

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

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長  
諫田 泰成

要旨

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質や医薬品の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農薬クロルピリホスや防汚剤トリブチルスズ曝露により、ヒト iPS 細胞において ATP 産生や神経分化の抑制が認められた。そこで、多数の化学物質を用いて大規模検証試験を実施したところ、ATP により懸念のある化学物質をスクリーニングできる可能性を見出している。以上より、ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能を指標にして、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暴露の可能性が考えられる。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、医薬品を含む化学物質の発達期における毒性を評価するために、ヒト iPS 細胞を用いて発達神経毒性を評価できるか検討を行った。特に、case study として近年毒性が懸念されているナノマテリアル(銀ナノ粒子, AgNPs) を追加して評価を行った。

本年度は、ヒト iPS 細胞における毒性メカニズムの検討を行い、毒性評価における有用性を検証した。また、HESI NeuTox のメンバーとなり、国際検証試験に取り組んだ。

B. 研究方法

1. 細胞

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 MitoTracker Red CMXRos および核を DAPI により染色し、confocal 顕微鏡 (Nikon A1) で観察した。点状のミトコンドリアが 10%未

満の細胞数を計測した。

3. ATP 量

ルシフェラーゼ法により計測した。

4. qPCR

TRIzol 試薬を用いて RNA を抽出した。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った。

5. 神経分化

Dual smad 阻害法を用いて、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 及び Activin シグナル阻害剤 SB431542 により iPS 細胞を神経外胚葉から神経前駆細胞へと分化させた。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する化学物質の作用

発達神経毒性が懸念される 40 種類の化学物質を用いて iPS 細胞のミトコンドリアへの影響を検討した。その結果、iPS 細胞の ATP 量だけでも 7 割の化合物の毒性を検出できることを見出した。一方、陰性対照のソルビトールやアスコルビン酸では陰性にカテゴリー化された。したがって、iPS 細胞のミトコンドリア機能異常は良い評価指標になることが示唆された。

2. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する AgNP の作用

発達神経毒性が懸念される AgNP を用いて iPS 細胞への影響を検討した。AgNP 曝露

は細胞内 ATP 含量の低下、ミトコンドリア膜電位の低下およびミトコンドリア形態異常を引き起こした(図1)。したがって、iPS細胞において AgNP はミトコンドリア機能異常を引き起こすことが示唆された。

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。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(図2A)。一方で、AgNP 暴露によって Mfn1 のタンパク分解が誘導されることを見出した(図2B, C)。すでに報告したように shRNA を用いて Mfn1 をノックダウンするとミトコンドリア形態異常が観察されることから、AgNP 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。

### 3. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する AgNP の作用

AgNP が iPS 細胞の分化に及ぼす影響を調べるために、Dual smad 阻害法を用いて、iPS 細胞の神経分化誘導を行った。AgNP 曝露した iPS 細胞に神経分化刺激を与えた結果、神経外胚葉のマーカーである OTX2, PAX6 (Manuel et al., *Front. Cell Neurosci.*, 2015), FOXG1 (Shen et al., *Hippocampus*, 2006) や神経前駆細胞のマーカーである Nestin (Hendrickson et al., *PLoS One*, 2011) の発現低下が認められた(図3)。したがって、AgNP は iPS 細胞の初期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 Mfn1 をノックダウンした iPS 細胞を用いて、神経分化誘導を行った結果、OTX2, PAX6, FOXG1, Nestin の発現が低下することを見出している。したがって、AgNP 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機能異常により引き起こされると考えられる。

### 4. AgNP 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、AgNP 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 AgNP 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 AgNP 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 AgNP 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 のリン酸化を調べた結果、Erk リン酸化レベルの亢進を見出している。またこのリン酸化は U0126 処理で消失し、Mfn1 ノックダウンによる OTX2 経路の低下は U0126 処理により回復することも見出している。したがって、AgNP によるミトコンドリア機能異常を介した神経分化の阻害は Erk シグナルが関与していることが示唆された(図5)。

以上より、iPS 細胞において TBT と同様に、AgNP はミトコンドリア機能異常を引き起こすことが明らかになった。また、iPS 細胞で ATP 量、ミトコンドリア膜電位・形態さらには神経分化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

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、これまで見出した指標により発達神経毒性が懸念される化学物質の検証試験を実施した。その結果、ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能により発達神経毒性の懸念のある化合物を評価できることを明らかにした。神経分化能に関しても、今後化学物質の数を増やして、検証する必要がある。

また、ヒト iPS 細胞を用いて、ゼブラフィッシュで発生毒性が認められる銀ナノマテリアルを評価したところ、ATP 産生の低下を見出した(論文1)。発達神経毒性が懸念される抗がん剤 5-フルオロウラシルでも同様の事象が認められることから(論文3) 化合物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。

また、諫田は OECD DNT 専門委員として 2018 年 3 月以降に電話会議に参加している。また、HESI NeuTox の運営委員としても議論を行っており、in vivo と in vitro の相関やヒトにおける予測性をどのように考えるのか議論している。これらの国際連携を取りなが

ら、iPS 細胞などの有用性や適用限界などを明らかにする必要がある。さらに、QSAR などとの組み合わせを議論することにより、さらに予測性の高い試験法に発展できることが期待され、引き続き OECD で議論を深める予定である。

#### E. 結論

ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能や分化を指標に、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

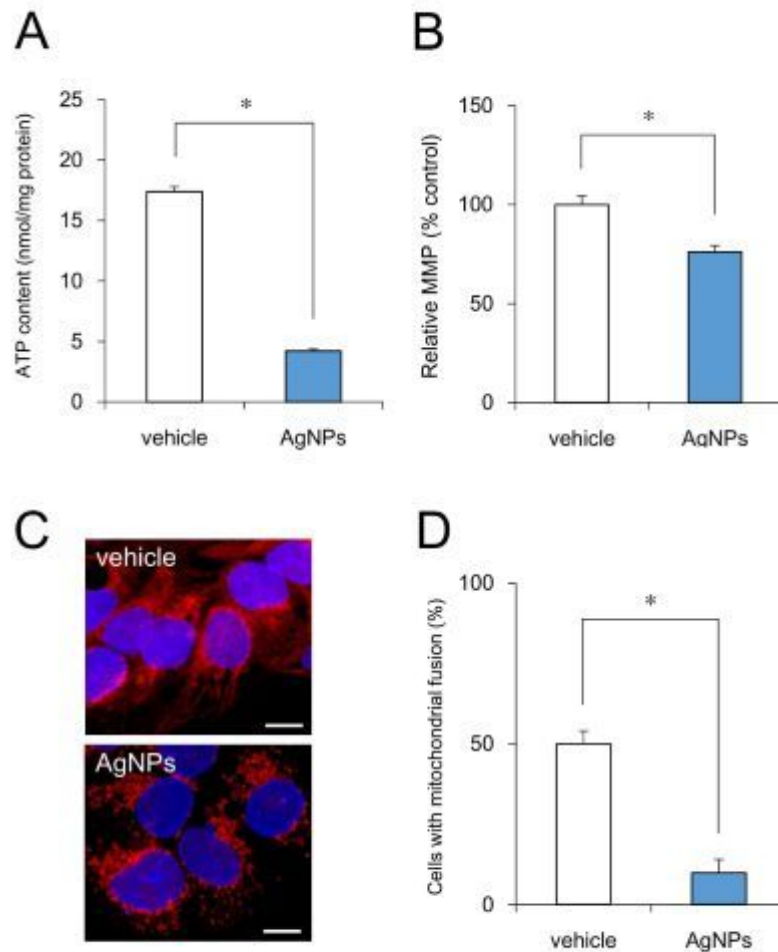
- [1] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. Silver nanoparticles inhibit neural induction in human induced pluripotent stem cells. *Nanotoxicology*. 14, 1-11 (2018).
- [2] Yamada S, Kubo Y, Yamazaki D, Sekino Y, Nomura Y, Yoshida S, Kanda Y. Tributyltin Inhibits Neural Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 8, 12155 (2018).
- [3] Yamada S, Yamazaki D, Kanda Y. 5-Fluorouracil inhibits neural differentiation via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells. *J Toxicol Sci*. 43, 727-734 (2018).
- [4] Fueta Y, Sekino Y, Yoshida S, Kanda Y, Ueno S. Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus. *Neurotoxicology* 65:1-8 (2018).
- [5] Fueta Y, Ishidao T, Ueno S, Yoshida Y, Kanda Y, Hori H. Prenatal exposure to 1-bromopropane causes delayed adverse effects on hippocampal neuronal excitability in the CA1 subfield of rat offspring. *J Occup Health* 60:74-79 (2018)
- [6] 佐塚文乃, 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞を用いた医薬品の副作用予測法の開発と国際標準化, 情報技術強会 (印刷中)

##### 2. 学会発表

- [1] Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda, Y.: Novel role of mitochondrial fusion factor Mfn1 in neural differentiation of human iPS cells, 18th

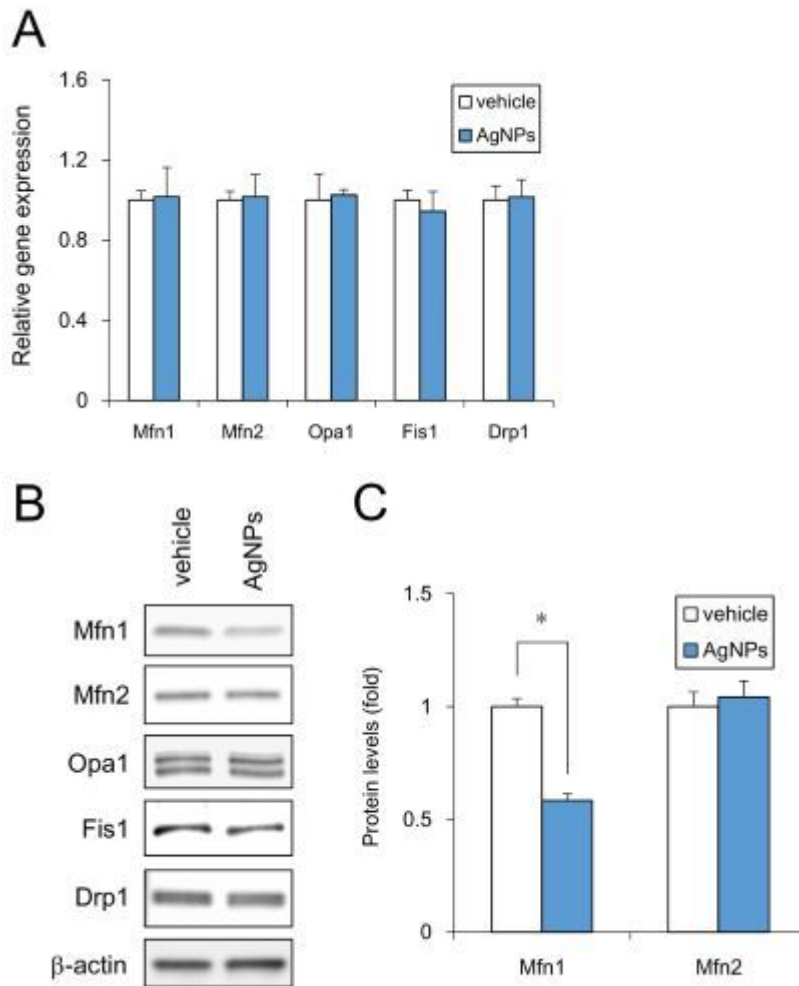
World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 京都 (2018.7)

- [2] 山田茂, 山崎大樹, 諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づく発達神経毒性の評価, 第 4 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, 東京 (2018.9)
- [3] Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda Y.: Assessment of neurotoxicity of silver nanoparticles using human iPS cell-based platform, Safety Pharmacology Society 2018, ワシントン DC (2018.10)
- [4] Yamazaki, D., Yamada, S., Kanda, Y.: Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells, China TATT-Asia CA 2018, 広州 (2018.10)
- [5] Yamada, S., Yamazaki, D., Kanda, Y.: Silver nanoparticles inhibit neural induction via mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells, Society for Neuroscience, サンディエゴ (2018.11)
- [6] 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銀ナノ粒子曝露の影響, メタルバイオサイエンス研究会, 仙台 (2018.11)
- [7] 諫田泰成: ヒト iPS 細胞技術による新たなインビトロ神経毒性試験法の開発と国際動向, 第 92 回日本薬理学会, 大阪 (2019.3)
- [8] 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, 第 92 回日本薬理学会, 大阪 (2019.3) など。



**図1 AgNPによるミトコンドリアの機能異常**

- A) ヒト iPS 細胞において、AgNP (0.3 μg/ml) の暴露によって ATP 産生低下が認められた。
- B) ヒト iPS 細胞において、AgNP の暴露によってミトコンドリア膜電位の低下が認められた。
- C) ヒト iPS 細胞において、AgNP の暴露によってミトコンドリアの分裂が誘導された。
- D) C)の結果を定量的に評価した。

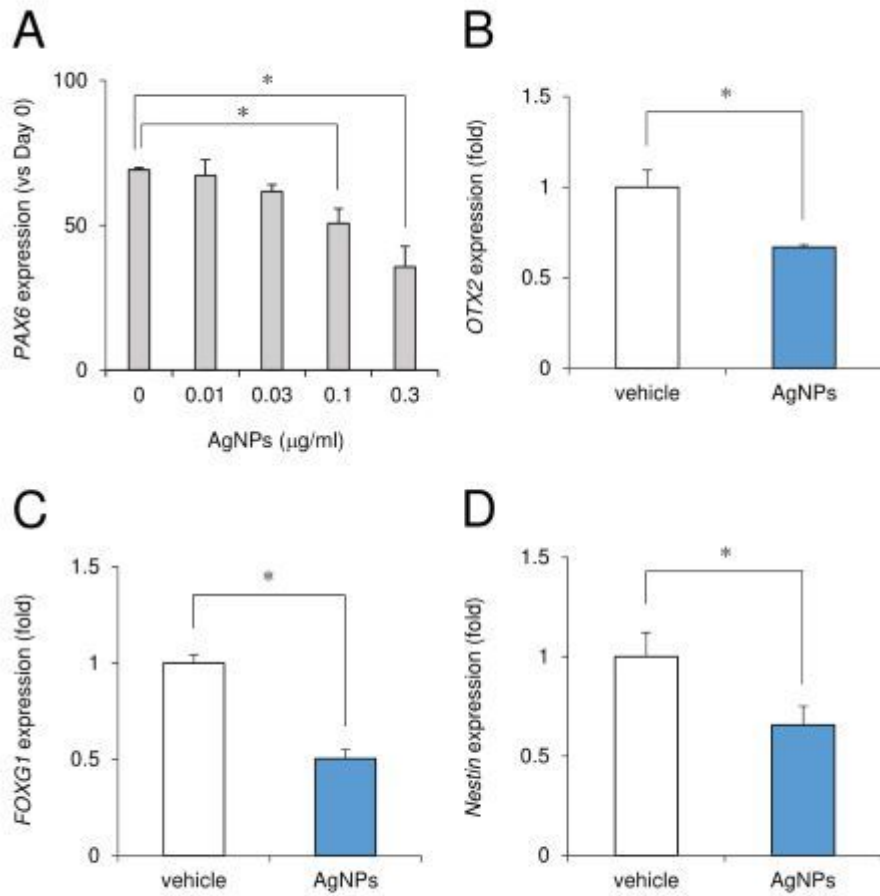


## 図2 AgNPによるMfn1の分解

A) 0.3  $\mu$ g/ml の AgNP を曝露したヒト iPS 細胞から RNA を抽出し、Mfn1、Mfn2、Opa1、Fis1、Drp1 遺伝子の qPCR を行った。

B) 0.3  $\mu$ g/ml の AgNP を曝露したヒト iPS 細胞から cell lysate を作成し、Mfn1、Mfn2、Opa1、Fis1、Drp1 蛋白質の発現をウエスタン法によって調べた。

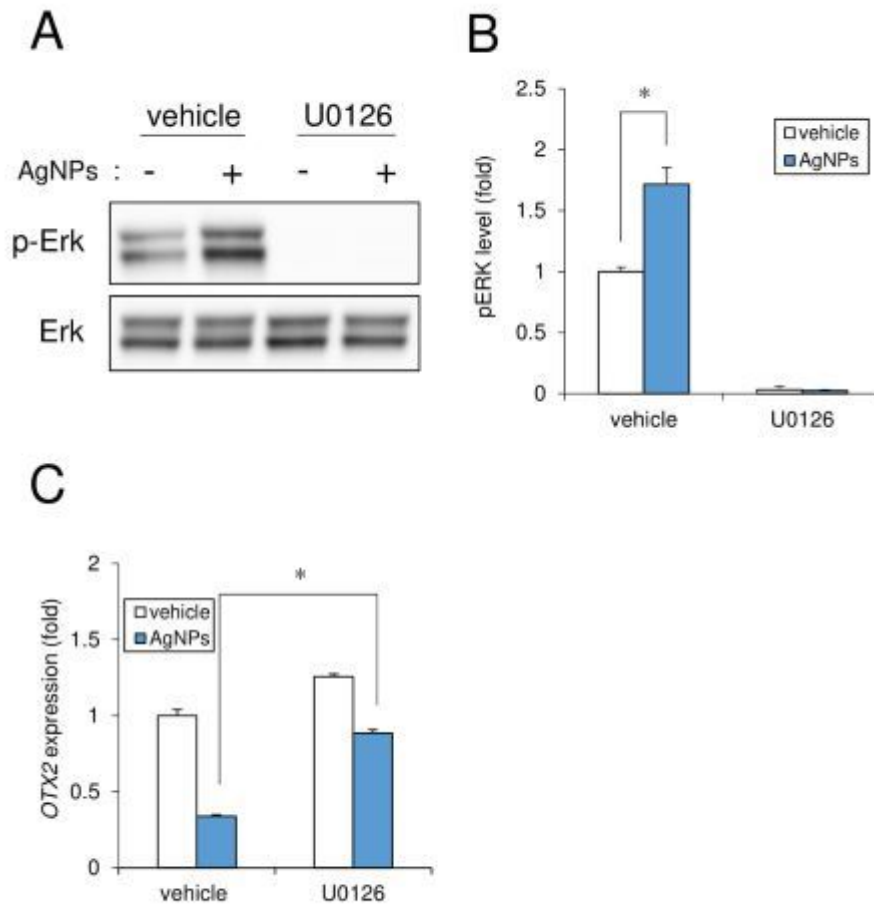
C) B) の Mfn1、Mfn2 蛋白質の発現を定量的に評価した。



### 図3 CPFによる神経分化誘導の阻害

0.3  $\mu\text{g/ml}$  の AgNP を曝露したヒト 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遺伝子発現を qPCR で調べた。

- A) 神経外胚葉マーカー-PAX6 遺伝子の発現変化
- B) 神経外胚葉マーカー-OTX2 遺伝子の発現変化
- C) 神経外胚葉マーカー-FOXG1 遺伝子の発現変化
- D) 神経前駆細胞マーカー-Nestin 遺伝子の発現変化



**図4 AgNPの神経誘導阻害におけるErkシグナルの関与**

A) 0.3 μg/mlのAgNP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細胞の神経分化誘導において、AgNP曝露によるOTX2の発現低下は、U0126処理により回復した。

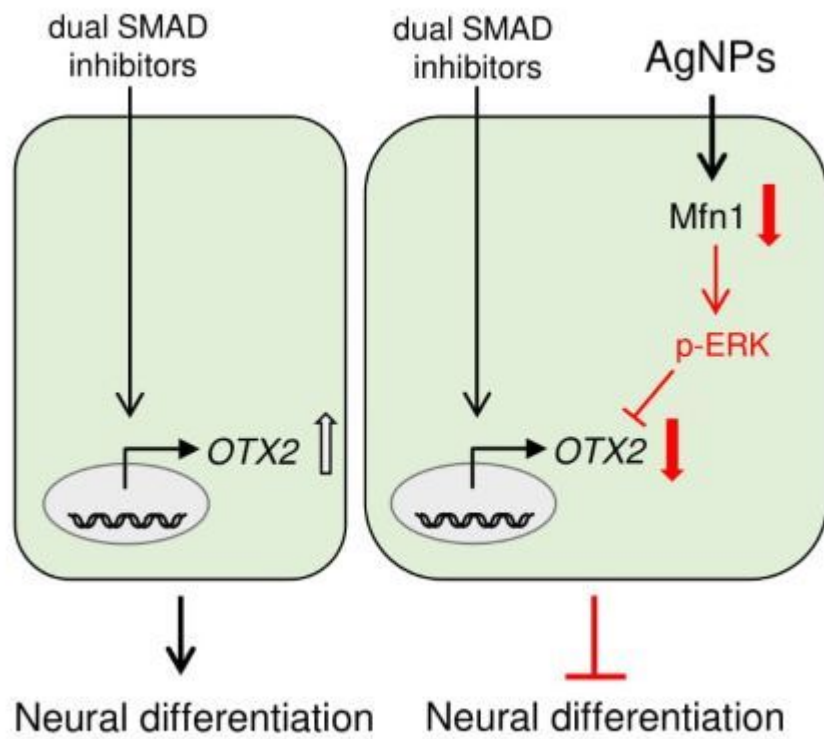


図5 AgNPの神経分化阻害作用(模式図)