

か検討した。その結果、Wnt-5a 遺伝子が C6 細胞に発現していること (Fig. 7a)、hiPSEC-mono および hiPSEC-C6CM の両者において Wnt-5a の受容体である Ror2、Fzd-4、Lrp-5 の各遺伝子が発現していることが明らかとなった (Fig. 7b)。また、Wnt-5a を作用させた hiPSECs におけるタイトジャンクション形成能を検討したところ、Wnt-5a の添加による TEER 値の上昇および FD 透過量の低下はみられず、Wnt-5a の作用では、hiPSECs のタイトジャンクション形成能は亢進されなかった (Fig. 7c, 7d)。以上の結果より、Non-canonical-Wnt シグナルはヒト脳血管内皮細胞の成熟化には寄与しないことが示唆された。

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

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、このような結果が得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 細胞から脳特異的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 (Fig. 4, 5)、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 (Fig. 8)、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 BBB 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 (Fig. 7c, 7d)。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。

E. 結論

本手法により、ヒト iPS 細胞由来血液前駆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。

また、ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞の作

製については、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。また、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。

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作製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. Tashiro K, Hirata N, Okada A, Yamaguchi T, Takayama K, Mizuguchi H, Kawabata K. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor separates hematopoietic and cardiac progenitor cells in Flk1-expressing mesoderm. *Stem Cells Transl Med.*, in press.
2. Okada A, Tashiro K, Yamaguchi T, Kawabata K. Selective differentiation into hematopoietic and cardiac cells from pluripotent stem cells based on the expression of cell surface markers. *Springer Protocol Methods in Molecular Biology ES Cells: Methods and Protocols-2nd Edition.*, in press.
3. Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R,

- Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
4. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-x_L mutant gene. *Cell Transplant.*, in press
 5. Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, Furue MK, Mizuguchi H. HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin. *PLoS One*. 3: e90791 (2014)
 6. Tashiro K, Nonaka A, Hirata N, Yamaguchi T, Mizuguchi H, Kawabata K. Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow. *Stem Cells Dev.*, 18: 2202-10 (2014)
 7. 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.*, 1: 81-6 (2014)
- ## 2. 学会発表
- 1 岡田淳雅、田代克久、山口朋子、平田信恵、菊池愛子、水口裕之、川端健二: CAR は Flk1 陽性中胚葉細胞から血液・心筋前駆細胞を分離可能な新規細胞表面分子である; 第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 14-18 日
 - 2 池田由美、山口朋子、田代克久、岡田淳雅、大川恭行、川端健二: 骨髄由来マスト細胞から各マスト細胞サブクラスへの分化誘導とサブクラス特異的因子の探索; 第 64 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2014 年 10 月 11 日
 - 3 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Haruka Minami, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of human iPS cell-derived endothelial cells into brain endothelial cells for establishment of *in vitro* blood brain barrier model; International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, June, 2014
 - 4 池田由美、山口朋子、田代克久、大川恭行、川端健二: マスト細胞関連疾患に対する創薬ツールとしての各種マスト細胞サブセットの分化誘導法の確立; 第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、名古屋、2014 年 5 月 23-24 日
 - 5 山口朋子、平林玲子、田代克久、岡田淳雅、水口裕之、川端健二: ヒト ES/iPS 細胞から皮膚型/粘膜型マスト細胞への

分化誘導; 第15回 Pharmaco-Hematology
シンポジウム、名古屋、2014年5月23-24
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

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

出願番号：特願 2014-038105

出願日：平成 26 年 2 月 28 日

2. 実用新案登録

3. その他

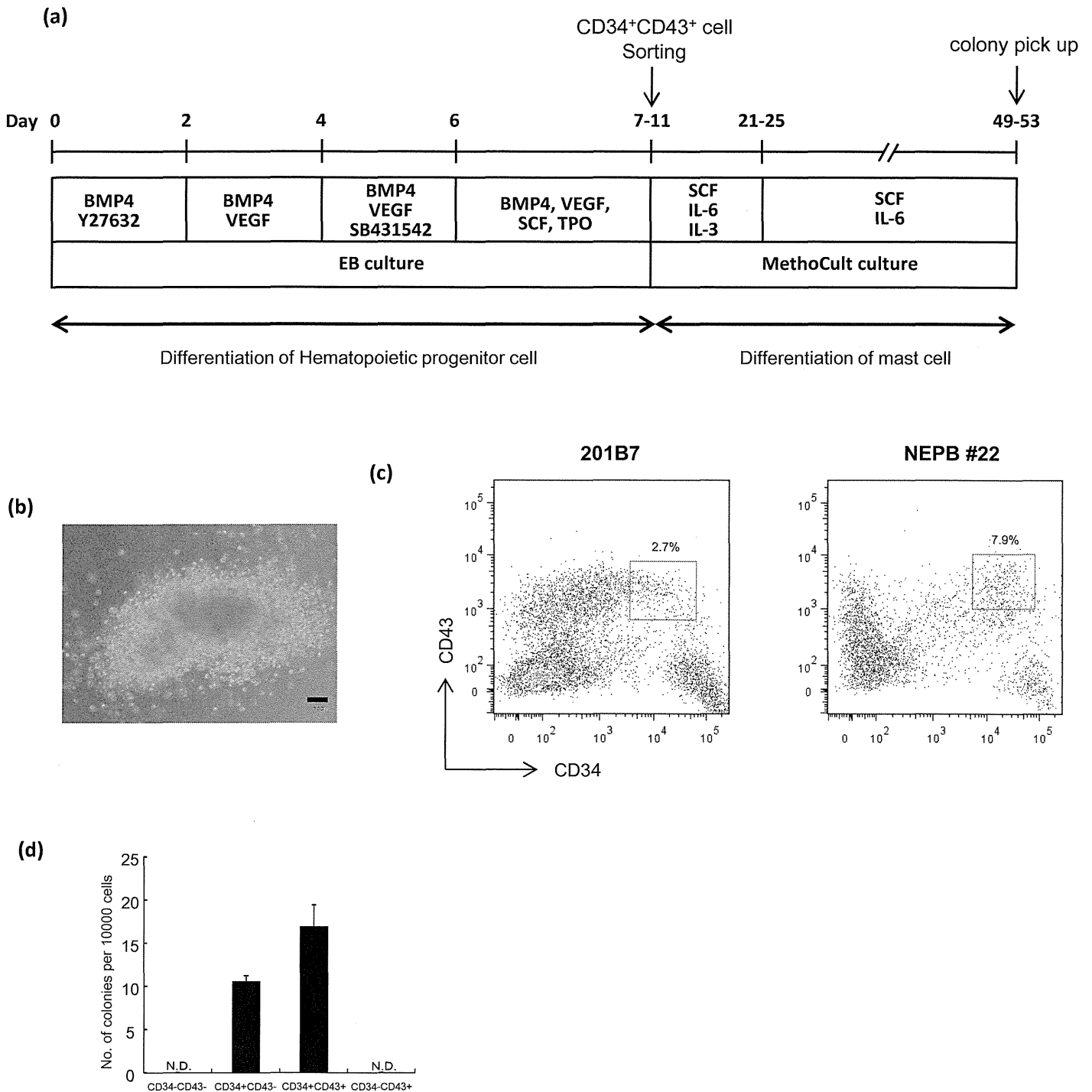


Figure 1 Differentiation of mast cell-like cells from human iPSCs.

(a) The protocol of the generation of mast cell-like cells from human iPSCs. (b) A typical mast cell colony grown at 6 weeks culture from iPS cell-derived CD34⁺CD43⁺hematopoietic progenitor cells. (c) The proportion of CD34⁺CD43⁺ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry. (d) The number of mast cell-like colony from iPS cell-derived CD34⁻CD43⁻, CD34⁺CD43⁻, CD34⁺CD43⁺, and CD34⁻CD43⁺ cells.

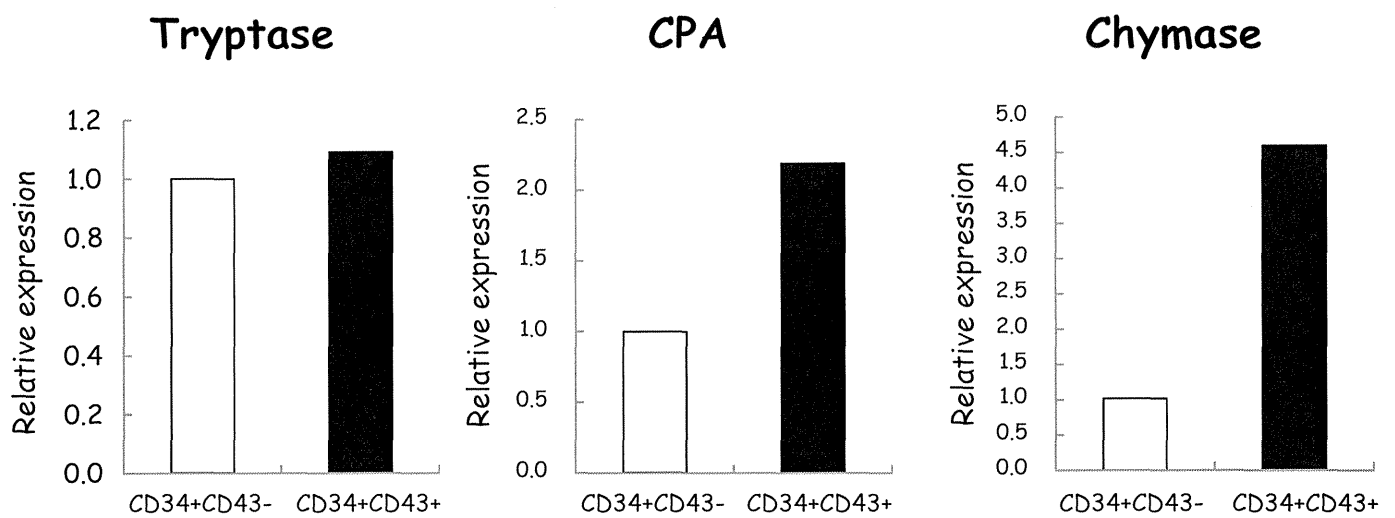


Figure 2 Characterization of CD34+-derived mast cells.

The expression of tryptase, CPA and chymase mRNA was examined in CD34+CD43- -derived mast cells and CD34+CD43+ -derived mast cells by qRT-PCR analysis.

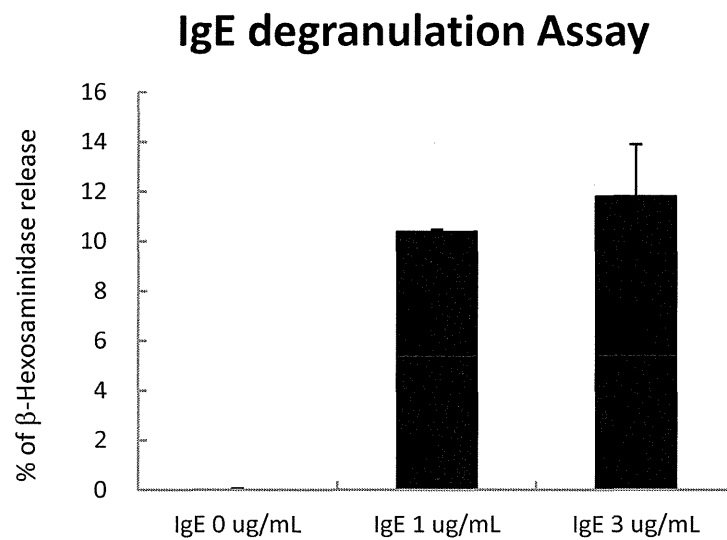


Figure 3 β -hexosaminidase release from iPS cell-derived mast cells after stimulation with IgE. The exocytotic response was determined by measuring the release of β -hexosaminidase. iPS cell-derived mast cells were sensitized with IgE and stimulation with anti-IgE antibody. β -hexosaminidase enzymatic activity was measured in supernatants and cell pellets solubilized with 0.5% Tryton X-100 in HEPES buffer.

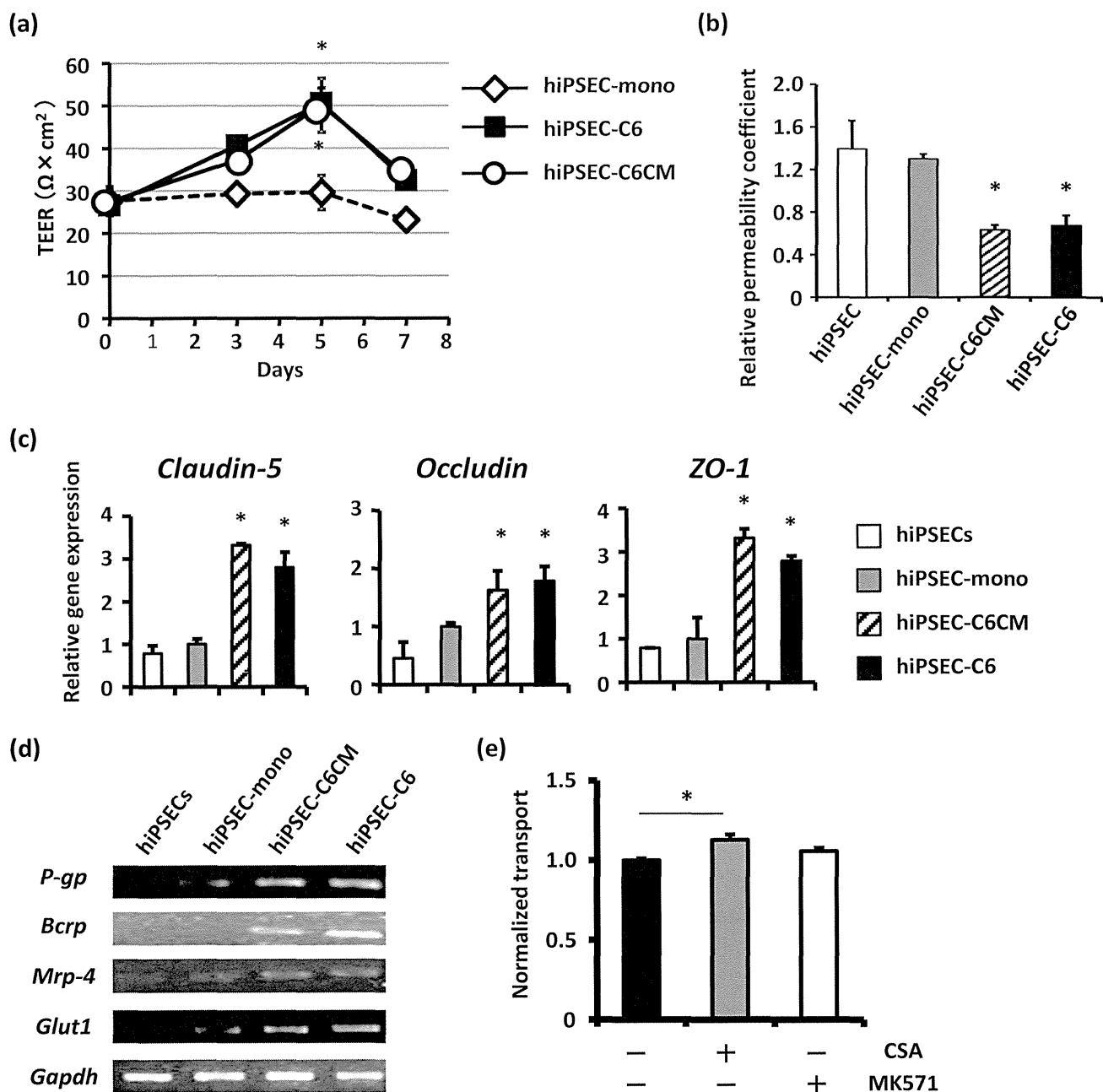


Figure 4 Induction of brain endothelial cell properties of hiPSECs by treatment with C6CM.

(a) hiPSEC monolayers were transferred onto non-cell culture (hiPSEC-mono), C6-cell culture (hiPSEC-C6) or C6CM (hiPSEC-C6CM) in 24-well plates. Then, the TEER value of each hiPSECs monolayer was measured at indicated days. (b) The permeability coefficient for FD was measured in hiPSECs before (hiPSECs) and after 5-day mono-culture (hiPSEC-mono), 5-day co-culture with C6 cells (hiPSEC-C6) or 5-day culture in C6CM (hiPSEC-C6CM). (c) Expressions of tight junction-related genes (*Claudin-5*, *Occludin* and *ZO-1*) were examined in hiPSECs, hiPSEC-mono, hiPSEC-C6 and hiPSEC-C6CM. (d) Expressions of transporter genes (*P-gp*, *Bcrp*, *Mrp-4* and *Glut1*) were examined in hiPSECs, hiPSEC-mono, hiPSEC-C6 and hiPSEC-C6CM by RT-PCR analysis. (e) The hiPSEC-C6 was treated with CSA or MK571, and then the permeability coefficient for Rhodamin 123 was investigated in them. All results shown are the mean of three independent experiments with the indicated standard deviations (S.D.). * $p < 0.05$.

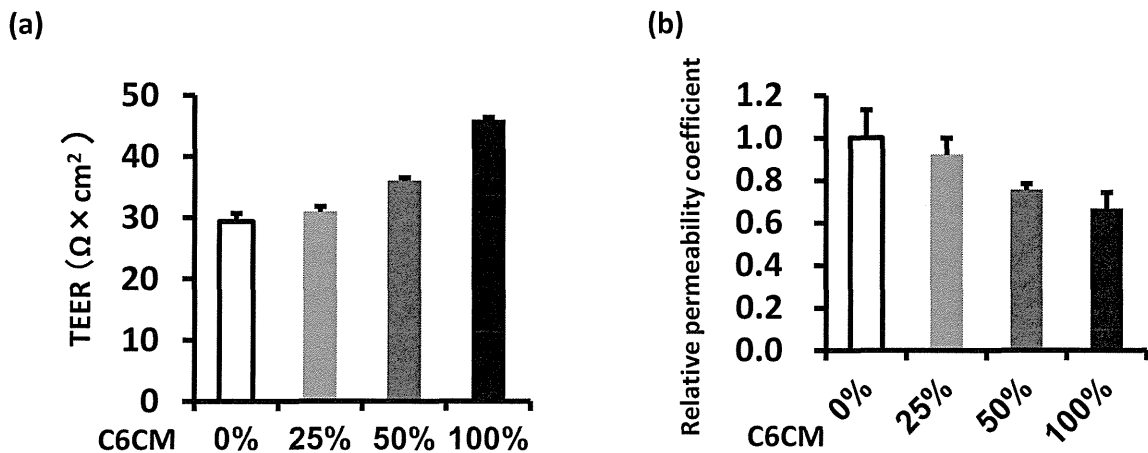


Figure 5 Dose-dependent effects of C6CM on induction of brain endothelial cell properties of hiPSECs.

(a) The TEER value of each hiPSEC monolayer treated with 0%-, 25%-, 50%-, 100%-C6CM was measured. (b) The permeability coefficient for FD was measured in hiPSECs treated with 0%-, 25%-, 50%-, 100%-C6CM.

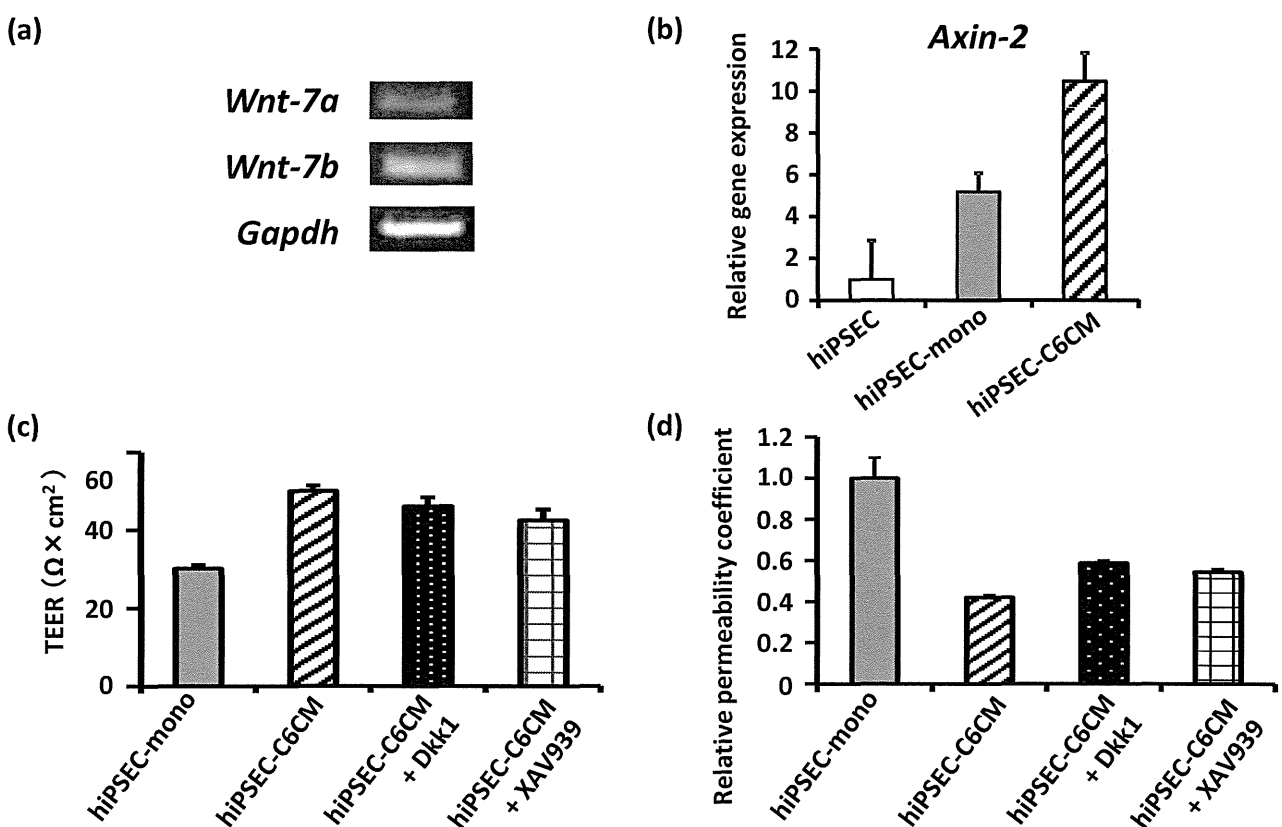
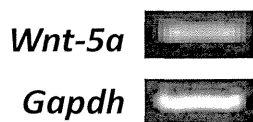


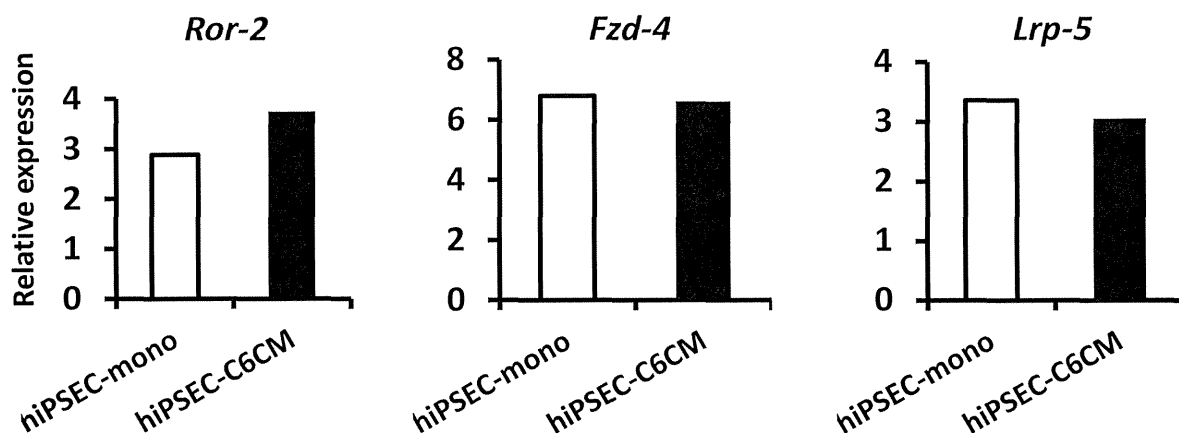
Figure 6 Effects of inhibitors of the canonical Wnt pathway on the differentiation of hiPSECs into brain endothelial cells by treatment of C6CM.

(a) Expression of Wnt-7a and Wnt-7b mRNA was examined in C6 cells. (b) Expression of Axin-2 mRNA was examined in hiPSECs, hiPSEC-mono and hiPSEC-C6CM by qRT-PCR analysis. (c, d) TEER values and permeability coefficients of hiPSEC-mono, hiPSEC-C6CM or Dkk1- or XAV939-treated hiPSEC-C6CM were measured. All results shown are the mean of three independent experiments with the indicated standard deviations (S.D.).

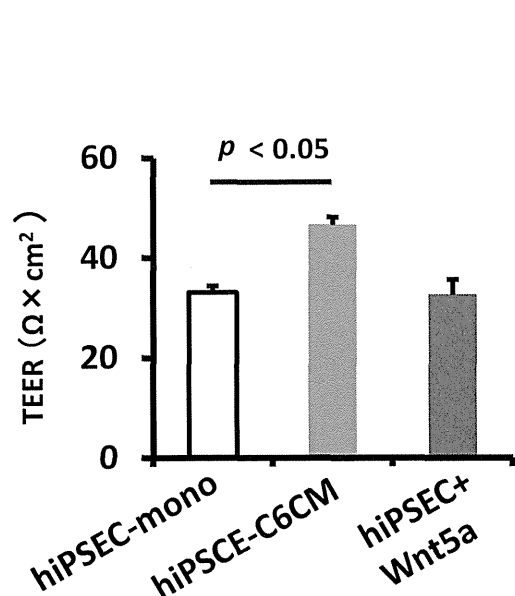
(a)



(b)



(c)



(d)

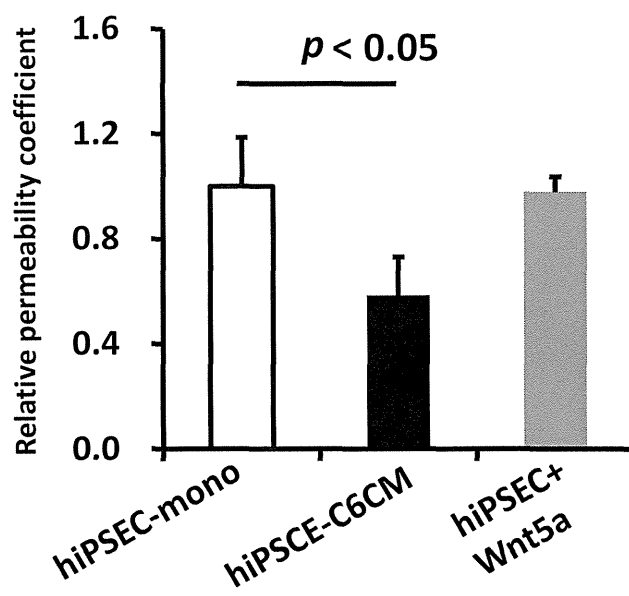


Figure 7 Effects of the non-canonical Wnt pathway on the differentiation of hiPSECs into brain endothelial cells.

(a) Expression of Wnt-5a mRNA was examined in C6 cells. (b) Expression of Ror-2, Fzd-4 and Lrp-5 mRNA was examined in hiPSECs, hiPSEC-mono and hiPSEC-C6CM by qRT-PCR analysis. (c, d) TEER values and permeability coefficients of hiPSEC-mono, hiPSEC-C6CM or Wnt5a-treated hiPSECs were measured. All results shown are the mean of three independent experiments with the indicated standard deviations (S.D.). * $p < 0.05$.

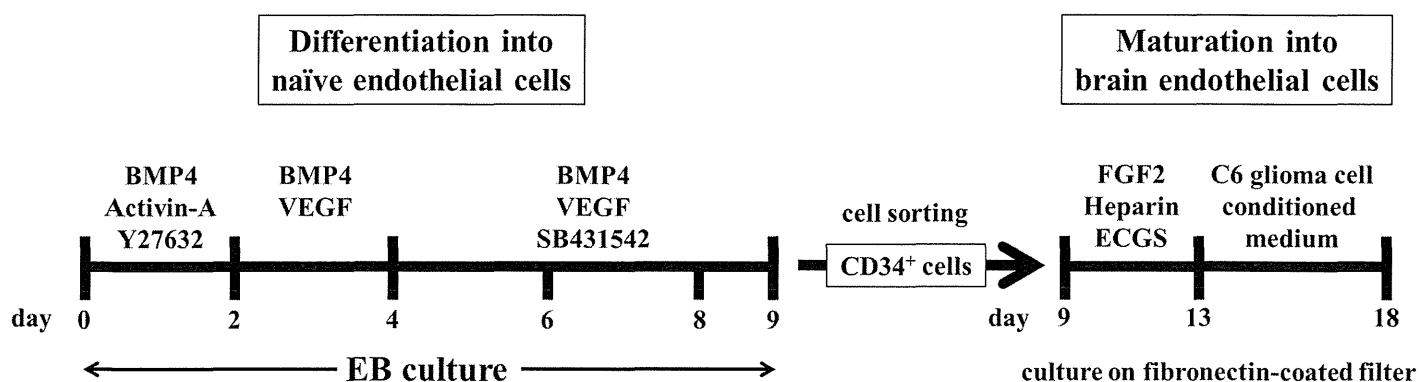


Figure 8 Experimental protocol for the generation of hiPSC-derived brain endothelial cells. hiPSCs were differentiated into CD34⁺ naïve endothelial cells, and further matured to brain endothelial cells.

Table 1 List of primers used in semi-quantitative PCR

<i>Genes</i>	(5') Forward Primers (3')	(5') Reverse Primers (3')
<i>Gapdh</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>Mdr-1</i>	GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAAAATT	CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGACT
<i>Bcrp</i>	TTATCCGTGGTGTGTCTGGA	CCTGCTTGGAAGGCTCTATG
<i>Mrp4</i>	CCATTGAAGATCTTCCTGG	GGTGTTCAATCTGTGTGC
<i>Glut-1</i>	CCTGCAGGAGATGAAGGAAG	TGAAGAGTTCAGCCACGATG
<i>Wnt-5a</i>	TGCCACTTGTATCAGGACCA	GGCTCATGGCATTACCCT
<i>Wnt-7a</i>	CACAATCCGAGAGCTAGGC	TAGCCTGAGGGGCTGTCTTA
<i>Wnt-7b</i>	GCTATCAGAAGCCGATGGAG	ACGTGTTGCACTTGACGAAG

Table 2 List of primers used in quantitative real-time PCR

<i>Genes</i>	(5') Forward Primers (3')	(5') Reverse Primers (3')
<i>Gapdh</i>	GGTGGTCTCTCTGACTTCAACA	GTGGTCGTTGAGGGCAATG
<i>Claudin-5</i>	CTTCCAGAATGGCAAGAGAGTGA	ACCACTGTTCTCCACTGCTCAGA
<i>Occludin</i>	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT
<i>Zo-1</i>	TGATCATTCCAGGCACTCG	CTCTTCATCTCTACTCCGGAGACT
<i>Axin-2</i>	GAGTGGACTTGTGCCGACTTCA	GGTGGCTGGTGCAAAGACATAG
<i>Ror-2</i>	AGGTGCCTATGCAAGTTCA	TGTGCGAGGTTTAAGGTCTA
<i>Fzd-4</i>	TACCTCACAAAACCCCATCC	GGCTGTATAAGCCAGCATCAT
<i>Lip-5</i>	ATGGGCGCCAGAACATCAA	AGATGTCGATGCTGAGGTCGTG

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 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。

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

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。昨年度、従来の in vitro BBB モデルにミクログリアを添加することにより、より強固なバリア機能を実現した。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の細胞毒性評価プロトコルおよび細胞に求められる必要条件を明らかとした。

A. 研究目的

薬物の中枢神経への作用を考えるうえで、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。昨年度、従来の in vitro BBB モデルにミクログリアを添加することにより、より強固なバリア機能を実現した。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の細胞毒性評価プロトコルおよび細胞に求められる必要条件を明らかとした。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いだした。そこで本年度は、ミクログリアを添加した

in vitro BBB モデルが病態脳（脳内炎症）に近い状態になったときにバリア機能にどのような変化が起こるかについて検討した。また、このモデルを用いて脳側、血管側 L-Glu 濃度調節機構と病態における変化について検討した。これまでの成果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

B-1. 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、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。ラット初代培養ミクログリア（ 1×10^5 cells / well）は、Lipopolysaccharide (LPS) (1000 ng/ml) もしくはミノサイクリン(10 μ M)+LPS と 1 時間反応させた後、培養 1 日目のアストロサイト（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。

B-2. 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。

B-3. 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℃、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。

B-4. Tight Junction proteins (TJs) 、Glutamate (L-Glu) transporters 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ー中にて溶解した。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), EAAT3, 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。

B-5. 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), Methylphenazonium methylsulfate (MPMS) (100 μ M) を含むアッセイバッファーと 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。

B-6. サイトカイン/ケモカイン多項目同時定量解析実験 (Milliplex)

BBB キット 5 日目の脳側培養上清を回収し、サイトカイン・ケモカイン量を Rat Cytokine/Chemokine Panel (Milliplex)を用いて測定した。BioPlex200 システム (Bio Rad 社) により、サイトカイン・ケモカイン 27 種類の濃度を定量解析をした。データは解析ソフト Milliplex Analyst Ver. 5.1 を用いて、ヒートマップグラフで表した。コントロール群 (n=8)、ミクログリア (MG) 添加群 (n=8) の平均値を算出し、コントロール群と比較して、MG 添加群で濃度が増大したサイトカイン・ケモカインを右に、減少したものを左に変化していないものを真ん中に並べ、それぞれ 8 サンプルずつのサイトカイン・ケモカイン濃度をヒートマップグラフとして示した。同様に、MG 添加群 (n=4)、LPS-MG 添加群 (n=4) の平均値を算出し、MG 添加群と比較して LPS-MG

添加群で 増大、不変、減少したサイトカイン・ケモカインの濃度をヒートマップグラフとして示した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。

C. 研究結果

C-1. ミクログリア添加 in vitro BBB モデルの脳内炎症時における barrier function の変化

LPS はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、実験的に炎症を再現するために使用される。in vitro BBB モデルの成熟期間中、脳側のアストロサイトに LPS によって 1 時間活性化させたミクログリアを添加したところ、TEER が有意に減少し、NA-F の透過性は有意に増大した (Fig. 2A)。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、LPS で活性化したミクログリアを添加した BBB モデルでは、Claudin5、Occludin の発現が有意に低下することが明らかになった (Fig. 2B)。ミクログリアの活性化を抑制することが知られているミノサイクリン共存下において、LPS で活性化したミクログリアを添加した BBB モデルでは、LPS 処置群と比較して、TEER が有意に改善した。しかしながら、NAF の透過性および TJs の発現については変化が無かった。

C-2. ミクログリア添加 in vitro BBB モデルを用いた脳側、血管側 L-Glu 濃度調節機構の検討

In vitro BBB キット指定の培地には 50 μ M の L-Glu が含有されおり、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 BBB 成熟に伴い、5 日間培養後には、血管側 >> 脳側となり、血管側は 70 μM 以上となる (Fig. 3A)。血管側が 50 μM 以上となったことは、BBB で能動的な L-Glu の排出が起こっていることが示唆される。LPS で活性化した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 LPS で有意に低下した (Fig. 3B)。脳側濃度は変化がなかった。本モデルの内皮細胞が発現している L-Glu トランスポーター、GLAST、GLT-1、EAAT3 の発現をウェスタンブロッティングで検討した結果、LPS で活性化したミクログリアを添加することにより、GLT-1 の発現量が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 3C)。

C-3. ミクログリア添加 in vitro BBB モデルの Barrier function の変化に関わるケモカイン、サイトカインについての検討

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 barrier function, 内皮細胞の蛋白質発現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。各種サイトカイン・ケモカイン濃度測定は、Bioplex200 で行った。Fig.4A は、右側に Control のアストロサイト単独の場合 (Control 群の 平均値) と比較して、ミクロ

グリア添加によって濃度が増大したサイトカイン・ケモカイン、左側に濃度が減少したサイトカイン・ケモカインを並べ、それぞれの濃度変化をヒートマップグラフとして示している。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、ミクログリアが入っていないコントロールと比較して、有意に、IL-5, MCP-1, IP-10, VEGF, GRO KC CINC, LIX, MIP-2 の産生が増大し、反対に、Fractalkine のみ有意に産生量が抑制していた (Fig. 4A)。特に IP-10, MCP-1, GRO KC CINC-1 の産生濃度が高く、それ以外のサイトカイン・ケモカイン濃度変化は数十 pg/ml と非常に少なかった。

LPS で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中には、無刺激ミクログリアが含まれたメディウムと比較して (無刺激ミクログリア群の 平均値)、有意に、IL-1 alpha, MIP-1a, IL-1beta, IL-6, MCP-1, IP-10, GRO KC CINC-1, LIX, RANTES, IL-10, IL-5, IL-17a, Fractalkine, MIP-2, TNFalpha の濃度が高いこと、とりわけ、IL-6, MCP-1, IP-10, GRO KC CINC-1, LIX, RANTES については非常に高濃度のサイトカイン・ケモカインが産生されていることが明らかになった (Fig. 4B)。

以上の結果から、ミクログリアが BBB バリア機能の向上をもたらしている際、また、活性化したミクログリアが BBB 機能を低下させている際に、異なる組み合わせのサイ

トカイン・ケモカインが変動していることが明らかになった。

D. 考察

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ポーター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ポーター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アウムでは、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アウムにおいて、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。