

令和3年度 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

研究課題名：化学物質誘導性の甲状腺機能低下症における次世代影響評価に関する総合研究
(21KD1004)

分担研究課題名：甲状腺ホルモン関連指標の変動を考慮したヒト細胞試験法の構築
研究分担者：諫田 泰成（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部・部長）

研究要旨

大規模疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められたことに関する懸念が高まっており、様々な化合物の毒性を評価するOECDの試験法ガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

本分担研究では、ヒトiPS細胞に着目して甲状腺機能影響を評価可能な*in vitro*評価法の確立を目指している。初年度の令和3年度は、まずヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体（THR）の発現をリアルタイムPCRにより検討した。その結果、未分化のヒトiPS細胞にはTHR α とTHR β の両方のアイソフォームが発現していることが明らかになった。神経分化におけるTHR β の発現変化について検討したところ、分化誘導にともないTHR α の発現亢進が観察されたが、THR β には影響が認められなかった。次に、ヒトiPS細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体THR α のノックダウンを行い、甲状腺機能低下モデルを作製した。本モデルを用いて神経分化能の検討を行った結果、発達神経毒性が懸念されている医薬品バルプロ酸（VPA）曝露によりTHR α をノックダウンしたヒトiPS細胞の神経分化阻害が認められた。従って、本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響を評価できる可能性が示唆された。

今後、他の化学物質の影響を調べて、本モデルの有用性を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

欧米諸国では、大規模疫学調査によって妊婦の甲状腺ホルモン低下と出生児の知能低下との間に明らかな相関性が認められたことに関する懸念が高まっており（Gilbert et al., *Neurotoxicology*, 2012）、様々な化合物の毒性を評価するOECDの試験法ガイドラインでも発生毒性試験やその他の試験で動物（発生毒性試験においては母動物）の甲状腺ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの定量的評価を追加する等の措置が取られた。

また甲状腺に対する何らかの影響が観察された化合物について、発達神経毒性（DNT）試験実施の必要性を判断するために、Comparative Thyroid Assay（CTA）という新たな*in vivo*試験法が提案され、試験実施のtriggerやこれらの試験で得られるデータの解釈について、各国のリスク評価当局者による議論や意見交換が続いている。

このような背景のもと、*in vitro*で甲状腺機能低下の影響を評価できるアッセイ系があれば、メカニズムベースに機能解析が進み、また3Rsの促進にもつながることが期待さ

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ことが示唆されているため、甲状腺機能低下症に認められる化学物質影響にも応用できる可能性がある。

そこで、本研究では、甲状腺機能低下モデルのヒトiPS細胞の作製を行った。未分化のヒトiPS細胞にはTHR α とTHR β の両方のアイソフォームが発現していること、神経分化誘導にともないTHR α のみ発現亢進が観察されたことから、甲状腺ホルモン受容体THR α をノックダウンしたヒトiPS細胞を作製した。さらに、本研究班で共通の化学物質として発達神経毒性の陽性対照物質のリストから選定したバルプロ酸（VPA）を用いて、ATP産生能や神経分化能を指標に化学物質の影響を検討した。

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) を用いてヒト iPS 細胞を 4 日間培養した。

3. ATP 量

ATP determination kit (Thermo Fisher Scientific) によるルシフェラーゼ法に基づいて定量した。

4. qPCR

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) 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。

5. shRNA によるノックダウン

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 細胞における THR α 、 β の発現

ヒト iPS 細胞には THR α と THR β の両方のアイソフォームが発現していることを qPCR で確認した (図 1)。比較として未分化マーカーである Nanog を示した。

2. ヒト iPS 細胞に神経分化に伴う THR α 、 β の発現変化

次に、ヒト iPS 細胞に神経分化に伴う THR α と THR β の発現変化を調べた。その結果、神経分化誘導にともない THR α のみ発現亢進が観察された (図 2)。

3. shRNA を用いたヒト iPS 細胞における THR α のノックダウン

まずヒト iPS 細胞の化学物質に対する応答性に対する THR α の影響を検討するために、shRNA を用いて THR α のノックダウンを行った。レンチウイルスを用いて iPS 細胞に THR α shRNA を導入した後、感染細胞をピューロマイシンで選択した。さらに 3 日後に RNA を回収して qPCR を行った結果、scramble control を導入した細胞に比べて約 93% の THR α ノックダウンが認められた (図 3)。

4. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する VPA 曝露の影響

次に、THR α をノックダウンした iPS 細胞に VPA (100 μ M) を曝露し、ATP 産生能に対する影響を調べた。ヒト iPS 細胞へ VPA を曝露しても ATP 産生に影響は無かった (図 4, left panel)。また THR α ノックダウンした iPS 細胞に VPA 曝露しても、scramble control を導入した細胞と比べて ATP 産生に変化は無かった (図 4, right panel)。

5. THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する VPA 曝露の影響

さらに THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に VPA を曝露 (100 μ M) し、神経 (外胚葉) 分化能に対する影響を調べた。ヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露したところ、分化マーカーである PAX6 の発現はわずかに減少した (図 5, left panel)。一方、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、神経分化時に VPA を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現が約 64% 抑制された (図 5, right panel)。したがって、THR α は VPA の発達神経毒性に関与している可能性が考えられた。

以上より、甲状腺機能低下症のモデルとして THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞が有用である可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、 $THR\alpha$ をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて、本研究班で共通の DNT 陽性対照物質として使用している VPA の影響を解析した。エンドポイントとして ATP 産生を指標とした解析では iPS 細胞、 $THR\alpha$ ノックダウンした iPS 細胞において VPA に対する細胞応答には大きな違いは認められなかった。一方、神経分化を指標とした解析では $THR\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞では、VPA による神経分化抑制が認められた。このことから、VPA によるヒト発達期の神経毒性に $THR\alpha$ が関与していることが示唆される。

THR には α と β のアイソフォームが存在しており、ノックアウトマウスを用いた研究では、 $THR\alpha$ は神経発生に関係するが、脳における $THR\beta$ はフェノタイプが認められていない (Krieger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019)。また、分化誘導にともない $THR\alpha$ の発現が選択的に亢進したことから、今回は $THR\alpha$ を優先的に評価した。しかしながら、 $THR\alpha$ と β の機能的な違いについては明らかにされておらず、甲状腺機能低下による子どもの影響を考慮する上でどちらがより重要であるのかは慎重に検討する必要がある。

今後は、鉛等の重金属やクロルピリホスを初めとする農薬など発生毒性や神経毒性が懸念されている他の化学物質に焦点を当て

て同様に曝露影響の解析を行い、本モデルの有用性を明らかにしていく予定である。

E. 結論

$THR\alpha$ をノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化を指標にして、甲状腺機能低下時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。本モデルは甲状腺機能低下時の化学物質影響を評価できることが考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 諫田 泰成、安彦 行人：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価法の現状と今後の展望、日本薬学会第 142 年会シンポジウム、オンライン、2022 年 3 月 27 日
2. 諫田 泰成：インビトロ発達神経毒性評価法の現状と今後の課題、第 61 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、オンライン、2021 年 8 月 8 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

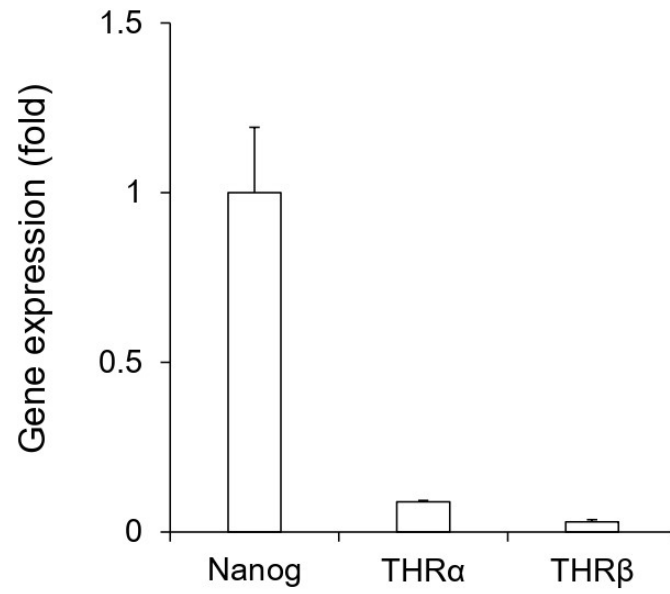


図1 ヒト iPS 細胞における THR の発現

ヒト iPS 細胞における THRα, THRβ の発現を qPCR で調べた。比較として未分化マーカー Nanog を用いた。

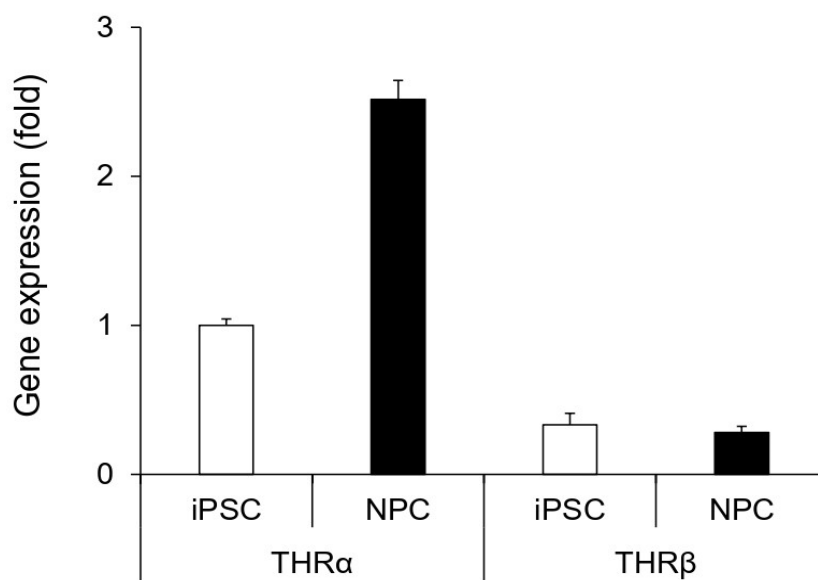


図2 ヒト iPSC 細胞の神経分化による THR の発現変化

ヒト iPSC 細胞の THR α , THR β の発現を神経分化前後で比較検討した。

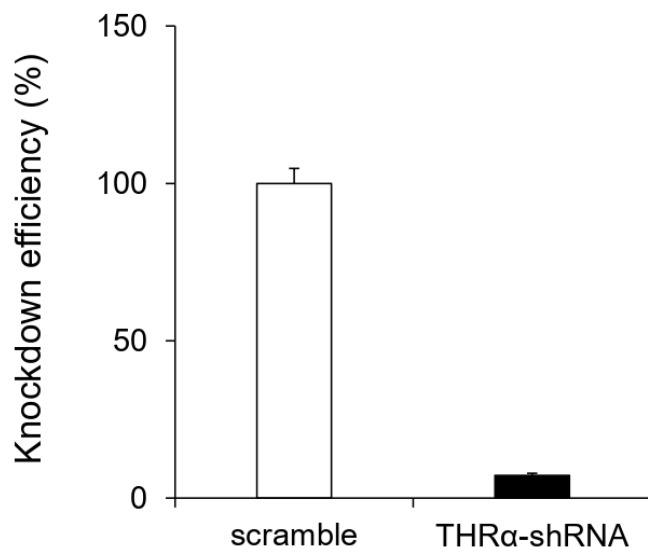


図3 ヒト iPS 細胞の THRα ノックダウン

ヒト iPS 細胞に THRα に対するレンチウイルス shRNA を導入後した後、THRα のノックダウン効率を qPCR により調べた。

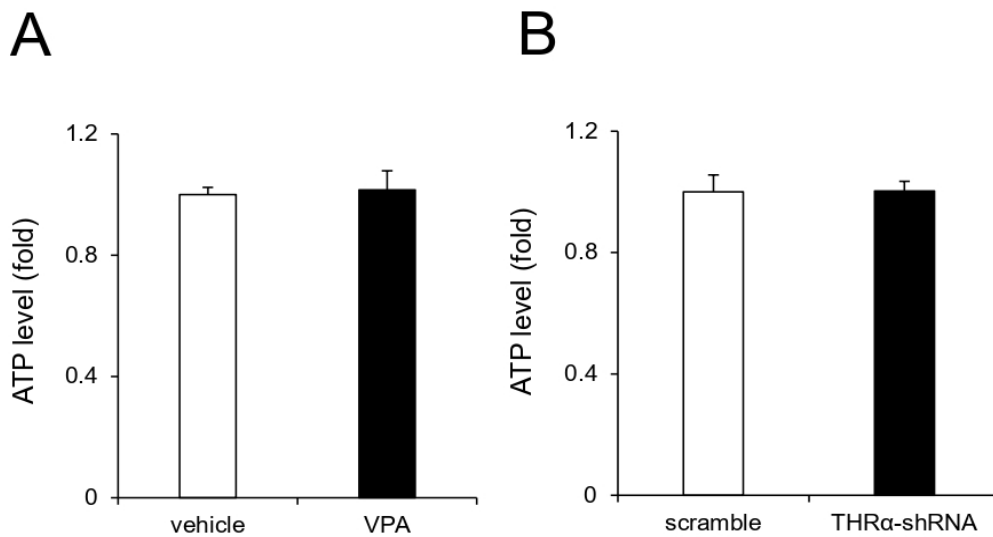


図4 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する VPA 曝露の影響

ヒト iPS 細胞に VPA (100 μ M) を曝露して 24 時間後に細胞内 ATP 量を調べた。

(A) ヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

(B) THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

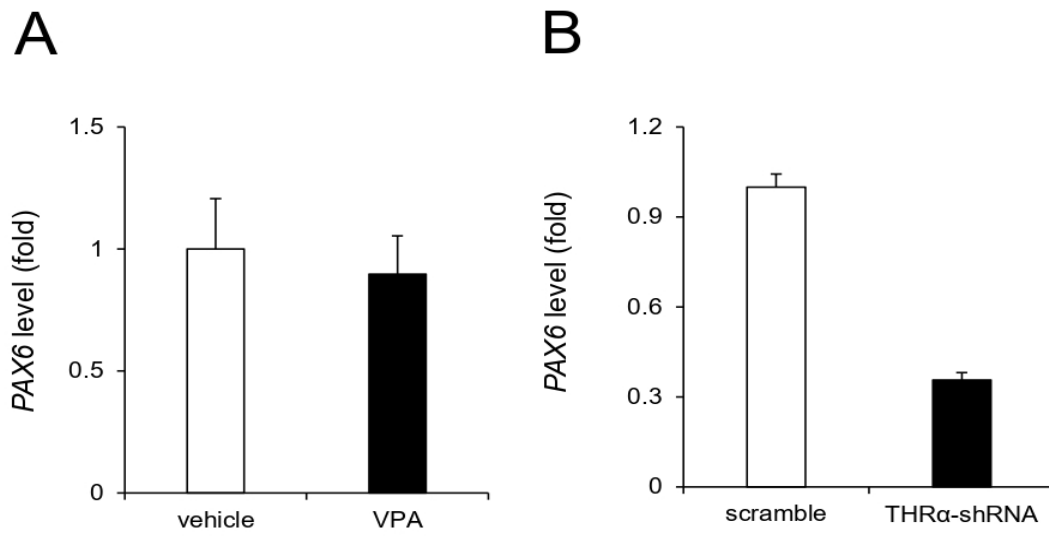


図5 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経分化に対する VPA 曝露の影響

VPA (100 μ M) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に神経分化マーカー PAX6 の発現を調べた。

(C) ヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響

(D) THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対する VPA 曝露の影響