

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790552

研究課題名（和文） iPS細胞を用いた造血幹細胞に対する化学物質の毒性影響評価

研究課題名（英文） Effects of environmental chemicals on the hematopoiesis of iPS cells

研究代表者

伊藤 智彦（ITO TOMOHIRO）

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：60391067

研究成果の概要（和文）：iPS細胞から造血幹細胞への分化培養系において、環境化学物質であるフタル酸エステルの毒性影響を評価した。その結果、最も広く利用されているDEHPが分化を抑制すること、逆にDEHPの代謝産物であるMEHPは促進的に影響することがわかった。また、これらフタル酸エステルによる影響には、これまで報告されている受容体・転写因子とは異なる作用機序が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：By using iPS cells, effects of phthalate esters on the hematopoiesis were examined. In that system, DEHP suppressed the appearance of hematopoietic progenitor from iPS cells while MEHP, a metabolite of DEHP, accelerated it. It was also suggested that their effects are caused independently of estrogen receptor and peroxisome proliferators-activated receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医薬薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：iPS細胞、造血幹細胞、フタル酸エステル

1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎といった、小児におけるアレルギー疾患が先進国を中心に増加してきている。この背景には、我々を取り巻く環境の変化、とりわけ、化学物質等による環境汚染の生体影響が懸念されている。環境省による大規模な疫学調査である「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」において、胎児や新

生児期における化学物質の曝露がその後の免疫系を中心とした各種生体機能に影響を与える可能性を検討しているように、発達時期は重要な機能を担う各種組織がまだ未成熟であり、組織を構築している細胞群が増殖や分化を繰り返してダイナミクスに活動しているタイミングは外部からの異物が特に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。また、環境化学物質は受容体や転写因子といった、細胞の増殖、分化、細胞死のような組織

の発達に働く因子に作用することも知られており、受容体や転写因子の正常から逸した活性化や阻害を介して影響を及ぼすことも考えられる。

このような環境化学物質による免疫系の毒性影響については、アレルギー疾患モデルを用いた動物実験を中心に報告されている。また、培養細胞を用いた培養細胞レベル (*in vitro*) の実験により、毒性メカニズムの解析や環境化学物質が及ぼす影響を簡便に解析するなどの報告が多数ある。リンパ球、抗原提示細胞といった免疫系の細胞は、成熟期において、骨髄細胞や末梢血中に存在する前駆細胞から分化・成熟する。そのため、実験動物より採取した骨髄細胞や末梢血細胞を用いた評価系が報告されており、動物レベル (*in vivo*) で免疫系に対して毒性影響の見られた化学物質が、こうした *in vitro* の評価系においても毒性が見られることが報告されている。一方で、胎児期等の発達期における毒性影響を反映する *in vitro* 系についての報告は多くない。

2006年に京都大学の山中信弥教授らによって樹立された iPS 細胞は、繊維芽細胞などの末梢組織を構築する細胞から人工的に造られた多能性幹細胞であり (文献1)、体を構築する全ての細胞への分化が可能と考えられている。そのため、iPS 細胞は、胚から個体発生に至る胎児期での毒性を *in vitro* で評価することができる可能性・将来性を持ち合わせている。

2. 研究の目的

これまで我々は、アレルギーの原因となる免疫反応に化学物質がどう影響するか検討を行ってきた。*in vivo* および *in vitro* の両面から研究を行った結果、環境化学物質であるダイオキシン、ディーゼル排気微粒子、フタル酸エステルが、樹状細胞や T 細胞といった免疫細胞の機能に影響を及ぼすことを明らかにしてきた (文献2、3、4)。一方、様々な免疫細胞を含む血液細胞は造血幹細胞から造り出されるが、造血幹細胞もまた化学物

質の標的となることが報告されている (文献5)。造血幹細胞は胎児期から盛んに増殖・分化を繰り返し、血液細胞を末梢へと供給している。こうした動的活動から、造血幹細胞は化学物質の標的となりやすいことも予想され、今後、末梢細胞だけに限らず造血幹細胞をターゲットとした毒性評価が必要になると考えられる。また、特に胎児期は免疫系が成熟する時期であり、造血幹細胞を取り巻く環境、とりわけ化学物質による曝露は、成熟後の免疫応答の異常に繋がる要因となることが危惧されるため、胎児期をターゲットとした毒性評価が必要である。

そこで本研究では、胎児期における個体発生から発達について細胞レベルで再現することが可能な iPS 細胞を用いた新規の毒性評価系を確立し、化学物質の評価を行うことを目的とした。まず、iPS 細胞から造血幹細胞への分化培養系を確立し、次に環境化学物質の毒性影響を評価し、本実験系の有用性について検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス iPS 細胞 (2006年に京都大学山中教授らにより樹立された株、理化学研究所バイオリソースセンターより提供株) をグラチンコーティングシャーレ上で ESGRO COMPLETE PLUS Clonal Grade Medium (Milipore) を用いて未分化状態を保持しながら培養した。コンフルエントになるまで培養後、accutase で剥離し、グラチンコーティングしたマルチプレート上で更に Knock-out DMEM (Invitrogen、15% fetal bovine serum、GlutaMAX-I supplement、10 mM non essential amino acids、55 mM beta-mercaptoethanol、LIF 含有) を用いて培養した。3日後 (Day 0)、トリプシンで細胞を剥離し、 1×10^4 cells/well になるように低吸着性の丸底 96-well plate (Corning) に播種した。この様に、低吸着性のプレートで培養すると、iPS 細胞は胚様体 (EB) を形成し、分化が開始されることが知られている。5日後 (Day 5)、形成した EB をトリプシンで single cell suspension とし、各

種の分化マーカーに対する抗体で染色した後、フローサイトメトリーにより解析した。また、各段階における EB から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて調製した total RNA を用いて RT-PCR 法により各分化マーカーの遺伝子発現変化を調べた。

(2) 環境化学物質でありアレルギー・免疫系に影響を及ぼすことが報告されているフタル酸エステルによる iPS 細胞の分化に対する影響を調べるため、最も広く利用されている DEHP およびその体内代謝産物である MEHP を Day 0~5 までの EB 形成時期に曝露し、Day 5 での EB サイズおよび表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、同様に各種の核内受容体のリガンドを Day 0~5 で添加し、iPS 細胞の分化に対する影響を調べた。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞から造血幹細胞への分化培養系の検討

① 造血幹細胞は中胚葉から分化することが知られている。そこでまず、本実験系において iPS 細胞から中胚葉に分化しているかを調べた。Day 0~5 の EB から採取した total RNA を用いて RT-PCR 法により中胚葉の分化マーカーであるの発現を調べた (図 1)。その結果、中胚葉マーカーである Brachyury および Mesp1 の発現が Day 3 において一過性に増加した。一方で、未分化マーカーである Oct3/4 の発現は Day 3 以降、減少した。また、Day 3 より中胚葉より発生する心筋細胞の初期分化マーカーである Gata4 の発現が上昇した。以上のことから、本実験系において、Day 3 で中胚葉へ iPS 細胞が分化し、その後は更に分化が進行することが示唆された。

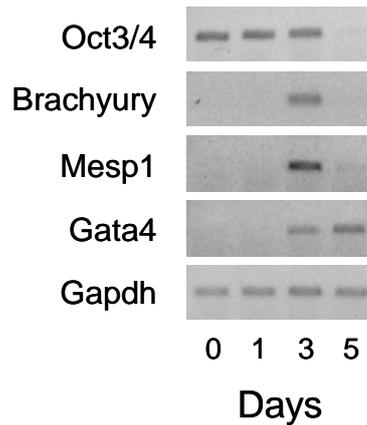


図 1. iPS 細胞の分化培養に伴う遺伝子発現変化

② 次に iPS 細胞の分化に及ぼす血清 (FBS) 濃度の影響を調べた (図 2)。Day 0~5 までの EB 形成時の培地中に含まれる FBS 濃度を 5、7.5、10、15% 調べた結果、FBS 濃度依存的に GFP 陽性細胞の割合が低下した。本実験において使用した iPS 細胞は未分化状態において GFP を発現し、分化すると GFP の発現が消失する。そのことから、FBS 濃度依存的に分化が促進されていることがわかった。また、初期の造血幹細胞 (hematopoietic progenitor) の分化マーカーである CD41 陽性細胞の割合が FBS 濃度依存的に増加したが、更に発達した造血幹細胞のマーカーである CD45 や Sca1、各免疫系細胞の前駆細胞のマーカーなど、それ以降の分化マーカーの発現は見られなかった (data not shown)。同様に、血管系細胞のマーカーである CD31、VE-cadherin も FBS 濃度依存的に増加した。これらの結果から、FBS 濃度は iPS 細胞から中胚葉を介した造血幹細胞等への分化に重要であり、環境化学物質による毒性を評価する上で、適度な分化効率を示す 7.5% FBS を含有する培地を用いて以後の実験を行った。CD45 や Lineage 陽性の成熟造血幹細胞への分化については、colony forming assay 等で検討中である。

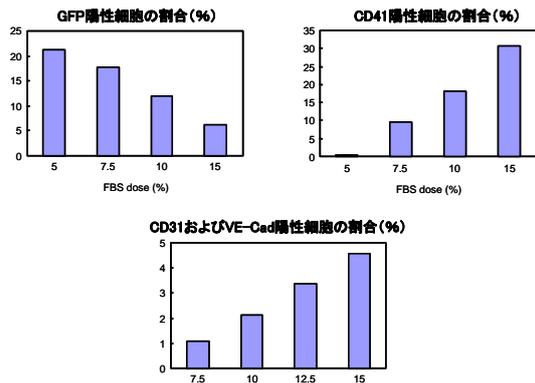


図 2. FBS 濃度が iPS 細胞の分化に及ぼす影響

(2) iPS 細胞の造血幹細胞への分化に対する DEHP および MEHP 曝露の影響

① 0.1~10 μM の DEHP または MEHP を Day 0~5 まで曝露し、形成した EB の大きさ (直径) に対する影響を調べた (図 3)。DEHP は今回、検討した中で最も高濃度であった 10 μM で EB の大きさが抑制された。一方で、MEHP は 10 μM まで影響が見られなかった。これらの結果から、DEHP は EB の形成発達に抑制的な影響を与えることが明らかになった。10 μM の DEHP は細胞毒性に影響を及ぼさなかったことから、DEHP は分化段階において細胞の増殖に影響を与える可能性が示唆された。

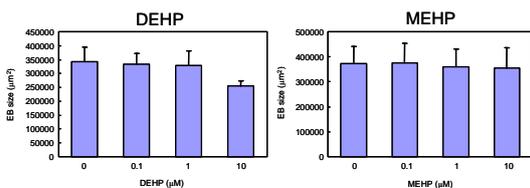


図 3. EB サイズに及ぼすフタル酸エステルの影響

② 次に、0.1~10 μM の DEHP または MEHP を Day 0~5 まで曝露した EB における造血幹細胞への分化について、Day 5 における表面抗原の発現を指標に調べた。その結果、DEHP は 10 μM において CD41 陽性細胞の割合をほぼ完全に抑制した。逆に、10 μM の DEHP は GFP 陽性細胞の割合を有意に増加し、FLK1 についても増加する傾向が見られた。一方、

MEHP は DEHP の場合とは逆に、0.1 μM において CD41 陽性細胞の割合を有意に増加させた。また、GFP および FLK1 陽性細胞については、DEHP の場合と同様に増加傾向が見られた。

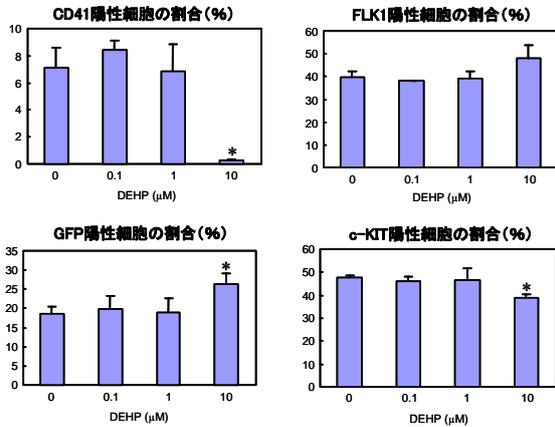


図 4. DEHP が iPS 細胞の分化に及ぼす影響

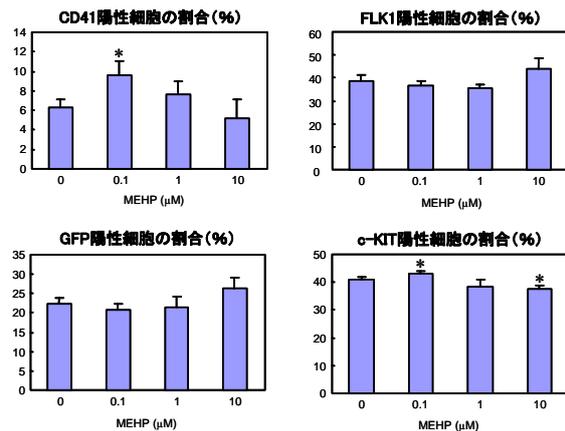


図 5. MEHP が iPS 細胞の分化に及ぼす影響

(3) iPS 細胞から造血幹細胞への分化における核内受容体活性化の影響

① DEHP は MCF-7 ヒト乳癌細胞の増殖を女性ホルモン受容体 (ER) 依存的に促進することが報告されている (文献 6)。また、我々は以前の研究において、マウス末梢血中単球細胞から樹状細胞への分化・成熟化に対して、DEHP が ER 依存的に抑制することを示している (文献 7)。これらの報告は DEHP が ER の活性化を介して様々な生体影響を惹起する可能性を示唆している。そこで、ER の活性化が iPS 細胞の分化に及ぼす影響を調べる

ため、Day 0~5 まで ER の活性化リガンドである 17 β -エストラジオール (E2, 1 nM) で刺激し、造血幹細胞への分化を調べた。その結果、E2 は GFP、FLK1、CD41、c-Kit、何れのマーカーに対しても影響を及ぼさなかった。また、ER の阻害剤である ICI 182,780 (10 nM) についても同様に影響が見られなかった。以上の結果から、本実験系における iPS 細胞から造血幹細胞への分化に ER は影響を及ぼさないこと、また同実験系において見られた DEHP の影響に ER は関与しないことがわかった。

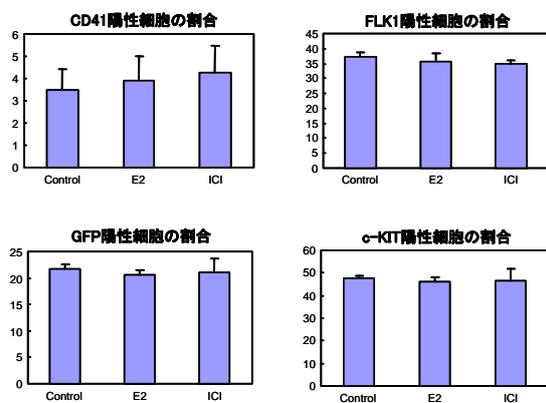


図 6. ER が iPS 細胞の分化に及ぼす影響

② 次に、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の関与について検討した。PPAR は α 、 β/δ 、 γ のアイソフォームが知られており、MEHP は各 PPAR を活性化することが報告されている (文献 8)。そこで各種の PPAR が iPS 細胞の分化に関与しているか、各アイソフォームを特異的に活性化するリガンドを用いて調べた (図 7)。まず、PPAR γ リガンドである ciglitzone (10 μ M) で iPS 細胞を刺激したところ、GFP 陽性細胞の割合が増加し、FLK1 および CD41 陽性細胞の割合は減少した。逆に、PPAR β/δ リガンドである GW0742 (10 μ M) は GFP 陽性細胞の割合を減少させ、FLK1 および CD41 陽性細胞の割合を増加させた。一方で、PPAR α リガンドである Wy-14,643 (10 μ M) については、各マーカーの発現への影響は見られなかった。以上の結果から、PPAR は iPS 細胞の初期分化段

階に深く関与し、PPAR γ が抑制的に作用するのに対し、PPAR β/δ は促進的に働くことがわかった。

MEHP の影響においては GFP には変化が無かったことから、iPS 細胞から中胚葉への分化初期段階での影響は少なく、中胚葉から造血幹細胞への分化段階で影響を及ぼすことが推測される。一方で、PPAR γ や PPAR β/δ リガンドは GFP 陽性細胞の割合に影響を与えたことから、作用は分化初期段階に働くと考えられる。これらのことから、MEHP は PPAR 以外の作用機序により iPS 細胞の分化に影響を及ぼすことが考えられた。

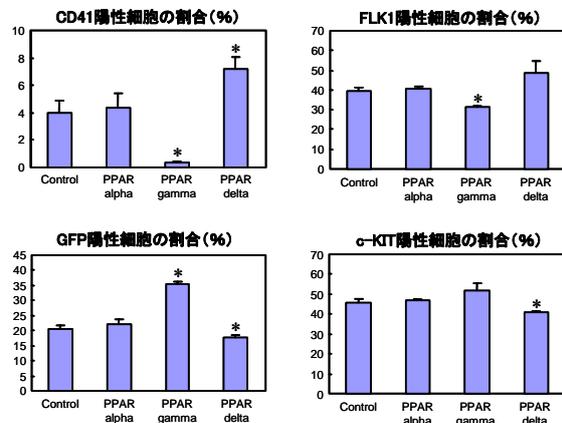


図 7. PPAR が iPS 細胞の分化に及ぼす影響

(4) まとめ

以上の結果から、最も広く利用されているフタル酸エステルである DEHP、その代謝産物である MEHP は iPS 細胞を用いた造血幹細胞の発生において影響を及ぼすことがわかり、その影響は代謝により変化すること、毒性機序はこれまで報告されていた ER や PPAR とは異なることが示唆された。

フタル酸エステルは体内半減期は短いものの、日常的に食物から摂取されることや、医療用器具類によって直接、体内に吸収されることが知られており、胎児期での曝露によって免疫系の発達に悪影響を与えてその後のアレルギー等の免疫疾患に繋がる可能性も否定できない。今後、動物実験を用いた *in vivo* での胎仔の発達段階における hematopoietic

development に対する影響について更なる検討を行い、本研究での iPS 細胞を用いた *in vitro* での毒性評価と総合して解析する必要がある。

(5) 参考文献

文献 1 : Takahashi and Yamanaka, *Cell*, 126, 663-676 (2006).

文献 2 : Murante and Gasiewicz, *Toxicol. Sci.*, 54, 374-383 (2000).

文献 3 Ito et al., *Toxicol. Sci.*, 70, 46-54 (2002).

文献 4 : Ito et al., *J. Biol. Chem.*, 279, 25204-25210 (2004).

文献 5 : Ito et al., *J. Immunotoxicol.*, 3, 21-30 (2006).

文献 6 : Okubo et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1219 (2003).

文献 7 : Ito et al., *J. Appl. Toxicol.*, 32, 142-148 (2012).

文献 8 : Bility et al., *Toxicol. Sci.*, 82, 170-182 (2004).

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 智彦 (ITO TOMOHIRO)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号 : 60391067

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし