

国立環境研究所研究プロジェクト報告

NIES Research Project Report from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 102 - 2012

胚様体を用いた発生分化毒性学の特化した
マトリックスの開発
(特別研究)

Development of basement membrane substrata customized for developmental toxicology by high throughput screening in vitro in use of embryoid body

平成 21 ~ 23 年度

FY2009 ~ 2011

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

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

胚様体を用いた発生分化毒性学の特化した
マトリックスの開発
(特別研究)

Development of basement membrane substrata customized for developmental toxicology by high throughput screening in vitro in use of embryoid body

平成 21 ~ 23 年度

FY2009 ~ 2011

特別研究「胚様体を用いた発生分化毒性学に特化したマトリックスの開発」
(期間 平成 21 ～ 23 年度)

課題代表者：持立克身 (平成 21 ～ 22 年度)
曾根秀子 (平成 23 年度)

執 筆 者：曾根秀子
編 者：曾根秀子

序

本報告書は、平成 21 ～ 23 年度の 3 年間にわたって実施した特別研究「胚様体を用いた発生分化毒性学に特化したマトリックスの開発」の研究成果を取りまとめたものです。

文明の急速な発達により膨大な数の化学物質が生産され、環境中に放出されています。しかし、それらの化学物質が健康にどのように影響をおよぼすかということについて、十分に把握されていないのが現状です。安心・安全な社会の構築のために、環境化学物質ならびに環境有害因子のヒト健康に対する迅速なリスク管理が求められています。健康影響を反映するような細胞アッセイの技術が必要であると議論されています。多くの細胞を用いたアッセイがあるなかで、特に近年、動物及びヒトの ES/iPS 細胞である多能性細胞を用いて、種々の組織に分化誘導する研究が、世界中で活発に行われています。それらのうち、胚性幹 (ES) 細胞を用いた分化細胞を誘導するアッセイ系は、発生の過程全てを代表するものではありませんが、発生分化に対する健康影響を評価する試験として有力であると考えられています。特に、胎児や新生児などの脆弱な人々に対する化学物質の影響を評価するモデルとして重要です。この胚性幹細胞は、一旦、胚様体と呼ばれる幹細胞から少し分化した細胞集塊を経て、各成熟細胞へと分化していきます。化学物質の毒性影響を評価するためには、均一な胚様体が必要であり、胚様体から目的の成熟細胞に分化するには、細胞外の基底膜基質 (マトリックス) が必要です。しかしながら、化学物質の評価に耐えるマトリックスは、これまで十分に開発されてきませんでした。

本研究は、化学物質の発生毒性を評価するための細胞アッセイに最適化したマトリックスを開発することにより、細胞の分化誘導の過程を再現性良く制御した細胞アッセイの確立を目的に実施されました。ヒト胚様体を用いた細胞分化アッセイが順調に稼動していくなれば、そこから得られた化学物質の量反応関係データをシステムズバイオロジーなどの手法に適用し、ヒトの曝露や生体影響を予測することが可能となり、次世代の化学物質環境リスク管理に道を拓く足がかりとなります。本特別研究がきっかけとなって、日本の環境保健行政やグローバルな人類の健康施策のためのデータの蓄積が始まれば、様々な分野で利用されるようになることが期待されます。

本研究では主に有機塩素化合物や内分泌攪乱化学物質を対象化学物質としました。その結果、ES 細胞を用いた健康リスク評価研究を行う上で重要な手法の開発や、初期曝露の晩発影響 (疾患胎児起原説 DoHAD) における化学物質の作用機序に関して多くの知見を得ることができました。この研究で得られた成果は、今後環境化学物質の生体影響を評価する上での科学的基盤として役立てられていくものです。

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 24 年 12 月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 大垣 眞一郎

目 次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の背景	1
1.1.1	毒性試験のあり方：パラダイムシフトの実態と必要性	1
1.1.2	<i>in vitro</i> 細胞試験の確立の重要性と <i>in vitro</i> 発生毒性試験の確立の意義	2
1.1.3	<i>in vitro</i> 細胞発生毒性試験における細胞支持基盤である細胞外マトリックスの役割	4
1.1.4	これまでの研究と基底膜成分ラミニンの重要性	5
1.2	研究の目的	6
1.3	研究の構成	6
2	研究の成果	7
2.1	神経細胞分化のマトリックス創製と評価に関する研究	7
2.1.1	細胞毒性試験に適したマトリックスの創製	7
2.1.2	細胞毒性試験に適したマトリックスの評価	8
2.2	血管内皮分化のマトリックス創製と評価に関する研究	12
2.3	胚様体を用いた <i>in vitro</i> 発生毒性試験への適用の評価	14
2.3.1	環境化学物質の神経発生毒性影響評価	14
2.3.2	環境化学物質の血管発生毒性影響評価	16
2.4	まとめと今後の課題	16
[資 料]		
I	研究の組織と研究課題の構成	23
1	研究の組織	23
2	研究課題と担当者	23
II	研究成果発表一覧	24
1	誌上発表	24
2	口頭発表	26

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の背景

1.1.1 毒性試験のあり方：パラダイムシフトの実態と必要性

環境中に存在する化学物質の数は、爆発的に増大し、2012年現在、5000万種を超えている。この人間活動がもたらした化学物質の安全性・有害性を含めたリスク評価の管理は、私たちの安全・安心な社会を維持していく上で緊急かつ、極めて重要な課題となっている。リスク評価のための有害性確認や、作用機構の研究においては、現在でも動物実験が中心的な手法であるが、多種類の化学物質を迅速に評価するには、経済性、時間など様々な制約がある。また、化学物質のヒトに対する生体影響を算定するリスク評価においても、信頼しえるヒトのデータがない場合は、動物実験のデータをヒトへ外挿することにより数値を算出するのが一般的に行われる。その手法では、最大無毒性量を不確実係数 (Uncertainty Factor: UF) で割り、ヒトの影響の下限値としている場合が多い。このUFは、種内(個体)差・種間差・低濃度域外挿・曝露シナリオ・毒性の種類の変異・データ信頼性の6項目を各々10段階評価で行うため、その値は最大 10^6 となる。規制科学的観点から、ヒト健康リスクにおける影響の算定には、このUFをいかに低くできるかが重要課題であり、観察された有害影響の発現メカニズムがヒトと共通であることが一定の確かさをもっていえるかどうか検証の上、慎重に行うべきとされている。

この種間差の問題が、予測が難しく、最も解決困難な問題である。多くの動物モデルが人間の健康影響の予測に役立ってきたと認識されているが、それが必ずしも最良の選択だとは限らない。過去の事例では、メチル水銀は哺乳類の間でも毒性の種間差が大きく、多くの実験動物ではヒトと同様の毒性が発現しない。ラットやマウスなどでは腎毒性や末梢神経に対する毒性が強く、ヒトの水俣病のような中枢神経毒性はあまり報告がない。一方ネコの場合は中枢神経症状も現れる。ラットとヒトでは脳への分布に10倍の差があり、このことがメチル水銀においてヒトの中枢神経に対する影響が強い原因となっている。ダイオキシンの例では、非発がん性の毒性については、ヒトにおいて最も特徴的な影響がクロールアクネの発症である。実験動物では、サルにおいてのみ同様な

症状が確認できている。妊娠母体への曝露による胎仔の死亡率のNOAEL(最大無毒性量)及びLOAEL(最小毒性量)でみると、サルで22及び111 ng/kg/day、ラットで30及び500 ng/kg/dayとなっておりLOAELで約5倍の差がある。マウスにいたっては、500 ng/kg/dayでも胎仔の死亡率の有意な増加は観察されていない。視点を変えて、各ヒト及び動物種での母親(獣)への曝露による胎児(胎仔)及び子どもへの最小毒性量で比較してみると、感受性が最も高かったヒトと最も低かったマウスで30倍以上の開きがあった。

現在の毒性試験の体系は、生物学やバイオテクノロジーなどの科学の進展を適宜取り入れて発展してきた。しかし、リスク評価と管理の全体に照らして毒性試験の構成が適切かどうかという評価は実施されてこなかった。米国環境保護庁(EPA)は、2004年、National Research Council(NRC)に毒性試験方法のレビューと長期ビジョンと戦略の提案を依頼し、NRCはそれを受けて「環境化学物質の毒性試験と評価に関する委員会」を組織した。2007年にその委員会が提案した最終報告書では21世紀の毒性試験のキーワードは「毒性経路(toxicity pathway)」であると書かれている。毒性経路とは、化学物質などの環境外的要因に曝されて健康の悪影響を引き起こす生体の応答経路のことである。最終報告書で提案された「21世紀の毒性試験」は、この毒性経路の攪乱をエンドポイントとした毒性評価を、計算アプローチとヒト由来細胞を使った*in vitro*試験が中心となり、限定的な*in vivo*試験(動物実験)がそれを支援補完するという形で達成することを目指す、というものである。

一方、European Centre for the Validation of Alternative Methods(ECVAM)などの欧州のアプローチでは、主な目標が「動物での高用量試験の結果を予測できる*in vitro*試験体系の開発」である。欧州委員会では、2007年より前に、化粧品市場に関して2013年までに動物実験の撤廃を目標にそれに替わる*in vitro*試験の確立を目標としていた。さらに、新規化学物質の査定にもこの規制案を考慮に入れることを目標としている。それに対して、先に示したNRC専門委員会の提案では、ヒト由来細胞を利用することで、ヒトが曝露している低濃度での

影響を「毒性経路の攪乱」として見出すことを目指している。このような国外の動向を鑑みると、未来の毒性評価の手順は次の通りと予見される（図1）。まず対象物質と、それらの代謝物を明らかにし、それらの毒性経路を解明し、また *in vitro* 試験での用量を測定する。これらから毒性経路攪乱をエンドポイントとした用量反応関係を得る。これらについて PBPK モデル等を使い、*in vitro* での用量をヒト曝露量に換算するとともに、実測あるいは予測された実際のヒト曝露データと比較し、リスクを評価する。具体的には、*in vitro* 試験を中心として、統合された試験戦略、トキシコキネティクス、オミックス、システムバイオロジー、バイオインフォマティクス、コンピューターモデリングのような代替戦略が促進されている。これらの手法は、従来の動物実験からヒトへの外挿よりも、ヒトの生物学に基づいた新たな手法を提案している。いずれの場合においても、重要な事は「21世紀の毒性試験」によって動物試験への代替アプローチの成長が加速されることであり、この新しい方式によって健康リスク評価の迅速な結果やより良い予測を提供するという事である。

毒性経路攪乱をエンドポイントとした用量反応関係に用いられる *in vitro* 試験には様々なものがある。現在までに哺乳類細胞を用いた多くの *in vitro* 試験が開発されてきたが、OECD 毒性試験ガイドラインに記載されているものとしては、遺伝毒性試験として、TG473：哺乳類の *in vitro* 染色体異常試験、TG476：哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験、TG479：哺乳動物細胞を用

いる *in vitro* 姉妹染色分体交換試験、TG482：DNA 傷害及び修復／哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 不定期 DNA 合成試験、TG487：哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験があり、さらに内分泌攪乱試験では TG455：化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化試験、皮膚吸収試験では TG428：*in vitro* 皮膚吸収試験法、光毒性試験では TG432：*in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験などがあげられる。一方、未だ脳、心臓、肺臓、肝臓といったいわゆる主要臓器の細胞を反映した *in vitro* 試験は公式試験として採用にいたっていない。これは、生体内での吸収、分布、代謝などのトキシコキネティクス（毒物動態学）との関係が明確にされていないということもあるが、臓器を的確に反映した細胞培養条件が整わなかった事によるかもしれない。しかし、最近の再生医療学の発展を支えている培養技術、特に細胞外マトリックスを操作することで組織や細胞を制御し再生医療などに利用する応用技術が急速に発展していることから、*in vitro* 毒性試験の有用性は高まりつつある。

1.1.2 *in vitro* 細胞試験の確立の重要性と *in vitro* 発生毒性試験の確立の意義

21世紀の毒性試験を成功させるために、現在ヒト細胞を用いた毒性試験における細胞培養方法の議論が活発となっている（図2）。議論の中心となっている細胞培養方法には大別して、初代培養細胞と幹細胞の二種がある。前者は、臓器毒性を反映した *in vitro* 細胞試験であ

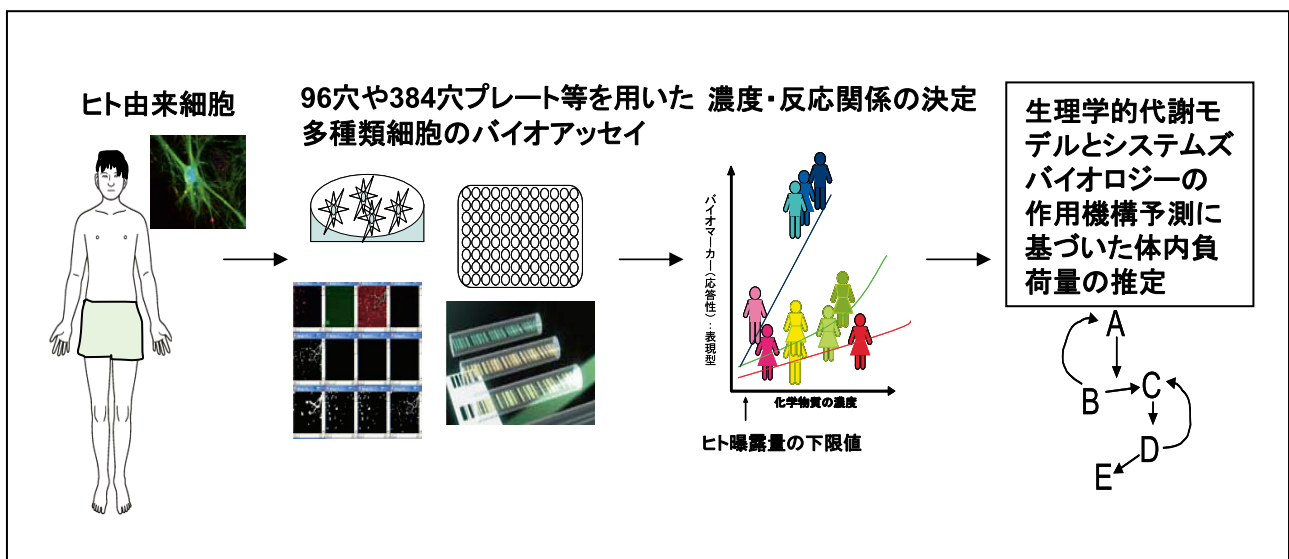


図1 健康リスク評価における近未来の動物フリー毒性試験の概念図

り、後者は、発生・発達影響を反映した *in vitro* 細胞試験である。特に後者は、近年の細胞培養技術の発展によって、ES や iPS 細胞などの多能性細胞を用いた分化過程の研究、成熟細胞の取得など、再生医療技術、創薬への活用、*in vitro* 発達試験の確立に役立つことが期待されている。

ところで、わが国の環境保健行政においては小児の環境健康調査が優先課題の一つとされ、「エコチル調査」が2011年より正式に開始されている。発達期影響を及ぼす化学物質のスクリーニングや影響評価に関する研究は、疫学調査のための資料として有用であると考えられる。エコチル調査が検証すべき重要仮説のひとつとして、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD, 胎児期病態起源説) があげられるが、この仮説は、Barker 仮説 (胎生期の低栄養状態のために低体重で生まれてきた子供は、成人期の2型糖尿病や心疾患という生活習慣病に罹りやすいという仮説) から発展してきた概念である。DOHaD は胎児や新生児など脆弱な時期における環境因子によりエピゲノムに不可逆的変化が残ることを病態の成因と想定している。DOHaD 研究は保健衛生学上の重要性により、現在も世界各国で精力的に進められているが、ゲノム疫学的報告は多いものの、発生

機構に関する生化学的報告は少ない。初期曝露による晩発影響といった経時的な変化の観察が不可欠であること、さらにヒトの脳の発達のような複雑系を反映する多細胞モデルが必要とされるなどの観点から、DOHaD の検証には ES や iPS 細胞などの多能性細胞を用いた評価系が最も適しているものと考えられる。

胎児及び幼少期は、化学物質に対する感受性の高い時期と考えられ、その後の生涯にわたる健康に影響を引き起こす可能性が懸念されている。環境化学物質のうち、鉛、水銀、PCB 類、砒素、トルエンなどでは、発達期の曝露がその後の脳に影響を及ぼすことが知られているが、これら以外の化学物質については、胎生期曝露の影響に関する評価が十分にされていない。一方で、注意欠陥・多動性障害、パーキンソン病や、アルツハイマー病などの中枢性疾患に関しては、環境中の化学物質の胎生期曝露がその発症や病態の進展に深く関わっている可能性が指摘されている。それらの研究の緊急性、重要性は2006年に英国 *Lancet* 誌に Grandjean 博士らによって報告され、同じ頃に、Barlow らによっても、パーキンソン病を事例として、妊娠期における農薬などの環境化学物質に曝露されると、発症の閾値が下がるという動物実験や疫学調査の証拠が示された。さらに、胎生プロ

新技術に期待されている事

- (1) 毒性試験における試験方法をモデル化するのに必要な人間の毒性経路の同定を加速すること
- (2) 標的組織の複雑さを低減したモデルで毒性評価できること
- (3) 健康影響を反映したエンドポイントで特異的なメカニズムが検証できること
- (4) 自動化した試験方法の使用によってより高い効率で毒性メカニズムが測定できること

開発中もしくは標準化がテストされている試験項目

- A. 初代培養細胞単層培養と3次元培養
- (1) 肝細胞
 - (2) 中枢神経 (大脳皮質)
 - (3) 腎臓
 - (4) 網膜・視覚細胞
- B. ヒト幹細胞・分化培養 (胚性及び間質系、iPS)
- (1) 肝毒性の評価モデル
 - (2) 心毒性の評価モデル
 - (3) 生殖発生毒性 (胚毒性含) の評価モデル
 - (4) 発がん性・遺伝毒性の評価モデル
 - (5) 視覚細胞の評価モデル
 - (6) 血液毒性の評価モデル
 - (7) トキシコキネティクス

図2 多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) を活用した *in vitro* 毒性試験の現状と将来

グラミングと発達毒性に関する第1回国際カンファレンスが2007年に開催され、発生・発達期の環境化学物質曝露による健康影響についてフェロー宣言がまとめられた。第3回会合（2012年）ではエピゲノム影響について中心に話し合われる予定である。このように、環境中の化学物質曝露による発達期への影響の問題は、世界的にも非常に注目されている。

そのような状況の中で、本研究課題では、*in vitro* 細胞毒性試験のうち幹細胞を活用した試験に特化して研究を実施することとした。すなわち、最終目標としては *in vitro* 細胞発生毒性試験の確立と利用を目指し、そのために、ES や iPS 細胞などの多能性細胞から胚様体を経由して各分化細胞に効率良く発達させる細胞培養系の確立を不可欠な最重要課題とした（図3）。

in vitro 細胞発生毒性試験の確立のためには、ES や iPS 細胞由来の多能性細胞が集塊した胚様体から効率よく、再現性良く、目的組織を構成する実質細胞に分化させる技術が必要である。その技術には、培養液の組成と細胞支持基盤（培養プレート）の構築が最も重要な二大要素となる。

本研究課題では、細胞培養における細胞支持基盤の中でも鍵となっている細胞外マトリックスのうち、基底膜基質に焦点をあてて、*in vitro* 細胞発生毒性試験に最適な細胞外マトリックスの創製を目指した。生体内で基底膜は、上皮細胞の基底面の直下に存在する厚さ約 50 nm の薄膜状の構造体で、きめ細かな網目状構造により、周囲の結合組織から上皮組織を分離している（図4）。その機能は、上皮組織における恒常性の維持、細胞接着・伸展・移動、極性、細胞死、増殖、ニッチ（niche）を提供するなど、個体発生と分化の基礎となる重要な現象の全てに関わっている（図5）。

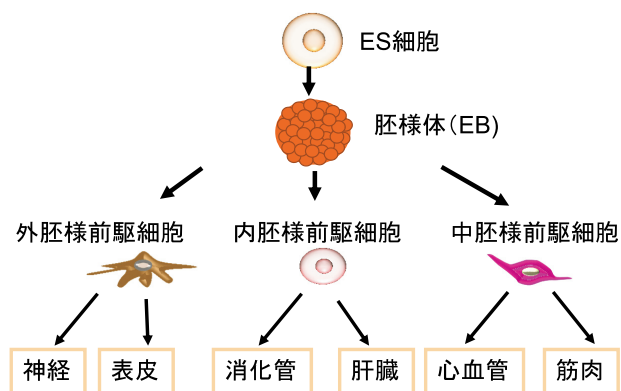


図3 ヒト胚性幹 (ES) 細胞からの胚様体を経由した細胞・組織分化

1.1.3 *in vitro* 細胞発生毒性試験における細胞支持基盤である細胞外マトリックスの役割

細胞外マトリックスは、多細胞生物の場合、細胞外の空間を充填する物質であると同時に骨格的役割（例：動物の軟骨や骨）、細胞接着における足場の役割、細胞増殖因子などの保持・提供する役割などを担う重要な“基盤”である。言い換えれば、多細胞生物を構成する個々の細胞の多くは、細胞活動を変化させることができる動的で機能的な細胞外マトリックスの“基盤”上で生命を育んでいる。ヒトを含めた脊椎動物の場合の細胞外マトリックス成分は、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチンやラミニンといった糖タンパク質が主成分であり、これらの一部は、細胞接着分子として機能している。間質にはI型コラーゲン、プロテオグリカン（パーシカン、デコリンなど）、フィブロネクチンなどが豊富

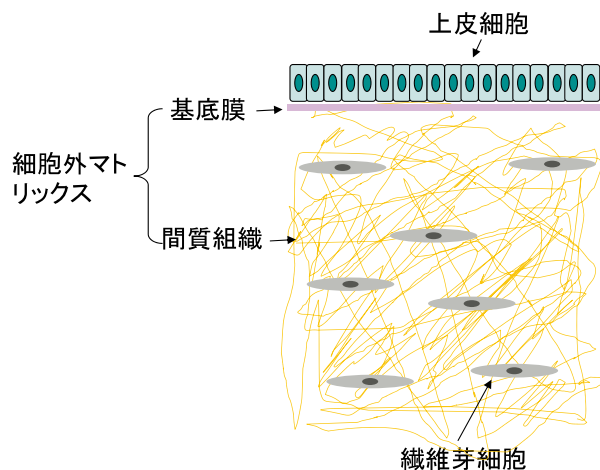


図4 上皮組織における細胞外マトリックスの位置

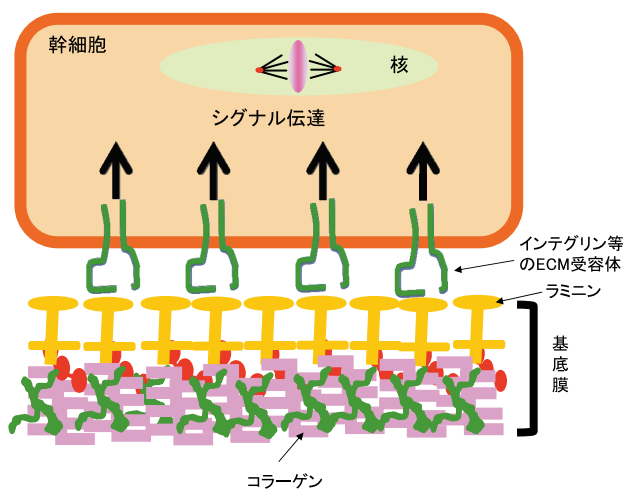


図5 細胞分化における幹細胞と細胞外マトリックス（基底膜）の微小環境（ニッチ）

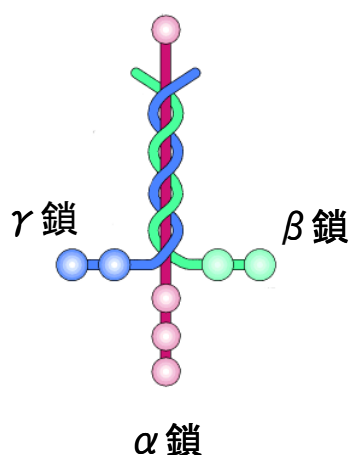
に存在している。間質（結合組織）と上皮（実質）の間などに見られる基底膜には、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン、エンタクチンなどの成分が見られる。脳の主要な細胞外マトリックス成分はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヒアルロン酸、テネイシンなどの糖タンパク質である。細胞外マトリックスの構造体の中で直接細胞に接している膜様構造物が、細胞外基底膜（以後、単に基底膜と呼ぶ）である。I型コラーゲンは、各組織の間充織に存在して、重力や応力に抗して組織の形状を保持する役割を果たしている細胞外マトリックスの重要な構成要素である。しかし、I型コラーゲンの役割はこれに留まらず、フィブロネクチン（FN）やビトロネクチン（VN）等の細胞接着分子に結合する場所を与え、細胞接着の場の形成に寄与している。更には、ヒアルロン酸に代表される多糖類は、間隙を縫って結合組織中の細胞が共存できる場を与え、水分やイオンの保持、そして細胞接着に役立っている。細胞外マトリックスを構成する各要素は、それぞれ多岐に渡る役割や結合関係を持つことで、各組織を構成する細胞に合った固相環境の形成を実現している。培養科学の分野では酸可溶性I型コラーゲン分子を中性等張塩溶液中で線維形成（ゲル化）させることで培養基質としたものが、平面培養や包埋培養に数十年間活用されてきた。しかし、現在ではインテグリン接着受容体との結合領域を持つFN、VN、ラミニン（LN）分子をプラスチック培養容器にコートすることで培養基質とする技術が普及している。この場合、接着分子を吸着する支持体としての役割を、簡便なプラスチックが代行している。

1.1.4 これまでの研究と基底膜成分ラミニンの重要性

本研究課題グループの持立らは、基底膜が上皮組織や内皮組織の機能発現や形態形成に深く係わることを活かして人工組織の構築に基底膜を利用できないだろうか、という発想をもとにして、上皮細胞を用いた基底膜構造体の形成、及び基底膜を組織構築の基質に用いることを検討してきた。従来は、I型コラーゲンゲル中で線維芽細胞を3次元培養し、その上に上皮細胞を播種して、基底膜を形成していた。しかし、この方法では、I型コラーゲンゲル中の線維芽細胞の除去が難しく、形成した基底膜を培養基質に用いる目的には十分に適さなかった。そこで、ラットII型肺胞上皮（SV40-T2）細胞の基底膜基質創製の培養モデルにおいて、高密度に細胞

を培養した後、界面活性剤0.1% Triton.X-100、及びアルカリ 20-50 mM NH₃/PBS（-）溶液処理でSV40-T2細胞を除くと、緻密な基底膜板（sBM）が形成された。sBMの基となる培養する細胞の種類や共培養細胞の有無を選択することで、細胞分化に深く関与するラミニンの亜型も制御することができた。この方法は基底膜形成した上皮細胞に限らず他の上皮細胞の培養にも使えるものと考えられ、SV40-T2細胞（T2 sBM）においては、自らが形成した基底膜基質に再接着後、基底膜緻密板との間で、アンカリングフィラメントを形成して繋がること、電子顕微鏡を用いて観察された。また、気道上皮細胞のSPOC1（SPOC1 sBM）も、SV40-T2細胞が形成した基底膜を認識し、等しくアンカリングフィラメントを形成して繋がることがわかった。さらには、上皮細胞内の細胞骨格が細胞-基質間結合から細胞-細胞間結合にシフトすることで、密着結合が強化され、例えば活性酸素による傷害にも耐性を増大することがわかった。また、sBMは、冷凍による長期保存が可能であり、試験の前に予め大量に作成しておくことが可能であることもわかった。

一方、基底膜成分のうち、ラミニンは、発生初期から成体まで全ての器官に発現している重要な分子で、 α 鎖には5種類（ $\alpha 1 \sim \alpha 5$ ）、 β 鎖（ $\beta 1 \sim \beta 3$ ）と γ 鎖（ $\gamma 1 \sim \gamma 3$ ）には、それぞれ3種類ずつの異なる組み合わせがあり、現在までにそのアイソフォームは16種類にまで及んでいる（図6）。ラミニン α 鎖だけでも器官・細胞ごとに多様な分子組成を持ち、それぞれの機能の違いが予想されている。その中で、laminin-511（LN511, $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ）は、胎児期や成体の組織の上皮に広範囲にわたって発現している。特に、腎臓、心臓および肺組織、ヒトの骨格筋、ヒトの副腎皮質、ヒトの胎盤組織、髪の毛などでその発現が確認されている。スウェーデンのTryggvasonらのグループは、LN $\alpha 5$ 鎖の完全なヒトcDNA配列を決定し、ヒト胎児腎由来HEK293細胞にLN $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、および $\gamma 1$ 鎖をコード化した完全長cDNAを導入した組み換えヒトLN511（rLN511）タンパクを産生する細胞（hLN-10細胞）を作製した。さらに彼らは、LN511の機能解析を行ったところLN-8やLN-1と比して移動や増殖の他に非常に強力な接着性を持つことを明らかにした。そこで、本研究課題グループの持立らは、LN511を大量に産生するhLN-10細胞を用いて、接着性の強い新規な基底膜構造体（hLN-10細胞由来基底膜構造体、hLN10



α鎖	3量体組成	主な発現部位
α1	α1β1γ1 α1β1γ2	胎児組織
α2	α2β1γ1 α2β2γ1 α2β1γ	筋肉、シュワン細胞(神経)
α3	α3β3γ2 α3β1γ1 α3β2γ1	皮膚、肺、その他の上皮細胞
α4	α4β1γ1 α4β2γ1	血管
α5	α5β1γ1 α5β2γ1	血管、腎臓、肺、神経、その他の上皮組織

図6 基底膜成分ラミニンの種類

sBM と呼ぶ)を開発した。これまでに、これを用いて、ラットの気道上皮細胞から線毛形成を効率良く誘導する培養系の開発を試みている。すなわち、ラット不死化肺胞II型上皮(SV40-T2)細胞を使用して、hLN10 sBMの共存下、TGFβ-1や精製した基底膜成分を添加することで、SV40-T2細胞の直下に*in vivo*に近い基底膜構造体を再現させることに成功した。この成果は、LN511が線毛形成の誘導刺激を行う重要な基底膜構成成分であることを初めて明らかにした点においても学術的に重要である。今回の研究計画は、以上の結果が、種々の*in vitro*細胞試験へと応用の可能性を上げたことを受けて、立案されたものである。

1.2 研究の目的

本研究課題は、発生過程における細胞分化への影響を評価する*in vitro*細胞毒性試験に最適化したマトリックスを開発することおよび、分化誘導の過程を精密に再現するアッセイ系を確立することを目的にした。

マウス及びヒトES細胞を、種々の組織に分化誘導させる過程は、発生の全過程を反映するものではないが、毒性学の立場から発生過程における細胞分化に対する影響を検討するには有力な研究手段になり得ることは、専門家間で共通に認識されている。しかしながら、既に医療や研究で使用されている細胞外マトリックスは、発生過程における細胞分化に対する影響を評価する*in vitro*試験にはいまだ用いられておらず、その適用が課題となっていた。本研究課題の成果は、その問題を克服することで、ESやiPS細胞などの多能性細胞を用いた*in vitro*発達試験すなわち*in vitro*細胞発生毒性試験の確立に役立つことが期待される。

1.3 研究の構成

本研究では、サブテーマ1. 神経細胞分化のマトリックス創製と評価に関する研究、サブテーマ2. 血管内皮分化のマトリックス創製と評価に関する研究、の2つのサブテーマのもとに研究を行った。サブテーマ1では、ヒトES細胞由来及びマウスES細胞由来の胚様体から神経細胞へ効率よく分化へ導くのに必要なマトリックスの創製を検討し、市販の単一物質のマトリックスを含め様々な細胞から作成したマトリックスを比較した。マトリックス評価には、神経分化細胞の存在比率、神経細胞の突起長、突起の分枝率などを指標とした。また、神経前駆細胞集団であるニューロスフィアから神経細胞への分化にもマトリックスが支持体として役立つかどうかを検討した。これに加えて、環境化学物質を胚様体形成時に添加し、神経分化への影響を調べ、*in vitro*細胞発生毒性試験が実施可能であるかを検討した。サブテーマ2では、ヒトES細胞由来の胚様体から血管内皮細胞へ効率よく分化へ導くのに必要なマトリックスを創製し、神経と同様に、血管内皮細胞の針様形態の存在率を指標としてそのマトリックスを評価した。これに加えて、環境化学物質を胚様体形成時に添加し、血管分化への影響を調べ、*in vitro*発生影響試験が実施可能であるかを検討した。

本報告書では、これらの結果を以下の3つの項目にまとめ、次の章に記した。1. 神経細胞分化のマトリックス創製と評価に関する研究、2. 血管内皮細胞分化のマトリックス創製と評価に関する研究、3. 胚様体を用いた*in vitro*細胞発生毒性試験への適用に関する研究。

2 研究の成果

2.1 神経細胞分化のマトリックス創製と評価に関する研究

2.1.1 細胞毒性試験に適したマトリックスの創製

ヒトにおける上皮細胞のラミニンは成人型 LN511 であることをふまえて、ヒト LN511 (hLN511) を多量に分泌するように遺伝子改変した rLN10 細胞を化学繊維製メンブレンやプラスチックプレートに高密度に培養して、主成分が hLN511 から成る基底膜基質 LN511 sBM を作製した。作製の基本原理は、基底膜形成に関わる受容体を細胞の基底面に集積させ、分泌された遊離のラミニン分子と複合体を形成させる点にある。その結果、ラミニン分子は3次元の自由拡散から基底面上の2次元拡散に制限されることで、ラミニン分子同士の衝突頻度が高まり、多量体化が促され、ラミニン格子の形成が飛躍的に増大する。この方法を用いることで、線維芽細胞やマトリゲルとの共培養による基底膜成分の大量供給が可能となり、基底膜が形成されるようになった。

従来の HEK293 細胞と遺伝子改変 HEK293 の hLN-10 細胞をセルカルチャーインサートのポリエチレンテレフタレート (PET) メンブレン上に培養し、HEK293 sBM 及び rhLN511 sBM 基底膜をそれぞれ作製した。このときの、両者の基底膜構造の違いを走査型電子顕微鏡で比較検討した (図7)。rhLN511 sBM では、繊維が高密に広がり、その中を長径が 50 nm から 5 μm サイズの楕円状の間隙が随所に散在する構造となっていた。

さらに、IV型コラーゲンとラミニン $\alpha 1$ 、ラミニン $\alpha 5$ 、ラミニン $\beta 1$ 、ラミニン $\gamma 1$ の局在性を比較検討するため、それぞれの特異的抗体を入手し、免疫組織化学的にこれらタンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した (図8)。HEK293 sBM の場合は、IV型コラーゲン (図8A) とラミニン $\alpha 1$ (図8B) の沈着が観察されたが、ラミニン $\alpha 5$ (図8C) はわずかであり、ラミニン $\beta 1$ (図8D) 及びラミニン $\gamma 1$ (図8E) については殆ど検出することは出来なかった。一方、hLN10 sBM の場合は、シート状の基底膜構造体が形成されていたが、走査型電子顕微鏡での観察と同様に、楕円状の間隙が随所に散在する構造が認められ、IV型コラーゲン、ラミニン $\alpha 5$ 、ラミニン $\beta 1$ 及びラミニン $\gamma 1$ は全て陽性反応を示した (図8F-J)。

次に、細胞毒性試験に適した24穴プラスチックプレート上に、基底膜基質が強固に接着できるように支持溶液を塗布後、上記と同様に、rSN2 遺伝子導入 HEK293 細胞と rhLN511 を導入した hLN-10 細胞を高密度に培養して、rSN2 sBM (主成分がエンタクチン基底膜) と hLN511 sBM から成る基底膜基質を作製した。免疫組織化学的にIV型コラーゲン、ラミニン $\alpha 5$ 及びフィブロネクチンタンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果、PETメンブレン上と同様にプラスチックプレート上に hLN511 sBM において、3者のタンパク質が検出できた (図9)。免疫組織化学的

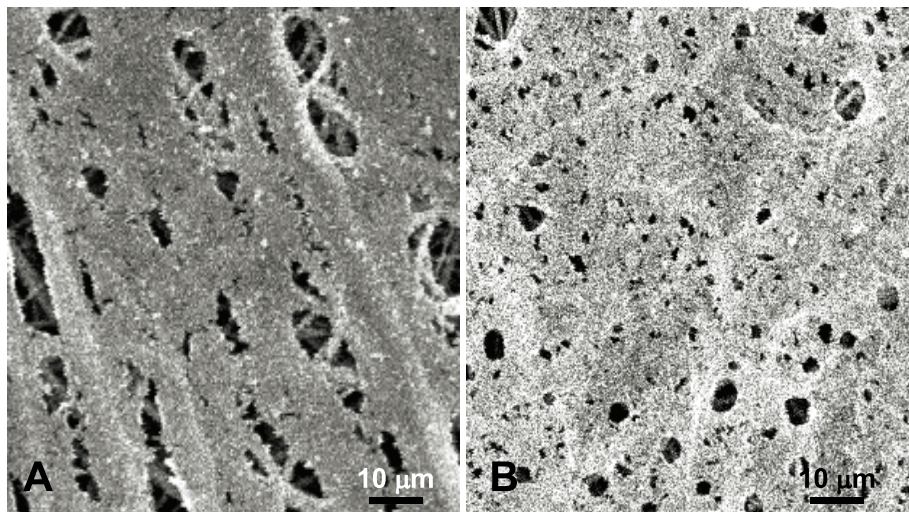


図7 走査型電子顕微鏡観察による人工基底膜 (マトリックス) の構造
左写真: HEK293 sBM、右写真: hLN10 sBM

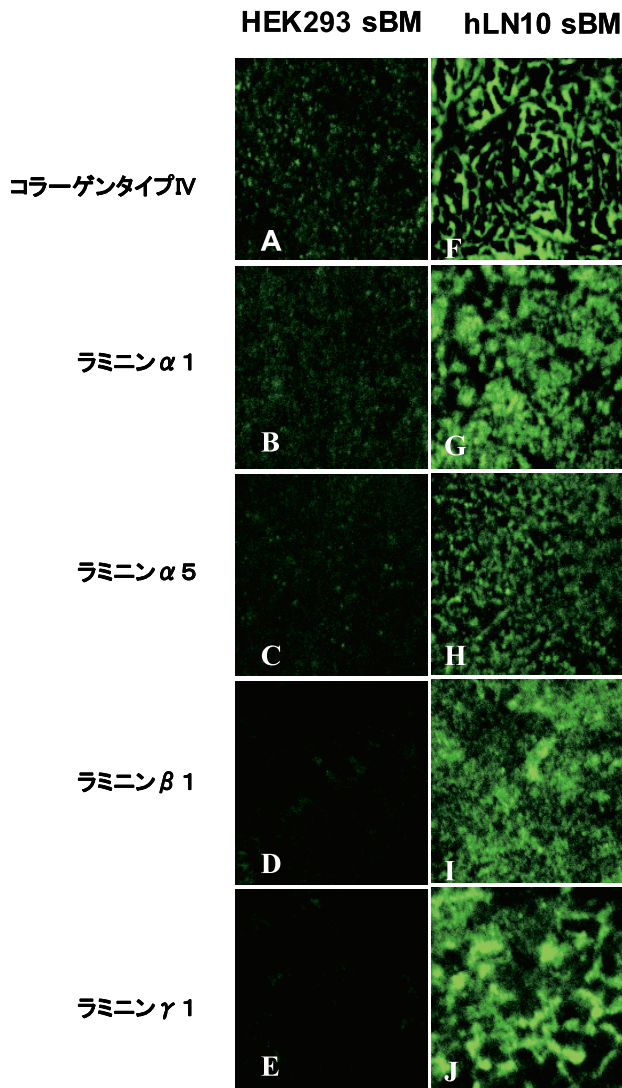


図8 免疫蛍光組織化学的染色による人工基底膜（マトリックス）の構造の比較
HEK293 sBM は A ~ E、hLN10 sBM は F ~ J の写真。

に検出された基底膜構造をさらに精査するために、走査型電子顕微鏡により rSN2 sBM と rLN10 sBM の違いを調べた（図 10）。PET メンブレン上の場合（図 8F-J）と同様に、長径が 50 nm から 110 μ m サイズの楕円状の間隙が随所に散在する構造（図 10C）となっており、さらに高倍率の観察では、間隙孔に粒子状物質の高密度な存在が確認できた（図 10D）。しかし、この物質が何かは明らかにできなかった。

次に、IV 型コラーゲン、ラミニン α 5、ラミニン β 1、エンタクチン及びフィブロネクチンの存在量を比較するため、ウェスタンブロット法によるタンパク質量を測定した（図 11）。rSN2 sBM に比べ rLN10 sBM は、有意に高い発現量の IV 型コラーゲンとラミニン α 1 を有していることがわかった。しかし、エンタクチン及びフィブ

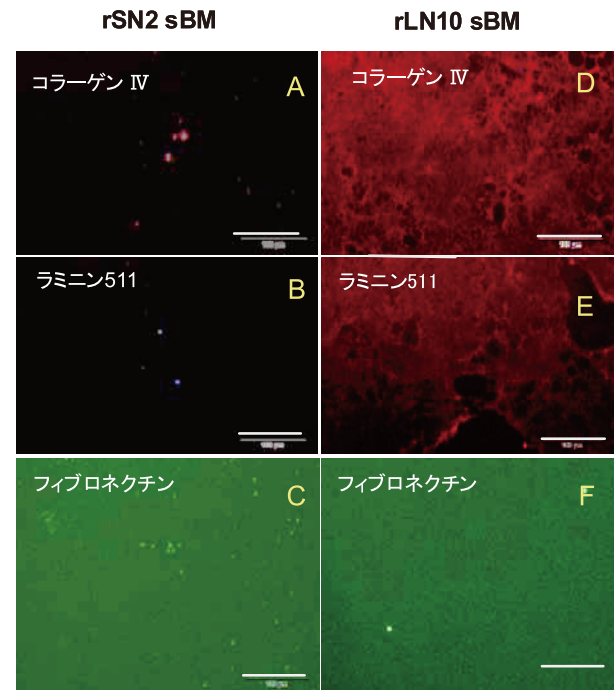


図9 エンタクチン基底膜（rSN2 sBM）とラミニン 511 基底膜（rLN10 sBM）の各種基底膜成分の抗体を用いた免疫蛍光組織化学的染色による比較
赤：コラーゲンIV、ラミニン 511 緑：フィブロネクチン

ロネクチンの存在量（図 11A）はわずかであった。

以上の免疫組織化学的解析、走査型電子顕微鏡による観察及びウェスタンブロット法によるタンパク質の半定量の結果にもとづき、rSN2 sBM、rLN10 sBM 及び市販の PL-O-LN の基底膜基質成分の構造を図 12 のように推定した。rLN10 sBM は、基底膜の最上部に LN511 が分布し、それをエンタクチン、IV 型コラーゲン及びフィブロネクチンが強固に裏打ちしていることが推定された。今後の更なる詳細な解析が必要とされる。

2.1.2 細胞毒性試験に適したマトリックスの評価

ヒト ES 細胞を使用する前に、マウス ES 細胞由来胚様体から神経分化細胞の誘導能を調べた。神経系細胞の分化は、おおまかには外胚葉から外胚葉前駆細胞を經由して内皮前駆細胞から神経系細胞系列（神経前駆細胞及びグリア前駆細胞）へと分化する（図 13）。3 種の基底膜 rSN2 sBM（エンタクチン基底膜）、rLN10 sBM（LN511 基底膜）及びポリオルニチン-ラミニン（PL-O-LN、汎用マトリックス）の神経細胞の分化能を評価した。最初に神経細胞の分化の指標として、神経細胞に特異的に発現している細胞骨格タンパク質である MAP2 の抗体で免疫蛍光化学染色を施し、MAP2 陽性細胞の神経突起

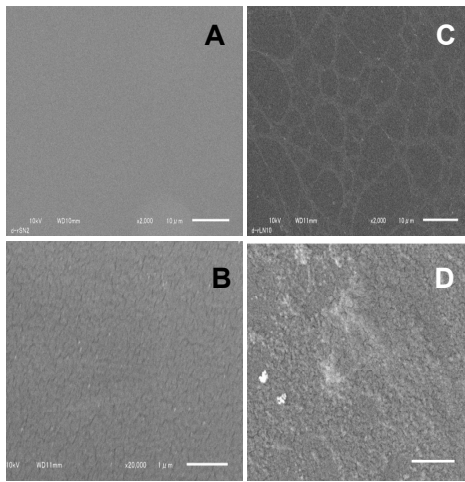


図10 rSN2 sBM (左)と rLN10 sBM (右)の構造比較:
走査型電子顕微鏡による解析
AとCが倍率2000倍、BとDが倍率20000倍

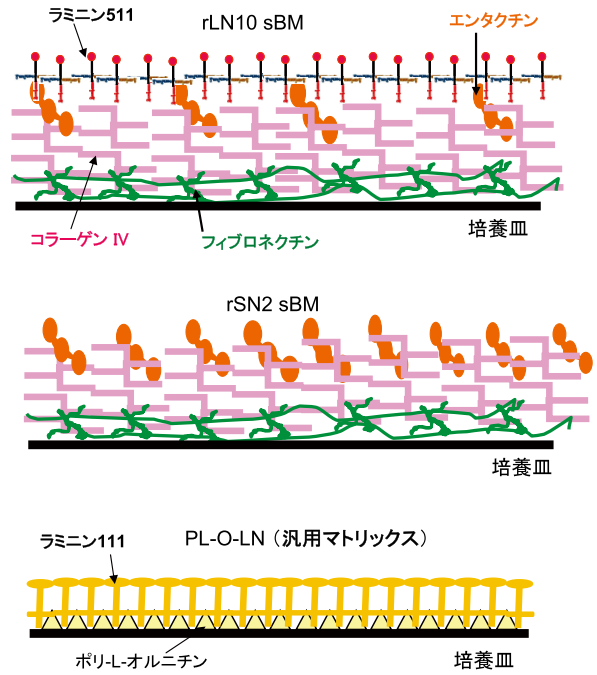


図12 rSN2 sBM (エンタクチン基底膜)、rLN10 sBM (ラミニン 511 基底膜) 及びポリオルニチン-ラミニン (PL-O-LN、汎用マトリックス) の比較:
解析結果からの予想模式図

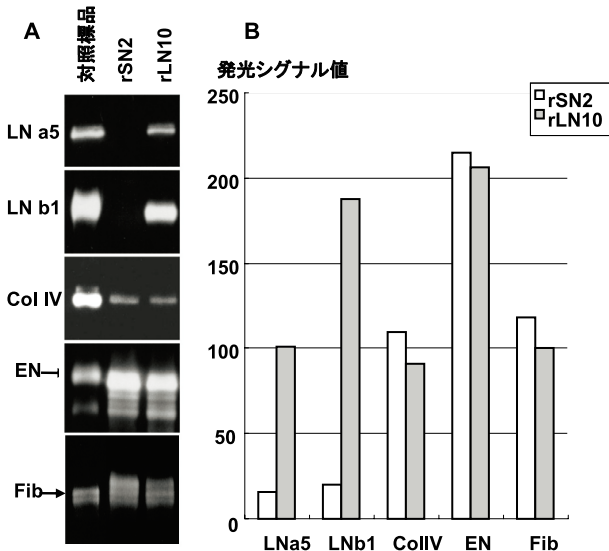


図11 rSN2 sBM (エンタクチン基底膜) と rLN10 sBM (ラミニン 511 基底膜) の比較: ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の比較
A: 電気泳動写真、B: 泳動バンドの定量
LNa5: ラミニン α 鎖5、LNb1: ラミニン β 鎖1、
ColIV: IV型コラーゲン、EN: エンタクチン、
Fib: フィブロネクチン

数、神経突起長、神経突起面積、神経分枝数、神経交差数の測定を行った (図14)。

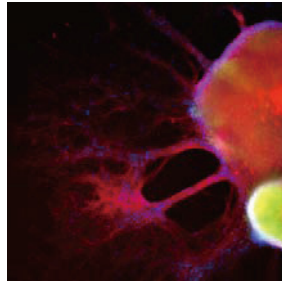
rSN2 sBM では対照群とした市販の PL-O-LN sBM と比較して、MAP2 陽性神経分岐数および MAP2 陽性神経突起交差数が有意に増加した。また、rLN10 sBM では、MAP2 陽性神経突起長、MAP2 陽性神経突起面積および MAP2 陽性神経突起交差数が顕著に増加した。以上の結果から、rLN10 sBM は、rSN2 sBM と比較してマウス胚様体から MAP2 陽性ニューロンの伸長を促進する作

用を持つことが示唆された (図15)。

同様に、グリア細胞に特異的に発現しているタンパク質である GFAP の抗体で免疫蛍光化学染色を施して GFAP の陽性細胞数や突起などを調べると、ポリオルニチン-ラミニンに比べ rSN2 sBM と rLN10 sBM 上で培養した細胞が、有意に発現を増加させていた。SN2 sBM では、rLN10 sBM と比較してマウス胚様体から分化する GFAP 陽性細胞の細胞質の分岐数、細胞質が交差する数が有意に増加した。その一方で、rLN10 sBM は、GFAP 陽性細胞の細胞質の伸長、細胞質の突起数を増大させていた (図16)。以上の結果から、rLN10 sBM はマウスの発生の初期の神経系において、MAP2 陽性ニューロンおよびグリア細胞の分化を促進する因子を備える事が考えられた。

次に、ヒト ES 細胞由来胚様体から神経分化細胞の誘導能を調べた。ヒト ES 細胞由来の胚様体から分化して形成された神経前駆細胞の塊であるニューロスフィアは、放射状に神経細胞を伸長していた。ポリオルニチン-ラミニン、および rSN2 sBM では、ヒト ES 細胞由来の胚様体から分化して形成された神経幹細胞の塊であるニューロスフィアそのものは維持され、また、

多重染色
(青:核、
赤:ニューロン、
緑:グリア)



蛍光顕微鏡を内臓
最大96穴プレートフォーマット



マルチチャンネル
自動画像解析装置
(IN Cell Analyzer 1000)

パラメーターの設定と自動化計算のためのアルゴリズム構築

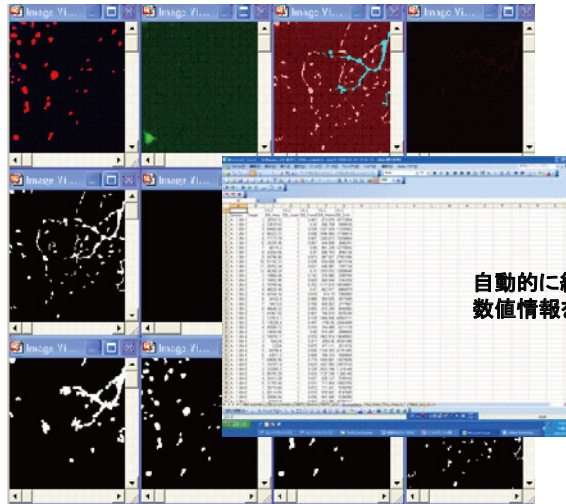
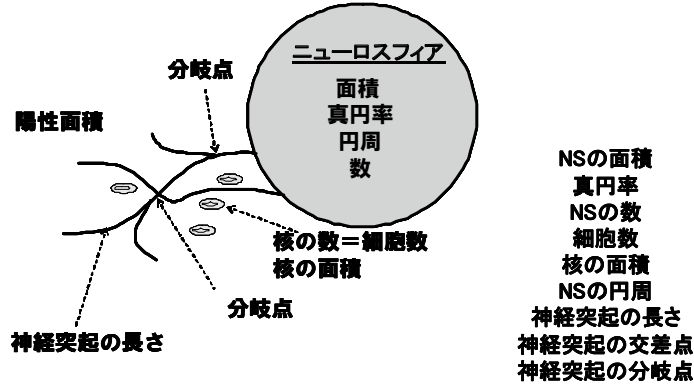


図 13 マウス胚様体から神経細胞への分化における rhLN10sBM の有用性の検討に関する方法の概略
胚様体を多重染色し、マルチチャンネル自動画像解析装置により蛍光シグナルを測定し、細胞ごとの形態計測を行う。得られたデータを定量的に解析する。

ニューロスフィアから放射状に MAP2 陽性細胞、および GFAP 陽性細胞の伸長が確認された。一方で、rLN10 sBM (LN511 基底膜) は、ニューロスフィアは崩れ、殆どの細胞は MAP 陽性細胞および GFAP 陽性細胞群として検出され、不規則に伸長する事が確認された。以上の事から、PL-O-LN および rSN2 sBM と比較して、rLN10 sBM は神経分化の成熟を促進する作用を持つことが示唆された (図 17)。マウス ES 細胞由来胚様体の場合と同様に、神経突起数、神経突起長、神経突起面積、神経分枝数、神経交差数を分化の指標として測定し

た結果、rLN10 sBM (LN511 基底膜) が、最も高かった。同様に、GFAP で調べると、rLN10 sBM が最も高かった。マウス ES 細胞由来胚様体の場合と異なり、rSN2 sBM (エンタクチン基底膜) は、ポリオルニチン-ラミニン (PL-O-LN, 汎用マトリックス) と同様のレベルであった。ニューロン突起中の微小管の構成蛋白の一つである neuronal class III β -Tubulin (Tuj1) は、未成熟神経細胞に特異的に発現している。微小管結合タンパク質である microtubule-associated protein 2 (MAP2) は、成長した神経細胞に発現している。Tuj1 の発現に

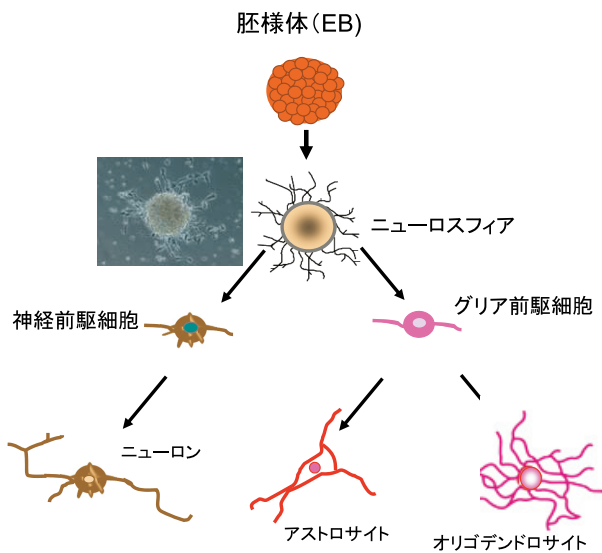


図14 胚様体からニューロスフィアを経て神経系細胞への分化過程の模式図

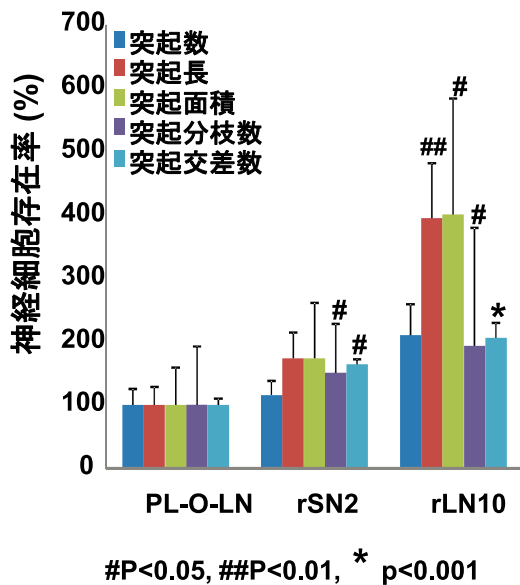


図15 マウス胚様体から神経細胞 (MAP2 陽性細胞) への分化における rLN10 sBM の有用性の検討

については、rSN2 sBM 上で培養した胚様体では Tuj1 陽性ニューロンの突起の長さや面積は rLN10 sBM および PL-O-LNN 基底膜と比較して有意に増加することが確認された (図 18A)。その一方で、MAP2 陽性ニューロンでは、ニューロンの長さや突起の数が増加する傾向にあった (図 18B)。また、GFAP 陽性細胞 (グリア) についても、rLN10 sBM 上で培養した胚様体から顕著にグリア細胞の細胞質の伸長、細胞質面積、細胞質突起の数を増加させる事が確認された (図 18C)。以上の結果からも、rLN10 sBM はヒト胚様体由来から神経系を誘導する際に、成熟神経への分化を促進する作用を備える事が示唆された。

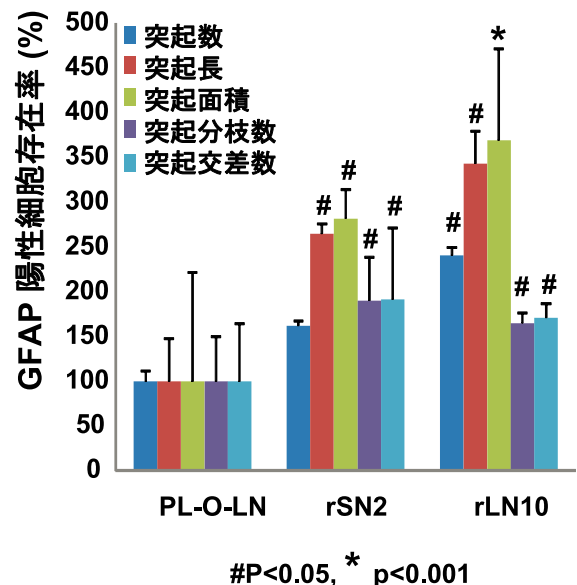


図16 マウス胚様体からグリア細胞 (GFAP 陽性細胞) への分化における rLN10 sBM の有用性の検討

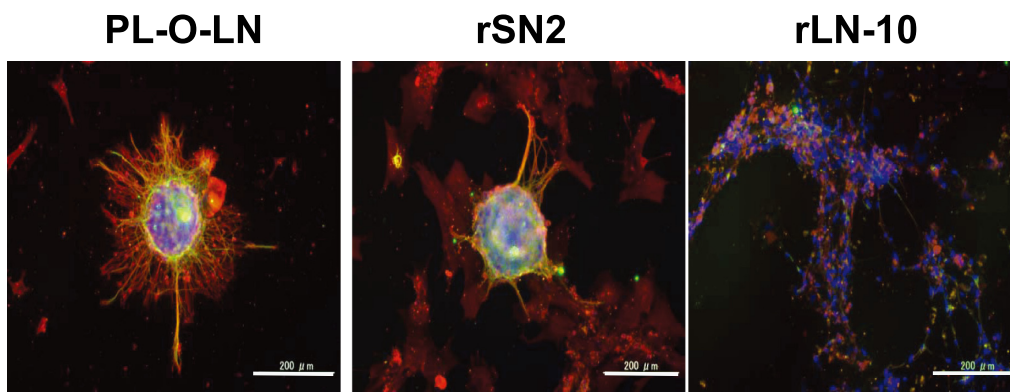
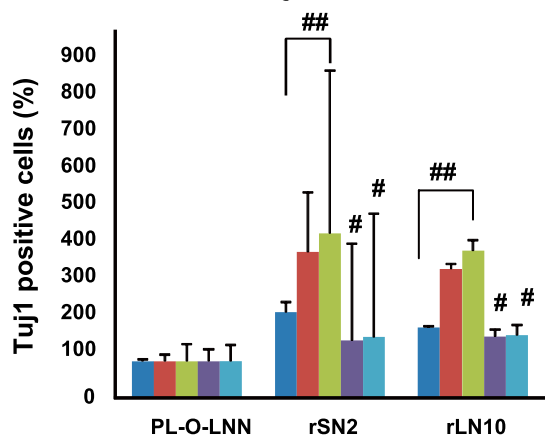
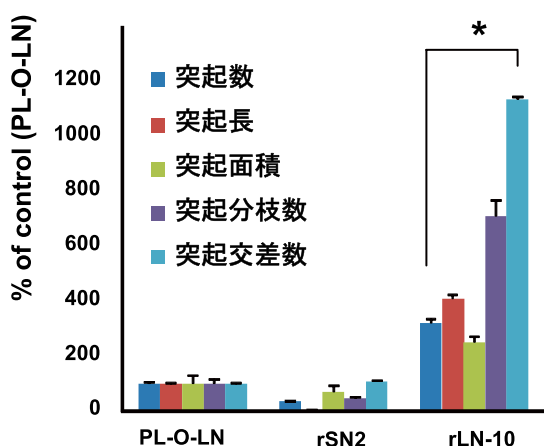


図17 各種マトリックス上で培養したヒト胚様体から神経細胞への分化における形態観察
PI-O-LN、rSN2、rLN10 の3種類 sBM 上の神経誘導。写真はいずれもヒト胚様体からの誘導で、神経マーカー MAP2 (緑)、グリア神経細胞マーカー (赤)、細胞核 (青)。

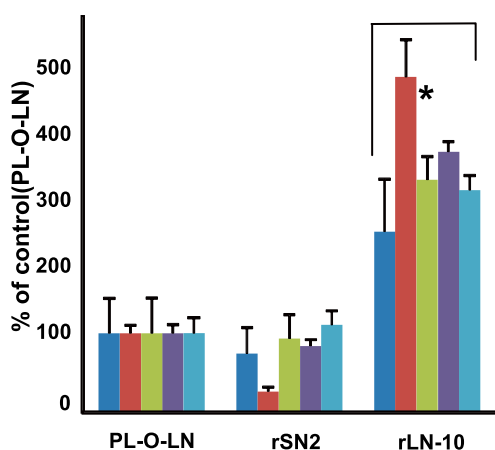
A 未熟成熟神経細胞(Tuj1陽性細胞)の変化



B 成熟神経細胞(MAP2陽性細胞)の変化



C グリア神経細胞(GFAP陽性細胞)の変化



#, P < 0.05; ##, P < 0.01; *, P < 0.001

図18 ヒト胚様体から神経系細胞への分化における rLN10 sBM の有用性の検討：神経系細胞形態の定量

2.2 血管内皮分化のマトリックス創製と評価に関する研究

環境化学物質においては、血管内皮細胞への影響を及ぼして循環器系疾患との関与が懸念される物質が比較的多い。最も代表的なものはディーゼルや排気ガスや NOx、SOx などのいわゆる大気汚染物質である。これらの細胞レベルでの影響を調べるツールのひとつとして血管内皮細胞を用いた細胞アッセイは有用であると考えられた。血管内皮細胞の分化は、おおまかには内胚葉から内胚葉前駆細胞を經由して内皮前駆細胞から内皮細胞へと分化する(図19)。その過程で特異的に発現するタンパク質も変化する。内皮細胞であることの確定には血管内皮細胞に発現する細胞間接着タンパク質 VE-cadherin (vascular endothelial cadherin)、Ig スーパーファミリーに属する細胞表面受容体 I 型膜貫通糖タンパク PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) のいずれかあるいはすべてが発現していることが証明となる。現在、血管内皮細胞を誘導させるために、様々な手法が試みられているが、細胞毒性試験に用いるためには、やはり神経分化の場合と同様に、大きさの揃った胚様体が必要である。そこで、本研究では、神経細胞分化のアッセイと同様に、ヒト ES 細胞から胚様体を經由して血管内皮細胞を分化誘導する実験系を組み立てた。そのために、EB 形成時の培養液、培養プレート、分化時期の培養液、培養プレート、誘導因子を検討し、最終的な標準手法の確立を目指した(図20)。基本的な分化培養のプロトコルでは、EB 播種から 24 時間後に EB はマトリックスに接着し、EB 周囲からは分化した細胞が広がった(EB 播種 4 日目)。播種から 8 日目には PECAM-1 (緑) に染まる血管内皮細胞がみられた(図20B)。

さらに解析を進めるため、まず、血管内皮誘導に適したマイクロスフェアアレイの検討を行った。誘導期間の短縮のためにも胚様体形成時に細胞を血管内皮前駆細胞へ分化促進させる必要があった。他の研究者らが使用している Hydrocell (セルシード)、Aggrewell (ベリタス)、マイクロスフェアアレイ(STEM バイオメソッド)、Nunc (U96 plate、ヌンク)、及び Aggrewell+ Hydrocell など計 5 種のデバイスを調べたが毒性試験に適した均一な胚様体形成には、丸底で底面が 300 μm 高さが 200 μm のものが最も効率良く、均一になることがわかった。以後、この 96 穴丸底プレートをを使用した。

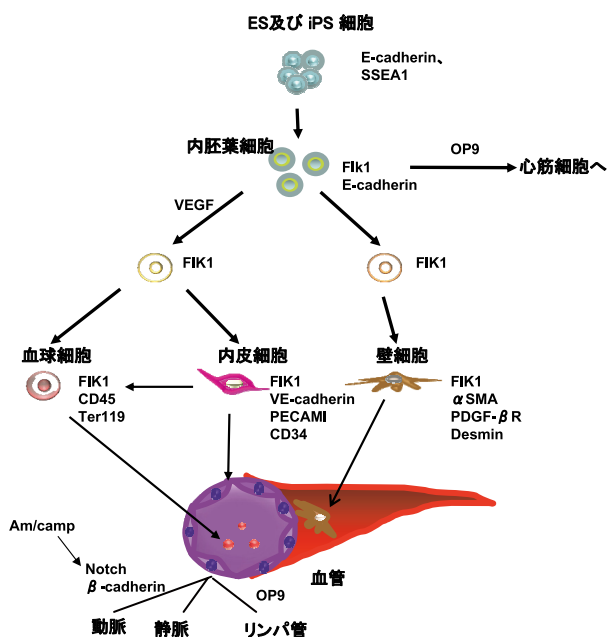


図 19 ES 細胞及び iPS 細胞から血管内皮細胞への分化過程の概略
英字シンボルは、各細胞で発現しているタンパク・遺伝子を示す。

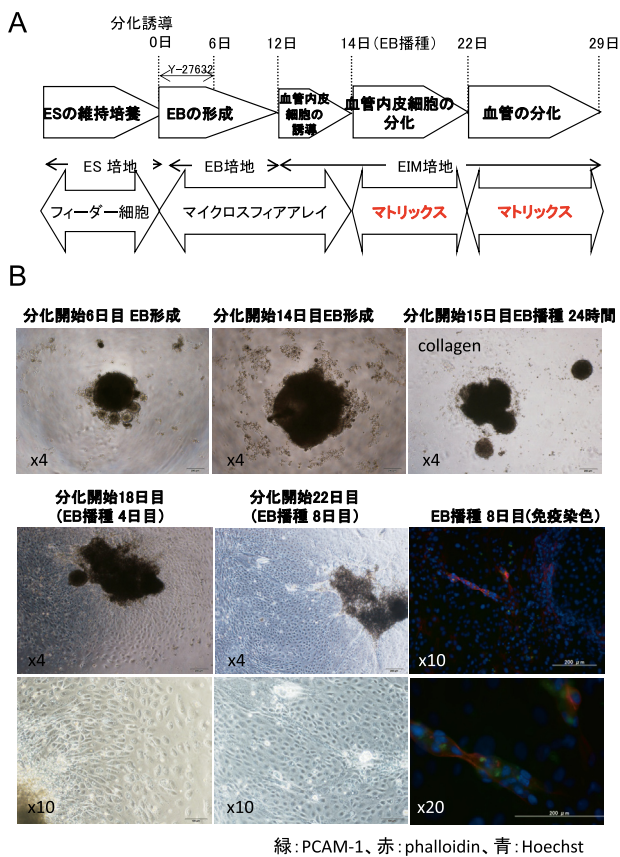


図 20 ヒト ES 細胞からの血管内皮細胞分化培養の実験手順と分化誘導の推移
本研究においては、赤字のマトリックス及び最適培地を検討した。

次に内皮細胞分化時期の誘導培地について検討した。実験に使用した培地は、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Life Technologies)、ヒト造血細胞用に調製された無血清培地 StemPro34 (Invitrogen/Life Technologies)、内皮細胞培地 EGM-2 (Lonza) の 3 種である。IMDM は、細胞があまり活発に増殖、分化せず、一方、内皮細胞分化時期に Stempro 及び EGM-2 で育った細胞は、分化した内皮細胞を VE-cadherin 抗体で染色すると良く染まり、管腔形成の始まりも認められた (図 21)。

さらに、成熟過程でのマトリックスを検討した。成熟過程前期においては、rLN10 では細胞数が増えているが、PECAM-1 陽性細胞はあまり見られなかった。ヒト不死化肝類洞内皮細胞株 TMNK-1 では PECAM-1 陽性細胞が多数みられた。すなわち、TMNK-1 由来 sBM のコート上で培養した細胞だけが PCAM-1 抗体に反応して蛍光緑色に染色され血管内皮細胞に分化していることがわかった (図 22)。

そこで、さらに本研究の課題であるマトリックスの創製のため基底膜基質成分をスクリーニングした。スクリーニングには、世界中で使用されているヒト胚性幹細胞 H9 から樹立された血管内皮前駆細胞 4SKEL 細胞を用いた。基底膜成分 3 種 (I 型コラーゲン、LN511、Laminin-411 (LN411))、細胞由来基底膜 (sBM) 9 種 (L190、内皮細胞、ヒト肺動脈血管内皮細胞 HPAEC、rSN8-2、LN10、ヒト包皮皮膚細胞 HFF、TMNK-1、ヒト HBMVEC、HUVEC) の計 12 種を調べた。細胞外マトリックスとしての有用性は、4SKEL20 細胞の増殖と集合形態を観察することによって評価した。その結果、I 型コラーゲン、LN511、LN411、LN10 sBM、TMNK-1 sBM が再現性良く増殖と細胞形態の変化を示した (図 23、24)。

さらに、どの基底膜成分がよいかを調べるため、血管内皮細胞を特異的に検出するマーカー抗体 VE-cadherin 抗体で免疫蛍光染色を施し、4SKEL 細胞を用いて確認実験を行った。確認実験には、管腔形成試験を用いた。前駆細胞は未分化のため、脳血管内皮細胞は、コラーゲンを培地に添加して細胞上に重層すると、細胞が遊走して管腔形成を引き起こす。この確認では、4SKEL 細胞の遊走終了前の細胞形態を観察した。その結果、TMNK-1 由来 sBM の主成分である LN411 では VE-cadherin 陽性細胞が比較的多くみられ、コラーゲンを

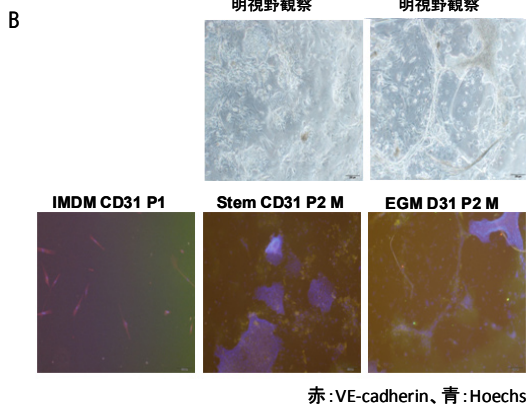
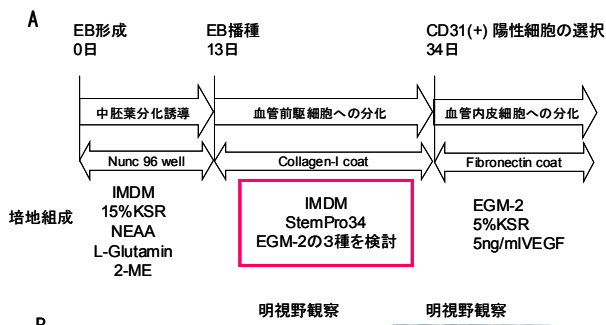


図 21 ヒト ES 細胞から血管内皮細胞への分化プロトコルの標準化-誘導因子の検討
A 実験手順の概要、検討した培地を記載 (赤枠)。
B 分化誘導の結果の組織写真

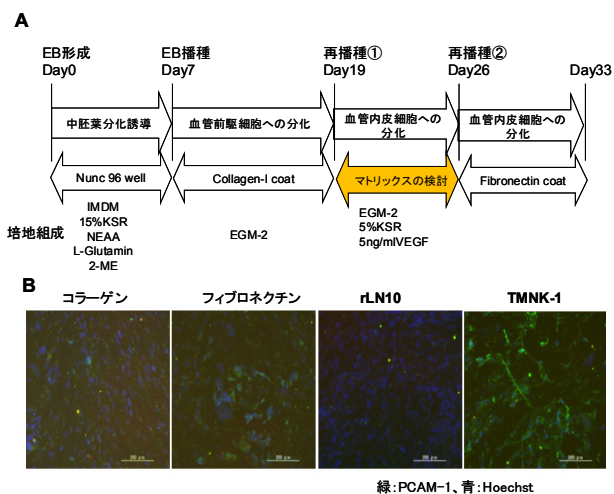


図 22 ヒト ES 細胞からの血管内皮細胞分化のためのマトリックス (基底膜) の検討
A 実験手順の概要
B 分化誘導の結果の組織写真

重層することでより一層分化が促進された。すなわち、LN411 上での培養は血管内皮への分化を亢進させることがわかった (図 25)。これらの実験条件を検討して、次項 (図 30) で示す培養条件で環境化学物質の細胞毒性試験を行った。

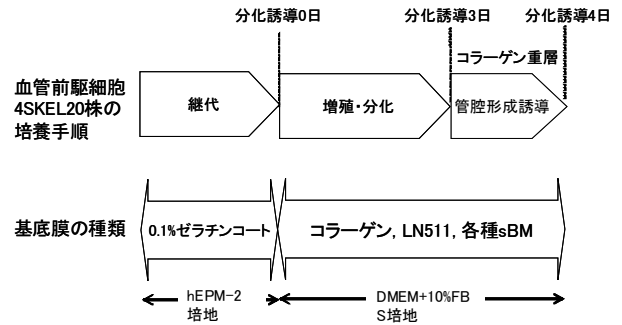


図 23 血管内皮分化のための創製マトリックスの評価: 種々のマトリックス上における血管前駆細胞の形態変化の検討

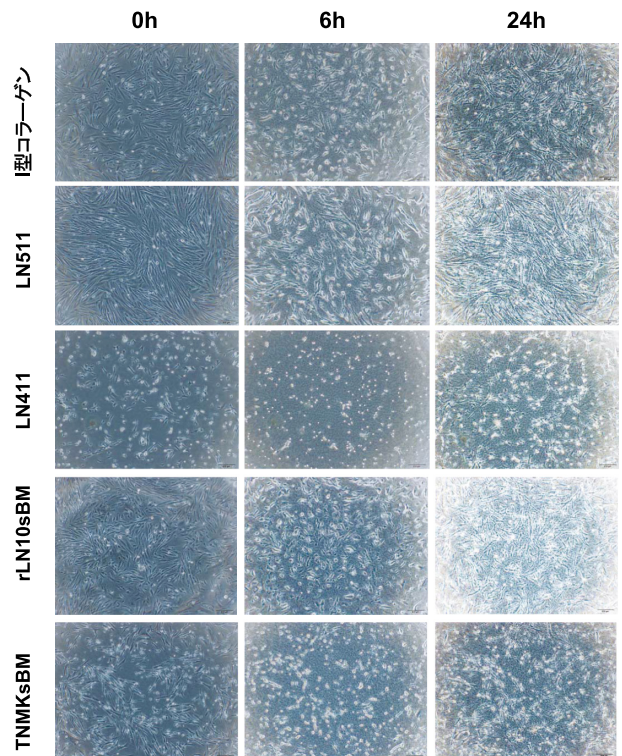


図 24 血管内皮分化のための創製マトリックス (基底膜) の評価: 血管前駆細胞 4SKEL20 における細胞形態変化の時間経過
0h は、Ⅰ型コラーゲン重層開始時点。

2.3 胚様体を用いた *in vitro* 発生毒性試験への適用の評価

2.3.1 環境化学物質の神経発生毒性影響評価

前項において、胚様体を用いた *in vitro* 発生毒性試験への適用の評価のために使用する細胞外マトリックスにはどのようなものが良いかを調べるとともに、細胞の培地、期間などの培養条件を調べた。その結果、神経細胞への分化系では、rLN10 の細胞外マトリックスとその主成分 LN511 が有用であることを明らかにした。しかしながら、現時点では、手工業的な作製に頼るため、化

学物質の評価のためのハイスループットな試験に用いるための大量かつ安定的な供給はできない。そこで、組成が類似している市販のマトリゲル（ベクトン・ディッキンソン製のBD マトリゲル）に rLN10 の主成分である LN511 を一定量混ぜて、基底膜マトリックスとした。マトリゲルは Engelbreth-Holm- Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出した可溶性液で細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む。主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドジェンであり、これに、TGF-β、上皮細胞増殖

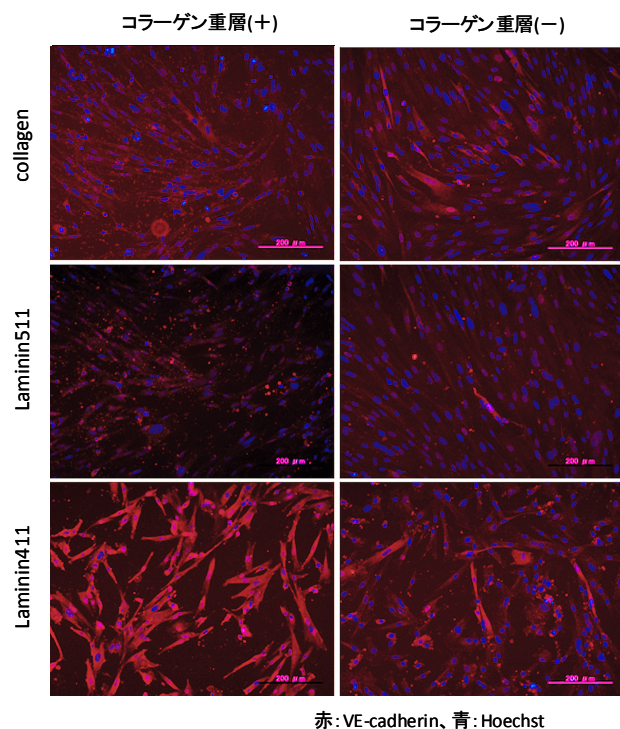


図 25 マトリックス成分コラーゲン重層における血管前駆細胞 4SKEL の血管内皮細胞の誘導に関する検討

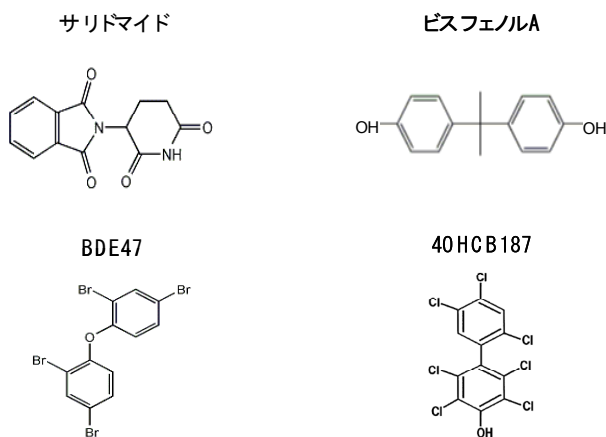


図 26 胚様体を用いた発生毒性試験に使用した化学物質の構造

因子、インシュリン様成長因子、線維芽細胞増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子などが含まれている。この基底膜マトリックスを用いて1ヶ月以内で終了するような神経発生影響アッセイを考案した。調べた化学物質は、陽性対照としてのサリドマイド (Thalidomide, 2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl) isoindole-1,3-dione)、ビスフェノール A (4,4'-Isopropylidenediphenol, 2-Bis(4-hydroxyphenyl) propane)、BDE47 (2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether)、および 4OHCB 187 (2,2',3,4',5,5',6-heptachloro-4-biphenylol) の4種である(図 26)。サリドマイドは、四肢の発達不全を主症状とする催奇形性薬剤として知られている。1999年には日本国内では約309名の「海豹肢症」の子供が生まれサリドマイドの危険性が明らかとなった。この薬害にもかかわらず近年では血管新生阻害作用を利用した多発性骨髄腫に対する抗がん剤として国内外で使用されている。また海外ではハンセン病の鎮痛剤、HIV ウイルスの増殖抑制剤などとしても使用されている功罪両面を併せ持つ臨床上の薬剤である。一方、重篤な催奇形性を示してはいないものの、母親が妊娠20~24日目に服用した場合に生まれた子供の一部は、頭外側部の異常と共に自閉症を併発している事が報告されている。ビスフェノール A は、内分泌かく乱化学物質であり、BDE47 は難燃剤、4OHCB 187 は PCB の主たる代謝物質であり、いずれも、疫学調査や動物実験から神経発達障害への関与が懸念されている環境化学物質である。

実験手順と化学物質の曝露の時期を図 27 に示した。胚様体形成時期に化学物質を曝露する利点は、96 穴の

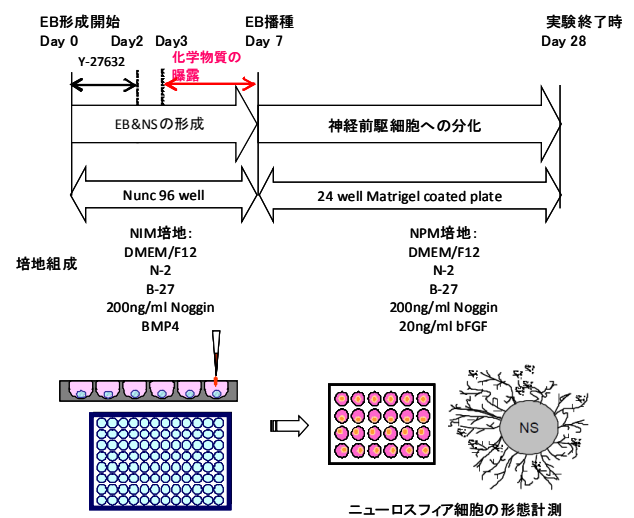


図 27 環境化学物質の神経発生毒性影響試験の実験手順

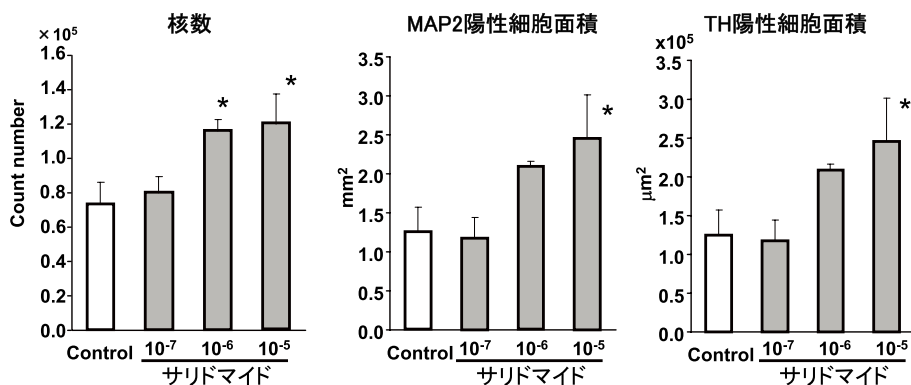


図 28 神経発生毒性影響試験の結果：サリドマイドによる神経細胞の形態指標の変化 Control からの有意差 *, $P < 0.05$ 。

丸底フラスコで均一な胚様体が形成される時期に曝露することで、再現性の高い結果が得られるからである。

サリドマイドを 10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度 (10^{-6} M は臨床用量の 400–800 mg/1 回投薬量に相当) になるように培養プレートに添加した。その結果、 10^{-6} M と 10^{-5} M では、有意に神経特異的マーカーである MPA2 陽性細胞が有意に上昇しており、正常とは異なる過剰な増殖が認められた (図 28)。このことは、妊娠中の飲酒による発達障害児の出産で問題となっているエタノールでもヒト ES 細胞由来の神経細胞の異常な増殖が認められたとする先行研究の結果と一致する。

加えて、BDE47 においても、曝露群で全体の細胞数の有意な増加やドーパミンニューロンを示す TH 陽性細胞の面積の有意な増加が認められた (図 29)。この結果は、BDE47 が神経分化に対して影響を及ぼすことを示唆した。しかし、ビスフェノール A や 4OHCB187 では、我々が用いた指標では有意な変化が認められなかった (図 29)。

2.3.2 環境化学物質の血管発生毒性影響評価

前述したように、血管内皮細胞への分化における細胞外マトリックスは、TMNK 細胞およびその主成分である LN411 が有用であると明らかになった。しかしながら、本研究課題における化学物質の評価アッセイに用いる細胞外マトリックスは、LN411 よりも分化誘導能がわずかに劣るが安価なため、I 型コラーゲンを使用した (図 30)。図 30 にアッセイ手順を示した。このプロトコルを用いて、血管内皮細胞への分化への影響を、内胚様が形成され、血管内皮前駆細胞が形成される時期に化学物質 (サリドマイド及びビスフェノール A) を曝露させ

ることで調べた。サリドマイドは、血管内皮の血管腔形成を阻害し、血管新生を阻害することが知られているので、分化阻害作用を期待して調べたが、神経の場合に反して影響は認められなかった。同様に、ビスフェノール A の曝露に関しても血管内皮細胞への分化には抑制影響が示されなかった (図 31)。むしろ、高濃度で、有意な細胞増殖能が認められた。ビスフェノール A は、乳腺や前立腺上皮細胞において細胞増殖能があることが知られているが、EB 形成から血管内皮細胞への分化時期においてもその細胞増殖能があることが今回の結果から解った (図 32)。

2.4 まとめと今後の課題

本研究では、ES 細胞から分化細胞を誘導する過程のなかで最初の段階で形成される胚様体を用いることで、神経細胞や血管内皮細胞へ有効に分化させるための細胞外マトリックスを開発することを主な目標とした。さらに、内分泌かく乱物質や残留性有機化学物質などの影響も調べ、細胞外マトリックスの開発中に得た分化細胞を用いた細胞アッセイも実施した。その結果、ヒト胚性幹細胞から形成された胚様体への化学物質の曝露はヒトの発生毒性のモデルとなることを示すことができた。この研究で得られた成果は、今後、環境化学物質の生体影響、特に胎児や新生児などの発達の初期段階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る。

今日、欧米諸国では、化学物質管理の観点から従来の健康リスクアセスメントとは異なる未来型の *in vitro* 毒性試験の確立に関するプロジェクトが実施されている。その中心にあるのが細胞培養を基盤としたバイオ

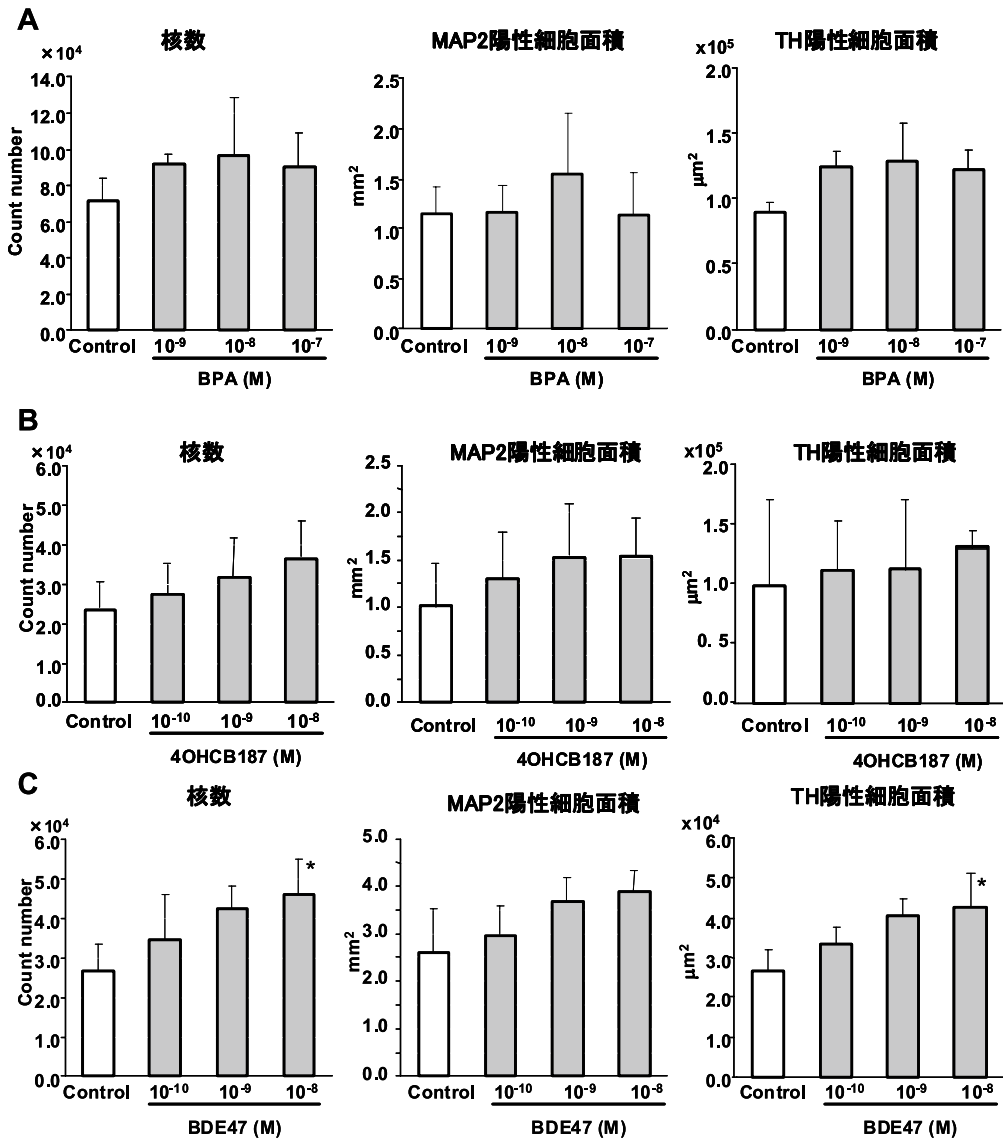


図 29 神経発生毒性影響試験の結果：環境化学物質の曝露による神経細胞の形態指標の変化
 A：ビスフェノール A (BPA)、B：水酸化 PCB (4OHCB187)、C：BDE47

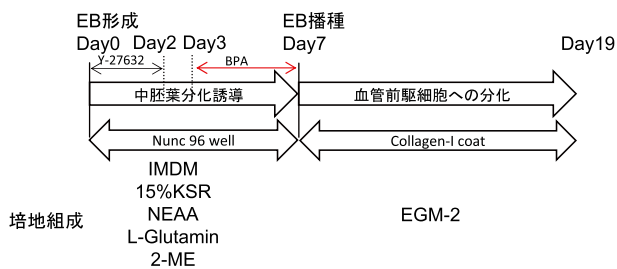


図 30 血管内皮細胞発生毒性影響試験の実験手順

アッセイである。これまでもいくつかのバイオアッセイが提示されてきたが、今後は、多様なバイオアッセイ系の組み合わせが必要かつ重要となると思われる。米国環境庁の EPA ではすでに TOXCAST というプロジェクトで実際の環境管理への導入と活用を試みている。

最新の Tox21 プロジェクト (EPA, National Institutes of Environmental Health Sciences/National Toxicology Program, National Institutes of Health and the Food and Drug Administration の合同プロジェクト) では 8193 種の化学物質について 8 種類の毒性をおおよそ 400 種以上の指標で調べる予定との報告がなされている。その中には、核内受容体の転写活性をルシフェラーゼ活性を指標として調べるアッセイやマウス ES 細胞を用いたアッセイが含まれているが、ヒト ES や iPS 細胞などを使用したアッセイはまだ含まれていない。本研究の成果を有効に活用するためには、今後、ヒト ES や iPS 細胞などの多能性細胞やヒト正常細胞を使用したアッセイを早期に実用化することが必要と考えられる (図 33)。実効性を持ったアッセイの確立のためには、以下の点が今後の課

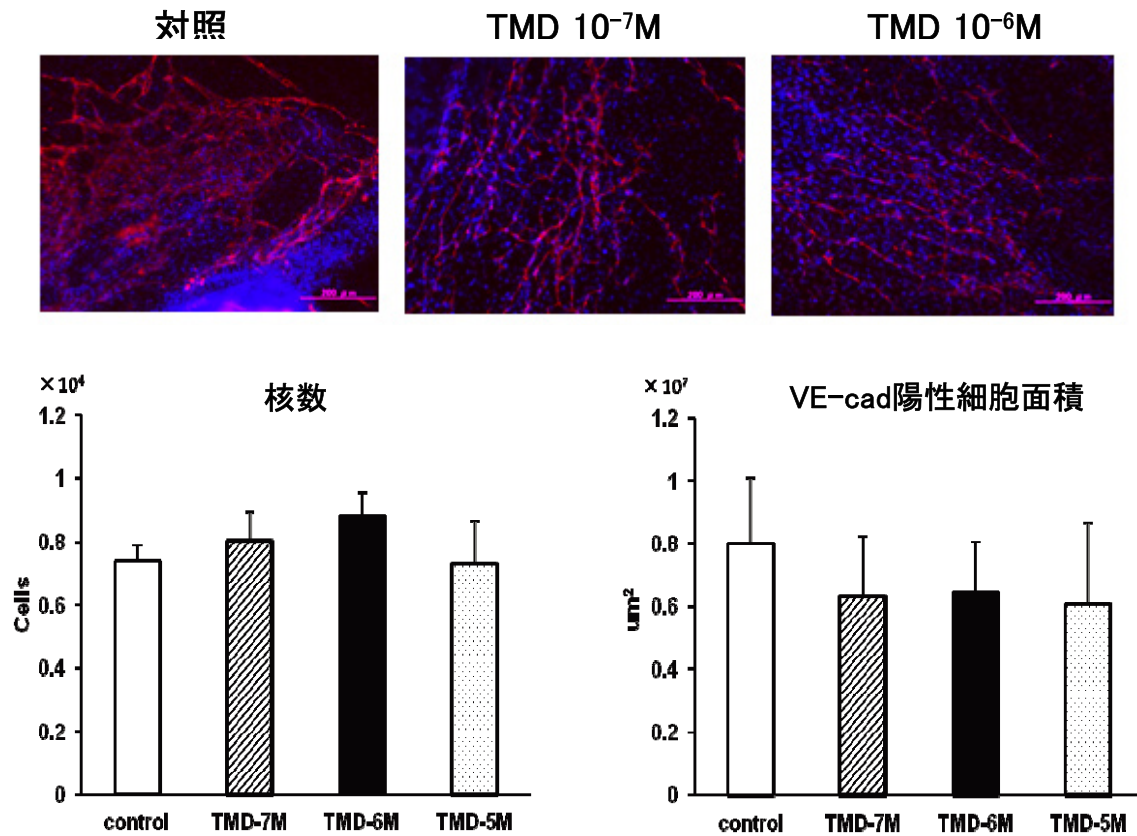


図 31 環境化学物質の血管発生毒性影響評価-サリドマイド (陽性コントロール) の事例
赤: VE-cadherin、青: ヘキスト核染色

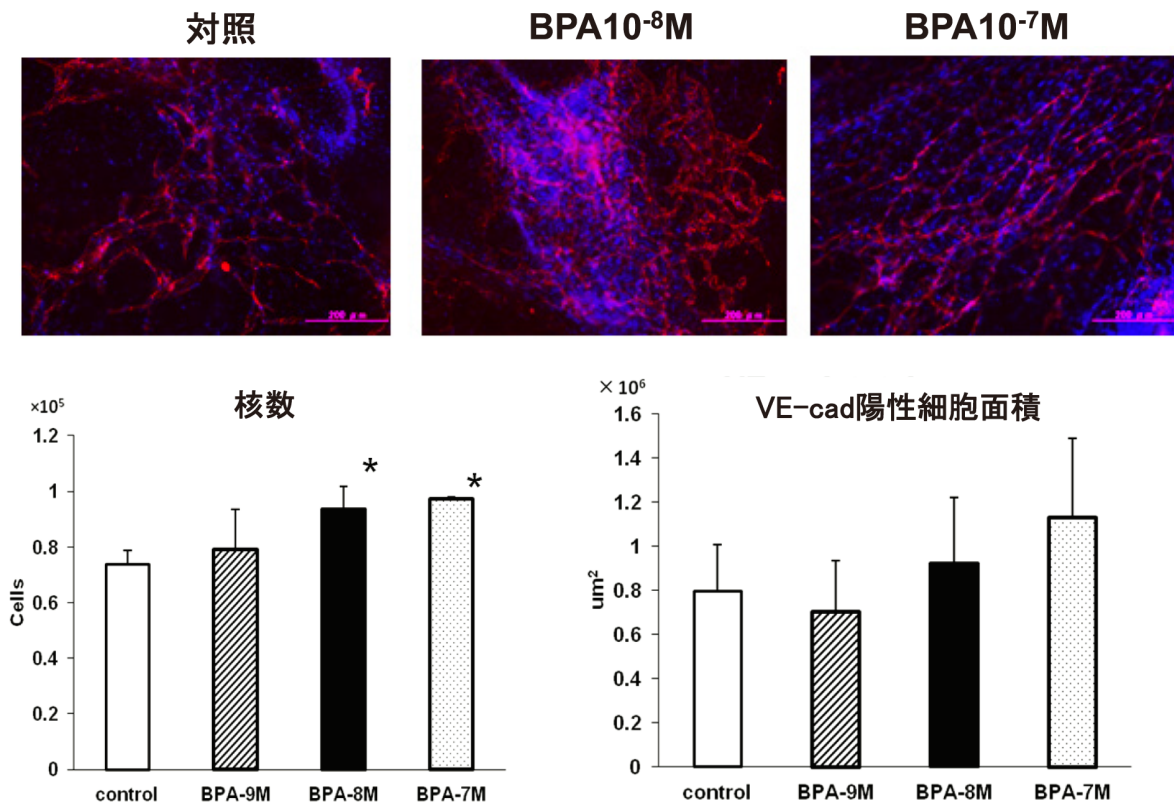


図 32 環境化学物質の血管発生毒性影響評価: BPA の事例
赤: VE-cadherin、青: ヘキスト核染色、*、 $P < 0.05$

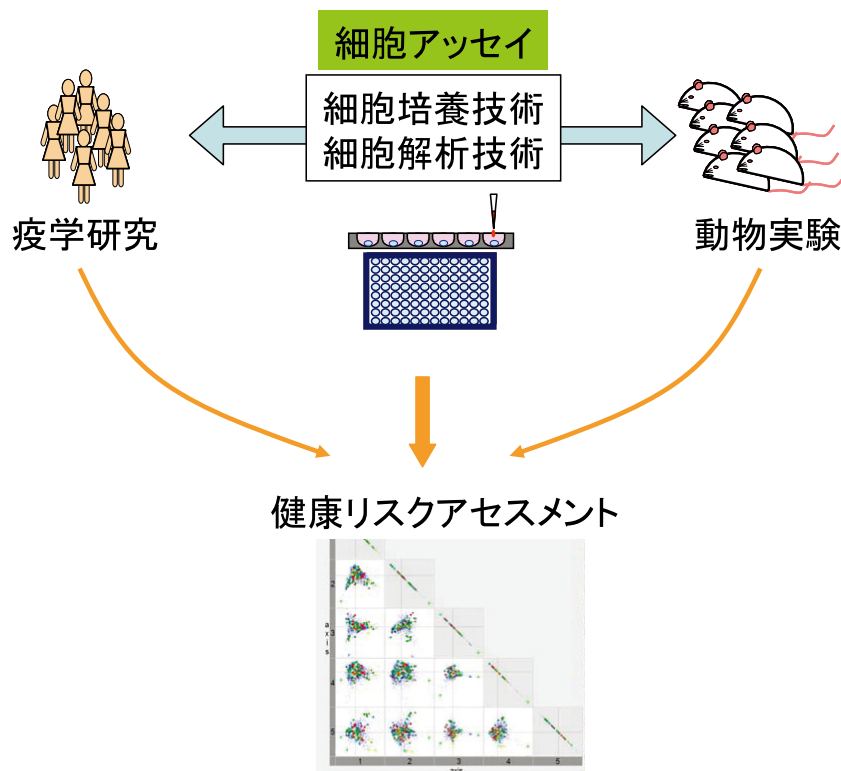


図 33 *in vitro* 細胞試験の将来構想：展望

迅速なヒトの健康リスク評価には、疫学と動物実験のギャップを埋めるブリッジングサイエンスが必要である。コンピュータサイエンス（情報・計算科学）とヒト細胞アッセイバッテリーによる新たな枠組み作りが求められる。そこには、細胞アッセイの基盤技術の技術革新が必要とされるが、本研究で検討した細胞外マトリックスはその中の中心技術の一つとなりうる。

題となる。

(1) 細胞外マトリックスの供給体制の確立

本特別研究で得られた成果を基にして、早期に細胞外マトリックスの規格化を行い、各種のプレートフォーマットに対応した製品化を行う。ヒト由来培養細胞を組み合わせて用いたバイオアッセイの供給体制を整える。

(2) バイオアッセイを導入した新たな環境健康管理システムの提案

他のユニットや他機関の研究者等と協働して、現時点で可能なバイオアッセイを実施し、新たな健康管理システムを導入する。バイオアッセイの限界が見えつつある現行の個別物質対応の管理システムでカバーできない部

分を補うものとして位置づけられる。

(3) バイオアッセイ指標と健康ハザードの相関スコア化

最終的な迅速な健康リスク評価のためには、バイオアッセイ指標のスコア化が必要となる。本アッセイは人間もしくは哺乳類動物の健康への影響が対象となるため、基軸となるエンドポイントに何を設定するかを議論する必要がある。

以上の検討により、未来型の環境健康管理システムが構築され、実施されることを期待する。莫大な数の化学物質の管理における健康リスクを迅速に評価するためには、やはり従来の毒性学、リスク科学にはとらわれない新たな発想と戦略が必要である。

[資料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境リスク研究センター

白石寛明

青木康展

健康リスク研究室

平野靖史郎

曾根秀子

黒河佳香

NIES ポスドクフェロー

永野麗子 (平成 21 年度)

准特別研究員

赤沼宏美

NIES リサーチアシスタントフェロー

秦センヨウ

高度技能専門員

座波ひろ子

高度技能専門員

曾 勤

アシスタントスタッフ

黄倉雅広

環境健康研究センター

新田裕史

高野裕久 (元)

持立克身 (平成 21 ~ 22 年度)

NIES ポスドクフェロー

中村宣篤 (平成 21 ~ 22 年度)

[B 客員研究員]

大迫誠一郎

(東京大学大学院)

(平成 21 年度 ~ 23 年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

- (1) 神経及び血管内皮分化のマトリックス創製に関する研究
持立克身、中村宣篤、曾 勤、永野麗子、曾根秀子
- (2) 神経及び血管内皮分化のマトリックス評価に関する研究
曾根秀子、赤沼宏美、曾 勤、永野麗子、秦センヨウ
- (3) 胚様体を用いた *in vitro* 発生毒性試験への適用に関する研究
曾根秀子、赤沼宏美、秦センヨウ、*大迫誠一郎

II 研究成果発表一覧

1 誌上发表

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

- Akanuma H., Qin X.Y., Nagano R., Tin-Tin Win-Shwe, Imanishi S., Zaha H., Yoshinaga J., Fukuda T., Ohsako S., Sone H. (2012) Identification of stage-specific gene expression signatures in response to retinoic acid during the neural differentiation of mouse embryonic stem cells, *Frontiers in Genetics original research article*, Volume 3, Article 141, 1-12
- Alam M.S., Ohsako S., Matsuwaki T., Zhu X.B., Tsunekawa N., Kanai Y., Sone H., Tohyama C., Kurohmaru M. (2010) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate, *Reproduction*, 139, 427-437
- Fujibuchi W., Kim H., Okada Y., Taniguchi T., Sone H. (2009) High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data, *Methods Mol. Biol.*, 577, 55-65
- Imanishi S., Okura M., Zaha H., Yamamoto T., Akanuma H., Nagano R., Shiraishi H., Fujimaki H., Sone H. (2011) Prenatal Exposure to Permethrin Influences Vascular Development of Fetal Brain and Adult Behavior in Mice Offspring, *Environmental Toxicology*, Article first published online: 24 AUG 2011, (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20758/abstract>) in press
- Mitsuhashi T., Yonemoto J., Sone H., Kosuge Y., Kosaki K., Takahashi T. (2010) In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Sep 14, 107(37), 16331-16335
- Nagano R., Akanuma H., Qin X.Y., Imanishi S., Toyoshiba H., Yoshinaga J., Ohsako S., Sone H. (2012) Multi-Parametric Profiling Network Based on Gene Expression and Phenotype Data: A Novel Approach to Developmental Neurotoxicity Testing, *Int. J. Mol. Sci.*, 13(1), 187-207
- Qin X.Y., Wei F.F., Yoshinaga J., Yonemoto J., Tanokuru M., Sone H. (2011) siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells, *FEBS Lett.*, 585(20), 3310-3315
- Qin X.Y., Zaha H., Nagano R., Yoshinaga J., Yonemoto J., Sone H. (2011) Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism, *Toxicol. Lett.*, 206(2), 152-157
- Qin X.Y., Fukuda T., Yang L., Zaha H., Akanuma H., Zeng Q., Yoshinaga J., Sone H. (2012) Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells, *Cancer Biol. Ther.*, 13, 296-306
- Qin X.Y., Kojima Y., Mizuno K., Ueoka K., Massart F., Spinelli C., Zaha H., Okura M., Yoshinaga J., Yonemoto J., Kohri K., Hayashi Y., Ogata T., Sone H. (2012) Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias, *J. Hum. Genet.*, 57, 434-441
- Qin X.Y., Kojima Y., Mizuno K., Ueoka K., Muroya K., Miyado M., Zaha H., Akanuma H., Qin Z., Fukuda T., Yoshinaga J., Yonemoto J., Kohri K., Hayashi Y., Fukami M., Ogata T., Sone H. (2012) Identification of Novel Low-Dose Bisphenol A Targets in Human Foreskin Fibroblast Cells Derived from Hypospadias Patients, *PLoS ONE*, 7(5), e36711, 1-9
- 曾根秀子 (2009) 核内受容体作動性化学物質の発がん・加齢などに及ぼす影響の分子メカニズムに関する研究, 井上達監修, 形態形成期・思春期などの高感受性期にある集団での核内受容体作動性化学物質等の有害性発現メカニズムの解明及びその評価手法にかかる総合研究—厚生労働科研費補助金(化学物質リスク研究事業), 41-43.
- Sone H., Akanuma H., Fukuda T. (2010) Oxygenomics in environmental stress, *Redox Rep.*, 15(3), 98-114
- Sone H., Fukuda T., Toyoshiba H., Yamanaka T., Perham F., Portier C. (2010) Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method, *The Open Cell Signaling Journal*, 2, 1-12
- Sone H., Okura M., Zaha H., Fujibuchi W., Taniguchi T., Akanuma H., Nagano R., Ohsako S., Yonemoto J. (2010) pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals, *J. Toxicol. Sci.*, 35(1), 115-123

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

Xiaoming He, Imanishi S., Sone H., Nagano R., Qin X.Y., Yoshinaga J., Akanuma H., Yamane J., Fujibuchi W., Ohsako S., (2012) Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells, *Toxicology Letters*, 212(1), 1-10

[書籍]

発表者・(刊年)・題目・編著者名・書名・出版社・頁

Sone H., Imanishi S., Nagano R., Akanuma H., Fukuda T., Ohsako S. (2009) Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders, In: *Biophys.Soc.China (BSC)ed., The Roles of Free radicals in Biology and Medicine*, Medimond S.r.l., 45-52

Sone H., Akanuma H. (2011) Oxidative stress-mediated signaling pathways by environmental stressors, In *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular aspects of cell signaling*, Farooqui T., Farooqui A.A. eds, Wiley-Blackwell, 13:175-195

Sone H., Win-Shwe T.T., Qin X.Y. (2012) Environmental Chemical Substances in Relation to Neurodevelopmental Disorders: A Systematic Literature Review, *Learning Disabilities*, 16:313-342.

持立克身, 古山昭子, 白木伸明 (2012) 基底膜基質を用いた組織構築と化学合成マトリックスによる簡素化, 岩田博夫, 松岡厚子, 岸田晶夫監修, 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, シーエムシー出版, 209p

- Akanuma H., Nagano R., Imanishi S., Toyoshiba H., Sone H. (2009) Stage-Specific Gene profiling during neural differentiation of mouse embryonic stem cells, 48th Annu.Meet.Soc.Toxicol., Abstracts, 1843
- Akanuma H., Nagano R., Sone H., Koikegami S. (2009) Exploring gene expression signatures related to stage-specific gene profiling neural differentiation of mouse embryonic stem cells, 21st Cent.Adv.Mol.Toxicol.EnvIRON.Chem.Pathog. Dis., Abstracts, 169
- 赤沼宏美, 永野麗子, 曾根秀子, 大迫誠一郎, 今西哲 (2009) マウス ES 細胞における水酸化 PCB187 及び BDE47 の神経系及び血管系分化への影響に関する研究, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 12 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 116
- Akanuma H., Nagano R., Toyoshiba H., Koikegami S., Ohsako S., Sone H. (2010) Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks, Chem-Bio Informatics(CBI)2010, Abstracts, 131
- Akanuma H., Nagano R., Toyoshiba H., Koikegami S., Ohsako S., Sone H. (2010) Multi-profiling analysis of Chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks, Comput.Biol.Res.Cent.Workshop 2010, Abstracts, 74
- 赤沼宏美, 永野麗子, 座波ひろ子, 大迫誠一郎, 曾根秀子 (2010) 胎生プログラミング異常を検出するためのマルチプロファイリング技術の確立, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 13 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 37
- Akanuma H., Sone H., Okura M., Zaha H., Fujibuchi W., Taniguchi T. (2010) Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and toxicity information by using O-PLS CBRC2010
- Akanuma H., Zaha H., Okura M., Kanda K., Fujibuchi W., Taniguchi T., Sone H. (2010) Bayesian network analysis of chemical toxicities for health risk assessments, InCOB2010(9th Int.Conf.Bioinformatics), Abstracts, 39
- 赤沼宏美, 永野麗子, 秦咸陽, 今西哲, 大迫誠一郎, 曾根秀子 (2011) ヒト ES 細胞由来神経前駆細胞からの神経成熟分化に対するサリドマイド曝露影響評価, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 82
- 何小明, 永野麗子, 赤沼宏美, 座波ひろ子, 遠山千春, 曾根秀子, 大迫誠一郎 (2010) マウス ES 細胞を用いた神経分化系におけるメチル水銀の毒性影響評価, 第 37 回日本トキシコロジー学会
- Higuchi Y., Shiraki N., Zeng Q., Mochitate K., Yamane K., Kume K., Kume S. (2009) Novel differentiation procedures of the mouse ES or iPS cells into pancreatic cell lineages, ISSCR 2010 Annu.Meet., Abstracts, 64
- Imanishi S., Akanuma H., Okura M., Shiraishi H., Fujimaki H., Sone H. (2009) Prenatal exposure to permethrin causes vascular malformations in the fetal brain and decreases motility of adult mice, 48th Annu.Meet.Soc.Toxicol., Abstracts, 2121
- Miyazaki W., Nagano R., Sone H., Tohyama C., Ohsako S. (2009) Effects of dioxin and OH-PCB on neural differentiation from mouse ES cells, Horiba/CDBIM Symposium
- Miyazaki W., Nagano R., Sone H., Tohyama C., Ohsako S. (2009) Effects of dioxin and OH-PCB on neural differentiation from mouse ES cells, DIOXIN2009
- Nagano R., Akanuma H., Koikegami S., Imanishi S., Miyazaki W., Okura M., Zaha H., Ohsako S., Sone H. (2009) Development of an image profiling system to evaluate for the effects of chemicals in neural differentiation from mES cells, 第 32 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2009), 同講演要旨集, 182
- Nagano R., Akanuma H., Koikegami S., Imanishi S., Miyazaki W., Okura M., Zaha H., Ohsako S., Sone H. (2009) Development of an image profiling system to evaluate for the effects of Thalidomide and permethrin in neural differentiation from mouse embryonic stem (ES) cells, Horiba/CDBIM Symposium, Abstract 182
- Nagano R., Akanuma H., Koikegami S., Imanishi T., Miyazaki W., Okura M., Zaha H., Ohsako S., Sone H. (2009) Development of an image profiling system to evaluate for the effects of thalidomide and permethrin in neural differentiation from mouse embryonic stem(ES) cells, 21st Cent.Adv.Mol.Toxicol.EnvIRON.Chem.Pathog.Dis., Abstracts, 169

永野麗子, 小池上繁, 今西哲, 赤沼宏美, 宮崎航, 大迫誠一郎, 座波ひろ子, 黄倉雅広, 曾根秀子 (2009) マウス ES 細胞を用いた神経形成におけるサリドマイドとペルメトリンの影響評価, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 12 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 115

永野麗子, 何小明, 横山雅美, 赤沼宏美, 座波ひろ子, 末盛博文, 大迫誠一郎, 曾根秀子 (2010) マウスおよびヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究, 第 37 回日本トキシコロジー学会

仲峰宏政, 赤沼宏美, 今西哲, 秦咸陽, 曾勤, 大迫誠一郎, 鍛冶利幸, 曾根秀子 (2011) 胚性幹細胞から分化する血管内皮及び神経細胞に及ぼす難燃剤 BDE47 の影響, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 126

大迫誠一郎, 永野麗子, 何小明, 今西哲, 藤渕航, 赤沼宏美, 曾根秀子 (2010) マウスおよびヒト ES 細胞を用いた神経分化培養系におけるメチル水銀の毒性影響評価, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 13 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 39

Qin X.Y., Zaha H., Nagano R., Yonemoto J., Sone H., Yoshinaga J. (2009) Estrogenic activities of endocrine-disrupting chemicals and their effects on male genital disorders related genes expression, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 12 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 180

Qin X.Y., Zaha H., Yoshinaga J., Yonemoto J., Sone H. (2009) Association of AHR-and ES1-responsive gene variations with susceptibility to endocrine-disrupting chemicals in risk of male genital disorders, 29th Int.Symp.Halogenat. Persistent Org.Pollut.-DIOXIN 2009, Organohalogen Compd, 71, 372-376

秦咸陽, 座波ひろ子, 永野麗子, 吉永淳, 米元純三, 曾根秀子 (2010) 男児生殖疾患感受性遺伝子 ARNT2 とエストロゲン様内分泌かく乱物質との関連, 第 80 回日本衛生学会学術総会, 日衛誌, 65 (2), 265

秦咸陽, 小島祥敬, 水野健太郎, 上岡克彦, 吉永淳, 米元純三, 林祐太郎, 群健二郎, 緒方勤, 曾根秀子 (2011) 尿道下裂男児の皮膚細胞を用いた環境内分泌かく乱化学物質の目的遺伝子の解明, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 139

Qin X.Y. (2012) The potential role of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 in molecular responses to xenoestrogens in human breast cancer cells, The Society of Toxicology's 51st Annual Meeting & ToxExpo, The Toxicologist, Proceeding, 426

Shiraki N., Zeng Q., Mochitate K., Higuchi Y., Umeda K., Kume K., Kume S. (2009) Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro, ISSCR 2010 Annu. Meet., Abstracts, 65

曾根秀子 (2009) 発達期曝露を模倣したモデル細胞系による小児神経発達疾患発症メカニズムの研究, 第 17 回生殖・発生毒性学東京セミナー, プログラム

Sone H., Fukuda T., Yang L. (2009) BPA は、p53 を介して発がん物質に対する HMEC 細胞の感受性を上昇する, 第 68 回日本癌学会学術総会, プログラム, 54

Sone H., Imanishi S., Okura M., Zaha H., Shiraiishi H., Fujimaki H. (2009) Prenatal exposure to permethrin inhibits brain development via disruption of vascular development in mice, CCT Meet.PPTOXII: Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, Abstracts

曾根秀子, 黄倉雅広, 座波ひろ子, 赤沼宏美, 永野麗子, 米元純三 (2009) 化学物質の生体影響に関する類型化システムを用いた毒性予測に関する研究, 第 53 回日本薬学会関東支部会, 同予稿集, 85

曾根秀子, 黄倉雅広, 座波ひろ子 (2009) 化学物質の毒性予測及びリスク評価手法確立のための基盤システムの構築, 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, プログラム

Sone H., Okura M., Zaha H., Nagano R., Akanuma H., Yonemoto J. (2009) Construction of the basic system to establish an approach for risk evaluation and toxicity prediction of chemicals using informatics, 第 18 回環境化学討論会, 同講演要旨集

Sone H., Yang L., Fukuda T., Akanuma H., Nagano R., Zaha H. (2009) The effect of low dose BPA on cell proliferation and senescence in human mammary epithelial cells, 21st Cent.Adv.Mol.Toxicol.Environ.Chem.Pathog.Dis, Abstracts, 170

Sone H., Akanuma H., Okura M., Zaha H., Fujibuchi W., Taniguchi T., Nagano R., Ohsako S. (2010) Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks, CBI2010

曾根秀子, 永野麗子, 赤沼宏美, 座波ひろ子, 大迫誠一郎 (2010) ヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 13 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 38

曾根秀子 (2011) 薬効と毒性研究の新しい潮流, 第 319 回 CBI 学会研究講演会

曾根秀子 (2011) LCE ラットの肝発がん: 環境ストレスのインディケーター, 北海道実験動物研究会・日本実験動物技術者協会北海道支部合同学術集会 2011

曾根秀子, 赤沼宏美 (2011) ヒト ES 細胞における神経分化フェノタイプネットワーク解析, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム予稿集, 204

曾根秀子, 赤沼宏美, 黄倉雅広, 座波ひろ子, 今西哲, 藤巻秀和, 白石寛明 (2011) ヘルメトリンの胎児期曝露による脳血管系への影響に関する研究, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 120

曾根秀子, 赤沼宏美, 黒河佳香, 南齋ひろ子, 山崎将嗣, 平野靖史郎 (2012) PAMAM デンドリマーのヒト ES 由来胚様体及び神経系分化細胞への分子送達に関する研究, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会

曾根秀子, 黒河佳香, 山崎将嗣, 平野靖史郎 (2012) ヒト細胞におけるナノサイズ PAMAM デンドリマーの光学的観察と細胞内挙動, 第 39 回日本毒性学会学術年会

Sone H., Nagano R., Akanuma H., Tanigichi T., Imanishi S., Fujibuchi W., Osako S. (2012) Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: a novel approach to developmental neurotoxicity testing, 第 6 回アジア毒性学会学術集会 (ASIATOX-VI)

米元純三, 河原純子, 曾根秀子, 服部達也, 松村徹, 大矢幸弘, 洲鎌盛一 (2011) 保存臍帯中 OH-PCB 濃度と 2 歳児の体重、軽度発達障害との関係, 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会, 同研究発表会要旨集, 140

Yonemoto J., Kawahara J., Sone H., Hattori T., Matsumura T., Ohya Y., Sugama S. (2011) Prenatal exposure to OH-PCBs in relation to body weight and neurodevelopment, 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abstract of 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 73, 1211-1214

NIES RESEARCH PROJECT REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所研究プロジェクト報告
SR - 102 - 2012

平成 24 年 12 月 28 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 株式会社 イ セ ブ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

December 2012

無断転載を禁じます

リサイクル適性の表示：紙へリサイクル可
本冊子は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料 [A ランク] のみを用いて作製しています。