

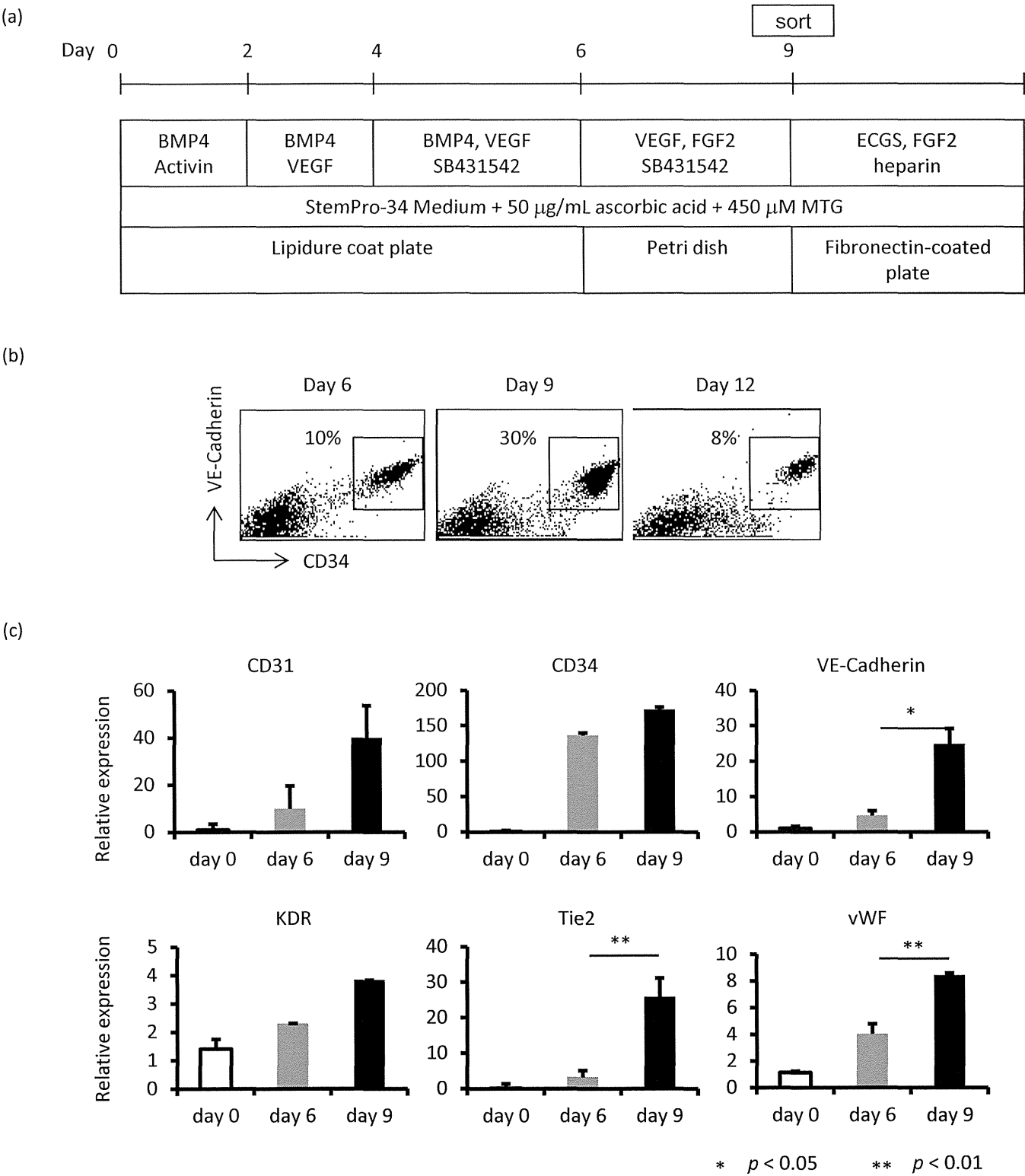


Figure 13 Differentiation of CD34+VE-Cadherin+ cells from human iPS cells by EB formation. (a) Differentiation protocols. (b) The proportion of CD34+VE-Cadherin+ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry. (c) The expression of genes characteristic of endothelial cells in EB cells was investigated by quantitative PCR analysis.

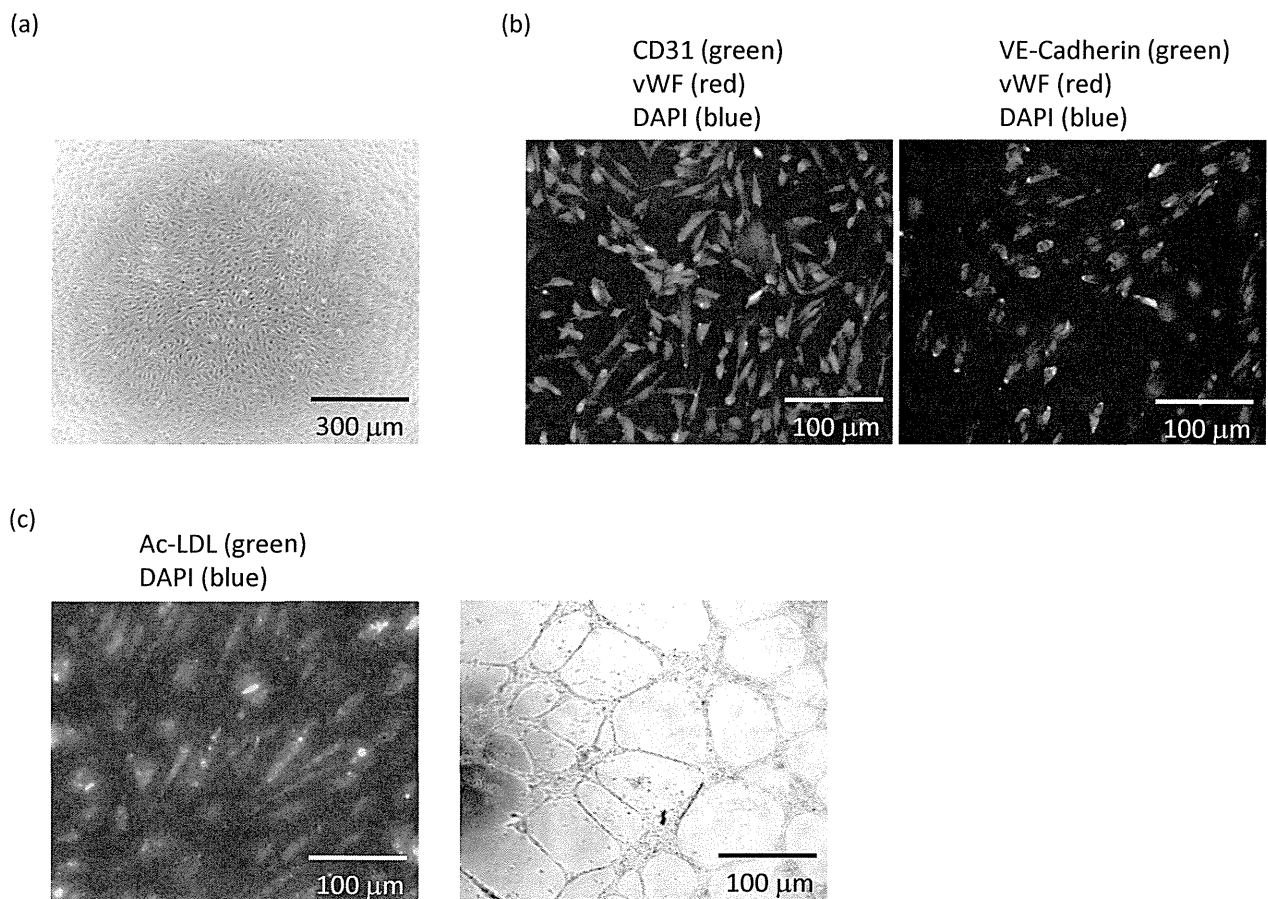


Figure 14 Characterization of human iPS cell-derived endothelial cells. (a) Morphology of human iPS cell-derived endothelial cells. (b) The expression of endothelial marker was examined by immunostaining. (c) Ac-LDL uptake assay (left) and Matrigel tube formation assay (right) were performed.

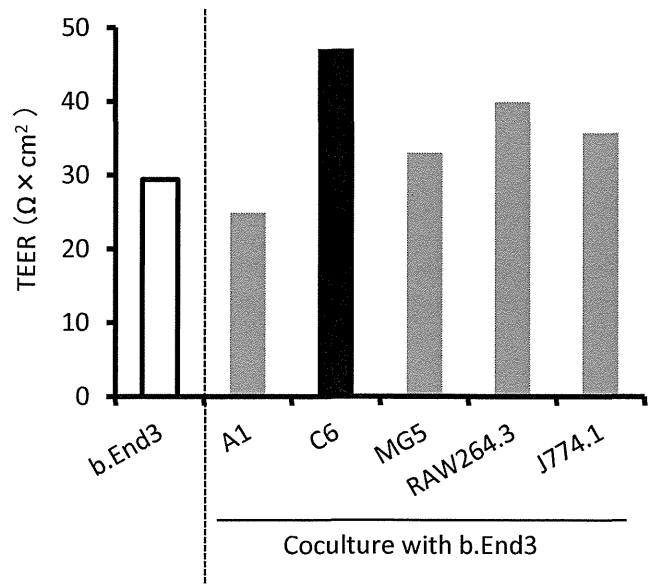


Figure 15 Increased TEER of b.End3 cells by coculturing with C6 cells. After b.End3 cells were cultured with various types of cell lines, TEER of b.End3 cells was measured.

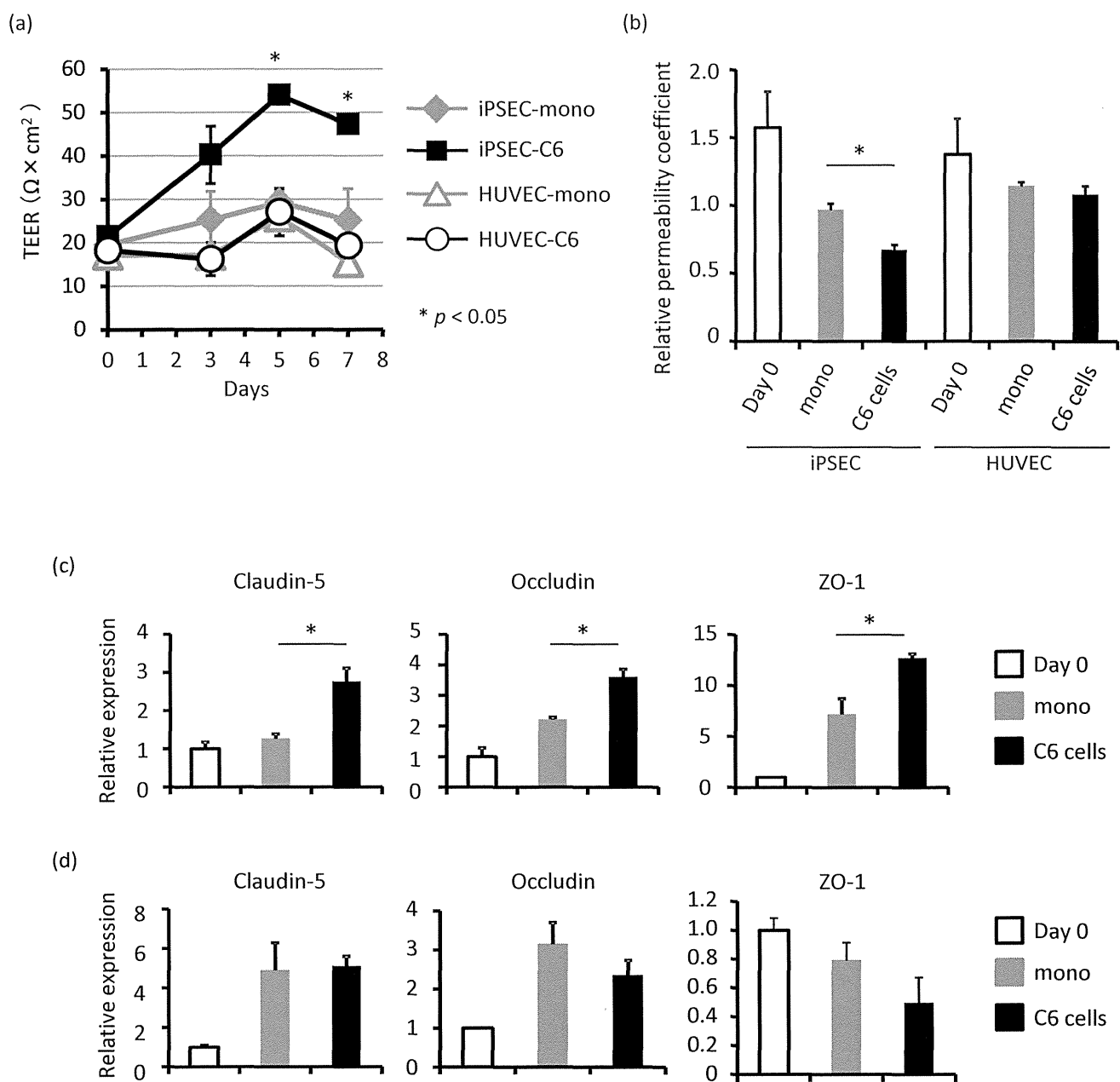


Figure 16 Enhanced barrier function of human iPS cell-derived endothelial cells by coculturing with C6 cells. (a, b) TEER (a) and permeability (b) of human iPS cell-derived endothelial cells and HUVEC was measured after coculturing with or without C6 cells. (c, d) The expression of genes associated with tight junction complexes in human iPS cell-derived endothelial cells (c) or HUVEC (d) was investigated by quantitative PCR analysis.

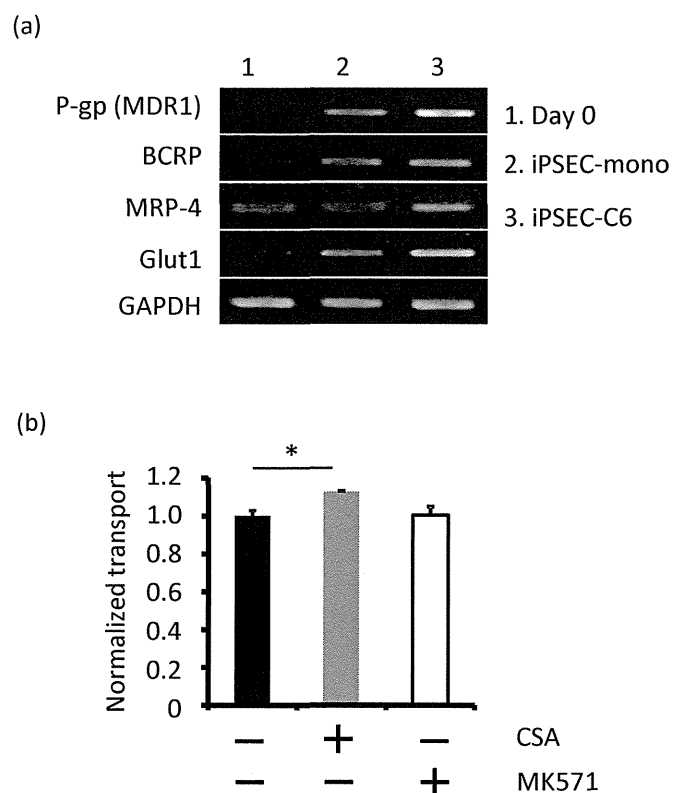


Figure 17 Coculture of Human iPS cell-derived endothelial cells with C6 cells led to the elevation of transporter gene expression.

(a) The expression of transporter genes in the cells were examined by semi-quantitative PCR analysis. (b) The amount of rhodamin123 in the lower chamber was measured in the presence or in the absence of cyclosporin A (CSA) and MK571. Rhodamin123 is known as a substrate for P-gp. To examine the functionality of p-gp, we used CSA and MK571, each of which is a specific inhibitor P-gp and MRP-1, respectively.

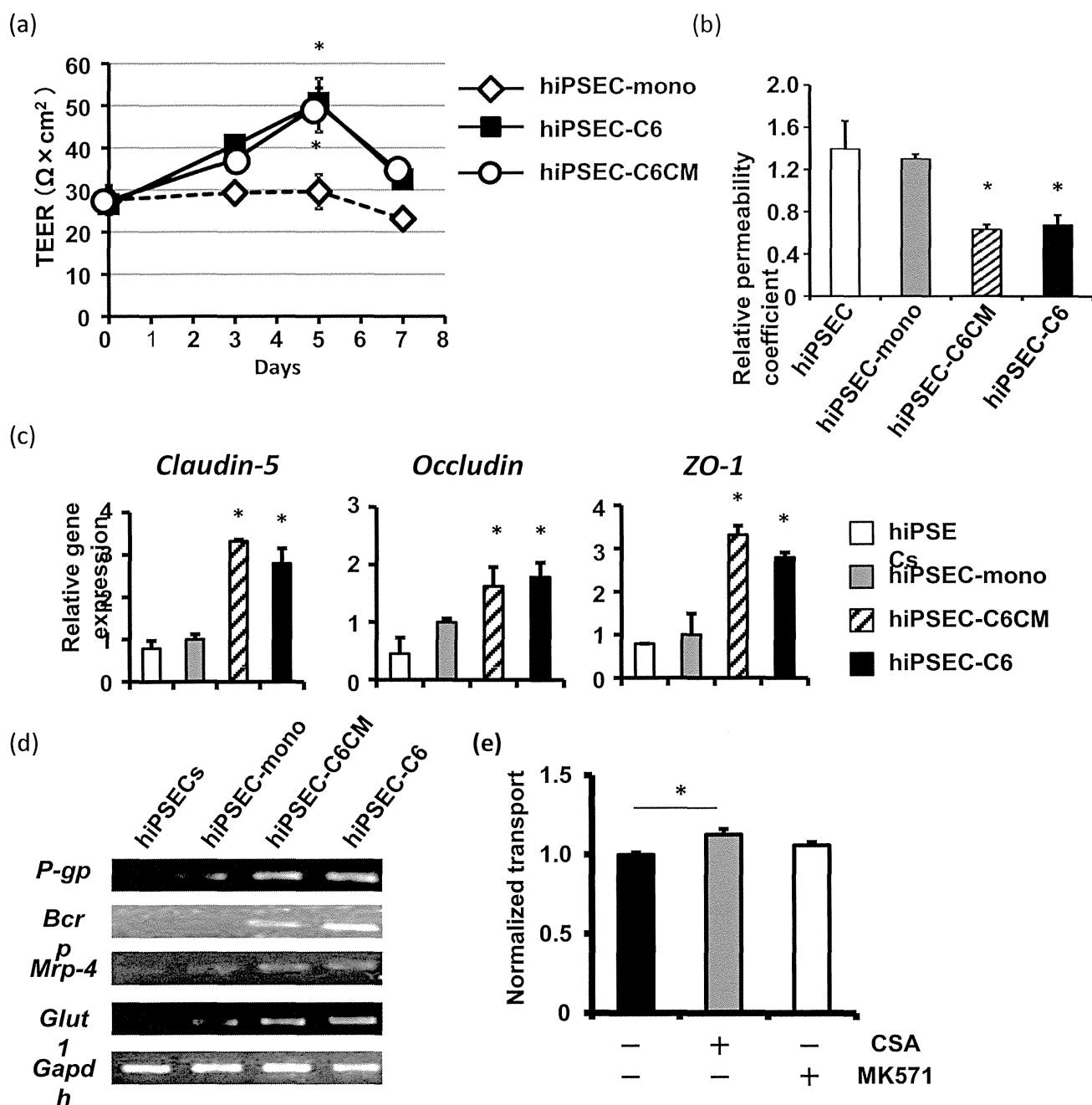


Figure 18 Induction of brain endothelial cell properties of hiPSECs by treatment with C6CM. (a) hiPSEC monolayers were transferred onto non-cell culture (hiPSEC-mono), C6-cell culture (hiPSEC-C6) or C6CM (hiPSEC-C6CM) in 24-well plates. Then, the TEER value of each hiPSECs monolayer was measured at indicated 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.). * $p < 0.05$.

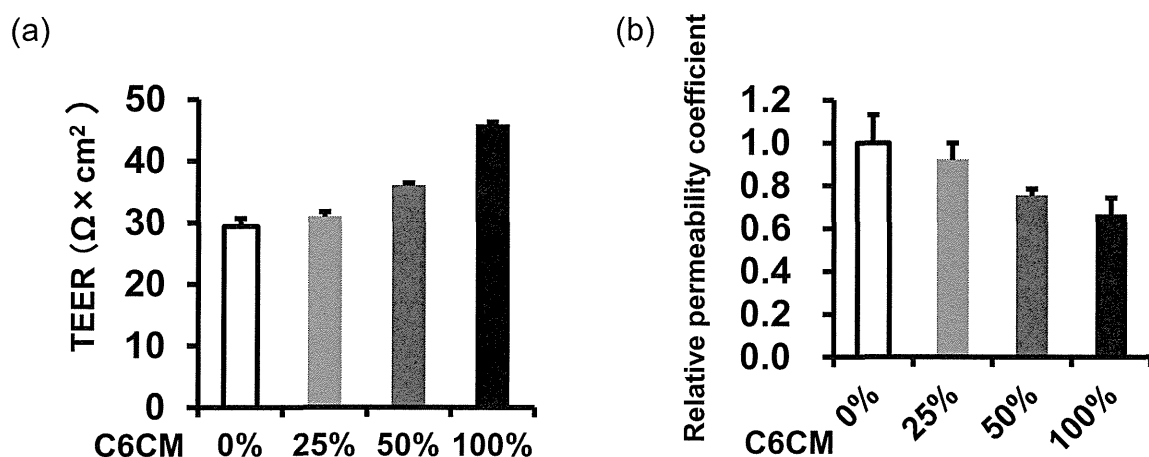


Figure 19 Dose-dependent effects of C6CM on induction of brain endothelial cell properties of hiPSECs. (a) The TEER value of each hiPSEC monolayer treated with 0%-, 25%-, 50%-, 100%-C6CM was measured. (b) The permeability coefficient for FD was measured in hiPSECs treated with 0%-, 25%-, 50%-, 100%-C6CM.

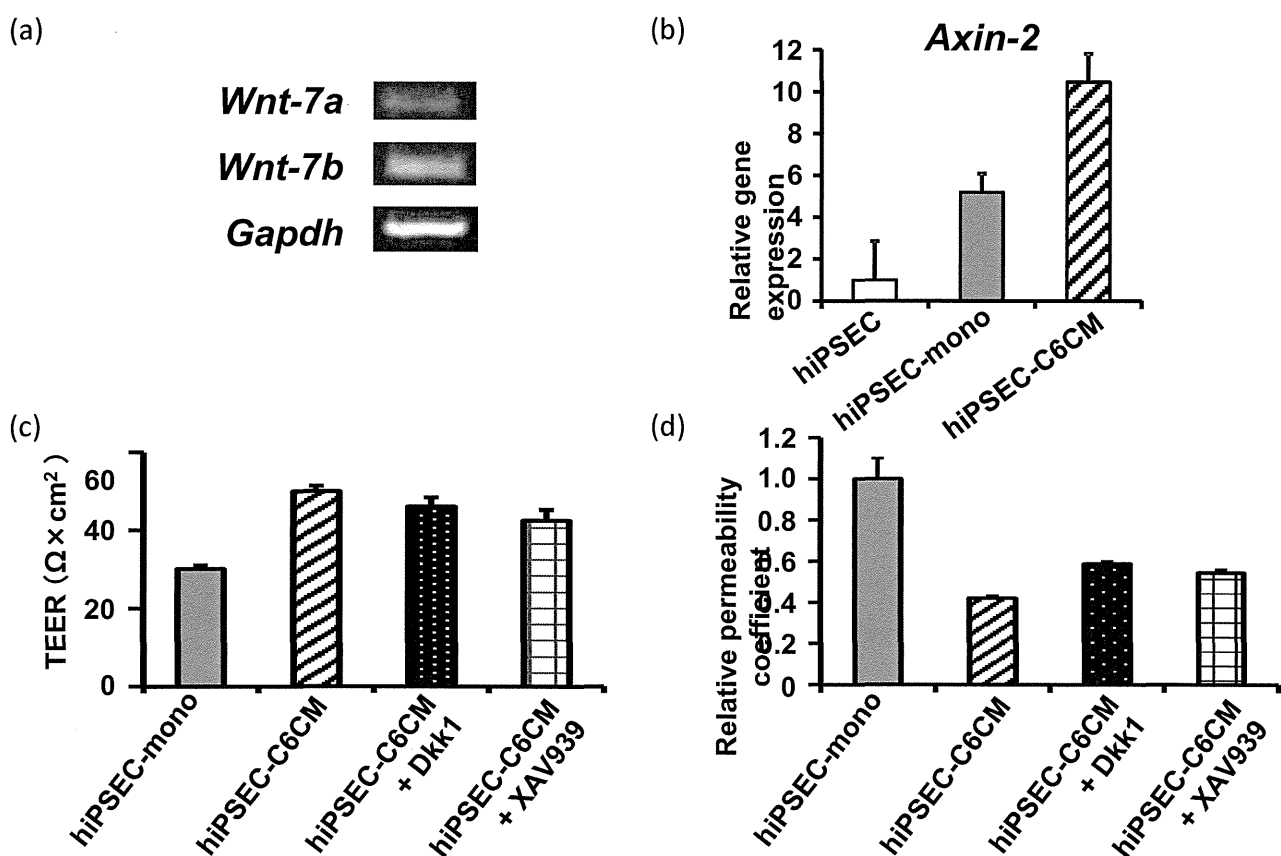
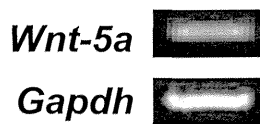


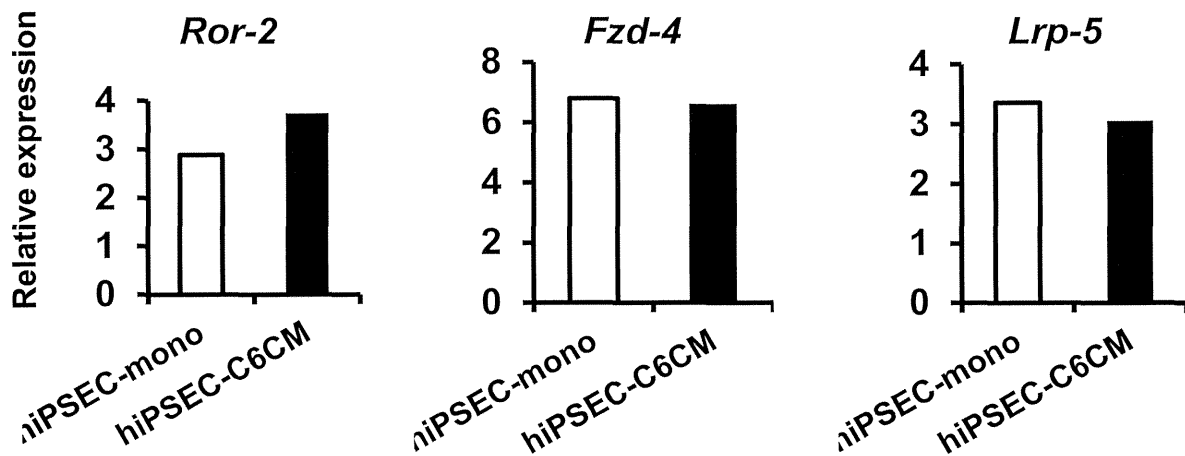
Figure 20 Effects of inhibitors of the canonical Wnt pathway on the differentiation of hiPSECs into brain endothelial cells by treatment of C6CM.

(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.).

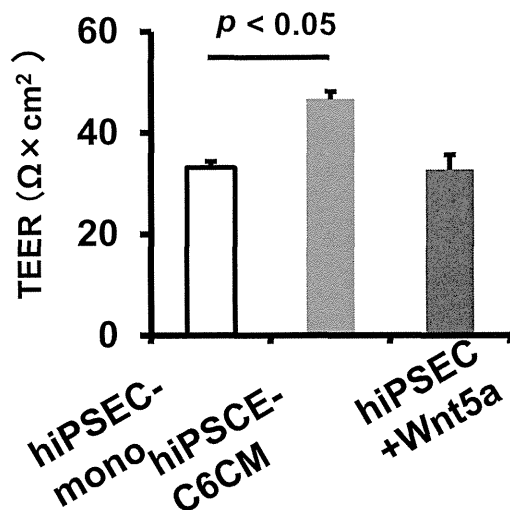
(a)



(b)



(c)



(d)

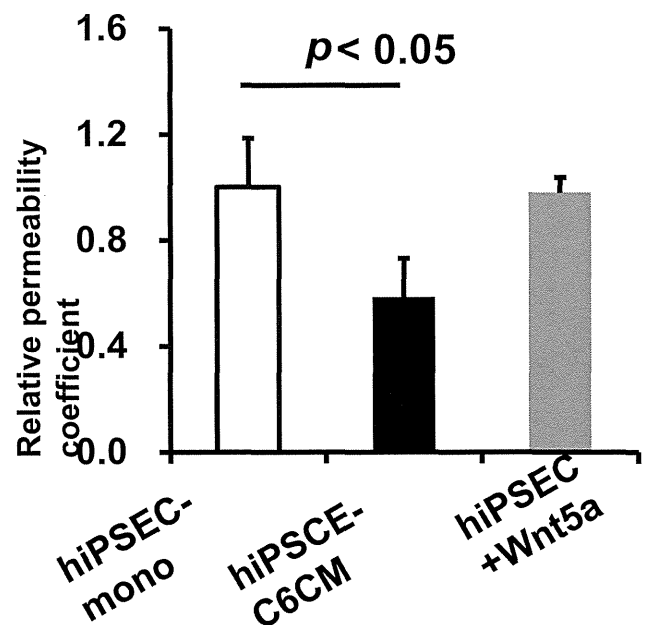


Figure 21 Effects of the non-canonical Wnt pathway on the differentiation of hiPSECs into brain endothelial cells.

(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.). * $p < 0.05$.

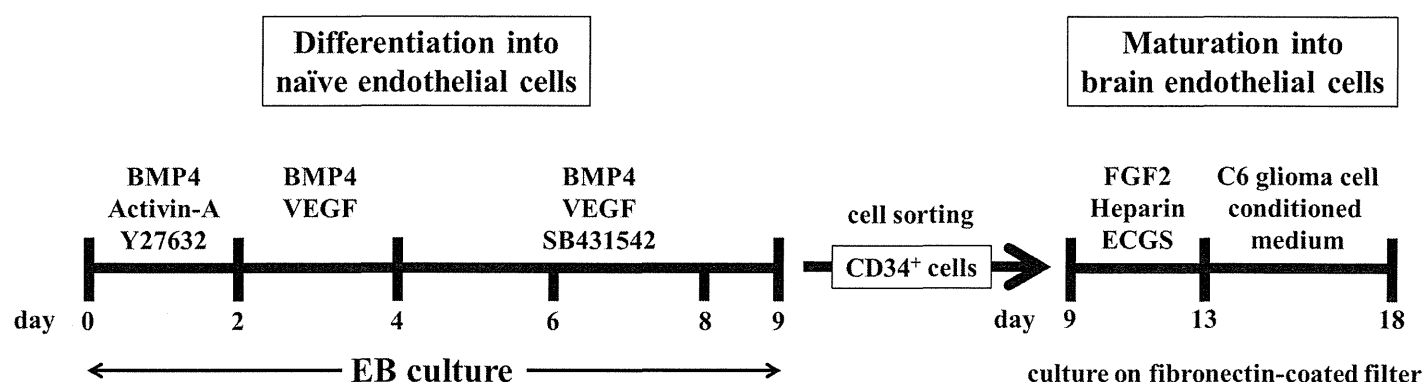


Figure 22 Experimental protocol for the generation of hiPSC-derived brain endothelial cells. hiPSCs were differentiated into CD34⁺ naïve endothelial cells, and further matured to brain endothelial cells.

Table 1 List of primers used in semi-quantitative PCR

Genes	(5') Forward Primers (3')	(5') Reverse Primers (3')
<i>Gapdh</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>Mdr1</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>	CACAATTCCGAGAGCTAGGC	TAGCCTGAGGGGCTGTCTTA
<i>Wnt-7b</i>	GCTATCAGAAGCCGATGGAG	ACGTGTTGCACTTGACGAAG

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

Genes	(5') Forward Primers (3')	(5') Reverse Primers (3')
<i>Gapdh</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTGGTCGTTGAGGGCAATG
<i>Claudin-5</i>	CTTCCAGAAATGGCAAGAGAGTGA	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>Lrp-5</i>	ATGGGCGCCAGAACATCAA	AGATGTCGATGCTGAGGTCGTG

総合報告書

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

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、興奮毒性試験の試行に成功した。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。オールインワン型モデルを達成する基盤技術を確立した。

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。このために、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトにより構成される従来の in vitro BBB モデルにその他の中枢神経系細胞成分 (ミクログリアなど) を添加することにより in vitro BBB モデルの改良をラット由来細胞を用いて試みる。また、オールインワン型モデルへの組み込みに適した、ヒト iPS 細胞由来神経細胞による in vitro 神経毒性評価系を確立する。これらの成果を組み合わせる

A. 研究目的

薬物の中枢神経への作用を考えるうえでは、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

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. *in vitro* BBB モデルの改良

B-1-1. 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、無処置群あるいは、Lipopolysaccharide (LPS) (1000 ng/ml) もしくはミノサイクリン ($10 \mu\text{M}$)+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-1-2. 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-1-3. 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-1-4. 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-1-5. 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 (NAD) (2.5 mg/ml), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide yellow tetrazole (MTT) (0.25 mg/ml), Methylphenazinium 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-1-6. 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。

B-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

B-2-1. 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 (253G1 株) 由来神経幹細胞塊を単一細胞に分散したのち神経細胞に分化誘導し、分化誘導 20 日目に propidium iodide (PI) (2 μ M) および Hoechst 33342 (1 μ g/ml) を培地に添加した。24 時間後、細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1) により観察した。さらに、Propidium iodide (PI) (死細胞にとりこまれて赤色蛍光を発する色素) / Calcein (生細胞にとりこまれて緑色蛍光を発する色素) イメージング、LDH/MTT 同時測定法 (Abe and Matsuki, Neurosci Res, 38(4) 325-9, 2000) によって得られる複数パラメーターに基づき細胞毒性を評価するプロトコルを整備した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞が初代培養齧歯類神経細胞に比較して非常にはがれやすいことから、プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した。ヒト iPS 細胞 (253G1 株) 由来神経幹細胞、iNeuron (CDI 社) の 2 種類のヒト iPS 細胞由来神経細胞における L-Glu 反応性、NMDA 受容体成分の有

無を fura2 カルシウムイメージング法により検討した後、同じ実験バッチのヒト iPS 細胞由来神経細胞を 100 μ M L-Glu に 1 時間暴露し (齧歯類初代培養神経細胞では必ず神経細胞死を引き起こす条件)、24 時間後にヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した細胞毒性試験 (PI/calcein imaging、LDH/MTT 同時測定) を行った。

B-2-2. シナプス機能障害の定量評価化法の確立

胎生 18 日齢ウィスターラットから海馬を取り出し、既報に従い初代培養を行った (Takahashi et al., J Neurosci 23, 6586-6595, 2009)。培養 21 日目にドレブリンの免疫染色および f-actin のファロイジン染色を行った。蛍光像を CCD カメラで撮影し、定量評価法を開発した。また、グルタミン酸暴露 (100 μ M, 10 min) 後のドレブリン、アクチンのスパイン樹状突起スパイン起始部の分布について定量評価を試みた。

(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. *in vitro* BBB モデルの改良

C-1-1. ミクログリア添加 *in vitro* BBB モデルにおける BBB 機能成熟向上

in vitro BBB モデルの成熟期間中、脳側のアストロサイトにミクログリアを 1×10^5 cells / well の密度で添加したところ、TEER の優位な上昇が起こった (Fig. 2A)。NA-F や EBA の透過性には有意な変化は認められなかった。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、ミクログリアを添加した BBB モデルでは、Claudin5 の発現が有意に増大することが明らかになった (Fig. 2B)。

C-1-2. 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. 3A)。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. 3B)。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なかった。

C-1-3. 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 $50 \mu\text{M}$ の L-Glu が含有されており、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 $\gg$ 脳側となり、血管側は $70 \mu\text{M}$ 以上となる (Fig. 4A)。血管側が $50 \mu\text{M}$ 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. 4B)。脳側濃度は変化がなかった。脳血管内皮には L-Glu トランスポーター GLAST、GLT-1、EAAT3 が発現していることが報告されている (Cohen-Kashi-Malina et al., J Cereb Blood Flow Metab 32, 177-189, 2012)。そこで、内皮細胞の 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. 4C)。

C-1-4. 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.5A 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. 5A)。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. 5B)。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。

C-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

C-2-1. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の細胞死評価法の確立

ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞では分化誘導中に生存細胞数の減少が起こる。そこでこの条件下で生細胞と死細胞の可視化を試みた (Fig. 6A)。Hoechst 染色により全細胞 (生細胞および死細胞の両者) の核が可視化され、PI は細胞膜に侵襲のある細胞

にとりこまれ、死細胞の核が可視化された。また、PI 染色像によりアポトーシスの特徴とされる DNA 断片化やアポトーシス小体も明確に判別できることがわかった (Fig. 6A, arrowheads)。ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した毒性評価プロトコルを確立するため、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 細胞由来神経細胞がこれまで *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に比較して、非常にはがれやすいことから、プロトコルを最適化した (Fig. 6B)。

C-2-2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の興奮毒性検出能力検証 (Fig. 6C)

253G1 由来神経細胞は L-Glu に対してほとんどカルシウム応答性を示さず、NMDA 受容体成分も検出されなかった。一方、iNeuron は総じて L-Glu に対してカルシウム応答を示したが、同じロットでも NMDA 受容体成分が検出されるチューブと検出されないチューブがあった。そこで、NMDA 受容体成分が検出された iNeuron と 253G1 由来神経細胞に、L-Glu を適用した (100 μ M, 1 hr)。253G1 では、PI/Calcein イメージング、LDH/MTT 測定法のいずれのパラメーターでも毒性が検出されなかった。一方、NMDA 受容体成分が検出された iNeuron は上記いずれ

のパラメーターでも有意な細胞毒性が検出された。

C-2-3. シナプス機能影響評価法の確立

細胞骨格タンパク質である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ラット培養海馬神経細胞を用いて確立した。樹状突起において、スパインとその起始部の樹状突起のドレブリン分布比を Fig. 7A で示す様にスパイン樹状突起比 (spine-dendrite ratio: SDR) として算出することに成功した。また、L-Glu 100 μ M を 10 分間適用すると、SDR の有意な低下が見いだされ、シナプス機能障害の SDR による定量化が可能であることが示された (Fig. 7B) (Mizui et al., PLOS ONE 9(1) e85367, 2014 より抜粋)。

D. 考察

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、ノックアウトしても 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、ノ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マイクログリアは Claudin5 の特異的な発現上昇を誘導し、LPS 刺激したマイクログリアは 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 刺激したマイクログリアによって有意に減少した。我々のマイクログリア添加 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 モデルにマイ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、このマイ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、検出機器のブラ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、カルシウムイメージング等で機能的 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

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimori K, Takaki J, Miura M, Shigemoto-Mogami Y, Sekino Y, Suzuki T, Sato K, Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation, J Pharamcol Sci (in press)
2. Shigemoto-Mogami Y, Fujimori K, Ikarashi Y, Hirose A, Sekino Y, Sato K, Residual metals in carbon nanotubes suppress the proliferation of neural stem cells. (2014) Fundam Toxcol Sci, 1(3), 87-94 (2014)
3. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K, (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. J Neurosci 34(5), 2231-2243
4. Fujieda T, Koganezawa N, Ide Y, Shirao T, Sekino Y, An inhibitory pathway controlling the gating mechanism of the mouse lateral amygdala revealed by voltage-sensitive dye imaging. (2015) Neurosci Lett. 590C:126-131. doi: 10.1016/j.neulet. 2015.01.079
5. Nagakubo T, Demizu Y, Kanda Y, Misawa T, Shoda T, Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M, Development of Cell-Penetrating R7 Fragment -Conjugated Helical Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. (2014) Bioconjug Chem. 25(11): 1921-1924
6. Hirata N., Yamada S., Shoda T. ,Kurihara M., Sekino Y, Kanda Y, Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation. Nat Common. 5: 4806. doi: 10.1038/ncomms5806. (2014)
7. Kim SR, Kubo T, Hojyo M, Matsuo T, Miyajima A, Usami M, Sekino Y, Matsushita T, Ishida S, Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in human. (2014) J Toxicol Sci. 39(5): 717-723
8. Yamada S, Kotake Y, Demizu Y, Kurihara Y, Sekino Y, Kanda Y, NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. (2014) Sci. Rep. 4: 5952. doi: 10.1038/srep05952
9. Nakamura Y, Matsuo J, Miyamoto N, Ojima A, Ando K, Kanda Y, Sawada K, Sugiyama A, Sekino Y, Assessment of testing methods for