

201035014A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験

データ適用法の標準化に関する研究

(H21-化学-一般-003)

平成 22 年度 総括・分担報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験

データ適用法の標準化に関する研究

(H21-化学-一般-003)

平成 22 年度 総括・分担報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 23 (2011) 年 3 月

目次

I 総括研究報告書

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験データ適用法の標準化に関する研究

・・・・・・・・・・ 1

研究代表者 東京大学 疾患生命工学センター 大迫 誠一郎

II 分担研究報告書

1. ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

・・・・・・・・・・ 8

国立環境研究所 環境リスク研究センター 曾根 秀子

2. ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究

・・・・・・・・・・ 16

産業技術総合研究所 生命情報工学センター 藤渕 航

3. ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究

・・・・・・・・・・ 19

東京大学 疾患生命工学センター 大迫 誠一郎

4. ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験に関する研究

・・・・・・・・・・ 27

東京大学 疾患生命工学センター 大迫 誠一郎

III 研究成果の刊行一覧表

・・・・・・・・・・

IV 研究成果の刊行物・別刷り

・・・・・・・・・・

総括研究報告書

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験データ適用法の 標準化に関する研究

研究代表者
大迫 誠一郎
東京大学 准教授

研究要旨

化学物質の安全性評価において重要な問題であるヒトへの生体影響を予測するシステムを開発するため、ヒト胚性幹細胞試験（EST）を利用し、影響評価のためのデータ適応法の標準化に関する開発を行う。今年度実施した各研究項目の概要は以下のものである。

1) ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究：化学物質が神経細胞の各分化過程へどのように影響するか評価するために、曝露時期の違いによる影響を比較検討した。ヒト胚性幹細胞（H9）由来の神経細胞にサリドマイドを曝露し、形態変化及びメタボローム解析を行った結果、MAP2 陽性細胞の形態への影響は認められないものの、ドーパミンニューロンの発生抑制ならびにメチオニン中間体やグルタチオンの低下が認められた。これにより、昨年度行った未分化期の曝露影響とは異なることが明らかになった。2) ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究：計算機を用いた化合物の生体影響予測の新しい手法として、様々な毒性を一度に線形空間で学習する基礎的な手法である PARCA（PAirwise Ranking Component Analysis）を開発した。この手法を用いることで、新しい化学物質の毒性が、既知のどの毒物に類似しているかをランキングで表示できるとともに、毒物間の関係が空間中に視覚化できる効果が期待できる。3) ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：昨年度実施したヒトとマウス ES 細胞のメチル水銀に対する影響解析を進めた。全自動細胞画像データと分化マーカー発現データを用いベイジアンネットワーク解析したところ、より低濃度から有意な影響の見られたヒト ES 由来細胞のネットワークモデルでメチル水銀のノード(Node)が最上層に来ることがわかった。これより評価法とする確率推論モデルは遺伝子発現変動とその結果である細胞表現型に予測性を持つことが示唆された。4) ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験に関する研究：判別装置開発の予備的試験として、複数の化合物（神経毒性物質、発ガン性物質等）を用いヒト ES 細胞の神経誘導培養条件下で化学物質曝露試験を実施した。経時的に RNA を採取して 10 種の遺伝子について測定した。得られた遺伝子変動情報を基に最大エントロピーカーネルを利用したサポートベクターマシン（SVM）による判別予測を実施した。その結果、神経毒性物質に対しては 86.6%、発ガン性物質で 93.3%、さらには非遺伝毒性発ガン物質で 100%の確率で判別可能であった。これにより、使用したヒト

ES細胞（KhES-3株）は十分に化合物固有の毒性影響を表出することがわかり、また開発したSVMの精度を確認できた。さらに、ベイジアンネットワーク解析から計算された各遺伝子ノード間のベータ値を利用することにより、この予測率がアップすることもわかった。

共同研究者

サブテーマ1： ヒトES細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

- 曾根秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 主任研究員
- 永野麗子 国立環境研究所 環境リスク研究センター NIESポスドクフェロー
- 赤沼宏美 国立環境研究所 環境リスク研究センター NIESアシスタントフェロー

サブテーマ2： ES細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究

- 藤淵航 産業技術総合研究所 生命情報工学センター チーム長

サブテーマ3： ES細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究

- 大迫誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授
- 何小明 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員
- 今西哲 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員
- 山根順子 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員

サブテーマ4： ES細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験に関する研究

- 大迫誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授
- 今西哲 東京大学 疾患生命工学センター 特

任研究員

- 山根順子 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員
- 藤淵航 産業技術総合研究所 生命情報工学センター チーム長

A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）の再生医療技術への応用研究が進展し、随時大量に準備可能なES細胞から、各種細胞への分化培養系が確立されつつある。このような分化培養系は受精卵から胚、胎児を経て成熟個体に至るまでの過程を再現しており、ヒトの発生影響試験の理想的モデルと言える。本研究では化学物質の安全性評価で重要な問題であるヒトへの生体影響を予測するシステムを開発するため、ヒト胚性幹細胞試験（EST）を利用する。マウスES細胞実験との比較検討とともに、取得する影響指標（遺伝子発現情報および形態情報）からバイオインフォマティクスを駆使し、ヒトへの影響レベルの確率推論アルゴリズムによる予測を試みるが、そのための実験系確立ならびにシステム標準化を実施する。最終的には、ヒト細胞への分化影響を類型化し、これを基に化学物質のヒトへの生体影響を予測するシステム構築を行う。

B. 研究方法

サブテーマ1： ヒトES細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究：ヒト胚性幹細胞（H9細胞）由来神経前駆細胞株（米ジェロン社）にサリドマイドを曝露した（最終濃度 $10^{-7}M$ 及び $10^{-5}M$ ）。4日間曝露後MAP2染色、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）染色し、マルチチャンネル画像解析装置によって、神経突起面積

(Neurite area)、細胞数 (Nuc count)、総神経突起長 (Neurite length)、分岐点総数 (Branch point)、および交差点総数 (Crossing point) を測定した。また、メチオニン代謝については、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (ヒューマンメタボロームテクノロジー株式会社) によって行った。

サブテーマ 2: ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究: 1) Pairwise Ranking Component Analysis 法の開発: 機械学習により、正確に質問データと類似した細胞をデータベースと比較してランキングする手法である PARCA を考案した。本手法では、線形空間でランキングエラーを最小化する目的関数を持つ。さらに非負値の重みを持ち、過学習に対する抑制パラメーターを持つ logistic PARCA も開発した。2) 大規模遺伝子ネットワーク探索法の開発: 遺伝子の数や実験データの数が増大すると、ベイジアンネットワークの推定は事後確率分布に基づくため、推定が困難になることが知られている。そこで、遺伝子モジュールを初期値として探索空間を効率よく探す手法を開発した。本手法は今後、公開が見込まれている毒性試験のマイクロアレイなどの大量遺伝子発現データにも応用できる画期的な手法である。

サブテーマ 3: ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究: hESC は京大再生医科学研究所幹細胞センターの末盛博文博士から提供された KhES-3 株を、mES 細胞には B6G-2 を使用、各 ES 細胞の維持分化にはこれまでに確立した手法を用いた。メチル水銀の曝露はヒト培養系では NDM 培地培養期間中の Day27 から最終培養到達時点の Day50 まで、マウス培養系では NIM 培地培養期間中の Day12 から最終培養到達時点の Day23 までとした。曝露スタート時点から MTT アッセイにより経時的に細胞活性を測定、培養最終段階で RNA を採取し、*Nanog*, *Pou5f1*, *Nodal*, *Nes*, *Pax6*, *Emx2*, *Mtap2*, *En1*, *Otx1*, *Hoxb1*, *Hoxb4*, *Olig1*, *Olig2*, *Gapdh* の mRNA を定量 RT-PCR で測定した。また MAP2 抗体による免疫染色を施し、全自動細胞画像

解析装置で MAP2 陽性細胞のからの神経突起長と分岐点数を測定した。

サブテーマ 4: ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験に関する研究: ヒト ES 細胞 (KhES-3 株) は維持分化にはこれまでに確立した手法を用いた。分散した KhES-3 を Rock 阻害剤 10 μ M 添加したヒト EB 形成用培地に懸濁して数を数えた後、9000 cell/well となるように、非接着性 U 字底 96 穴プレートにまいた (Day1)。Day12 に神経誘導培地に交換し Day14 にオルニチン/ラミニンでコートした接着性平底 96 穴プレートに 1 EB/well となるように播いた。同時に培地を神経増殖培地に交換した。Day16 に EB が接着したことを確認した後、化学物質もしくは溶媒のみ (DMSO 終濃度 0.002%) を添加した神経増殖培地に交換し曝露を開始した。24、48、72、96 時間後に RNA 精製用のライシスバッファーにて、各実験群 EB2 個ずつ処理した。神経毒性物質、発ガン性物質等の各種用量の曝露を行った。RNA を採取して複数の分化マーカー遺伝子 (*OCT3/4*, *NANOG*, *NESTIN*, *NODAL*, *GATA2*, *LMX1A*, *PAX6*, *TUJ1*, *MAP2*, β -*ACTIN*) の発現レベルを qRT-PCR で測定した。この大規模遺伝子発現情報を基にサポートベクターマシン (SVM) を構成し、毒性の判別試験を行った。

(倫理面への配慮)

共同研究機関である国立環境研究所は、2008 年 10 月 11 日付で文部科学省ヒト ES 細胞使用実験倫理審査委員会から研究実施が認可されている。また、研究代表者大迫も東京大学ライフサイエンス委員会倫理審査専門委員会で 2009 年 12 月機関承認、2010 年 1 月文部科学省より使用許可を得た。また、データ解析を行う産業技術総合研究所でもヒト由来試料実験倫理委員会にて研究承認が得られた (2009 年 7 月 8 日付)。

C. 研究結果

サブテーマ 1: ヒト ES 細胞実験における神経

分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究：H9 細胞由来神経前駆細胞を培養し、3 日目に、サリドマイドを培養液に添加し、7 日目に培地からサリドマイドを取り除き、さらに 5 日間培養したとき、コントロールと比較して $10^{-7}M$ 及び $10^{-5}M$ サリドマイド曝露群は、神経突起面積、神経突起伸長、分枝点数及び交差点数には、増加傾向はあるものの有意な影響を示さなかった。一方、TH 陽性ニューロンについては、高濃度の $10^{-5}M$ サリドマイドの曝露によって、神経突起面積、TH 陽性ニューロン数が抑制された。また、TH 陽性ニューロンを 3 つのサイズに分けて、影響を調べると、サリドマイド曝露群で小と中のサイズで大きく抑制されていることがわかった。次に、細胞の状態を最も良く反映しているメタボローム解析を行った。メチオニン代謝の変動が、ドーパミン、ノルエピネフリンの代謝に影響し、ドーパミンニューロンの発達に影響を及ぼすことが知られている。また、サリドマイドの催奇形性のメカニズムには、酸化ストレスの誘発による DNA 傷害や蛋白質の酸化的損傷の関与があると指摘されている。そこで、メチオニン代謝の中で、S-アデノシルメチオニン（SAM）、コリン、グルタチオン、グルタチオンジスルフィド(GSSG)を測定し、昨年度実施した未分化期の曝露影響と比較した。その結果、今回の実験では、SAM はサリドマイド曝露でほとんど影響をしめさなかった。コリンは、約 60%の減少で、あったが、グルタチオンは、 $10^{-7}M$ で約 40%の減少が認められた。SAM、コリン及び GSSG に関する結果は、未分化期の曝露の場合と反対の結果であった。

サブテーマ 2： ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究：1) Pairwise Ranking Component Analysis 法の開発：PARCA を用いて、ES 細胞、iPS 細胞、癌細胞のデータを類似検索させたところ、検索ランキング間違いのエラー率がわずか 6%という、既存の手法に比べて最も良い精度が得られた。2) 大規模遺伝子ネットワーク探索法の開発：昨年度から国立環境研究所と共同開発してきたレプリカ交換法ペイジ

アンネットワーク推定プログラム RX-TAOgen を完成させ、インターネット上から利用できるようにした。また、産業技術総合研究所で開発された遺伝子モジュール探索プログラム SAMURAI を用いて 100 ~200 遺伝子のマイクロアレイデータに対して遺伝子モジュールを網羅探索し、このモジュールを出発点として、RX-TAOgen を用いると従来よりも高速に遺伝子ネットワークを推定することができた。

サブテーマ 3： ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：メチル水銀は 10 nM からマウス胚様体（EB）の生存率を低下させる作用を示したが、生存した神経細胞の dendrite 伸長には影響がなかった。一方ヒト EB では、10 nM メチル水銀は生存率には影響がないものの、分化した神経細胞の dendrite 伸長には 1nM から統計学的に有意な抑制効果を示した。ヒトおよびマウス間で十分に比較可能なオースログ遺伝子 13 種を定量 PCR で測定したデータセットと形態情報による確率推論モデルにおいても、マウスではメチル水銀に起因するネットワーク構造が見られないのに対して、ヒトではメチル水銀を最上位（親 Node）にもつネットワークを描くことがわかった。

サブテーマ 4： ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験に関する研究：全ての実験系において、2 試験、4 タイムポイント（化学物質曝露 24, 48, 72, 96 時間後）、6 濃度を使用した。この大規模遺伝子発現情報を基に、藤渕らが独自開発した最大エントロピーカーネルを利用した SVM を構成し、毒性の判別試験を行った。その結果、判別試験対象の化学物質を含まず構成した場合においても、神経毒性物質に対して 86.6%、発ガン性物質で 93.3%、さらに、非遺伝毒性発ガン物質で 100%という高確率で判別可能であった。さらに、ベイジアンネットワーク解析から計算された各遺伝子ノード間のベータ値を利用することにより、この予測率が向上することもわかった。

D. 考察

サブテーマ1： ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

研究：胎児毒性を有するサリドマイドをドーパミンニューロン分化時期に曝露し、神経細胞系列の細胞形態変化とメチオニン代謝の影響を解析した。先行研究（昨年度報告書）では、100nM のサリドマイドがニューロスフィアへの分化に影響を及ぼし、その結果として神経分化に影響を及ぼすことを示した。今年度の実験では、MAP2 ニューロンには影響を示さず、TH 陽性ニューロンすなわち、ドーパミンニューロンの発生が選択的に抑制された。特に、小さいサイズの TH 陽性ニューロンの分化が抑制されていることから、神経前駆細胞からドーパミンニューロンへの終末分化が抑制された可能性が高いものと考えられた。また、SAM は抑制されなかったが、コリン及びグルタチオンレベルが抑制されたことから、SAM 以降の経路に関与する酵素の損傷の可能性が示唆された。

サブテーマ2： ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究：当初は SVM による特定の毒性を持つかどうかの二値予測のみを考えていたが、複数の毒性を持つことも考えられるため、類似毒性のランキングを用いるデータマイニングの手法を導入した。これは現実の問題をより良く反映しており、神経毒でありかつ発癌性がある化合物などに対して計算機が示唆を与えるものとして重要であると考えられる。

サブテーマ3： ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：メチル水銀曝露は低濃度（10nM）でマウスの EB 生存率低下を引き起こしたが、ヒトではこの濃度では EB 生存率に影響はなかった。しかしながら、1nM から分化神経細胞のデンドライト伸長抑制効果が観察できたことは、この物質のヒト神経細胞への特有の効果だと考えられる。ヒトでは細胞死よりも神経系機能異常が生じるため胎生期影響が顕著に出るのではないかと考察できる。

サブテーマ4： ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験

に関する研究：今回作成した判別装置である最大エントロピーカーネルを利用した SVM は化学物質の毒性影響を十分に判別することができることが立証された。また、使用したヒト ES 細胞 KhES-3 は化合物固有の毒性影響を十分に表出することがわかった。現在確率推論により取得したネットワークデータによる判別や正準相関解析等の検討を行っている。

E. 結論

サブテーマ1： ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究：神経分化後におけるサリドマイドの曝露により、MAP2 陽性細胞の神経突起、分枝には影響が認められなかったが、ドーパミンニューロンの発生が抑制され、メチオニン中間体やグルタチオンの低下が認められた。

サブテーマ2： ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究：高性能な大規模遺伝子ネットワーク推定法が開発でき、毒性予測をするアルゴリズムも揃ってきた。最終年度は全体を統合して予測するシステムを開発する予定である。

サブテーマ3： ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：本研究課題で開発した神経細胞分化系は、同一化合物であっても、発生という観点からヒトにおける特徴的影響を観察できるポテンシャルをもつことが実証された。また、評価法として導入するベイズ推定モデルも遺伝子発現変動とその結果である細胞表現型に予測性を持つことが提示できた。

サブテーマ4： ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の判別試験に関する研究：本研究課題で評価法として導入する確率推論モデルのベイズ推定は遺伝子発現変動という細胞表現型に予測性を持つことが提示できた。また、目標とする化学物質影響予測システムのための判別装置開発に今回確立したヒト ES 細胞分化培養系は有効であることも立証された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

大迫誠一郎：研究代表者

1. Ohsako S. Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring. *Genes Environ* (2011) (*in press*)
 2. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxcol Sci* 35, 115-123, (2010).
 3. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C, and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 139, 427-437, (2010).
 4. Ohsako S, Fukuzawa N, Ishimura R, Kawakami T, Wu Q, Nagano R, Zaha H, Sone H, Yonemoto J, and Tohyama C. Comparative contribution of the aryl hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod* 82, 636-643, (2010).
 5. Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsuhashi T, Nanmori T, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, and Hoshi N. When does the sex ratio of offspring of the paternal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure decrease: In the spermatozoa stage or at fertilization? *Reprod Toxicol* 29, 68-73, (2010).
- #### 曾根秀子：研究分担者
1. Sone H and Akanuma H. (2011) Oxidative Stress-Mediated Signaling Pathways by Environmental Stressors. In: Tahira Farooqui and Akhlaq A. Farooqui editors. *Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signaling in Vertebrates and Invertebrates*. Hoboken, NJ., Wiley-Blackwell, March, in press (書籍).
 2. Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T. (2010). In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107 (37):16331-16335.
 3. Ohsako S, Fukuzawa N, Ishimura R, Kawakami T, Wu Q, Nagano R, Zaha H, Sone H, Yonemoto J, Tohyama C. Comparative contribution of the aryl hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod*. 2010 Mar;82(3):636-643.
 4. Sone H, Akanuma H, Fukuda T. *Redox Rep*. 2010;15(3):98-114. (Review) Oxygenomics in environmental stress.
 5. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S., and Yonemoto J. (2010) pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxcol Sci*. 35: 115-123.
 6. Sone H, Fukuda T, Toyoshiba H, Yamanaka T, Perham F, Portier C. (2010) Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method. *The Open Cell Signaling Journal* 2: 1-12.
 7. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and Kurohmaru M. (2010) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective

- of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate. *Reproduction*. 139: 427-437.
8. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H. (2009) High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577:55-65.
9. Sone H., Imanishi S., Nagano R., Akanuma H., Fukuda T., Ohsako S. (2009) Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: *Biophys.Soc.China (BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and Medicine. Medimond S.r.l., 45-52 (書籍).*
5. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for multi-platform microarray data, *SIG-BIO*, 2011.
6. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Pairwise Ranking Component Analysis, submitted to *Knowledge and Information Systems* (submitted).

2. 学会発表

各研究分担報告書に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

藤渕 航 : 研究分担者

1. Jean-Francois Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs, *PLoS ONE*, 5(8):1-8, 2010.
2. Edward Wijaya, Jean-Francois Pessiot, Martin Frith, Wataru Fujibuchi, Kiyoshi Asai and Paul Horton, In Search of True Reads: A Classification Approach to Next Generation Sequencing Data Selection, in *Proc. 2010 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM) Next Generation Sequencing Workshop*, 561-566, 2010.
3. Miura K., Kinouchi M., Ishida K., Fujibuchi W., Naitoh T., Ogawa H., Ando T., Yazaki N., Watanabe K., Haneda S., Shibata C., and Sasaki I. Cell Death and Cancer (Edited by Prof. Samali A) 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs, *Cancers Special Issue*, 2, 1717-1730, (2010).
4. 千葉啓和、藤渕航「細胞情報解析に役立つツール—幹細胞研究の進展とその創薬応用に向けて」、*実験医学* Vol.28(19)(12月号)2010.
1. 曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西聡、赤沼宏美、宮崎航。「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」。特願 2009-81497(識別番号 100078662) (2009)
2. 大迫誠一郎、栗田尚佳。「CpG メチル化頻度の変動をゲノムワイドに比較解析するための DNA 試料作成方法」。米国仮出願 (出願番号: 61/309971) (2010)
3. 藤渕航、千葉啓和。「プライマーセット探索装置、プライマーセット探索方法およびプログラム」。特願 2009-212703、(2009)

分担研究報告書

ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

研究分担者

曾根秀子

国立環境研究所 環境リスク研究センター 主任研究員

研究要旨

ヒト胚性幹 (ES) 細胞から神経細胞への分化過程での化学物質の影響評価の標準化プロトコルを作成するために、その基礎データとして、曝露時期の違いによる影響を比較検討した。胚性幹細胞由来の神経細胞にサリドマイドを短期に曝露し、神経細胞の形態変化及びメチオニン、グルタチオン代謝への影響を解析した。その結果、神経分化後におけるサリドマイドの曝露により、MAP2 陽性細胞の神経突起、分枝には影響が認められなかったが、ドーパミンニューロンの発生は抑制され、メチオニン中間体やグルタチオンの低下が認められた。したがって、昨年度行った分化前曝露の影響と異なることが明らかになった。

A. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞から神経細胞への分化系を活用した化学物質の安全性評価プロトコルの標準化のためには、様々な実験条件の検討が必要である。ヒト ES 細胞から神経細胞の分化過程は、多段階である。

催奇形性を示す化合物として報告されてきたサリドマイドは、近年になって、国内では骨髄異形成症候群の治療薬として認可され、海外ではハンセン病の鎮痛剤、HIV ウイルスの増殖抑制剤として使用されている。サリドマイドの催奇形性は、曝露時期により多様であることが知られている。ヒトでの四肢損傷は、7 週以降で多発し、一方、知能発達や知覚神経障害は、妊娠 20-24 日目に頻発することが報告されている。これまでの研究において、ドーパミンニューロン分化前の未成熟神経細胞の時期にサリドマイドを曝露すると、MAP2 陽性神経細胞が増加し、細胞障害を引き起こすメチオニン代謝中間体の一物質であるシスチンも上昇されることを見出した。そこで、本研究では、先行研究との比較の

ために、胎児毒性を有するサリドマイドをドーパミンニューロン分化時期に曝露し、神経細胞系列の細胞形態変化とメチオニン代謝の影響を解析した。

B. 研究方法

本研究で使用したヒト胚性幹細胞 (H9 細胞) 由来神経前駆細胞株は、米ジェロン社から購入した。サリドマイド (CasN0. 50-35-1) は、Toronto Research Chemicals, Inc. から購入した。サリドマイドの曝露は、培養液中最終濃度 $10^{-7}M$ 及び $10^{-5}M$ になるように曝露した。曝露期間は、4 日間で行った。細胞の形態を測定するために、培養後、4%PFA で固定の後、神経特異的マーカーである MAP2 たんぱく質、ドーパミンニューロンを認識するチロシンヒドロキシラーゼ (TH) たんぱく質をそれぞれの抗体で免疫染色を施した。蛍光シグナルは、マルチチャンネル画像解析装置 (IN Cell アナライザー1000、GE ヘルスケア・ジャパン) によって検出した。解析した細胞形態は、MAP2 陽性細胞と TH 陽性細胞について、それぞれ、神経突起面積 (Neurite area)、細胞の数 (Nuc count)、神経突起の総伸長 (Neurite

length)、分岐点の総数 (Branch point)、および交差点 (Crossing point) の総数とした。また、メチオニン代謝については、キャピラリー電気泳動-質量分析計(ヒューマンメタボロームテクノロジー株式会社)によって行った。

(倫理面への配慮)

ヒトES細胞の培養操作は、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」および国立環境研究所の医学研究倫理審査委員会の「国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理規定」に基づいて行われた。

C. 研究結果

H9 細胞由来神経前駆細胞を培養し、3 日後に、サリドマイドを培養液に添加し、4 日後の 7 日目に培地からサリドマイドを取り除き、さらに 5 日間培養したときの、コントロール、サリドマイド $10^{-7}M$ 及び $10^{-5}M$ 曝露群の典型的な細胞形態を図 2 に示した。ほぼ均一にヘキストで青く染色された核と、赤い MAP2 陽性ニューロン線維の様な分布と、局在する緑の TH 陽性コントロールが確認できる。コントロールと比較して $10^{-7}M$ 及び $10^{-5}M$ サリドマイド曝露群は、神経突起面積、神経突起伸長、分枝点数及び交差点数には、増加傾向はあるものの有意な影響を示さなかった (図 3)。一方、TH 陽性ニューロンについては、高濃度の $10^{-5}M$ サリドマイドの曝露によって、神経突起面積、TH 陽性ニューロン細胞体数が抑制された (図 4A、図 4C)。また、TH 陽性ニューロンを 3 つのサイズに分けて、影響を調べると、サリドマイド曝露群で $150-199 \mu m^2$ 、 $200-249 \mu m^2$ の小と中のサイズで大きく抑制されていることがわかった。次に、細胞の状態を最も良く反映しているメタボローム解析を行った。メチオニン代謝の変動が、ドーパミン、ノルエピネフリンの代謝に影響し、ドーパミンニューロンの発達に影響を及ぼすことが知られている。また、サリドマイドの催奇形性のメカニズムには、酸化ストレスの誘発による DNA 傷害や蛋白質の酸化的損傷の関与があ

ると指摘されている。そこで、メチオニン代謝の中で、S-アデノシルメチオニン (SAM)、コリン、グルタチオン、グルタチオンジスルフィド(GSSG)を測定し、先行研究の結果と比較した。その結果、今回の実験では、SAM はサリドマイド曝露でほとんど影響をしめさなかった。コリンは、約 60%の減少で、あったが、グルタチオンは、 $10^{-7}M$ で約 40%の減少が認められた。SAM、コリン及び GSSG に関する結果は、初期曝露の場合と反対の結果であった。

D. 考察

本研究は、胎児毒性を有するサリドマイドをドーパミンニューロン分化時期に曝露し、神経細胞系列の細胞形態変化とメチオニン代謝の影響を解析した。先行研究 (昨年度報告書)では、 $100nM$ のサリドマイドがニューロスフィアへの分化に影響を及ぼし、その結果として神経分化に影響を及ぼすことを示した。今年度の実験では、MAP2 ニューロンには影響を示さず、TH 陽性ニューロンすなわち、ドーパミンニューロンの発生が選択的に抑制された。特に、小さいサイズの TH 陽性ニューロンの細胞体が抑制されていることから、今回の培養期間における発生の芽を抑制した可能性が高いものと考えられた。

また、SAM は抑制されなかったが、コリン及びグルタチオンレベルが抑制されたことから、SAM 以降の経路に関与する酵素の損傷の可能性示唆された。

先行研究と今回の実験の違いには、KhES-3 細胞(京大分与、日本人)と H9 細胞(ウイスコンシン)の違い、曝露時期の違いと、ふたつの違いによる可能性がある。そのため、今後、本格的な標準化のためには、使用する細胞株や曝露時期のポイントなど複数の視点からの総合評価が必要と考えられた。

E. 結論

ヒト胚性幹細胞由来の神経細胞にサリドマイドを短期に曝露し、神経細胞の形態変化及びメチオニ

ン、グルタチオン代謝への影響を解析した。その結果、神経分化後におけるサリドマイドの曝露により、MAP2 陽性細胞の神経突起、分枝には影響が認められなかったが、ドーパミンニューロンの発生が抑制され、メチオニン中間体やグルタチオンの低下が認められた。

F. 健康危険情報

特に記載する項目はない

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sone H and Akanuma H. (2011) Oxidative Stress-Mediated Signaling Pathways by Environmental Stressors. In: Tahira Farooqui and Akhlaq A. Farooqui editors. *Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signaling in Vertebrates and Invertebrates*. Hoboken, NJ., Wiley-Blackwell, March, in press (書籍).
2. Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T. (2010). In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107 (37):16331-16335.
3. Ohsako S, Fukuzawa N, Ishimura R, Kawakami T, Wu Q, Nagano R, Zaha H, Sone H, Yonemoto J, Tohyama C. Comparative contribution of the aryl hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod*. 2010 Mar;82(3):636-643.
4. Sone H, Akanuma H, Fukuda T. *Redox Rep*. 2010;15(3):98-114. (Review) Oxygenomics in environmental stress.
5. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S., and Yonemoto J. (2010) pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxcol Sci*. 35: 115-123.
6. Sone H, Fukuda T, Toyoshiba H, Yamanaka T, Perham F, Portier C. (2010) Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method. *The Open Cell Signaling Journal* 2: 1-12.
7. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and Kurohmaru M. (2010) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate. *Reproduction*. 139: 427-437.
8. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H. (2009) High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577:55-65.
9. Sone H., Imanishi S., Nagano R., Akanuma H., Fukuda T., Ohsako S. (2009) Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: *Biophys.Soc.China (BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and Medicine*. Medimond S.r.l., 45-52 (書籍).

2. 学会発表

1. 赤沼宏美, 永野麗子, 座波ひろ子, 大迫誠一郎, 曾根秀子 (2010) 胎生プログラミング異常を検出するためのマルチプロファイリング技術の確立. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 13 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 37
2. Akanuma H., Nagano R., Toyoshiba H., Koikegami S., Ohsako S., Sone H. (2010) Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks. *Chem-Bio Informatics(CBI)2010, Abstracts*, 131.
3. Akanuma H., Nagano R., Toyoshiba H., Koikegami

- S., Ohsako S., Sone H. (2010) Multi-profiling analysis of Chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks. Comput.Biol.Res.Cent. Workshop 2010, Abstracts, P74
4. Akanuma H., Zaha H., Okura M., Kanda K., Fujibuchi W., Taniguchi T., Sone H. (2010) Bayesian network analysis of chemical toxicities for health risk assessments. InCOB2010 (9th Int.Conf.Bioinformatics) , Abstracts, 39
5. 永野麗子, 何小明, 横山雅美, 赤沼宏美, 座波ひろ子, 末盛博文, 大迫誠一郎, 曾根秀子 (2010) マウスおよびヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究. 第 37 回日本トキシコロジー学会年会。
6. 大迫誠一郎, 永野麗子, 何小明, 今西哲, 藤渕航, 赤沼宏美, 曾根秀子 (2010) マウスおよびヒト ES 細胞を用いた神経分化培養系におけるメチル水銀の毒性影響評価. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 13 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 39
7. QIN XIANYANG, 座波ひろ子, 永野麗子, 吉永淳, 米元純三, 曾根秀子 (2010) 男児生殖疾患感受性遺伝子 ARNT2 とエストロゲン様内分泌かく乱物質との関連. 第 80 回日本衛生学会学術総会, 日衛誌, 65(2), 265
8. 曾根秀子, 永野麗子, 赤沼宏美, 座波ひろ子, 大迫誠一郎 (2010) ヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 13 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 38

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

曾根秀子, 大迫誠一郎, 永野麗子, 今西 聡, 赤沼宏美, 宮崎 航. 「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」特願 2009-81497, (2009).

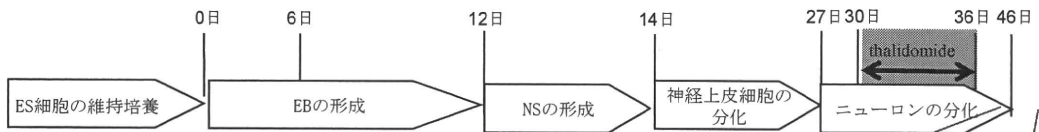
2. 実用新案登録

なし

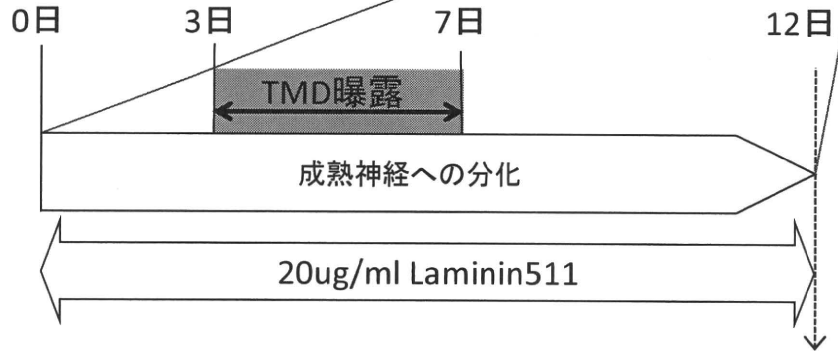
3. その他

本研究は、永野麗子（独立行政法人国立環境研究所, NIES ポスドクフェロー）及び赤沼広美（独立行政法人国立環境研究所, NIES リサーチアシスタントフェロー）が共同研究者として参加した。

KhES-3細胞からの分化(先行研究)



H9由来ヒト神経前駆細胞 (hNPC) からの分化



- ・メタボローム解析
- ・免疫染色→マルチチャンネル画像解析

図1 ヒト神経前駆細胞(hNPC)培養プロトコル

KhES-3細胞から神経系への分化プロトコルと、本実験で用いたhNPCとの分化的時系列を示した。hNPCは既に神経系への分化が決まった細胞でありKhES-3細胞からの分化と比較するとかなり後期の段階に当たる。

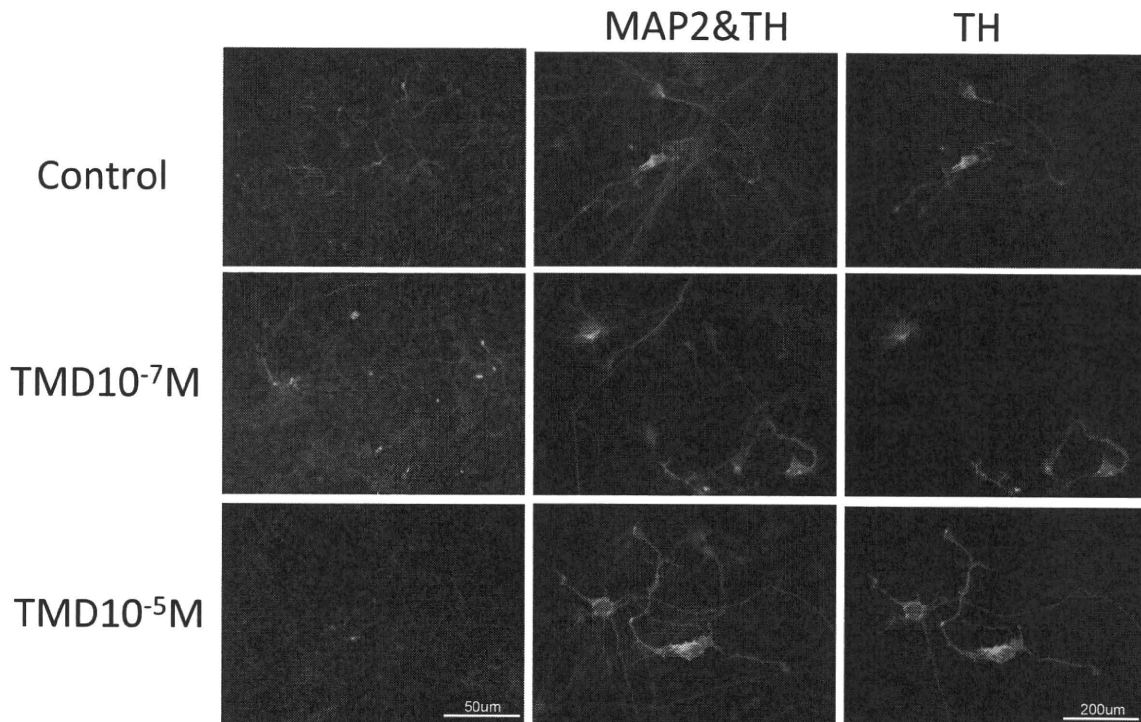


図2 hNPC分化神経細胞のMAP2及び、TH免疫染色

Control、TMD曝露群ともに、MAP2陽性神経細胞とTH陽性の神経細胞の両方が見られた。

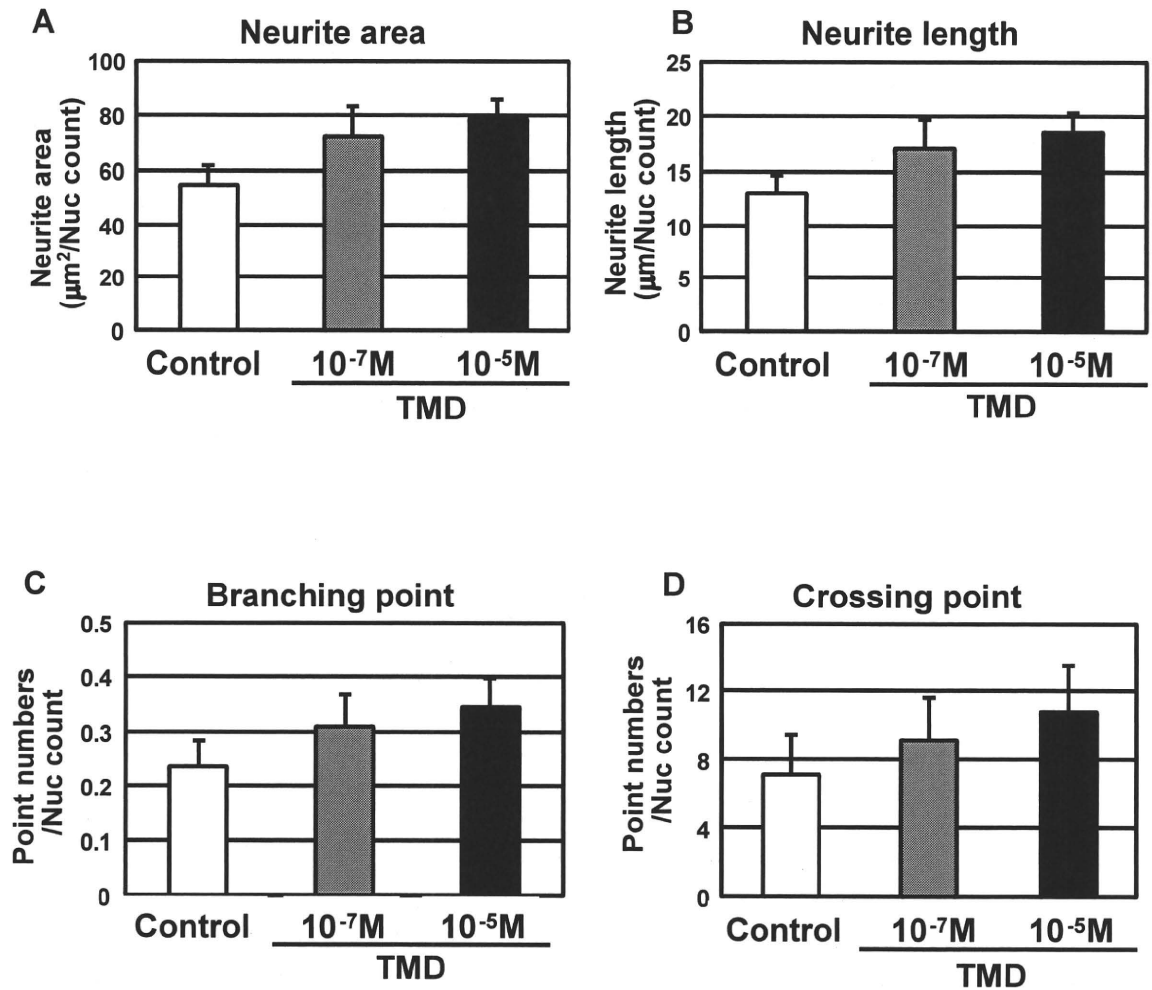


図3 hPNC分化MAP2陽性神経細胞の形態解析
Neurite area (A), Neurite length, (B) Branching point, (C) Crossing point (D)について
全細胞数あたりで補正した値を示した。Controlと比較してTMD曝露群では神経細胞
が多く、神経突起も長くなる傾向が見られた。

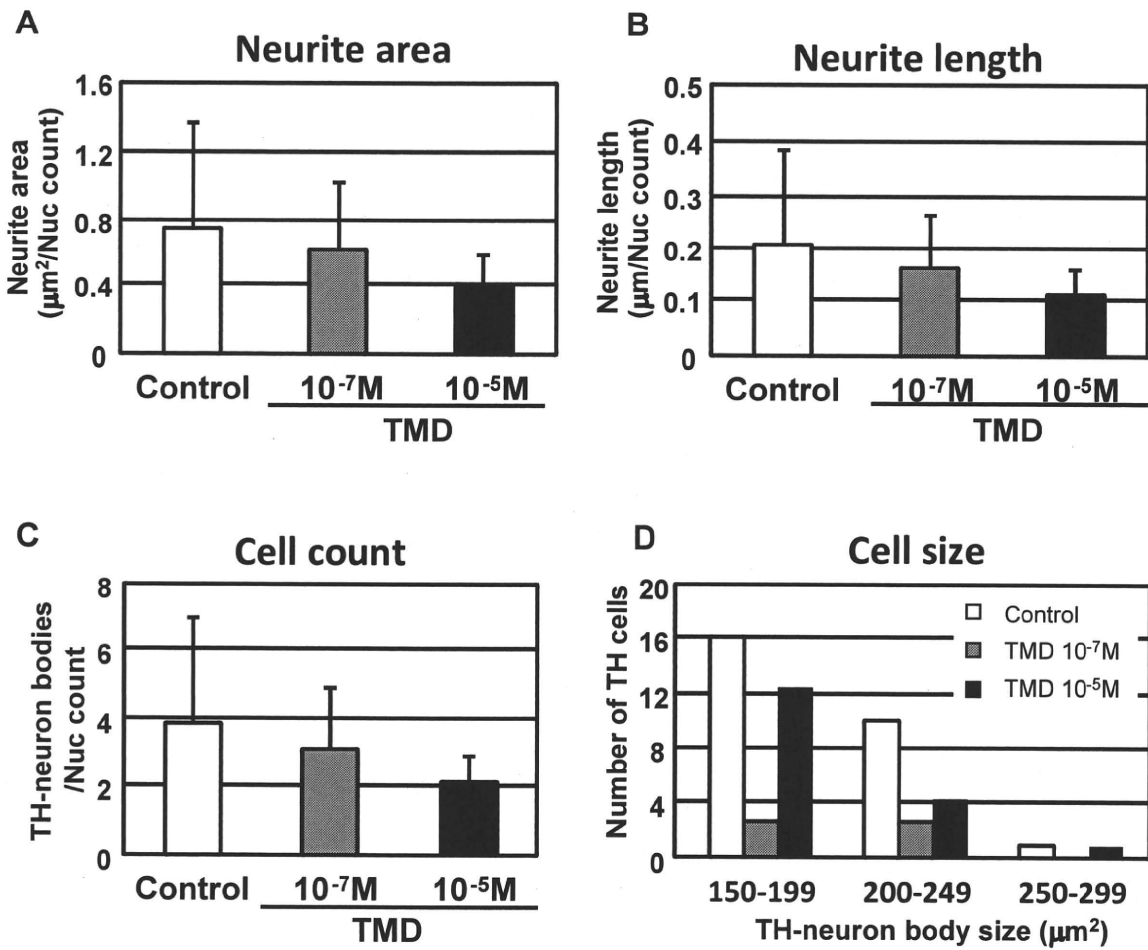


図4 TH陽性神経細胞のINCell Analyzer解析結果

Neurite area (A), Neurite length (B), Cell count (C)について全細胞数あたりで補正した値を示した。

各条件下においてTH positive cellを細胞の大きさの違いによる分布を示した(D)。

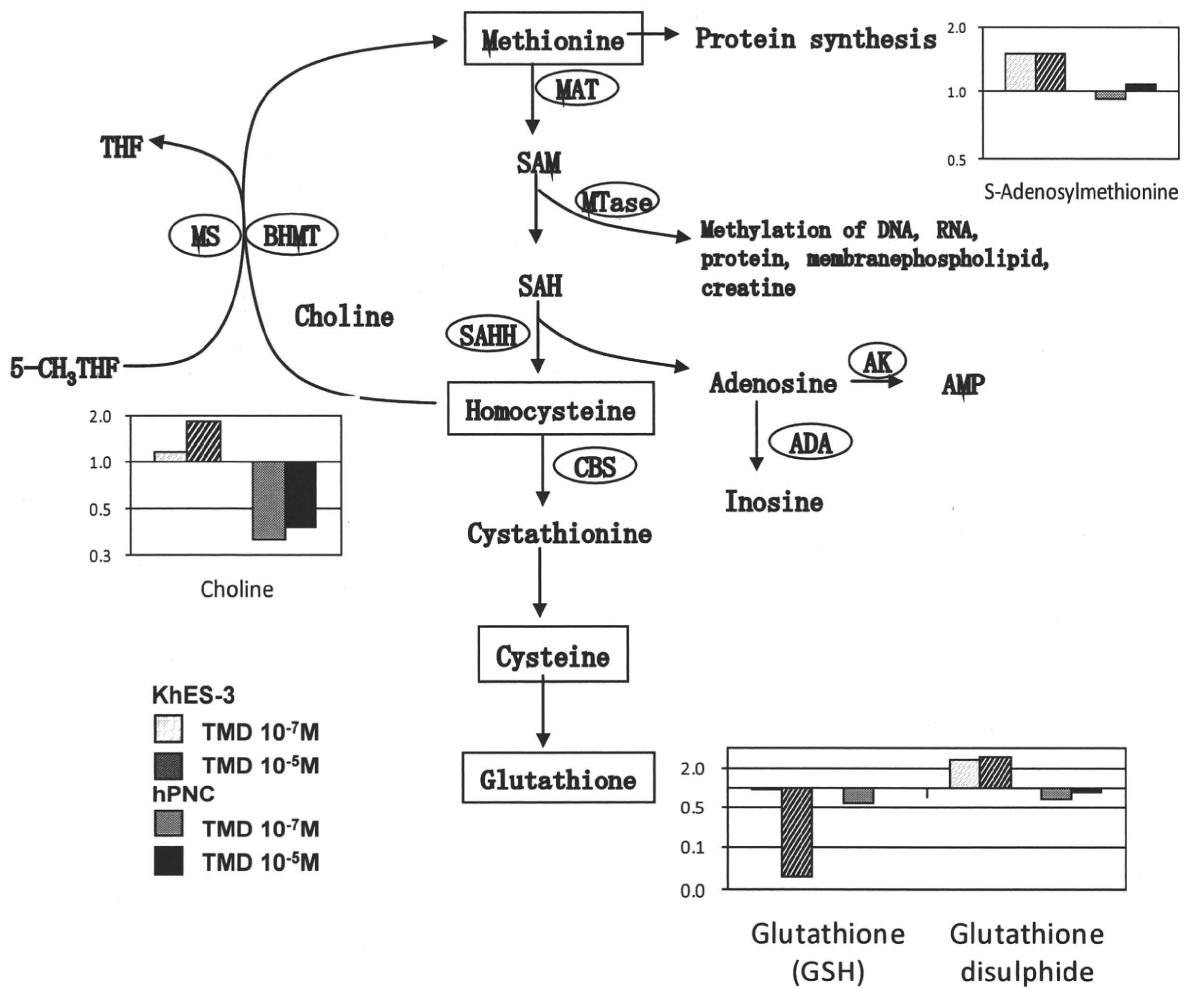


図5 メタボローム解析結果(メチオニン代謝)

KhES-3細胞から神経分化させた場合でメチオニン代謝を比較すると、hNPCの場合、ほとんどの代謝物が減少する傾向が見られた。