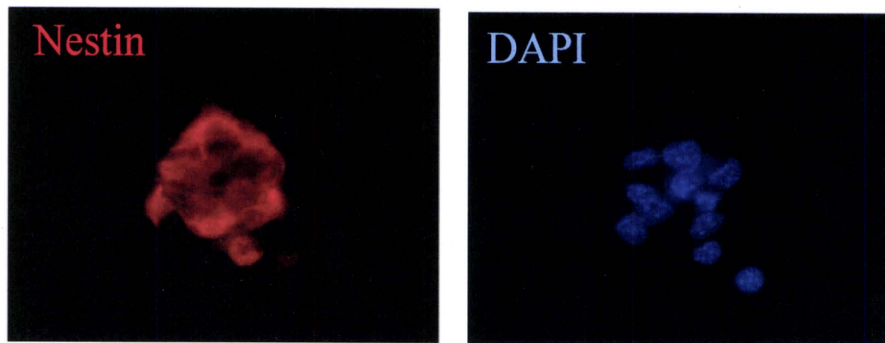


(A)



(B)

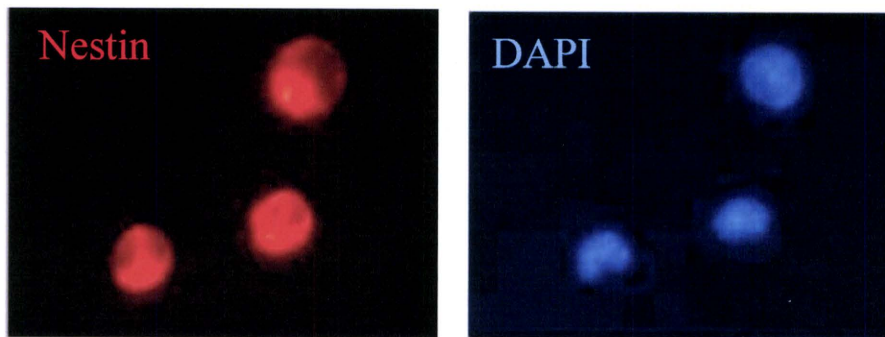


図9. 神経幹／前駆細胞における Nestin の発現.

(A) NT2 由来の neurosphere、(B) neurosphere より単離した神経幹／前駆細胞を抗 Nestin 抗体で免疫染色を行った。

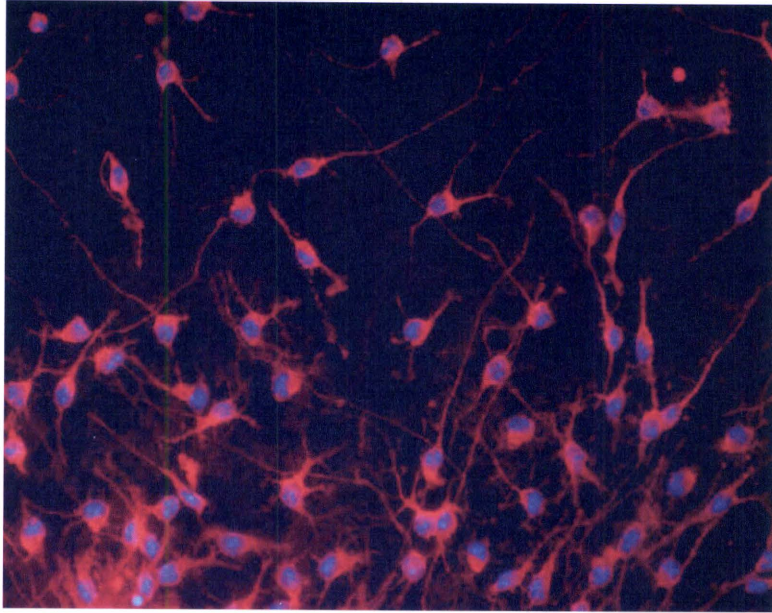


図 10. 神経細胞への分化誘導.

NT2 細胞由来の神経幹／前駆細胞を fibronectin でコートしたディッシュに播種して分化誘導を行い、抗 β -tubulin-III 抗体を用いて免疫染色した。

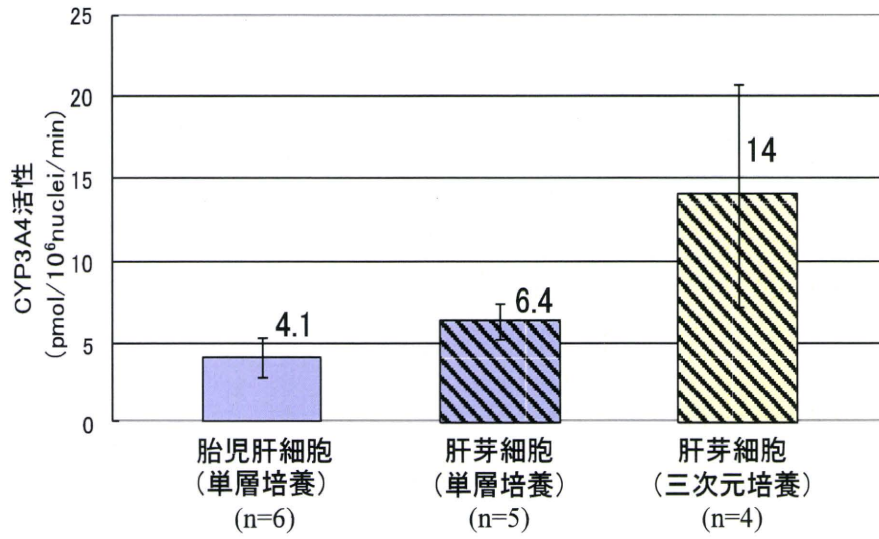


図 11. 胎児肝細胞および肝芽細胞の CYP3A4 活性

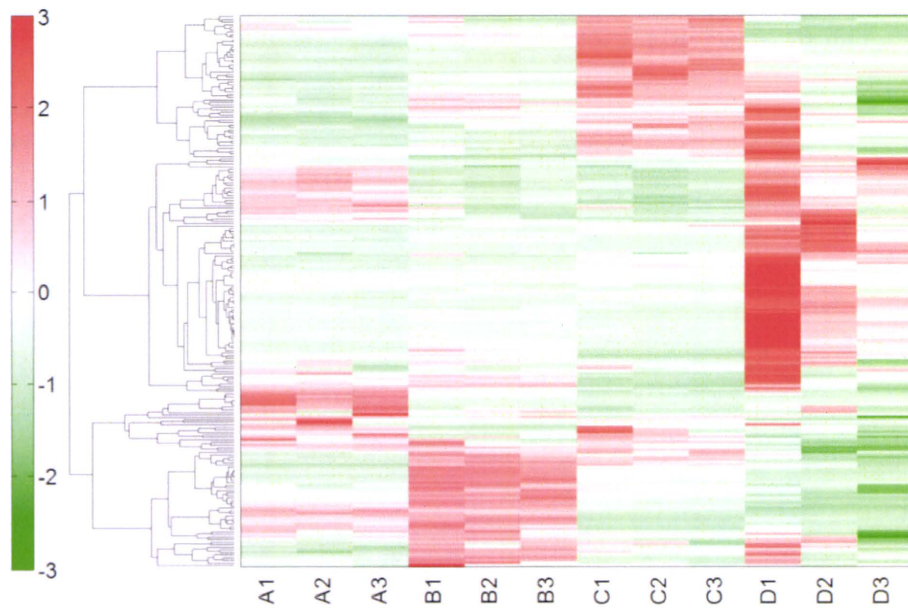


図 12. 全測定結果を用いた階層的クラスタリング.

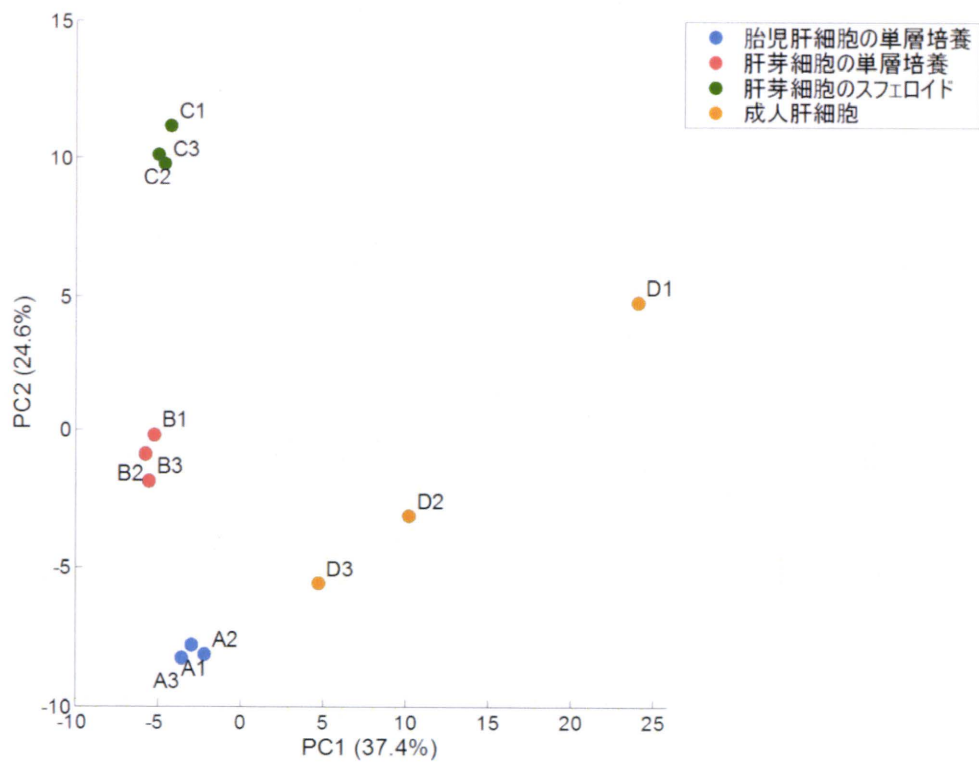


図 13. 全測定結果を用いた主成分分析.

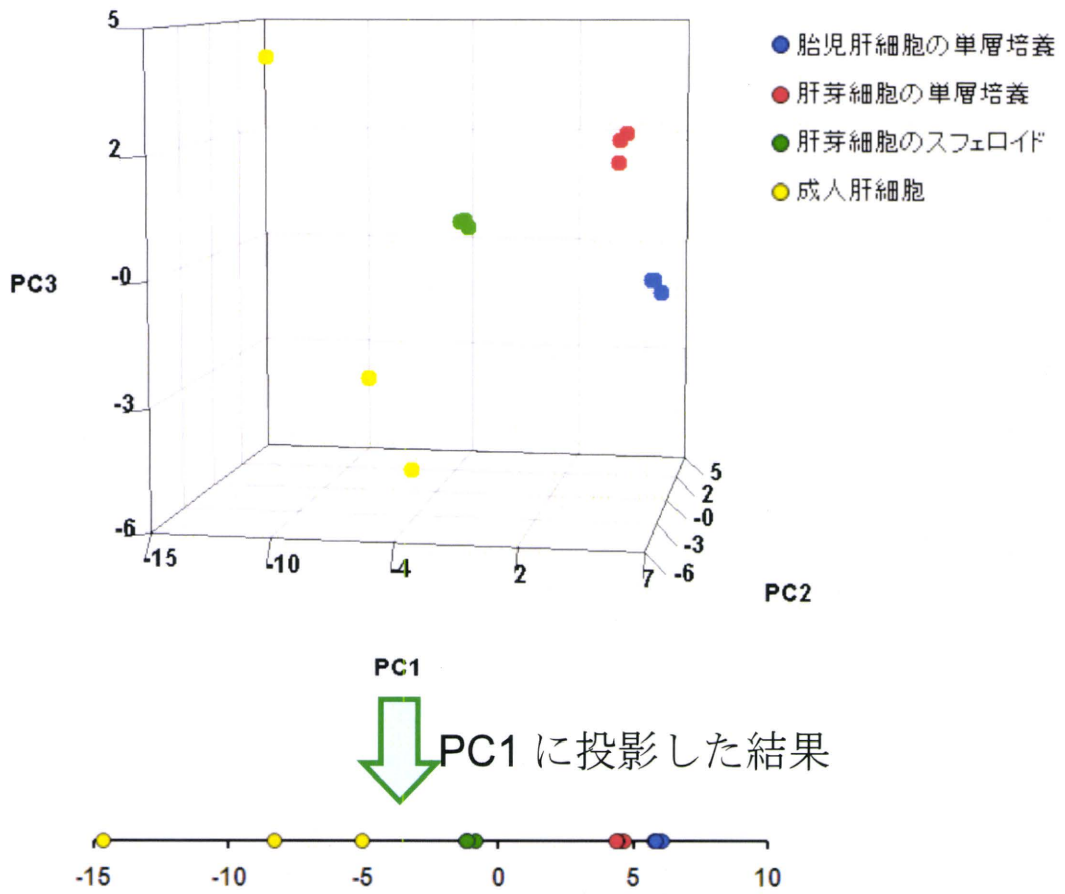
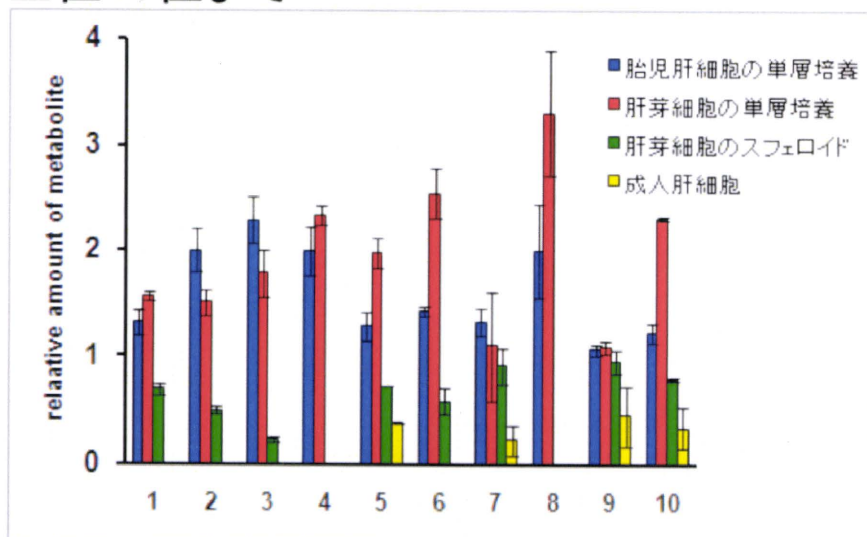


図 14. 72 の代謝物質の測定値を用いた主成分分析.

上位10位まで



下位10位まで

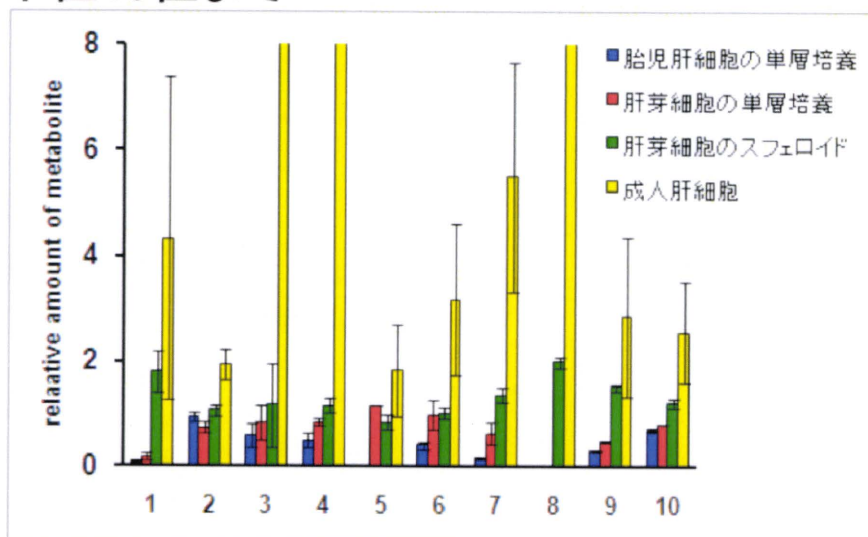


図 15. 主成分分析の第一主成分において因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質の相対的存在量.

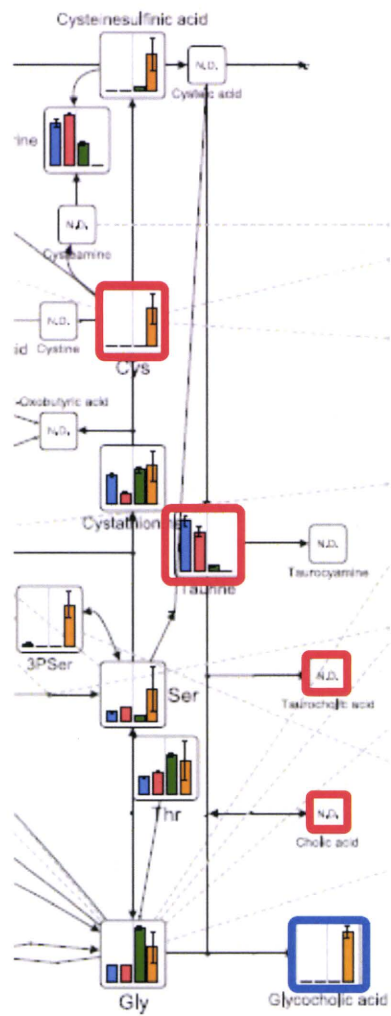


図 16. 代謝物質の経路図(システイン).
 赤枠, 主成分分析で因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質.
 青枠, 考察参照.

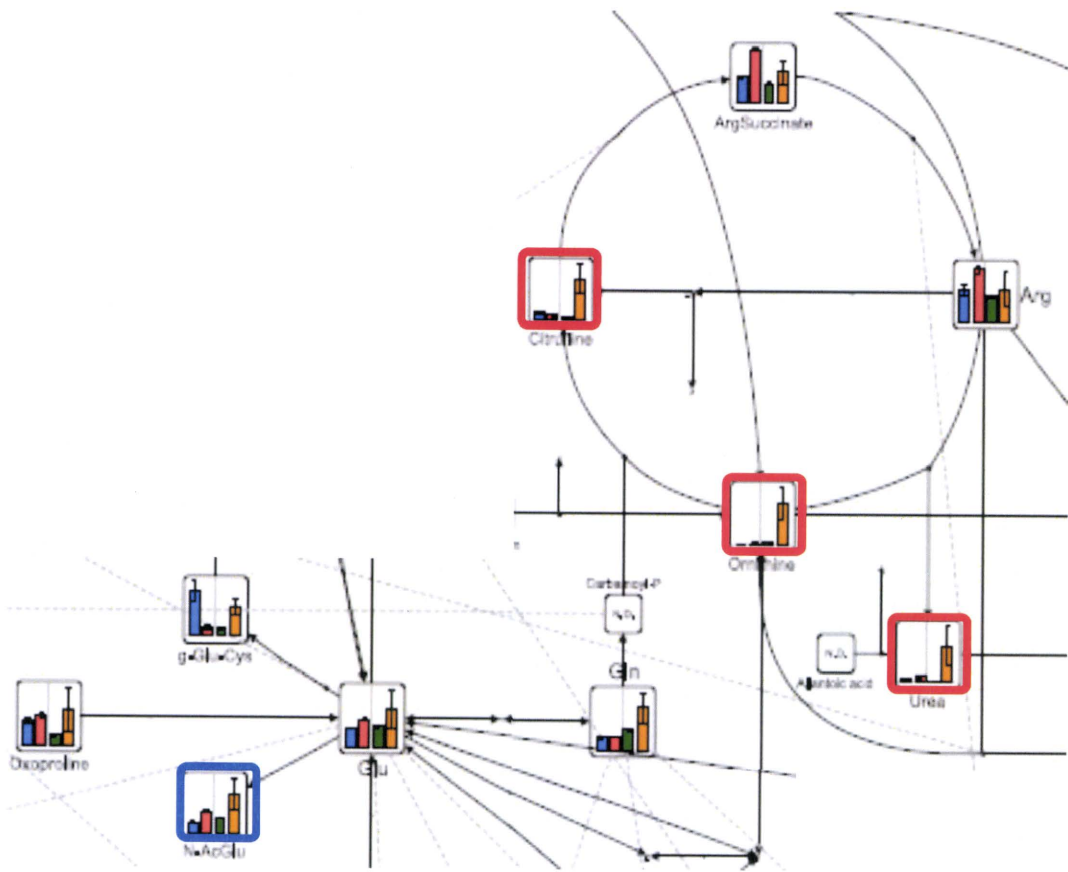


図 17. 代謝物質の経路図(オルニチン回路).
 赤枠, 主成分分析で因子負荷量の絶対値が大きかった代謝物質.
 青枠, 考察参照.

表 1. 神経堤細胞遊走距離解析法の検討

面積から計算した半径の差
 (移動距離に相当する) $100 \mu\text{M}=0.48$

実験群	平均値	標準偏差	変動係数
1	2.60	0.21	0.08
2	1.95	0.40	0.21
3	2.58	0.51	0.20
4	2.08	0.25	0.12

面積から計算した半径の比
 (移動距離の比率に相当する)

実験群	平均値	標準偏差	変動係数
1	1.93	0.17	0.09
2	1.68	0.14	0.08
3	1.85	0.10	0.05
4	1.68	0.08	0.05

培養 24 時間および 48 時間における細胞の広がりを見なして、面積から半径をもとめた。各群 3 または 4 個の培養神経管からの同一のデータについて、半径の差および比を計算した。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

神経堤細胞の機能解析による評価法の開発

研究代表者 宇佐見 誠 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第四室長
研究協力者 関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

研究要旨

個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして、ラット神経堤細胞遊走実験法を確立した。ラット妊娠 10.5 日胚の菱脳部神経管を、周辺組織の物理的除去後に、プライマリア®処理した培養容器に付着させて培養する。培養 24 時間からは被験物質を含む培養液で 48 時間まで培養し、培養 24 時間および 48 時間で求められる細胞の広がりを目と見なして求められる半径の比を遊走量として、被験物質の影響を評価する。培養終了後の細胞について、タンパクの発現解析も可能である。

A. 研究目的

神経堤細胞は、脊椎動物における個体発生の限られた時期に存在し、胚の隅々に遊走した後に末梢神経、グリア細胞などの神経系細胞を含む様々な細胞に分化することにより、個体の機能発育および形態形成に重要な役割を果たす。そのため、発生過程における神経堤細胞の誘導、遊走、分化などにおける異常は、神経堤症と総称される神経芽細胞腫などの神経系の異常を含むさまざまな疾患を引き起こす。

また、神経堤細胞のうち、頭部神経管に由来する頭部神経堤細胞の異常では、顔面の奇形などの形態形成に及ぼす影響も認められる。神経堤症による顔面奇形と同様の奇形は、胚のレチノイン酸への過剰暴露においても生じることから、神経堤細胞は化学物質による毒性の標的組織となり得ると考えられている。しかし、適切な実験法が確立されていないため、化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響は、ほとんど調べられていない。

本研究では、神経堤細胞の特徴的な機能である細胞遊走を主な指標とする、形態形成期に重要な役割を果たす神経堤細胞の機能に及ぼす化学物質の影響を調べる方法を確立し、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の一つとして用いることを目的とする。神経堤細胞実験法としては、初期着床胚をまるごと培養するラット全胚培養法との比較実験が可能であり、解析が容易な、ラット神経堤細胞を用いた実験法の確立を目指した。

ラット神経堤細胞は、妊娠 10.5 日頃の胚

から摘出した神経管を、フィブロネクチンでコートした培養容器に付着させて培養することにより、培養容器底面に遊出し、放射状に広がるように遊走する。そこで、培養液に被験化学物質を添加し神経堤細胞の遊走に及ぼす影響を調べる実験法を検討した(図 1)。胚の摘出時期、神経管の摘出法、培養容器、解析法などを検討した結果、毒性発現機序の解析も可能な簡便で安定したラット神経堤細胞遊走実験法を確立することができた。

B. 研究方法

1. 動物

ウィスター系ラット (Crlj:WI, 日本チャールスリバー) を用いた。発情前期の雌ラットを雄と終夜同居させ、妊娠ラットを得た。同居中の深夜を妊娠 0 日として起算した。妊娠 9.5 又は 10.5 日に、妊娠ラットから初期着床胚を摘出して実験に用いた。

2. 培養方法

摘出したラット初期着床胚から、電解研磨したタングステン針を用いて、菱脳部を切り出し、酵素的又は物理的に神経管を取り出した。取り出した神経管を、培養シャーレ、培養マルチプレート又は培養用スライドチャンバー (Becton, Dickinson and Company) に培養液 (10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) と共に入れ、炭酸ガスインキュベーター内で、5% CO₂、37°Cにて培養した。

3. 観察方法

培養 24 時間及び 48 時間に、神経管から遊走した細胞すべてを含む領域を、位相差顕微鏡(BZ-900、株式会社キーエンス)で撮影し、神経管の培養容器底面への付着及び遊走細胞の広がりを観察した。いずれかの観察時において、培養容器底面に付着していない神経管のデータは実験から除外した。タイムラプス観察では、培養スライドチャンバー又は 35 mm 培養シャーレで培養した神経堤細胞を、位相差顕微鏡(BZ-900)に取り付けた温度 CO₂ 制御チャンバに入れて、間欠的に撮影を行った。

4. 免疫細胞化学的方法

培養終了時に、培養組織から実体顕微鏡下で、神経管およびその周囲組織に由来する細胞を、タングステン針を用いて除去し、神経堤細胞のみを培養容器に残した。培養容器に残した神経堤細胞を、4%グルタルアルデヒドを含む生理的リン酸バッファー溶液で固定して、免疫染色を行った。一次抗体として、非標識の抗 SOX10 マウスモノクローナル抗体(MAB2864、R & D Systems)、抗 cofilin1 ウサギ抗体(sc-33779、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、抗リン酸化 cofilin1 ウサギ抗体坑(sc-21867、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、抗 LIMK-1 抗ウサギ抗体(sc-5576、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、抗 LIMK-2 ウサギ抗体(sc-5577、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を用いた。二次抗体として、蛍光標識抗マウス抗体(A-11005、Invitrogen)または抗ウサギ抗体(A-11008、Invitrogen)を反応させた後、蛍光顕微鏡(BZ-900)で観察した。

5. データの解析

細胞の撮影画像ファイルを画像解析ソフト ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) で開き、最外側の神経堤細胞をポリゴンツールでつないでできる図形を円とみなして、そのピクセル数で表される面積から計算した半径を神経堤細胞の遊走距離として解析した。実験群間の有意差の検定には *t* 検定を用いた。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては国立医薬品食品

衛生研究所の「動物事件に関する指針」を遵守した。

C. 研究結果

1. ラット胚の胎齢の検討

本実験法では、神経堤細胞が神経管に多く含まれることが望ましいと考えられる。神経堤細胞は、ラット胚では妊娠 9 日頃から認められること、12 日頃までには遊走が終わるので、遊出前の神経堤細胞が多く含まれると期待される妊娠 9.5 および 10.5 日胚について検討した。

妊娠 9.5 または 10.5 日に妊娠ラットから摘出した胚から、9.5 日では神経褶、10.5 日では菱脳部を取り出して、フィブロネクチンでコートした培養スライドチャンバーで 24 時間培養した(図 2A)。9.5 日胚の培養では、組織褶の外形は崩れていたが神経堤細胞と思われる細胞の遊出は認められなかった。また、9.5 日胚は壊れやすいため、多くの胚から同じように組織褶を取り出すことは困難であると思われた。

10.5 日胚の培養では、神経堤細胞と思われる細胞の遊出が認められた(図 2B)。また、10.5 日胚の培養 48 時間では、24 時間に比べて、神経管から遊出した細胞の遊走によると考えられる細胞集団の広がりが認められた(図 3)。培養中に神経管が培養容器底面から剥がれた場合には遊出した細胞の広がりには認められず、細胞を遊走させるためには神経管が近くに存在することが必要であると考えられた。

以上のことから、本研究におけるラット神経堤細胞遊走実験法では、ラット 10.5 日胚の神経管を 48 時間培養することにした。

2. 神経堤細胞の同定

神経管より遊出した細胞が神経堤細胞であることを確認するために、神経堤細胞マーカーの一つである核タンパク SOX10 を免疫細胞化学的に検出した。フィブロネクチンでコートした培養スライドチャンバーで、妊娠 10.5 日胚の神経管を 48 時間培養した。培養終了時に固定した遊出細胞を、抗 SOX10 抗体および蛍光標識二次抗体で染色したところ、核の部分に蛍光が観察され、神経管からの遊出細胞は神経堤細胞であることが確認された(図 4)。

3. 遊走細胞のタイムラプス観察

神経堤細胞遊走の解析法を検討するために、タイムラプス観察を検討した。フィブロネクチンでコートした培養スライドチャンバーで、妊娠 10.5 日胚の神経管を培養し、培養 30 時間から培養 46 時間まで、間欠的に遊出細胞の位相差顕微鏡像を撮影した。

遊出細胞は、培養時間の経過とともに、神経管から離れていく遊走を示したが、4 時間頃から、神経管の方向に戻る動きを示した(図 5)。撮影された組織全体の動き方から、この逆方向の動きは、神経管周囲の組織の収縮によると考えられた。また、この動きにより、細胞の密度が高くなることによる遊走細胞の線ができることが明らかになった(図 3 B)。

さらに、神経堤細胞の遊走は細胞毎に著しく異なっていたことから、タイムラプスにより化学物質の影響を調べるための処理群毎の比較をするためには、処理群毎に多くの神経堤細胞について遊走距離を測定しなければならないと考えられた。

4. 神経管調製法の検討

タイムラプス観察により、神経管周囲の組織が神経堤細胞の遊走に影響すると考えられたので、培養前に神経管周囲の組織を除く方法として、培養細胞を分散させるために汎用される、コラーゲナーゼ処理およびディスペパーゼ処理を検討した。

コラーゲナーゼ(0.1%, 室温, 12 分)は、神経管に対する毒性が強く、処理後の神経管を培養しても、神経堤細胞の遊出は認められなかった。

ディスペパーゼは、神経管の周囲組織を容易に取り除くことが出来る条件(3.42U/ml, 37°C, 30 分)では、培養期間中に壊れる細胞が多かった(図 6 A)。より温和な条件(1-0.5U/ml, 37°C, 30 分)では、ディスペパーゼ処理後にタングステン針で周囲組織を除く必要があり、タングステン針のみで物理的に周囲組織を除く方法と比べて、実験操作的に利点はなかった。また、この検討過程で、神経管から周囲組織を完全に取り除くと、神経管からの神経突起の伸展が起り、培養終了後の神経堤細胞の分離に影響すると考えられた(図 6 B)。

以上の結果から、本研究におけるラット神経堤細胞遊走実験法では、タングステン針を用いて物理的に周囲組織を除いた神経管を

用いることにした(図 6 C)。また、同時に神経管の長さを検討したところ、約 0.7 mm にすると培養終了時に円に近いような形で細胞が広がるということが分かったので、この長さに調製することにした。

5. 培養容器の検討

フィブロネクチンコートした培養容器は、他のコートに比べて高価であることおよび製造ロットによる品質のバラツキがあるように思われたことから、他のコート処理培養容器および化学処理した培養容器の利用を検討した。

細胞外基質として、フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV、ラミニンまたはポリ-D-リシンでコートした 6 ウェルプレートおよび化学処理としてプライマリア®処理した 6、24、96 ウェルプレートまたは 35 mm シャーレを用いて、ラット 10.5 日胚の神経管を 48 時間培養した。フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV およびプライマリア®では、神経管の付着、並びに神経堤細胞の遊出および遊走に差は認められなかった(図 7)。ラミニンおよびポリ-D-リシンでは、神経管の付着が弱く神経堤細胞の遊出が少なかった(図 7)。

これらの結果から、培養容器の価格、保管条件、製造ロットによる差などを考慮して、プライマリア®処理した培養容器を使用することにした。また、6 ウェルプレートまたは 35 mm ディッシュを用いた場合には、容器の径が大きいため、タングステン針で神経管を培養容器底面に押さえつけることにより、強制的に位置を決めて付着させることが出来ること、および押さえつけにより底面に付いた傷は、培養終了後に神経管を除いた後の目印となる利点があった。ただし、プライマリア®処理したガラス表面を作ることは出来ないため、観察のためにガラス表面で培養する必要がある場合は、フィブロネクチンまたはコラーゲンでコートした培養容器を用いることにした。

6. 解析法の検討

細胞遊走を簡便にかつ定量的に測定するために、神経堤細胞の広がりを見なして、その面積から計算で得られる半径の変化を遊走量とする方法を検討した。神経堤細胞の広がり面積を求める方法として、広がり

外周をなぞる方法と、再外側の細胞をポリゴンツールで繋ぐ方法を試みたところ、後者の方法が、容易で客観的であると考えられた(図8)。

ピクセル数として面積をもとめ、円の半径を計算したところ、半径の差とスケールバーの長さから、培養24時間から48時間の間の平均直線移動距離は約540 μm であると計算された。実験群間での比較において適した指標を選ぶために、半径の比も計算したところ、計算に用いたすべての群で半径の比が半径の差に比べて、変動係数が小さく、データのバラツキが小さかった(表1)。この結果から、神経堤細胞遊走実験では培養24時間および48時間で求められる細胞の広がりや円と見なして求められる半径の比を測定値として用いることにした。さらに、標準化のために、半径の比から1を引いて増加量とした後に、対照群の増加量を100%として遊走距離を計算した。

7. タンパク発現解析法の検討

培養終了時に、培養細胞を二次元電気泳動用溶解バッファーで溶解して回収し、電気泳動分析を行った。その結果、培養細胞タンパクの明瞭な二次元電気泳動像を得ることが出来た(図9)。この結果から、化学物質による培養神経堤細胞のタンパク発現に及ぼす影響を、二次元電気泳動法およびウエスタンブロット法などにより解析できると考えられた。

また、細胞遊走に重要な役割を果たす細胞骨格タンパクアクチンの機能を調節する、アクチン結合タンパクであるコフィリン1およびそのリン酸化体であるp-コフィリン1、並びにそのリン酸化制御タンパクであるLIMキナーゼ1および2の発現を、培養終了時の神経堤細胞について免疫細胞化学的に調べた。その結果、コフィリン、p-コフィリン1、LIMキナーゼ1および2を検出することが出来た。このことから、本実験法において、これらのタンパクの発現変化を解析できると考えられた(図10)。

8. 陽性対照物質を用いた検討

陽性対照物質として、胚の過剰暴露により神経堤症に似た症状を誘発することおよび神経堤細胞遊走に対する阻害作用が報告されている、オールトランス-レチノイン酸を

用いて、本研究で確立したラット神経堤細胞遊走実験法の有用性について検討した。

ラット10.5日胚の神経管を培養し、培養24時間に培養容器の底面への神経管の付着および神経堤細胞の遊走が認められるものを、以降の実験に用いた。ラット全胚培養法において、胚の形態異常および発育抑制を示す濃度である10 μM のオールトランス-レチノイン酸の存在下で、24時間から48時間まで神経堤細胞を培養した。48時間に神経管が培養容器底面から剥がれていたもののデータは除外した。その結果、対照群と比較して、約10%の有意な遊走阻害作用が認められ、本実験法は神経堤細胞遊走実験法として有用であると考えられた(図11)。

D. 考察

本研究では、化学物質の神経堤細胞機能に及ぼす影響を調べる実験系として、ラット神経堤細胞遊走実験系を確立した。この実験法は、タンパク発現の解析が可能であり、毒性発現機序に基づく評価法として有用であると考えられる。毒性発現機序を推定できるバイオマーカータンパクの同定などにより、将来的には神経堤幹細胞などの株化細胞におけるタンパク発現に及ぼす影響を調べることによる健康影響評価法への発展が期待できる。

神経堤細胞遊走阻害の作用機序としては、細胞の遊走への直接作用の他に、他の細胞における遊走の足場となる分子の合成阻害、走化性因子の合成・分泌阻害等が考えられる。本実験法では基本的には、細胞遊走への直接作用を検出する方法である。しかし、細胞遊走の解析法の検討において、移動量に対応する半径の差に比べて半径の比のバラツキが小さいことから、本実験法における細胞遊走は培養組織片の大きさに依存すると考えられる。この依存性は、神経管からの分泌物および遊出細胞数によると思われることから、本実験で検出される遊走阻害作用には、神経管を介した影響を含む可能性がある。

神経管からの細胞遊走の測定では、神経管からの距離を計測することが最も簡便であるが、培養48時間では外形が不明なため不可能であった。一方、簡便な解析法としては適さないが、本実験で検討したタイムラプス観察は、遊走速度を正確に測定できると考えられる。今回確立した実験法において、被験

物質の毒性による細胞数の減少が遊走抑制として検出された可能性がある場合には、追加実験としてタイムラプス観察は有用であると考えられる。

陽性対照物質として用いたオールトランス-レチノイン酸による遊走阻害は阻害率と対照群の移動距離から、平均 $54\ \mu\text{m}$ と計算される。これは神経堤細胞1個の大きさ程度でしかないが、神経管からの遊走を直線距離として測定したものであるため、胚においては、遊走阻害による影響はより大きいと考えられる。いずれにしても、本実験法は $50\ \mu\text{m}$ 程度の遊走阻害を検出できる感度を有し、化学物質の神経堤細胞遊走に及ぼす影響を評価するために、十分な感度があると考えられる。

E. 結論

ラット神経堤細胞の遊走に及ぼす化学物質の影響を調べるための簡便な実験法として以下の方法を確立した。ラット妊娠 10.5 日胚の菱脳部神経管を、周辺組織の物理的除去後に、プライマリア®処理した培養容器に附着させて培養する。培養 24 時間からは被験物質を含む培養液で 48 時間まで培養する。培養 24 時間および 48 時間で求められる細胞の広がりを見なして求められる半径の比を遊走量として、被験物質の影響を評価する。培養終了後の細胞について、タンパクの発現解析を行い、作用機序を推定する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Usami M., and K. Mitsunaga. 2011. Proteomic analysis and in vitro developmental toxicity tests for mechanism-based safety evaluation of chemicals. *Expert Rev Proteomics* 8: 2. 153-155.
- 2) Usami M., K. Mitsunaga, A. Miyajima, M.

Sunouchi, and O. Doi. 2010. Complement component C3 functions as an embryotrophic factor in early postimplantation rat embryos. *Int J Dev Biol* 54: 8/9. 1229-1239.

2. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., M. Nakajima, K. Mitsunaga, M. Sunouchi, O. Doi, Y. Sekino, and M. Usami. 2010. Proteomic approach to embryotoxic mechanisms of indium in cultured rat embryos. XII International Congress of Toxicology, Barcelona.
- 2) 宇佐見 誠, 満長 克祥, 宮島 敦子, 簾内 桃子, 関野 祐子. 2010. 培養ラット胚における胚本体および卵黄囊膜のプロテオーム解析. 第 55 回日本先天異常学会学術集会, 淡路島.
- 3) 宇佐見 誠, 宮島 敦子, 満長 克祥, 簾内 桃子, 関野 祐子. 2010. ラット着床胚におけるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのチャージバリエーション発現に関する研究. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 宜野湾.
- 4) Miyajima-Tabata A., M. Sunouchi, K. Mitsunaga, Y. Yamakoshi, K. Nakazawa, and M. Usami. 2010. Sexing of early postimplantation rat embryos by amplification of Sry gene in stored 2-DE samples for developmental toxicity studies. The 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

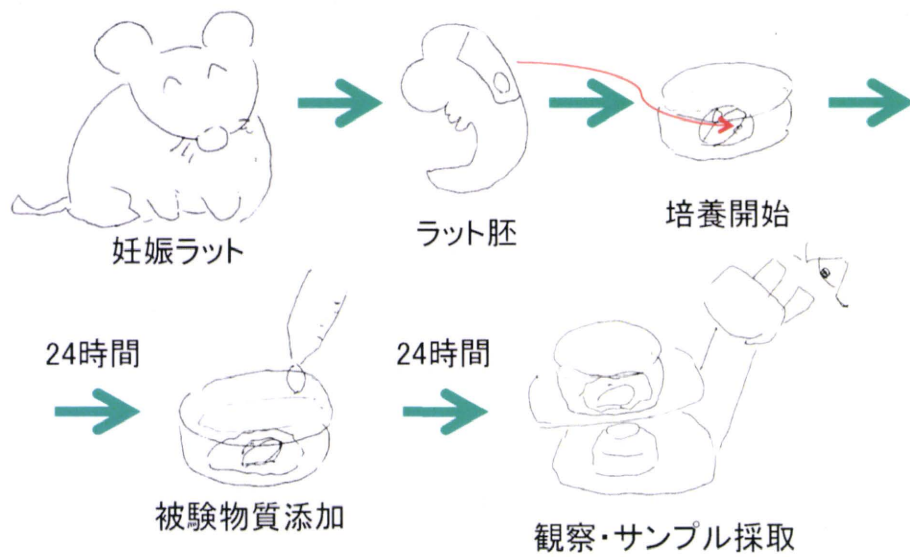


図1. 実験法の概要

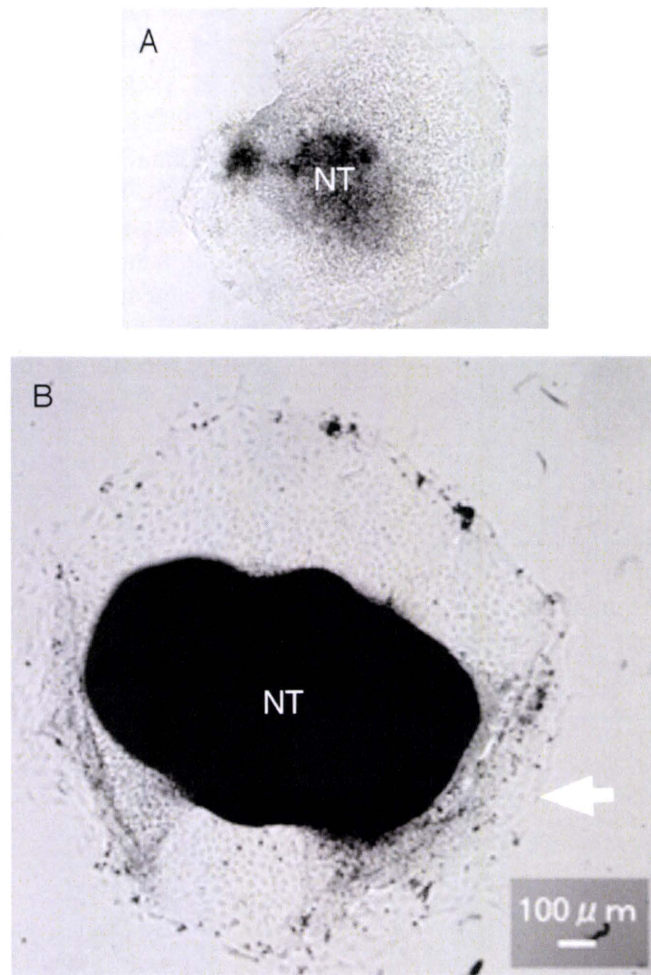


図2. ラット妊娠 9.5 および 10.5 日胚の神経管の培養.
 A. 妊娠 9.5 日胚の神経管を 24 時間培養. B. 妊娠 10.5 日胚の神経管を 48 時間培養. NT, 神経管. 白い矢印が神経堤細胞.

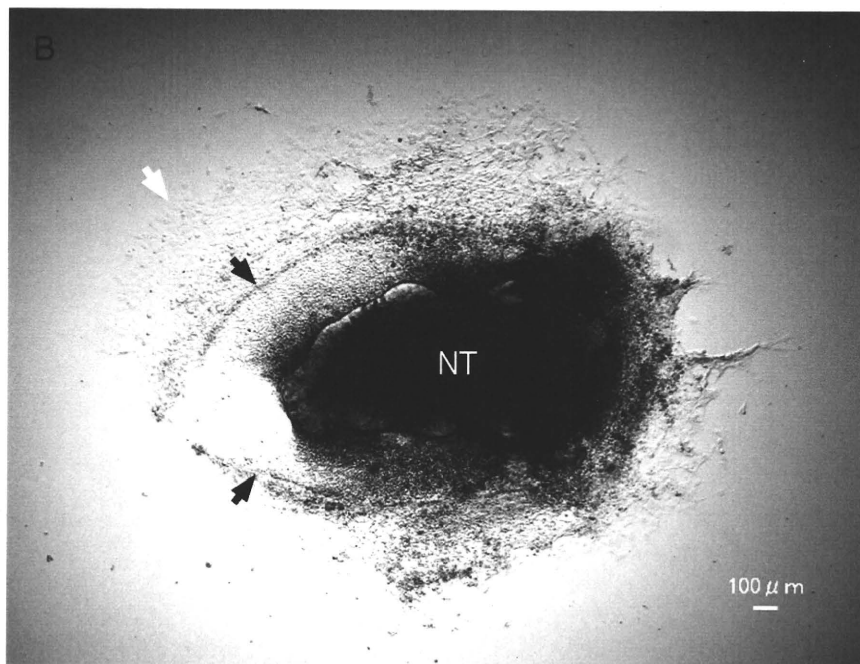
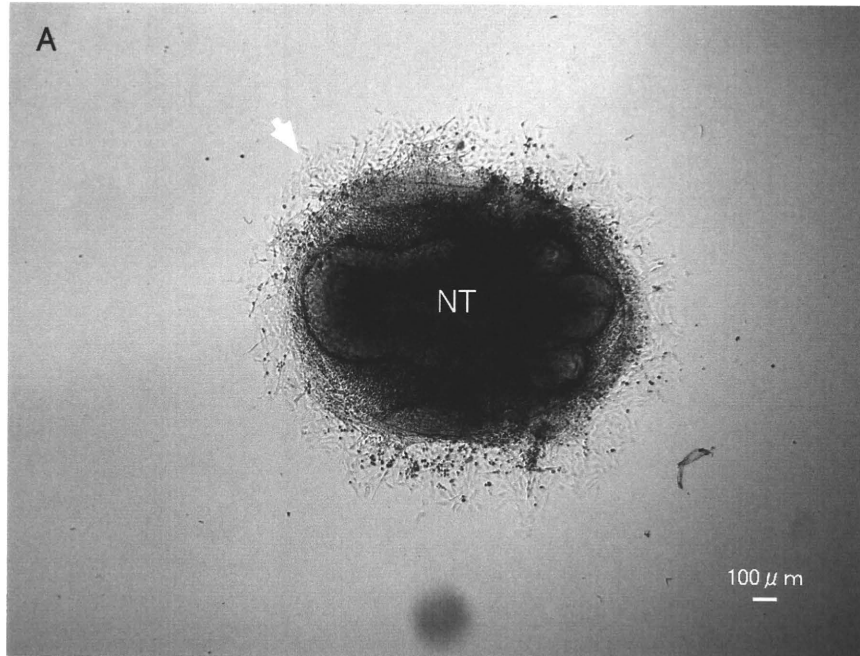


図3. ラット妊娠 10.5 日胚の培養神経管の位相差顕微鏡像。
A. 培養 24 時間. B. 培養 48 時間. NT, 神経管. 白い矢印が神経堤細胞. 黒い矢印はタイムラプス観察により明らかになった細胞が神経管の方向へ戻る動きにより生じる線.

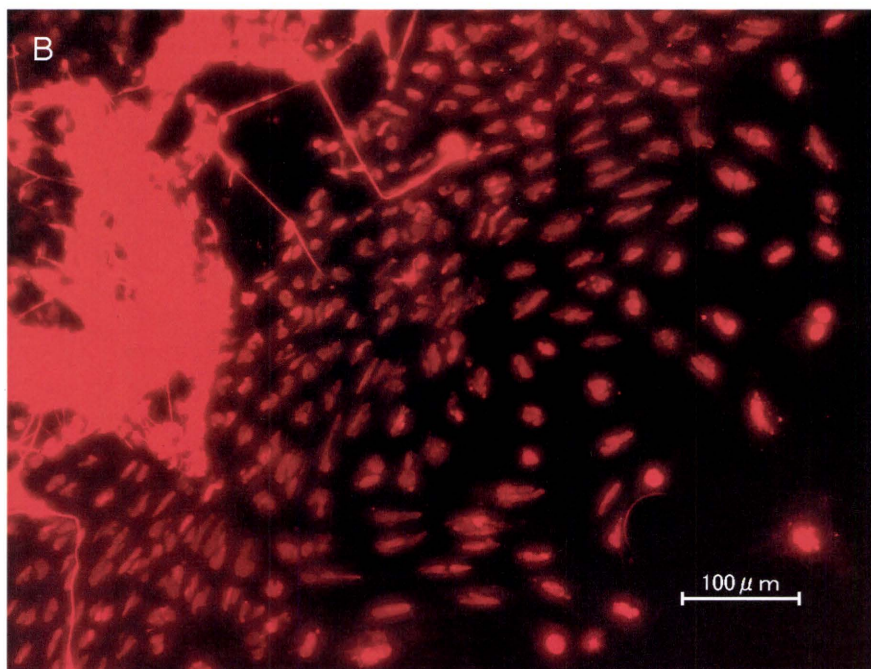
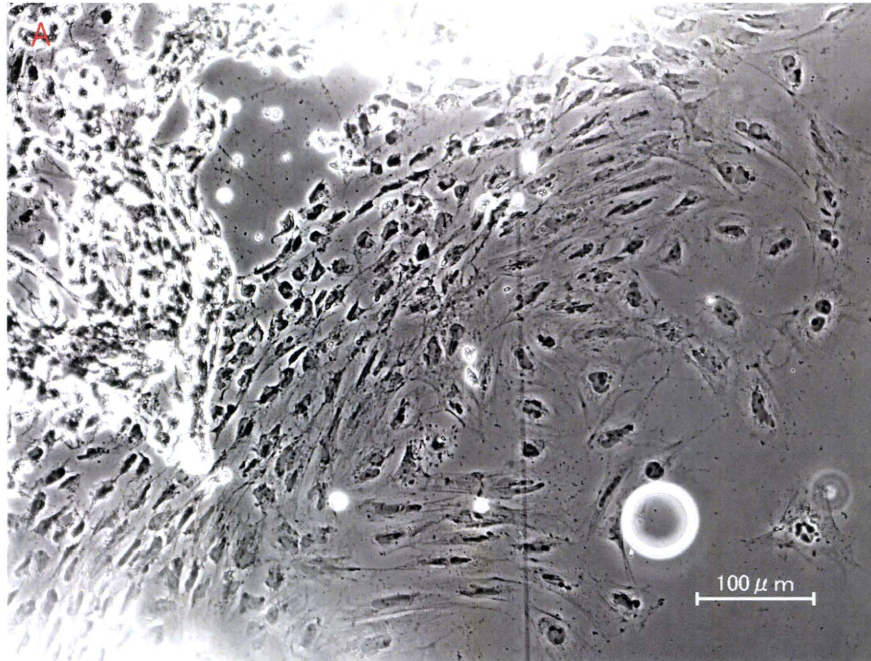


図4. 核タンパク SOX10の免疫細胞化学的検出による神経堤細胞の同定.
A. 位相差顕微鏡像. B. 抗 SOX10 抗体および蛍光標識二次抗体による蛍光顕微鏡像. 赤いところに SOX10 が存在する.

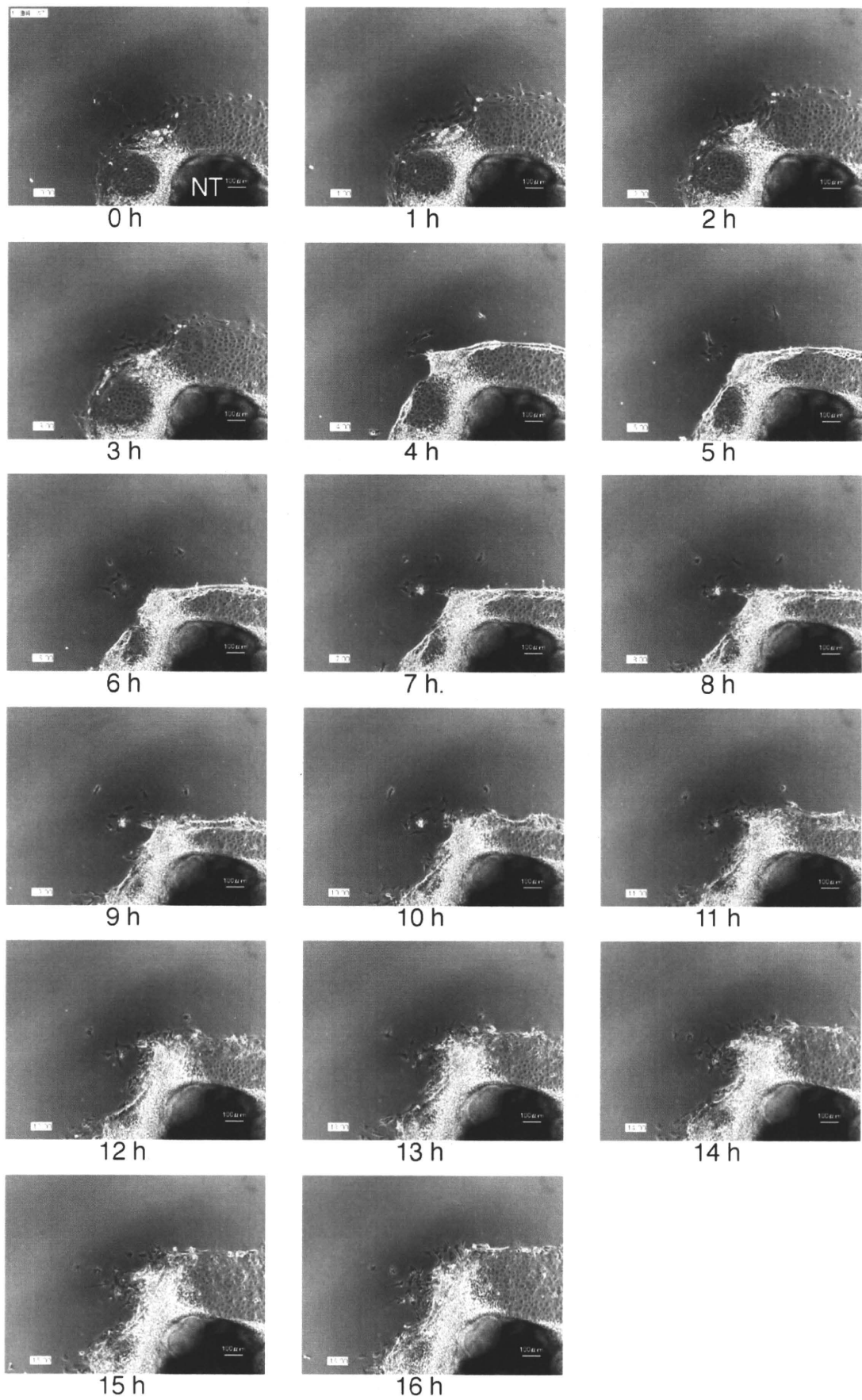


図5. ラット妊娠10.5日胚の培養神経管の培養30時間から46時間までのタイムラプス観察. 培養30時間からの1時間ごとの位相差顕微鏡像を示す. NT, 神経管.

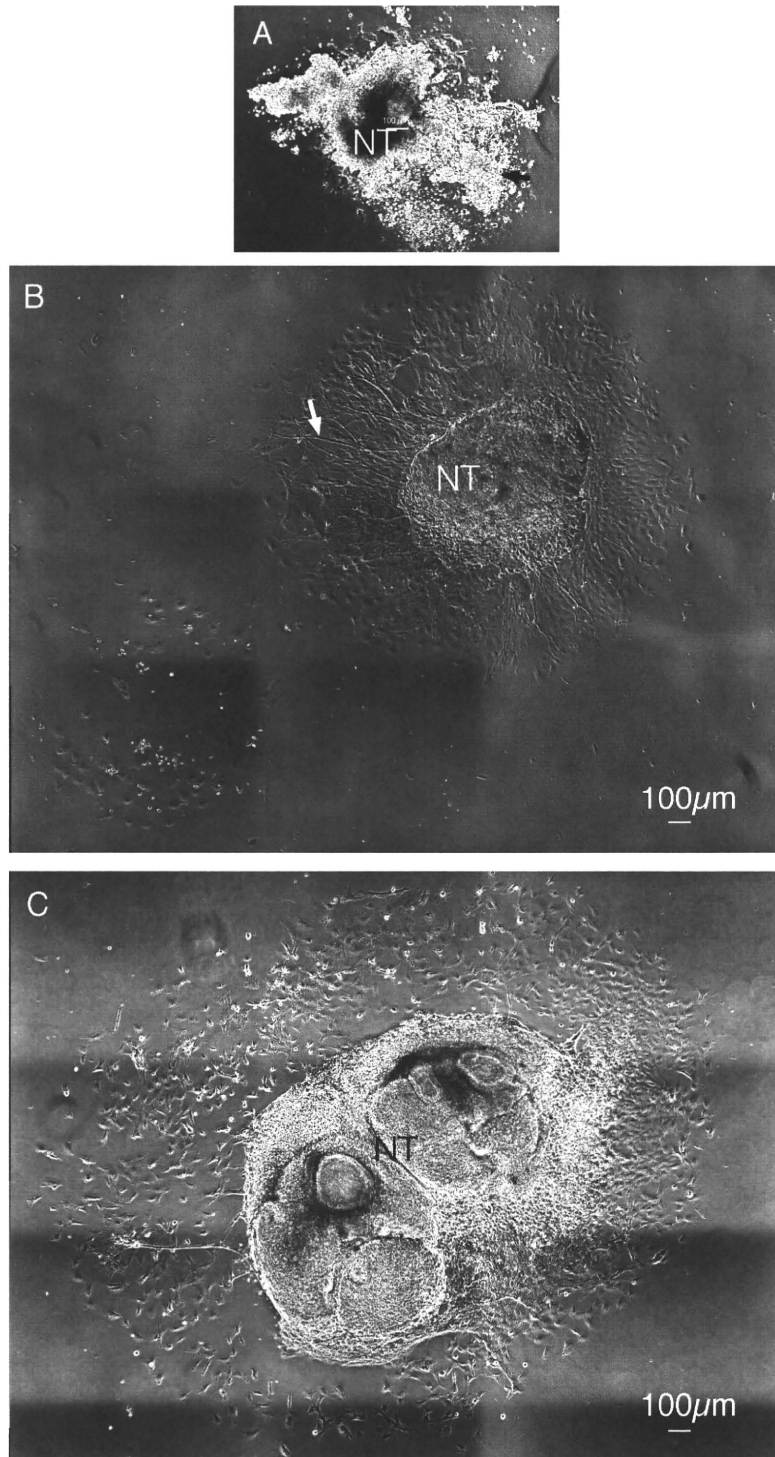
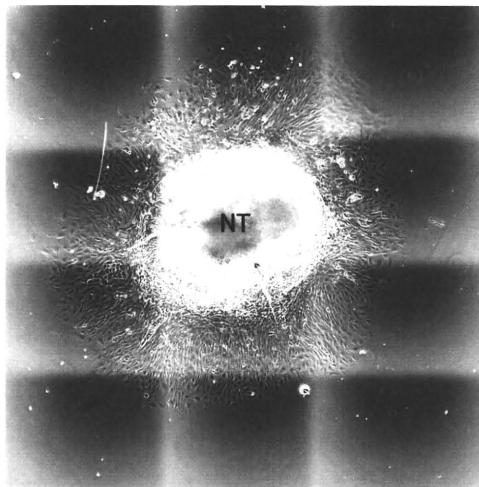
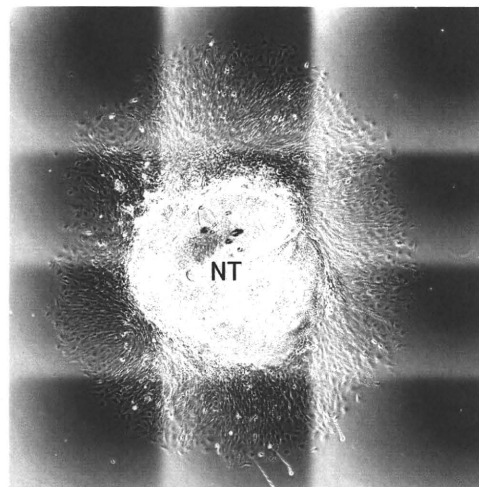


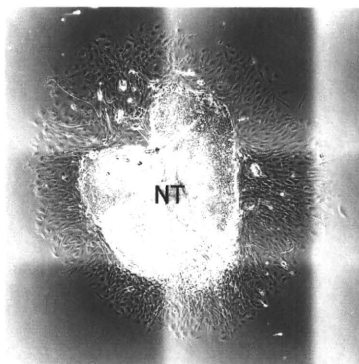
図6. ラット妊娠10.5日胚の培養神経管に及ぼすディスパーゼ処理の影響.
 A. 3.4 U/ml ディスパーゼ処理後に24時間培養した神経管. B. 1 U/ml ディスパーゼ処理後に48時間培養した神経管. C. ディスパーゼ処理なしで48時間培養した神経管. NT, 神経管. 黒い矢印は、壊れた細胞を示す. 白い矢印は、神経突起を示す.



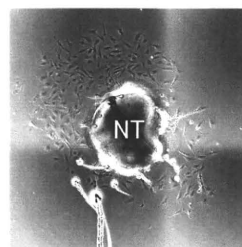
フィブロネクチン



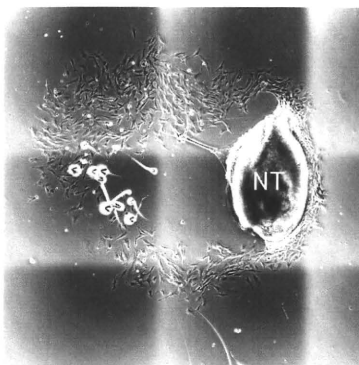
コラーゲンI



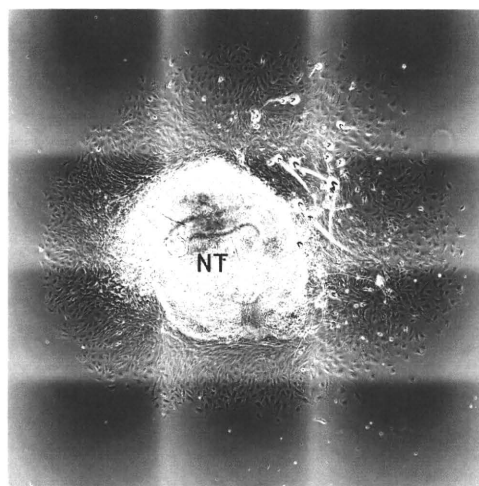
コラーゲンIV



ラミニン



ポリ-D-リシン



プライマリア

500 μ m

図7. ラット妊娠 10.5 日胚の培養神経管に及ぼす培養容器表面処理の影響. 培養 48 時間の位相差顕微鏡像を示す. NT, 神経管.