

# 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。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、使用するヒト ES/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「ヒト多能性幹細胞試験バッテリー」構築を目的とした。

### サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

ヒト H9 株（ヒト ES 細胞由来）の神経前駆細胞（hPNC）を用い、三次元培養によるニューロスフィアを形成させ、ハイスループットアッセイに最適化した短期ニューロスフィアアッセイの条件を検討した。影響評価の検討には、Benzo[a]pyrene（BaP）及び 5-Aza-2'-deoxycytidine（5-Azadc）の 2 種類の化学物質を使用、用量反応関係を調べたところ、10 日間で多検体も同時に可能なアッセイ条件を見出し、化学物質の影響を定量的に把握することができることがわかった。

### サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

ヒト ES 細胞に Transcription activator-like effector nuclease（TALEN）を用いたゲノム編集手法により、ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase（TH）遺伝子のエクソン 1 下流に EGFP を挿入した細胞を作出ことを試みた。TH のエクソン 1 直後領域を特異的に切断する TALEN 左右側ベクター（Sigma 社）および切断領域と相補的配列を両端に持つ 5'TH-EGFP-neo-3' を作成した。KhES1 にリポフェクションによる導入後、G418 によるセレクションを行い、10 日目に生存しているコロニーをピックアップしてクローン化しゲノム DNA を抽出した。PCR による TH 遺伝子への編集をチェックしたが、目的のサイズに PCR 産物

が確認できるものの、陰性対象である野生型 KhES1 にも同様なバンドが確認されたことから、ゲノム編集は期待通りに起きていないことがわかった。

### **サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究**

ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験を実現化する上で、将来的に大きな壁となると考えられる種々の解析法に関して検討した。具体的には1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法、及び、2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法について研究を行った。これらの基礎技術は次世代の高性能な大規模ヒト幹細胞毒性試験システムを構築するために大変重要な構成要素であり、特に従来の遺伝子ネットワーク解析で課題となっていた実験データ数を軽減可能であることが示唆された。

## **共同研究者**

### **サブテーマ 1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討**

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

### **サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み**

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フローにおける不足要素に関する研究**

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、ヒト ES/iPS 細胞を用いた分化培養系を応用したソリューションが期待されているがヒト ES/iPS 細胞を用いた EST で実効性の高い評価系の報告は少ないのが現状である。

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., 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) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

ヒト胚性幹細胞（H9 細胞）由来神経前駆細胞株を米 EMD Millipore 社から購入し以下の実験を行った。

#### 1) 神経系細胞分化マーカーの遺伝子導入

ヒト MAP2 遺伝子調節領域として報告されている、ゲノム領域を組み込んだ pGL3-Metluc-copGFP-Neo プラスミドを遺伝子導入

した hMAP2-Metluc-copGFP-hNPC 細胞（平成 24 年度作成）、およびドーパミンニューロ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 直後領域を組み込んだ TH-pEGFP プラスミドを導入した hsTH-pEGFP-hNPC 細胞（平成 25 年度作成）の増殖・分化培養実験を行った。

#### 2) ニューロスフィアアッセイに関する検討

正常 hNPC 細胞を用いて「ニューロスフィアアッセイ」の最適化試験を実施した。丸底 96 ウェルプレート（Nunc-Falcon）の 1 ウェルあたり、3000～6000 個細胞を播種、5～7 日間培養し、平面底の 24 ウェルプレートもしくは 48 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 1 個のスフィアになるように再播種し、神経分化専用培地で 5～7 日間さらに培養した。免役染色で MAP2 をラベルしマルチチャンネル自動画像解析装置（INCell-Analyzer 1000）により、神経突起伸長を定量化した。さらに、スフィア自体の形態計測のため Image J で面積を定量した。また、アッセイの評価のため、Benzo[a]pyrene（BaP）及び 5-Aza-2'-deoxycytidine（5-Azadc）を培地中に添加した。

### サブテーマ 2) TALEN を用いた TH 陽性細胞を検出する EGFP レポーター導入ヒト ES 細胞株樹立の試み

TH のエクソン 1 直後領域を特異的に切断する TALEN 左右側ベクター（PTAL-R および PTAL-L）を準備し、PTAL-R および PTAL-L から mRNA に変換し、ドナー DNA として TH-pEGFP DNA と共にヒト ES 細胞（KhES1）へ同時に遺伝子導入した。リポフェクションにより遺伝子導入、G418 によるセレクトションを行い、10 日目に生存しているコロニーをピックアップしてクローン化した。レポーター遺伝子の導入を確認するため、PCR により検討した。

### サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

#### 1) シングルセルメチローム解析におけるバイサル

## ファイトロス軽減法の検討

近年、特に毒性物質がエピゲノム状態の変化をもたらすことが報告されるようになり、化合物毒性試験技術の高度化にメチロームによる測定も重要視されている。より多種類の ES/iPS 細胞を、同一環境、同一曝露系による一連の毒性試験を実現するには、シングルセルレベルでのメチローム解析が重要である。しかしながら、世界的にも技術基盤はまだ確立されていない。昨年度より、バイサルファイトロスを軽減する手法を設計し、従来、捨てられてしまう核酸配列の再利用に取り組んだ。

## 2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法の開発

RT-PCR やマイクロアレイ等遺伝子発現データを用いた遺伝子ネットワークを推定し、これを用いて毒性予測を行うことは従来に比べて予測の高性能化をもたらすことが我々の研究で確かめられたが、遺伝子ネットワークの推定には大量の実験データを必要とし、毒性試験システムの大規模化に大きな障壁となっていた。このため、各種細胞毎で得られた実験データが希少であっても、全細胞種では相当なデータ数が得られることを利用してコンセンサスネットワークを生成し、そこから逆に解析したい細胞種を除去することで生じる遺伝子ネットワークへの影響を測定する「サブトラクティブネットワーク」の手法を開発した。

## (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) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

#### 1) 神経系細胞分化マーカーの遺伝子導入

hMAP2-Metluc-copGFP-hNPC 細胞の増殖及び分化培養を行ったが、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ことは出来るものの、copGFP 蛍光は非常に微弱でアッセイに十分な蛍光強度は得られなかった。また、hsTH-pEGFP-hNPC 細胞の増殖・分化培養を行い、神経分化の様子を TH 特異抗体による蛍光免疫化学染色で行ったところ、EGFP の蛍光が TH とマージすることが確認できた。しかし、EGFP 蛍光は分化とともに減少し非常に微弱でアッセイに十分な蛍光強度は得られなかった。

#### 2) ニューロスフィアアッセイに関する検討

我々の先行研究において二次元の培養ではあるが、ラミニン 511 (LN511) が従来のポリオルニチン-ラミニン (PL-O-LN111) より神経分化が適当であることを見出し、これを使用してきたが、3次元培養のスフィアアッセイにおいても同様であるかどうかを4種の細胞外マトリックス蛋白質のコートプレートを作成して検討した。その結果、LN511 が含有されているコートプレートでは、十分に神経突起が伸展し、更に、固定→洗浄→免疫染色という多段階の行程を経ても型崩れしなかった。しかし、細胞あたりの神経突起伸長とスフィアコアから外側への遊走はポリオルニチン-ラミニン 111+ラミニン 511 (PL-O-LN111+LN511) が最も大きかった。ニューロスフィアに最適な1ウェルあたりの細胞数では、3000個と6000個で検討したが、6000個のほうが再現性、均一性が高かった。また、スフィア形成と分化期間の長さに関する検討では、スフィア形成期間が長いほど、分化培地に移した後の細胞遊

走能は高いことがわかったが、一方で細胞遊走能が高すぎると、解析のための細胞固定→免疫染色の行程には再現性が悪く、結果的にスフィア形成期間を5日間と、分化期間を5日間ないし6日間とする計10-11日間のアッセイを確立した。さらに、BaP及び5-Azadcのそれぞれ、3用量をスフィア形成2日後に添加し3日間培養し、その後、化学物質のない分化培地で培養し、影響を調べたところ、両物質とも、量依存的にスフィアコアからの神経細胞の遊走を抑制し、コアの増殖も抑制されることが観察された。

### サブテーマ2) TALENを用いたTH陽性細胞を検出するEGFPレポーター導入ヒトES細胞株樹立の試み

トランスフェクション後のG418を用いたセレクションにより最終的に15クローンのG418耐性株が得られた。Nested PCRを実施したが、すべてのクローンにおいて予想されるサイズにアンプリコンは確認できなかった。

### サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

#### 1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法の検討

ES細胞株、iPS細胞株、MSC等を用いたマルチプレックスシングルセルメチローム法のプロトコル設計に取り組んだ。本プロトコルは、未だに関連する決定的な論文がなく独自に開発する必要がある、発表済みの「シングルセルメチローム解析」及びバイサルファイト処理とフラグメント化の順番を入れ替えた「RRBS法」と「PBAT法」を基軸としてプロトコルの設計を行った。また、本手法により、従来のRRBS法でバイサルファイト時に損失のあった核酸配列を回収できる系の確立を試みた。収量獲得を高くするためのビーズ精製法を、バイサルファイト処理後のロス軽減を目指し特殊な酵素を用い検討を重ね、レスキューを行わない場合と比べ回収率の上昇が認められた。

#### 2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法の開発

現在マルチプレックスシングルセルRNA-seqでは一度に8種の細胞からそれぞれ12データずつ、計96データの取得が可能である。従来のベイジアンネットワーク推定では、1種の細胞で12/4=3遺伝子程度でのネットワークしか推定が可能でなかった。今回、全96データから、96/4=24であるため、26の幹細胞維持や分化に必要な遺伝子について「コンセンサスネットワーク」推定を行った。さらに、そこから脂肪細胞12データを削除した場合の「サブトラクティブネットワーク」推定を行った。

## D. 考察

### サブテーマ1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

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遺伝子に緑色蛍光タンパク質EGFP遺伝子を結合したりレポーター遺伝子をhPNCに組み込んだが、両遺伝子ともハイスループットアッセイに耐えうる安定株は樹立できない結果となった。今後ヒト細胞で導入実績のあるDNA配列に切り替える必要があると考えられる。

一方で、遺伝子改変のないhNPCを用いてニューロスフィアアッセイの確立を試みた。ハイスループット化には、再現性と定量性が求められる。そのため、1ウェル1スフィアでアッセイすることを考案した。96ウェルプレートでスフィアを作成し、ウェルの中心にスフィアを置いて、顕微鏡観察を行うためには、96ウェルプレートよりも、48ウェルプレートの方が再現性よく、スフィアをおくことができ、また定量性もあるため、後者で化学物質の影響を評価した。しかし今後、ロボットアッセイ機器の導入が可能になれば、384ウェルレベルまで解析が可能になるものと考えられた。

### サブテーマ2) TALENを用いたTH陽性細胞を検出するEGFPレポーター導入ヒトES細胞株樹立の試み

今回TALENを用いて実施したKhES1細胞へのレポーター遺伝子の編集は確認できなかった。

### サブテーマ3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

シングルセルメチロームについては現時点ではまだマルチプレックスに対応出来る系は確立されておらず、また、ゲノムを対象とするため、バイサルファイト処理を行うことで生じる核酸配列の損失をいかに回復させられるかということが大きな課題となる。今年度行ったマルチプレックスシングルセルメチローム解析のプロトコルは、ある程度再現性良く回収出来る系が確立されることが示唆され、今後更にこの技術を用いて細胞を対象とした重要な知見が得られると期待させる結果が得られた。

毒性試験において、従来、各化合物について遺伝子数の約4倍の実験データが必要であったが、この手法を用いると実験データが化合物の数だけ倍増するという利点がある。例えば、20化合物でそれぞれ40データしかない場合、これまで各化合物で10遺伝子しかネットワーク推定ができなかったが、本手法を用いると200遺伝子のコンセンサスネットワークを推定でき、1化合物を除去した場合190遺伝子のネットワークとなる。おそらく100遺伝子もあれば詳細な推定が可能であると考えられるため、半分の20データでも可能であり、マイクロアレイに換算すると、20化合物×20データ=400枚程度で十分テスト予測系の構築が可能であると示唆された。

## E. 結論

### サブテーマ1) ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイの最適化に関する検討

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性幹細胞由来神経分化細胞を構築するために、二

種の神経細胞特異的遺伝子プロモーターを用いたが、分化後に十分な強さの蛍光を持つ細胞は樹立できなかった。今後、更なる導入技術の改善やマーカー遺伝子の変更が必要と考えられた。また、非遺伝子改変hNPCを用いた短期のニューロスフィアアッセイを確立し、化学物質曝露による評価を行い、アッセイの有用性を提示した。

### サブテーマ2) TALENを用いたTH陽性細胞を検出するEGFPレポーター導入ヒトES細胞株樹立の試み

TALENを用いたヒトES細胞への遺伝子編集は前年のヒト神経幹細胞を用いたい場合の結果と同じであり、今回の戦略では極めて困難であることがわかった。

### 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

昨年度の報告書で重要と判明したシングルセルメチローム解析法のプロトコルの開発で、最も核心となる核酸配列の回収を可能とした。また、希少データでもES/iPS細胞を一度に遺伝子ネットワーク推定するサブトラクティブネットワーク手法の有効性が示唆された。

## 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. Aida-Yasuoka K, Yoshioka W, Kawaguchi T, Ohsako S, Tohyama C. A mouse strain less responsive to dioxin-induced prostaglandin E2 synthesis is resistant to the onset of neonatal hydronephrosis. *Toxicol Sci*, 141(2), 465-474, (2014).
2. 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).

3. 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).
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).

#### 曾根秀子：研究分担者

1. Goodson III WH et al (**Sone H**, 54 of 139). Assessing the Carcinogenic Potential of Low Dose Exposures to Chemical Mixtures in the Environment: The Challenge. *Carcinogenesis*, 2015, in press.
2. Win-Shwe TT, **Sone H**, Kurokawa Y, Zeng Y, Zeng Q, Nitta H, Hirano S. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicol Lett.*, 228(3):207-215, 2014.
3. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, **Sone H**. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicol Lett.*, 228(3):235-240, 2014.
4. Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, **Sone H**, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. *Cytotechnology*. 67(2):191-197, 2015.

#### 藤淵 航：研究分担者

1. 山根順子、丸山徹、**藤淵航**、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. Wong PS, Tanaka M, Sunaga Y, Tanaka M, Taniguchi T, Yoshino T, Tanaka T, **Fujibuchi W**, Aburatani S. Tracking difference in gene expression in a time-course experiment using gene set enrichment analysis, *PLoS One*, 9(9): e107629 (2014).
3. Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, Miyagawa I, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka R, Yamamoto N, Nakae H, Kawase M, Gemma N, Sekiguchi Y, **Fujibuchi W**, Matoba R. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms, *Analytical Biochemistry*, 472: 75-83 (2015).
4. 加藤有己、桜井都衣、**藤淵航**。「ヒト細胞からのビッグデータの情報管理と情報解析技術」ビッグデータの収集、調査、分析と活用事例 pp.249-254 (2014)。(書籍)
5. **藤淵航**。「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  
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

