

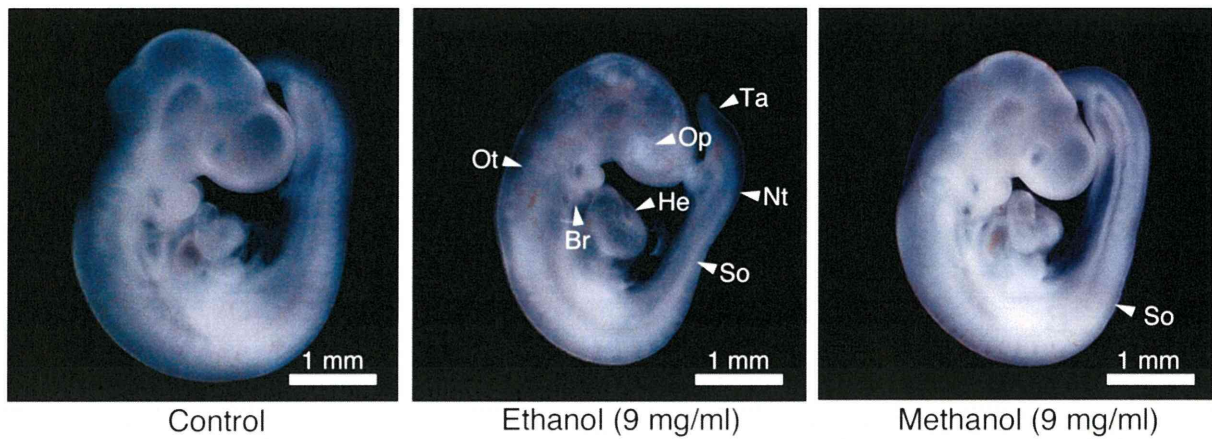
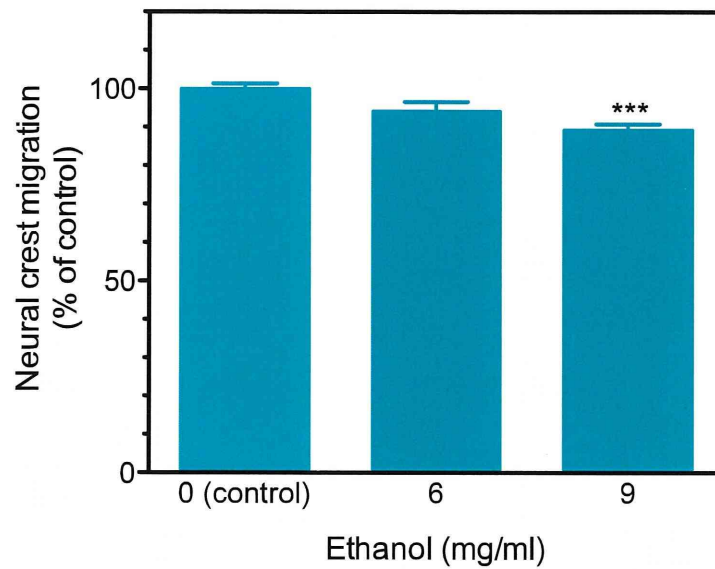


図4. ラット培養胚に及ぼすエタノールおよびメタノールの影響
 胚膜を除いた培養24時間のラット胚を示す。矢頭は形態異常の認められる部位を示す。Br, 鰓弓; He, 心臓; Nt, 神経管; Op, 眼胞; Ot, 耳胞; So, 体節; Ta, 尾。

A



B

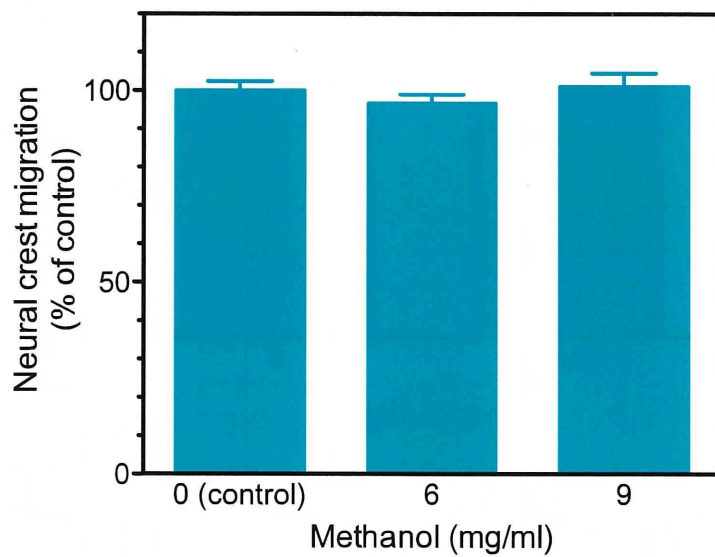
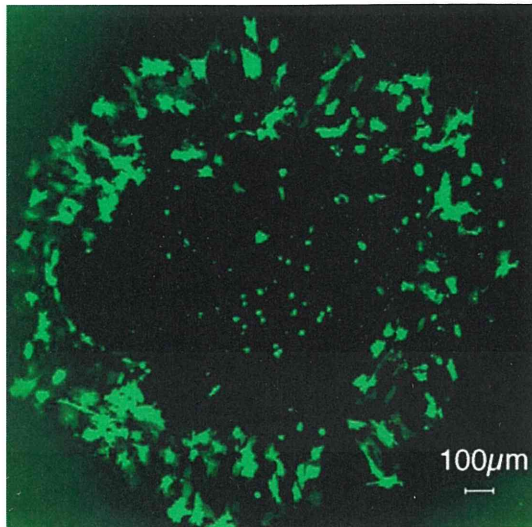


図5. エタノールおよびメタノールのラット神経堤細胞遊走に及ぼす影響

A, 頭部神経堤細胞の遊走に及ぼすエタノールの影響。B, 頭部神経堤細胞の遊走に及ぼすメタノールの影響。平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があることを示す (***, $p < 0.001$)。

A



B

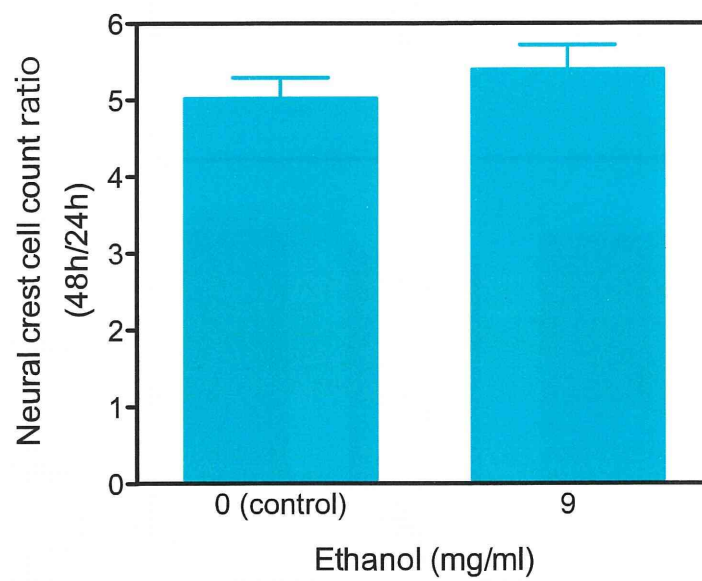
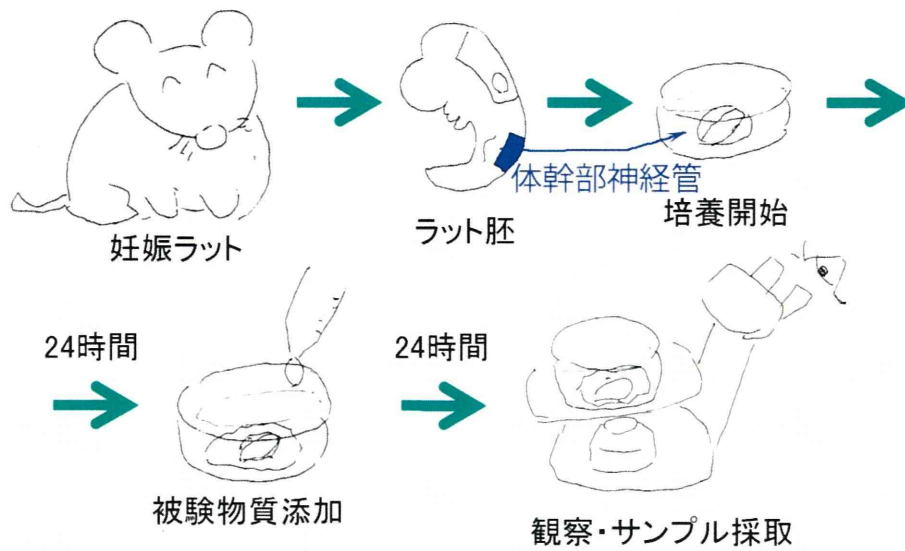


図6. ラット神経堤細胞数に及ぼすエタノールの影響

A, 頭部神経堤細胞の DiO による染色。B, 頭部神経堤細胞数及ぼすエタノールの影響。平均値と標準誤差を示す。

A



B

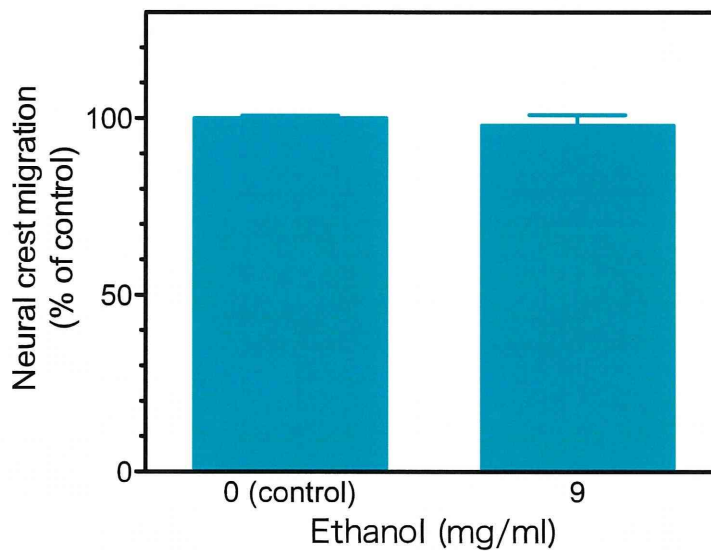


図7. ラット体幹神経堤細胞の遊走に及ぼすエタノールの影響

A, 体幹神経堤細胞遊走実験法の概要。B, 体幹部神経堤細胞の遊走に及ぼすエタノールの影響。平均値と標準誤差を示す。

表 1. ラット培養胚の発育に及ぼすエタノールおよびメタノールの影響

	0 (control)	Ethanol (9 mg/ml)	Methanol (9 mg/ml)
No. of embryos	6	6	6
No. of viable embryos	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
Crown-rump length (mm)	4.04 ± 0.10	3.13 ± 0.08****	3.99 ± 0.06
Head length (mm)	2.19 ± 0.08	1.52 ± 0.09***	2.17 ± 0.04
No. of somite pairs	26.9 ± 0.48	20.5 ± 0.99****	26.5 ± 0.22
No. of embryos with deformed organ	0	6 (100%)**	6 (100%)**
Branchial arch	0	6 (100%)**	0
Heart	0	6 (100%)**	0
Neural tube	0	5 (83%)**	1 (17%)
Optic vesicle	0	6 (100%)**	0
Otic vesicle	0	6 (100%)**	0
Somite	0	6 (100%)**	6 (100%)**
Tail	0	6 (100%)**	0

平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があることを示す (**, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$)。

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

発達成長期ニューロン・グリア新生評価法

研究分担者 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。今年度は新生ラット前脳矢状面切片培養系において、オリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出可能であることを明らかにした。この実験系において検出されたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子として、fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1、platelet derived growth factor receptor (PDGFR) a を見いだした。

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きている。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）。特に、オリゴデンドロサイトはこの時期にほぼ全ての新生が完了する。昨年度は、新生ラット前脳矢状面切片の SVZ の神経幹細胞および前駆細胞を緑色蛍光蛋白質（enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP）により標識し切片培養するという実験系を確立し、この実験系を用いてオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対する化学物質の影響が検討可能であることを示した。また、cytosine arabinoside (AraC) のオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対する影響について薬理的検討を試行したところ、AraC はオリゴデンドロサイトの分化および遊走を抑制した。しかし、前脳切片培養系はこれまでに前例のない新技術であり、あらゆる薬物が全て負の方向に影響を与える可能性も否定できない。そこで本年度は、我々の確立した実

験系でオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対する正の作用も検出可能かどうかを検討し、本実験系の信頼性を検証する。また、この研究班の大きな目標として、ラット前脳矢状面切片培養系において得られたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカーを探索することがある。そこで、オリゴデンドロサイトの分化および遊走において、ヒトと齧歯類で共通の生理的機能を担っている分子を文献調査し、実際の前脳切片培養系における発現についても検討する。

B. 研究方法

1. 前脳矢状面切片培養系

生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片標本を作成し（150 mm）トランスメンブレン（millipore）上に静置し、SVZ に eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウィルス（NIT-eGFP; J Neurosci 19(19) 8487-97, 1999）を 30 nl 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。切片培養用培地（N2 1%, B27 1%, L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM, Kynurenic acid 0.5 mM in Neurobasal）で 3 日間培養した。

2. オリゴデンドロサイト分化および遊走の確認

eGFP 標識細胞の O1（オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー）の発現について免疫組織化学的に検討した。ブロッキング液で 1 時間処理した後、4°C で抗 O1 抗体（IgM）

(Millipore [Chemicon] MAB344)により2日間処理し、PBSで3回洗浄した後、蛍光標識された二次抗体で4°Cで2日間処理しPBSで洗浄した。eGFP(+)細胞中のeGFP(+) O1(+)細胞の比率を算出した。

3. eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理学的検討

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の分化および遊走に対する正の作用も検出可能かどうか検討するため、切片培養開始時より終了時まで培地中にプロラクチン (prolactin: Prl) (10, 100 nM) を添加し、上記の通り、オリゴデンドロサイト分化および遊走を確認した。

4. ヒトへの外挿に応用可能なバイオマーカーの探索

オリゴデンドロサイトの分化および遊走において、齧歯類とヒトとで共通の生理機能を担っている分子について文献調査し、候補となる分子について培養前脳矢状面切片における発現を免疫組織化学的に確認した。

(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。ウィルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「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におけるオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対する Prl の作用

前脳矢状面切片 SVZ の神経幹細胞および前駆細胞を eGFP で標識し、Prl 存在下 (10, 100 nM) で3日間培養した。図 1B の eGFP(+)細胞数が示すように、Prl は神経幹細胞および前駆細胞の増殖を抑制する傾向を示したが、有意な差には至らなかった。しかし一方、GFP(+)細胞の遊走に対しては促進的に作用した(図 1A)。また、eGFP(+) O1(+)細胞数は Prl の用量依存的に増加した(図 1B)。eGFP(+)細胞中の O1(+)細胞が占める割合

を算出したところ、Prl の用量依存的に O1(+)細胞の比率が上がっていくことが明らかとなった(図 1C)。Prl 100 nM においてはその差は有意となっていた。以上の結果は Prl によってオリゴデンドロサイトの分化および遊走が促進されたことを示している。

2. ヒトへの外挿に応用可能なバイオマーカーの探索

オリゴデンドロサイトの分化および遊走において、ヒトと齧歯類で共通の生理機能を担っている分子を文献検索した。O1 はヒトの脳発達においてもオリゴデンドロサイト前駆細胞に必ず発現する分子であった。(J Comp Neurol 501 (6) 879-90, 2007; Int J Neurosci 120 (4) 305-13, 2010)。従って、培養ラット前脳矢状面切片における O1 の発現を検討することで、ヒトにおけるオリゴデンドロサイト分化への影響を予測できる可能性が示された。さらに、fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1 (J Neurosci 31(42) 14899-14909, 2011) および platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α (Nat Biotechnol 29(10) 34-942, 2011) がヒト脳において遊走が活発なオリゴデンドロサイト前駆細胞に高発現しているという報告を見いだした。そこで、培養前脳矢状面切片において O1-FGFR1, O1-PDGFR α の二重染色を行い、FGFR1 および PDGFR α が遊走のバイオマーカーたり得るかどうかについて検討した。図 2 に示すように、SVZ の O1(+)細胞はほぼ全てが FGFR1(+)であった。図 2D の orthogonal 画像が示すように、FGFR1 シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。しかし、FGFR1(+)細胞の中には O1 を発現していない細胞も数多く見受けられた。図 3 で示すように、PDGFR α の場合も同様に、SVZ の O1(+)細胞はほぼ全てが PDGFR α (+)であった。しかし、PDGFR α (+)細胞の中には O1 を発現していない細胞も数多く見受けられた。図 3D の orthogonal 画像が示すように、PDGFR α シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。

D. 考察

培養前脳矢状面切片においてオリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出可能であるかどうかについて、Prl を用いて検討した。妊娠中動物において神経

新生が促進されることが知られているが、Prl がこの作用本体であることが明らかにされている (Science 299 (5603) 117-20, 2003)。今回、前脳矢状面切片培養系を用いて、Prl が神経新生ばかりでなく、オリゴデンドロサイトの分化および遊走も促進することを見いだした。この結果は、前脳矢状面切片培養系においてオリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出できることを示している。Prl は eGFP(+) 細胞数をむしろ減少させる傾向を示し、一方で、O1 (+) 細胞数が増加した。また、eGFP(+) 細胞分布範囲もコントロール群に比較して明らかに広がっている。これは、Prl 処理により、SVZ の神経幹細胞および前駆細胞が増殖から分化の方向へとシフトしたことを示している。本 Prl 適用条件での神経新生の変化に興味が持たれる。

ラット前脳矢状面切片培養系において検出されたオリゴデンドロサイトの分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子を文献調査により探索したところ、遊走のバイオマーカーとして FGFR1、PDGFRa を見いだした。FGFR1 は多発性硬化症においてオリゴデンドロサイト前駆細胞が活発にリクルーティングされるときにオリゴデンドロサイト前駆細胞に高発現している分子である (J Neurosci 31(42) 14899-14909, 2011)。また、多発性硬化症などのミエリン異常疾患においてオリゴデンドロサイト前駆細胞を移植する場合、PDGFRa (+) 細胞を移植すると非常に遊走能が高く移植の効果が高いことが知られている (Nat Biotechnol 29 (10) 934-942, 2011)。今回、培養前脳矢状面切片において O1 (+) 細胞はほぼ全てが FGFR1 (+)、PDGFRa (+) であった。遊走が正常に起こっている場合、これらの両分子が確かに O1(+) 細胞に発現していることが確認された。しかし、FGFR1(+) 細胞、PDGFRa(+) 細胞が全て O1(+) ではなかったことから、バイオマーカーとして活用する場合、組織化学的に分布や発現量の確認を行う必要があることが明らかとなった。本年度までにオリゴデンドロサイトの分化および遊走に対して正の方向に働く Prl と負の方向に働く AraC を見いだしている。そこで今後は、これらの薬物が FGFR1、PDGFRa の発現量、発現パターンにどのような影響を与えるのかを確認する必要がある。

E. 結論

新生ラット前脳矢状面切片培養系において、オリゴデンドロサイト分化および遊走に対する正の作用も検出可能であることがわかった。オリゴデンドロサイト分化および遊走への影響に関する結果をヒトへ外挿するためのバイオマーカー候補分子として FGFR1、PDGFRa を見いだした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] K. Sato, J. Kuriwaki, K. Takahashi, Y. Saito, J. Oka, Y. Otani, Y. Sha, K. Nakazawa, Y. Sekino, T. Ohwada, Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors. ACS Chem Neurosci. 3 (2012) 105-113 (C.A.)
- [2] F. Takata, S. Dohgu, A. Yamauchi, J. Matsumoto, T. Machida, K. Fujishita, K. Shibata, Y. Shinozaki, K. Sato, Y. Kataoka, S. Koizumi, In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. Plos ONE (in press)
- [3] Y. Morizawa, K. Sato, J. Takaki, A. Kawasaki, K. Shibata, T. Suzuki, S. Ohta, S. Koizumi, Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. Cell Mol Neurobiol (in press)
- [4] 佐藤 薫, グリア型グルタミン酸トランスポーター, 日薬理誌. 138 (2011) 127.

2. 学会発表

- [1] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳之, 炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 東京, 2011.
- [2] 佐藤 薫, 高木淳平, 藤森康希, 鈴木岳之, 関野祐子, パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込み機能低下を抑制する. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜市, 2011.
- [3] 鈴木岳之, 高木淳平, 藤森康希, 佐藤 薫, 炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [4] 最上(重本) 由香里, 関野祐子, 大野泰雄,

- 佐藤 薫, 生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [5] 片山(小口) 敦子, 門間彰彦, 大友ゆき, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫, 胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析. 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜, 2011.
- [6] 高橋由香里, 永瀬将志, 落合敏平, 安井豊, 中尾彩乃, 渡部文子, 高木 聡, 佐藤優, 奥津 浩也, 守口 徹, 佐藤 薫, 加藤総夫 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法 第 34 回 日本神経科学大会, 横浜市, 2011.
- [7] 中 誠則, 真嶋悠幾, 井手総一郎, 佐藤薫, 南 雅文, 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 東京, 2011.
- [8] 真嶋悠幾, 中 誠則, 井手総一郎, 佐藤薫, 南 雅文, 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響. 第 62 回日本薬理学会北部会, 仙台市, 2011.
- [9] 佐藤 薫, iPS 細胞由来ニューロンの薬理学的プロファイリング 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 東京, 2012.
- [10] 佐藤 薫, 最上由香里, 関野祐子, 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第 132 回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」札幌市, 2012.
- [11] 高橋華奈子, 最上(重本)由香里, 岡田洋平, 大津香苗, 福角勇人, 正札幌子, 金村米博, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫, ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [12] 最上(重本) 由香里, 藤森 康希, 五十嵐 良明, 広瀬 明彦, 関野 祐子, 佐藤薫 カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [13] 片山敦子, 門馬彰彦, 大友ゆき, 今井美鈴, 秋友孝文, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤薫, 胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索. 日本薬学会第 132 回年会, 札幌市, 2012.
- [14] 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳志, 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会, 京都市, 2012.
- [15] 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 斉藤善郎, 岡淳一郎, 尾谷優子, 沙宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦, エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見, 第 85 回日本薬理学会年会, 京都市, 2012.
- [16] K. Sato, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Ohno, Y. Sekino, Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ. ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece, 2011.
- [17] K. Sato, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Ohno, Y. Sekino, The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ. ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology, Ljubljana, Slovenia, 2011.
- [18] K. Sato, J. Takaki, K. Fujimori, T. Suzuki, Y. Sekino, Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication. Washington D.C., USA, 2011.
- 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。

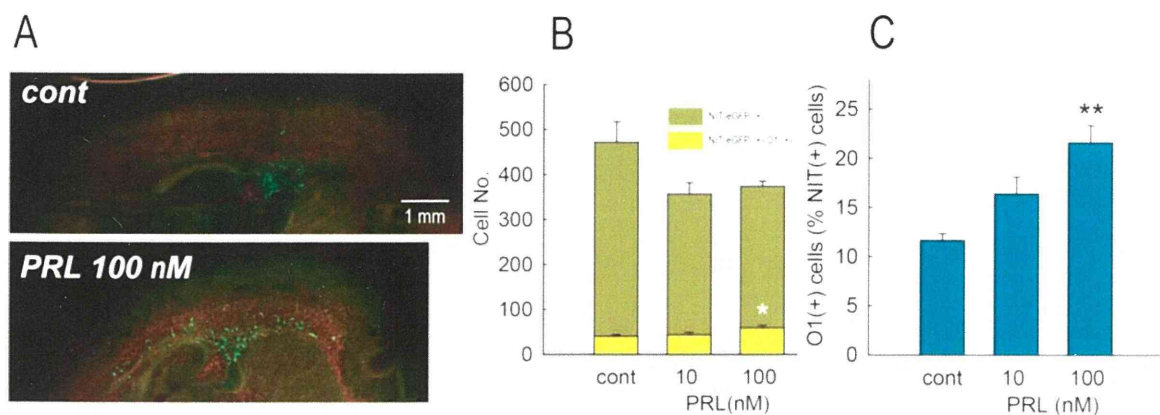


図1. eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討—Prl のオリゴデンドロサイト新生に対する影響

A: eGFP 標識神経幹細胞、前駆細胞を含む前脳矢状面切片を Prl (10, 100 nM) 存在下で培養したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲が広がった。赤: O1、緑: eGFP。B: eGFP 標識細胞数を計測したところ細胞数に有意な変化は見られなかった。しかし、eGFP(+) O1(+) 細胞数は 100 nM Prl によって有意に増加していた。C: eGFP 標識細胞に占める O1(+) 細胞の比率も有意に増加していた。

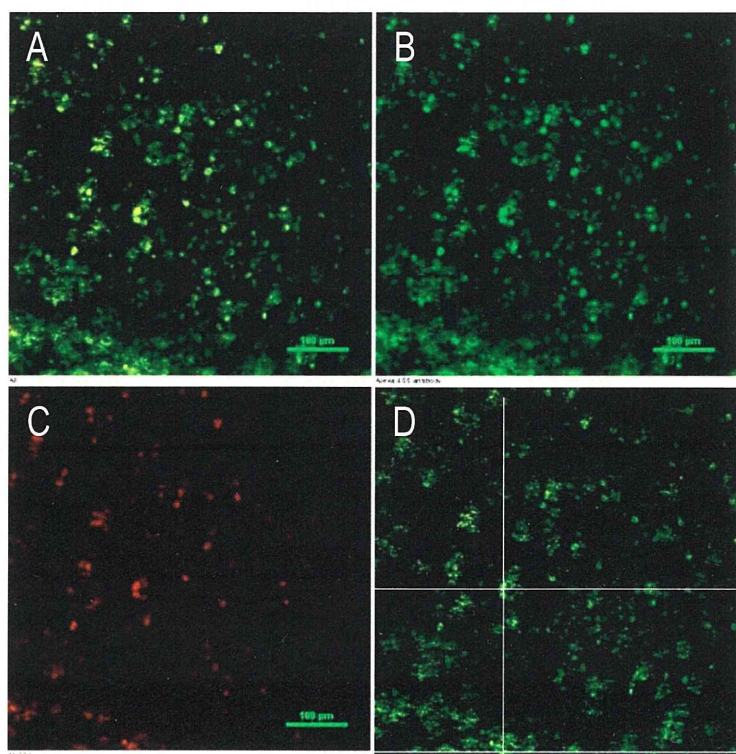


図2. 培養前脳矢状面切片 SVZ における O1 および FGFR1 の発現

A: merge 画像。B: FGFR1 (緑) 染色像。C: O1 染色像 (赤)。D: orthogonal 画像。ほぼ全ての O1(+) 細胞に FGFR1 が発現していることが確認された。D の orthogonal 画像が示すように、FGFR1 シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。

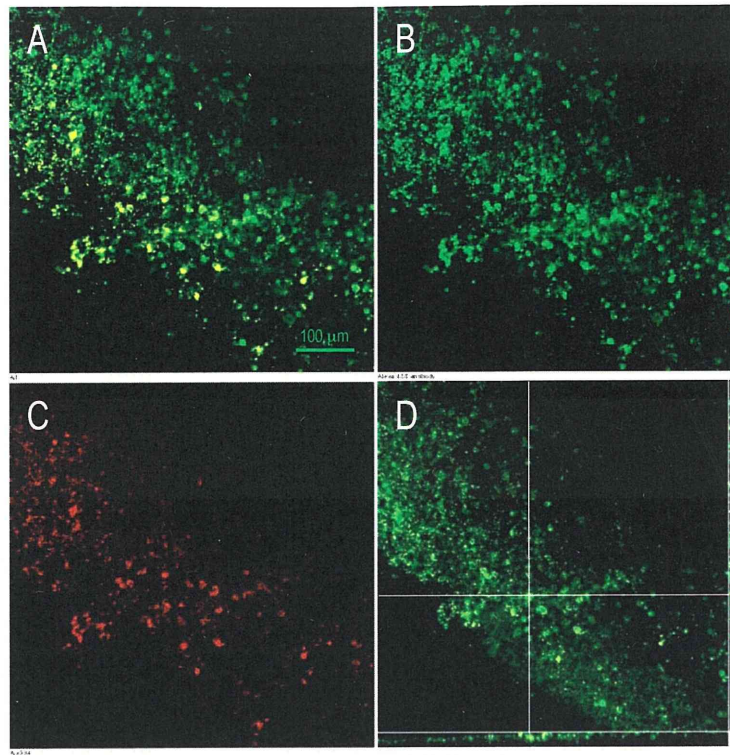


図3．培養前脳矢状面切片 SVZ における O1 および PDGFA の発現

A: merge 画像。B: PDGFA (緑) 染色像。C: O1 染色像 (赤)。D: orthogonal 画像。ほぼ全ての O1(+) 細胞に PDGFA が発現していることが確認された。D の orthogonal 画像が示すように、PDGFA シグナルと O1 シグナルは確かに同一の細胞由来であった。

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

神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築

研究分担者 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 Embryonic Carcinoma 細胞株由来の神経幹／前駆細胞を用いて、化学物質としてトリブチルスズの影響を検討した。その結果、ミトコンドリアの酸素消費量およびPGC1の発現低下を指標に、毒性を評価できることを明らかにした。

A. 研究目的

私たちは環境中の様々な化学物質に曝露されており、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主として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。また、動物愛護の観点からも in vitro の評価系が望まれている。化学物質の毒性発現メカニズムに基づいたアッセイ系を構築すれば、環境中の化学物質がヒト健康に及ぼす影響の予測が可能となる。そのためには毒性発現メカニズムを解析し、評価に有用な指標を明らかにする必要がある。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おり、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は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、ヒト神経幹／前駆細胞はアッセイ系構築に有用なソースと考えられる。

有機スズ化合物はもともと船底などの防汚塗料として使用され、海洋汚染や魚介類への残留が問題となっている。我が国においては、1990 年より「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）の第一種及び第二種特定化学物質に指定された。イボニシなどの巻き貝類に対しては内分泌攪乱作用を示すことが知られている。また、ヒトにおいても神経毒性など様々な毒性が懸念されているが、発達期における影響はあまり分かっていない。これらの理由により、評価系の指標の探索を行う上でモデル化合物として相応しいことが示唆される。

我々は昨年度に、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ヒト Embryonic Carcinoma (EC) 細胞からモデル細胞への分化誘導法を構築した。そこで本年度は、有機スズ化合物を用いて、安全性評価の指標の探索を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト EC 細胞株 NT2/D1 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 µg/ml streptomycin (Gibco BRL) を加えた培地にて培養した。

2. 分化誘導

NT2/D1 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 $10\mu\text{M}$, Sigma-Aldrich) を添加して、さらに 1 週間培養を行った。得られた sphere を 0.25% トリプシン (Gibco BRL) とピペッティングにより single cell にして分化細胞として用いた。

3. 細胞増殖

分化細胞を 10^4 cells/dish の割合で 96 穴プレート (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) に播種した。細胞増殖は、MTS (Promega) を加えて 1 時間培養し、595nm における吸光度の変化により解析した。

4. 酸素消費量

酸素消費量は、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse Bioscience) を用いて、酸素消費速度 OCR (Oxygen Consumption Rate) により解析した。専用の 96 穴プレートに分化細胞を播種して、接着させた後、種々の濃度の有機スズあるいは酢酸スズを添加した。24 時間後に OCR の測定を行った。

5. Real-time PCR

遺伝子発現は、Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いて解析した。

C. 研究結果

化学物質として有機スズ化合物であるトリブチルスズを用いて、神経幹/前駆細胞の生存率に対する影響を検討した。その結果、図 1 に示すように、濃度依存的に生細胞数の減少が認められた。一方、コントロールとして毒性の少ない無機スズ化合物である酢酸スズを用いて処理した結果、生細胞数の減少が認められなかった。従って、生細胞数は毒性と相関していることが示唆された。さらに、有機スズの濃度は 100nM と非常に低濃度で作用が認められていることから、生細胞数の測定は一定の感度を有していると考えられた。

次に、神経幹/前駆細胞における未分化マーカー Nestin の遺伝子発現をリアルタイム

PCR によって検討したところトリブチルスズあるいは酢酸スズの曝露によってほとんど影響が認められなかった (図 2)。これらの結果から、トリブチルスズは細胞数を抑制するものの未分化状態には影響を与えないことが示唆された。

さらに、神経幹/前駆細胞の生細胞数減少のメカニズムとしてミトコンドリア機能に着目し、酸素消費量の測定を行った。その結果、図 3 に示すようにトリブチルスズ曝露によって濃度依存的に酸素消費量の低下が認められた。また酸素消費量の低下は 100nM から認められたことから、細胞数とパラレルであった。一方、酢酸スズの曝露によってほとんど影響が認められなかった。また cAMP や cGMP のアナログは酸素消費量を上げることが知られているが、神経幹/前駆細胞においても同様の作用を確認している (図 3)。これらの結果から、トリブチルスズはミトコンドリアの酸素消費量の低下を介して細胞数を減少させることが示唆された。

このミトコンドリア機能の低下を分子レベルで検討することによりリスク評価の指標の候補が明らかになると考えて、トリブチルスズによって影響を受けるミトコンドリア関連遺伝子の探索を行った。その結果、トリブチルスズの長期曝露によりエネルギー産生に関わる転写共役因子 PGC1 α および β の発現が低下することを見いだした (図 4)。毒性の低い酢酸スズの曝露ではほとんど影響が認められなかった。従って、PGC1 はトリブチルスズの毒性に関連して発現が低下することが示唆された。

D. 考察

本研究において、ヒト EC 細胞から調製した神経幹/前駆細胞を用いて、有機スズの毒性の指標の探索を行い、ミトコンドリア関連マーカーを新たに見いだした。

毒性評価の指標を探索するには、まずは既存の化学物質を用いて検討する必要がある。有機スズはすでに中枢毒性が報告されており、また毒性の少ない無機スズも対象として使用可能であること、低濃度の曝露により県境への影響が懸念されていることなどの理由により、モデル化合物として使用することにした。その結果、非常に低濃度の有機スズの曝露により神経幹/前駆細胞の生存率を抑制することを見いだした。論文などでは、

500nM や 1 μ M など非常に高濃度のトリブチルスズの作用を検討しており、毒性域の基準値の設定にはつながらないことが考えられる。本研究で用いたアッセイ系は従来よりも高感度で毒性を評価できる可能性がある。

生細胞数の減少はミトコンドリアの機能障害によっておこる可能性があることから、酸素消費量の測定を行ったところ、毒性とパラレルであることが明らかになった(図3)。そこで、さらに分子レベルでの指標の探索を行った。トリブチルスズ 24 時間処理では遺伝子発現に変化は認められなかったが、6 日間の長期曝露により PGC1 の発現が選択的に減少していることが示唆された。PGC1 はエネルギー産生に関わる遺伝子発現を制御していることから、その下流のシグナル経路も抑制され、結果として酸素消費量が低下する可能性が考えられる。

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。本研究で用いた、低濃度の有機スズの毒性をミトコンドリアの機能およびエネルギー産生に関わる転写共役因子 PGC-1 の発現低下により評価できる可能性が示唆された。PGC-1 発現量は他の化学物質評価の指標につながる可能性がある。今後は、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 細胞から分化誘導した神経幹/前駆細胞を用いて、ミトコンドリアの機能を指標とすることにより化学物質のリスク評価に応用できる可能性が示唆された。今後、ヒトのデータなどと照らし合わせることで成長期における健康影響評価系の構築を目指していきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Y. Kanda, T. Hinata, S.W. Kang S.W., Y. Watanabe. Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal

stem cells. *Life Sciences* 89 (2011) 250-258.

- [2] W. Lin, N. Hirata, Y. Sekino, Y. Kanda. Role of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor in Normal and Cancer Stem Cells. *Current Drug Targets* (in press).

2. 学会発表

- [1] 諫田 泰成, 平田 尚也, 林 和花, 関野 祐子, Effects of sex hormones on proliferation of breast cancer stem cell. 第 9 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2011.
- [2] 平田 尚也, 林 和花, 関野 祐子, 諫田 泰成, エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖, 第 124 回薬理学会関東部会, 2011.
- [3] 李 敏, 黒川 洵子, 諫田 泰成, 関野 祐子, 古川 哲史, Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 第 124 回薬理学会関東部会, 2011.
- [4] Y. Kanda, N. Hirata, Y. Sekino, Sphingosine-1-phosphate mediates proliferation of breast cancer stem cells, FASEB summer conference, 2011.
- [5] 諫田 泰成, 平田 尚也, 関野 祐子, 乳癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸の作用, 第 34 回分子生物学会, 横浜, 2011.
- [6] M. Li, J. Kurokawa, Y. Kanda, S. Toyama, M. Murata, Y. Sekino, K. Fukuda, T. Furukawa Quantitative characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, The 1st HD physiology international symposium: Integrative multi-level systems biology for *in silico* cardiology and pharmacokinetics, Tokyo, Japan 2012.
- [7] Y. Kanda, N. Hirata, Y. Sekino, Sphingolipid-mediated proliferation of cancer stem cells, Keystone Symposia (Q3), Banff, Canada, 2012.
- [8] 諫田 泰成, 厚生労働省公開シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」, 分化心筋細胞のクオリティコントロール, 2012.
- [9] 平田 尚也, 関野 祐子, 諫田 泰成, エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖に対する Src の影響, 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012.
- [10] 諫田 泰成, 平田 尚也, 山田 茂, 関野 祐子, トリブチルスズのミトコンドリア機能に対する影響, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012.

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。

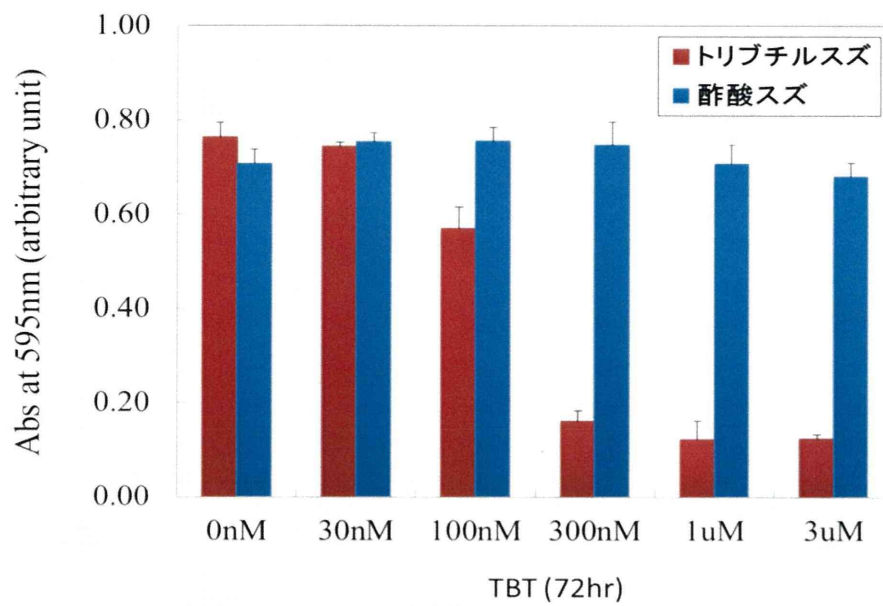


図 1 . 神経幹／前駆細胞の増殖に対するトリブチルスズの影響
NT2 由来の神経幹／前駆細胞を用いて、種々の濃度のトリブチルスズ（青色）あるいは酢酸スズ（赤色）を暴露し、細胞の生存数に対する影響を検討した。

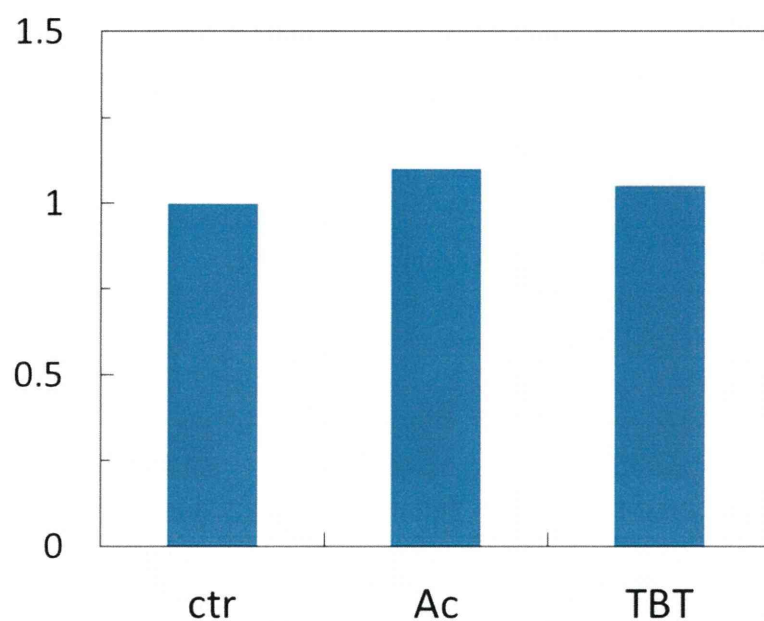
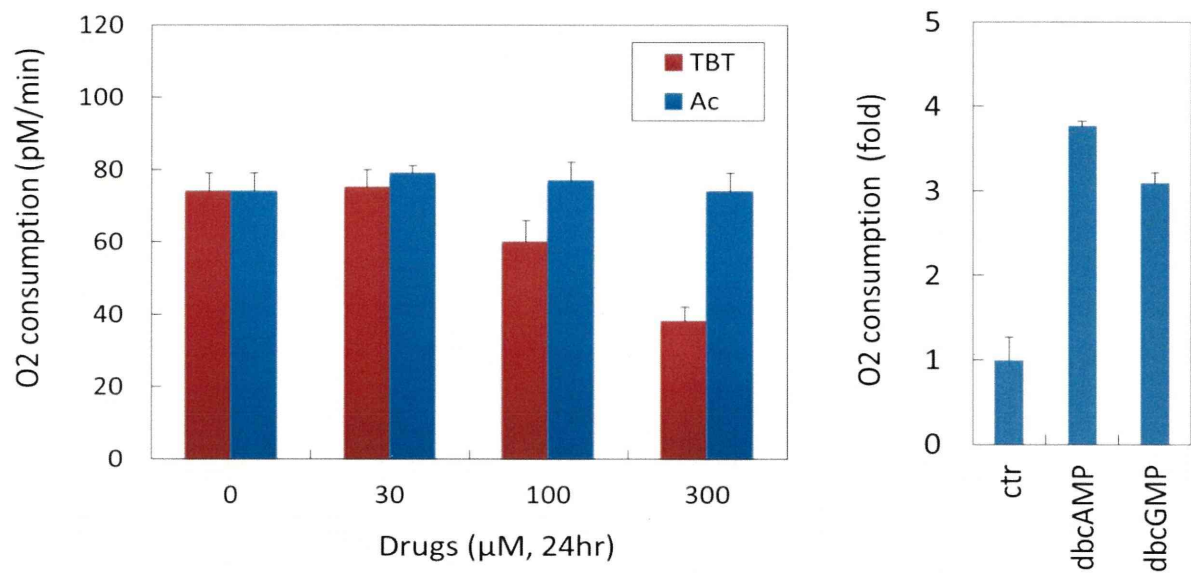


図 2. Nestin 発現に対するトリブチルスズ暴露の影響
NT2 由来の神経管／前駆細胞に 100 nM のトリブチルスズあるいは酢酸スズで 24 時間暴露し、未分化マーカー Nestin の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。



TBT: トリブチルスズ

Ac: 酢酸スズ

図 3. 神経幹／前駆細胞の酸素消費量に対するトリブチルスズの影響

(右) NT2 由来の神経幹／前駆細胞に種々の濃度のトリブチルスズあるいは酢酸スズで 24 時間曝露し、酸素消費量を測定した。(左) NT2 由来の神経幹／前駆細胞にミトコンドリア機能を活性化させる試薬ジブチル cAMP あるいはジブチル cGMP を曝露し、酸素消費量を測定した。

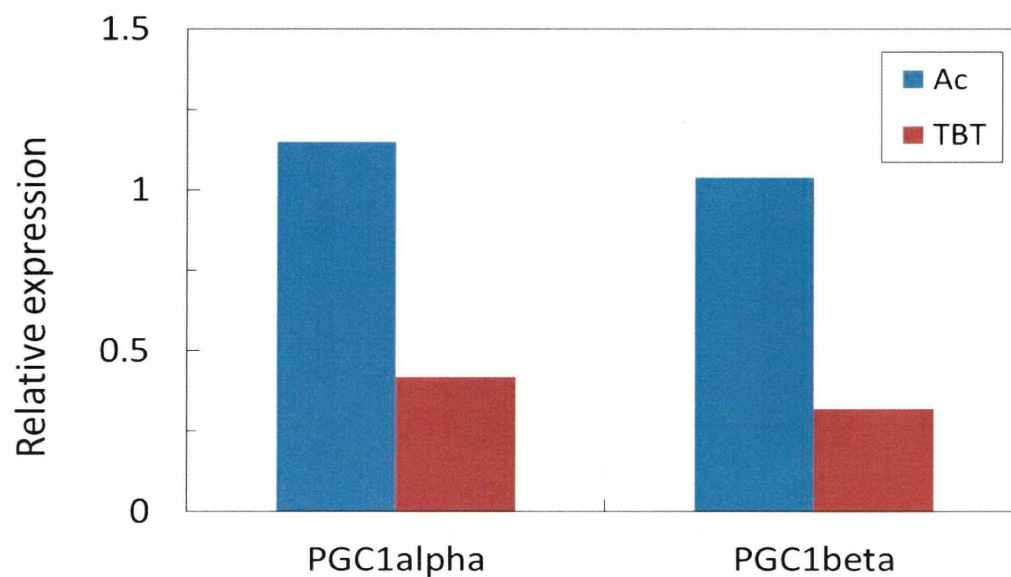


図4. PGC1 発現に対するトリブチルスズ曝露の影響

NT2 由来の神経幹／前駆細胞に種々の濃度のトリブチルスズあるいは酢酸スズで6日間曝露し、転写共役因子 PGC1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。発現量は暴露しない細胞における発現量を1としてその相対値として示した。

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

研究要旨

本年度は昨年度に引き続き、メタボローム解析を進めるとともに、昨年度の結果に基づき、化合物暴露実験を実施した。合わせて、ゲノミクス解析にも着手した。メタボローム解析では、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では別な経路で代謝していることを示唆するデータを得た。また、メタボローム解析により示された胎児肝細胞より成人肝細胞でグルクロン酸抱合能が高いという予測と一致して、より成人肝細胞に近いと考えられる肝芽細胞のスフェロイド培養で、グルクロン酸抱合を受けるアセトアミノフェンに対する毒性がより高濃度にシフトするのが観察された。遺伝子発現は胎児肝細胞の培養方法により大きく変化していることを示す結果を得た。

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。本年度は昨年度に引き続き、メタボローム解析を進めるとともに、昨年度の結果に基づき、化合物暴露実験を実施した。合わせて、ゲノミクス解析にも着手した。

B. 研究方法

1. サンプル調製

（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、63mg/L penicillin と 100mg/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 60mm の培養ディッシュ（FALCON 社製、付着細胞用）を用い、5% CO₂ を含む気相下 37℃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 1×10^5 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。

（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、1mM 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、1mM 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。