

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510063

研究課題名(和文) BAC ベクター導入 ES 細胞を用いた環境評価システムの構築

研究課題名(英文) Validation system of chemicals using BAC vector transfected ES cells

研究代表者

高田 達之(TAKADA TATSUYUKI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90206756

研究成果の概要(和文):

ES細胞の分化系を用いて、ビスフェノールA(BPA)の存在下で、発現が変化する遺伝子を見いだした。当該遺伝子のプロモーター制御下で蛍光タンパク質(Venus)を発現するレポーターを構築し、導入ES細胞株を樹立した。

このES細胞を化学物質の存在下で培養すると、濃度依存的な蛍光強度の上昇が示され、レポーター導入ES細胞を用いて、化学物質の存在、濃度を評価するシステム基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文):

Germ cell related gene which expression was up-regulated by the exposure to bisphenol A(BPA) was identified. ES cell line which express venus under the control of this promoter was established. This ES cell line express venus in the presence of chemicals in a dose-dependent manner, suggesting validation system of environmental chemicals can be achieved using reporter ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：幹細胞生物学、環境科学

科研費の分科・細目：環境学/放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌攪乱物質、ES細胞、細胞分化、生殖細胞分化

1. 研究開始当初の背景

近年急増しているアレルギーや男性不妊において、内分泌攪乱物質の関与が指摘されているが、ヒト等の哺乳類に対しては未だに明確な結論は得られていない。一方で今日我々の生活は衣食住の全てにおいて「明らかな内分泌攪乱作用は認められない」と報告される化学物質に取り囲まれており、これらと無縁に生活することはほとんど不可能に近い。

魚貝類における生殖器分化への影響が実験的に証明された、代表的な内分泌攪乱物質であるビスフェノールAやノニルフェノールの哺乳類への影響評価は主にラットへの投与実験や培養細胞が使用されてきた。しかし生殖能への影響を評価するモデルとして多産で繁殖能の高いげっ歯類や培養細胞の使用が適しているとは言い難い。明確な結論が得られない一因としてヒトの生殖能への影響を評価する適切な実験系が存在しないと

という問題点が挙げられる。化学物質はサリドマイドの例に見られる様に分化した機能細胞より、未分化細胞、細胞の分化過程、器官や形態形成過程に大きな影響を与える場合がある。それ故、化学物質が細胞分化、形態形成に与える影響を評価するには細胞分化系を使用するのが適切である。報告者はこれまでマウスおよびサル ES 細胞の分化研究(神経、心筋、骨、脂肪)を行ってきた。その経験から ES 細胞の *in vitro* 分化系は、実験条件の変化に鋭敏に反応するため化合物が直接細胞分化に与える影響を調べるのに適しているという着想に至った。さらに本研究では分化を非侵襲に検出する方法としてレポーターを組み合わせて使用する。特に BAC(Bacterial artificial chromosome)クローンは 100kb 以上に渡る長い制御領域をクローン化できるため、導入時に組み込み部位の位置効果を受けず、内在性遺伝子と同じ時空間的な発現パターンを示すことが期待できるという利点がある。そこで生殖細胞に特異的に発現する分化マーカー Vasa, Sox9 遺伝子の BAC クローンにレポーターとして蛍光蛋白 GFP, RFP 遺伝子を組込んだ BAC ベクターを複製し、ES 細胞に導入する。この BAC 導入 ES 細胞を化学物質の存在下で生殖細胞に分化させ、レポーターを発現する細胞数の変化を指標として化合物が生殖細胞や性分化に与える影響を容易にかつ定量的に評価するシステムを構築するものである。

2. 研究の目的

魚貝類では内分泌攪乱物質が生殖能に影響するという明確な実験結果が得られている。一方で、ヒトに対する影響はアレルギーや男性不妊への関与が指摘されているにも関わらず、未だに明らかにされていない。これは実験の再現性が乏しく、統一した結果が得られないためである。しかし哺乳動物において、生殖細胞に影響するという実験結果が得られている事も事実である。生殖細胞への影響は、次世代に及ぶという人類にとって非常に深刻な問題であるため、その正確な評価と対策は急務である。明確な結論が得られない一因として、これまでヒトの生殖能への影響を評価する適切な実験系がなかったという問題点が挙げられる。本研究は、ES 細胞の *in vitro* 分化系を内分泌攪乱物質の評価に応用し、化学物質が哺乳動物の生殖細胞および性分化に直接与える影響を明らかにするという観点から、これらの議論に終止符を打つとするものである。

すなわち生殖細胞特異的遺伝子のプロモーター制御下で GFP, RFP をレポーターとして発現するベクターを構築し、ES 細胞に導入する。この ES 細胞を化学物質の存在下で生殖細胞に分化させた際、レポーターを発現する

細胞数の変化でその影響を判断する事を目的としている。

具体的には BAC-Vasa-RFP(GFP)ベクターを導入したマウスおよびサル ES 細胞を生殖細胞へ分化させ、RFP(GFP)の発現をモニターすることにより、RFP(GFP)が生殖細胞への分化レポーターとして使用可能なことを確認する。次にこの分化系において合成化合物(ビスフェノール A やノニルフェノールおよびそれらの誘導体)を添加し、これら化合物が RFP(GFP)発現細胞(生殖細胞への分化)の出現率に与える影響を調べる。この結果を配偶子形成に対する新たな指標として、これら化合物の危険度としての表示を試みる。同時に化学物質影響をより鋭敏に検出できる遺伝子の探索を行い、レポーターベクターを複製し、感度の高いシステムの構築を目指す。

またビスフェノール A の誘導体、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル(BADGE)は脂肪細胞分化の鍵となる転写因子 PPAR γ のアンタゴニストであることがわかっている。すなわちこれらの化学物質は生殖細胞のみならず様々な細胞分化に影響する可能性がある。そこで、同様なレポーターシステムを脂肪細胞、骨芽細胞への分化系においても構築する。近年問題となっている肥満や骨粗鬆症に対する環境化学物質の影響を解明し、肥満防止薬の検索等の創薬分野へ応用可能な基盤技術の構築を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) BAC-RFP ベクターの構築

マウスおよびヒトの Vasa 遺伝子のジェノミッククローンを BAC ライブラリーから単離し、Red/ET Recombination system を使用してエクソンに RFP (赤色蛍光蛋白) 発現カセット、薬剤耐性遺伝子を組み込む。ベクターを制限酵素で直線化し、マウス ES 細胞に導入する。

(2) 生殖細胞への *in vitro* 分化

ES 細胞を単独または BMP4 生産細胞と凝集させ胚様体を形成させる。この状態で数日~1 週間浮遊培養を行い、RFP を発現する細胞が出現することを蛍光顕微鏡で観察する。同時に未分化マーカー遺伝子 (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*)、生殖細胞関連遺伝子 (*Blimp1*, *Prdm14*, *Fragilis*, *Stella*, *Gcna1*, *Sycp3*, *Stra8*, *Vasa*, *Dazl*, *Spo11*, *Tnp1* など)、精巣体細胞マーカー (*Fshr*, *Lhr*, *Star*, *Sox9*) の経時的発現を real time PCR を用いて調べその分化段階を明らかにする。また Vasa 抗体および他の始原生殖細胞マーカー (germ cell nuclear antigen 1, synaptonemal complex protein 3) 抗体での染色を行い、real time PCR の結果と比較すると共に生殖細胞分化を確認する。

(3) ビスフェノール A (BPA) が生殖細胞分

化に与える影響

確立した ES 細胞の分化系において様々な濃度 (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) の BPA の存在下で、レポーター導入 ES 細胞の生殖細胞への分化実験を行い、RFP 陽性細胞出現数の変化を FACS 解析、および生殖細胞マーカーの発現を real time PCR により測定する。本実験によりレポーター導入 ES 細胞の分化を利用して、化学物質が生殖細胞分化に与える影響を蛍光として検出できるかを明らかにする (図 1)。

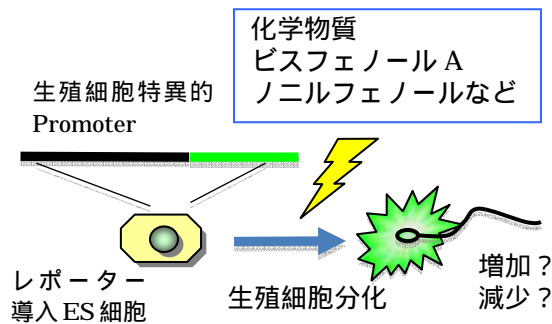


図 1 レポーター-ES 細胞を用いた化学物質評価システム

(4) 再現性の高い評価系の構築

EB 作成時の条件により生殖細胞関連遺伝子の発現が大きく変動する可能性が考えられる。そこで再現性の高い均一な EB を作成するため、マイクロウェルプレートの使用を試みる。数種のマイクロウェルを使用し、生殖細胞関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析し、再現性の高い評価系の構築を行う。

(5) 化学物質に鋭敏に反応する遺伝子探索
生殖細胞関連遺伝子の発現解析の過程において、これまで注目してきた *Vasa* 遺伝子よりも反応性の高い遺伝子の抽出を試みる。

(6) 化学物質高感受性遺伝子のプロモーターを使用した検出ベクターの構築

化学物質高感受性遺伝子のプロモーター配列を PCR で取得し、その制御下で検出感度の高い蛍光タンパク質 Venus を発現するベクターを構築する。さらに当該ベクターを ES 細胞に導入し、環境化学物質の存在で蛍光を発する再現性の高い評価系の構築を行うと共に環境化学物質が生殖細胞分化に与える影響を明らかにする。さらに Venus 発現細胞を FACS により単離し、他の生殖細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR、蛍光染色、分化培養による生殖細胞への分化を調べる。

(7) BPA などの環境化学物質が生殖細胞分化に与える影響

様々な濃度 (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M,

50 μ M) の BPA の存在下で、新たに作製した高感受性レポーター導入 ES 細胞の生殖細胞への分化実験を行い、Venus 陽性細胞出現数の変化を FACS 解析、および生殖細胞マーカーの発現を real time PCR により測定する。本実験によりレポーター導入 ES 細胞の分化を利用して、化学物質の影響を評価するシステムが機能するか否かを明らかにする。

これが可能であれば化学物質が生殖細胞分化に与える影響を定量的に解析し、危険度としての数値化を試みる。

4. 研究成果

(1) ヒト *Vasa* 遺伝子を含む BAC クローンに Red/ET Recombination system を使用してエクソンに RFP (赤色蛍光蛋白) 発現カセット、薬剤耐性遺伝子を組込んだ。このベクターを制限酵素で直線化し、マウス、およびサル ES 細胞への導入を行い、薬剤耐性クローンを複数選抜した。それぞれからジェノミック DNA を調整し、RFP の組み込みを指標として調べた結果、BAC ベクターが組み込まれた ES 細胞株を数クローン得た。

これらを用い、生殖細胞への分化実験を行った。生殖細胞マーカー *Vasa* はマウスおよびサル ES 細胞において既に発現が認められることがわかった。マウス ES 細胞において RFP 発現細胞は 1 つのコロニーにモザイク状で存在するよりもコロニー全体が一様に RFP を発現している場合が多かった。この結果は一旦 RFP を発現するとその発現が維持されるためと考えられた。

単独または BMP4 生産細胞と凝集させ胚様体を形成させて RFP の発現をモニターした結果、マウス ES 細胞では明らかな RFP の発現が認められた。

しかしマウス ES 細胞の分化系は非常に環境の影響を受けやすく、鋭敏であるため、逆に再現性に問題があることが明らかとなった。特に環境化学物質存在下において、EB 作成時の条件により、*Vasa* の発現が大きく変動し、そのコントロールが困難な場合が認められた。その結果、*Vasa* をレポーター遺伝子に置き換えたとき、実験間の変動がレポーター遺伝子発現の変化を打ち消してしまう場合が認められた。

そこで、再現性のある分化条件を検討した結果、マイクロウェルプレートを使用して均一な大きさの EB を形成させることが重要であることがわかった。

一方サル ES 細胞株では少数の細胞に RFP の発現は認められるものの、分化に伴い明確な発現増加は認められなかった。BMP4 生産細胞との共存下で分化実験を行った場合でも、蛍光を発現する細胞の顕著な増加は認められなかった。そこでサル ES 細胞の生殖細胞

分化過程を把握するため、*Vasa*をはじめとする分化に伴う様々な生殖細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR により解析した。その結果、生殖細胞分化は進行し、*Vasa*の発現上昇が認められるもののRFPの発現としては反映されない事が明らかとなった。

(2) 以上の実験から*Vasa*レポーターでは環境化学物質の影響評価において十分な感度が得られないという結果が得られた。そこでリアルタイム PCR により、*Vasa* 遺伝子より生殖細胞分化過程において変動の大きい関連遺伝子の探索を行った。*Prdm14*はコントロール EB において継時的に発現が減少しているが、BPA 処理した EB では発現の減少は見られなかった。一方で、*Oct4*や*Blimp1*はコントロールと差は認められなかった。BPAは生殖細胞マーカーの発現に対して影響を与える遺伝子が認められた。特に、分化培養7日目においてコントロールに比べ、BPA 処理で発現が増加する遺伝子が認められた(図2)。一方*Vasa*及び*Piwi2*は顕著な発現変化は見られなかった。BPAはライディッヒ細胞マーカーである*Star*の発現変化を起こさなかったが、セルトリ細胞マーカーである*Sox9*は分化培養7、10日目でBPAが発現を増加させないことが確認された。減数分裂マーカーの*Spo11*や精細胞マーカーの*Tnp1*はES細胞及びEBで検出されなかった。

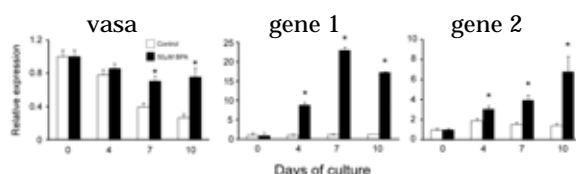


図2 BPAが遺伝子発現に及ぼす影響

以上の解析により、BPAの存在下において、*Vasa* 遺伝子よりも鋭敏に発現が変化する生殖細胞関連遺伝子を見いだすことができた。BPA存在下で分化させると、この遺伝子の発現は約10-20倍上昇した。一方でこの発現上昇はBPA濃度が50µMという比較的高い濃度でのみ認められた。さらにBPAはこの遺伝子の発現を制御する遺伝子群の発現にも影響することも明らかとなった。マイクロウェルプレートを使用し、環境化学物質(BPA)の存在下でES細胞を分化させた際、これらの遺伝子は*Vasa* 遺伝子よりBPAに対し、鋭敏にかつ再現性良く反応した。

すなわちこれまで注目してきた*Vasa*遺伝子よりも反応性の高い遺伝子を見いだすことができたとともに再現性の良いES細胞分化システムの構築を行うことができた。次に、検出感度を上げるため、これらの化学物質高感受性遺伝子のプロモーター配列をPCRで取得し、

その制御下で高感度の蛍光タンパク質Venusを発現するベクターの構築を行った。

このベクターをマウスES細胞へ導入して得られたレポーター導入株は、未分化状態では蛍光を發せず、化学物質存在下においてのみ再現性良くVenusを発現した。

そこでこのレポーター導入ES細胞株を化学物質(レチノイン酸)の存在下で培養後、蛍光観察に加え、FACSによるVenusの発現解析を行った。その結果、化学物質の濃度依存的に蛍光強度が上昇し、化学物質の存在、およびその濃度を推定することが可能であることが示された(図3)。すなわち当初の目的であったES細胞を化学物質のセンサーとして使用し、蛍光強度により化学物質を評価するシステムが構築できた。

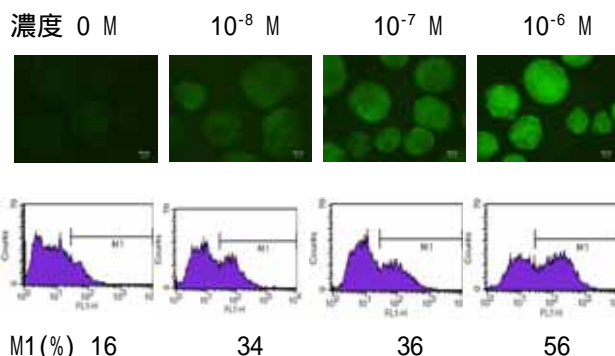


図3 化学物質の濃度とレポーター発現

さらに本評価系でニルフェノール(NP)の検出を試したところ、蛍光強度を上昇させることが示された。この結果は、NPが生殖細胞分化に影響する可能性を示唆すると共に、本評価系でNPの存在を検出することが可能であることを示すものである。遺伝子発現は10µM NPで認められたこと等からRARの関与が示唆された。一方で、さらなる検出感度の改善が今後の課題として示された。

以上、本研究により、レポーターを導入したES細胞を用いて、化学物質の存在、濃度を評価するシステム基盤を構築することができた。

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11件)

Ando M., Nishida H., Ueda K., Itoh K., Okamoto Y., Kojima N
oligoselenodiglutathiones and their suppressive effects on oxidative DNA damage induced by catechol and copper
J. Health Sci. 査読有, 57, 2011, 72-77
Suzuki N., Liu X., Laxmi Y.R.S.,

Okamoto K., Kim H.J., Zhang G., Chen J.J., Okamoto Y., Shibutani S. Anti-breast cancer potential of SS5020, a novel benzopyran antiestrogen Int. J. Cancer 査読有, 128, 2011, 974-982
Ando M., Nishida H., Nishino Y., Ohbayashi M., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N. Carbonyl side-chain of catechol compounds is a key structure for the suppression of copper-associated oxidative DNA damage in vitro Toxicol. Lett. 査読有, 199, 2010, 213-217
Nishida H., Ando M., Itoh K., Ueda K., Nishida Y., Okamoto Y., Toda C., Kojima N. Production of polyselenodipenicillamines, unique selenium compounds Chem. Pharm. Bull. 査読有, 58, 2010, 957-960
Laxmi YR, Liu X, Suzuki N, Kim SY, Okamoto K, Kim HJ, Zhang G, Chen JJ, Okamoto Y., Shibutani S. Anti-breast cancer potential of SS1020, a novel antiestrogen lacking estrogenic and genotoxic actions Int J Cancer 査読有, 127, 2010, 1718-26
Okamoto Y., Liu X, Suzuki N, Okamoto K, Kim HJ, Laxmi YR, Sayama K, Shibutani S. Equine estrogen-induced mammary tumors in rats Toxicol Lett. 査読有, 193, 2010, 224-8
Ugi, S., Shi, K., Nishio, Y., Shimizu, S., Guo, B., Sekine, O., Ikeda, K., Egawa, K., Yoshizaki, T., Nagai, Y., Koya, D., Takada, T., Torii, R., Kimura, H., Kashiwagi, A., and Maegawa, H. Membrane localization of protein-tyrosine phosphatase 1B is essential for its activation of sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression and consequent hypertriglyceridaemia. J. Biochem. 査読有, 146, 2009, 541-547
Okamoto Y., Liu X, Suzuki N, Okamoto K, Sekimoto M, Laxmi Y.R.S., Shibutani S Increased antitumor potential of the raloxifene prodrug, raloxifene diphosphate Int. J. Cancer 査読有, 112, 2008 2142-2147
Okamoto Y. Chou P.H, Kim S.Y., Suzuki N, Laxmi Y. R. S., Okamoto K, Liu X, Matsuda T, Shibutani S

Oxidative DNA damage in XPC-knockout and its wild mice treated with equine estrogen. Chem. Res. Toxicol 査読有, 21, 2008, 1120-1124
Okamoto Y., T. Hayashi T, Matsunami S, Ueda K, Kojima N. Combined activation of methyl paraben by light irradiation and esterase metabolism toward oxidative DNA damage Chem. Res. Toxicol. 査読有, 21, 2008, 1594-1599
Kobayashi M., Takada T., Takahashi K., Noda Y., and Torii R. BMP4 induces primitive endoderm but not trophectoderm in monkey embryonic stem cells Cloning Stem Cells 査読有, 10, 2008 495-502

[学会発表](計10件)

青木智弘、高田達之
Bisphenol AがES細胞の生殖細胞分化に与える影響
第38回日本トキシコロジー学会学術年会
7/11-13, 2011(発表確定・発表日未定)
パシフィコ横浜(神奈川県)
Takada T., Shimozawa N., Noce T., Suemori H., Ohta Y.
Expression of post-meiotic markers during differentiation of non-human primate ES cells *in vitro*
9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research
June 17, 2011
Tronto, Canada
青木智弘、高田達之
マウスES細胞の生殖細胞分化におけるBisphenolAの影響
第13回日本内分泌攪乱化学物質学会
12/17, 2010
東京大学(東京都)
太田康夫、下澤律浩、未盛博文、野瀬俊明、高田達之
カニクイザルES細胞における生殖細胞分化
第33回日本分子生物学会、第83回日本生化学会、合同大会、神戸国際展示場(兵庫県) 2010(12/9)
太田康夫、下澤律浩、野瀬俊明、高田達之
Non-human primate ES細胞の生殖細胞分化
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」生殖サイクル若手勉強会
2010、つくばグランドホテル(茨城) 2010(7/22)
Ohta Y., Shimozawa N., Noce T., Suemori

H., Takada T.
Expression of post-meiotic markers during differentiation of non-human primate ES cells *in vitro*
International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells

九州大学(福岡県), Nov 23, 2010
太田康夫、橋本圭史、青木智弘、岡本誉士典、鳥居隆三、野瀬俊明、高田達之
Non-human primate ES細胞の分化過程における生殖細胞マーカー遺伝子の発現変化
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」
第2回公開シンポジウム、コクヨホール(東京都) 2009 (11/27)

太田康夫、橋本圭史、青木智弘、岡本誉士典、鳥居隆三、野瀬俊明、高田達之
Non-human primate ES細胞の生殖細胞への分化
文部科学省・科学研究費補助金・特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」生殖サイクル若手勉強会
2009、御殿場高原ホテル(静岡県) 2009 (8/28)

Takada T., Masuda C., Okamoto Y., Tooyama I., Kato M., and Hirabayashi M.
Derivation of rat cell line which contribute to visceral yolk sac
7th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research
Barcelona, Spain, July 10, 2009

小林昌、高田達之、高橋健太郎、野田洋一、鳥居隆三
BMP4 はカニクイザル ES細胞を primitive endoderm へ分化させる
第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会、合同大会、神戸ポートアイランド(兵庫県) 2008 (12/10)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：遺伝子中のメチル化塩基の迅速・超高感度分析法

発明者：高田達之、小嶋仲夫、岡本誉士典

権利者：立命館大学、名城大学

種類：特許

番号：特願 2011-102765

出願年月日：2011年5月2日

国内外の別：国内

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

<http://www.collabo.sk.ritsumeai.ac.jp/laboratory/takada.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 達之 (TAKADA TATSUYUKI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90206756

(2) 研究分担者

岡本 誉士典 (OKAMOTO YOSHINORI)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：50512323

(3) 連携研究者

野瀬俊明 (NOCE TOSHIAKI)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任教授

研究者番号：70183902