

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19510076

研究課題名（和文） ヒト間葉系幹細胞を用いたサリドマイド誘発奇形の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms of thalidomide-induced teratogenesis using human mesenchymal stem cells

研究代表者

高木 篤也（TAKAGI ATSUYA）

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究者番号：00179419

研究成果の概要（和文）：

サリドマイドによるヒトの四肢低形成奇形については、血管形成阻害、酸化的 DNA 傷害、代謝物の関与等の種々の仮説が提案されているが、未だ明らかでない。そこで、本研究は初期の血管形成前の肢芽（手足の原基）に対する影響を *in vitro* で見る系として、肢芽の間葉組織に近似したヒトの間葉系幹細胞を用いて検討した。10 μ M のサリドマイドを培地に添加し、24 時間後までの遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析した結果、酸化的ストレスを含め、明瞭な変化は認められなかった。一方、比較のため、マウス間葉系細胞を用いた実験でサリドマイドを 10-300 μ M で添加し、24 時間後の遺伝子発現を同様にマイクロアレイで解析したところ、癌転移に関係することが示唆されている long non-coding RNA の一つが用量依存的に減少することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

There are many proposed mechanisms of action in thalidomide teratogenicity including inhibition of angiogenesis or oxidative DNA damage. We have undertaken a microarray gene expression analysis on human mesenchymal stem cells and mouse mesenchymal stem like cells treated with thalidomide. No clear changes of gene expression including oxidative stress were observed (10 μ M thalidomide) in the human cells. On the other hand, dose-dependent decrease of a long non-coding RNA was observed in mouse mesenchymal stem like cells (10-300 μ M thalidomide).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,100,000	0	1,100,000
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：サリドマイド、間葉系幹細胞、マイクロアレイ、遺伝子、ヒト、マウス、発生・分化

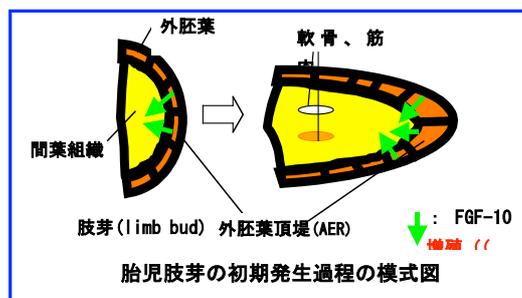
科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

本研究は 1) サリドマイドの作用機序、2) 種差の研究、また、3) 催奇形性物質のスクリーニング系としての有用性の確認のため、サリドマイドに感受性があるヒト由来の細胞で、かつ、胎児の手足の基となる組織に近似した細胞としてヒトの間葉系幹細胞を用いようとするものである。ヒトに四肢(特に上肢)の奇形を生じさせる催奇形性物質のサリドマイドは、マウス、ラット等のげっ歯類では起こさない。よって、サリドマイドの催奇形性を研究するためには、ヒトの細胞で、なおかつ、胎児発生過程の組織、特に肢芽(手足の基となる部分)の組織に近似した試験系が有用であると思われる。分化能を有し、間葉系組織に近似した試験系として、ヒト間葉系幹細胞は最適であり、また、これまで行った、マウス ES 細胞での遺伝子発現データベース作製の技術を活かすことが出来るため、ヒト間葉系幹細胞を用いてサリドマイドの研究を行うという本研究を着想するに至った。

哺乳類の四肢初期発生過程について以下のことが知られている(下図参照)。

- i) 四肢の原基(肢芽)は間葉組織から出来、外側を外胚葉に覆われる。
- ii) 肢芽の頂点の外胚葉頂堤(AER)より、増殖因子である FGF-10 が分泌される。
- iii) 直下の間葉細胞の増殖が促進され、肢芽が伸長、遠方の間葉組織は軟骨や筋肉細胞に分化する。



サリドマイド毒性により生まれた子供の四肢(特に上肢)低形成は、間葉組織の増殖が何らかの理由により阻害されたため、肢芽の伸長及びそれに引き続く間葉組織の分化が阻害されたと考えられる。その考えを支持するデータとして、AER から分泌される FGF-10 のノックアウトマウスで四肢が欠損することが報告されている(Min H et al., Genes Dev, 12, 3156-3161, 1998)。しかし、サリドマイドはヒトに奇形を生じさせるが、ラット、マウスには奇形を生じさせず、ヒトの胎児を用いた試験も困難であることも

あり、サリドマイド奇形機序の解析の研究は奇形発生の最初の報告(1961年)から長期間経過した現在まで、あまり進捗していない状況であった。しかし、最近、ヒトの間葉系幹細胞が樹立され、培養法も確立され、その利用が可能となった。さらに、間葉系幹細胞が、骨、軟骨、筋肉等に分化出来ることから、ヒトの間葉組織と似ており、ヒトの間葉組織への影響を検索する系として有用であることが期待された。そこでサリドマイドによるヒト四肢低形成の機序を調べる系として、FGF 添加培養ヒト間葉系幹細胞を用いて研究を行った。

2. 研究の目的

サリドマイドによるヒトの四肢低形成奇形については、血管形成阻害、酸化的 DNA 傷害、代謝物の関与等の種々の仮説が提案されているが、未だ明らかでない。そこで、本研究は初期の血管形成前の肢芽(手足の原基)に対する影響を *in vitro* で見る系として、肢芽の間葉組織に近似したヒトの間葉系幹細胞を用い、サリドマイドの影響を明らかにする。

3. 研究の方法

1) ヒト及びマウス間葉系幹細胞の FGF 添加培地の培養条件の設定

ヒト間葉系幹細胞及び、それとの比較のためのマウス間葉系細胞の至適な培養条件を設定するため、細胞を Dish 上で培養後、増殖因子の FGF を用量を変えて培地に添加した。添加後、経時的に細胞数を計測ることにより、それぞれ、至適な増殖因子の濃度設定を行った。

2) ヒト及びマウス間葉系幹細胞の形態、増殖に及ぼすサリドマイドの影響解析

ヒト及びマウス間葉系幹細胞を Dish 上で上記培地で培養後、サリドマイドを用量を変えて培地に添加した。添加後、経時的に細胞数を計測ることにより増殖に対する影響を確認した。また、形態学的観察を行った。

3) マイクロアレイ法によるヒト及びマウス間葉系幹細胞の遺伝子発現に及ぼすサリドマイドの影響解析

ヒト及びマウス間葉系幹細胞のマイクロアレイ解析を実施するにあたって、用いる手法である「遺伝子発現量絶対値化」のために、RNA サンプルに加える必要がある内部標準 RNA の添加量を決定した。次いで、ヒト間葉系幹細胞にサリドマイドを 10 μM の濃度で培地に添加した。対照群には DMSO (final 0.1%) を培地に添加した。添加 0、2、4、8、24 時間後に細胞を採取してプールし、RNA 抽出用サンプルとした。次いで、ア

フィメトリス社の Gene Chip Human Genome U133 plus 2.0 を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、Percellome 手法（細胞1個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法）（Kanno J. et al., BMC Genomics, 7, 64, 2006）を適用した。また、マウス間葉系細胞にサリドマイドを 10-300 μ M の濃度で添加し、24 時間目に細胞を採取し、同様にマイクロアレイ解析をアフィメトリス社の Gene Chip Mouse Genomu 430 2.0 Array を用いて実施した。

4. 研究成果

ヒト間葉系幹細胞に対してサリドマイドは形態学的に明らかな影響を示さなかった。ヒト間葉系幹細胞でサリドマイドにより有意に変動した遺伝子数は約 55,000 遺伝子 probe set 中、下の表のとおりであった。

Time	Up	Down
2hr	3278	951
4hr	785	2003
8hr	638	2918
24hr	5049	313

$p < 0.05$

さらに、マイクロアレイのデータを詳細に調べた結果、本実験条件下では酸化的ストレスや血管形成阻害遺伝子を含め明らかな影響は確認されなかった。また、gene ontology 解析や pathway 解析を実施したが、それぞれ、明らかな傾向を見いだすことは出来なかった。一方、マウス間葉系細胞においてはマイクロアレイ解析を実施し、データの解析を継続しているが、癌転移に関係することが示唆されている long non-coding RNA の用量依存的な減少が認められている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

Percellome 手法によるマウス ES 細胞分化過程における遺伝子発現の経時データベースの構築と活用、高木篤也、北嶋聡、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜

Quantitative microarray analysis by "Percellome" method on murine embryonic stem cells and embryoid bodies, TAKAGI A, KITAJIMA S, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M AND KANNO J, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2008 年 3 月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子の Percellome 手法を用いた定量的マイクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月、横浜

マウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子発現パターンの解析（その 2）、高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月、東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 篤也 (TAKAGI ATSUYA)

研究者番号：00179419

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：