

201406037B

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24～26年度 総合研究報告書

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24～26年度 総合研究報告書

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	----- 13
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 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	----- 66
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	----- 95
---------------------	----------

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し、H24 年度から H26 年度までの 3 年間で、以下の結論を得た。

- (1) 支持細胞との共培養法あるいは胚様体形成法を介して、ヒト ES/iPS 細胞から CD34 陽性の血液前駆細胞への分化誘導法を確立した。また、ヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からメチルセルロース法を用いることで、マスト細胞が分化誘導可能であることが示された。さらに、得られたヒト iPS 細胞由来マスト細胞が機能的な細胞であることを確認した。
- (2) 適切なサイトカインを作用することで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。また、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。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、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、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を明らかにした。
- (3) *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。また、*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。

以上の結果は、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。

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. マウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いた薬物毒性評価系構築に関する基礎的検討

OP9 細胞や Swiss3T3 線維芽細胞を支持細胞として用いることで、マウス iPS 細胞から毒性評価系へ応用可能な成熟度の高いマスト細胞を誘導可能であることを明らかにし、この iPS 細胞由来マスト細胞はアレルギーを惹起する薬物に対して感度良く脱顆粒することが示された。

2. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞からマスト細胞等の血液細胞を分化誘導するには、血液前駆細胞を得る必要がある。そこで、H24 年度は、ヒト iPS 細胞を VEGF 存在下で支持細胞と共培養することにより、血液前駆細胞への分化を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞株である 201B7 から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞が得られた。

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。

H26 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 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞分画だけでなく CD34 陽性 CD43 陰性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。

3. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立

H24 年度は、胚様体 (embryoid body; EB) 形成法によりヒト iPS 細胞から血管内皮細胞の分化誘導法の確立を試みた。その結果、Tic 株と 201B7 株の両細胞株におい

て分化誘導 6 日目以降において血管内皮細胞のマーカーである CD34 を発現する細胞が検出された。さらに、CD34 陽性細胞は CD31、CD144、KDR を発現していることも観察され、血管内皮細胞が誘導されていることが示唆された。

4. 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

H25 年度、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。

H26 年度は、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。

4. 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）
ヒト iPS 細胞由来神経細胞で機能する伝達物質受容体を調べるための細胞内カルシウムイメージング系を確立した。また、ミクログリアを従来型血液脳関門 (BBB) モデルに添加しバリア機能の定量的解析を行ったところ、バリア機能が増強することを見出した。

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ーに基づき、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。

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

本研究では、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。そこで本研究では、まずマウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いた薬物毒性評価系構築に関する基礎的検討を行った。これまでにアナフィラキシー症状を引き起こすことが報告されているバンコマイシンに対する脱顆粒応答能について評価した結果、マウス iPS 細胞由来マスト細胞では濃度依存的な脱顆粒が観察された。したがって、

マスト細胞を用いることにより、薬物免疫毒性評価系を構築できる可能性が示された。今後、ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞にバンコマイシン等のアレルギーを引き起こす複数の薬物を作用後、それらの薬物に対する脱顆粒応答能について評価する。

ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 薬物毒性評価系の構築に向け、ヒト iPS 細胞由来 CD34 陽性 CD43 陽性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 陽性 c-kit 陽性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 陽性 c-kit 陽性マスト細胞を分化誘導可能であると考えられる。

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 陰性 CD43 陰性、CD34 陽性 CD43 陰性、CD34 陽性 CD43 陽性、CD34 陰性 CD43 陽性の 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 陰性 CD43 陰性分画や CD34 陰性 CD43 陽性分画からは、マスト細胞は得られなかった。CD34 陰性 CD43 陰性は非血液細胞集団、CD34 陰性 CD43 陽性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 陽性 CD43 陽性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 陽性 CD43 陽性分画からはマスト細胞が多く得られた。さらに、CD34 陽性 CD43 陰性分画からもマスト細胞コロニーが出現した。CD34 陽性 CD43 陰性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 陽性 CD43 陰性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

脳特異的血管内皮細胞の作製に向け、H24 年度はヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の検討を行った。その結果、BMP4 や VEGF を作用させることで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。今後、得られた細胞の機能評価を行う予定である。また、ヒト iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞とアストロサイト様細胞株等との共培養により、脳血管内皮細胞が高発現しているタイトジャンクション蛋白質・トランスポーター蛋白質等の発現が上昇するかどうか

検討を進めることで、脳特異的血管内皮細胞の作製を試みる予定である。

H25 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、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。

さらに、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。

H25 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示され、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。

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳血

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 をヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞へ作用させたが、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關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關与の検証ならびに 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-1. in vitro BBB モデルの改良

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。ミクログリアは有意に BBB のバリア機能成熟を促進させた。また、LPS で刺激をしたミクログリアは BBB 機能を抑制した。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。また、我々は生後初期の神経新生、グリア新生をミクログリアが複数のサイトカインを介して促進することを見いだしている (Shigemoto-mogami et al., J Neurosci 34(5), 2231-43)。従って、同様のサイトカインを介したメカニズムにより、内皮細胞の機能分化を促進している可能性が考えられた。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 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。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。

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。刺激を与えていないミクログリアは Claudin5 の特異的な発現上昇を誘導し、LPS 刺激したミクログリアは Claudin5 および Occludin の発現を抑制した。これら 2 条件におけるメディウム中サイトカイン、ケモカインの組み合わせ、濃度の違いとの関連に興味を持たれる。

また、我々は本モデルによって BBB に能動的 L-Glu 排出機能があることも見いだした。脳血管内皮細胞が発現している GLAST, GLT-1, EAAT3 の発現量は LPS 刺激したミクログリアによって有意に減少した。我々のミクログリア添加 in vitro BBB モデルは、様々な条件における L-Glu 排出能力の変化およびそのメカニズムを検討する強力なツールとなる。

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、本モデルは健康脳から病態脳まで網羅した *in vitro* BBB モデルであると言える。

D-2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた *in vitro* 毒性評価系の構築

ヒト iPS 細胞由来神経細胞の生細胞と死細胞の可視化、および定量化を達成した。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、蛍光を発することから、これまでフローサイトメトリーなどへ応用されていたが、今回、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の神経細胞死評価にも有効であることが示された。ただし、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。二本鎖構造の核酸と intercalate して赤色蛍光を発するため、二本鎖 RNA と結合してもわずかに蛍光を発する。従って、正確な定量を行うためには、核以外の蛍光レベルをほぼ 0 にするよう、検出機器のバックレベルを調整する必要があるであろう。また、PI 染色ではアポトーシスを起こした細胞の DNA 断片化やアポトーシス小体も明確に判別できた。従って死細胞数の定量的な情報に加えて定性的な情報 (細胞死がアポトーシスによるものか、ネクローシスによるものか、等) も得ることが可能とな

った。我々はさらに、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ールをヒト iPS 細胞由来神経細胞用に最適化した。主な注意点としては、ヒト iPS 細胞由来神経細胞は齧歯類初代培養細胞に比較し、非常にはがれやすい点に注意すること、従来のプロトコールでは PI 暴露時間が 24 時間となっているが、同じ条件では PI 暴露のみでほとんどの細胞が死滅してしまうため、PI 暴露時間を短縮した点である。これまで、PI 自体に毒性が報告された例はなく、細胞毒性が表れたメカニズムは不明である。中枢神経系において、神経細胞どうし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、NMDA 受容体を持たない 253G1 由来神経細胞標本では興奮毒性が再現できず、NMDA 受容体を持つ iNeuron では興奮毒性を再現できた。これらの結果は、医薬品等の中枢神経系への影響評価を行うためには、カルシウムイ

メーキング等で 機能的 NMDA 受容体発現を確認する必要があることを示している。

細胞骨格タンパク質ドレブリンをバイオマーカーとしてシナプス機能への影響を評価する手法を確立した。アクチン結合蛋白質であるドレブリンはシナプス機能が正常な時は、後シナプス部位であるスパインに集積しているが、シナプス機能に異常が現れると局在が樹状突起に分散する (Takahashi et al., J Neurosci 23, 6586-6595, 2009)。従って、ドレブリンのスパイン集積度をシナプス機能障害のパラメーターとして応用することができる。我々は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。さらに、スパイン構造が明らかなヒト iPS 細胞由来神経細胞を入手した際には本パラメーターの有効性について確認を行う予定である。

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。中枢神経系における細胞毒性評価に必須である興奮毒性評価系プロトコルを iPS 細胞由来神経細胞用に最適化し、興奮毒性の試行に成功した。また、高次機能評価の基板となるシナプス機能評価系をドレブリン SDR により定量的に評価可能とした。以上の基盤技術の組み合わせによりオールインワン型モデルが達成される。

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。研究期間の3年間で以下のような結論が得られた。

- (1) 支持細胞との共培養法あるいは胚様体形成法を介して、ヒト ES/iPS 細胞から CD34 陽性の血液前駆細胞への分化誘導法を確立した。また、ヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からメチルセルロース法を用いることで、マスト細胞が分化誘導可能であることが示された。さらに、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。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。
- (2) 適切なサイトカインを作用することで、ヒト iPS 細胞から CD34 や CD31、CD144 を発現する細胞の作製に成功した。また、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。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、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、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
岡田淳雅 (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。

ヒト iPS 細胞からマスト細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞への分化誘導法の確立へ向け、平成 24 年度は、血液前駆細胞への

分化誘導法の確立を行った。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。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。

ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立を目指し、平成 24 年度は、分化誘導条件の検討を行った。平成 25 年度は、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。また、平成 26 年度は、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法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. マウス iPS 細胞の培養

マウス iPS 細胞株 38C2 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は mES Complete Medium (Millipore) を用いて Mitomycin-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。

B-1-2. マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導

マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導は以下の方法で行った。3 日前に骨髓ストローマ細胞株である OP9 細胞を培養皿に播種し、フィーダー細胞として用いた。マウス iPS 細胞を 0.25% Trypsin/EDTA solution (Life Technologies) を用いて単一細胞へ分離し、37°C で 30 分間静置した後、上清を回収し iPS 細胞と MEF を分離した。その後、iPS 細胞のみを 1×10^3 cells/100 mm dish となるようにフィーダー細胞上に播種した。培養 7 日目までは播きなおしをせず、培地を 24 時間後と 4 日後に全量交換した。培養 7 日目に 0.25% Trypsin/EDTA solution で細胞を回収し、37°C で 30 分間静置した後、上清を回収することで iPS 細胞由来中胚葉系細胞と OP9 細胞を分離した。中胚葉系細胞を回収し、Interleukine-3

(IL-3, 30 ng/mL, Peprotech)、Stem Cell Factor (SCF, 100 ng/mL, Peprotech) を含む α -MEM 培地 (Sigma) に懸濁後、OP9 細胞上に播種し、7 日間培養した。さらに、7 日後および 14 日後に浮遊細胞のみを回収し、IL-3 (30 ng/mL)、SCF (100 ng/mL) を含む α -MEM 培地に懸濁後、新しく播種しなおした OP9 細胞上で培養した。

B-1-3. マウスマスト細胞を用いた脱顆粒応答能の評価

B-1-2. の方法により分化誘導したマウス iPS 細胞由来マスト細胞およびマウス骨髓細胞より誘導したマスト細胞 (bone marrow-derived mast cell; BMMC) を回収し、 1×10^5 cells/well の密度で播種した。次に、compound 48/80 (10 ug/mL, Sigma)、substance P (100 uM, Sigma)、2 mg/ml あるいは Vancomycin (5 mg/ml, Wako) を加え、37°C で 30 分間細胞を刺激した。なお、抗原刺激の場合は、モノクローナル抗 dinitrophenyl (DNP)-IgE 抗体 (1 ug/mL, Sigma) を培養液に加え、24 時間培養することによって細胞を感作した。その後、感作した細胞に抗原 (DNP-human serum albumin; DNP-HSA, 100 ng/mL, Biosearch Technologies) を加え、37°C で 30 分間細胞を刺激した。遠心後上清を回収し、96-well plate に移し、0.1 M citrate buffer に溶解した p-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (1 mM) を加

えて混和後 37°C で 2 時間反応させた。反応溶液に stop buffer (0.4 M Glycine, pH 10.7) を加え混和し、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定し、遊離率を求めた。なお、細胞内全 β -hexosaminidase の測定には、0.1% Triton (Sigma) 含有 HEPES で懸濁し、氷上で 10 分反応後に遠心した上清を用いた。

B-1-4. 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 fibroblast growth factor 2 (FGF2, 5 ng/mL, 片山工業化学) を含む ReproStem 培地 (霊長類 ES 細胞用培地, ReproCell) を用いて、Mitomycin-C 処理済みの MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Tic (JCRB Cellbank から供与, JCRB Number: JCRB1331)、Toe (国立成育医療センター、梅澤明弘先生から供与) は、FGF2 (10 ng/mL) を含む ReproStem 培地を用いて、Mitomycin-C 処理済みの MEF 上で培養した。4-7 日ごとに dispase (0.1 mg/mL, 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-1-5. Sac を介したヒト iPS 細胞から血液前駆細胞の分化誘導

分化誘導開始の前日に 50 Gy の放射線照

射し増殖を止めた C3H10T1/2 細胞株を gelatin コートした 100 mm dish に 7×10^5 cells/dish の密度で播種し、フィーダー細胞として用いた。iPS 細胞は、 $5 \cdot 10 \times 10^4$ cells/100 mm dish の密度となるようにフィーダー細胞上に播種した。細胞の播き直しを行わず、vascular endothelial growth factor (VEGF, 50 ng/mL, Peprotech) 含有培地を 9 日目までは 3 日ごと、9 日目から 15 日目までは 2 日ごとに交換することにより血液前駆細胞の誘導を行った。

B-1-6. 胚様体 (embryoid body; EB) 形成法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、Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632, 10 μ M, Wako) を含む EB 形成培地中でピペッティングすることにより単一細胞へと解離した。なお、EB 形成培地の組成は、Ascorbic acid (50 μ g/ml, Sigma)、Monothioglycerol (MTG, 450 μ M, Sigma) および mTeSR 5 Supplement (Stem Cell Technologies) を加えた mTeSR 培地 (Stem Cell Technologies) である。その後、iPS 細胞 (1×10^6 cells) と前日放射線処理した C3H10T1/2 細胞 (6×10^5 cells) を Activin-A (2 ng/mL, R&D Systems)、bone morphogenic protein 4 (BMP4, 10

ng/mL, R&D Systems)、Y-27632 (10 uM) を含む EB 形成培地に懸濁し、100 mm petri dish に播種した。2 日後 (day 2)、BMP4 (10 ng/mL)、VEGF (5 ng/mL) を含む EB 分化培地に置き換えた。なお、EB 分化培地の組成は、Ascorbic acid (50 µg/ml)、MTG (450 uM)、L-Glutamin (2 mM, Life Technologies)、ITS (Insulin Transferrin Selenium solution, Life Technologies) を含む IMDM 培地 (Sigma) である。その 2 日後 (day 4)、BMP4 (10 ng/mL)、VEGF (5 ng/mL)、transforming growth factor (TGF) β inhibitor (SB431542, 10 uM, Wako) を含む EB 分化培地で培養液を半量交換し、さらに 2 日培養した(この際、SB431542 の終濃度は 5 µM である)。分化誘導から 6 日目 (day 6) に、BMP4 (2 ng/mL)、VEGF (5 ng/mL)、SCF (10 ng/mL)、Thrombopoietin (TPO, 10 ng/mL, Peprotech) を含む EB 分化培地に培地を交換した。さらにその 2 日後 (day 8) に day 6 と同じ培地で培養液を半量交換し、血液前駆細胞の誘導を行った。

B-1-7. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析

B-1-5.の方法により分化誘導した細胞は、ピペッティングを繰り返すことで機械的に囊状構造体を崩し、cell strainer (40 µm, BD Bioscience) を通して、囊状構造体内部の血液細胞のみを回収した。B-1-6.の方法

により分化誘導した場合は、培養 8-10 日目の EB を回収し、Cell dissociation buffer (Life Technologies) を加えて 37°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、fetal bovine serum (FBS, 2%, Life Technologies) 含有 PBS (FACS Buffer) で再懸濁し、フローサイトメーター (LSR Fortessa II, BD Bioscience) を用いて解析を行った。

B-1-8. セルソーターによる細胞分離

B-1-5.および B-1-6.の方法により分化誘導した細胞は、B-1-7.の方法を用いて回収し、APC 標識抗ヒト CD34 抗体および FITC 標識抗ヒト CD43 抗体を氷上、遮光で 30 分間反応させた。その後、セルソーター (BD FACS Aria, BD Bioscience または SH-800, SONY) を用いて CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞を分離した。分離後、CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞が 90%以上の純度で得られていることを確認した。

B-1-9. コロニーアッセイ