201329008A

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25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　　大迫誠一郎

平成26（2014）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25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　　大迫誠一郎

平成26（2014）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
・・・・・・・・・・8
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
・・・・・・・・・・15
曽根秀子　　国立環境研究所　室長

3.　ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における測定の標準化に関する研究
・・・・・・・・・・23
藤渕　航　　京都大学　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、創薬や毒性試験へは早期に応用できると考えられている。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あり、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。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ヒト ES 細胞株を樹立した。この細胞コロニーは TCDD の用量依存的に EGFP の蛍光強度が増加すること、胚様体の状態での TCDD 感受性が高く、野生型で観察した結果と類似していた。また、肝細胞分化培養系に持ち込んだ際の TCDD による蛍光強度増加も著しいことがわかった。

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

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を構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質であるMAP2の転写開始点より1kb上流領域もしくはドーパミン神経特異的マーカーであるTH遺伝子のエクソン1直後領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター発現ベクターを作成した。ヒトH9株ES細胞由来の神経前駆細胞（hPNC）を用いて、MAP2に関しては通常の遺伝子導入を、TH遺伝子については、Transcription activator-like effector nuclease（TALEN）ゲノム編集手法により遺伝子導入を実施した。その結果、神経細胞分化40日後において、MAP2-リポーター遺伝子hMAP2-metluc-Neo-copGFP及びTH-pEGFPを導入した場合に、PCRによるゲノムの導入が確認できた。この結果より、神経前駆細胞を用いた神経特異的分子のモニタリングの道筋ができた。

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測定の標準化に関する研究

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を実現化する上で、重要となるヒト細胞の標準化及びデータの正規化について研究を行った。その結果、1）マルチプレックスシングルセル解析に基づくES/iPS細胞及び分化細胞の標準化に重要な知見として、平均値解析だけではわからない細胞株間の遺伝子発現ゆらぎの違いが存在すること。また、データの正規化として、2）経験的ベイズ法を用いた線形モデルを用いてRT-PCRのバッチに依存するノイズを除去し、データの標準化を格段に向上させる手法を開発し、これを用いて高性能な毒性予測に至る可能性があることが示唆された。

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

○曽根 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

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測定の標準化に関する研究

○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

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., Toxcol 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., Toxcol 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。

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

ヒト ES 細胞は京大再生医科学研究所幹細胞センターから提供された 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、9.0×103 個/well の hES 細胞を SUMILON PrimeSurfase 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。

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

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。

実験 **I.** pGL3-hMAP2-metluc-Neo-copGFP の導入:エレクトロポレーションによるプラスミドの細胞への導入の確認のため、培養 29-34 日目の細胞を回収した。

実験 **II.** Th–TALEN の作成とドナーベクター5’-Metluc-copGFP-neo-3’を活用した hNPC への導入：ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域（hs_TH_T01）を特異的に切断する TALEN ベクターを Sigma 社で作成した。TALEN による切断領域

と相補的配列を両端に持つ組み込む DNA 断片 5'TH-Metluc-copGFP- neo-3'を作成し、ドナーベクターに組み込んだ。作成したプラスミドを hNPC 細胞にトランスフェクションし、導入後 27 日まで分化培養した。プラスミドの細胞への導入確認のため、培養 20 日目の細胞を回収した。

実験 III. ドナーベクター5'arm-pEGFP-3'arm の導入：ドナーベクターを変えて実験 II.と同様のゲノム編集実験を行った。TALEN による hs_TH_T01 領域の切断の際に、切断領域と相補的配列を両端に持つ組み込む DNA 断片 5'arm-pEGFP-3'arm を作成し、ドナーベクターに組み込んだ。プラスミドの細胞への導入の確認のための細胞回収は、培養終了時に行った。

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測定の標準化に関する研究

ES/iPS 細胞及び分化細胞などヒト細胞は個性があることが知られており、実験上のゆらぎを創出してしまうことが問題視されている。細胞を用いた毒性試験にはこれらのゆらぎができるだけ少ない「標準細胞」を用いた実験系の開発が急務である。我々は、昨年度より、バーコード識別に基づくマルチプレックスシングルセルトランスクリプトーム手法を確立し、ヒト細胞が持つゆらぎの実態解明と問題解決に取り組んだ。また、RT-PCR やマイクロアレイ等遺伝子発現データの正規化は既知の問題であり、特にバッチ効果によるノイズが出易い傾向がある。これを除去するにはデータ値をテクニカルノイズとバイオロジカルな実測値からなる方程式でモデル化することでテクニカルノイズ部分だけを引き去ることを可能とし、データの純度を高める手法を開発した。

（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。京都大学医学研究科では「医の倫理委員会」を通してその倫理面の審査を行っている。共同研究者から得られる遺伝子発現データの情報解析については、倫理委員会で承認の必要がないと判断され、倫理面での問題はない。

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。内胚葉系への分化誘導培地（HGF を含む）により分化誘導を行った。この細胞集団を再播種して、TCDD を 10 nM で曝露し、経時的に蛍光観察を行った。その結果、EGFP 強度の強い細胞が観察されることがわかった。定量的解析でも有意な蛍光強度の増加が確認できた。

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

実験 I. pGL3-hMAP2-metluc-Neo-copGFP の導入：43 日の神経分化の様子を MAP2 抗体による蛍光免疫化学染色で観察すると、十分に神経突起が伸長した様子が得られた。しかし、GFP の蛍光は非常に微弱であった。さらに、ゲノム DNA を回収して細胞内のプラスミド導入の確認を行ったところ、目的サイズの箇所に強いバンドを得た。

実験 II. Th–TALEN の作成とドナーベクター5' arm -Metluc-copGFP-neo-3' arm を活用した hNPC への導入：導入後 27 日まで分化培養したが、PCR による目的遺伝子の明瞭なバンドが得られなかった。ドナーベクタープラスミドは、十分に細胞内に導入されたものの、ゲノム編集は十分でない可能性が示唆された。

実験 III. ドナーベクター5'arm-pEGFP-3'arm の導入：TALEN による hs_TH_T01 領域の切断の際に

組み込むドナーベクターとして、TH-pEGFP プラスミドを作成した。　導入 3、7、8 日後には、GFP の蛍光が観察されたが、37 及び 50 日では観察できなかった。しかし、TH 及び MAP2 抗体で免疫染色すると両抗体で染色される神経細胞を確認した。さらに、プラスミド導入後 29 ないし 34 日目の細胞を回収し、PCR によりゲノム DNA の確認を行ったところ、5'arm 外側の配列で作成した primer と内側 primer では目的サイズの位置にバンドはみられなかったが、5'arm 内側の primer では目的サイズの位置に明瞭なバンドを得た。この結果は、実験 II の場合と同様にドナーベクタープラスミドは、十分に細胞内に導入されたものの、ゲノム編集は十分でない可能性が示唆された。

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測定の標準化に関する研究

昨年度に開発したマルチプレックスシングルセルトランスクリプトーム法を利用して ES 細胞株(WA09)、iPS 細胞株(201B-7, 305A-1, 409B-2)、MSC、及び一次培養細胞での分化細胞（Adipocyte, Chondrocyte, Fibroblast HDF1388）を解析した。元データによる測定値への影響を考慮し、細胞株は全て Caucasian かつ女性株を選択した。主成分分析（PCA）の結果から細胞集団の中にはこれまでの平均値的な解析だけではわからなかった、発現分布が互いに重なっている細胞種があり、正しい毒性反応を見るには、適正な細胞選別方法の開発が必要であることがわかった。

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

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、さらに内胚葉系分化培養では、その反応性が回復することがわかった。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

MAP2-リポーター遺伝子 hMAP2-metluc-Neo-copGFP に関しては、これまでに、Bhat KM ら（2006）による報告だけで、未だ安定株は採れていない。我々は、神経細胞分化 30 日付近での細胞において、hMAP2 プラスミドが細胞に導入されたことを確認したが、ハイスループットにイメージングできるような強い蛍光シグナルは確認できなかった。また、このプラスミドは、Metluc が導入されているので、培養上清を取って発光を測定したが、強いシグナルは得られなかった。 我々は、とトランスフェクション後 7 日までは細胞の蛍光シグナルを確認しているので、分化が進むと外来 MAP2 および TH プロモーター領域のエピジェネティック変化が起きるものと考察される。

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測定の標準化に関する研究

シングルセル解析によって毒性測定を行う場合に iPS 細胞間で差が出る可能性があることが示唆された。これは、最近の論文（Shimamoto et al. PLOS ONE, 2014）などでも、樹立した iPS 細胞間ではメチル化などエピゲノム状態が高品質な iPS 細胞の作成に重要と示唆されており、今後はメチル化状態による iPS 細胞の標準化が 1 つの重要な因子となることが示された。

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。

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を構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質である MAP2 もしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子のエクソン 1 直後領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター発現ベクターを作成し、ヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞（hPNC）を用いて、MAP2 に関しては、通常の遺伝子導入を、TH 遺伝子については、ゲノム編集手法により遺伝子導入を実施した。神経分化後の細胞において、いずれのプラスミドも導入されていることをゲノムの PCR で確認できた。しかしながら、蛍光シグナルは弱く、今後の改善が必要と考えられた。

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測定の標準化に関する研究

前年度、確立したハイスループットのシングルセルトランスクリプトーム解析法を利用して、ES/iPS 細胞及び分化細胞の標準化に関する知見が得られた。また、得られたデータについてノイズを考慮してモデル化を行うことで高品質な結果を得られることが示唆された。次年度は細胞の標準化に重要と考えられるメチル化状態の解析が必要であることが示唆された。

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. Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, and Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol,* 85(2), 279-289, (2014).
2. Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemical*, 116(3), 474-480, (2014).
3. Aburatani S, Fujibuchi W, Yamane J, Nagano R, Sone H, Imanishi S, Ohsako S. Inference of Gene Regulatory Networks to Detect Toxicity-Specific Effects in Human Embryonic Stem Cells. *Intl J Adv Life Sci*, v5 n 1&2 (2013).
4. 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*, 34(3), 296-306, (2014).
5. 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).

曽根秀子 ： 研究分担者

1. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Nansai H, Fukuda T, Hayashi Y, Nasu T, Sone H. Peroxisome proliferator-activated receptor <alpha> mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. Toxicology Letters, in press.
2. Win-Shwe TT, Sone H, Kurokawa Y, Zeng Q, Zeng Y, Nitta H, Hirano S.　Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. Toxicology Letters, in press.
3. Win-Shwe TT, Fujitani Y, Sone H, Furuyama A, Nitta H, Hirano S.　Effects of acute single

intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice. J Toxicol Sci. Feb;38(1):71-82, 2013.

4. Imanishi S, Okura M, Zaha H, Yamamoto T, Akanuma H, Nagano R, Shiraishi H, Fujimaki H, Sone H.　Prenatal exposure to permethrin influences vascular development of fetal brain and adult behavior in mice offspring. Environ Toxicol. 28(11):617-29, 2013.
5. Fukuda T, Katayama M, Kinoshita K, Kasugai T, Okamoto H, Kobayashi K, Kurita M, Soichi M, Donai K, Uchida T, Onuma M, Sone H, Isogai E, Inoue-Murayama M. Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (Lepidochelys olivacea). In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2013
6. Donai K, Kuroda K, Guo Y, So KH, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. Anal Biochem. 2013 Dec 1;443(1):104-12.

藤淵　航　：　研究分担者

1. 山根順子、丸山徹、藤渕航、単細胞技術に基づく iPS 細胞の標準化、生体の科学、65(2): 154-158 (2014).
2. Nakano, S., Ikebe, E., Tsukamoto, Y., Wang, Y., Matsumoto, T., Mitsui, T., Yahiro, T., Inoue, K., Kawazato, H., Yasuda, A., Ito, K., Yokoyama, S., Takahashi, N., Hori, M., Shimada, T., Moriyama, M., Kubota, T., Ono, K., Fujibuchi, W., Jeang, K.T., Iha, H., Nishizono, A., Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice, PLoS One, 8(9): e73205 (2013).
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, Systems Biomedicine, 1(3): 1-7 (2013).
4. Aburatani, S., Fujibuchi, W., Yamane, J., Imanishi, S., Nagano, R., Sone, H., Ohsako, S., Inference of Gene Regulatory Networks to Detect Toxicity-Specific Effects in Human Embryonic Stem Cells, International Journal On Advances in Life Sciences, 5(1&2): 103-114 (2013).
5. 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): 83-88 (2013).
6. 藤渕航、iPS 細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用、生命のビッグデータ利用の最前線、176-184 (2014)。(書籍)

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

曽根秀子、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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
研究分担報告書

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ヒト 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）へ遺伝子導入した。この細胞コロニーは 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た。また、胚様体の状態での TCDD 感受性が高く、野生型で観察した結果と類似していた。また、肝細胞分化培養系に持ち込んだ際の TCDD による蛍光強度増加も著しいことがわかった。

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

ダイオキシン類はヒトが曝露された場合の健康影響について最も研究さ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等で知られている。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。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なように、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ため、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、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 PrimeSurfase 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。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によるセレクションを行った。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。

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。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。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。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。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（図 2)。

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。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)。

内胚葉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、その後、内胚葉系への分化誘導培地（HGF を含む）により分化誘導を行った。この細胞集団を再播種して、TCDD を 10 nM で曝露し、経時的に蛍光観察を行った。その結果、EGFP 強度の強い細胞が観察されることがわかった（図 3)。定量的解析でも有意な蛍光強度の増加が確認できた（図 3)。

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、さらに内胚葉系分化培養では、その反応性が回復することがわかった。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。

F．健康危険情報

なし。

G．研究発表

1．論文発表

1. Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, and Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol,* 85(2), 279-289, (2014).
2. Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces

spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemical*, 116(3), 474-480, (2014).

3. Aburatani S, Fujibuchi W, Yamane J, Nagano R, Sone H, Imanishi S, Ohsako S. Inference of Gene Regulatory Networks to Detect Toxicity-Specific Effects in Human Embryonic Stem Cells. *Intl J Adv Life Sci*, v5 n 1&2 (2013).
4. 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*, 34(3), 296-306, (2014).
5. 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).

２．学会発表

1. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, and Wataru Fujibuchi. Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences iPS Cells in Drug Discovery& Development January 16-18, 2014. CiRA International Symposium 2014.
2. Seiichiroh Ohsako. Generation of the human ES cell line driven by dioxin responsive reporter gene. The 11st Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Bostin, (2013)
3. Keiko Aida-Yasuoka, Wataru Yoshioka, Tatsuya Kawaguchi, Seiichiroh Ohsako, Chiharu Tohyama. Microsomal prostaglandin E synthase-1 plays an important role in strain-difference in the onset of TCDD-induced hydronephrosis in mice. ICT2013, Korea (2013).
4. 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 microsomal prostaglandin E2 synthase-1 の誘導におけるマウス系統差について日本毒性学会（2013）
5. 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 (2013).

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

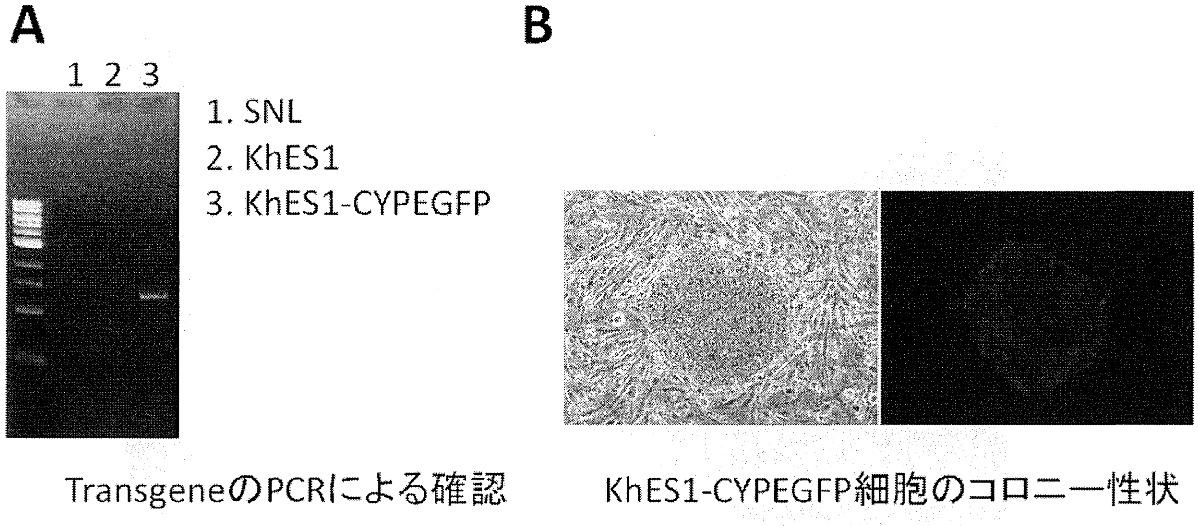

図 1.　安定導入 ES 細胞（KhES1-CYPEGFP）の性状。
図 1 のプラスミドをリニアライズし、PCR-purification kit（QIAGEN）で精製した DNA を、ヒト ES 細胞（KhES1）へ Lipofectamine-LTX（Invitrogen 社）でリポフェクションにより遺伝子導入、G418 によるセレクションを行った。（A）G418 耐性細胞に目的のレポーター遺伝子が安定導入されているか、ゲノム DNA を抽出して導入遺伝子プライマー（Forward primer,Cyp1a1; reverse primer, EGFP）で検討した。（B）このヒト ES 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。

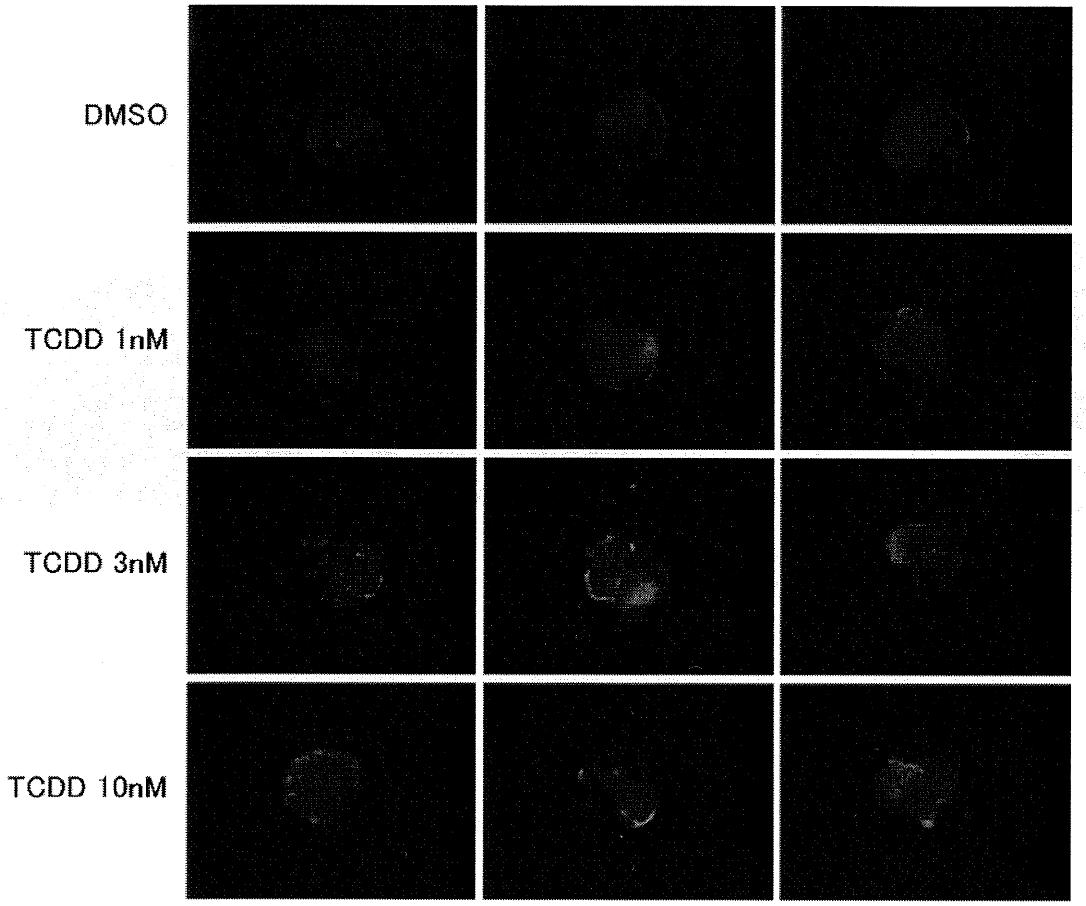

図 2.　安定導入 ES 細胞（KhES1-CYPEGFP）からの EB 形成過程における TCDD に対する反応性。

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ところ、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。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。

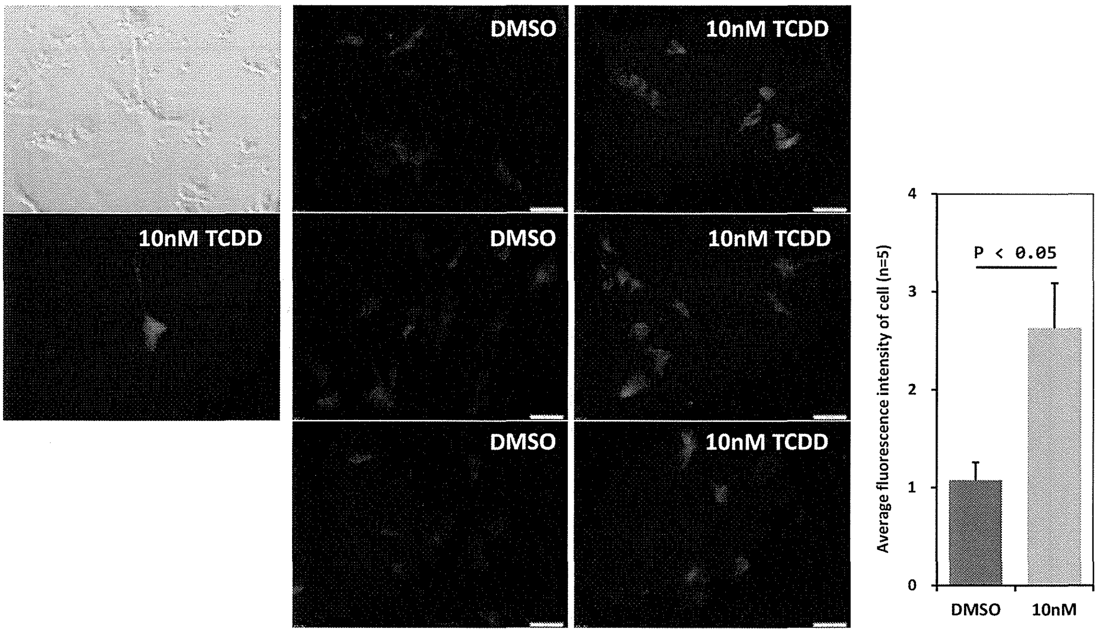

図 3.　分化させた KhES1-CYPEGFP の TCDD に対する反応性。
肝細胞分化条件下で TCDD を 10 nM で曝露したところ、10 nM TCDD で EGFP の蛍光強度が増加することが示された。Image-J による蛍光強度の定量解析したところ、10 nM で約 2 倍に増加することがわかった。

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

研究分担者　曽根秀子　国立環境研究所

研究要旨

昨年度に引き続き、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を構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質である Map2 の転写開始点より 1kb 上流領域もしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子のエクソン 1 直後領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター発現ベクター pGL3-hMAP2-metluc-Neo-copGFP 、pBluescriptIISK(+)TH-metluc-Neo-copGF 及び pBluescriptIISK(+)TH-pEGFP を作成した。ヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞（hPNC）を用いて、MAP2 に関しては、通常の遺伝子導入を、TH 遺伝子については、transcription activator-like effector nuclease（TALEN）ゲノム編集手法により遺伝子導入を実施した。その結果、神経細胞分化 40 日後において、MAP2-リポーター遺伝子 hMAP2-metluc-Neo-copGFP 及び TH-pEGFP を導入した場合に、PCR によるゲノムの導入が確認できた。この結果より、神経前駆細胞を用いた神経特異的分子のモニタリングの道筋ができた。

A. 研究目的

化学物質の安全性・有害性評価における多能性幹細胞の利点は、生体内の発生初期の過程を再現できる点にあるが、化学物質の安全性・有害性評価のためのヒト ES/iPS 細胞を用いた実用性の高いハイスループット評価系の報告はほとんど報告されていない。

本分担研究では、ヒト多能性幹細胞由来の神経前駆細胞を活用して、従来の遺伝子改変技術並びに TALEN を用いたゲノム編集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。期待される効果は、毒性が懸念される化学物質のヒトへの影響を発生細胞レベルでスクリーニングできるため、将来には大量の化学物質の安全基準に関わる試験データをデータベース化出来る点である。公的研究施設に多能性幹細胞試験センターを設け情報を公開していく場合、重要なことは一試験の単価を極力抑えるべきで、今回提案する新規マーカーの選択や形態指標、バイオインフォマティクスによる影響予測の有効性の検討はそのために重要である。また、我々の実施している研究プロトコルは ECVAM や JCVAM テストガイドラインへ提案できるような標準プロトコルの作成も視野にいれる。特にヒト細胞への影響という点で化学物質リスク事業のみならず創薬分野にも貢献できると思われる。

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。

実験 I. pGL3-hMAP2-metluc-Neo-copGFP の導入

昨年作成した Kumar et al (Nucleic Acids Research, 2006)の報告に準じて、hMAP2 ゲノム DNA の-1854 から +369 の領域を組み込んだpGL3-Metluc-copGFP-Neo プラスミドを hNPC 細胞にエレクトロポレーションで導入し、導入後、29～43 日まで分化培養した。プラスミドの細胞への導入の確認のため、培養 29-34 日目の細胞を回収した。ゲノム DNA の抽出は、DNeasy (QIAGEN 69504)で行い、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）には、Ex Taq (TaKaRa RR001）酵素を用いた。エレクトロポレーション