

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 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790150

 研究課題名（和文） ヒト多能性幹細胞からの *in vitro* 器官形成を用いた
中枢神経系発生毒性評価法

 研究課題名（英文） Development of test for central nervous system developmental toxicity
using *in vitro* organization from human pluripotent stem cells.

研究代表者

今西 哲（IMANISHI SATOSHI）

東京医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：50462479

研究成果の概要（和文）：ヒトまたはマウス多能性幹細胞を用いた毒性評価法の開発において最も大きな問題点は分化の不均一性である。本研究では培養条件を検討し、マウス ES 細胞から均一かつ迅速に大脳様構造を形成させることに成功した。また、実際にヒト、マウスに大脳構造の異常を誘発する化学物質を曝露し、*in vitro* で形成した大脳様構造に異常が生じることを確認し、このシステムをもちいて発生毒性を評価できる可能性をみいだした。また、ヒト ES 細胞の培養条件を調節することで、短期間で神経系に分化させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The most important point is the regulation of uniformity of differentiation in establishment the test developmental toxicity using pluripotent stem cells. In this study, the timing and efficiency of nervous differentiation from mouse ES cell were successfully made uniform. The central nervous system developmental toxicity of chemical can be detected in the system. Additionally, shortening of period for neural differentiation was achieved by the modification of culture condition of human ES cells.

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：毒性学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：発生毒性、多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）多能性幹細胞を用いた毒性評価の現状と課題

近年、動物愛護の観点から、化学物質の安全性・毒性の評価における動物試験の代替法が注目されている。特に多能性幹細胞を用いた試験は、従来 *in vivo* 試験でしか成しえなかった発生毒性の評価を、*in vitro* で再現できる可能性が期待されている。欧州代替法評価センター（ECVAM）は、Embryonic stem cell test（EST）を発生毒性評価の代替法として推奨している。EST では 1. マウス繊維芽細胞 3T3 への細胞毒性 2. マウス ES 細胞へ

の細胞毒性 3. マウス ES 細胞の心筋分化率への影響の 3 点を指標に化学物質の発生毒性を推測する。Genshow らは発生毒性情報の明らかな 20 種類の化学物質を評価した結果、78% の確かさで既知の毒性を予測できたと報告している。しかし、実際に毒性試験に適応するには、心筋分化率への影響を指標に発生毒性を評価することの妥当性、マウス ES 細胞を用いることの妥当性等、詳細に検討しなければならない課題が残されている。Genshow らの報告においても、メチル水銀の毒性を 50% の確率で誤判定している。メチル水銀は水俣病の原因となった非常に強い毒

性物質であるが、その毒性は主に神経毒性によると考えられている。胎児期のメチル水銀曝露は脳の皮質形成異常を引き起こし、胎児性水俣病の特徴とされている。メチル水銀と同じく強い発生神経毒性を示す物質にバルプロ酸がある。バルプロ酸は抗てんかん薬として用いられているが、母親が妊娠期に服用すると、新生児の神経管閉鎖不全等の奇形の発生率が上昇することが知られている。動物実験でもヒトと同様の奇形が発生することが知られている。Niedenらは改変ESTを用いてバルプロ酸を評価した結果を報告している。それによると、心筋への分化率ではIC50=120 μ g/mlであったのに対し、神経マーカーであるニューロフィラメント遺伝子の発現量は23 \cdot g/mlで半減する。これらの既報は、ES細胞に評価対象物質を曝露し、心筋や神経に分化させるだけの単純な系では、非常に重大な毒性を見逃してしまうことを強く示している。組織の特異性や発生ステージを十分に考慮した発生毒性評価法の開発が必要である。

(2) 化学物質曝露と高次脳機能

胎児期の化学物質への曝露が、生後の行動・記憶等の高次脳機能に影響を及ぼすことが知られてきている。胎仔期にメチル水銀に曝露されたマウスは、生後6カ月の時点で自発行動の減少、記憶力の低下、思い出しの低下等の症状を示すことが報告されている。またバルプロ酸を胎仔期に曝露されたマウスでも、同様の行動異常が報告されている。環境中に存在する様々な化学物質に関しても高次脳機能異常との関連が指摘されており、注意欠陥多動性障害や自閉症、統合失調症等の精神疾患との関連も疑われている。このような高次脳機能は、大脳皮質における神経細胞間の情報伝達に依存している。そのため単離した神経細胞を用いた *in vitro* 試験では予測できず、適切な評価系の構築とメカニズムの解明が求められている。

2. 研究の目的

多能性幹細胞を用いた発生毒性の評価法が注目されているが、現在推奨されている方法は検討すべき課題が多く残されている。また近年、化学物質が高次脳機能に及ぼす影響が懸念され始めている。本研究は、ヒト多能性幹細胞からの大脳の *in vitro* 器官形成を用いて中枢神経への発生毒性評価法を開発することを目的とする。ヒト多能性幹細胞は無限増殖性を持つため、遺伝的に均一な細胞をほぼ無制限に供給でき、動物種の違いによる感受性の差を考慮する必要もない。しかし、この系は分化誘導に長期間必要なため、スループットが低いという問題がある。併せてマウス多能性幹細胞からの *in vitro* 器官形成を用いて、短期間での評価の可能性を探る。本研究が目指すシステムはヒトの器官形成

への化学物質影響を *in vitro* で評価できる初めての手法となるとともに、化学物質への胎児期曝露がもたらす、生後の高次脳機能への影響を予測できる初めての *in vitro* 評価方法となることが期待できる。

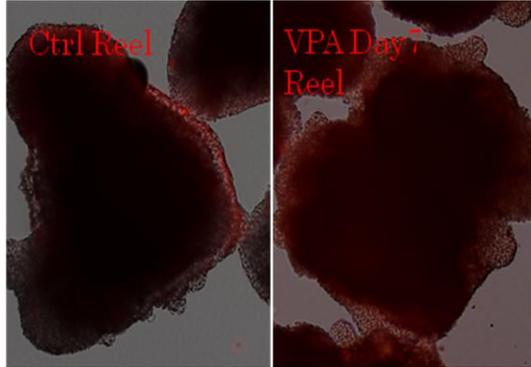
3. 研究の方法

ヒトおよびマウス多能性幹細胞からの *in vitro* 器官形成系を確立する。その際、毒性評価系としての汎用性を担保するために、分化期間と分化効率の均一化を試みる。その手法として、胚性幹細胞の維持培養条件の検討、大脳様構造への分化条件の検討を行う。確立できた *in vitro* 器官形成系に、モデル物質を添加し、毒性評価系としての妥当性を評価する。モデル物質はメチル水銀、バルプロ酸とする。またヒトの *in vitro* 器官形成や成熟神経分化には、すくなくとも50日以上期間が必要であることが知られている。このことはヒト多能性幹細胞を用いた神経発達毒性評価において、非常に大きな障害となりうる。そこでヒトの *in vitro* 器官形成系の改良、特に分化誘導期間の短縮を試みる。

4. 研究成果

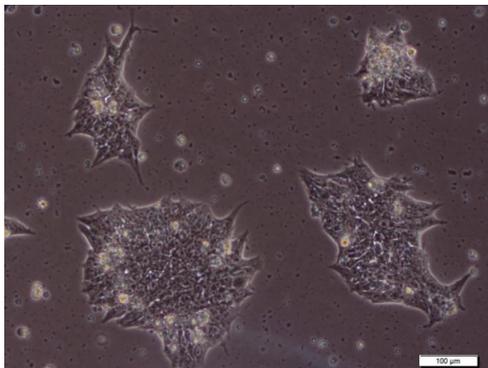
まず C57BL/6 系マウス由来の胚性幹細胞 B6-N22UTR をフィーダー細胞を用いずに安定して培養できるよう条件を調節した。このマウス胚性幹細胞から、既報に基づいて大脳皮質様構造を分化誘導し、成熟神経マーカー Map2、アストロサイトマーカー Gfap、神経幹細胞マーカー Nestin に対する抗体で染色をほどこしたところ、神経幹細胞が中心部に集まり、外側で成熟神経細胞やアストロサイトが層をなす構造が確認できた。また分化の各段階で、神経系細胞の種々の分化ステージマーカー (*Oct3*, *Nanog*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Sox2*, *Pax6*, *Nestin*, *Tubb3*, *Map2*) の発現を定量的 RT-PCR で調べたところ、既報と一致する結果を得た。このことから、大脳皮質様構造作成の再現は成功したと考えられた。しかし分化効率が予想より悪く、また分化のタイミングにも大きなばらつきがみられた。毒性評価を目的とする本研究において、このようなばらつきは大きな問題である。分化条件の最適化を試みた結果、ヒト多能性幹細胞用の神経分化培地を使用した場合、分化14日目の細胞では、形態的に神経様以外の細胞がほとんど出現しないことが確認できた。いじょうの様にして確立したマウス胚性幹細胞からの *in vitro* 器官形成過程に実際に化学物質を曝露し、その影響を評価した。マウス ES 細胞を、大脳様構造分化誘導条件下で浮遊培養し、分化開始0日と7日にバルプロ酸 1mM を添加した。それぞれ、0日、7日、14日で mRNA を回収し DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化を調べたところ、インスリンシグナルの顕著な抑制が検出された。また14日目の大脳様構造に対し、神経幹細胞マーカー

Nestin、第一層マーカーReelin、第二層マーカー STAB1 に対する免疫染色を施したところ、バルプロ酸曝露群では Nestin の局在に変化は見られないものの、Reelin 陽性細胞の減少 (図 1) と STAB1 のシグナルの不検出がみられ、大脳様構造の層構造形成の攪乱が生じていることが観察された。バルプロ酸はマウス、ヒトで大脳構造の異常を誘発することが知られており、本システムが中枢神経の発生毒性を検出できることが確認できた。



以上のマウス ES 細胞を用いた *in vitro* 器官形成の結果は、バルプロ酸による大脳層構造の乱れに、インスリンシグナルが関与するという意外な結果を示している。近年、バルプロ酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害活性が注目されている。大脳層構造の形成過程におけるインスリンシグナルの異常と、ヒストン脱アセチル化酵素阻害活性の関連の有無については今後詳細な解析が必要であろう。

ヒト多能性幹細胞からの大脳皮質様構造の分化には、50 日以上を要することが報告されている。毒性評価に用いるには分化誘導期間の短縮が欠かせない。また、ヒト胚性幹細胞の安定した維持培養にはフィーダー細胞が必要とされているが、毒性評価においては、フィーダー細胞の影響が無視できないという問題につながる。そこでヒト多能性幹細胞を様々な培養底面のコーティングと培地の組み合わせで、フィーダー細胞フリーの条件で維持培養すると、神経上皮細胞様の形態を呈する細胞が出現した (図 2)。

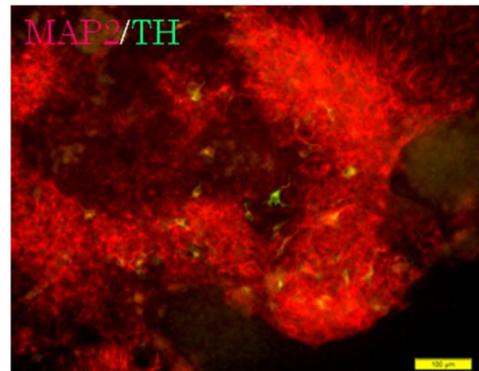


通常このような分化傾向にある細胞は、自発

的分化を起こすが、この細胞はそれ以上の分化を起こさなかった。また数か月以上に亘って維持が可能であり、正常胚性幹細胞のようにセルフリニューールをおこなっていると思われた。一方、この細胞はトリプシン処理によってシングルセルにまで分散しても、死滅することなく増殖し、神経上皮細胞様のコロニーを形成した。ヒト胚性幹細胞はシングルセルにまで分散した場合、薬剤処理などを施していないと死滅してしまうことが知られている。

一方、この細胞を通常の維持条件で培養すると、ヒト多能性幹細胞様の形態を呈し、様々な細胞に分化できることも確認できた。また、形態的に異常では有っても、OCT3/4、NANOG に陽性であることも確認できた。

この細胞を神経系に分化誘導すると、従来よりも短時間で MAP2 陽性神経細胞が出現することが分かった。またドーパミン神経細胞マーカーTh 陽性の細胞も確認でき、成熟した神経が分化していることが明らかになった (図 3)。



これらの結果から、この細胞は多能性を維持しながら、神経系に分化しやすい性質を獲得していると考えられ、毒性評価には有用な細胞であると思われた。

当初予定では、これらの細胞に緑色蛍光タンパク質 GFP を導入し、リアルタイムでの解析可能性をさぐる予定であった。CAG プロモーター下流に GFP を組み込んだプラスミドを作成し、ROCK 阻害剤存在下でシングルセルに分散したこれらの細胞に遺伝子導入を試みたが、安定して発現する細胞株を樹立するには至らず、ヒト多能性幹細胞に関する解析は不十分な結果となった。

代表者の所属研究機関の変更に伴い、当初予定されていたが実施できなかった部分が有ったが、マウス ES 細胞からの器官形成による中枢神経発生毒性の検出に成功し、*in vitro* 器官形成による毒性評価法の有用性を裏付けるものとなった。また、ヒト ES 細胞の維持条件を調節することで、短時間で成熟神経細胞に分化させることも確かめられ

た。この結果はヒト多能性幹細胞を用いた神経発生毒性評価法の開発において大きなインパクトとなることが期待できる。

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 (equally contributed)
Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells
Toxicol Lett 212 1-10, 2012
DOI:10.1016/j.toxlet.2012.04.011.
査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 哲 (IMANISHI SATOSHI)
東京医科大学・医学部・ポストドクター
研究者番号：50462479