

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第131号

NIES Research Project Report, No.131

SR-131-2017

iPS細胞を活用した*in vitro*/ハザード評価システムの 構築に関する研究 (所内公募型提案研究)

Development of *in vitro* hazard testing systems using iPS cells

平成26～28年度
FY2014～2016

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第131号

NIES Research Project Report, No.131

SR－131－2017

iPS細胞を活用した*in vitro*/ハザード評価システムの 構築に関する研究 (所内公募型提案研究)

Development of *in vitro* hazard testing systems using iPS cells

平成26～28年度
FY2014～2016

所内公募型提案研究「iPS 細胞を活用した *in vitro* ハザード評価システムの構築に関する研究」

(期間：平成 26 ～ 28 年度)

課題代表者：曾根秀子

執筆 者：曾根秀子、伊藤智彦、黒河佳香、南齋ひろ子

編 者：曾根秀子、伊藤智彦

序

本報告書は、平成 26 ～ 28 年度の 3 年間にわたって実施した所内公募型提案研究「iPS 細胞を活用した *in vitro* ハザード評価システムの構築に関する研究」（課題代表者：曾根秀子）の研究成果を取りまとめたものです。化学物質による健康影響の評価や予測は、これまで動物実験や疫学調査のデータに基づいて行われてきました。近年、経済面、動物愛護の倫理的観点、生命科学に関する技術の進歩などを踏まえ、動物実験に依存した毒性評価試験から脱却し、細胞を用いた試験を化学物質管理規制に活用するための戦略が練られています。ヒトに対する化学物質の毒性を評価するためには正常なヒト細胞を用いた試験が欠かせません。その中でも、子供への影響、特に、胎児期の発達への影響を模倣する有用なモデル細胞として、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性を持った幹細胞の利活用が注目され、毒性評価の強力なツールとして期待されるようになりました。

本研究は、ヒトおよびマウス iPS 細胞を用いて、呼吸器系への毒性が評価可能な *in vitro* ハザード評価システムの構築を行うとともに、大気環境中に存在する化学物質を対象として毒性評価を行い、潜在的なハザードを明らかにすることによって、iPS 細胞を活用した *in vitro* ハザード評価システムによる迅速な影響モニタリングに発展する道筋をつける、ということを目的に実施しました。その結果、ヒト iPS 細胞については、呼吸器の部位によって異なる 3 タイプの肺上皮細胞系に至る各分化段階に必要な分化因子を検討したところ、気管・気管支については基底細胞や繊毛細胞、杯細胞マーカーの増加、細気管支についてはクララ細胞マーカーの増加、肺胞については肺胞上皮 II 型マーカーの増加を認め、それぞれの異なる上皮細胞へ分化誘導する試験法を構築することができました。また、肺上皮前駆細胞を有害化学物質に曝露したところ、化学物質に特徴のある応答性を確認できました。マウス iPS 細胞については、マクロファージへの分化培養法を検討し、大気汚染物質の PM_{2.5} やその構成成分が、初代細胞と同様に iPS 細胞由来マクロファージに対して非常に強い炎症や酸化ストレス反応を誘導することを見い出しました。これらの成果は、iPS 細胞由来の肺上皮細胞やマクロファージが大気汚染物質の毒性評価試験法として利用できる可能性を示唆しており、今後、環境化学物質の呼吸器への影響を評価する上での科学的基盤として役立つことが期待されます。

本研究の遂行にあたっては、研究所の多くのスタッフや所外の方々に多大なご協力・ご支援やご助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。

平成 30 年 3 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 渡 辺 知 保

目 次

1 研究の目的と経緯	1
1.1 研究の背景と目的	1
1.2 研究の構成	2
2 研究の成果	3
2.1 ヒト iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築	3
2.1.1 目的と経緯	3
2.1.2 実験方法	4
2.1.3 結果と考察	5
2.1.3.1 内胚葉から肺前駆細胞への分化誘導の検討	5
2.1.3.2 内胚葉から肺上皮細胞系列への分化誘導の検討	8
2.1.3.3 各種 iPS 細胞での肺上皮細胞への分化能の検討	10
2.1.3.4 有害化学物質の曝露による影響	11
2.2 マウス iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築	15
2.2.1 研究の背景と目的	15
2.2.2 方法	16
2.2.3 結果と考察	17
2.2.3.1 マウス iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導の検討	17
2.2.3.2 マウス iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導	19
2.2.3.3 マウス iPS 細胞由来のマクロファージを用いた曝露評価	23
2.3 まとめと今後の課題	26

引用文献

[資 料]

1 研究の組織と研究課題の構成	33
1.1 研究の組織	33
1.2 研究課題と担当者	33
2 研究成果発表一覧	34
2.1 誌上発表	34
2.2 口頭発表	35

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の背景と目的

近年の化学物質に対するリスク評価方法は迅速・簡便性が求められるとともに、動物福祉や倫理上の観点から動物実験を極力減らすための代替法の開発が望まれている。このことから、細胞レベルで検討する *in vitro* 評価試験が重要な位置づけとなってきた。一方で、これまでデータを蓄積してきた *in vivo* との影響差、種差、個体差、遺伝的素因との関係など、様々な問題点は残っている。

将来的に *in vitro* 評価試験の中心的な位置づけとなると考えられるヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞など）を利用した応用研究は、我が国において重点的に推進すべき科学技術分野となっている（平成 20 年 5 月「革新的技術戦略」「iPS 細胞活用毒性評価技術」は総合科学技術会議から革新的技術の位置づけ）。多能性幹細胞の利点は、生体内での発生初期過程を再現できる点や、様々な臓器を構成する多種の体細胞への分化が可能な点である。従来の *in vitro* 評価法においては、利用できる各体細胞の種類が少なく限定されており、データの普遍性・信頼性に問題が残る。一方で、多能性幹細胞は様々な体細胞に分化が可能なため、体細胞のソースとして利用することで、この問題を解消できると期待できる。特にヒト iPS 細胞は、胚を破壊して作成される ES 細胞と異なり倫理的問題が少ないため、既に多数の株が作製されており、バリエーションが豊富である。また、ヒト iPS 細胞は健常者だけでなく様々な疾患患者からも作成されているため、創薬の分野では患者由来 iPS 細胞から分化した細胞を疾患モデル細胞として創薬スクリーニングに活用し始めている。申請者らは、これまでヒト ES 細胞を用いて、様々な化学物質の神経毒性評価を実施してきたが、こうした状況を踏まえ、今後、多能性幹細胞を用いた毒性研究をヒト iPS 細胞に発展させていく必要がある。また、化学物質の毒性を扱う上で環境要因と遺伝的要因の両方を考慮する必要があるが、ヒト iPS 細胞は疾患等も含めた様々な遺伝的素因を含んだツールとなりえるため、将来的な *in vitro* での毒性評価系として構築していくべきものと考えている。そこで、本申請課題では、ヒト iPS 細胞に加え、*in vivo* での評価も可能なマウスの iPS 細胞系も併せた統合的なハザード評価を目指すことを目標とする。

ヒト iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築においては、化学物質等の毒性評価は動物実験主体から、培養細胞による *in vitro* 評価系が占める割合が増してきている。その理由としては、実験動物とヒトとの間の感受性種差や動物愛護の観点といった背景がある。前者においては例えばサリドマイドがげっ歯類よりも霊長類で毒性が強いという感受性の種差があることが知られているが、動物実験で得られた結果が必ずしもヒトへの影響を直接示しているわけではないことに留意する必要がある。また、後者においては動物実験を減らすための代替法の開発が進められており、培養細胞のような評価システムを実施する機会が増えてきている。ヒトの培養細胞を用いた毒性評価は、ヒトの細胞で直接、評価することが可能で、動物実験の低減にも繋がるため、重要視されている。ヒトの培養細胞としては不死化細胞と初代細胞が古くから利用されているが、不死化細胞は本来の性質を失っているため信頼性に欠ける点、また初代細胞はコストや同一ドナーからの供給が困難といった問題を抱えている。例えば、創薬において薬効との関連から薬物代謝酵素誘導評価が行われるが、不死化細胞では評価が困難なため初代細胞を用いる。しかしながら、初代細胞では無数のスクリーニング対象物質に対応するには莫大なコストが掛かり、また同一のドナーからの初代細胞を継続的に入手することが困難なため、遺伝的背景の点で統一した試験での評価の実施が難しい。こうした背景から、ヒト ES/iPS 細胞を用いた毒性評価試験法の開発が進んできた。ヒト ES/iPS 細胞は様々な体細胞への分化が理論的に可能であり、また初代細胞に近い正常な体細胞への誘導が見込まれる。つまり、ヒト ES/iPS 細胞から毒性評価の対象となる体細胞へと分化誘導することができれば、初代細胞と同様なレベルの評価が行え、しかも一定の遺伝的背景を持った標的細胞を安定的に供給することが可能と期待できる。こうした利点から、上記の創薬における毒性評価のため、ヒト ES/iPS 細胞由来の肝細胞の利用法が研究開発されている。さらにヒト iPS 細胞は様々な疾患患者からも樹立されており、疾患モデル細胞として疾患に対する有効薬の開発のためのツールとして重要な役割を期待されている。一方で、ES/iPS 細胞が受精卵と類似した発生過程をたどって分化することが可能なため、実際にヒトでは研究困難な発生学の研究にも利用さ

れ、毒性学の観点からも発生毒性の評価系としての利用価値も大きい。特に、脳神経系、肝臓、心筋等の循環器系に関する研究は初期から進められており、毒性評価系として期待されている。

マウス iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築においては、環境汚染物質の毒性評価は、古くからマウス等の動物モデルを用いて行われてきており、現在もヒトボランティアでは不可能な実験は *in vivo* 動物実験が主体である。一方で、動物愛護の観点、実験動物とヒトとの毒性影響の種差といった問題から、毒性評価の手法は *in vivo* 主体から *in vitro* へと移りつつある。つまり、培養細胞であれば、直接、ヒトの細胞を使うことができるため、実験動物を犠牲にすることも種差を考慮する必要もないのが利点として挙げられる。しかしながら、近年は自閉症といった脳神経の発達における影響やアレルギーのような免疫系への影響と化学物質曝露との関連性が危惧され、脳神経系の高次機能や行動学的視点、複雑に細胞が絡み合う免疫系といった対象はシンプルな細胞培養試験法では簡単に評価することが困難であるため、今後もマウス等の動物実験も必要であると考えられる。そのため、マウス個体で得られた毒性情報をヒトに外挿する際に、マウスとヒトとの間でどのような種差が存在するか調べていくには、同じ土俵である培養細胞での比較が望ましく、マウスの培養細胞を用いた実験系の継続的な発展も不可欠である。培養細胞としては不死化細胞と初代細胞があるが、前者は不死化のため本来の機能を喪失して信頼性に欠ける点、後者は実験動物を犠牲にしなければならない点が問題となる。これらの問題を解決するため、本研究課題では、多能性幹細胞である iPS 細胞を利用し、実験動物を犠牲にせず、初代細胞に近い性質を有する標的細胞を獲得して毒性評価に応用することを目指すための研究に着手した。

1.2 研究の構成

本研究課題は、iPS 細胞を用いた毒性試験法を目指すため、ヒトおよびマウスの iPS 細胞から、化学物質に対する毒性影響評価が可能な標的細胞への分化培養法を確立させることを目指す。本研究では、大気汚染物質とその標的となる呼吸器系への影響に絞って検討を行い、大気環境化学物質に対するハザード評価システムとしての道筋をつけることを目標とした。そのため、本研究課題は以下の二つのサブテーマで構成する。これらの研究課題の実施により、iPS 細胞を用いたハザード評価系の確立から様々な環境汚染物質の毒性影響予測を実施できることが期待でき、的確な予防対策や注意喚起が可能となることを期待した。

サブテーマ 1. ヒト iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築

ヒト iPS 細胞から各種の呼吸器系列細胞への分化を検討し、代表的な有害化学物質の曝露による影響を調べた。具体的には、1) 内胚葉から肺前駆細胞への分化誘導の検討、2) 内胚葉から肺上皮細胞系列への分化誘導の検討、3) 各種 iPS 細胞での肺上皮細胞への分化能の検討、4) 有害化学物質の曝露による影響の検討について、行った。

サブテーマ 2. マウス iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築

マウス iPS 細胞を用いた研究では、1) マウス iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導の検討、2) マウス iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導、3) マウス iPS 細胞由来のマクロファージを用いた曝露評価の検討を行った。

2 研究の成果

2.1 ヒト iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築

2.1.1 目的と経緯

呼吸器系臓器である肺は様々な種類の細胞で構成された複雑な組織である。下気道と呼ばれる部位は、気管、気管支、細気管支、肺泡で構成されるが、それぞれの部位で構成する細胞種が異なり、部位特異的な生体反応を担っている。例えば、気管支は、繊毛細胞、杯細胞（粘液分泌細胞）、基底細胞などの複数の細胞種で構成され、擬似的な積層構造の表面を持っており、主に繊毛細胞は呼気により侵入した異物を外に排除する役割を担い、杯細胞から分泌される粘液は異物をトラップして痰として外部へ排除するのに役立つ。一方で、末端の肺泡では肺泡上皮細胞と呼ばれる平坦な細胞で構成され、直ぐ近傍に毛細血管が存在し、ガスの交換場としての機能を有している。こうした呼吸器系臓器の表面を構成する細胞は上皮細胞の一種であるが、肺が発生、発達する段階において、部位によって異なる上皮細胞が形成される。

肺の発生は非常に複雑であるが、肺を構築する肺上皮細胞は、内胚葉から発生する。発生の初期段階において、胞胚の一部が陥入して原腸が形成され、この段階で内側に陥入した原腸の部分が内胚葉となる。その後、内胚葉から、前腸と後腸ができる。この内、前腸から肺、甲状腺、肝臓、膵臓などの臓器へと発達する。前腸はさらに前方前腸（anterior foregut）と後方前腸（posterior foregut）に分かれ、前者が肺や甲状腺、後者が肝臓や膵臓の元となる。肺は、前方前腸からさらに分化した肺前駆細胞である前方前腸腹側内胚葉（ventralized anterior foregut）から形成される肺芽より発生する。肺芽からは気管、気管支が形成され、伸長、分岐を繰り返し、やがて末端の肺泡まで形成される。こうした複雑な立体構造をなす肺の発生は、伸長の停止から分岐が起こる部位などの局所に特異的なシグナルが発生することで厳密に管理される（図1）。

一方、免疫系のマクロファージは中胚葉から発生し、胎児期初期に作られた原始的な細胞が各組織に移行して常在性

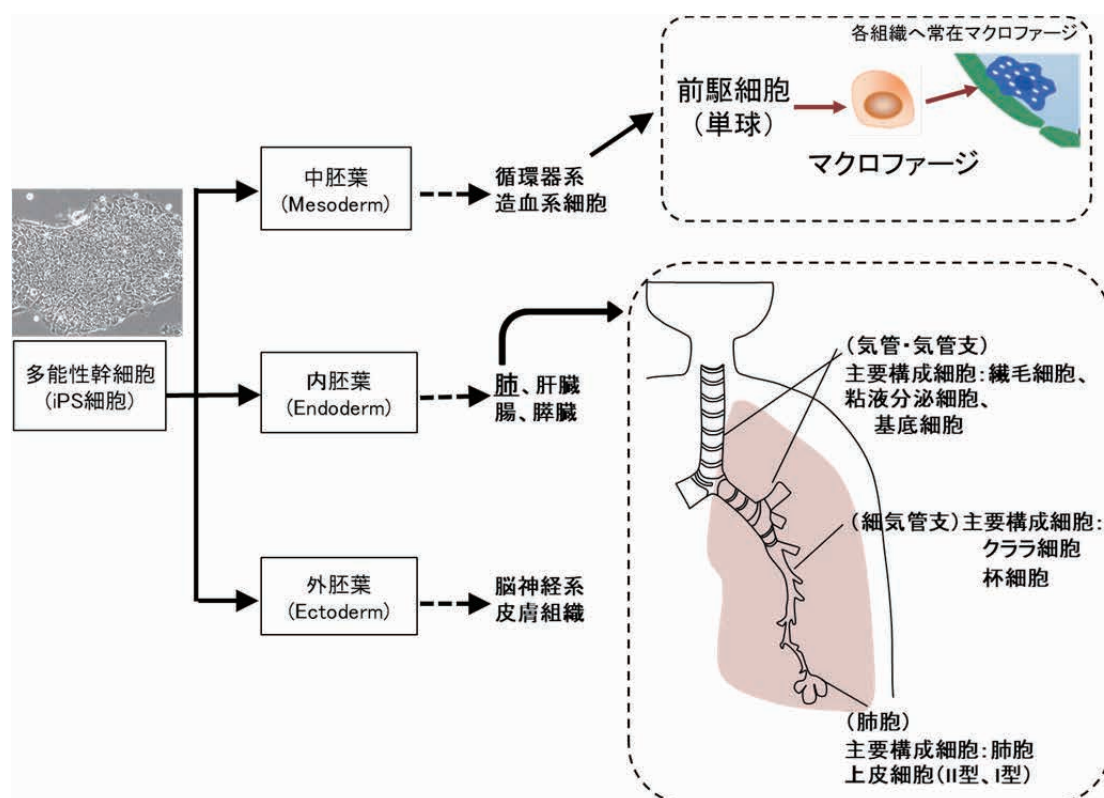


図1 iPS細胞から三胚葉を介した各種の体細胞への分化経路と、肺の構造と肺を構成する肺上皮細胞及び中胚葉からのマクロファージへの分化

となる（図 1）。肺に常在する肺泡マクロファージは、呼気から侵入した異物、特に大気汚染物質で粒子である PM_{2.5} を取り込み排除しようとするが、これによりマクロファージが活性化されることで肺に炎症や酸化ストレスが引き起こされるため、このマクロファージの異物応答性が、呼吸器系疾患の要因ともなりえる。

ヒト ES/iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導は他の組織構成細胞よりも分化誘導が難しかったが、近年は報告例が増えている。内胚葉以降の分化については再生医療の重要性から肝臓や膵臓に関する研究が多かったが、そのような中、2011 年に Green ら¹⁾ がヒト ES/iPS 細胞由来の内胚葉をトランスフォーミング増殖因子（transforming growth factor β (TGF β)) および骨形成タンパク質（bone morphogenetic protein, BMP）の阻害剤を組み合わせることで処理することにより効率的に前方前腸の誘導が可能となること、また前方前腸から背腹パターンニング（dorsoventral patterning）についても示し、前方前腸腹側内胚葉へと分化可能であることを明らかにしたことでヒト ES/iPS 細胞から肺への分化培養の道が大きく開けた。その後、同グループはこの培養法を発展させ、さらにヒト ES/iPS 細胞から繊毛上皮や杯細胞の気管支上皮、クララ細胞、肺泡上皮細胞といった様々な肺上皮細胞を混合状態で誘導したことを報告している²⁾。一方で、京都大学のグループでは肺前駆細胞を三次元培養してオルガノイドを形成させる培養法で、肺泡上皮細胞、気管支の繊毛上皮をそれぞれ独立して分化誘導することを報告している^{3,4)}。こうした技術は、将来的には慢性閉塞性肺疾患（COPD）等の呼吸器疾患に対する再生医療の手法として期待されているが、培養法の再現性、分化誘導の効率、肺上皮細胞の分化特異性など、様々な課題が残っており、今後、再生医療に向けてさらなる発展が期待されている。

呼吸器の毒性評価は、例えば大気汚染物質、近年では PM_{2.5} といった微粒子の毒性評価はマウス等の実験動物で実施されてきた。肺の構造は複雑であることから、毒性評価としては動物曝露実験が多かったが、最近では各肺上皮の不死化細胞培養方法でも調べられることが多い。ヒト ES/iPS 細胞は、従来の不死化細胞や初代細胞に代わる新たな *in vitro* 毒性評価試験法のツールとして期待されているが、ヒト ES/iPS 細胞を用いた大気汚染物質の毒性評価はまだ実施されていない。

そこで本サブテーマでは、ヒト iPS 細胞を用いた大気汚染物質の評価試験法の開発を目指すため、まずヒト iPS 細胞から肺上皮系の細胞へ分化させる培養システムについて立ち上げ、各種の肺上皮細胞への分化手法の最適化を図ることを検討した。また、近年はオルガノイドのようなゲル中で立体構造を構築する三次元培養による分化手法の有効性が報告されているが^{3,4)}、ゲル中の三次元培養による細胞の集合体オルガノイドに大気汚染物質を曝露することは現時点では曝露量の定量や影響の計測手法の開発が別に必要なため、毒性評価システムとして発展させるためにはシンプルな二次元培養による分化培養システムのほうが利点があると考えた。したがって、本研究では二次元の平面培養による分化培養法を用いて検討した。

2.1.2 実験方法

ヒト iPS 細胞である 201B7、253G1、409B2 は理化学研究所バイオリソースセンターから譲渡を受けた。これらの iPS 細胞は、まずフィーダー細胞である SNL76/7 細胞（European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)）上に播種し、霊長類用未分化維持培養液 Primate ES Cell Medium (ReproCELL) で維持を行った。コロニーがある程度の大きさに達した後、細胞をヒト ES 細胞剥離液 (ReproCELL) でコロニー状のまま分離し、ガラス化法である細胞保存液 Cell Reservoir One（ナカライ）で保存を行った。次に細胞を解凍後、iPS 細胞をフィーダーレス状態にするため、細胞外基底膜基質マトリゲル (Corning) をコートしたディッシュに播種し、ヒト用未分化維持培養液 mTeSR-1 培地 (StemCell Technologies) で維持を行った。細胞が 80 ～ 90% 程度の密度に達したら、コロニー剥離液 ReLeSR (StemCell Technologies) で処理し、適度なコロニーサイズにして継代を行い維持した。その後、3 継代ほど維持を行ってから実験に使用した。

分化実験は、フィーダーレスの iPS 細胞を Y27632 (ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ阻害剤) で 1 時間処置後、Accutase (Gibco) で 37℃、10 分間処理し、細胞をシングルセルの状態にした。分化を行うため、マトリゲルコートした 48 well plate に 1×10^5 cells/well で播種した。Goto らの方法³⁾ で内胚葉に分化させる場合には、0 日目の培地は Activin (100 ng/ml)、CHIR99021 (1 μ M)、B-27 supplement 含有 RPMI-1640 培地を用いた。

1 日目に培地を Activin (100 ng/ml)、CHIR99021 (1 μ M)、酪酸ナトリウム (250 μ M)、B-27 supplement 含有 RPMI-1640 培地に交換した。2 日目に培地を Activin (100 ng/ml)、CHIR99021 (1 μ M)、酪酸ナトリウム (125 μ M)、B-27 supplement 含有 RPMI-1640 培地に交換し、4 日目にも同じ培地に交換した。また、Loh らの方法⁵⁾で内胚葉に分化させる場合には、0 日目は Activin (100 ng/ml)、CHIR99021 (2 μ M)、PI-103 (50 nM) 含有の CDM2 培地 (BSA (5 %)、lipid concentrate (1 %)、MTG (450 μ M)、insulin (0.7 μ g/ml)、transferrin (15 μ g/ml) 含有 IMDM/F12 培地) を用いた。1 日目に培地を Activin (100 ng/ml)、LDN-193189 (250 nM) 含有 CDM2 培地に交換し、3 日目まで培養した。誘導した内胚葉から先の分化の基本培地は B-27 supplement、L-ascorbic acid (50 μ g/ml)、MTG (400 μ M) 含有 DMEM/F12 を使用した³⁾。まず、内胚葉を前方前腸化するため、SB431542 (10 μ M) および Noggin (100 ng/ml) 含有培地に交換し、4 日間培養を行った。その後、Goto らの方法³⁾に従って肺胞上皮細胞に分化する場合は、FGF10 (100 ng/ml) 含有培地で 7 日間、培養後、dexamethasone (50 nM)、8-Br-cAMP (0.1 mM)、3-isobutyl-1-methylxanthine (0.1 mM)、KGF (100 ng/ml) 含有 Ham's F12 培地 (DCI+K) で 4 日間、培養した。Huang らの方法²⁾に従う場合には、FGF10 (10 ng/ml)、KGF (10 ng/ml)、CHIR99021 (3 μ M) で 7 日間、培養後、DCI+K で 4 日間、培養を行った。Wong らの方法⁶⁾に従って分化培養する場合は、FGF10 (50 ng/ml)、FGF7 (50 ng/ml)、BMP4 (5 ng/ml) で 5 日間、培養後、FGF10 (10 ng/ml)、FGF7 (10 ng/ml)、FGF18 (10 ng/ml) で 6 日間、培養を行った。

リアルタイム PCR 法による遺伝子の発現誘導解析は、まず細胞から総 RNA を NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) で精製した。得られた RNA を用い、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) を使用して cDNA を合成した。リアルタイム PCR 解析は、GeneAmp SYBR qPCR Mix α (NipponGene) および Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Bio) で行った。

免疫染色法によるタンパクの発現誘導は、まず細胞を 4 % パラホルムアルデヒド (Wako) で室温、15 分間、固定を行った。PBS (-) で洗浄後、0.5% Triton X-100 で室温、15 分間処置し、細胞膜の透過処理を行った。次に、3 % ウシ血清アルブミンでブロッキングを室温、1 時間、行った後、各一次抗体を添加し、室温、1 時間、あるいは 4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。一次抗体は、抗 CC10 抗体 (Santa Cruz)、抗 Cytokeratin 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 HNF-3b (FOXA2) 抗体 (Santa Cruz)、抗 NKX2.1 抗体 (Abcam)、抗 OCT3/4 抗体 (R&D)、抗 SFTPC 抗体 (Santa Cruz)、抗 SOX17 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 SSEA1 抗体 (R&D) を使用した。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体である Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体および Alexa594 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Molecular Probes) を添加した。室温で 1 時間反応後、細胞を PBS で洗浄し、核染色のため DAPI (DOJINDO) で室温、5 分間、反応させた。

免疫染色後、細胞の観察及び撮影は、主に、蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X700 もしくは、オリンパス IX71) を用いて行った。また、詳細な細胞像の観察と撮影には、高解像度検出器を付加した共焦点蛍光顕微鏡 (オリンパス FV1200) で行った。

尚、ヒト iPS 細胞を使用した研究は、独立行政法人国立環境研究所ヒト ES 細胞等使用研究倫理委員会において「独立行政法人国立環境研究所ヒト iPS 細胞の取扱い等に関する規程」に基づいて承認され、その規程に順守して行ったものである (承認日平成 25 年 9 月 2 日)。

2.1.3 結果と考察

2.1.3.1 内胚葉から肺前駆細胞への分化誘導の検討

これまで多くのヒト ES/iPS 細胞の分化に関する報告がされているが、その分化手法の有効性は iPS 細胞の樹立法や由来組織等、色々な条件によって変化する⁷⁾。そのため、まず内胚葉への分化を行う上で、どの手法が我々の実験条件上で最適かの検討を行った。本研究では、先述した株のうち、山中らのグループが樹立したヒト iPS 細胞株の 201B7⁸⁾を中心に実験を行った。内胚葉への分化法については様々なグループから報告があるが、ここでは Goto らの方法³⁾と Loh らの方法⁵⁾を比較した (図 2A)。その結果、Goto らの方法で分化させたほうが、より内胚葉分化マーカーの FOXA2 遺伝子が高く誘導された (図 2B)。また、免疫染色法により、Goto らの方法で分化させた細胞の殆どが FOXA2 および別の内胚葉マーカーの SOX17 の両方を発現していることを確認した (図 2C)。

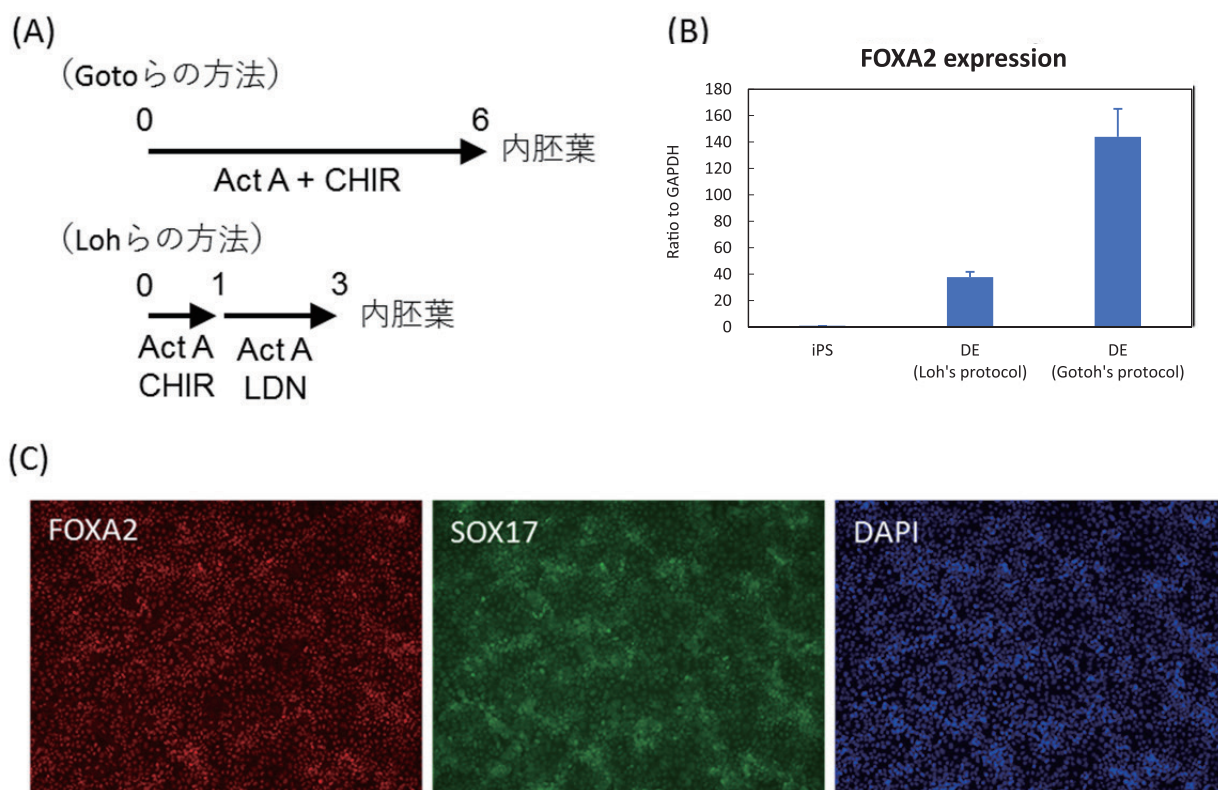


図2 ヒト iPS 細胞から内胚葉への誘導

(A) 未分化 iPS 細胞から内胚葉分化の各種方法、(B) 未分化 iPS 細胞 (iPS) および各分化プロトコルで誘導した内胚葉 (DE) におけるマーカー遺伝子 FOXA2 の遺伝子発現、(C) 内胚葉マーカー (FOXA2 および SOX17) の蛍光免疫染色の画像

そこで、Goto らの方法で分化させた内胚葉から、さらに SB431542 + Noggin 刺激で前方前腸内胚葉 (anterior foregut) へ、次に BMP4 + ATRA + CHIR99021 刺激で前方前腸腹側内胚葉 (ventralized anterior foregut) まで誘導の刺激³⁾を行った (図 3A)。その結果、未分化の iPS 細胞を内胚葉へ分化させた後に SB431542 + Noggin (SB + NG) 処理すると、顕著に肺前駆細胞マーカー NKX2.1 の遺伝子発現が増加することが確認された (図 3B)。また、前方前腸化を行う刺激について、他の TGFβ および BMP 阻害剤である化学物質の A8301 + LDN-193189 (A + LDN) の組み合わせについても検討した (図 4A)。その結果、10 日目の前方前腸内胚葉誘導時において、SB + NG よりも A + LDN の方で前方前腸のマーカーである OTX2 が強く誘導され、逆に後方前腸マーカーの HNF1B がより低下した。また、中腸および後腸のマーカーである CDX2 も A + LDN で強く抑制されている結果となった (図 4B)。

同様の実験を 14 日目でも調べたが (図 5A)、やはり A + LDN のほうが前方前腸への分化をより強く誘導していることが示唆された (図 5B)。しかしながら、肺前駆細胞のマーカーである NKX2.1 の誘導については、SB + NG のほうが A + LDN よりも強い誘導を示した (図 3B)。A + LDN のほうが前腸前方化をより強く誘導している傾向を示したのに何故、NKX2.1 の誘導は SB + NG のほうが高いのか理由は不明であるが、肺上皮細胞への分化を目指すにあたり、肺上皮細胞への分化誘導に関与する転写因子の NKX2.1 がより強く誘導される SB + NG 刺激の方を選択することにした。さらに、NKX2.1 誘導に対する内胚葉分化期間の影響について検討した。ES/iPS 細胞から分化した内胚葉には多様性があり、同じように FOXA2/SOX17 を発現していても刺激の仕方により、前方前腸内胚葉へ分化する傾向を示すものと、後に肝臓や膵臓へと発達する後方前腸内胚葉 (posterior foregut) に分化しやすいものと異なるサブタイプがあると言われている⁹⁾。また、Huang ら²⁾ は内胚葉への分化期間によって NKX2.1 発現誘導の効率が変化することを報告していることから、内胚葉分化期間について 4、5、6 日間で行った場合の NKX2.1 の発現誘導を比較した。その結果、内胚葉分化を 4 日間で行った場合に最も NKX2.1 が誘導したことから、内胚葉への分化期間は 4 日とした (図 6B)。

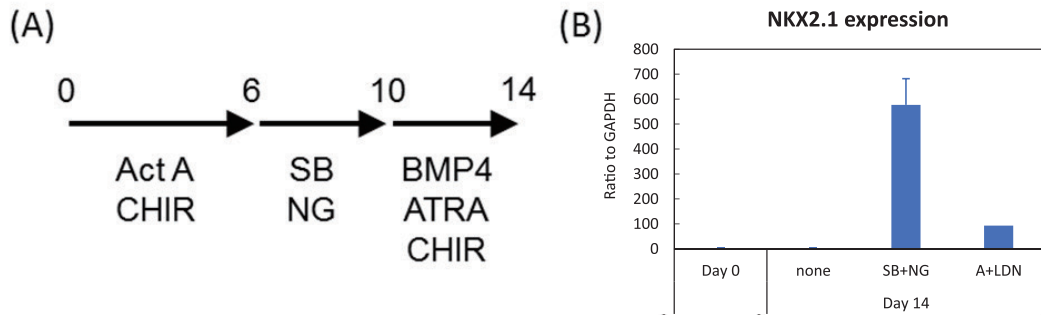


図3 ヒト iPS 細胞から肺前駆細胞への分化誘導

(A) 未分化 iPS 細胞から肺前駆細胞への分化誘導法、(B) 未分化 iPS 細胞 (Day 0) および iPS 細胞から分化培養した 14 日目の細胞 (6 ~ 10 日目に未処置 (none)、SB+NG 処置、A+LDN 処置したもの) の肺前駆細胞マーカー (NKX2.1) の遺伝子発現量の解析

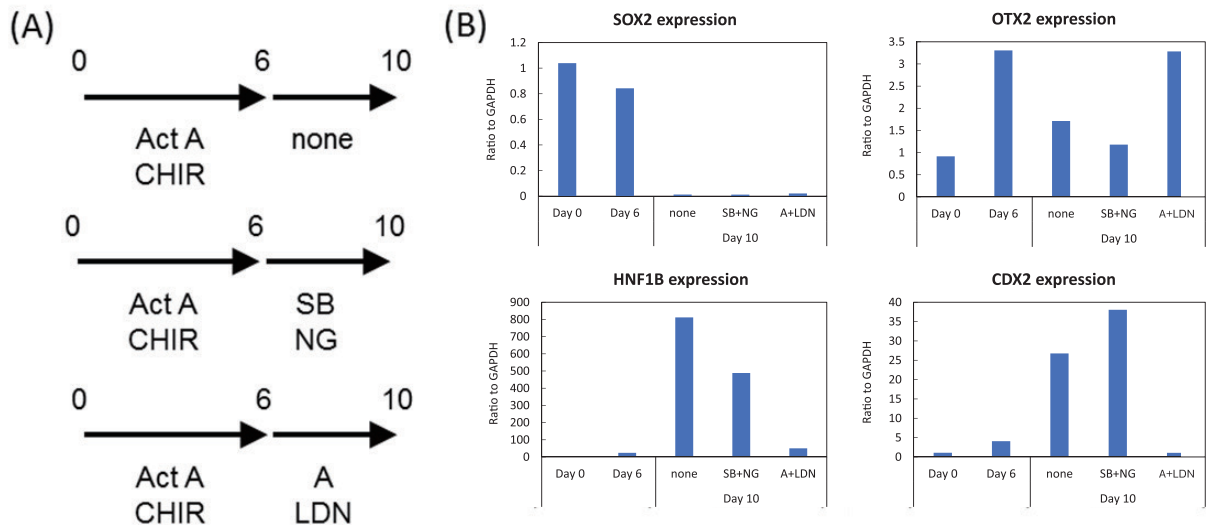


図4 内胚葉分化から前方前腸内胚葉への分化への各種刺激剤の検討

(A) 未分化 iPS 細胞から前方前腸内胚葉への各種刺激剤の方法、(B) 未分化 iPS 細胞 (Day 0)、分化 6 日目の内胚葉 (Day 6)、分化 10 日目の細胞 (6 ~ 10 日目に未処置 (none)、SB+NG 処置、A+LDN 処置したもの) の前方前腸 (SOX2 および OTX2)、後方前腸 (HNF1B)、中腸および後腸 (CDX2) の各マーカー遺伝子の発現解析

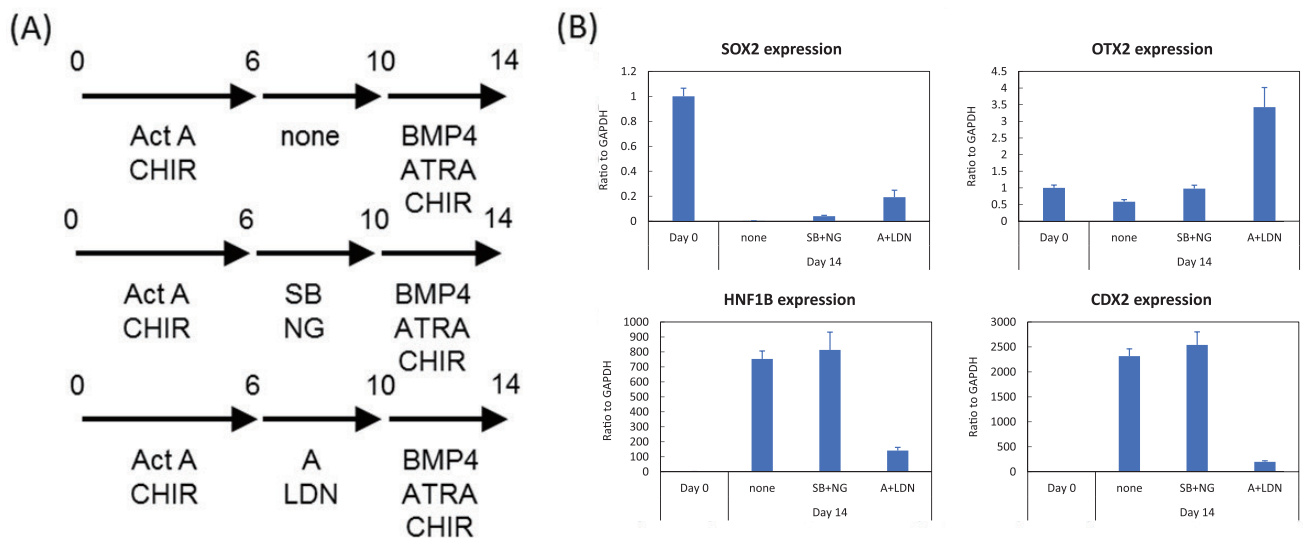


図5 内胚葉分化から前方前腸内胚葉を経て肺前駆細胞への分化への各種刺激剤の検討

(A) 未分化 iPS 細胞から肺前駆細胞への各種刺激剤の方法、(B) 未分化 iPS 細胞 (Day 0)、分化 14 日目の細胞 (6 ~ 10 日目に未処置 (none)、SB+NG 処置、A+LDN 処置したもの) の前方前腸 (SOX2 および OTX2)、後方前腸 (HNF1B)、中腸および後腸 (CDX2) の各マーカー遺伝子の発現解析

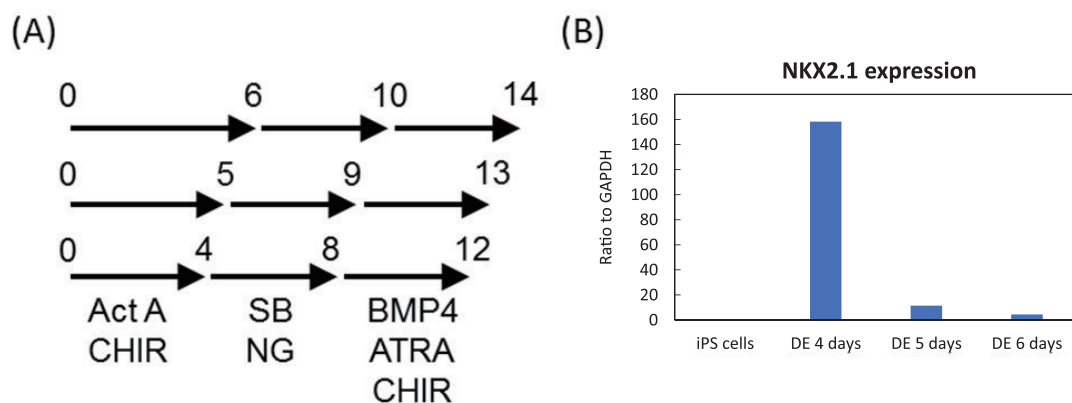


図6 内胚葉分化期間が及ぼす肺前駆細胞への分化誘導への影響

(A) 異なる内胚葉分化期間による肺前駆細胞への分化方法、(B) 未分化 iPS 細胞およびそれぞれの内胚葉分化期間を経て誘導した細胞における肺前駆細胞マーカー (NKX2.1) 遺伝子の発現解析 (DE 4 days、DE 5 days、DE 6 days は、4 日間、5 日間、6 日間分化させた内胚葉を使用)。

2.1.3.2 内胚葉から肺上皮細胞系列への分化誘導の検討

NKX2.1 陽性の内胚葉は発生学的に肺前駆細胞として肺芽を形成するものであり、ここから各肺の部位に発達していく。そこでまず、Goto ら³⁾の方法に従って肺胞上皮細胞に分化するか検討を行った。肺胞は肺の形成段階において FGF10 が発現する部位において細胞の増殖が起こり伸長して分岐が形成されていく。また、dexamethasone、cAMP、isobutylmethylxanthine (IBMX) や keratinocyte growth factor (KGF) が肺胞の成熟化に有効であることが報告されている¹⁰⁾。このような知見を元にした方法で、まず NKX2.1 陽性細胞に分化させた細胞を FGF10 で培養し、さらに dexamethasone、cAMP、IBMX、KGF (DCI+K) で培養した。その結果、肺胞上皮 II 型細胞のマーカーである surfactant protein C (SFTPC) の発現が増加することが確認できたが、その増加はわずかであり効率は低いと思われた (図 7)。

次に、肺前駆細胞から気管支上皮細胞への分化誘導を検討した。気管支上皮としては繊毛細胞、杯細胞、基底細胞があるが、方法としては Wong ら⁶⁾の報告を参考にした。Wong らは肺前駆細胞を FGF10、FGF7、BMP4 で刺激後、さらに FGF10、FGF7、FGF18 で刺激することで、主に気管支上皮へ分化誘導させている。我々の実験条件でも同様の刺激を行ったところ、基底細胞、繊毛細胞、杯細胞の各マーカーの増加が確認された (図 8)。その中でも特に基底細胞の

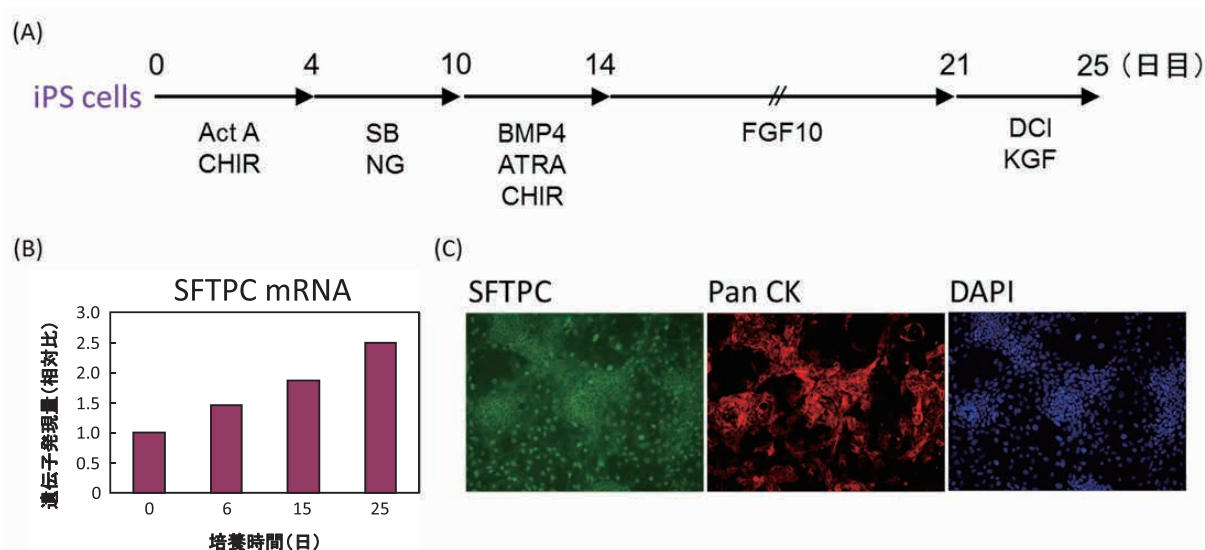


図7 ヒト iPS 細胞から肺胞上皮細胞の誘導

(A) 未分化 iPS 細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導法、(B) 肺胞上皮 II 型細胞マーカー (SFTPC) 遺伝子発現の経日変化の解析、(C) 肺胞上皮細胞マーカー抗体による蛍光免疫染色の画像 (SFTPC: 肺胞上皮 II 型細胞マーカー、Pan CK: 上皮細胞マーカー、DAPI: 核染色)

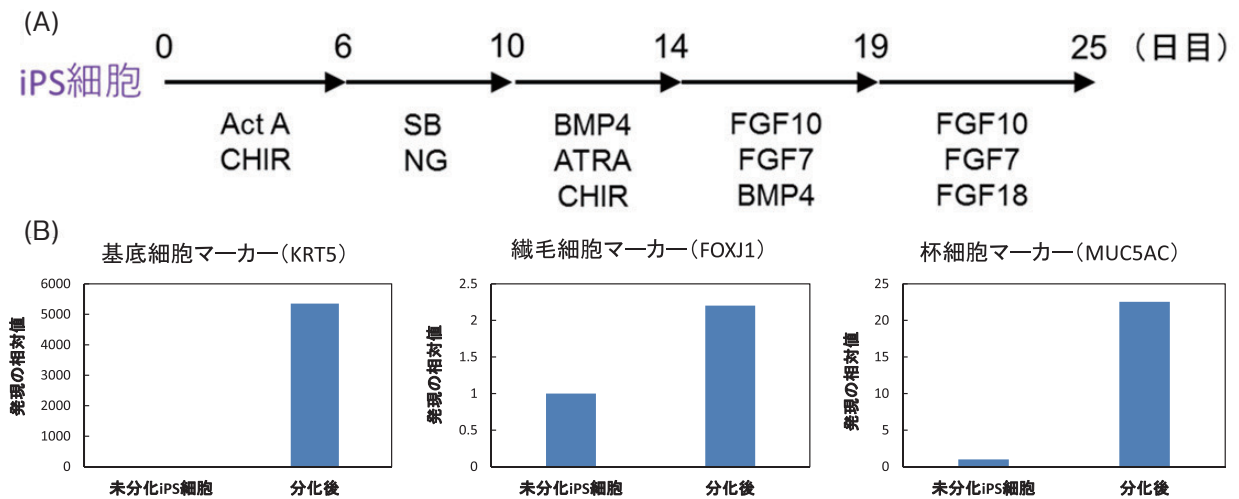


図8 ヒト iPS 細胞から気管支上皮細胞の誘導

(A) 未分化 iPS 細胞から気管支上皮細胞への分化誘導方法、(B) 各気管支上皮細胞マーカー (KRT5、FOXJ1、MUC5AC) の遺伝子発現の解析

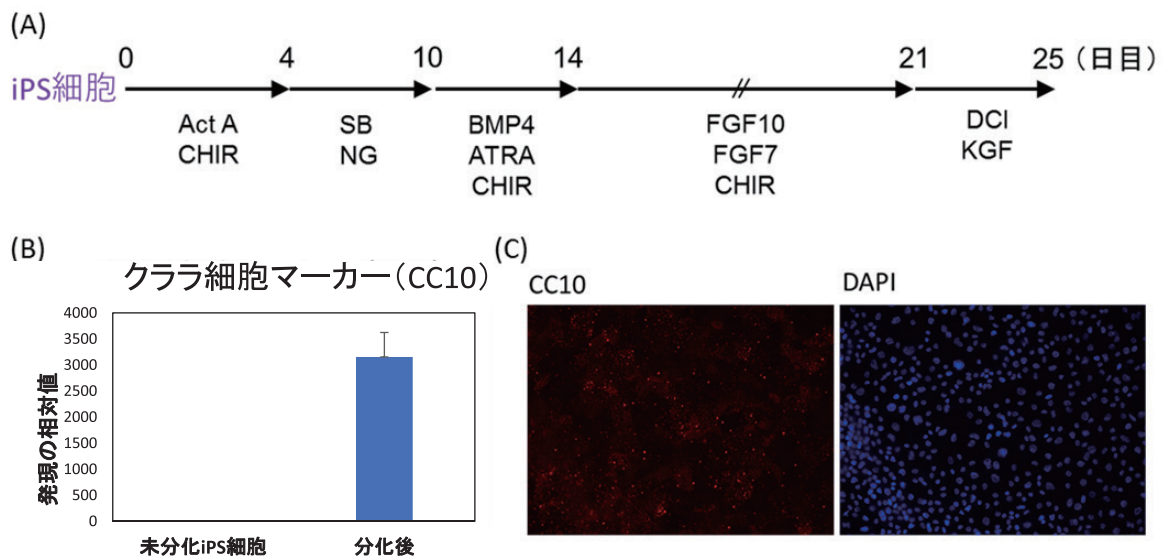


図9 ヒト iPS 細胞からクララ細胞への分化誘導

(A) 未分化 iPS 細胞からクララ細胞への分化誘導方法、(B) クララ細胞マーカー (CC10) の遺伝子発現解析、(C) CC10 発現の蛍光免疫染色の画像

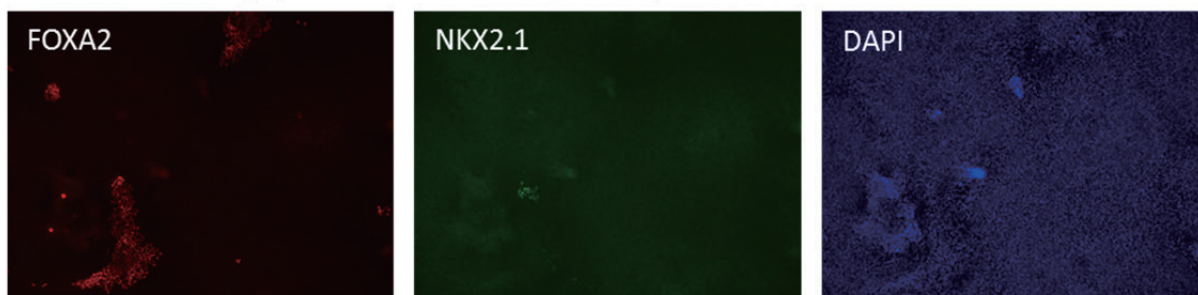
マーカーの増加が顕著であり、基底細胞への分化プロトコルとして利用できることが示唆された。基底細胞は繊毛細胞や杯細胞の前駆細胞としての役割を持っており、基底細胞の *in vitro* 培養試験においても気層培養下で繊毛形成や粘液分泌が認められるようになる。そのため、将来的には図8で示したプロトコルで分化した細胞を気層培養下で繊毛細胞や杯細胞へと分化して気管支モデルが構築できるか検討する予定である。

肺前駆細胞の刺激の方法としては、他に Huang ら²⁾ が報告している FGF10、KGF、CHIR99021 による刺激後、DCI + K を行う方法があり、この方法では気管支上皮や肺胞上皮の混合として誘導されると報告されている。この刺激についても試してみたところ、特にクララ細胞のマーカーである CC10 の発現量が大きく増加していた (図9)。このことから、この分化方法はクララ細胞への分化プロトコルとして利用できることが示唆された。

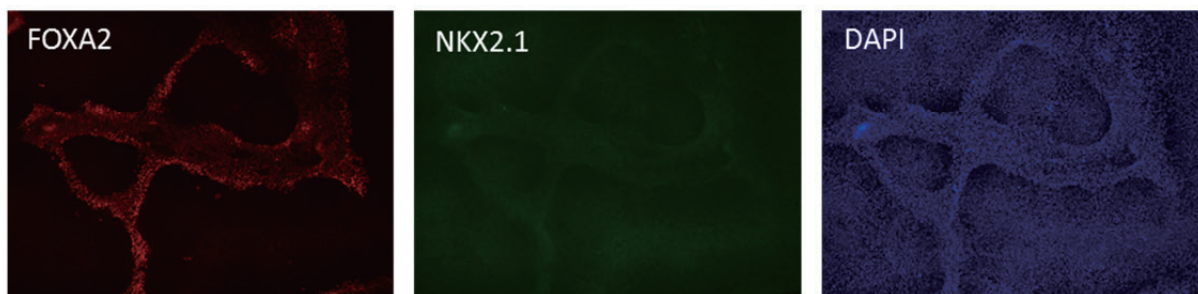
2.1.3.3 各種 iPS 細胞での肺上皮細胞への分化能の検討

上記のヒト iPS 細胞の分化培養実験では国内で広く利用されている 201B7 を用い、内胚葉、前方前腸、肺前駆細胞、肺上皮細胞と各段階を経て分化培養を検討したが、内胚葉へは高い分化効率を示したものの、それ以降、分化段階を経るごとに効率は下がって行っていた。Goto らの報告³⁾では NKX2.1 陽性細胞の割合は 60 ~ 70% と比較的、高い分化効率を示しているが、我々の条件下では免疫染色で確認したところ全体的に非常に弱い発現しか認められず、改善の余地があると考えられた。特に、肺前駆細胞への分化効率をより高める必要があると考えられた。この問題の原因として使用している iPS 細胞株の分化しやすさの違いが考えられたため、201B7 以外の細胞株で試した。201B7 と同じドナーから同様のレトロウイルスベクターにより 3 因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4) のみの導入により樹立された株の 253G1 や、染色体に取り込まれずに遺伝子を持続的に発現できるエピソーマルベクターにより 6 因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28、p53shRNA) を導入して作成された 409B2 について試した。その結果、253G1 iPS 細胞では NKX2.1 を高発現した分化はわずかにしか認められなかったが (図 10)、409B2 iPS 細胞では播種する細胞数を多くして密度を高

Low density (0.5×10^5 cells/well)



Medium density (1×10^5 cells/well)



High density (2×10^5 cells/well)

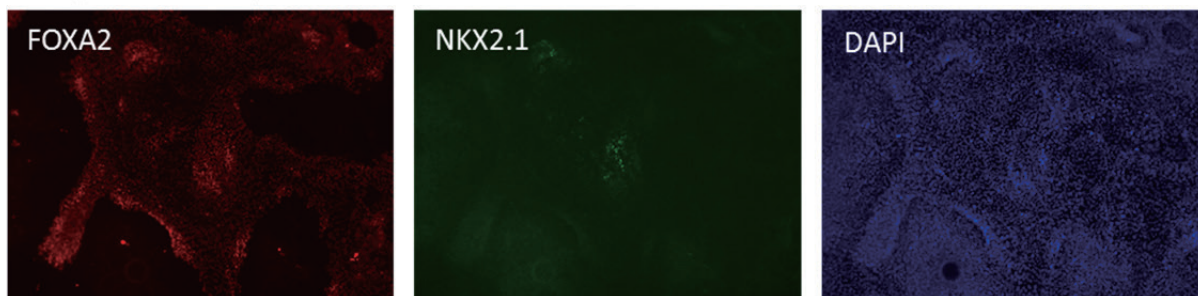


図 10 ヒト iPS 細胞 (253G1) による肺前駆細胞への分化誘導

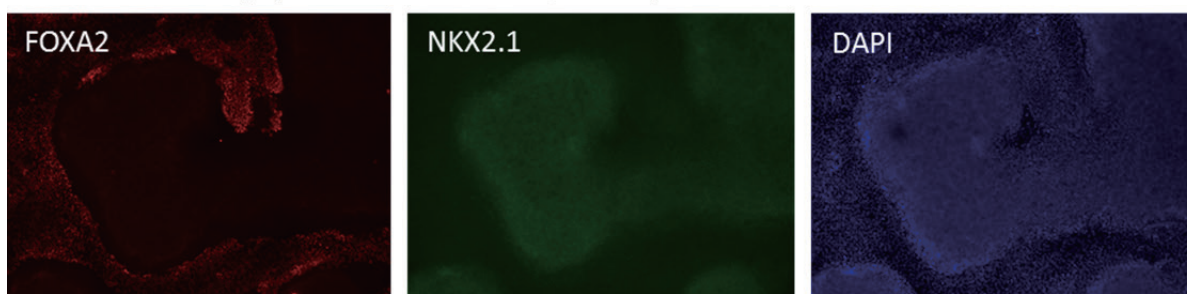
ヒト iPS 細胞 (253G1) を各細胞密度で分化を開始し、図 6A で示した方法で分化させ、肺前駆細胞への分化を行った。細胞の確認には、内胚葉マーカーである FOXA2 抗体を赤色に、肺前駆細胞マーカー NKX2.1 抗体を緑色に蛍光免疫染色を同時に施した。

くしてやると NKX2.1 の高発現細胞が多数出現することがわかった（図 11）。これらの NKX2.1 を高発現している細胞は同時に FOXA2 も発現していることが確認でき、肺前駆細胞が NKX2.1⁺FOXA2⁺であることが確認できた。この結果から、同じヒト iPS 細胞でもその樹立の方法の違いにより分化効率が大きく左右されることが示唆され、特にエピソードベクターで作出された iPS 細胞が、肺上皮への分化に適している可能性が考えられた。さらに、この 409B2 を用いて肺上皮への分化誘導を検討したところ、409B2 では、細胞がコロニー状に集まり、肺胞様のドーム形成をしている様子が観察された（図 12）

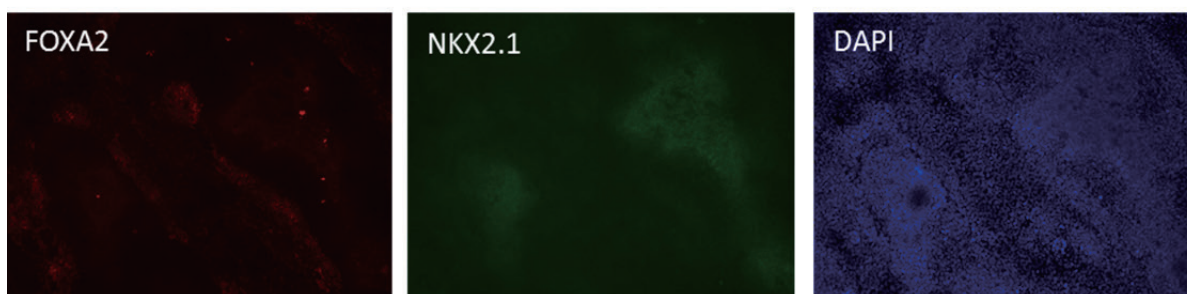
2.1.3.4 有害化学物質の曝露による影響

iPS 細胞から肺前駆細胞を用いて有害化学物質の有害性確認であるハザード評価を行うことは、化学分析で物質の検知や同定、環境媒体のモニタリングが大きく進展している今日では、動物実験だけではその進展のスピードに追いついていないため、*in vitro* での評価は重要な試験の一つである。そのため、より精度の高い共焦点レーザー顕微鏡によ

Low density (0.5 x 10⁵ cells/well)



Medium density (1 x 10⁵ cells/well)



High density (2 x 10⁵ cells/well)

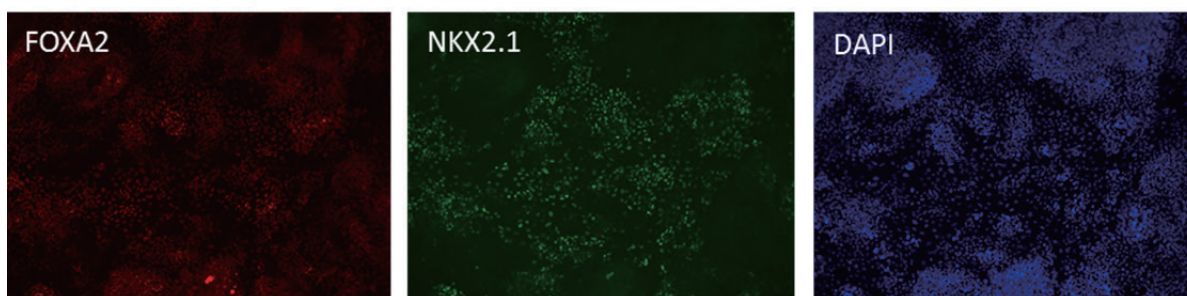


図 11 ヒト iPS 細胞（409B2）による肺前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞（409B2）を各細胞密度で分化を開始し、図 6A で示した方法で分化させ、肺前駆細胞への分化を行った。細胞の確認には、内胚葉マーカーである FOXA2 抗体を赤色に、肺前駆細胞マーカー NKX2.1 抗体を緑色に蛍光免疫染色を同時に施した。

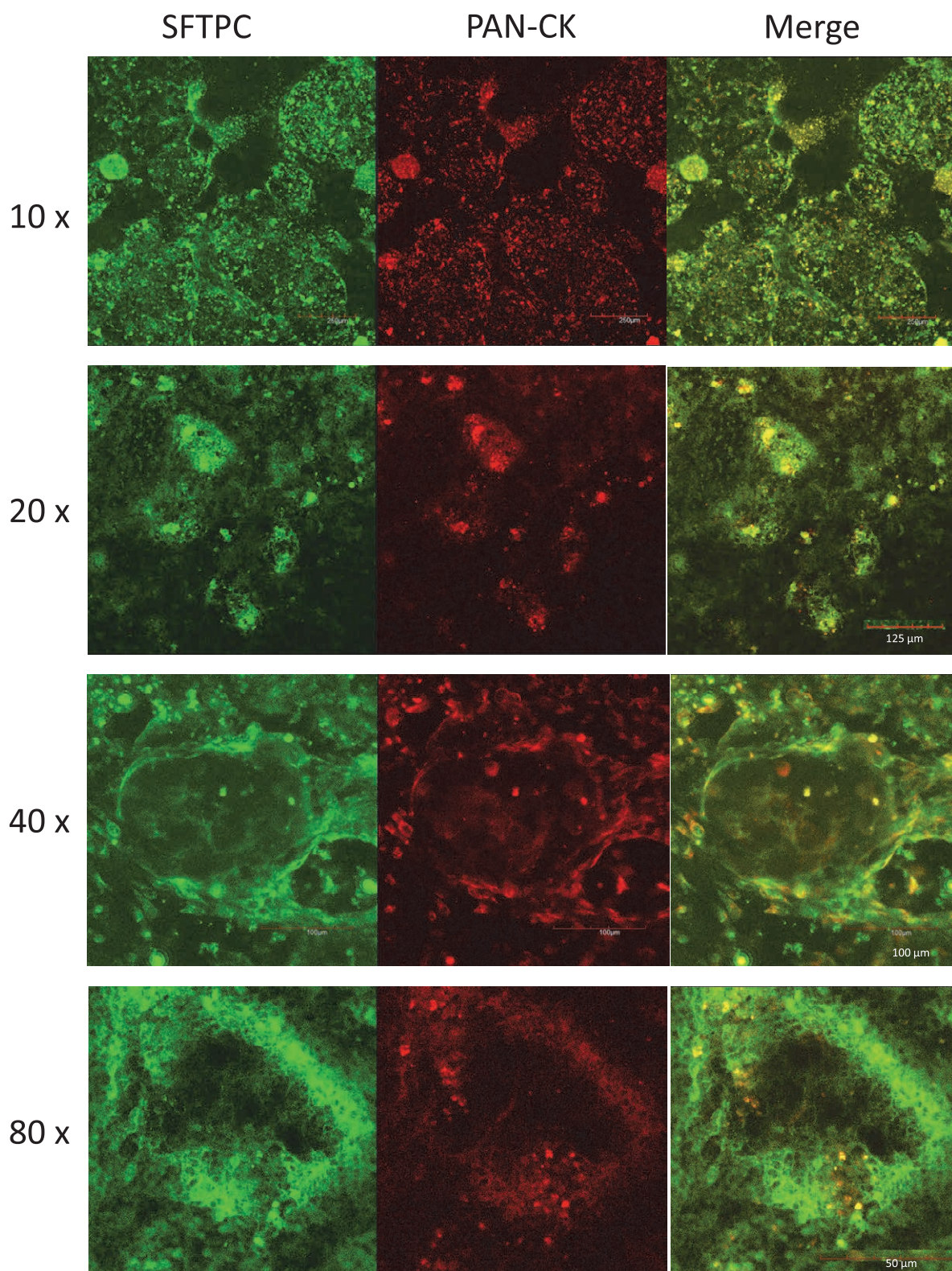


図 12 iPS 細胞（409B2）による肺前駆細胞（肺胞上皮Ⅱ型細胞）への分化誘導

ヒト iPS 細胞（409B2）を図 7A に示した方法で、肺胞上皮Ⅱ型細胞への分化を行った。細胞の確認には、肺胞上皮Ⅱ型細胞マーカーである SFTPC 抗体を緑色に、同じくマーカーである PAN-CK 抗体を赤色に蛍光免疫染色を同時に施した。Merge: 重ね合わせ。10x、20x、40x、80x は、それぞれ共焦点レンズ 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍の観察像。

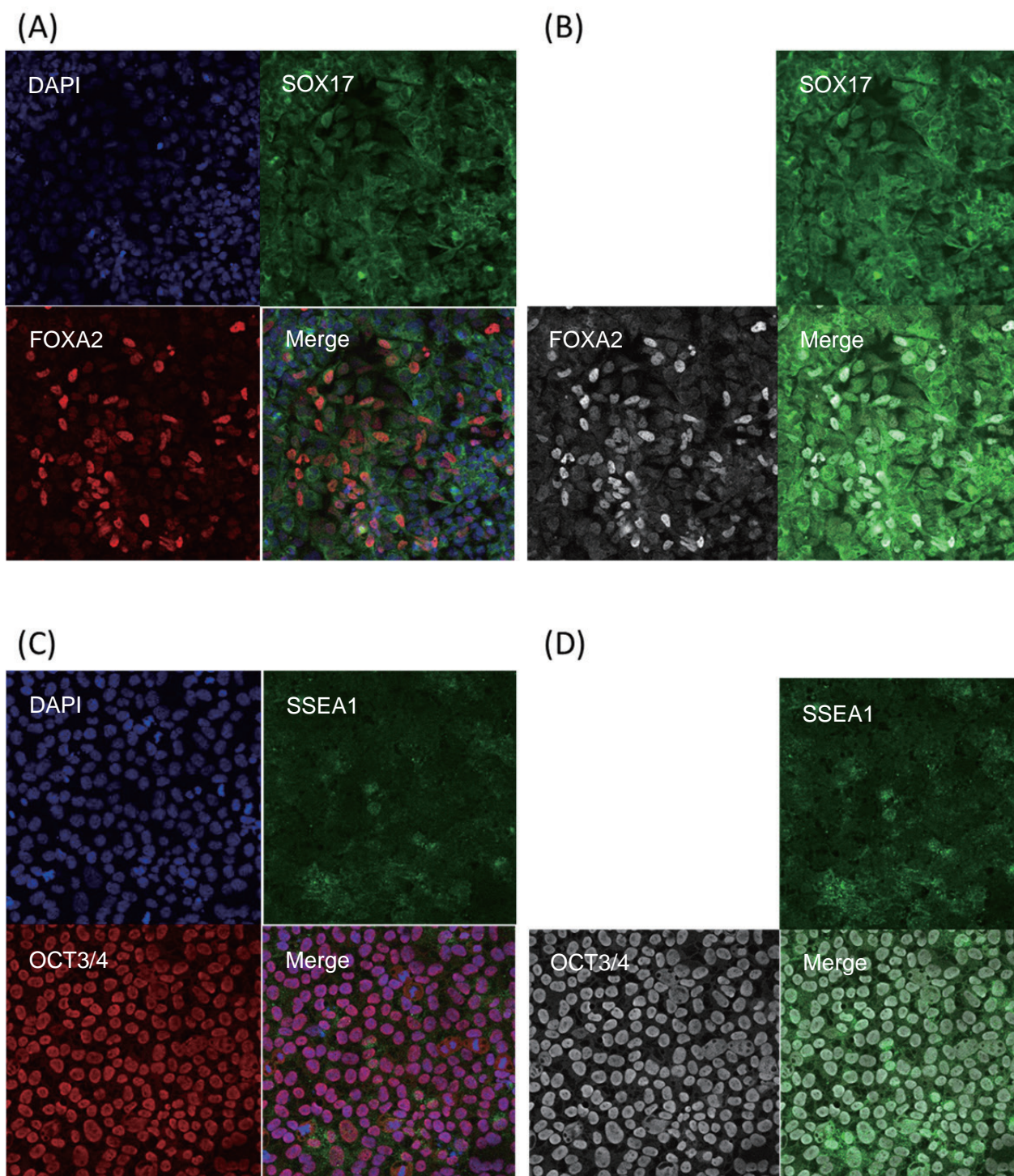


図 13 ヒト iPS 細胞による内胚葉への分化及び未分化細胞の共焦点蛍光顕微鏡による検討

(A) ヒト iPS 細胞 (253G1) から分化させた内胚葉を分化マーカーの FOXA2 および SOX17 抗体で蛍光免疫染色し、共焦点で観察した画像、(B) 同じ蛍光免疫染色した内胚葉を高感度付共焦点で観察した画像、(C) 未分化のヒト iPS 細胞を未分化マーカーの SSEA1 および OCT3/4 抗体で蛍光免疫染色し、共焦点で観察した画像、(D) 同じ蛍光免疫染色した未分化 iPS 細胞を高感度付共焦点で観察した画像、すべてプラスチックボトムプレート使用、Merge：重ね合わせ画像

る画像評価の可能性を検討した。その結果、安価で汎用性のあるプラスチックプレートでも、画像にむらがなく、効率よく画像が取得できた (図 13C, D)。目的に応じて、精細な構造変化を観察する必要がある場合には、高感度検出器を付加した共焦点画像もより画像が鮮明で有効なことがわかった (図 13B, D)。

大気汚染において有害化学物質である多環芳香族炭化水素類の一つベンゾピレン (benzo[a]pyrene, BaP)、重金属硫酸

ベリリウム (Be) の2 化学物質と脱メチル化阻害剤 5- アザ-2- デオキシシチジン (5-Aza-1-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl) cytosine, 5AZ) を培地に添加して、各種分化マーカー遺伝子発現の変化を調べた (図 14A)。その結果、分化マーカー遺伝子である NKX2.1 及び CPM に対して、BaP 及び Be は、影響をおよぼさなかったが、脱メチル化阻害剤の 5AZ は有意に遺伝子発現変化を増強させた (図 14B)。一方、AhR 応答遺伝子である薬物代謝酵素チトクローム P450 CYP1A1 の発現は、BaP で有意に高く、同様に、酸化ストレス応答遺伝子である HO1 の遺伝子発現も、BaP で高かった。肺がん特異的マーカーである FOXM1 が3 物質とも誘導された。これらの結果は、肺前駆細胞を用いた環境化学物質の有害性評価が有用であることを示唆するとともに、疾患特異的遺伝子の発現を調べることで、化学物質の特徴を把握することが可能であると示唆している。

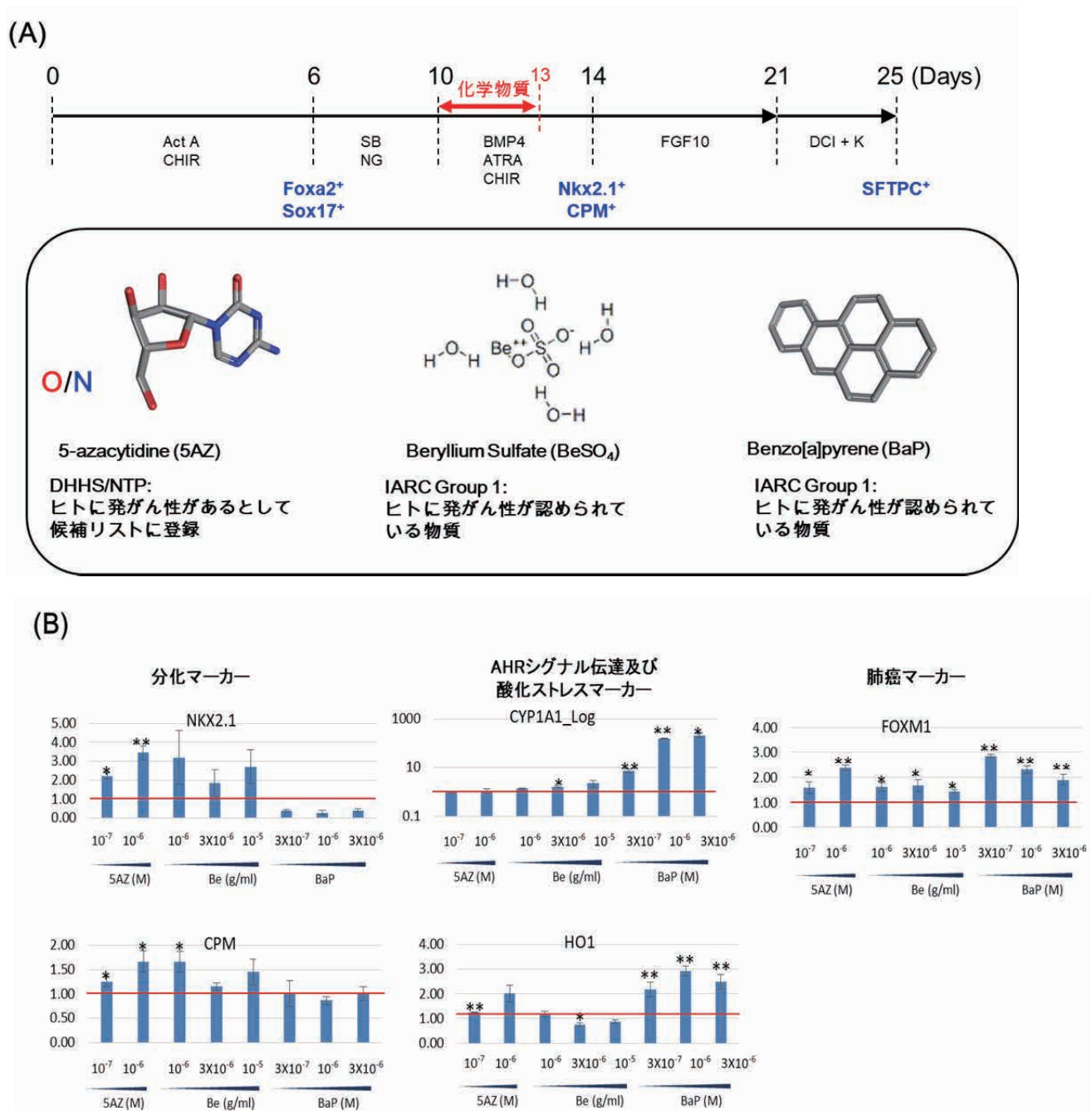


図 14 ヒト iPS 細胞への有害化学物質の曝露による影響

(A) ヒト iPS 細胞から肺前駆細胞分化時期における曝露の方法と曝露物質、(B) 各種分化マーカー遺伝子、応答遺伝子および肺癌マーカー遺伝子の発現量変化 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

2.2 マウス iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築

2.2.1 研究の背景と目的

マクロファージは胎児期初期に作られた原始的な細胞が各組織に移行して常在性となるが、出生後は主に骨髄の造血幹細胞から造られる前駆細胞（単球）から分化する¹¹⁾。各組織に常在するマクロファージは生体に侵入した異物を取り込み、それを排除する免疫機構の最前線で重要な役割を果たす細胞である。一方で、マクロファージの機能が化学物質等によって影響を受けることにより、疾患に繋がる可能性もある。例えば、肺に常在する肺胞マクロファージは呼気から侵入した大気汚染物質、特に粒子である $\text{PM}_{2.5}$ を取り込み排除しようとするが、これによりマクロファージが活性化されることで肺に炎症や酸化ストレスが引き起こされるため、呼吸器系疾患の要因ともなりえる¹²⁾。こうしたことから、マクロファージ系の免疫細胞を用いて、化学物質の免疫毒性解析の評価も実施されている。免疫毒性の評価系にはマクロファージ系の不死化細胞が利用されており、多くの対象物質をスループットに解析する上でも有効である。一方で、マウスにおいては骨髄の造血幹細胞から比較的容易にマクロファージの初代細胞を調製することが可能であり、初代細胞のほうが本来のマクロファージの機能を有した信頼性のある材料として認識されているため、多くの基礎研究でも古くから利用されている。毒性評価は不死化細胞や初代細胞のそれぞれの利点を生かしたシステムの構築が必要であると考えられるが、マウスの初代細胞の調製にはマウス個体の犠牲が必要であり、3R の原則から、より初代細胞に近い代替手法の開発が望まれている。

初代細胞に変わる標的細胞の候補として ES 細胞や iPS 細胞から分化した細胞の利用が考えられるが、ES/iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導については、ヒト ES/iPS 細胞で比較的少ないが報告されている。基本的には多能性幹細胞から中胚葉に分化し、そこから造血系の分化経路を誘導することによって得られるが、具体的方法としては、胚様体(EB)を介した方法^{13,14)}、二次元培養による方法^{15,16)}、フィーダー細胞を用いた方法^{17,18)}が報告されている。本サブテーマでは、比較的簡便な手法である EB 法を用い、まだ報告のないマウス iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導および肺上皮細胞への分化を試み、新たな毒性評価系として有効か検証を行った。

一方、肺上皮細胞に関して、大気汚染物質のような呼吸器系を曝露経路とする有害物質は、肺の内腔を覆う上皮細胞に対して影響を与える。例えば、マウスを用いた動物実験からは、 $\text{PM}_{2.5}$ の曝露が杯細胞（粘液分泌細胞）の過形成や粘液分泌の亢進等の影響が報告されている¹⁹⁾。こうした肺上皮細胞に与える影響について、*in vitro* 培養系による毒性評価の重要性が増してきた今日においても、培養細胞を用いた解析例はまだあまり多くない²⁰⁾。特にマウスの場合には、使用できる不死化細胞がわずかしかなこと、マウスから得られる肺上皮細胞の数がわずかであり操作が容易ではないこと、多くのマウスを屠殺する必要があるなどの理由が考えられる。そのため、ES/iPS 細胞から肺上皮系の分化誘導を行い毒性評価に応用することができれば、代替法として有効な評価法になる可能性がある。2.1.1 で述べたように、ヒト ES/iPS 細胞から肺上皮細胞系列への分化誘導に関する基礎研究は、ここ最近、増えつつあるが、一方でマウス ES/iPS 細胞からの分化誘導に関する報告は限定的である²¹⁻²³⁾。その理由として、ES/iPS 細胞から肺上皮への分化誘導に関する研究の方向性が再生医療を目指したものであり、そのためヒト ES/iPS 細胞を対象とした基礎研究が多いと推測される。

マウス ES/iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導は、ヒト ES/iPS 細胞での分化誘導がマウスの発生学的知見を基にしているという背景から、大部分が共通していると考えられる。基本的には受精卵から内胚葉に分化後、肝臓や脾臓への分化系列から別れ、肺芽を構築する肺前駆細胞の Nkx2.1 陽性の細胞となる。さらに、気管支の部分になるものと枝分かれして肺胞の末端を構築するパターンニングが起こり発達していく³⁾。本サブテーマでは、京都大学の山中らが世界で初めて樹立することに成功したマウス iPS 細胞から肺上皮細胞への分化を試み、ヒト ES/iPS 細胞での分化条件の方法を参考に、大気汚染物質の毒性評価の代替法の基礎となる培養系の検討に着手した。

環境汚染物質によるマクロファージへの影響としては、様々なシグナル経路から細胞を活性化されることにより炎症性サイトカインやケモカインを産生することが知られている。例えば、大気汚染物質である $\text{PM}_{2.5}$ をマウス気管内に曝露すると、肺への炎症性細胞の遊走や各種の炎症性因子が増え、肺の炎症が起こる¹⁹⁾。我々の以前の研究においては、 $\text{PM}_{2.5}$ やその構成成分によるマクロファージへの影響を培養細胞レベルで調べたところ、同様の炎症反応や酸化ス

トレス反応といった影響が見られた^{20, 24)}。こうした実験はこれまで不死化細胞や初代細胞のマクロファージを用いて解析してきており、動物曝露実験と合わせたマウスの細胞を用いた解析も行われているが、初代細胞に代わる動物実験代替法としての多能性幹細胞を用いた解析はまだ行われていない。こうした経緯から、本研究では iPS 細胞由来のマクロファージがこうした大気汚染物質の毒性影響評価に活用することができるか、PM_{2.5} とその構成成分の毒性影響について、不死化細胞や初代細胞と比較して検証することにした。

2.2.2 方法

マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17、京都大学 iPS 細胞研究所の山中伸弥教授らにより樹立²⁵⁾) は理化学研究所バイオリソースセンターより譲渡された。マウス iPS 細胞はまずマウス胚性繊維芽細胞 (ReproCell) 上で培養し、維持を行った。培地は 15% KSR、NEAA、 β -mercaptoethanol、LIF 含有 DMEM (Wako) を使用した。次に、フィーダーレス化するため、細胞をグラチンコート上で ESGRO COMPLETE PLUS Clonal Grade Medium (Millipore) を用いて 2 継代、培養を行った。得られたフィーダーレスの iPS 細胞は Accutase (Invitrogen) で剥離後、実験に使用した。

マウス iPS 細胞からマクロファージへの分化培養は、ヒト ES 細胞で報告されている Karlsson らの方法を適応させた¹⁴⁾。シングルセルとしたマウス iPS 細胞は、低吸着性丸底 96 well plate (Corning) に 1×10^4 cells/well で播種して EB を形成させた。培地は 15% FBS 含有 DMEM を使用した。培養 5 日目に EB を回収し、グラチンコートした 6 well plate に 10 EBs/well で移した。培地は FBS (10%)、M-CSF (100 ng/ml)、IL-3 (25 ng/ml) を含有した DMEM を使用した。4～5 日目に培地の 2/3 を新しい培地に交換し、3～4 週間、培養を行った。その後、浮遊している細胞を回収し、さらに 7 日間、接着培養して細胞を得た。

iPS 細胞から得られたマクロファージを用いた毒性評価の比較対象として、マウスマクロファージ由来の不死化細胞および骨髄由来の初代細胞を用いた。マクロファージの不死化細胞である MH-S および RAW264.7 細胞はそれぞれ ECACC および American Type Culture Collection (ATCC) から得た。MH-S 細胞は 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で、RAW264.7 細胞は 10% FBS 含有 DMEM 培地で培養した。マクロファージの初代細胞である骨髄由来マクロファージは、マウス的大腿骨から骨髄細胞を調製し、M-CSF (20 ng/ml) および 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で 7 日間分化を行ったものを使用した。

各種マクロファージを用いた曝露評価に関しては、対象の大気汚染物質として PM_{2.5} およびその構成成分の生物由来成分と重金属を用いた。PM_{2.5} は中国瀋陽で 2013 年 3 月に採取されたもの²⁴⁾ を使用した (大分県立看護科学大学の市瀬孝道教授から分与)。生物由来成分としてはエンドトキシンであるリポ多糖 (ultrapure lipopolysaccharide (LPS)、InvivoGen) を、重金属としては CdCl₂ (Wako) を使用した。

マウス iPS 細胞から内胚葉を経て肺上皮細胞に分化誘導させる場合は、EB 形成で内胚葉に分化させる方法と平面培養で分化させる 2 種類の方法を用いた。EB 形成を介して内胚葉に分化させる場合には、まずフィーダーレスのマウス iPS 細胞を Accutase でシングルセルとした後、低吸着性丸底 96 well plate (Corning) に 1×10^3 cells/well で播種した。培地は 15% FBS 含有 DMEM 培地を用いた。3 日間培養して形成させた EB を次にグラチンコートした 24 well plate に 7 EBs/well で移し、Activin (50 ng/ml)、0.5% FBS、B-27 および N2 supplement を添加した DMEM 培地で 3 日間培養して内胚葉に分化させた。次に、培地を SB431542 (10 μ M)、Noggin (100 ng/ml)、0.5% FBS、B-27 および N2 supplement を添加した DMEM 培地に交換し、2 日間培養した。その後、培地を CHIR99021 (3 μ M)、FGF10 (10 ng/ml)、FGF7 (10 ng/ml)、BMP4 (10 ng/ml)、EGF (20 ng/ml)、FGF2 (250 ng/ml)、heparin (100 ng/ml)、0.5% FBS、B-27 および N2 supplement を添加した DMEM 培地に交換して 5 日間、培養した。平面培養で内胚葉に分化させる場合には、シングルセルにしたマウス iPS 細胞を 2×10^3 cells/well でグラチンコートの 48 well plate に播種した。培地は Activin A (100 ng/ml)、B-27 および N2 supplement、L-ascorbic acid (0.5 mM)、MTG (45 mM)、BSA (0.05%) を添加した IMDM/F12 培地を用いた。2 日おきに培地を交換し、6 日目まで培養した。その後は EB 形成の場合と同様に分化培養を行った。

リアルタイム PCR 法による遺伝子の発現誘導解析は、まず細胞から総 RNA を NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) で精製した。得られた RNA を用い、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) を使用して cDNA を

合成した。リアルタイム PCR 解析は、GeneAce SYBR qPCR Mix α (NipponGene) および Thermal Cyclers Dice Real Time System (TaKaRa Bio) で行った。

フローサイトメトリー解析は、細胞を各種の抗体（ビオチン標識抗 F4/80 抗体、PE 標識抗 CD11b 抗体、PE 標識抗 CD80 抗体 (eBioscience)）と氷上で 30 分間、反応させ、さらにストレプトアビジン -APC と反応させた後、Guava easyCyte フローサイトメーター (Millipore) で測定した。

免疫染色法によるタンパクの発現誘導は、まず細胞を 4% パラホルムアルデヒド (Wako) で室温、15 分間、固定を行った。PBS (-) で洗浄後、0.5% Triton X-100 で室温、15 分間処置し、細胞膜の透過処理を行った。次に、3% BSA でブロッキングを室温、1 時間、行った後、各一次抗体を添加し、室温、1 時間、あるいは 4℃ で一晩放置した。一次抗体は、抗 Cytokeratin 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 FOXA2 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 NKX2.1 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 SFTPB 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 SFTPC 抗体 (Millipore)、抗 SOX17 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 SOX2 抗体 (Sigma-Aldrich) を使用した。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体 (Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa594 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Molecular Probes)) を添加した。室温で 1 時間反応後、細胞を PBS で洗浄し、核染色のため DAPI (DOJINDO) で室温、5 分間、反応させた。免疫染色後、細胞は Axio Observer A1 (Carl Zeiss) あるいは BZ-X700 (Keyence) で観察を行った。

2.2.3 結果と考察

2.2.3.1 マウス iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導の検討

まず、マウス iPS 細胞から EB 形成の条件として、BMP4 の効果を調べた。ヒト ES/iPS 細胞においては、BMP4 の刺激によって中胚葉へ分化することが報告されている²⁶⁾。BMP4 刺激有り無しの条件で形成させた EB を、接着条件下でマクロファージ分化や増殖に必要な M-CSF および IL-3 存在下で培養した。その結果、BMP4 無しの条件で形成した EB は接着培養後に細胞が EB から拡がっていき、同じ中胚葉由来である拍動する心筋が出現した。その後、2 週間目ぐらいから造血細胞と思われる緩く接着した細胞が見られた。このような細胞の分化は、EB を BMP4 存在下で形成させた場合には見られなかった。そのことから、EB の形成は BMP4 非含有で形成することにした。その後、接着培養開始 3 週間後に浮遊している細胞を回収し、フローサイトメトリーで表面抗原の発現を調べた。その結果、この浮遊細胞は、殆どの細胞にマクロファージのマーカーである CD11b (97.25%) と F4/80 (96.75%) が発現していた (図 15)。そ

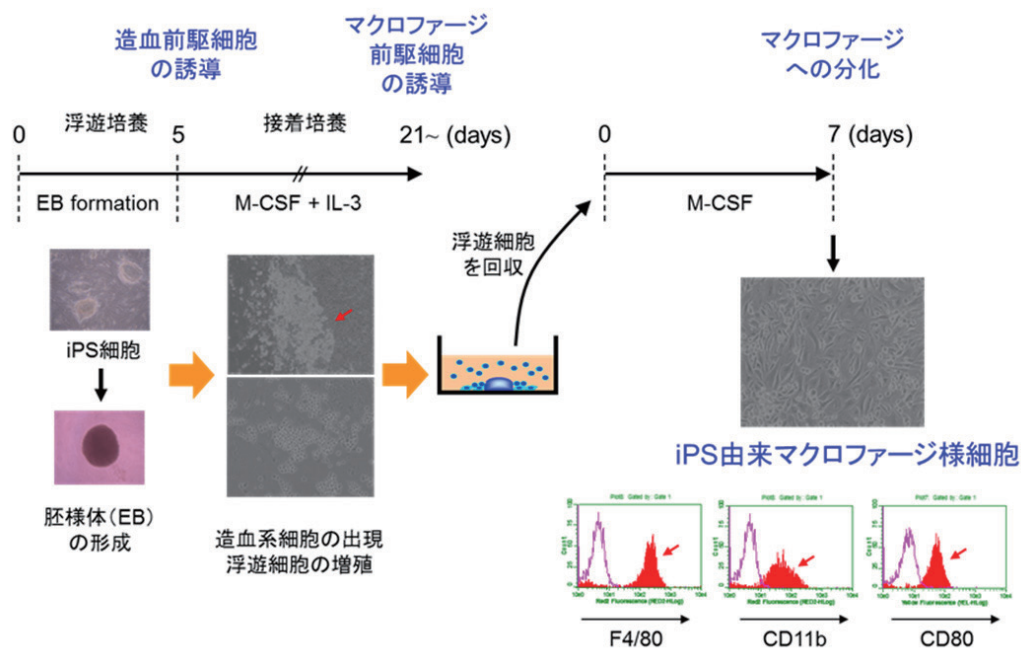


図 15 マウス iPS 細胞からマクロファージの分化誘導

マウス iPS 細胞から EB 形成で中胚葉へ分化後、M-CSF および IL-3 刺激でマクロファージへの分化培養を行った。得られた細胞は、フローサイトメトリー法でマクロファージのマーカーである F4/80、CD11b、CD80 の発現を確認した。

のことから、この細胞を iPS 細胞由来のマクロファージとした。ただし、細胞の回収量については現状のプロトコルでは多くなく、効率が低いと思われた。今後は効率を高めて培養法の改善を行っていく必要があると考えられた。

マクロファージはその性質によって炎症性の M1 タイプと抗炎症性の M2 タイプに分けられ、培養条件下ではマクロファージを interferon γ 刺激すると M1 タイプになり、一方で IL-4 刺激すると M2 タイプとなることが知られている²⁷⁾。そこで次に、得られたマクロファージ様細胞が M1、M2 タイプへの分化を示すかどうか調べた。iPS 細胞由来のマクロファージを interferon γ (10 ng/ml) で 24 時間、刺激したところ、M1 マーカーの IL-1 β 、MIP-1 β 、Mcp-1 の誘導が見られた (図 16)。一方で、IL-4 (10 ng/ml) で刺激した場合、M2 マーカーである IL-10 はわずかながら増加する傾向が見られ、IL-12A については殆ど誘導しなかった (図 16)。そのことから、得られた iPS 細胞由来のマクロファージは、炎症性のマクロファージに分化しやすい傾向を持つ可能性が考えられた。

マクロファージの発生に繋がる造血機構は、胎生初期には卵黄で原始的な造血が始まるが、その後、肝臓で行われる。その際に発生した未熟なマクロファージは各組織に移行することで、各組織に特異的な常在性のマクロファージとなる²⁸⁾。その際に、肺胞へと移行したマクロファージは肺胞マクロファージとなるが、その成熟化に GM-CSF が関与するとの報告がある²⁹⁾。そこで、マウス iPS 細胞を M-CSF と IL-3 培養下で得られた浮遊細胞を M-CSF および GM-CSF 存在下で培養した。その結果、肺胞マクロファージに特異的に発現する Siglec-F が顕著に増加していた (図 17)。また、肺胞マクロファージで比較的、高発現する PPAR γ も高い発現を示していた (図 17)。このことから、マウス iPS 細胞からより肺胞マクロファージに近い細胞に分化誘導した可能性が示唆された。今後、より詳細な解析が必要である。

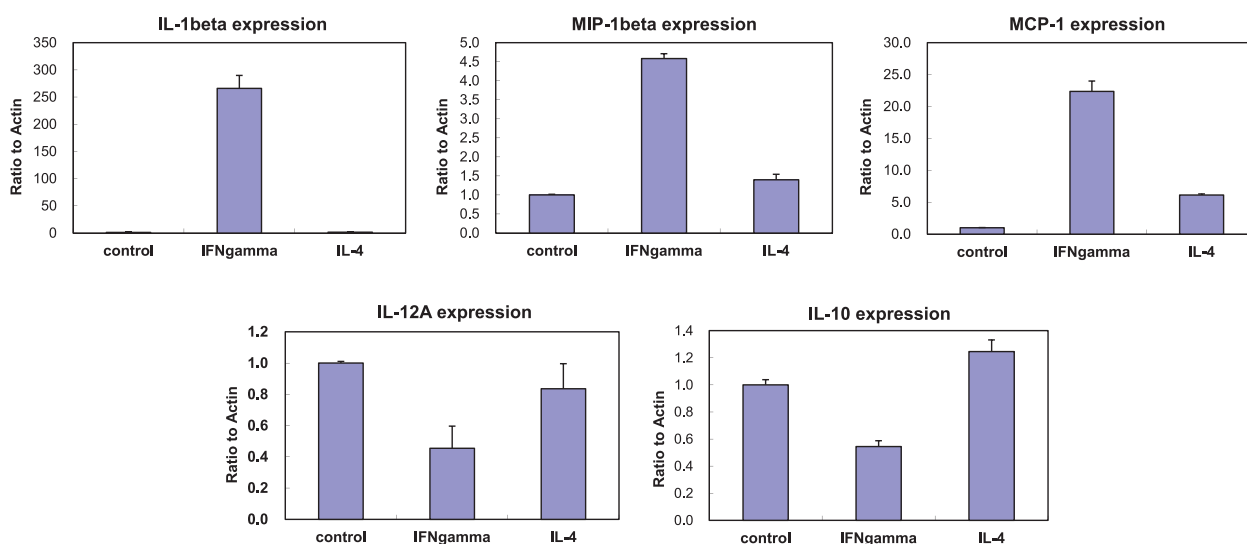


図 16 マウス iPS 細胞由来マクロファージの分化機能

マウス iPS 細胞から得られたマクロファージを M1 および M2 タイプに擬似的に誘導する interferon γ (IFNgamma、10 ng/ml) あるいは IL-4 (10 ng/ml) で 24 時間刺激を行い、各マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

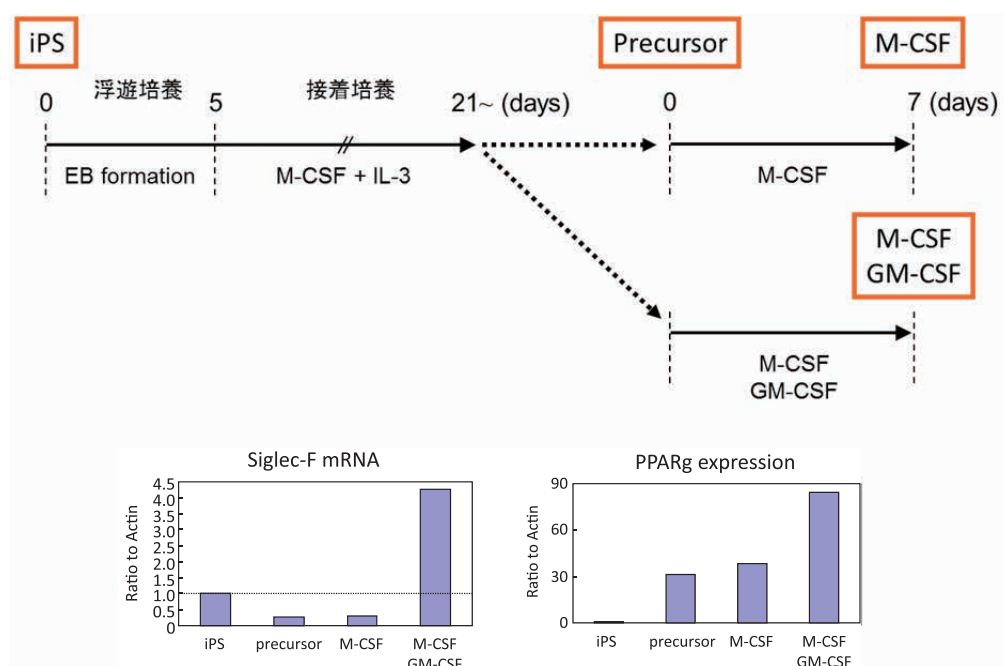


図 17 マウス iPS 細胞から肺マクロファージ様細胞への分化誘導

マウス iPS 細胞から得られたマクロファージ (precursor) をさらに M-CSF のみ、GM-CSF および M-CSF で培養し、肺マクロファージに特異的な Siglec-F および PPARγ 遺伝子の発現量を測定した。

2.2.3.2 マウス iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導

マウス ES/iPS 細胞から内胚葉、肺上皮系列への分化方法については、ヒトの場合と同様に、EB 形成を介した三次元培養による方法^{21,22)}と、二次元の平面培養下での培養法²³⁾の二つが報告されている。まず、EB を介した方法について試した。未分化 iPS 細胞を浮遊培養下で培養してエピブラスト細胞にした後、Activin 添加条件でさらに EB を形成させて内胚葉への分化を行った²²⁾。この EB についてリアルタイム PCR 法で調べたところ、未分化状態に比し、培養 6 日目において内胚葉分化マーカー遺伝子である Foxa2 および Sox17 が強く誘導され、逆に未分化マーカー遺伝子の Oct3/4 および Nanog の発現は顕著に低下していることが確認できた (図 18)。また、同じ結果がマウス ES 細胞である TT2 細胞でも認められた (図 18)。次に、Nkx2.1 陽性の肺前駆細胞への誘導を検討した。得られた内胚葉を SB431542 および Noggin で処理後、さらに CHIR99021、FGF7、FGF10、BMP4、EGF、FGF2 刺激^{21,22)}で培養した。実験の結果、SB431542 + Noggin 処理することで未処置の場合と比べ Nkx2.1 が弱いながらも誘導を示した (図 19)。さらに、FGF2 + FGF10 で 9 日間培養後、DCI + K で 4 日間培養する肺上皮細胞への分化操作²¹⁾を行った。この細胞についてリアルタイム PCR 法で解析したところ、肺上皮 II 型細胞のマーカーである Sftpc の発現が増加していた (図 20)。このことから、分化誘導が弱いながらも、一部の細胞が肺上皮細胞へ分化していたと考えられた。また、マウス ES 細胞である TT2 細胞でも同様の培養手順で分化誘導を行ったところ、iPS 細胞よりも強く Sftpc が誘導された (図 21)。このことから、ES 細胞より iPS 細胞のほうが分化がより起こりにくいと考えられたが、同様の現象も報告されていた²²⁾。

次に、平面培養による分化法を検討した。平面培養での内胚葉への分化は Activin + CHIR99021 による刺激が報告されている²³⁾。まず、CHIR99021 による Wnt シグナル活性化の効果を調べてみたが、CHIR99021 を添加するタイミングに関係なく内胚葉マーカー遺伝子の Foxa2 および Sox17 が誘導された (図 22)。このことから、平面培養における内胚葉への分化は Activin のみで行うこととした。また、Foxa2 および Sox17 のタンパクの発現誘導も免疫染色法により調べ、この二つの内胚葉分化マーカーが共に発現している内胚葉が確認された (図 23)。次に、この内胚葉を Zhou らの報告にある方法²³⁾ (BEGM + FGF2) で 5 日間、培養した結果、肺前駆細胞のマーカーである Nkx2.1 の発現が認められた (図 23)。この平面培養によって得られた結果は、前述の三次元培養法よりも良好な結果が得られたため、以降の実験には平面培養法で行った。

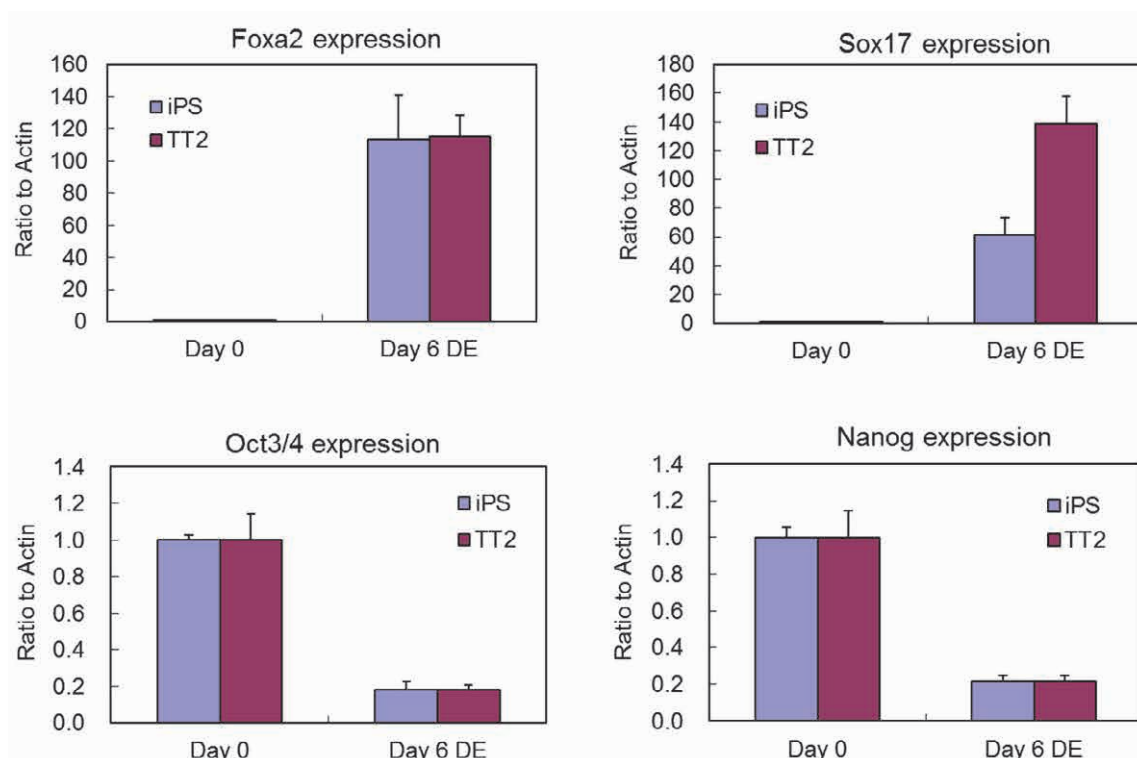


図 18 マウス iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

マウス iPS 細胞および ES 細胞 (TT2) から EB 形成によって内胚葉へ分化し、各マーカー遺伝子 (内胚葉マーカー: Foxa2 および Sox17、未分化マーカー: Oct3/4 および Nanog) の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。Day 0 は未分化の細胞を、Day 6 DE は内胚葉に分化させた細胞を示している。

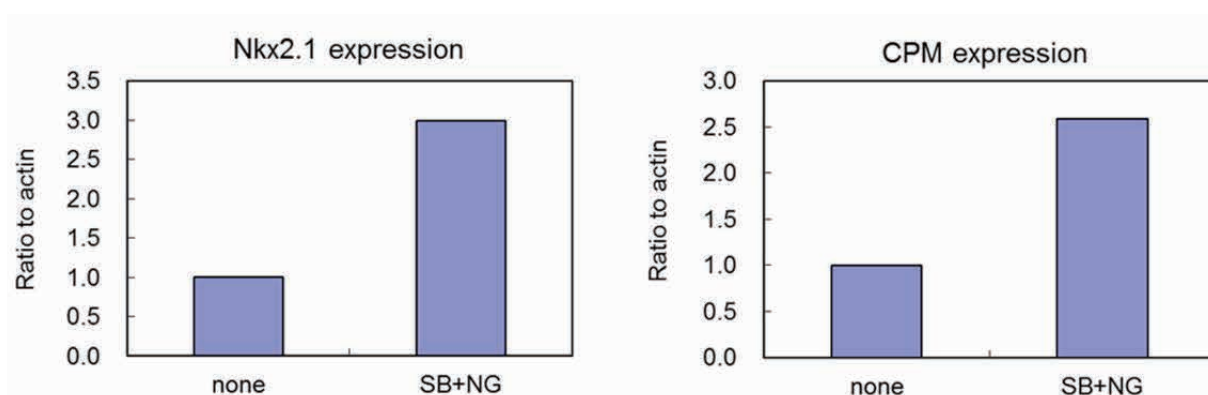


図 19 マウス iPS 細胞から肺前駆細胞への分化誘導

マウス iPS 細胞から EB 形成によって内胚葉へ分化後、肺前駆細胞への分化プロトコルで培養した細胞のマーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。データは内胚葉分化後、前方前腸化において未処置のもの (none) と SB+NG 処置したもの (SB+NG) を示している。

マウス iPS 細胞から得られた Nkx2.1 陽性細胞を、次に肺上皮細胞への分化させることを検討した。肺上皮は主に気管支、細気管支、肺泡に分けられ、それぞれの主な構成細胞は基底細胞・繊毛細胞・杯細胞、クララ細胞、肺泡上皮細胞となる。まず、Goto ら³⁾ がヒト ES/iPS 細胞で報告している肺泡上皮細胞への分化誘導法で培養したところ、肺泡上皮 II 型細胞のマーカーである Sftpc の発現誘導が遺伝子レベルおよびタンパクレベルで認められた (図 24)。次に、気管支を構成する肺上皮への分化を検討するため、1.2.2 で示したのと同様の Wong ら⁶⁾ が用いている刺激 (BMP4 + FGF10 + FGF7 → FGF10 + FGF7 + FGF18) を試したところ、気管支を構築する上皮細胞の前駆細胞と考えられている基底細胞マーカー (p63) や繊毛細胞のマーカー (Foxj1)、また細気管支のクララ細胞 (CC10) といった肺上皮細胞の分化マーカー遺伝子の発現の顕著な増加が確認された (図 25)。

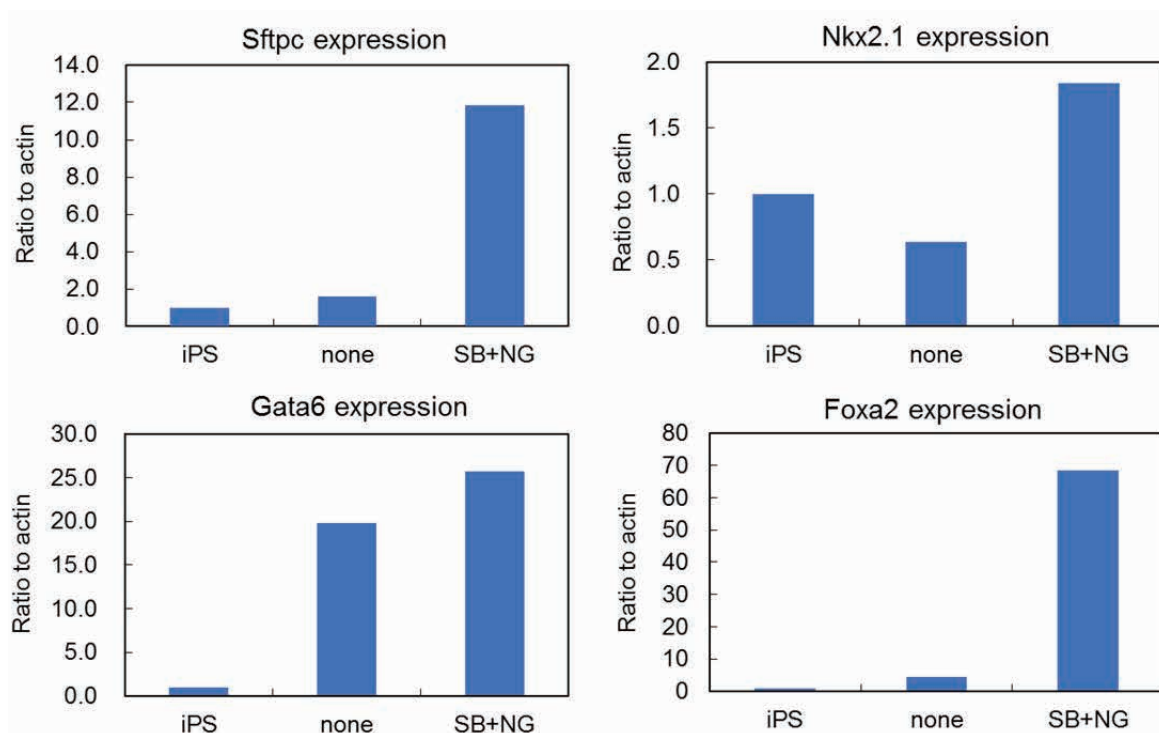


図 20 マウス iPS 細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導

マウス iPS 細胞から EB 形成によって内胚葉へ分化後、肺胞上皮細胞への分化プロトコルで培養した細胞のマーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。データは未分化 iPS 細胞 (iPS)、前方前腸化において未処置のもの (none) と SB+NG 処置したもの (SB+NG) を示している。

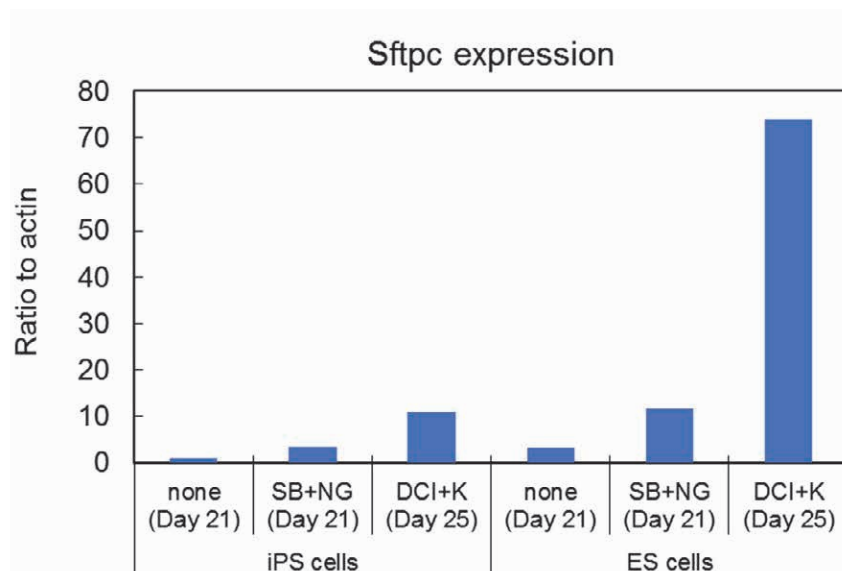


図 21 マウス iPS 細胞および ES 細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導

マウス iPS 細胞および ES 細胞から EB 形成によって内胚葉へ分化後、肺胞上皮細胞への分化プロトコルで培養した細胞の肺胞上皮マーカー遺伝子 (SFTPC) の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。データは 21 日目の細胞で前方前腸化において未処置のもの (none) と SB+NG 処置したもの (SB+NG)、DCI+K 処置で 25 日目まで培養したものを示している。

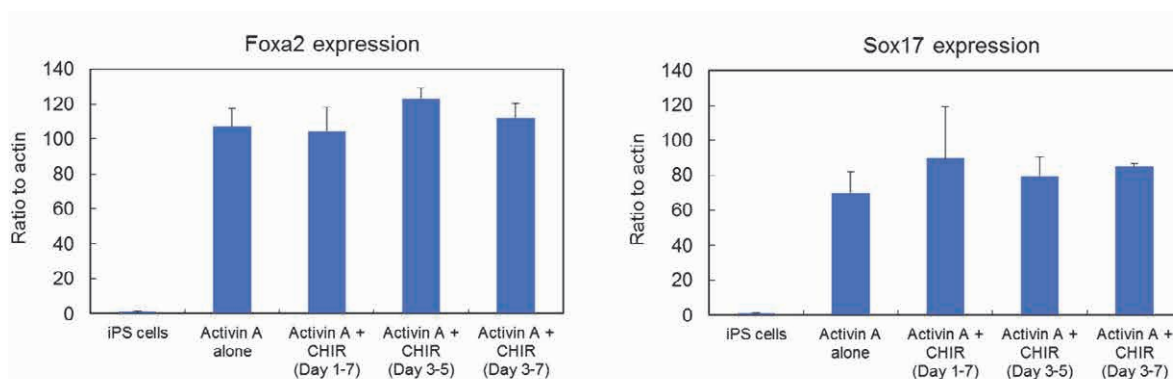


図 22 平面培養における内胚葉への分化法の検討

マウス iPS 細胞を 1 日目から 7 日目まで Activin A のみで培養したもの (Activin A alone)、1 ~ 7 日目まで Activin A + CHIR99021 で培養したもの (Activin A + CHIR (Day 1-7))、3 ~ 5 日目だけ CHIR99021 を加えたもの (Activin A + CHIR (Day 3-5))、3 ~ 7 日目まで CHIR99021 を加えたもの (Activin A + CHIR (Day 3-7)) における内胚葉分化マーカー遺伝子の発現量を測定した。

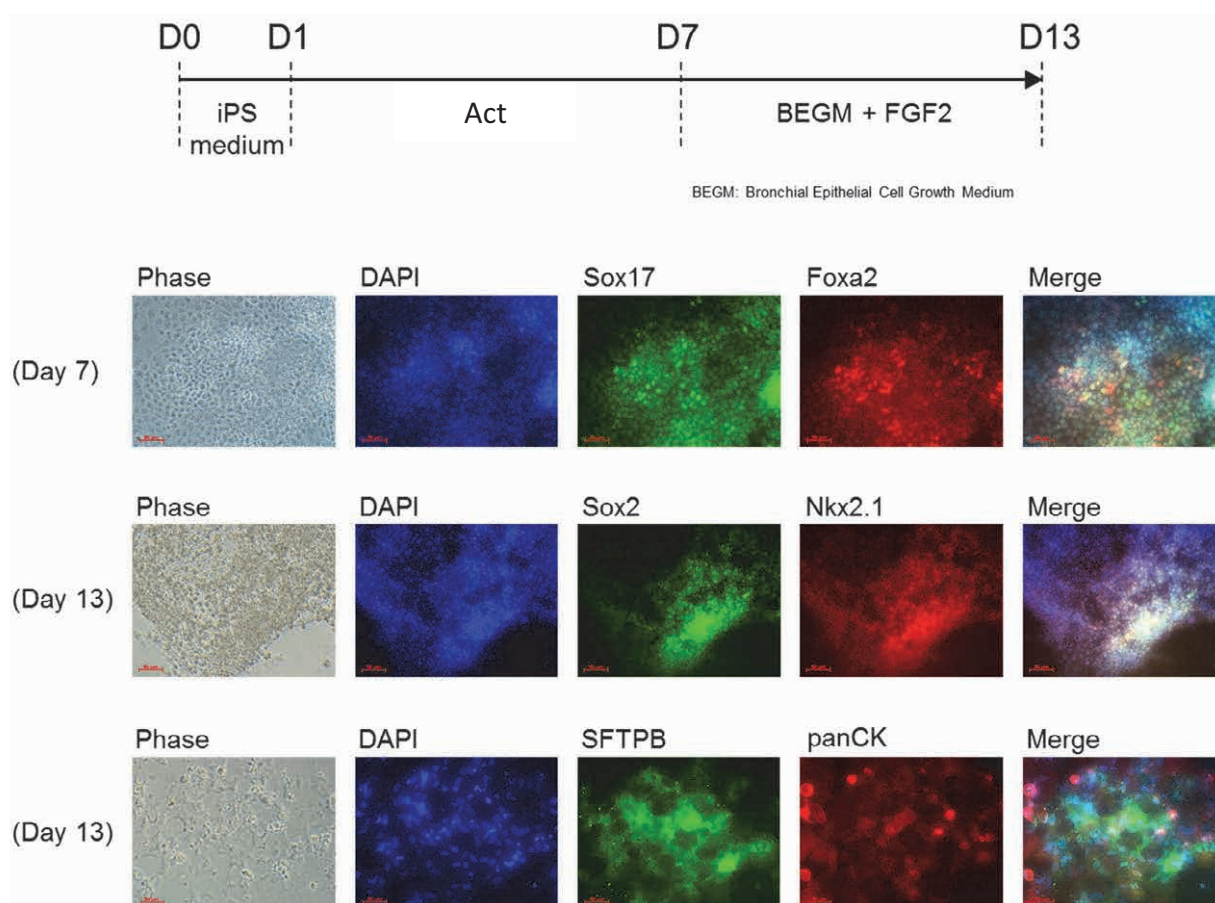


図 23 マウス iPS 細胞から肺前駆細胞への分化誘導

写真上部に示した分化プロトコルに従い、マウス iPS 細胞から内胚葉 (7 日目) および肺前駆細胞 (13 日目) まで培養した細胞における各マーカーの発現を免疫染色法により調べた。

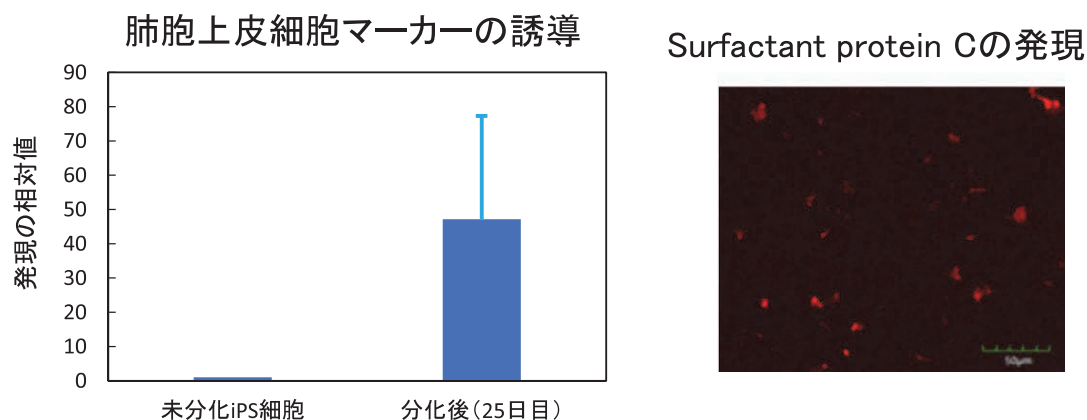


図 24 マウス iPS 細胞から肺胞上皮細胞の分化誘導

マウス iPS 細胞から図 23 で示した培養法で肺前駆細胞にした後、図 7 で示した方法で肺胞上皮細胞への分化を行った。細胞のマーカー遺伝子の発現およびタンパクの発現を、それぞれリアルタイム PCR 法および免疫染色法により調べた。

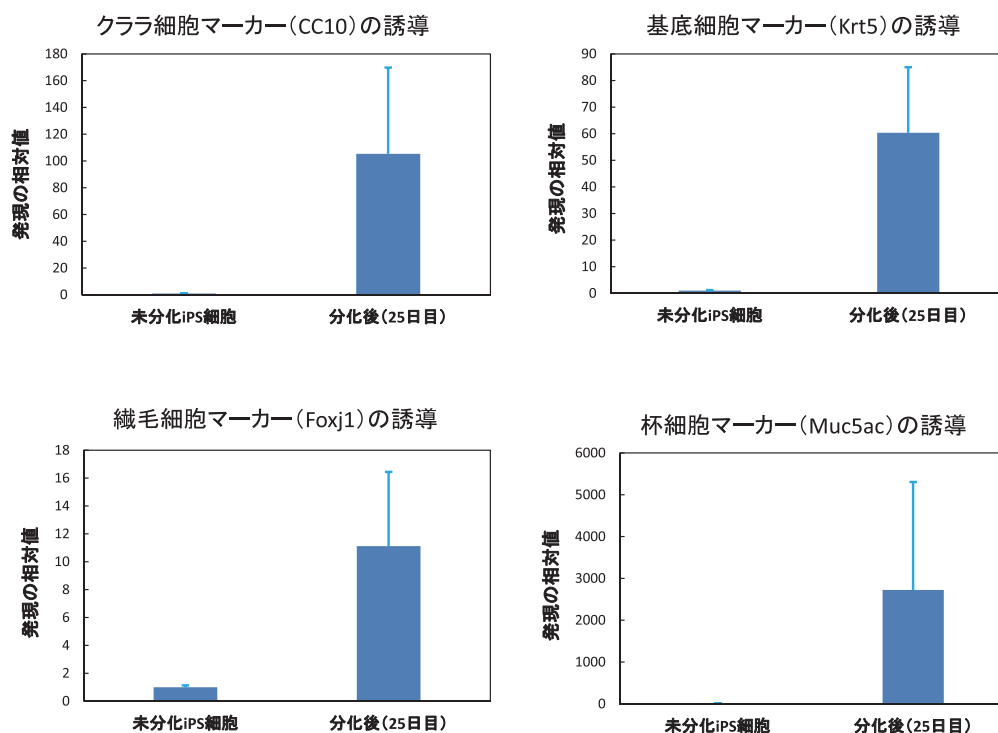


図 25 マウス iPS 細胞から気管支上皮細胞の分化誘導

マウス iPS 細胞から図 23 で示した培養法で肺前駆細胞にした後、図 8 で示した方法で肺胞上皮細胞への分化を行った。細胞のマーカー遺伝子の発現およびタンパクの発現を、それぞれリアルタイム PCR 法および免疫染色法により調べた。

2.2.3.3 マウス iPS 細胞由来のマクロファージを用いた曝露評価

マクロファージに対する $PM_{2.5}$ の影響としては、炎症反応と酸化ストレスの誘導が知られている²⁴⁾。そこで、各種のマクロファージにまず $PM_{2.5}$ を曝露し、炎症反応と酸化ストレスのマーカーの誘導を調べた。その結果、各種マクロファージともに、炎症マーカー遺伝子の IL-1 β 、Cox2、IL-6、KC、TNF α 、酸化ストレスマーカー遺伝子の Hmox1 の発現が誘導されたが、これらマーカーの誘導率は iPS 細胞由来マクロファージ、初代細胞で高い一方で、不死化細胞では非常に弱い結果となった (図 26)。次に、構成成分のエンドトキシンと重金属について調べたが、こちらも各種のマクロファージで炎症および酸化ストレスマーカーが誘導されたが、各遺伝子でバラつきがあったものの誘導率に大きな差はなかったと考えられた (図 27、図 28)。これらの結果から、iPS 細胞由来のマクロファージは初代細胞と同様に $PM_{2.5}$

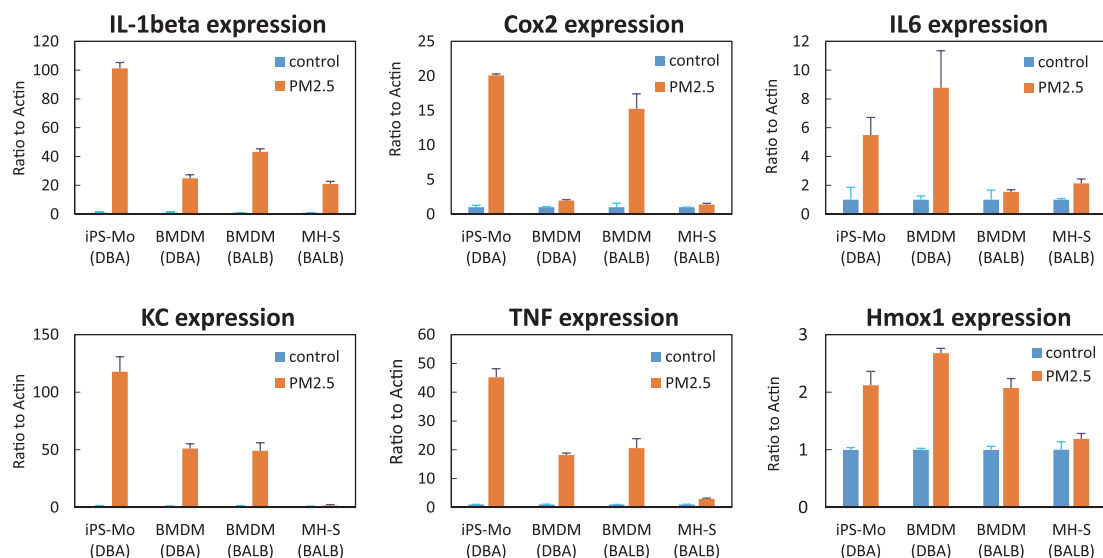


図 26 PM_{2.5} 曝露に対する各種マクロファージの反応性

マウス iPS 細胞から得られたマクロファージ (iPS-Mo)、マウス骨髄細胞から得られたマクロファージ (BMDM)、不死化マクロファージ (MH-S) を 30 µg/ml の PM_{2.5} に 3 時間曝露した。その後、各炎症性遺伝子および酸化ストレスマーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

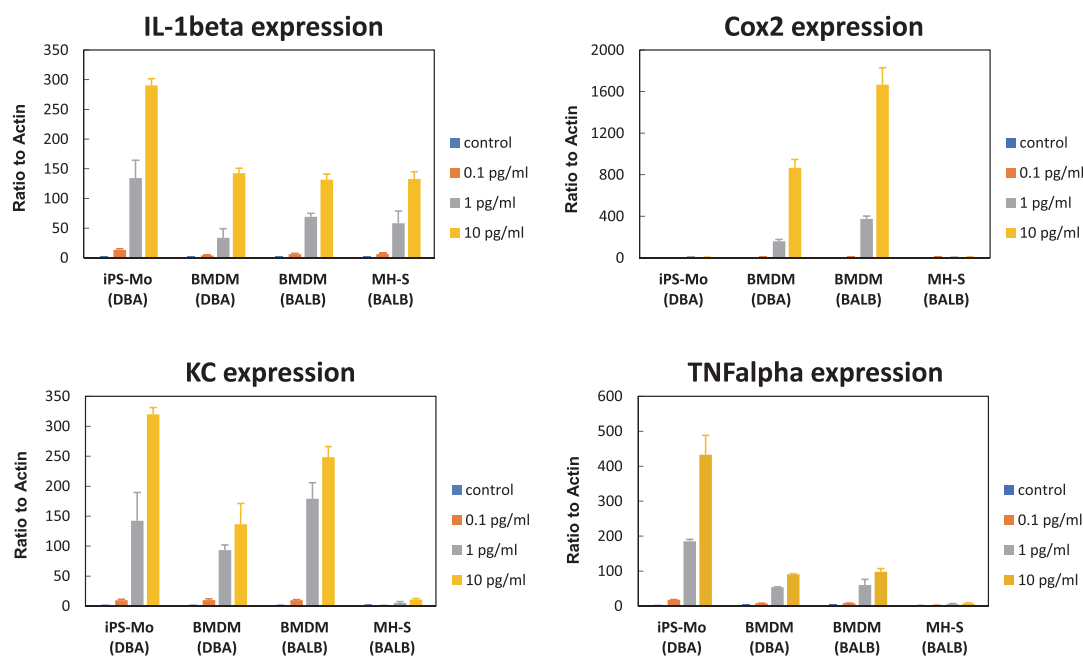


図 27 LPS に対する各種マクロファージの反応性

マウス iPS 細胞から得られたマクロファージ (iPS-Mo)、マウス骨髄細胞から得られたマクロファージ (BMDM)、不死化マクロファージ (MH-S) を各濃度の LPS に 3 時間曝露した。その後、各炎症性遺伝子および酸化ストレスマーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

に対して炎症反応および酸化ストレスを誘導することが確認されたため、大気汚染物質の毒性評価系としても有効である可能性が示唆された。一方で、不死化細胞ではやや反応性が弱くなっていたため、影響を低く見積もる可能性も危惧された。また、PM_{2.5} が引き起こす影響として、アリアル炭化水素受容体 (AhR) の活性化が知られている。AhR の活性化はダイオキシンによって誘導されることでよく知られているが、PM_{2.5} には化石燃料の燃焼で生じる多環芳香族炭化水素 (PAH) 類であるベンツピレン等の AhR の活性化リガンドが含まれている²⁴⁾。AhR 活性化は PAH 類の代謝を引き起こして毒性の強い代謝産物を生成したり、免疫毒性等の作用にも関与することが報告されている³⁰⁾。しかし、一

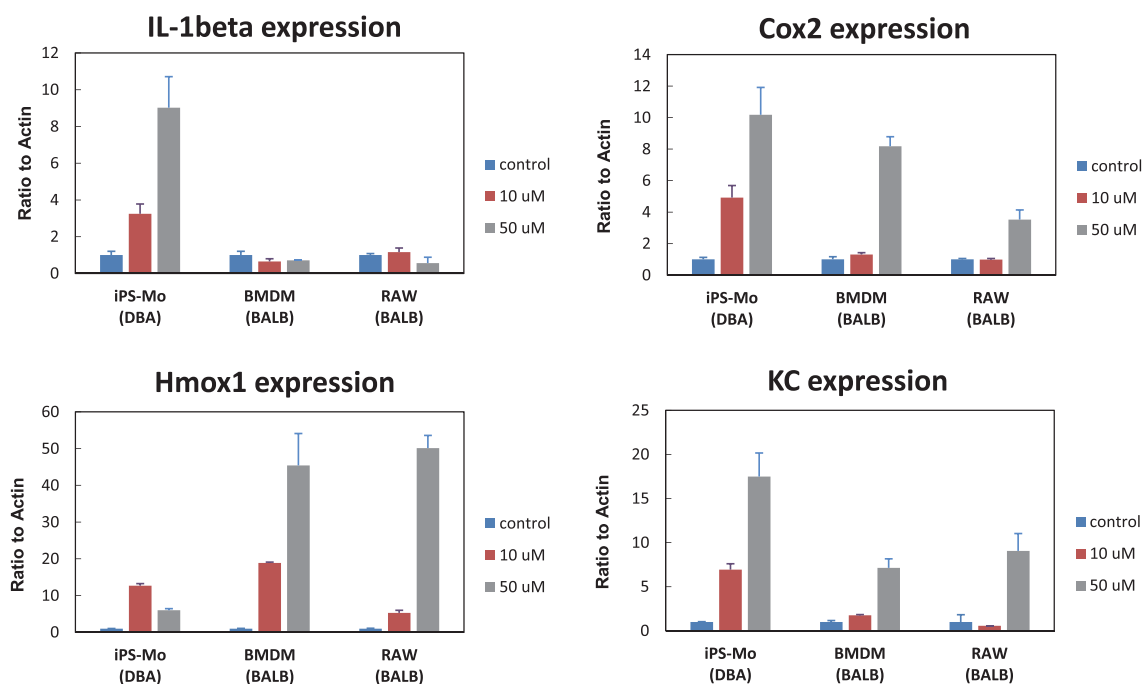


図 28 重金属に対する各種マクロファージの反応性

マウス iPS 細胞から得られたマクロファージ (iPS-Mo)、マウス骨髄細胞から得られたマクロファージ (BMDM)、不死化マクロファージ (RAW) を各濃度の CdCl_2 に 6 時間曝露した。その後、各炎症性遺伝子および酸化ストレスマーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

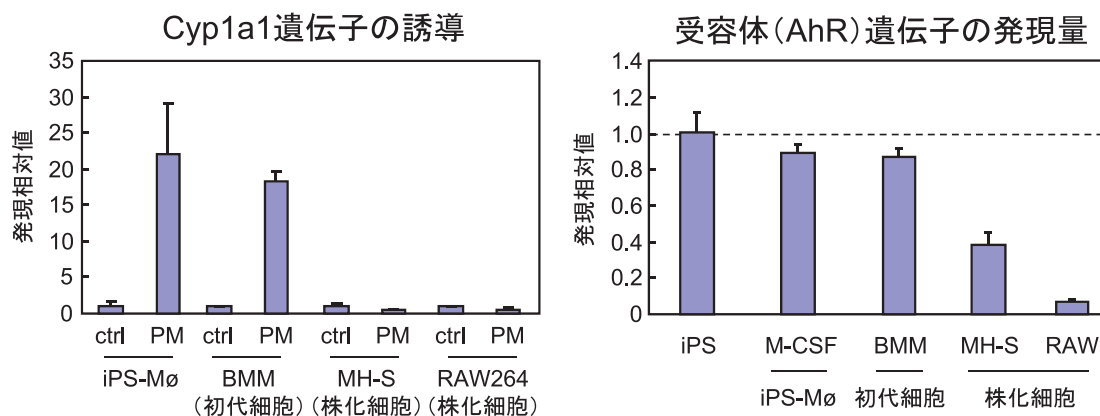


図 29 各種マクロファージでの AhR 反応性の比較

マウス iPS 細胞から得られたマクロファージ (iPS-Mo)、マウス骨髄細胞から得られたマクロファージ (BMM)、不死化マクロファージ (MH-S および RAW264) を $30 \mu\text{g/ml}$ の $\text{PM}_{2.5}$ に 3 時間曝露した。その後、Cyp1a1 および AhR の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

一般的に使用されるマウスマクロファージの不死化細胞では AhR を欠損しているため、AhR を介した反応を見ることができない。一方で、今回、調製した iPS 細胞由来のマクロファージでは、 $\text{PM}_{2.5}$ 曝露によって AhR 活性化の指標である Cyp1a1 遺伝子の誘導が確認できた (図 29)。この結果からも、iPS 細胞由来マクロファージがより初代細胞に近い反応性を有する可能性を示唆していると考えられた。

2.3 まとめと今後の課題

本研究では、ヒト iPS 細胞およびマウス iPS 細胞を用いて、有害化学物質の呼吸器への影響（図 30）が評価可能な *in vitro* ハザード評価システムの構築を目指して、気道から肺を構成する各種細胞の作成と、化学物質の曝露による有害性の検討を行った。このことにより、大気環境中に存在する化学物質を対象として毒性評価を行い、潜在的なハザードを明らかにし、iPS 細胞を活用した *in vitro* ハザード評価システムによる迅速な影響モニタリングに発展できる可能性を見出すことを期待した。

具体的には、ヒト iPS 細胞から呼吸器系細胞への分化の検討においては、部位によって異なる 3 タイプの肺上皮細胞系列に至る各分化段階に必要な分化因子を検討し、気管・気管支の主要な構成細胞である基底細胞や繊毛細胞、杯細胞、細気管支についてはクララ細胞、肺上皮 II 型細胞への分化を各々の特異的細胞分化マーカーの発現を指標に確認し、分化誘導することができた。また、肺前駆細胞を用いて、3 種類の有害化学物質を曝露した。それぞれ、化学物質に特性のある応答性を確認した。さらに、マウス iPS 細胞からも呼吸器系細胞である肺上皮細胞への分化誘導を確認できた。マウス iPS 細胞からマクロファージへの分化培養法を検討した結果、マクロファージの特徴を示す非常に高純度の細胞を得ることができた。そのため、このマウス iPS 細胞から作成したマクロファージ細胞を用いて、大気汚染物質の PM_{2.5} やその構成成分に対する反応性について、初代細胞や不死化細胞と比較検証し、初代細胞と同程度かそれ以上に iPS 細胞由来マクロファージに対して非常に強い炎症や酸化ストレス反応を誘導することを確認した。したがって、iPS 細胞由来のマクロファージが大気汚染物質の毒性評価試験法として利用できる可能性を示すことができた。これらの成果は、次の 2 点にまとめることができる。

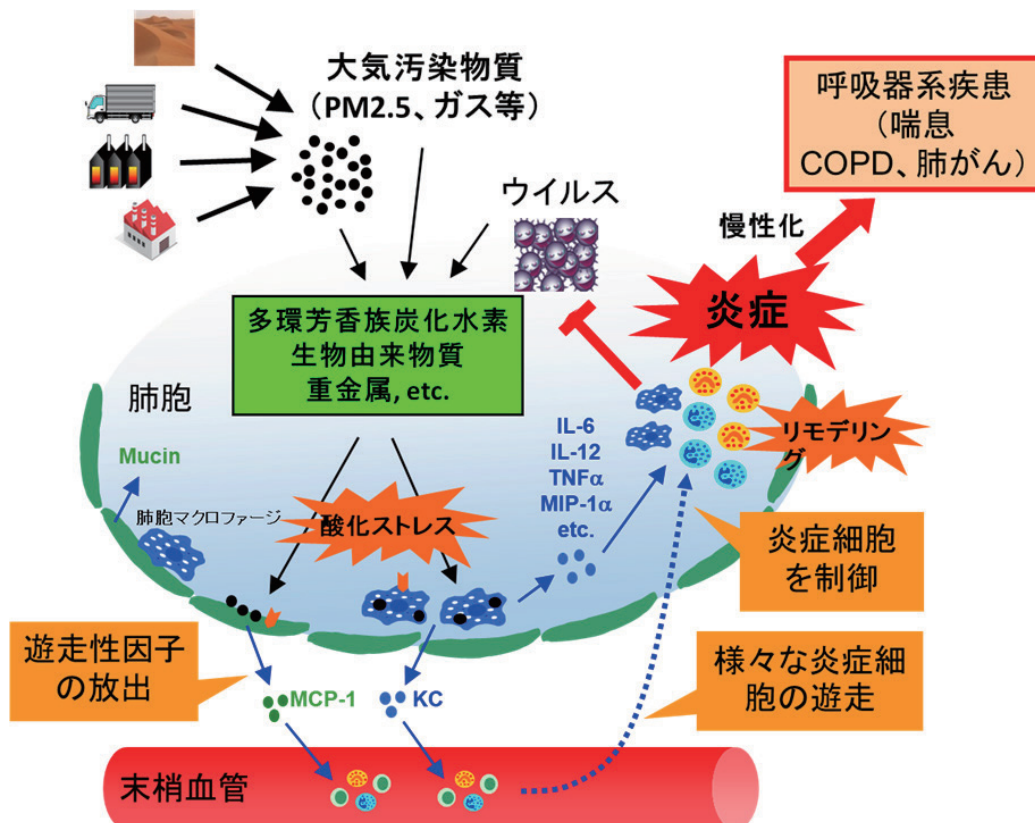


図 30 大気汚染物質の標的細胞：肺上皮とマクロファージ

肺にはマクロファージと呼ばれる免疫系の細胞や肺の内腔を構築する上皮細胞が存在し、外来因子の侵入を感知する機能を担っている。これらの細胞は、肺に侵入した異物を認識すると活性化されて、様々な因子を放出し、炎症と呼ばれる生体防御機構が起こって異物の排除が行われる。しかし、炎症が過剰に起こると疾患に繋がることが知られており、これらの過程に大気汚染物質による毒性が関与していることが知られている。

成果 1) ヒト iPS 細胞から内胚葉および肺上皮細胞の元となる前駆細胞を誘導することができた。気管・気管支を構築する 3 タイプの上皮細胞（基底細胞、繊毛細胞、杯細胞）、細気管支を構築するクララ細胞及び、肺胞を構築する肺胞上皮細胞に分化誘導することができた。また、ヒト iPS 細胞から作成した肺前駆細胞を用いて大気汚染物質による有害性を評価することができた。

成果 2) マウス iPS 細胞から肺胞上皮細胞と、高純度のマクロファージ系細胞に分化誘導することができた。この iPS 細胞由来の分化細胞は、他の初代細胞や株化細胞と同程度かそれ以上に、PM_{2.5} やその構成成分に対して、強い炎症や酸化ストレスの誘導応答性を示し、ハザード評価に有用であることが確認できた。

今後の課題としては、ヒト iPS 細胞から作成した各種肺上皮細胞の有害性確認の有効性や汎用性を検討することや、ヒト iPS 細胞からのマクロファージを用いた評価システムを開発していく必要がある。これらの点が解決したのちに、肺の微小組織を再構成することができ、より精度の高いハザード評価システムの確立ができる。マウス iPS 細胞から誘導して作成する各種の肺上皮細胞に関しては、まだ、十分な純度で作成が可能となっていないため、さらなる実験条件の検討が必要である。また、毒性評価においてマウス iPS 細胞由来のマクロファージは、初代細胞と同等の結果が得られたことから、将来的には実験動物の使用の削減に繋がる代替法として利用できる可能性を示すことができた。実験動物におけるデータはヒトに外挿するために、細胞レベルの基礎情報が必要であり、その基礎データとなることが期待される。

今回の研究をより発展させ現実に活用できるシステムにしていくためには、ヒト iPS 細胞からの各種標的細胞の安定的な供給が必要である。大気汚染物質の標的となるヒトの肺上皮細胞は簡単には採取できないため、現実には、メーカーから初代細胞や不死化細胞を入手して実験が行われている。iPS 細胞由来の正常細胞の安定供給ができれば、マルチウェルによるハイスループットによる解析を可能にすることで、より多くの化学物質の解析が可能になると期待できる。さらに、毒性と遺伝的素因の関係はまだ明らかになっていないばかりか探索するためのツールすらも存在していなかったが、本研究で実施された培養システムを様々な遺伝的背景をもったヒト iPS 細胞に応用することで、疾患の要因や大気有害化学物質に対する感受性要因の候補を探索することができるようになり、治療や予防対策に貢献できることが期待できる。

引用文献

- 1) Green M.D., Chen A., Nostro M.C., d'Souza S.L., Schaniel C., Lemischka I.R., Gouon-Evans V., Keller G., Snoeck H.W. (2011) Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotech.*, 29, 267-272.
- 2) Huang S.X.L., Islam M.N., O'Neill J., Hu Z., Yang Y.G., Chen Y.W., Mumau M., Green M.D., Vunjak-Novakovic G., Bhattacharya J., Snoeck H.W. (2014) Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotech.*, 32, 84-91.
- 3) Goto S., Ito I., Nagasaki T., Yamamoto Y., Konishi S., Korogi Y., Matsumoto H., Muro S., Hirai T., Funato M., Mae S., Toyota T., Sato-Otsubo A., Ogawa S., Osafune K., Mishima M. (2014) Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 3, 1-10.
- 4) Konishi S., Gotoh S., Tateishi K., Yamamoto Y., Korogi Y., Nagasaki T., Matsumoto H., Muro S., Hirai T., Ito I., Tsukita S., Mishima M. (2016) Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 6, 18-25.
- 5) Loh K.M., Ang L.T., Zhang J., Kumar V., Ang J., Auyeong J.Q., Lee K.L., Choo S.H., Lim C.Y.Y., Nichane M., Tan J., Noghabi M.S., Azzola L., Ng E.S., Durruthy J., Sebastiano V., Poellinger L., Elefanty A.G., Stanley E.G., Chen Q., Prabhakar S., Weissman

- I.L., Lim B. (2014) Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. *Cell Stem Cell*, 14, 237-252.
- 6) Wong A.P., Bear C.E., Chin S., Pasceri P., Thompson T.O., Huan L.J., Ratjen F., Ellis J., Rossant J. (2012) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat. Biotech.*, 30, 876-882.
 - 7) Kajiwar M., Aoi T., Okita K., Takahashi R., Inoue H., Takayama N., Endo H., Eto K., Toguchida J., Uemoto S., Yamanaka S. (2012) Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 109, 12538-12543.
 - 8) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-872.
 - 9) Matsuno K., Mae S., Okada C., Nakamura M., Watanabe A., Toyoda T., Uchida E., Osafune K. (2016) Redefining definitive endoderm subtypes by robust induction of human induced pluripotent stem cells. *Differentiation*, 92, 281-290.
 - 10) Gonzales L.W., Guttentag S.H., Wade K.C., Postle A.D., Ballard P.L. (2002) Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP. *Am. J. Physiol.*, 283, L940-L951.
 - 11) Ginhoux F., Jung S. (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 392-404.
 - 12) He M., Ichinose T., Yoshida S., Nishikawa M., Mori I., Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Sun G., Shibamoto T. (2010) Urban particulate matter in Beijing, China, enhances allergen-induced murine lung eosinophilia. *Inhal. Toxicol.*, 22, 709-718.
 - 13) van Wilgenburg B., Browne C., Vowles J., Cowley S.A. (2013) Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PLoS One*, 8, e71098.
 - 14) Karlsson K.R., Cowley S., Martinez F.O., Shaw M., Minger S.L., James W. (2008) Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp. Hemato.*, 36, 1167-1175.
 - 15) Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.K. (2011) A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One*, 6, e22261.
 - 16) Yanagimachi M.D., Niwa A., Tanaka T., Honda-Ozaki F., Nishimoto S., Murata Y., Yasumi T., Ito J., Tomida S., Oshima K., Asaka I., Goto H., Heike T., Nakahata T., Saito M.K. (2013) Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One*, 8, e59243.
 - 17) Choi K.D., Vodyanik M.A., Slukvin I.I. (2009) Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin⁻CD34⁺CD43⁺CD45⁺ progenitors. *J. Clin. Invest.*, 119, 2818-2829.
 - 18) Senju S., Hirata S., Matsuyoshi H., Masuda M., Uemura Y., Araki K., Yamamura K., Nishimura Y. (2003) Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood*, 101, 3501-3508.
 - 19) He M., Ichinose T., Kobayashi M., Arashidani K., Yoshida S., Nishikawa M., Takano H., Sun G., Shibamoto T. (2016) Differences in allergic inflammatory responses between urban PM_{2.5} and fine particle derived from desert-dust in murine lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 297, 41-55.
 - 20) He M., Ichinose T., Yoshida S., Ito T., He C., Yoshida Y., Arashidani K., Takano H., Sun G., Shibamoto T. (2017) PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. *J. Appl. Toxicol.*, 37, 1203-1218.
 - 21) Longmire T.A., Ikonomou L., Hawkins F., Christodoulou C., Cao Y., Jean J.C., Kwok L.W., Mou H., Rajagopal J., Shen S.S., Downton A.A., Serra M., Weiss D.J., Green M.D., Snoeck H.W., Ramirez M.I., Kotton D.N. (2012) Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10, 398-411.

- 22) Garreta E., Melo E., Navajas D., Farre R. (2014) Low oxygen tension enhances the generation of lung progenitor cells from mouse embryonic and induced pluripotent stem cells. *Physiol. Rep.*, 2, e12075.
- 23) Zhou Q., Ye X., Sun R., Matsumoto Y., Moriyama M., Asano Y., Ajioka Y., Sauo Y. (2014) Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into alveolar epithelial cells in vitro for use in vivo. *Stem Cells Translat Med.*, 3, 675-685.
- 24) Bekki K., Ito T., Yoshida Y., He C., Arashidani K., He M., Sun G., Zeng Y., Sone H., Kunugita N., Ichinose T. (2016) PM_{2.5} collected in China causes inflammatory and oxidative stress responses in macrophages through the multiple pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 45, 362-369.
- 25) Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448, 313-317.
- 26) Chadwick K., Wang L., Li L., Menendez P., Murdoch B., Rouleau A., Bhatia M. (2003) Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 102, 906-915.
- 27) Italiani P., Boraschi D. (2014) From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.*, 17, 514.
- 28) Ginhoux F. (2014) Fate PPAR-titoning: PPAR- γ 'instructs' alveolar macrophage development. *Nat. Immunol.*, 15, 1005-1007.
- 29) Kopf M., Schneider C., Nobs S.P. (2015) The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 16, 36-44.
- 30) Stockinger B., Meglio P.D., Gialitakis M., Duarte J.H. (2014) The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 32, 403-432.

[資 料]

1 研究の組織と研究課題の構成

1.1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境リスク・健康研究センター

曾根秀子

伊藤智彦

黒河佳香

南齋ひろ子

大塚悟史

(注) 所属は年度終了時点のもの。

1.2 研究課題と担当者

サブテーマ1：ヒト iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築

曾根秀子・伊藤智彦・黒河佳香・南齋ひろ子・大塚悟史

サブテーマ2：マウス iPS 細胞を用いたハザード評価システムの構築

伊藤智彦

2 研究成果発表一覧

2.1 誌上発表

<雑誌>

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

Bekki K., Ito T., Yoshida Y., He C., Arashidani K., He M., Sun G., Zeng Y., Sone H., Kunugita N., Ichinose T. (2016) PM_{2.5} collected in China causes inflammatory and oxidative stress responses in macrophages through the multiple pathways. Environ. Toxicol. Pharmacol., 45, 362-369.

He M., Ichinose T., Yoshida S., Ito T., He C., Yoshida Y., Arashidani K., Takano H., Sun G., Shibamoto T. (2017) PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. J. Appl. Toxicol., 37, 1203-1218.

<書籍等(分担執筆)>

発表者・(刊年)・題目・編著者名・書名・出版社・頁

Zeng Y., Win-Shwe T.T., Ito T., Sone H. (2017) A three-dimensional neurosphere system using human stem cells for nanotoxicology studies. Jamie Davies, Organs and Organoids. Elsevier, Chapter 11 p213-245.

2.2 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

戸次加奈江, 伊藤智彦, 吉田安宏, He Cuiying, He Miao, 平野靖史郎, 樺田尚樹, 市瀬孝道 (2015) 中国の都市大気汚染が示す毒性影響における生物由来活性物質の関与. 第9回大気バイオエアロゾルシンポジウム, 同予稿集, 13-14

戸次加奈江, 伊藤智彦, 吉田安宏, He Cuiying, He Miao, 平野靖史郎, 樺田尚樹, 市瀬孝道 (2015) 中国のPM_{2.5}を曝露したマクロファージにおける酸化ストレスおよび炎症反応の誘導. 日本薬学会第135年会, 同予稿集, 181

伊藤智彦, 南齋ひろ子, 曾洋, 曾根秀子 (2016) iPS細胞を活用した呼吸器系疾患への環境要因関与の解明とハザード評価法の開発. iPS情報交換会

伊藤智彦 (2016) 多能性幹細胞を用いた環境汚染物質の毒性評価研究. SATテクノロジーショーケース2016, 同予稿集

伊藤智彦, 戸次加奈江, 市瀬孝道, 曾根秀子 (2017) 多能性幹細胞を用いた大気汚染物質の毒性評価系の検討. 日本薬学会第137年会, ファルマシア53巻2号, 173

伊藤智彦, 戸次加奈江, 曾根秀子, 市瀬孝道 (2017) 培養細胞を用いた呼吸器系に対するPM_{2.5}の毒性影響の解析. 第44回日本毒性学会学術年会, The Journal of Toxicological Sciences, Supplement, 42, S89

Sone H. (2016) Development of the Hazard Assay using the Differentiation of Pulmonary Epithelium cells from Pluripotent Stem Cells. 第75回日本癌学会総会, 同予稿集

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 131 号
NIES Research Project Report, No.131

(SR - 131 - 2017)

iPS 細胞を活用した *in vitro* ハザード評価システムの構築に関する研究
(所内公募型提案研究)
平成 26 ～ 28 年度
Development of *in vitro* hazard testing systems using iPS cells
FY2014 ～ 2016

平成 30 年 3 月 15 日発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会

発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2
E-mail: pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan
March 2018

組 版 株式会社 イ セ ブ
〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。
<http://www.nies.go.jp/kanko/index.html>