

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790657

研究課題名（和文）ヒト ES 細胞を用いた毒性試験系に有効なモデル細胞の構築

研究課題名（英文）Construction of a model cell effective in the toxicity test system using a human embryonic stem cell

研究代表者 山根 順子(JUNKO YAMANE)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：10433278

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ヒトの発達神経毒性試験に利用可能なモデル細胞構築を行うことである。神経細胞の分化や発達過程における化学物質曝露による影響を見る上で、そのようなモデル細胞の創出は毒性試験系の有効なツールとなる。神経細胞分化マーカーのプロモーター領域を遺伝子導入した細胞株の取得を目指したが、毒性試験に利用可能なレベルの発現をモニター出来る細胞株の取得には至らなかった。しかし、遺伝子導入を行う細胞株についての詳細な遺伝子発現解析を行うことは成功し、今後の細胞株選択に利用できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to construct the model cell system for using human development neurotoxicity study. When seeing the influence by chemical exposure in specialization and developing process of neuronal cells, creation of such a model cell serves as an effective tool of a toxicity test system.

Although I strived to an acquisition of the cell lines carrying out transgenics of the promoter region of a neuronal differentiation marker, it could not get the cell lines which can monitor revelation of the level to be used for a toxicity test.

However, it turned out that it is successful to conduct detailed gene expression analysis about a cell lines conducted for transgenics, and it can use for future cell lines selection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒、ヒト多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを取り巻く環境に蔓延している有害化学物質で最も重度の障害を引き起こすものとして、カドミウム、メチル水銀等に代表される神経毒性化学物質が挙げられる。特に胎児期、主に神経幹細胞が成熟した神経細胞に分化する時期に、母体経由でこれら化学物質に曝露された場合、出生後に神経発達障害が生じるリスクは生後曝露されたものより

深刻である。よって胎児期の化学物質曝露による神経細胞への毒性影響を調べることは重要である。しかし、実際にヒトを研究対象とすることは不可能であるので、神経分化段階における各種化学物質の及ぼす影響を検索するために、ヒト多能性幹細胞をモデル細胞として用いることが非常に有効であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトの神経毒性試験に利用可能なモデル細胞の構築である。神経細胞の分化・発達過程における化学物質曝露による影響を見る上で、影響の検出が容易なマーカーが導入されていること、神経分化段階での均一な細胞集団に分取が可能であることは重要で、そのようなヒト多能性幹細胞の創出は衛生学上も重要なツールとなりうる。そこでヒト多能性幹細胞を用い遺伝子導入により均一な分化段階の細胞株を樹立する。さらにこれら細胞株を神経誘導後、種々の環境化学物質を作用させ、ヒト神経発達毒性試験への有用性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 神経毒性試験系に用いるプラスミドの構築

①細胞に遺伝子導入するプラスミドの構築

神経分化マーカーとして MAP2、終末神経分化マーカーとして TH を選択し、各プロモーター領域を EGFP と Luciferase を同時に発現するベクターに組み込む。また、各プロモーター領域を EGFP、Luciferase のみを発現するベクターにも組み込む。

②細胞への遺伝子導入と耐性株の樹立

得られたプラスミドをリポフェクション法によりヒト多能性幹細胞（京都大学より移入した KhES-3 株）に導入する。ベクターにはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、ネオマイシンに対する耐性株を得ることができる。

③神経分化誘導

耐性株から胚葉体（EB）形成を行い、更に神経分化誘導を行う。

④発現定量化の解析

ルシフェラーゼを組み込んだ細胞株に関しては、神経分化させ、ルシフェラーゼ活性を測定することで、発現レベルを計測する。

(2) 遺伝子導入を行うヒト多能性幹細胞の検討

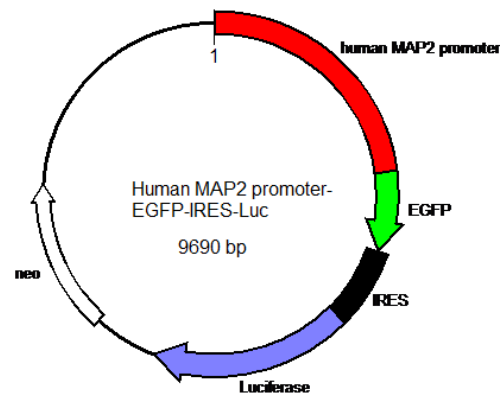
①DNA バーコードを用いたシングルセル遺伝子発現解析

細胞株におけるヒト多能性幹細胞の遺伝子導入効率の違いを見るため、ヒト ES 細胞の KhES-1 株、KhES-3 株、ヒト iPS 細胞の 201B-7 株、253G-1 株、454C-2 株の 5 種類の細胞株を用いてシングルレベルでの遺伝子発現解析を行った。細胞の特定を行うために DNA バーコードを細胞に組み込ませ、RNA-seq を行った。

## 4. 研究成果

(1) 神経毒性試験系に用いるプラスミドの構築

human MAP2 promoter EGFP IRES Luciferase (図 1)、human MAP2 promoter EGFP、human MAP2 Luciferase プラスミドを作成した。



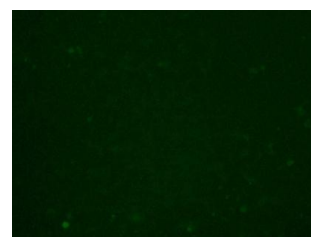
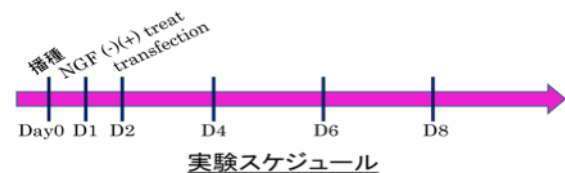
(図 1) プラスミドコンストラクト (human MAP2 promoter EGFP-IRES-Luc)

(2) プラスミドの遺伝子導入チェック

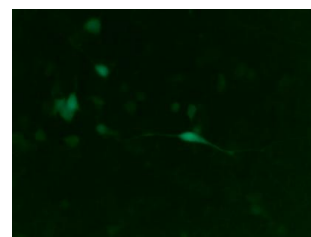
①PC-12 細胞への遺伝子導入

ヒト多能性幹細胞への遺伝子導入前に、PC-12 細胞への遺伝子導入を行い、作成したプラスミドが正しく機能するかを調べた。PC-12 細胞は NGF で処理することにより神経分化を誘導した。

Human MAP2 promoter EGFP-IRES-Luc は正しく機能しなかったが、Human MAP2 promoter EGFP は神経分化に伴い EGFP の発現が確認出来た (図 2)。



Day4



Day8 (図 2)

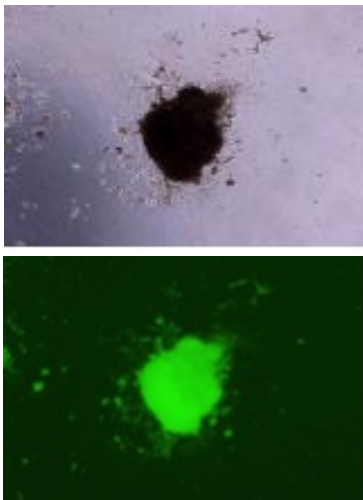
Day4 あたりから発現が見られ、Day8 では神経様細胞は EGFP が高発現していることが確

認され、作成したプラスミドは正しく機能することが証明出来た。

### ②マウス ES 細胞への遺伝子導入、神経誘導

マウス ES 細胞 B6N22<sup>UTR</sup> 細胞への遺伝子導入を行った。フィーダーフリーで培養したマウス ES 細胞に Human MAP2 promoter EGFP を遺伝子導入し、ネオマイシン耐性細胞株を取得した。

取得したうちの数クローンで神経誘導を行うにつれ EGFP の発現が高くなるように見えるクローンは得られたが、毒性試験系に利用可能なレベルに達するクローンは得る事が出来なかった (図 3)。



(図 3) オルニチン・ラミニンコートディッシュに播種後 Day20 (上; 明視野、下; GFP)

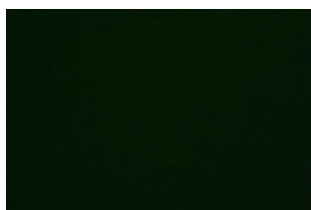
### ③ヒト ES 細胞への遺伝子導入、神経誘導

ヒト ES 細胞 KhES-3 株をフィーダーフリーで培養し、Human MAP2 promoter EGFP を遺伝子導入し、ネオマイシン耐性細胞株を取得した。

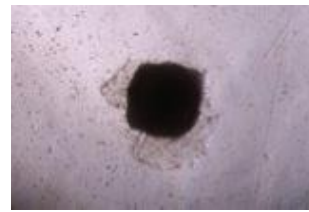
取得した細胞株を神経誘導したが、マウス ES と同様に毒性試験系に使用できるレベルの細胞株の取得は出来なかった (図 4)。



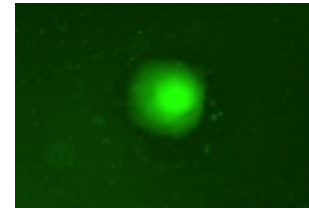
Day 0 (ES)



上; 明視野  
下; EGFP



上; 明視野  
下; EGFP



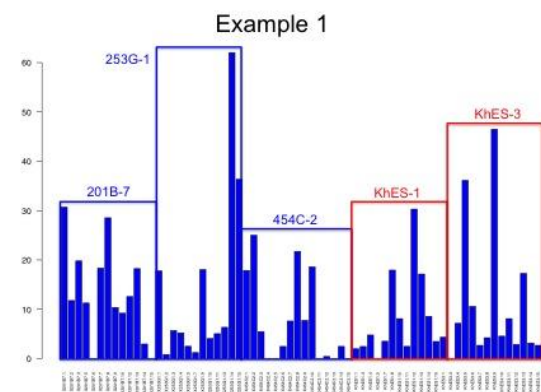
Day 20  
(オルニチン・ラミニンコートディッシュに播種後)

(図 4)

### (3) 遺伝子導入を行うヒト多能性幹細胞のシングルセル遺伝子発現解析

多能性幹細胞の細胞間での遺伝子発現レベルの違いを詳細に調べるため、シングルセルでの遺伝子発現解析を行った。方法としては DNA バーコードを細胞に組み入れ細胞の特定ができるようにし、RNA-seq を試みた。調べた細胞株はヒト ES 細胞の KhES-1、KhES-3、ヒト iPS 細胞の 201B-7、253G-1、454C-2、及びマウスフィーダー細胞 SNL76/7 である。

各細胞株を 15 シングルセルずつ用いた遺伝子発現解析では、DNA バーコードを組み込むことによりわずか 1 回のシークエンランスで測定可能にしたが、細胞より取得した mRNA の収量がまだ十分でないため、手法の更なる改良が必要である事がわかった。しかしながら、得られた結果から、同じ細胞株間でも個々の細胞レベルで発現の違いが観察され (図 5)、目的の遺伝子導入細胞を得る上で技術的な困難をもたらすことがわかった。



(図 5) シングルセル遺伝子発現データ

これまでのところ、ヒト神経毒性試験に利用できるモデル細胞の取得には至っておらず、技術的な面も含め更に改良の余地があることは否めない。ただ、未分化状態である多

能性幹細胞における細胞間の遺伝子発現レベルの違いが、分化過程の運命を左右することも考えられ、より正確な毒性試験のモデル系を構築するためには個々の細胞レベルでの解析も必要になってくるだろう。最終年度に行ったシングルセルレベルの遺伝子発現解析は今後ますます技術レベルも上がり詳細な解析が可能になると期待できる。その上でヒト発達神経毒性をモニターできる細胞株の樹立は更なる重要性を持つようになると考えられる。

#### 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 1 件)

- ① He, X., Imanishi, S., Sone, H., Nagano, R., Qin, X-Y., Yoshinaga, J., Akanuma, H., Yamane, J., Fujibuchi, W., Ohsako, S., Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells, *Toxicology Letters*, 212: 1-10 (2012). (査読有)  
DOI; 10.1016/j.toxlet.2012.04.011.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Junko Yamane, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi, Standardization of human iPS cells with single cell technology, poster presentation at International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, Kyoto Research Park, 2012, 28<sup>th</sup> November, Kyoto.

[その他]

ホームページ等  
該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山根 順子 (YAMANE JUNKO)  
京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員  
研究者番号：10433278

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし