

細胞機能の評価に着目した MPS デバイスの開発

研究分担者：松永民秀 名古屋市立大学 教授

研究要旨

血液脳関門（BBB）は脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトから構成されている。これまで、どのような化学物質が BBB を通過して神経毒性を示すのかを評価するための *in vitro* システムは皆無に等しかった。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を播種した多電極アレイ（MEA）とヒト iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を播種したセルカルチャーインサートを Microphysiological System（MPS）デバイスに搭載し、メカニズムベースに予測性の高い化学物質の BBB 透過性と神経毒性の評価を開発することを目的としている。本研究の中で我々は、MPS に搭載する細胞株選択および培養条件の検討を担っており、特にヒト iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を構築し MPS に搭載、多電極アレイ（MEA）と統合することを目標としている。

A. 研究目的

MPS 上での iPS 細胞由来 BBB 構成細胞の培養条件の検討および iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を搭載した MPS と MEA の統合に向けた開発を目的とする。本年度においては 2 層灌流デバイス上においてヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞にシエアストレスをかけた場合における遺伝子・タンパク質発現の変化、透過性試験の開発、BBB を構成するアストロサイトおよび脳ペリサイトとの共培養実験を行い、ヒト iPS 細胞由来 BBB 構成細胞を搭載した MPS の開発を目標とした。また、MEA 搭載型 2 層灌流デバイスの開発にも着手した。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を 2 層灌流デバイス上に播種し、48 時間シエアストレスをかけた後、RNA 抽出を行い BBB マーカーにおける遺伝子発現について解析を行った。また、2 層灌流デバイスの上層部をルシファーイエローにて満たした後、上層部および下層部を様々な流速で灌流し、経時的（20、40、60 分）に下層部の溶液を回収することで、細胞間隙による透過性を解析した。また、ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を長期間にわたって、高い経内皮電気抵抗（TEER）値を維持できる培地が研究代表者によって発見されたことに伴い、同様に高い TEER 値を維持したまま培養できるかどうかを測定した。

C. 研究結果

2 層灌流デバイス上にヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を播種し 24 時間静置培養から流速を徐々に上げながら、培地を灌流することで細胞にシエアストレスを 48 時間かけた。その結果、タイトジャンクションマーカーである ZO-1 や生体内の脳毛細血管内皮細胞にて高発現している GLUT-1 が発現していることが示された（図 1）。さらに、シエアストレスをかけることで、静置培養と比較して排泄トランスポーターである P-gp や GLUT-1 の遺伝子発現が有意に高くなることが示された（図 2）。さらに、デバイスの下チャネルのみ 19 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で灌流を行いながらルシファーイエローによる透過性試験を行ったところ、いずれにおいても静置培養時と同様の $2.0 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{sec}$ 程度の透過係数を得た。

このことから、タイトジャンクション機能が十分に機能し、細胞間隙による透過は認められないことが確認できた（図 3）。

D. 考察

ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を播種した 2 層灌流デバイスを用いた結果、細胞間隙におけるタイトジャンクション機能は静置培養と同程度であることが示された。さらに細胞にシエアストレスをかけることでトランスポーターなどの遺伝子発現が有意に増加したことから、灌流によるシエアストレスは細胞における機能を増加させることが示唆される。

E. 結論

2 層灌流デバイスを用いることにより、静置培養と同等またはそれ以上の機能を有することが示された。今後、このデバイスと MEA を搭載したデバイスを連結させることで、BBB を透過する物質による評価が可能な MPS 開発へと繋げていく。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

竹内規晃，西川斗偉，坂下真大，岩尾岳洋，常喜祥子，広瀬賢一，山中 誠，小柳 博，畠山 健治，松永民秀。ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた BBB-on-a-chip の開発。合同会社メドテックコンサルティング創業記念学術集会，東京，2023 年 7 月 3 日。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

(図表は以下、1ページに1点でお願いいたします。)

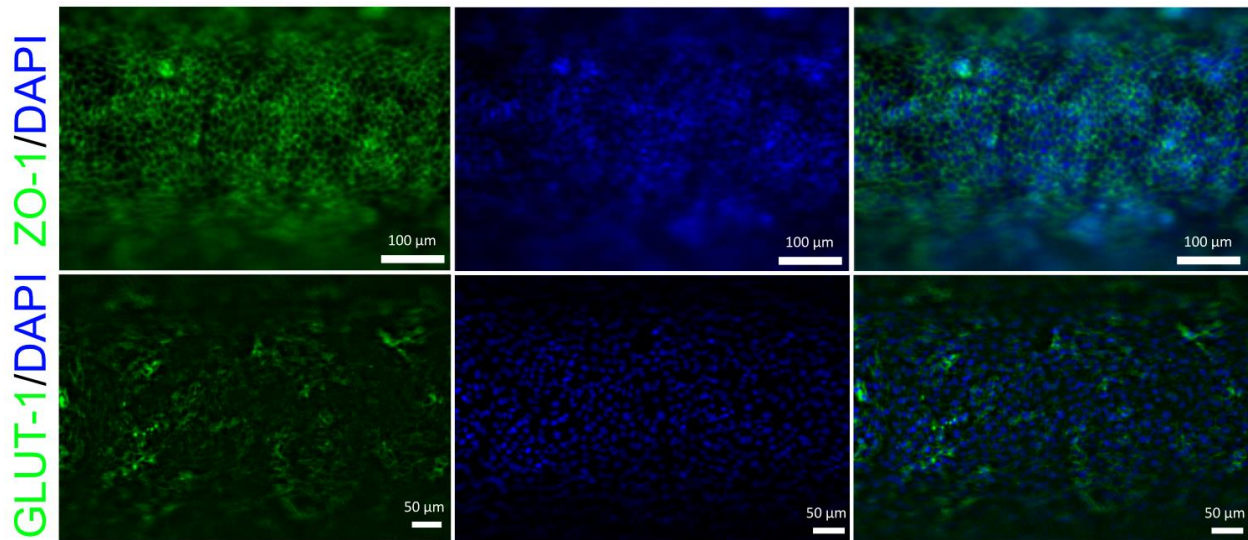


図1 2層灌流デバイスに播種したヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるタンパク質発現

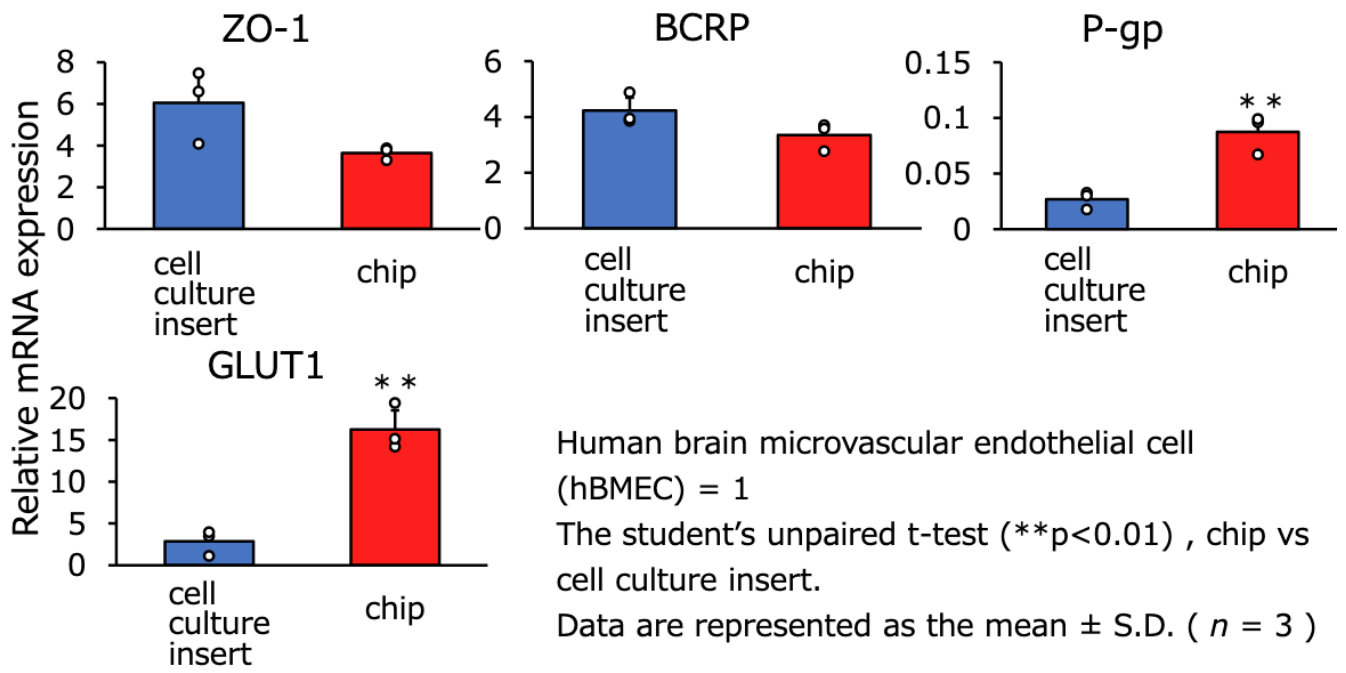


図2 2層灌流デバイスに播種したヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞と静置培養における遺伝子発現の変化

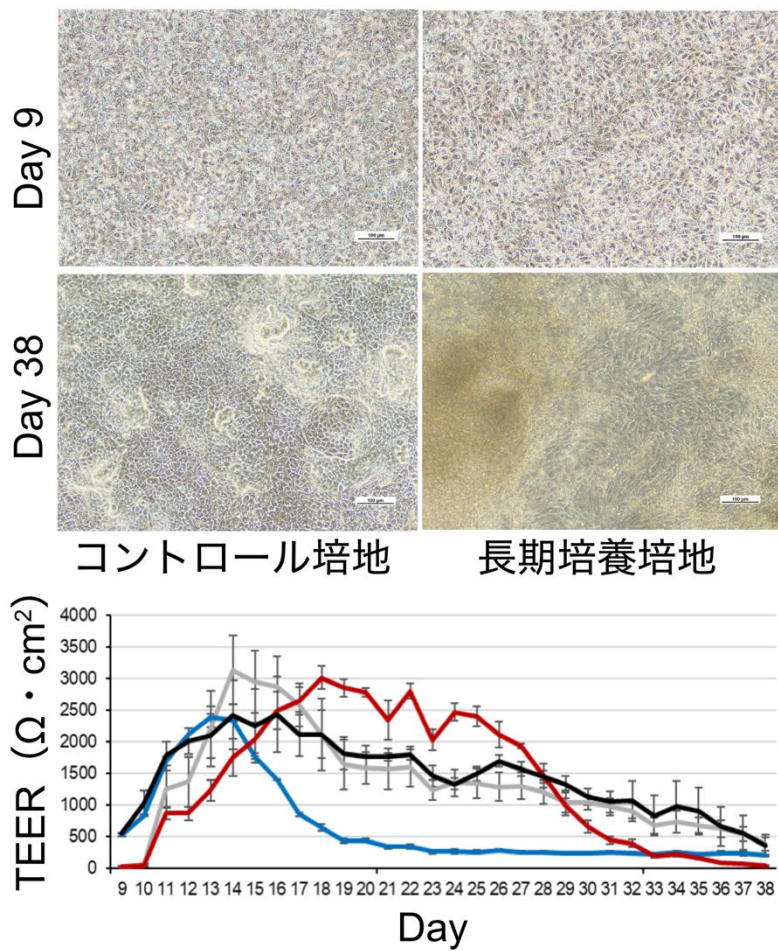


図3 長期培養培地によるヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞のタイトジャンクション機能と細胞形態の変化