

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

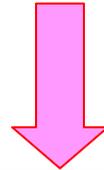
曾根秀子
国立環境研究所
環境リスク研究センター
(一部抜粋)

平成21年10月2日

提案のポイント(背景及び目的・目標)

背景及び目的

- 1) 曝露・有害性情報の不足が指摘されている。
- 2) ヒト胚性幹(ES)細胞及び正常ヒト細胞の利用
「胎生プログラミング」に着目したヒト健康影響(初期曝露による晩発影響)に焦点をあてた検出系を確立。
- 3) 動物実験からのヒトへの外挿
不確実性の問題の解決、次世代への影響の解明
化学物質の影響評価手法の開発

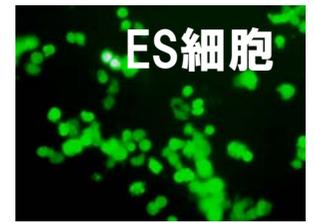


目標

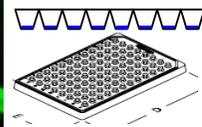
胎生期など感受性の高い時期における化学物質の曝露とその晩発影響を検出する
新しいヒト健康影響評価システムの基盤の作成

研究開発の実施方法

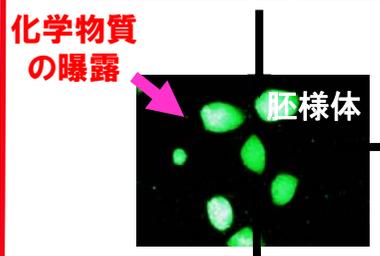
サブテーマ1:細胞工学を用いた胎生プログラミング異常を検出するモデル細胞系の確立



ES細胞



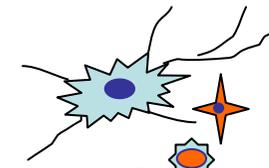
多穴プレートで培養



化学物質の曝露

胚様体

分化
(細胞の発達、成長)



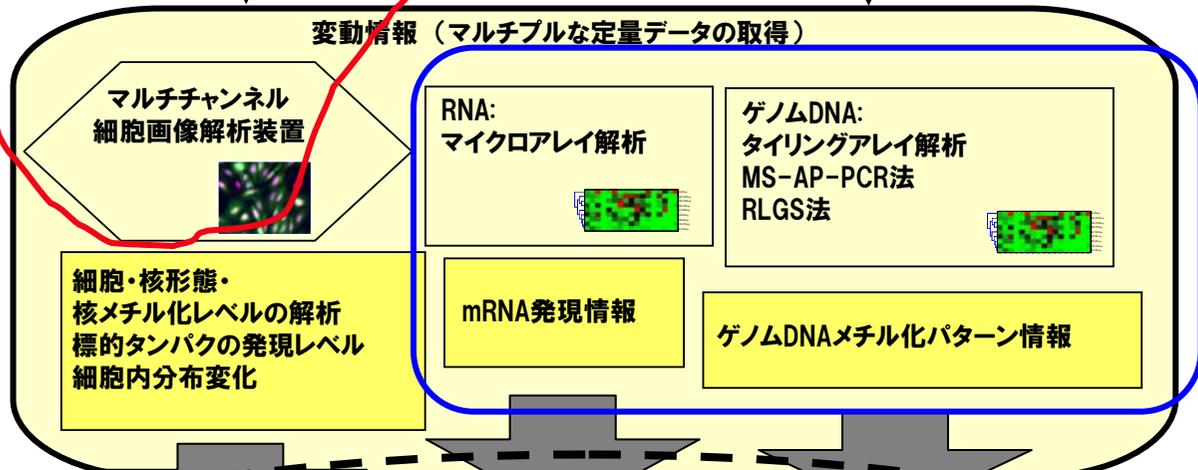
神経系細胞
血管内皮系細胞

曝露後の晩発影響

影響評価技術

胎生プログラミング異常を検出するモデル細胞系の確立と細胞形態、遺伝子発現、メチル化状態の検出技術の確立に関する研究

サブテーマ2:マルチプロファイリングのための遺伝子発現・メチル化ステータスの検出に関する研究



解析技術

数理工学的手法による多元情報のマルチプロファイリング化に関する技術の開発研究

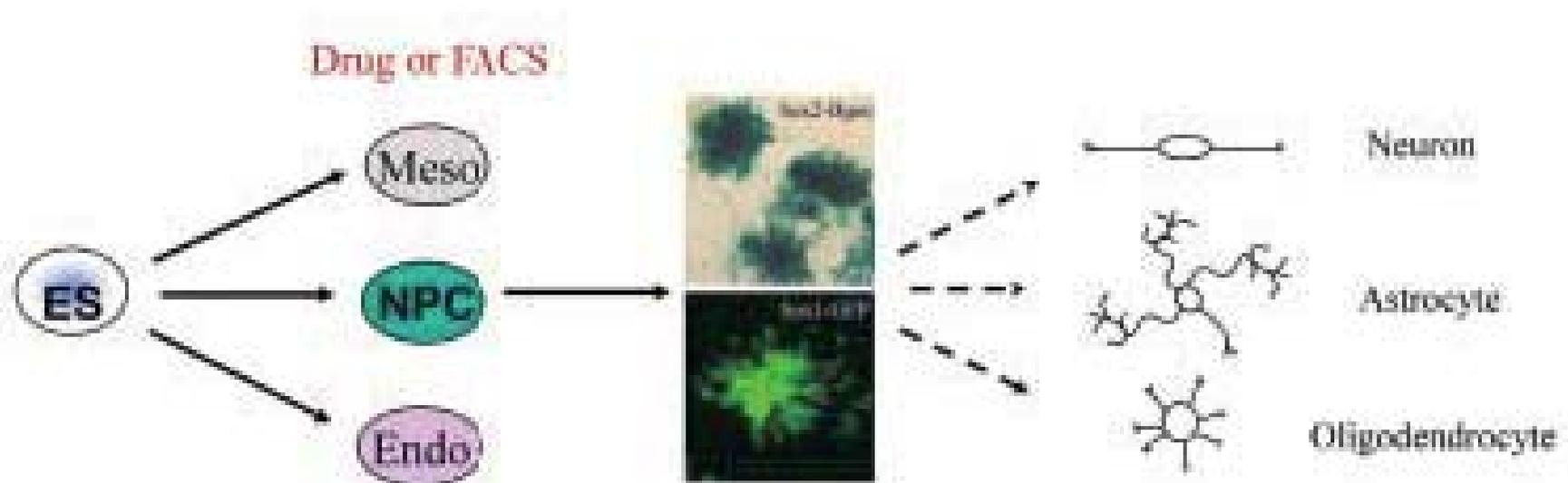
サブテーマ3:数理工学を用いた表現型情報からのマルチプロファイリングに関する研究



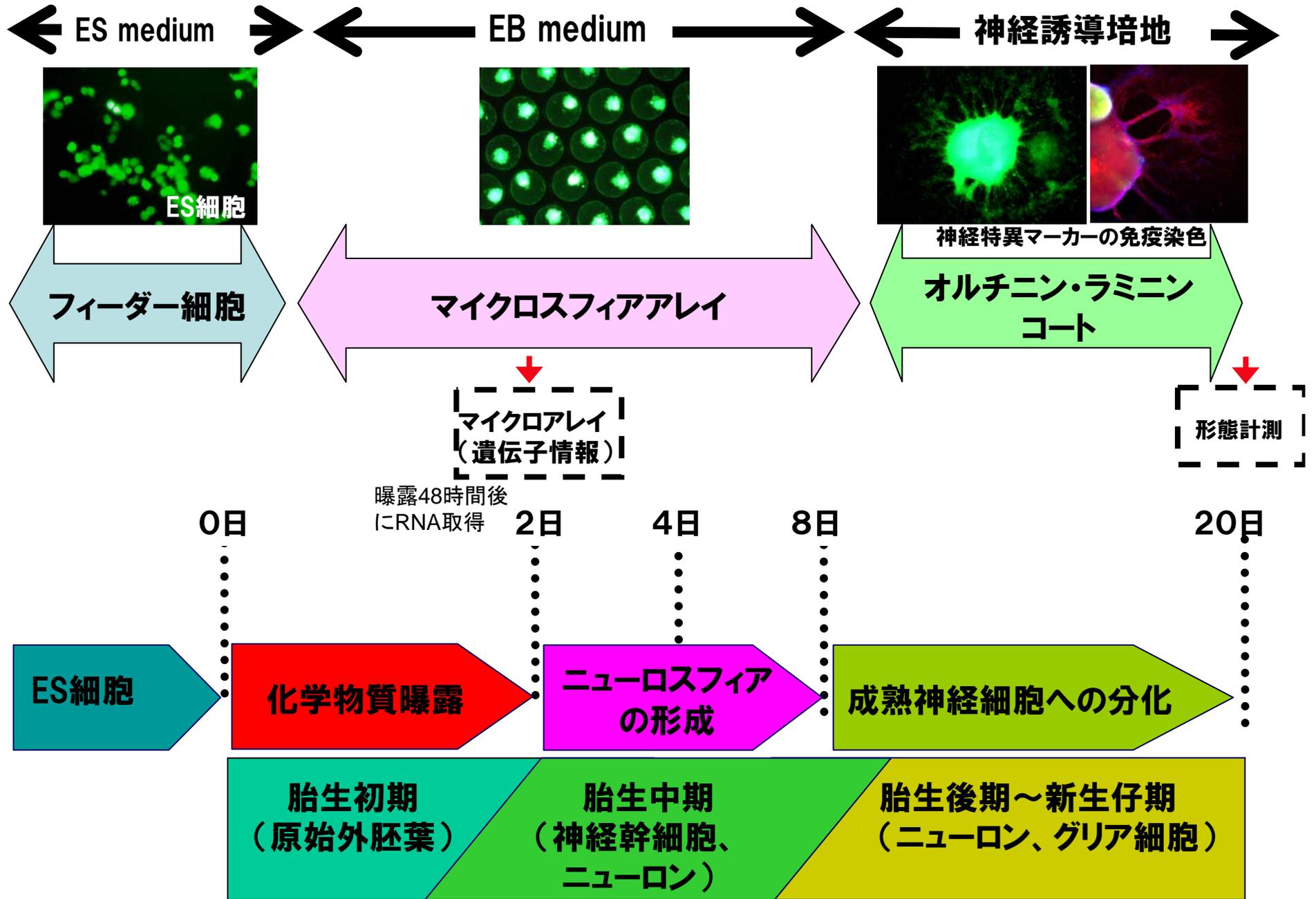
発達期曝露を模倣したモデル細胞系による小児神経発達疾患発症メカニズムの研究

1. マウスESから神経系細胞への分化
2. マウスESから血管内皮細胞への分化
3. 影響予測システムへの応用

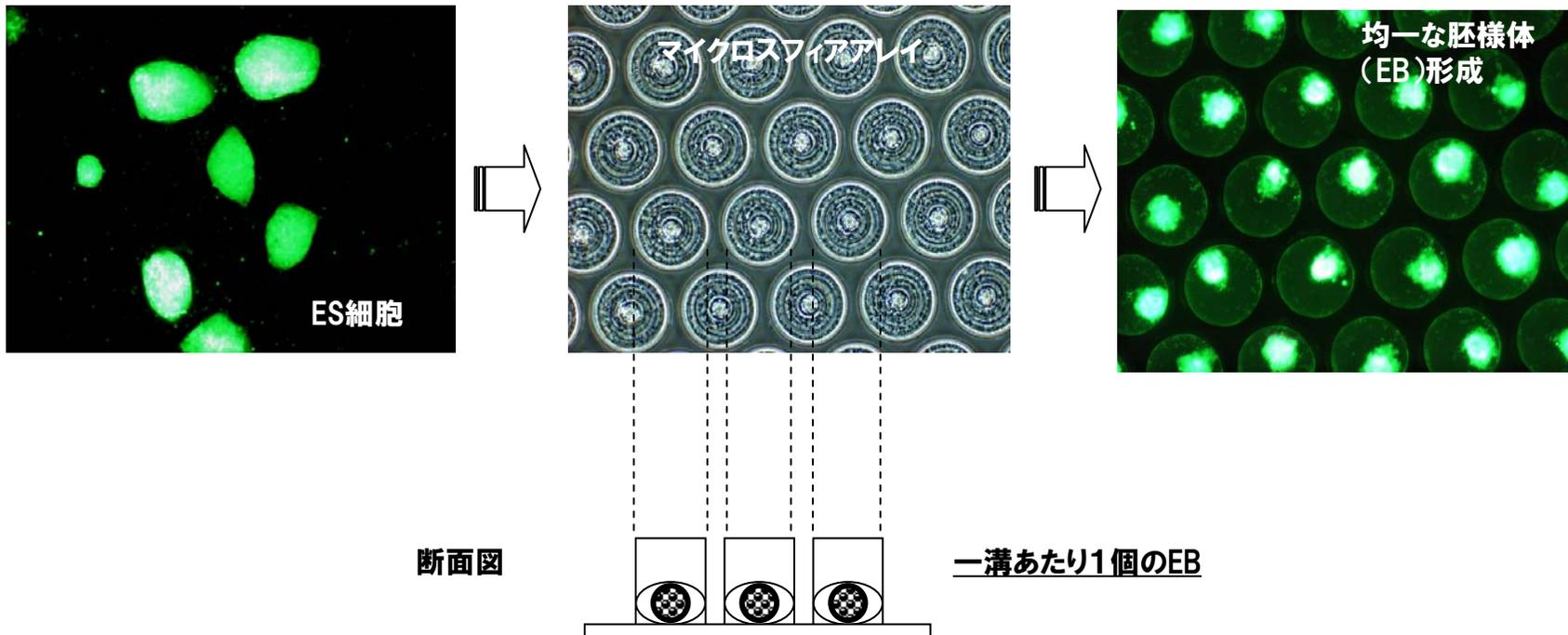
1. マウスESから神経系細胞への分化



標準プロトコル

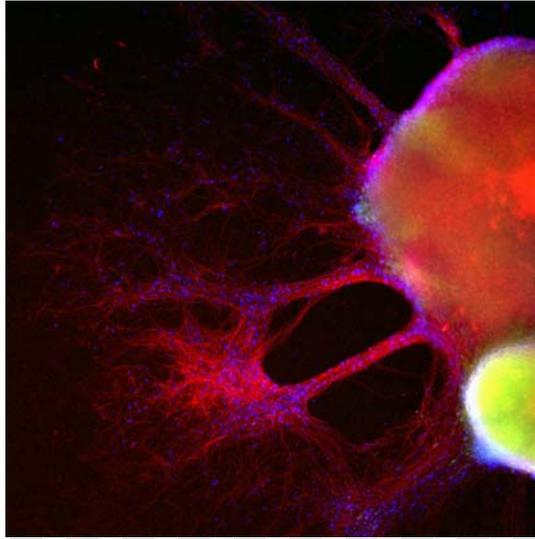


均一な微細構造体 マイクロスフィアアレイを用いたEBの形成



多重染色

緑:GFP; 青:核Hoechst

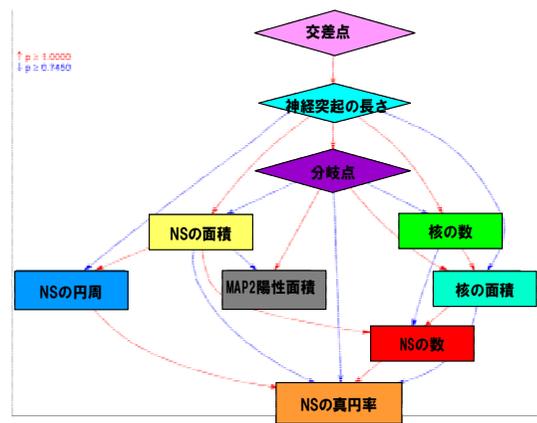


神経に特異的なマーカー
MAP2 (脳神経由来ニューロン)
GFAP (グリア)

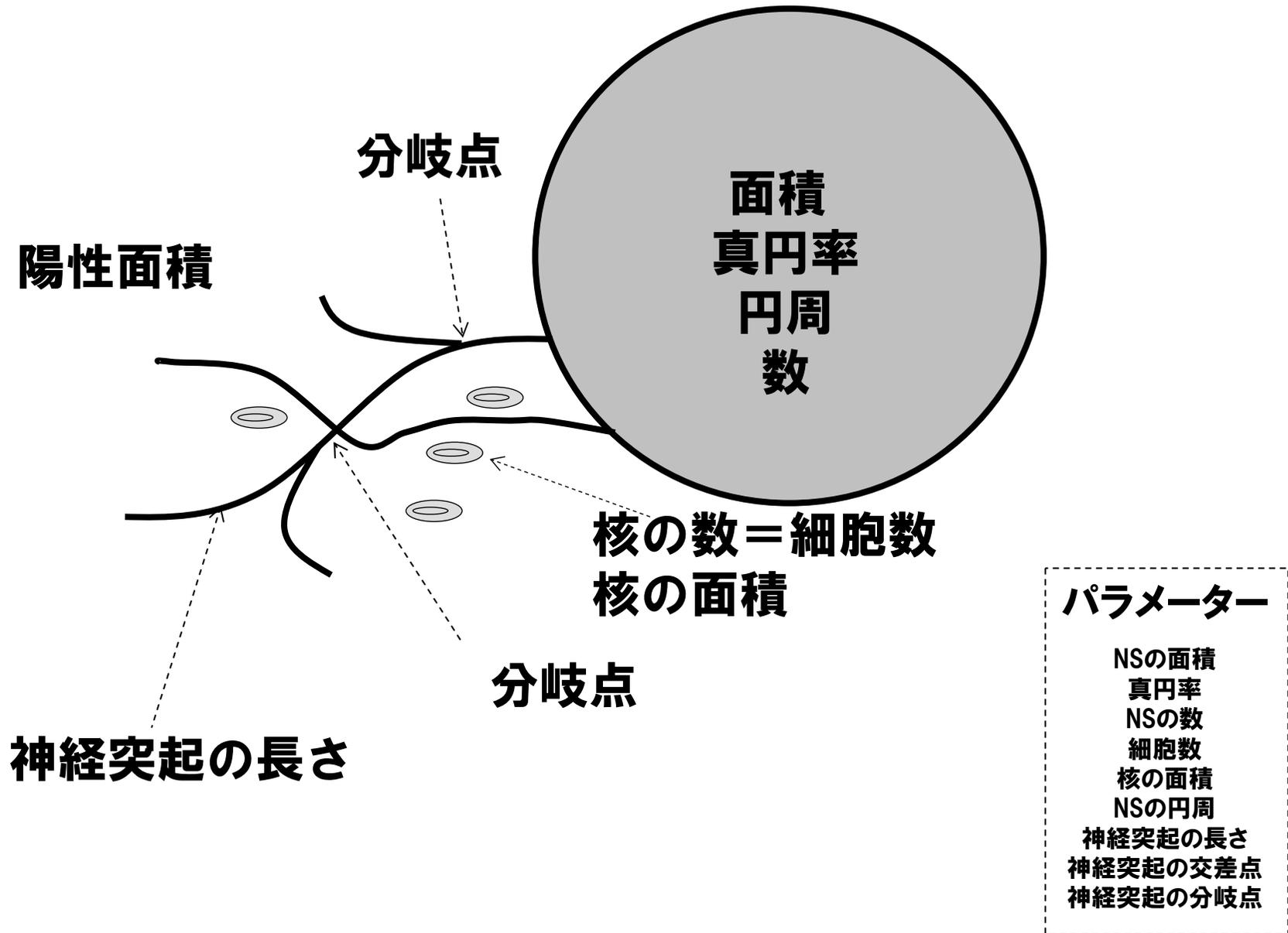


マルチチャンネル
画像解析装置
(IN Cell Analyzer
1000)

Developer
Tool Boxで
大量の細胞の
数値情報を取得

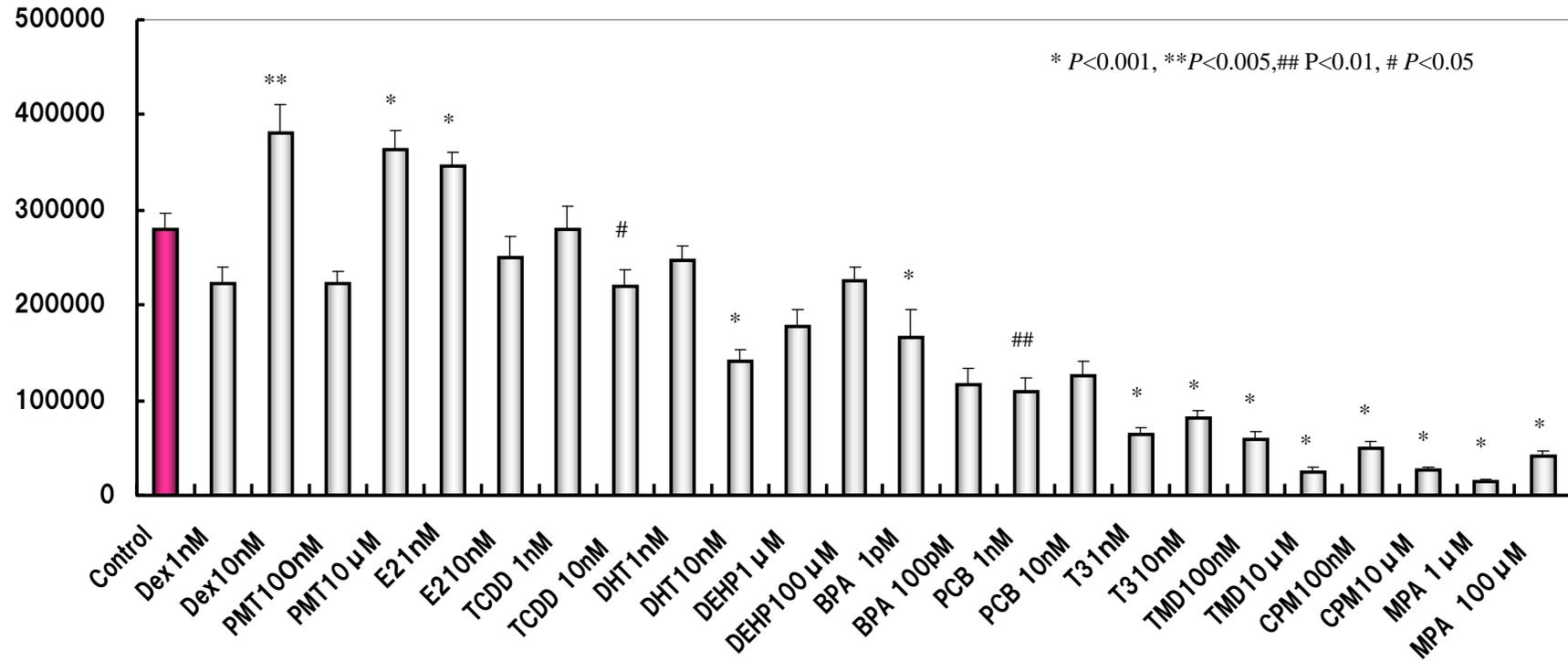


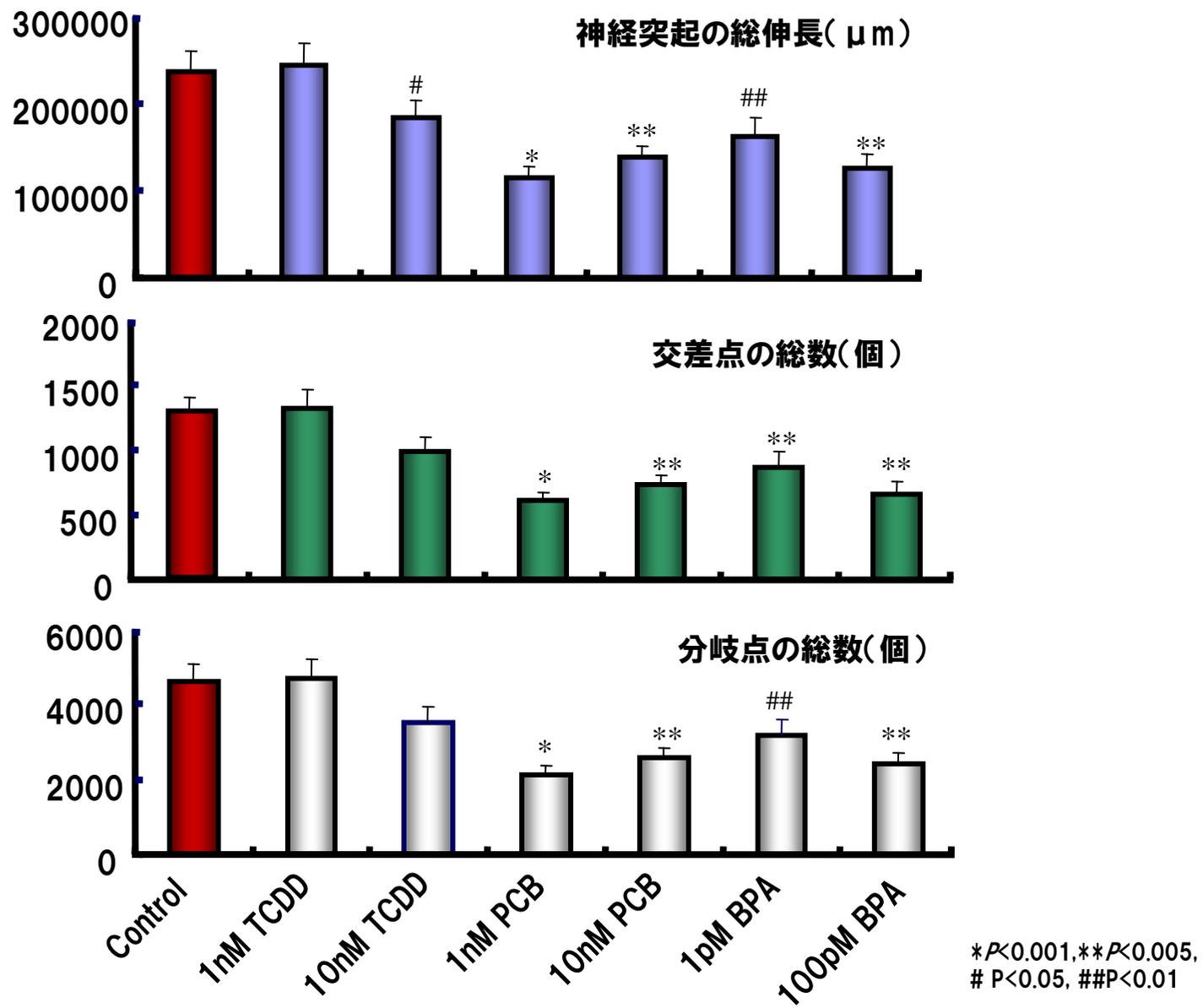
最適なパラメーターの決定



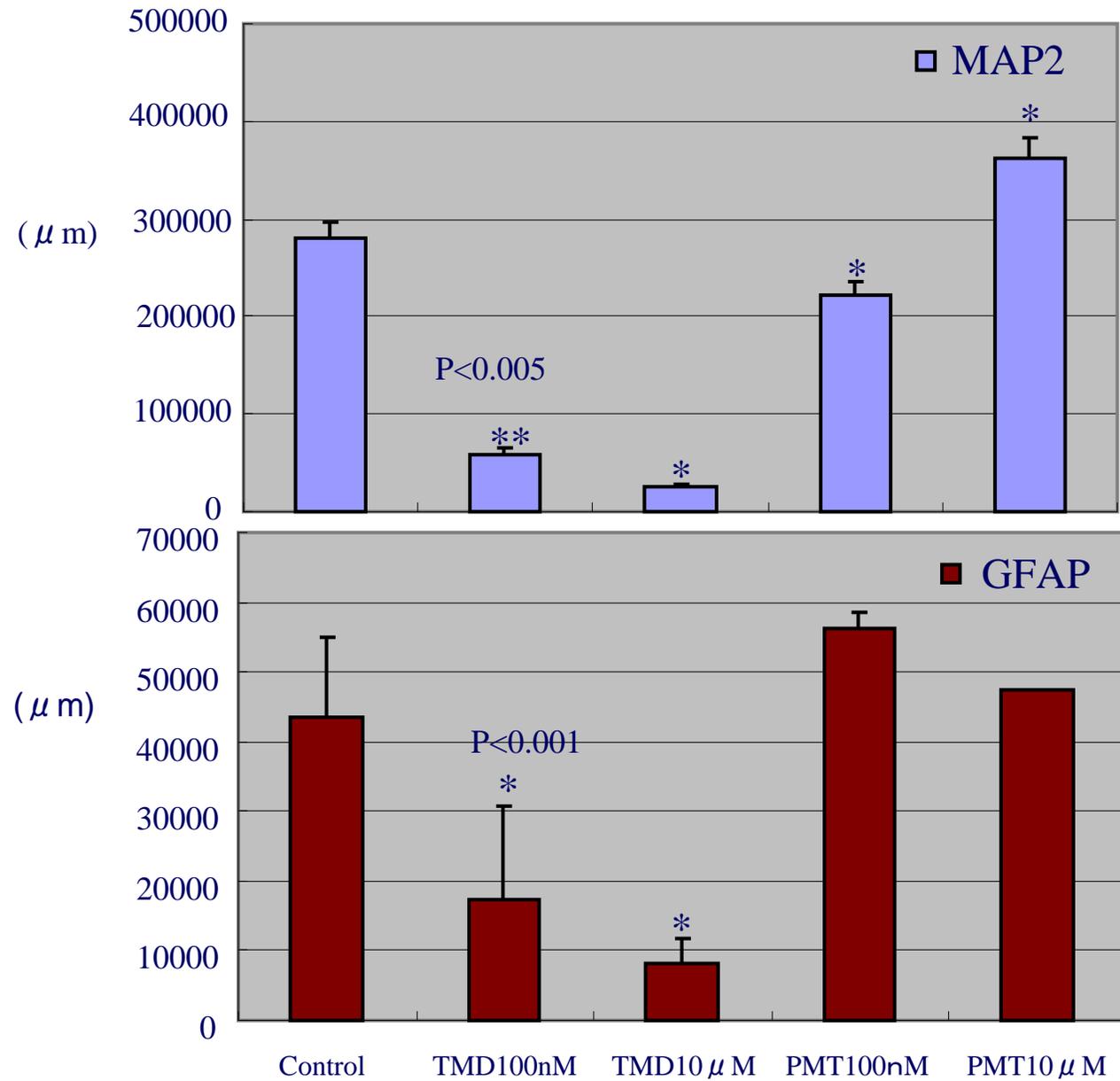
選定12化学物質の神経系分化への影響

(μm) MAP2陽性ニューロンの総伸長(神経突起の長さ)

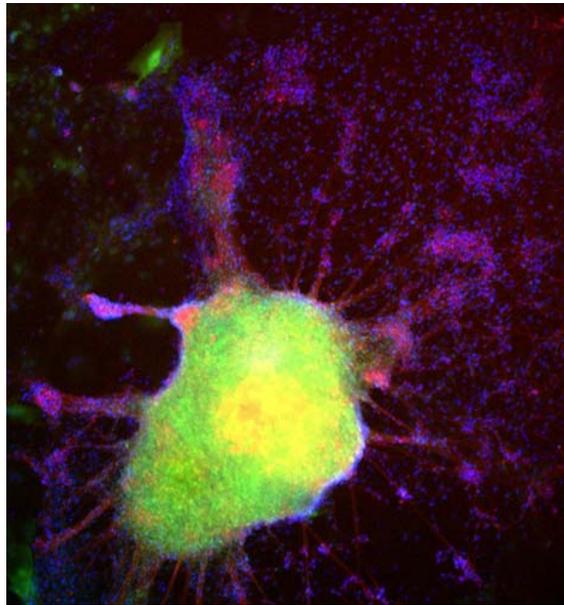




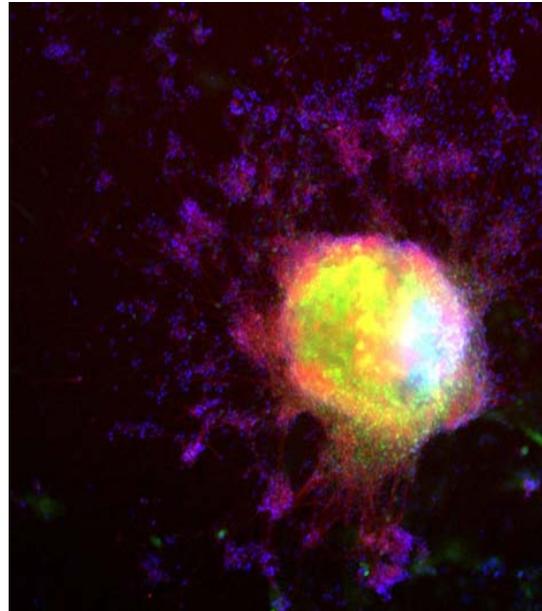
神経突起、グリア細胞突起に及ぼす化学物質の影響



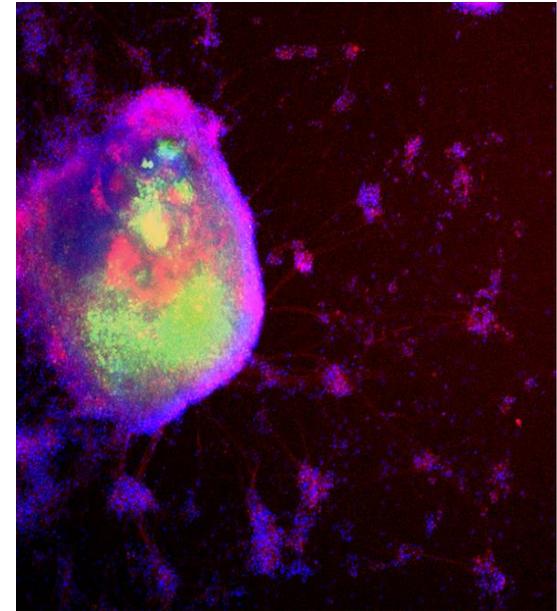
形態変化によるグループ分け



グループ1



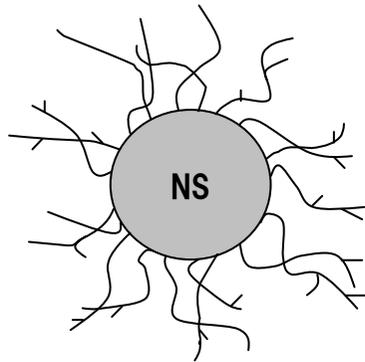
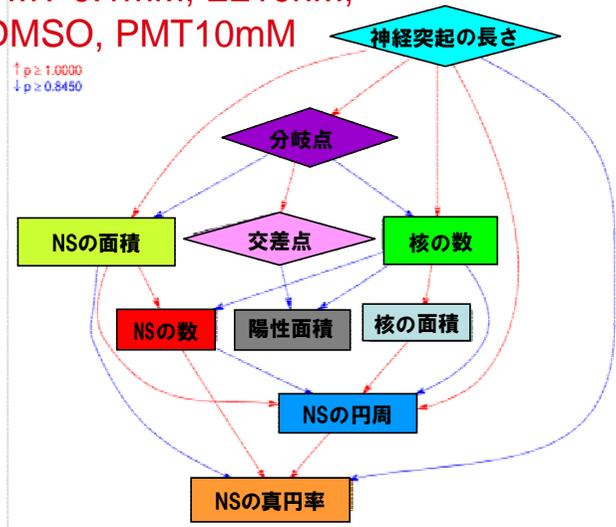
グループ2



グループ3

形態ネットワーク グループ1

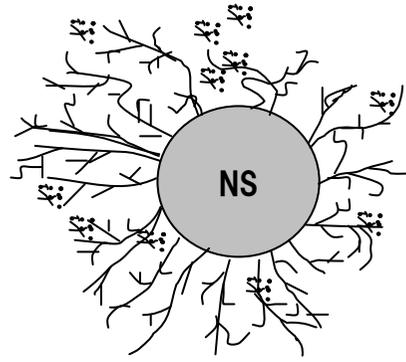
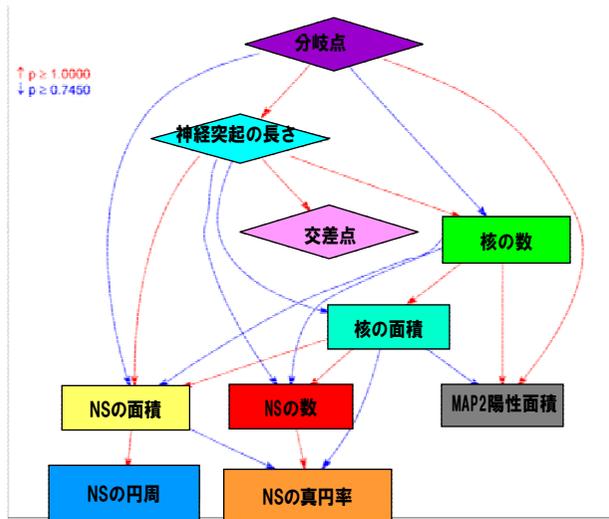
PMT 0.1mM, E210nM,
DMSO, PMT10mM



交差点が多い事から、神経突起が伸長するが、分岐点からの神経突起は短い

グループ2

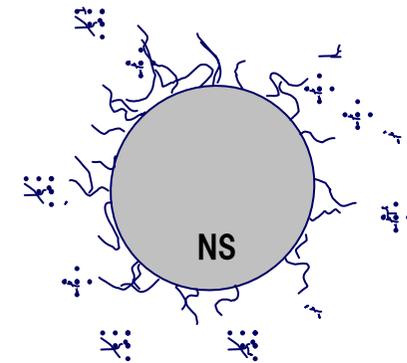
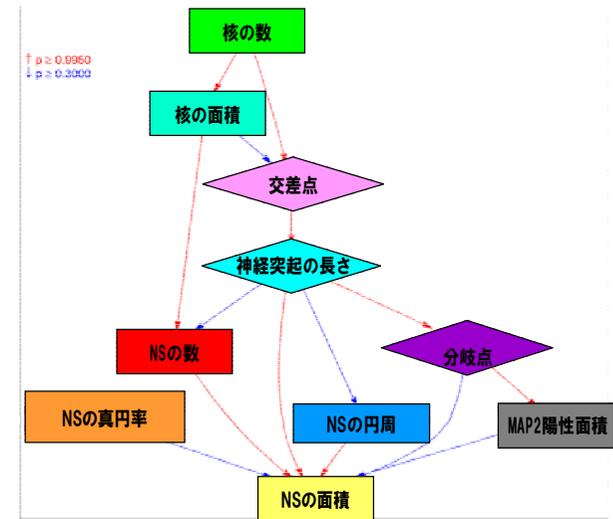
1 & 10nM TCDDと10nM PCB



分岐点から神経突起が多く伸長するため、神経突起の総伸長も増加する。

グループ3

1nM PCBと100pM BPA



交差点が少なく、分岐はするもの全体的に神経突起の伸長が抑制される。

1. マウスESから神経系細胞への分化

- まとめ

マウスES細胞にさまざまな環境化学物質12種類を曝露させ、神経系細胞への分化を観察した。

これらの化学物質は、形態指標によって、おおまかに、3グループに分けられた。

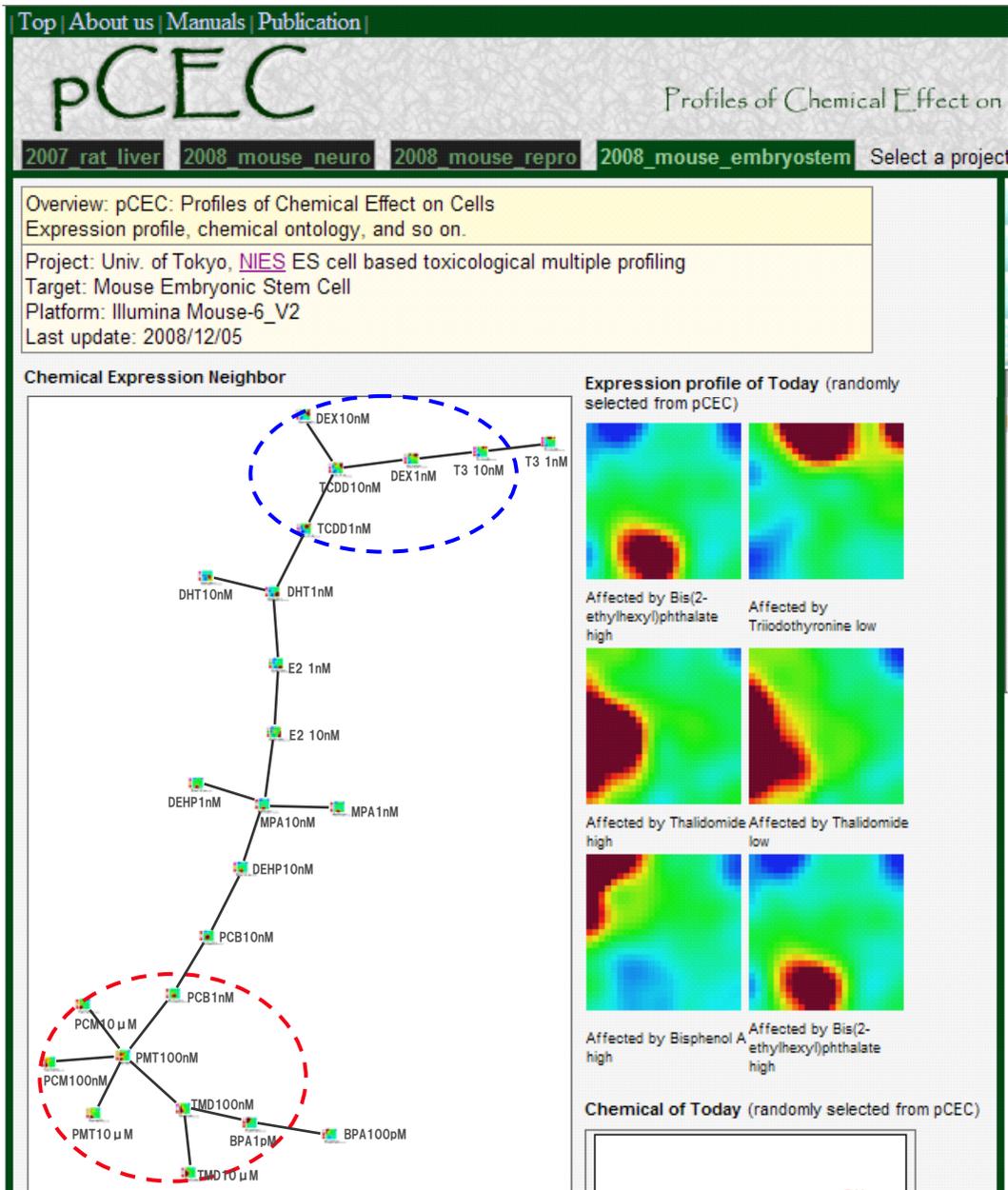
3. 影響予測システムへの応用

- メカニズムの推定が可能になる？
- 種差の不確定係数の最小化に役立つ？

12化学物質を例とした場合

化学物質名	省略記号	用途	生理作用、毒性	作用機序	標的タンパク質
トリヨードチロキシン	T3	医薬品	内因性甲状腺ホルモン	転写調節	ThR α 、ThR β
デキサメタゾン	DEX	医薬品	合成副腎皮質ホルモン	転写調節	GR
エストラジオール	E2	医薬品	内因性女性ホルモン	転写調節	ER α 、ER β
ジヒドロテストステロン	DHT	医薬品	内因性男性ホルモン	転写調節	AR
テトラクロロジベンゾダイオキシン	TCDD	非意図的生成	多岐に亘る毒性	転写調節	AhR
メトプレン酸	MPA	農薬	催奇形性（ヒトでは未知）	転写調節	RXR α 、RXR β 、RXR γ
シクロパミン	CPM	医薬品	催奇形性	シグナル阻害	Smo
サリドマイド	TMD	医薬品	催奇形性、自閉症	不明	oxidative stress?
水酸化ポリクロロビフェニル107	PCB	PCBの代謝物	多岐に亘る毒性	不明	不明 (ER α , oxidative stress)
ペルメトリン	PMT	農薬	神経毒性	不明	oxidative stress?
ビスフェノールA	BPA	プラスチック原料	神経毒性？ 生殖毒性？	不明	不明 (ER α , ERR γ)
フタル酸ジエチルヘキシル	DEHP	プラスチック原料	神経毒性？ 生殖毒性？	不明	不明 (PPAR α , γ , antiTR)

一部公開予測システムの基盤部分pCECに搭載



網羅的遺伝子プロファイリング(遺伝子発現印章gene expression signature)は、ペルメトリン、サリドマイド、ビスフェノール群と、TCDD、デキサメサゾン群と、その中間群との3グループに分かれた。

詳しくは、下記ウェブサイトへ
<http://project.nies.go.jp/eCA/cgi-bin/index.cgi?page=1&proj=5>

遺伝子セットの選択

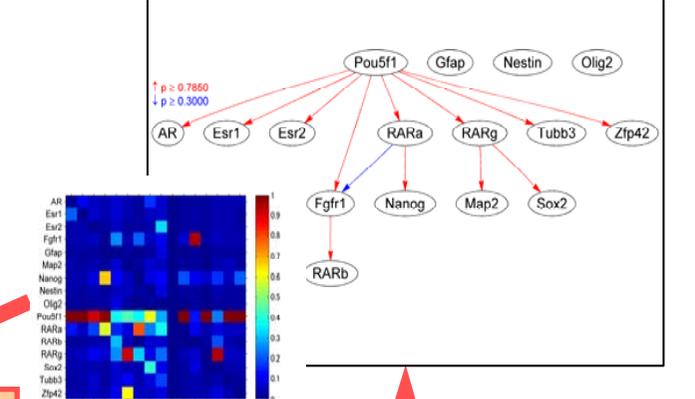
データベースから候補遺伝子を抽出

遺伝子ごとに、証拠文献を評価

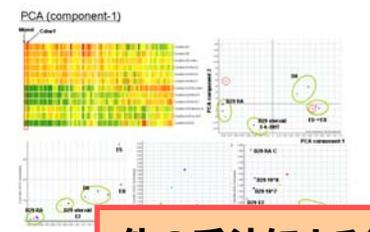
文献との照合による検証

機能を明示して、セットを作成

TAO-Genによるネットワーク

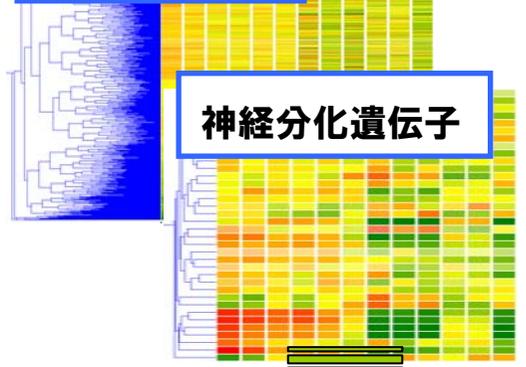


比較による検証



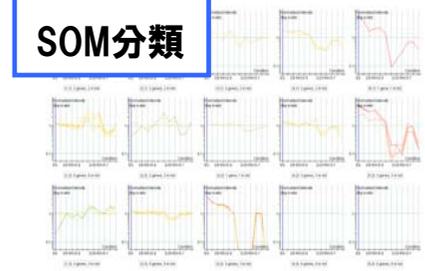
他の手法による解析

標準化などの処理後のデータ

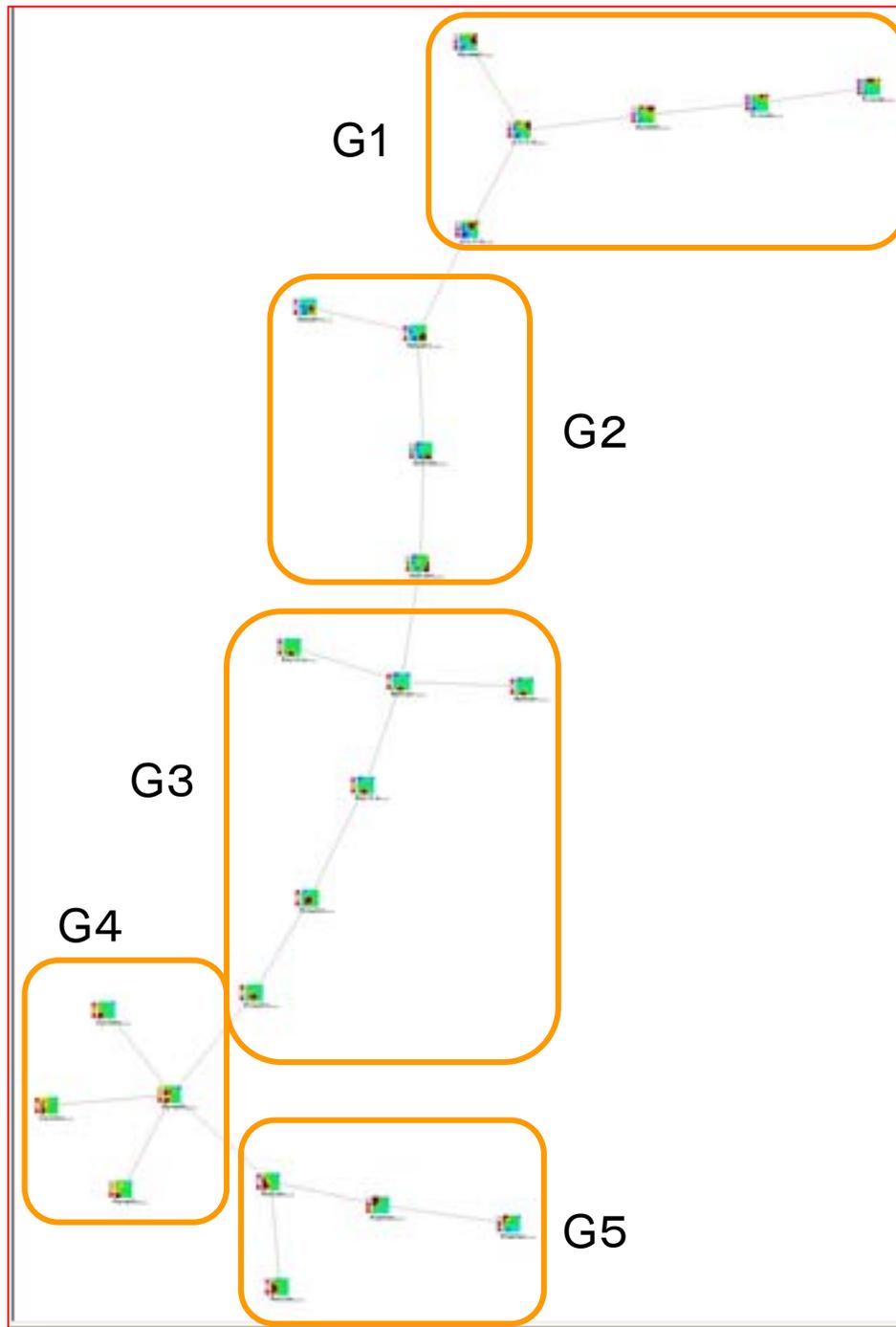


神経分化遺伝子

SOM分類



遺伝子セット



・G1－G5の対比、G1－G5に類似性のある化学物質の検索

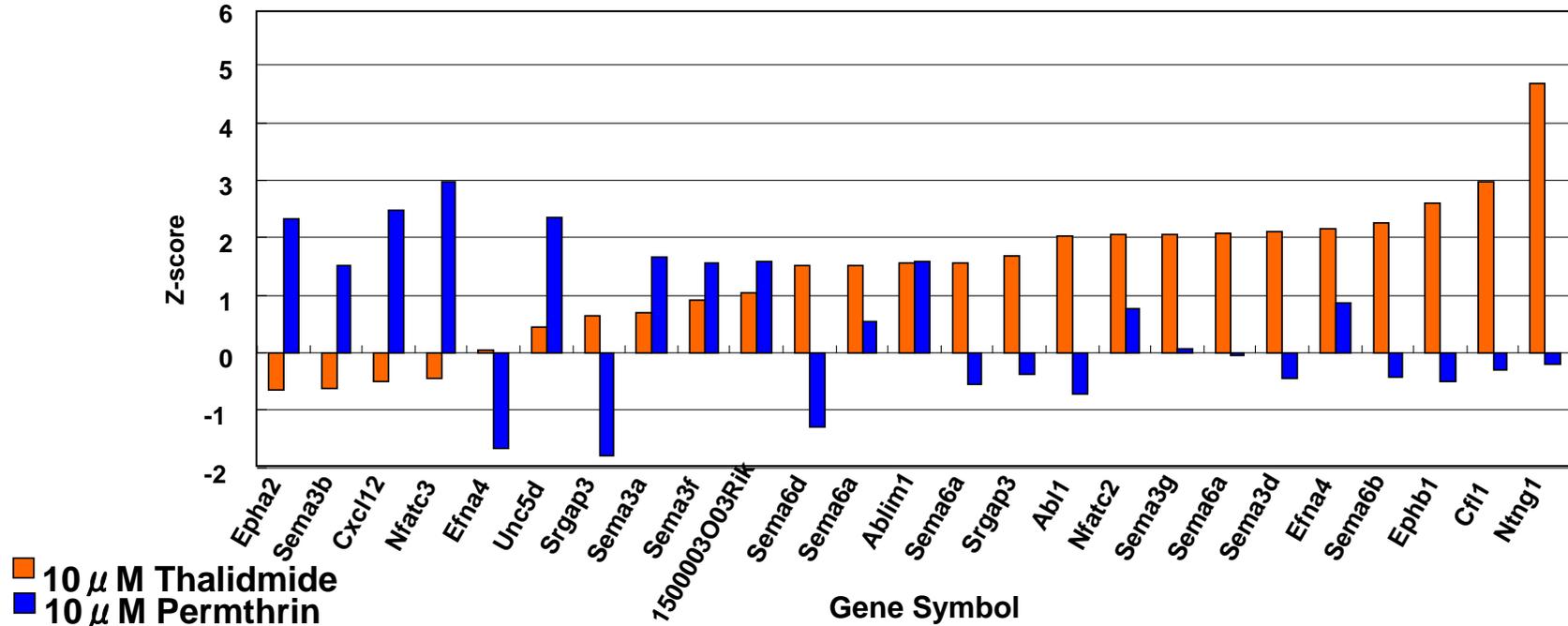
強類似、弱類似、部分類似、非類似

・疾患関与遺伝子セットの変化パターンからのリスク想定

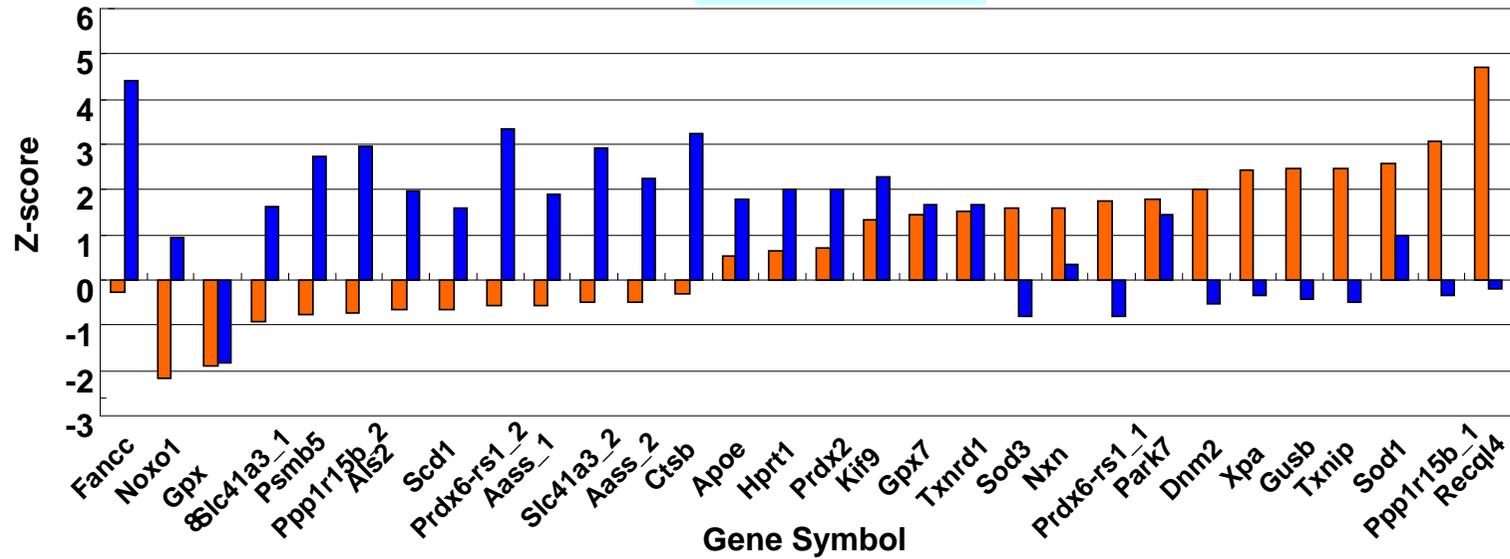
Disease category	神経発達障害			変性性疾患		
	遺伝子セット名	神経分化遺伝子	分化段階マーカー遺伝子	Axon Guidance with Synaps Marker (軸索伸長及びシナプスマーカー遺伝子)	Autism (自閉症関連遺伝子)	パーキンソン病関連遺伝子

- ・関与する遺伝子数のヒット数やパターンの類似性で評価をスコア値として算出
- ・曝露量のリストをスコア化
- ・両者の掛け合わせでランキング化

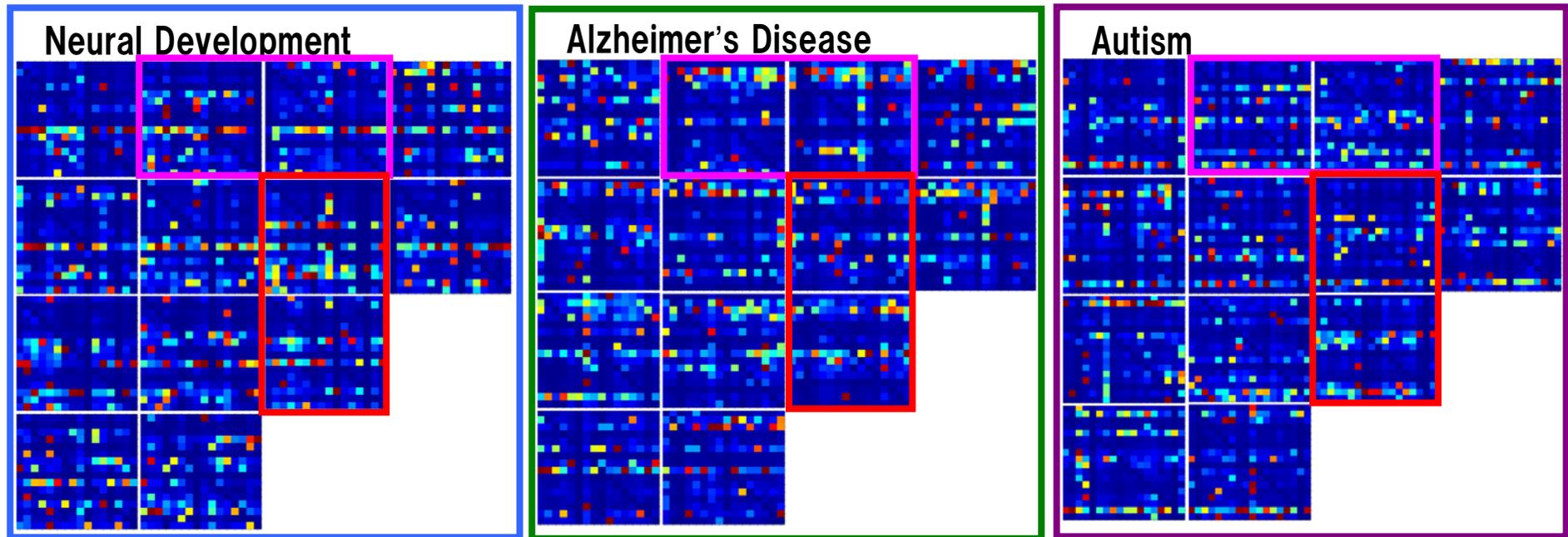
Axon Guidance



Oxidative Stress



遺伝子セットの解析



ピンクの囲み

性差の検出(E2 vs. DHT)

Alzheimer's Disease: 男:女=1:2

Autism: 男:女=4:1

赤の囲み

化学物質の影響分類

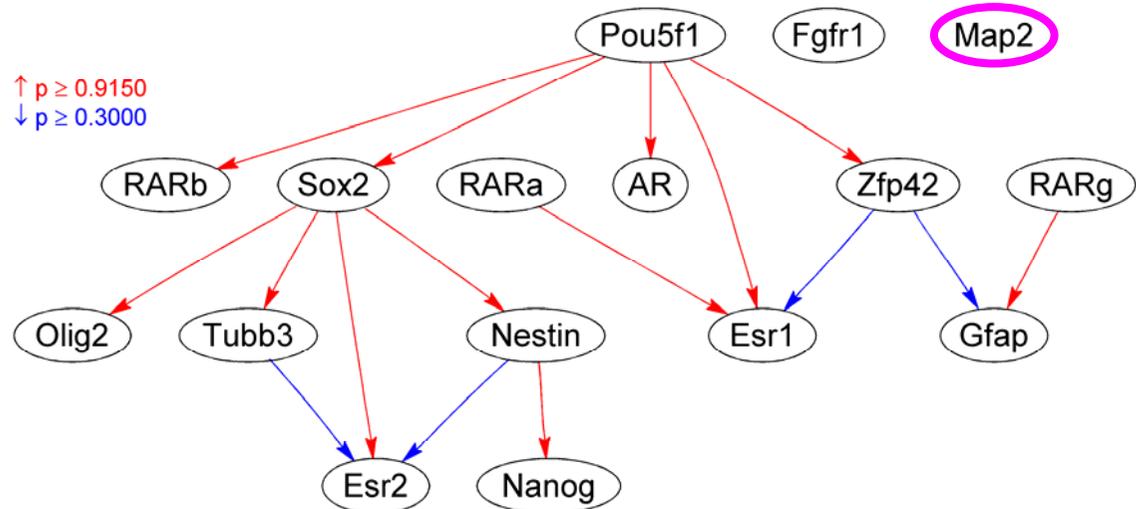
(シクロパミン vs. ペルメトリン)

全ての遺伝子セットで類似

統合ネットワーク

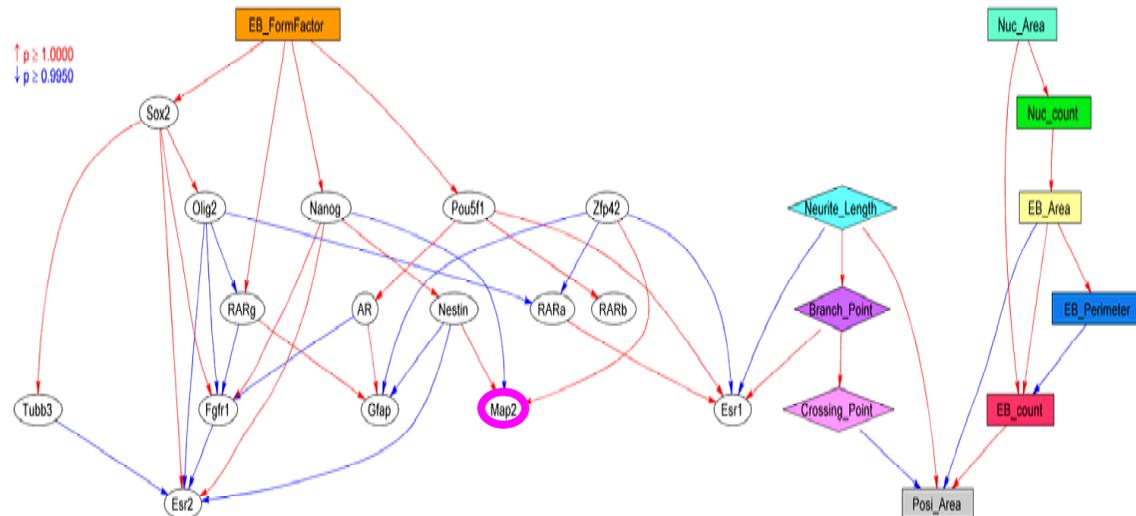
遺伝子ネットワーク
PCB_1nM
Neural Development

遺伝子情報: Day 2



統合ネットワーク
PCB_1nM_day29
Neural Development

遺伝子情報: Day 2
形態情報: Day 20

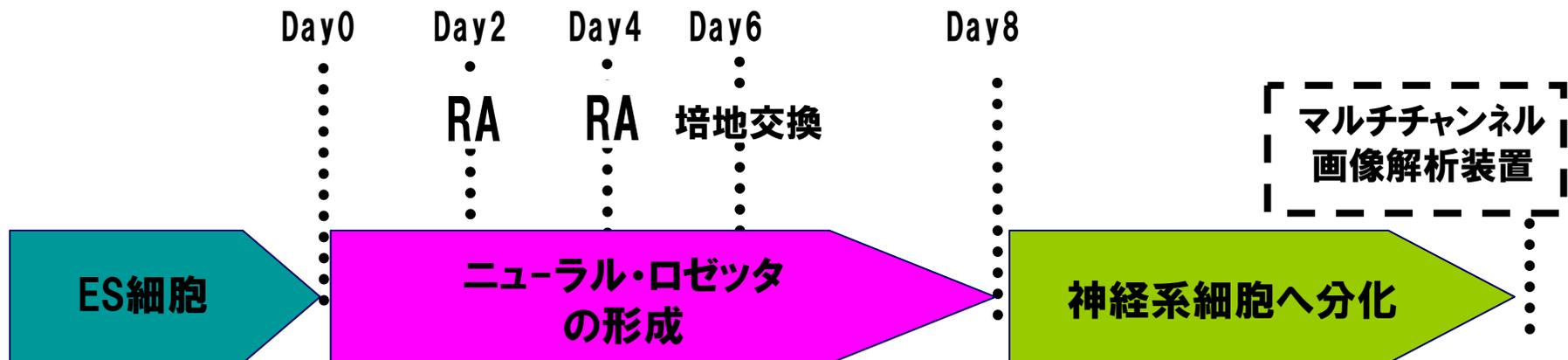
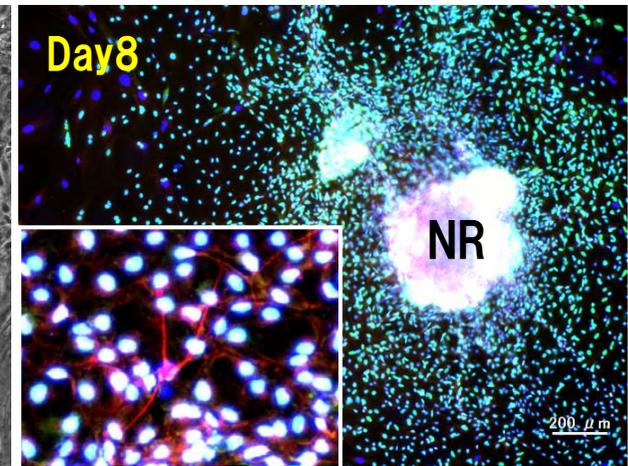
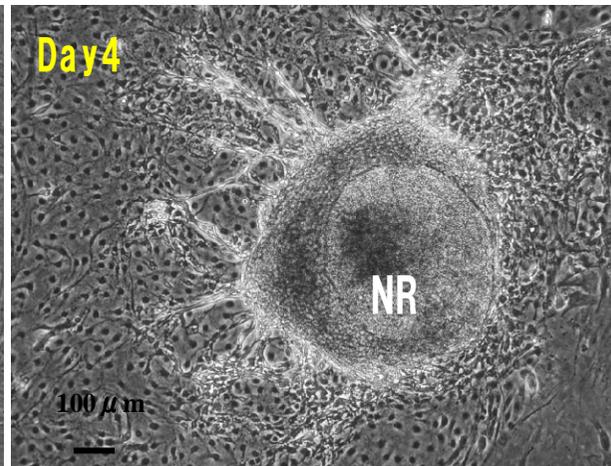
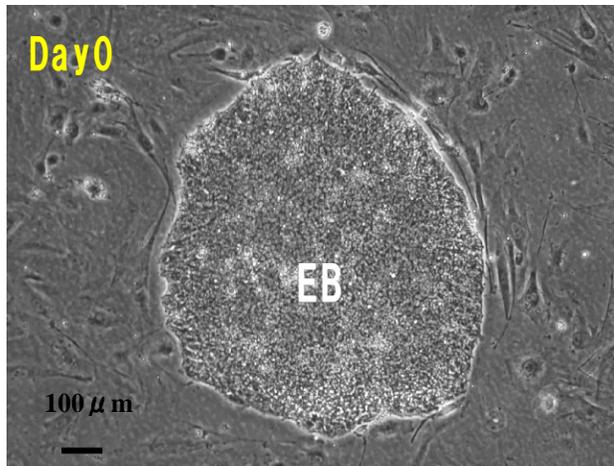
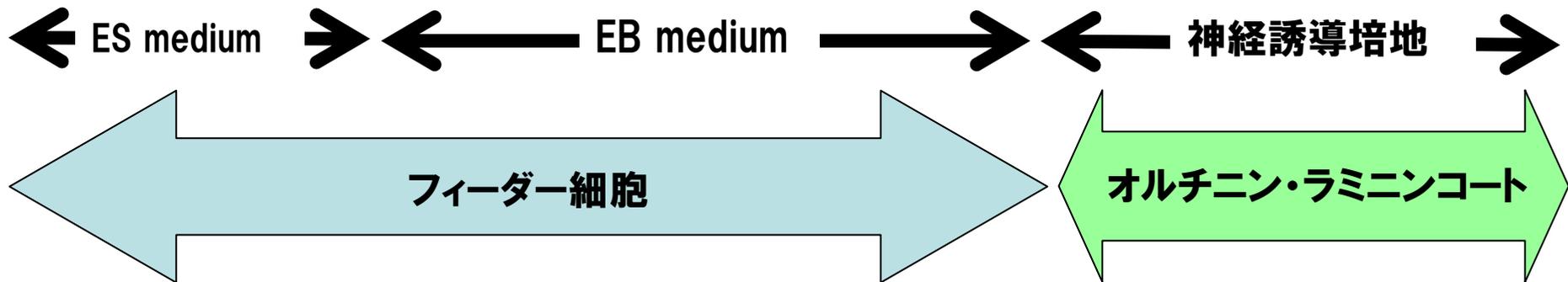


Disease category	Neural development disorder (神経発達障害)						Degenerative disorder(変性性疾患)					
遺伝子セット名	Neural Development (神経分化遺伝子)		Stage Specific Markers (分化段階マーカー遺伝子)		Axon Guidance with Synaps Marker (軸索伸長及びシナプスマーカー遺伝子)		Autism(自閉症関連遺伝子)		Parkinson's Disease (パーキンソン病関連遺伝子)		Alzheimer's Disease (アルツハイマー病関連遺伝子)	
	gene	GenebankID	gene	GenebankID	gene	GenebankID	gene	GenebankID	gene	GenebankID	gene	GenebankID
	Raf1	AK036317	Esr1	AK054182	Esr1	AK054182	Esr1	AK054182	Esr1	AK054182	Esr1	AK054182
	Atbf1	NM_007496	Esr2	NM_010157	Esr2	NM_010157	Esr2	NM_010157	Esr2	NM_010157	Esr2	NM_010157
	Pla2g6	NM_016915	AR	NM_013476	AR	NM_013476	AR	NM_013476	AR	NM_013476	AR	NM_013476
	Cdyl	NM_009881	RARa	NM_031528	RARa	NM_031528	RARa	NM_031528	RARa	NM_031528	RARa	NM_031528
	Mapk3	NM_011952	RARb	Mm.259318	RARb	Mm.259318	RARb	Mm.259318	RARb	Mm.259318	RARb	Mm.259318
	Shc1	NM_011368	RARg	NM_011244	RARg	NM_011244	RARg	NM_011244	RARg	NM_011244	RARg	NM_011244
	Hras1	NM_008284	Nanog	NM_028016	EphrinB	NW_001030882	Tsc1	NM_022887	Th	NM_009377	App	NM_007471
	Rps6ka1	NM_009097	Klf4	NM_010637	EphB	NM_173447	Tsc2	NM_011647	Slc6a3	NM_010020	Bace	NM_011792
	Mapk1	NM_011949	Zfp42	NM_009556	Sema3A	NM_009152	Fmr1	NM_008031	Snca	NM_009221	Psen	NM_008943
	Smarcad	NM_007958	Pou5f1	NM_013633	PlexinA	Mm.3789	Ube3a	NM_011668	Uba1	NM_0011360	ApoE	NM_009696
	Gbx2	NM_010262	Fgfr1	NM_010206	Sema7A	NM_011352	Reln	NM_011261	Ubch7	NM_020569	Ide	NM_031156
	Sall1	NM_021390	Nestin	NM_016701	Itgb1	NM_010578	Nlgn3	NM_172932	Park2	NM_016694	Mme	NM_008604
	Map2k1	NM_008927	Tuj1	NM_023279	Netrin1	Mm.39095	Foxp2	NM_053242	Uchl1	NM_011670	Il1r1	NM_008362
	Fos	NM_010234	Map2	NM_008927	Slit1	NM_015748	Cntnap2	NM_001004357	Park7	NM_020569	Tnfrsf1a	NM_011609
	Rif1	NM_175238	Olig2	NM_016967	Robo2	NM_175549	Slc6a4	NM_010484	Casp9	NM_015733	Casp3	NM_009810
	Gfap	NM_010277	Gfap	NM_010277	Cxcl12	NM_013655	Gabrb3	NM_008071	Casp3	NM_009810	Casp7	NM_007611
	Map2	NM_008927			Cxcr4	NM_009911	Mecp2	NM_010788	Casp7	NM_007611		
	Nestin	NM_016701			NetrinG	Mm.39262	En2	NM_010134				
	Tuj1	NM_023279			NGL1	Mm.241682						
					Unc5	NM_153131						

まとめと今後の課題

- ES細胞の分化モデル系における環境化学物質の曝露データをインフォマティクスに活用して、毒性予測へ展開することが、今後の課題
- 具体的なリスク評価への道筋を示して行きたい。

ヒトES細胞の神経誘導系における標準化プロトコルの確立



謝辞

永野麗子、赤沼広美(国立環境研究所)、今西哲(元国立環境研究所)

大迫誠一郎先生(東京大学准教授)
宮崎航(東京大学研究員)