

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20736

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞からP-糖タンパク質を高発現する脳血管内皮細胞の作製

研究課題名(英文) Differentiation of brain microvascular endothelial cells from human iPS cells

研究代表者

山口 朋子 (YAMAGUCHI, Tomoko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト・研究員

研究者番号：50580130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経疾患治療薬の開発において、脳内移行性を包括するin vitro BBBモデルの開発が重要である。そのin vitro BBBモデルに搭載する細胞としてiPS細胞由来脳血管内皮細胞は有望である。但し、iPS細胞由来脳血管内皮細胞は、P-gpの発現が低いことが問題点として挙げられる。そこで本研究では、転写因子や低分子化合物などを利用してP-gpの発現を上昇させることを試みた。SOX18やWntシグナルを活性化させる低分子化合物をiPS細胞由来脳血管内皮細胞に作用させた結果、バリア機能を低下させることなくP-gpの発現を上昇させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、より生体に近い脳血管内皮細胞をiPS細胞から作成可能となれば、iPS細胞由来脳血管内皮細胞が中枢神経疾患治療薬の開発において有用なツールになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Currently, iPSC-derived BMECs (iBMECs) have been used to construct in vitro BBB models with physiological barrier functions, such as high trans-endothelial electrical resistance (TEER) and expression of transporter proteins. However, the relatively low p-glycoprotein (P-gp) level and a decrease in the efflux ratio of its substrates in iBMECs suggest their immature character. Therefore, more mature iBMECs by optimizing the differentiation protocol is beneficial for establishing a more reliable in vitro BBB model for studying central nervous system drug transport. Inducible SOX18 expression in iBMECs gained mature BBB phenotypes, including high TEER values and upregulation of P-gp expression. In addition, physiological barrier function and P-gp expression in BMECs can be enhanced by the canonical Wnt signaling activator. Our results may be useful for promoting the development of drugs for central nervous system diseases using in vitro BBB model

研究分野：幹細胞学

キーワード：BBB P-gp iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

脳には物質の脳内移行を制御する血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が存在している。BBB は、脳血管内皮細胞やペリサイト、アストロサイトなどから構成されており、中でも、機能的に最も重要な役割を担うのは脳血管内皮細胞である。脳血管内皮細胞は、強固な結合 (タイトジャンクション) を形成し、かつ薬剤の排出を担うトランスポーターや栄養素の選択的な取り込みを行うトランスポーターを発現しており、これらの機能によって血液中から脳実質側への物質の移行を厳密に制御している。そのため、アルツハイマー病やパーキンソン病などの中枢神経疾患の場合、in vitro で効果のみられた候補薬物を生体に投与した場合、BBB により脳内に移行されないケースが多く、創薬プロセスの障害となっている。したがって、中枢神経疾患治療薬の開発においては、治療標的分子の探索だけでなく、脳内移行性を包括する in vitro BBB モデルの開発が重要となる。

これまでに、申請者らのグループは、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を利用した、in vitro BBB モデルを開発し、それを用いた薬物動態評価系への応用例や、疾患モデルなどを報告してきた。しかしながら、ヒト iPS 細胞から分化誘導した脳血管内皮細胞では、薬物排出に重要なトランスポーターである P-糖タンパク質 (P-gp) の発現が著しく低いことが課題としてあげられる。 P-gp は、血液中から脳血管内皮細胞に取り込まれた薬物を再度血液中に排出する機能を有しており、その基質認識性は広いことが知られている。そのため、P-gp によって認識される多くの薬物の in vivo での脳移行性をヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を利用して正確に評価することは現状困難である。したがって、生体の BBB と同程度の P-gp を発現するような脳血管内皮細胞の作製が望まれている。

2. 研究の目的

本研究計画では、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の P-gp の発現を向上させることを目的とする。前述したように、申請者らのグループでは、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を用いて BBB モデルを作製し、薬物動態評価系への応用例 (Kurosawa et al., *Mol. Pharm.*, Mochizuki et al., *Drug Metab.*) や、虚血性脳血管障害や重度熱中症モデル (Kokubu et al., *BBRC*, Yamaguchi et al., *PLoS One*) などを報告してきた。その中で、初代培養脳血管内皮細胞や BBB 研究で汎用されている hCMEC/D3 細胞と比較して、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞では P-gp の発現が有意に低いことが明らかとなった。初代培養脳血管内皮細胞は P-gp は高発現しているが、入手困難であり、hCMEC/D3 細胞も P-gp は高発現しているものの、物理的バリア機能が低いことが知られている。そこで本研究では、P-gp の発現を制御する因子 (液性因子、低分子化合物、転写因子) などを用いて、P-gp を高発現するようなヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製を試みた。

3. 研究の方法

上記の背景を基に、本研究では、P-gp の発現を制御する因子 (液性因子・低分子化合物・転写因子) の探索研究を実施する。研究期間内には以下のことを行った。

1) 液性因子・低分子化合物の探索

iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の P-gp 発現を向上させるためには、生体での発生を模倣し、その過程に参与する因子を分化プロトコルに作用させる必要がある。生体における脳血管内皮細胞

の発生は完全には理解されていないが、その過程で Wnt シグナルや Sonic hedgehog、bFGF など種々の因子が関与していることが知られている。そこで、ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞を分化誘導する際に、Wnt シグナルを活性化する低分子化合物や bFGF などの液性因子を作用させ、脳血管内皮細胞の性質の変化を解析した。

2) 転写因子の探索

1. ウイルスベクターおよびウイルスの作製

候補の転写因子をクローニングし、レンチウイルスベクターに導入した。その後、転写因子を搭載したレンチウイルスを作製した。

2. 候補因子の絞り込み

上記で作製したレンチウイルスをまずは HUVEC に作用させることで、P-gp などの脳血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現について解析を試みた。

3. iPS細胞から脳血管内皮細胞への分化誘導系に応用

iPS 細胞から脳血管内皮細胞へ分化誘導する過程で、候補因子を発現するウイルスを作用させることで、P-gp などの脳血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現や TEER について解析を試みた。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞は、ヒト脳血管内皮細胞株である hCME/D3 などと比較し、圧倒的にバリア機能も高く、多くのトランスポーターが機能していることをこれまでに報告している (Kurosawa et al., *Mol. Pharm.*)。しかしながら、排出トランスポーターである P-gp の発現が低いことが問題点として挙げられている。これまでに、脳血管内皮細胞の発生過程において、Wnt シグナルが重要な役割を担うことが報告されている。そこで本研究では、Wnt シグナルを利用することで、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の P-gp の発現を上昇させることを目指した。ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞の分化誘導過程に、Chir99021 や BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime) といった Wnt シグナルを活性化させる低分子化合物を作用させた結果、コントロール群と比較して、バリア機能の増強が観察された。また、タイトジャンクションの形成に重要な役割を担う、claudin-5 の発現について検討した結果、Wnt シグナルを活性化させることで、claudin-5 の発現が上昇することが示された。さらに、Glut1、BCRP、P-gp などのトランスポーターの発現について検討した結果、Glut1 の発現には顕著な差は観察されなかったが、P-gp の発現上昇が観察された。さらに、P-gp の基質である Rhodamine-123 を用いて、Rhodamine-123 の取り込み能を検討した結果、Wnt シグナルを活性化させた群では、Rhodamine-123 の取り込み能が低下していた。すなわち、Wnt シグナルを活性化させた群では、P-gp の発現が上昇することにより Rhodamine-123 が積極的に細胞外に排出されたことが示された。一方、P-gp の阻害剤であるシクロスポリン A (CsA) を作用させることで Rhodamine-123 の取り込み能が増加していたことから、Wnt シグナルを活性化させることで、機能的な P-gp の発現が上昇していると考えられる。本研究内容に関しては、学術論文として発表済みである。

脳血管内皮細胞の分化や機能に係る転写因子に着目した。まず、臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に候補因子をレンチウイルスベクターを用いて導入した。その結果、Sox18 を導入した群で P-gp の発現上昇が観察された。そこで、Tet-On システムを利用し、時期特異的 Sox18 を発現する iPS 細胞を作製した。作製した iPS 細胞は、コントロール群と比較し、Nanog や Oct3/4 の発現に有意な差は観察されなかったことから、未分化能は維持されていた。次に、作製した iPS 細胞を用いて、脳血管内皮細胞への分化誘導を行なった。分化誘導において、血管内

皮細胞の増殖および選別の期間にドキシサイクリンを作用させることで、Sox18 を強制発現させた。その結果、コントロール群と比較して、膜間電気抵抗値の低下は観察されなかったことから、Sox18 を強制発現しても高いバリア機能は維持していることが明らかとなった。次に、各種遺伝子発現について解析した結果、Sox18 を強制発現させることで、血管内皮細胞マーカー、脳血管内皮細胞マーカー（Mfsd2a、P-gp）の発現が上昇した。以上の結果より、Sox18 を発現させることで、脳血管内皮細胞の成熟化が促進される可能性が示された。さらに、発現上昇した P-gp の機能に関してピューロマイシンを用いて細胞毒性試験を行なった結果、Sox18 を強制発現させることで、ピューロマイシンによる細胞死が抑制されることが示された。以上より、Sox18 を時期特異的に発現させることで、脳血管内皮細胞が成熟化することが明らかとなった。本研究内容に関しては、学術論文として発表済みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Zhang Hongyan, Yamaguchi Tomoko, Kawabata Kenji	4. 巻 20
2. 論文標題 The maturation of iPS cell-derived brain microvascular endothelial cells by inducible-SOX18 expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12987-023-00408-5	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 Yamaguchi Tomoko, Nishijima Misae, Kawabata Kenji	4. 巻 45
2. 論文標題 Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3? Enhances Functions of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells in the Blood?Brain Barrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1525 ~ 1530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00393	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川端健二、張鴻燕、西島美妙江、山口朋子
2. 発表標題 ヒト iPS 細胞から P-糖タンパク質を発現する脳血管内皮細胞への分化誘導
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 山口朋子、張鴻燕、西島美妙江、川端健二
2. 発表標題 薬物動態評価系への応用を目指したヒトiPS細胞由来脳血管内皮細胞の作製
3. 学会等名 日本組織培養学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口朋子、西島美妙江、張鴻燕、川端健二
2. 発表標題 創薬に適したiPS細胞由来脳血管内皮細胞の改良
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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