



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1972号
学位記番号	第403号
氏名	山下 美紗季
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	ヒト人工多能性幹細胞由来脳毛細血管内皮細胞の分化誘導法の開発
論文審査担当者	主査： 糸 和彦 副査： 松永 民秀， 山村 壽男， 湯浅 博昭

名古屋市立大学学位論文

ヒト人工多能性幹細胞由来  
脳毛細血管内皮細胞の分化誘導法の開発

令和4年度（2023年3月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

山下 美紗季

- 一. 本論文は、2023年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 糸和彦 教授

副査 松永民秀 教授

山村寿男 教授

湯浅博昭 教授

- 二. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

#### 【基礎となる報文】

1. **Misaki Yamashita**, Hiromasa Aoki, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga.

Inhibition of transforming growth factor beta signaling pathway promotes differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial-like cells.

*Fluids Barriers CNS*, **17**(1):36, 2020.

2. Hiromasa Aoki\*, **Misaki Yamashita**\*, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Mineyoshi Aoyama, Tamihide Matsunaga (\* equal contribution).

Generation of brain microvascular endothelial-like cells from human iPS cell-derived endothelial progenitor cells using the TGF- $\beta$  receptor inhibitor, laminin 511 fragment, and neuronal cell culture supplements.

*Pharmaceutics*, **14**:2697, 2022.

#### 【参考論文】

1. Hiromasa Aoki, **Misaki Yamashita**, Tadahiro Hashita, Mizuki Nakayama, Mayuko Yagi, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga.

Isolation of induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells from sac-like structures.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **515**:672-678, 2019.

2. Hiromasa Aoki\*, **Misaki Yamashita**\*, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao,

Tamihide Matsunaga (\* **equal contribution**).

Laminin 221 fragment is suitable for the differentiation of human induced pluripotent stem cells into brain microvascular endothelial-like cells with robust barrier integrity.

*Fluids Barriers CNS*, **17**(1):25, 2020.

3. Hiromasa Aoki, **Misaki Yamashita**, Tadahiro Hashita, Koichi Ogami, Shin-ichi Hoshino, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga.

Efficient differentiation and purification of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells and expansion with the use of inhibitors of ROCK, TGF- $\beta$ , and GSK3 $\beta$ .

*Heliyon*, **6**(3):e03493, 2020.

- 三. 本論文の基礎となる研究は、松永民秀 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。



## 略語一覽

Ac-LDL	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein
A-83-01	3-(6-methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide
BBB	blood–brain barrier
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovine serum albumin
Calcein-AM	3',6'-di(O-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluoresceintetraacetoxymethyl ester
CsA	cyclosporin A
D-PBS (-)	Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium, magnesium
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM/F12	1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's nutrient mixture F-12
EndoMT	endothelial to mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
FD4	fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa
FGF2	fibroblast growth factor 2
GFR-Matrigel	Matrigel Growth Factor Reduced
GLUT1	glucose transporter 1
HBSS	Hanks' balanced salt solution with calcium and magnesium
HE-SFM	Human Endothelial Serum Free Medium
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetha-nesulfonic acid
HPRT1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
iBMELCs	human induced pluripotent stem cell-derived brain microvasucular endothelial like cells

iEPCs	human induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells
iPS cells	human induced pluripotent stem cells
KSR	KnockOut Serum Replacement
LN221F	laminin 221 fragment
LN411F	laminin 411 fragment
LN511F	laminin 511 fragment
LY	lucifer yellow
MDR1	multiple drug resistance 1
MMP9	matrix metalloproteinase 9
N-cadherin	neural cadherin
NEAA	MEM non-essential amino acid
P-gp	P-glycoprotein
PECAM1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PDS	platelet-poor plasma derived bovine serum
PS	penicillin-streptomycin mixed solution
RA	all-trans retinoic acid
RepSox	2-[5-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-1,5-naphthyridine
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
SB-431542	4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide
TBS-T	Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20
TEER	transendothelial electrical resistance
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
VE-cadherin	vascular endothelial-cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VTN-N	vitronectin-N
Y-27632	(1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)-cyclohexanecarboxamide
ZO-1	zonula occludens-1

## 目次

第一章 序論.....	1
第二章 iBMELCs の分化誘導における TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果.....	3
2.1 緒言.....	3
2.2 実験方法.....	4
2.2.1 試薬及び細胞.....	4
2.2.2 細胞培養.....	6
2.2.3 コーティング.....	7
2.2.4 ヒト iPS 細胞から iBMELCs への分化誘導.....	7
2.2.5 TEER 値計測.....	8
2.2.6 LY の透過試験.....	8
2.2.7 RT-qPCR 解析.....	9
2.2.8 免疫蛍光染色法.....	9
2.2.9 管状構造形成試験.....	10
2.2.10 Ac-LDL 取り込み試験.....	10
2.2.11 Western blotting.....	11
2.2.12 P-gp および BCRP の機能解析.....	11
2.2.13 iBMELCs の凍結融解.....	12
2.2.14 統計学的解析.....	12
2.3 結果.....	15
2.3.1 TGF- $\beta$ 受容体阻害薬を用いて分化誘導した iBMELCs の特徴.....	15
2.3.2 タイトジャンクション形成に対する TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果.....	16
2.3.3 トランスポーターの発現と活性に対する TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果.....	20
2.3.4 iBMELCs の凍結保存に対する TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果.....	21
2.4 考察.....	25
2.5 小括.....	29
第三章 ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞から iBMELCs への分化誘導法の開発.....	30
3.1 緒言.....	30
3.2 実験方法.....	31
3.2.1 試薬及び細胞.....	31
3.2.2 細胞培養.....	31
3.2.3 コーティング.....	31
3.2.4 ヒト iPS 細胞から L-iBMELCs への分化誘導.....	32
3.2.5 ヒト iPS 細胞から iEPCs への分化誘導および iEPCs の凍結融解.....	32
3.2.6 iEPCs から E-iBMELCs への分化誘導.....	33

3.2.7	TEER 値測定.....	33
3.2.8	FD4 および LY の透過試験.....	34
2.2.9	RT-qPCR 解析.....	34
3.2.10	免疫蛍光染色法.....	34
3.2.11	管状構造形成試験.....	34
3.2.12	Ac-LDL 取り込み試験.....	34
3.2.13	P-gp の機能解析.....	35
3.2.14	統計学的解析.....	35
3.3	結果.....	37
3.3.1	iEPCs のバリア機能に対する凍結融解の影響.....	37
3.3.2	iEPCs のバリア機能を向上させる分化誘導条件の探索.....	38
3.3.3	E-iBMELCs の特性評価.....	41
3.4	考察.....	44
3.5	小括.....	49
第四章	総括.....	50
	謝辞.....	51
	引用文献.....	53

## 第一章 序論

血液脳関門 (BBB) は、血液と脳実質間の分子輸送を厳密に制御するバリア機構であり、脳毛細血管内皮細胞から構成される血管をペリサイトやアストロサイトが取り囲んだ特殊な構造をしている。中でも脳毛細血管内皮細胞は、バリア機能の主軸を担い、強固なタイトジャンクションと排出トランスポーターの発現を特徴としている[1] (Fig. 1-1)。

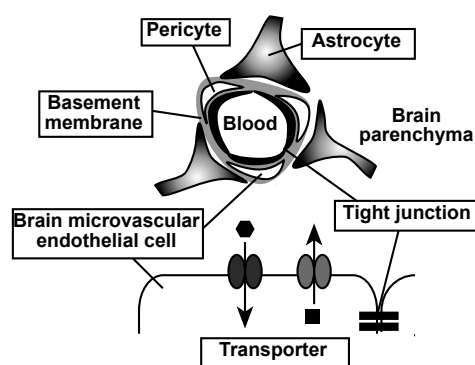


Figure 1-1. Scheme of the blood-brain barrier.

医薬品開発において、医薬品候補化合物の有効性や安全性を評価する上で BBB 透過性を非臨床試験の段階で正確に把握することは重要である[2]。通常、*in vitro* BBB モデルによる BBB 透過性試験はげっ歯類などの動物を用いた *in vivo* BBB 透過性試験に先行して行われるが、動物を用いた *in vivo* 試験はロースループットであることから、ハイスループットな *in vitro* 試験の段階で候補化合物を絞り込めることが望ましい。また近年、神経変性疾患と BBB の破綻に密接な関連があることも明らかとなってきた[3]。例えば、アルツハイマー病では、脳内のアミロイド  $\beta$  沈着や神経原線維変化と並行して、脳血管障害や BBB 変化が頻繁に起こっていることが示されている。特にアミロイド  $\beta$  は BBB を通じて脳内から排出されるため、BBB の機能障害はアミロイド  $\beta$  沈着を悪化させ、アルツハイマー病の発症原因になりうると考えられている。このような背景から、BBB の薬物透過性や BBB の破綻と関連する病態を、簡便かつ正確に解析できるような *in vitro* BBB モデルの開発が強く望まれている。既存の BBB モデルにはヒト不死化脳毛細血管内皮細胞や動物由来脳毛細血管内皮細胞などが用いられ

ているが、BBB の特徴である高いバリア機能が再現されていないことや、種差によりヒトへの外挿が困難なことが問題となっている[4,5]。また、ヒト脳組織の入手は困難であり、ヒト初代培養細胞を用いた BBB モデルの構築には限界がある[6]。

近年、これらの問題を克服すべく、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞由来脳毛細血管内皮細胞様細胞 (iBMELCs) が開発された[7-9]。この細胞は強固なバリア機能を有している点で他の BBB モデルにおける脳毛細血管内皮細胞よりも優れているが、内皮細胞としての性能が低いことから脳毛細血管内皮細胞とは異なる細胞であることが示唆されている[10]。そこで本研究では、薬物動態試験や病態研究に応用可能な *in vitro* ヒト BBB モデルを確立するため、内皮細胞としての特徴を強化した iBMELCs を作製することを目的とした。第二章では、iBMELCs の分化誘導における transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) 受容体阻害薬の効果を検討し、第三章では、ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞 (iEPCs) から iBMELCs への分化誘導法の開発を行った。

## 第二章 iBMELCs の分化誘導における TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果

### 2.1 緒言

iBMELCs を薬物動態研究や病態研究に応用するためには、生体内の脳毛細血管内皮細胞の性状に近い細胞が必要である。既存の報告における iBMELCs は、バリア機能は強固であるものの、内皮細胞マーカーの発現が極めて低く、上皮細胞マーカーを一部発現していると報告されている[10]。また、iPS 細胞株の違いによって分化後のバリア機能にばらつきがあることが問題である[11,12]。

これまで、BBB の構成要素であるペリサイト、アストロサイト等との共培養法により、高機能な iBMELCs への分化を促進することが試みられてきた[13]。しかし、これらは複雑な操作を要し、共培養細胞のロット間差に影響されやすく、再現性を担保することが難しいため、薬物スクリーニングには適していない。そこで本研究では、共培養法などの複雑な技術を用いずに、分化した iBMELCs の機能および内皮特性を向上させ、汎用性のある BBB モデルの開発を試みた。

一般に、低分子化合物は大量かつ高純度で合成が可能のためコストが低く、ロット間差も少ない。また、前述の共培養法とは異なり、分化培地への添加のみで効果を発揮するため非常に簡便であり、ヒト iPS 細胞から iBMELCs への分化誘導因子として有益であると考えた。TGF- $\beta$  シグナルは、細胞分化、アポトーシスを含む胚発生に関与しており[14,15]、BBB のタイトジャンクション機能障害と関連していることが報告されている[16,17]。そのため、TGF- $\beta$  受容体阻害薬は BBB のタイトジャンクション機能を向上させると考えた。しかし、TGF- $\beta$  受容体阻害薬が iBMELCs への分化に及ぼす影響については検討されていない。そこで、TGF- $\beta$  受容体阻害薬が iBMELCs の分化を促進するかどうかについて評価した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬及び細胞

ヒト iPS 細胞株 610B1、606A1 は、ヒト臍帯血細胞より、648A1 は、ヒト末梢血細胞より樹立された。これらのヒト iPS 細胞株は RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan) より購入した。ヒト不死化細胞株である hCMEC/D3 細胞は Merck Millipore (Burlington, MA, USA) より、ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC および Endothelial Cell Media は ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) より購入した。1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's nutrient mixture F-12 (DMEM/F12)、StemSure hPSC medium、3-(6-methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide (A-83-01)、2-[5-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-1,5-naphthyridine (RepSox) 、 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide (SB-431542) 、 cyclosporin A (CsA)、Hoechst 33342、fibronectin、hydrocortisone、platelet-poor plasma derived bovine serum (PDS)、paraformaldehyde および 3',6'-di(O-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluoresceintetraacetoxymethyl ester (calcein-AM) は Fujifilm Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) より、MEM non-essential amino acid (NEAA) および L-glutamine は Biological Industries (Beit Haemek, Israel) より、penicillin-streptomycin mixed solution (PS)、accutase は nacalai tespue (Kyoto, Japan) より、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) solution、L-ascorbic acid、fatal bovine serum (FBS)、2-mercaptoethanol および donkey serum は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、trypsin、collagenase type IV、Pierce BCA Protein Assay Kit、KnockOut Serum Replacement (KSR)、TrypLE select、Hanks' balanced salt solution with calcium and magnesium (HBSS)、1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL)、



chemically defined lipid concentrate、 lucifer yellow (LY) および Human Endothelial Serum Free Medium (HE-SFM) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)より、 Cell carrier-96 は PerkinElmer (Waltham, MA, USA)より、 TC Protector は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)より、 mitomycin C は Kyowa Hakko Kirin (Tokyo, Japan)より、 fibroblast growth factor 2 (FGF2)は GenScript (Nanjing, China)より、 cell culture inserts (0.4 μm transparent PET membrane) および Matrigel Growth Factor Reduced (GFR-Matrigel)は Corning (Corning, NY, USA)より、 (1R,4r)-4-((R)-1-Aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)-cyclohexanecarboxamide (Y-27632) は Focus Biomolecules (Plymouth Meeting, PA, USA)より、 collagen type IV は Nitta Gelatin (Osaka, Japan)より、 *all-trans* retinoic acid (RA)は Tocris Bioscience (Bristol, UK)より、 vascular endothelial growth factor (VEGF)は BioLegend (San Diego, CA, USA)より、 rhodamine 123 は PromoCell (Heidelberg, Germany)より、 KAPA SYBR FAST qPCR Kit は Kapa Biosystems (Wilmington, MA, USA)より、 Triton X-100 は AMRESCO (Solon, OH, USA)より、 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)は Dojindo (Kumamoto, Japan)より、 Agencourt RNAdvance Tissue Kit は Beckman Coulter (Brea, California, USA)より、 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix は TOYOBO (Osaka, Japan)より、 Endothelial Cell Basal Medium 2 は Lonza (Basel, Switzerland)より、 collagen type I solution は Research Institute for the Functional Peptides (Yamagata, Japan) より購入した。抗体については、 anti-neural cadherin (N-cadherin) antibody は BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) より、 anti-GAPDH, HRP-linked antibody は Fujifilm Wako Pure Chemical より、 anti-rabbit IgG HRP-linked antibody、 anti-SMAD2 antibody、 anti-p-SMAD2 (Ser465/467) antibody、 anti-caspase-3 antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より、 Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody、 Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody、 anti-zonula

occludens-1 (ZO-1) antibody、anti-occludin antibody、anti-claudin-5 antibody、anti-glucose transporter 1 (GLUT1) antibody は Thermo Fisher Scientific より、anti-vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) antibodies は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)より、Anti-P-glycoprotein (P-gp) antibody および anti-breast cancer resistant protein (BCRP) antibody は abcam (Cambridge, UK)より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

### 2.2.2 細胞培養

未分化なヒト iPS 細胞 (610B1、606A1 および 648A1) は mitomycin C 処理により増殖能を不活化した mouse embryonic fibroblasts 上で、5 ng/mL FGF2 を含む iPS cell medium (20% KSR、1 × NEAA、2 mM L-glutamine、0.1 mM 2-mercaptoethanol を含む DMEM/F12) を用いて培養した。剥離液には 1 mg/mL collagenase type IV、0.25% trypsin、20% KSR、1 mM CaCl<sub>2</sub> を含む Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium, magnesium (D-PBS (-)) を用いた。

hCMEC/D3 細胞は 5% FBS、5 µg/mL L-ascorbic acid、1% chemically defined lipid concentrate、10 mM HEPES solution、1% PS、1.4 µM hydrocortisone、および 1 ng/mL FGF2 を含む Endothelial Cell Basal Medium-2 (hCMEC/D3 medium) 中で培養した。細胞は TrypLE select で剥離し、1:5 の割合で collagen type I でコートしたディッシュに継代した。経内皮電気抵抗 (TEER) 値の測定前には、collagen type I でコートしたセルカルチャーインサートに細胞を  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、TGF-β 受容体阻害薬 (1 µM) 含有または非含有の hCMEC/D3 medium で培養をした。

HUVEC は Endothelial Cell Media を用いて添付マニュアルに従い培養した。TrypLE select で細胞を剥離し、20 µg/mL fibronectin でコートしたセルカルチャーインサートに  $4.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。TGF-β 受容体阻害薬 (1 µM) 含有ま

たは非含有の HE-SFM based medium (1% PDS および 1 × PS を含有する HE-SFM) で 24 時間培養した。

### 2.2.3 コーティング

GFR-Matrigel は氷上で iPS cell medium にて 30 倍希釈し、6-well プレートに冷やしたチップを用いて移した。その後、37°C で 30 分静置した。

Fibronectin および collagen type IV はそれぞれ 100 µg/mL、400 µg/mL となるよう D-PBS (-) で希釈し、セルカルチャーインサートもしくは well プレートに移した。その後、37°C でセルカルチャーインサートは 4 時間、well プレートは 1 時間静置した。

Collagen type I はセルカルチャーインサートもしくは well プレートに行き渡らせた後、除去し、乾燥させた。使用前に D-PBS (-) で洗浄した。

### 2.2.4 ヒト iPS 細胞から iBMELCs への分化誘導

Lippmann らの報告[7,8]を改変したプロトコルを用いてヒト iPS 細胞から iBMELCs への分化誘導を行った。ヒト iPS 細胞を GFR-Matrigel でコーティングした 6-well プレートに播種し、35 ng/mL の FGF2 を添加した StemSure hPSC medium にて 3 日間もしくは 4 日間培養した。この間、培地交換は毎日行った。ヒト iPS 細胞が 70%コンフルエントの状態になった状態で分化を開始した。分化開始日に培地を iPS cell medium に変更し、6 日間培養した。この間、毎日培地交換を行った。分化 6 日目に培地を 10 µM RA および 20 ng/mL FGF2 を含有する HE-SFM based medium でさらに 2 日間培養し、毎日培地交換を行った。分化 8 日目に分化細胞を D-PBS (-) で洗浄し、Accutase を加え、37°C で 20 分間静置した。その後、培地を用いて回収した細胞を 100 × g で遠心し、培地を吸引した後

に再度培地を注ぎ、細胞懸濁液を作製後、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin および 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  collagen type IV の混合液にてコーティングされたセルカルチャーインサートもしくは well プレートに  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、10  $\mu\text{M}$  RA および 20 ng/mL FGF2 を添加した HE-SFM based medium にて培養した。分化 9 日目に培地を RA と FGF2 非添加の HE-SFM based medium に変更し、培養した。分化 10 日目に RA と FGF2 非添加の HE-SFM based medium で培地交換し、以降、培地交換は行わなかった。TGF- $\beta$  受容体阻害薬は分化 8 日目から 10 日目までの 48 時間添加した。

### 2.2.5 TEER 値計測

分化 9 日目以降、24-well セルカルチャーインサート上の TEER 値を Millicell ERS-2 (Merck Millipore) または cellZscope (CellSeed, Tokyo, Japan) を使用し、添付マニュアルに従い測定した。培地量は頂端側で 300  $\mu\text{L}$ 、基底側で 800  $\mu\text{L}$  とした。24-well セルカルチャーインサートの面積は 0.3 cm<sup>2</sup> である。補正 TEER 値は実測値にセルカルチャーインサートの表面積を掛けた値 ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) とした。

### 2.2.6 LY の透過試験

分化 10 日目に培地を transport buffer (10 mM HEPES solution を含む HBSS) に置き換え、37°C で 20 分間プレインキュベーションした。300  $\mu\text{M}$  LY を含有する transport buffer を頂端側に加え、37°C で 60 分間インキュベート後、100  $\mu\text{L}$  の溶液を基底側から回収した。Transport buffer の液量は頂端側で 300  $\mu\text{L}$ 、基底側で 800  $\mu\text{L}$  とした。LY (励起波長; 428 nm、蛍光波長; 536 nm) の蛍光強度は Synergy HTX multimode plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VA, USA) で測定し、Gen 5 data analysis software (BioTek Instruments) を用いて解析した。

### 2.2.7 RT-qPCR 解析

Total RNA は Agencort RNAdvance Tissue Kit の添付マニュアルに従い抽出した。cDNA の合成は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を使用して添付マニュアルに従って調製し、サーマルサイクラーを用いて 37°C にて 15 分間、50°C にて 5 分間、98°C にて 5 分間処理して逆転写反応を行った。

RT-qPCR は KAPA SYBR FAST qPCR Kit および LightCycler 96 System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて、95°C にて 3 分間プレインキュベーション後、95°C にて 3 秒間、60°C にて 31 秒間のサイクルを 40 サイクル行った。結果は内在性コントロールとして hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) を用いて補正し、算出した。RT-qPCR Primer は Table 2-1 に示したものをを用いた。

### 2.2.8 免疫蛍光染色法

Cell carrier-96上の細胞を4% paraformaldehydeを用いて15分間室温で固定し、glycine含有D-PBS (-) で3回洗浄後、0.1% Triton X-100含有D-PBS (-) で透過処理を室温で25分間行った。5% donkey serumを用いて室温で20分間ブロッキングを行った後、一次抗体を室温で2時間反応させた。Glycine含有D-PBS (-) で3回洗浄した後、室温で二次抗体を200倍希釈で60分間反応させた。この間、核染色試薬である1 µg/mL DAPIも同時に反応させた。その後、3回D-PBS (-) で洗浄し、Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer) にて解析した。一次抗体としてVE-cadherin、claudin-5、P-gp、BCRP、およびGLUT1を用いる場合は、Cell carrier-96上の細胞を0.1% bovine serum albumin (BSA)含有D-PBS (-) で3回洗浄後、4% paraformaldehydeを用いて15分間室温で固定し、再度0.1% BSA含有D-PBS (-) で

3回洗浄した後、0.1% Triton X-100含有D-PBS (-) にて5分間透過処理を行った。その後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄し、一次抗体を用いて4°Cで一晩反応後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄、200倍希釈した二次抗体を用いて60分間室温で反応させた。その後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄し、1 µg/mLのDAPIを5分間反応させ、細胞を4% paraformaldehydeを用いて5分間処理し、D-PBS (-) で3回洗浄した。解析はOperetta High-Content Imaging Systemにて行った。Harmony high-content analysis software (PerkinElmer) を用いて陽性細胞をカウントし、3 well (6 field/well) の平均細胞数を算出した。陽性細胞率は、陽性細胞数を全細胞数で割ることにより算出した。また、蛍光強度は、Harmony high-content analysis softwareを用いて、3 well (6 field/well) の平均蛍光強度を算出した。平均蛍光強度は、蛍光強度を全細胞数で割ることにより算出した。抗体はTable 2-2に示したものをを用いた。

### 2.2.9 管状構造形成試験

分化8日目の細胞を100 µg/mL fibronectin と 400 µg/mL collagen type IV でコートした6-well プレートに播種した。分化10日目に、細胞をTrypLE Selectにて剥離し、300 µLのGFR-Matrigel (原液) をコートした24-well プレートに $6 \times 10^5$  cells/well、 $8 \times 10^5$  cells/well、もしくは $10 \times 10^5$  cells/wellの細胞密度で播種し、HE-SFM based medium に50 ng/mL VEGFを加えた培地中にて20–24時間培養した。その後、calcein-AMを含む培地を用いて室温で30分間静置し、ECLIPSE Ni microscope (Nikon, Tokyo, Japan)を用いて管状構造を観察した。

### 2.2.10 Ac-LDL 取り込み試験

Cell carrier-96上の分化細胞を10 µg/mL Ac-LDLを含む培地中で37°Cで5時間培養し、10 µg/mL Hoechst 33342を含む培地に交換した後、室温にて30分静置

した。培地で4回洗浄した後、Operetta High-Content Imaging Systemにてサンプルを観察した。陽性細胞率はHarmony high-content analysis softwareを用い、3 well (6 field/well) の平均数としてカウントした。陽性細胞数を全細胞数で割ることにより、陽性細胞率を算出した。

### 2.2.11 Western blotting

細胞を1×sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis sample bufferにて溶解させ、サンプルを作製した。サンプルをpolyvinylidene fluoride membranesに転写し、4% Block-Ace solutionにてブロッキングを行った。Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T)にて洗浄し、一次抗体を室温で1時間処理した。その後TBS-Tにて洗浄し、二次抗体を室温で30分間処理した。TBS-Tにて洗浄した後、Amersham Imager 600 system (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA)にて検出し、シグナル強度を定量化した。バックグラウンドはRolling Ball algorithmにより消去した。抗体はTable 2-3に示したものをを用いた。

### 2.2.12 P-gp および BCRP の機能解析

96-well プレート上に播種した細胞 (分化 10 日目) の培地を吸引後、transport buffer に置換し 37°C で 15 分間プレインキュベートした。Transport buffer を吸引後、P-gp の受容体阻害薬である 10  $\mu$ M CsA または BCRP の受容体阻害薬である 20  $\mu$ M Ko 143 の存在下または非存在下で、10  $\mu$ M rhodamine 123 または 20  $\mu$ M Hoechst 33342 を含有する transport buffer に置換し、37°C で 60 分間インキュベートした。その後、細胞を D-PBS (-) で 3 回洗浄し、5% Triton X-100 含有 D-PBS (-) で溶解した。Rhodamine 123 および Hoechst 33342 の蛍光強度を Synergy HTX multimode plate reader で測定し、Gen 5 data analysis software にて解析した。分化細胞の総タンパク質量は、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。

### 2.2.13 iBMELCs の凍結融解

分化 8 日目に細胞を D-PBS (-) で洗浄し、accutase を加え、37°C で 20 分間静置した。その後、培地を用いて回収した細胞を 100 × g で遠心し、培地を吸引した後に TC Protector を注ぎ、細胞懸濁液を作製後、-80°C のディープフリーザーにて凍結した。60–90 分後、または 1 ヶ月後に凍結細胞を解凍した。融解時には、温めた HE-SFM を使用し、細胞保存液を除去するため、細胞を 15 mL 遠沈管もしくは 50 mL 遠沈管に移して、100 × g で 5 分間遠心した。遠心後、培地を吸引した後に新しい培地で懸濁し、その後の実験に使用した。

### 2.2.14 統計学的解析

「n」はサンプル数を表している。定量的なデータは means ± SD として表した。2 群間の比較は Student's *t*-test によって行った。長期間の TEER 値測定実験での 2 群間比較には Two-way repeated measures analysis of variance を用いた。多重比較の際には、One-way analysis of variance を行った後、Tukey's honestly significant difference test によって行った。統計分析には IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いた。



**Table 2-1. PCR primer sequences**

Gene	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')
<i>VE-cadherin</i> (NM_001795.5)	GATTTGGAACCAGATGCACA	ACTTGGCATTCTTGCGACTC
<i>MDRI</i> (NM_001348945.2)	CCCATCATTGCAATAGCAGG	TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA
<i>BCRP</i> (NM_004827.3)	AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT	CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA
<i>GLUT1</i> (NM_006516.3)	GAAGAGAGTCGGCAGATGATG	GGAGTAATAGAAGACAGCGTTGATG
<i>Occludin</i> (NM_002538.4)	TCCAATGGCAAAGTGAATGA	GCAGGTGCTCTTTTTGAAGG
<i>ZO-1</i> (NM_001355012.2)	CGAGGGATAGAAGTGCAAGTAGA	TATTCTTCATTTTTCCGGGATTT
<i>MMP9</i> (NM_004994.3)	TGTATTTGTTCAAGGATGGGAAG	AGAAGAAAAGCTTCTTGAGAGC
<i>HPRT1</i> (NM_000194.3)	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	TCAAGGGCATATCCTACAACA

**Table 2-2. Antibodies for immunofluorescence analysis**

Target	Source	Catalog number	Species	Dilution
VE-cadherin	Santa Cruz	sc-9989	Mouse	1:25
P-gp	Abcam	ab10333	Mouse	1:25
BCRP	Abcam	ab3380	Mouse	1:50
GLUT1	Thermo	MA5-11315	Mouse	1:50
Occludin	Thermo	71-1500	Rabbit	1:50
ZO-1	Thermo	33-9100	Mouse	1:100
Claudin-5	Thermo	35-2500	Mouse	1:25
N-cadherin	BD Biosciences	610920	Mouse	1:25
Caspase-3	CST	9661S	Rabbit	1:100
Anti-rabbit (Alexa Fluor 488)	Thermo	A-21206	Donkey	1:200
Anti-mouse (Alexa Fluor 568)	Thermo	A-11004	Goat	1:200

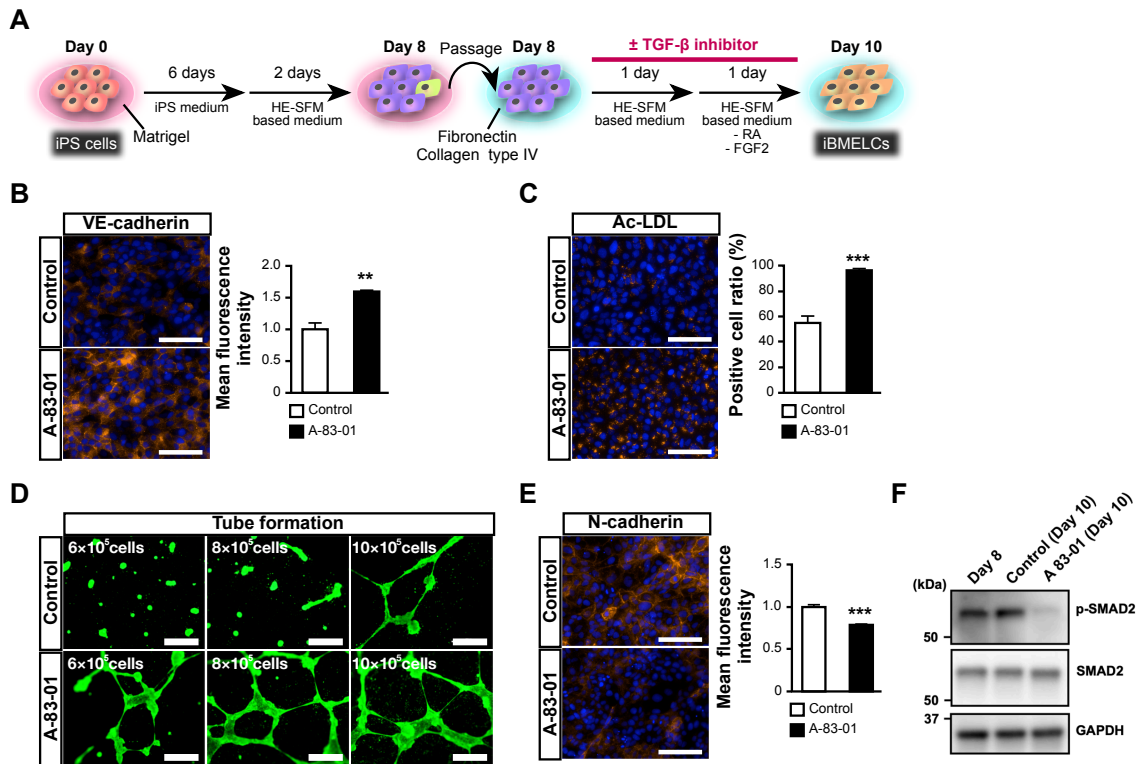
**Table 2-3. Antibodies for Western blotting analysis**

Target	Source	Catalog number	Species	Dilution
GAPDH (HRP)	Wako	35-2500	Mouse	1:1000
SMAD2	CST	5339	Rabbit	1:1000
p-SMAD2 (Ser465/467)	CST	3108	Rabbit	1:100
Rabbit (HRP)	CST	7074	Goat	1:5000

## 2.3 結果

### 2.3.1 TGF- $\beta$ 受容体阻害薬を用いて分化誘導した iBMELCs の特徴

Fig. 2-1A に示したプロトコルを用いて iBMELCs を分化させた。TGF- $\beta$  受容体阻害薬が血管内皮細胞としての iBMELCs の特性に与える影響を調べるために、免疫蛍光染色、Ac-LDL 取り込み試験、管状構造形成試験を行った。血管内皮細胞マーカーである VE-cadherin の発現 (Fig. 2-1B)、および Ac-LDL 取り込み試験における陽性細胞率は A-83-01 の添加により有意に増加した (Fig. 2-1C)。また、対照群では管状構造の形成に約  $10 \times 10^5$  cells/well が必要であったのに対し、A-83-01 添加群では  $10 \times 10^5$  cells/well 以下でも管状構造を形成した (Fig. 2-1D)。TGF- $\beta$  は、endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) を仲介することが知られている [18]。そこで、TGF- $\beta$  阻害による EndoMT の抑制が血管内皮細胞としての特性を向上させていると考え、間葉系細胞マーカーである N-cadherin の発現量を確認した。その結果、A-83-01 の添加により N-cadherin の発現量は有意に減少した (Fig. 2-1E)。続いて、分化過程における TGF- $\beta$  シグナル経路の活性化を確認するため、Western blotting により SMAD2 のリン酸化を検出した。その結果、分化 8 日目および 10 日目の対照群ではリン酸化された SMAD2 が検出されたが、10 日目の A-83-01 添加群ではほとんど検出されなかった (Fig. 2-1F)。



**Figure 2-1. The effect of TGF-β inhibitor on iBMELCs differentiation.**

(A) A schematic diagram of the protocol of differentiation of human iPSCs to iBMELCs. (B) Immunofluorescence for the endothelial cell adhesion molecule (VE-cadherin; red). Blue; DAPI. Scale bar, 100 μm. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test (\*\**p* < 0.01), control = 1. Data are represented as the mean ± SD (*n* = 3, *n*; sample number). (C) Ac-LDL (red) uptake assay. Blue; Hoechst 33342. Scale bar, 100 μm. Positive cell ratio was defined as the number of cells with Ac-LDL uptake to the total number of cells. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test (\*\**p* < 0.001). Data are represented as the mean ± SD (*n* = 3, *n*; sample number). (D) Tube formation assay. The cells were stained with calcein (green). Scale bar, 500 μm. (E) Immunofluorescence with mesenchymal cell adhesion molecule (N-cadherin; red). Blue; DAPI. Scale bar, 100 μm. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test (\*\**p* < 0.001), control = 1. Data are represented as the mean ± SD (*n* = 3, *n*; sample number). (F) The phosphorylation levels of SMAD2 in iBMELCs were detected by Western blotting analysis.

### 2.3.2 タイトジャンクション形成に対する TGF-β 受容体阻害薬の効果

タイトジャンクション形成に対する TGF-β 受容体阻害薬の効果を調べるために、タイトジャンクション強度の指標である TEER 値を測定した。その結果、全ての iPS 細胞株において、A-83-01 は iBMELCs の TEER 値を有意に増加させた (Fig. 2-2A)。さらに、他の TGF-β 受容体阻害薬である SB-431542 および RepSox を用いた場合にも同様の効果が観察された (Fig. 2-2B)。TEER 値はタイトジャン

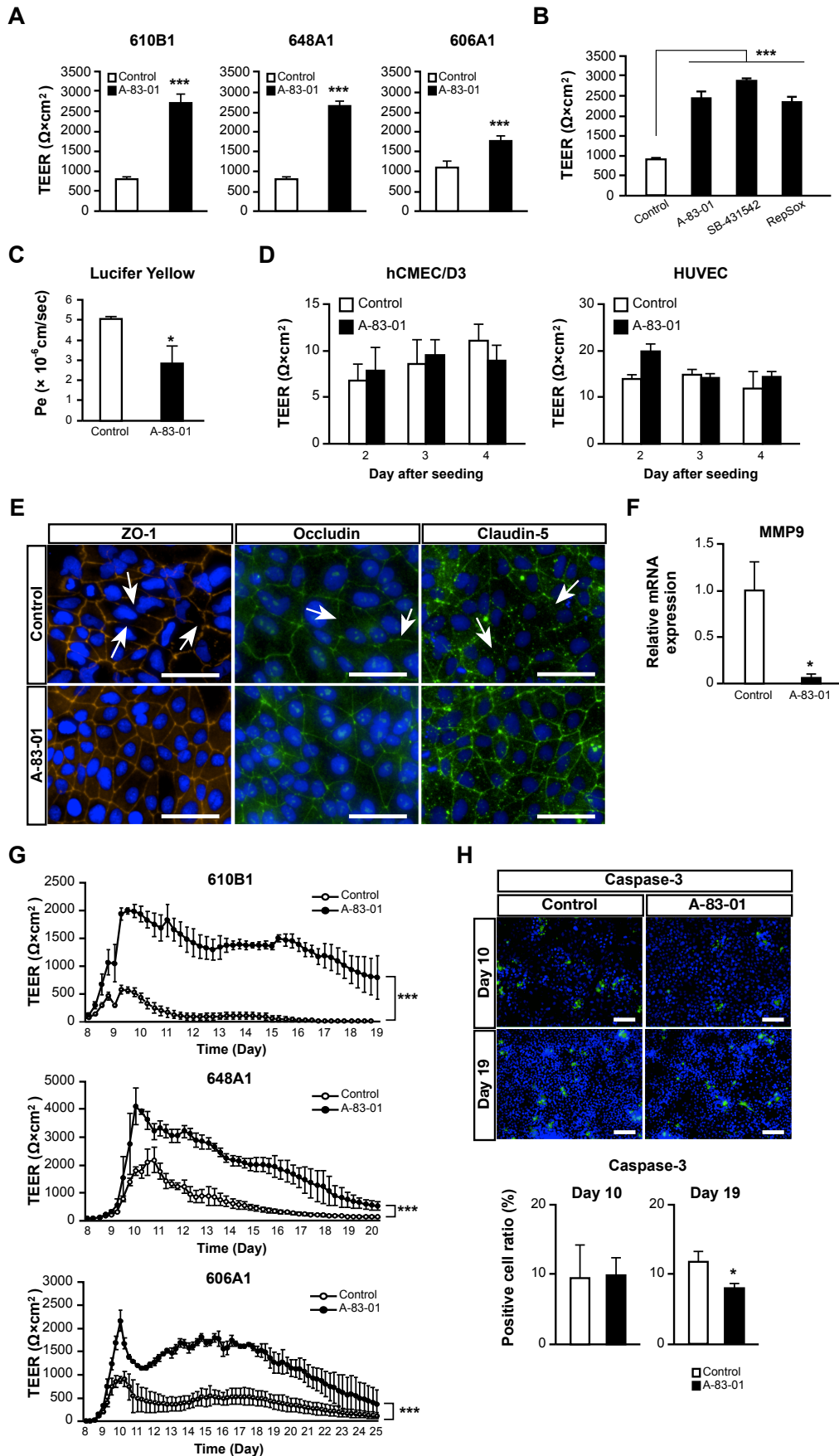
クシヨンの強度を簡易的に測定できる一方で、測定装置や温度に大きく依存するため、LY を用いて透過性試験を行い傍細胞系輸送の評価を行った。その結果、A-83-01 は LY の透過係数 ( $P_e$ ) についても有意に低下させることが示された (Fig. 2-2C)。

他の内皮細胞に対する TGF- $\beta$  受容体阻害薬の効果を調べるために、ヒト不活化脳毛細血管内皮細胞である hCMEC/D3 細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC を A-83-01 で処理したが、A-83-01 は hCMEC/D3 細胞および HUVEC の TEER 値に対してほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 2-2D)。

さらに、iBMELCs における A-83-01 がタイトジャンクション関連タンパク質にどのような影響を与えているのかを調べるために、タイトジャンクションマーカーである ZO-1、occludin、claudin-5 を免疫蛍光染色法にて解析した。その結果、対照群で観察された断片的で不連続なタイトジャンクション (白矢印) が、A-83-01 添加群では連続的になっている様子が観察された (Fig. 2-2E)。続いて、タイトジャンクションが連続的になっているメカニズムとして、BBB 透過性を高める matrix metalloproteinase 9 (MMP9) [19] の発現量が変化しているのではないかという仮説のもと、MMP9 の mRNA 発現量を測定した。その結果、対照群に比べ A-83-01 添加群で有意に mRNA 発現量が減少していることが示された (Fig. 2-2F)。

iBMELCs を薬物動態試験に使用するためには、高い TEER 値を安定的に維持することが必要である。そこで、24-well セルカルチャーインサート上に細胞を播種してから約 2 週間、6 時間ごとに TEER 値を測定した。その結果、全ての iPS 細胞株において、A-83-01 添加群では対照群よりも有意に高い TEER 値が長期間維持された (Fig. 2-2G)。続いて、長期間 TEER 値が高いまま維持されたメカニズムとして、A-83-01 の添加により長期的な細胞生存率が上がった可能性を

考えた。そのため、caspase-3 の陽性細胞率を調べたところ、分化 10 日目では A-83-01 添加の有無に関わらず同程度であったが、分化 19 日目では A-83-01 添加群で有意に減少した (Fig. 2-2H)。



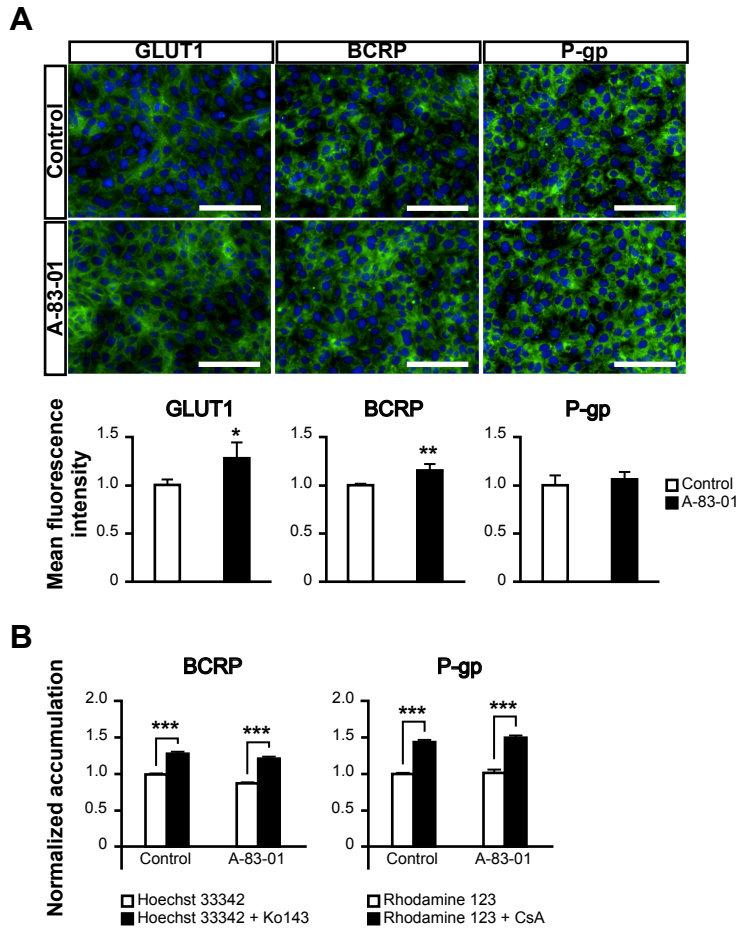
### Figure 2-2. Tight junction analysis.

(A) Effects of A-83-01 on the TEER values of brain microvasculae endothelial cells derived from multiple iPSC lines. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test ( $***p < 0.001$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD (610B1,  $n = 3$ ; 648A1, 606A1  $n = 4$ ,  $n$ ; sample number). (B) Effects of TGF- $\beta$  inhibitors (A-83-01, SB-431542, and RepSox) on the TEER values of iBMELCs. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA and Tukey test ( $***p < 0.001$ ), vs. control. Data are represented as the mean  $\pm$  SD (610B1,  $n = 3$ ,  $n$ ; sample number). (C) Lucifer Yellow permeability coefficient (Pe) in iBMELCs. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number). (D) Effect of TGF- $\beta$  inhibitor on human immortalized brain microvasculae endothelial cells (hCMEC/D3) and umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Statistical significance was calculated using two-way repeated measures ANOVA. Data are represented as the mean  $\pm$  SD (hCMEC/D3,  $n = 4$ ; HUVEC,  $n = 3$ ,  $n$ ; sample number). (E) Immunofluorescence for the tight junction markers (ZO-1, occludin, and claudin-5). Blue: DAPI. White arrows: fragile and discontinuous tight junctions. Scale bar, 50  $\mu$ m. (F) Relative gene expression of *MMP9* in A-83-01-treated cells. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ), control = 1. Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number). (G) Time-course of the TEER values of iBMELCs derived from multiple iPSC lines. Statistical significance was calculated using two-way repeated measures ANOVA ( $***p < 0.001$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD (648A1,  $n = 6$ ; 610B1, 606A1,  $n = 4$ ,  $n$ ; sample number). (H) Immunofluorescence for the apoptosis marker caspase-3 (green). Blue: DAPI. Scale bar, 100  $\mu$ m. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number).

### 2.3.3 トランスポーターの発現と活性に対する TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果

トランスポーターは、物質の選択的な脳への移行において重要な役割を果たしている。そこで、ヒト脳毛細血管内皮細胞において高発現しているトランスポーターである GLUT1、BCRP、P-gp の発現に着目し、免疫蛍光染色法にて解析した。その結果、A-83-01 の添加による P-gp の発現に変化は認められなかったが、GLUT1 および BCRP の発現は有意に上昇した (Fig. 2-3A)。続いて、トランスポーター活性を評価するために、iBMELCs への各基質の蓄積量を測定した。その結果、BCRP または P-gp 基質の細胞内蓄積が両群で観察され、その量は各阻害薬の添加により有意に増加した (Fig. 2-3B)。





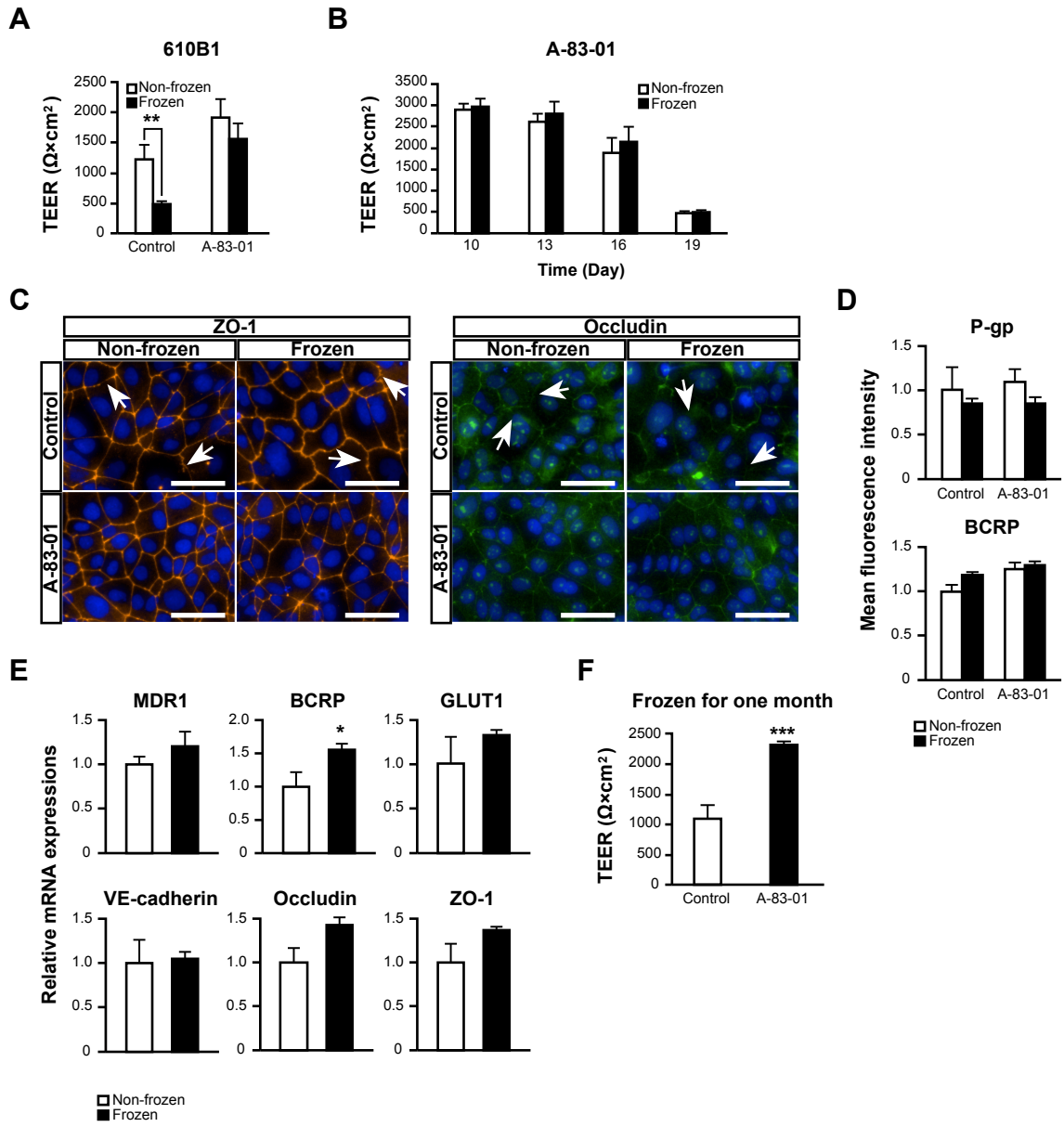
**Figure 2-3. Protein expression and activities of efflux transporters in iBMELCs.**

(A) Immunofluorescence and mean fluorescence intensity of transporters (GLUT1, BCRP, and P-gp). Blue: DAPI. Scale bar, 100  $\mu$ m. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ), control = 1. Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number). (B) Intercellular accumulation of each substrate of efflux transporters. iBMELCs were incubated with Hoechst 33342 (20  $\mu$ M) or rhodamine 123 (10  $\mu$ M) in the absence or presence of Ko143 (20  $\mu$ M) or CsA (10  $\mu$ M), respectively for 60 min at 37  $^{\circ}$ C. Relative fluorescence intensity values were normalized to protein content and self-normalized to the conditions without inhibitor. Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number). Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test ( $***p < 0.001$ ), vehicle of control = 1.

### 2.3.4 iBMELCs の凍結保存に対する TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の効果

細胞の凍結保存は、実用的な *in vitro* モデルを開発する上で必要なプロセスである。そこで本項目では、iBMELCs の凍結保存方法の開発を行った。分化 8 日目に凍結した iBMELCs を解凍し、24-well セルカルチャーインサートに播種し

た。播種後 2 日目の TEER 値は、対照群の凍結細胞では非凍結細胞に比べ有意に減少したが、A-83-01 添加群では凍結細胞における TEER 値の減少が抑制された (Fig. 2-4A)。さらに、A-83-01 添加群の TEER 値を継続して測定したところ、播種後 2 日目から 11 日目にかけて、凍結細胞および非凍結細胞の 2 群間で差は見られなかった (Fig. 2-4B)。続いて、免疫蛍光染色法によりタイトジャンクションを観察したところ、A-83-01 添加群では凍結融解に関係なく、連続したタイトジャンクションが観察された (Fig. 2-4C)。次に、P-gp および BCRP のタンパク質発現を確認した結果、各タンパク質の蛍光強度は、対照群および A-83-01 添加群ともに、非凍結群と凍結群の間でほとんど変化が認められなかった (Fig. 2-4D)。また、VE-cadherin、multiple drug resistance 1 (MDR1)、BCRP、GLUT1、occludin、ZO-1 の mRNA 発現量も凍結群と非凍結群で同等であった (Fig. 2-4E)。さらに、1 ヶ月間凍結保存した iBMELC においても、A-83-01 添加群の方が対照群と比べて有意に TEER 値が高く、A-83-01 添加群の TEER 値 (約  $2500 \Omega \times \text{cm}^2$ ) は、非凍結細胞と同等の値であった (Fig. 2-4F)。



**Figure 2-4. The effect of TGF- $\beta$  inhibitor on freezing–thawing of iBMELCs.**

(A) Freezing–thawing was performed at day 8 and the TEER values were measured at day 10. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test (\*\* $p < 0.01$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3, n$ ; sample number). (B) Temporal changes in TEER values were observed in the iBMELCs with TGF- $\beta$  inhibitor. Statistical significance was calculated using two-way repeated measures ANOVA. Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3, n$ ; sample number). (C) Immunofluorescence for the tight junction markers (ZO-1 and occludin). Blue; DAPI. White arrows: discontinuous tight junctions. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (D) Mean fluorescence intensities of P-gp and BCRP staining were calculated. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test, non-frozen of control = 1. Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3, n$ ; sample number). (E) Relative gene expression levels of *MDR1*, *BCRP*, *GLUT1*, *VE-cadherin*, *occludin*, and *ZO-1*. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ ), non-frozen = 1. Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3, n$ ; sample number). (F) Effect of TGF- $\beta$  inhibitor on the cryopreservation of iBMELCs. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t*-test (\*\*\*) $p < 0.001$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3, n$ ; sample number).

## 2.4 考察

A-83-01 は血管内皮細胞マーカーである VE-cadherin のタンパク質発現量と Ac-LDL 取り込み細胞の陽性細胞比率を有意に増加させた。これらの結果から、TGF- $\beta$  受容体阻害薬がヒト iPS 細胞から iBMELCs への分化を促進し、内皮細胞としての特性を強化していることが示唆された。この効果は、A-83-01 の添加により管状構造形成能が上昇した結果からも支持される。さらに、TGF- $\beta$  受容体阻害薬を添加した iBMELCs は、対照群と比べて有意に高い TEER 値を示し、LY の透過係数が低く、より強固で連続したタイトジャンクションを形成していた。生体内のヒト脳における TEER 値は報告されていないため、ラット脳での TEER 値 [20] を基に、 $1000 \Omega \times \text{cm}^2$  を生体内と同等の高い TEER 値と定義すると、A-83-01 添加群では生体と同等の TEER 値が再現できたとと言える。TGF- $\beta$  は EndoMT を介し、BBB 透過性を増加させることが知られている [18,21] ことから、TEER 値の上昇は EndoMT の抑制により生じていると仮定し、EndoMT が既に観察されている HUVEC や hCMEC/D3 細胞 [18,22] など他の内皮細胞を用いて検証した。しかし、TGF- $\beta$  受容体阻害薬は、HUVEC や hCMEC/D3 細胞の TEER 値にほとんど影響を与えなかった。また、TGF- $\beta$  受容体阻害薬は、間葉系細胞マーカーである N-cadherin のタンパク質発現量を低下させた。これらのことから、TEER 値の上昇は EndoMT の抑制だけでなく、TGF- $\beta$  シグナル経路の阻害による iBMELCs への分化促進効果によって引き起こされている可能性があることが示唆された。さらに、VE-cadherin がタイトジャンクションの正の調節因子であることを考慮すると [23]、TGF- $\beta$  受容体阻害薬の添加による VE-cadherin の発現増加は、TEER 値の有意な増加と相関することが示唆された。また、TGF- $\beta$  はタイトジャンクションを破壊する matrix metalloproteinase である MMP9 をアップレギュレートし、BBB における薬物の透過性を増加させることも報告されている

[19]。本研究では、TGF- $\beta$  受容体阻害薬の添加により、MMP9 の遺伝子発現レベルが有意に減少したことから、TGF- $\beta$  受容体阻害薬による MMP9 の発現抑制が強固なタイトジャンクションの形成に寄与している可能性が示された。一方で、HUVEC や hCMEC/D3 細胞の TEER 値には影響を与えなかったことから、MMP9 の遺伝子発現抑制が直接 TEER 値の上昇に寄与していない可能性や iBMELCs 特異的に効果を示す可能性も考えられる。そのため、MMP9 の発現抑制が TGF- $\beta$  受容体阻害薬の作用機序の一つであるか否かを決定づけるには更なる検討が必要である。また、分化 19 日目における caspase-3 の発現が有意に減少していたことから、高い TEER 値の維持効果は、TGF- $\beta$  受容体阻害薬によるアポトーシス抑制に関連している可能性も考えられる。排出トランスポーター解析の結果から、対照群および A-83-01 添加群の両方で活性を評価することができた。得られた結果は既存の報告で示された値に近かった[7,9]。特定のヒト iPS 細胞株ではより高い活性が報告されているが[8]、一般に iBMELCs の P-gp 機能は改善が必要だと言われている。また、本研究では蓄積法のデータのみを示しているため、透過法による評価が今後の課題の一つとなる。TGF- $\beta$  受容体阻害薬は、トランスポーター活性にほとんど影響を与えなかったが、BCRP と GLUT1 のタンパク質発現をわずかに増加させた。これらの結果は、TGF- $\beta$  受容体阻害薬を用いて分化させた細胞の特性が、脳毛細血管内皮細胞の特性に近くなっていることを示している。以上の結果から、TGF- $\beta$  受容体阻害薬は、ヒト iPS 細胞から iBMELCs への分化誘導において脳毛細血管内皮細胞の特性を調節し、*in vitro* BBB モデルの開発に有用であることが示された。

iBMELCs を実用的な *in vitro* モデルに適用するためには、細胞の凍結保存を可能にすることが必要である。対照群の凍結後の細胞では、非凍結の場合と比較して TEER 値が有意に低下した。Wilson らは、凍結保存が iBMELCs のバリア機能

を低下させることを報告している[25]。本研究で得られた結果は、この報告と一致している。しかし、TGF- $\beta$  受容体阻害薬を添加することにより、この凍結保存による TEER 値の低下を抑制し、強固なタイトジャンクションを維持することに成功した。iBMELCs を 1 ヶ月間凍結保存しても、TGF- $\beta$  受容体阻害薬により高い TEER 値を維持することができたことから、TGF- $\beta$  受容体阻害薬を分化誘導に用いることは、性能を維持したまま iBMELCs を凍結融解するためにも有用であることが示された。Wilson らも、ROCK 阻害薬である Y-27632 が TEER 値の減少を抑制することを報告している[24]。したがって、アポトーシスの抑制は、タイトジャンクションの強化につながるメカニズムの一つであるといえる。しかし、本研究では、分化 10 日目における A-83-01 の添加の有無に関わらず、非凍結条件下で caspase-3 の陽性細胞率は変化しなかったことから、この現象は TGF- $\beta$  受容体阻害薬による他の作用である可能性も否定できない。

本研究で使用したヒト iPS 細胞株は全て健常者由来であり、610B1 および 606A1 はヒト臍帯血細胞より、648A1 はヒト末梢血細胞より樹立されたものである。TGF- $\beta$  受容体阻害薬による VE-cadherin の免疫蛍光染色、Ac-LDL 取り込み試験、TEER 値計測は全ての細胞株で実施し、凍結融解後の TEER 値計測については 610B1 と 648A1 で実施した。それぞれの評価において株間の差はほとんどなく、同様の結果が得られたことから、TGF- $\beta$  受容体阻害薬の効果は汎用性の高いものと考えられる。

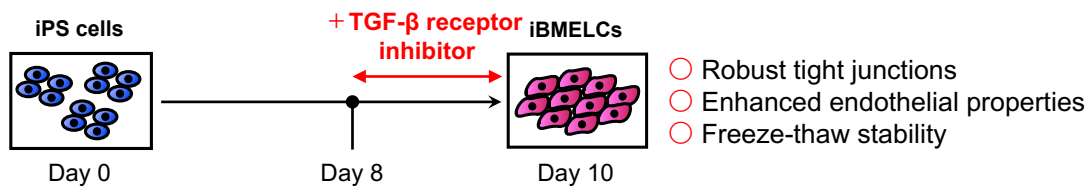
本研究では、特定の分化誘導法で作製した iBMELCs に対して TGF- $\beta$  阻害の効果を確認した。しかし、iBMELCs の分化誘導法には Quian らの方法[25]や Hollmann らの方法[9]など、いくつかの分化誘導法が存在する。Hollmann らの方法で分化した細胞は Lippmann らの方法で分化した細胞と比較的似ていることから、Hollmann らの方法においても TGF- $\beta$  受容体阻害薬は iBMELCs の分化を促

進すると推測する。一方で、Quian らの方法で分化させた iBMELCs の特性は Lippmann らの方法で分化させたものと類似しておらず、Quian らの方法における TGF- $\beta$  受容体阻害薬の効果は予測できない。したがって、TGF- $\beta$  阻害を他の分化誘導法に適用できるかどうかについては、今後の検討が必要である。



## 2.5 小括

TGF- $\beta$  受容体阻害薬を用いることで、iBMELCs のバリア機能と内皮特性を向上させることに成功した。また、TGF- $\beta$  受容体阻害薬には iBMELCs の凍結融解の影響を緩和する効果があることも明らかとなった。TGF- $\beta$  受容体阻害薬は低分子化合物であり、共培養法のような煩雑な操作を必要とせずに iBMELCs の性能を向上させることを考慮すると、TGF- $\beta$  受容体阻害薬は高機能で簡便な *in vitro* ヒト BBB モデルの開発に大きく寄与することが期待される。



Lippmann et al. *Fluids Barriers CNS*. (2017) 14(1):9.

### 第三章 ヒト iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞から iBMELCs への分化誘導法の開発

#### 3.1 緒言

第二章では、既存の分化誘導法を改良し、より血管内皮細胞としての性質を強め、バリア機能を向上させた iBMELCs を作製することに成功した。この改良を加えた iBMELCs を L-iBMELCs (Lippmann らによる報告を基に改良を加えた iBMELCs) と定義した。L-iBMELCs は、高いバリア機能を有する点で優れており、欠点であった血管内皮細胞としての性質の弱さを一定のレベルで克服したが、依然として内皮マーカーの発現が低く、遺伝子発現プロファイルが脳毛細血管内皮細胞と異なることが問題であった[26,27]。また、分化させた細胞を更に増殖させる方法がなく、L-iBMELCs を安定的に入手することが困難である。

血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞は胚発生期に脳に侵入し、ペリサイトや細胞外マトリックスと相互作用しながら脳毛細血管内皮細胞へと成熟する[28]。そこで、ヒト iPS 細胞由来内皮前駆細胞 (iEPCs) を経由して脳毛細血管内皮細胞に分化することで、生体内の脳毛細血管内皮細胞と同様の特徴を有する iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞様細胞を得ることができると仮定した。以前にヒト iPS 細胞より高純度な iEPCs を生成し、拡大培養後に凍結保存することに成功している[29]。本研究では、この凍結保存した iEPCs を用いて脳毛細血管内皮細胞へ分化誘導する方法を検討した。本研究で求めた条件を用いて分化誘導した iEPCs 由来脳毛細血管内皮細胞を L-iBMELCs と対比して E-iBMELCs と定義した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬及び細胞

ヒト初代培養細胞である hBMECs の total RNA は、ScienCell Research Laboratories より購入した。Laminin 211 の E8 断片 (LN221F)、laminin 411 の E8 断片 (LN411F) および laminin 511 の E8 断片 (LN511F) は Nippi (Tokyo, Japan) より、anti-platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM1) antibody は abcam より、anti-CD34 antibody は Novus Biologicals (Littleton, CO, USA) より、Essential 8 Flex medium および vitronectin-N (VTN-N) は Thermo Fisher Scientific より、cell culture inserts (1.0  $\mu\text{m}$  transparent PET membrane) は Corning より、fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa (FD4) およびゼラチンは Sigma-Aldrich より購入した。その他の試薬は第二章と同じものまたは市販の特級品を用いた。

### 3.2.2 細胞培養

L-iBMELCs に用いた未分化なヒト iPS 細胞株 610B1 は、mitomycin C 処理により増殖能を不活化した mouse embryonic fibroblasts 上で 5 ng/mL FGF2 を添加した iPS cell medium を用いて培養した。剥離液には 1 mg/mL collagenase IV、0.25% trypsin、20% KSR、および 1 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む D-PBS (-) を用いた。

E-iBMELCs に用いた未分化なヒト iPS 細胞株 610B1 は VTN-N (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) がコートされたプレート上で Essential 8 Flex medium を用いて培養した。剥離液は維持する際には 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid を、分化させる際には TrypLE Select を用いた。

hCMEC/D3 細胞は第 2 章と同様に hCMEC/D3 medium 中で培養した。

### 3.2.3 コーティング

ゼラチンのコーティングは、ゼラチンを蒸留水で 0.1% となるように溶解し、オートクレーブで滅菌した。この溶液を well プレートまたはセルカルチャーインサートに塗布し、37°C で 1 時間、または 4°C で一晩インキュベートしてから使用した。VTN-N のコーティングは、VTN-N を D-PBS (-) で 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  に希釈し、37°C で 1-2 時間培養した後、0.01% collagen type I solution を well プレートまたはセルカルチャーインサートに加えた後、すぐに乾燥させた。使用前に D-PBS (-) で洗浄後、使用した。Fibronectin および collagen type IV のコーティングは、fibronectin および collagen type IV を D-PBS (-) でそれぞれ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、well プレートまたはセルカルチャーインサートに加え、37°C で 2-4 時間インキュベートした。3 成分のコーティングでは、fibronectin と collagen type IV の混合物に VTN-N または laminin 断片を加えてコーティングに使用した。GFR-Matrigel のコーティングは、GFR-Matrigel を氷上にて DMEM/F12 で 30 倍に希釈し、希釈した溶液を冷えたチップで 6-well プレートに移し、37°C で 1 時間インキュベートしてから使用した。

### 3.2.4 ヒト iPS 細胞から L-iBMELCs への分化誘導

第二章と同様の方法を用い、TGF- $\beta$  受容体阻害薬である A-83-01 を使用して分化誘導を行った。

### 3.2.5 ヒト iPS 細胞から iEPCs への分化誘導および iEPCs の凍結融解

本研究室で以前に確立した方法 [29] を用いて分化誘導を行った。本研究においては、拡大培養および純化の操作を一部変更した。分化 11 日目に D-PBS (-) で洗浄後、TrypLE Select を用いて細胞を継代した。iEPCs 以外の細胞が残存する場合は、以下の手順で除去した。TrypLE Select 添加後、iEPCs 以外の細胞がプレ

ートから剥離するまで数回タッピングした。iEPCs 以外の細胞を含む TrypLE Select を吸引除去した後、D-PBS (-) で 1 回洗浄した。その後、TrypLE Select を再度使用して iEPCs を継代した。

iEPCs の凍結は TC Protector を用いて行った。TC Protector にて再懸濁後、 $-80^{\circ}\text{C}$  のディープフリーザーにて凍結した。融解時は  $37^{\circ}\text{C}$  の温浴にて半融解させ、あらかじめ温めておいた 15 mL 遠沈管もしくは 50 mL 遠沈管に入った 10 mL の培地の中から 1 mL を取り、半融解の細胞懸濁液に注ぎ、完全に融解させた後、遠沈管に戻し、 $100 \times g$  で 5 分間遠心した。その後、培地を吸引した後に新しい培地で懸濁し、その後の実験に使用した。

### 3.2.6 iEPCs から E-iBMELCs への分化誘導

解凍した iEPCs を各種コーティング剤でコートした 12-well セルカルチャーインサート ( $0.5\text{--}9 \times 10^5$  cells/insert)、12-well プレート ( $3.5 \times 10^5$  cells/well)、96-well プレート ( $0.3 \times 10^5$  cells/well) に播種し、 $1 \times \text{PS}$  と  $20 \text{ ng/mL FGF2}$  に 2–10% KSR、5% FBS、5% PDS、2–10% B27、または 7.5% B27、 $0.1\text{--}10 \mu\text{M A-83-01}$  のいずれかを添加した HE-SFM で培養した。iEPCs と hCMEC/D3 細胞のバリア機能を比較するために、hCMEC/D3 細胞 (継代数 4) を iEPCs と同じ方法で培養した。

### 3.2.7 TEER 値測定

解凍した iEPCs または hCMEC/D3 細胞を 12-well セルカルチャーインサートに播種し、播種翌日より Millicell ERS-2 または cellZscope を使用し、添付マニュアルに従い測定した。培地量は頂端側で  $500 \mu\text{L}$ 、基底側で  $1500 \mu\text{L}$  とした。12-well セルカルチャーインサートの面積は  $1.12 \text{ cm}^2$  である。補正 TEER 値は第 2 章と同様に算出した。

### 3.2.8 FD4 および LY の透過試験

iEPCs を播種してから 4 日目に、培地を transport buffer に置き換え、37°C で 20 分間プレインキュベーションした。その後、1 mg/mL FD4 または 300  $\mu$ M LY を含有する transport buffer を頂端側に加え、37°C で 60 分間インキュベート後、基底側から 100  $\mu$ L の溶液を回収した。Transport buffer の液量は頂端側で 500  $\mu$ L、基底側で 1500  $\mu$ L とした。FD4 (励起波長; 498 nm、蛍光波長; 522 nm) または LY (励起波長; 428 nm、蛍光波長; 536 nm) の蛍光強度は Synergy HTX multimode plate reader で測定し、Gen 5 data analysis software を用いて解析した。

### 2.2.9 RT-qPCR 解析

第二章と同様の方法で試験し、RT-qPCR に用いたプライマーは Table 3-1 に示したものを使用した。

### 3.2.10 免疫蛍光染色法

第二章と同様の方法で試験し、抗体は Table 3-2 に示したものを使用した。

### 3.2.11 管状構造形成試験

解凍した iEPCs を 300  $\mu$ L の GFR-Matrigel (原液) をコートした 24-well プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し、5% KSR および 1  $\times$  PS を含む HE-SFM に 50 ng/mL VEGF を加えた培地中にて 20–24 時間培養した。その後、calcein-AM を含む培地中で室温にて 30 分間静置し、ECLIPSE Ni microscope を用いて管状構造を観察した。

### 3.2.12 Ac-LDL 取り込み試験

Cell carrier-96 上の分化細胞を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ac-LDL を含む iEPCs 培地中で 37°C で 5 時間培養し、その後、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33342 を含む培地中で室温にて 10 分静置した。培地で 4 回洗浄した後、Operetta High-Content Imaging System にてサンプルを観察した。陽性細胞率は Harmony high-content analysis software を用い、3 well (6 field/well) の平均数としてカウントした。陽性細胞数を全細胞数で割ることにより、陽性細胞率を算出した。

### 3.2.13 P-gp の機能解析

iEPCs を播種してから 4 日目に、第二章と同様の方法で試験した。

### 3.2.14 統計学的解析

「n」はサンプル数を表している。定量的なデータは  $\text{means} \pm \text{SD}$  として表した。2 群間の比較は Student's *t*-test によって行った。長期間の TEER 値測定実験での 2 群間比較には Two-way repeated measures analysis of variance を用いた。多重比較の際には、One-way analysis of variance を行った後、Tukey's honestly significant difference test によって行った。統計分析には IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 を用いた。

**Table 3-1. PCR primer sequences**

Gene	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')
<i>VE-cadherin</i> (NM_001795.5)	GATTTGGAACCAGATGCACA	ACTTGGCATTCTTGCGACTC
<i>MDR1</i> (NM_001348945.2)	CCCATCATTGCAATAGCAGG	TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA
<i>BCRP</i> (NM_004827.3)	AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT	CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA
<i>GLUT1</i> (NM_006516.3)	GAAGAGAGTCGGCAGATGATG	GGAGTAATAGAAGACAGCGTTGATG
<i>Occludin</i> (NM_002538.4)	TCCAATGGCAAAGTGAATGA	GCAGGTGCTCTTTTTGAAGG
<i>ZO-1</i> (NM_001355012.2)	CGAGGGATAGAAGTGCAAGTAGA	TATTCTTCATTTTTCCGGGATTT
<i>PECAMI</i> (NM_000442.5)	AGTCGGACAGTGGGACGTAT	ATGACCTCAAACCTGGGCATC
<i>HPRT1</i> (NM_000194.3)	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	TCAAGGGCATATCCTACAACA

**Table 3-2. Antibodies for immunofluorescence analysis**

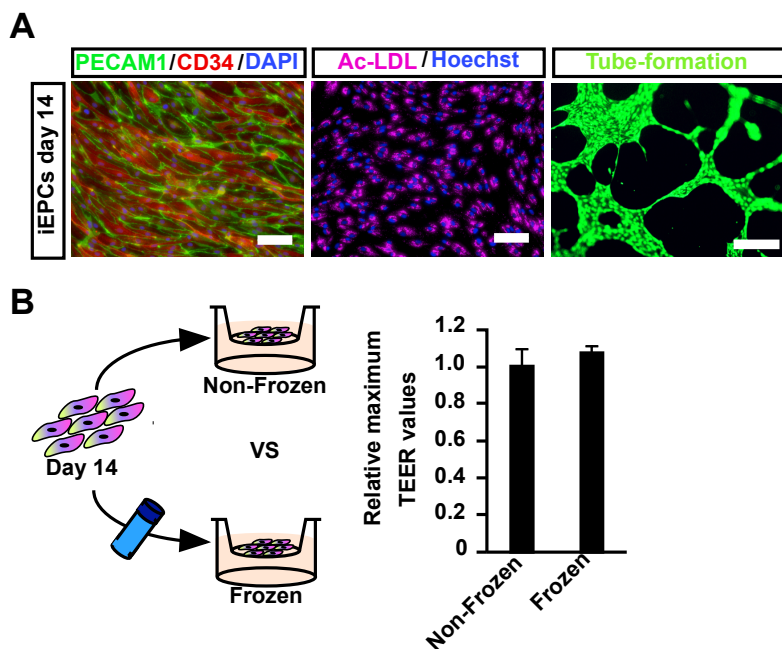
Target	Source	Catalog number	Species	Dilution
VE-cadherin	Santa Cruz	sc-9989	Mouse	1:25
P-gp	Abcam	ab10333	Mouse	1:25
BCRP	Abcam	ab3380	Mouse	1:50
CD34	Novus	NBP2-32932	Mouse	8 µg/mL
GLUT1	Thermo	MA5-11315	Mouse	1:50
PECAM1	Abcam	ab28364	Rabbit	1:25
ZO-1	Thermo	33-9100	Mouse	1:100
Claudin-5	Thermo	35-2500	Mouse	1:25
Anti-rabbit (Alexa Fluor 488)	Thermo	A-21206	Donkey	1:200
Anti-mouse (Alexa Fluor 568)	Thermo	A-11004	Goat	1:200



### 3.3 結果

#### 3.3.1 iEPCs のバリア機能に対する凍結融解の影響

当研究室の以前の報告 [29] に基づいて、iEPCs を拡大培養し、凍結保存した。以前の報告と同様に、iEPCs は PECAM1 および CD34 陽性細胞であり、Ac-LDL 取り込み能や管状構造形成能を有することを確認した (Fig. 3-1A)。さらに、iEPCs における遺伝子発現、管状構造形成能および Ac-LDL の取り込み能は凍結融解の影響を受けないことを以前に報告している[29]。本研究では、iEPCs のバリア機能に対する凍結融解の影響を解析するために、凍結 iEPCs と非凍結 iEPCs を用いて TEER 値の差を測定した。その結果、両群に有意差がなかったため、以降、凍結 iEPCs を使用して実験を行った (Fig. 3-1B)。



**Figure 3-1. Effect of freeze–thawing on the physical barrier function of iEPCs.**

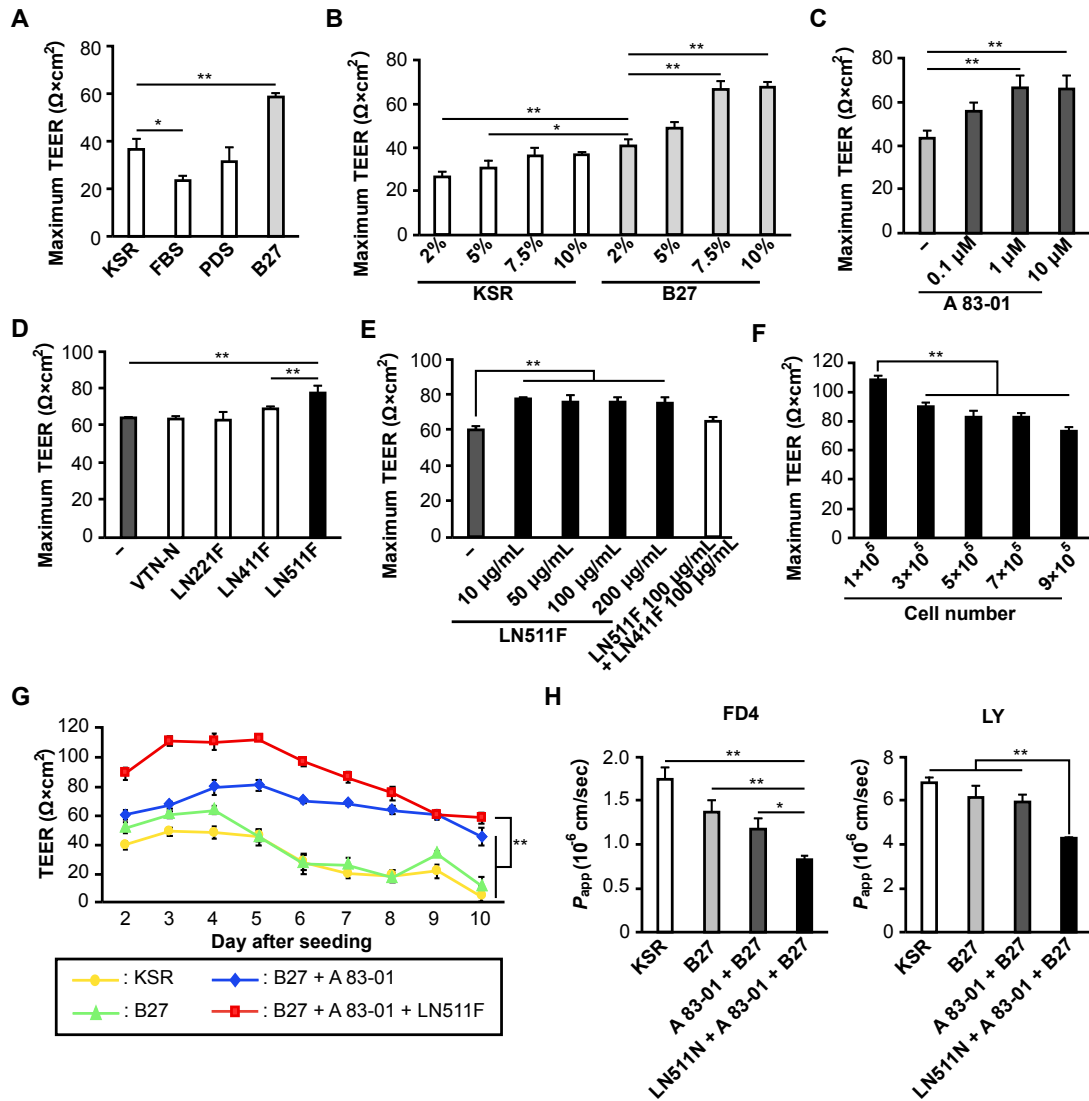
(A) Immunofluorescence analyses of PECAM1 (green), CD34 (red), and Dil-Ac-LDL uptake and tube formation assays of 610B1-derived iEPCs. DAPI = blue (immunofluorescence analyses), Hoechst 33342 (Dil-Ac-LDL uptake assay) = blue, Dil-Ac-LDL = pink, calcein = green. Scale bars = 100  $\mu$ m (immunofluorescence analyses and Dil-Ac-LDL uptake assay) and 500  $\mu$ m (tube formation assay). (B) Measurement of TEER values of frozen and non-frozen iEPCs ( $7 \times 10^5$  cells/insert) on day 14. Data are presented as the mean  $\pm$ SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number).

### 3.3.2 iEPCsのバリア機能を向上させる分化誘導条件の探索

解凍したiEPCsを用いてTEER値が増加する様々な条件を探索したところ、神経細胞培養用サプリメントであるB27の添加により、他のサプリメントと比較してiEPCsのTEER値が有意に増加した (Fig. 3-2A)。また、B27の濃度に依存してTEER値が上昇し、特に7.5%と10%の濃度において顕著な上昇が確認された (Fig. 3-2B)。第一章にて、TEER値を上昇させることを見出したTGF- $\beta$ 受容体阻害薬A-83-01を7.5% B27添加培地に加え、A-83-01がiEPCsのTEER値を上昇させるかどうかを検討した。その結果、A-83-01の濃度に依存してTEER値は上昇し、特に1  $\mu$ Mと10  $\mu$ Mにおいて有意な上昇が認められた (Fig. 3-2C)。iBMELCsは、BBBに豊富に存在するfibronectinやcollagen type IVでコーティングされたプレート上で培養されることが多いが [8,9,30]、生体内のBBBには、fibronectinやcollagen type IVの他に、lamininも基底膜に存在している。そこで、より生体内BBB環境下に近いコーティングを生成するために、fibronectinやcollagen type IVに混合することで、更にTEER値を高める基底膜成分がないかどうかについて検討した。その結果、LN511Fを混合すると、他の基底膜成分と比較して、iEPCsのTEER値が有意に増加した (Fig. 3-2D)。LN511FによるTEER値の増加は、10  $\mu$ g/mLで最も高く、10  $\mu$ g/mL以上の濃度には依存しなかった (Fig. 3-2E)。また、LN511FとLN411Fの混合物を添加しても、TEER値は増加しなかった。続いて、7.5% B27、1  $\mu$ M A-83-01、10  $\mu$ g/mL LN511Fを用いた最良の条件で、最適細胞播種数を検討した。その結果、iEPCsを $1 \times 10^5$  cells/wellで播種した場合に、最もTEER値が高くなった (Fig. 3-2F)。

以上の結果を踏まえ、7.5% B27、1  $\mu$ M A-83-01、10  $\mu$ g/mL LN511Fを用いた最良の条件で、 $1 \times 10^5$  cells/wellで播種したiEPCsのTEER値を長期間測定した。その

結果、7.5% B27、1  $\mu$ M A-83-01、10  $\mu$ g/mL LN511Fの条件は、他の群と比較して高いTEER値を長期間維持することが示された (Fig. 3-2G)。さらに、傍細胞経路で透過することが知られているFD4とLYを用いて、透過性試験を実施した結果、7.5% B27、1  $\mu$ M A-83-01、10  $\mu$ g/mL LN511Fの条件は、他の群と比較して有意に低い透過性を示した (Fig. 3-2H)。以降、7.5% B27、1  $\mu$ M A-83-01、10  $\mu$ g/mL LN511Fの条件を用いて分化させた細胞をE-iBMELCsと定義した。



**Figure 3-2. Evaluation of the physical barrier function of iPSCs under various conditions.** (A–E) Thawed iPSCs ( $7 \times 10^5$  cells/insert) were cultured under the indicated conditions. Measurement of TEER values from day 2 to 10 and the maximum value among them is shown. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ). (A) Tukey’s HSD test; KSR group vs. others. (B) Tukey’s HSD test; 2% B-27 group vs. others. (C) Tukey’s HSD test; control vs. others. (D) Tukey’s HSD test; control vs. others, LN411F group vs. LN511F group. (E) Tukey’s HSD test; control vs. others. (F) Thawed iPSCs were seeded at the indicated number of cells and cultured under the indicated conditions. Measurement of TEER values of iPSCs from day 2 to 10 and the maximum value among them is shown. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $**p < 0.01$ ; Tukey’s HSD test;  $1 \times 10^5$  group vs. others). (G) Measurement of TEER values of iPSCs ( $1 \times 10^5$  cells/insert) cultured under the indicated conditions from day 2 to 10. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $**p < 0.01$ ; two-way repeated measures analysis of variance; B-27, A-83-01, and LN511F group vs. others). (H) FD4 and LY permeability assay of iPSCs ( $1 \times 10^5$  cells/insert) cultured under the indicated conditions on day 4.  $P_{app}$ , apparent permeability coefficient. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; Tukey’s HSD test; B-27, A-83-01, and LN511F group vs. others).

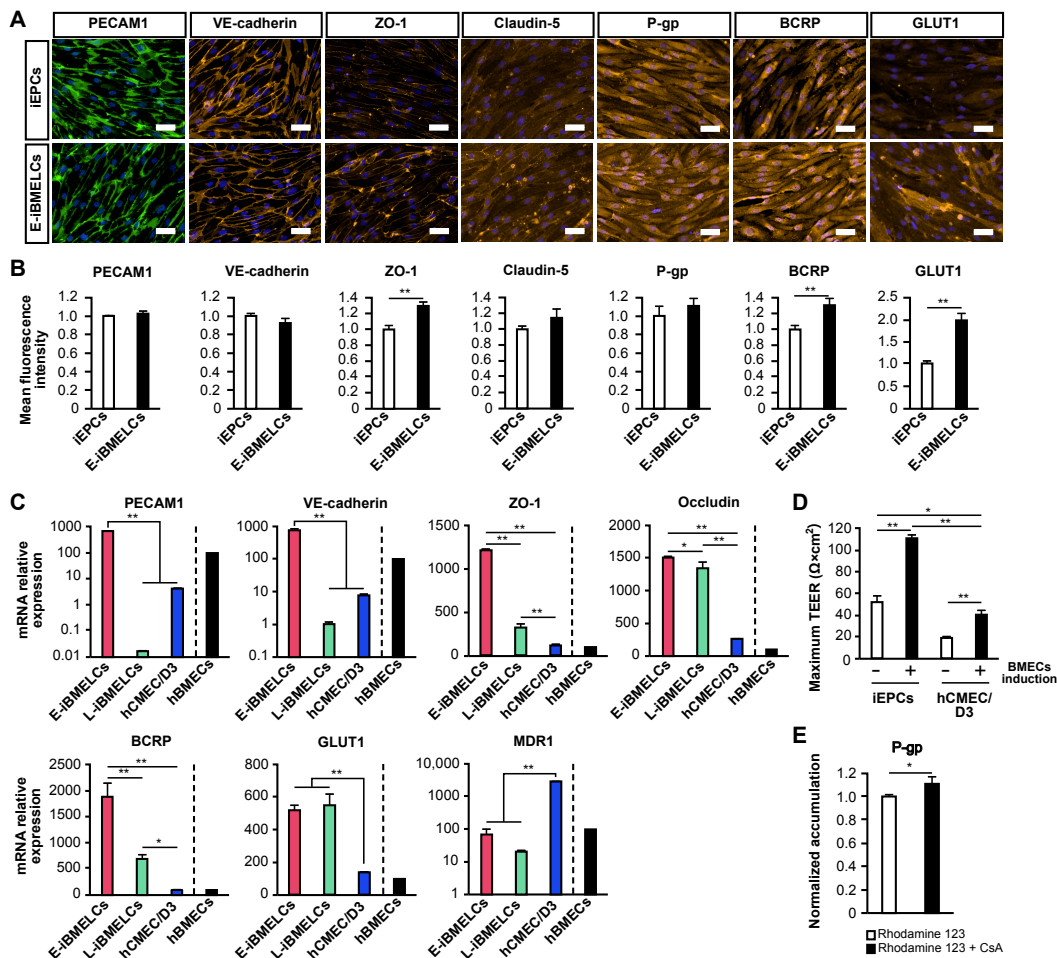
### 3.3.3 E-iBMELCs の特性評価

初めに、iEPCs (7.5% KSR で培養した細胞) と E-iBMELCs における脳毛細血管内皮細胞関連タンパク質の発現を免疫蛍光染色法で解析した (Fig. 3-3A)。その結果、内皮細胞マーカーである PECAM1 と VE-cadherin は両細胞の膜上に発現していた。タイトジャンクションマーカーである ZO-1 と claudin-5 は両細胞に発現していたが、E-iBMELCs ではより細胞膜に局在していた。また、ヒト脳毛細血管内皮細胞において高発現しているトランスポーターである P-gp、BCRP、GLUT1 の発現が両細胞で確認された。タンパク質の発現量を定量したところ、E-iBMELCs では ZO-1、BCRP、GLUT1 が有意に増加していた (Fig. 3-3B)。

続いて、E-iBMELCs における脳毛細血管内皮細胞関連遺伝子の発現を L-iBMELCs、hCMEC/D3 細胞および hBMECs と比較した (Fig. 3-3C)。その結果、E-iBMELCs における PECAM1 および VE-cadherin の mRNA の発現量は、L-iBMELCs および hCMEC/D3 細胞と比較して有意に高く、hBMECs と同程度であった。E-iBMELCs の ZO-1、occludin、BCRP、GLUT1 の発現は他の細胞と同等以上だったが、MDR1 の発現に関しては、L-iBMELCs と同等であるものの hCMEC/D3 細胞と比較して有意に低かった。hCMEC/D3 細胞における脳毛細血管内皮細胞関連遺伝子の発現は、hBMECs と比較的類似していた。

不死化細胞は、安定供給が可能な点において他の細胞よりも利便性が高く優れているが、バリア機能が著しく低い。そこで、培養条件を E-iBMELCs 誘導条件に変更することで、hCMEC/D3 細胞のバリア機能を向上させることが可能かどうかを検討した (Fig. 3-3D)。その結果、hCMEC/D3 細胞に E-iBMELCs 誘導条件を適応することで、TEER 値の上昇が確認された。しかし、E-iBMELCs 誘導条件を適応した hCMEC/D3 細胞の TEER 値は、E-iBMELCs に誘導していない iEPCs の TEER 値よりも低かった。

続いて、P-gp の活性を評価するために、E-iBMELCs への基質の蓄積量を測定した。その結果、受容体阻害薬の添加による基質の細胞内蓄積量の有意な増加が観察された (Fig. 3-3E)。



**Figure 3-3. Characterization of E-iBMELCs.**

(A,B) Immunofluorescence analysis of PECAM1 (green), VE-cadherin (orange), ZO-1 (orange), claudin-5 (orange), P-gp (orange), BCRP (orange), and GLUT1 (orange) expression in iEPCs (cultured in HE-SFM supplemented with 20 ng/mL FGF2, penicillin-streptomycin solution, 7.5% KSR on a cell culture insert coated with a coating solution consisting of fibronectin and collagen type IV) and E-iBMELCs (cultured in HE-SFM supplemented with 20 ng/mL FGF2, penicillin-streptomycin solution, 7.5% B-27 supplement, and 1  $\mu\text{M}$  A-83-01 on a cell culture insert coated with a coating solution consisting of fibronectin, collagen type IV and LN511F) on day 4. DAPI = blue. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ . Relative protein expression levels were calculated based on fluorescence intensities. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $**p < 0.01$ ; Student's  $t$ -test). (C) Relative mRNA expression levels of PECAM1, VE-cadherin, ZO-1, occludin, BCRP, GLUT1, and MDR1 in E-iBMELCs, L-iBMELCs, hCMEC/D3 cells, and hBMECs. The values are normalized to the expression of HPRT1. The relative mRNA expression levels of hBMECs were defined as 100. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; Tukey's HSD test). hBMECs:  $n = 1$ . (D) TEER values of hCMEC/D3 cultured under E-iBMELCs-inducing conditions. Measurement of TEER values from day 2 to 10 and the maximum value among them is shown. Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; Tukey's HSD test). (E) Relative intracellular accumulation of rhodamine 123. The E-iBMELCs on day 4 were incubated with 10  $\mu\text{M}$  rhodamine 123 in the absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  CsA for 1 h at 37  $^\circ\text{C}$ . Relative fluorescence intensity values were normalized to a condition without CsA (set to 1). Data are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ,  $n$ ; sample number;  $*p < 0.05$ ; Student's  $t$ -test).

### 3.4 考察

本研究では、L-iBMELCs よりも生体脳毛細血管内皮細胞に近い E-iBMELCs を凍結保存した iEPCs から作製することに成功した。当研究室では以前に、iEPCs の遺伝子・タンパク質発現量、増殖能、Ac-LDL 取り込み能、管状構造形成能が、凍結の有無によって変化しないことを明らかにしている [29]。また、本研究により、凍結群と非凍結群の TEER 値は変化しないことが明らかとなった。これらの結果から、iEPCs は凍結融解の影響をほとんど受けず、E-iBMELCs への分化に適した供給源であることが示された。

iEPCs を E-iBMELCs に分化させるために、まず培養液組成について検討した。iEPCs の分化・拡大培養培地には、iPS 細胞の未分化維持に適した血清代替物である KSR が添加されている。そこで、KSR よりも分化に優れたサプリメントを探索したところ、B27 が TEER 値を有意に増加させることを見出した。B27 は神経細胞の培養に必須であることから、これを培養液に加えることで、より脳的环境に近づけることができたのではないかと考えた。胚発生時に脳毛細血管内皮細胞が脳内の血管内皮前駆細胞から分化する[28]ことを考慮すると、これは予想された結果である。逆に、FBS の添加は E-iBMELCs の TEER 値を有意に低下させ、PDS は TEER 値に影響を与えなかった。これらの結果は、FBS に含まれる様々な栄養素、ホルモン、サイトカイン、特に PDS には含まれていない血小板由来成分の存在 [31] が iEPCs に強く影響することを示している。次に、TGF- $\beta$  受容体阻害薬である A-83-01 が E-iBMELCs の TEER 値を上昇させるかどうかを検討した。第二章にて、TGF- $\beta$  受容体阻害薬が L-iBMELCs のバリア機能を有意に上昇させることを見出した[27]。本研究においても、A-83-01 が E-iBMELCs のバリア機能を向上させたことから、強固な BBB 機能の獲得と維持に TGF- $\beta$  シグナルの制御が関連していることが示唆された。最後に、細胞外マトリックスが



E-iBMELCs の TEER 値に影響を与えるかどうかを検討した。BBB は基底膜に富む構造をしており、基底膜は BBB に強いバリア機能を付与していると考えられている[32]。iBMELCs の培養には、主に fibronectin や collagen type IV が用いられているが[8,9,30]、生体内の BBB の基底膜成分には LN411 や LN511 などの laminin が含まれている。そこで、各 laminin を fibronectin と collagen type IV の混合物に添加したところ、LN511F の添加により TEER 値が有意に上昇することを見出した。当研究室では以前に、LN221F 上で分化初期から中期まで培養した L-iBMELCs が高い TEER 値を示すことを報告したが[26]、本研究において LN221F は E-iBMELCs の TEER 値に影響を与えなかった。これは、L-iBMELCs と E-iBMELCs で分化誘導法が異なるためであると思われる。既存の報告によると、BBB には laminin 511の方が laminin 221 よりも豊富に存在していることから[33]、LN511F がバリア機能に大きく寄与するという本研究の結果は妥当であると考えた。また、LN511F 単体では、fibronectin と collagen type IV の混合物と比較して TEER 値の上昇が小さく、バリア機能を高めるには、fibronectin と collagen type IV の混合物が必要であることが示唆された。近年、L-iBMELCs において、LN511F を単独で用いた場合に、fibronectin や collagen type IV と比べて TEER 値が上昇することが報告されたが、LN511F 単独では内皮細胞マーカーの遺伝子発現が減少することも示されている [34]。この報告における LN511F による TEER 値の増加は、LN511F が細胞を非内皮細胞へ誘導した結果である可能性が考えられる。

iEPCs (KSR 群) と E-iBMELCs (B27、A-83-01、LN511F 群) の脳毛細血管内皮細胞マーカーの発現量を比較すると、ZO-1、BCRP、GLUT1 タンパク質の発現量が E-iBMELCs において有意に増加していることがわかった。また、claudin-5 と P-gp の発現がわずかに上昇し、claudin-5 はより強く細胞膜に局在していた。これらの結果から、E-iBMELCs は iEPCs と比べてバリア機能が向上しており、

脳毛細血管内皮細胞の性質を獲得していることが示唆された。L-iBMELCs は血管内皮細胞マーカーである PECAM1 と VE-cadherin の膜局在が弱い [10,26,27,35] が、本研究で作製した E-iBMELCs は iEPCs と同様に PECAM1 と VE-cadherin が細胞膜上に強固に局在していることが確認された。また、L-iBMELCs では PECAM1 および VE-cadherin の mRNA の発現が著しく低いのに対し、本研究で作製した E-iBMELCs では hBMECs とほぼ同じ発現量を示した。これらの結果から、E-iBMELCs が、L-iBMELCs よりも血管内皮細胞としての強い特徴を有していることが示唆された。加えて、E-iBMELCs における ZO-1、occludin、GLUT1、BCRP の遺伝子発現量は、hBMECs および hCMEC/D3 細胞よりも高い値を示した。また、E-iBMELCs の MDR1 遺伝子の発現量は hCMEC/D3 細胞よりも低かったが、そのレベルは hBMECs と同程度であった。hBMECs は *in vitro* で培養すると遺伝子発現が著しく低下するため、ZO-1 や occludin 等に関して、E-iBMELCs が hBMECs よりも高い遺伝子発現を有していることは必ずしも問題ではなく、むしろ好ましいと考えられる。さらに、E-iBMELCs は、BBB における重要な排出トランスポーターである P-gp の機能を有していた。これらの結果から、本研究で得られた E-iBMELCs は、L-iBMELCs にはない血管内皮細胞としての特性を示し、生体内脳毛細血管内皮細胞に類似した細胞であることが示唆された。

不死化細胞である hCMEC/D3 細胞は、高い増殖能を持ち、簡便に培養できる点で優れているが、TEER 値が著しく低いことが問題であった。そこで、B27、A-83-01、LN511F を含む E-iBMECs 誘導条件により、hCMEC/D3 細胞の TEER 値が上昇するかどうかを調べたところ、TEER 値が有意に上昇することが示された。これらの結果から、本研究で開発した E-iBMECs 誘導条件は汎用性があり、バリア機能を付与することが示唆された。しかし、E-iBMECs 誘導条件で培養した

hCMEC/D3 細胞の TEER 値は、E-iBMECs へ誘導していない iEPCs と比較すると有意に低かった。そのため、不死化細胞に生体内の脳毛細血管内皮細胞と同等の性質を付与するためには、別の方法を開発する必要があると考えられる。

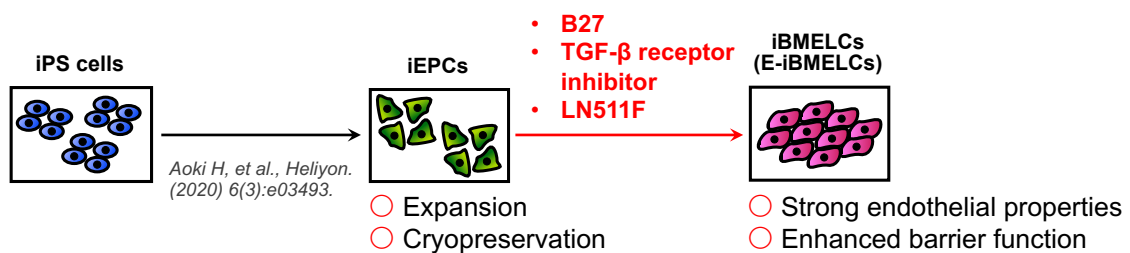
近年、Praca らは、ヒト iPS 細胞由来の血管内皮前駆細胞から VEGF、Wnt3a、レチノイン酸を用いて iBMELCs を作製できることを報告した[36]。Praca らは開発した iBMELCs が生体内の脳毛細血管内皮細胞と類似していることを報告しているが、TEER 値は低く (約  $60 \Omega \times \text{cm}^2$ )、傍細胞経路の透過性は高い (LY の透過係数: 約  $1 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ ) ことが問題であった。本研究の E-iBMELCs は、Praca らの報告した iBMELCs と比較して TEER 値が高く ( $100 \Omega \times \text{cm}^2$  以上)、傍細胞経路の透過性が低い [LY の透過係数: 約  $4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  ( $2.4 \times 10^{-4} \text{ cm/min}$ )] ことから、より脳毛細血管内皮細胞のバリア機能に近いものが作製されたことがわかった。一方、L-iBMECs は、共培養法を用いずに生体内 BBB のバリア機能に近いとされる高い TEER 値 ( $1000 \Omega \times \text{cm}^2$  以上) を示す点で優れているが、生体内の脳毛細血管内皮細胞とは異なる性質を持つ細胞であることが問題点として報告されている [20,37]。以上を踏まえると、本研究で作製した E-iBMELCs は、既存の血管内皮前駆細胞由来 iBMELCs と比較して強固なタイトジャンクション機能を有し、L-iBMECs にはない内皮細胞の特性を示す点で優れた細胞と言える。また、E-iBMELCs は、拡大培養・凍結保存を行った iEPCs から作製できる点で実用的である。しかし、E-iBMELCs の TEER 値は生体内 BBB と比較すると依然として低く、生体を模倣した *in vitro* BBB モデルを確立するためには、本研究を足がかりとした更なる研究が必要だと考える。

L-iBMELCs の強みは、その強固なタイトジャンクション機能と研究の蓄積にある。iPS 細胞由来 BBB モデルの草分けとして最もよく用いられている分化誘導法であり、現在に至るまで各種細胞との共培養や様々な薬物動態学的評価が

行われてきた。また、複数細胞株に適用可能な分化誘導法である点でも優れている。これらの理由から、特に高いバリア機能を前提とする薬物動態研究においては、E-iBMELCs よりも L-iBMELCs の方が BBB モデルに使用する細胞として期待値が高いと考える。一方で、E-iBMELCs の強みは、高い血管内皮特性にある。E-iBMELCs 誘導条件の汎用性については hCMEC/D3 細胞とヒト iPS 細胞株一株でしか解析できていないため、今後より詳細な検討を行う必要があるものの、E-iBMELCs は L-iBMELCs では得られない血管内皮細胞に特徴的な事象を評価するのに優れていると思われる。特に病態モデルとして遺伝子解析等を行う場合には、上皮特性を併せ持つ L-iBMELCs よりも血管内皮特性の強い E-iBMELCs の方が適していると考えられる。E-iBMELCs では L-iBMELCs と比較してバリア機能の指標の一つである TEER 値が低いことが弱点である。しかし、LY の透過係数から分かる通り、実際の物質透過性はさほど問題ないレベルにあるため、改善を重ねることで E-iBMELCs にも薬物動態評価系として実用できる可能性は十分に期待できる。E-iBMELCs は L-iBMELCs と比較して研究の蓄積が少ないため、今後様々な角度からの評価が加わることで、L-iBMELCs の問題点を克服した新たな評価系として発展することが期待される。

### 3.5 小括

本研究では、B27、TGF- $\beta$  受容体阻害薬、LN511F を用いることで、iEPCs から iBMELCs (E-iBMELCs) を分化させることに成功した。作製した E-iBMELCs は、L-iBMELCs よりも強い血管内皮特性を示し、既存の iEPCs 由来 iBMELCs より高いバリア機能を有していた。また、iEPCs は優れた増殖能を有し、拡大培養や凍結保存が可能であるため、容易に入手できる細胞源である。以上のことから、本研究で作製した E-iBMELCs は、中枢神経系を標的とした創薬研究や BBB 破綻に伴う神経変性疾患の病態解明などへの応用が期待される。



#### 第四章 総括

本研究では、TGF- $\beta$  受容体阻害薬を用いることで、共培養法のような煩雑な操作を必要とせず、BBB 特性が向上した iBMELCs を作製できることを示した。また、TGF- $\beta$  受容体阻害薬は iBMELCs の凍結融解の影響を緩和することを明らかにした。さらに、本研究では、iEPCs を脳毛細血管内皮細胞に分化誘導する条件として、7.5% B27、1  $\mu$ M A-83-01、10  $\mu$ g/mL LN511F の組み合わせを決定することができた。本研究で得られた iBMELCs は、中枢神経系を標的とした創薬研究や BBB 破綻に伴う神経変性疾患の病態解明などへの応用が期待される。アルツハイマー病をはじめとする中枢神経系疾患は、その病態が未だ解明されていないことから新薬開発が滞っている現状がある。iBMELCs はヒト BBB を再現するモデルとして病態解明研究を加速し、中枢神経系疾患の新薬開発を促進する画期的知見を与える可能性がある。また、iBMELCs はハイスループットモデルとして非臨床試験でより精度の高いスクリーニングを可能にし、臨床試験成功率を高めることで開発コストの削減および効率的な創薬を実現すると考えられる。これらは総じて、現状の問題点を打破し、患者にいち早く医薬品を提供することに繋がる。本研究で得られた知見が今後様々な技術と融合して活用され、人々の健康に貢献することを大いに期待する。

## 謝辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 松永民秀 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、格別の御配慮と御激励を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 鈴木匡 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科神経薬理学分野 糸和彦 教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野 山村寿男 教授ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 湯浅博昭 教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際し、有益な御助言とご協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 岩尾岳洋 准教授、堀英生 講師ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科病態解析学分野 青山峰芳 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 坡下真大 講師ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科病態解析学分野 青木啓将 助教に深甚なる謝意を表します。

研究途上、種々の御便宜を図っていただきました名古屋市立大学大学院薬学  
研究科臨床薬学分野ならびに薬学部臨床薬学教育研究センターの卒業生、在室  
生ならびに研究員に感謝致します。



## 引用文献

- 1) Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood–brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1788:842-857, 2009.
- 2) Reichel A. Addressing central nervous system (CNS) penetration in drug discovery: basics and implications of the evolving new concept. *Chem Biodivers*, 6:2030–2049, 2009.
- 3) Yamazaki Y, Kanekiyo T. Blood–brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, 18:1965, 2017.
- 4) Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood–brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, 25:59–127, 2005.
- 5) Syvänen S, Lindhe Ö, Palner M, Kornum BR, Rahman O, Långström B, Knudsen GM, Hammarlund-Udenaes M. Species differences in blood–brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metab Dispos*, 37:635–643, 2009.
- 6) Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, Förster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, et al. In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36:862–890, 2016.
- 7) Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A. Derivation of blood–brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 30:783–791, 2012.

- 8) Lippmann ES, Al-Ahmad A, Azarin SM, Palecek SP, Shusta EV. A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood–brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci Rep*, 4:4160, 2014.
- 9) Hollmann EK, Bailey AK, Potharazu AV, Neely MD, Bowman AB, Lippmann ES. Accelerated differentiation of human induced pluripotent stem cells to blood–brain barrier endothelial cells. *Fluids Barriers CNS*, 14:9, 2017.
- 10) Delsing L, Dönnés P, Sánchez J, Clausen M, Voulgaris D, Falk A, Herland A, Brolén G, Zetterberg H, Hicks R, et al. Barrier properties and transcriptome expression in human iPSC-derived models of the blood-brain barrier. *Stem Cells*, 36:1816–1827, 2018.
- 11) Canfield SG, Stebbins MJ, Morales BS, Asai SW, Vatine GD, Svendsen CN, Palecek SP, Shusta EV. An isogenic blood–brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Neurochem*, 140:874–888, 2017.
- 12) Katt ME, Xu ZS, Gerecht S, Searson PC. Human brain microvascular endothelial cells derived from the BC1 iPS cell line exhibit a blood–brain barrier phenotype. *PLoS ONE*, 11:e0152105, 2016.
- 13) Appelt-Menzel A, Cubukova A, Günther K, Edenhofer F, Piontek J, Krause G, Stüber T, Walles H, Neuhaus W, Metzger M. Establishment of a human blood–brain barrier co-culture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells. *Stem Cell Rep*, 8:894–906, 2017.
- 14) Sneha R, Gary MW, Philip HH. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-induced apoptosis: the rise & fall of Bim. *Cell Cycle*, 8:11–17, 2009.

- 15) Wu MY, Hill CS. TGF- $\beta$  superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell*, 16:329–343, 2009.
- 16) Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood–brain barrier dysfunction, TGF $\beta$  signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia*, 60:1251–1257, 2012.
- 17) Ronaldson PT, Demarco KM, Sanchez-Covarrubias L, Solinsky CM, Davis TP. Transforming growth factor- $\beta$  signaling alters substrate permeability and tight junction protein expression at the blood–brain barrier during inflammatory pain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29:1084–1098, 2009.
- 18) Cooley BC, Nevado J, Mellad J, Yang D, St Hilaire C, Negro A, Fang F, Chen G, San H, Walts AD. TGF- $\beta$  signaling mediates endothelial to EndMT during vein graft remodeling. *Sci Transl Med*, 6:227ra34, 2014.
- 19) McMillin MA, Frampton GA, Seiwell AP, Patel NS, Jacobs AN, DeMorrow S. TGF $\beta$ 1 exacerbates blood–brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab Investig*, 95:903–913, 2015.
- 20) Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood–brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 429:47–62, 1990.
- 21) Derada Troletti C, Fontijn RD, Gowing E, Charabati M, van Het Hof B, Didouh I, van der Pol SMA, Geerts D, Prat A, van Horssen J. Inflammation-induced endothelial to mesenchymal transition promotes brain endothelial cell dysfunction and occurs during multiple sclerosis pathophysiology. *Cell Death Dis*, 10:45, 2019.
- 22) Krishnan S, Szabo E, Burghardt I, Frei K, Tabatabai G, Weller M. Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF- $\beta$  in glioblastoma: vEGF-dependent

- angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6:22480–22495, 2015.
- 23) Herron CR, Lowery AM, Hollister PR, Reynolds AB, Vincent PA. p120 regulates endothelial permeability independently of its NH2 terminus and Rho binding. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300:H36–H48, 2011.
- 24) Wilson HK, Faubion MG, Hjortness MK, Palecek SP, Shusta EV. Cryopreservation of brain endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells is enhanced by rho-associated coiled coil-containing kinase inhibition. *Tissue Eng Part C Methods*, 22:1085–1094, 2016.
- 25) Qian T, Maguire SE, Canfield SG, Bao X, Olson WR, Shusta EV, Palecek SP. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood–brain barrier endothelial cells. *Sci Adv*, 3:e1701679, 2017.
- 26) Aoki H, Yamashita M, Hashita T, Iwao T, Matsunaga T. Laminin 221 fragment is suitable for the differentiation of human induced pluripotent stem cells into brain microvascular endothelial-like cells with robust barrier integrity. *Fluids Barriers CNS*, 17:25, 2020.
- 27) Yamashita M, Aoki H, Hashita T, Iwao T, Matsunaga T. Inhibition of transforming growth factor beta signaling pathway promotes differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial-like cells. *Fluids Barriers CNS*, 17:36, 2020.
- 28) Saili KS, Zurlinden TJ, Schwab AJ, Silvin A, Baker NC, Hunter ES, Ginhoux F, Knudsen TB. Blood–brain barrier development: Systems modeling and predictive toxicology. *Birth Defects Res*, 109:1680–1710, 2017.

- 29) Aoki H, Yamashita M, Hashita T, Ogami K, Hoshino S, Iwao T, Matsunaga T. Efficient differentiation and purification of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells and expansion with the use of inhibitors of ROCK, TGF- $\beta$ , and GSK3 $\beta$ . *Heliyon*, 6:e03493, 2020.
- 30) Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyés M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ*, 6:e4774, 2018.
- 31) Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX*, 20:275–281, 2003.
- 32) Xu L, Nirwane A, Yao Y. Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke Vasc. Neurol*, 4:78–82, 2019.
- 33) Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhes Migr*, 7:101–110, 2013.
- 34) Motallebnejad P, Azarin SM. Chemically defined human vascular laminins for biologically relevant culture of hiPSC-derived brain microvascular endothelial cells. *Fluids Barriers CNS*, 17:54, 2020.
- 35) Grifno GN, Farrell AM, Linville RM, Arevalo D, Kim JH, Gu L, Searson PC. Tissue-engineered blood–brain barrier models via directed differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 9:13957, 2019.
- 36) Praça C, Rosa SC, Sevin E, Cecchelli R, Dehouck M, Ferreira LS. Derivation of brain capillary-like endothelial cells from human pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells. *Stem Cell Rep*, 13:599–611, 2019.
- 37) Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*, 241:49–55, 1982.