

201428002B

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～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 27 (2015) 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
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

・・・・・・・・・・1

II 分担研究報告書

1. ヒト ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立に関する研究

大迫 誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授

・・・・・・・・・・13

2. ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究

曾根 秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長

・・・・・・・・・・22

3. ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験構築のための情報解析パイプラインに関する研究

藤渕 航 京都大学 iPS 細胞研究所 教授

・・・・・・・・・・32

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。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の開発のために、神経系細胞の分化培養に加えて肝細胞分化培養も導入し、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、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。

作出された加工 ES 細胞株は限られたものとなったが、ハイスループットアッセイに耐えうるいくつかの細胞を樹立することができた。また、将来的にインフォマティクスに使用するための数理工学的検討を多数実施して発達期影響予測法の確立に向けた基盤を確立した。

サブテーマ 1) ヒト ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立に関する研究: 多能性幹細胞試験バッテリーの構築のために、特定の分化マーカー遺伝子によってドライブされる蛍光蛋白マーカー（主に EGFP）を導入して細胞を加工することを目的とし、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、および Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いたゲノム編集を試みた。ダイオキシン等により誘導のかかる代表的薬物代謝酵素である *Cyp1a1* 遺伝子プロモーターで EGFP をドライブさせたコンストラクトをヒト ES 細胞 (KhES1) へ遺伝子導入した。樹立されたこの細胞 (KhES1CYPEGFP) のは胚様体の状態で TCDD 曝露により EGFP 強度が増し、導入遺伝子も野生型で観察した内因性 CYP1A1 と類似の分化に連動した挙動を取ることが示された。さらに、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。また、神経系細胞のうちドーパミンニューロンの発生率とその形態をライブイメージング出来るよう遺伝子を加工したヒト ES 細胞を作成することを目的に、TALEN を用いたゲノム編集で、Tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子への EGFP 挿入を

試みた。TH 遺伝子エクソン 1 直後領域を特異的に切断する TALEN 左右ベクターならびに TH-EGFP-neo を KhES1 にリポフェクションによる導入後、セレクション後に生存した複数コロニーを調べたが、結果として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 2) ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究: ヒト多能性幹細胞バッテリー構築に向けて、主にヒト由来神経前駆細胞株 (hNPC) を用いた実験を行った。まず、ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイを確立するため、hNPC 三次元培養後形成されるニューロスフィア培養条件の最適化を行い、10 日間で終了する多検体同時解析可能なアッセイ条件を確立した。化学物質曝露影響評価として Benzo[a]pyrene (BaP) と 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) を使用したところ、十分な定量的解析ができることが示された。また、ハイスループットアッセイ最適化に向け、hNPC に神経系細胞分化マーカーの導入を試みた。分化後の神経細胞をライブイメージング出来るよう Map2 あるいは TH 遺伝子で蛍光タンパク質等をドライブした種々のコンストラクトを hNPC に遺伝子導入した。その結果、神経細胞分化 40 日後で MAP2 リポーター遺伝子 hMAP2-metluc-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、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。また、TH 遺伝子について TALEN によるゲノム編集を hNPC で実施したが、期待される遺伝子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構築のための情報解析パイプラインに関する研究: ヒト多能性幹細胞バッテリーを実現化する上で、重要となるデータの情報解析パイプラインの構築を行った。1) 多変量解析によるマーカー遺伝子の抽出、2) qRT-PCR 実験データのバッチノイズ除去、3) レプリカ交換法 10 並列によるベイジアンネットワーク推定、4) サポートベクターマシンによる毒性推定、の一連のパイプラインを用いて予測率 97%以上の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) ヒト ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立

○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向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究

○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 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験構築のための情報解析パイプラインに関する研究

○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., *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。

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 ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立に関する研究

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 株を使用した。C57BL/6J マウスのゲノム DNA より *Cypl1a1* 遺伝子プロモーターに EGFP を連結したコンストラクトを KhES1 へ Lipofectamine-LTX でリポフェクションにより遺伝子導入した。この細胞を SNL 細胞上に再び播種し、G418 によるセレクション後クローン化してゲノム DNA の PCR で安定化クローンを選別した。クローン化した 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 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プレートに再播種し各種の分化培養を行った。各ステージの mRNA 定量には Light Cycler 480 を用いた。

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 (hs_TH_T01) を特異的に切断する TALEN 右側ベクター PTAL-R (pTAL-CMVn-021157) と左側ベクター PTAL-L (pTAL-CMVn-020432)、並びに TALEN による切断領域と相補的配列を両端に持つ TH-EGFP を組み込んだプラスミド DNA を準備した。PTAL-R および PTAL-L は予め mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA Transcription Kit によって mRNA に変換した。KhES1 へリポフェクションにより共導入、セクションを行い、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た。各クローンのゲノム DNA を抽出し、レポーター-EGFP 遺伝子のゲノム編集確認を PCR により実施した。

サブテーマ 2) ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討

ヒト胚性幹細胞 (H9 細胞) 由来神経前駆細胞株 (hNPC) は米 EMD ミリポア社から購入した。hNPC 細胞を常法に従って培養し、ニューロスフィアアッセイに必要な量を増殖培養後、丸底 96 ウェルプレート (Nunc-Falcon) の 1 ウェルあたり 3000 および 6000 個細胞で播種培養し、さらに平面底の 24 ウェルプレートもしくは 48 ウェルプレートに 1 スフィア/ウェルになるように再播種した。神経分化培地で 5~7 日間さらに培養後固定、MAP2 抗体で染色し、INCell-Analyzer 1000 により、神経突起伸長を

定量化した。さらに画像を取得後、Image J でスフィアの面積を定量した。アッセイの評価のため、Benzo[a]pyrene (BaP) 及び 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) を最終濃度 0.1%DMSO に溶解して、細胞培養の培地中に添加した。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒト hNPC の加工

Kumar ら (Nucleic Acids Res, 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 Metluc-copGFP-Neo コンストラクトを 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 日目のゲノム DNA を抽出した。

TALEN によるゲノム編集の試みのために、TH 遺伝子エクソン 1 直後領域 (hs_TH_T01) を特異的に切断する TALEN ベクターを準備した (サブテーマ 1 参照)。ドナー DNA には、5' arm-Metluc-copGFP-neo-3' arm あるいは 5' arm-pEGFP-3' arm を作成した。Trans it Neural (MIR2140) を用いたりポフェクションあるいはエレクトロポレーションによる遺伝子導入で、導入後 27 日まで、あるいは 37 日ないし 50 日まで分化培養した。ゲノム DNA の抽出及び PCR による確認を行った。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験構築のための情報解析パイプラインに関する研究

多種細胞からの大量な毒性試験データが産生された場合に最も必要となるハイスループットの毒性解析パイプラインの構築を目指し、qRT-PCR による ES 細胞測定値の産生から僅か 1 日で予測まで行うシステムの構築を目指した。

1) ES 細胞から多変量解析によるマーカー遺伝子の抽出

毒性化合物に対して十分な生物学的応答を行う遺伝子を抽出するため、ES 細胞において 10 化合物 (valproic acid, cyclophamide, phenytoin, methylmercury, acrylamide, benzo[a]anthracene, 3-methylcholanthrene, benzo[a]pyrene, diethylnitrosamine, diethylstilbestrol) 及び 1 コントロール実験を用いて、Correspondence

Analysis を行った。実際には、R/Bioconductor の MASS ライブラリに含まれている corresp 関数を使用した。これにより、11 の固有値が得られ、それぞれから、以下の 4 つの基準を満たす遺伝子 10 個を選択した。

- i) signal detection P-value < 0.1 for three or more samples
- ii) encoded protein is a transcription factor
- iii) within the top 20 highest (or lowest for negative) weights in each principal component
- iv) abundantly expressed in hESCs, as determined by qRT-PCR analysis.

2) qRT-PCR 実験データのバッチノイズ除去

qRT-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。開発した手法は、R/Bioconductor の limma ライブラリに含まれている経験的ベイズ法に基づく線形回帰法を下記の方程式に基づいて行った。

$$g_i = \sum_j a_{i,j} G_{i,j} + \sum_k b_{i,k} B_{i,k} + e_i$$

ここで、 i , g_i , $G_{i,j}$, e_i は遺伝子番号、発現量、ケミカル効果、バッチ効果、ガウスノイズを示している。内部標準の 11 遺伝子、4 時間点、計 44 の遺伝子番号 i について、 j は 22 化合物 + 1 コントロール、 k は 10 プレートを表している。 $a_{i,j}$ と $b_{i,k}$ のそれぞれ 1 つは 0 でない値を取る。この式で推定された「バッチ効果」の項を元データより引き去ることでバッチ効果を軽減したデータが得られる。

3) レプリカ交換法 10 並列によるベイジアンネットワーク推定

ベイジアンネットワーク法による遺伝子ネットワーク推定を高速で安定に行うために開発した 8 コアのレプリカ交換 TAOgen アルゴリズムを用いたが、さらに初期値の依存を軽減するためこれを 10 並列でランさせて、

最も高い尤度を示した解を使用した。レプリカ交換法とは、

$$r = \frac{f(T_l, B_l, S_l | g; C_{l+1})}{f(T_l, B_l, S_l | g; C_l)} \times \frac{f(T_{l+1}, B_{l+1}, S_{l+1} | g; C_l)}{f(T_{l+1}, B_{l+1}, S_{l+1} | g; C_{l+1})}$$

の式で表現されるように、 l 系列と $l+1$ 系列でそれぞれ事後確率 f を計算し、その比 r がある閾値より大きい場合にこの 2 系列を交換するものである。今回の r は random に $[0,1]$ の値を取った。

4) サポートベクターマシンによる毒性判定

サポートベクターマシンにはカーネルと呼ばれる非線形の空間にマッピングして予測を高性能化する核心の部分がある。今回のシステムでは、カーネルに線形だけでなく、幾つもの非線形カーネル (polynomial, RBF, EKM, Saigo, ME) を用いている。また、予測を公正に行うため、同じ化合物のデータは 2 リピートずつ測定しているが、片方だけを学習に用いたりせず、同じ化合物データは全て抜いて学習させる Leave-One-Chemical-Out-Prediction (LOCOP) を行った。

(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、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

サブテーマ 1) ヒト ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立に関する研究

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

以下に作出された KhES1CYPEGFP 細胞の性状を

示す。このヒト ES 細胞は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、このクラス的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。また、KhES1CYPEGFP 細胞から EB 形成を行い、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。

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 陽性のもは全く観察されなかった。

また、EB から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。

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。各クローンのゲノム DNA を回収し Nested PCR により、予想されるサイズ 1242 bp に近い 1.3 kbp 付近のバンドが 15 クローン中 14 クロー

ンにおいて認められた。しかし、ネガティブコントロールとして用いた wild type の KhES1 の DNA においても同様のサイズのバンドが検出された。よって、目的のゲノム領域へのレポーター遺伝子の編集は明確に確認することが出来なかった。

サブテーマ 2) ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討

ニューロスフィアアッセイの確立のために、薄くて丈夫なマトリックスの検討、ニューロスフィアに最適な 1 ウェルあたりの細胞数、スフィア形成と分化期間の長さに関して基礎検討を行った。まず、マトリックスの検討では、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+ 511) 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 6000 個/ウェルが、再現性、均一性が高かった。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かった。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。その結果、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。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒト hNPC の加工

ヒト MAP2 遺伝子に 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。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、copGFP 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、PCR による細胞内の DNA 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。この結果から、プラスミドは十分に細胞内に導入されたものと考えられた。

次に、TH のエクソン 1 直後領域への TALEN 編集では、ドナーベクター 5' arm-pEGFP-3' arm で、導入 3 日、7、8 日後には、EGFP 蛍光が観察されたが、37 及び 50 日ではほとんど観察できなかった。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 の確認を行ったが、ゲノム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構築のための情報解析パイプラインに関する研究

1) ES 細胞から多変量解析によるマーカー遺伝子の抽出

Correspondence Analysis を用いて 11 サンプルから既述した基準を用いて 10 遺伝子を各コンポーネントから正負の重みが高い 20 位以内から選択した。これらの遺伝子は、*NANOG*、*SOX2*、*DMTF1*、*ZNF208*、*ADRM1*、*TRIB1*、*CRY1*、*SMAD7*、*SMAD6*、*VHL1* であった。それぞれを選択したコンポーネントでは、第 1 コンポーネントが最も多かった。それぞれの遺伝子で最初に現れたコンポーネントを考えると第 1~6

コンポーネントから選択されており、合理的な結果であると考えられる。

2) qRT-PCR 実験データのバッチノイズ除去

qRT-PCR は 96 well のプレートを用いて実験することが通常起こり、10 プレートを用いた毒性試験データはプレート毎に遺伝子発現が類似性を持つバッチ効果が観察されるため、これを定式化しノイズレベルの係数を線形回帰した結果、生データとは異なる補正した数値データが得られた。これを元に濃度別の化合物間で総当たりの相関係数を比較して、補正前と比較した。その結果、補正前と補正後では相関が減少する領域と増加する領域の両方が観測された。減少した部分はバッチ効果が数値の大部分を占めていたことによる擬似相関だったと考えられる。逆に相関が増加した部分は異なるプレート間で相関が減少していたのが補正されたと考えられる。この補正の効果は毒性カテゴリー予測にも影響し、qRT-PCR のみでの予測では、バッチノイズを除去した方がどのカテゴリーも予測が良くなっている。

3) レプリカ交換法 10 並列によるベイジアンネットワーク推定

レプリカ交換法を用いたことで最終的な尤度が安定した値を取るネットワークを推定していることが経時変化を観測することで得られている。10 サンプル毎にレプリカ交換を行い、20,000 回の交換を 10 並列で行って最も高い尤度となったネットワークを抽出した。この結果からは、各毒性カテゴリーで顕著に保存されたネットワーク構造は発見できなかった。これは、各毒性カテゴリーという主観的な分類では遺伝子発現パターンを反映することにならないことを示唆している。換言すれば、毒性カテゴリーでは分類が粗いため、サブカテゴリーに分類することも考えられる。

4) サポートベクターマシンによる毒性判定

サポートベクターマシンのカーネル 6 種類について、10 遺伝子×4 時間点×5 濃度=200 の組み合わせで得られた数値データを特徴量のセットとし

た。それぞれの化合物から得られた 200 の特徴量（22 次元）をテスト化合物を抜いたデータセットで t 検定を行って特徴量のランク付けを行い、これを 1 つずつ増やしながら最高予測値を得た。また、10 遺伝子×10 遺伝子のエッジから得られる 100 の重みについても、先述した 200 特徴量に加えてから t 検定することで、特徴の選択を繰り返した。その結果、極めて高い高予測率を得た。

D. 考察

サブテーマ 1) ヒト ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立に関する研究

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 KhES1CYPEGFP 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。

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EGFP の導入では、G418 耐性の細胞株が 15 クローン得られたことから、レポーター遺伝子はゲノムに導入されたと考えられるが、TH 遺伝子

エクソン 1 直後領域に導入されているかどうかは、明確に確認できなかった。

サブテーマ 2) ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討

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。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒト hNPC の加工

ヒト神経細胞の分化を指標としたハイスループットアッセイを構築するために、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 プロモーターもしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH プロモーターに蛍光タンパクレポーターを組み込んだコンストラクトの hNPC への遺伝子導入を行った。神経細胞分化 30 日付近での細胞において、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。分泌型ルシフェラーゼである Metluc も導入されているため培養上清で発光を測定したが、強いシグナルは得られなかった。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ため、分化が進むと外来 MAP2 プロモーター領域のエピジェネティック変化が起きるのかもしれない。TH-pEGFP を導入した場合も同様な現象が起きていると思われる。

サブテーマ 3) ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験構築のための情報解析パイプラインに関する研究

遺伝子ネットワークを利用した生命現象の予測は幾つか報告がある（Chung et al 2007, Rapaport et al 2007）。Chung らの論文では、スペクトルクラスターリングに基づいてノイズを軽減する方法で予測率を改善している。また、Rapaport らの論文では、タンパク質相互作用ネットワークから小さなサブネットワークを作成しておき、そのサブネットワークにある遺伝子群の発現が乳がんに関連しているもの（マーカー）を抜き出すということで、単なる t 分布などのマーカー遺伝子選択による予測などに比べて異なるデータセットにもロバストな予測法となることが報告されている。

我々の手法は、単純に遺伝子発現データではなく、そこから遺伝子ネットワーク構造を推定し、そのエッジの重みを直接に SVM に用いる点が異なっている。これは、遺伝子のノイズを軽減したり、マーカー一選択法を変更するのではなく、2 遺伝子間の関連性の変化をマーカーにしているため、構造情報を直接に取り込んでいることになると考えられる。

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。また、TALEN を用いたヒト ES 細胞への遺伝子編集も試みたが、下記の hNPC を用いたい場合と同様に、今回の手技では困難であることがわかった。

ハイスループットアッセイ最適化のために、hNPC を用いて短期のニューロスフィアアッセイ法を確立し、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。また、hNPC に Map2 および TH 遺伝子のエクソン 1 直後領域に蛍光レポーター結合したコンストラクト DNA 導入を行ったが、分化後に十分な強さの蛍光を持つ細胞の加工はできなかった。さらに、hNPC で TALEN によるレポ

ーター導入を試みたがゲノム編集は確認できなかった。

また、3 年間の研究を通じてハイスループットの毒性試験を実現するための多能性幹細胞バッテリーシステムからのマルチプロファイリングデータから、ノイズを軽減し、ベイズ統計に基づくネットワーク構造の推定を迅速に行い、毒性物質の晩発影響を 97%以上の高性能に予測することを可能とする実用に耐えうる一連のインフォマティクスパイプラインの開発を完成した。

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. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, **Sone H, Ohsako S**, and **Fujibuchi W**. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a human embryonic stem cell validation system. (*Nucleic Acids Res*, submitted).
2. 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, 465-474, (2014).
3. 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, 279-289, (2014).
4. Alam MS, **Ohsako S**, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemica*, 116(3), 474-480, (2014).
5. 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).

6. 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*, 34(3), 296-306, (2014).
7. 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).
8. Qin X-Y, 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).
9. Akanuma H, Qin X-Y, 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
1. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, **Sone H**, **Ohsako S**, and **Fujibuchi W**. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a human embryonic stem cell validation system. (*Nucleic Acids Res*, submitted).
2. 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*, in press, (2015).
3. 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).
4. 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).
5. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, **Sone H**. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicol Lett*, 228(3):235-240, (2014).
6. 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*. 38(1):71-82, (2013).
7. 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).
8. 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).
9. 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*. 443(1):104-12, (2013).
10. Qin XY, **Sone H**, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K,

曾根秀子：研究分担者

1. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, **Sone H**, **Ohsako S**, and **Fujibuchi W**. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a

- 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 genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One*. 7(12):e52756 (2012).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. 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 fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One*. 7(5):e36711 (2012).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. **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).

藤渕 航：研究分担者

1. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, **Sone H**, **Ohsako S**, and **Fujibuchi W**. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a human embryonic stem cell validation system. (*Nucleic Acids Res*, submitted).
2. 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).
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. 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).
5. 加藤有己、桜井都衣、藤渕航「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(書籍)pp249-254 (2014).
6. 藤渕航「iPS細胞からのビッグデータの情報セキュ

- リテイと創薬、医療への活用」、生命のビッグデータ利用の最前線（書籍）pp176-184（2014）。
7. Pessiot JF, Kim H, **Fujibuchi W**. Pairwise Ranking Component Analysis. *Knowledge and Information Systems*, 36(2): 459-487 (2013).
 8. 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 KT, Iha H, Nishizono A. Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice. *PLoS One*, 8(9): e73205 (2013).
 9. Pessiot JF, Wong PS, 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. Miura K, **Fujibuchi W**, Unno M. Review: Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 33(12): 2311-2319 (2012).
 15. Miura K, **Fujibuchi W**, Unno M. Review: Splice variants in apoptotic pathway. *Experimental Oncology*, 34(3): 212-217 (2012).
 16. 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).
 17. 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).
 18. Hamada S, Satoh K, **Fujibuchi W**, Hirota M, Kanno A, Unno J, Masamune A, Kikuta K, 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).
 19. 藤渕航「マイクロアレイ解析の基本」、バイオ実験に絶対使える 統計の基本 Q&A（書籍）pp57-77（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

ヒト ES 細胞株へのレポーター遺伝子導入と遺伝子編集による細胞の樹立に関する研究

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

本研究班のテーマである「多能性幹細胞試験バッテリー」の構築のために、特定の分化マーカー遺伝子によってドライブされる蛍光蛋白マーカー（主に EGFP）を導入して細胞を加工することを目的とし、この分担研究部分は実施された。ヒト多能性幹細胞に対して、従来型のリポフェクションによるランダムな遺伝子導入、ならびに Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いたゲノム編集手法を試みた。

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、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。さらに、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。

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：神経系細胞のうちドーパミンニューロンの発生率とその形態をライブイメージング出来るよう遺伝子を加工したヒト ES 細胞を作成することを目的に、TALEN を用いたゲノム編集手法で 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成することを試みた。TH 遺伝子エクソン 1 直後領域を特異的に切断する TALEN 左右ベクターならびに DNA 断片 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、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、PCR で 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、ゲノム編集は期待通りに起きていないことがわかった。

A. 研究目的

本研究班のテーマである「多能性幹細胞試験バッテリー」の構築のために、目的の分化細胞の発生率とその形態をライブイメージング出来るよう遺伝子を加工したヒト ES/iPS 細胞を作成する必要がある。第一の理由として、多検体低コストを実現するためにハイスループットイメージング解析可能とすることが上げられる。多能性幹細胞試験で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の有効性の検討は、再現性信頼性が必要とされる ECVAM や JaCVAM テストガイドラインで採用されるために必須である。

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。また、実験動物の胎児期曝露の場合では数ナノグラム/kg の単回投与でも生まれてくる個体の生殖発生学的影響（催奇形性・胎仔死亡・生殖機能異常・行動異常等）が引き起こされる。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まだ多い。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、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。

一方、近年、化学物質の曝露により発達期影響や遅延型影響の懸念される最重要な標的組織は中枢神経系であるとされている。本研究では、多能性幹細胞試験バッテリー構築に向けて、ダイオキシン標的の一つである CYP1A1 遺伝子プロモーターに EGFP レポーターを接続した DNA のランダムな導入、および神経系細胞特異的マーカーを発現させるため、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いたゲノム編集手法による EGFP カセットの導入によるヒト ES 細胞の加工を試みた。

B. 研究方法

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。

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 で増幅しクローニング、pEGFP-1 ベクターにクローニングした (図 1)。このコンストラクトをリニアライズし、ヒト ES 細胞 (KhES1) へ Lipofectamine-LTX (Invitrogen 社) でリポフェクションにより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 細胞上に再び播種し、G418 によるセクションを行った。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。

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。

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 (hs_TH_T01) を特異的に切断する TALEN 右側ベクター PTAL-R (pTAL-CMVn-021157) と左側ベクター PTAL-L (pTAL-CMVn-020432)、並びに TALEN による切断領域と相補的配列を両端に持つ DNA 断片 5' arm-pEGFP-3' arm を組み込んだ pBluescriptIIISK (+) TH-pEGFP

プラスミドは国立環境研究所曾根秀子博士より譲渡を受け使用した。PTAL-R および PTAL-L は予め mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA Transcription Kit (Ambion 社) によって mRNA に変換し、ドナーベクターを組み込んだ pBluescriptII SK (+) TH-pEGFP プラスミドと共にヒト ES 細胞 (KhES1) へ分離回収した KhES1 の細胞浮遊液へ Lipofectamin3000 (Invitrogen 社) でリポフェクションにより遺伝子導入した。

この細胞を SNL 細胞上に播種し、G418 によるセクションを行い、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た。その後、MEF 上で培養を続けゲノム DNA を抽出した。レポーター-EGFP 遺伝子のゲノム編集確認には、Nested PCR により、各子ローンから抽出したゲノム DNA に対して 5' arm 外側の配列で設計した TH primer と EGFP 内部配列で設計した primer を用いて実施した。

（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にて 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

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

以下に作出された KhES1CYPEGFP 細胞の性状を示す。このヒト ES 細胞は維持培養条件下でも EGFP の弱い蛍光を発していた (図 2)。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。また、KhES1CYPEGFP 細胞を用い SUMILON PrimeSurface 96U プレート上で EB 形成を行い、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 3)。

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。

また、EB から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 (図 4)。

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。各クローンのゲノム DNA を回収し Nested PCR により、予想されるサイズ 1242b に近い 1.3 kbp 付近のバンドが 15 クローン中 14 クローンにおいて認められた。しかし、ネガティブコントロールとして用いた wild type の KhES1 の DNA においても同様のサイズのバンドが検出された。よって、目的のゲノム領域へのレポーター遺伝子の編集は明確に確認することが出来なかった。

D. 考察

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 KhES1CYPEGFP 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。

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-EGFP の導入では、G418 耐性の細胞株が 15 クローン得られたことから、レポーター遺伝子はゲノムに導入されたと考えられるが、TH 遺伝子エクソン 1 直後領域に導入されているかどうかは、明確に確認できなかった。

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。

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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, Sone H, **Ohsako S**, and Fujibuchi W. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a human embryonic stem cell validation system. (*Nucleic Acids Res*, submitted).
2. 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, 465-474, (2014).
3. 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, 279-289, (2014).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, **Ohsako S**, Yoshinaga J, Yonemoto J,