

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790407

研究課題名（和文） マウス胚性幹細胞を用いた新規薬物毒性評価系の構築

研究課題名（英文） Establishment of new toxicity test using mouse ES cells

研究代表者 草川森士（KUSAKAWA SHINNJI）

国立成育医療センター（研究所）・薬剤治療研究部 ・ 共同研究員

研究者番号：80462802

研究成果の概要（和文）：

マウス胚性幹細胞（ES 細胞）の分化誘導・発生毒性解析系の確立のため、ドイツの研究グループによって考案されたマウス ES 細胞を用いた発生毒性試験（Embryonic stem cell test: EST 法）の改良を行い、薬剤の組織特異的な発生毒性評価を可能とする試験系を確立した。この毒性試験を応用し、抗うつ剤 SSRI を試験薬剤として発生毒性評価を行ったところ、代表的な SSRI、フルオキセチンが胎児毒性を持つことを示唆する結果が得られた。さらに、フルオキセチンは神経系の発生に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The embryonic stem cell test (EST) is an *in vitro* toxicity assay that assesses the ability of drugs and chemical compounds to inhibit the differentiation of ES cells into cardiomyocytes, and has been validated as an *in vitro* developmental toxicity test. We have developed an assay system based on the conventional EST, and tested this *in vitro* system by evaluating the embryotoxicity of antidepressant drugs (SSRIs) which have been reported as *in vivo* teratogens. In our studies, we added a molecular endpoint of differentiation to the conventional EST and attempted to characterize the tissue-specific embryotoxicity of these drugs by analyzing the gene expression of the tissue-specific markers as well as by conducting a histological and immunocytochemical study in the mouse ES cell differentiation system. These analyses revealed that fluoxetine, a prototypical SSRI, has potent tissue-specific embryotoxicity. Since these corresponds with the known *in vivo* teratology of these drugs, we concluded that our assay system is useful for predicting the degree of embryotoxicity of teratogens, and that it can be used to estimate the *in vivo* embryotoxic effects of various medicines quickly and accurately. However, further improvements, such as addition of new endpoints and expansion of test system, are necessary for optimized embryotoxicity test method. Thus, we have adopted a neural ES cell differentiation assay and conducted qualitative and/or quantitative analysis of the extent of differentiation by means of a GFP or a luciferase reporter assay. We previously found that fluoxetine induced fluctuations of ectodermal marker gene expression during ES cells differentiation from embryoid bodies, suggesting that fluoxetine may affect neural tissue development. Therefore, we further investigated the effect of fluoxetine in differentiation from ES cells to neural cells using the stromal cell-derived inducing activity (SDIA) method in this study and revealed that fluoxetine predominantly promotes the expression of glial cell lineage genetic markers during neural differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：医薬品副作用・薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

私たちの身の回りには医薬品、農薬、化粧品など多様な化学物質が存在するが、これらのヒトに対する安全性評価は多岐に渡り行われている。中でも、生殖発生毒性試験は、サリドマイド薬害をきっかけにその重要性が認識されるようになり、成人における配偶子形成、生殖機能、さらに、次世代の発生及び成長といった、世代を越えた幅広い影響が評価される。特に、次世代(胎児)の形態的な異常を検出する催奇形性試験は、生殖発生毒性試験の中で最も重要視されている。胎児や小児など成長過程の個体に対する薬物の影響をヒトで試験することは事実上不可能であるので、一般の毒性試験は動物を用いて研究されている。しかしながら、動物実験は膨大なコストと時間を要するものであり、加えて、動物愛護の観点からも世界的に縮小の傾向にある。このような背景から、動物実験に代わる様々な試験法の模索が続けられている。近年、動物実験の代替法として、細胞を用いた *in vitro* 薬剤毒性試験、特に生殖発生試験が様々な細胞を用いて試みられ、その有用性についてのバリデーションテストが行われてきている。その中でもドイツ連邦リスク評価研究所の Dr.Spielmann らによって考案された、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた Embryonic stem cell test (EST 法) は、その有効性が確認され、既にヨーロッパの製薬企業において実用化されている方法である。ES 細胞は、未分化な状態を維持したまま無限に増殖し続ける全能性を有する細胞であり、様々な細胞に分化することが可能である。ES 細胞を各組織へ分化誘導する実験系は、個体の初期発生及び器官形成を模倣したものと考えられ、毒性試験へ応用することで、薬物の催奇形性評価に適した良い *in vitro* のモデルとして考えられている。申請者が所属するグループでは、動物実験を補完しうる、迅速かつ安価で特異性・感受性の高い新たな発生毒性試験法の構築の一環として、マウス ES 細胞の分化誘導・発生毒性解析系の確立に取り組んできた。既に、バルプロ酸やカルマバゼピン等の抗けいれん剤の毒性やそのメカニズムについて解析し、報告を行っている。従来の EST 法であった心筋細胞への

分化誘導系を利用した毒性評価に加え、分化の指標として、組織特異的分化マーカーの利用を積極的に取り入れ、毒性発現に対応して変化する遺伝子、タンパク質の発現レベルの解析をするという改良点に加えられたことで、この試験法の有用性が確認されている。今後は、EST 法の最適化を目指し、さらなる改良点を加えるだけでなく、薬物の毒性作用機序解明への応用を試みていく。具体的には、1. 新たな検出系を加え、より精度の高いものにする。2. ES 細胞の特徴を活かし、様々な組織への分化誘導法を確立し、発生毒性試験の幅を広げていく。3. 毒性発現機構の解明への応用を試みる。

2. 研究の目的

マウス ES 細胞を用いる EST 法は、ヨーロッパの研究機関のバリデーションテストによって有用性が証明され、簡便性・迅速性に優れた発生毒性試験法である。しかしながら、従来の EST 法は、試験項目を細胞の生存率と心筋細胞の分化効率に絞って行うため、心筋以外のどの組織がより薬物によって影響を受けるのか、薬物の毒性の具体的な性質を予想することができなかった。この問題を解決するため、各組織特異的な分化マーカー遺伝子に解析に着手し、薬物が発生段階の個々の組織に与える特異的な影響を、分子レベルでの解析が試みられてきた。この EST 法をさらに発展させれば、様々な薬物の組織特異的な発生毒性を *in vitro* で効率良く解析することが可能となり、医薬品開発の迅速化、コスト削減に寄与するものと考えられる。また、本研究における、GFP 遺伝子を導入した ES 細胞を確立し、発生毒性試験に用いるという試みは、ES 細胞の分化の程度を定量化することも可能となり、EST 法の精度を大きく高めるものと考えられる。さらに、マウス ES 細胞の各組織分化誘導法を構築し、毒性試験へ応用するという試みは、各組織の発生・分化に与える薬物の影響を詳細に検討することが可能となり、発生毒性試験の幅を大きく広げることになる。例えば、これまで神経の発生・分化に与える薬物の影響を調べられる試験系は開発されてこなかった。マウス ES 細胞の神経分化誘導法、

及び毒性試験への応用が確立されれば、副作用として神経系を傷害する薬剤として知られる抗精神病薬、睡眠薬、抗ガン剤、抗生物質、抗てんかん薬など、神経の初期発生に与える反応を分子レベルで詳細に調べられるようになる。また、新たに開発される医薬品や化学物質などの神経発生毒性を簡便に予測できるようになることが期待できる。

3. 研究の方法

1. EST 法による化学物質・薬物の毒性評価

マウス ES 細胞は高栄養条件下で培養すると特別な誘導を行わなくても自然に心筋細胞に分化し、その自律的収縮運動によって細胞の存在を容易に検知できる。EST 法は、このようなマウス ES 細胞の特性を利用した評価方法であり、培養系に直接薬物を加えることにより、薬物の細胞生存率、および心筋細胞への分化過程に与える影響を調べることにより、発生毒性評価を行う方法である。

1-1 細胞毒性試験

マウス ES 細胞、および成熟細胞のコントロールとして NIH-3T3 細胞を 1.0×10^4 個/ml になるように懸濁し、96 ウェルマルチプレートの各ウェルに 50 μ l ずつ分注した。37°C で 2 時間培養し、150 μ l の薬物添加培地を加え、3 日目、5 日目にそれぞれ同濃度の薬物添加培地で交換をした後、10 日目に MTT アッセイにより、細胞のミトコンドリア内脱水素酵素により生成された青紫色のフォルマザンの呈色を 570 nm の吸光度として定量した。薬剤非添加条件の吸光度を 100% としたときの薬物添加時の吸光度の割合を計算し、 IC_{50} : 50% 生存阻害濃度を求めた。

1-2 分化抑制試験

薬物を様々な濃度で添加した培養液にマウス ES 細胞を 3.75×10^4 個/ml になるように懸濁し、ディッシュの蓋の内面に 700 個/20 μ l の懸濁液を作製した。蓋を裏返してディッシュに被せ、湿潤状態、37°C で 3 日間頭滴培養した。この間、ES 細胞は液滴の底に沈み、細胞同士が凝集して球形の胚様体 (embryoid bodies: EBs) を形成した。この胚様体をさらに 2 日間、浮遊培養すると球形の凝集体を保ったまま増殖成長した。これを 24 ウェルマルチプレートの各ウェルに 1 個ずつ移し、静置培養し、5 日後に倒立方位相差顕微鏡にて各ウェル毎の心筋細胞の鼓動の有無を調べた。ES 細胞の分化度は、細胞の鼓動を認めるウェル数の割合をすべてのウェル数の百分率から算出し、 ID_{50} : 50% 分化阻害濃度を求めた。

1-3 発生毒性のクラス分け

分化抑制試験、細胞毒性試験によりそれぞれ求められた ID_{50} 、 IC_{50} を図 3 のモデル式に代入し、最終的にクラス 1-無毒性、クラス 2-弱毒性、クラス 3-強毒性に区分した。

2. ES 細胞から神経細胞への分化系を利用した薬剤毒性試験法の開発及び評価

ES 細胞の分化に対する薬物の影響として、これまでは心筋細胞への分化誘導の系を用いていたが、分化の多方向性への影響を考慮し、心筋以外の別の組織として、神経細胞への分化誘導系を取り入れた。神経細胞への分化誘導法は、SDIA 法というマウス ES 細胞とストローマ細胞との共培養の系を取り入れ、薬剤添加試験の最適化に向けた条件検討を行った。外胚葉系への分化促進傾向が認められていた SSRI のフルオキセチンについて、組織特異的な影響をより詳細に解析するため、ES 細胞の神経分化過程にフルオキセチンを添加し、その影響を検討した。

2-1 SDIA 法による神経分化誘導

6 ウェルプレートで培養しコンフルエントに達したストローマ細胞 PA6 上に、マウス ES 細胞 129fc-1 を 2000 個/1 ウェルとなるように播種し、分化用培地 (GMEM、10% Knockout Serum Replacement (KSR)、2 mM glutamine、0.1 mM nonessential amino acids、0.1 mM 2-mercaptoethanol (2-ME)、1mM sodium pyruvate) で、共培養を開始した (0 日目)。培地交換は、4 日目、6 日目に行った。フルオキセチン (0、0.3、1 μ M) は、0、4、6 日目に添加した。

2-2 分化マーカー遺伝子の発現解析

神経分化誘導後 6、8 日目の細胞を回収し、RNA 抽出、逆転写による cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR 法によって遺伝子発現解析を行った。解析を行った遺伝子は以下の通りである。ニューロンマーカー (Nestin、Tuj1、Synaptophysin、TH、Nurr1)、グリア細胞マーカー (GFAP、Olig2、S100 β 、DM20、Vimentin)。

3. ES 細胞分化の定性的、定量的な解析

ES 細胞の分化に対する薬物の影響は、心筋細胞の拍動への影響を指標としているが、拍動していたか、していないかという拍動の有無のみの評価しかしておらず、分化の程度への影響は考慮されていない。分化の程度を定量的に評価する方法として、レポーターアッセイの系の利用などが考えられる。具体的には、組織特異的遺伝子のプロモーターによって、ルシフェラーゼや GFP といったレポーター遺伝子が活性化するように改変された ES 細胞を利用し、分化に伴って変動するレポーター遺伝子の発現を定量的に評価するという手法である。プレートリーダーを用い、蛍光や発光の解析を行

うことでハイスループットな解析も可能となり、さらに、より精度の高いID50値が得られことが期待される。

3-1 プラスミド構築

ラットのゲノム DNA より、ニューロンのマーカー遺伝子である Tubulin alpha 1 遺伝子のプロモーターを含む 1.1kb の領域を PCR で増幅、また、マウスのグリア細胞マーカー遺伝子 GFAP のプロモーターを持つ市販のベクターより、プロモーター部だけを PCR で増幅し、それぞれをプロモーターレスの GFP ベクター、ルシフェラーゼベクターにサブクローニングした。

3-2 マウス ES 細胞への遺伝子導入、安定発現株単離

上記のプラスミドベクターをリポフェクション法 (Lipofectamine 2000) により、マウス ES 細胞、129fe-1 細胞株へトランスフェクションし、G418 もしくは puromycin によるセレクションによって安定発現株を単離した。各ラインについて神経分化誘導を行い、レポーター遺伝子の発現を確認した。

4. 研究成果

細胞毒性試験において、ES 細胞、NIH-3T3 細胞共に、フルオキシセチンの濃度依存的な生存率の低下が観察された。生存曲線の傾きの違いから、細胞による薬物に対する感受性の違いも明らかとなった。また、分化抑制試験においても、マウス ES 細胞の心筋細胞への分化が、薬物の濃度依存的に抑制された。これら 2 つの試験によりそれぞれ求められた IC₅₀、ID₅₀ 値を EST 法の毒性予測式に代入し、毒性の区分を行ったところ、フルオキシセチンはクラス 3 の強毒性という結果が得られた。次に、フルオキシセチンの組織特異的な影響を検討するため、三胚葉分化マーカーの解析を行った。その結果、フルオキシセチンによる未分化マーカー遺伝子の発現上昇、内胚葉、中胚葉系マーカーの発現低下、外胚葉系マーカーの発現上昇が観察された。以上のようなフルオキシセチンの ES 細胞分化への影響、特に、中胚葉系、外胚葉系マーカーの発現への影響は、SSRI によって誘発される催奇形性として知られている、心房中隔欠損といった心血管系の異常、また、その他報告されている脳、頭蓋骨、消化管などの異常との関連を示唆するものと考えられた。以上のように、マウス ES 細胞を用いた EST 法、そしてそれを応用し遺伝子発現プロファイリング解析などを行うことは、薬物による毒性の予測を向上させる有効な試験系と考えられた。

続いて、EST 法の最適化を目的とし、さらなる改良に着手した。ES 細胞の分化に

対する薬物の影響として、これまでは心筋細胞への分化誘導の系を用いていたが、分化の多方向性への影響を考慮し、心筋以外の別の組織として、神経細胞への分化誘導系を取り入れ、薬物毒性試験への応用を試みた。ES 細胞の神経分化誘導法は神経細胞への分化誘導法は、SDIA 法というマウス ES 細胞とストローマ細胞との共培養の系を取り入れ、薬剤添加試験の最適化に向けた条件検討を行った。SDIA 法によるマウス ES 細胞の神経分化誘導は、神経様の突起の出現、ニューロンマーカー遺伝子、グリアマーカー遺伝子の発現が約 1 週間と比較的短期間で観察され、簡便で効率的な神経系細胞への分化誘導法であることが確認された。この系を用い、フルオキシセチン添加実験を試みた。その結果、フルオキシセチンによってニューロンマーカー遺伝子の発現低下、さらに、グリアマーカー遺伝子の発現増加が観察された。以上のように、SDIA 法を用い、この方法による分化している細胞での薬物の影響の観察は、胎児期における神経系の発達 (神経のみならずグリア細胞) への影響を観察するのに適した *in vitro* の系と考えられた。

EST 法の最適化に向けた取り組みとして、さらに、ES 細胞分化の定性的、定量的に解析する方法を検討した。組織特異的遺伝子のプロモーターによって、ルシフェラーゼや GFP といったレポーター遺伝子が活性化するように改変された ES 細胞の作成を行った。ニューロンのマーカー遺伝子である Tubulin alpha 1 遺伝子、グリア細胞マーカー遺伝子 GFAP、それぞれのプロモーターによって GFP もしくはルシフェラーゼ遺伝子が発現する ES 細胞が数ラインずつ単離し、分化特異的なレポーター遺伝子の発現も確認できた。この ES 細胞を用い、EST 法、特に神経分化誘導の系を用いた薬物毒性評価を行っている。

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 2 件)

草川森土, 宮本幸, 藤原葉子, 三部篤, 小出寛, 山内淳司, 田上昭人
マウス胚性幹細胞を利用した SSRI の発生毒性評価
日本小児臨床薬理学会雑誌 第 21 巻, 第 1 号, 2008 年

Kusakawa S, Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, and Tanoue A
Estimation of embryotoxic effect of fluoxetine using embryonic stem cell

differentiation system.
Life Sciences. 83: 871-877, 2008.

[学会発表] (計3件)
草川森土、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人
胚性幹細胞の神経分化過程における SSRI の影響
第32回日本神経科学大会、ポスター発表、名古屋、2009年9月

草川森土、田上昭人
Embryonic stem cell test (EST 法) を用いた薬剤の発生毒性評価
-抗てんかん剤、抗うつ剤の発生毒性評価-
第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、シンポジウム (ES, iPS 細胞を使用した代替法研究) (口頭発表)、大阪、2009年11月

草川森土、田上昭人
胚性幹細胞を用いた薬剤の発生毒性評価
第36回日本小児臨床薬理学会(口頭発表)、香川、2009年11月

[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:

草川森土 (KUSAKAWA, SHINNJI)
国立成育医療センター (研究所)・
薬剤治療研究部・共同研究員
研究者番号: 80462802

(2) 研究分担者 ()
研究者番号:

(3) 連携研究者 ()
研究者番号: