

図8. ポリゴンツールによる培養24時間および48時間における神経堤細胞の広がりへの測定. 画像解析ソフト ImageJ のポリゴンツールで、最外側の神経堤細胞を繋いだ(黄色い線). NT, 神経管.

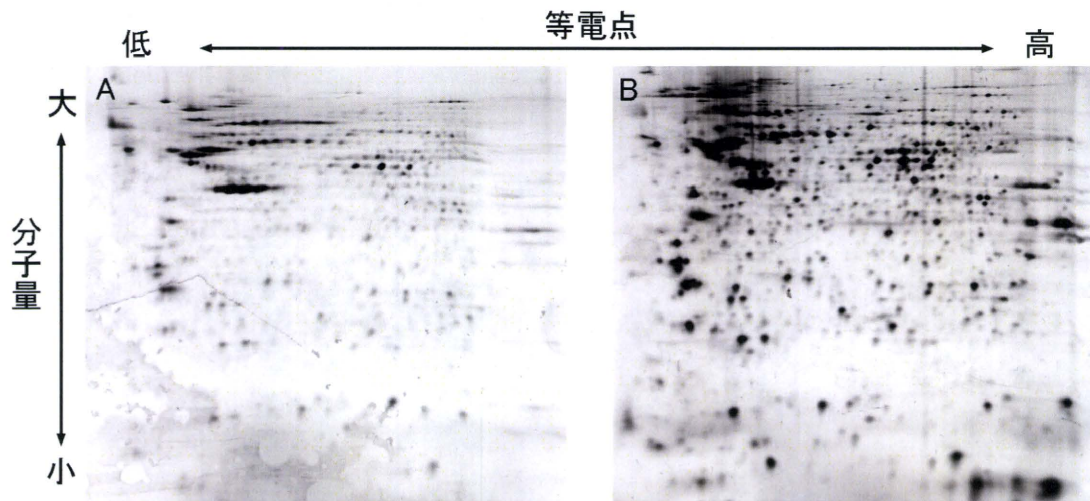


図9. ラット胚タンパクの二次元電気泳動分析.  
A. 培養神経堤細胞のタンパク. B. ラット妊娠 11.5 日胚全体のタンパク.

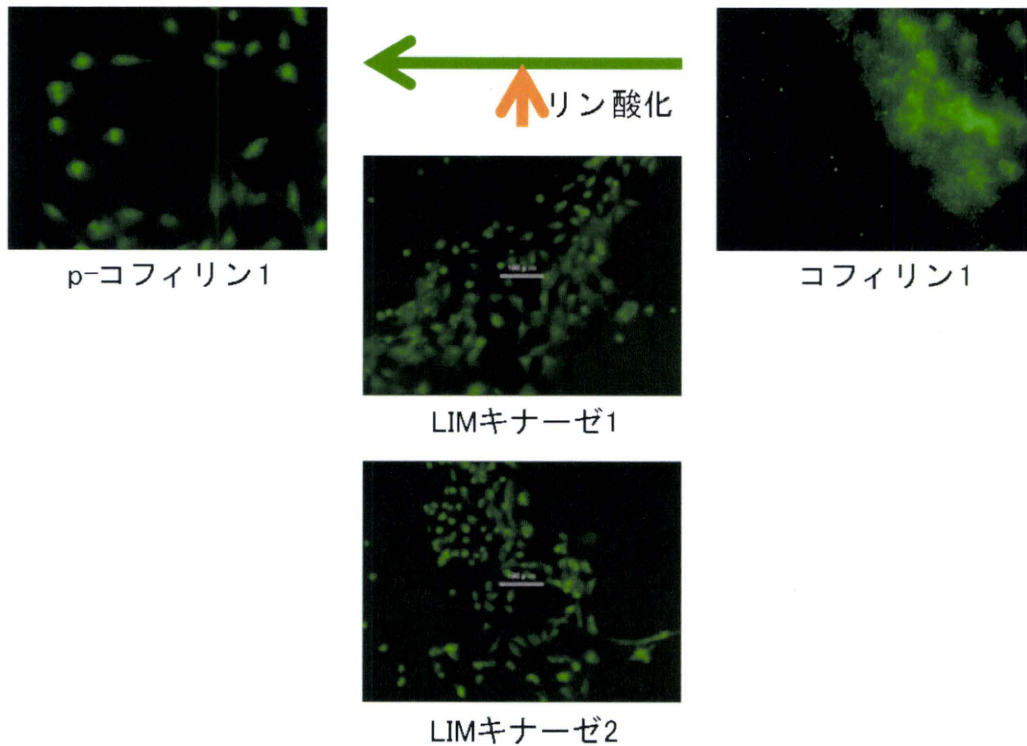


図 10. 神経堤細胞におけるアクチン結合タンパク発現の免疫細胞化学的検出. 各アクチン結合タンパクに対する抗体を用いて免疫染色した神経堤細胞の蛍光顕微鏡像を示す.

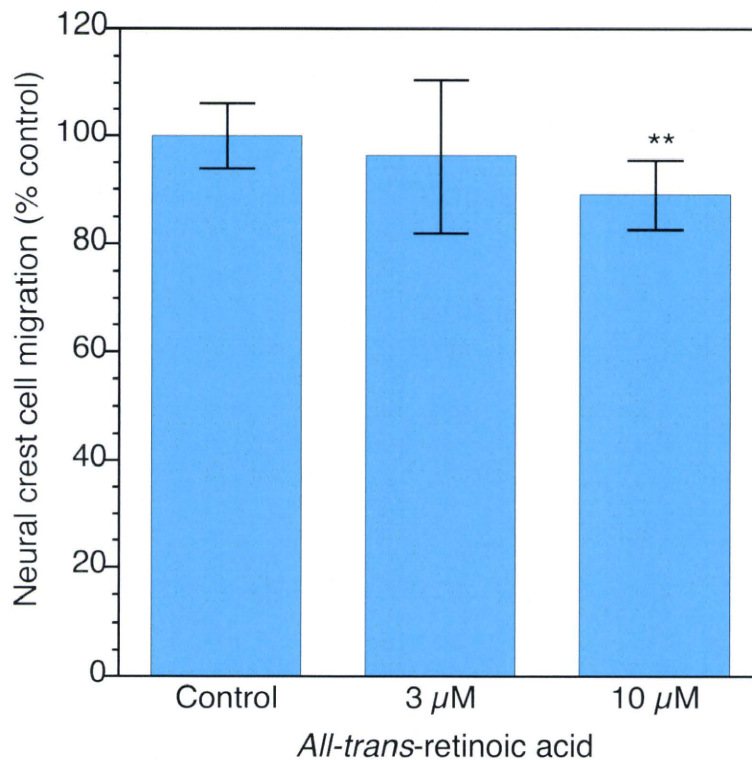


図 11. オールトランス-レチノイン酸のラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響. 培養 24 時間および 48 時間で求められる細胞の広がりを見なして求められる半径の比から 1 を引いて増加量とした後に、対照群の増加量を 100%として遊走距離を計算した。平均値と標準偏差を示す。\*\*, 対照群と比較して、有意差があることを示す( $p < 0.01$ ). N=9-11.

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円と見なして、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。

発達成長期ニューロン・グリア新生評価法

分担研究者 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長

研究要旨

本研究は、脳神経系形成の基礎過程であるニューロン・グリア新生に化学物質が及ぼす影響について評価するための新たな評価手法を確立することを目的とする。今年度は生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響について薬理的に検討可能な *in vitro* 評価系の確立を試みた。生後 1-3 日齢ラットの前脳矢状面切片脳室下帯に eGFP を組み込んだレトロウイルスを滴下することにより神経幹細胞および前駆細胞を標識した後、切片培養し、オリゴデンドロサイト前駆細胞数およびその遊走を評価指標とすることに成功した。

A. 研究目的

本研究は、脳神経系形成の基礎過程であるニューロン・グリア新生に化学物質が及ぼす影響について評価するための新たな評価手法を確立することを目的とする。ラット脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) では新生～一週間ほどの間、神経幹細胞からニューロン新生およびグリア新生の両者が活発に起こっている。この時期の新生ニューロンは 吻側移動経路 (rostral migratory stream: RMS) を通り嗅球の介在性神経に、新生グリアは放射状に遊走しオリゴデンドロサイト及びアストロサイトに分化することが知られている (J Comp Neurol 519(4) 690-713, 2011; J Neurosci 29(36) 11172-81, 2009)。これらの過程に何らかの異常があると、重篤な認知障害や一生続く器質的障害が残る可能性がある。実際に、これらのリスクを回避するために、脳腫瘍の小児に対しては抗がん剤の使用が禁忌とされている。そこで、生後初期の SVZ に含まれる神経幹細胞及び前駆細胞を緑色蛍光蛋白質 (enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP) で標識した後に、前脳まるごとの矢状面切片を作成、培養し、この前脳矢状面切片培養系を用いてニューロン・グリアの新生・遊走の可視化、定量化、さらに薬理的検討を試みる。以上の切片培養系を確立すれば、ニューロン・グリア新生に化学物質が及ぼす影響の解明、ヒトへの外挿をめざした毒性発現メカニズムの解明が可能になることが期待できる。

B. 研究方法

1. 前脳矢状面切片培養系の確立

生後 1-3 日齢ラットの前脳矢状面切片標本を作成し (150  $\mu\text{m}$ ) トランスメンブレン (Millipore) 上に静置し、各種培地 (表 1) で 1 週間培養し細胞のバイアビリティ、大脳皮質層構造の変化をニッスル染色により確認した。

2. Retrovirus を用いた SVZ の神経幹細胞および前駆細胞の可視化

生後 1-3 日齢ラット脳 SVZ に eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウイルス (NIT-eGFP; J Neurosci 19(19) 8487-97, 1999) を 500  $\mu\text{l}$  注入することにより神経幹細胞および前駆細胞を標識した。このレトロウイルスはマウスの白血病レトロウイルスに eGFP tag を組み込んだものである。レトロウイルスは細胞に感染すると細胞分裂を起こしている核に遺伝子が組み込まれる性質があるため、SVZ を狙って、ウイルスを注入/滴下することにより、神経幹細胞および前駆細胞を特異的に標識することができる。1-7 日後に環流固定し前脳矢状面切片標本 (150  $\mu\text{m}$ ) を作成し eGFP 標識細胞の遊走経路を確認した。また、eGFP 標識細胞の分化マーカー蛋白質 (A2B5, O1, O4, GFAP など) 発現について免疫組織化学的に検討した。オリゴデンドロサイトの出現率算出および培養前脳矢状面切片との比較のために 20  $\mu\text{m}$  の薄切切片 7-8 枚中の eGFP 標識細胞および eGFP (+) O1 (+) 細胞の総細胞数をそれぞれ計数した。



### 3. eGFP 標識細胞の培養前脳矢状面切片における分化・遊走の検討

生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片 (150  $\mu\text{m}$ ) を作成してから NIT-eGFP を SVZ に 30 nl 滴下し、6 日間培養後に固定し観察した。eGFP 標識細胞の分化マーカー蛋白質 (A2B5, O1, O4, GFAP など) 発現について免疫組織化学的に検討した。オリゴデンドロサイト出現率算出のために、eGFP (+) O1 (+) 細胞を計数した。

### 4. eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討

eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を用いて、オリゴデンドロサイト新生に対する化学物質の影響を評価できるかどうか、作用メカニズムが既知の薬物を用いて検討した。シタラビン (cytosine arabinoside: AraC) は細胞分裂阻害剤として汎用されている。そこで、eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を AraC 処理 (1.5 mM, 24 hr)、オリゴデンドロサイト新生に対する影響について薬理的検討を試みた。

#### (倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いには「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

## C. 研究結果

### 1. 前脳矢状面切片培養系の確立

前脳矢状面切片を表 1 で示す培地で培養し、細胞の viability, 大脳皮質層構造を比較検討したところ、#6 の培地で培養したときに最も層構造が保持され、*in vivo* に近い状態となった。そこで今後、前脳矢状面培養には #6 の培地を用いることとした。

### 2. SVZ の神経幹細胞および前駆細胞の可視化と培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の分化・遊走

生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、8 日齢で還流固定し、矢状面切片 (150

$\mu\text{m}$ ) を作成し観察したところ、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (図 1)。生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片を作成し、直ちに NIT-eGFP を滴下し 6 日間培養した場合も上記の場合と同様に、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた。以上のことから、培養前脳矢状面切片において、eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の経路を遊走することが確かめられた。そこで次に、培養前脳矢状面切片中の eGFP 標識細胞の分化が *in vivo* の分化に対応しているかどうか検討した (図 2)。①生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5 日齢で還流固定し作成した前脳矢状面切片 (150  $\mu\text{m}$ )、②生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片 (150  $\mu\text{m}$ ) に NIT-eGFP を滴下し 3 日間培養した標本、のそれぞれにおける eGFP 標識細胞の分化マーカー発現、細胞分布を比較した。今回は特に放射状に遊走するグリア細胞の分化に着目した。①、②ともに、グリア前駆細胞マーカーである A2B5 の発現は SVZ 内に限られ、白質では発現している細胞は見られなかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーである O4 の発現は SVZ にはほとんど見られず、白質で多くの陽性細胞を確認した。さらに、アストロサイトマーカーである GFAP については、SVZ、白質ともに陽性細胞を確認した。以上の結果は培養前脳矢状面切片において eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の分化パターンを示すことが確認された。

### 3. 培養前脳矢状面切片におけるオリゴデンドロサイト新生の定量的検討

生後 1-3 日齢は、特にオリゴデンドロサイト新生が活発な時期であることが知られている。そこで、eGFP 標識細胞中の O1 (O4 と同じくオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー) (+) 細胞出現率について上記①、②の標本間で比較した (図 3)。①の標本では  $14.28 \pm 1.439\%$ 、②の標本では  $13.13 \pm 1.114\%$  の細胞が O1 (+) 細胞となり、①と②ではオリゴデンドロサイト新生がほぼ同じ出現率で起こっていることが確認された。

### 4. eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた

## 薬理的検討—AraC のオリゴデンドロサイト新生に対する影響

eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を AraC 処理 (1,5 mM, 24 hr) したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲は明らかに狭くなっていた (図 4A)。eGFP 標識細胞数を計測したところ、有意に減少していた (図 4B)。また、eGFP 標識細胞に占める O1 (+) 細胞の比率も有意に減少していた (図 4C)。これらの結果から AraC は神経幹細胞および前駆細胞の分裂を抑制すること、神経幹細胞および前駆細胞の分裂が抑制されるとオリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走および分化がさらに抑制されることが示された。以上の結果から、eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系がオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響評価を薬理的に解析できる実験系であることが示された。

## D. 考察

本研究では、放射状に遊走するグリア前駆細胞、特にオリゴデンドロサイト新生への影響評価系を確立した。この理由としては、この時期にほとんどのオリゴデンドロサイト新生が起こるため成長後の影響が甚大であること、放射状の遊走の方が RMS 遊走よりも早く進むため少ない培養日数での評価が可能であること、などがあげられる。実際に、AraC を用いて培養 3 日目での薬理的検討に成功した。

オリゴデンドロサイトはニューロンの髄鞘を形成するグリアであり、発達期にこの細胞が十分に作られないと重篤な認知障害が引き起こされることが示唆されている。また、オリゴデンドロサイトが特異的に失われる脳疾患である多発性硬化症では、しびれ、運動麻痺、歩行障害などが現れる。従って、発達期のオリゴデンドロサイトの正常な分化、遊走は脳神経系が健全に発達するためには欠かせない過程であるが、これまでにオリゴデンドロサイトの発達に着目した評価系は確立されていない。今回はこのオリゴデンドロサイト発達を eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を採用することにより評価可能にした。

AraC はピリミジン系抗がん剤の一種 (商品名: キロサイド) としても知られている。細胞分裂阻害剤として基礎研究でもよく使

用されている。細胞分裂阻害のメカニズムとしては細胞内で迅速にシトシンアラビノシドトリフォスフェート (cytosine arabinoside triphosphate) に変換され、S 期の DNA にダメージを与えるためである。また、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ を阻害することも知られている (The Chemotherapy source book Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. pp. 80, 2008)。今回は、前脳矢状面切片培養系で薬理的検討が可能かどうか、まずはメカニズムが明らかな薬物である AraC を用いて検討した。AraC は eGFP 標識細胞数を減少させた。また、O1 (+) 細胞数の出現率も低下させた。これは、SVZ の神経幹細胞および前駆細胞が、何回かの分裂を経て、オリゴデンドロサイト前駆細胞含有率を上昇させながら分化していくことを示唆している。以上のように、すでに作用メカニズムの明らかな AraC を用いることにより、eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系で薬理的検討が可能であることが示された。今回は、特にオリゴデンドロサイト新生に着目したが、神経前駆細胞マーカーを選択すればニューロン新生についても同様の検討を行うことが期待できる。

## E. 結論

生後初期脳のオリゴデンドロサイト新生に化学物質が及ぼす影響について薬理的に検討可能な *in vitro* 評価系 (eGFP 標識神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系) を確立した。

## G. 研究発表

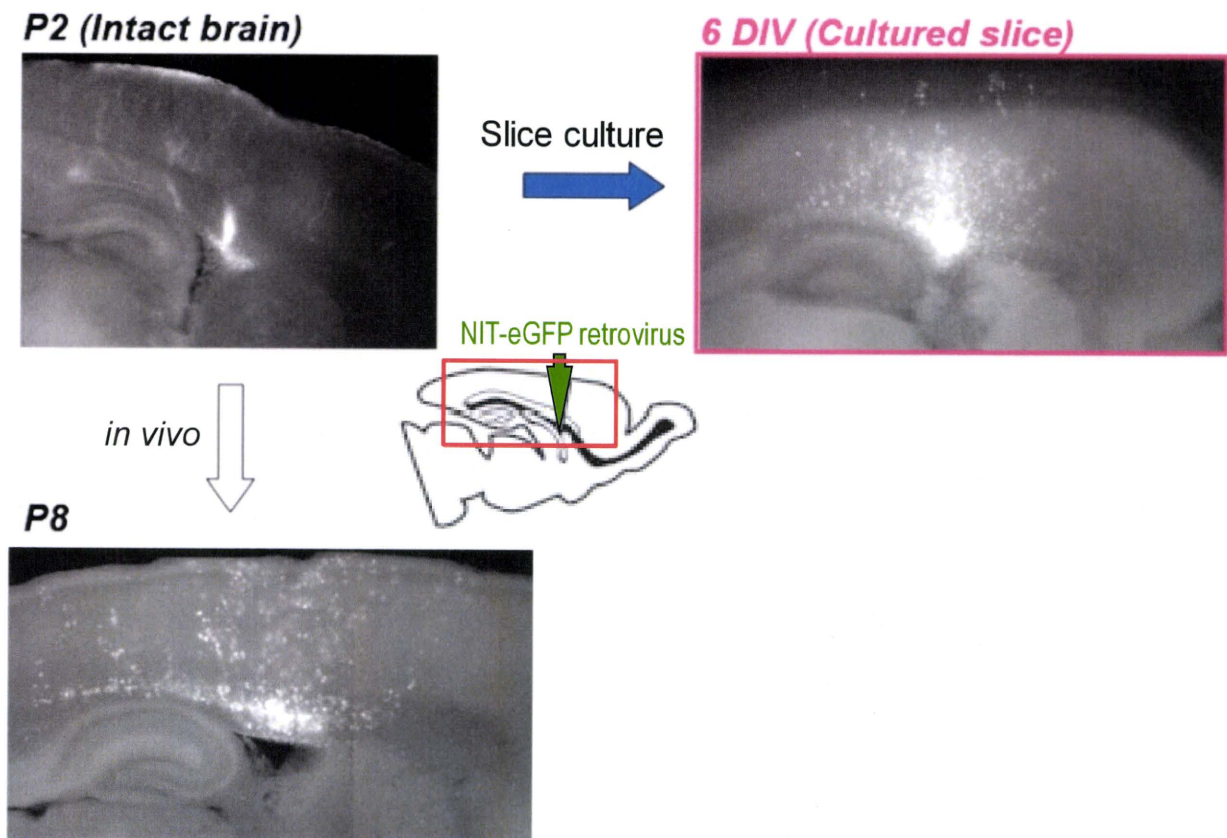
### 1. 論文発表

1. Takahashi, K., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K., Nakazawa, K., Sato, K. (2010). Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. *J Pharmacol Sci* 112, 113-117.

### 2. 学会発表

1. 佐藤 薫、重本一最上 由香里、大野 泰雄、関野 祐子、ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を誘導する Neuro2010 (2010.9, 神戸市)

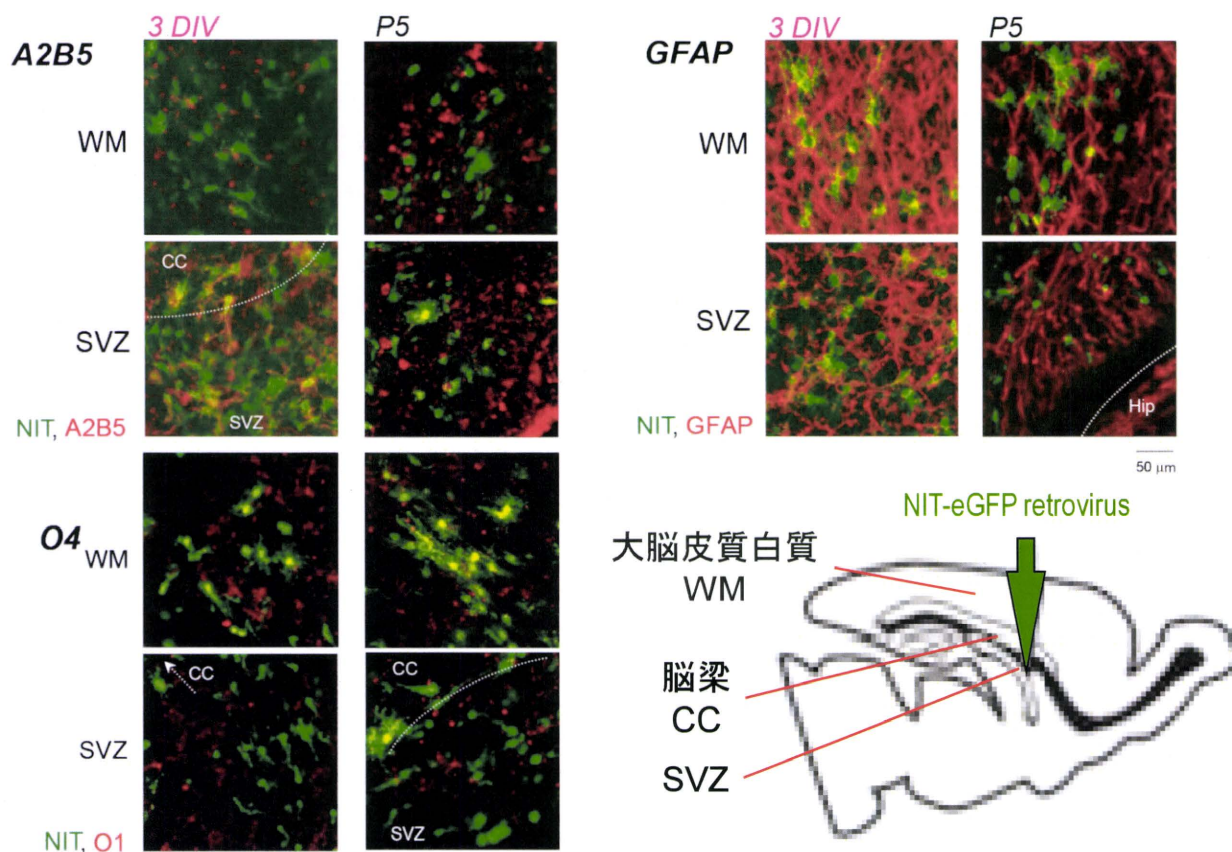
2. 高橋華奈子、中澤憲一、石井一野澤 玲子、竹内 幸一、関野祐子、佐藤 薫、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節 Neuro2010 (2010. 9, 神戸市)
  3. 佐藤 薫、重本一最上 由香里、大野 泰雄、関野祐子、生後初期脳におけるミクログリアの役割 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
  4. 高橋華奈子、中澤憲一、石井一野澤 玲子、竹内 幸一、関野祐子、佐藤 薫、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節 内藤コンファランス (2010. 10, 神奈川県湘南市)
  5. 佐藤 薫、高橋華奈子、中澤憲一、石井一野澤 玲子、竹内 幸一、関野祐子、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節 第 84 回日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
  6. 高木 淳平、佐藤 薫、鈴木 岳之、パロキセチンはリボポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する 第 84 回 日本薬理学会年会 (2011. 3, 横浜市)
  7. 佐藤 薫、James E Goldman、関野 祐子、生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築、日本薬学会第 132 回年会 (2011. 3, 静岡市)
- H. 知的財産権の出願・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. SVZ 神経幹細胞および前駆細胞の可視化、培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の遊走経路確認**

生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、8 日齢で還流固定し、矢状面切片を作成し観察したところ、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた(左下)。生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片を作成し、直ちに NIT-eGFP を滴下し 6 日間培養した場合も、上記と同様に、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた(右)。培養前脳矢状面切片において、eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の経路を遊走することが確かめられた。





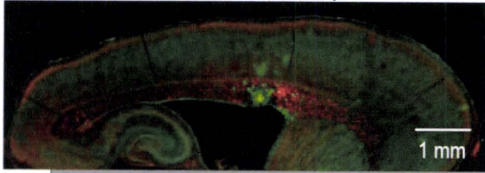
**図 2. 培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の分化マーカー発現**

生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5 日齢で還流固定し作成した矢状面切片、生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片に NIT-eGFP を滴下し 3 日間培養した標本、のそれぞれにおける eGFP 標識細胞の分化マーカー発現、細胞分布を比較したところ、両者共にグリア前駆細胞マーカー A2B5 の発現は SVZ 内に限られ、白質では発現している細胞は見られなかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー O4 の発現は SVZ にはほとんど見られず、白質で多くの陽性細胞を確認した。アストロサイトマーカーである GFAP については、SVZ、白質ともに陽性細胞を確認した。以上の結果は培養前脳矢状面切片において eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の分化パターンを示すことが確認された。

3 DIV (cultured slice) 150  $\mu$ m



P5 (Intact brain) 20  $\mu$ m x 7-8



Sum

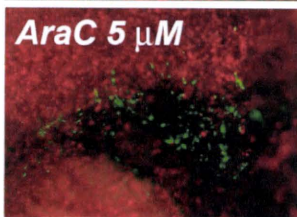
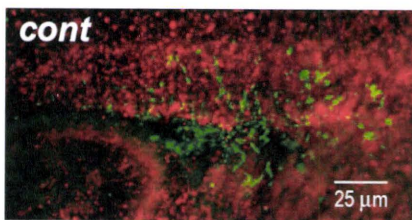
NIT, O1

	cultured slice	Intact brain
eGFP(+) cell No.	381.2 $\pm$ 521.7	469.5 $\pm$ 56.58
O1 (%eGFP(+) cells)	13.13 $\pm$ 1.114	14.28 $\pm$ 1.439

### 図 3. 培養前脳矢状面切片におけるオリゴデンドロサイト新生の定量的検討

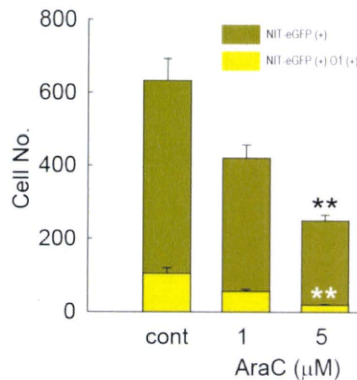
生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5 日齢で還流固定し作成した矢状面切片、生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片に NIT-eGFP を滴下し 3 日間培養した標本とで、eGFP 標識細胞中の O1 (+) 細胞出現率を比較した。両標本ともにオリゴデンドロサイト新生がほぼ同じ出現率で起こっていることが確認された。

A

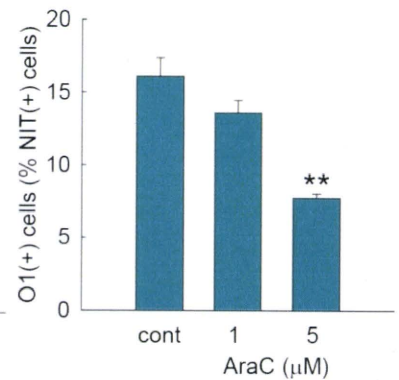


NIT, O1

B



C



\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

### 図 4. eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討—AraC のオリゴデンドロサイト新生に対する影響

A: eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を AraC 処理したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲は明らかに狭くなっていた。B: eGFP 標識細胞数を計測したところ、有意に減少していた。C: eGFP 標識細胞に占める O1 (+) 細胞の比率も有意に減少していた。AraC は神経幹細胞および前駆細胞の分裂を抑制すること、神経幹細胞および前駆細胞の分裂が抑制されるとオリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走および分化がさらに抑制されることが示された。

表 1. 前脳矢状面切片培養系最適培地の検討に用いた培地一覧

	medium	supplement	buffer	antibiotics	serum	Cell viability
1	DMEM			Antibiotic-micotic mixture	FBS 10%	×
2	DMEM	N2 1%			FBS 10%	×
3	DMEM:F-12 (1:1)	N2 0.1%, L-glutamine 0.1 mM, D-glucose 13.3mM		PS	FBS 10%	×
4	DMEM:F-12 (1:1)	ITS 1%, Progesterone 20 nM, putresine 60 μM, L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM, Na2CO3 3 mM	HEPES 85 mM			○
5	BME	L-glutamine 1 mM, D-glucose 27.8 mM	HBSS 25%		HS 5%	×
6	Neurobasal	N2 1%, B27 1%, L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3mM, Kyunurenic acid 0.5 mM		PS		◎
7	BME	N2 1%, B27 1%, ITS 1%, L-glutamine 1 mM	HBSS 25%	PSA	FBS 0.5%	○
8	BME	D-glucose 36.7 mM	HBSS 25%	PSA	HS 25%	×

Neurobasal 培地に添加物を加えた培地 (#6) で最も大脳皮質の層構造が保持されたため、以後、#6 を基本培地として用いることにした。



神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築

分担研究者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長

研究要旨

本研究において、ヒト成長期の中枢神経系に対する化学物質の影響を評価する目的で、ヒト Embryonic Carcinoma 細胞株 NteraT2/clone D1 からヒト神経幹／前駆細胞のモデルとなる細胞を構築した。

A. 研究目的

私たちは環境中の様々な化学物質に暴露されており、中枢神経系に対する影響は重要である。特に、脆弱な発達期の胎児、小児期において、化学物質により脳発達に必須であるホルモンや生理活性物質に影響が出る場合には、その後の発達に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。また、化学物質が母親の体内に取り込まれると、多くの物質が胎盤経由で胎児に移行することが指摘されている。本来、中枢神経系は防御機能である血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) により有害物質から保護されている。しかしながら、胎児期や新生児期は BBB が未発達であるため、胎児の脳は母親の血中濃度に近い濃度で環境化学物質の影響を受ける可能性があり、出生後も BBB が未発達な子どもの脳は、母乳や外界からの環境化学物質が脳内に侵入しやすいと報告されている (Stefanidou, et al., *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets* 9:269-276, 2009)。以上のことから、化学物質の生体影響は、その曝露時期に依存した生体の発育段階に大きく左右されることが示唆される。現在までの化学物質のリスク評価は実験動物の行動実験などの結果に基づいているが、ヒトとげっ歯類の種差の問題がある。従って、ヒト細胞を用いることにより、子供の健康に及ぼす化学物質のリスク評価の予測性の向上が期待される。

神経幹／前駆細胞は、胎児および成体に存在する未分化な細胞で神経細胞などへの分化能を有する。中枢神経系の発達に加えて、学習などの高次機能に寄与することが知られている。発達期に化学物質に暴露されて神経幹／前駆細胞に影響が出る場合には、その後長期にわたり中枢神経毒性が出る可能性

が考えられる。従って、神経幹／前駆細胞を用いることによって、特に発達期における化学物質のリスクを評価できる可能性が考えられる。

化学物質のリスク評価システムに使用するヒト神経幹／前駆細胞のソースとして、(1) 初代培養系、(2) 幹細胞が考えられる。ヒト神経幹／前駆細胞の初代培養は入手が困難であり、また倫理的な問題があることから現実的ではない。また、幹細胞は、ヒト Embryonic Stem (ES) 細胞やヒト induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞、ヒト Embryonic carcinoma (EC) 細胞などがあげられる。ヒト ES 細胞の場合には初代培養と同様に倫理的な障害があり、また培養の過程で脱分化することも示されている。またヒト iPS 細胞の場合には、様々な形質を有する細胞に分化誘導されてしまい、形質が安定した細胞が得られず、健康影響評価のモデル細胞には適さないと考えられる。一方、ヒト EC 細胞はヒト胎児の繊維芽細胞から樹立され、神経系を含む多くの組織への分化能を有する。不死化されていることから形質も安定で、モデル細胞として扱える可能性が高い。EC 細胞は ES 細胞と同様に、レチノイン酸処理によって直接、神経細胞に分化誘導をうけることが知られている (Andrews PW, *Developmental biology* 103:285-293, 1984)。しかしながら、ヒト EC 細胞から神経幹／前駆細胞への分化誘導法は確立されていない。

そこで、本研究では、ヒト EC 細胞を用いてヒト神経幹／前駆細胞のモデル細胞の作製を行い、化学物質の健康影響評価システムの開発を目指す。まず本年度は、ヒト EC 細胞である NteraT2/clone D1 (NT2) 細胞株を用いてヒトモデル細胞の作製を行った。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養

ヒト EC 細胞株 NT2 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Ashrat, Israel)、100U/ml penicillin (Gibco BRL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco BRL) を加えた培地にて培養した。

### 2) Neurosphere の形成

NT2 細胞を  $10^6$  cells/dish の割合で非接着性のペトリディッシュ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に播種した。週に 2 回の割合で培地を交換し、培養 1 週間後にレチノイン酸 (All-Trans Retinoic Acid 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) を添加して、さらに 1 週間培養を行った。レチノイン酸は DMSO により 10mM のストック溶液を作成して用いた。得られた sphere を 1 $\mu$ g/ml fibronectin (Sigma-Aldrich) でコートしたスライドガラスに置いてパラホルムアルデヒドで固定後、抗 Nestin 抗体 (Chemicon Group, Millipore Corporation, Temecula, CA, USA) と DAPI (Sigma-Aldrich) により免疫抗体染色を行った。写真は蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, Keyence, Osaka) により撮影した。

### 3) Neurosphere の分化誘導

Neurosphere を 0.25% トリプシン (Gibco BRL) により single cell にした後、1 $\mu$ g/ml fibronectin (Sigma-Aldrich) でコートしたガラスボトムディッシュ (BD Biosciences) に播種し、10% FBS を含む増殖培地にて 2 週間培養した。培地は週に 2 回の割合で交換した。パラホルムアルデヒドで固定後、抗  $\beta$ -tublin-III 抗体 (Chemicon) と DAPI (Sigma-Aldrich) により免疫抗体染色を行った。写真は蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000) により撮影した。

## C. 研究結果

ヒト NT2 細胞はディッシュに接着した状態で未分化状態のまま増殖する (図 1A)。非接着性のペトリディッシュを用いてヒト NT2 細胞の浮遊培養を行い、さらに神経系に分化をコミットさせるためにレチノイン酸

で処理を行った結果、細胞塊 (sphere) が形成されることが明らかになった (図 1B)。

この sphere の発現マーカーを免疫抗体染色によって検討したところ、未分化な神経幹/前駆細胞のマーカーである nestin の発現が観察された (図 2A)。Sphere から単離した個々の細胞においてもほぼ 100% の細胞が nestin 陽性であった (図 2B)。これらの結果から、この sphere は neurosphere であることが示唆された。

さらに、neurosphere 由来の神経幹/前駆細胞を fibronectin でコートしたディッシュを用いて培養することにより分化誘導を行い、神経分化マーカーである  $\beta$ -tublin-III で染色した。その結果、図 3 に示すように、ほぼすべての細胞は  $\beta$ -tublin-III 陽性であり、主に神経細胞に分化誘導されることが示唆された。また、得られた細胞は未分化な細胞であることが示唆された。

## D. 考察

本研究において、ヒト EC 細胞から神経幹/前駆細胞への分化誘導系を構築した。

ヒト NT2 細胞は様々な細胞への分化能を有しており、ES 細胞のコントロールとなる細胞として使用されてきた。我々は、ES 細胞の分化や癌幹細胞の作製に使用される非接着性のディッシュを用いて、sphere の作製に成功した。一般に、接着細胞は接着できない環境下においては apoptosis や anoikis などの細胞死が誘導されることが知られている。EC 細胞においても細胞死を起こす細胞が認められたが、sphere を形成する細胞は浮遊の状態を増殖できることが明らかになり、特定の細胞が選択されて増殖していると考えられる。

sphere は未分化な神経幹/前駆細胞マーカーである nestin を発現していることから (図 2)、神経幹/前駆細胞によって形成される neurosphere であることが示唆された。さらに、Neurosphere から単離した細胞を用いてレチノイン酸による分化誘導を行った場合、ほとんどの細胞は神経細胞に分化し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなど他の中枢神経系の細胞は認められなかった (図 3)。この結果から、neurosphere は多分化能を有する神経幹細胞より分化のステージが進んでおり、多くは神経前駆細胞である可能性が考えられた。しかしながら、他の



分化条件でグリアなどの他の細胞に分化する可能性も否定できないことから、神経幹細胞と神経前駆細胞の割合に関してはマーカー分子の発現などを検討する必要がある。

化学物質のリスク評価は、従来、実験動物の行動薬理などを指標に行われているが、種差の問題がある。また、細胞に関しては動物由来やヒト由来の神経細胞株を用いて検討されているものの、適切なモデル細胞や毒性の指標などは開発されておらず、*in vitro* 健康影響評価系はまだ確立されてはいない。今後は、本研究で作製したヒトモデル細胞を用いて、化学物質による未分化状態、分化能、増殖などに対する影響を検討する。さらに、そのメカニズムをベースとして健康影響評価の指標を探索し、ヒトにおけるデータと比較することにより成長期における化学物質の健康影響評価系の構築を目指したい。

#### E. 結論

本研究において、ヒト EC 細胞から神経幹/前駆細胞を作製した。ヒトモデル細胞として化学物質のリスク評価に応用できる可能性があり、今後、化学物質を用いて健康評価の指標を探索し、成長期における健康影響評価系の構築を目指す。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hirata N., Sekino Y. and Kanda Y. Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 403:138-143 (2010).

##### 2. 学会発表

1) Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Waka Lin, Yuko Sekino. TGF $\beta$ -induced stem cell phenotype in breast cancer cells. *Keystone Symposia (A8)*, Vancouver, British Columbia, Canada, 2011.01.21-26.

2) 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：乳癌細胞に含まれる癌幹細胞の割合に対するニコチンの影響、第 10 回再生医療学会、東京、2011.03.01-02

3) 平田尚也、林和花、関野祐子、諫田泰成：MCF-7 細胞における乳癌幹細胞に対するエストロゲンの影響、第 84 回日本薬理学会、誌上開催、2011.03.22-24

#### H. 知的財産権の出願・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

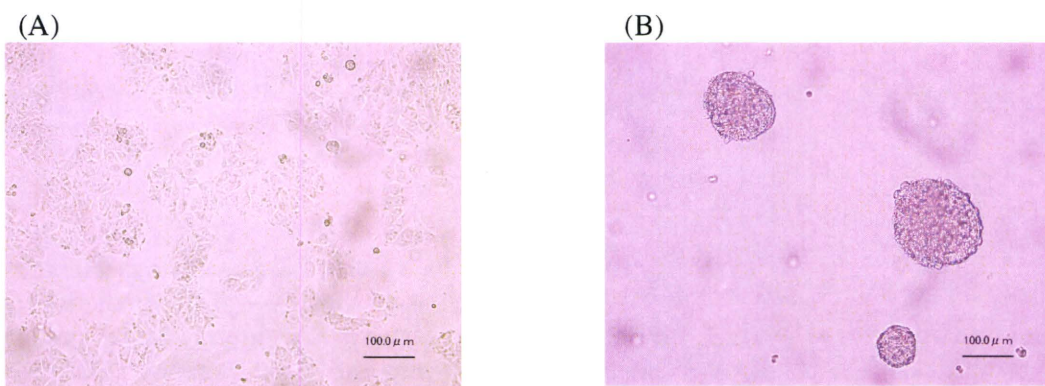
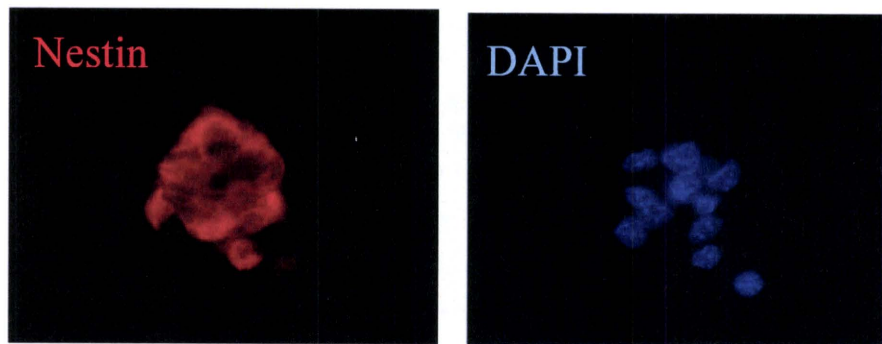


図1 NT2細胞を用いた neurosphere の作製

(A) NT2 細胞の接着培養。(B) NT2 細胞から浮遊培養により作製した neurosphere。(Bar: 100μm)

(A)



(B)

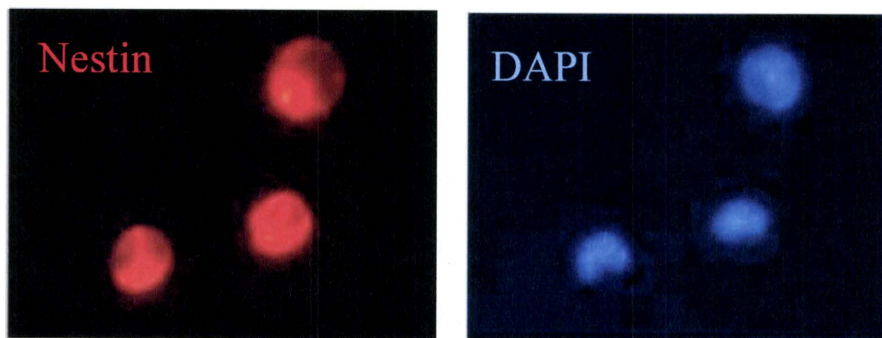


図 2 神経幹／前駆細胞における Nestin の発現

(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。

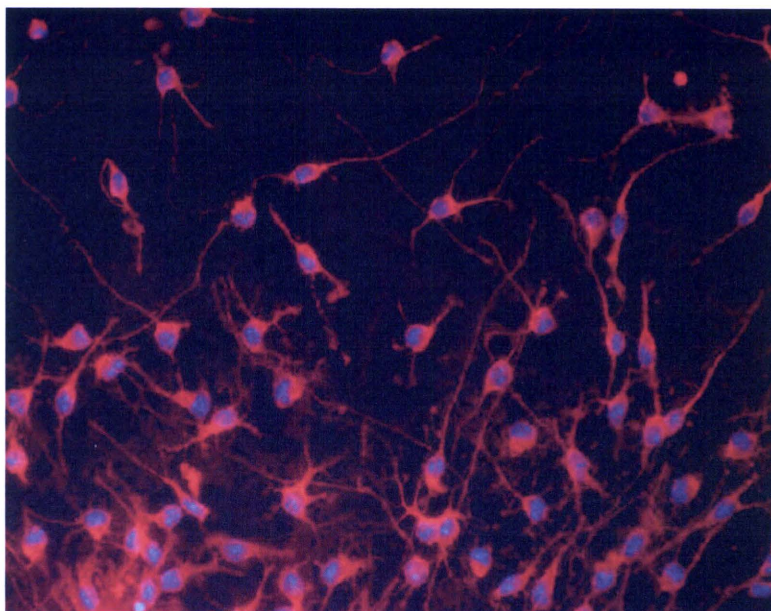


図3 神経細胞への分化誘導

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  $\beta$ -tubulin-III 抗体を用いて免疫染色した。



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

胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のゲノミクス、メタボロミクス解析

研究分担者 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長  
研究協力者 松下 琢 崇城大学生物生命学部 教授

胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のエピゲノム解析

研究分担者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部第二室長

研究要旨

胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法の確立を目的とし、胎児・新生児期の肝臓による化学物質代謝の解析法を確立するための基礎的な知見の収集にあたった。

ヒト胎児肝細胞の単層培養とそれを分化誘導した肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、および、ヒト成人肝細胞の4種の *in vitro* 培養系について、メタボローム解析を行った結果、胎児肝細胞由来の細胞では、成人肝細胞に比べ胆汁酸の生合成が低いこと、グルクロン酸抱合能が低いことを示唆する結果を得た。この結果は、過去の知見と一致していた。また、成人肝細胞においてオルニチン回路の活性化が認められた。

A. 研究目的

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。また、成長期における健康被害は長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起こる場合があるため、化学物質の適切な健康影響評価は非常に重要である。一方、個体の成長期は動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期である。そのため、毒性発現メカニズムの解明に基づく評価法が必要であるが、体系的な方法は見あたらない。

本研究では、胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、これまでに我々が実施してきた細胞機能の研究の成果を基礎にして、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的とする。本年度は、成体における代謝データを利用可能な胎児・新生児期の肝臓による化学物質代謝の解析法を確立するための、基礎的な知見の収集にあたった。

B. 研究方法

1. ヒト胎児肝細胞の培養

1.1. ヒト胎児肝細胞の単層培養

ヒト胎児肝細胞（CS-ABI-3716）は、DSファーマバイオメディカル（株）より購入し

た。培養には、同社より購入した CSC Complete Medium（10% FBS 含有、同一ロット）に、63 mg/L penicillin と 100 mg/L streptomycin を加えたものを用いた。ヒト胎児肝細胞の単層培養には、直径 60 mm の培養ディッシュ（FALCON 社製、付着細胞用）を用い、5% CO<sub>2</sub> を含む気相下 37°C で、6 日間培養を行った（Matsushita et al, 2003）。継代数は、6 継代の細胞を使用し、播種密度は 1×10<sup>5</sup> cells/dish、培地交換は 2 日毎に行った。6 日間培養した細胞を、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、トリパンブルー染色法で生細胞数を計数した。

1.2. 胎児肝細胞から肝芽細胞の誘導と単層培養

上記と同じ条件でヒト胎児肝細胞の播種後、培養 4 時間後に培地交換を行い、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で 8 日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った（Kiyota, 2007）。その間、培地交換は、5 日目までは 2 日毎に行い、それ以降は毎日行った。アルブミンとサイトケラチン 19 をマーカーとするフローサイトメーターでの解析では、1 mM 酪酸ナトリウムでの肝芽細胞の誘導効率は約 30% である。8



日間培養した細胞を、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、トリパンブルー染色法で生細胞数を計数した。

### 1.3. 肝芽細胞の三次元培養(Spheroid 培養)

肝芽細胞の三次元培養には、WE を基本培地として、Insulin 10 mg/L, EGF 50 µg/L, Linoleic acid 50 µg/L, 63 mg/L penicillin, 100 mg/L streptomycin など含む Hormone Defined Medium (HDM 培地)を用いた (Matsushita et al, 2003, 2006)。ヒト胎児肝細胞を HDM 培地に懸濁し、1mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した直径 60 mm の培養ディッシュ (IWAKI 社製、浮遊細胞用) に、 $8 \times 10^5$  cells/dish の密度で播種した。播種後 2 日目に、1mM 酪酸ナトリウムを含んだ HDM 培地に交換し、さらに 6 日間培養を行った。培地交換は 2 日毎に行った。培養後、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、遠心によって回収した後、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、0.1% クリスタルバイオレット溶液を用いて核数計数法によって算出した。

### 1.4. CYP3A4 の誘導及び活性測定

CYP3A4 活性の誘導には、10 mM rifampicin を含む培地で、4 日間培養を行った。活性測定には、20 µM benzyloxyresorufin を基質として用い、脱アルキル活性を測定することで測定した (BROD 法)。

## 2. ヒト成人肝細胞の培養

### 2.1. ヒト成人肝細胞

ヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社よりヒト非凍結肝細胞 (12.5 cm<sup>2</sup> フラスコ接着、製品番号 HEP220-FL12) 3 ロットを購入した (ロット番号: HEP220523、HEP220524、HEP220527)。各ロットの基本情報を以下に示す。

HEP220523

Age: 81

Sex: Male

Ethnicity: Unknown

Liver pathology: Hepatocellular carcinoma

HEP220524

Age: 66

Sex: Male

Ethnicity: Unknown

Liver pathology: Hepatic metastases

HEP220527

Age: 62

Sex: Female

Ethnicity: Caucasian

Liver pathology: Hepatocellular carcinoma

細胞を受領後、培地を Incubation Medium (肝細胞培養用培地、製品番号 MIL214-100M) に交換し、3 日間培養した。培地は毎日新鮮なものに交換した。培養 3 日目に細胞から解析用のサンプルを調製した。

### 2.2. CYP3A4 誘導試験

フラスコ 1 枚を培養 1 日目から 10 mM リファンピシンに暴露した。毎日リファンピシンを含む培地に交換しつつ、2 日間培養を継続した。培養 3 日目に PBS で細胞を洗浄後、RNeasy Mini kit (Qiagen) で細胞を溶解し、RNA を得た。

### 2.3. 細胞数計測

細胞を受領した日に細胞数を計数した。細胞を PBS により洗浄後、PBS にて 1/5 に希釈したトリプシン-EDTA 溶液 (Invitrogen) にて処理し、細胞を注意深く剥がした。FBS によりトリプシンを不活化したのち、細胞数を計測した。

## 3. サンプル調製

### 3.1. 代謝物質の調製

細胞を 5% mannitol 溶液で 2 回洗浄後、ヒューマンメタボローム社より提供された内部標準物質を含むメタノール (WAKO、∞pure グレード) で処理することで代謝物質を回収した。回収した代謝物質は -80°C で保存した。

### 3.2. ゲノム DNA/RNA の調製

細胞を PBS で 2 回洗浄後、Qiagen AllPrep DNA/RNA Mini kit を用いて、ゲノム DNA と RNA を調製した。

### 3.2. totalRNA の調製

細胞を PBS で 2 回洗浄後、TRIzol (Invitrogen) を用いて、トータル RNA を調製した。

## 4. メタボローム解析

代謝物質の測定はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に委託した (委託試験名: CE-TOFMS による培養細胞のメタボローム解析、報告書番号: NIHSF-HMT-003)。

ヒト胎児肝細胞および成人肝細胞から回収した代謝物質サンプルを -80°C 下ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に送付した。測定は n=3 で各サンプルとも細胞

2×10<sup>6</sup>個当たりから回収した代謝物質について、CE-TOFMS（キャピラリー電気泳動-質量分析法キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計）により行った。

試料の情報を Table 1 に示す。

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社の有するデータベースをもとに、測定結果より代謝物質を同定した。

解析の詳細は、別添資料として添付した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト胎児肝細胞は、米国 ABI 社がインフォームドコンセントを得て研究用に取得したものを、DS ファーマバイオメディカル(株)より購入している。

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施している。

### C. 研究結果

#### 1. ヒト胎児肝細胞の培養

Fig. 1 から 3 に、それぞれの細胞の回収直前の位相差顕微鏡写真を示した。

ヒト胎児肝細胞は、ほぼコンフルエントに増殖しているが、肝実質細胞様の細胞はほとんど見当たらない (Fig. 1)。

1mM 酪酸ナトリウムによって、肝芽細胞に誘導した細胞 (単層培養) では、ところどころに、明瞭な核を有する肝実質細胞様の細胞が散見されるが、形態は不定形で、一部が敷石上の特徴的な形態をとる (Fig. 2)。

肝芽細胞の三次元培養 (Spheroid 培養) では、細胞が、poly-L-glutamic acid 被覆ディッシュの上で、自発的に三次元的な凝集塊を形成している状態が見られる (Fig. 3)。

それぞれの細胞の CYP3A4 活性を BROD 法によって測定した。Fig. 4 に結果を示した。胎児肝細胞 (単層培養) → 肝芽細胞 (単層培養) → 肝芽細胞の三次元培養と、徐々に活性が増大していた。

#### 2. ヒト成人肝細胞の培養

ヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社より非凍結の状態で輸送されたものを用いた。本細胞は肝組織から肝細胞を単離後、凍結融解の操作なしに納品されるもので、新鮮肝細胞に近い性質を有していると考えられる。

受け入れ時に各ロットとも顕微鏡下で細胞の形態を観察するとともに、細胞数を計測した。顕微鏡像を Fig. 5 に示す。各細胞とも、正常な初代肝細胞に近い像を示していた。また、細胞数も各フラスコとも 2×10<sup>6</sup>個以上あり、BIOPREDIC 社添付のデータと相違なかった。以上より、輸送の過程で細胞は大きなダメージを受けていないと考えられた。

#### 3. サンプル調製

ヒト胎児肝細胞 (CS-ABI-3716) は、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入した。播種後 6 日間培養を行い、メタボローム解析用の代謝物質を調製した。

同じヒト胎児肝細胞を、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で 8 日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った (Kiyota, 2007)。アルブミンとサイトケラチン 19 をマーカーとするフローサイトメーターでの解析では、1 mM 酪酸ナトリウムでの肝芽細胞の誘導効率は約 30%であった。8 日間培養した細胞よりメタボローム解析用の代謝物質を調製した。

肝芽細胞の三次元培養では、ヒト胎児肝細胞を 1 mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した直径 60 mm の培養ディッシュで 8 日間培養した。培養 2 日目から培地に 1 mM 酪酸ナトリウムを添加し肝芽細胞へ誘導した。8 日間培養した細胞よりメタボローム解析用の代謝物質を調製した。

ヒト成人肝細胞は、当所で受け入れ後、3 日間毎日培地を交換しつつ培養した。3 日目に、各フラスコから、メタボローム解析用の代謝物質と、ゲノミクス解析用の microRNA 画分を含む total RNA、メチル化解析用のゲノム DNA をそれぞれのプロトコールに従って調製した。培養終了時においても細胞の顕微鏡像に大きな変化はなかった。

上記サンプルのうち、本年度はメタボローム用サンプルの解析を実施した。

#### 4. メタボローム解析

ヒト胎児肝細胞および成人肝細胞から回収した代謝物質サンプルを -80°C 下ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に送付した。測定は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社にて、各サンプルとも細胞 2×10<sup>6</sup>個当たりから回収した代謝物質について、CE-MS (キャピラリー電気泳動-質量分