

201236017A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の

発達期影響予測法に関する研究

(H24-化学-一般-002)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 25 (2013) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の

発達期影響予測法に関する研究

(H24-化学-一般-002)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 25 (2013) 年 4 月

目次

I 総括研究報告書

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の発達期影響予測法に関する研究

・・・・・・・・・・・・・1

研究代表者 大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授

II 分担研究報告書

1. 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒト ES 細胞株の樹立

・・・・・・・・・・・・・10

大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授

2. ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

・・・・・・・・・・・・・18

曽根 秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長

3. ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

・・・・・・・・・・・・・24

藤渕 航 京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 教授

III 研究成果の刊行に関する一覧表

IV 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

ヒト多能性幹細胞試験バッテリーによる化学物質の発達期影響予測法に関する研究

研究代表者
大迫 誠一郎
東京大学 准教授

研究要旨

ヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞など）を利用した応用研究は、我が国が重点的に推進すべき科学技術分野となった。臨床応用にはまだ多くの技術上の課題があるが、創薬や毒性試験への応用は早期に実現できるものとして期待されている。多能性幹細胞の利点は生体内の発生過程を再現できる点で、化学物質のヒトへの発達毒性試験にヒト ES/iPS 細胞を用いた分化培養系の有効性が期待されている。

我々は、平成 21～23 年度の厚生労働科学研究費でヒト ES 細胞を利用した EST による化学物質の影響評価法の開発を実施し、(1) ベイジアンネットワーク解析を用いた評価系、(2) サポートベクターマシンによる化合物の影響判別、(3) 遺伝子変動情報と形態情報との関連性を評価するマルチパラメトリックプロファイリングネットワークという新しい概念を確立した。しかしながら、ヒト多能性幹細胞を用いた分化培養系は簡便性向上という点から、遺伝子導入や培養技術など、さらなる開発研究が必要である。

本研究では、複数の標的組織細胞の分化影響を簡便にモニタリングし、上記の評価手法に応用できる細胞開発の目的のために、神経系細胞の分化培養に加えて、肝細胞分化培養系を新たに導入し、同一環境、同一曝露系による比較解析を行う。使用する全てのヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞を遺伝子改変でハイスループットイメージング用に加工し、複数のドナー株ならびに系統株を同一線上に配置した曝露試験を行う。予測法としては確率推論を融合したサポートベクター回帰法を適応し、これにより「ヒト多能性幹細胞試験バッテリー」を構築する。

サブテーマ 1) 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒト ES 細胞株の樹立

ダイオキシン類は個体発生過程において作用すると催奇形性等の様々な生体影響を引き起こすが、ヒトと実験動物では感受性域や感受性組織が大きく異なる。ダイオキシン類のヒトの各組織細胞への曝露影響を可視化できるよう、標的遺伝子の一つである *Cyp1a1* 遺伝子の活性化をリアルタイムモニタリングできる ES 細胞株の樹立を試みた。マウス *Cyp1a1* 遺伝子プロモーターで EGFP をドライブさせたコンストラクトをヒト ES 細胞（KhES1）へリポフェクションにより遺伝子導入し耐性細胞を得た。このヒト ES 細胞は TCDD の用量依存的に EGFP の蛍光強度が増加することが示され、胚様体の状態での TCDD 感受性が高いことがわかり、野生型で観察した結果と類似していた。ダイオキシン等の環境汚染物質の発達期影響の評価

に応用可能と思われる。

サブテーマ2) ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築するために、MAP2 プロモーターで2種のレポーター遺伝子をドライブしたプラスミド(MAP2-MLNCG)を構築し、そのプラスミドの有効性を検討した。ヒトH9株ES細胞由来の神経前駆細胞(hPNC)にMAP2-MLNCGを導入し、神経細胞分化後に発光活性および蛍光イメージングシグナルを測定したところ、分化に伴う若干の蛍光イメージングシグナル指標の上昇が認められた。この結果より、MAP2-MLNCG-hPNC神経細胞株構築の道筋ができた。

サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

複数の株種からなるES細胞並びにiPS細胞に同一環境、同一曝露系を用いた一連の化合物毒性試験技術が確立されたことを想定した場合の遺伝子発現情報マイニング技術について研究を行った。その結果、1)新しい遺伝子発現順位に基づくロバストな主成分空間学習法を開発し、従来よりもクラスタリング精度を向上させた、2)新型の遺伝子ネットワーク予測法である構造方程式モデルを用いた毒性ネットワーク推定を行った。さらに、毒性試験のハイスループット能力を上げるため、多数の株種を一度に効率的に遺伝子発現解析できる技術としてDNAバーコードを用いたマルチプレックスシングルセルRNA-seq法の検討を行い、例としてiPS細胞研究所で入手可能な5種の幹細胞(201B7, 454C2, 253G1, KhES1, KhES3)を15個ずつ用いた遺伝子発現解析をわずか1回のシーケンサーランで測定可能にした。

共同研究者

サブテーマ1) 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒトES細胞株の樹立

○大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター
准教授

○甲田 雅伸 東京大学 疾患生命工学センター
技術員

サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

○藤渕 航 京都大学 iPS細胞研究所 増殖分化機構
研究部門 教授

○山根 順子 京都大学 iPS細胞研究所 増殖分化機構
研究部門 研究員

サブテーマ2) ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

○曾根 秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長

○南斎 ひろ子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 技術員

A. 研究目的

ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞など)を利用した応用研究は、山中教授のノーベル賞受賞を機に我が国が重点的に推進すべき科学技術分野となった。神経系細胞等の分化細胞を移植する臨床応用には、まだまだ多くの技術上の課題があるが、創薬や毒性

試験への応用は早期に実現できるものとして期待されている。多能性幹細胞の利点は発生の極めて初期の生体内の発生過程を再現できる点にある。化学物質のヒトへの発達毒性試験では、ヒトに近い高等な霊長類を用いた実験が必要だがコスト面で実施困難な場合が多い。したがって、特に理想としてはヒト ES/iPS 細胞を用いた分化培養系が直接的で有効と思われるが、ヒト ES 細胞を用いた EST で実効性の高い評価系の報告はない。

我々は、平成 21～23 年度の厚生労働科学研究費でヒト ES 細胞を利用した EST による化学物質の影響評価法開発として「確率推論型アルゴリズムへのヒト胚性幹細胞試験データ適用方法の標準化に関する研究」を実施し、(1) ベイジアンネットワーク解析を用いたメチル水銀に対する発達神経分化影響 (He et al., *Toxicol Lett* 2012)、(2) 複数の化学物質を用いたヒト ES 細胞の発達毒性のベイズ推定を融合したサポートベクターマシンによる影響判別、(3) 分化初期の化学物質曝露による遺伝子変動情報と後の形態情報との関連性を評価するための、確率推論モデルを用いたマルチパラメトリックプロファイリングネットワーク (Multi-parametric profiling network) という新しい概念を確立した (Nagano et al., *Int J Mol Sci.*, 2012)。

なお、ベイジアンネットワーク解析を用いたメチル水銀に対する発達神経分化影響の新しい評価法 (He et al., *Toxicol Lett.*, 2012) では、ヒトの発達途上の神経細胞のほうがマウスのそれよりメチル水銀に対する後発的影響が出やすいこと見出し、動物実験では検出できないヒトへの影響を予測できる可能性を示した。東京大学と国立環境研究所の共同プレスリリースを行い、日刊工業新聞、日経電子版等、いくつかの報道機関により報道された (日刊工業：<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020120518eaau.htm> D)。

本研究では、複数の標的組織細胞の分化影響を簡便にモニタリングし、上記の評価手法に応用できる

細胞の開発を行うことを目的としている。すでに確立されているヒト多能性幹細胞を用いた神経系細胞の分化培養に加えて、肝細胞分化培養系を新たに導入し、同一環境、同一曝露系による比較解析を行う。使用する全てのヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞を遺伝子改変でハイスループットイメージング用に加工し、複数のドナー株ならびに系統株を同一線上に配置した曝露試験を行う。予測法としては確率推論を融合したサポートベクター回帰法を適応し、これにより「ヒト多能性幹細胞試験バッテリー」を構築する。

B. 研究方法

サブテーマ 1) 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒト ES 細胞株の樹立

より効率的な多能性幹細胞試験確立のため、遺伝子導入によるヒト ES 細胞株の樹立を行った。薬物代謝酵素第 1 相酵素である CYP1A1 遺伝子プロモーターで EGFP をドライブさせた Neo 発現カセットをもつコンストラクトをヒト ES 細胞 (KhES1) へリポフェクションにより遺伝子導入し G418 耐性株を得た。ヒト ES 細胞へのリポフェクションによる耐性株の樹立は難易度が高いとされているが、フィーダー細胞 (SNL 細胞) を使用した系で樹立可能であることがわかった。

サブテーマ 2) ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

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。hMAP2 のプロモーター領域 (-1854 から +369) を増幅し、pGL3-Metluc-copGFP-Neo プラスミドに組み込んだ。H9 細胞由来神経前駆細胞を培養した hNPC (ヒト神経前駆細胞) を 48 ウェルプレートに播種し、80%コンフルエントになるように増殖培地で培養、Neon を用いて pGL3-hMAP2-Metluc-copGFP-Neo プラスミド (MAP2-MLNCG) のエレクトロポレーションを行った。遺伝子導入後 8 日目に分化培地に変えて培養を行い、さらに 15 日後に G418 を添加し、細胞のセレクションを

行った。また、遺伝子導入翌日より、各ポイントにおいて培養液をとり、Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay を用いて発現測定した。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

1) 新しい遺伝子発現順位に基づくロバストな主成分空間学習法: マイクロアレイ等遺伝子発現データの正規化はデータ統合解析上の問題であり、遺伝子の発現順位を用いた解析がロバストであるとのコンセンサスがある。しかし、順位データによる多変量解析法は未開拓の分野なため、我々は新規に検索エラーを最小化する線形マッピングの手法を開発した。

2) 構造方程式モデルを用いた毒性ネットワーク推定: これまで用いたベイジアンネットワークの推定だけでは、本当に遺伝子ネットワークが情報を捉えているのか不明なため、異なる手法による遺伝子ネットワークを試す必要がある。これまで用いていた GGM (グラフィカルガウシアンモデル)、CrossR (交差相関係数) に加え、未知のネットワーク構造因子を発見可能な構造方程式モデルからの遺伝子ネットワーク推定法を開発した。

3) DNA バーコードを用いたマルチプレックスシングルセル RNA-seq 法の検討: 遺伝子ネットワークの推定には遺伝子数の約 4 倍のデータ点が必要であり、1 化合物種につき 10 遺伝子なら、5 濃度 4 時点 2 リピートで 400 点のデータが必要とされ、20 化合物ならコントロールなども合わせて約 10,000 点近いデータを測定することになり、実験者への負担が大きかった。そこで、シングルセルを用いた手法により、1 度のシーケンサー解析で 96 細胞データを取得することができるマルチプレックス RNA-seq 手法の開発を試みた。

(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。

C. 研究結果

サブテーマ 1) 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒト ES 細胞株の樹立

作出された KhES1-CYPEGFP 細胞は TCDD の用量依存的に EGFP の蛍光強度が増加することが示され、ダイオキシン等の環境汚染物質のモニタリングが可能であることが示された。このような化学物質の曝露を検出できるヒト多能性幹細胞の樹立は世界的にも初めてである。今後、内胚葉系あるいは外胚葉系に分化培養した際の挙動を詳細に検討する。

サブテーマ 2) ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

hMAP2 promoter 領域の同定には、正常皮膚細胞及び乳がん細胞株 MCF7 由来のゲノムを用いて配列解析を行った。その結果、ヒト皮膚細胞と MCF7 は同一であるが、NCBI に記載の配列とは異なっていた。しかし、ヒト皮膚細胞と MCF7 の 2 種で同一の配列であったため、そのまま pGL3-Metluc-copGFP-Neo に挿入した。エレクトロポレーションにより遺伝子導入、さらに 15 日後に G418 を添加し、細胞のセレクションを行って、Metluc (分泌型 Luciferase) のアッセイと copGFP の蛍光を神経細胞分化後に測定したところ、分化に伴う若干の蛍光イメージングシグナル指標の上昇が認められた。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

1) 新しい遺伝子発現順位に基づくロバストな主成分空間学習法: 遺伝子発現データの正規化に対して有効な手段として発現順位を用いた解析が用いられている。我々は、遺伝子発現順位データを用いて、類似遺伝子発現パターン検索を行う場合での線形重み学習を行い、検索のエラー率を最小化する主成分空間学習法 PARCA (Pairwise Ranking Component

Analysis) 法を開発した。本手法は従来手法である LDA（線形判別解析）、PCA（主成分分析）、NCA（近傍成分分析）と比較して特にカテゴリーデータの空間分離が優れている。例として iPS 細胞の遺伝子発現データ 73 マイクロアレイに使用したところ、12 マルチプラットフォームからなる混成データセットであっても iPS 細胞の由来細胞による違いを検出する能力が最も高いことが判明した。

2) 構造方程式モデルを用いた毒性ネットワーク推定：新しく「構造方程式モデル」と呼ばれる手法によるネットワーク推定を行った。本手法は遺伝子ネットワークにおける遺伝子間の依存関係をダイレクトに最尤推定する手法であり、得られたネットワークはデータを如実に反映していた。本研究班第一期で取得した 15 化合物 9 遺伝子（GATA2, Lmx1A, MAP2, Nanog, Nestin, Nodal, Oct3/4, Pax6 and Tuj1）のネットワークを推定し、化合物のうち、Acrylamide、Diethylnitrosamine、Thalidomide について詳細な遺伝子ネットワーク図が得られた（この研究成果は国際学会 GLOBAL HEALTH 2012 において、ベストペーパー賞を受賞した）。

3) DNA バーコードを用いたマルチプレックスシングルセル RNA-seq 法の検討：1 度のシーケンサー解析で 96 細胞データを取得することができるマルチプレックス RNA-seq 手法の開発を行った。この新規手法で 5 種の幹細胞（201B7, 454C2, 253G1, KhES1, KhES3）及びマウスフィーダー細胞（SNL76/7）を 15 個ずつ用いた遺伝子発現解析を 1 回のシーケンサーランで可能にした。また、収量が十分であった 6 遺伝子を用いてベイジアンネットワークを推定することにも成功した。

D. 考察

サブテーマ 1) 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒト ES 細胞株の樹立

我々は本研究班第一期の最終年度において、野生型の KhES1 を用い、ES 細胞維持培養時、EB 形成時ならびに神経細胞分化誘導時の各ステージの

TCDD 曝露による反応性を、AHR 活性化のバイオマーカーである CYP1A1 の誘導能で検索した。その結果、EB 形成期では TCDD に対する反応性が他のステージより高いことを見出し、神経細胞分化誘導条件下（Day35 曝露）のでは誘導が観察されないことを報告した。

今回作成した KhES1-CYPEGFP 細胞の EGFP によるリアルタイム解析では、EB 形成期の表面の細胞で TCDD 反応性が上がること、神経細胞に分化した後では EGFP の発現が消えることがわかった。分化神経細胞の TCDD 曝露による EGFP 誘導性については現在観察中であるが、少なくともこれら観察結果は、既報の野生型の KhES1 と同じく、今回安定導入したトランスジーン（マウス *Cyp1a1*-EGFP）も分化の進行と方向性に伴ってその誘導能が変容することを示している。

サブテーマ 2) ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

本研究は、ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築するために、hMAP2 プロモーターで 2 種のレポータージーンをドライブしたプラスミド（MAP2-MLNCG）を構築し、そのプラスミドの有効性を検討した。このアッセイ系の問題は、未分化細胞が神経の分化細胞に分化したときに、レポーターたんぱく質の発現活性をみるため、増殖期で細胞のセレクションができない点である。また、MAP2 プロモーター研究は Kumar らの報告（Kumar et al., *Nuc Acid Res.*, 2006）のみで、どのような転写機構で発現されるのかといった基本情報がほとんど報告されておらず、今後、当研究室でもプロモーター領域を変えた検討が必要かもしれない。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

今年度は前年度までの「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」をさらに発展させたハイスループット型の多種幹細胞による毒性予測バッテリーシステムの開発を開始し

た。

今年度は、(1) 高性能な毒性分類のための情報学的手法2つ（PARCA 及び構造方程式モデル）を利用した手法を開発し、(2) ハイスループット遺伝子発現解析実現のためのマルチプレックスシングルセル解析技術の予備研究を行った。平成25年度は遺伝子発現解析を開始するため、本技術を洗練・統合し使用できるようにしなくてはならない。予定されているiPS細胞2株、ES細胞6株の計8株でそれぞれ18個の遺伝子からなるネットワークを描かせるためには、 $8 \times (18 \times 4) = 576$ シングルセル解析ができる必要がある。96細胞システムなら6プレートで済む。1細胞中のmRNA分子 10^7 個を50bpでシーケンスするため、等量の外部標準RNAと合わせて計 $10^9 = 1\text{Gbp}$ が生産されることになる。HiSeq2000のスループットが600Gbであることから、理論上、600個までのシングルセルは1ランで解析できることになり、今回の毒性試験バッテリーシステムのスペックを満たす。しかし、これは1化合物についての計算であり、予定されている22化合物では22ランが必要であり、不可能である。今後はターゲットシーケンシング等と組み合わせで効率化を図ることを計画している。

E. 結論

サブテーマ1) 薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒトES細胞株の樹立

ヒトES細胞(KhES1)にダイオキシン応答性の遺伝子*Cyp1a1*によりドライブされるEGFPレポーターをもった安定導入ES細胞を作成することに成功した。作出されたKhES1-CYPEGFP細胞はTCDDの用量依存的にEGFPの蛍光強度が増加することが示され、ダイオキシン等の環境汚染物質のモニタリングが可能であることが示された。このような化学物質の曝露を検出できるヒト多能性幹細胞の樹立は世界的にも初めてである。今後、内胚葉系あるいは外胚葉系に分化培養した際の挙動を詳細に検討する。

サブテーマ2) ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築するために、MAP2プロモーターで2種のレポータージーンをドライブしたプラスミド(MAP2-MLNCG)を構築し、ヒトH9株ES細胞由来の神経前駆細胞(hPNC)に導入し、神経細胞分化後に発光活性および蛍光イメージングシグナルの上昇が認められた。この結果より、MAP2-MLNCG-hPNC神経細胞株構築の道筋ができた。

サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

前年度までのES細胞毒性試験システムによる研究成果を踏まえて、さらにハイスループットで毒性を予測するシステムを構築することが本プロジェクトの課題である。今回の高度な情報解析技術及び次世代シーケンシング技術はこの難題を超える可能性を示唆したものであり、今後の研究の発展が期待できる。

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. Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, Ohsako S, and Tohyama C. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *J Applied Toxicol*, in press, (2013).
2. Kurita H, Ohsako S, Hashimoto S, Yoshinaga J, and Tohyama C. Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene. *J Nutr Biochem* 24, 256-266, (2013).
3. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q,

- Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, and Sone H. Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: A combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology* 33, 1375-1380, (2012).
4. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, and Sone H. Identification of stage-specific gene expression signatures in response to retinoic acid during the neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Front Genet.* 3:141. (2012).
5. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin X-Y, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, and Ohsako S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett* 212, 1-10, (2012).
6. Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, Ohsako S, Hara S, Uematsu S, Akira S, and Tohyama C. Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Sci* 127, 547-554, (2012).
7. Nagano R, Akanuma H, Qin X-Y, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and Sone H. Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: A novel approach to developmental neurotoxicity testing. *Int J Mol Sci* 13, 187-207, (2012).
- genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One.* 7(12):e52756 (2012).
2. Fukuda T, Kurita J, Saito T, Yuasa K, Kurita M, Donai K, Nitto H, Soichi M, Nishimori K, Uchida T, Isogai E, Onuma M, Sone H, Oseko N, Inoue-Murayama M. Efficient establishment of primary fibroblast cultures from the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 48(10):660-665 (2012).
3. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H. Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: a combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology.* 33(5):1375-1380 (2012).
4. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, Sone H. Identification of Stage-Specific Gene Expression Signatures in Response to Retinoic Acid during the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Front Genet.* 3:141 (2012).
5. Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H. Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet.* 57(7):434-441 (2012).
6. Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T, Sone H. Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin
- 曾根秀子：研究分担者**
1. Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T. Individual variation of the

- fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One*. 7(5):e36711 (2012).
7. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin XY, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, Ohsako S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett*. 212(1):1-10 (2012).
 8. Nagano R, Akanuma H, Qin XY, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, Sone H. Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: a novel approach to developmental neurotoxicity testing. *Int J Mol Sci*. 13(1):187-207 (2012).
 9. Qin XY, Fukuda T, Yang L, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Sone H. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol Ther*. 13(5):296-306 (2012).
 10. Sone H, Tin-Tin WS, Qin XY, Akanuma H and Imanishi S. IN: Learning Disabilities. Environmental Chemical Substances in Relation to Neurodevelopmental Disorders:A Systematic Literature Review, Chapter 16, InTech Europe (2012).
 3. Pessiot, J.F., Wong, P.S., Maruyama, T., Morioka, R., Aburatani, S., Tanaka, M., Fujibuchi, W., The impact of collapsing data on microarray analysis and DILI prediction, *Landis Bioscience*, 1(3): 1-7 (2013).
 4. Aburatani, S., Fujibuchi, W., Application of Structural Equation Modeling for Inferring Toxicity-Dependent Regulation in Human Embryonic Stem Cells, *GLOBAL HEALTH 2012, The First International Conference on Global Health Challenges*, 27-32 (2012)(Best Paper Award).
 5. Aburatani, S., Fujibuchi, W., Inference of Specific Gene Regulation by Environmental Chemicals in Human Embryonic Stem Cells, *Journal of Molecular Biology Research*, 2(1): 54-64 (2012).
 6. Miura, K., Fujibuchi, W., Unno, M., Review: Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer, *Carcinogenesis*, 33(12): 2311-2319 (2012).
 7. Miura, K., Fujibuchi, W., Unno, M., Review: Splice variants in apoptotic pathway, *Experimental Oncology*, 34(3): 212-217 (2012).
 8. He, X., Imanishi, S., Sone, H., Nagano, R., Qin, X-Y., Yoshinaga, J., Akanuma, H., Yamane, J., Fujibuchi, W., Ohsako, S., Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells, *Toxicology Letters*, 212: 1-10 (2012).
 9. Miura, K., Ishida, K., Fujibuchi, W., Ito, A., Niikura, H., Ogawa, H., Sasaki, I., Differentiating rectal carcinoma by an immunohistological analysis of carcinomas of pelvic organs based on the NCBI Literature Survey and the Human Protein Atlas database, *Surgery Today*, 42: 515-525 (2012).
 10. Hamada, S., Satoh, K., Fujibuchi, W., Hirota, M., Kanno, A., Unno, J., Masamune, A., Kikuta, K., (on-line accepted).
- 藤淵 航 : 研究分担者**
1. Pessiot, J.F., Kim, H., Fujibuchi, W., Pairwise Ranking Component Analysis, *Knowledge and Information Systems* (on-line accepted).
 2. Kinouchi, M., Miura, K., Mizoi, T., Ishida, K., Fujibuchi, W., Sasaki, H., Ohnuma, S., Saito, K., Katayose, Y., Naitoh, T., Motoi, F., Shiiba, K., Egawa, S., Shibata, C., Unno, M., Infiltration of CD40-Positive Tumor-Associated Macrophages Indicates a Favorable Prognosis in Colorectal Cancer Patients, *Hepatogastroenterology*, 60(121)

Kume, K., Shimosegawa, T., MiR-126 Acts as a
Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer Cells via
the Regulation of ADAM9, *Molecular Cancer
Research*, 10(1): 3-10 (2012).

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

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

なし

分担研究報告書

薬物代謝酵素遺伝子レポーターを導入したヒト ES 細胞株の樹立

研究分担者

大迫誠一郎

東京大学 疾患生命工学センター 准教授

研究要旨

ダイオキシン類は個体発生過程において作用すると催奇形性等の様々な生体影響を引き起こすが、ヒトと実験動物では感受性域や感受性組織が大きく異なる。本研究班のテーマである多能性幹細胞試験バッテリーの一部として、ダイオキシン類のヒトの各組織細胞への曝露影響を可視化できるよう、ダイオキシン標的遺伝子の一つである *Cyp1a1* 遺伝子の活性化をリアルタイムモニタリングできる ES 細胞株の樹立を試みた。

マウス *Cyp1a1* 遺伝子プロモーターで EGFP をドライブさせた Neo 発現カセットをもつコンストラクトをヒト ES 細胞 (KhES1) へリポフェクションにより遺伝子導入し G418 耐性細胞を得た。このヒト ES 細胞は TCDD の用量依存的に EGFP の蛍光強度が増加することが示され、胚様体の状態での TCDD 感受性が高いことがわかり、野生型で観察した結果と類似していた。この細胞はダイオキシン等の環境汚染物質の発達期影響の評価に応用可能と思われる。

A. 研究目的

ヒトが環境汚染化学物質に曝された場合の健康影響について、ダイオキシン類は最も研究の行われた物質の一つである。急性毒性として皮膚の塩素ザソウや肝機能異常を引き起こすことが、日本のカネミ油症事件、台湾油症事件、イタリアのセベソ事故、あるいはウクライナのユーシェンコ氏毒殺未遂事件で知られている。一方、実験動物ではモルモット・ラット・マウスにおいて肝障害に続く消耗性症候群、さらにそれに引き続く死亡を伴うことが古くから知られている。これらの毒性影響は数マイクログラム/キログラム体重という低レベルの曝露でも引き起こされる。

特に胎児期曝露の場合では数ナノグラムの単回摂取でも生まれてくる個体の不可逆的変化、すなわち生殖次世代影響として種々の影響を示すことが知られている。これら生殖発生学的影響（催奇形

性・胎仔死亡・生殖機能異常・行動異常等）は、胎児の高感受性と言う点からリスク管理上注視すべき指標である。しかし各指標とも発生学的な病態発生の分子機構は未知な部分が多い。

上記の現象はダイオキシン受容体であるアリールハイドロカーボン受容体 (AHR) のノックアウトマウスで見られないことから、AHR がプライマリーの標的分子であることは間違いない。AHR は多環芳香族炭化水素やダイオキシンなどの体外異物に反応する核内受容体であり、生体防御に必須で、正常な個体発生過程において不可欠な遺伝子である。

ヒト集団においても胎児新生児影響は動物実験のように起きうると考えられるが、上述した成熟個体への曝露の例でも明らかのように、ヒトと齧歯類では感受性域や感受性組織が大きく異なる。ヒトの各組織細胞への発達影響を明らかにすることが求められるが、*in vivo* 実験は不可能であり、ヒト未

分化細胞を用いた代替法が求められる。

本研究では、ヒト ES 細胞を用いた神経系細胞発生過程においてダイオキシンによる AHR の活性化の影響を調べるため、新たに AHR の標的遺伝子の一つである CYP1A1 遺伝子プロモーターに蛍光タンパクレポーターを接続した遺伝子をヒト ES 細胞に安定導入した。本研究班のテーマである多能性幹細胞試験バッテリーの一部として、より簡便なアッセイ系が可能な細胞株の樹立を行った。

（倫理面への配慮）

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 月機関承認を得、それにより、2010 年 1 月文部科学省より使用許可を得た。

B. 研究方法

ヒト ES 細胞の維持培養ならびに分化培養：

ヒト ES 細胞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-1 株 (XX genotype) を使用した。ES 細胞の維持分化にはマウス胚性線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として継代を行った。MEF を酵素的に浮遊させ、ES 細胞集塊のみをディッシュ上に残した上で、Rock 阻害剤 Y-27632 を添加した EB 培地に懸濁し、 9.0×10^3 個 /well の hES 細胞を SUMILON PrimeSurface 96U (住友ベークライト社製) に播種し、胚様体 (EB) の形成を行った。形成された EB を Day10 でオルニチンラミニン (O/L) コートプレートに播種し、各種の胚様体への分化培養を行った。

TCDD 曝露：

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) を上記の ES 細胞維持培養時、あるいは EB 形成培養時に 0.1 nM~30 nM の濃度で、24 時間~4 日間、培養液中に添加することで曝露させた。

レポーター遺伝子の導入：

C57BL/6J マウスのゲノム DNA より *Cyp1a1* 遺伝子プロモーター (転写開始点上流-1534 からエクソン 1 の+23) を PCR で増幅し、pGL3-basic ベクター

(Promega 社) の MluI-XhoI サイトにクローニングした。このプラスミドから SacI-XhoI フラグメント (1465 bp) を制限酵素で切り出し、Neo 発現カセットを持つ、pEGFP-1 ベクター (CLONTECH 社) の SacI-SalI サイトにクローニングした (図 1)。このコンストラクトを XhoI でリニアライズし、PCR-purification kit (QIAGEN) で精製した DNA を、ヒト ES 細胞 (KhES1) へ Lipofectamine-LTX (Invitrogen 社) でリポフェクションにより遺伝子導入した。実際には分離回収した KhES1 の細胞浮遊液へのトランスフェクションにより遺伝子導入した。この細胞を SNL 細胞 (G418 耐性フィーダー細胞) 上に再び播種し、G418 によるセクションを行った。ヒト ES 細胞へのリポフェクションによる遺伝子導入は効率が悪いとされているが、複数のリポフェクション試薬による数回にわたる条件検討で、この遺伝子導入法により耐性細胞樹立が可能であることが明らかとなった。

G418 耐性細胞に目的のレポーター遺伝子が安定導入されているか、ゲノム DNA を抽出して検討した (図 2A)。

定量 RT-PCR：

各ステージ曝露 24 時間目の RNA を回収し、CYP1A1 ならびに NANOG の mRNA 量を Light Cycler 480 (ロッシュ社) で測定した。

C. 研究結果

安定導入細胞の TCDD 反応性：

以下に作出された KhES1-CYPEGFP 細胞の性状を示す。このヒト ES 細胞は、クローン化する以前に一部のコロニーで ES 維持培養条件下でも EGFP の弱い蛍光を発していた (図 2B)。維持培養条件下で TCDD を 0.1、1、10 nM で曝露したところ、10 nM TCDD で EGFP の蛍光強度が増加することが示された (図 3A)。Image-J による蛍光強度の定量解析でも約 2 倍に増加することがわかった (図 3B)。またトータル RNA の解析でも 10 nM TCDD の曝露で内因性のヒト CYP1A1 mRNA レベルが上昇してい

た。しかし、このクルードな細胞集団を数回にわたり継代していくと、EGFP の基底レベルでの蛍光高度が落ちるとともに、TCDD による EGFP の増加も無くなることがわかった（データは示さない）。

分化培養条件下での TCDD 反応性：

このクルードな KhES1-CYPEGFP 細胞を用い EB 形成を SUMILON PrimeSurfase 96U プレート上で実施した。EB 形成開始 8 日目に、TCDD を 0.3、1、3、10、30 nM で曝露し、経時的に蛍光観察を行った。その結果、3 nM 以上の TCDD で EB の表面に EGFP 強度の強い細胞が観察されることがわかった（図 4）。この強陽性細胞は時間の経過とともに増えていくこともわかった。

神経細胞分化培養条件下での EGFP 発現：

上記の EB のうち非曝露の EB を基底膜コートの培養ディッシュ上に播種し、神経誘導培地（NIM）により神経系細胞への分化誘導を行った。ほとんどの EB はこれまでの我々の野生型の KhES1 を用いた場合と同様にトロフォブラストアウトブレイク（栄養膜細胞の伸展増殖）をプレート上で引き起こした。培養 5 日目でニューラルロゼッタが出現したが、観察したすべてのニューラルロゼッタで EGFP 陽性のものは観察されなかった。また、神経突起をもって分化した多数の細胞も出現したが、これらの分化細胞で EGFP 陽性のものは全く観察されなかった。しかし、扁平な突起を持たない細胞群で EGFP 陽性のものが多数観察された（データは示さない）。

D. 考察

我々は本研究班第一期の最終年度において、野生型の KhES1 を用い、ES 細胞維持培養時、EB 形成時ならびに神経細胞分化誘導時の各ステージの TCDD 曝露による反応性を、AHR 活性化のバイオマーカーである CYP1A1 の誘導能で検索した。その結果、EB 形成期では TCDD に対する反応性が他のステージより高いことを見出し、神経細胞分化誘導条件下（Day35 曝露）のでは誘導が観察されない

ことを報告した。

今回作成した KhES1-CYPEGFP 細胞の EGFP によるリアルタイム解析では、EB 形成期の表面の細胞で TCDD 反応性が上がることが示された。また神経細胞に分化した後では EGFP の発現が消えることがわかった。分化神経細胞の TCDD 曝露による EGFP 誘導性については現在観察中であるが、少なくともこれら観察結果は、既報の野生型の KhES1 と同じく、今回安定導入したトランスジーン（マウス *Cyp1a1*-EGFP）も分化の進行と方向性に伴ってその誘導能が変容することを示している。

E. 結論

ヒト ES 細胞（KhES1）にダイオキシン応答性の遺伝子 *Cyp1a1* によりドライブされる EGFP レポーターをもった安定導入 ES 細胞を作成することに成功した。この細胞は TCDD などの環境汚染物質のヒト胎児細胞の発生影響をリアルタイムでモニタリングできる可能性をもつ。このような化学物質の曝露を検出できるヒト多能性幹細胞の樹立は世界的にも初めてである。今後、内胚葉系あるいは外胚葉系に分化培養した際の挙動を詳細に検討する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugai E, Yoshioka W, Takeyama M, Ohsako S, and Tohyama C. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *J Applied Toxicol*, in press, (2013).
2. Kurita H, Ohsako S, Hashimoto S, Yoshinaga J, and Tohyama C. Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene. *J Nutr Biochem* 24,

- 256-266, (2013).
3. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, and Sone H. Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: A combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology* 33, 1375-1380, (2012).
 4. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, and Sone H. Identification of stage-specific gene expression signatures in response to retinoic acid during the neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Front Genet.* 3:141. (2012).
 5. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin X-Y, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, and Ohsako S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett* 212, 1-10, (2012).
 6. Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, Ohsako S, Hara S, Uematsu S, Akira S, and Tohyama C. Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Sci* 127, 547-554, (2012).
 7. Nagano R, Akanuma H, Qin X-Y, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and Sone H. Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: A novel approach to developmental neurotoxicity testing. *Int J Mol Sci* 13, 187-207, (2012).
2. 学会発表
1. Keiko Aida-Yasuoka, Wataru Yoshioka, Tatsuya Kawaguchi, Seiichiroh Ohsako, Chiharu Tohyama, Resistance to dioxin-induced hydronephrosis in a mouse strain having unresponsive microsomal prostaglandin E synthase-1. SOT2013
 2. 相田圭子、吉岡亘、川口達也、大迫誠一郎、遠山千春. ダイオキシン経母乳曝露による新生仔水腎症発症の原因遺伝子での microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (mPGES-1)の誘導性の役割—マウス系統差実験モデルによる検討. 環境ホルモン学会、東京（2012）
 3. Seiichiroh Ohsako, Junko Yamane, Chiharu Tohyama Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the neuronal differentiation system using human embryonic stem cells. Dioxin2012, Carinz
 4. 大迫誠一郎, 山根順子, 今西哲, 遠山千春. ヒトES細胞を用いた神経系誘導培養系におけるAhrアゴニストの影響. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜（2012）6月12日
 5. Seiichiroh Ohsako, Junko Yamane, Satoshi Imanishi, Chiharu Tohyama Effects of Ahr agonist on neuronal cell differentiation from human ES cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2012, Yokohama, Japan
- 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

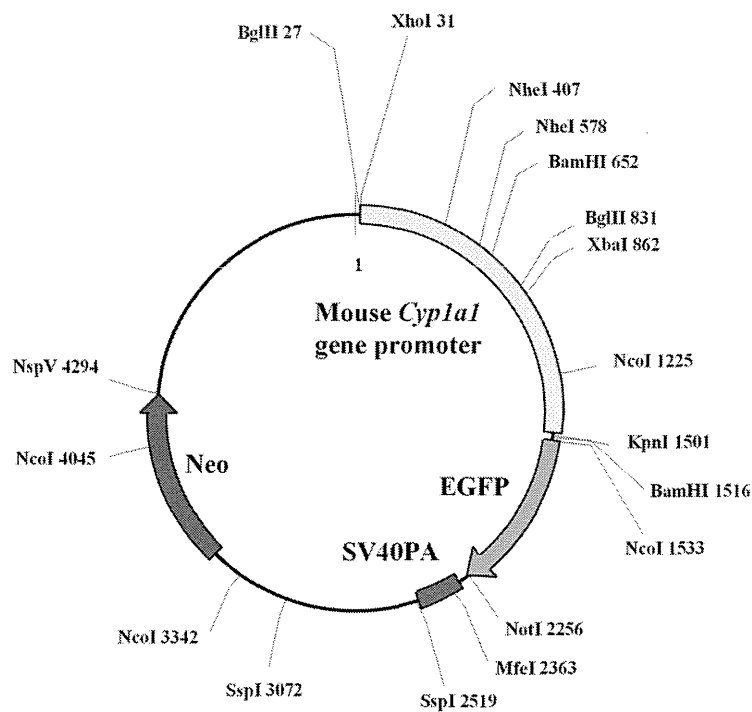


図 1. 導入遺伝子。

C57BL/6J マウスのゲノム DNA より *Cyp1a1* 遺伝子プロモーター（転写開始点上流-1534 からエクソン 1 の+23）を PCR で増幅し、pGL3-basic ベクター（Promega 社）の MluI-XhoI サイトにクローニングした。このプラスミドから SacI-XhoI フラグメント（1465 bp）を制限酵素で切り出し、Neo 発現カセットを持つ、pEGFP-1 ベクター（CLONTECH 社）の SacI-SalI サイトにクローニングした。

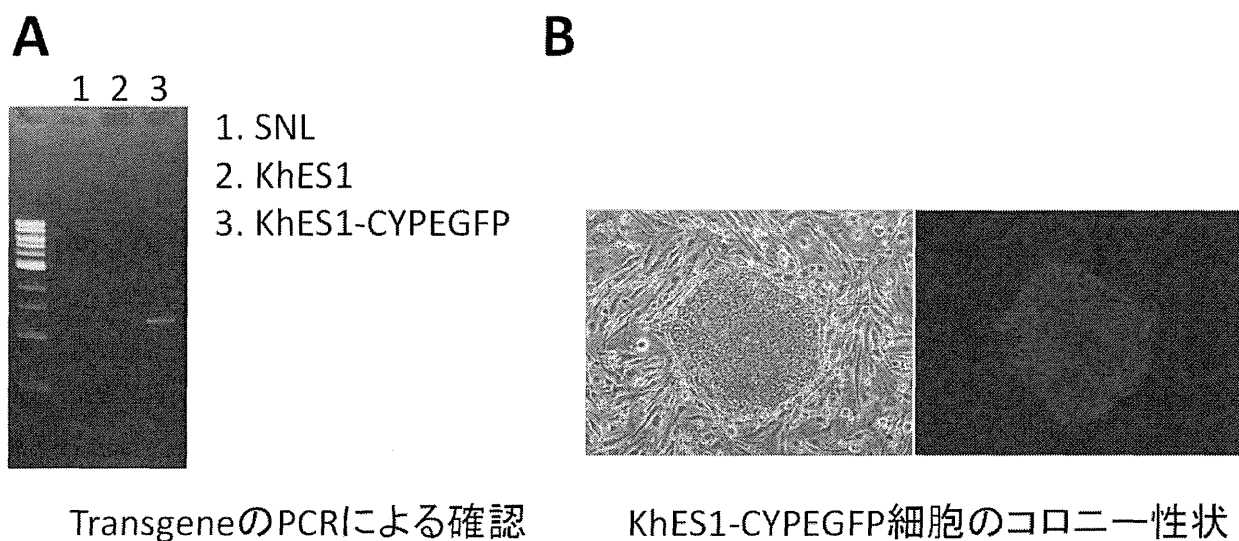


図2. 安定導入 ES 細胞 (KhES1-CYEGFP) の性状。

図1のプラスミドをリニアライズし、PCR-purification kit (QIAGEN) で精製した DNA を、ヒト ES 細胞 (KhES1) へ Lipofectamine-LTX (Invitrogen 社) でリポフェクションにより遺伝子導入、G418 によるセレクションを行った。(A) G418 耐性細胞に目的のレポーター遺伝子が安定導入されているか、ゲノム DNA を抽出して導入遺伝子プライマー (Forward primer, Cyp1a1; reverse primer, EGFP) で検討した。(B) このヒト ES 細胞は、クローン化する以前に一部のコロニーで ES 維持培養条件下でも EGFP の弱い蛍光を発していた。