

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15321

研究課題名（和文）ヒト脳微小環境を再現するヒトiPS細胞由来血液脳関門マイクロチップの構築と評価

研究課題名（英文）Construction and evaluation of a human blood-brain barrier micro-chip derived from human iPS cells that reconstructs the brain microenvironment

研究代表者

黒澤 俊樹（Kurosawa, Toshiki）

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：90839466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ヒト血液脳関門（blood-brain barrier; BBB）のモデル細胞としてヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮様細胞（hiPS-BMECs）を搭載した3次元フロー培養システムを構築することである。MIMETAS社のOrganoPlate 3-laneを採用した本システムは、ヒトBBBに特徴的な強力な密着結合能およびトランスポーターを介した選択的な輸送機能を再現することが明らかとなった。本研究で構築した3次元フロー培養システムは、中枢疾患の治療薬開発に有益であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症をはじめとする中枢疾患の罹患数が急増している我が国では有効な治療薬の開発が喫緊の課題であり、治療薬の開発を促進するためにヒトBBBの機能を再現し評価可能なシステムの開発が求められている。BBBの機能は微小血管構造や血流等の影響を受けることから、これらの脳内環境を再現する3次元フロー培養システムは中枢疾患の治療薬開発の一助となることが期待されている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to construct a three-dimensional flow culture system with brain microvascular endothelial-like cells derived from human iPS cells (hiPS-BMECs) as a model for the human blood-brain barrier (BBB). This system using OrganoPlate 3-lane (MIMETAS) reproduces the strong tight-junction and the selective transport function via transporters that are characteristic of the human BBB, and will be beneficial in the development of therapeutics for CNS disorders.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 トランスポーター ヒトiPS細胞 3次元培養 MPS Organ-on-a-chip

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢社会の到来に伴い認知症や統合失調症をはじめとする中枢疾患の罹患数が急増しており、難治性の中枢疾患に対する有効な薬物療法の確立が喫緊の課題である。中枢疾患治療薬の創薬におけるボトルネックは血液脳関門 (**blood-brain barrier; BBB**) の存在であり、**BBB** における薬物輸送機能の解明は治療薬の開発促進に繋がると期待される¹⁾。**BBB** は脳毛細血管の内皮細胞同士が密着結合を形成し物理的な障壁を構築するだけでなく、トランスポーターや受容体等の機能性膜タンパク質により選択的な輸送機能を有する。これまで **BBB** の機能研究についてはげっ歯類や家畜動物の脳組織を用いて発展してきた。その一方で、ヒトの脳組織の入手が困難であることに加え、ヒト個体での臨床試験が不可能に近いことから、ヒト **BBB** の機能については未だ不明な点が多く存在する。

近年、創薬研究において生体内を模倣した実験システム、いわゆる **microphysiological system (MPS)** の重要性が唱えられ、**3**次元培養やオルガノイド、スフェロイド等を用いた研究が活発化している。**BBB** においても血流によって生じる **shear stress** や **3**次元的な血管構造の再構築が **BBB** フェノタイプの獲得に寄与することが報告されており²⁾、新薬候補の脳内移行性を精度よく予測するためにヒト **BBB** の **MPS** 開発が急務であると考えられている。以上の背景から、ヒト **BBB** の生理的機能および薬物輸送機能が解析できる代替細胞および脳内の微小環境を再現した実験システムの開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト **BBB** のモデル細胞としてヒト **iPS** 細胞由来脳毛細血管内皮様細胞 (**hiPS-BMECs**) を用い、ヒト **BBB** の生体内微小環境を再現した **3**次元フロー培養システムを開発することである。**hiPS-BMECs** を搭載した **3**次元フロー培養システムにおいて、密着結合能およびトランスポーター等の機能性膜タンパク質を介した輸送機能を評価する。さらに、ヒト由来のアストロサイト、ペリサイトを共培養した **3**次元フロー培養システムを構築し、より精密にヒト **BBB** の環境を再現したシステムの開発に取り組む。

また、より高精度に薬物の脳移行性を予測するために、**hiPS-BMECs** の改良に着手する。**ABC** トランスポーターの **P** 糖タンパク質 (**multidrug resistance 1; MDR1**) は **BBB** において多くの薬物の脳移行を妨げ脳内の恒常性を維持する役割を果たしているが、**hiPS-BMECs** において **MDR1** の発現および機能が欠如していることが報告されている^{3,4)}。したがって、**MDR1** の機能を改善した **hiPS-BMECs** を構築し、**3**次元フロー培養システムへの適応を試みた。

以上の取り組みにより、**hiPS-BMECs** を搭載した **3**次元フロー培養システムの有用性を評価した。

3. 研究の方法

ヒト **iPS** 細胞 (**IMR90-4** 株) から **hiPS-BMECs** への分化誘導は **Lippmann** らの先行報告に従った^{5,6)}。将来的な創薬研究への応用を目指し、**hiPS-BMECs** を搭載するデバイスは高いスループット性を有する **MIMETAS** 社の **OrganoPlate® 3-lane** を採用した。培養方法は **MIMETAS** 社の公開プロトコルに修正を加え確立した⁷⁾。**3**つのレーンのうち、**hiPS-BMECs** を播種したレーンを血液側、コラーゲンを注入した中央レーンを隔てて反対側を脳側レーンとした。当デバイスはレーン内を培地が灌流することにより **0~5 dyn/cm²** の **shear stress** が細胞にかかると考えられている。**OrganoPlate® 3-lane** を用いた **3**次元フロー培養システムにおける密着結合能は細胞間隙マーカーである **lucifer yellow (LY)** の透過性から評価した。トランスポーターによる輸送機能は基質薬物もしくは内因性基質を用いて、血液側レーンから脳側レーンへの輸送 (**apical-to-basolateral; A-to-B**) および逆方向の輸送 (**basolateral-to-apical; B-to-A**) を透過実験により評価した。また、アストロサイトおよびペリサイトを脳側レーンに播種した共培養システムの培養方法を検討した。

MDR1 の機能を改善した **hiPS-BMECs** は、**MDR1** 遺伝子を導入したヒト **iPS** 細胞を作製し同様の分化方法により樹立した。**MDR1** を含めたトランスポーターのタンパク質発現は、**sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra mass spectrometry (SWATH-MS)** 法により測定した。**MDR1** の機能は、**Transwell®** を用いた **2**次元培養において種々の **MDR1** 基質薬物による透過実験にて評価した。さらに、**OrganoPlate® 3-lane** を用いた **3**次元フロー培養システムにおける機能評価を実施した。

4. 研究成果

(1) hiPS-BMECs を搭載した 3 次元フロー培養システムの構築

分化誘導 8 日目における hiPS-BMECs を剥離し、**fibronectin/collagen IV** をコーティングした血液側レーンに播種した。細胞をゲル面に接着後、48 時間のフロー培養を実施し 3 次元フロー培養システムを構築した。細胞膜染色試薬を用いて hiPS-BMECs を染色した結果、血液側レーンにて血管構造を形成していることが明らかとなった(図 1)。また、脳側レーンにアストロサイトやペリサイトを播種した共培養システムのプロトコル樹立にも成功した。

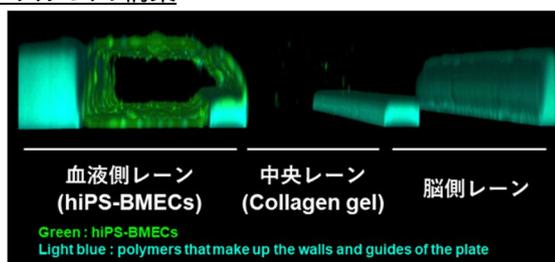


図 1 OrganoPlate® 3-lane における hiPS-BMECs の細胞膜染色

(2) 3 次元フロー培養システムにおける密着結合能の評価

細胞間隙マーカーである LY の見かけの透過係数 (P_{app}) は $0.189 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ を示し、プランクにおける $32.0 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ と比較して 99% 以上の低下を示した。また、3 次元フロー培養システム上の hiPS-BMECs において、密着結合形成タンパク質である ZO-1 の発現を免疫染色にて確認した。これらの結果から、hiPS-BMECs は 3 次元フロー培養システムにおいて強力な密着結合を形成していることを示唆された。

(3) 3 次元フロー培養システムにおけるトランスポーターを介した輸送機能の評価

SLC トランスポーターである L-type amino acid transporter 1 (LAT1) は、基質薬物である gabapentin を A-to-B 方向へ輸送し、血液側から脳側へ供給する方向性輸送を示した。その一方で、ABC トランスポーターである breast cancer resistant protein (BCRP) の基質である cladribine の輸送は B-to-A 方向の膜透過クリアランスが A-to-B 方向を有意に上回り、脳側からの積極的な排出輸送を示した。これらの結果は本システムが BBB における選択的輸送機能を再現していることを示している。

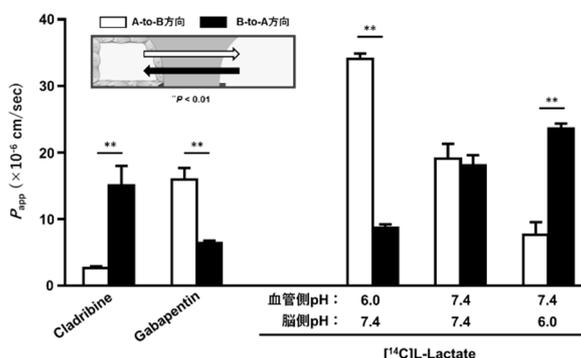


図 2 3 次元フロー培養システムにおけるトランスポーターの機能評価

また、monocarboxylate transporter 1 (MCT1) 基質の [^{14}C]L-lactate は血液側、脳側レーンの pH 変化によって輸送の方向性が逆転し、MCT1 の特徴である H⁺勾配に従った輸送を示した。本システムは血液側と脳側の pH に感受性があり、pH 変化に伴う疾患の病態 BBB モデルとしても有用であることが示唆された。

(4) MDR1 機能を改善した hiPS-BMECs の樹立

MDR1 遺伝子を導入した未分化のヒト iPS 細胞を作製し、従来の方法で分化することにより MDR1 機能を獲得した hiPS-BMECs (MDR1-BMECs) の樹立に取り組んだ。その結果、MDR1-BMECs における MDR1 タンパク質発現は不死化モデルの hCMEC/D3 細胞と同程度まで上昇した。また、分化後の密着結合能やトランスポーターの輸送機能に対し、遺伝子導入による影響がないことを確認した。MDR1 の排出機能を Transwell® を用いた 2 次元培養にて評価した結果、8 種の MDR1 の基質薬物は全て B-to-A 方向有意な輸送を示し、それらの排出比 ($P_{app,B-to-A}/P_{app,A-to-B}$) は 1.5 から 26.0 と算出された。また、MDR1 阻害剤である PSC-833 共存下ではこれらの排出比が 1 付近にまで低下した。これらの結果から、MDR1 の排出機能を有する hiPS-BMECs の樹立に成功した⁹⁾。MDR1-BMECs は 3 次元フロー培養システム上においても MDR1 による排出輸送を示すことを確認している。

以上の結果は、hiPS-BMECs がヒト BBB のモデル細胞として MPS へ適応可能であることを示すとともに、本研究で確立した 3 次元フロー培養システムが中枢疾患を対象とした創薬研究に有用であることを示している。

<引用文献>

- 1) Abbott NJ, *In Drug Delivery to the Brain* (book chapter), 3-21, 2014.
- 2) Cucullo L., et al., *BMC Neurosci.*, 12, 40, 2011.
- 3) Kurosawa T., et al., *Mol. Pharm.*, 15, 5546-5555, 2018.
- 4) Ohshima M., et al., *Biores. Open Access*, 14, 200-209, 2019.
- 5) Lippmann ES., et al., *Nat. Biotechnol.*, 30, 783-791, 2012.

- 6) **Lippmann ES., et al., *Sci. Rep.*, 4, 4160, 2014.**
- 7) **Kurosawa T., et al., *Pharm. Res.*, 39, 1535-1547, 2022.**
- 8) **Yamaguchi T., et al., *J. Pharm. Sci.*, 112, 3216-3223, 2023.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi Tomoko, Sako Daiki, Kurosawa Toshiki, Nishijima Misae, Miyano Ayaka, Kubo Yoshiyuki, Ohtsuki Sumio, Kawabata Kenji, Deguchi Yoshiharu	4. 巻 112
2. 論文標題 Development and Functional Evaluation of MDR1-expressing Microvascular Endothelial-like Cells Derived from Human iPS Cells as an In vitro Blood-brain Barrier Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3216 ~ 3223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2023.09.004	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 -
1. 著者名 Kurosawa Toshiki, Tega Yuma, Uchida Yasuo, Higuchi Kei, Tabata Hidetsugu, Sumiyoshi Takaaki, Kubo Yoshiyuki, Terasaki Tetsuya, Deguchi Yoshiharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Proteomics-Based Transporter Identification by the PICK Method: Involvement of TM7SF3 and LHFPL6 in Proton-Coupled Organic Cation Antiport at the Blood?Brain Barrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1683 ~ 1683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14081683	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 -
1. 著者名 Kitamura Atsushi, Higuchi Kei, Kurosawa Toshiki, Okura Takashi, Kubo Yoshiyuki, Deguchi Yoshiharu	4. 巻 45
2. 論文標題 Naltrexone Transport by a Proton-Coupled Organic Cation Antipporter in hCMEC/D3 Cells, an <i>in Vitro</i> Human Blood?Brain Barrier Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1585 ~ 1589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00347	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 -
1. 著者名 Kurosawa Toshiki, Sako Daiki, Tega Yuma, Debori Yasuyuki, Tomihara Yumi, Aoyama Kazunobu, Kubo Yoshiyuki, Amano Nobuyuki, Deguchi Yoshiharu	4. 巻 39
2. 論文標題 Construction and Functional Evaluation of a Three-Dimensional Blood?Brain Barrier Model Equipped With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 1535 ~ 1547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-022-03249-3	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 -

1. 著者名 Kurosawa Toshiki, Tega Yuma, Sako Daiki, Mochizuki Tatsuki, Yamaguchi Tomoko, Kawabata Kenji, Inoue Katsuhisa, Ito Naoki, Kusuhara Hiroyuki, Deguchi Yoshiharu	4. 巻 110
2. 論文標題 Transport Characteristics of 6-Mercaptopurine in Brain Microvascular Endothelial Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3484 ~ 3490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2021.06.007	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18件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、久保義行、花田雄志、三枝大輔、大槻純男、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルを用いたD-angiotensin-2輸送機構の評価
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 黒澤俊樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルを用いた輸送解析およびMPS構築への応用
3. 学会等名 CBI学会2023年大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒澤俊樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いたBBBモデルの構築と輸送解析への応用
3. 学会等名 第30回HAB研究機構学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshiki Kurosawa, Daiki Sako, Yoshiyuki Kubo, Yoshiharu Deguchi
2. 発表標題 Construction and functional evaluation of a fluidic 3D blood-brain barrier system using human iPS cells-derived BMEC-like cells
3. 学会等名 Cerebral Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、山口朋子、宮野綾華、久保義行、川端健二、大槻純男、出口芳春
2. 発表標題 MDR1遺伝子導入ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルにおける輸送体機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第38年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市之瀬未歩、黒澤俊樹、佐孝大樹、久保義行、出口芳春
2. 発表標題 H+/有機カチオン交換輸送体の経細胞輸送評価におけるヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルの有用性
3. 学会等名 日本薬学会第38年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒澤俊樹、佐孝大樹、出堀泰之、富原裕美、青山和誠、天野信之、久保義行、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデル細胞を用いた3次元フロー培養システムの構築
3. 学会等名 第43回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、山口朋子、宮野綾華、久保義行、川端健二、大槻純男、出口芳春
2. 発表標題 MDR1遺伝子導入ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデル細胞の作製と機能解析
3. 学会等名 第43回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒澤俊樹、手賀悠真、内田康雄、樋口慧、田畑英嗣、住吉孝明、久保義行、寺崎哲也、出口芳春
2. 発表標題 血液脳関門におけるTM7SF3およびLHFPL6のH+/有機カチオン交換輸送への関与
3. 学会等名 第37回 日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、山口朋子、宮野綾華、久保義行、川端健二、大槻純男、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるP-gpの発現および機能の改善
3. 学会等名 第37回 日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出口芳春、黒澤俊樹、佐孝大樹、久保義行
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルのMPSへの展開
3. 学会等名 第37回 日本薬物動態学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒澤俊樹、手賀悠真、内田康雄、樋口慧、佐孝大樹、田畑英嗣、住吉孝明、久保義行、寺崎哲也、出口芳春
2. 発表標題 プロテオミクス解析による血液脳関門におけるH ⁺ /有機カチオン交換輸送体候補分子の探索とその機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、山口朋子、久保義行、川端健二、出口芳春
2. 発表標題 P-gp発現ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞における輸送体機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒澤俊樹、手賀悠真、佐孝大樹、出堀泰之、富原裕美、青山和誠、久保義行、天野信之、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた3次元BBB-on-a-chipの構築と評価
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会 シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、手賀悠真、出堀泰之、久保義行、天野信之、出口芳春
2. 発表標題 3次元培養におけるヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞のLAT1の輸送機能
3. 学会等名 第36回 日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤俊樹、出口芳春
2. 発表標題 2次元および3次元培養ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルを用いたトランスポーター機能評価
3. 学会等名 第36回 日本薬物動態学会年会 シンポジウム12 (トランスポーターDIS) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤俊樹
2. 発表標題 Meet a cutting-edge technology : ヒト中枢移行評価を創薬初期段階から可能にするHuman BBB-on-a-chip
3. 学会等名 AXCELEAD Drug Discovery Partners webセミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤俊樹、手賀悠真、佐孝大樹、出堀泰之、富原裕美、天野信之、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた3次元実験モデルの構築
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 黒澤俊樹、佐孝大樹、久保義行、出口芳春	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Drug Delivery System	5. 総ページ数 8
3. 書名 ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルの構築とトランスポーター機能評価	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 輸送体タンパク質の探索方法及びその使用	発明者 出口芳春、久保義行、黒澤俊樹、田畑英嗣 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-118082	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

トランスポーターの機能から見るヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルの有用性
https://www.jssx.org/nl/nl37_4/NewsLetter_37_4.html

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

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