多能性幹細胞の神経系分化誘導と金属による神経毒性研究への応用

谷口結基,^a 戸邊隆夫,^a 速水英明,^a 岡本誉士典,^{*,a}
植田康次,^a 高田達之,^b 小嶋伸夫^a

Neural Differentiation of Pluripotent Stem Cells and
Application for Metal-induced Neural Toxicity Study

Yuki Taniguchi,^a Takao Tobe,^a Hideaki Hayami,^a Yoshinori Okamoto,^{*,a}
Koji Ueda,^a Tatsuyuki Takada,^b and Nakao Kojima^a

^aFaculty of Pharmacy, Meijo University; 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503,
Japan: and ^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University;
1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan.

(Received January 30, 2014)

Metals are effectively used in biological systems under the strict regulation for exploiting their specific and broad reactivities. For example, manganese (Mn) can induce catecholamines-mediated oxidative biological damage in cooperation with iron (Fe) and/or copper (Cu). In children, the damage could induce developmental disorders such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). We hypothesize that infant neurons are more labile to metals than adult ones due to the prematured protection systems and sensitive differentiating cells. An experimental system reconstituting neural differentiation is expected to assess the influences of endogenous/exogenous factors including metals. In this study, we investigated an impact of Mn together with Fe and dopamine (DA) on neural differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs). The differentiation of mESCs was initiated by embryoid bodies (EBs) formation in the presence of all-*trans* retinoic acid, and then EBs were treated with Mn, Fe and/or DA. Then, the mRNA levels of neural differentiation marker genes (*Nestin*, *Emx2*, *Mtap2*, *Th*, *Olig2* and *Gfap*) were examined using realtime RT-PCR analysis. Mn or DA alone reduced *Mtap2*, *Th* and *Olig2* expression levels and increased *Nestin*. Moreover, combined treatment of Mn and DA also increased *Nestin* expression level. On the other hand, Fe alone reduced *Mtap2*, *Th* and *Olig2* expression levels, and increased *Emx2*. Combined treatments of Fe with Mn or DA also tended to increase *Emx2* expression level. These effects emerged at about 100 times less concentration than that inducing cytotoxicity in human neuroblastoma. The present study showed that Mn inhibits neural development, and that our mESCs system can be a useful tool to elucidate the toxicity mechanism as well as to evaluate the effects of metals and chemicals on differentiating cells.

Key words—mouse embryonic stem cell; neurotoxicity; cell differentiation; neural development

1. 背景

生命は、ある選択律で取り込んだ金属の特有かつ多様な性質を有効に利用することによって、代謝や呼吸、シグナル伝達などの様々な生体反応を駆動している。¹⁾ これらの金属は、通常その動態が綿密に制御されており悪影響を及ぼすことはない。しかしながら、過剰曝露や個体感受性差などによりこれら

の制御システムが破綻した場合、金属毒性を示すようになり、種々の疾病の発症につながるものと考えられる。例えば、銅 (copper; Cu) などの生体内金属は、カテコール類と反応して活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を産生し、酸化的 DNA 損傷を引き起こして発がんを誘発することもある。^{2,3)} 特に、活発な呼吸はしながらも増殖分裂による DNA 修復が行われていない神経細胞は、酸化ストレスに対して脆弱であると考えられている。われわれの研究グループでは、パーキンソン病に類似した症状を引き起こすマンガン (manganese; Mn) について、酸化ストレス惹起と発症との観点から詳細な研究を続け、報告してきている。⁴⁻⁶⁾ この反応機

The authors declare no conflict of interest.

^a名城大学薬学部 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山150), ^b立命館大学薬学部 (〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1)

*e-mail: okmt@meijo-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム GS-2 で発表した内容を中心に記述したものである。

構としては、Mn が鉄 (iron; Fe) あるいは Cu と協働して、生体内神経伝達物質であるドパミン (dopamine; DA) などのカテコールアミン類の酸化・環化を促進し、ROS の生成を増強することが重要と考えている。このように金属による毒性の発現は、ある種の環境変化に伴って、複数の化合物と金属との複合的な反応によって引き起こされていることが強く示唆される。

一方、子どもを対象にした近年の疫学的調査によれば、環境中の Mn に曝露されると、不注意・多動性・衝動性を特徴とする発達障害及び日常生活や学習に支障をきたす注意欠陥多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder; ADHD) の発症率に関連してくることが報告されている。⁷⁻⁹⁾ その要因として、子どもは血液脳関門などの防御システムが未熟であるため、Mn が脳に移行し易く、上記のカテコールアミン類との協働作用による悪影響を受け易いことが考えられる。加えて、神経系がまだ発達段階にあるため、神経細胞死が引き起こされる濃度より低濃度でも、神経前駆細胞などでは分化・発達異常が生じている可能性がある。この神経分化・発達異常を実験的に再構成することができれば、神経系に影響を及ぼす金属を始めとする様々な化学物質の分化過程への影響を評価することができる。

こうした新たな評価システムに応用が考えられる多能性幹細胞は、実験的に純粋培養することができる正常幹細胞であり、適切な培養環境で分化誘導することにより、様々な機能性細胞に分化させることができる。機能性細胞の中でも、神経細胞への分化は比較的容易であり、分化・発達過程に影響を及ぼす化学物質のスクリーニング系として有用である。そこでわれわれは以下のように、マウス胚性幹細胞 (mouse embryonic stem cells; mESCs) を用いて、神経系分化誘導に対して金属が引き起こす影響を評価するシステム構築に取り組んでいる。

2. 結果・考察

マウス胎児性線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) を支持細胞として mESCs を維持培養し、mESCs を凝集させて胚様体 (embryoid bodies; EBs) を作製した。EBs 形成と同時に化学物質処理 (DA 1 μ M, Mn 2 μ M, Fe 2 μ M の単独あるいは併用) を開始し、7 日間培養後、神経系分化マーカー遺伝子 (*Nestin*, 神経幹細胞; *Emx2*, 神経前駆細胞;

Fig. 1. Evaluation of Test Chemicals Neurotoxicity Using mESCs

Mtap2, 神経細胞; *Th*, DA 作動性神経; *Olig2*, オリゴデンドロサイト; *Gfap*, アストロサイト) の発現強度を解析することで試験化合物による神経細胞分化に対する影響を評価した (Fig. 1)。

ESCs の神経分化誘導剤として知られているレチノイン酸 (all-*trans* retinoic acid; RA, 1 μ M) を EBs に加えると mESCs が神経系へ分化し、種々の神経系分化マーカー遺伝子が発現誘導されることを確認している。この神経分化誘導条件に Mn, Fe 及び DA を併用した場合に各試験物質が神経細胞分化に与える影響を検討した。Mn と DA の単独処理において *Mtap2*, *Th*, *Olig2* の発現が減少し、*Nestin* の発現が増加した。さらに、Mn と DA の併用処理においては明らかに *Nestin* の発現が増加した。このことから、Mn と DA は mESCs の *Nestin* の発現を増加させるが、その先のマーカーの発現抑制が起こることが示唆された。一方、Fe の単独処理においては *Mtap2*, *Th*, *Olig2* の発現は、Mn 及び DA と同様に減少し、*Emx2* の発現が増加した。また、Fe に Mn や DA を併用処理した場合でも *Emx2* の発現が増加傾向を示した。このことから Fe は *Nestin* から *Emx2* の発現を促進するが、*Emx2* 以降の発現抑制が起こると考えられる。また、本実験系では *Gfap* の発現はすべての処理においてほとんどみられなかった。ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞に対する細胞死の誘導には、DA 200 μ M, Mn 及び Fe 400 μ M という高濃度を必要としたのに対して、mESCs においては DA 1 μ M, Mn 及び Fe 2 μ M という低濃度で上記の分化異常を示した。今回の実験

から、以前の研究で報告していた「Mn は Fe と協働して酸化 DNA 損傷を増強させる」ことに加えて、「Mn は神経系の発達段階において神経幹細胞の分化を抑制する」という新しい知見が得られた。今後、Mn による多面的な毒性メカニズムの解明につながるものと期待される。

本研究では、Mn を例に挙げて神経分化に対する影響を評価することができた。また、その影響は、これまでの細胞死というエンドポイントと比較して 100 分の 1 程度という低濃度で観察できる。したがって、本実験系は神経分化過程に及ぼす化学物質の影響をより鋭敏に確認でき、化学物質のスクリーニングや毒性メカニズムなどを解明するために有用なツールになり得るものと考えられる。

謝辞 本研究の遂行にあたりご協力頂いた近藤沙和美さん、山田育代さん、岩井宏徳さん、松田栄二さん、そして本稿執筆に際し貴重なご助言を頂いた方々に、ここに記して感謝します。

REFERENCES

- 1) Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G. L., Thornton J. M., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 1205–1218 (2008).
- 2) Oikawa S., Hirose I., Hirakawa K., Kawanishi S., *Carcinogenesis*, **22**, 1239–1245 (2001).
- 3) Midorikawa K., Uchida T., Okamoto Y., Toda C., Sakai Y., Ueda K., Hiraku Y., Murata M., Kawanishi S., Kojima N., *Chem. Biol. Interact.*, **150**, 271–281 (2004).
- 4) Ando M., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N., *J. Health Sci.*, **57**, 204–209 (2011).
- 5) Nishino Y., Ando M., Makino R., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N., *Neurotox. Res.*, **20**, 84–92 (2011).
- 6) Ueda K., Ando M., Okamoto Y., Kojima N., *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, **12**, 75–80 (2013).
- 7) Barlow P. J., *Med. Hypotheses*, **11**, 309–318 (1983).
- 8) Woolf A., Wright R., Amarasinghe C., Bellinger D., *Environ. Health Perspect.*, **110**, 613–616 (2002).
- 9) Bouchard M., Laforest F., Vandelac L., Bellinger D., Mergler D., *Environ. Health Perspect.*, **115**, 122–127 (2007).

1) Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday