

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 （課題番号：22KD1002）
 令和4-6年度総合報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発
 研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
 分担課題：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 特任教授

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上でのヒトiPS細胞由来BBB細胞の培養条件の検討およびヒトiPS細胞由来BBB細胞を搭載したMPSとMEAの統合に向けた開発を目的とした。初年度（R4年度）においては、スタンディングタイプのセルカルチャーインサート上においても、高い経内皮的電気抵抗（TEER）値を維持した培養が可能かどうかを調べることを目的とした。次年度（R5年度）においては2層灌流デバイスにおいてヒト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細胞を搭載したMPSの開発を目標とした。最終年度（R6年度）においては2層灌流デバイスにMEAを連結できる方法を開発、灌流時における神経細胞への影響を調査し、デバイスを改良することを目標とした。

B. 研究方法

【R4年度】

ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞をスタンディングタイプのセルカルチャーインサートに播種し、チップスティック型の測定器を用いて経内皮的電気抵抗（TEER）値を測定した。また、ルシファーイエローを用いた透過性試験により、傍細胞経路輸送についても確認した。

【R5年度】

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。

【R6年度】

開発してきた2層灌流デバイスに既存のMEA（MaxWell Biosystems社）を連結し、MEA側に播種したラット初代培養神経細胞に灌流の影響がでないか神経活動電位を長時間測定した。灌流培養用ポンプには圧力駆動型ポンプ（Fluigent社製）を用い、20、40、80 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で灌流を行った。

C. 研究結果

既存のセルカルチャーインサートと同様に、スタンディングタイプのセルカルチャーインサートにおいても、TEER値を測定できることを確認した。また、得られたTEER値は、既存のセルカルチャーインサートよりもやや低い値ではあったものの、 $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ を超える値を示したことから、タイトジャンクション機能を十分に備えていることが示された。また、ルシファーイエローを用いた透過性試験においても、 $2.2 \times 10^{-5} \text{ cm}/\text{sec}$ の値を示し、TEER値同様、高いタイトジャンクション機能を有していることが確認できた（図1）。

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挙げながら、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2）。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3）。また、デバイスの下チャンネルのみ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4）。

2層灌流デバイスにMEAを搭載したデバイスの開発を

進めてきたが、既存のMEAと2層灌流デバイスを一体化させる方法が困難を極め、一体型デバイスの開発を断念した。そこで、2層灌流デバイスとMEAを配管にて連結したMEA連結型BBB-on-a-chipの開発を行い（図5）、既存のMEA側にシリコン製のカバーを被せ、上部を厚めの蓋で押さえつけることで灌流できる装置を開発した。当初、MEA側に取り付けた配管の入口側と出口側の高さを培地液面と同様にして灌流操作を行った。その結果、電極すべてにノイズが生じ神経活動電位を測定することが困難であった。

次にMEA側に取り付けた入口側の配管の高さを短くし、培地液面と接しないように改良した。その結果、灌流培養を行いながら神経活動電位を測定することに成功した。しかし、同じ間隔でノイズが生じる現象も生じたため、灌流速度を20, 40, 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ の3通りで測定を行ったところ、ノイズが生じる間隔が灌流速度の増加に伴い短くなることが判明した。

D. 考察

スタンディングタイプのセルカルチャーインサートを用いた場合においても高いタイトジャンクション機能を有することが確認できた。

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された。

MEAにおいて灌流ができるように改良した装置では、MEA内の液培地液面と入口側および出口側の配管が繋がってしまったことで、MEA内に電流が流れ込み実測値にノイズが生じる結果となった。そこで、改良型では入口側の配管を培地液面より高くすることで培地との接地を避ける構造にした。その結果、全ての電極にノイズが生じることはなくなったが、一定間隔でノイズが生じる現象が生じるようになった。灌流速度を変更したところ、灌流速度依存的にノイズ間隔が短くなることが判明し、入口側の配管で生じている液滴がMEA内の培地液面に落ちる際にノイズが生じていると考察された。

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。また、MEA側に配管をつなげることで、神経細胞上で灌流を生じさせることに成功した。一方、神経活動電位の測定には、ノイズを生じさせない方法が必要であることも判明した。本研究にて得られた課題をもとに、これらの課題を解決したMEA連結型BBB-on-a-chipの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、山下美紗季、坡下真大、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. 日本薬学会 第143年会, 2023年3月26日.

竹内規晃, 西川斗偉, 坡下真大, 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.

Hiroyuki Sato, Kaho Nakai, Yuri Ikeda, Nagae Kazue, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga. Evaluation of receptor-mediated uptake and transcytosis using human iPS cell-derived brain microvascular endothelial-like cells, 2024 International Society for the Study of Xenobiotics/The Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Hawaii, 2024年9月15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。)

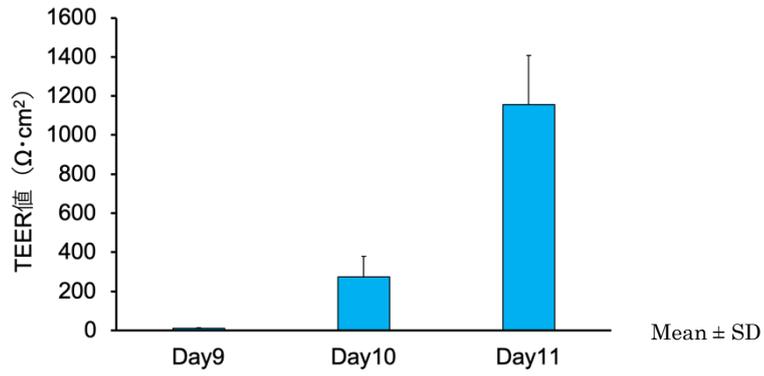


図1 スタンディングインサート上に播種したヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞の経内皮的電気抵抗値

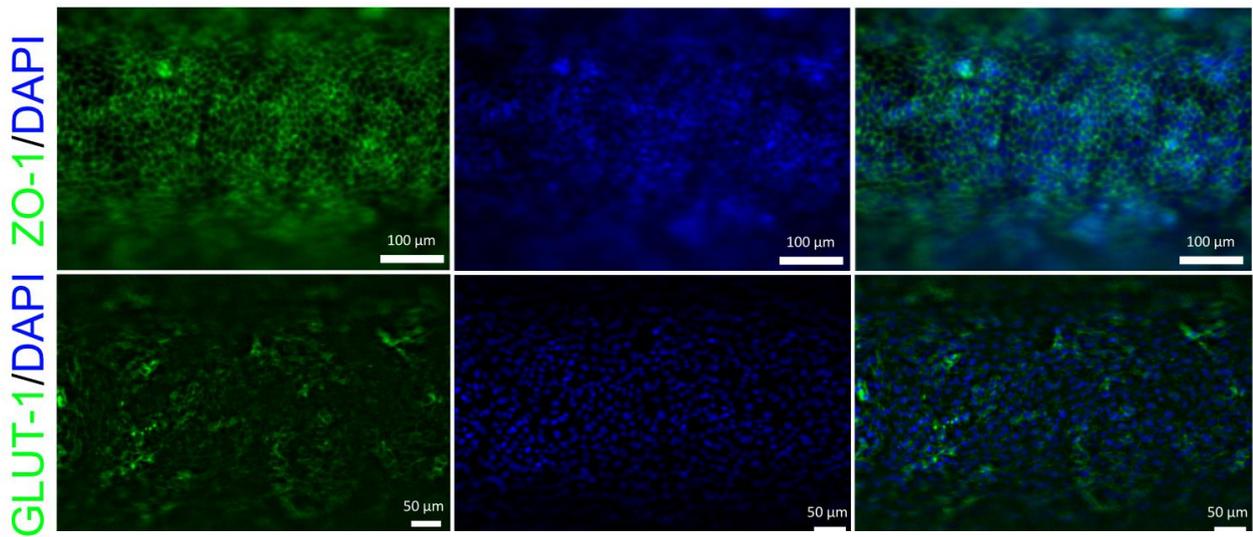


図2 2層灌流デバイスに播種したヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるタンパク質発現

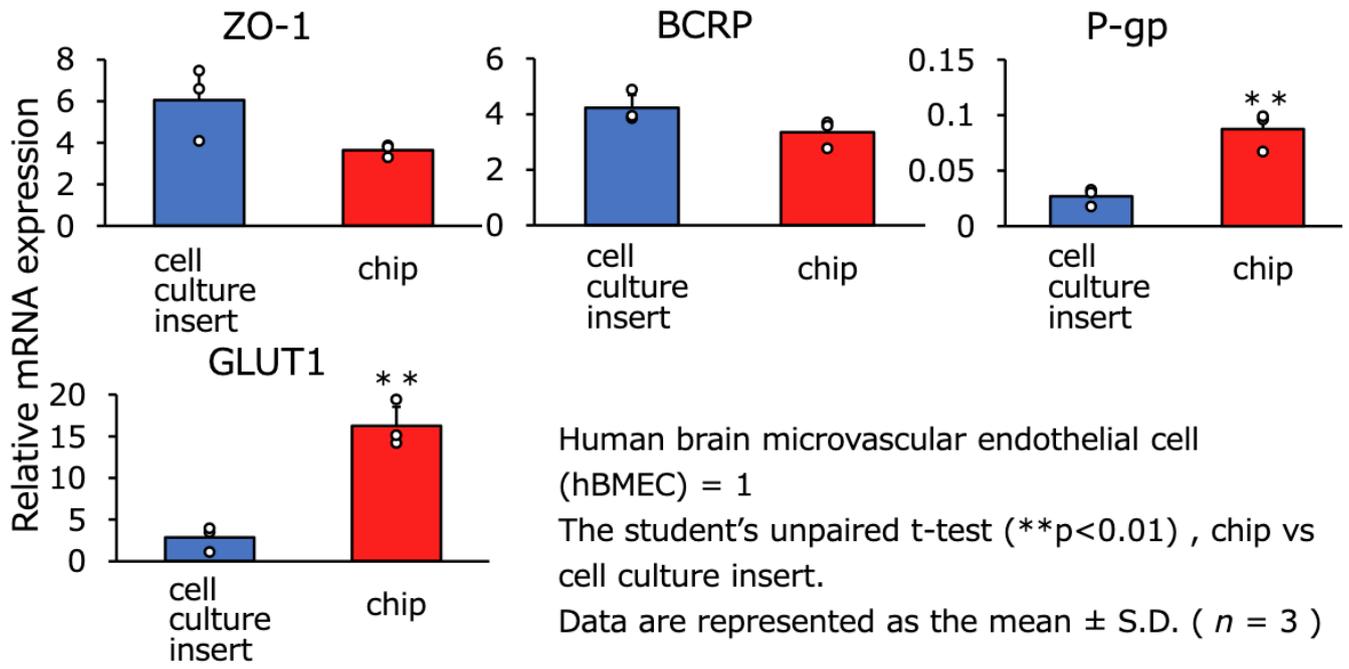


図3 2層灌流デバイスに播種したヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞と静置培養における遺伝子発現の変化

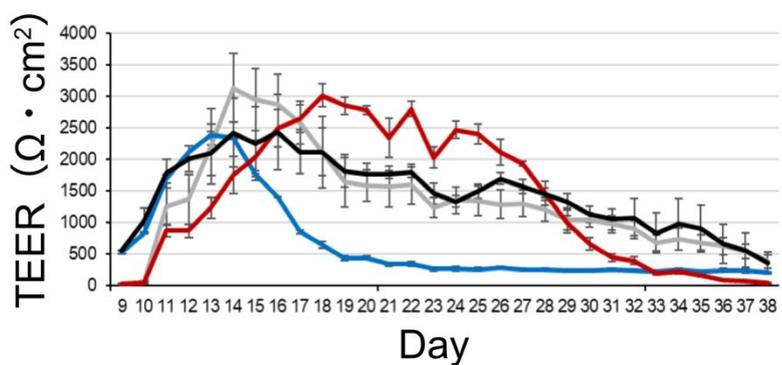
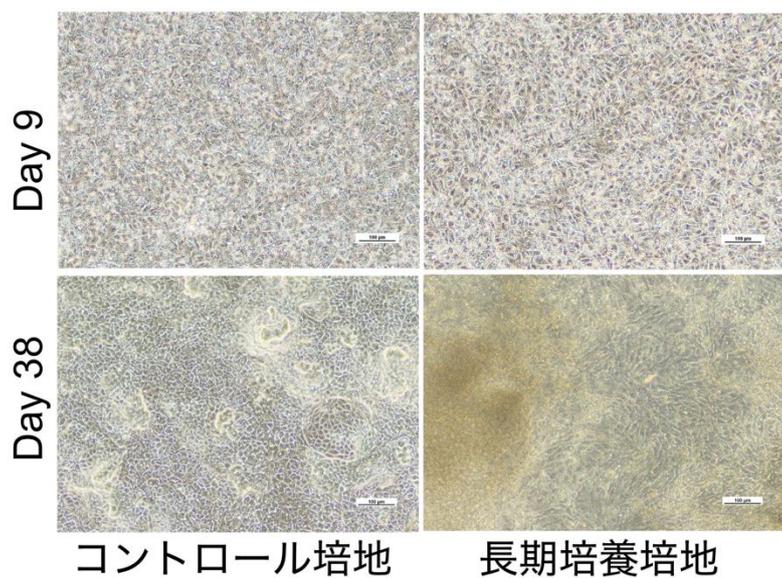


図 4 長期培養培地によるヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞のタイトジャンクション機能と細胞形態の変化

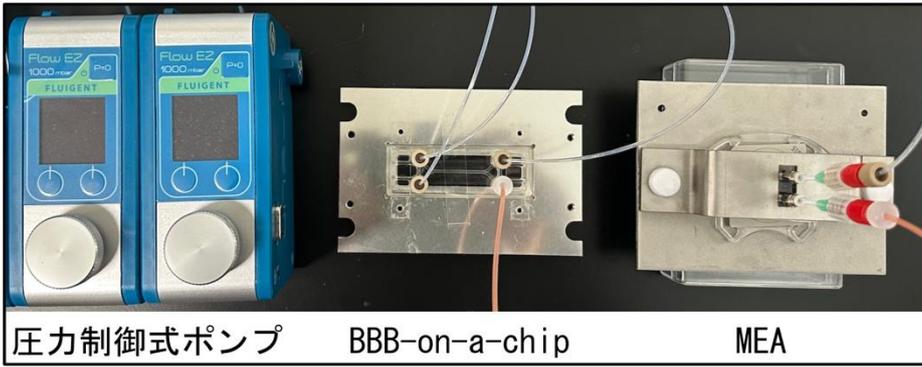


図5 開発中のMEA連結型BBB-on-a-chip