

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08422

研究課題名(和文)新規ヒトiPS細胞由来血管内皮前駆細胞を用いた血液脳関門モデルの構築

研究課題名(英文)The construction of a blood-brain barrier model using novel human iPS cell-derived endothelial progenitor cells

研究代表者

坂下 真大 (Hashita, Tadahiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師

研究者番号：20613384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、我々はヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞(hiEPC)の血液脳関門(BBB)機能を向上させる因子の発見、ヒトiPS細胞由来血管内皮前駆細胞から脳毛細血管内皮細胞(BMEC)への成熟化を開発し、不死化BMECと同等の経内皮電気抵抗値を示す培養法の同定、hiEPCの大量培養を可能にする低分子化合物の発見、hiEPCの凍結保存法の開発、BMECの分化形質を向上させる不死化アストロサイトと不死化ペリサイトとの共培養法の確立、ヒトiPS細胞由来BMECの遺伝子発現量をmRNA-seqにより網羅的に解析することでBBB機能を高めるために必要な遺伝子群を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経を標的とした医薬品の開発において、医薬品が脳内へ移行できるかどうかはBBBの影響が大きい。そのため、生体内のBBBを模倣したモデルは創薬研究等において非常に重要であるが、開発は難航している。本研究成果は、これまでのBBBモデルに利用されていた不死化細胞を上回る機能を持ったiPS細胞由来BMECの開発に成功し、またアストロサイトやペリサイトと共培養によりBBBモデルの構築が可能であることを示した。さらに、BMECの前駆細胞を大量に培養する方法の確立ならびに凍結保存方法の開発にも成功しており、iPS細胞由来BMECを用いたBBBモデルの創薬研究や薬物動態研究への応用を確立できたといえる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we 1) discovered factors that improve blood-brain barrier (BBB) function of human iPS cell-derived brain microvascular endothelial cells, 2) identified a culture method to mature human iPS cell-derived endothelial progenitor cells into brain microvascular endothelial cells (BMECs) that exhibit transendothelial electrical resistance (TEER) values above those of immortalized BMECs, 3) discovered small molecule compounds that enable mass culture of human iPS cell-derived endothelial progenitor cells, 4) developed a cryopreservation method for human iPS cell-derived endothelial progenitor cells, 5) established a co-culture method for immortalized astrocytes and immortalized pericytes that improve the differentiation of BMECs, and 6) discovered genes needed to enhance BBB function by comprehensively analysis of gene expression levels of human iPS cell-derived BMECs using mRNA-seq.

研究分野：臨床薬学

キーワード：血液脳関門 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品やサイトカインなど様々な物質の脳への移行を制限している血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) は、脳毛細血管内皮細胞 (Brain Microvascular Endothelial cells: BMEC) を中心として、その周囲に周皮細胞 (ペリサイト) が数多く接着し、星状膠細胞 (アストロサイト) の足突起がさらに覆う構造をとっている。これまで薬物動態研究や創薬研究に応用するために、BBB の構造を *in vitro* で模倣する取り組みが数多く取り組まれてきたが、生体内の BBB 機能には及ばなかった。特に、BBB 機能において物質の脳内移行の制限を担っている BMEC 間ジャンクションが生体内の BBB と比較して著しく低いことが報告されている。ところが、2012 年に Lippmann らにより **非常に強固な BMEC 間タイトジャンクションを形成する iPS 細胞由来 BMEC が発表**され、その後いくつかの iPS 細胞株においても同様に報告された。Lippmann らの方法では、iPS 細胞を bFGF 不含 iPS 培地で 5 日間培養後、血管内皮細胞用培地で 4 日間培養し、ラット初代培養アストロサイトや初代ヒト胎児神経細胞塊と共培養することで、BMEC へ分化させる。BMEC としての機能は高いが、分化方法を含めた次の 3 点において非常に煩雑であり再現することが難しい。

- (1) iPS 細胞から分化させた BMEC 塊は神経細胞との混合物であり、BMEC のみの機能を測定している訳ではない。
- (2) 共培養させるラット初代培養アストロサイトの単離が煩雑であることや初代ヒト胎児神経細胞塊の入手が非常に難しい。
- (3) 生体内 BBB の構造を模倣した BMEC とペリサイト、アストロサイトの 3 種類を共培養させた実験を行っていない。

本研究では以上の 3 点を下記に示す方法で改良することで、生体内 BBB モデルを簡便に構築する方法を確立することを目的としている。

2. 研究の目的

これまで薬物動態研究や創薬研究に応用するため、様々な BBB モデルの構築が行われてきたが、残念ながら生体内と同等の機能をもったモデルの構築にはいたっていない。だが最近、iPS 細胞から作製した BMEC とアストロサイトを用いた BBB モデルが、生体内に近いタイトジャンクション機能をもっていることが報告された。iPS 細胞から BMEC へ分化誘導することが重要であると考えられたが、実験方法が非常に煩雑であり簡便に再現できる方法ではない。そこで本研究では、我々が確立した新規ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞と既に樹立されている温度感受性ヒト不死化アストロサイトとペリサイトを用いて、簡便に生体内と同様の機能をもつ BBB モデルを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、我々が確立したヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞、温度感受性不死化ヒトアストロサイトとペリサイトを用いて、BBB モデルを構築し、下記のような方法で機能を解析する。

- (1) RT-qPCR 法による iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞から BMEC への分化誘導の確認
 - (2) 経内皮電気抵抗値測定による、BBB モデルにおけるタイトジャンクション機能の測定
 - (3) 薬物透過試験によるトランスポーター機能の測定
 - (4) トランスポーターの局在、タイトジャンクションの形態学的解析
- iPS 細胞由来 BMEC の網羅的遺伝子解析による BBB に必須な遺伝子の同定

4. 研究成果

本研究課題において、我々は ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞の BBB 機能を向上させる因子の発見、ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞から BMEC への成熟化を開発し、不死化 BMEC 以上の経内皮電気抵抗 (TEER) 値を示す培養法の同定、ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞の大量培養を可能にする低分子化合物の発見、ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞の凍結保存法の開発、BMEC の分化形質を向上させる不死化アストロサイトと不死化ペリサイトとの共培養法の確立、ヒト iPS 細胞由来 BMEC の遺伝子発現量を mRNA-seq により網羅的に解析することで、BBB 機能を高めるために必要な遺伝子群を発見した。

ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞から BMEC への分化誘導法の開発 (および) においては、BBB 機能を向上させる因子の組み合わせを発見した。

ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞の大量培養・凍結保存法の開発(および)については、低分子化合物の組み合わせにより低分子化合物非添加群と比較して 100 倍程度増殖能力を高めることに成功した(図 1A)。さらにこの方法によって、内皮細胞の老化を示す β -ガラクトシダーゼの値が細胞増殖を繰り返しても抑えられていることを示した(図 1B)。このことから、前駆細胞としての能力を維持したまま大量培養が可能であることが示唆される。凍結保存についても、血管内皮前駆細胞の機能を失うことなく長期間凍結保存後に解凍することが可能であることが示され、凍結保存法の開発にも成功している。

BBB モデルの構築()に関しては、まず最初にヒト不死化 BBB 細胞を用いて共培養法の開発を行った(図 2)。ヒト不死化 BBB 細胞を用いたモデルの開発によりトランスウェルプレートを用いた二次元型プロトタイプ BBB モデルの構築に成功した。また、この BBB モデルを用いて医薬品等による BBB 透過性についても解析を行った(図 2B)。

BMEC において BBB 機能を高めるために必要な遺伝子群()について、iPS 細胞由来 BMEC の mRNA-seq による解析を行い発見した。iPS 細胞由来 BMEC には、我々が発見したタイトジャンクション機能を向上させる低分子化合物添加群と非添加群を比較して、有意に上昇する遺伝子群を解析した。その結果、我々が発見した低分子化合物は、既に報告のあるタイトジャンクション機能を高める遺伝子群ではあったが、それらの発現を高めることでタイトジャンクション機能を亢進していることが示された。

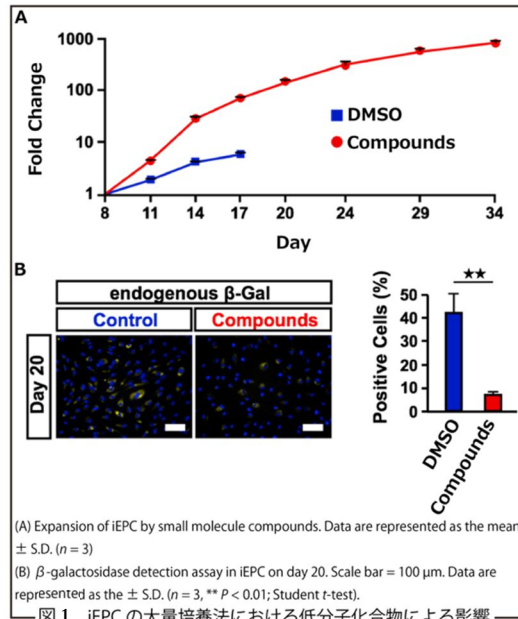


図 1 iEPC の大量培養法における低分子化合物による影響

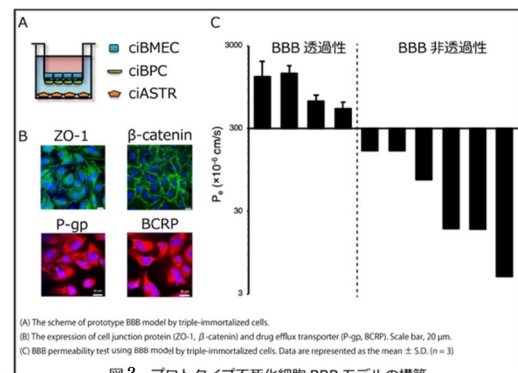


図 2 プロトタイプ不死化細胞 BBB モデルの構築

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Aoki Hiromasa, Yamashita Misaki, Hashita Tadahiro, Nakayama Mizuki, Yagi Mayuko, Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide | 4. 巻 515 |
| 2. 論文標題 Isolation of induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells from sac-like structures | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 672 ~ 678 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.05.179 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂下 真大 |
| 2. 発表標題 血液脳関門（BBB）モデルを目指したヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞の開発と課題 |
| 3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第32回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiromasa Aoki, Misaki Yamashita, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga. |
| 2. 発表標題 Differentiation of human iPS cell-derived endothelial progenitor cells into brain microvascular endothelial cells. |
| 3. 学会等名 The 55th Congress of the European Societies of Toxicology（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Misaki Yamashita, Hiromasa Aoki, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga. |
| 2. 発表標題 Differentiation and freeze, thawing of human iPS cell-derived brain microvascular endothelial cells. |
| 3. 学会等名 The 55th Congress of the European Societies of Toxicology（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Misaki Yamashita, Hiromasa Aoki, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga |
| 2. 発表標題 Effect of compounds Y on the barrier function of human iPSCs derived brain microvascular endothelial cells. |
| 3. 学会等名 The 54th Congress of the European Societies of Toxicology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Misaki Yamashita, Hiromasa Aoki, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga |
| 2. 発表標題 Development of a novel blood brain barrier model derived from human iPSCs. |
| 3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 青木啓将, 山下美紗季, 坡下真大, 松永民秀 |
| 2. 発表標題 異種由来不含条件下におけるiPS細胞由来血管内皮前駆細胞の作出 |
| 3. 学会等名 再生医療学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山下美紗季, 青木啓将, 坡下真大, 松永民秀 |
| 2. 発表標題 Compounds Y improve the barrier function of brain microvascular endothelial cells derived from human iPSCs. |
| 3. 学会等名 薬物動態学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 青木啓将, 山下美紗季, 坂下真大, 松永民秀 |
| 2. 発表標題 Generation of endothelial progenitor cells and brain microvascular endothelial cells from human iPSCs. |
| 3. 学会等名 薬物動態学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|---------------------------------------|------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 多能性幹細胞から脳毛細血管内皮細胞への分化誘導方法 | 発明者 松永民秀、坂下真大、山下美紗季 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/17799 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 外国 |

| | | |
|---|-----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 高純度ヒトiPS細胞由来血管内皮前駆細胞の作製法および拡大培養法の確立 | 発明者 松永民秀、坂下真大、青木啓将 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-40117 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 松永 民秀 (Matsunaga Tamihide) (40209581) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903) | |
| 研究分担者 | 降幡 知巳 (Furihata Tomomi) (80401008) | 千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|