

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年11月24日(24.11.2022)



(10) 国際公開番号

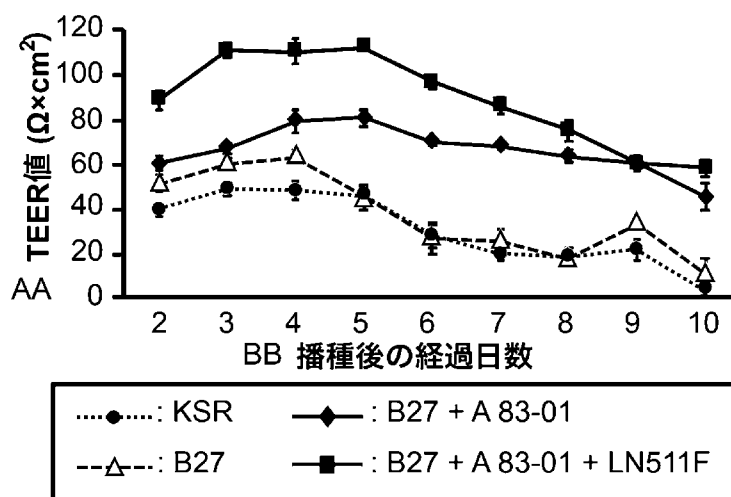
WO 2022/244841 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *C07K 14/50* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01) *C07K 14/78* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/020827
- (22) 国際出願日: 2022年5月19日(19.05.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2021-085121 2021年5月20日(20.05.2021) JP
- (71) 出願人: 公立大学法人名古屋市立大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 松永 民秀(MATSUNAGA Tamihide); 〒4678603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3丁目1番地 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科内 Aichi (JP). 坡下 真大(HASHITA Tadahiro); 〒4678603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3丁目1番地 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科内 Aichi (JP). 青木 啓将(AOKI Hiromasa); 〒4678603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3丁目1番地 公立大学法人名古屋市立大学大学院薬学研究科内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 野村 和弘(NOMURA Kazuhiro); 〒4710875 愛知県豊田市下市場町3丁目100番地 Aichi (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BRAIN CAPILLARY ENDOTHELIAL-LIKE CELLS, AND USE THEREFOR

(54) 発明の名称: 脳毛細血管内皮様細胞の製造方法およびその利用

Fig.11



AA TEER value
BB Days elapsed after inoculation

(57) Abstract: Provided is a technique capable of producing brain capillary endothelial-like cells having improved immitation of brain capillary endothelial-like cells in a living body. This method for producing brain capillary endothelial-like cells includes a culturing step for culturing vascular endothelial progenitor cells by using a Laminin 511 fragment, Fibronectin, and collagen type IV.

WO 2022/244841 A1

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP,
KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 生体内の脳毛細血管内皮細胞に対する模倣性を向上させた脳毛細血管内皮様細胞を製造できる技術を提供する。脳毛細血管内皮様細胞の製造方法は、Laminin 511断片と、Fibronectinと、collagen type IVと、を用いて血管内皮前駆細胞を培養する培養工程を含む。

明 細 書

発明の名称：脳毛細血管内皮様細胞の製造方法およびその利用 技術分野

[0001] 本開示は、脳毛細血管内皮様細胞の製造方法に関する。本出願は、2021年5月20日に出願された日本国特許出願第2021-085121号に基づくもので、ここにその記載内容を援用する。

背景技術

[0002] 血液脳関門 (Blood-Brain Barrier : BBB) の構成細胞の1つである脳毛細血管内皮細胞 (Brain microvascular endothelial cells : BMECs) は、強力な細胞間接着と排出トランスポーターの発現とによって、物質の脳実質への非特異的侵入を阻害する。創薬において、この強いバリア機能が医薬品候補薬の脳実質 (神経) 側への移行を阻害するため、薬物開発が中止になることがある。このため、ヒトBBBにおいて薬物動態を評価できるスクリーニングモデルが望まれている。特許文献1では、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS細胞) を用いてBMECsに類似した細胞を作製しており、かかる細胞においてタイトジャンクションタンパク質や排出トランスポーターの発現が確認されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2011/159572号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 特許文献1に記載の方法を用いてヒトiPS細胞を分化誘導して得られる脳毛細血管内皮様細胞は、血管内皮細胞 (Endothelial cells : ECs) としての性質が極めて弱く、さらには上皮細胞としての性質も有してしまうことから、ヒト生体内のBMECsとは性質が異なることが示唆されている。このことに関し本願発明者らは、従来の方法においては、血管細胞への分化に必要不可欠な

血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor：以下、「VEGF」とも呼ぶ）等の因子が添加されていないことから、BMECsの前駆体である血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cells: EPCs）を経由せずにBMECsへと分化誘導されていると考えた。そして、本願発明者らは、生体内のBMECsに対する模倣性（類似性）を向上させた細胞を作製するためには、EPCsを経由してBMECsへと分化誘導することが有効であることを見出した。さらに、本願発明者らは、鋭意研究を進めることにより、生体内のBMECsに対する模倣性を向上させた脳毛細血管内皮様細胞の製造を可能にする技術を発明するに至った。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明は、以下の形態として実現することが可能である。
- [0006] (1) 本発明の一形態によれば、脳毛細血管内皮様細胞の製造方法が提供される。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法は、Laminin511断片と、Fibronectinと、collagen type IVと、を用いて血管内皮前駆細胞を培養する培養工程を含む。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法によれば、生体内の脳毛細血管内皮細胞に対する模倣性を向上させた脳毛細血管内皮様細胞を製造できる。
- [0007] (2) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法において、前記培養工程では、B27（登録商標） supplementと、A 83-01と、Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2) と、を含む培地を用いて培養してもよい。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法によれば、脳毛細血管内皮様細胞のバリア機能をより向上させることができる。
- [0008] (3) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法において、前記血管内皮前駆細胞は、多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。
- [0009] (4) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法において、前記血管内皮前駆細胞は、ヒト人工多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法によれば、ヒト生体内の脳毛細血管内皮細胞を模倣した脳毛細血管内皮様細胞を容易に製造できる。

- [0010] (5) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法において、前記血管内皮前駆細胞は、血管内皮増殖因子を用いて分化誘導された細胞であってもよい。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法によれば、血管内皮前駆細胞が、血管内皮増殖因子を用いて多能性幹細胞から分化誘導された細胞であるので、生体内の脳毛細血管内皮細胞に対する模倣性をさらに向上させた脳毛細血管内皮様細胞を製造できる。
- [0011] (6) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法において、前記培養工程では、前記血管内皮前駆細胞を脳ペリサイトと共培養してもよい。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法によれば、血管内皮前駆細胞を脳ペリサイトと共培養するので、生体内の脳毛細血管内皮細胞に対する模倣性をさらに向上させた脳毛細血管内皮様細胞を製造できる。
- [0012] (7) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法において、前記脳ペリサイトは、A 83-01を含む培地を用いて多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法によれば、A 83-01を含む培地を用いることにより、生体内の脳ペリサイトに対する模倣性を向上できる。
- [0013] (8) 本発明の他の形態によれば、上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法により得られた脳毛細血管内皮様細胞の細胞層を用いて、被検物質の血液脳関門透過性を評価する方法が提供される。この形態の血液脳関門透過性を評価する方法によれば、生体内の脳毛細血管内皮細胞を模倣した脳毛細血管内皮様細胞の細胞層を用いるので、被験物質の血液脳関門における透過性の評価精度を向上できる。
- [0014] (9) 上記形態の被検物質の血液脳関門透過性を評価する方法において、以下の工程 (i) ~ (iii) を含んでもよい：
- (i) 前記細胞層を用意する工程；
 - (ii) 前記細胞層に前記被検物質を接触させる工程；
 - (iii) 前記細胞層を透過した前記被検物質を定量することにより、前記被検物質の血液脳関門透過性を評価する工程。

この形態の被検物質の血液脳関門透過性を評価する方法によれば、被検物質の血液脳関門における透過性の評価精度をさらに向上できる。

[0015] (10) 本発明の他の形態によれば、上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法により得られた脳毛細血管内皮様細胞の細胞層を用いて、被検物質の血液脳関門バリア機能への影響を評価する方法が提供される。この形態の被検物質の血液脳関門バリア機能への影響を評価する方法によれば、生体内の脳毛細血管内皮細胞を模倣した脳毛細血管内皮様細胞の細胞層を用いるので、被検物質の血液脳関門バリア機能への影響の評価精度を向上できる。

[0016] (11) 本発明の他の形態によれば、上記形態の脳毛細血管内皮様細胞の製造方法で得られた、脳毛細血管内皮様細胞が提供される。

[0017] (12) 上記形態の脳毛細血管内皮様細胞において、PECAM1の発現量が、初代培養脳毛細血管内皮細胞および不死化脳毛細血管内皮細胞よりも大きく、TEER値が、 $50 \Omega \times \text{cm}^2$ 以上であってもよい。

[0018] (13) 本発明の他の形態によれば、脳毛細血管内皮様細胞の分化誘導方法が提供される。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の分化誘導方法は、Laminin 511断片と、Fibronectinと、collagen type IVと、を用いて血管内皮前駆細胞を培養する培養工程を含む。この形態の脳毛細血管内皮様細胞の分化誘導方法によれば、生体内の脳毛細血管内皮細胞を模倣した脳毛細血管内皮様細胞を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]ヒトiPS細胞からiEPCsへの分化プロトコールを示す説明図。

[図2]分化14日目のiEPCsの性状確認の結果を示す説明図である。

[図3]非凍結iEPCsおよび凍結iEPCsの電気抵抗値を比較して示す説明図。

[図4]iBMELCsへの分化誘導条件（培地成分の種類）の検討結果を示す説明図

。

[図5]iBMELCsへの分化誘導条件（培地成分の濃度）の検討結果を示す説明図

。

[図6]iBMELCsへの分化誘導条件（A 83-01の濃度）の検討結果を示す説明図。

[図7] iBMELCsへの分化誘導条件（コーティング成分種）の検討結果を示す説明図。

[図8] iBMELCsへの分化誘導条件（コーティング成分種）の検討結果を示す説明図。

[図9] iBMELCsへの分化誘導条件（LN511Fの濃度）の検討結果を示す説明図。

[図10] iBMELCsへの分化誘導条件（細胞数）の検討結果を示す説明図。

[図11] 各分化誘導条件におけるTEER値の経時的変化を示す説明図。

[図12] 各分化誘導条件におけるFD4およびLYの透過試験の結果を示す説明図。

[図13] タンパク質発現解析の結果を示す説明図。

[図14] 遺伝子発現解析の結果を示す説明図。

[図15] iEPCsと不死化細胞とにおける電気抵抗値を比較して示す説明図。

[図16] P糖タンパク質（P-gp）の機能解析の結果を示す説明図。

[図17] iEPCsとiBPCとの共培養の概要を説明するための説明図。

[図18] iEPCsとiBPCとの共培養によるTEER値の経時的変化を示す説明図。

[図19] 脳ペリサイトマーカータンパク質の免疫染色の結果を示す説明図。

[図20] 脳ペリサイトマーカー遺伝子発現量の解析結果を示す説明図。

[図21] 脳ペリサイトマーカータンパク質の免疫染色の結果を示す説明図。

[図22] 脳ペリサイトマーカータンパク質の発現解析結果を示す説明図。

[図23] iBPCの細胞遊走能・増殖能を示す顕微鏡画像。

[図24] iBPCの細胞遊走能・増殖能を示す説明図。

発明を実施するための形態

[0020] 本開示の一実施形態によれば、脳毛細血管内皮様細胞（Brain microvascular endothelial-like cells：以下、「BMELCs」とも呼ぶ）の製造方法が提供される。この製造方法は、Laminin511断片と、Fibronectinと、collagen type IV（IV型コラーゲン）と、を用いて血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cells：以下、「EPCs」とも呼ぶ）を培養する培養工程を含む。

[0021] 本開示の方法で用いるEPCsは、多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよく、生体由来の細胞であってもよく、不死化細胞であってもよい。

本明細書において「分化誘導する」とは、特定の細胞系譜に沿って分化するように働きかけることをいう。本明細書において、「多能性幹細胞」とは、生体を構成するすべての細胞に分化しうる能力（分化多能性）と、細胞分裂を経て自己と同一の分化能を有する娘細胞を生み出す能力（自己複製能）とを併せ持つ細胞をいう。分化多能性は、評価対象の細胞をヌードマウスに移植し、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）のそれぞれの細胞を含むテラトーマ形成の有無を試験することにより評価することができる。

[0022] 多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等が挙げられる。多能性幹細胞としては、分化多能性及び自己複製能を併せ持つ細胞である限り、これらに限定されない。多能性幹細胞としては、入手性や倫理性の観点から、iPS細胞を用いることが好ましい。多能性幹細胞としては、哺乳動物の細胞を用いることが好ましい。この哺乳動物としては、特に限定されないが、例えば、ヒトやチンパンジー等の霊長類、マウスやラット等のげっ歯類等が挙げられる。多能性幹細胞としては、ヒトの細胞を用いることがより好ましい。したがって、多能性幹細胞としては、ヒトiPS細胞を用いることが特に好ましい。ヒトiPS細胞から分化誘導されたEPCsを用いることにより、ヒト生体内のBMELCsに対する模倣性を向上させたBMELCsを容易に製造することができる。

[0023] ES細胞は、例えば、着床以前の初期胚、当該初期胚を構成する内部細胞塊、単一割球等を培養することによって樹立することができる（Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) ;Thomson, J. A. et al., Science, 282, 1145-1147 (1998)）。初期胚として、体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を用いてもよい（Wilmut et al. (Nature, 385, 810 (1997)）、Cibelli et al. (Science, 280, 1256 (1998)）、入谷明ら（蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999)）、Baguisi et al. (Nature Biotechnology, 17, 456 (1999)）、Wakayama et al. (Nature, 394, 369 (1998) ; Nature Genetics, 22, 127 (1999) ; Proc. Natl. Acad. Sci. U

SA, 96, 14984 (1999))、Rideout III et al. (Nature Genetics, 24, 109 (2000))、Tachibana et al. (Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer, Cell (2013) in press))。初期胚として、単為発生胚を用いてもよい (Kim et al. (Science, 315, 482-486 (2007))、Nakajima et al. (Stem Cells, 25, 983-985 (2007))、Kim et al. (Cell Stem Cell, 1, 346-352 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 9, 432-449 (2007))、Revazova et al. (Cloning Stem Cells, 10, 11-24 (2008)))。上掲の論文の他、ES細胞の作製についてはStrelchenko N., et al. Reprod Biomed Online. 9: 623-629, 2004 ; Klimanskaya I., et al. Nature 444: 481-485, 2006 ; Chung Y., et al. Cell Stem Cell 2: 113-117, 2008 ; Zhang X., et al Stem Cells 24: 2669-2676, 2006 ; Wassarman, P.M. et al. Methods in Enzymology, Vol.365, 2003等が参考になる。なお、ES細胞と体細胞の細胞融合によって得られる融合ES細胞も、本開示における胚性幹細胞に含まれる。

[0024] ES細胞の中には、保存機関から入手可能なもの、或いは市販されているものもある。例えば、ヒトES細胞については、京都大学再生医科学研究所 (例えばKhES-1、KhES-2及びKhES-3) 、WiCell Research Institute、ESI BIO等から入手可能である。また、ES細胞は、始原生殖細胞を、LIF、bFGF、SCFの存在下で培養すること等により樹立することができる (Matsui et al., Cell, 70, 841-847 (1992))、Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (23) , 13726-13731 (1998))、Turnpenny et al., Stem Cells, 21 (5) , 598-609, (2003)) 。

[0025] iPS細胞は、初期化因子の導入等により体細胞をリプログラミングすることによって作製される、多能性 (多分化能) と増殖能を有する細胞である。iPS細胞は、ES細胞に近い性質を示す。iPS細胞の作製に使用する体細胞は、特に限定されず、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。また、その由来も特に限定されないが、好ましくは哺乳動物 (例えば、ヒトやチンパンジー等の霊長類、マウスやラット等のげっ歯類) の体細胞、特に好まし

くはヒトの体細胞を用いる。iPS細胞は、これまでに報告された各種方法によって作製することができる。また、今後開発されるiPS細胞作製法を適用することも当然に想定される。

[0026] iPS細胞作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子を、ウイルスを利用して細胞へ導入する方法である (Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126 (4), 663-676, 2006; Takahashi, K, et al: Cell 131 (5), 861-72, 2007)。ヒトiPS細胞についてはOct4、Sox2、Lin28及びNonogの4因子の導入による樹立の報告がある (Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007)。c-Mycを除く3因子 (Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008)、Oct3/4及びKlf4の2因子 (Kim J B, et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008)、或いはOct3/4のみ (Kim J B, et al: Cell 136 (3), 411-419, 2009) の導入によるiPS細胞の樹立も報告されている。また、遺伝子の発現産物であるタンパク質を細胞に導入する手法 (Zhou H, Wu S, Joo JY, et al: Cell Stem Cell 4, 381-384, 2009; Kim D, Kim CH, Moon JI, et al: Cell Stem Cell 4, 472-476, 2009) も報告されている。一方、ヒストンメチル基転移酵素G9aに対する阻害剤BIX-01294やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸 (VPA) 或いはBayK8644等を使用することによって、作製効率の向上や導入する因子の低減等が可能であるとの報告もある (Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (7), 795-797, 2008; Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (11), 1269-1275, 2008; Silva J, et al: PLoS. Biol. 6 (10), e 253, 2008)。遺伝子導入法についても検討が進められ、レトロウイルスの他、レンチウイルス (Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007)、アデノウイルス (Stadtfield M, et al: Science 322 (5903), 945-949, 2008)、プラスミド (Okita K, et al: Science 322 (5903), 949-953, 2008)、トランスポゾンベクター (Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al: Nature 458, 766-770, 2009; Kaji K, Norrby K, Pac a A, et al: Nature 458, 771-775, 2009; Yusa K, Rad R, Takeda J, et al: Nat Methods 6, 363-369, 2009)、或いはエピソーマルベ

クター (Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al: Science 324, 797-801, 2009) を遺伝子導入に利用した技術が開発されている。

[0027] iPS細胞への形質転換、すなわち初期化 (リプログラミング) が生じた細胞は、Fbxo15、Nanog、Oct/4、Fgf-4、Esg-1及びCript等の多能性幹細胞マーカー (未分化マーカー) の発現等を指標として選択することができる。選択された細胞をiPS細胞として回収する。

[0028] iPS細胞は、例えば、国立大学法人京都大学又は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンターから提供を受けることもできる。また、iPS細胞は、例えば、株式会社リプロセルから提供を受けることもできる。

[0029] iPS細胞等の多能性幹細胞からEPCsへの分化誘導は、例えば、国際公開第2020/179380号パンフレットに記載の方法や、特開2018-110548号に記載の方法等を用いてもよい。例えば、多能性幹細胞をEPCsへと分化させる工程と、その工程で得られた細胞集団を構成するEPCsとその他の細胞の接着能力の差を利用してEPCsを純化する工程とを含んでもよい。

[0030] 多能性幹細胞をEPCsへと分化させる工程では、EPCsへの分化を誘導する条件下で多能性幹細胞を培養する。例えば、多能性幹細胞が中胚葉 (Mesderm) を介してEPCsへと分化するように、以下で説明する2段階の分化誘導、すなわち、多能性幹細胞を中胚葉へと分化させる工程と、得られた細胞をEPCsへと分化させる工程とを行ってもよい。

[0031] 多能性幹細胞を中胚葉へと分化させる工程では、例えば、過去の報告 (例えばSriram G. et al, Efficient differentiation of human embryonic stem cells to arterial and venous endothelial cells under feeder- and serum-free conditions. Stem Cell Research & Therapy 2015;6:261が参考になる) に準じ、GSK-3 β 阻害剤が添加された培地を用いたGSK-3 β 阻害剤の存在下で培養した後、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が添加された培地を用いたbFGFの存在下で培養してもよい。なお、一般に、bFGFは、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) とも呼ばれる。得られた細胞をEPCsへと分化させる工程で

は、例えば、分化誘導因子として骨形成因子4 (BMP4)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、bFGF等を用い、EPCsへと分化誘導してもよい。

[0032] 多能性幹細胞をEPCsへと分化させる工程における、その他の培養条件 (培養温度等) は、動物細胞の培養において一般に採用されている条件としてもよい。例えば37℃、5%CO₂の環境下等で培養してもよい。また、基本培地として、例えば、無血清血管内皮細胞用培地 (Human Endothelial-SFM) やダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM)、イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、MEM α 培地、ハムF12培地 (HamF12)、グラスゴー基本培地、RPMI1640培地、MCD B107培地等の基本培地を用いてもよく、D-MEMとハムF12培地等の混合培地等、二種以上の基本培地を混合して用いてもよい。また、血清や血清代替物、抗生物質、サプリメント等、培地に他の任意成分が添加されていてもよい。

[0033] EPCsへ分化したことは、例えば、血管内皮前駆細胞マーカーの発現を指標にして判定ないし評価することができる。血管内皮前駆細胞マーカーとしては、例えば、PECAM1 (CD31)、CD34、CDH5 (VE-Cadherin)、FLK1 (VEGFR-2) 等が挙げられる。中でもCD34は、EPCsに特異的であり、特に有用な血管内皮前駆細胞マーカーである。

[0034] EPCsを純化する工程では、細胞集団を構成するEPCsの比率を高める。EPCsがその他の細胞よりも高い接着能力を示すことを利用して、接着能力の低いその他の細胞を優先的ないし選択的に剥離、除去することで、EPCsの純化を図ることができる。

[0035] 純化後の細胞 (高純度のEPCs) は、維持・増殖のために培養に供されてもよく、使用時まで保存されてもよい。保存方法は、常法に従えばよく、例えば、TC protector (DSファーマバイオメディカル社)、Cell Banker (ゼノアック社)、Stem Cell Banker (ゼノアック社)、Cell Reserver One (ナカライ社) 等を利用し、-80℃等で凍結保存してもよい。凍結保存により、EPCsストックを作成できる。

[0036] 本開示におけるBMELCsの製造方法では、上述のように、Laminin511断片と、Fibronectinと、collagen type IV (IV型コラーゲン) と、を用いてEPCsを

培養する培養工程（以下、「工程A」とも呼ぶ）を含む。工程Aにおいて、Laminin511断片（以下、「LN511F」とも呼ぶ）と、Fibronectin（以下、「FBN」とも呼ぶ）と、collagen type IV（以下、「COL4」とも呼ぶ）との3成分は、コーティング剤として用いられることが好ましい。ここで、コーティング剤とは、基底膜成分を含み、細胞を培養するための培養容器にコート層を形成するためのものをいう。

[0037] LN511FとFBNとCOL4との3成分を培地等で希釈し、培養皿等の培養容器に注いで静置することによって、これらの3成分を含有するコート層を形成できる。以下、コート層を形成することを、「コーティングする」とも呼ぶ。一般に、細胞の生存率や増殖率の向上、分化誘導の促進、細胞のセレクション等のために、コーティング剤によって形成されたコート層上で細胞を培養することがある。本開示におけるBMELCsの製造方法では、FBNおよびCOL4に加えて、LN511Fを用いることにより、BMELCsのバリア機能を優位に向上させることができる。

[0038] Laminin（ラミニン）は、 α 鎖、 β 鎖および γ 鎖の3本のサブユニット鎖からなるヘテロ3量体分子である。 α 鎖は $\alpha 1 \sim \alpha 5$ の5種類、 β 鎖は $\beta 1 \sim \beta 3$ の3種類、 γ 鎖は $\gamma 1 \sim \gamma 3$ の3種類が知られている。LamininのReference Sequence RNAとしては、例えば、NM_000426, NM_001079823 (Subunit alpha2), NM_002291 (Subunit beta1), NM_002292 (Subunit beta2), NM_000228 (Subunit beta3), NM_001318046, NM_001318047, NM_001318048, NM_007356 (Subunit beta4), NM_002293 (Subunit gamma 1), NM_005562, NM_018891 (Subunit gamma 2)が知られている。

[0039] Laminin511は、 $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖のサブユニット鎖からなるラミニン分子である。本明細書において、「Laminin511断片 (LN511F)」とは、Laminin511のうちインテグリン結合部位に相当する断片 (E8断片)を意味している。また、本明細書におけるLN511Fには、LN511Fと同一性が高いタンパク質も含まれるものとする。本明細書において、「LN511Fと同一性が高いタンパク質」とは、かかるタンパク質を構成するアミノ酸配列中に、LN511FのA

ミノ酸配列と80%以上一致するアミノ酸配列を含むものをいう。すなわち、「LN511Fと同一性が高いタンパク質」には、LN511Fよりもアミノ酸配列が長いタンパク質も含まれる。BMELCsのバリア機能を向上させる観点から、LN511Fと同一性が高いタンパク質の相同性は、85%以上であることが好ましく、90%以上であることがより好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

[0040] LN511Fの含有量は特に限定されないが、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることが好ましく、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることがより好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることがさらに好ましい。また、LN511Fの含有量は、経済性の観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることが好ましく、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることがより好ましい。

[0041] FBNの含有量は特に限定されないが、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることが好ましく、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることがより好ましい。また、FBNの含有量は、経済性の観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることが好ましく、 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることがより好ましい。

[0042] COL4の含有量は特に限定されないが、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることが好ましく、 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることがより好ましい。また、COL4の含有量は、経済性の観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、 $2000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることが好ましく、 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることがより好ましい。

[0043] LN511FとFBNとCOL4との3成分の合計含有量は、特に限定されないが、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、合計 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることが好ましく、合計 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることがより好ましく、合計 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含まれていることがさらに好ましい。また、LN511FとFBNとCOL4との3成分の合計含有量は、経済性

の観点から、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、合計 $2000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることが好ましく、合計 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であることがより好ましい。また、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、LN511FとFBNとの含有比率は、特に限定されないが、BMELCsのバリア機能を高める観点から、 $1:1\sim 1:100$ であることが好ましく、 $1:2\sim 1:20$ であることがより好ましい。また、工程Aにおいて用いるコーティング剤において、LN511FとCOL4との含有比率は、特に限定されないが、BMELCsのバリア機能を高める観点から、 $1:4\sim 1:400$ であることが好ましく、 $1:8\sim 1:80$ であることがより好ましい。

[0044] LN511FとFBNとCOL4との3成分の合計含有量は、培養皿等の面積、すなわちコート層のコート面積 1cm^2 あたり、合計 20ng 以上であることが好ましく、合計 100ng 以上であることがより好ましい。また、LN511FとFBNとCOL4との3成分の合計含有量は、コート層のコート面積 1cm^2 あたり、合計 $200\mu\text{g}$ 以下であることが好ましく、合計 $40\mu\text{g}$ 以下であることがより好ましい。また、なお、培養皿（培養dish）としては、例えば、シャーレや、複数のウェルを有するセルカルチャープレート等、任意の形態の培養皿を用いることができる。また、コーティング剤およびコート層には、発明の効果を妨げない範囲内で、他の任意の成分が含まれていてもよい。任意成分としては、特に限定されないが、例えば、ビトロネクチン、各種ラミニン、アグリニン、ゼラチン、ポリ-L-リジン等を挙げることができる。

[0045] 上記工程Aは、種々の培地を用いて行うことができる。培地としては、例えば、無血清血管内皮細胞用培地（Human Endothelial-SFM）やダルベッコ変法イーグル培地（D-MEM）、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、MEM α 培地、ハムF12培地（HamF12）、グラスゴー基本培地、RPMI1640培地、MCDB107培地等の基本培地を挙げることができる。なお、培地として、二種以上の基本培地を混合して用いてもよい。

[0046] 上記培養工程（工程A）では、B27（登録商標） supplement（以下、「B27s」とも呼ぶ）と、A 83-01と、Fibroblast Growth Factor-2（以下、「FGF2」とも呼ぶ）とを含む培地を用いて培養することが好ましい。B27sとA 83-01

とFGF2とを含む培地を用いて培養することにより、BMELCsのバリア機能をより向上させることができる。

[0047] B27sは、細胞培養サプリメントであり、Thermo Fisher Scientific社から入手することができる。B27sは、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aで用いる培地において、0.5%以上含まれていることが好ましく、2.5%以上含まれていることがより好ましく、7%以上含まれていることがさらに好ましい。また、B27sの含有量は、経済性の観点から、工程Aで用いる培地において、15%以下であることが好ましく、10%以下であることがより好ましい。

[0048] A 83-01は、TGF- β 阻害剤の一種である。より具体的には、A 83-01は、TGF- β type I /activin 受容体様キナーゼ (ALK5)、type I activin/nodal 受容体様キナーゼ (ALK4)、type I nodal 受容体様キナーゼ (ALK7) の選択的阻害剤である。A 83-01は、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aで用いる培地において、10 nM以上含まれていることが好ましく、0.1 μ M以上含まれていることがより好ましい。また、A 83-01の含有量は、経済性の観点から、工程Aで用いる培地において、100 μ M以下であることが好ましく、10 μ M以下であることがより好ましい。

[0049] FGF2は、線維芽細胞増殖因子2を意味しており、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) とも呼ばれる。FGF2は、例えばヒト組換えFGF2等のヒトFGF2であってもよい。FGF2は、BMELCsのバリア機能を高める観点から、工程Aで用いる培地において、1 ng/mL以上含まれていることが好ましく、10 ng/mL以上含まれていることがより好ましい。また、FGF2の含有量は、経済性の観点から、工程Aで用いる培地において、10 μ g/mL以下であることが好ましく、1 μ g/mL以下であることがより好ましい。

[0050] 工程Aで用いる培地には、発明の効果を妨げない範囲内で、他の任意成分が含まれていてもよい。任意成分としては、特に限定されないが、例えば、血清 (ウシ胎仔血清、ヒト血清、羊血清など)、血清代替物 (Knockout serum replacement (KSR) など)、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン

など)、サプリメント(例えばITS-Gサプリメント)、L-グルタミン、L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物、非必須アミノ酸(NEAA)、2-メルカプトエタノール、Chemically Defined Lipid Concentrate(Gibco社)等を挙げることができる。

[0051] 工程Aの培養期間は、特に限定されないが、例えば1日間~10日間であってもよく、好ましくは2日間~5日間である。当該培養期間とすることにより、BMELCsへの分化誘導効率の悪化を抑制でき、また、BMELCsのバリア機能を高めることができる。また、分化誘導の途中において、継代培養を行ってもよい。例えばコンフルエント又はサブコンフルエントになった際に細胞の一部を採取して別の培養容器に移し、培養を継続してもよい。培地交換や継代培養等に伴う、細胞の回収の際には、細胞死を抑制するためにY-27632等のROCK阻害剤(Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ)で予め細胞を処理しておいてもよい。

[0052] その他の培養条件(培養温度等)は、動物細胞の培養において一般に採用されている条件としてもよい。例えば37℃、5%CO₂の環境下で培養してもよい。また、培養皿等を用いて二次元的に細胞を培養する方法に限らず、上記コーティング剤がコートされたコート層を含む3次元培養プレート等を用いた3次元培養を実施してもよい。

[0053] 本開示におけるBMELCsの製造方法は、培養工程(工程A)の前に、多能性幹細胞を血管内皮前駆細胞へと分化誘導させる工程(以下、「工程B」とも呼ぶ)を含んでいてもよい。また、工程Bは、血管内皮増殖因子を用いて多能性幹細胞を血管内皮前駆細胞へと分化誘導させる工程であってもよい。

[0054] 本開示におけるBMELCsの製造方法において、工程A、すなわちEPCsを培養する培養工程では、EPCsを脳ペリサイト(Brain Pericyte:以下、「BPC」とも呼ぶ)と共培養してもよい。一般に、脳ペリサイトは、周皮細胞とも呼ばれ、脳毛細血管内皮細胞と共に血液脳関門を構成する。

[0055] 本明細書において、「EPCsとBPCとの共培養」とは、EPCsとBPCとを一緒に培養する状態を意味する。共培養において、EPCsとBPCとは、同一の培地(培

養液)中に存在していてもよく、互いに異なる培地(培養液)中に存在していてもよい。共培養において、EPCsとBPCとは、細胞同士が接触した状態であってもよく、非接触の状態であってもよいが、非接触の状態であることが好ましい。非接触の状態とは、EPCsとBPCとが、例えば、微孔性の支持膜等を介してその表面側と裏面側にそれぞれ隔てて存在する状態や、支持体等を介して培地中で距離を隔てて別々に存在する状態等が該当する。支持体は、特に限定されないが、例えば、支持膜と支持具とから構成されていてもよい。支持体は、EPCsとBPCとを担持し、かつ支持膜を培養容器に固定するための部材である。支持体は、具体的には、シルクハット様形状のセルカルチャーインサートであってもよい。支持膜は、微孔性のものが好ましく、孔の大きさは、細胞が通過できない大きさであって、細胞の突起や培地等が通過できる大きさであることが好ましい。支持膜は、細胞の維持・生存・分化誘導を妨げない任意の材料によって形成されていてもよい。

[0056] EPCsとの共培養に用いるBPCは、多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよく、生体由来の細胞であってもよく、不死化細胞であってもよい。BPCとしては、入手性の観点から、多能性幹細胞から分化誘導された細胞を用いることが好ましく、倫理性の観点から、iPS細胞を用いることがより好ましい。

[0057] 本開示におけるBMELCsの製造方法は、培養工程(工程A)の前に、多能性幹細胞を脳ペリサイトへと分化誘導させる工程(以下、「工程C」とも呼ぶ)を含んでいてもよい。

[0058] 工程Cでは、BPCへの分化を誘導する条件下で多能性幹細胞を培養する。例えば、多能性幹細胞が中胚葉(Mesderm)を介してBPCへと分化するように、以下で説明する2段階の分化誘導を行ってもよい。すなわち、多能性幹細胞を中胚葉へと分化させる工程と、得られた細胞をBPCへと分化させる工程とを行ってもよい。

[0059] 多能性幹細胞を中胚葉へと分化させる工程は、例えば、上述の方法により行ってもよい。得られた細胞をBPCへと分化させる工程では、例えば、分化誘

導因子として血小板由来成長因子（PDGF-BB）等を用い、BPCへと分化誘導してもよい。

[0060] 工程Cにおける、その他の培養条件（培養温度等）は、動物細胞の培養において一般に採用されている条件としてもよい。培養条件は、例えば、37°C、5%CO₂等に設定してもよい。また、基本培地として、例えば、無血清血管内皮細胞用培地（Human Endothelial-SFM）やダルベッコ変法イーグル培地（D-MEM）、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、MEM α 培地、ハムF12培地（HamF12）、グラスゴー基本培地、RPMI1640培地、MCDB107培地、EGM-2 basal培地等の基本培地を用いてもよく、D-MEMとハムF12培地等の混合培地等、二種以上の基本培地を混合して用いてもよい。また、血清や血清代替物、抗生物質、サプリメント等、培地に他の任意成分が添加されていてもよい。また、工程Cでは、例えば、Vitronectin-N（VTN-N）等のコーティング剤を用いてもよい。

[0061] BPCへ分化したことは、例えば、ペリサイトマーカーの発現を指標にして判定評価することができる。ペリサイトマーカーとしては、例えば、PDGFR- β 、NG2、 α -SMA等が挙げられる。BPCは、生体内の細胞を模倣する観点において、 α -SMAの発現が陰性であることが好ましい。このため、 α -SMAの発現が陰性であることは、脳ペリサイトと末梢ペリサイトを分ける有用な指標として用いることができる。

[0062] 工程Aで用いられるBPCは、A 83-01を含む培地を用いて多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。このため、工程Cは、A 83-01を含む培地を用いて多能性幹細胞を脳ペリサイトへと分化誘導させる工程を含んでもよい。A 83-01を含む培地を用いることにより、BPCの模倣性をさらに向上できる。A 83-01は、BPCの細胞遊走能や細胞増殖能を向上させる観点から、工程Cで用いる培地において、10 nM以上含まれていることが好ましく、0.1 μ M以上含まれていることがより好ましい。また、A 83-01の含有量は、経済性の観点から、工程Cで用いる培地において、100 μ M以下であることが好ましく、10 μ M以下であることがより好ましい。

- [0063] 工程AにおいてEPCsをBPCと共培養する場合には、工程Cと工程Aとを連続的に行ってもよい。すなわち、工程Cで用いたセルカルチャーインサート等の培養容器をそのまま用い、適宜培地を置換しながら連続的に工程Aを行ってもよい。より具体的には、まず、工程Cとしてセルカルチャーインサートの外側（底部裏面）に多能性幹細胞を播種し、多能性幹細胞をBPCへと分化誘導してもよい。その分化誘導の際には、培地にA 83-01を添加することが好ましい。その後、そのセルカルチャーインサートの内側（底部上面）にEPCsを播種し、LN511FとFBNとCOL4とを用いて、EPCsをBPCと共培養してもよい。
- [0064] 本開示の方法によれば、生体内のBMECsに対する模倣性を向上させた細胞、すなわち生体内のBMECsを模倣したBMELCsを製造することができる。
- [0065] 加えて、EPCsをBMELCsへと分化誘導する培養工程において、EPCsをBPCと共培養する方法によれば、生体内のBMECsに対する模倣性をさらに向上させたBMELCsを製造することができる。さらに、EPCsと共培養するBPCを多能性幹細胞から分化誘導する際に、A 83-01を含む培地を用いる態様によれば、生体内のBPCに対する模倣性を向上できる。このため、生体内のBMECsに対する模倣性をより一層向上させたBMELCsを製造することができる。
- [0066] ここで、従来報告されている方法によってiPS細胞を分化誘導して得られる脳毛細血管内皮様細胞は、拡大培養に関する報告が存在せず、iPS細胞から毎回分化誘導させる必要がある。このため、従来の方法では、細胞の供給面において大きな課題が存在する。
- [0067] これに対し、本開示におけるBMELCsの製造方法では、EPCsをBMELCsへと分化誘導させる。ここで、EPCsは、拡大培養および凍結保存が可能であるため、供給性に優れる。したがって、EPCsをBMELCsへと分化誘導させる本開示の方法によれば、凍結細胞を分化源として利用できるため、BMELCsを容易に製造できる。また、EPCsをBMELCsへと分化誘導させる本開示の方法によれば、製造した細胞のロットの違いに起因する性能のばらつきを抑制できる。
- [0068] 上記工程Aを含む分化誘導によって製造されたBMELCsを、BMELCsの維持、増殖に適した培養条件で引き続き培養することにより、BMELCsの単層（細胞

層)が形成される。本開示の方法によれば、バリア機能に優れた細胞層が得られる。本開示の方法で得られる細胞層のバリア機能は、強固なタイトジャンクションと、長期間に渡るタイトジャンクションの維持によって特徴付けることができる。

[0069] 本開示の方法で得られる細胞層のバリア機能を、BMECsにおいて重要な又は特徴的な薬物トランスポーター(例えばBCRP、P-gp、GLUT1)の機能を有していることによってさらに特徴付けることもできる。また、BMECsに重要な又は特徴的なタイトジャンクションマーカー(例えばClaudin5、Occludin、ZO-1)の発現等を指標にして、BMECsの機能を判定ないし評価することができる。

[0070] 分化誘導の後期において、培養を半透過性膜(多孔性膜)の上で行うことにより、半透過性膜上にBMECsの細胞層を形成させることができる。この態様は、本開示の製造方法により得られたBMECsの細胞層を各種アッセイに利用する場合に特に有効である。例えば、カルチャーインサート(半透過性膜からなる培養面を有する)を備えた培養容器(例えば、コーニング社が提供するトランズウェル(登録商標))を使用し、インサート内で細胞培養し、細胞層を形成させることができる。

[0071] 本開示の他の形態は、上記の方法により分化誘導して製造されたBMECsの利用に関する。上記の通り、本開示によれば、BMECsで構成された細胞層を得ることが可能であり、当該細胞層をBBBモデルに利用できる。例えば、BBBにおける薬物動態研究や病態解析、分化研究等に応用することが可能である。より具体的には、BBBにおける薬物動態研究として、新規BBB薬物動態評価モデル等に利用でき、病態解析として、例えばBBB破綻に関与する疾患についての疾患iPS細胞を用いた病態再現モデル等に利用でき、分化研究として、胚発生時におけるBBB発生・分化研究への応用や、BBB炎症モデル等に利用できる。例えば、本開示の方法により調製されたBMECsで構成された細胞層を用いたアッセイは、医薬品又は医薬品候補等の被検物質における脳内移行性(血液脳関門透過性)の評価に利用でき、その評価精度を向上できる。この結

果、ヒト生体内のBBBにおける被検物質の透過性を、in vitroにおいて簡便に予測できる。

[0072] 本開示の他の形態によれば、上記の製造方法により得られたBMELCsの細胞層を用いて、被検物質のBBB透過性を評価する方法（以下、「本開示のBBB透過性評価方法」とも呼ぶ）が提供される。本開示のBBB透過性評価方法では、以下の（i）～（iii）の工程を行う。

（i）本開示の製造方法により得られたBMELCsの細胞層を用意する工程

（ii）前記細胞層に被検物質を接触させる工程

（iii）前記細胞層を透過した被検物質を定量することにより、被検物質の血液脳関門透過性を評価する工程

[0073] 工程（i）では、本開示の製造方法により得られたBMELCsの細胞層を用意する。なお、BMELCsの細胞層に加え、他の細胞（ペリサイト、アストロサイト等）を併用することにしてもよい。例えば、カルチャーインサートを備えた培養容器を採用してBMELCsの細胞層をカルチャーインサート内に形成させることにし（カルチャーインサートの底部上面に細胞層が形成される）、カルチャーインサートの底部裏面に接着した状態でペリサイトを培養したり（ペリサイト接着共培養系）、カルチャーインサートとウェルの間の区画でペリサイトを培養したり（ペリサイト非接着共培養系）、カルチャーインサートの底部裏面に接着した状態でペリサイトを培養するとともにカルチャーインサートとウェルの間の区画でアストロサイトを培養したり（ペリサイト接着／アストロサイト非接着共培養系）、カルチャーインサートの底部裏面に接着した状態でアストロサイトを培養したり（アストロサイト接着共培養系）することが可能である。

[0074] 工程（ii）での「接触」は、典型的には、培地に被検物質を添加することによって行われる。被検物質の添加のタイミングは特に限定されない。したがって、被検物質を含まない培地で培養を開始した後、ある時点で被検物質を添加することにしても、予め被検物質を含む培地で培養を開始することにしてもよい。

- [0075] 典型的には、医薬品又は医薬品候補の物質が被検物質として用いられる。但し、被検物質は特に限定されるものではなく、様々な分子サイズの有機化合物又は無機化合物を被検物質として用いることができる。有機化合物の例として核酸、ペプチド、タンパク質、脂質（単純脂質、複合脂質（ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質、グリコシルグリセリド、セレブロシド等）、プロスタグランジン、イソプレノイド、テルペン、ステロイド、ポリフェノール、カテキン、ビタミン（B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、A、D、E等）を例示できる。植物抽出液、細胞抽出液、培養上清等を被検物質として用いてもよい。2種類以上の被検物質を同時に添加することにより、被検物質間の相互作用、相乗作用等を調べてもよい。被検物質は天然物由来であっても、合成によるものであってもよい。後者の場合には、例えばコンビナトリアル合成の手法を利用して効率的なアッセイ系を構築することができる。
- [0076] 被検物質を接触させる期間は任意に設定可能である。接触期間は例えば10分間～3日間、好ましくは1時間～1日間である。
- [0077] 工程（i i i）では、細胞層を透過した被検物質を定量する。例えば、トランズウェル（登録商標）のようなカルチャーインサートを備えた培養容器を使用した場合には、カルチャーインサートを透過した被検物質、即ち、細胞層を介して上部容器（カルチャーインサート）もしくは下部容器（ウェル）内に移動した被検物質を、被検物質に応じた測定方法で定量する。測定方法としては、質量分析、液体クロマトグラフィー、免疫学的手法（例えば蛍光免疫測定法（FIA法：Fluorescent Immunoassay）、酵素免疫測定法（EIA法：Enzyme Immunoassay））等の測定方法を例示することができる。定量結果（細胞層を透過した被検物質の量）と被検物質の使用量（典型的には培地への添加量）とに基づき、被検物質の膜透過性を評価する。膜透過性に加え、細胞層による吸収（吸収性）、細胞層への影響（例えばバリア機能への影響）、トランスポーター（例えばBCRPやP-gp）の発現又は機能への影響等を評価してもよい。一般に、吸収性は、透過性と表裏の関係にあることから、透過性の場合と同様の方法で評価することができる。バリア機能への影響は、T

EER値の測定、非吸収性マーカーを用いた透過試験等によって評価することができる。また、トランスポーターの発現への影響は、免疫学的手法、ウエスタンブロットング法、フローサイトメトリー等によって評価することができる。同機能への影響は、例えば基質を用いた活性試験によって評価することができる。

[0078] 上記の説明からわかるように、BMELCsの細胞層を用いることにより、被検物質のBBB機能への影響（例えばBBB機能の向上、低下、破綻）も評価することができる。そこで本開示は、本開示の製造方法によって製造されたBMELCsの細胞層の別の用途として、BBB機能を標的ないし対象とした評価方法、すなわち、被検物質のBBBバリア機能への影響を評価する方法も提供する。当該評価方法は、例えば、バリア機能を強化（向上）する物質、バリア機能を保護する物質、バリア機能を調節する物質等の探索手段として有用である。また、BBBに対する毒性の評価にも利用可能である。当該評価方法では、上記のBBB透過性評価方法と同様、細胞層を用意する工程と細胞層に被検物質を接触させる工程を行い、その後、細胞層のバリア機能への影響を評価する。バリア機能への影響を評価する手法は、上述の通りである。

[0079] 本開示の他の形態によれば、上記の製造方法で得られる脳毛細血管内皮様細胞が提供される。また、本開示の他の形態によれば、PECAM1の発現量が、初代培養脳毛細血管内皮細胞および不死化脳毛細血管内皮細胞よりも大きく、経内皮電気抵抗（TEER値）が、 $50 \Omega \times \text{cm}^2$ 以上である脳毛細血管内皮様細胞が提供される。このような脳毛細血管内皮様細胞は、例えば、上記の製造方法によって得ることができる。

[0080] PECAM1の相対的な発現量の定量には、mRNAの発現量を用いてもよく、タンパク質の発現量を用いてもよい。mRNAの発現量の定量は、例えば、RT-q PCRを用いて行うことができる。タンパク質の発現量の定量は、例えば、免疫染色法により行うことができる。TEER値の測定は、Millicell ERS-2（チョップスティック型）を使用して、その装置に添付されているマニュアルに従い測定することができる。TEER値の測定は、培地交換前に行うものとする。より

具体的には、まず、培養dishを室温で15分程度静置することで培地内温度を室温に戻した後、細胞を播種していないセルカルチャーインサートのTEER値を測定してブランクとする。その後、細胞を播種したセルカルチャーインサートのTEER値を測定後、ブランクのTEER値を引いた値を実測値として求めることができる。

実施例

[0081] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0082] 図1は、ヒトiPS細胞（以下、「hiPSCs」とも呼ぶ）から、ヒトiPS細胞由来血管内皮前駆細胞（以下、「iEPCs」とも呼ぶ）への分化プロトコールを示す説明図である。実施例では、図1に示すように、hiPSCsを、原始線条（Primitive streak）、中胚葉（Mesoderm）、未成熟（Immature）iEPCsを経てiEPCsへと分化誘導させ、その後、純化させることにより、iEPCsを製造した。そのように製造したiEPCsを用いて、ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮様細胞（以下、「iBMELCs」とも呼ぶ）へと分化誘導した。なお、以下の説明では、特に断らない限り、「%」は体積%（volume/volume%）を示しており、「w/v%」は質量体積%（weight/volume%）を示している。

[0083] 1. 材料および方法

（1）培養dishのコーティング

hiPSCsをiEPCsに分化誘導する際の培養dishのコーティングとして、Vitronectin-N (VTN-N)コーティングは、VTN-N (Thermo Fisher Scientific製) を1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるようD-PBS (-) で希釈し、37°Cで1~2時間静置した。Gelatinコーティングは、0.1% gelatin溶液を37°Cで1時間または4°Cで一晩静置した。iEPCsをiBMELCsに分化誘導する際の培養dishのコーティングとして、Fibronectinとcollagen type IVとの2成分のコーティングは、Fibronectin (Wako Pure Chemical Industries製) が100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、collagen type IV (Nitta Gelatin Inc. 製) が400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにD-PBS (-) で希釈し、37°Cで2~4時間静置した。また、3成分によるコーティングは、Fibronectinとcollagen type

IVとの混合液に1成分を追加してコーティングを行なった。この3成分目には、VTN-N (Thermo Fisher Scientific製)、ラミニン221断片 (LN221F:Nippi Incorporated製 iMatrix221)、ラミニン411断片 (LN411F:Nippi Incorporated製 iMatrix411)、ラミニン511断片 (LN511F:Nippi Incorporated製 iMatrix511)、ラミニン断片mix (ラミニン221F、ラミニン411Fおよびラミニン511Fの混合物)、ラミニン211 (Veritas製)、ラミニン411 (Veritas製)、ラミニン511 (Veritas製)、アグリニン (R&D製)、ラミニンmix (ラミニン211、ラミニン411およびラミニン511の混合物) が該当する。VTN-N、LN221F、LN411Fの濃度は、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。LN511Fの濃度は、 $10\sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。また、LN411FおよびLN511Fをいずれも $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた4成分によるコーティングも行った。また、ヒト不死化細胞株の培養に用いるCollagen type Iコーティングは、 0.01% collagen type I溶液 (新田ゼラチン製) で浸し、吸引後、静置して乾燥させた。Lippmannらの報告に準じた方法において用いるMatrigel GFRコーティングは、氷上でMatrigel GFR (Corning Incorporated製) をヒトiPS細胞の維持培地で30倍希釈し、 37°C で30分以上静置した。

[0084] (2) 細胞培養

ヒトiPS細胞として610B1株 (Riken Cell Bankより入手) を用い、VTN-Nをコートした培養dish上で、Essential 8 flex medium (Thermo Fisher Scientific製) を培地として用いて培養を行った。610B1株の継代時の剥離液には、 0.5M EDTA (pH 8.0) またはTrypLE Select (Thermo Fisher Scientific製) を用いた。剥離にTrypLE Selectを用いた場合、継代直後にY-27632を $10 \mu\text{M}$ 添加して翌日培地交換をした。

[0085] ヒト不死化細胞株であるhCMEC/D3は、Merck Millipore社から入手し、hCMEC/D3 medium (5% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich製)、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate、1% chemically defined lipid concentrate (Thermo Fisher Scientific製)、 $10 \mu\text{M}$ HEPES solution (Sigma-Aldrich製)、1% penicillin-streptomycin solution (Biological Industries製)、 $1.4 \mu\text{M}$ hydrocortisone (Wako製) および $1 \text{ ng}/\text{mL}$ FGF2 (

PeproTech, Inc.製)を含むEndothelial Cell Basal Medium-2 (Lonza)) を用いて培養した。継代時の剥離には、TrypLE Selectを用い、 5.0×10^3 cells/cm²でcollagen type I コート培養dishに播種した。培地交換は、2日に一回行なった。

[0086] 比較例としてLippmannらの報告に準じてヒトiPS細胞を脳毛細血管内皮様細胞へと分化誘導する際には、ヒトiPS細胞として610B1株を用い、FGF2を5 ng/mL添加したiPS cell medium (20% KSR (Thermo Fisher Scientific製)、1 × MEM nonessential amino acids、2 mM L-glutamine (Wako Pure Chemical Industries製)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Corporation製)を含むDMEM/F12 (Wako Pure Chemical Industries製))を用いて培養を行った。なお、mitomycin C処理により増殖能を不活化したmouse embryonic fibroblasts上で培養した。剥離液には、1 mg/mL collagenase IV、0.25% trypsin、20% KSR、1 mM CaCl₂を含むD-PBS (-) (タカラバイオ製)を用いた。

[0087] (3) iEPCsへの分化誘導

Essential 8 Flex medium中にて培養されたヒトiPS細胞を、TrypLE Selectで剥離し、 2×10^4 cells/cm²の密度で、VTN-Nコート培養dish上に播種し、Y-27632 (Focus Biomolecules製)を10 μM含むEssential 8 Flex mediumで24時間培養した。その後、modified DMEM/F12 (0.1% chemically defined lipid concentrate、0.1 × insulin - transferrin - selenium (Thermo Fisher Scientific製)、2 mM GlutaMAX (Sigma-Aldrich製)、450 mM 1-thioglycerol (Sigma-Aldrich製)、50 μg/mL of L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrateおよび1 × penicillin - streptomycin solutionを含むDMEM/F12)に5 μMのCHIR-99021 (Focus Biomolecules製)を添加した培地で1日培養した。その後、modified DMEM/F12に、50 ng/mLのFGF2を添加した培地で1日培養した。その後、modified DMEM/F12に50 ng/mL VEGF (Biolegend製)および25 ng/mL BMP4 (Prospec製)を添加した培地で3日間培養した。この間毎日培地交換を行った。5日目に、10 μM Y-27632にて1時間処理した細胞をTrypLE Selectで解離させ、 3.5×10^4 cells/cm²で新しいgelatinコート培養

ishに継代し、modified Human endothelial (HE)-SFM {HE-SFM (Thermo Fisher Scientific製) + 5% knockout serum replacement (Thermo Fisher Scientific製) + 1× penicillin - streptomycin} に50 ng/mLのVEGFと10 ng/mLのFGF2を添加した培地にて分化誘導を行った。この間毎日培地交換した。

[0088] (4) iEPCsの純化

10 μ MのY-27632にて1時間処理した分化8日目の細胞を、TrypLE Selectで45~60秒間処理し、iEPCs以外の細胞 (extra cells) をある程度剥がし、培養dishを数回弾くように叩く (タッピングする) ことで、完全にextra cellsを剥がした。この時点で、培養dishの一番端の細胞が剥がれにくい場合、培養dishの端の細胞を、一周円を描くように吸引した。その後D-PBS (-) で3回以上洗い、再びTrypLE Selectで処理し、iEPCsを剥離した後、tubeに回収し、100 \times gで5分間遠心して新しい培養dishに再播種した。

[0089] (5) iEPCsの培養

純化後の細胞は、modified Human endothelial SFMに10 ng/mL EGF (GenScript製)、20 ng/mL FGF2、10 μ M Y-27632、0.5 μ M A 83-01 (Aadoq Bioscience製)、3 μ M CHIR-99021を加えた培地で培養を行った。培地交換は、播種後1日目 (分化9日目および12日目) において行った。また、継代は、分化11日目で行った。継代時は、D-PBS (-) で一回洗浄した後、37°CにおいてTrypLE Selectで5分以上処理し、細胞を剥離させた。その後、培地で細胞を15 mL tubeもしくは50 mL tubeに回収し、100 \times gで5分間遠心した。その後、培地を用いて再懸濁させ、VTN-Nをコートした培養dishに、1 \times 10⁴ cells/cm² または1.5 \times 10⁴ cells/cm²で再播種した。分化11日目の時点でextra cellsの残存率が多く、純化しきれいでいなかったと判断した場合、D-PBS (-) にて洗浄した後、TrypLE Selectを加え、常温にて顕微鏡で観察し、extra cellsが剥がれ始めた段階で数回強くタッピングし、剥離液を吸引し、D-PBS (-) にて一回洗浄した後、再度TrypLE Selectを加え、通常の継代法を適用した。分化14日目まで培養した。

[0090] (6) 細胞の凍結保存および解凍

継代時と同様の操作で、分化14日目のiEPCsの細胞ペレットを作製し、TC Protector (DSファーマバイオメディカル社製) にて再懸濁後、 -80°C のディープフリーザーにて凍結し、保存した。解凍時は、 37°C の温浴にて半融解させ、あらかじめ温めておいた15 mL tubeもしくは50 mL tubeに入った10 mLの培地の中から1 mLを半融解の細胞懸濁液に注ぎ、完全に融解させた後、tubeに戻し、 $100 \times g$ で5分間遠心した。その後、培地で再懸濁し、wellプレートまたはTranswell (登録商標) に播種した。また、hCMEC/D3から調製された血管内皮前駆細胞についても、同様の方法により凍結保存・解凍した。

[0091] (7) 脳毛細血管様細胞への分化誘導

コーティング剤および培地への添加物を互いに異ならせた条件において、iEPCsをiBMELCsへと分化誘導した。培養dishのコーティングには、上述のように、FBNとCOL4との2成分、またはこれら2成分にVTN-N、LN221、LN411F、LN511Fのうちのいずれか1成分を追加した3成分もしくはLN411FとLN511Fとを加えた4成分を用いた。また、3成分目として、ラミニン211、ラミニン411、ラミニン511、アグリン、ラミニンmix、ラミニン断片mix、hep exも用いた。非凍結・凍結iEPCs (分化14日目) を播種し、HE-SFM (+1 \times penicillin - streptomycin 以降省略) に2~10% KSRおよび20 ng/mL FGF2を添加した培地、HE-SFMに5% FBS (Sigma-Aldrich Corporation製) および20 ng/mL FGF2を添加した培地、HE-SFMに5% Platelet-poor plasma-derived bovine serum (PDS) (Alfa Aesar製) および20ng/mL FGF2を添加した培地、HE-SFMに2~10% B27 (登録商標) supplement (Thermo Fisher Scientific製) および20 ng/mL FGF2を添加した培地、もしくはHE-SFMに7.5% B27 supplement、 $0.1\sim 10\ \mu\text{M}$ A83-01および20 ng/mL FGF2を添加した培地で培養し、脳毛細血管様細胞へと分化誘導した。播種後1日目に培地交換し、その後は1日おきに培地交換した。また、培養dishにiEPCsを播種する際の細胞密度を検討するために、 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のFibronectin、 $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のcollagen type IV、 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のLN511Fでコーティングした培養dishに、 $1 \times 10^5\ \text{cells}/\text{cm}^2$ 、 $3 \times 10^5\ \text{cells}/\text{cm}^2$ 、 $5 \times 10^5\ \text{cells}/\text{cm}^2$ 、 $7 \times 10^5\ \text{cells}/\text{cm}^2$ 、 $9 \times 10^5\ \text{cells}/\text{cm}^2$ にて播種を行い、HE-SFM

に7.5% B27 supplement、1 μ M A 83-01および20 ng/mL FGF2を添加した培地にて培養を行った。また、ヒト不死化脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3) についても、同様に、後述する分化誘導条件 A を用いて脳毛細血管様細胞へと分化誘導した。

[0092] (8) 既存の方法でのiBMELCsへの分化誘導 (比較例)

Lippmannらの報告を改変したプロトコールを基に行なった。ヒトiPS細胞をMatrigel-GFRにてコーティングした6-wellプレートに播種し、35 ng/mLのFGF2を添加したStemSure hPSC medium (wako製) にて3日間または4日間培養した。この間培地交換は毎日行なった。分化開始日 (60–70%コンフルエント) に培地をDMEM/F12 based medium (iPS cell medium) に変更し、6日間培養した。この間培地交換は毎日行なった。分化6日目に培地を10 μ M のall-trans-retinoic acid (RA) (Tocris Bioscience製) および20 ng/mLのFGF2を含有するHE-SFM based medium (1% PDSおよび1 \times Penicillin-streptomycin solution (Biological Industries USA, Inc. 製) を含有するHE-SFM) でさらに2日間培養した。この間毎日培地交換を行なった。分化8日目に分化細胞をD-PBS (-) で洗浄し、Accutase cell detachment solution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 \times gで5分間遠心し、細胞懸濁液を作製後、Fibronectin + collagen type IVコートwellプレートまたはTranswell (登録商標) (12-well, pore size: 1 μ m) に播種し、10 μ MのRAおよび20 ng/mLの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。

[0093] (9) 免疫染色解析

上記の方法によりhiPSCsから分化誘導されたiEPCsに対し、EPCsとしての性状を確認するために、免疫染色法による解析を行なった。この免疫染色における抗体には、PECAM1およびCD34を用いた。また、以下の分化誘導条件 A を用いた上記方法により凍結iEPCsから分化誘導されたiBMELCsと、比較例として、Fibronectin 100 μ g/mLとcollagen type IV 400 μ g/mLとを含むコーティング剤と、7.5% KSRと20 ng/mL FGF2とを添加したHE-SFM培地を用いて培養した

細胞とに対し、免疫染色によるタンパク質発現解析を行なった。この免疫染色における抗体には、PECAM1、CDH5、ZO-1、CLAUDIN5、P-gp、BCRPおよびGLUT1を用いた。96-wellプレート上の細胞を、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄後、4% paraformaldehyde中で15分間固定し、再度0.1% BSA含有D-PBS (-) で洗浄した後、0.1 w/v% Triton X-100含有D-PBS (-) にて5分間透過処理を行った。続いて、0.1% BSA含有D-PBS (-) で洗浄した後、一次抗体を4℃で1晩反応させた。その後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄し、室温で二次抗体 (Anti-Rabbit、Anti-Mouse) を200倍希釈で60分間反応させた。その後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄し、核染色試薬である1 μ g/mLのDAPI (Dojindo製) を5分間反応させた。その後、D-PBS (-) で3回洗浄し、Opera High-Content Imaging System (PerkinElmer製) にて解析した。免疫染色において用いた抗体の詳細を、表1に示す。

[0094] <iBMELCsへの分化誘導条件A>

コーティング剤：100 μ g/mLのFibronectin、400 μ g/mLのcollagen type IV、10 μ g/mLのLN511F

培地：7.5% B27 (登録商標) supplement、1 μ M A 83-01および20 ng/mL FGF2を添加したHE-SFM

[0095]

[表1]

Table 1

Targets	Manufacturer	Catalog number	Species	Dilution
PECAM1	Abcam	ab28364	Rabbit	1:25
CDH5	Santa Cruz	sc-9989	Mouse	1:25
P-gp	Abcam	ab10333	Mouse	1:25
BCRP	Abcam	ab3380	Mouse	1:50
ZO-1	Fisher Scientific	33-9100	Mouse	1:100
Claudin-5	Fisher Scientific	35-2500	Mouse	1:50
GLUT1	Fisher Scientific	MA5-11315	Mouse	1:50
Anti-Rabbit (Alexa Flour 488)	Fisher Scientific	A-21206	Donkey	1:200
Anti-Mouse (Alexa Fluor 568)	Fisher Scientific	A-11004	Goat	1:200

[0096] (10) アセチル化LDL取り込み試験

hiPSCsから分化誘導されたiEPCsに対し、EPCsとしての性状を確認するために、アセチル化LDLの取り込み試験を行った。hiPSCsから分化誘導されたiEPCs（分化14日目）に、DiIで標識されたアセチル化LDLを終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で5時間反応させ、その後、蛍光標識であるHoechst33342を30分間反応させ、培地で4回洗浄し、Operetta High-Content Imaging Systemにて解析した。

[0097] (11) iEPCsの凍結の影響の確認試験

hiPSCsから分化誘導されたiEPCsにおける凍結保存の影響を確認するために、凍結の有無による経内皮電気抵抗（TEER値）の違いを比較した。分化14日目のiEPCsを上記の方法により凍結し、解凍させた凍結群と、分化14日目のiEPCsを凍結しなかった非凍結群とを、上記の分化誘導条件Aを用いた上記方法によりiBMELCsへと分化誘導させ、TEER値を測定した。凍結群と非凍結群のサンプル数は、それぞれ3とした。非凍結群の最大TEER値を基準として、凍結群の相対最大TEER値を求めた。本明細書において、「最大TEER値」とは、播種

後2日目から播種後10日目までの各日に測定したTEER値のうち、最大の値を意味している。TEER値は、Millicell ERS-2（チョップスティック型）を使用し、添付マニュアルに従い測定した。培地の液量は、頂端側で600 μ L、基底側で1800 μ Lとした。

[0098] (1 2) iEPCsからiBMELCsへの分化誘導条件の違いによる経内皮電気抵抗値の解析

コーティング剤および培地を互いに異ならせた各誘導条件を用いて上記方法により凍結iEPCsから分化誘導されたiBMELCsに対し、TEER値を解析することによりバリア機能を評価した。サンプル数は、特に断らない限り、それぞれ3とした。TEER値の測定は、上記のとおり行った。

[0099] (1 1) fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa (FD4) および lucifer yellow (LY) の透過試験

互いに異なる4つの誘導条件を用いて上記方法により凍結iEPCsから分化誘導されたiBMELCsに対し、傍細胞経路による透過の指標となるFD4およびLYを透過対象として、透過試験を行った。4つの分化誘導条件では、FBNとCOL4との2成分を含むコーティング剤と20 ng/mLのFGF2を含有するHE-SFM培地とが共通条件であり、サンプル「KSR」では培地にさらに7.5% KSRを含有させ、サンプル「B27」では培地にさらに7.5% B27sを含有させ、サンプル「B27+A 83-01」では培地にさらに7.5% B27sと1 μ M A 83-01とを含有させ、サンプル「B27+A 83-01+LN511F」では培地にさらに7.5% B27sと1 μ M A 83-01とを、コーティング剤にはさらに10 μ g/mL LN511Fを含有させた。サンプル数は、それぞれ3とした。透過試験にはTranswell（登録商標）（12-well, pore size: 1 μ m）上の細胞を用いた。播種後4日目に、培地をtransport buffer（10 mM HEPE solutionを含むHBSS）に置き換え、37°Cで20分間培養した。1 mg/mL FD4または300 μ M LYを含有するtransport bufferを頂端側に加えた。37°Cで60分間インキュベートした後、100 μ Lの溶液を側底側から回収した。トランスポートバッファの液量は頂端側で500 μ L、基底側で1500 μ Lとした。FD4またはLYの蛍光強度をSynergy HTX multimode plate reader (BioTek) で

測定し、Gen 5 data analysis software (BioTek) にて解析した。

[0100] (12) 脳毛細血管内皮細胞マーカータンパク質発現量の解析

脳毛細血管内皮細胞マーカータンパク質発現量の解析を行なった。サンプルとしては、上記の分化誘導条件 A を用いて上記方法により凍結 iEPCs から分化誘導された iBMELCs (播種後 4 日目) と、比較例として、Fibronectin 100 μ g/mL と collagen type IV 400 μ g/mL とを含むコーティング剤と、7.5% KSR と 20 ng/mL FGF2 とを添加した HE-SFM 培地を用いて培養した細胞 (播種後 4 日目) とを用いた。サンプル数は、それぞれ 3 とした。タンパク質発現量の解析には、Operetta High-Content Imaging System を用い、上記のとおり免疫染色を施した細胞をオペレッタ顕微鏡にて観察し、Harmony (登録商標) high-content analysis software にて蛍光強度を算出した。比較例におけるタンパク質の発現量を基準として、iBMELCs におけるタンパク質の相対的発現量を求めた。

[0101] (13) 脳毛細血管内皮細胞マーカー遺伝子発現量の解析

脳毛細血管内皮細胞マーカー遺伝子発現量の解析を、RT-q PCR にて行なった。サンプルとして、上記の分化誘導条件 A を用いて上記方法により凍結 iEPCs から分化誘導された iBMELCs (播種後 4 日目、サンプル数 3)、上記 Lippmann らの報告を改変した方法により分化誘導された細胞 (以下、「iBMELCs 2」とも記載、サンプル数 3)、ヒト不死化 BMECs (以下、「hCMEC/D3」とも記載、サンプル数 3)、ヒト初代 BMECs (以下、「hBMECs」とも記載、サンプル数 1) を用いた。RNA 抽出は、Agencourt (登録商標) RNeasy Tissue Kit (Qiagen, Inc. 製) の添付マニュアルに従い行った。逆転写反応として、相補的 DNA (cDNA) の合成を、Reverta Ace (登録商標) qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Ltd. 製) を使用し、添付マニュアルに従い行なった。RT-q PCR には、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics Co., Ltd. 製) を用い、cDNA を鋳型にして、反応は添付マニュアルに従い行なった。得られた結果を、内在性コントロールとして HPRT1 を用いて補正した。hBMECs における mRNA の発現量を基準として 100 とし、iBMELC

s、iBMELCs 2およびhCMEC/D3におけるmRNAの相対的発現量を求めた。

[0102] RT-q PCRにおいて用いたプライマーとして、CDH5のフォワードプライマーの配列を配列番号1に示し、CDH5のリバースプライマーの配列を配列番号2に示し、MDR1のフォワードプライマーの配列を配列番号3に示し、MDR1のリバースプライマーの配列を配列番号4に示し、BCRPのフォワードプライマーの配列を配列番号5に示し、BCRPのリバースプライマーの配列を配列番号6に示し、GLUT1のフォワードプライマーの配列を配列番号7に示し、GLUT1のリバースプライマーの配列を配列番号8に示し、Occludinのフォワードプライマーの配列を配列番号9に示し、Occludinのリバースプライマーの配列を配列番号10に示し、ZO-1のフォワードプライマーの配列を配列番号11に示し、ZO-1のリバースプライマーの配列を配列番号12に示し、LAT1のフォワードプライマーの配列を配列番号13に示し、LAT1のリバースプライマーの配列を配列番号14に示し、HPRT1のフォワードプライマーの配列を配列番号15に示し、HPRT1のリバースプライマーの配列を配列番号16に示し、PECAM1のフォワードプライマーの配列を配列番号17に示し、PECAM1のリバースプライマーの配列を配列番号18に示す。

[0103] (14) iEPCsと不死化細胞とにおける分化誘導条件の違いによる電気抵抗値の比較

iEPCsと不死化細胞とのTEER値を比較検討した。上記の分化誘導条件Aを用いて上記方法により凍結iEPCsから分化誘導されたiBMELCsおよびhCMEC/D3—分化誘導有り（播種後4日目）と、比較例として、Fibronectin 100 μ g/mLとcollagen type IV 400 μ g/mLとを含むコーティング剤と、7.5% KSRと20 ng/mL FGF2とを添加したHE-SFM培地を用いて培養したiEPCsおよびhCMEC/D3—分化誘導無し（播種後4日目）とを用いた。サンプル数は、それぞれ3とした。TEER値の測定は上記のとおり行い、最大TEER値を比較した。

[0104] (15) P-gpの機能解析

上記の分化誘導条件Aを用いて上記方法により凍結iEPCsから分化誘導されたiBMELCs（播種後4日目）に対して、排出トランスポーターとしてのP糖タン

パク質 (P-gp) の機能解析のために、基質取り込み試験を行なった。基質取り込み試験には、Transwell (登録商標) (12-well, pore size: $1\mu\text{m}$) 上の細胞を用いた。基質としては、rhodamine 123を用いた。培地を除去し、トランスポートバッファー中にて 37°C で15分間プレインキュベートした。なお、サンプル数は3とした。P-gpの阻害剤である $10\mu\text{M}$ シクロスポリンA (CsA)の存在下または非存在下で、 $10\mu\text{M}$ rhodamine 123を含有するトランスポートバッファー中にて 37°C で60分間インキュベートした。その後、細胞をPBSで三回洗浄し、5 w/v% Triton X-100含有 PBSで溶解し、rhodamine 123の蛍光強度を、Synergy HTXマルチモードプレートリーダーで測定し、Gen5データ分析ソフトウェアで解析した。

[0105] 2. 結果・考察

(1) iEPCs の性状確認結果

図2は、分化14日目のiEPCsの性状確認の結果を示す説明図である。図2において、紙面左側の画像は、免疫染色法によるタンパク質発現解析の結果を示しており、紙面右側の画像は、アセチル化LDL取り込み試験の結果を示している。いずれの画像においても、 $100\mu\text{m}$ のスケールバーが示されている。図2に示す結果から、血管内皮前駆細胞マーカーであるPECAM1およびCD34が発現していることを確認でき、また、血管内皮前駆細胞の機能の一つであるアセチル化LDLの取込機能を細胞が有していることがわかった。すなわち、上記方法にて分化および純化された細胞が、血管内皮前駆細胞の性状を有していることがわかった。

[0106] (2) iEPCsの凍結保存の影響確認結果

図3は、非凍結iEPCsおよび凍結iEPCsの電気抵抗値を比較して示す説明図である。図3において、縦軸は、非凍結群の最大TEER値を基準として1.0とした場合の相対最大TEER値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) を示している。図3に示す結果から、非凍結群と凍結群との最大TEER値に有意差はなく、凍結iEPCsが非凍結iEPCsと同等のバリア機能を有することがわかった。したがって、hiPSCsから分化誘導されたiEPCsを凍結保存してiEPCsストックを作成し、そのiEPCsストックを

iBMELCsの調製に利用できることがわかった。

[0107] (3) iEPCsからiBMELCsへの分化誘導条件の検討結果

図4～10は、iEPCsからiBMELCsへの分化誘導条件の検討結果を示す説明図である。分化誘導条件として、図4では培地成分の種類、図5では培地成分の濃度、図6ではA 83-01の濃度、図7および図8ではコーティング成分種、図9ではLN511Fの濃度、図10では細胞数の検討結果を示している。図4～図6、図8～図10における縦軸は、最大TEER値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) を示し、図7における縦軸はcontrol (FBNとCOL4との2成分のみ) の最大TEER値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) を基準として1.0とした場合の各サンプルの相対最大TEER値を示している。

[0108] 図4では、FBNとCOL4との2成分をコーティング剤とし、FGF2を20 ng/mL添加したHE-SFM培地にKSR、FBS、PDSまたはB27sを各5%添加した検討結果を示している。図4に示す結果から、B27sを培地に添加して分化誘導することにより、iBMELCsのバリア機能を特に向上できることがわかった。

[0109] 図5では、FBNとCOL4との2成分をコーティング剤とし、FGF2を20 ng/mL添加したHE-SFM培地にKSRまたはB27sを2～10%添加した検討結果を示している。図5に示す結果から、培地におけるB27sの含有量が増えるほどiBMELCsのバリア機能が向上し、含有量7.5%の場合には、含有量10%の場合と同等の高いバリア機能を示すことがわかった。また、いずれの含有量においても、B27sの添加によって、KSRの添加よりもiBMELCsのバリア機能が向上することがわかった。

[0110] 図6では、FBNとCOL4との2成分をコーティング剤とし、FGF2を20 ng/mL、B27sを7.5%添加したHE-SFM培地に、A 83-01を0.1 μM 、1 μM または10 μM 添加した検討結果を示している。図6に示す結果から、A 83-01を添加した場合には、A 83-01を添加しなかった場合と比較してiBMELCsのバリア機能が向上することがわかった。また、A 83-01の含有量1 μM の場合には、含有量10 μM の場合と同等の高いバリア機能を示すことがわかった。

[0111] 図7では、コーティング剤として、FBNとCOL4との2成分に各種成分 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を加えた検討結果 (サンプル数: 1) を示している。なお、培地として、7.

5% B27s、1 μ M A 83-01および20 ng/mL FGF2を添加したHE-SFMを用いた。図7に示す結果から、コーティング剤にLN511Fを加えることにより、iBMELCsのバリア機能を特に向上できることがわかった。

[0112] 図8では、コーティング剤として、FBNとCOL4との2成分に、各種成分 10 μ g/mLを加えた検討結果を示している。なお、培地として、7.5% B27s、1 μ M A 83-01および20 ng/mL FGF2を添加したHE-SFMを用いた。図8に示す結果から、コーティング剤にLN511Fを加えることにより、iBMELCsのバリア機能を特に向上できることがわかった。

[0113] 図9では、コーティング剤として、FBNとCOL4との2成分に、LN511Fを10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mLまたは200 μ g/mL加えた検討結果を示している。また、FBNとCOL4との2成分にLN411FとLN511Fとを100 μ g/mLずつ加えた検討結果も示している。なお、培地として、7.5% B27s、1 μ M A 83-01および20 ng/mL FGF2を添加したHE-SFMを用いた。図9に示す結果から、コーティング剤においてLN511Fを10 μ g/mL含有することにより、含有量200 μ g/mLの場合と同等の高いバリア機能を示すことがわかった。また、FBNとCOL4との2成分にLN411FとLN511Fとを併用したコーティング層を用いた場合よりも、FBNとCOL4との2成分にLN511Fのみを添加したコーティング層を用いた場合の方が、iBMELCsのバリア機能を効果的に向上できることがわかった。

[0114] 図10では、上記分化誘導条件Aのもと、iEPCsの細胞数を互いに異ならせて播種した検討結果を示している。図10に示す結果によれば、細胞数が1 $\times 10^5$ cells/wellの場合に最大TEER値が最も高かったことから、細胞密度を低く設定することによってiBMELCsのバリア機能をより向上できることがわかった。

[0115] 図11は、各分化誘導条件におけるTEER値の経時的变化を示す説明図である。図11において、縦軸は、TEER値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) を示しており、横軸は、播種後の経過日数を示している。図11において用いた4つの分化誘導条件では、FBNとCOL4との2成分を含むコーティング剤と20 ng/mLのFGF2を含有するHE-SFM培地とが共通条件であり、サンプル「KSR」では培地にさらに7.5% KSRを

含有し、サンプル「B27」では培地にさらに7.5% B27sを含有し、サンプル「B27+A 83-01」では培地にさらに7.5% B27sと1 μ M A 83-01とを含有し、サンプル「B27+A 83-01+LN511F」では培地にさらに7.5% B27sと1 μ M A 83-01とを、コーティング剤にさらに10 μ g/mL LN511Fを含有している。図11に示す結果から、LN511Fを含有するコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsは、LN511Fを含有しないコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsよりも、長期に亘って高いTEER値を示すことがわかった。すなわち、LN511Fを含有するコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsは、LN511Fを含有しないコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsよりも、長期的に高いバリア機能を有することがわかった。

[0116] (4) 透過性試験結果

図12は、各分化誘導条件におけるFD4およびLYの透過試験の結果を示す説明図である。図12において、縦軸は、透過係数 P_{app} (10^{-6} cm / sec) を示している。図12において用いた4つの分化誘導条件は、TEER値の経時的变化の解析において用いた分化誘導条件と同じである。図12に示す結果から、傍細胞経路による透過の指標となるFD4とLYとのいずれを透過対象とした場合においても、LN511Fを含有するコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsは、LN511Fを含有しないコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsよりも、低い透過係数を示すことがわかった。すなわち、LN511Fを含有するコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsは、LN511Fを含有しないコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsよりも、高いバリア機能を有することがわかった。

[0117] TEER値の測定結果と透過試験との結果から、FBNおよびCOL4に加えてLN511Fを含有するコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsは、LN511Fを含有しないコーティング剤を用いて分化誘導したiBMELCsと比較して、高いバリア機能を持つことが示唆された。したがって、iEPCsを、LN511FとFBNとCOL4とを用いて培養する培養工程を含む製造方法により製造されたiBMELCsは、ヒトBBBのモデルとして有用であることがわかった。また、B27sを含有する培地を用

いて分化誘導することにより、B27sを含有しない培地を用いて分化誘導した場合よりも、iBMECsのバリア機能をより向上できることがわかった。さらに、培地にA 83-01を添加した場合には、培地にA 83-01を添加しない場合よりもiBMECsのバリア機能をさらに向上できることがわかった。

[0118] (5) 脳毛細血管内皮細胞マーカータンパク質の発現解析結果

図13は、免疫染色によるタンパク質発現解析結果と、Operetta High-Content Imaging Systemによるタンパク質発現量の解析結果とを示す説明図である。図13の紙面上側は、50 μ mのスケールバーとともに、各BMECsマーカーに対する免疫蛍光染色法によって得られた画像を示しており、図13の紙面下側は、相対タンパク質発現量を示している。相対タンパク質発現量は、比較例の細胞(図13において「iEPCs」と記載)におけるタンパク質発現量を基準として1.0とした場合の相対値として示している。免疫染色によるタンパク質発現解析結果から、以下のことがわかった。すなわち、血管内皮細胞マーカーとして代表的なPECAM1およびCDH5が、iBMECsの細胞膜上に局在しているため、iBMECsが血管内皮細胞としての性質を有していることが示唆された。また、iBMECsは、比較例の細胞と比較して、タイトジャンクションマーカーのZO-1およびCLAUDIN5、薬物排出トランスポーターマーカーのP-gpおよびBCRP、グルコーストランスポーターマーカーのGLUT1等のBMECsマーカーの発現量が上昇した。したがって、上記の分化誘導方法により製造されたiBMECsは、脳毛細血管内皮細胞としての特徴を強く有することが示唆された。

[0119] (6) 脳毛細血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現解析結果

図14は、RT-q PCR法による遺伝子発現解析の結果を示す説明図である。図14の縦軸は、ヒト初代BMECs (hBMECs) におけるmRNA発現量を基準として100とした場合の相対mRNA発現量を示している。図14に示す結果から、iBMECsは、PECAM1、CDH5、ZO-1、OCCLUDIN、BCRPの各BMECsマーカーについて、Lippmannらの報告を改変した方法により分化誘導された細胞(iBMECs 2)やhBMECs、ヒト不死化BMECs (hCMEC/D3) よりも優位に高い発現量を示すことがわかった。また、iBMECsは、GLUT1について、hBMECsおよびhCMEC/D3よりも

優位に高い発現量を示すとともに、iBMELCs 2と同等の発現量を示した。また、iBMELCsは、P-gpについても、hBMELCsと同等に発現することが確認できた。

[0120] タンパク質発現解析および遺伝子発現解析の結果から、上記の分化誘導方法により製造されたiBMELCsは、脳毛細血管内皮細胞としての性質を有するとともに、生体内のBMELCsに対する模倣性が高いことが示唆された。したがって、上記の分化誘導方法により製造されたiBMELCsは、生体内のBMELCsに類似した性質を示すことにより、ヒトBBBのモデルとして有用であることがわかった。

[0121] (7) iEPCsと不死化細胞とにおける分化誘導条件の違いによる電気抵抗値の比較結果

図15は、iEPCsと不死化細胞とにおける電気抵抗値を比較して示す説明図である。図15における縦軸は、最大TEER値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) を示しており、「+」は、上記の分化誘導条件Aを用いて分化誘導したサンプルを示しており、「-」は、比較例として、分化誘導条件Aとは異なる上述の条件により培養したサンプルであることを示している。図15に示す結果から、iPS細胞と不死化細胞とのいずれを用いた場合においても、分化誘導条件Aを用いて上記方法により分化誘導した細胞では高いTEER値を示すことがわかった。すなわち、iPS細胞由来と不死化細胞由来とのいずれの場合においても、上記の培養方法により分化誘導を行うことにより、脳毛細血管内皮細胞を模倣したバリア機能を有する脳毛細血管内皮様細胞を製造できることが示された。また、図15に示す結果から、iPS細胞を用いて分化誘導を行うことにより、不死化細胞を用いて分化誘導を行った場合と比較して、より高いバリア機能を有するiBMELCsを製造できることが示された。

[0122] (8) P-gpの機能解析結果

図16は、P糖タンパク質 (P-gp) の機能解析の結果を示す説明図である。図9および図16において、縦軸は、シクロスポリンの非存在下における基質蓄積量を基準として1.0とした場合の相対的基質蓄積量を示しており、「-」は、シクロスポリン非存在下のサンプルを示し、「+」は、シクロスポリ

ン存在下のサンプルを示している。図16に示す結果から、上記方法により分化誘導されたiBMELCsは、排出トランスポーターに対する阻害剤であるシクロスポリンの存在下において、かかる阻害剤の非存在下と比較して基質の蓄積量が多くなることが確認できた。したがって、上記方法により分化誘導されたiBMELCsは、P-gpの機能を有することがわかった。

[0123] 3. まとめ

以上の結果より、上記方法を用いて分化誘導を行うことにより、血管内皮細胞としての性質を有し、生体内の脳毛細血管内皮細胞に対する模倣性（類似性）を向上させた脳毛細血管内皮様細胞を製造できることがわかった。

[0124] 4. iEPCsとiBPCとの共培養

図17は、iEPCsとiBPCとの共培養の概要を説明するための説明図である。図17では、ヒトiPS細胞（hiPSCs）をヒトiPS細胞由来脳ペリサイト（以下、「iBPC」とも呼ぶ）へと分化誘導し、そのiBPCと上述のiEPCsとを共培養する方法の概要が模式的に示されている。後述するように、セルカルチャーインサートの裏面の膜上にiBPCを播種した後、分化誘導8日目に培地にA 83-01を加え、ペリサイト分化培地にて培養を行った。その後、分化誘導12日目にセルカルチャーインサートの表側にiEPCsを播種して、BMECs分化培地にて共培養した。分化誘導13日目から19日目まで、すなわち共培養1日目から7日目まで、TEER値を測定して解析することにより、バリア機能を評価した。

[0125] (1) 材料等

iBPCに分化誘導させるためのhiPSCとしては、802-3G株（株式会社リプロセルより入手）を用いた。このhiPSCを維持培養する際のMatrigel GFRコーティングは、氷上でMatrigel GFR（Corning Incorporated製）をヒトiPS細胞の維持培地で30倍希釈し、その後、37℃で30分以上静置して作製した。このhiPSCを、VTN-Nをコートした培養dish上で、mTeSR plus medium（StemCell Technologies製）を培地として用いて培養を行った。802-3G株の継代時の剥離液には、0.5M EDTA（pH 8.0）またはTrypLE Select（Thermo Fisher Scientific製）を用いた。剥離にTrypLE Selectを用いた場合、継代直後にY-27632を10

μM 添加して翌日培地交換した。なお、上記培養dishへのVTN-Nコーティングは、VTN-N (Thermo Fisher Scientific製) を $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるようにD-PBS (-) で希釈し、その後、 37°C で1~2時間静置して作製した。

[0126] (2) 共培養の方法

後述する方法によってhiPSCから分化4日目まで分化誘導させたiBPCを用いた。培養dishのコーティングとして、セルカルチャーインサート内部 (apical) 側の膜上には、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のFibronectin、 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ のcollagen type IV、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のLN511F の3成分を用いた。培養dishのコーティングとして、セルカルチャーインサート外部 (basal) 側の膜上には、 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のVTN-Nを用いた。 10 cm 培養皿の上にセルカルチャーインサートを裏返した状態で静置し、その後、iBPC (分化4日目) を $1.2\times 10^4\text{ cells}/\text{cm}^2$ にて膜上に播種し、EGM-2に $10\mu\text{M}$ のY-27632と $50\text{ ng}/\text{mL}$ のPDGF-BBと $1\mu\text{M}$ のA 83-01とを添加した培地にて2時間培養を行った。その後、iBPCを播種したセルカルチャーインサートを12 wellコンパニオンプレートに設置し、apical側に $600\mu\text{L}$ 、basal側に $1800\mu\text{L}$ のEGM-2に、 $10\mu\text{M}$ のY-27632と $50\text{ ng}/\text{mL}$ のPDGF-BBとを添加した培地にて培養を行った。分化5日目からは、EGM-2に $50\text{ ng}/\text{mL}$ のPDGF-BBを添加した培地にて培養を行い、分化8日目からは、EGM-2に $50\text{ ng}/\text{mL}$ のPDGF-BBと $1\mu\text{M}$ A 83-01とを添加した培地にて培養を行った。この間毎日培地交換した。分化12日目に凍結iEPCs (分化14日目) を $1\times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ にてapical側に播種し、HE-SFMに7.5% B27 supplementと $1\mu\text{M}$ のA 83-01と $20\text{ ng}/\text{mL}$ のFGF2とを添加した培地で分化19日目まで培養し、脳毛細血管様細胞へと分化誘導した。この間毎日培地交換した。

[0127] (3) 共培養の有無の違いによるiBMELCsにおける経内皮電気抵抗値の解析

上記方法により凍結iEPCsおよびiBPCを共培養した条件下で分化誘導されたiBMELCsに対して、TEER値を解析することによりバリア機能を評価した。解析には、Two-way Repeated-Measures ANOVAを用いた。また、上記方法により凍結iEPCsを単独で培養した場合におけるiBMELCsに対しても、同様にTEER値を測定した。サンプル数は、それぞれ3とした。TEER値は、Millicell ERS-2 (

チョップスティック型) を使用し、添付マニュアルに従い測定した。培地の液量は、頂端側で600 μ L、基底側で1800 μ Lとした。

[0128] 図18は、共培養の有無の違いによるiBMELCsにおけるTEER値の経時的変化を示す説明図である。図18において、縦軸は、TEER値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) を示しており、横軸は、共培養後の経過日数(共培養せずにiEPCs単独培養の場合は、共培養の場合と対応する日数)を示している。図18では、iBPCと共培養したサンプルを「EPC+PC」と示し、iBPCと共培養せずにiEPCs単独で培養したサンプルを「EPC」と示している。

[0129] 図18に示す結果から、以下のことが示された。iEPCsを培養する工程において、iBPCと共培養したiBMELCsのTEER値は、iEPCs単独で培養して得られたiBMELCsのTEER値と比較して、2要因以上の反復測定分散分析により1%水準で有意差が認められ、経時的にTEER値が上昇することが示された。したがって、iBPCとの共培養により、iBMELCsのタイトジャンクション機能をより向上できることが分かった。

[0130] 5. iBPCへの分化誘導に及ぼすA 83-01の影響

hiPSCからiBPCへの分化誘導に及ぼすA 83-01の影響を調べた。

[0131] (1) 分化誘導

上述のhiPSCを用いてiBPCへの分化誘導を行った。mTeSR plus medium中に培養されたヒトiPS細胞を、TrypLE Selectで剥離した後、 2×10^4 cells/cm²の密度で、VTN-Nコート培養dish上に播種し、Y-27632 (Focus Biomolecules製) を10 μ M含むmTeSR plus mediumで24時間培養した。その後、modified DMEM/F12 (0.1% chemically defined lipid concentrate、0.1 \times insulin-transferrin-selenium (Thermo Fisher Scientific製)、2 mM GlutaMAX (Sigma-Aldrich製)、450 mM 1-thioglycerol (Sigma-Aldrich製)、50 μ g/mL of L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrateおよび1 \times penicillin-streptomycin solutionを含むDMEM/F12) に5 μ MのCHIR-99021 (Focus Biomolecules製) を添加した培地で1日培養した。その後、modified DMEM/F12に、50 ng/mLのFGF2を添加した培地で1日培養した。その後、EGM-2 (2% FBS、0.2 μ g/

mL Hydrocortisone、10 ng/mL FGF2、20 ng/mL R3-IGF-1、1 μ g/mL Ascorbic acid、5 ng/mL hEGF、Gentamicin、amphotericinBを含むEGM-2 basal medium) に50 ng/mL PDGF-BBおよび0.5 ng/mL VEGFを添加した培地で2日間培養した。この間毎日培地交換を行った。4日目に、10 μ M Y-27632にて1時間処理した細胞をTrypLE Selectで解離させた後、 1.25×10^4 cells/cm²で新しいVTN-Nコート培養dishに継代し、EGM-2培地に50 ng/mLのPDGF-BBを添加した培地にて分化誘導を行った。この間毎日培地交換した。8日目に、EGM-2に50 ng/mLのPDGF-BB、1 μ MのA 83-01を添加した培地にて分化誘導を行った。この間毎日培地交換した。以下の説明では、培地にA 83-01を添加して分化誘導されたiBPCsを、「X (+)」とも記載し、培地にA 83-01を添加せずに分化誘導されたiBPCsを、「X (-)」とも記載する。

[0132] (2) 免疫染色解析

上記の方法によりhiPSCsから分化誘導されたiBPC (X (+) およびX (-)) に対し、BPCとしての性状を確認するために、免疫染色法による解析を行った。この免疫染色における抗体には、PDGFR- β 、NG2および α -SMAを用いた。96-wellプレート上の細胞を、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄後、4% paraformaldehyde中で15分間固定し、その後、再度0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄した後、0.1w/v% Triton X-100含有D-PBS (-) にて5分間透過処理を行った。続いて、0.1% BSA含有D-PBS (-) で洗浄した後、一次抗体を4°Cで1晩反応させた。その後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄した後に、室温で二次抗体 (Anti-Rabbit) を200倍希釈で60分間反応させた。その後、0.1% BSA含有D-PBS (-) で3回洗浄し、核染色試薬である1 μ g/mLのDAPI (Dojindo製) を5分間反応させた。その後、D-PBS (-) で3回洗浄した後に、Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer製) にて解析した。免疫染色において用いた抗体の詳細を、表2に示す。なお、表2において、「Target」は抗体名を示し、「Source」は抗体の製造会社名を示し、「Catalog number」は抗体のカタログナンバーを示し、「Species」は抗体の由来を示し、「Dilution」は体積換算における希釈率を示す。

[0133] [表2]

Table 2

Target	Source	Catalog number	Species	Dilution
PDGFR- β	Abcam	ab32570	Rabbit	1 : 100
NG2	Sigma-Aldrich	AB5320	Rabbit	1 : 100
α -SMA	Abcam	ab5694	Rabbit	1 : 100
Anti-rabbit (Alexa Fluor 488)	Thermo Fisher Scientific	A-21206	Donkey	1 : 200

[0134] (3) 脳ペリサイトマーカー遺伝子発現量の解析

脳ペリサイトマーカー遺伝子発現量の解析をRT-q PCRにて行った。サンプルとして、上記の方法においてA 83-01を添加して分化誘導された分化12日目のiBPCs (X (+))、上記の方法においてA 83-01を添加せずに分化誘導された分化12日目のiBPCs (X (-))、ヒト初代ペリサイト (以下、「hPC」とも記載する) を用いた。サンプル数は、いずれも3とした。RNA抽出は、Agencourt (登録商標) RNAdvance Tissue Kit (Beckman Coulter, Inc. 製) の添付マニュアルに従い行った。逆転写反応として、相補的 DNA (cDNA) の合成を、ReverTra Ace (登録商標) qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Ltd. 製) を使用し、装置の添付マニュアルに従い行なった。RT-q PCRには、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics Co., Ltd. 製) を用い、cDNAを鋳型にして、反応は装置の添付マニュアルに従い行なった。得られた結果を、内在性コントロールとしてHPRT1を用いて補正した。hPCにおけるmRNAの発現量を基準として1とし、X (+)、X (-) におけるmRNAの相対的発現量を求めた。解析には、One-way ANOVAおよびTukey' s testを用いた。

[0135] RT-q PCRにおいて用いたプライマーとして、PDGFR- β のフォワードプライマーの配列を配列番号19に示し、PDGFR- β のリバースプライマーの配列を配列番号20に示し、NG2のフォワードプライマーの配列を配列番号21に示し、NG2のリバースプライマーの配列を配列番号22に示し、 α -SMAのフォワードプラ

イマーの配列を配列番号23に示し、 α -SMAのリバースプライマーの配列を配列番号24に示し、HPRT1のフォワードプライマーの配列を配列番号15に示し、HPRT1のリバースプライマーの配列を配列番号16に示す。

[0136] (4) 細胞遊走能・増殖能の解析

サンプルとして、上記の方法においてA 83-01を添加して分化誘導されたiBPCs (X (+)) と、上記の方法においてA 83-01を添加せずに分化誘導されたiBPCs (X (-)) とを用いた。サンプル数は、いずれも1とした。上記の方法により6-well プレート上で分化誘導されたiBPC (分化12日目) に、10 μ Lピペットチップを用いて縦に傷をつけた。その後、EGM-2に50 ng/mLのPDGF-BBを添加した培地を用いて培養を行った。その培養の際に、A 83-01を添加して分化誘導されたiBPCs (X (+)) の培地には、0.1~10 μ MのA 83-01をさらに添加し、A 83-01を添加せずに分化誘導されたiBPCs (X (-)) の培地には、A 83-01を添加しなかった。細胞損傷後における培養0、12、24時間後の細胞遊走の様子を明視野観察にて確認し、Image Jにて、損傷面積の算出を行った。

[0137] (5) 結果・考察

図19は、脳ペリサイトマーカータンパク質の免疫染色の結果を示す説明図である。図19では、A 83-01を添加せずに分化誘導されたiBPCs (X (-)) について、分化8日目と分化12日目における免疫染色の結果が示されている。いずれの画像においても、100 μ mのスケールバーが示されている。図19に示す結果によれば、分化8日目と分化12日目において、経時的にPDGFR- β 、NG2、 α -SMAのタンパク質発現が強くなっていることが分かった。なお、生体内の脳ペリサイトでは、 α -SMAの発現が弱いことが知られている。

[0138] 図20は、脳ペリサイトマーカー遺伝子発現量の解析結果を示す説明図である。図20の縦軸は、ヒト初代ペリサイトにおけるmRNAの発現量を基準として1とした場合の相対mRNA発現量を示している。図20において、「*」は、1元配置分散分析において多重比較 (Tukey' s test) により5%水準で有意差が認められたことを示し、「**」は、1元配置分散分析において多重

比較 (Tukey' s test) により 1%水準で有意差が認められたことを示し、「***」は、1元配置分散分析において多重比較 (Tukey' s test) により 0.1%水準で有意差が認められたことを示す。図 20 に示す結果から、以下のことがわかった。すなわち、iBPCへと分化誘導する培地に A 83-01 を加えることによって、ヒト初代ペリサイトと同程度まで、 α -SMA の遺伝子発現を抑制できることが分かった。

[0139] 図 21 は、脳ペリサイトマーカータンパク質の免疫染色の結果を示す説明図である。図 21 では、各マーカーに対する免疫蛍光染色によって得られた画像が、100 μ m のスケールバーとともに示されている。

[0140] 図 22 は、脳ペリサイトマーカータンパク質の発現解析結果を示す説明図である。図 22 では、Operetta High-Content Imaging System による各マーカータンパク質の発現量の解析結果が示されている。図 22 の縦軸は、A 83-01 を添加せずに分化誘導された iBPCs (X (-)) におけるマーカータンパク質の平均蛍光強度を基準として 1 とした場合の平均蛍光強度の相対値を示している。図 22 において、「*」は、Student' s t-test において 5%水準で有意差が認められたことを示し、「**」は、Student' s t-test において 1%水準で有意差が認められたことを示す。

[0141] 図 21 および図 22 に示す結果から、以下のことがわかった。すなわち、iBPCへと分化誘導する培地に A 83-01 を加えることによって、 α -SMA のタンパク質発現を抑制できることがわかった。また、A 83-01 の添加は、PDGFR- β や NG2 の発現には大きな影響を及ぼさなかった。したがって、図 20 ~ 図 22 に示す結果によれば、A 83-01 を含む培地を用いて多能性幹細胞から脳ペリサイトへと分化誘導することにより、生体内の脳ペリサイトに対する模倣性 (類似性) を向上できることが示された。

[0142] 図 23 は、iBPC の細胞遊走能・増殖能を示す顕微鏡画像である。図 23 における双方向矢印は、細胞損傷部分の距離、換言すると、細胞が存在しない範囲を示している。

また、いずれの画像においても、100 μ m のスケールバーが示されている。図

23に示される画像では、図示の便宜上、細胞損傷時（細胞損傷後における培養0時間後）における細胞損傷部分の境界を太線で示し、その後の培養によって推移した細胞の境界を細線で示している。図24は、iBPCの細胞遊走能・増殖能を示す説明図である。図24の縦軸は、細胞損傷部分の距離を、細胞損傷時（細胞損傷後における培養0時間後）を基準として1とした場合の相対値を示している。

[0143] 図23および図24に示す結果から、以下のことがわかった。A83-01を添加して分化誘導されたiBPCs（X（+））では、A83-01を添加せずに分化誘導されたiBPCs（X（-））と比較して、細胞損傷後の培養時間の経過に伴って損傷部分の距離が縮まった。特に、細胞損傷後24時間後には、その距離がゼロとなっていた。このように、iBPCへと分化誘導する培地にA83-01を加えることによって、iBPCの細胞遊走能や増殖能を向上できることがわかった。したがって、A83-01を含む培地を用いて多能性幹細胞から脳ペリサイトへと分化誘導することにより、生体内の脳ペリサイトに対する模倣性（類似性）を向上できることが示された。

産業上の利用可能性

[0144] 本開示によれば、生体内の脳毛細血管内皮細胞に対する模倣性を向上させた脳毛細血管内皮様細胞を製造できる。また、本開示によれば、凍結細胞の血管内皮前駆細胞を分化源として利用できるため、脳毛細血管内皮様細胞を容易に製造できる。このため、脳毛細血管内皮様細胞を安定供給することができるので、製薬企業や研究機関に向けた脳毛細血管内皮様細胞の供給体制の確立に寄与できる。また、本開示を利用して構築されたBBBモデルは、例えば、医薬品の有効性／安全性等の評価系に利用され得る。

[0145] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報等の内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

配列表フリーテキスト

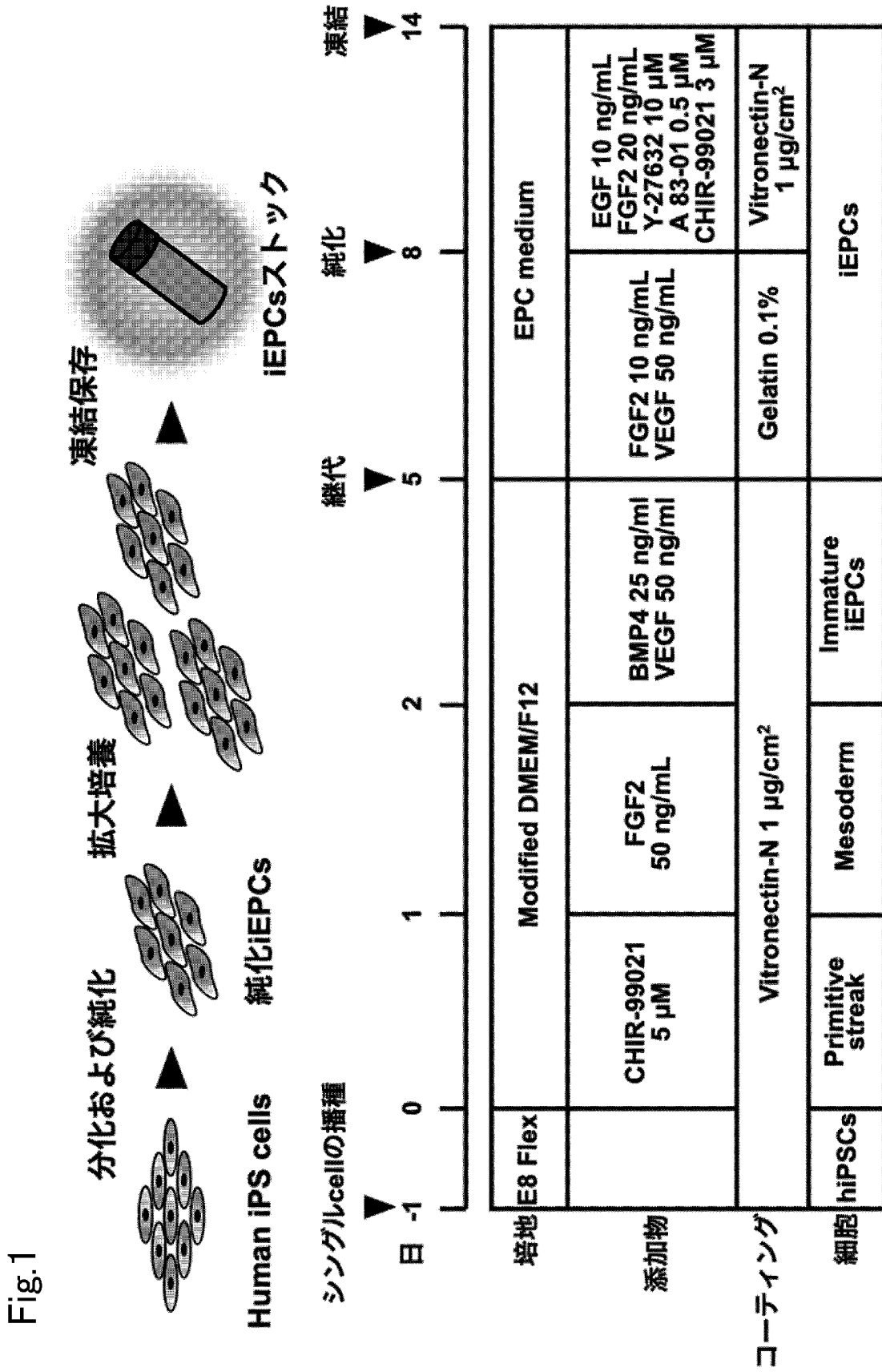
- [0146] 配列番号 1 : 人工配列の説明 : CDH5 フォワードプライマー
配列番号 2 : 人工配列の説明 : CDH5 リバースプライマー
配列番号 3 : 人工配列の説明 : MDR1 フォワードプライマー
配列番号 4 : 人工配列の説明 : MDR1 リバースプライマー
配列番号 5 : 人工配列の説明 : BCRP フォワードプライマー
配列番号 6 : 人工配列の説明 : BCRP リバースプライマー
配列番号 7 : 人工配列の説明 : GLUT1 フォワードプライマー
配列番号 8 : 人工配列の説明 : GLUT1 リバースプライマー
配列番号 9 : 人工配列の説明 : Occludin フォワードプライマー
配列番号 10 : 人工配列の説明 : Occludin リバースプライマー
配列番号 11 : 人工配列の説明 : ZO-1 フォワードプライマー
配列番号 12 : 人工配列の説明 : ZO-1 リバースプライマー
配列番号 13 : 人工配列の説明 : LAT1 フォワードプライマー
配列番号 14 : 人工配列の説明 : LAT1 リバースプライマー
配列番号 15 : 人工配列の説明 : HPRT1 フォワードプライマー
配列番号 16 : 人工配列の説明 : HPRT1 リバースプライマー
配列番号 17 : 人工配列の説明 : PECAM1 フォワードプライマー
配列番号 18 : 人工配列の説明 : PECAM1 リバースプライマー
配列番号 19 : 人工配列の説明 : PDGFR- β フォワードプライマー
配列番号 20 : 人工配列の説明 : PDGFR- β リバースプライマー
配列番号 21 : 人工配列の説明 : NG2 フォワードプライマー
配列番号 22 : 人工配列の説明 : NG2 リバースプライマー
配列番号 23 : 人工配列の説明 : α -SMA フォワードプライマー
配列番号 24 : 人工配列の説明 : α -SMA リバースプライマー

請求の範囲

- [請求項1] 脳毛細血管内皮様細胞の製造方法であって、
Laminin511断片と、Fibronectinと、collagen type IVと、を用いて血管内皮前駆細胞を培養する培養工程を含む、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の製造方法において、
前記培養工程では、B27（登録商標）supplementと、A83-01と、Fibroblast Growth Factor-2（FGF2）と、を含む培地を用いて培養する、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。
- [請求項3] 請求項1または請求項2に記載の製造方法において、
前記血管内皮前駆細胞は、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。
- [請求項4] 請求項3に記載の製造方法において、
前記血管内皮前駆細胞は、ヒト人工多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。
- [請求項5] 請求項3または請求項4に記載の製造方法において、
前記血管内皮前駆細胞は、血管内皮増殖因子を用いて分化誘導された細胞である、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。
- [請求項6] 請求項1から請求項5までのいずれか一項に記載の製造方法において、
前記培養工程では、前記血管内皮前駆細胞を脳ペリサイトと共培養する、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。

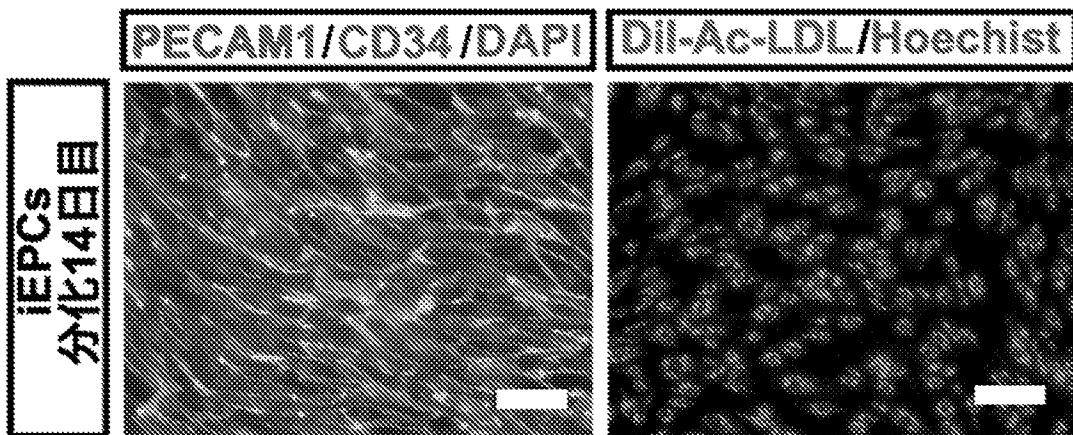
- [請求項7] 請求項6に記載の製造方法において、
前記脳ペリサイトは、A 83-01を含む培地を用いて多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、
脳毛細血管内皮様細胞の製造方法。
- [請求項8] 請求項1から請求項7までのいずれか一項に記載の製造方法により得られた脳毛細血管内皮様細胞の細胞層を用いて、被検物質の血液脳関門透過性を評価する方法。
- [請求項9] 請求項8に記載の方法において、以下の工程(i)～(iii)を含む、方法：
(i) 前記細胞層を用意する工程；
(ii) 前記細胞層に前記被検物質を接触させる工程；
(iii) 前記細胞層を透過した前記被検物質を定量することにより、前記被検物質の血液脳関門透過性を評価する工程。
- [請求項10] 請求項1から請求項7までのいずれか一項に記載の製造方法により得られた脳毛細血管内皮様細胞の細胞層を用いて、被検物質の血液脳関門バリア機能への影響を評価する方法。
- [請求項11] 請求項1から請求項7までのいずれか一項に記載の製造方法で得られた、脳毛細血管内皮様細胞。
- [請求項12] 請求項11に記載の脳毛細血管内皮様細胞において、
PECAM1の発現量が、初代培養脳毛細血管内皮細胞および不死化脳毛細血管内皮細胞よりも大きく、
TEER値が、 $50\Omega \times \text{cm}^2$ 以上である、
脳毛細血管内皮様細胞。
- [請求項13] 脳毛細血管内皮様細胞の分化誘導方法であって、
Laminin511断片と、Fibronectinと、collagen type IVと、を用いて血管内皮前駆細胞を培養する培養工程を含む、
脳毛細血管内皮様細胞の分化誘導方法。

[図1]



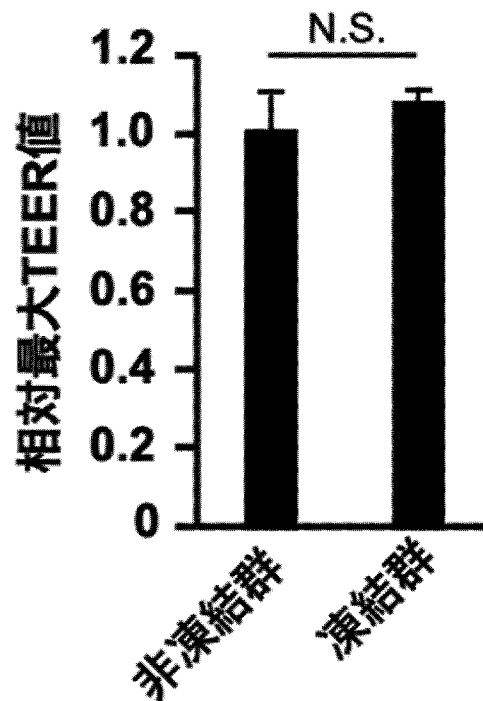
[図2]

Fig.2



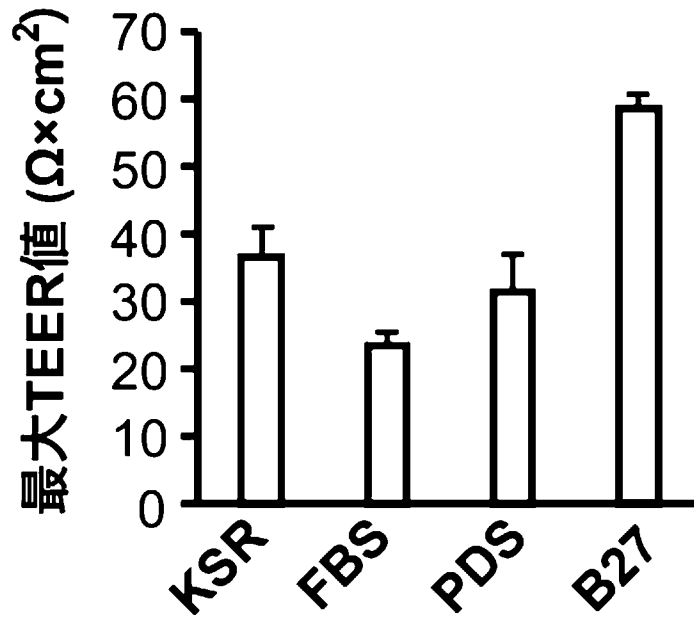
[図3]

Fig.3



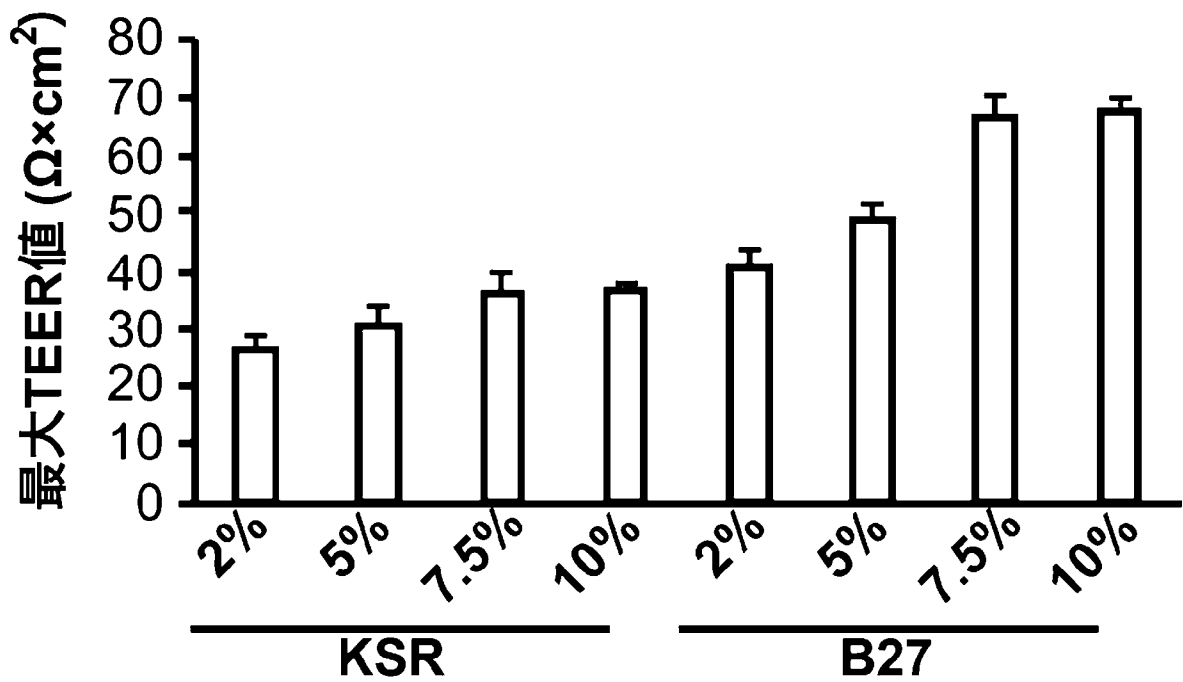
[圖4]

Fig.4



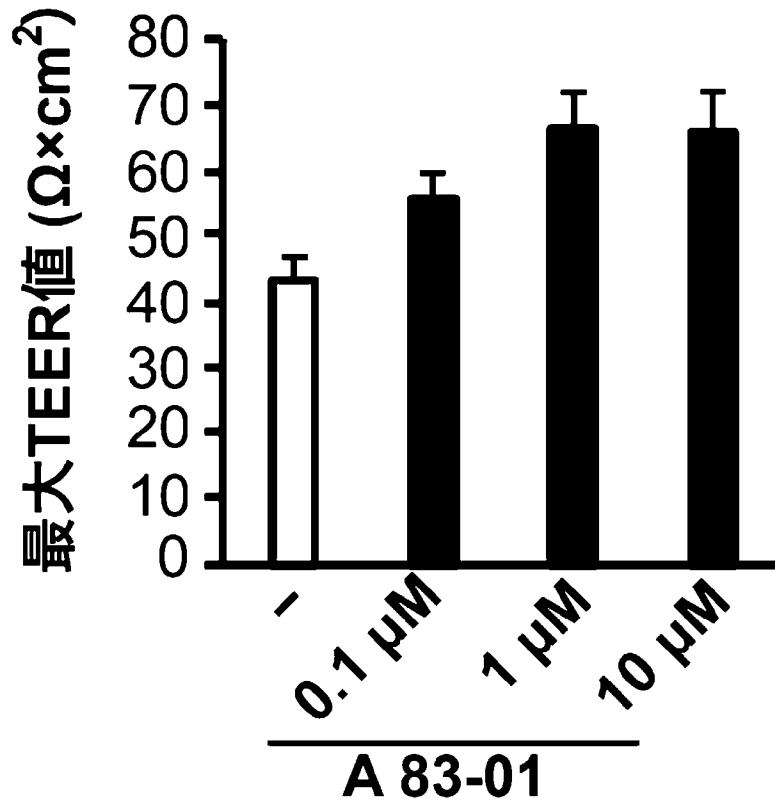
[圖5]

Fig.5



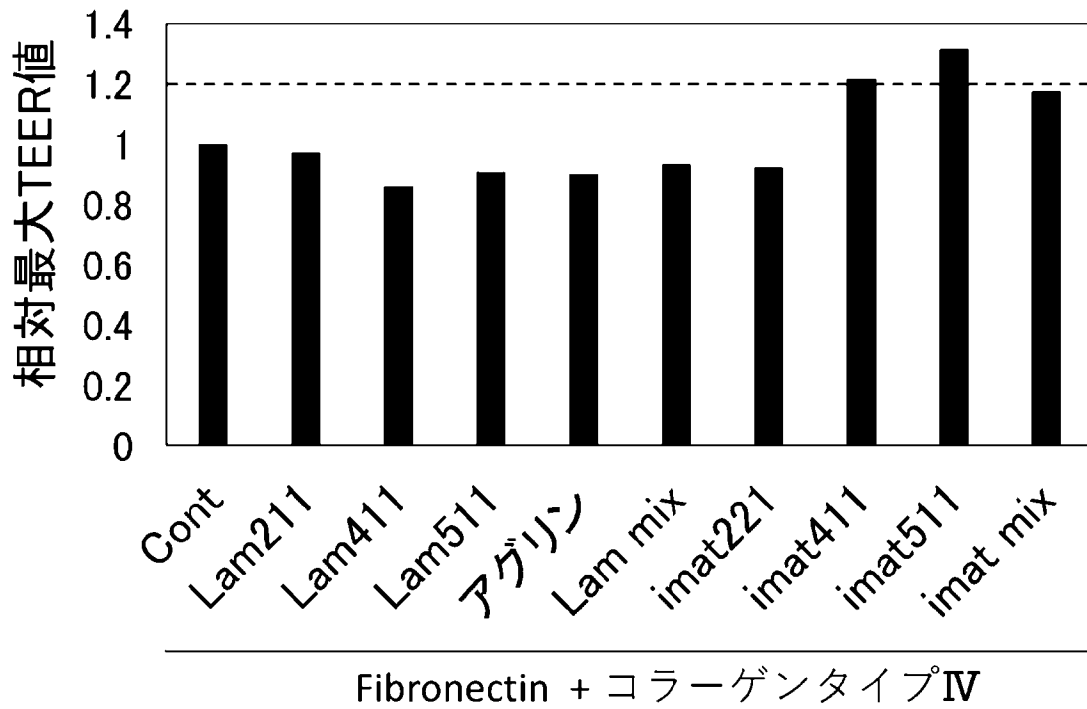
[図6]

Fig.6



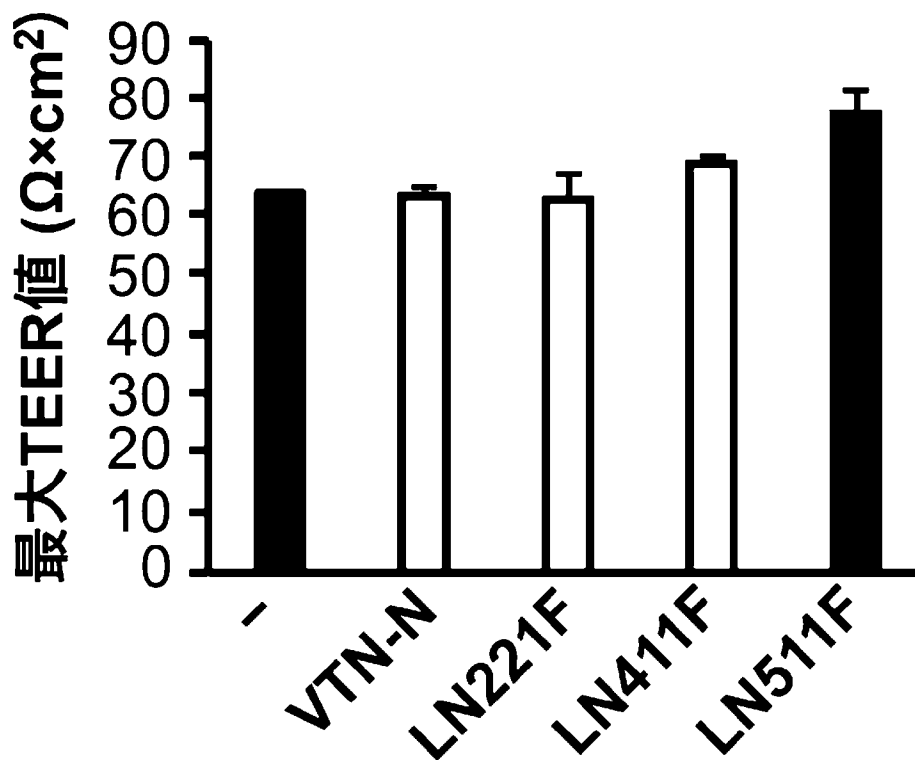
[図7]

Fig.7



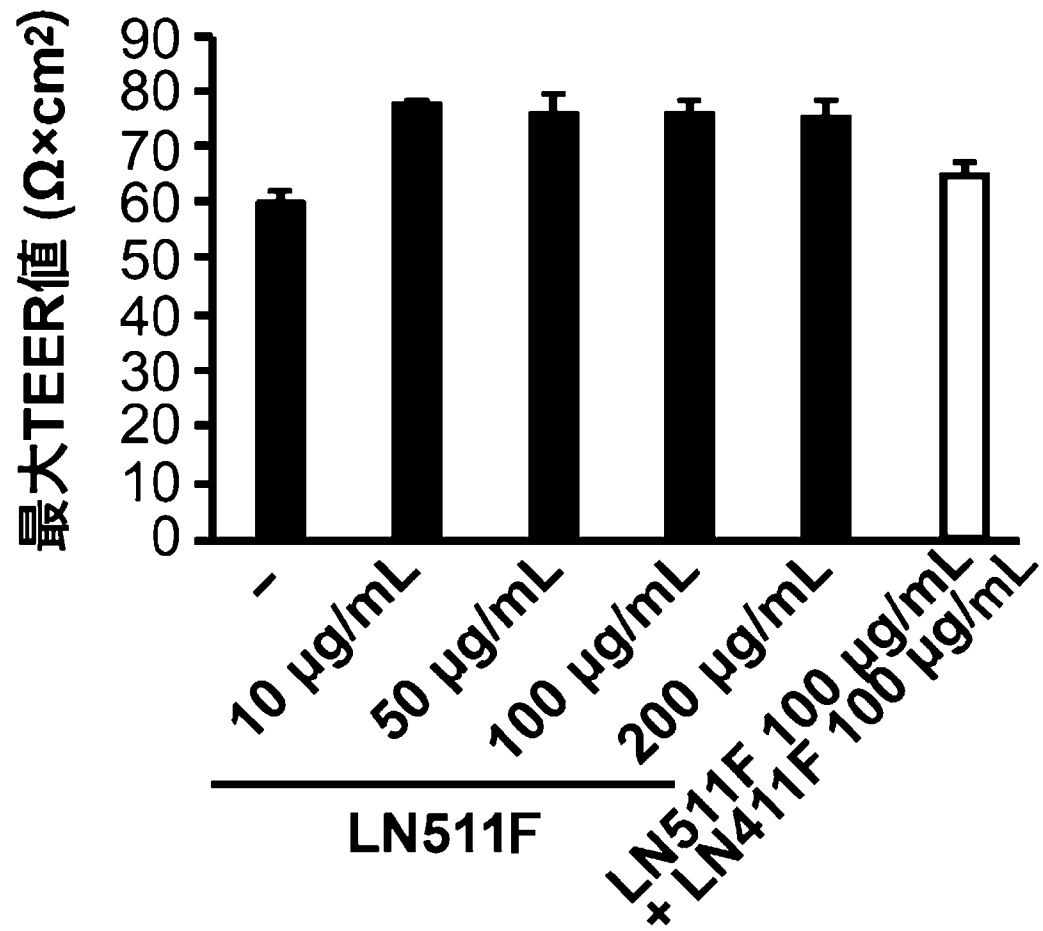
[図8]

Fig.8



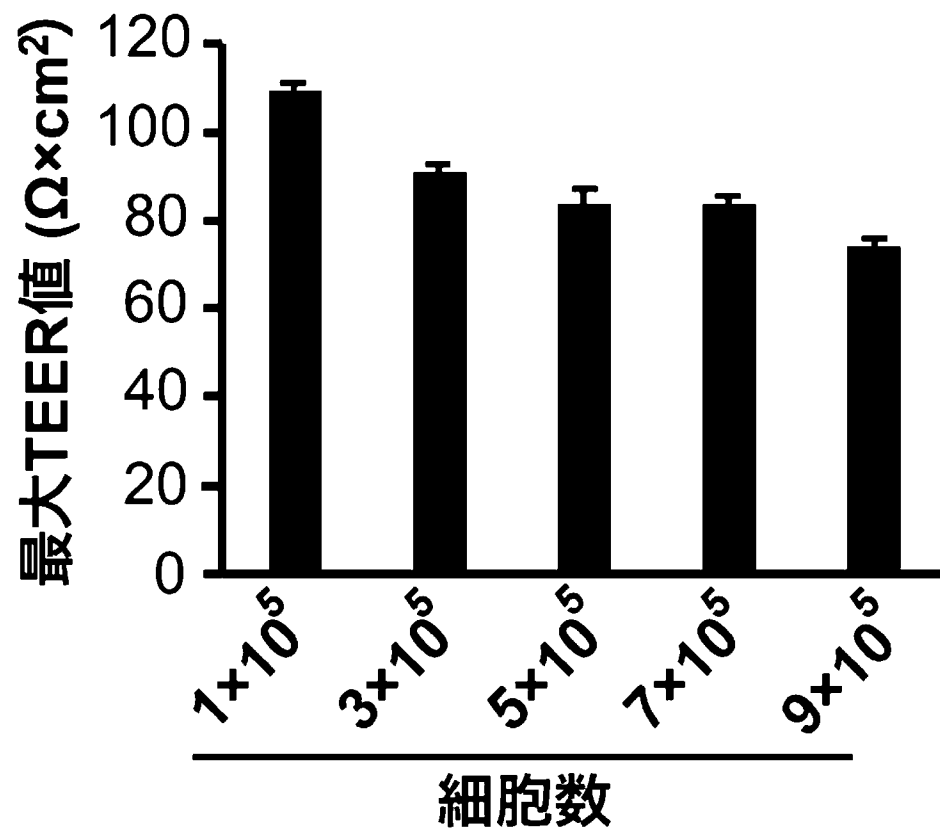
[図9]

Fig.9



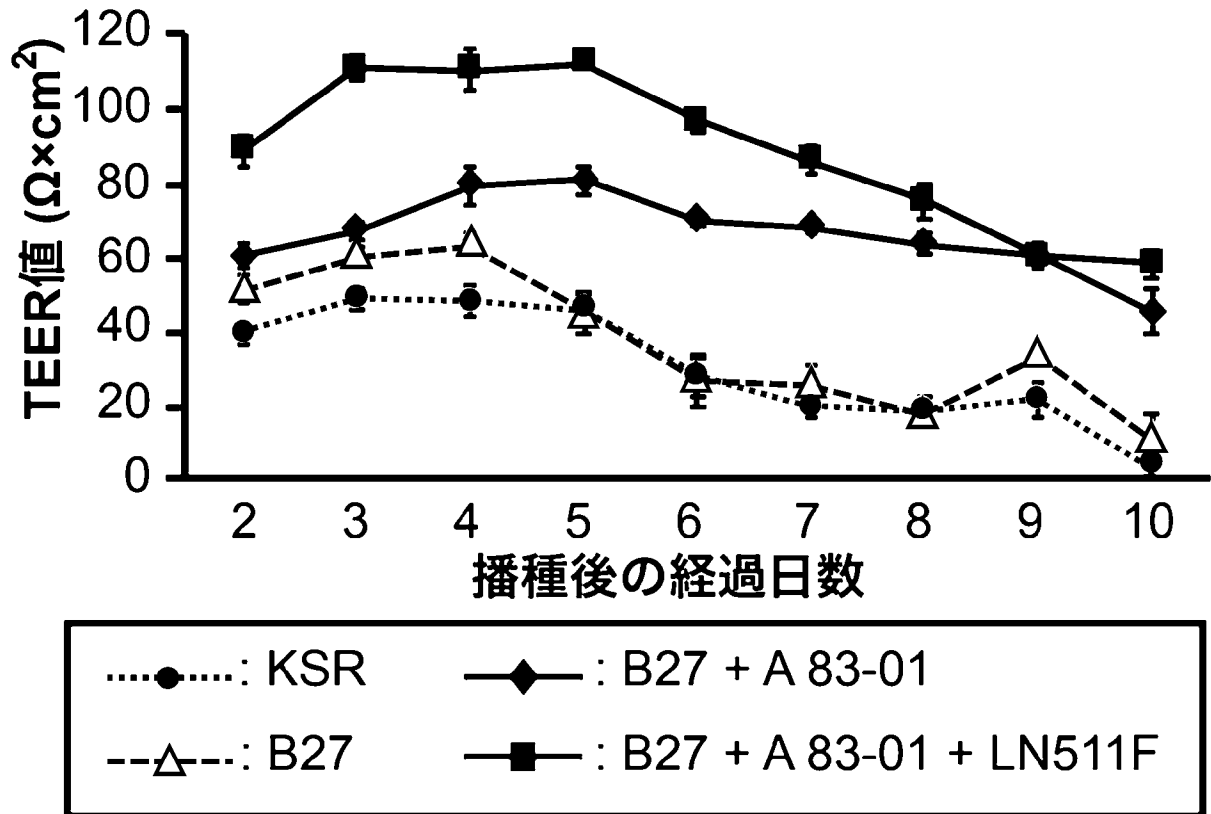
[図10]

Fig.10



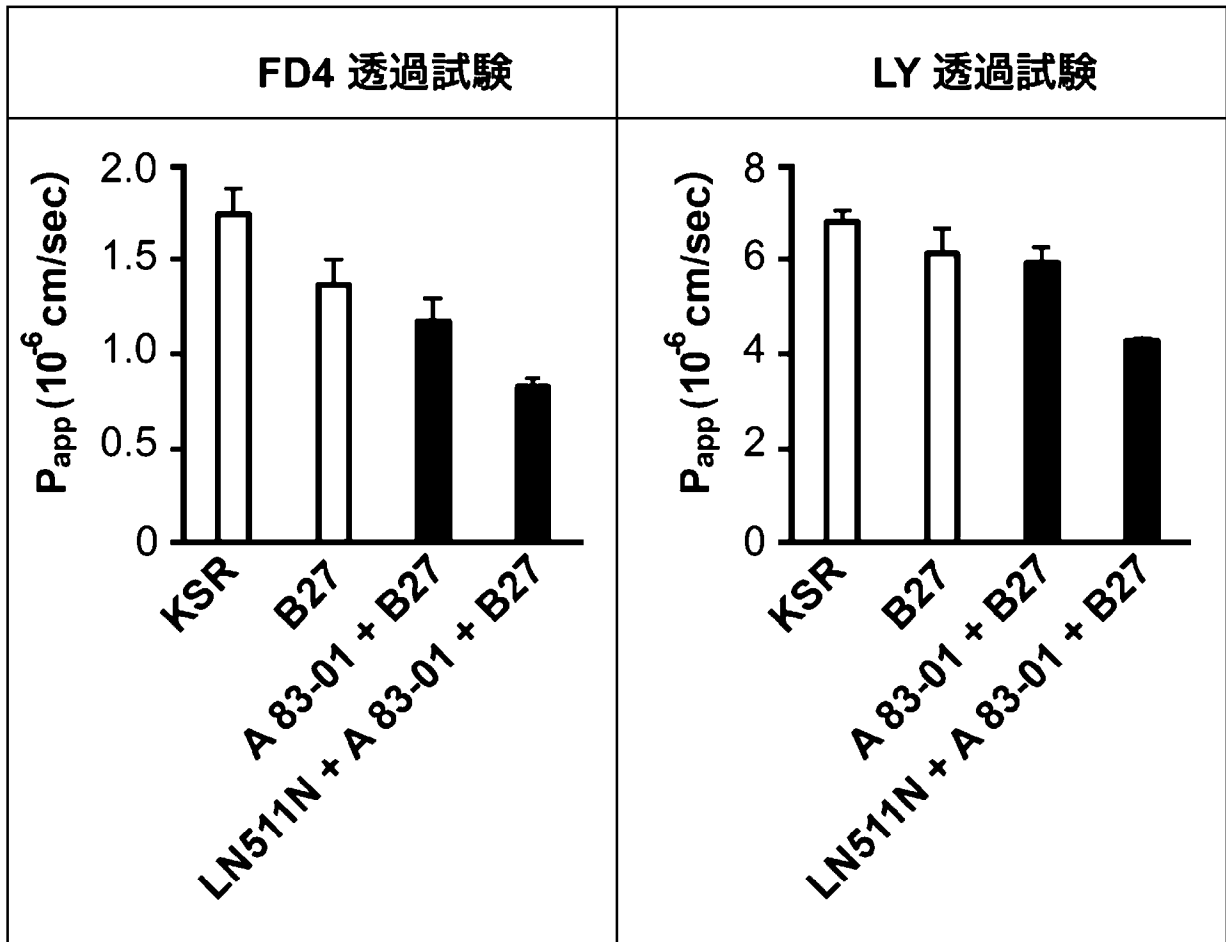
[図11]

Fig.11



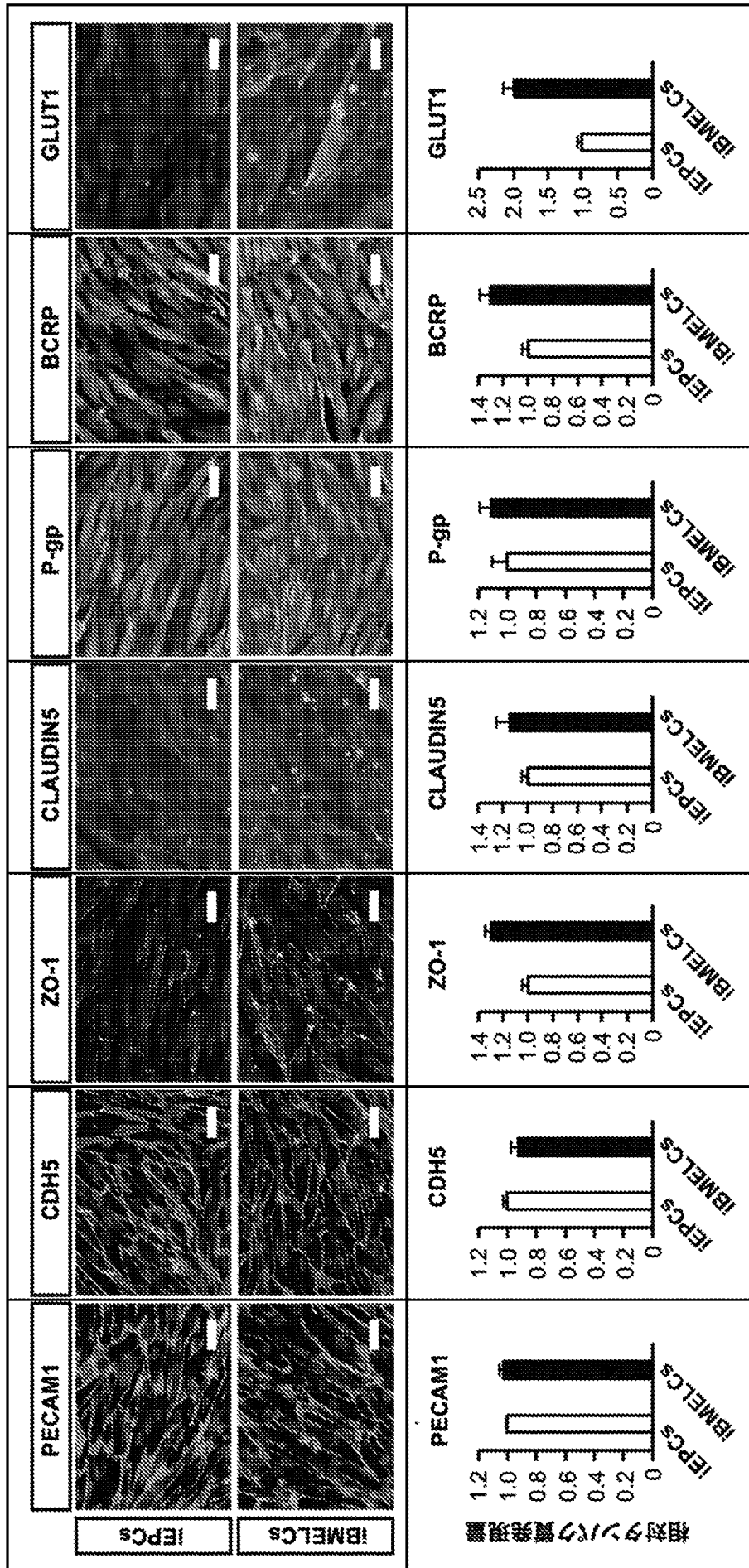
[図12]

Fig.12



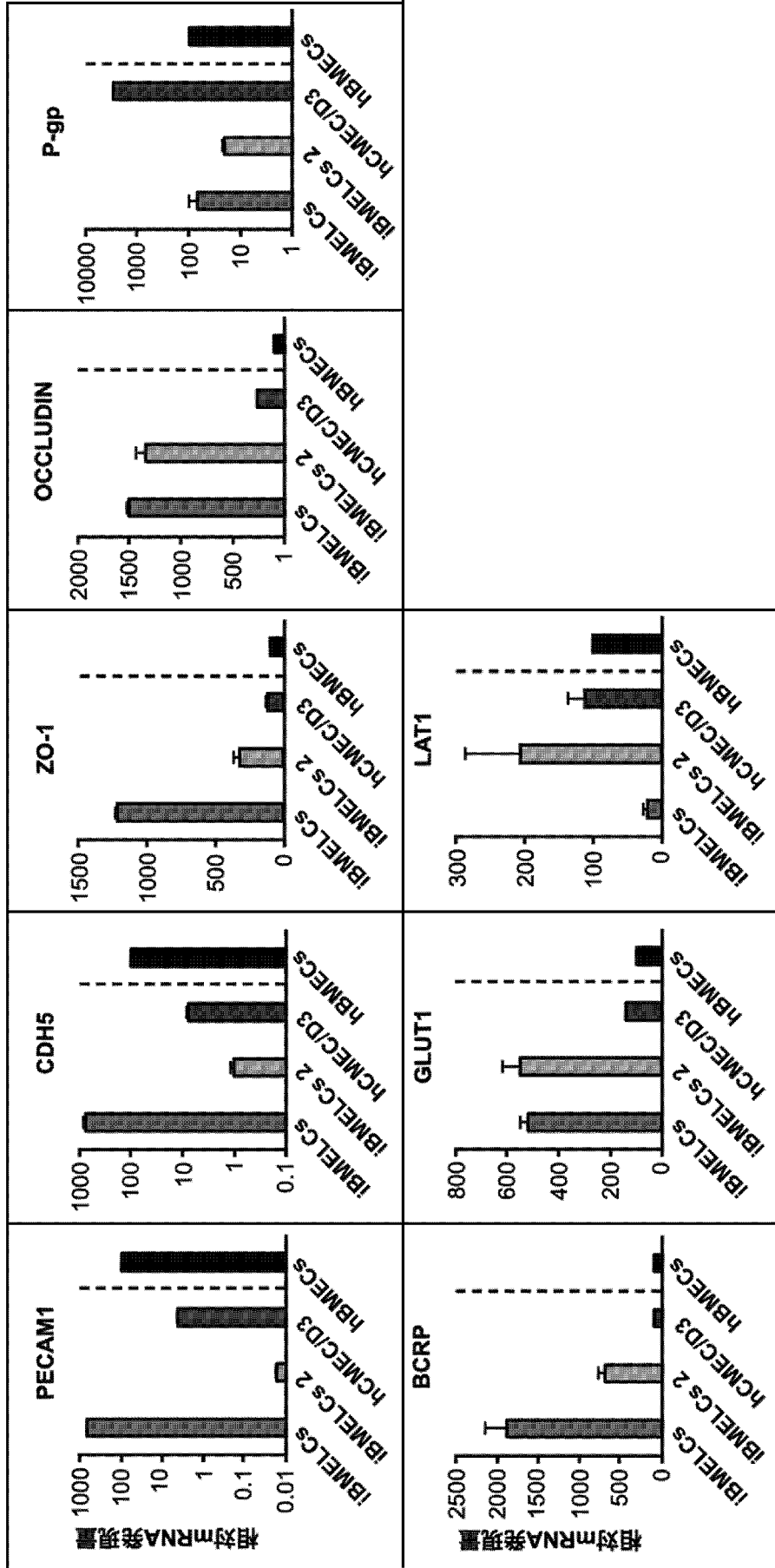
[13]

Fig.13



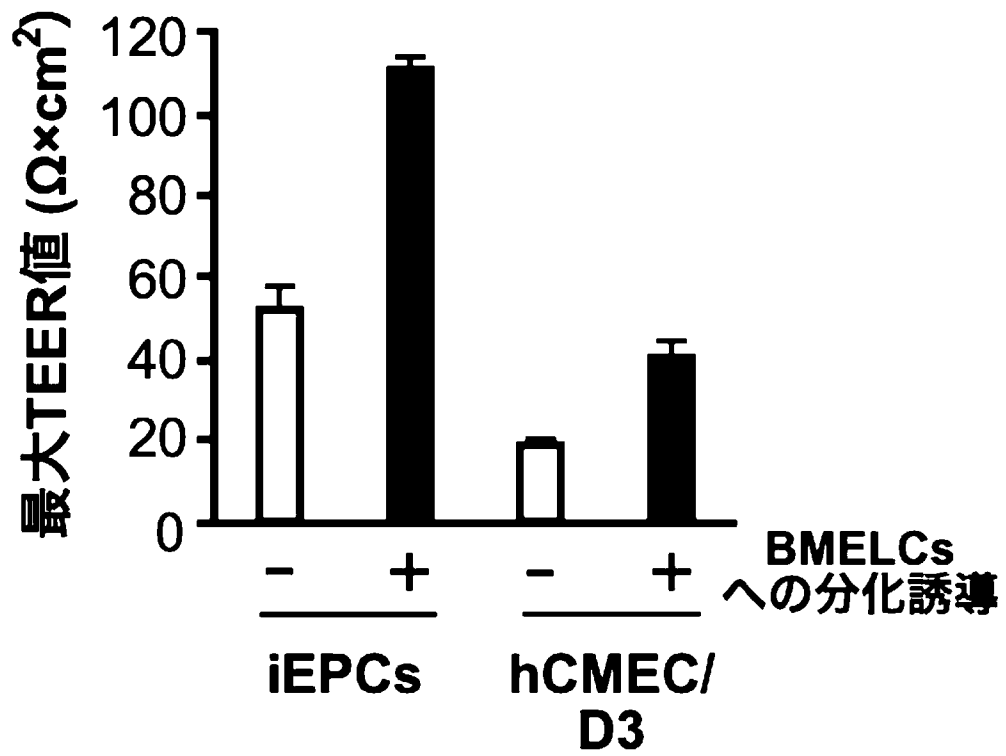
[圖14]

Fig.14



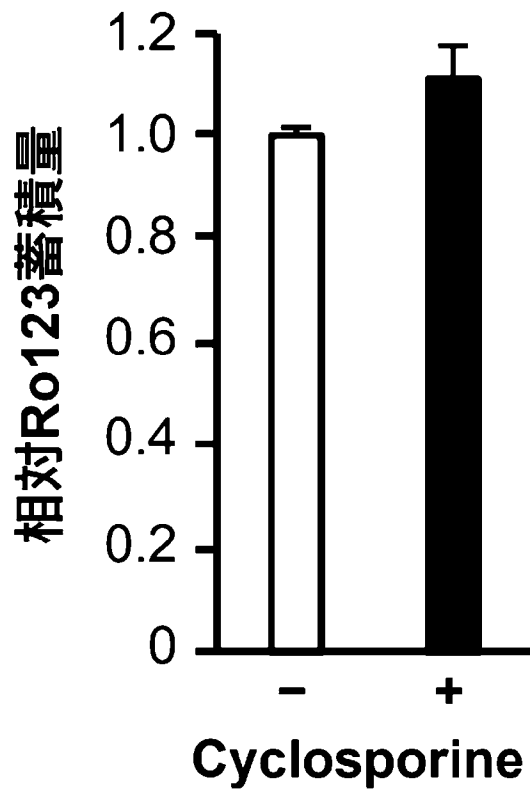
[図15]

Fig.15



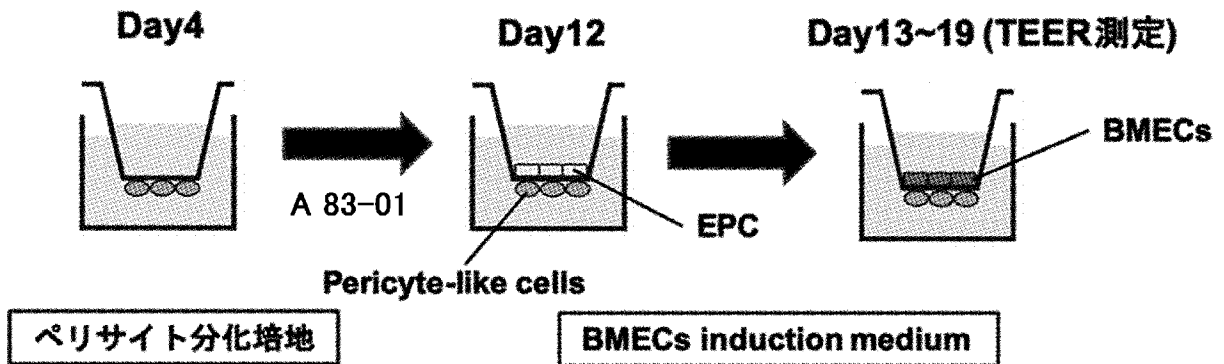
[図16]

Fig.16



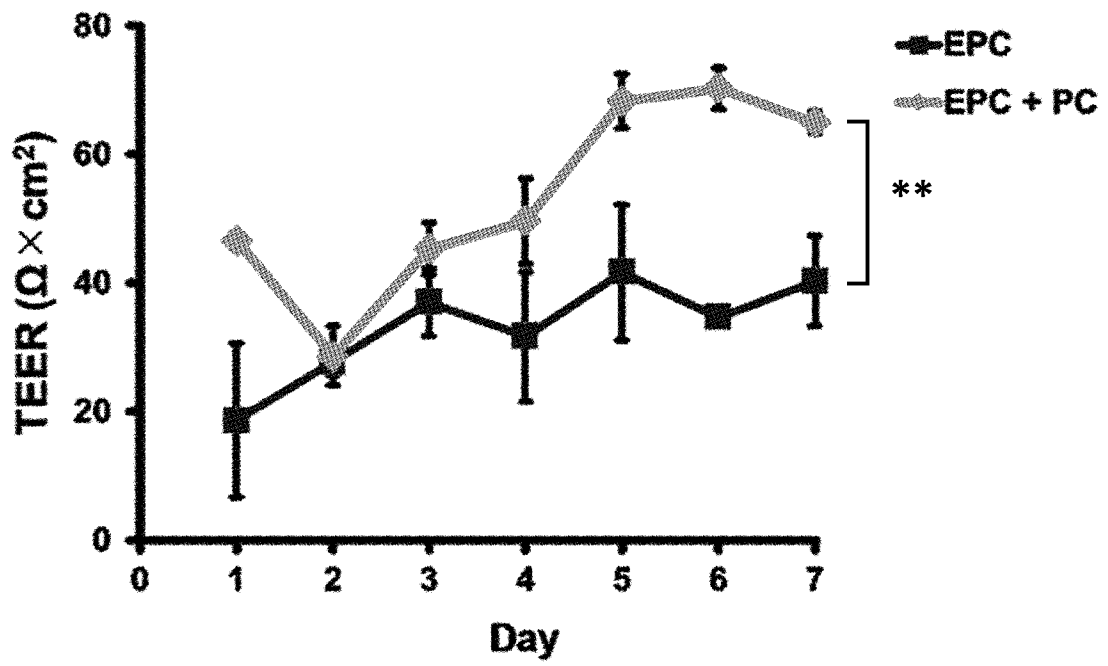
[図17]

Fig.17



[図18]

Fig.18



[19]

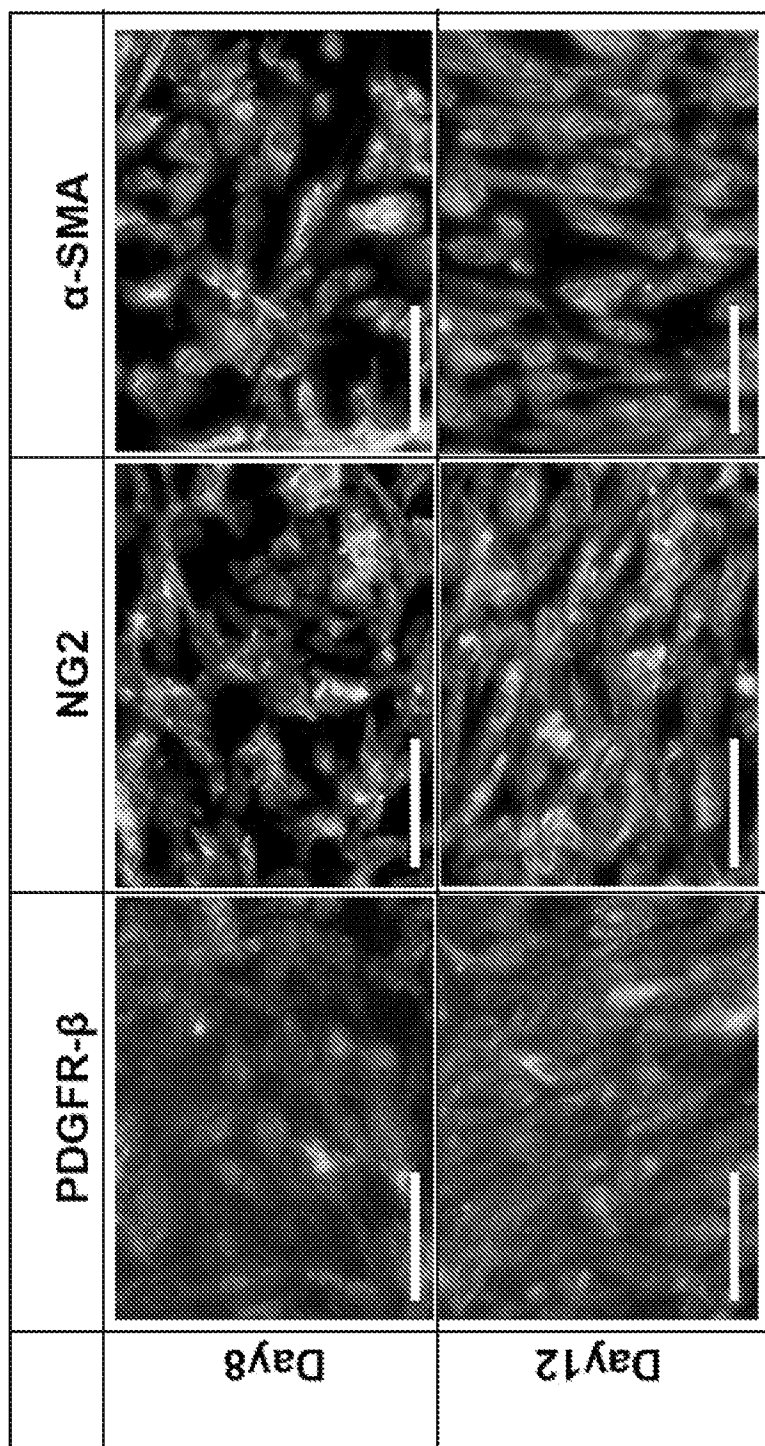
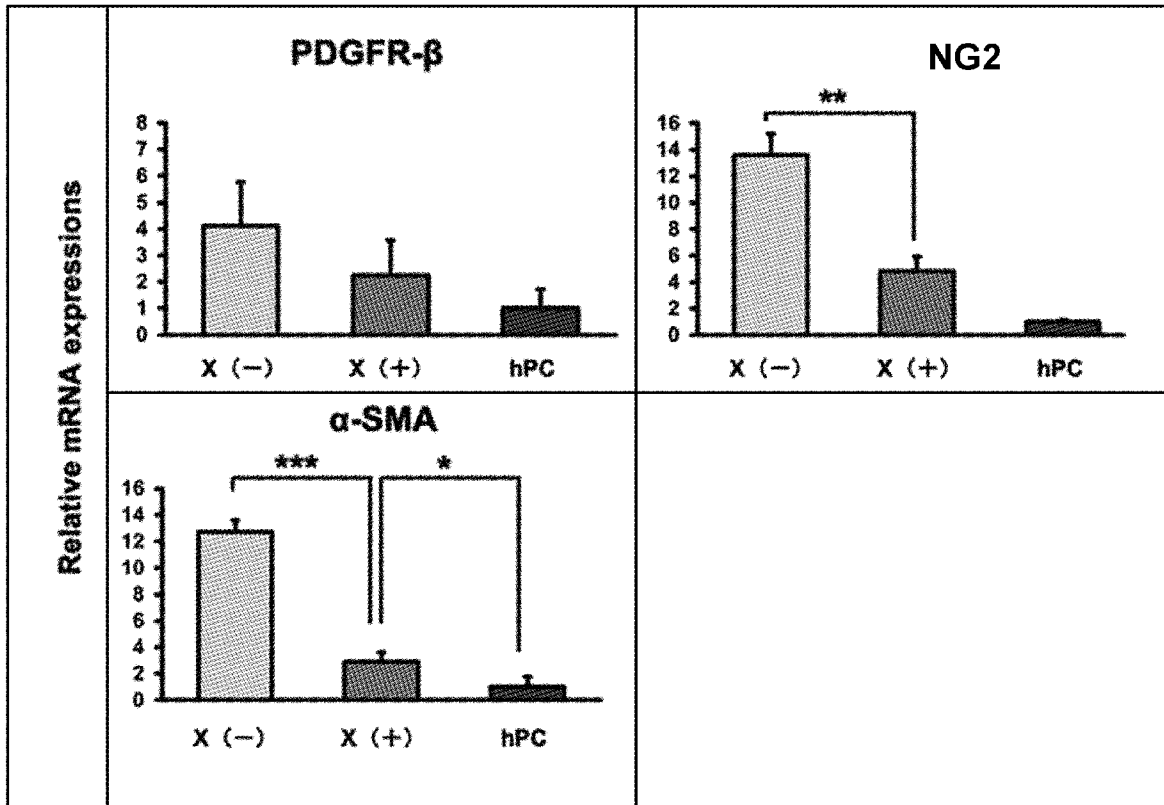


Fig.19

[図20]

Fig.20



[図21]

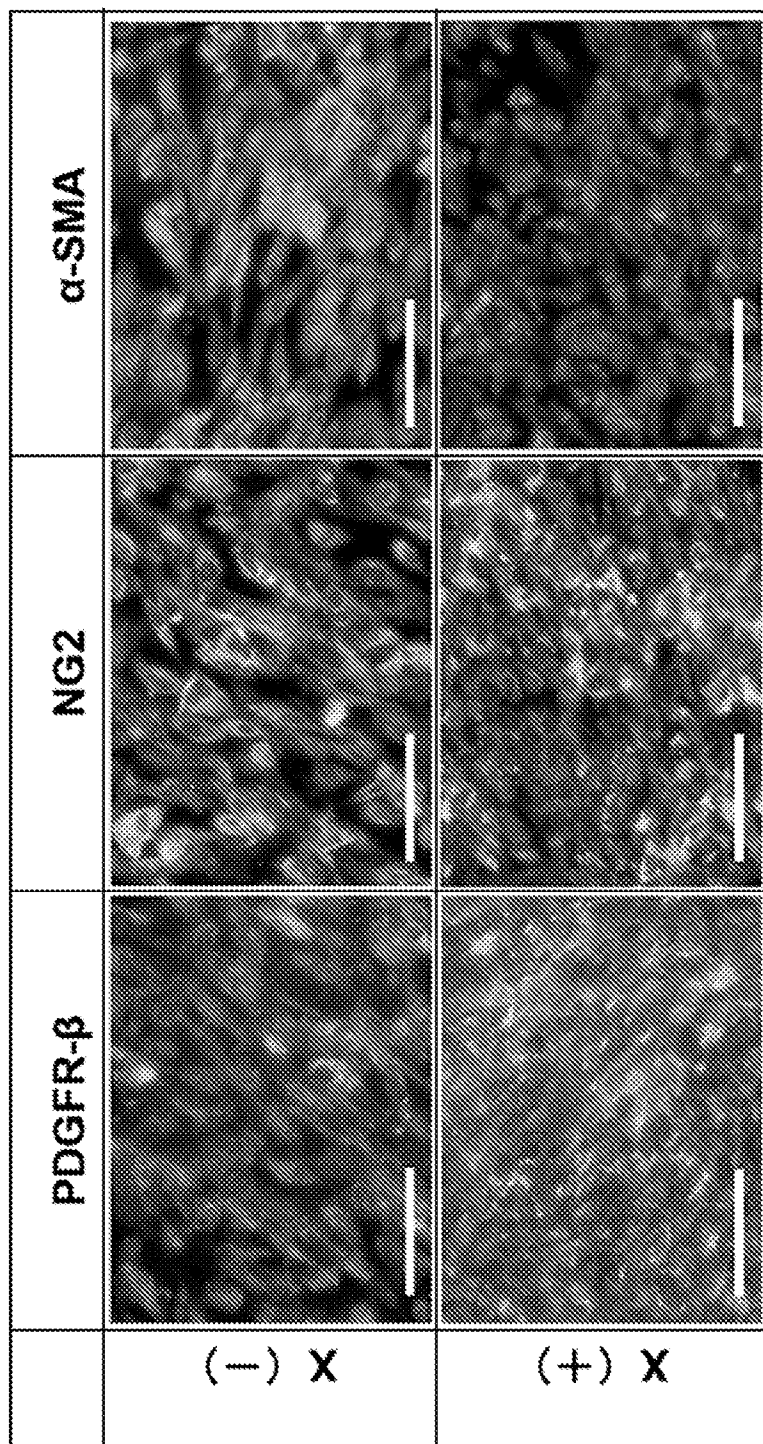


Fig.21

[Fig.22]

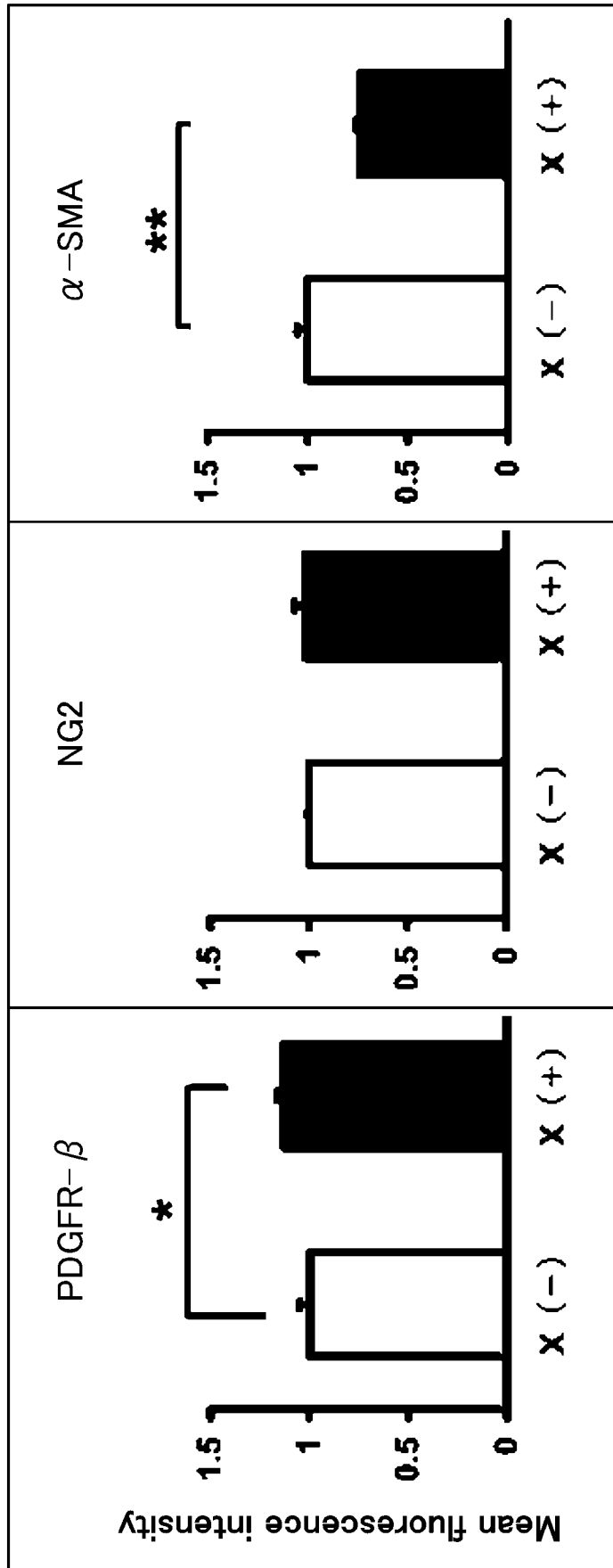


Fig.22

[図23]

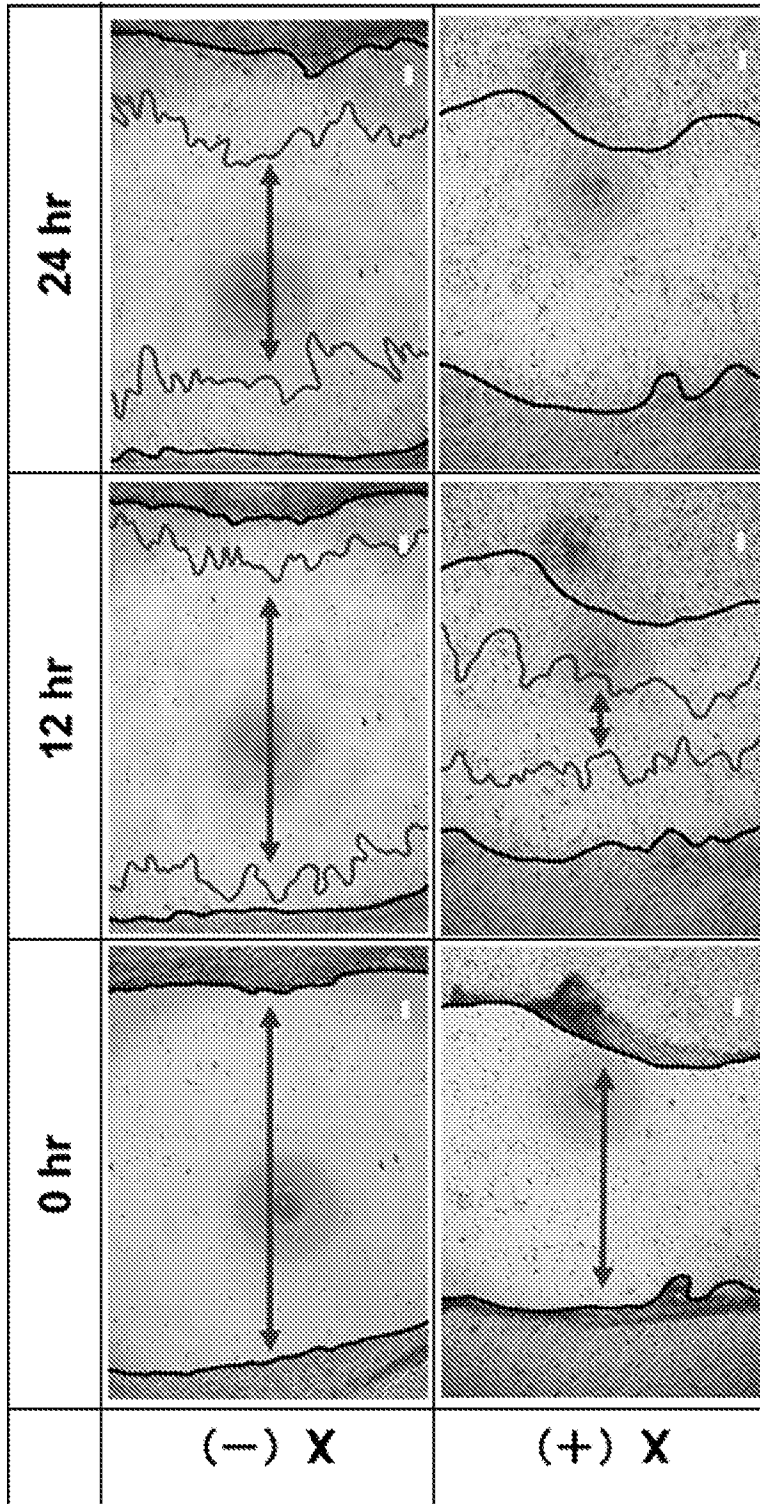
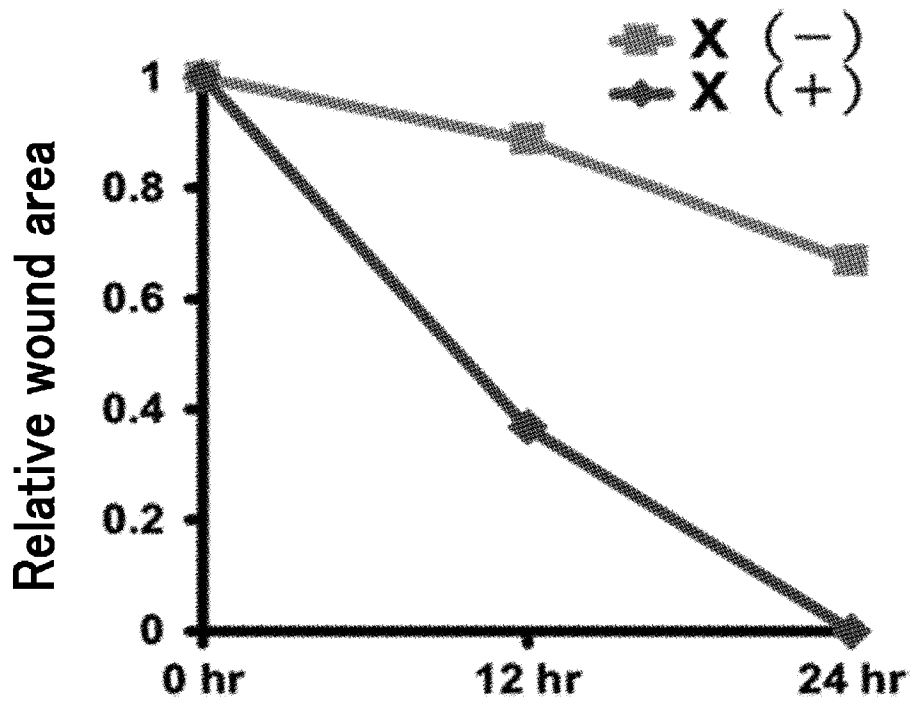


Fig.23

[図24]

Fig.24



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/020827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/074</i> (2010.01)i; <i>C12Q 1/02</i> (2006.01)i; <i>C07K 14/50</i> (2006.01)i; <i>C07K 14/78</i> (2006.01)i FI: C12N5/071 ZNA; C12Q1/02; C07K14/78; C12N5/074; C07K14/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C12Q; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2018-110548 A (UNIV NAGOYA CITY) 19 July 2018 (2018-07-19) claims, paragraphs [0002], [0015]-[0031]	1-5, 8-13
A	claims, paragraphs [0002], [0015]-[0031]	6-7
Y	岩尾岳洋、坡下真大、松永民秀、ヒトiPS細胞を用いた創薬研究支援細胞の作製, Drug Delivery System, 2020, vol. 35, no. 4, pp. 319-330 3.	1-5, 8-13
A	3., (IWAO, Takahiro. HASHITA, Tadahiro. MATSUNAGA, Tamihide. Generation of cells to support drug discovery research using human iPS cells.)	6-7
Y	AOKI, Hiromasa et al. 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 and Barriers of the CNS. 2020, vol. 17, Article No. 25, pp. 1-11 background, discussion	1-5, 8-13
A	background, discussion	6-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 July 2022		Date of mailing of the international search report 09 August 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/020827

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOTALLEBNEJAD, Pedram et al. Chemically defined human vascular laminins for biologically relevant culture of hiPSC-derived brain microvascular endothelial cells. Fluids and Barriers of the CNS. 2020, vol. 17, Article No. 54, pp. 1-16 abstract	1-5, 8-13
A	abstract	6-7
Y	US 2017/0283772 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 05 October 2017 (2017-10-05) paragraphs [0003]-[0063], [0094]-[0101]	2-5, 8-13
Y	WO 2019/208736 A1 (UNIV NAGOYA CITY) 31 October 2019 (2019-10-31) claims	8-10
A	JP 2007-166915 A (NIWA, Masami) 05 July 2007 (2007-07-05) claims	1-13
A	WO 2020/179380 A1 (UNIV NAGOYA CITY) 10 September 2020 (2020-09-10) paragraphs [0011]-[0076]	1-13

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/020827

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-110548 A	19 July 2018	(Family: none)	
US 2017/0283772 A1	05 October 2017	(Family: none)	
WO 2019/208736 A1	31 October 2019	(Family: none)	
JP 2007-166915 A	05 July 2007	US 2010/0273200 A1 claims	
		WO 2007/072953 A1	
		EP 1964915 A1	
WO 2020/179380 A1	10 September 2020	US 2022/0125854 A1 paragraphs [0062]-[0146]	
		EP 3939657 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/074(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; C07K 14/50(2006.01)i; C07K 14/78(2006.01)i FI: C12N5/071 ZNA; C12Q1/02; C07K14/78; C12N5/074; C07K14/50</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N; C12Q; C07K</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
Y	JP 2018-110548 A (公立大学法人名古屋市立大学) 19.07.2018 (2018-07-19) 特許請求の範囲、[0002]、[0015] - [0031]	1-5, 8-13								
A	特許請求の範囲、[0002]、[0015] - [0031]	6-7								
Y	岩尾岳洋、坡下真大、松永民秀、ヒトiPS細胞を用いた創薬研究支援細胞の作製, Drug Delivery System, 2020, Vol. 35, No. 4, p. 319-330 3.	1-5, 8-13								
A	3.	6-7								
Y	AOKI, Hiromasa et al., 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 and Barriers of the CNS, 2020, Vol. 17, Article No. 25, p. 1-11 Background, Discussion	1-5, 8-13								
A	Background, Discussion	6-7								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献</p>										
<p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触 するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	26.07.2022	国際調査報告の発送日 09.08.2022								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 山本 晋也 4N 3341 電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MOTALLEBJAD, Pedram et al., Chemically defined human vascular laminins for biologically relevant culture of hiPSC-derived brain microvascular endothelial cells, Fluids and Barriers of the CNS, 2020, Vol. 17, Article No. 54, p. 1-16 Abstract	1-5, 8-13
A	Abstract	6-7
Y	US 2017/0283772 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 05.10.2017 (2017 - 10 - 05) [0003]-[0063], [0094]-[0101]	2-5, 8-13
Y	WO 2019/208736 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 31.10.2019 (2019 - 10 - 31) 請求の範囲	8-10
A	JP 2007-166915 A (丹羽 正美) 05.07.2007 (2007 - 07 - 05) 特許請求の範囲	1-13
A	WO 2020/179380 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 10.09.2020 (2020 - 09 - 10) [0011]-[0076]	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/020827

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-110548 A	19.07.2018	(ファミリーなし)	
US 2017/0283772 A1	05.10.2017	(ファミリーなし)	
WO 2019/208736 A1	31.10.2019	(ファミリーなし)	
JP 2007-166915 A	05.07.2007	US 2010/0273200 A1 Claims WO 2007/072953 A1 EP 1964915 A1	
WO 2020/179380 A1	10.09.2020	US 2022/0125854 A1 [0062]-[0146] EP 3939657 A1	