

B-1-5.の方法により分化誘導後、B-1-7.の方法により CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞を回収した。その後、メチルセルロース培地 (MethoCult H4435, Stem Cell Technologies) に CD34 陽性 CD43 陰性あるいは CD34 陽性 CD43 陽性細胞を懸濁し、35 mm dish (Stem Cell Technologies) に播種した。37℃、5% CO₂ インキュベーターで 14 日間培養を行い、顕微鏡下で形態学的に識別しコロニー形成細胞 (colony-forming cell; CFC) を分類・計数・観察した。

B-1-10. メチルセルロース法を用いた CD34 陽性 CD43 陽性細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立

CD34 陽性 CD43 陽性細胞を SCF (200 ng/mL)、IL-3 (5 ng/mL)、IL-6 (50 ng/mL) を含む培地で懸濁後、メチルセルロース培地 (MethoCult H4236, Stem Cell Technologies) と混和し、24-well Low Cell Binding plate (Thermo Scientific) に播種した (week 1)。2 週間後 (week 3)、SCF (200 ng/mL) および IL-6 (50 ng/mL) を含む IMDM 培地と MethoCult H4236 培地を混和し重層した。その 2 週間後 (week 5)、SCF (200 ng/mL) および IL-6 (50 ng/mL) を含む IMDM 培地をさらに重層した。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-1-11. 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を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を作製した。その後、メイ・グリュンワルド染色液で 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-1-12. 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、リアルタイム PCR システム (StepOne Plus; Life Technologies) を用いて定量化した。

B-1-13. 免疫抗体染色

ヒト iPS 細胞由来分化細胞を 4% paraformaldehyde (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、AlexaFluor 488 標識された各種 2 次抗体 (Life Technologies) を室温で作用させ、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, Keyence) にて観察した。

B-1-14. ヒトマスト細胞を用いた脱顆粒応答能の評価

iPS 細胞由来マスト細胞に Human IgE purified (1 µg/mL, Millipore) を 24 時間作用した。その後、細胞を回収し、HEPES Buffer で洗浄後、ポリクローナル抗ヒト IgE antibody (0 µg/mL, 1 µg/mL または 3 µg/mL, 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 (0.5% Triton X-100/HEPES) 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 (0.04 M クエン酸緩衝, pH 4.5) を加え、37°C で 60 分間反応させた。反応溶液に stop buffer (0.4 M 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-hexaminidase の遊離率は以下の計算式で算出した。

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

B-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

B-2-1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 および Tic は FGF2 を終濃度 5 ng/mL および 10 ng/mL で含む ReproStem 培地を用いて、Mitomycin-C 処理済の MEF 上で培養した。両ヒト iPS 細胞株ともに、4-7 日ごとに、コロニーピックアップ、または dispase 処理により継代した。

B-2-2. Matrigel を用いた接着培養による血管内皮細胞への分化誘導

Matrigel を用いた血管内皮細胞への分化誘導は以下の方法で行った。まず、分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Cell Science & Technology Institute) で培地交換した。次に、Accutase を用いてヒト iPS 細胞を回収後、Activin-A (100 ng/mL) および FGF2 (10 ng/mL) を含む Differentiation hESF-DIF 培地に懸濁後、

Matrigel (Matrigel Matrix 2270588, BD Biosciences) をコートした 12-well plate (Nunc) に 1×10^5 cells/well の密度で播種した後、2 日間培養した。なお、Differentiation hESF-DIF 培地の組成は、human recombinant insulin (10 ug/mL, Sigma)、human apotransferrin (5 ug/mL, Sigma)、2-mercaptoethanol (10 uM, Sigma)、ethanolamine (10 uM, Sigma)、sodium selenite (10 uM, Sigma)、fatty acid free bovine albumin (0.5 mg/mL, Sigma) を含む hESF-DIF 培地 (Cell Science & Technology Institute) である。その後、BMP4 (50 ng/mL) および FGF2 (10 ng/mL) を含む Differentiation hESF-DIF 培地にて 4 日間培養した。分化誘導 6 日目に細胞を回収し、EGM-2 SingleQuots Kit (CC-4176, Lonza) を添加した EGM-2 培地 (Lonza) にてその後の培養を行った。

B-2-3. 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)、Y-27632 (10 uM) 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 ug/mL)、MTG (450 uM)、L-glutamine (2 mM)、streptomycin (120 ug/ml, Life Technologies) および penicillin (200 ug/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 uM) を含む StemPro-34 培地で 2 日間培養した。血液前駆細胞と共に血管内皮細胞を得る場合、分化誘導から 6 日目の EB を各 well から回収し、BMP4 (2 ng/mL)、VEGF (5 ng/mL)、SCF (20 ng/mL)、TPO (20 ng/mL) を含む StemPro-34 培地へ懸濁し、petri dish へ播種した。2 日後に培地を半量交換し、分化誘導 10 日目以降は VEGF (5 ng/mL)、SCF (20 ng/mL)、TPO (20 ng/mL) を含む StemPro-34 培地中で培養することにより血液前駆細胞と血管内皮細胞の誘導を行った。血管内皮細胞のみを得る場合、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 陽性細胞をセ

ルソーター (SH800) により分離した。分離した細胞は、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 ug/cm², BD) をコートした 48-well plate (Nunc) に 5×10^4 cells/well の密度で播種した。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-2-4. 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

B-2-2 および B-2-3 の方法により分化誘導した細胞に Cell dissociation buffer 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させた。その後、FITC 標識抗ヒト CD31 抗体 (clone WM59, Biolegend)、APC 標識抗ヒト CD34 抗体、phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト CD144 抗体 (clone 16B1, eBioscience)、FITC 標識抗ヒト CD43 抗体、PE-Cy7 標識抗ヒト CD45 抗体 (clone HI30, BD Bioscience)、PE 標識抗ヒト KDR 抗体 (clone 89106, BD Bioscience) を 4°C、遮光で 30-40 分間反応させた。細胞を洗浄後、FACS Buffer で再懸濁し、フローサイトメーター (BD LSR Fortessa II) を用いて解析した。セルソーターにて細胞分離を行う場合は、0.25% Trypsin/EDTA solution により EB

を単一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、FACS Buffer で再懸濁し、セルソーター (SH-800) にて CD34 陽性および CD34 陰性細胞を分離した。

B-2-5. 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 ISOGEN (Nippon Gene) あるいは RNAiso Plus を用いて Total RNA を抽出した。各 Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit 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 にて増幅し、リアルタイム PCR システム (StepOne Plus) 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-2-6. Matrigel を用いた in vitro 管腔構造形成能の評価

24-well plate (Nunc) または 48 well plate に 100 ul の Matrigel を加えて 37°C、1 時間静置することにより、各 plate をコーティングした。接着培養して増幅させた CD34 陽性あるいは CD34 陰性細胞を 0.25% Trypsin/EDTA solution にて回収し、

VEGF (10 ng/mL) を含む ECGS + Heparin 培地に懸濁し、 $5 \cdot 10 \times 10^4$ cells/well の密度で Matrigel 上へ播種した。37°C、16 時間培養後に顕微鏡下で細胞を観察した。

B-2-7. アセチル化 LDL の取り込み能の評価

接着培養した CD34 陽性および CD34 陰性細胞の培地を、AlexaFluor 488 で標識された acetylated LDL (10 ug/mL, Life Technologies) を含む ECGS + Heparin 培地で置換し、37°C、4 時間培養後に蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000) にて観察した。

B-2-8. 免疫抗体染色

48-well plate に播種して増殖させた CD34 陽性または CD34 陰性細胞を 4% PFA で固定した後、bovine serum albumin (2%) 含有 PBS 溶液でブロッキングした。その後、抗ヒト CD31 (PECAM) 抗体 (Dako, 原液で使用)、抗ヒト von Willebrand factor (vWF) 抗体 (Dako, 200 倍希釈で使用)、抗ヒト CD144 (VE-Cadherin) 抗体 (R&D Systems, 20 倍希釈で使用) を 4°C で作用させた。続いて、AlexaFluor 488 あるいは AlexaFluor 594 で標識された各種 2 次抗体 (Life Technologies) を室温で作用させた。2 次抗体反応後に 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 (BIOREVO BZ-9000) にて観察した。

B-2-9. 各種細胞株の培養

b.End3 細胞 (マウス脳血管内皮細胞株, ATCC より購入, ATCC No. CRL-2299) は、Sodium Pyruvate 含有 DMEM (High Glucose) 培地 (DMEM-HP, Wako) を用いて培養した。4-5 日ごとに 0.25% Trypsin/EDTA solution を用いて継代した。A1 細胞 (マウスアストロサイト株, JCRB 細胞バンクより供与, JCRB No. IFO50519) は、DMEM (High Glucose) 培地 (DMEM-HG, Wako) を用いて培養した。3 日ごとに 0.25% Trypsin/EDTA solution を用いて継代した。MG5 細胞 (マウスミクログリア細胞株, JCRB 細胞バンクより供与, JCRB No. IFO50520) は DMEM-HG と A1 細胞培養上清を 3:7 の割合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 (マウスマクロファージ細胞株) は DMEM 培地 (Sigma) 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 (マウスマクロファージ細胞株) は RPMI1640 培地 (Sigma) 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 FBS (10%) を加えて使用した。C6 細胞 (ラットグリオーマ細胞株, JCRB 細胞バンクより供与, JCRB No.

JCRB9096) は horse serum (15%, Nichirei Biosciences Inc.)、FBS (2.5%) 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 を用いて継代した。なお、上記全ての培地には streptomycin および penicillin を加えて使用した。

B-2-10. C6 細胞培養上清の調製

C6 細胞を 100 mm cell culture dish (Nunc) 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/100 mm 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-2-11. b.End3 細胞と各種細胞株の共培養

b.End3 細胞を 24-well cell culture insert (pore size 0.4 μ m, Membrane area 0.3 cm^2 , BD Falcon) 上に、 1×10^5 cells/well の密度で播種した。24-well plate 側には共培養する細胞を 1×10^3 cells の密度で播種した。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 insert を、細胞株を播種した well へと移し共培養を開始した (day 0)。insert および

well に播種した細胞の培地は b.End3 細胞の培地で 2 日ごとに交換した。

B-2-12. 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。

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

B-2-13. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical Vein Endothelial cell; HUVEC) の培養

HUVEC (Lonza, Lot No. 0000311614) は、EGM-2 SingleQuots Kit を添加した EGM-2 培地で培養した。3 日ごとに 0.25% Trypsin/EDTA solution を用いて継代をした。

B-2-14. 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 ECGS + Heparin 培地に懸濁後、Fibronectin (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) をコートした 24-well cell culture insert に、 5×10^4 cells/insert の密度で播種した。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 5×10^3 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 TEER 測定 (B-2-12) および遺伝子発現解析 (B-2-5) の他に、後述の Dextran または Rhodamine を用いた物質透過性測定 (B-2-16, B-2-17) 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。インサートに HUVEC を播種した場合も、CD34 陽性細胞と同様の条件で実験を実施した。

B-2-15. 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 標識された Dextran (FD;

M.W. 3000, Life Technologies) を 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように溶解した 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-2-16. ロードミンを用いた 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 uM, Wako) または MK571 (10 uM, Sigma) を 37°C で 1 時間作用させた。その後、PBS を用いて insert 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、well 側の培地を懸濁して回収し、GENIOS を用いて移行した Rhodamine-123 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 hiPSECs の Rhodamine-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 0.1%FBS/EBM-PRF を用いた。

B-2-17. 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-2-3.および B-2-14.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 日ごとに行った。

B-2-18. 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-2-3.および B-2-14.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 日ごとに行った。

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. マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いて薬物毒性評価系を構築する前に、マウス iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いて機能評価を行った。成熟マスト細胞でのみ脱顆粒を惹起することが知られている compound 48/80 および substance P に対する脱顆粒応答能を検討した結果、マウス iPS 細胞由来マスト細胞では骨髓由来マスト細胞と比較しより高い脱顆粒応答性を示した (Figure 1a)。通常、アレルゲンは、高親和性 IgE 受容体である FcεRI を介して、マスト細胞の表面に結合している IgE を架橋することによって有効に働く (IgE 依存性の脱顆粒応答)。これまでに、ラット腹腔マスト細胞はリゾフォスファチジルセリン (lysophosphatidylserine; Lyso-PS) 存在下でのみ IgE 依存性の脱顆粒応答を惹起することが報告されている。そこで次に、マウス iPS 細胞由来マスト細胞を用いて、Lyso-PS 存在下における IgE 依存性の脱顆粒応答能について検討した。その結果、骨髓由来マスト細胞と比較しマウス iPS 細胞由来マスト細胞では、より高い脱顆粒応答性を示した (Figure 1b)。さらに、薬物アレルギー評価系の構築に向け、

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 Vancomycin に対する脱顆粒応答能についても評価した。その結果、骨髓由来マスト細胞では脱顆粒を惹起しないのに対し、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 (Figure 1c)。したがって、骨髓ストローマ細胞株である OP9 細胞などの支持細胞を用いることにより、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が明らかとなった。

C-1-2. 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。ヒト ES 細胞あるいは iPS 細胞から血液前駆細胞を得る方法として、OP9 細胞などの支持細胞との共培養法や EB 形成法などが汎用されている。そこで、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) との共培養することで血液前駆細胞への分化誘導を試みた (Figure 2a)。その結果、共培養 15 日頃からヒト iPS 細胞株 201B7 由来のコロニーが隆起してできた嚢状構造の内部に血球様の球状細胞が出てくるのが確認された (Figure 2b)。この血球様細胞は、血液前駆細胞のマーカーである CD34 や CD43 を発現するような細胞であることが

フローサイトメトリー解析により確認された (Figure 3a)。次に、CD34 陽性 CD43 陰性細胞および CD34 陽性 CD43 陽性細胞をそれぞれセルソーターにて回収後、コロニーアッセイを行った。その結果、CD34 陽性 CD43 陰性細胞からはコロニーが得られなかったが、CD34 陽性 CD43 陽性細胞からは多くのコロニーが得られた (Figure 3b)。以上の結果より、201B7 株から血液前駆細胞を分化誘導可能であることが示された。また、株間での比較を行うため、ヒト iPS 細胞株 201B7 株、Toe 株、Tic 株を用いて同様の検討を行った結果、Toe を用いた場合では嚢状構造が観察されなかった (Figure 4)。以上の結果から、細胞株により血液前駆細胞への分化誘導法 (共培養、EB 形成法など) を選択する必要があることが示唆された。

次に、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 陽性 CD43 陽性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 (Figure 5a)。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 (Figure 5b)。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 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞 (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 (Figure 6)。その結果、未分化マーカーは

iPS 細胞で高く、iPS 細胞由来 CD34 陽性 CD43 陽性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 (Figure 6a)。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 陽性 CD43 陽性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 (Figure 6b)。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 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞と比較して上昇していた (Figure 6c)。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 (Figure 7)。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。

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 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞の割合が高かった (Figure 8a)。次に、CD34 陽性 CD43 陽性 血液前駆細胞を、 1×10^4 cells/well の密度で 24-well low cell

binding plate 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 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。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 陰性 CD43 陰性および CD34 陰性 CD43 陽性分画からは、コロニーが生じなかった (Figure 8b)。一方、CD34 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞および CD34 陽性 CD43 陰性分画からは、マスト細胞様コロニーが出現した (Figure 8b)。なお、CD34 陽性 CD43 陽性分画では、CD34 陽性 CD43 陰性分画と比較し、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 陽性 CD43 陽性 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が示された。

次に、CD34 陽性 CD43 陽性分画および CD34 陽性 CD43 陰性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) の遺伝子発現

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遺伝子発現が CD34 陽性 CD43 陰性分画由来マスト細胞よりも CD34 陽性 CD43 陽性分画由来マスト細胞で高かった (Figure 9)。以上の結果から、CD34 陽性 CD43 陰性分画由来マスト細胞は、CD34 陽性 CD43 陽性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 FcεRI 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 FcεRI 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 (Figure 10)。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. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導

脳血管内皮細胞の作製の前段階として、まずヒト 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。血管内皮細胞は中胚葉由来の細胞であり、これまでの研究からヒト ES/iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化には BMP4 や VEGF のシグナルが重要であることが報告されている。そこで、これらのサイトカインを作用させて血管内皮細胞の誘導を試みた。

まず、Matrigel を用いた単層培養法による誘導を行った (Figure 11a)。その結果、ヒト iPS 細胞株 Tic を用いた場合、分化誘導 5・6 日目において KDR を発現する中胚葉細胞が 30・40%得られることが明らかとなった (Figure 11b)。その後、血管内皮細胞用培地である EGM-2 培地中で培養したところ、内皮細胞の特徴である敷石状の細胞が得られた (Figure 11c)。また、これらの細胞のうち 70%は CD31 陽性、40%は CD144 陽性であり、血管内皮細胞が得られていることが確認された (Figure 11d)。次に、Matrigel を用いて、得られた細胞の管腔構造形成能を評価したところ、iPS 細胞株 Tic から誘導した細胞は管腔構造形成能を有していることが明らかとなった (Figure 11e)。しかしながら、ヒト iPS 細胞株 201B7 では、本手法で血管内皮細胞を

得ることはできなかった。また、Tic 株を使用した際にも安定的に血管内皮細胞を誘導することができず、プロトコールを検討する必要があると考えられた。

そこで次に、EB 形成法によりヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法を試みた (Figure 12)。その結果、Tic 株と 201B7 株の両細胞株において分化誘導 6 日目以降に血管内皮細胞のマーカである CD34 を発現する細胞が検出された。さらに、ヒト iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞において、CD31、CD144 および KDR の発現がみとめられたことより、本手法で血管内皮細胞が誘導されていることが示された。CD34 陽性細胞は未熟な血液細胞のマーカでもあるため、血液細胞のマーカである CD43、CD45 の発現も解析したところ、Tic 株、201B7 株の両細胞株とも CD34 陽性細胞の一部は CD43 や CD45 を発現する血液細胞であることが明らかとなり、本手法では血液細胞と血管内皮細胞の双方が誘導可能であることが示された (Figure 12)。

次に、EB 形成法による血管内皮細胞への分化誘導プロトコールの最適化を行った。Figure 13a 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 陽性 CD144 陽性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

(Figure 13b)。また、培養 9 日目において各種血管内皮細胞の各種マーカ遺伝子 (CD31, CD34, VE-Cadherin, KDR, Tie2, vWF) の発現上昇がみられた (Figure 13c)。FACS 解析により、CD34 陽性細胞は CD144 陽性細胞と同一であることが確認されたため (Figure 13b)、次に CD34 陽性細胞をセルソーターにて分離し、血管内皮細胞への分化誘導・増幅を試みた。Fibronectin にてコートした plate 上で 4 日間接着培養を行った結果、CD34 陽性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 (Figure 14a)。また、これらの細胞は血管内皮細胞のマーカ分子である CD31 や CD144 (VE-Cadherin)、vWF を発現していることも明らかとなった (Figure 14b)。さらに、これら CD34 陽性細胞は、アセチル化 LDL の取り込み能や Matrigel 中での管腔構造形成能を有していることも示された (Figure 14c)。以上の結果より、本培養法によりヒト iPS 細胞から機能的な血管内皮細胞 (hiPSECs) が誘導できることが示された。

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、hiPSECs から脳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、hiPSECs と共培養する細胞種を決定するため、マウス脳血管内皮細胞株である b.End3 細胞を用いて細胞種のスクリーニングを行った。

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、hiPSECs 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 (Figure 15)。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。

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、hiPSECs 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 hiPSECs 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、hiPSECs の対照コントロールとして、HUVEC も同様の方法で C6 細胞と共培養した。なお、共培養実験のコントロールとしては、hiPSECs または HUVEC を単独培養した insert を用いた。

hiPSECs を insert 上に播種し、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 hiPSECs (hiPSEC-C6) の TEER を測定したところ、day 0 において $20.1 \pm 3.3 \Omega/\text{cm}^2$ であった TEER は、共培養 3 日目には $30.4 \pm 3.5 \Omega/\text{cm}^2$ 、そして共培養 5 日目には $52.3 \pm 5.1 \Omega/\text{cm}^2$ にまで上昇していた。一方、hiPSECs を単独培養したサンプル (iPSEC-mono) における TEER は、培養 5 日目においても $27.6 \pm 2.3 \Omega/\text{cm}^2$ であり、hiPSEC-C6 と比較すると有意に低いものであった (Figure 16a)。したがって、C6 細胞との共培養により hiPSECs 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、insert で培養している hiPSECs の物質透過性を評価するため、FD の透過性を解析した。共培養開始時 (day 0) ならびに培養 5 日目におい

て、iPSEC-mono、iPSEC-C6 における FD の透過性を解析した結果、iPSEC-C6 の FD 透過量は、iPSEC-mono と比較して有意に減少していることが明らかとなった (Figure 16b)。また、iPSEC-C6 では、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, ZO-1) の発現が有意に上昇していた (Figure 16c)。以上の結果より、C6 細胞と共培養することにより、hiPSECs 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 insert 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 (Figure 16a-d)。

脳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 hiPSECs (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 (multidrug resistance protein 1, 別名 P-gp)、BCR (breast cancer resistance

protein)、MRP-4 (multidrug resistance associated protein 4) および Glut1 の遺伝子発現を半定量的 PCR 法にて解析した (Figure 17a)。その結果、培養開始時の hiPSECs において各トランスポーターの発現はみられなかったが、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 (Figure 17a)。また、Rhodamine-123 は排出トランスポーターで P-gp (別名 MDR-1) の基質である。そこで P-gp の阻害剤である 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、Rhodamine-123 の well 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 (Figure 17b)、iPSEC-C6 に発現している P-gp が機能的であることが示された。なお、Rhodamine-123 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。そこで、MRP-1 の阻害剤を作用させた結果、Rhodamine-123 の移行量に変化はみられなかった (Figure 17b)。以上の結果より、C6 細胞と共培養した hiPSECs では、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。

C-2-4. C6 細胞培養上清による hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化促進作用

C6 細胞と共培養により、hiPSECs が脳血管内皮細胞様の性質を獲得することが明らかとなった。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。本手法では、C6 細胞と iPSECs 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。そこで次に、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。

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 (Figure 18a, b)。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 (Figure 18c)、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 (Figure 18d)。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 (Figure 18e)。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 (Figure 19)。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-2-5. 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 (Figure 20a)。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 (Figure 20b)。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 (Figure 20c, d)。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 (Figure 20c, d)。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 (Figure 21a)、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 (Figure 21b)。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 (Figure 21c, d)。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

D-1-1. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

各種血液細胞の作製に向け、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の検討を行った。その結果、VEGF 存在下で C3H10T1/2 細胞と共培養することで、ヒト iPS 細胞から CD34 陽性 CD43 陽性細胞を得ることが可能となった。さらに、CD34 陽性 CD43 陽性細胞からは多くの血液コロニーが得られた。また、ヒト iPS 細胞の株によっては、VEGF 存在下で C3H10T1/2 細胞と共培養するだけでは血液前駆細胞が得られないことが示唆された。今後、本手法によって得られたヒト iPS 細胞由来 CD34 陽性 CD43 陽性細胞を用いて、各種血液細胞への分化誘導法を確立する。

D-1-2. 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

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 の発現が検出できなかった。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、本分化誘導系に 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 細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導法の確立

D-2-1. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導

脳血管内皮細胞の作製に向け、まずヒト 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結果、EB 形成を介して BMP4 や VEGF を作用させることで、ヒト iPS 細胞から CD34、CD31 および CD144 を発現する血管内皮細胞 (hiPSECs) を作製することに成功した。さらに、脳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。また、それら血管内皮細胞はアセチル化 LDL 取り込み能および Matrigel 上において管腔構造形成能を有することから、機能的な血管内皮細胞であることも示された。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、BBB を構成する細胞として、ニューロン、血管内皮細胞、アストロサイト以外にもミクログリアが知られている。このうち、ミクログリアはマクロファージと形状および機能が非常に似ているため、前述したヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からミクログリアを分化誘導できる可能性がある。ヒト iPS 細胞からミクログリアが分化誘導