

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：82815

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00576

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞のミトコンドリア制御因子による新しい化学物質の神経毒性評価法の開発

研究課題名(英文) A novel DNT assessment of chemicals by mitochondrial factors in human iPSCs

研究代表者

山田 茂 (Yamada, Shigeru)

一般社団法人日本薬理評価機構・評価法開発センター・客員研究員

研究者番号：50508679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト発達期に神経毒性が懸念される化学物質があり、安全性の評価は重要である。現在、ヒトにおける発達神経毒性は妊娠動物を用いて評価しているが、有用な評価マーカーはいまだ同定されていない。そこで発達期モデルとしてヒトiPS細胞を用いて、発達神経毒性が懸念される化学物質の検討を行った。その結果、ナノマテリアルAgNPsや抗がん剤5-FU曝露後に神経誘導すると神経分化マーカーPAX6の発現が低下することを見出した。さらに、分化抑制の要因としてミトコンドリア融合蛋白Mfnの分解を介したミトコンドリア機能異常であることを見出した。従って、Mfnは新しい安全性評価の標的として利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しており、その原因の一つとして発達期の環境中の化学物質の曝露が指摘されている。本研究では、ヒトiPS細胞を用いて新たな神経毒性評価マーカーとしてミトコンドリア機能蛋白質であるMfnを同定した。Mfn分解は異なる化学物質により共通で引き起こされるため、今後、発達毒性が懸念される化学物質のスクリーニングへの利用が期待できる。また、これまでヒトiPS細胞の神経分化メカニズムは不明な点が多かったが、本研究の過程でMfnが神経分化に関与する新規分化機構も見出した。今後、ミトコンドリアを介した分化メカニズムの解明により、幹細胞生物学に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemical safety assessment avoids developmental neurotoxicity (DNT) induced by chemical exposure at human prenatal and postnatal stage. To date, chemicals are evaluated using pregnant rats and useful marker for DNT has not been determined. Here we investigated the toxicities of nanomaterial AgNPs and anti-cancer drug 5-FU, which have concern about DNT, using human iPSCs. We found that both compounds suppressed the expression levels of neural differentiation marker PAX6. Moreover, we found that these suppressive effects of neural induction were caused by degradation of mitochondrial fusion protein Mfn and subsequent mitochondrial dysfunction. These data suggest that Mfn can be used as a novel DNT target in human.

研究分野：神経毒性学

キーワード：化学物質 発達神経毒性 iPS細胞 ミトコンドリア 神経分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト発達期に神経毒性が懸念される化学物質があり、安全性の評価は重要である。現在、動物実験による評価が行われているが、種差などの問題により、発達期モデルとしてヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 評価系が期待されている。しかしながら、ヒト発達神経毒性の有用な評価マーカーはいまだ同定されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでにヒト iPS 細胞を用いて、発達神経毒性の陽性対照物質である農薬クロルピリホスがミトコンドリア形態制御因子の一つである Mfn1 を選択的に分解し、ミトコンドリア機能障害を引き起こすことを見出した (Yamada et al., *Sci. Rep.*, 2017)。本研究では、ヒト iPS 細胞の自己複製や神経分化に対する Mfn1 の役割を解明し、その分子メカニズムを明らかにする。さらに、他の種類の化合物曝露においても Mfn1 の分解が誘導されるのかどうか検討する。本研究により、発達期の神経毒性マーカーを見出し、ヒト iPS 細胞を用いた新たな毒性評価法の確立に資する研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト iPS 細胞株 253G1 (Nakagawa et al., *Nat. Biotechnol.*, 2008) は、マトリゲル (BD Biosciences) でコートしたディッシュを用いて TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にて培養した。

(2) 神経 (外胚葉) 分化誘導

外胚葉への分化は Dual smad 阻害法に従い (Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009) BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いて iPS 細胞を 2 日間培養した。

(3) qPCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

(4) shRNA を用いたノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルスを用いた。ヒト iPS 細胞に moi 1 でウイルスを感染させ、24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞を取得した。

4. 研究成果

(1) 神経分化に対する化学物質の影響

化学物質の発達神経毒性を明らかにするために、神経毒性が懸念される化学物質を用いて神経分化に対する検討を試みた。抗菌剤成分である銀ナノ粒子 (AgNPs) は、ゼブラフィッシュの脳の形成異常などが報告されている。また、抗がん剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) は中枢神経毒性が報告されている。本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて神経系の形成における AgNPs 及び 5-FU 曝露の影響を検討した。まずヒト iPS 細胞に化学物質を曝露し、神経分化を行った。その結果、AgNPs 及び 5-FU 曝露により、神経分化マーカーである PAX6 の発現低下を見出した (図 1A)。

次に、AgNPs 及び 5-FU 曝露により iPS 細胞の ATP 量が減少したことから、ミトコンドリアの検討を行った (図 1B)。その結果、AgNPs 及び 5-FU 曝露により、Mfn1 蛋白が減少し、ミトコンドリア分裂が促進した (図 1C, D)。以上より、ヒト iPS 細胞において、AgNPs 及び 5-FU 曝露により Mfn1 蛋白が減少してミトコンドリア機能が低下し、神経分化が抑制される可能性が示唆された。

(2) 神経分化に対する Mfn1 の役割

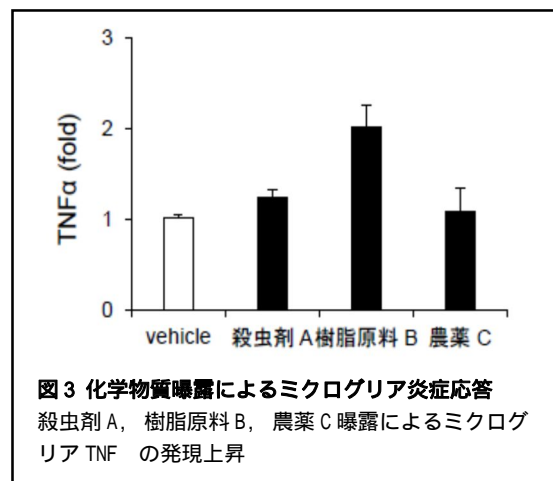
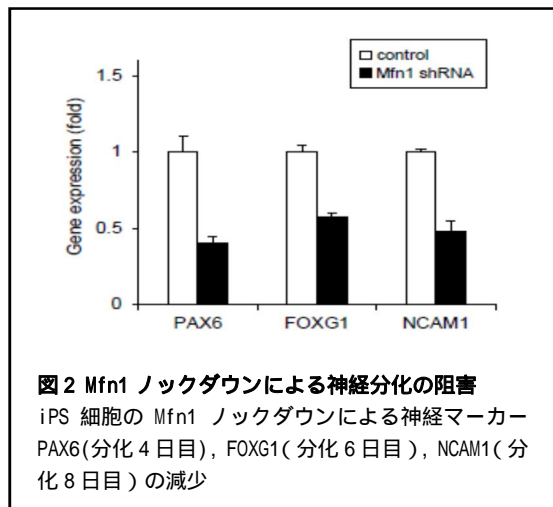
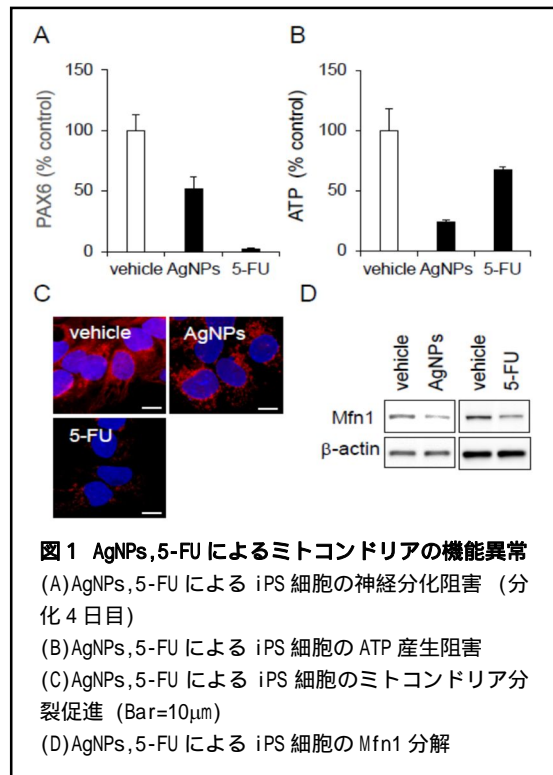
ヒト iPS 細胞の自己複製や神経分化に対する Mfn1 の役割を明らかにするために、shRNA を用いて Mfn1 のノックダウンを行った。その結果、Mfn1 をノックダウンした細胞では自己複製能の低下が認められた。さらにミトコンドリア分裂の亢進に伴い、ATP 産生能の低下やミトコンドリア膜電位の脱分極も認められた。

次に Mfn1 ノックダウンによる神経分化への影響を検討した。その結果、Mfn1 ノックダウンにより神経分化マーカーである PAX6, FOXG1, NCAM1 の発現低下が認められた (図 2)。

以上の結果から、Mfn1 はミトコンドリア形態の融合を介して、iPS 細胞の自己複製や神経前駆細胞への分化を制御することが示唆された。

(3) グリア炎症応答に対する化学物質の影響

我々はこれまで発達神経毒性の評価系として神経分化を指標に検討を行ってきたが、近年、iPS 細胞からグリア細胞への分化誘導技術の発展に伴ってグリア細胞の炎症応答に対する注目も高まっており、ミクログリア炎症応答の発達神経毒性指標としての有用性についても検討した。ヒト iPS 細胞由来ミクログリアに発達神経毒性が懸念される化学物質を曝露し、24 時間後に RNA を抽出して TNF や IL1 などの炎症性サイトカインの発現を定量的 PCR で調べた。その結果、殺虫剤 A、樹脂原料 B、農薬 C の曝露により TNF の発現上昇が認められた (図 3)。一方、IL1 の発現変化は認められなかった。以上より、殺虫剤 A、樹脂原料 B、農薬 C はミクログリアの炎症を引き起こすことが明らかとなり、この炎症応答を加味することにより、発達神経毒性の統合的な評価が可能となる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsunemoto Kazunobu, Yamada Shigeru, Kanda Yasunari	4. 巻 156
2. 論文標題 Current challenges and future perspectives of iPSC-based neurotoxicity testing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.20097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Shigeru, Kanda Yasunari	4. 巻 346
2. 論文標題 Evaluation of Barrier Functions in Human iPSC-Derived Intestinal Epithelium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2021_346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari	4. 巻 99
2. 論文標題 Silver nanoparticles inhibits neural differentiation in human iPS Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods	6. 最初と最後の頁 106595 ~ 106595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vascn.2019.05.195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama Yoshitake, Shinose Masato, Watanabe Hiroki, Yamada Shigeru, Kanda Yasunari	4. 巻 116
2. 論文標題 Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7738 ~ 7743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1808645116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Shigeru, Kanda Yasunari	4. 巻 140
2. 論文標題 Retinoic acid promotes barrier functions in human iPSC-derived intestinal epithelial monolayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 337 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.06.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari	4. 巻 43
2. 論文標題 5-Fluorouracil inhibits neural differentiation via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 727 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Shigeru, Kubo Yusuke, Yamazaki Daiju, Sekino Yuko, Nomura Yoko, Yoshida Sachiko, Kanda Yasunari	4. 巻 8
2. 論文標題 Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30615-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari	4. 巻 12
2. 論文標題 Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanotoxicology	6. 最初と最後の頁 836 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17435390.2018.1481238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 山田茂、常本和伸、諫田泰成
2. 発表標題 微小電極アレイを用いたヒトiPS由来神経細胞の神経毒性評価
3. 学会等名 第47回日本毒性学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamada S, Tsunemoto K, Kanda Y
2. 発表標題 Neurotoxicity assessment using microelectrode array recordings in human iPSC-derived neurons
3. 学会等名 ASCCT 9th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常本和伸、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いたマンガンの神経毒性評価
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常本和伸、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞技術を用いたベンゾジアゼピン系薬物の統合的な安全性評価
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 レチノイン酸はiPS由来ヒト小腸上皮のバリア機能を促進する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 銀ナノ粒子によるヒトiPS細胞の神経分化抑制
3. 学会等名 第46回日本毒性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茂、常本和伸、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞技術を用いた統合的な発達神経毒性評価法の開発
3. 学会等名 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたヒト小腸オルガノイドの作製
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価
3. 学会等名 第92回日本薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化に対する銀ナノ粒子曝露の影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari
2. 発表標題 Silver nanoparticles inhibit neural induction via mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari
2. 発表標題 Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells
3. 学会等名 China TATT-Asia CA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari
2. 発表標題 Assessment of neurotoxicity of silver nanoparticles using human iPS cell-based platform
3. 学会等名 Safety Pharmacology Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞のミトコンドリア機能に基づく発達神経毒性の評価
3. 学会等名 第4回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Shigeru, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari
2. 発表標題 Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPS cells
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化に対するトリブチルスズの影響
3. 学会等名 第44回日本毒性学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化に対するクロルピリホス曝露の影響
3. 学会等名 第136回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価系の開発
3. 学会等名 第3回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shigeru Yamada, Daiju Yamazaki, Yasunari Kanda
2. 発表標題 Development of human iPS cell-based platform for developmental neurotoxicity testing
3. 学会等名 Safety Pharmacology Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田茂、山崎大樹、諫田泰成
2. 発表標題 ミトコンドリアを介した新たな神経分化機構の解析
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeru Yamada, Daiju Yamazaki, Yasunari Kanda
2. 発表標題 Novel mechanism of neural differentiation via mitochondrial factor Mfn1 in human iPS cells
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐塚文乃、山田茂、山崎大樹、諫田泰成	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 10
3. 書名 ヒトiPS細胞を用いた医薬品の副作用予測法の開発と国際標準化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------