

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 4 月 30 日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659337

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた粒子状物質の新規リスク評価

研究課題名（英文）A novel study elucidating risk of particulate matters using iPS

研究代表者

井上 健一郎（INOUE KEN-ICHIRO）

国際医療福祉大学 保健医療学部 教授

研究者番号：20373219

研究成果の概要（和文）：初めに、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell; iPS）から循環器系細胞（心筋細胞、血管内皮細胞等）への分化培養条件を検討し確立した。次に、心血管（循環器）系毒性がヒト、*in vivo* で示唆されている粒子状環境汚染物質（ディーゼル微粒子：DEP）やその構成成分を対象に同培養系を用いた影響評価を行った。結果、DEP曝露によりiPSから分化した心筋細胞の拍動が抑制される傾向にあることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：At first, we examined *in vitro* assay conditions differentiating iPS toward cardiac cells such as myocytes and vascular endothelial cells, and developed condition differentiating iPS-derived myocytes. Next, we investigated the *in vitro* effects of diesel exhaust particle (DEP) -exposure on iPS-derived myocytes, and found that DEP tended to suppress pulsation of these cells as compared to vehicle-exposure.

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	2,500,000	750,000	3,250,000

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：環境保健

1. 研究開始当初の背景
環境汚染の健康影響評価について、これまでの疫学調査によって、ディーゼル排気微粒子（DEP）をはじめとする浮遊粒子状物質の環境中濃度と心血管系疾患の罹患率、死亡率等に

相関があることが示唆されてきた。また申請者らは、DEPやその構成成分、ナノ粒子等の経気道曝露が、血管内皮細胞の機能を障害したり、血液凝固異常を引き起こしたりすることを *in vivo* で明らかにしてきた。しかし

ながら、これら粒子状物質が直接循環器系細胞に及ぼす影響を検討した研究は少なく、更に、評価系モデルの確立を目指した研究は世界的にもほとんど存在しなかった。

2006年に京都大学の山中伸弥博士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、理論上生体を構築する全ての細胞への分化が可能と考えられ、模擬細胞・組織として活用できる可能性がある。一方毒性学において、様々な株化細胞を用いた*in vitro*評価系は存在するが、当該細胞のように、将来ヒト個人の臓器毒性を類推できる可能性を秘めた幹細胞を用いた毒性物質評価系に関する基礎研究の報告例は全く存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、(1)人工多能性幹細胞(iPS細胞)から、心筋細胞や血管内皮細胞等の循環器系細胞へ分化誘導させる培養系を検討・確立させ、(2)心血管系への影響が疫学調査(ヒト)や動物実験(*in vivo*)で示唆されているディーゼル微粒子(DEP)やその構成成分等を*in vitro*で曝露した際と同細胞への影響を形態学的・免疫学的・生理学的手法で調べ、影響評価の至適条件を検討する。また、(3)影響メカニズムを分子レベルで解明し、影響評価に適用可能な指標(バイオマーカー)を探索する。更に同アッセイ系を用いた汚染物質の毒性スクリーニング手法の可能性も検討する。

3. 研究の方法

初めに、マウスiPS細胞から心筋細胞、血管内皮細胞への分化培養系の条件を検討した。次に、選定した粒子状物質(DEP)やその構成成分をiPS細胞に曝露し、各細胞の分化、性質や機能に影響が現れるか調べた。また、粒子状物質の構成成分を代えて影響を検討するとともに、影響メカニズムを分子レベルで解明した。更に、影響に関連する予防的バイオマーカーの探索も行った。対象物質としては、疫学、*in vivo*研究等で心血管毒性影響が示唆されているDEP(環境ナノ粒子を多く含むDEPも含む)を選択した。

4. 研究成果

(1) 実験スキーム。Day 0までは未分化を維持した細胞で、Day -1~0までで曝露した。その後、低吸着性の96-well plateでEB(胚様体)を形成させた。EBは低吸着状態でiPSを培養すると球状になって増殖していく過程で三胚葉に分化した。その後、ゼラチンコート上で接着状態にて培養することにより拍動する心筋細胞に分化したことを確認した(図1)。

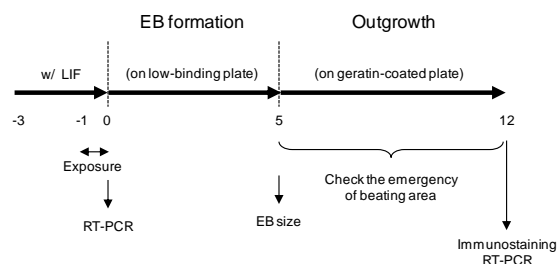


図 1

(2) 心筋への分化について、DEP曝露後の拍動細胞をカウントしたデータ(n=3)。拍動のカウントはそれぞれ、24個ずつのEBを接着培養していくDay 5からの段階で、拍動したEBを観察し、24個の内、いくつ拍動したか

で%を算出。DEP 曝露により iPS から分化した心筋細胞の拍動が抑制される傾向にあることが示された (図 2)。

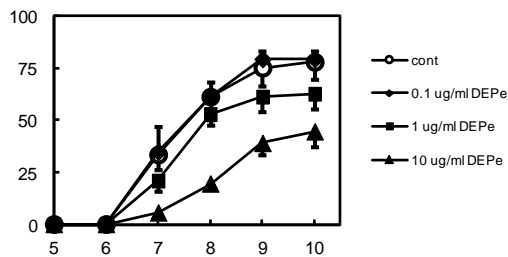


図 2

(3) 免疫細胞染色法により心筋のマーカーの 1 種である Troponin T で細胞を染色、心筋細胞への分化を確認した (図 3)。

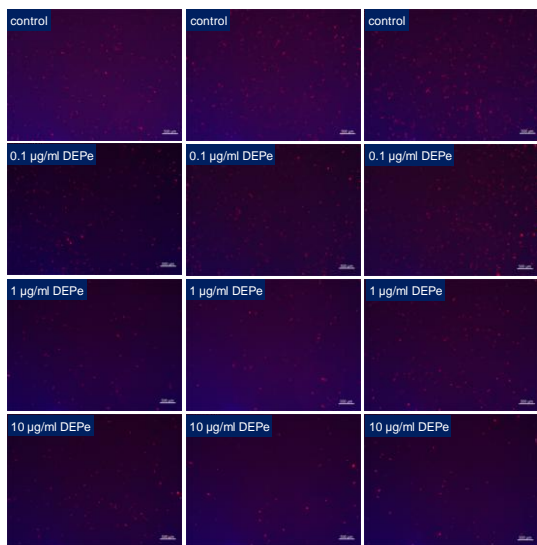


図 3

(4) RT-PCR 法で、図 4A は分化による各種マーカーの発現変化を調べた。EB 形成に伴い pluripotent なマーカーが減少し、中胚葉のマーカーが一過性に出現したことを確認した。その後、心筋のマーカーが出現した。

図 4B、C は、DEPe を曝露後の変化、図 B は Day 0 の時点でのもの。高濃度で Cyp1a1 が発現すること以外、特に明確な変化は認めなかった。また図 C は Day 12 の時点であり、Gata4 は高濃度で抑制されていた。

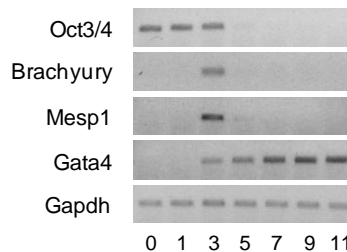


図 4A Days

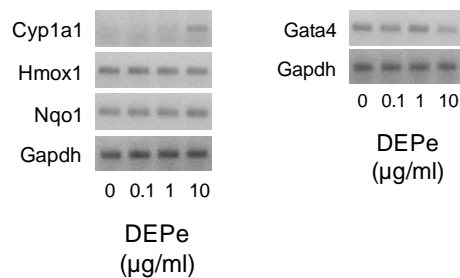


図 4B DEPe (μg/ml)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 健一郎 (INOUE KEN-ICHIRO)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20373219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし