

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

ヒト幹細胞の分化による評価法の開発

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 iPS 細胞を用いて、化学物質さらには医薬品についても影響評価に関する指標の最適化を行った。その結果、遅発性神経毒性が懸念される船底防汚剤であるトリブチルスズ (TBT) 曝露により、ヒト iPS 細胞における神経分化の抑制が認められた。また分化抑制メカニズムとして、Mfn1 分解を介したミトコンドリア機能異常を見出した。さらに医薬品の中で、遅発性神経毒性が懸念されている抗がん剤 5 フルオロウラシル (5-FU) 投与により同様のミトコンドリア異常及び神経分化抑制を見出した。以上より、ヒト iPS 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や医薬品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影響や医薬品の副作用が指摘されている (Robaey et al., *Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2008; Landrigan et al., *Environ. Health Perspect. Med.*, 2012; Ouzir et al., *Food Chem. Toxicol.*, 2016)。ヒト iPS 細胞はヒト発生過程を *in vitro* で模倣できることから、化学物質や医薬品の神経毒性を検出できる可能性が考えられる。しかし、評価系としての手法は確立されていない。

本研究では、化学物質や医薬品の発達期における毒性を評価するために、ヒト iPS 細胞を用いて分化に対する影響を調べた。評価系の構築には、HESI と共有している発達毒性が懸念される陽性対照物質のリストから、船底防汚剤であるトリブチルスズ (TBT) と抗がん剤である 5 フルオロウラシル (5-FU) を選択した。また陰性対照としてアスコルビン酸及びソルビトールを選択した。

B. 研究方法

1. 細胞

ヒト iPS 細胞株 253G1 (Nakagawa et al., *Nat. Biotechnol.*, 2008) は、TeSR-E8 培地 (Stem Cell Technologies) にてフィーダーフリー[マトリゲル (BD Biosciences) コート]の条件で培養

した。

2. 三胚葉分化

外胚葉への分化は Dual smad 阻害法 (Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009) に従い、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 (Wako) 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 (Wako) を用いて iPS 細胞を 2 日間培養した。中胚葉への分化は GSK3 阻害剤 CHIR99021 (Wako) を用いて iPS 細胞を 1 日培養した (Lian et al., *Nat. Protoc.*, 2013)。内胚葉への分化は activinA (R&D)、Wnt3a (R&D)、さらに HDAC 阻害剤 NaB (Sigma) を用いて iPS 細胞を 4 日間培養した (Kajiwara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012)。

3. 神経分化誘導

上記 Dual smad 阻害法を用いて、LDN193189 及び SB431542 により iPS 細胞を外胚葉からさらに神経前駆細胞へと分化させた。

4. ATP 量

ルシフェラーゼ法に基づいて定量した。

5. qPCR

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

6. 細胞染色

細胞を 4% PFA で固定後、抗 PAX6 抗体

(Biolegend) を用いて染色を行った。さらに核を DAPI 染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。

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 細胞の分化に対する TBT の作用

まず iPS 細胞の分化への影響を検討するために、三胚葉へ分化させ TBT の影響を調べた。TBT 曝露した iPS 細胞を三胚葉へ分化させた結果、Dual smad 阻害法で分化させた外胚葉においてマーカーの OTX2 (Mortensen et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2015) や IRX1 (Houweling et al., *Mech. Dev.*, 2001) の発現低下が認められた (図 1)。一方、中胚葉や内胚葉分化では各々のマーカーに影響はなかった。したがって、TBT は iPS 細胞の外胚葉分化誘導を阻害することが明らかとなった。

TBT が iPS 細胞の外胚葉分化を阻害したので、さらに神経前駆細胞へと分化させて、TBT 曝露の影響を検討した。TBT 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、神経分化マーカーである PAX6 (Manuel et al., *Front. Cell Neurosci.*, 2015) 陽性細胞数の低下が認められた (図 2)。したがって、TBT は iPS 細胞の神経分化誘導を阻害することが明らかとなった。

我々はこれまでに TBT 曝露した iPS 細胞でミトコンドリア形態制御因子の発現を検討した結果、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なかったが、Mfn1 タンパク質が分解されることを見出している (Yamada et al., *Toxicol. In Vitro*, 2016)。さらに Mfn1 分解に伴い、細胞内 ATP 含量の低下やミトコンドリア膜電位の低下といったミトコンドリア機能異常が引き起こされることを見出している (Yamada et al., *Toxicol. In Vitro*, 2016)。

そこで TBT による神経分化の阻害がミトコンドリア異常を介しているかを明らかにするために、Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞 (論文発表 3) を用いて、神経分化誘導を行った。その結果、Mfn1 ノックダウンにより、TBT 曝露と同様に、OTX2 の遺伝子発現や PAX6 陽性細胞数の低下が認められた (図 3)。したがって、TBT による神経分化の阻害は、Mfn1 分解を介したミトコンドリア異常により引き起こされることが示唆された。

2. TBT の神経分化阻害における Erk シグナルの関与

ミトコンドリア機能の破綻は Erk のリン酸化を引き起こすことが報告されている (Yu et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012)。一方、Erk のリン酸化によって OTX2 の発現が抑制され神経分化が阻害されるという報告もある (Greber et al., *EMBO J.*, 2011)。したがって、TBT による神経分化阻害の経路として Erk シグナルの関与が考えられる。まず TBT の作用に対する Erk シグナルの関与を調べるために、ヒト iPS 細胞に TBT を曝露した結果、Erk のリン酸化レベルの亢進が認められた。またこのリン酸化は Erk 阻害剤 U0126 処理により消失した (図 4A, B)。さらに神経 (外胚葉) 分化時の TBT 曝露による OTX2 の低下は、U0126 処理により回復した (図 4C)。我々はこれまでに Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞において Erk リン酸化レベルが亢進することを報告している (本リン酸化は U0126 処理で消失する)。さらに Mfn1 ノックダウンによる神経マーカーの低下が U0126 処理により回復することも見出している。したがって、TBT のミトコンドリア異常を介した神経分化阻害には Erk シグナルが関与していることが示唆された (図 5)。

3. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能や神経分化に対する医薬品 5-FU の影響

発達神経毒性が懸念される抗がん剤 5-FU を用いて、これまで見出した iPS 細胞の評価指標への影響を検討した。まず 5-FU 曝露は細胞内 ATP 量の低下を引き起こした (図 6A)。さらに 5-FU 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、PAX6 遺伝子の発現

低下が認められた (図 6B)。一方、陰性対照であるアスコルビン酸及びソルビトール添加は ATP 量や PAX6 発現に影響を及ぼさなかった。したがって、5-FU は TBT と同様に、ミトコンドリア機能異常を引き起こし、神経分化を阻害する可能性が明らかとなった。

以上より、医薬品についても、iPS 細胞のミトコンドリア機能を指標にして発達神経毒性を評価できる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、これまで見出したミトコンドリア指標 (ATP 産生など) により発達神経毒性が懸念される化学物質や医薬品の影響を評価できることを明らかにした。特に、iPS 細胞で使用した TBT や 5-FU は各々血中に存在しうる濃度 (Findlay et al., *Ann. Oncol.*, 1996; Whalen et al., *Environ. Res.*, 1999) をアッセイに使用しており、本アッセイ系は非常に好感度であると考えられる。

今回、iPS 細胞を用いて TBT の毒性作用点として、ミトコンドリア異常を介した神経分化の阻害を見出し、CPF と同様の神経毒性を示すことを明らかにした (論文発表 1, 3)。5-FU も同様のミトコンドリア異常や神経分化阻害を引き起こす (論文発表 2) ことから、発達神経毒性評価においてミトコンドリア機能は有効であり、医薬品など幅広く応用できる可能性が期待される。今後も iPS 細胞において、発達神経毒性が懸念される被験物質を増やすことで、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い、簡便で再現性のある評価法の確立を目指す。

また、研究代表者として、HESI NeuTox の国際検証試験の議論を新たに開始して、連携を取りながら試験法の確立に取り組みたい。

E. 結論

ヒト iPS 細胞の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や医薬品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

- [1] Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y., Nomura Y., Yoshida S., Kanda Y. “Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells.” 論文投稿中
- [2] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. “5-Fluorouracil inhibits neural induction via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells.” 論文投稿中
- [3] Yamada S., Kubo Y., Yamazaki D., Sekino Y. and Kanda Y. “Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells.” *Sci Rep.* (2017) 7:40925

2. 学会発表

- [1] 山田茂、久保祐亮、山崎大樹、関野祐子、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化におけるミトコンドリア因子 Mfn1 の機能、第 90 回日本薬理学会、2017 長崎
- [2] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化に対するトリブチルスズの影響、第 44 回日本毒性学会、2017 横浜
- [3] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化に対するクロルピリホス曝露の影響、第 136 回日本薬理学会関東部会、2017 東京
- [4] 山田茂、山崎大樹、諫田泰成：ヒト iPS 細胞の神経分化能を指標にした発達神経毒性評価系の開発、第 3 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2017 東京
- [5] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. : Development of human iPS cell-based platform for developmental neurotoxicity testing, SPS, 2017, Berlin

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

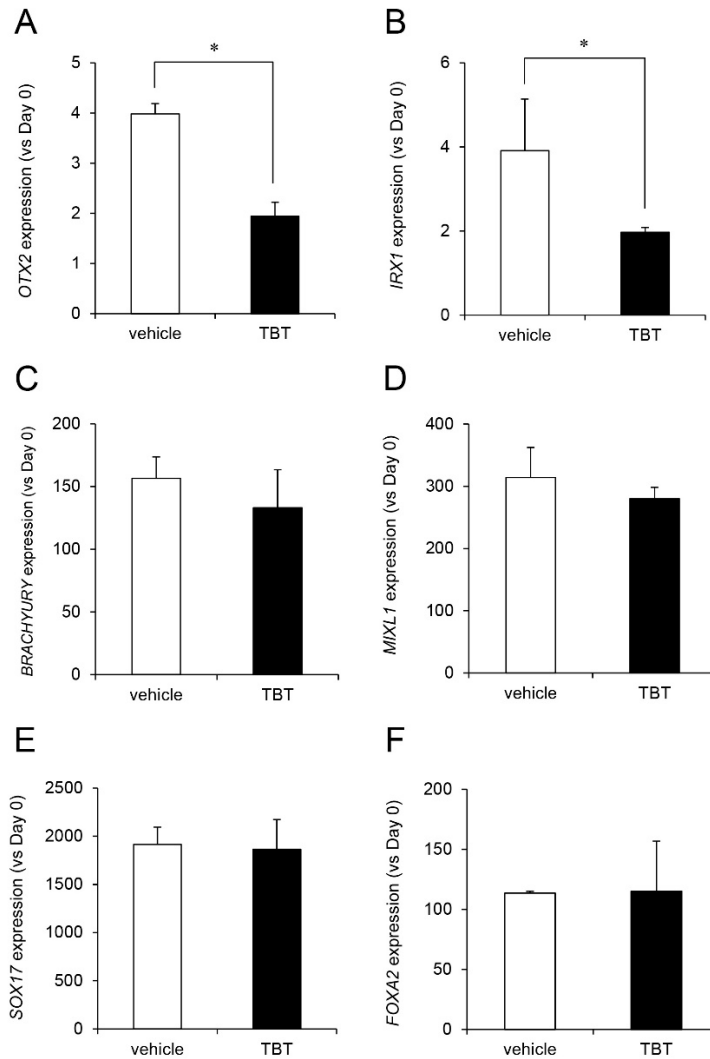


図1 TBTによる外胚葉分化阻害

50 nM の TBT を曝露したヒト iPS 細胞に外・中・内胚葉分化刺激を与えた後、各々の分化マーカーの遺伝子発現を qPCR で調べた。

- (A) 外胚葉マーカー OTX2 遺伝子の発現変化
- (B) 外胚葉マーカー IRX1 遺伝子の発現変化
- (C) 中胚葉マーカー BRACHYURY 遺伝子の発現変化
- (D) 中胚葉マーカー MIXL1 遺伝子の発現変化
- (E) 内胚葉マーカー SOX17 遺伝子の発現変化
- (F) 内胚葉マーカー FOXA2 遺伝子の発現変化

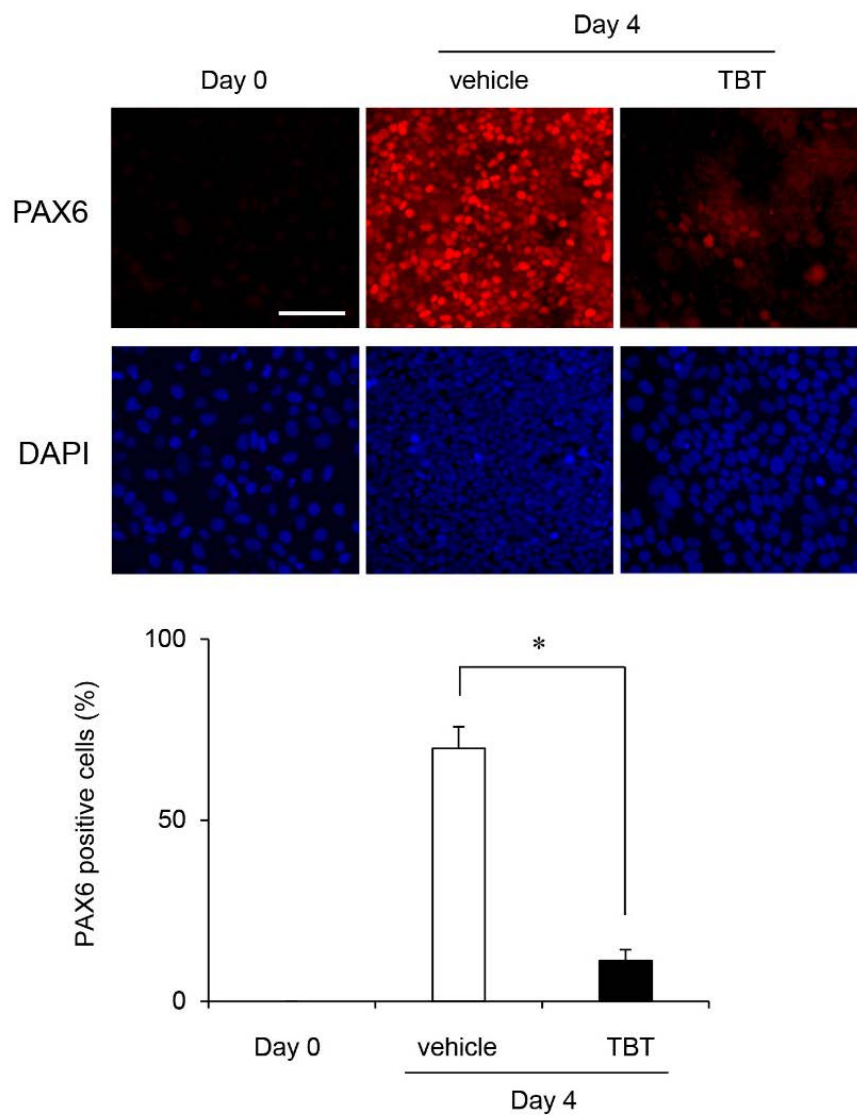


図2 TBTによる神経分化誘導の阻害

50 nM の TBT を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化刺激を与えた後、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の陽性細胞数を調べた。

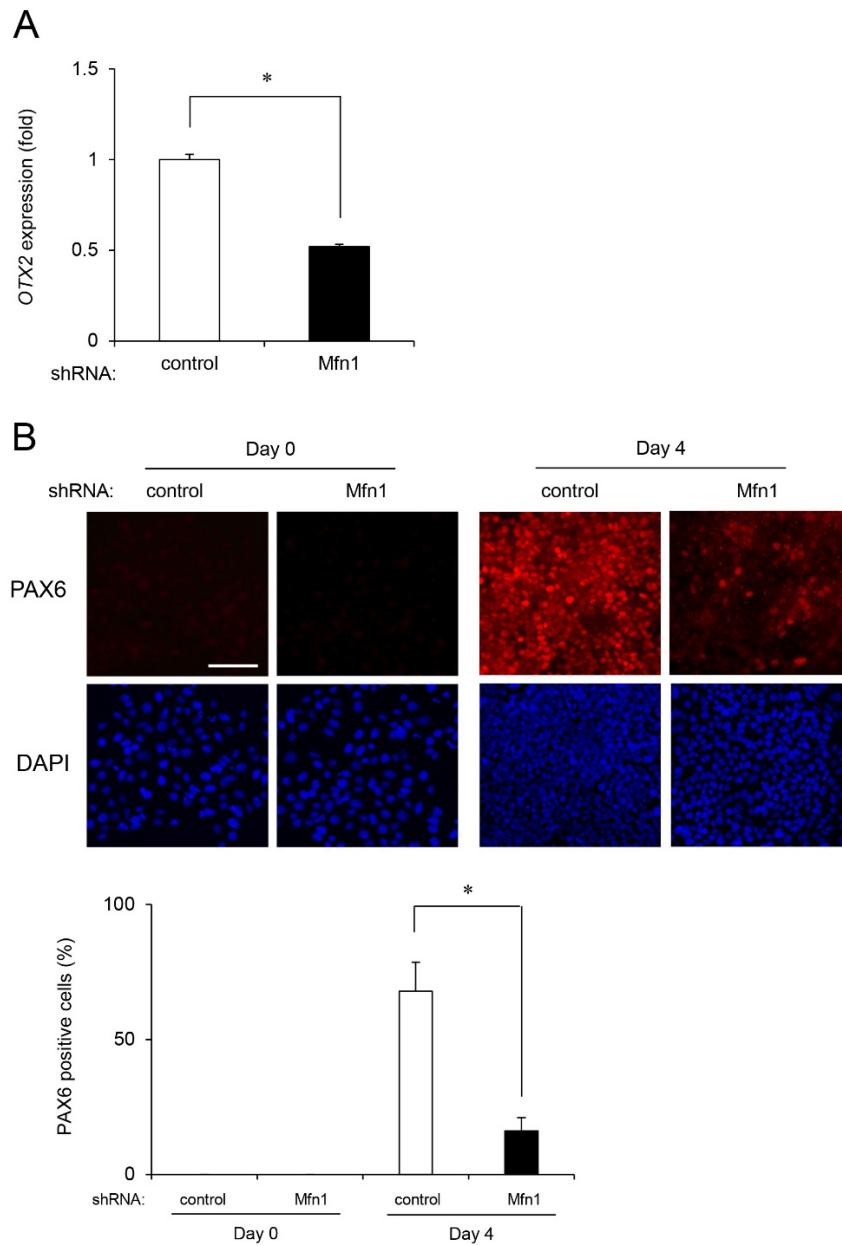


図3 Mfn1 ノックダウンによる神経分化誘導の阻害

Mfn1 をノックダウンしたヒト iPS 細胞に神経分化刺激を与えた後、タイムコースをとって神経分化マーカーの発現を調べた。

(A) 神経分化 2 日目の外胚葉マーカー OTX2 遺伝子の発現変化

(B) 神経分化 4 日目の神経分化マーカー PAX6 陽性細胞数の変化

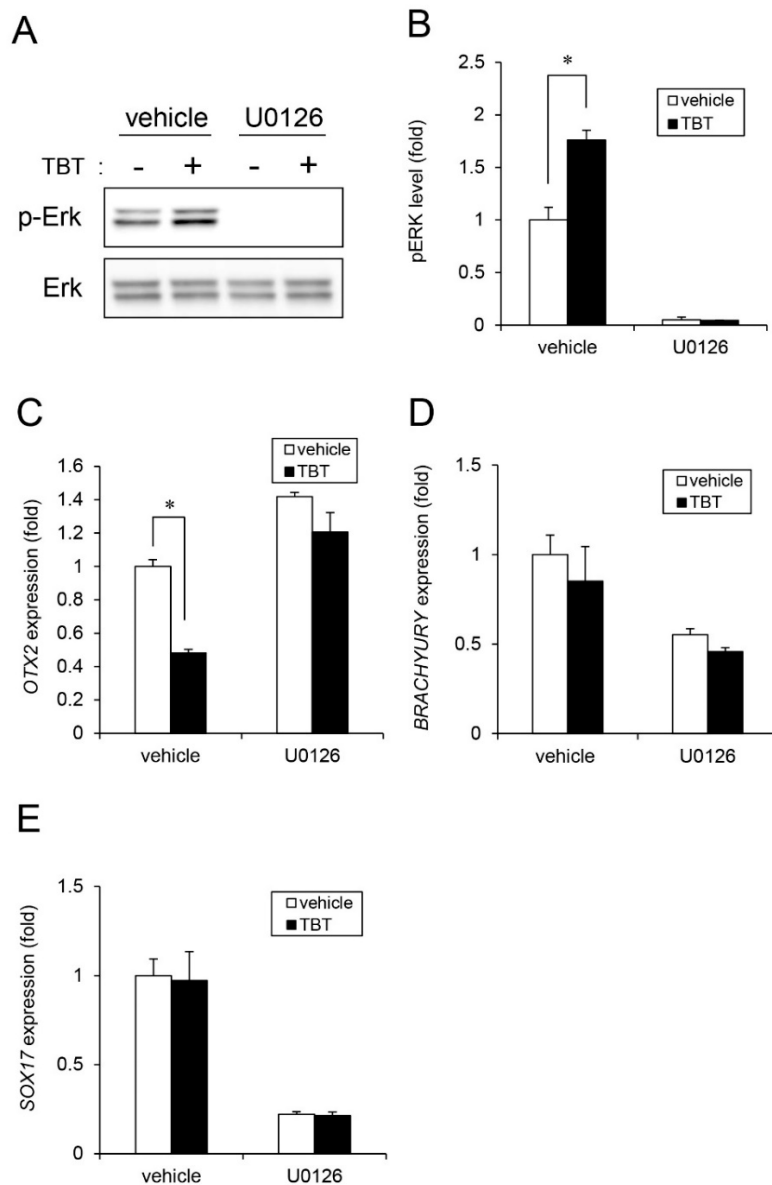


図4 TBTの神経（外胚葉）誘導阻害におけるErkシグナルの関与

(A) 50 nMのTBTを曝露したヒトiPS細胞からcell lysateを作成し、Erkのリン酸化レベルをウエスタン法によって調べた結果、Erkリン酸化の亢進が認められた。このリン酸化レベルの亢進はErk阻害剤であるU0126処理により消失した。

(B) (A)の結果を定量的に評価した。

(C)ヒトiPS細胞の神経（外胚葉）誘導において、TBT曝露によるOTX2の発現低下は、U0126処理により回復した。

(D)ヒトiPS細胞の中胚葉誘導において、TBT曝露によるBRACHYURYの発現変化は認められなかった。

(E)ヒトiPS細胞の内胚葉誘導において、TBT曝露によるSOX17の発現変化は認められなかった。

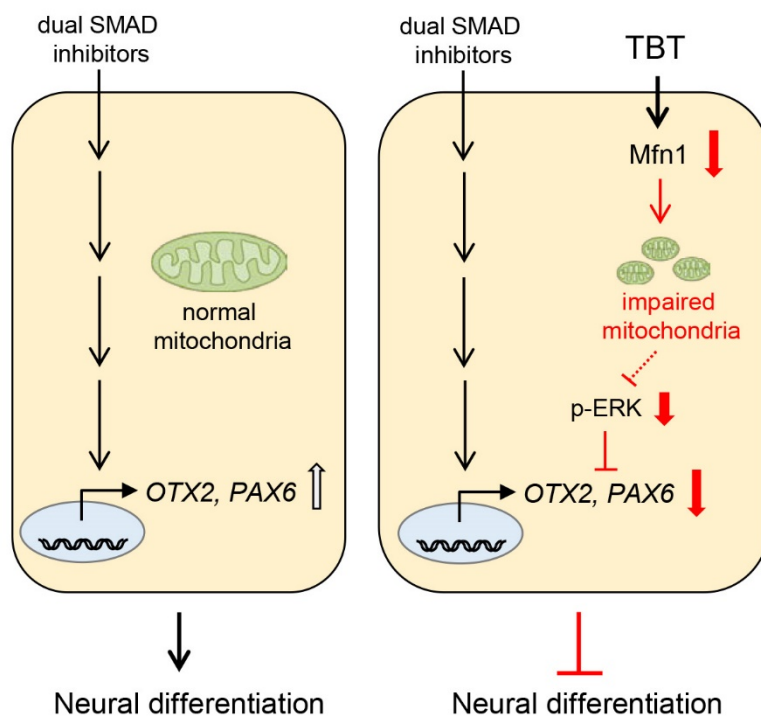


図5 TBTの神経分化阻害作用(模式図)

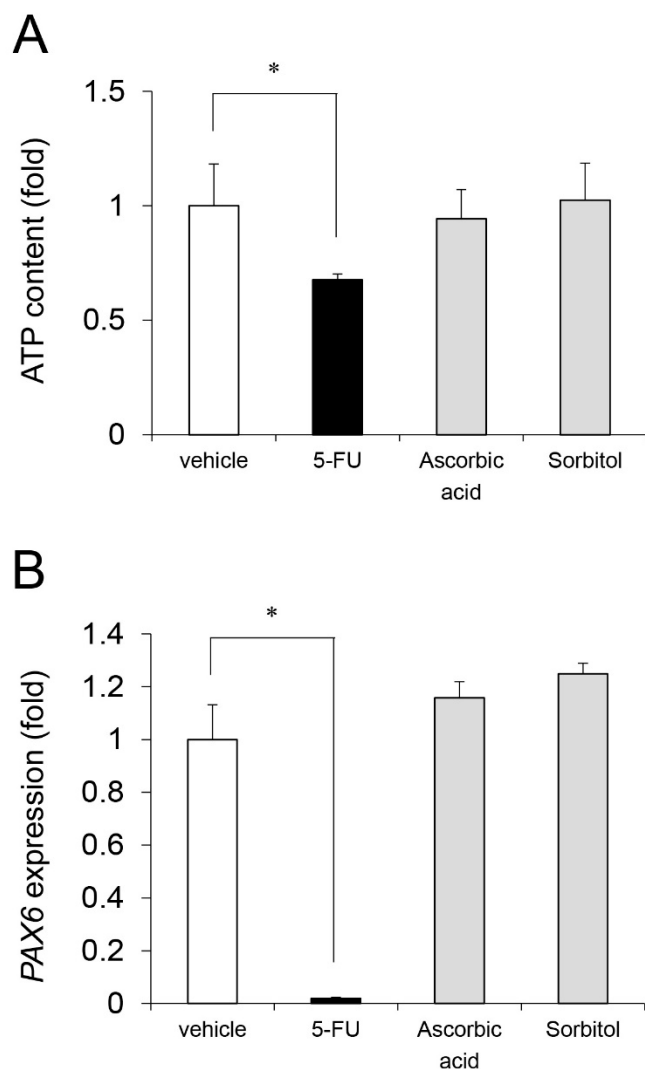


図6 5-FUによるATP産生及び神経分化誘導の阻害

(A) 1 μ Mの5-FUを曝露したヒトiPS細胞において細胞内ATP量を測定した。陰性対照としてアスコルビン酸及びソルビトール添加(各々100 μ M)の影響も調べた。

(B) 1 μ Mの5-FUを曝露したヒトiPS細胞に神経分化刺激を与えた後、4日目に神経分化マーカーPAX6遺伝子の発現変化を調べた。陰性対照としてアスコルビン酸及びソルビトール添加(各々100 μ M)の影響も調べた。