

令和5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、OECDのテスト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。前年度までにヒト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するとともに、農薬のクロルピリホス（CPF）や医薬品のバルプロ酸（VPA）の曝露による神経分化阻害が、THR α のノックダウンにより亢進することを見出した。またTHR α ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析（NGS解析）を行った結果、THR α 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のスクリーニングを行った。今年度は、NGS解析の結果を基に神経分化に関与する遺伝子としてFactor Xの同定に成功した。化学物質を曝露した甲状腺機能低下モデル細胞では、コントロール細胞に比べて神経分化時のFactor X発現がより低下することから、Factor Xはヒト発達期の神経毒性の評価マーカーになる可能性が考えられる。以上の結果より、本モデルを用いて甲状腺機能低下時の化合物曝露の影響を評価できる可能性が示唆された。

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]、OECDテスト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）試験の実施の必要性を判断するために、Comparative Thyroid Assay（CTA）の*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。

最近、3Rs原則の促進の国際的な動向として、New Approach Methodologies（NAMs）によって毒性評価を変革しようとする動き

が盛んである。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、化合物の神経毒性評価に有用であると期待されており、甲状腺機能低下症に認められる化合物の影響評価にも応用できる可能性がある。特に、*in vitro*で甲状腺機能低下の影響を評価できるアッセイ系を開発し、メカニズムベースに機能解析できることが必要である。

このような背景から、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。前年度までにヒト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するとともに、DNT陽性対照物質である農薬クロルピリホス（CPF）や医薬品バルプロ酸（VPA）の曝露により、神経分化阻害がTHR α のノックダウンにより亢進することを見出した。またTHR α ノックダウン細胞を用いて次世代シーケンス解析（NGS解析）を行った結果、THR α 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のスクリーニングを行ってきた。今年度は、NGS解析の結果を基に神経分化に関与する遺伝子としてFactor Xの同定の同定を試みるとともに、CPFおよびVPAによる神経分化阻害におけるFactor Xの関与について検証を行った。

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. 神経 (外胚葉) 分化

神経分化は Dual smad 阻害法 [Chambers et al., *Nat. Biotechnol.*, 2009] に従って実施した。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 日間培養することにより、外胚葉へと分化誘導した。

3. 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。

4. 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。3 日後に選別された細胞から RNA を回収して qPCR を行ったところ、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。

5. NGS 解析

THR α ノックダウンした細胞 (外胚葉) より RNA 抽出を行い、NGS 解析を行った。scramble control を導入した細胞と比較して、

THR α 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 α の下流で神経分化に関わる分子の NGS 解析

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞を神経分化したところ、scramble shRNA を導入した細胞と比べて分化マーカー PAX6 の発現が約 30% 減少することを見出した。従って、THR α は神経分化に関与することが示唆された。

次に、NGS 解析により、THR α の下流で神経分化に関わる遺伝子の探索を試みた。THR α ノックダウン細胞で発現が低下する遺伝子をスクリーニングした結果、神経分化に関わる Factor A, B (図 1)、軸索伸展に関わる Factor C (図 2)、D (図 3)、神経分化や薬剤抵抗性に関わる Factor X 遺伝子を同定した (図 4)。

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

THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞に DNT 陽性対照物質である CPF を曝露 (10 μ M) し、神経分化能に対する影響を調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞を神経系に分化誘導する際に CPF を曝露したところ、分化マーカー PAX6 の発現はわずかに減少した (図 5)。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 CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて PAX6 発現が約 50% 抑制された (図 5)。

そこで、THR α の下流因子について検討した。すでにスクリーニングした因子の中から、Factor X の発現について調べた。scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に CPF を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化しなかった (図 6)。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 CPF を曝露すると、scramble control の導入細胞と比べて Factor X 発現が約 40% 抑

制された (図 6)。

以上の結果から、Factor X は CPF の神経毒性に関与していることが示唆された。

4. 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

次に、DNT 陽性対照物質である VPA についても同様に神経分化能に対する影響を検討した。scramble shRNA を導入したヒト 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 7)。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 PAX6 発現が約 60%抑制された (図 7)。また THR α の下流因子として同定した Factor X の発現についても調べた。その結果、scramble shRNA を導入したヒト iPS 細胞の神経分化時に VPA を曝露しても Factor X の発現はほとんど変化が認められなかった (図 8)。非常に興味深いことに、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 Factor X 発現が約 30%抑制された (図 10)。したがって、Factor X は VPA の神経毒性に関与することが示唆された。

以上の結果より、NGS 解析で同定した Factor X は発達神経毒性の評価マーカーとして有用である可能性が考えられる。

D. 考察

THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて NGS 解析を行った結果、THR α の下流で働く神経分化因子として Factor X の同定に成功した。さらに上記の化合物に対する応答性を調べたところ、THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞における Factor X の発現は、コントロール細胞より低下する傾向が認められた。Factor X に関しては原著論文にまとめる必要があるため、この報告書では詳細な情報を記載できない。少なくとも PAX6 の下流で作用するシグナル分子であり、ヒト ES 細胞由来神経系細胞において機能を有す

ることが報告されている。しかしながら、FactorX による神経分化機構のメカニズムはいまだ不明であるため、今後、さらに詳細に検討する必要がある。

in vitro と *in vivo* を比較検討する観点から、動物でも同様に FactorX を介する機構が働いているのかは重要である。FactorX のノックアウトマウスの解析結果ではどのようなフェノタイプが報告されているのかなど興味深い。さらに、Syn-Rep マウスの NGS データと照合することにより、詳細な機能が明らかになることが期待される。さらに、化学物質の体内動態などの情報を考慮して、ハザードの特定からリスク評価に展開できるのか検討する必要がある。

最近、ヒト iPS 細胞にはプライム型とナイーブ型がありエピゲノム状態などによる株間差も明らかになってきており、神経分化機構や神経分化プロトコルに株間差があることが知られている。本評価手法においても、ヒト iPS 細胞の株間差を最小化できるようなプロトコルやエンドポイントを設定する必要がある。

今後は、発生毒性や神経毒性が懸念されている他のカテゴリーの化学物質、たとえば金属などを追加して、評価法の適用範囲や chemical spaceなどを明らかにする必要がある。これにより本モデルの有用性を明らかにすることが期待される。

E. 結論

甲状腺ホルモン受容体 THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞を用いて、神経分化をエンドポイントとした評価系により、甲状腺機能低下時における化合物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

特になし

2. 学会発表

1. 安彦 行人 他：化学構造に基づくク

- ラストリングと MEA 実験の統合的手法による化学物質発達神経毒性の評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 21 日
2. 山田 茂 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞における解離性麻酔剤の神経毒性評価、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 21 日
 3. **諫田 泰成**：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性ガイドランスと今後の展望、第 63 回日本先天異常学会学術集会シンポジウム、2023 年 7 月 28 日、つくば
 4. **諫田 泰成**：化学物質の発達神経毒性評価と甲状腺影響評価の取り組み、日本動物実験代替法学会、千葉、2023 年 11 月 29 日
 5. 安彦 行人 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイシステムによるフルオキセチンの神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023 年 12 月 14 日
 6. 山田 茂 他：ヒト iPS 細胞由来神経細胞による解離性麻酔剤の神経毒性評価、第 97 回日本薬理学会年会、神戸、2023 年 12 月 15 日
 7. **諫田 泰成**：甲状腺ホルモンを介した発達神経毒性の評価、日本薬学会第 144 回年会、横浜、2024 年 3 月 29 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
該当なし

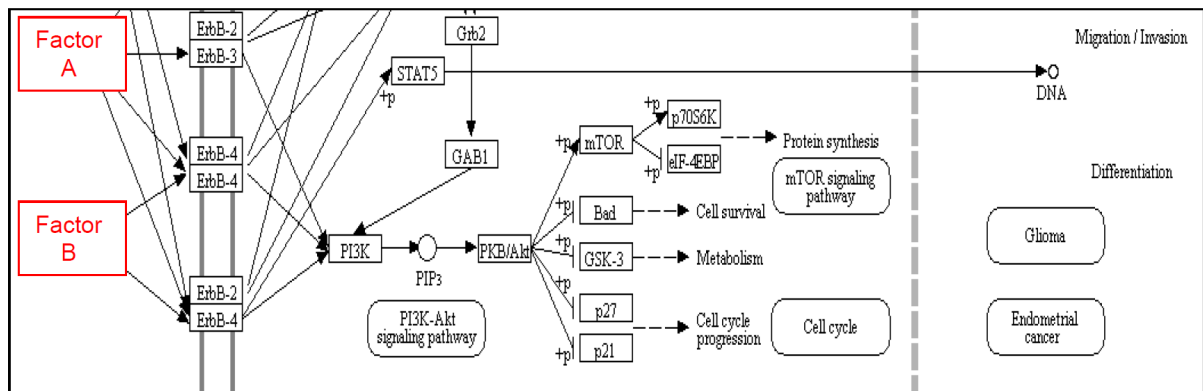


図1 THR α ノックダウンにより神経(外胚葉)分化で減少する遺伝子(NGS解析)

神経生存維持パスウェイ上にある Factor A, B がスクリーニングされた。

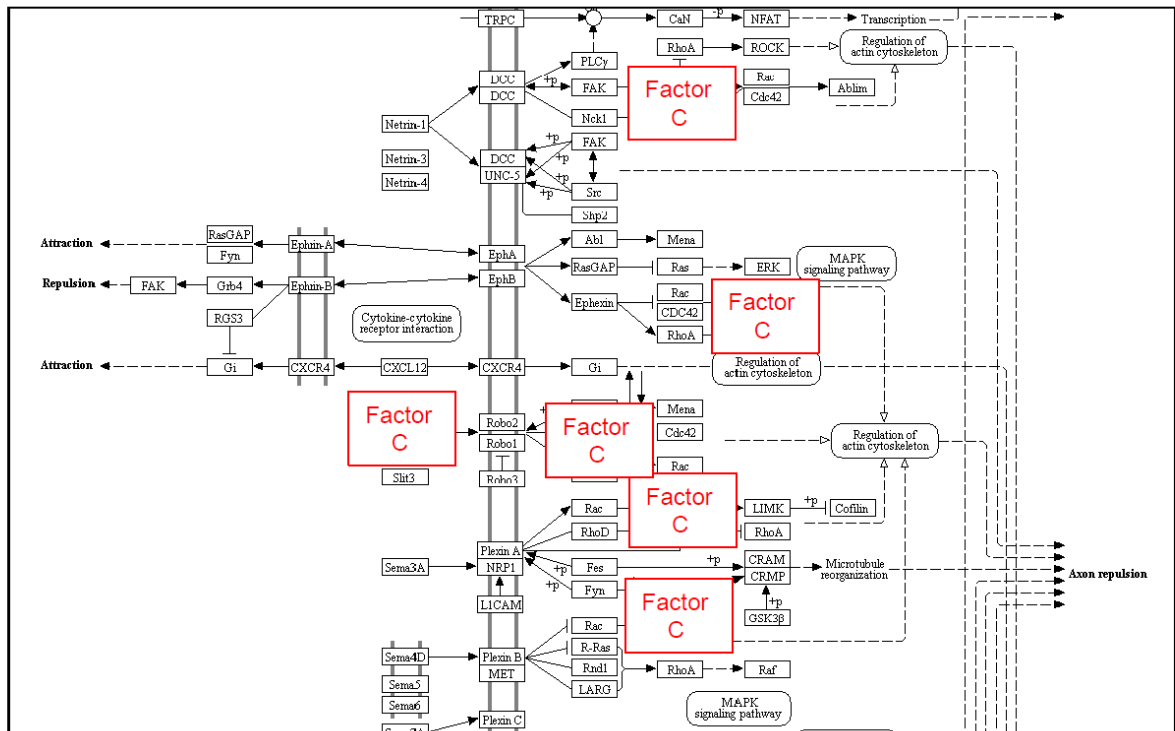


図2 THRαノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

軸索伸展パスウェイ上にある Factor C がスクリーニングされた。

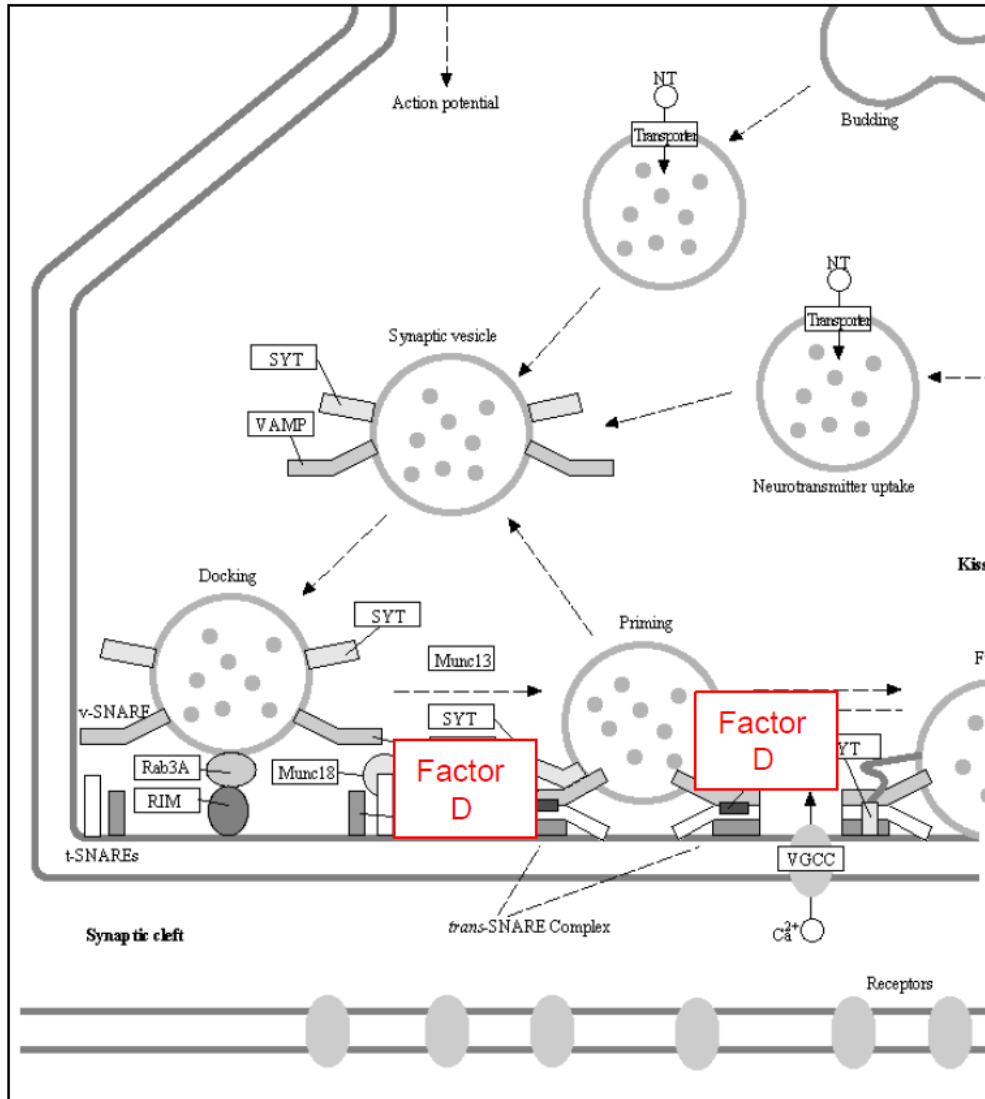


図3 $THR\alpha$ ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

軸索伸展パスウェイ上にある Factor D がスクリーニングされた。

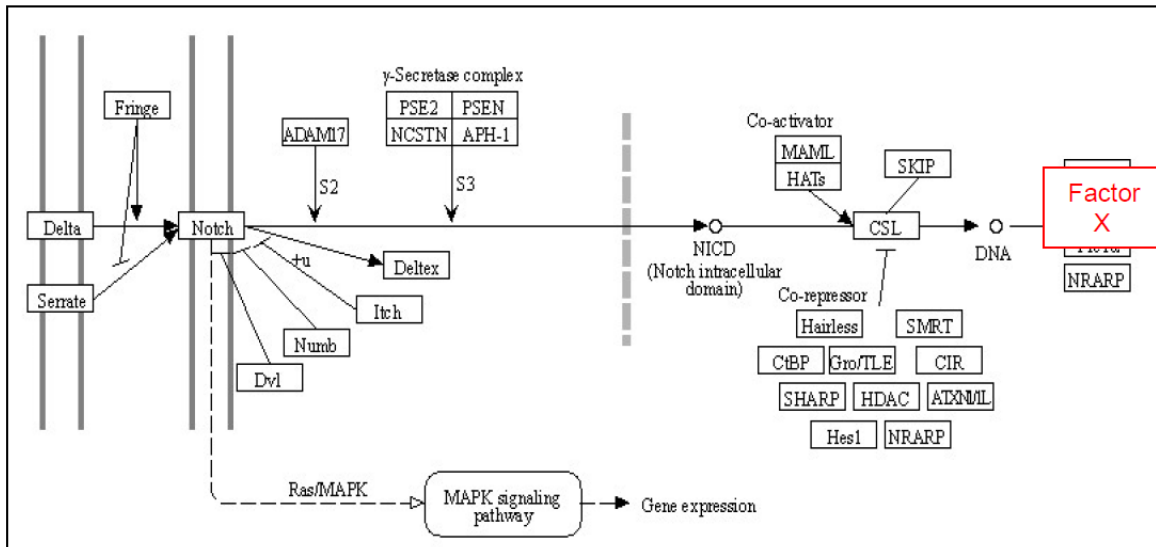


図4 THR α ノックダウンにより神経（外胚葉）分化で減少する遺伝子（NGS解析）

神経分化パスウェイ上にある Factor X がスクリーニングされた。

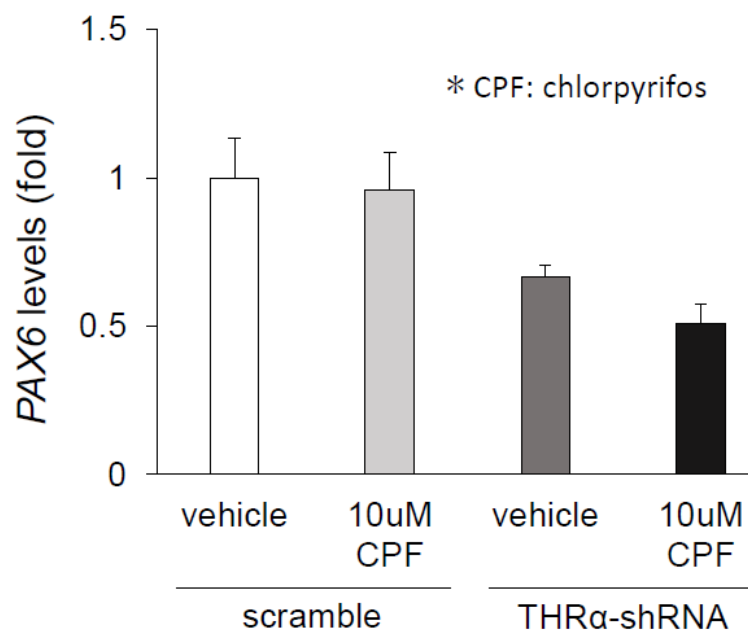


図5 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する CPF 曝露の影響

CPF (10 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。shRNA により THR α 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。

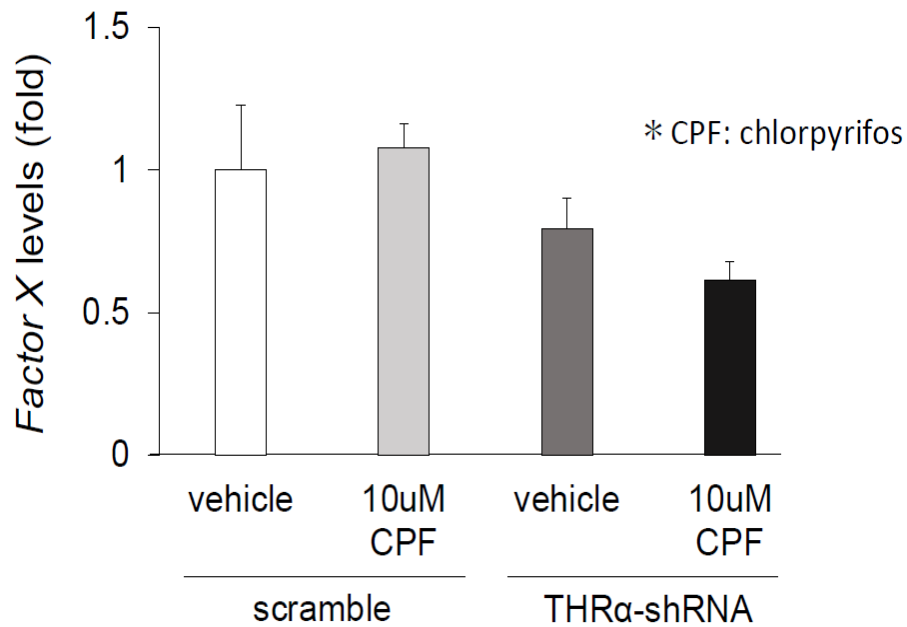


図 6 THRαノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する CPF 曝露の影響

CPF (10 μM) を曝露したヒト iPS 細胞に神経分化誘導を行い、4 日目に今回同定した Factor X 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。

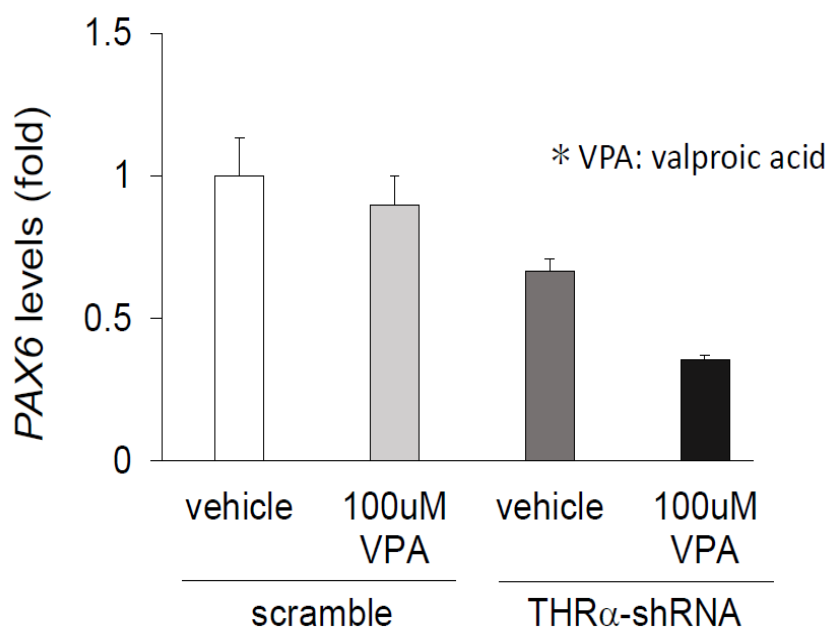


図7 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する VPA 曝露の影響

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。shRNA により THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。

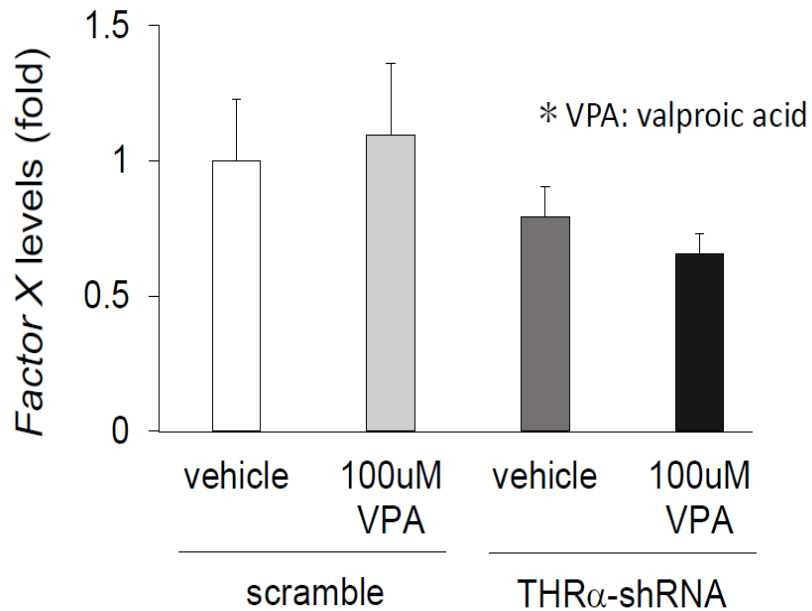


図8 THR α ノックダウンしたヒト iPS 細胞の神経 (外胚葉) 分化に対する VPA 曝露の影響

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 日目に今回同定した Factor X の発現を調べた。shRNA により THR α をノックダウンしたヒト iPS 細胞に対するバルプロ酸曝露の影響を示す。ノックダウンコントロールとして scramble shRNA を用いた。