

201424002A

**厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業**

**個体の成長期における毒性メカニズム
に基づく新規 in vitro 発達神経毒性
評価法に関する研究
(H25-化学-一般-002)**

平成 27 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 諫田 泰成

平成 28 (2016) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告	
	個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規 in vitro 発達神経毒性評価法に関する研究-----	1
	諫田 泰成	
II.	分担研究報告	
	ヒト未分化細胞を用いた化学物質の影響-----	3
	諫田 泰成	
	神経堤細胞の機能解析による評価法の開発-----	17
	宇佐見 誠	
	発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価-----	24
	佐藤 薫	
	生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究-----	29
	関野 祐子	
	幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価-----	41
	上野 晋	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	55
IV.	研究成果の刊行物・別刷 -----	61
V.	化学物質リスク研究事業・班会議内容資料 -----	181
	平成 27 年 9 月 12 日開催	

I. 総括研究報告

研究成果概要

**個体の成長期における毒性メカニズムに基づく新規 in vitro
発達神経毒性評価法に関する研究**

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室
諫田 泰成

<全体要旨>

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し社会問題となっている。その原因の一つは発達期における化学物質の曝露とされる。発達期の神経系は成体より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが考えられるため、子どもの影響評価法の確立が強く望まれる。

現在、OECDやEPAによって、妊娠ラットを用いる発達神経毒性試験ガイドラインが制定されているが、試験方法が複雑で、試験期間は1年以上、動物数は720にも及び経費も膨大である。さらに、日本ではこのようなガイドラインは未整備である。そこで我々は、現行ガイドラインの欠点を克服し、簡便かつ低コストのin vitro評価系として、各発達期における神経系の毒性評価法、遅発性の神経回路異常による毒性評価法の基盤を開発している。

昨年度までに、遅発性神経毒性が懸念されるバルプロ酸および発生毒性が懸念される内分泌かく乱物質トリブチルスズを研究班で共通の化合物として用いて、各発達段階における神経毒性を明らかにした。本年度は、発達神経毒性を有する有機リン系農薬クロルピリホスを共通の化合物として新たに検証した。その結果、幹細胞から生後神経回路にいたるまで様々な毒性を明らかにした。これらの結果から、我々の手法は幹細胞から生後・幼若期までの各発達段階において神経毒性を評価できることが示唆された。また、発生過程で毒性発現メカニズムが異なることが考えられた。

今後は、国際的な検証チームと連携を図りながら、再現性・予測性を検証し、新規試験法としての確立を目指す。

<研究分担者一覧>

宇佐見誠（国立衛研）
「神経堤細胞の機能解析による評価法の開発」
佐藤薫（国立衛研）
「発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価」
関野祐子（国立衛研）
「生後神経回路の機能的影響評価指標に関する研究」
上野晋（産業医大）
「幼若期の神経回路機能に対する化学物質の影響評価」

A. 研究目的

発達期の中枢神経系は成体組織より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが懸念される。

すでに我々は平成 22～24 年度の化学物質リスク事業「個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による化学物質の健康影響評価法に関する研究」において、各発達段階における評価系を構築した。

そこで、本年度は、遅発性の神経毒性が懸念されるバルプロ酸、および発生毒性が懸念される内分泌かく乱物質トリブチルスズに加えて、有機リン系農薬クロルピリホスを研究班共通の化学物質として使用し、当初の計画に従って、我々が独自に構築した各発達段階における in vitro 神経毒性評価を行った。

B. 研究方法

詳細は各分担報告書を参照のこと。

C. 研究結果

以下に示すように、幹細胞から生後・幼若期までの各発達段階において、陽性対照化合物クロルピリホスの神経毒性作用が検出できることを明らかにした。

【①ヒト未分化細胞の代謝】

クロルピリホスによりヒト幹細胞のエネルギー代謝異常を見出した。とくに、化学物質によりミトコンドリア形態制御機構が阻害され ATP 産生が抑制されることにより増殖が抑制される新規の毒性発現メカニズムを明らかにした。

【②神経堤細胞の遊走】

ラット神経堤細胞遊走実験法により、培養 48 時間までは 50 μ M までは神経堤細胞の遊走促進傾向が認められた。培養 48 から 72 時間では、最低濃度の 6.25 μ M 以上で抑制傾向が認められた。従って、クロルピリホスは神経堤細胞の遊走に対して複数のメカニズムを介して影響を及ぼすと考えられた。

【③発達成長期神経系細胞新生】

前脳矢状切片の脳室下帯に存在する神経幹細胞および前駆細胞を蛍光標識し切片培養を行い、評価化合物を適用し定量的な評価を行った。クロルピリホスは、新生神経系細胞数減少、新生オリゴデンドロサイト数の減少を引き起こすことを明らかにした。

【④生後神経回路】

バルプロ酸は伝達物質の放出異常と神経発達の異常を示し、行動異常は早期に出現した。クロルピリホスも同様な変化が観察され、過剰な脳回の形成も認められた。

【⑤幼若期神経回路】

有機リン系農薬クロルピリホス (CP) を VPA や TBT と同様に胎生期曝露ラットを用いた生後早期の海馬神経回路機能を評価したところ、VPA 胎生期曝露の場合に認められた興奮性神経回路の発達が亢進する傾向が認められた。

D. 考察

本研究において、陽性対照化合物であるバルプロ酸およびトリブチルスズに加えて、クロルピリホスを用いて、幹細胞から生後・幼若期までの毒性を統合的に評価した。

バルプロ酸およびトリブチルスズと同様に、クロルピリホスはすでに幹細胞に対して毒性が認められた。妊娠動物の投与により生後早期の海馬の興奮性神経回路の亢進、小脳の突起伸展の異常をきたすことから、我々が開発した各発達期における毒性評価系の有用性を示すことができた。

今後は、試験法の確立に向けて、本評価法の再現性、予測性などを検証する予定である。とくに、2015 年より開始された HESI の NeuroTOX と連携を図りながら、プロトコルの整備を進め、国際的な評価系へと発展させることを目指し、国内外のグローバルな化学物質の管理などに役立てたい。

E. 結論

我々が構築した各発達期の神経毒性評価により、バルプロ酸およびトリブチルスズの各発達段階における神経毒性を明らかにした。

F. 研究発表

分担研究者の報告書に示すように、多数の論文発表および学会発表を行った。

II. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ヒト未分化細胞を用いた化学物質の影響

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所薬理部第二室長
諫田 泰成

要旨

ヒト未分化細胞およびヒト iPS 細胞を用いて、発達神経が懸念される化学物質の影響を検討した。その結果、遅発性神経毒性が懸念される有機スズ化合物トリブチルスズおよび有機リン系農薬クロルピリホスの曝露により両細胞株の増殖抑制が認められた。この毒性メカニズムとしてミトコンドリアの形態異常による ATP 産生の低下を見いだした。以上の結果から、ヒト未分化/幹細胞におけるミトコンドリア機能を指標にして、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因の一つとして環境中の化学物質の関与が指摘されている。ヒト iPS 細胞などの未分化細胞はヒト発生過程を *in vitro* で模倣できることから、化学物質の神経毒性を検出できる可能性があり期待は大きい。しかしながら、評価系としての手法はいまだ確立されていない。

そこで本研究では、化学物質の発達期における毒性を評価するために、複数のヒト未分化細胞を用いて発達神経毒性を評価できるのか検討を行った。評価系の構築には発達毒性が懸念される陽性対象物質が必要となる。昨年度までに、研究班で共通のバルプロ酸を用いることにより、ヒト未分化細胞のエネルギー代謝が重要であることを見出した。

そこで、本年度は、研究班共通の化学物質として内分泌攪乱作用を有し発達神経毒性が懸念される環境汚染物質トリブチルスズ (TBT) を引き続き検討を行った。さらに、発達神経神経毒性を有する化合物として有機リン系農薬クロルピリホス (CPF) を追加して、毒性メカニズムの検討を行った。本研究により、ヒト未分化細胞のミトコンドリア機能による毒性評価の有用性を検証した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト未分化細胞株 NT2/D1 は 10%FBS を含む DMEM 培地を用いた。また、ヒト iPS 細胞株 253G1 は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリーの条件で培養した。

2. ミトコンドリアの形態

細胞を 4%FFA で固定後、ミトコンドリアを 50 nM の MitoTracker Red CMXRos (Cell Signaling Technology) および DAPI により染色し、confocal 顕微鏡 (Nikon A1) で観察した。Dot 状のミトコンドリアが 10%未満の細胞数を数えた。

3. qPCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて RNA を単離した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN)、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

4. ATP 量

ATP 量は、ルシフェラーゼ法により計測した。

5. MTT アッセイ

MTT アッセイは CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて行った。

6. ミトコンドリア膜電位

ミトコンドリア膜電位の測定は細胞を JC10 (Life technologies) で染色したのち FACS ARIAI (BD Biosciences) を用いて行った。

7. shRNA を用いたノックダウン

shRNA 導入はレンチウイルス (SIGMA) を用いた。ヒト iPS 細胞にウイルスを moi 1 で感染させた。さらに 24 時間後にピューロマイシンを添加して感染細胞のセレクションを行った。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞に対する TBT の作用

前年度にヒト未分化株細胞を用いて、TBT によりエネルギー代謝異常が誘導されることを見出した。本年度は他の未分化細胞においても同様であるのか明らかにするために、ヒト iPS 細胞を用いてその毒性メカニズムを検討した。図 1A, B に示すように、TBT 曝露により濃度依存的に増殖の低下が認められた。一方、毒性の低い酢酸スズ (TA) では影響は認められなかった。また 50nM TBT 曝露では未分化状態に影響はなかったが、ATP 量の低下が認められた (図 1C, D)。

ATP 量が低下したので、ミトコンドリア機能に着目した。まず主要な機能であるミトコンドリア膜電位について調べた結果、TBT 曝露により膜電位の低下が認められた (図 2A)。さらにミトコンドリアの形態異常が引き起こされることも見出した (図 2B, C)。一方、TA ではこうした影響は認められなかった。したがって TBT によりミトコンドリア機能低下が引き起こされることが示唆された。

次に、ミトコンドリアの形態制御因子の発現について検討した。qPCR により、分裂因子 (Drp1, Fis1) および融合因子 (Mfn1, Mfn2, Opa1) の遺伝子発現には影響が認められなかった (図 3A)。非常に興味深いことに、TBT の曝露によって Mfn1 のタンパク分解が誘導されることが示唆された (図 3B, C)。さらに Mfn1 の関与を調べるため shRNA を用いてノックダウンを行った結果、ミトコンドリア形態異常が観察された (図 3D, E, F)。したがって、TBT によるミトコンドリア機能の低下はミトコンドリア融合タンパク質の分解によって誘導されることが示唆された。

Mfn1 を特異的に分解するユビキチンリガーゼとして MARCH5 が報告されている

(Park et al., Cell Death Dis., 2014)。そこで、TBT のミトコンドリアに対する作用が MARCH5 を介しているのか検討するためにノックダウンを行った (図 4A)。その結果、TBT の Mfn1 分解は阻害された (図 4B, C)。したがって、TBT のミトコンドリアに対する作用は MARCH5 を介することが示唆された。

以上の iPS 細胞の結果から、TBT の曝露によりミトコンドリアの形態異常が起きて ATP 産生が低下し、その結果、細胞増殖が抑制されることが示唆された。

2. ヒト NT2/D1 細胞に対する CPF の作用

TBT 曝露により観察された現象が他の化学物質でも引き起こされるのか明らかにするために、発達神経毒性が懸念されるクロロピリホス (CPF) を用いて NT2/D1 細胞で検討を行った。図 5 に示すように、CPF 曝露により濃度依存的に増殖の低下が認められた。また ATP 量についても濃度依存的な低下が認められた (図 6)。さらにミトコンドリアを観察した結果、30 μ M CPF 曝露によりミトコンドリアの形態異常が引き起こされることも見出した (図 7)。既報では、CPF 曝露したラット皮質ニューロンにおいて、ミトコンドリア軸索輸送の阻害や膜電位の低下が引き起こされる一方で、ATP 産生量へは影響しないという報告がある (Middlemore-Risher et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2011)。本研究では既報と同程度の濃度で、ミトコンドリアの分裂促進に伴い ATP 量の低下が認められたため、既報と異なる結果となった。この違いは、未分化細胞の方が成熟神経細胞よりも化学物質に対する感受性が高いことが要因にあると考えられる。

以上の結果から、NT2/D1 細胞において TBT と同様に、CPF はミトコンドリア機能異常を介した細胞毒性を引き起こすことが明らかになった。また、未分化株細胞で ATP 量やミトコンドリア形態といった指標を用いることにより、発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究において、ヒト未分化株細胞およびヒト iPS 細胞を用いて、前年度の研究で見出した指標により発達神経が懸念される化学物質の影響を評価できることを明らかにし

た。特に、ヒト iPS 細胞で使用した TBT は 50nM で血中に存在する濃度であり、本アッセイ系は非常に好感度であると考えられた。

今回、ヒト iPS 細胞を用いて TBT の毒性作用点として、MARCH5-Mfn1 分解を介したミトコンドリアの分裂による ATP 産生の低下を見出した。現在、ATP は Tox21 でも肝臓細胞を用いてミトコンドリア毒性の大規模なバリデーション試験が進行中である。今後、神経などの前駆細胞をもちいて、他の化学物質の曝露によってミトコンドリアの機能異常が認められるのか検討を加えることにより、化学物質の毒性評価に幅広く応用できるのか明らかになると期待される。

また、本研究では、ヒト NT2/D1 細胞を用いて発達神経毒性が懸念される化学物質である CPF の毒性発現機構についても調べた。その結果、TBT と同様にミトコンドリア毒性を示すことが明らかとなった。したがって、発達神経毒性を示す化学物質の毒性評価においてミトコンドリアの機能異常は有効であり幅広く応用できる可能性が期待される。最近、メチル水銀の毒性をヒト iPS/ES 細胞で評価できる試みが報告されているが (He et al., *Toxicol Lett*, 2012)、どこまで動物実験の代替できるのか、ヒトにおける毒性を予測できるのかはほとんど明らかになっていない。今後も被験物質を増やし iPS 細胞をはじめとした未分化細胞を用いることで、ミトコンドリアを指標とした毒性マーカーの探索や評価法の検討を行う。特にスループット性の高い手法を開発し、簡便で再現性のある評価法の確立を目指したい。

E. 結論

ヒト未分化細胞およびヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能を指標とすることにより、成長期における化学物質の発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

論文

英文

- [1] Ishida K., Kotake Y., Miyara M., Aoki K., Sanoh S., Kanda Y., Ohta S. Involvement of GluR2 decrease in

lead-induced neuronal cell death. *J. Toxicol. Sci.* 38:513-21 (2013). (日本毒性学会田邊賞受賞論文)

- [2] Yamada S., Kotake Y., Sekino Y. and Kanda Y.*, AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metalomics* 5:484-91 (2013). *C.A. (第 3 回メタロミクス研究フォーラム若手奨励賞受賞論文)
- [3] Kanda Y. Cancer Stem Cells - Fact or Fiction? (Chapter1). Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. CRC Press (2013).
- [4] Nakamura Y., Matsuo J., Miyamoto N., Ojima A., Ando K., Kanda Y., Sawada K., Sugiyama A., Sekino Y. Standardization of testing methods with iPS derived cardiomyocytes for evaluating drug-induced repolarization delay. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 124:494-501 (2014).
- [5] Yamada S., Kotake Y., Demizu Y., Kurihara M., Sekino Y. and Kanda Y. "Isocitrate dehydrogenase 3 as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells." *Sci. Rep.* (2014) 4: 5952
- [6] Nagakubo T., Demizu Y., Kanda Y., Misawa T., Shoda T., Okuhira K., Sekino Y., Naito M., Kurihara M.. Development of cell-penetrating R7 fragment-conjugated helical peptides as inhibitors of estrogen receptor-mediated transcription. *Bioconjugate Chemistry* 25, 1921-1924 (2014).
- [7] Hirata N., Yamada S., Shoda T., Kurihara M., Sekino Y., Kanda Y. "Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation" *Nature Commun.* (2014) 5:4806
- [8] Hayakawa T., Kunihiro T., Ando T., Kobayashi S., Matsui E., Yada H., Kanda Y., Kurokawa J., Furukawa T.

- “Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: correlation and complementarity with extracellular electrophysiology.” *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2014) 77:178-91
- [9] Hiyoshi H., Goto N., Tsuchiya M., Iida K., Nakajima Y., Hirata N., Kanda Y., Nagasawa K., Yanagisawa J. “YL-109 is a novel antitumor agent suppressing triple-negative breast cancer progression by inducing ubiquitin ligase CHIP.” *Sci. Rep.* (2014) 4:7095.
- [10] Tsuchiya M, Nakajima Y, Hirata N, Morishita T, Kishimoto H, Kanda Y, Kimura K. Ubiquitin ligase CHIP suppresses cancer stem cell properties in a population of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452:928-32 (2014).
- [11] Kanda Y. Assessment of cigarette smoking toxicity using cancer stem cells. Nova Science Publishers (2014).
- [12] Yosuke Demizu, Takashi Misawa, Takaya Nagakubo, Yasunari Kanda, Keiichiro Okuhira, Yuko Sekino, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara. Structural development of stabilized helical peptides as inhibitors of estrogen receptor (ER)-mediated transcription. *Bioorg. Med. Chem.* 23:4132-8 (2015).
- [13] Asakura K, Hayashi S, Ojima A, Taniguchi T, Miyamoto N, Nakamori C, Nagasawa C, Kitamura T, Osada T, Honnda Y, Kasai C, Ando H, Kanda Y, Sekino Y, Sawada K. Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocyte. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (2015)
- [14] Yamada S., Kotake Y., Nakano M., Sekino Y. and Kanda Y.* Tributyltin induces mitochondrial fission through NAD-IDH dependent mitofusin degradation in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics* 7:1240-6 (2015). *C.A.
- [15] Hirata N., Yamada S., Asanagi M., Sekino Y. and Kanda Y.* Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470:300-5 (2016).
- [16] Asanagi M., Yamada S., Hirata N, Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y. Kanda Y.* Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells. *J. Toxicol. Sci.* (in press). *C.A.

和文

- [1] 関野祐子、佐藤薫、諫田泰成、石田誠一：ヒト iPS 分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化、国立医薬品食品衛生研究所報告。131: 25-34. (2013)
- [2] 諫田泰成、再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発、再生医療における臨床研究と製品開発、p572-576、技術情報協会 (2013).
- [3] 諫田泰成、ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導法、日本薬理学雑誌、141: 32-36 (2013).
- [4] 諫田泰成、ヒト iPS 細胞を用いた心毒性試験の現状と課題、谷本学校毒性質問箱 16: p91-94 (2014).
- [5] 諫田泰成、ヒト iPS 細胞を用いた成熟心筋細胞の開発、心電図, 34, 306-309 (2014)
- [6] 澤田光平、松尾純子、長田智治、吉田善紀、白尾智明、佐藤薫、諫田泰成、関野祐子：霧島会議 Stem Cell Safety Pharmacology Working Group まとめーヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞を用いた催不整脈作用検出とその課題ー、心電図 34:306-9 (2014).
- [7] 諫田泰成、癌幹細胞の受容体を標的とした創薬の可能性、日本薬理学雑誌 144:17-21 (2014).
- [8] 平田尚也、諫田泰成：癌幹細胞の解析モデルと創薬への応用、CBI 学会誌

- (2015).
- [9] 芦原貴司、黒川洵子、諫田泰成、原口亮、稲田慎、中沢一雄、堀江稔. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの不整脈研究への応用可能性: in silico 不整脈学の観点から. 生体医工学, 53(3), 100-105. 2015.
- [10] 山田茂、諫田泰成、幹細胞と発達神経毒性、日本薬理学雑誌 146:171-3 (2015).
- [11] 諫田泰成: 癌幹細胞の創薬応用、技術情報協会 (in press).
- [12] 諫田泰成、芦原貴司、黒川洵子: ヒト iPS 細胞から成熟した心筋細胞の開発と安全性評価への応用、日本薬理学雑誌 (in press)
2. 学会発表
- [1] 諫田泰成: リゾリン脂質による乳癌幹細胞の増殖制御と創薬応用、第 136 回日本薬学会シンポジウム、20160328
- [2] 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術を用いた次世代心臓安全性評価: JiCSA の取り組み. 第 89 回日本薬理学会年会, バシフィコ横浜, 東京, 20160310
- [3] 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来の成熟心筋細胞の作製と標準化に向けた次世代評価法の開発、第 3 回霧島会議、東京、20160218
- [4] 諫田泰成: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞による新しい安全性評価法の大規模検証実験: JiCSA の取り組み. 第 1 回 AMED RS シンポジウム, 読売大手町ホール, 東京, 20150201
- [5] 諫田泰成: GPCR によるリガンド非依存的な Notch シグナルの活性化機構、BMB2015 ワークショップ、横浜、20151202
- [6] 諫田泰成: ヒト未分化細胞のエネルギー代謝に基づく環境ホルモンの毒性評価、第 18 回環境ホルモン学会シンポジウム、栃木、20151210
- [7] 諫田泰成: ヒト iPS 細胞を利用した医薬品の心臓安全性評価系の開発と国際標準化、安全性評価研究会・夏のフォーラム 2015、八ヶ岳、20150911
- [8] 関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 心筋細胞を利用した催不整脈性リスク評価と ICHS7B 改訂に関する国際動向について、第 42 回 日本毒性学会学術年会、金沢、201507
- [9] Naoya Hirata, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Yuko Sekino, Yasunari Kanda. Estrogen induces proliferation of breast cancer stem cells via NO/sGC/cGMP signaling pathway. 第 13 回幹細胞シンポジウム、東京、201505
- [10] 出水庸介、三澤隆史、長久保貴哉、諫田泰成、奥平桂一郎、関野祐子、内藤幹彦、栗原正明: エストロゲン受容体転写活性化阻害能を有するヘリカルペプチドの開発、第 10 回ケミカルバイオロジー学会、仙台、201506
- [11] 諫田泰成: エストロゲンによる NO シグナルを介した乳癌幹細胞の増殖機構、第 14 回生命科学研究会、三浦市、201506
- [12] 山田茂、古武 弥一郎、中野瑞穂、関野祐子、諫田泰成: ミトコンドリア品質管理に対するトリプトシルスズの影響、第 42 回 日本毒性学会学術年会、金沢、201507
- [13] 石田慶士、古武弥一郎、青木香織、瀧下智子、木村朋紀、諫田泰成、太田茂: 有機スズ神経毒性に関与する核呼吸因子-1(NRF-1)阻害機構の解明、第 42 回 日本毒性学会学術年会、金沢、201507
- [14] 平田尚也、山田茂、出水庸介、栗原正明、関野祐子、諫田泰成: エストロゲンによる NO を介した乳癌幹細胞の増殖機構、第 132 回日本薬理学会関東部会、20150704
- [15] 諫田泰成: 化学物質の in vitro 発達神経毒性評価に向けた取り組み、第 34 回生体と金属・化学物質に関する研究会 (チョークトーク 2015)、滋賀、20150821
- [16] 黒川洵子、諫田泰成、古川哲史: ヒトが創った心臓: iPS 細胞から大人の心筋細胞を創る秘蔵のレシピ公開、生体機能と創薬シンポジウム 201508
- [17] 児玉昌美、李敏、芦原貴司、諫田泰成、関野祐子、古川哲史、黒川洵子: ヒトカリウムチャンネル遺伝子導入によるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化のメカニズム-発現レベルからの考察-、生体機能と創薬シンポジウム 2015、

- 20150827
- [18] 石田慶士, 古武弥一郎, 青木香織, 瀧下智子, 木村朋紀, 諫田泰成, 太田 茂: 低濃度トリブチルスズによるニューロン脆弱化機構の解明、第 10 回メタルバイオサイエンス研究会、名古屋、20150828
- [19] 山田茂、古武弥一郎、関野祐子、諫田泰成: ミトコンドリア品質管理に対するトリブチルスズの新たな毒性作用、日本神経化学会、大宮、2015 年 9 月
- [20] 平田尚也、諫田泰成: 前立腺癌幹細胞に対するスフィンゴシン 1 リン酸の機能、日本癌学会、名古屋、2015 年 9 月
- [21] 麻薙美紀、山田茂、古武弥一郎、板垣宏、関野祐子、諫田泰成「ヒト未分化細胞を用いた化学物質の毒性評価」、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、神戸、2015 年 9 月 17-18 日
- [22] 田中克哉、三澤隆史、出水庸介、諫田泰成、榎島誠、関野祐子、内藤幹彦、栗原正明: ジフェニルメタンを基本骨格とするエストロゲン受容体アンタゴニストの創製、第 59 回日本薬学会関東支部大会、201509
- [23] 平田尚也、関野祐子、諫田泰成: スフィンゴシン 1 リン酸による Notch3 を介したグリオーマ幹細胞の増殖、第 133 回日本薬理学会関東部会、201510
- [24] DEVELOPMENT OF HELICAL PEPTIDES AS INHIBITORS OF ESTROGEN RECEPTOR-MEDIATED TRANSCRIPTION. Yosuke Demizu, Takashi Misawa, Yasunari Kanda, Nobumichi Ohoka, Yuko Sekino, Mikihiro Naito, and Masaaki Kurihara 第 52 回ペプチド討論会、201511
- [25] 出水庸介、三澤隆史、諫田泰成、大岡伸道、関野祐子、内藤幹彦、栗原正明: エストロゲン受容体を標的とした転写活性化阻害および分解誘導ペプチドの創製、第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム、201511
- [26] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ミトコンドリア品質低下を介した有機スズの新規毒性メカニズム、BMB2015、神戸、2015 年 12 月
- [27] 山崎大樹, 安藤博之, 吉永貴史, 山本渉, 朝倉圭一, 谷口智彦, 宇田宗晃, 諫田泰成, 長田智治, 林誠治, 宮本憲優, 葛西智恵子, 田渋弘行, 犬塚隆志, 杉山篤, 澤田光平, 関野祐子. ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いた TdP リスク評価 - JiCSA60 化合物を用いて -. 第 89 回日本薬理学会年会, バシフィコ横浜, 神奈川, 20160310
- [28] 山田茂, 麻薙美紀, 山崎大樹, 諫田泰成, 関野祐子. ヒト iPS 細胞のミトコンドリアダイナミクスを用いた細胞毒性評価. 第 89 回日本薬理学会年会, バシフィコ横浜, 神奈川, 20160309-11
- [29] 麻薙美紀、山田茂、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成: ヒト未分化細胞を用いた発達神経毒性評価の試み、第 89 回日本薬理学会年会、バシフィコ横浜、神奈川、20160309-11
- [30] 平田尚也、関野祐子、諫田泰成: リゾフォスファチジン酸はトリプルネガティブ乳癌幹細胞の増殖を誘導する、第 89 回日本薬理学会年会、バシフィコ横浜、神奈川、20160309-11
- [31] Reiko Kimura, Masami Kodama, Kazuharu Furutani, Yasunari Kanda, Yoshihisa Kurachi, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa ヒト iPS 細胞由来心筋の活動電位形成に関連する遺伝子の定量的発現解析におけるリファレンス遺伝子の選定、第 89 回日本薬理学会年会、バシフィコ横浜、神奈川、20160309-11
- [32] Erina Hayashi, Reiko Kimura, Min Li, Tomoko Ando, Takashi Ashihara, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Yasunari Kanda, Junko Kurokawa. 内向き整流性カリウムチャネルを過剰発現させたヒト iPS 由来心筋細胞を用いた薬理作用解析、第 89 回日本薬理学会年会、バシフィコ横浜、神奈川、20160309-11
- [33] 井出吉紀, 小林真里子, 平田尚也, 板垣宏, 関野祐子, 諫田泰成. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた新しい安全性薬理試験法: 膜電位感受性色素イメージング (VSO) と多点電極 (MEA) の同時計測による検証実験. 第 89 回日本薬理学会年会, バシフィコ横浜, 神奈川, 20160309-11
- [34] 久保祐亮, 山田茂, 犬塚隆志, 諫田泰成,

関野祐子. 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞から GABA 作動性神経細胞への効率的な分化誘導法の確立. 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪, 2015 年 3 月 17~19 日

- [35] Yoshinori Ide, Michinori Ichikawa, Mariko Kobayashi, Kenji Tsubokura, Daiju Yamazaki, Yasunari Kanda, Yuko Sekino. Development of non-staining imaging technique for evaluating safety using human iPSC-derived cardiomyocytes. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 北海道, 2015 年 3 月 22~24 日

[国際学会]

- [1] Ashihara T, Kurokawa J, Kanda Y, Haraguchi R, Nakazawa K, Horie M: Spiral wave behaviors and antiarrhythmic drug efficacy in human induced pluripotent stem cell-derived myocardial sheet are different from those in original heart: A simulation study. Heart Rhythm 2015 Scientific Sessions, 2015.05.14, Poster, Boston.
- [2] Yasunari Kanda: S1P induces proliferation of cancer stem cells via a ligand-independent Notch activation. FASEB, Banff 2015.08.25
- [3] Yosuke Demizu, Takashi Misawa, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Masaaki Kurihara. Development of Cell-penetrating Fragment Conjugated Helical Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. 11th Australian Peptide Conference 2015, 25th October 2015
- [4] Kanda Y, Li M, Ashihara T, Yuko S, Furukawa T, Kurokawa J. Assessment of drug-induced QT prolongation using human iPS cell-derived mature cardiomyocytes, Prague, Czech Republic, Sep 30, 2015.
- [5] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Yuko Sekino. Toxicity Assessment by Mitochondrial Dynamics in Human

iPS Cells. 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, 2016.03

H. 知的財産の出願・登録状況

[特許]

1. 特許出願番号 : 2013-116243 (PCT/JP2014/002888)
「正常な内向きのカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞」

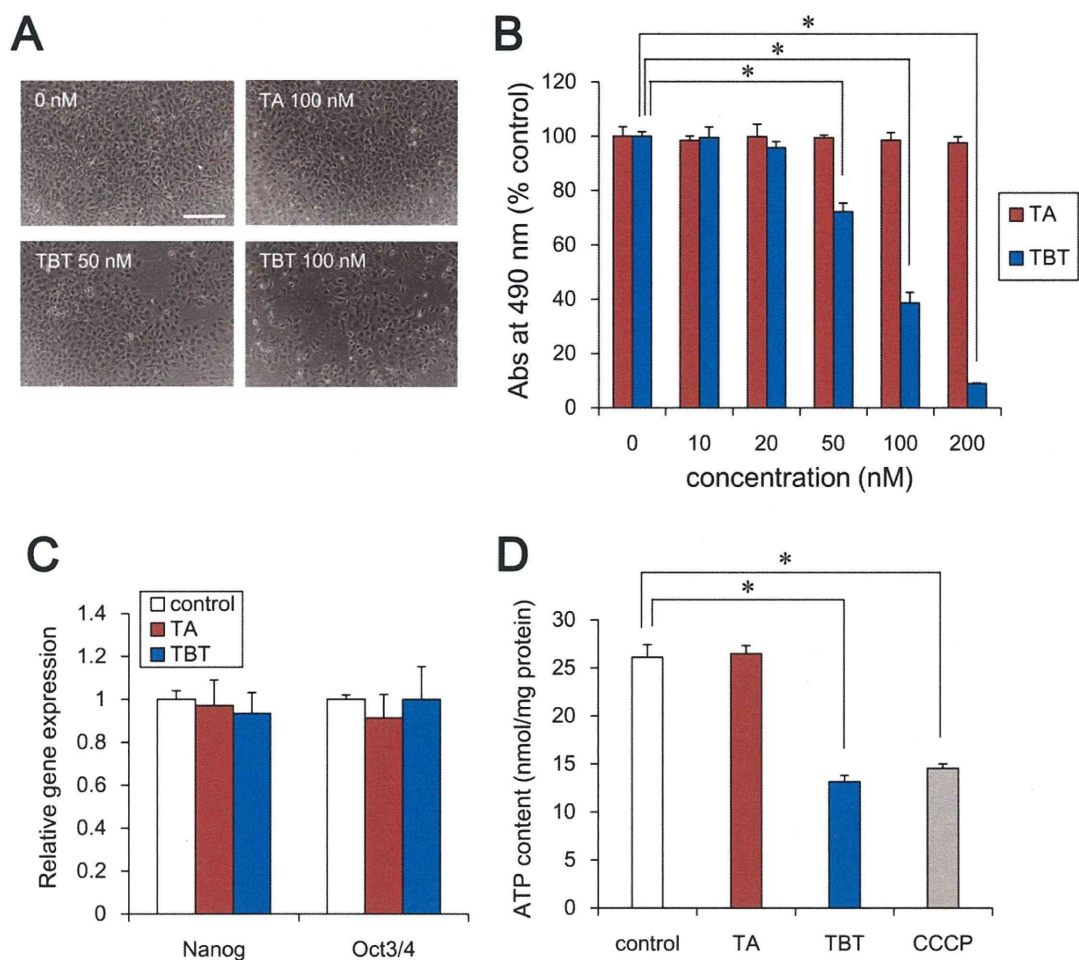


図1 トリブチルスズによるヒト iPS 細胞の毒性作用

A) iPS 細胞に異なる濃度の有機スズ TBT を曝露させ、72 時間後に位相差画像を取得した。

B) A)において MTT assay を行った。濃度依存的な増殖の低下が認められた。一方、無機スズ TA は効果がなかった。

C) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に RNA を回収した。Nanog, Oct3/4 の qPCR を行った。

D) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に ATP を測定した。TBT および脱共役剤 CCCP で ATP が低下した。TA は効果がなかった。

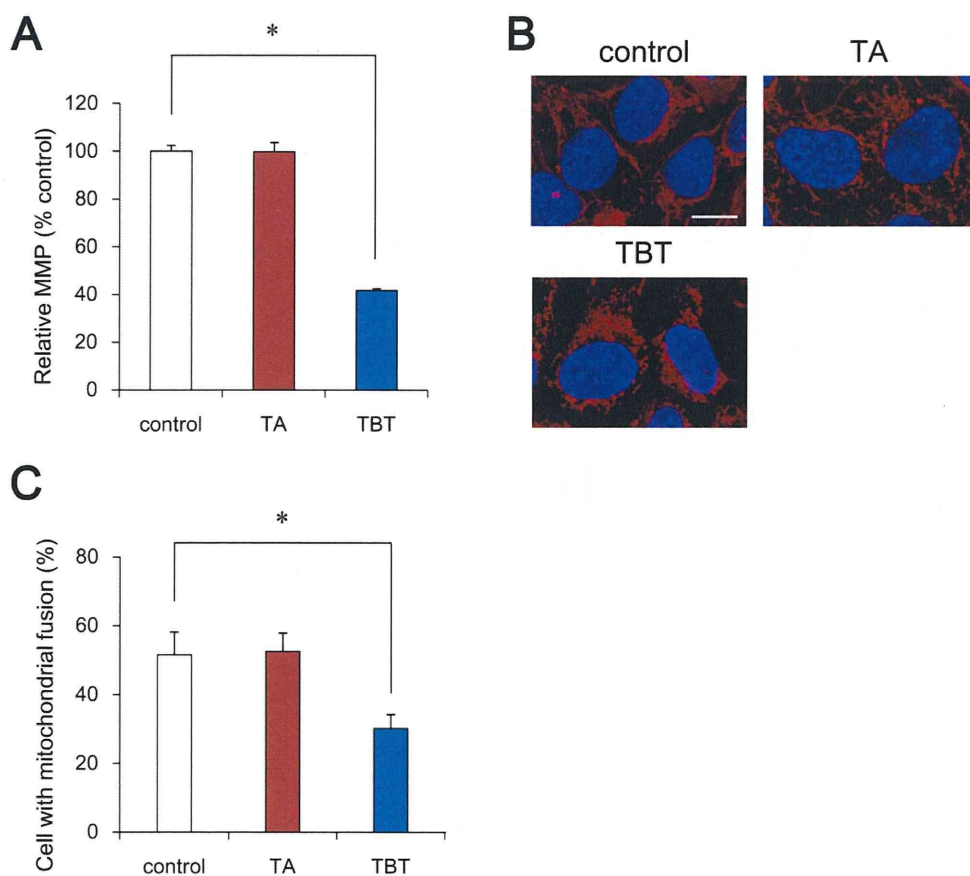


図2 トリphenylmethylsulfoniumによるミトコンドリア機能阻害

A) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、1 時間後にミトコンドリア膜電位を測定した。TBT で膜電位が低下した。TA は効果がなかった。

B) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後にミトコンドリア形態を共焦点顕微鏡で観察した。

C)B)の結果を定量的に評価した。TBT でミトコンドリア分裂低下が認められた。TA は変化がなかった。

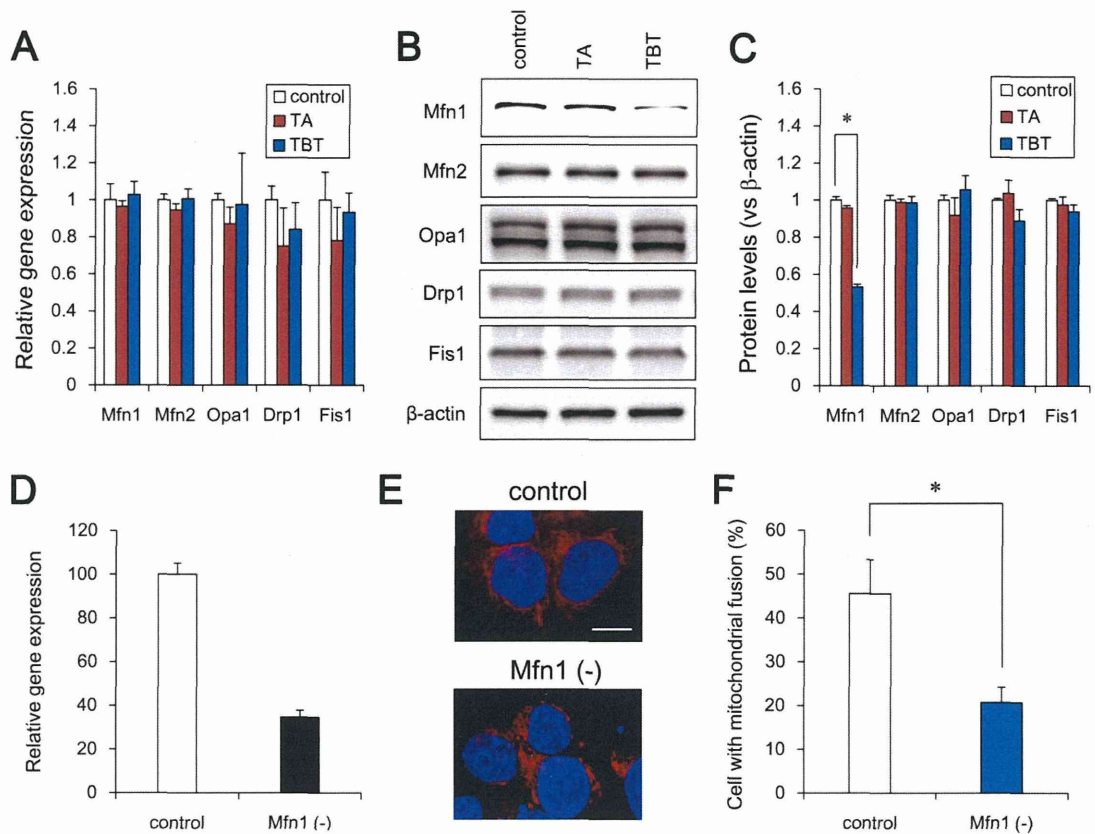


図3 トリブチルスズによる Mfn の分解

- A) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に RNA を回収した。Mfn1, Mfn2, Opa1, Drp1, Fis1 の qPCR を行った。
- B) iPS 細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に蛋白質を回収した。Mfn1, Mfn2, Opa1, Drp1, Fis1 のウェスタンブロットを行った。
- C) B)の結果を定量的に評価した。TBT で Mfn1 が分解した。
- D) レンチウイルスを用いて iPS 細胞に Mfn1 shRNA を導入した後、RNA を回収した。Mfn1 ノックダウン効率を qPCR にて調べた。
- E) Mfn1 ノックダウン細胞のミトコンドリア形態を共焦点顕微鏡で観察した。
- F) E)の結果を定量的に評価した。Mfn1 ノックダウンによりミトコンドリア分裂低下が認められた。

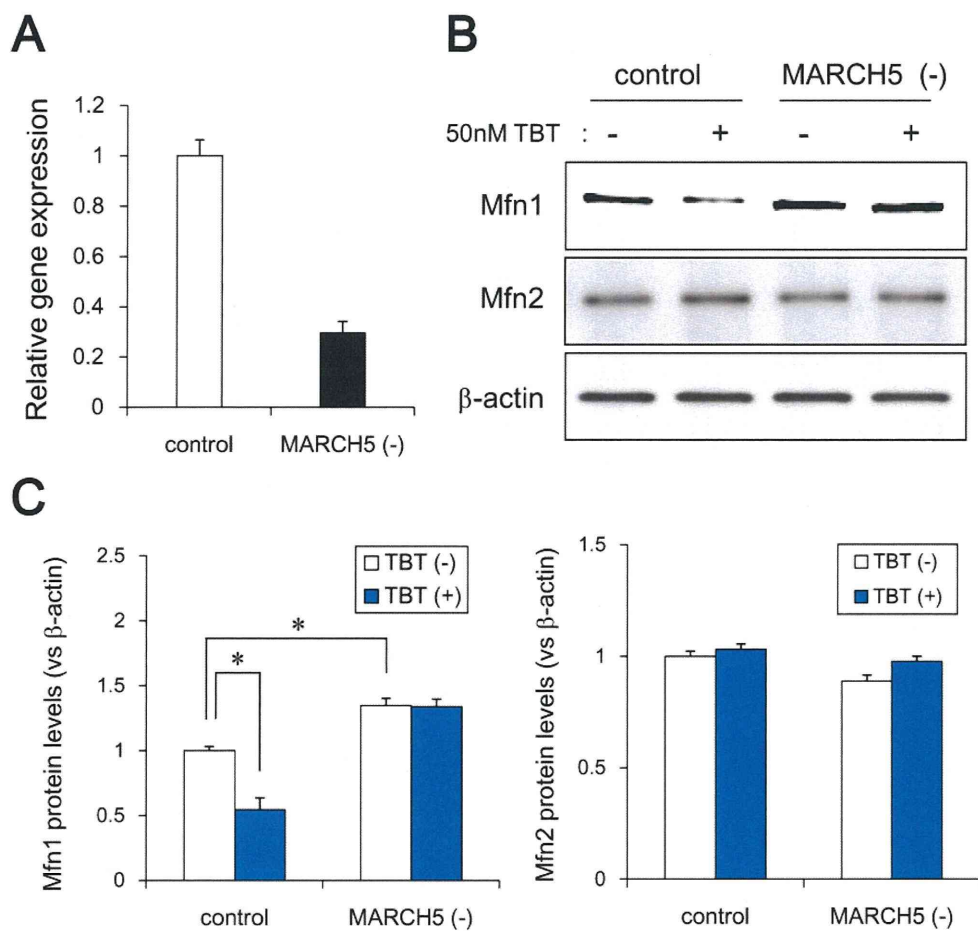


図4 トリブチルスズの Mfn1 分解における MARCH5 の関与

A) iPS 細胞に MARCH5 siRNA を導入した後、RNA を回収した。MARCH5 ノックダウン効率を qPCR にて調べた。

B) MARCH5 ノックダウン細胞に 50nM の TBT を曝露させ、72 時間後に蛋白質を回収した。Mfn1, Mfn2 のウェスタンブロットを行った。

C) B) の結果を定量的に評価した。MARCH5 ノックダウンにより TBT の Mfn1 分解が阻害された。

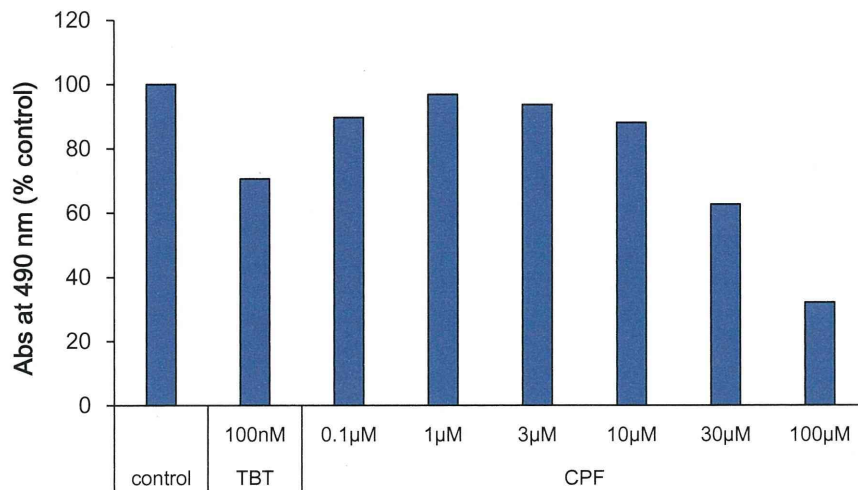


図5 クロルピリホスによる NT2/D1 細胞の増殖抑制
 NT2/D1 細胞において、クロルピリホスの暴露による濃度依存的な増殖低下が認められた。

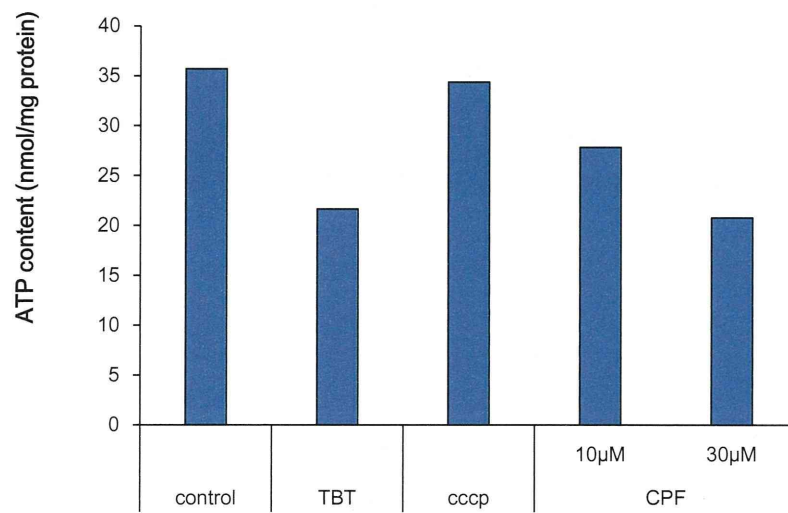


図6 クロルピリホスによる NT2/D1 細胞の ATP 産生抑制

NT2/D1 細胞において、クロルピリホスの暴露による濃度依存的な ATP 産生抑制が認められた。

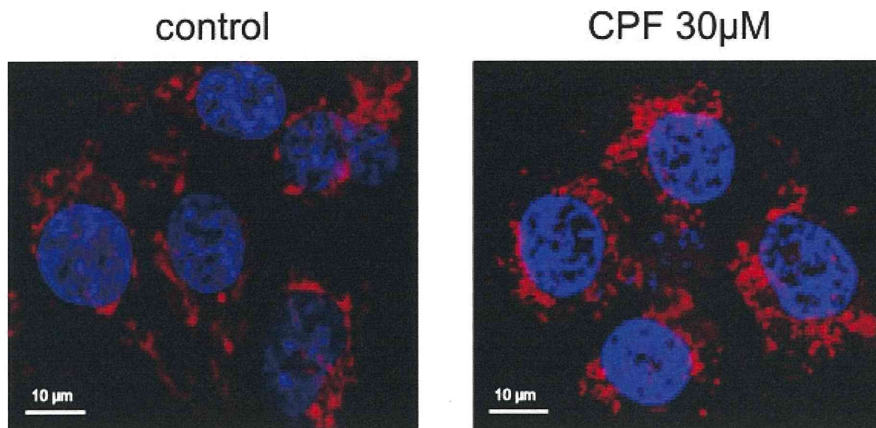


図7 クロルピリホスによるミトコンドリア分裂促進
NT2/D1細胞において、30μM クロルピリホスの暴露によりミトコンドリア分裂促進が認められた。