

令和4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インビトロ評価法の確立を目指している。前年度はヒト iPS 細胞を用いて甲状腺ホルモン受容体  $THR\alpha$  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。本年度は、 $THR\alpha$  ノックダウン細胞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る農薬クロルピリホス曝露により神経分化阻害が認められることを見出した。さらに  $THR\alpha$  ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析を行った結果、 $THR\alpha$  シグナルの下流で機能し、神経（外胚葉）分化に関与する遺伝子をスクリーニングすることに成功した。以上より、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、*in vivo* のデータと比較検討することにより、本モデルの有用性をさらに明らかにする予定である。

### 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。しかし発達神経毒性（DNT）の有無を判定するガイドライン試験（TG426 など）を実施するには、多大な資源と労力（コスト）が掛かることから、甲状腺関連指標の変動を化学物質のリスク管理に活用するためのスキームの確立には至っていない。またこの問題を解決するために、米国環境保護庁（EPA）が2005年にガイドダンスとして提唱した Comparative Thyroid Assay（CTA）がDNTスクリーニング試験として有望視されているが、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のが現状である。

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、甲状腺機能低下を反映するヒト iPS 細胞の作製を行った。未分化のヒト iPS 細胞には  $THR\alpha$  と  $THR\beta$  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  $THR\alpha$  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  $THR\alpha$  に焦点を当てて、ノックダウン株を作製した。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として選定した農薬クロルピリホス（CPF）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。

### **6. NGS 解析**

THR $\alpha$  ノックダウンした細胞 (外胚葉) より RNA 抽出を行い、Novogene 社に委託した。scramble control に対して THR $\alpha$  ノックダウンした細胞 (外胚葉) で発現が低下している遺伝子の探索を行った。

## **C. 研究結果**

### **1. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する CPF 曝露の影響**

THR $\alpha$  をノックダウンした iPS 細胞に CPF (10 $\mu$ M) を曝露し、ATP 産生能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞へ CPF を曝露しても ATP 産生に影響は無かった (図 1)。また THR $\alpha$  ノックダウンした iPS 細胞に CPF 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 1)。

### **2. THR $\alpha$ ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対するクロルピリホス (CPF) 曝露の影響**

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞に CPF (10 $\mu$ M) を曝露し、神経 (外胚葉) 分化能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF 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 2)。THR $\alpha$  をノックダウンしたヒト iPS 細胞は、CPF を曝露すると、control の細胞と比べて PAX6 の発現が約 50%抑制されることを見出した (図 2)。したがって、THR $\alpha$  は CPF による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 $\alpha$  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。

### **3. THR $\alpha$ の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索 (NGS 解析)**

THR $\alpha$  ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経 (外胚葉) 分化させたところ、scramble shRNA を導入した細胞と比べて分化マーカーである PAX6 の発現は約 30%減少した (図 2)。従って、THR $\alpha$  は神経 (外胚葉) 分化に関与すると考えられる。そこで NGS 解析により、THR $\alpha$  の下流で神経 (外胚葉) 分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR $\alpha$  ノックダウン細胞で発現が低下している遺伝子を探索した結果、神経分化に関わる因子 A, B (図 3)、軸索伸展に関わる因子 C (図 4)、D (図 5) などの遺伝子を抽出することができた。

## 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、本研究班で選定した発達神経毒性が懸念される農薬 CPF 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 CPF 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、CPF による神経分化抑制が認められた。このことから、ヒト発達期における神経毒性に THR $\alpha$  が関与していることが示唆される。

THR には  $\alpha$  と  $\beta$  のアイソフォームが存在することが知られている。ノックアウトマウスを用いた研究により、 $\alpha$  は神経発生に関係するが、 $\beta$  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、神経分化に影響があることを明らかにした。しかしながら、THR $\alpha$  と  $\beta$  の機能的な違いについては明らかになっておらず、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重要であるのかを慎重に検討する必要がある。さらに神経分化時に THR $\alpha$  の下流で働く可能性のある遺伝子を探索した結果、神経分化や軸索伸展に関与する遺伝子を同定した。こうした遺伝子と甲状腺機能低下の関連についても検討を進め *in vivo* でも機能するのか検証する必要がある。

今後は、金属などの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する必要がある。

## 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

1. Ishida K, Tatsumi K, Minamigawa Y, Mori K, Matsumaru D, Nagase H, **Kanda Y**, Takuma K, Nakanishi T. Neuronal differentiation reporter mice as a new methodology for detecting in vivo developmental neurotoxicity, *Biochem Pharmacol* 206: 115332 (2022)
2. Yasuhiko Y, Ishigami M, Machino S, Fujii T, Aoki M, Irie F, **Kanda Y**, Yoshida M. Comparison of the lower limit of benchmark dose confidence interval with no-observed-adverse-effect level by applying four different software for tumorigenicity testing of pesticides in Japan, *Regul Toxicol Pharmacol* 133:105201 (2022).

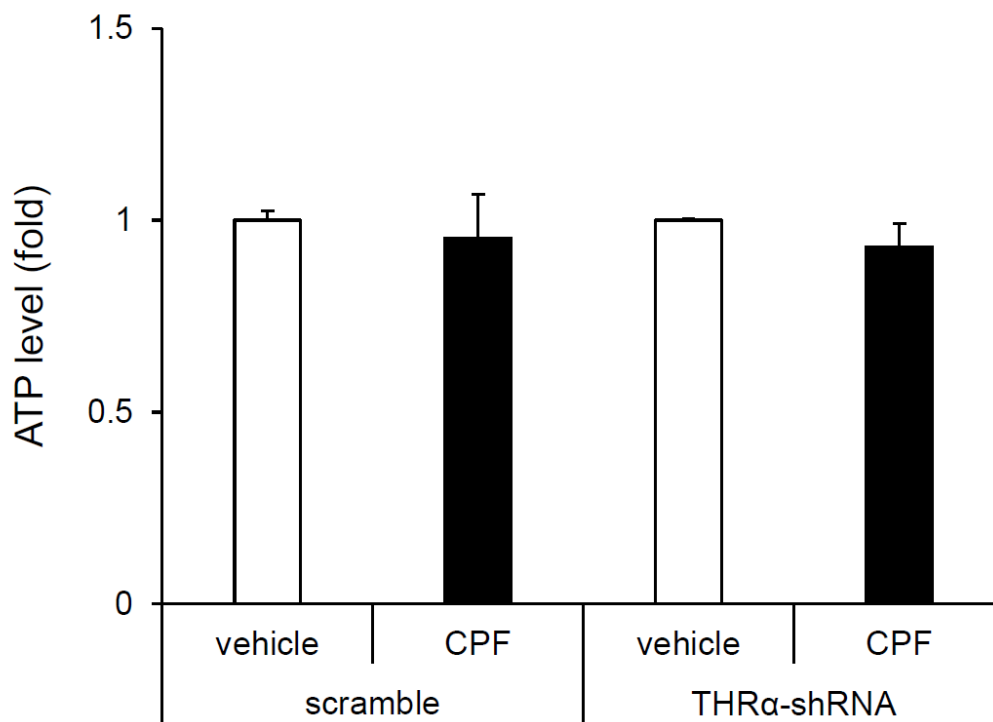
3.

### 2. 学会発表

1. **諫田泰成**：化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み、第 49 回日本毒理学学会学術年会、札幌、2022 年 7 月
2. **諫田泰成**：甲状腺機能を考慮したインビトロ神経毒性試験法の開発、フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー、熊本、2022 年 8 月
3. **諫田泰成**、安彦行人：新たなアプローチによる薬理試験の展開、第 96 回日本薬理学会年会、横浜、2022 年 12 月
4. **Kanda Y**: Current status and future challenge of developmental neurotoxicity, 3rd Asian Congress for Alternative to Animal Experiment, 済州, 2022 年 12 月
5. **Kanda Y**: hiPSC-derived neural cells for chemical toxicity evaluation, Inaugural International Scientific Conference of the SAAT- SL, コロンボ, 2023 年 2 月 1 日
6. 糟谷佐保里、目加田京子、石田慶士、松丸大輔、村嶋亜紀、**諫田泰成**、中西剛：母体甲状腺機能低下によって惹起される胎児発生毒性の評価、日本薬学会第 143 年会、札幌、2023 年 3 月

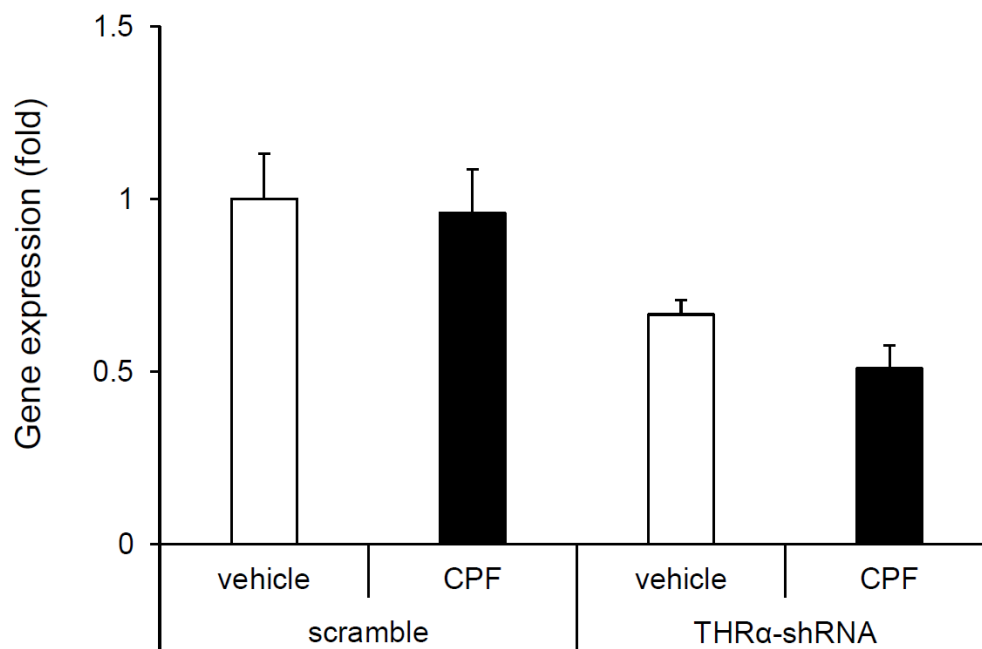
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況



**図1** THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の ATP 産生に対する CPF の影響

ヒト iPS 細胞に CPF (10 μM) を曝露して 24 時間後に細胞内 ATP 量を調べた。  
shRNA により THRα をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。



**図 2** THRα ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経（外胚葉）分化に対する CPF 曝露の影響

CPF (10 μM) 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。shRNA により THRα をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するクロルピリホス曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。

KEGG pathway: neural differentiation

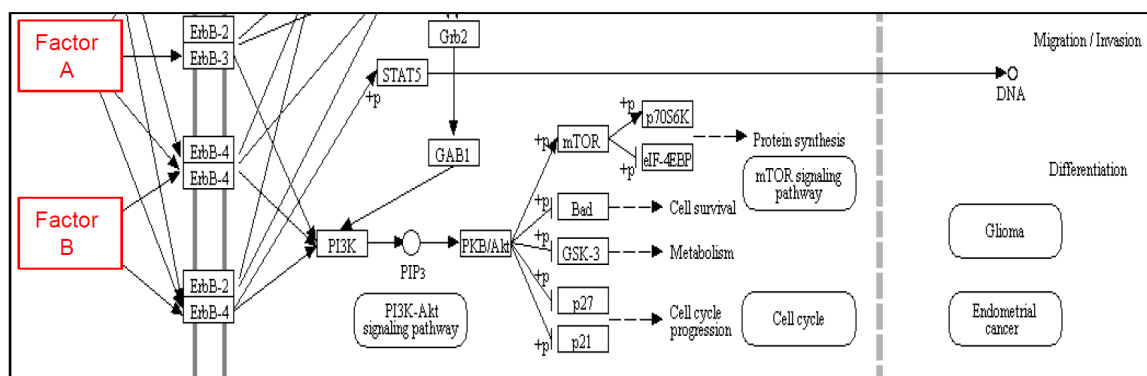


図3 THRa ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子

神経分化パスウェイ解析により、Factor A, B を同定した。

KEGG pathway: axonal growth

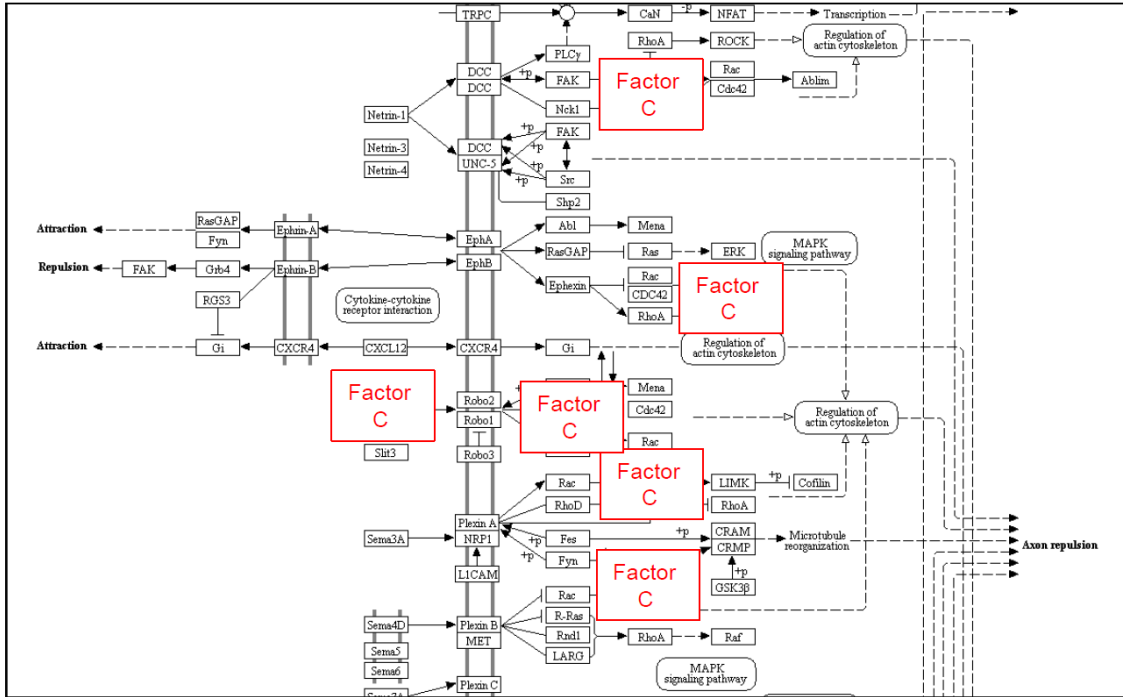


図4  $THR\alpha$  ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子

軸索伸展のパスウェイ解析により、Factor C を同定した。



KEGG pathway: axonal growth

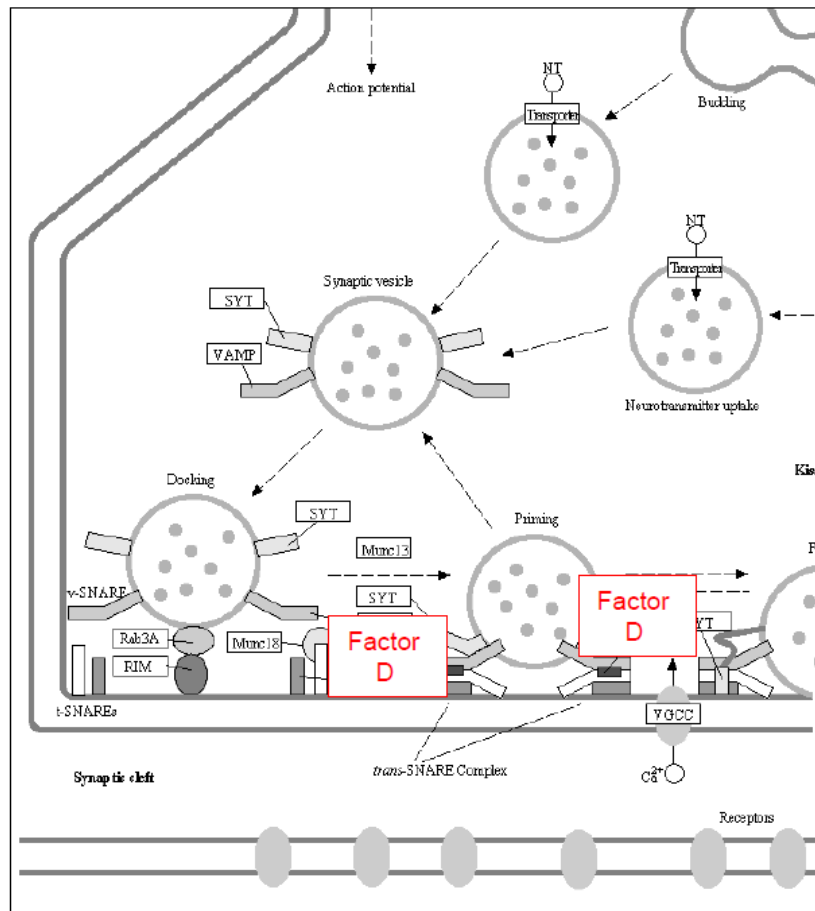


図5 *THRa* ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子

軸索伸展のパスウェイ解析により、Factor D を同定した。