

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12199

研究課題名(和文) 多面的指標を用いた神経発達毒性の新たな評価系の構築

研究課題名(英文) Investigation of new evaluation system for neurodevelopmental toxicity using multifaceted indices

研究代表者

伊藤 智彦 (Ito, Tomohiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主任研究員

研究者番号：60391067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、神経発達症の発症率が増加してきており、環境中の化学物質曝露の影響が要因の一つとして懸念されている。本研究では、マウスES細胞を用いた神経発達毒性評価系の検討を目的とした。マウスES細胞由来の神経幹細胞を用い、動物曝露実験で神経発達毒性が報告されている殺虫剤を用いて検討を行った結果、神経幹細胞からグリア細胞への分化が顕著に抑制されることがわかった。この系におけるグリア細胞分化に対する影響は、これまで報告されているin vitroでの神経発達毒性影響と比べても非常に感受性が高いことがわかり、神経発達毒性のin vitroスクリーニング手法として有効であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経発達毒性は動物曝露実験により評価されるが、時間的、コスト的、動物愛護的観点から、より迅速なin vitro系でのスクリーニング評価が求められている。本研究で示したin vitro培養系におけるスクリーニング系により、より優先的評価物質を絞り込むことができると期待できる。また、これまで困難であった単一の培養系で多くの候補物質をとらえる可能性もあり、より迅速化が見込まれることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the incidence of neurodevelopmental disorders has been increasing, and one of the factors is concerned about the effects of exposure to chemical substances in the environment. The purpose of this study was to investigate a neurodevelopmental toxicity evaluation system using mouse ES cells. As a result, we found that the differentiation to glial cells was remarkably suppressed when cells were exposed to several insecticides during the stage of differentiation from neural stem cells to neural cells. The effect on glial cell differentiation in this in vitro system was found to be highly sensitive compared to previously reported neurodevelopmental toxicity effects, suggesting that it is an effective in vitro screening tool for neurodevelopmental toxicity.

研究分野：毒性

キーワード：発達神経毒性 環境汚染物質 マウスES細胞 殺虫剤 グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脳神経系疾患、特に自閉症などの神経発達症が増加してきている。脳神経系は様々な思考、記憶、学習、感情といった社会行動において必要不可欠な機能を担っている。高度な脳神経系の機能を獲得するには胎児や新生児期の発達期における組織の成長が重要であるが、神経発達症はこうした発達期において脳組織の成長に何らかの障害が起きることで現れると考えられる。神経発達症の増加の原因として懸念されている外部要因が、環境中の化学物質による曝露である。我々の生活環境中には無数の化学物質が存在しているため、環境汚染物質や新たに市場に出る化学物質に対して、神経発達毒性の評価対策が求められる。

神経発達毒性の評価は、動物曝露実験によって調べることが推奨されている。しかしながら、動物曝露実験は長期間のスケジュールや高コストのため、多くの物質を評価することは困難である。実際に、環境中に存在する多くの化学物質に対して神経発達毒性評価が未実施のままである。この理由から、より迅速で簡便に毒性の評価が可能な *in vitro* での評価系の開発が進んできている。例えば、米国内閣毒性プログラム (National Toxicity Program, NTP) では、*in vitro* を中心とした神経発達毒性評価のアクセシバタリーを発表している (文献 1)。また、欧州では、*in vitro* での神経発達毒性評価系のバタリーを OECD のガイダンス文章として公表している (文献 2)。一方で、現状の課題としては、脳神経系の発達は非常に多岐に渡り複雑であり、*in vitro* 系であらゆる神経毒性物質を検出することが難しいことが挙げられる。また、脳神経系の発達には様々な生体内現象が関与するため、一つの評価系で毒性を検出できないため、複数の評価系のバタリーが必要となってしまう。将来的には、より生体に近づけた評価系の開発や、包括的に影響をとらえられる検出力の高い系の開発が望まれると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、マウス ES 細胞を用いた新たな神経発達毒性の評価系の構築を目的とした。近年の *in vitro* の研究では殆どがヒト ES/iPS 細胞を活用したものとなっているが、分化誘導にやや時間を要する点や、神経発達毒性の主体となっている齧歯類での *in vivo* 解析との整合性が取りづらくなっている。一方で、マウス ES 細胞はより分化誘導が簡便で短期間で行える点や、将来的にはマウス個体との整合性が取りやすい。また、ヒト細胞では様々な遺伝的背景の異なった細胞が乱立しているが、マウス ES 細胞の場合は系統的に統一が可能という利点がある。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と分化誘導

C57BL/6 マウス ES 細胞 (B6G-2 または B6-6) は理研バイオリソースセンターから提供を受けた。マウス ES 細胞はゼラチンコートディッシュ上で、14% KSR、1% FBS、1 mM sodium pyruvate、0.1 mM beta-mercaptoethanol、LIF、1 μ M PD0325901、3 μ M CHIR99021 含有 GMEM 培地で維持を行った。2、3 日後、Accutase により継代を行い、バンバンカー (日本ジェネティクス) でストックを行った。

ストックから細胞を起こして 2 日目に継代を行い、3 日目に実験に使用した。マウス ES 細胞を Accutase で剥離後、15% KSR および 0.25 μ M LDN-193189 含有 DMEM に懸濁し、 1×10^4 cells/0.2 ml で低吸着性丸底 96 well plate (住友ベークライト) に播種した。培養 6 日目 (Day 6) に形成された胚様体 (EB) を回収し、TrypLE (Invitrogen) 中で 37、5 分、反応させた。ピペetting で single cell とした後、細胞を bFGF および EGF (各 20 ng/ml) 含有 RHB-A (TaKaRa Bio) に懸濁し、ポリオルニチン/ラミニンコートしたディッシュまたはマルチプレートに播種した。平面培養 4 日目 (Day 10) に継代を行い、更に 4 日目 (Day 14) まで神経幹細胞/神経前駆細胞として培養を行った。

神経細胞およびグリア細胞を含む神経系細胞への分化は、Day 6、Day 10、Day 14 の各未分化な細胞を 96 well plate に播種し、1 日後、等量の B27 含有 BrainPhys (STEMCELL Technologies) を添加し、4 日間培養することで行った。各化学物質は、分化と同時に添加して曝露した。

(2) リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

マウス ES 細胞由来の神経幹細胞/神経前駆細胞を bFGF および EGF 含有 RHB-A に懸濁後、48 well plate に 3×10^4 cells/0.1 ml で播種した。24 時間後、B27 含有 BrainPhys を等量添加することで分化を開始すると共に化学物質を曝露した。4 日後、NucleoSpin RNA (マッハライ・ナーゲル) で total RNA を抽出し、PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) で逆転写反応を行った。得られた cDNA は、GeneAmp SYBR[®] qPCR Mix α No ROX (ニッポンジーン) を用いて、Gapdh、Pax6、Map2、Gfap 遺伝子の発現量を解析した。リアルタイム PCR 反応は LightCycler[®] 96 (Roche) を用いて行い、Gapdh の発現量で補正して各遺伝子の相対的発現量を算出した。

(3) 細胞毒性の解析

96 well plate にマウス ES 細胞由来の神経幹細胞/神経前駆細胞を 1×10^4 cells/0.1 ml で播種し、24 時間後、分化を開始すると共に化学物質を曝露した。4 日後、CellCounting Kit-8 (DOJINDO) で生細胞を測定した。

(4) 免疫染色

96 well plate あるいは 48 well plate で培養した細胞をパラホルムアルデヒドで固定した。細胞を洗浄後、0.1% Triton X-100 で 15 分間、3% BSA で 1 時間、処置した。各一次抗体を室温で 1 時間、蛍光標識二次抗体で 1 時間反応させた。DAPI で核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200、オリンパス) で観察を行った。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞から神経系細胞への誘導

マウス ES 細胞から神経系への分化誘導については、様々な手法が報告されている。本研究では短期間で効率よく分化誘導が可能な RHB-A (TaKaRa Bio、文献 3) を用いた培養系を行った。また、マウス ES 細胞から誘導した神経幹細胞/神経前駆細胞をニューロスフィアで維持すると、初めは神経細胞分化能だけを有するが、継代によりグリア細胞分化能への移行が起こることが報告されており (文献 4) こうした *in vivo* での発生期で見られる現象も再現されるかも調べた。まず初めに、マウス ES 細胞から神経系細胞への分化誘導を、文献に従って RHB-A による平面培養で行った。しかしながら、非常に細胞が剥がれやすく、安定しなかったため、安定的に神経系への誘導が行えるよう初めに浮遊条件で 6 日間、EB を形成させて三胚葉から外胚葉を誘導させた。その後、成長因子を含む RHB-A を用いた平面培養で神経系列の細胞へ成長させることを試みた (図 1 a)。その結果、神経幹細胞のマーカである Pax6 および Nestin 遺伝子が未分化 (Day 0) および EB (Day 6) と比して RHB-A で培養した Day 10 および Day 14 で急激に増加することが確認された (図 1 b)。また、免疫染色によるタンパクレベルでの解析においても、Pax6 の高発現が確認された (図 1 c)。同様に RHB-A を用いて浮遊条件で神経幹細胞/神経前駆細胞をニューロスフィアで培養する方法で検討したが、増殖が非常に遅かった。そのことから、多能性状態から初めに EB を形成させた後、RHB-A による平面培養で維持する方法が効率的な培養法であると考えられた。

更に、得られた Pax6 陽性神経幹細胞/神経前駆細胞から神経系細胞への分化を行った。文献 4 を参考に、Day 10 で初めに得られる神経前駆細胞 (NPC) をプライマリーNPC、Day 14 のものをセカンダリーNPC とした。各 NPC から BrainPhys を用いて分化を行ったところ、プライマリーNPC からは高い神経細胞マーカである Map2 の発現が見られたが、グリア細胞マーカである Gfap の誘導は弱かった (図 1 d)。一方で、セカンダリーNPC から分化させた場合には、非常に強い Gfap の誘導が認められた (図 1 d)。このことから、RHB-A を用いた本培養系においても、*in vivo* と同様に、神経幹細胞/神経前駆細胞の neurogenesis から gliogenesis への移行が見ることがわかった。一方で、神経細胞マーカである Map2 はプライマリーおよびセカンダリーNPC の段階から高くなっており、自発的な分化が起きてしまっているものと推測されたが、NPC 自体は増殖して維持が可能であり、分化能は保持しているものと考えられた。

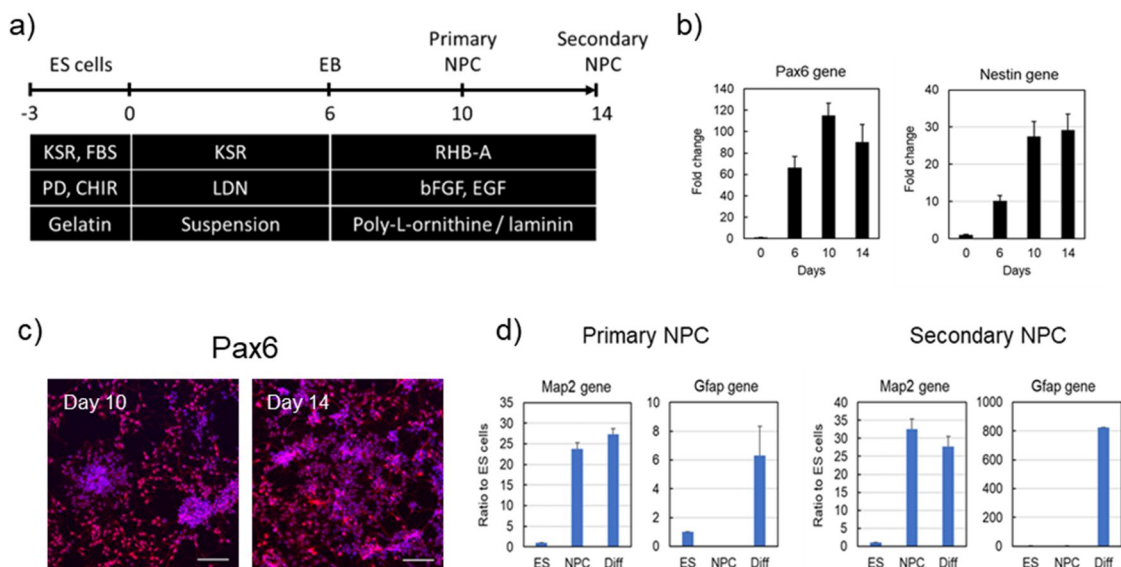


図 1 . マウス ES 細胞から神経系列への誘導

(2) 神経系細胞の分化に対する殺虫剤曝露の影響

次に、本マウス ES 細胞を用いた神経発達培養モデルにおいて、化学物質曝露影響の検討を行った。(1)の結果から、グリア細胞への分化誘導に対する影響はセカンダリーNPC からの分化条件で行った。一方で、神経細胞については NPC の段階からマーカの発現が高くなってしまっ

たため、Map2 の発現が低い Day 6 EB から神経細胞への分化のタイミングで行うこととした。本研究では、化学物質として、神経発達毒性が報告されている各種の殺虫剤、chlorpyrifos (有機リン系) DDT (有機塩素系) rotenone (フェニルプロパノイド系) carbaryl (カルバメート系) deltamethrin (ピレスロイド系) imidacloprid (ネオニコチノイド系) の影響を検討した。

まず、Day 6 EB から神経細胞へ分化させると同時に、上記 6 種の殺虫剤を曝露した。4 日後、細胞毒性および神経細胞マーカーの Map2 の測定を行った。その結果、Imidacloprid 以外は濃度依存的に生細胞の現象が見られ、細胞毒性が現れた (図 2 a)。Map2 遺伝子の誘導は生細胞値と同様かより緩やかに減少したが、全ての殺虫剤において Map2 誘導が低下する濃度は細胞毒性が現れるのと同程度かそれよりも高い濃度であったため、これらの殺虫剤は神経細胞への分化を直接的に抑制するのではなく、細胞毒性により Map2 の誘導が抑制されているものと考えられた。

次に、セカンダリーNPC を用いてグリア細胞への分化に対する影響を調べた。その結果、全ての殺虫剤で Gfap 誘導の抑制効果が見られたが、いずれにおいても、生細胞の減少よりも低濃度で Gfap 発現量の低下が起こることがわかった (図 2 b)。そのことから、これら殺虫剤は細胞毒性を示さない低濃度から、グリア細胞への分化を抑制していることがわかった。特に、Chlorpyrifos と Deltamethrin の影響が顕著であり、影響が弱い Imidacloprid においても Gfap の低下が見られた。

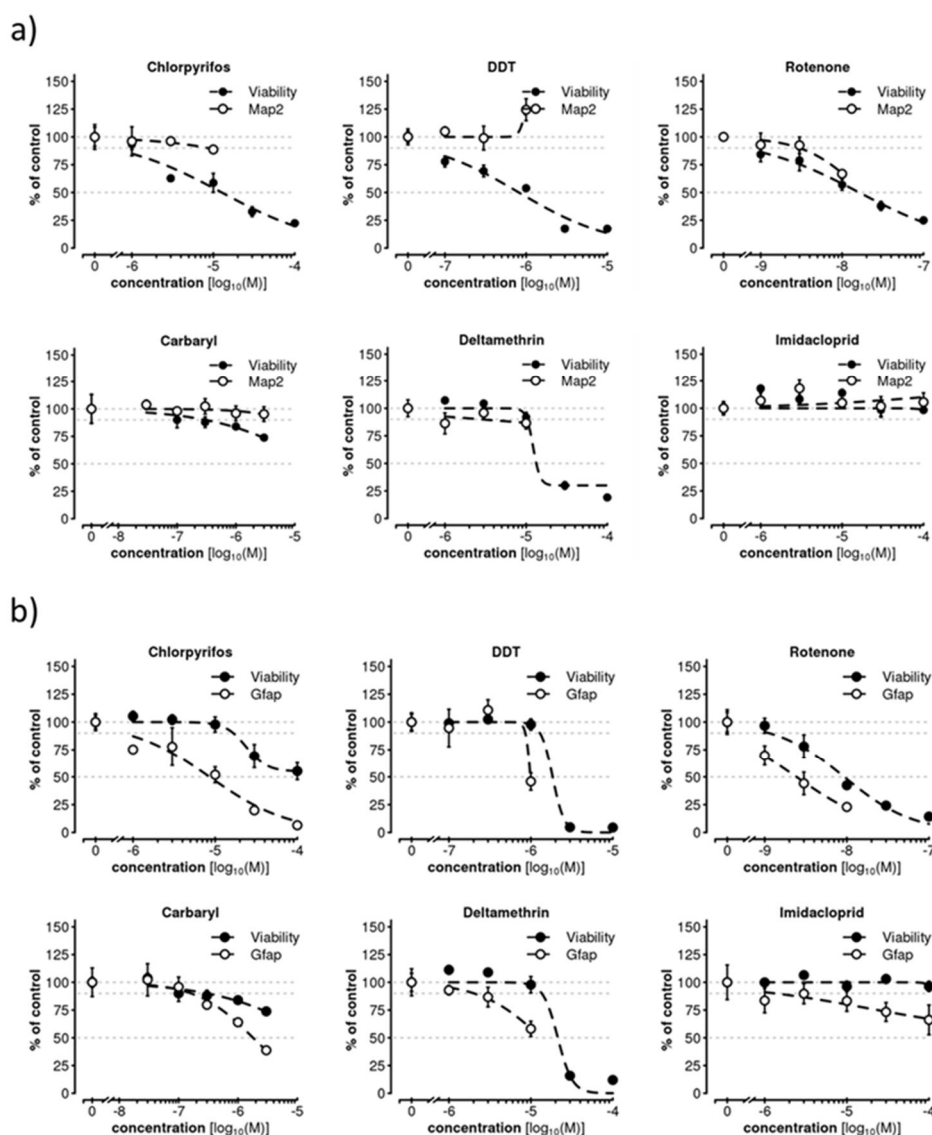


図 2 . 神経細胞およびグリア細胞分化に対する殺虫剤曝露の影響

(3) 毒性の定量化

上記実験で得られた各殺虫剤による Gfap の影響および細胞毒性について、定量化を行った。まず、細胞毒性および Gfap 発現量の濃度依存性データから、ベンチマークドーズ計算プログラム BMC (<http://invitrotox.uni-konstanz.de/BMceasy/>) を用いて EC₁₀ を算出した。次に、それぞれの EC₁₀ の対数比 ($\text{Log}_{10}(\text{EC}_{10_{\text{viability}}}/\text{EC}_{10_{\text{Gfap}}})$) を算出し、この値 (Selectivity Score (SS)) が 0.5 以上であれば神経系特異的に影響するものとした (文献 5)。その結果、Chlorpyrifos、Rotenone、Deltamethrin、Imidacloprid で SS が 0.5 以上であり、神経系特異的な影響があると見なされた (表)。Map2 の結果においても Chlorpyrifos および Deltamethrin において SS 値は

0.5以上を示したが、全体的にはGfapの方で影響がより顕著であると考えられた(表)。

また、これらの結果をNTPデータベースにある他の神経細胞等の培養系の結果と比較した(表)。Rotenoneは神経細胞の突起形成に対して顕著に影響することが報告されており(文献5)様々な神経細胞を用いた系で影響が見られていたが、本実験系においてグリア細胞分化指標でも影響がとらえられた。また、神経突起形成では検出できないChlorpyrifosやDeltamethrinが本実験系のGfapを指標とした評価で影響が検出されたことが特徴的であった。

表 本実験系および他の発達神経毒性評価系の Selective score (SS) 値

物質名	mES-Diff (Map2)	mES-Diff (Gfap)	hiPS (outgrowth)	Human Primary (outgrowth)	LUHMES (outgrowth)	Rat primary (fire rate)
Chlorpyrifos	0.94 (1.91/16.6)	1.35 (0.74/16.6)	0.17 (42.95/63.80)	NA (NA/NA)	NA (NA/NA)	0.58 (3.91/14.77)
DDT	0.13 (0.955/1.29)	0.17 (0.871/1.29)	0.06 (13.70/15.64)	NA (NA/NA)	NA (NA/NA)	- (6.13/3.89)
Rotenone	-0.42 (0.0030/0.0011)	0.74 (0.00021/0.0011)	1.37 (1.65/38.83)	> 4.67 (0.000424/NA)	> 2.50 (0.06/NA)	- (0.02/0.00767)
Carbaryl	-0.040 (0.331/0.302)	0.27 (0.162/0.302)	> 0.56 (27.78/NA)	> 0.13 (14.77/NA)	NA (NA/NA)	0.45 (2.93/8.26)
Deltamethrin	0.69 (2.75/13.5)	0.82 (2.04/13.5)	0.14 (26.25/36.36)	NA (NA/NA)	NA (NA/NA)	> 1.42 (1.15/NA)
Imidacloprid	-0.47 (331.1/112.2)	1.92 (1.35/112.2)	-	-	-	-

(4) まとめ

本研究では、発達神経毒性の新たな評価系を模索するため、マウス ES 細胞を用いた培養系の検討を行った。その結果、Gfap をマーカーとした分化培養系において、今回の実験で用いた 6 種全てでグリア細胞分化抑制効果が見られ、新たな評価系およびマーカーとしての可能性が示唆された。

< 引用文献 >

1. Behl M., Ryan K., Hsieh J.H., Frederick Parham F., Shapiro A.J., Collins B.J., Sipes N.S., Birnbaum L.S., Bucher J.R., Foster P.M.D., Walker N.J., Paules R.S., Tice R.R.(2019)Screening for Developmental Neurotoxicity at the National Toxicology Program: The Future Is Here. Toxicol Sci. 167, 6-14.
2. Crofton K.M., Mundy W.R.(2021)External Scientific Report on the Interpretation of Data from the Developmental Neurotoxicity In Vitro Testing Assays for Use in Integrated Approaches for Testing and Assessment. EFSA Supporting Publications. 18, EN-6924.
3. Ying Q.L., Stavridis M., Griffiths D., Li M., Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture.(2003)Nat Biotechnol. 21, 183-186.
4. Okada Y., Matsumoto A., Shimazaki T., Enoki R., Koizumi A., Ishii S., Itoyama Y., Sobue G., Okano H.(2008)Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. Stem Cells 26, 3086-3098.
5. Ryan K.R., Sirenko O., Parham F., Hsieh J.H., Cromwell E.F., Tice R.R., Mamta Behl M.(2016)Neurite outgrowth in human induced pluripotent stem cell-derived neurons as a high-throughput screen for developmental neurotoxicity or neurotoxicity. Neurotoxicology 53,271-281.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤智彦, 曽根秀子
2. 発表標題 マウス多能性幹細胞系における殺虫剤の神経発達毒性と機序の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤智彦
2. 発表標題 環境汚染物質の毒性研究の現状と今後の展開
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤智彦, 曽根秀子
2. 発表標題 マウスES細胞を用いた殺虫剤による神経発達毒性の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤智彦, 曽根秀子
2. 発表標題 神経系の発達過程に着目した神経発達毒性のin vitroアプローチ
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------