

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07160

研究課題名 (和文) ALS患者iPS細胞由来ミクログリアを用いた炎症反応模倣BBB評価系の構築

研究課題名 (英文) Development of a BBB evaluation system mimicking inflammatory response using ALS patient iPS cell-derived microglia

研究代表者

坂下 真大 (Tadahiro, Hashita)

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) 3,300,000 円

研究成果の概要 (和文) : ALS患者iPS細胞由来ミクログリアを用いた炎症反応模倣BBB評価系の構築のため、iPS細胞からミクログリアへの分化誘導法の確立、iPS細胞由来ミクログリアとBBB構成細胞の共培養法の検討を行った。その結果、iPS細胞由来ミクログリアへの分化誘導法を確立した。また、BBB構成細胞のうち、脳毛細血管内皮細胞 (BMEC) およびペリサイトとの共培養法、ならびに脳毛細血管内皮細胞とミクログリアとの共培養法を確立することに成功した。特に、ミクログリアとの共培養では、ミクログリア用培地とBMEC用培地との当量混合により、経内皮的電気抵抗値が内皮細胞用培地と比較して有意に増加する結果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脳内神経変性部位においては、血液脳関門 (BBB) が破綻していることが報告されており、神経変性要因の一つとして考えられている。特に、炎症反応を活性化するミクログリアがどのようにBBBの破綻に関与しているのかは分かっていない。本研究成果がさらに発展することによってALS患者iPS細胞由来ミクログリアとBBB構成細胞との共培養システムが構築されることで、ALSの脳内神経変性部位におけるBBB破綻の発症要因が判明し、治療法の開発や改善薬の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要 (英文) : In order to establish a BBB evaluation system that mimics inflammatory responses using ALS patients iPS cells-derived microglia, we established a differentiation method into microglia from iPS cells. We examined the co-culture of iPS cell-derived microglia and BBB constituent cells. As a result, we established a differentiation method of iPS cell-derived microglia. In addition, we established a co-culture method with brain microvascular endothelial cells (BMECs) and pericytes, and a co-culture method with BMECs and microglia. In particular, in the co-culture with BMECs and microglia, the equivalent mixture of medium for microglia and medium for BMECs resulted in a significant increase in transendothelial electrical resistance compared to the medium for endothelial cells.

研究分野：薬物動態、幹細胞、臨床薬学

キーワード：iPS細胞由来BBB構成細胞 ALS患者iPS細胞由来ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門（Blood Brain Barrier: BBB）は、脳毛細血管内皮細胞の周りを脳ペリサイトが包み込み、さらにその周囲をアストロサイトが取り囲む特殊な構造をしている。他の血管とは異なる構造によって、血管内皮細胞同士のタイトジャンクション機能が強くなり、細胞間隙が非常に狭くなっている。そのため、生体成分や医薬品などの物質の血管側から脳実質内側への移行が制限されている。

この BBB が破綻すると、血管内成分が制限なく脳実質内に入り込むだけでなく、脳内の神経伝達物質などの成分が血管側に漏れ出す。BBB の破綻には脳内ミクログリアによる炎症反応が関与していると考えられており、筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis: ALS）における BBB の破綻とも関連していると考えられている。ALS は運動ニューロンが障害を受け、体中の筋肉が衰えていく疾患であるが、この ALS の脳内運動神経変性部位において脳毛細血管内皮細胞の形態異常が報告されており、血管透過性の亢進によって神経が変性していると考えられている。ALS においてミクログリアによる炎症反応がどのように BBB を破綻しているのかは不明であり、未だこの点が解決されていない理由として ALS 患者由来ミクログリアを搭載した炎症反応模倣 *in vitro* BBB 評価系が未だ構築されていないことが挙げられる。そこで本研究では、ALS における BBB 破綻のメカニズムを解明するために、iPS 細胞から構築した BBB 構成細胞と ALS 患者 iPS 細胞由来ミクログリアを搭載した炎症反応模倣 *in vitro* BBB 評価系を構築することとした。

2. 研究の目的

これまで薬物動態研究などにおける BBB 研究では、ヒト不死化細胞やげっ歯類の BBB 細胞を中心に研究が行われてきた。しかし、機能が生体内と比較して低いことや、種差が大きいため、ヒト生体内を反映していないことが多い。そのため、患者から得られた細胞を用いた病態模倣 BBB 評価系の構築が確立できていなかったが、近年、ヒト iPS 細胞から作製した脳毛細血管内皮細胞が生体内と同様のタイトジャンクション機能を有していることが判明し、疾患 iPS 細胞を用いた *in vitro* BBB 評価系への応用が盛んに行われている。本研究では、ALS 患者 iPS 細胞から作製したミクログリアを健常人 iPS 細胞由来 BBB モデルと共培養することで、炎症反応模倣 *in vitro* BBB 評価系を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

Douvaras らによって確立されたミクログリアの分化誘導法を用いて、ミクログリア前駆細胞を作製する。その後、前駆細胞を増殖させる低分子化合物を用いてミクログリア前駆細胞を増殖させる。また、ミクログリア前駆細胞に IL-34 および GM-CSF を添加することでミクログリアへと成熟化させる。同様の方法を ALS 患者 iPS 細胞を用いて、ミクログリアを作製する。

BBB 構成細胞（脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト）とミクログリアを共培養可能な条件を検討する。脳毛細血管内皮細胞はセルカルチャーインサート膜の内側に、ペリサイトはセルカルチャーインサート膜の外側に播種し、アストロサイトはプレート底面、ミクログリアはプレート側培地内で浮遊させた状態で共培養可能かどうか検討する。構築した炎症反応模倣 *in vitro* BBB 評価系を用いて、ミクログリア細胞内の TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6 等の炎症性サイトカインの mRNA を RT-qPCR で測定する。また、ELISA 法を用いて培養中に含まれる炎症性サイトカインを測定する。さらに、BBB 破綻に伴う透過性亢進を確認するため、経内皮電気

抵抗 (Transendothelial Electric Resistance: TEER) 値の測定によるタイトジャンクション機能を確認する。

4. 研究成果

iPS 細胞から分化誘導した造血前駆細胞は 86~98%が CD43 陽性細胞であり、免疫蛍光染色の結果、造血前駆細胞からさらに分化誘導したミクログリアは TREM-2 および P2RY12 を発現していた。iPS 細胞由来 BMECs (iBMECs) の TEER 値は $1,000\Omega \times \text{cm}^2$ 以上の値を示し、BMECs としての特性を備えていることを確認した。

iBMECs とミクログリアの共培養を行なった結果、健常人 iPS 細胞由来 BMECs と疾患 iPS 細胞由来ミクログリアとの共培養により TEER 値が低下した。一方、疾患 iPS 細胞由来 BMECs と健常人 iPS 細胞由来ミクログリアの共培養を行なった場合には、TEER 値の変化は見られなかった。また、それぞれの共培養時に培養上清中におけるサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β) を測定したところ疾患 iPS 細胞由来の細胞による大きな変化は認められなかったが、健常人 iPS 細胞由来ミクログリアを共培養した場合においてはサイトカイン量が有意に減少した。

ミクログリアが脳毛細血管内皮細胞のタイトジャンクション機能に大きく影響しており、特に疾患由来ミクログリアによってタイトジャンクション機能が弱まることが判明した。さらに、健常人 iPS 細胞由来ミクログリアとの共培養により疾患 iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞から分泌されるサイトカインの量が減少したことから、ミクログリアが内皮細胞機能の正常化に関与していることが示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Hiromasa Aoki, Misaki Yamashita, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Mineyoshi Aoyama and Tamihide Matsunaga	4. 巻 14
2. 論文標題 Generation of Brain Microvascular Endothelial-like Cells from Human iPS Cell-Derived Endothelial Progenitor Cells Using TGF- β Receptor Inhibitor, Laminin 511 Fragment, and Neuronal Cell Culture Supplements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14122697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坡下 真大
2. 発表標題 創薬応用を目指したiPS細胞由来血液脳関門モデルの開発
3. 学会等名 日本実験動物代替法学会第35回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坡下 真大
2. 発表標題 創薬応用を目指したiPS細胞由来血液脳関門モデルの開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下美紗季, 青木啓将, 青山峰芳, 坡下真大, 松永民秀
2. 発表標題 病態解明研究に応用可能なヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞の作製
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 萌奈, 山下美紗季, 坡下真大, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳ペリサイトの分化誘導法の確立
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多能性幹細胞を脳毛細血管内皮様細胞へと分化誘導するためのコーティング剤およびその利用	発明者 松永民秀, 坡下真大, 青木啓将, 山下美紗季	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-500420	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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	諫田 泰成 (Kanda Yasunari) (70510387)	国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・部長 (82601)	

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
---------	---------