殖させた (上記の細胞密度で hiPSECs を insert 上へ播種した場合、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)。hiPSECs を播種して 3 日後に、C6 細胞を 5 x 10³ cells/well の密度で 24-well plate 内へ播種した。翌日、C6 細胞の培地を ECGS + Heparin 培地で置換後、コンフルエントの hiPSECs が接着している insert を C6 細胞が播種された well へ移して共培養を行い、脳血管内皮細胞へと成熟化させた。なお、脳血管内皮細胞への成熟化は、後述の電気抵抗値測定 (B-5)、遺伝子発現解析 (B-6) および物質透過性測定 (B-7, B-8) によりモニタリングした。また、C6 細胞の培養上清を用いる場合は、C6 細胞を培養した well 側の培地を培養上清で置換して実験を行った。

B-2-5. 電気抵抗値 (Trans Endothelial Electric Resistance; TEER) の測定

Millicell ERS-2 (Millipore) を用いて insert 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-2-6. 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 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、リアルタイム PCR システム (StepOne Plus; Life Technologies) を用いて定量化した。半定量的 PCR を行う場合は、cDNA を ExTaq HS polymerase (TakaRa) にて増幅し、アガロースゲルを用いて電気泳動した後に、EtBr 染色により検出した。

B-2-7. デキストランを用いた物質透過性の評価

FBS を終濃度 0.1% となるように添加した Endothelial Cell Basal Medium (EBM-PRF; Lonza) (0.1%FBS/EBM-PRF) で Fluorescein 標識 Dextran (FD; M.W. 3000, Life Technologies) を 100 µg/ml となるように溶解し FD 溶液を調製した。hiPSECs を接着培養している insert 内の培地を FD 溶液で置換し、well 側の培地を FD 不含の 0.1%FBS/EBM-PRF で置換した。15 時間培養後、well 側の培地を懸濁した後に回収し、insert 側から well 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)。なお、FD 段階希釈溶液を用いて作成した検量線

を基に回収した溶液中の FD 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の通りである。

- insert から well 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 well 側の FD 濃度

A_L : insert 内の FD 初濃度

V_A : well 側の培地の容積

S : insert の表面積

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-2-8. 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 hiPSECs に、Cyclosporin A (CSA; 5 µM, Wako) または MK571 (10 µM, 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、Rhodamine-123

(10 uM, 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 nm、蛍光波長; 530 nm）。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 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-2-9. Dickkopf-1 (DKK1)、XAV939 を添加したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の培養

hiPSECs の培養および脳血管内皮細胞への成熟化は、B-5.に記載した通りに行った。Canonical-Wnt シグナルの関与を検討するため、同経路の阻害タンパク質である human DKK1 (200 ng/mL, Peprotech) および阻害剤である XAV939 (10 uM, Sigma)を含む培地を調製し、insert 内の培地と置換して hiPSECs を培養した。この際、well 側には C6 細胞の培養上清を加えて培養した。培地交換は 2 日置きに行った。

B-2-10. Wnt-5a を添加したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の培養

hiPSECs の培養および脳血管内皮細胞への成熟化は、B-5.に記載した通りに行った。Non-canonical-Wnt シグナルの関与を検討するため、同経路リガンドである mouse Wnt-5a (100 ng/mL, R&D) を含む

培地を調製し、insert 上の培地と置換した。この際、well 側には ECGS + Heparin 培地を加えて培養した。培地交換は 2 日置きに行った。

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

これまでに、iPS 細胞が由来する元細胞の情報を記憶しているとの報告があることから、皮膚由来 iPS 細胞 (201B7) と血液細胞由来 iPS 細胞 (NEPB#22) を用いて、血液前駆細胞およびマスト細胞への分化能の違いについて検討した。まず、EB 形成法を介して、血液前駆細胞を分化誘導した結果、201B7 と比較し、NEPB#22 の方が $CD34^+CD43^+$ 血液前駆細胞の割合が高かった (Fig. 1b)。次に、 $CD34^+CD43^+$ 血液前駆細胞を、 1×10^4 cells/well で 24-well Low binding プレートに播種し、6 週間後にコロニー数をカウントした。その結果、201B7 と比較し、NEPB#22 でより多くのコロニーが観察された (data not shown)。以上の結果から、皮膚由来 iPS 細胞よりも血液細胞由来 iPS 細胞の方が、血液前駆細胞およびマスト細胞への分化能が高いことが示された。

EB 形成法により、血液前駆細胞を分化誘導した場合、 $CD34^-CD43^-$ 、 $CD34^+CD43^-$ 、 $CD34^+CD43^+$ 、 $CD34^-CD43^+$ の 4 分画が生じる。そこで、それぞれの分画をメチルセルロース中で培養することで、マスト細胞前駆細胞がどの分画に含まれるのか検討した。その結果、 $CD34^-CD43^-$ および

$CD34^+CD43^+$ 分画からは、コロニーが生じなかった (Fig. 1d)。一方、 $CD34^+CD43^-$ 血液前駆細胞および $CD34^+CD43^-$ 分画からは、マスト細胞様コロニーが出現した (Fig. 1d)。なお、 $CD34^+CD43^+$ 分画では、 $CD34^+CD43^-$ 分画と比較し、より多くのコロニーが得られた。以上の結果から、マスト細胞前駆細胞は、 $CD34^+CD43^+$ 分画だけでなく $CD34^+CD43^-$ 分画にも含まれていることが示された。

次に、 $CD34^+CD43^+$ 分画および $CD34^+CD43^-$ 分画から生じたマスト細胞様コロニーについて、マスト細胞マーカー (tryptase、CPA など) の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。その結果、CPA や chymase などのマスト細胞特異的酵素の発現が $CD34^+CD43^-$ 分画由来マスト細胞よりも $CD34^+CD43^+$ 分画由来マスト細胞で高かった (Fig. 2)。以上の結果から、 $CD34^+CD43^-$ 分画由来マスト細胞は、 $CD34^+CD43^+$ 分画由来マスト細胞と比較し、未熟であることが示唆された。

マスト細胞は、IgE に対する高親和性受容体 $Fc\epsilon RI$ を発現しており、IgE を介して多様な抗原を認識可能である。IgE を介して抗原が $Fc\epsilon RI$ を架橋することにより、細胞内に蓄積しているヒスタミンなどの炎症性メディエーターを放出 (脱顆粒) することが知られている。そこで、本年度は、脱顆粒応答能を検討することにより、ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞が機

能的な細胞であることを確認した。ヒト iPS 細胞由来マスト細胞に IgE を作用させることで、まずマスト細胞上の高親和性 IgE 受容体である FcεRI に結合させた。その後、抗 IgE 抗体を加えることで、FcεRI を架橋することで、脱顆粒応答能の測定を試みた。その結果、抗 IgE 抗体を加えることで、濃度依存的な脱顆粒応答能が観察された (Fig. 3)。以上の結果から、本分化誘導法により得られた iPS 細胞由来マスト細胞は、機能的な細胞であることが示された。

C・2. ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導法の確立

C・2-1. C6 細胞培養上清によるヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞 (hiPSECs) の脳血管内皮細胞への成熟化促進作用

昨年度の研究において、ラットグリオーマ C6 細胞と共培養した hiPSECs が脳血管内皮細胞様の性質を獲得することを報告した。しかし、共培養系による細胞の分化誘導法では、分化誘導効率が共培養に用いる細胞の状態に依存するため、脳血管内皮細胞を安定的に作製できないことが懸念される。本分化誘導法では、C6 細胞と hiPSECs との間に物理的な接触がないことから、C6 細胞由来の液性因子が脳血管内皮細胞への成熟化に関与することが示唆されている。そこで本年度は、現在の分化誘導法をより安定なものへ改良するため、C6 細胞との共培養を C6 細胞の培養上清

(conditioned medium; CM) (C6CM) で代用可能か検討した。

C6 細胞と共培養した hiPSECs (hiPSEC-C6) を比較対照とし、C6 細胞の培養上清を用いて培養した hiPSECs (hiPSEC-C6CM) のタイトジャンクション形成能について、TEER 値測定、FD 透過量測定およびタイトジャンクション関連遺伝子の発現解析により検証した。その結果、hiPSEC-C6CM では、hiPSEC-C6 と同程度の TEER 値の増加および FD 透過量の低下がみられた (Fig. 4a, 4b)。また hiPSEC-C6CM におけるタイトジャンクション関連遺伝子 (Claudin-5, Occludin, ZO-1) の発現も hiPSEC-C6 と同程度まで増加していることから (Fig. 4c)、C6CM 暴露により hiPSEC のタイトジャンクション形成が強固になっていることが示された。脳血管内皮細胞特有なトランスポーター遺伝子の発現を解析した結果、hiPSEC-C6CM では、全てのトランスポーター遺伝子が hiPSEC-C6 と同程度に発現していることが明らかとなった (Fig. 4d)。また、Rhodamin-123 を用いた物質透過性実験により P-gp が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. 4e)。さらに、C6CM の割合を 100、50、25、0 % と変化させて hiPSECs を培養したところ、C6CM の濃度依存的な TEER 値の上昇および FD 透過量の低下がみとめられた (Fig. 5)。以上の結果より、C6CM

は脳血管内皮細胞への成熟化促進作用を有すること、そしてその作用が C6 細胞と共培養した場合と同程度であることが明らかとなり、hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化誘導において、“C6 細胞との共培養”を“C6CM を用いた培養”で置換できることが示された。

C-2-2. C6 細胞由来の脳血管内皮細胞への成熟化促進因子の探索

前項の結果から、C6 細胞由来の液性因子が hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化を促進させることが明らかとなった。次に、より再現性の高いヒト脳血管内皮細胞の作製法の確立およびその脳血管内皮細胞への成熟化機構の解明を目的として、脳血管内皮細胞への成熟化因子の探索を行った。

マウスを用いた研究から、脳内における血管形成には Wnt シグナル、特に Wnt-7a および Wnt-7b が関与することが報告されている。そこで、C6CM による hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化作用に Wnt-7a および Wnt-7b が関与するのか検討した。C6 細胞における Wnt-7a 遺伝子および Wnt-7b 遺伝子の発現を解析した結果、両遺伝子ともに C6 細胞に発現していることが明らかとなった (Fig. 6a)。Wnt シグナル経路には β -catenin 依存的な Canonical-Wnt 経路と、 β -catenin 非依存的な Non-canonical-Wnt 経路が存在する。Wnt-7a および Wnt-7b は Canonical-Wnt

経路を活性化することが知られている。そこで、hiPSEC-C6CM において、Canonical-Wnt 経路が活性化されているか検討するため、 β -catenin の標的遺伝子である Axin-2 の発現を解析した。その結果、hiPSEC-mono と比較し、hiPSEC-C6CM では Axin-2 遺伝子の発現が上昇していた (Fig. 6b)。次に Canonical-Wnt 経路の阻害タンパク質である DKK1 を添加し、Canonical-Wnt シグナルの脳血管内皮細胞への成熟化への関与を検討した。その結果、DKK1 の添加により、hiPSEC-C6CM の TEER 値の低下ならびに FD 透過量の増加がみられたが、両者ともわずかな変化であり、依然として hiPSEC-mono における TEER 値および FD 透過量との差は有意なものであった (Fig. 6c, 6d)。また、DKK1 と作用機序が異なる Canonical-Wnt 経路の阻害剤 XAV939 を添加した場合でも、DKK1 添加した場合と同様の結果となった (Fig. 6c, 6d)。以上の結果から、Canonical-Wnt シグナルはヒト脳血管内皮細胞の成熟化にも関与し、C6CM による脳血管内皮細胞への成熟化作用の一部として Canonical-Wnt シグナルが機能していることが明らかとなった。

近年、Non-canonical-Wnt 経路を活性化する Wnt-5a がヒト脳血管内皮細胞株のタイトジャンクション形成に関与することが報告された。そこで Wnt-5a が C6CM による脳血管内皮細胞への成熟化に関与するの