

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長
諫田 泰成

要旨

ヒト iPS 細胞を用いて、化学物質、医薬品について影響評価に関する指標を検討した。その結果、遅発性神経毒性の可能性が懸念される農薬クロルピリホス（CPF）、船底防汚剤トリブチルスズ（TBT）などの曝露により、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、神経毒性の可能性が懸念される抗がん剤 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、成長期において発達神経毒性の可能性のある化学物質や医薬品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、環境中化学物質の暴露や医薬品の副作用の可能性が指摘されている（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、医薬品・化学物質など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・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の可能性が懸念される化合物リストから、農薬クロルピリホス（CPF）、船底防汚剤トリブチルスズ（TBT）、抗がん剤 5 フルオロウラシル（5-FU）を選択した。また陰性対照化合物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. 外胚葉分化

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。

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 細胞のミトコンドリア機能に対する CPF および TBT の作用

我々はこれまでに TBT を用いて iPS 細胞への影響を検討し、TBT がミトコンドリア融合因子 Mfn1 を分解してミトコンドリア機能異常を引き起こすことを報告している。本研究では発達神経毒性が懸念される CPF 用いて同様に iPS 細胞への影響を検討した。CPF 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 CPF は TBT 同様、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、CPF 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、CPF によるミトコンドリア機能の低下は TBT 同様、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。

2. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する CPF の作用

CPF 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。CPF 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 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 NCAM1 (Polo-Parada et al., *J. Neurosci.*, 2004) の発現低下が認められた (図 3)。したがって、CPF 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。

3. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する TBT の作用

まず iPS 細胞の神経分化への影響を検討するために、外胚葉へ分化させ TBT の影響を調べた。TBT 曝露した iPS 細胞を Dual smad 阻害法で外胚葉へ分化させた結果、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 4)。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 陽性細胞数の低下が認められた (図 5)。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。

4. CPF や TBT の神経分化阻害における Mfn1 の関与

次に CPF や 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、CPF や TBT 曝露と同様に、PAX6 や OTX2 の遺伝子発現低下が認められた (図 6)。

5. 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 7A)。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 7B)。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 CPF や 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。

9. ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に対する化学物質のコンコルダンス解析

これまでの結果から、CPF や 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 (図 8A)。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院生にカテゴライズされた。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 (図 8B)。

10. ヒト iPS 細胞の神経分化に対する化学物質の作用

CPF, TBT, 5-FU を用いて、化学物質を曝露した iPS 細胞に dual smad 阻害法を用いて、神経分化誘導を行った。その結果、神経外胚葉のマーカである PAX6, FOXG1 や神経前駆細胞のマーカである NCAM1, Nestin の発現低下が認められた。一方、陰性対照のソルビトールやアスコルビン酸では変化がなかった。したがって、CPF, TBT, 5-FU 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。以上より、iPS 細胞の神経分化等の指標により、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。

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 CPF, TBT, 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; Huen et al., *Environ. Res.*, 2012) 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 CPF や 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た。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., Asanagi M., Hirata N., Itagaki H., Sekino Y. and Kanda Y. “Tributyltin induces mitochondrial fission through Mfn1 degradation in human induced pluripotent stem cells.” *Toxicol. In Vitro.* (2016) 34:257-263
- [2] Asanagi M., Yamada S., Hirata N., Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y. and Kanda Y. “Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells.” *J. Toxicol. Sci.* (2016) 41:207-215
- [3] Hirata N., Yamada S., Asanagi M., Sekino Y. and Kanda Y. “Nicotine induces mitochondrial fission through mitofusin degradation in human multipotent embryonic carcinoma cells.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2016) 470:300-305
- [4] 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
- [5] 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.* (2018) 8:12155
- [6] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. “5-Fluorouracil inhibits neural induction via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells.” *Nanotoxicology* (2018) 1-11
- [7] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. “5-Fluorouracil inhibits neural induction via Mfn1/2 reduction in human induced pluripotent stem cells.” *J. Toxicol. Sci.*

(2018) 43:727-734

- [8] 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).
- [9] 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)
- [10] 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 (2019年2月発行)

2. 学会発表

- [1] 山田茂、麻薙美紀、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成: 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、2016 横浜
- [2] Yasunari Kanda, Shigeru Yamada, Naoya Hirata, Daiju Yamazaki, and Yuko Sekino. Role of mitochondrial dynamics in neural toxicity assessment in human iPS cells. 5th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology. US EPA Building Research Triangle Park, NC. 2016.9.29-30
- [3] 麻薙美紀、山田茂、平田尚也、板垣宏、関野祐子、諫田泰成: ヒト多能性幹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、2016 横浜
- [4] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能に基づいたクロルピリホスの毒性評価、第 134 回日本薬理学会関東部会、2016 大田原
- [5] 山田茂、久保祐亮、犬塚隆志、関野祐子、諫田泰成: ヒト iPS 細胞のミトコンドリア機能による医薬品の毒性評価、第 43 回日本毒性学会、2016 名古屋
- [6] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ミトコンドリアを指標としたヒト iPS 細胞毒性評価系の検討、第 2 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、2016 東京
- [7] 山田茂、関野祐子、諫田泰成: ミトコン

- ドリア機能を介した新規神経誘導メカニズム、第 39 回日本分子生物学会、2016 横浜
- [8] 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
- [9] 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
- [10] 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
- [11] 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
- [12] Yamada S., Yamazaki D., Kanda Y. : Development of human iPS cell-based platform for developmental neurotoxicity testing, SPS, 2017, Berlin
- [13] 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)
- [14] 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)
- [15] 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)
- [16] Yamazaki, D., Yamada, S., Kanda, Y.: Developmental neurotoxicity evaluation using human iPS cells, China TATT-Asia CA 2018, 広州(2018.10)
- [17] 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)
- [18] 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)
- [19] 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)
- [20] 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

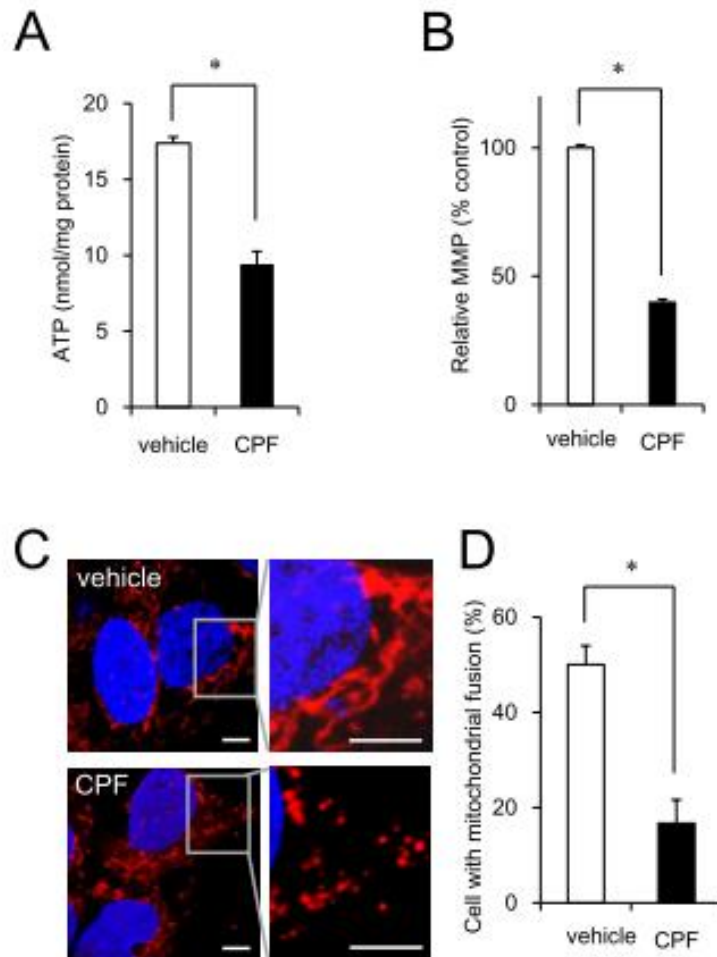


図1 CPFによるミトコンドリアの機能異常

- A) ヒト iPS 細胞において、CPF (30 μ M) 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、CPF 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、CPF 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。

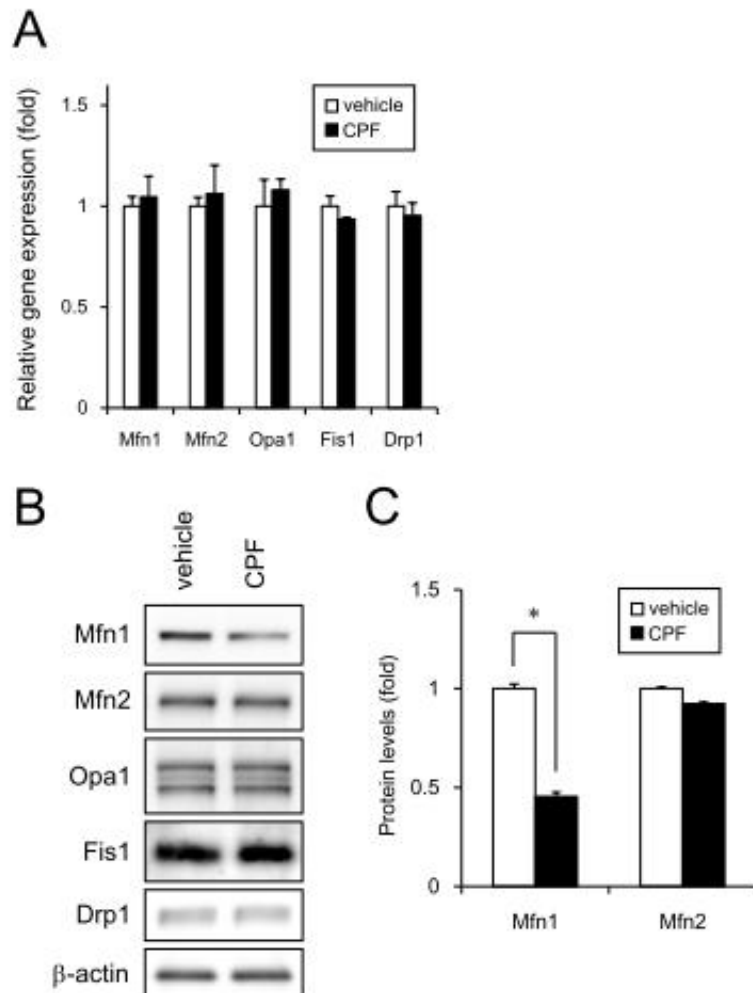


図2 CPFによるMfn1の分解

A) 30 μ M の CPF 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) 30 μ M の CPF 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。

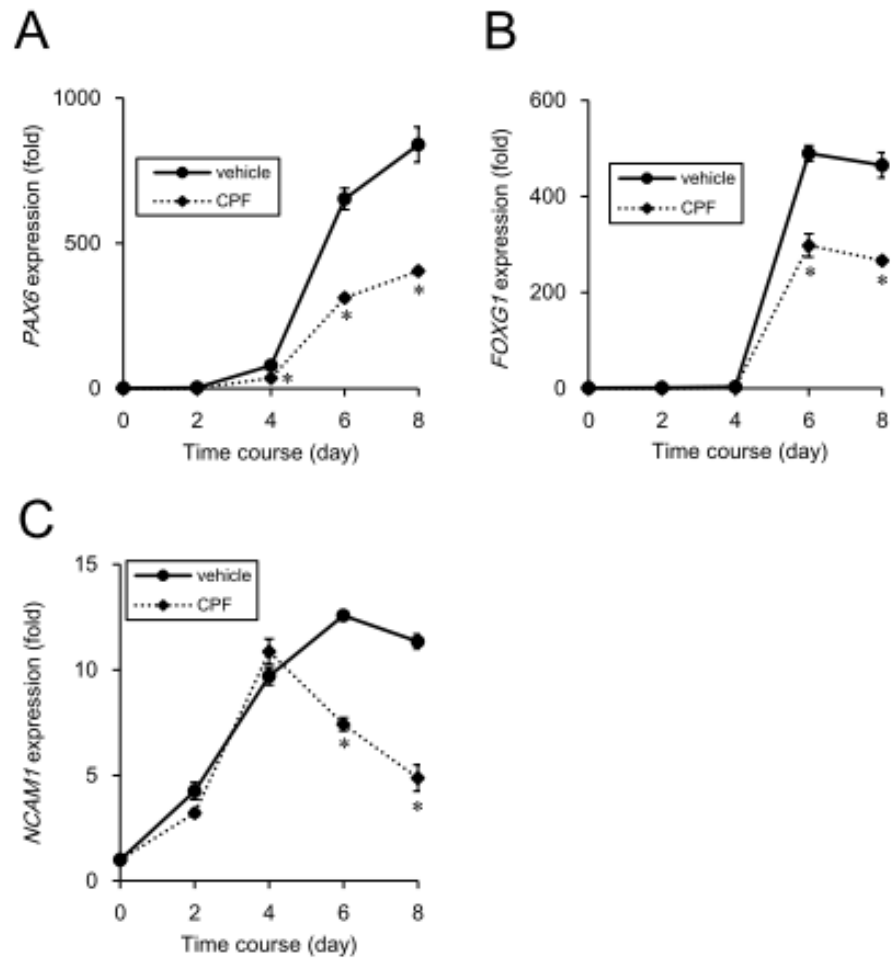


図3 CPFによる神経分化誘導の阻害

30 μ M の CPF 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-FOXG1 遺伝子の発現変化

C) 神経前駆細胞マーカー-NCAM1 遺伝子の発現変化

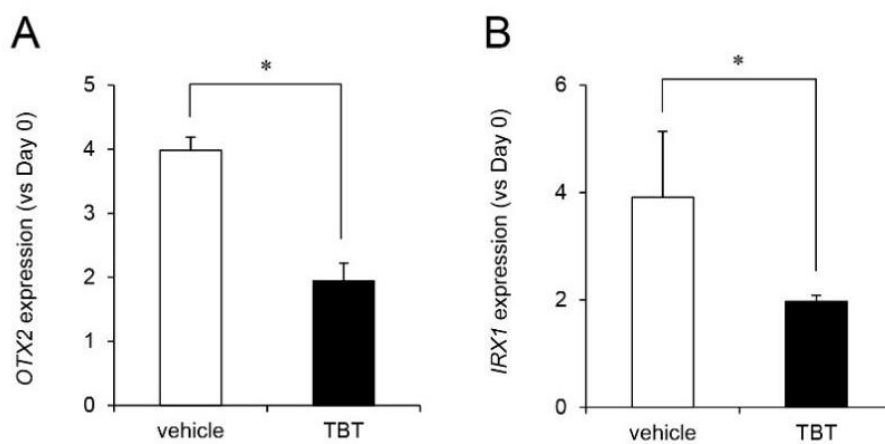


図4 TBTによる外胚葉分化阻害

50 nM の TBT を曝露したヒト iPS 細胞に外胚葉分化刺激を与えた後、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

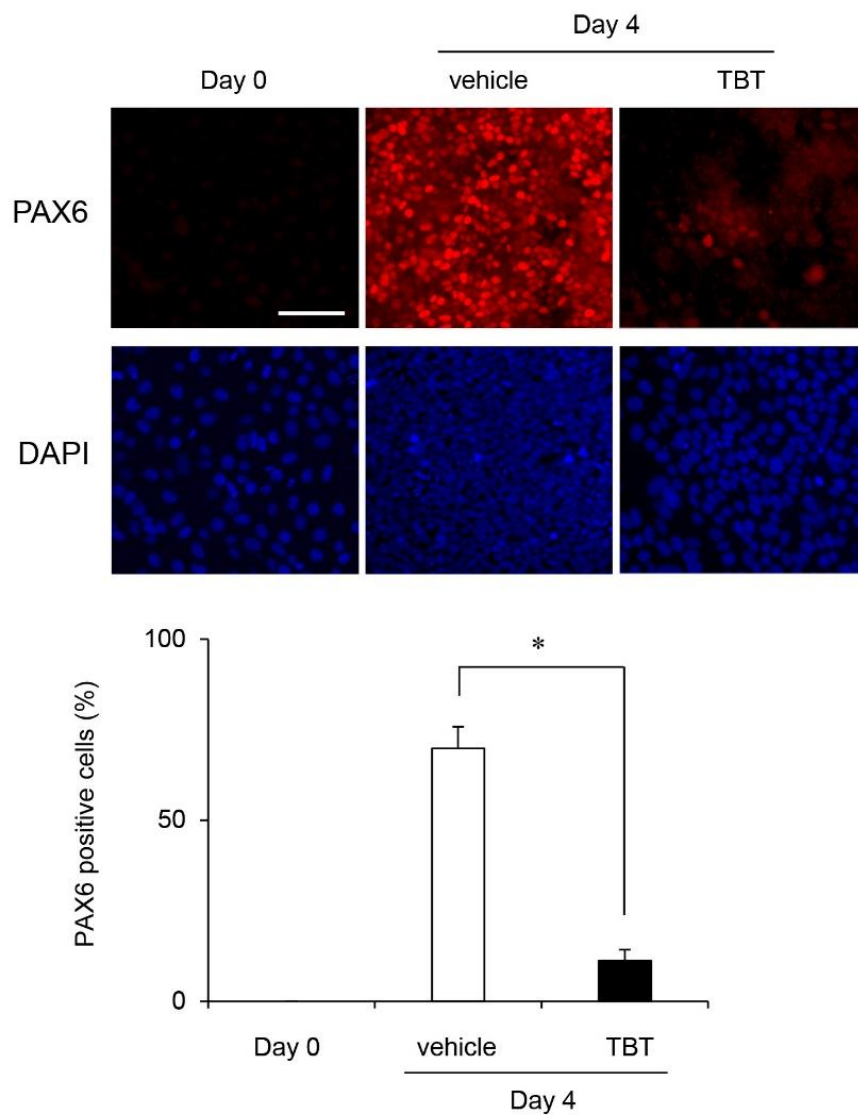


図5 TBTによる神経分化誘導の阻害

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。

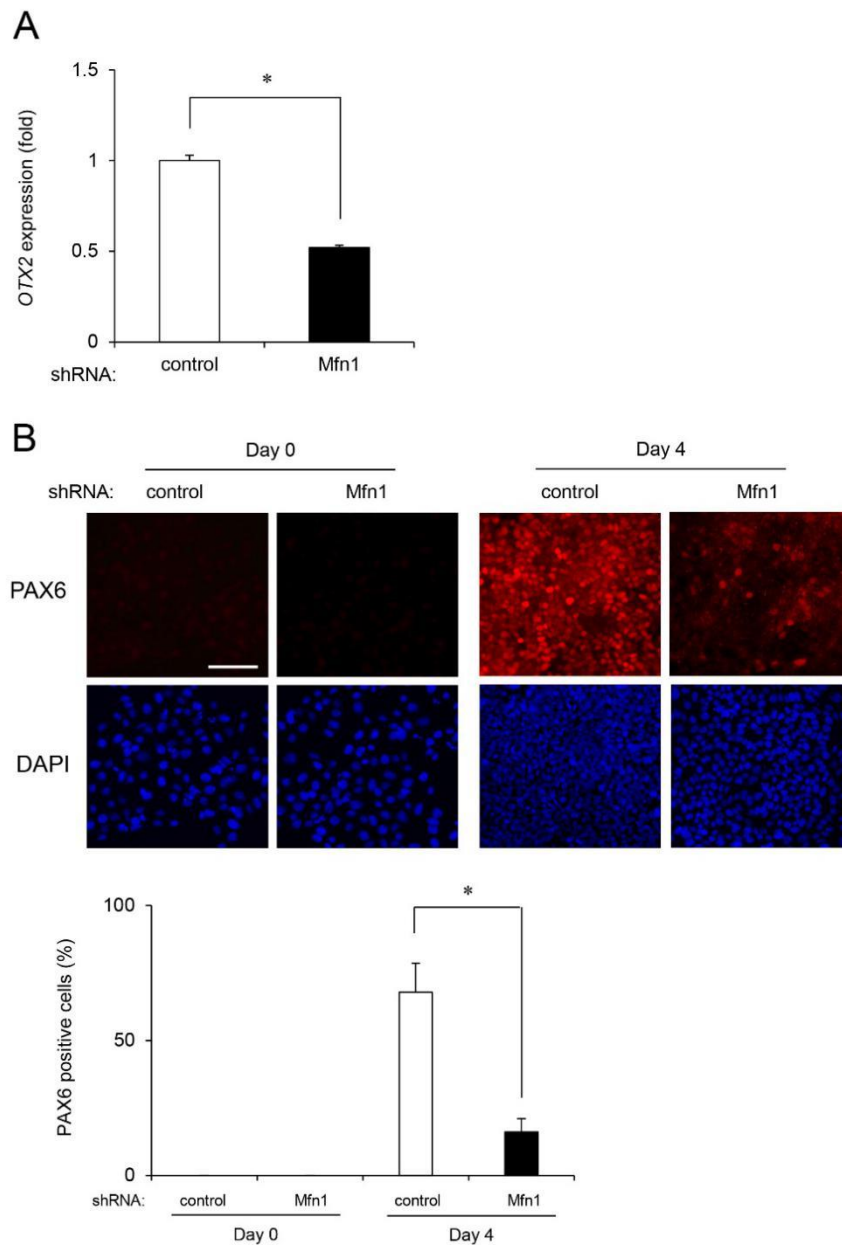


図 6 Mfn1 ノックダウンによる神経分化誘導の阻害

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

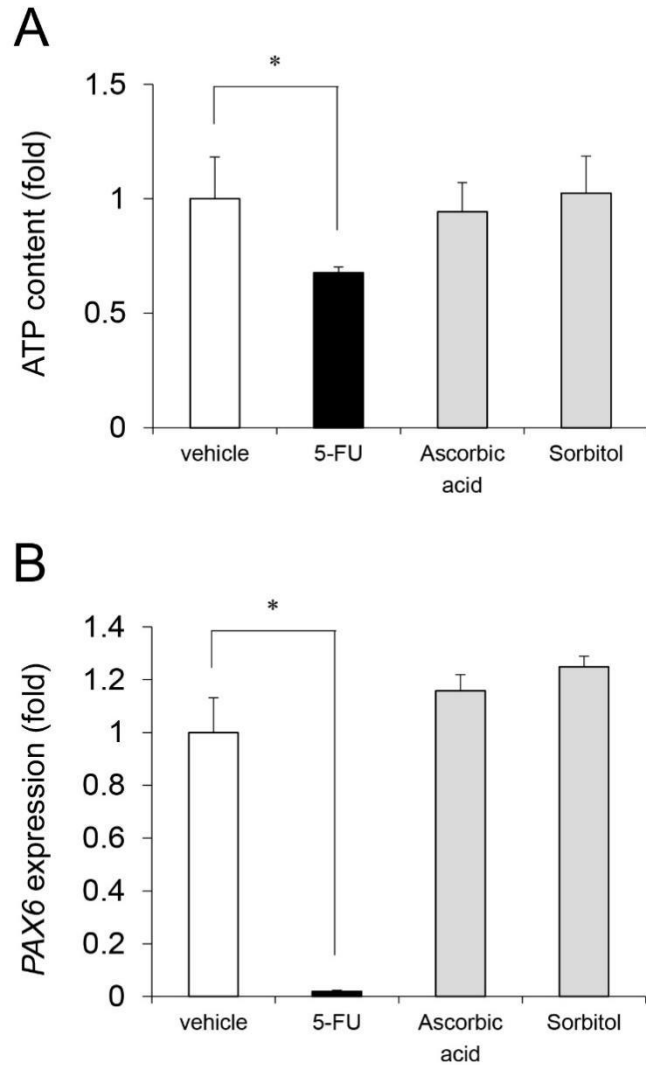


図7 5-FUによるATP産生及び神経分化誘導の阻害

(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。

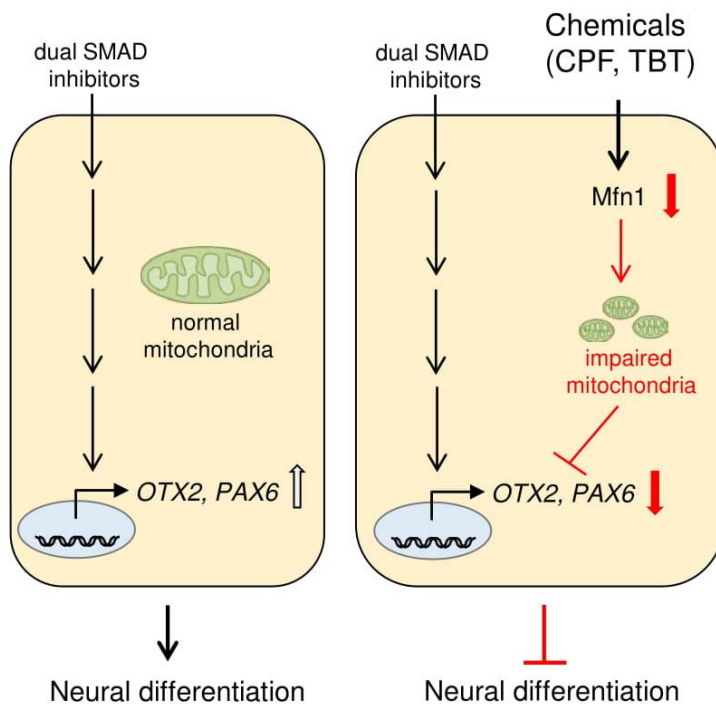


图 8 神經分化阻害作用 (模式图)