

サリドマイドがヒト人工多能性幹細胞の  
分化に及ぼす影響についての解析

太刀川 彩保子



## 目次

第1章 概要 .....	1
第2章 略語一覧 .....	3
第3章 序論 .....	4
3.1 本研究の目的と概要 .....	4
3.2 サリドマイド .....	6
3.3 Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) とヒトの胎児発達.....	12
3.4 多能性幹細胞を用いた <i>in vitro</i> 胎児毒性試験.....	20
第4章 未分化な hiPSCs および hiPSCs の初期胚体外胚葉分化へのサリドマイドの影響21	
4.1 目的.....	21
4.2 材料および方法.....	22
4.2.1 hiPSCs の血清・フィーダー培養 .....	22
4.2.2 hiPSCs の無血清・無フィーダー培養 .....	24
4.2.3 サリドマイドの調製.....	25
4.2.4 未分化な hiPSCs へのサリドマイド曝露 .....	25
4.2.5 hiPSCs の初期胚体外胚葉への分化誘導およびサリドマイド曝露 .....	26
4.2.6 免疫染色.....	27
4.2.7 フローサイトメトリー解析.....	29

4.2.8	生細胞数測定.....	30
4.2.9	死細胞数測定.....	30
4.2.10	アポトーシスアッセイ .....	31
4.2.11	細胞周期解析.....	31
4.2.12	Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) アレイ解析.....	32
4.3	結果.....	32
4.3.1	サリドマイドは未分化および胚体外胚葉分化マーカーの発現に影響しない.....	32
4.3.2	サリドマイドは未分化な hiPSCs の生細胞数を減少させる .....	37
4.3.3	サリドマイドは未分化な hiPSCs にアポトーシスを誘導する .....	39
4.3.4	サリドマイドは未分化な hiPSCs の細胞周期の停止に関与しない .....	42
4.3.5	サリドマイドは未分化な hiPSCs の未分化マーカーの発現に顕著な影響を及ぼさないが、神経幹細胞マーカーに著しい発現減少を引き起こす.....	44
4.4	考察.....	47
第 5 章	hiPSCs の初期中胚葉分化過程へのサリドマイドの影響.....	52
5.1	目的.....	52
5.2	材料および方法.....	54
5.2.1	hiPSCs の初期中胚葉，内胚葉への分化誘導およびサリドマイド曝露 .....	54
5.2.2	Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) .....	56

5.2.3 サリドマイド曝露開始期間の変更による初期中胚葉分化への影響についての 解析.....	57
5.3 結果.....	59
5.3.1 サリドマイドは主要な初期中胚葉分化マーカーの発現に影響しない.....	59
5.3.2 サリドマイドは一部の初期中胚葉分化マーカーの発現を減少させる.....	64
5.3.3 サリドマイドは初期中胚葉分化 hiPSCs の生細胞数を減少させる .....	66
5.3.4 サリドマイドは初期中胚葉分化過程においてアポトーシスを誘導する.....	68
5.3.5 サリドマイドは初期中胚葉分化 hiPSCs の細胞周期の停止に関与しない .....	71
5.3.6 サリドマイド曝露の開始期間を変更しても 5 日目における同薬の影響は変わら ない.....	73
5.3.7 サリドマイドは血管および心臓分化マーカーの発現を阻害し、外胚葉分化マ ーカーの発現を増加させる.....	75
5.4 考察.....	79
第 6 章 総合討論 .....	83
第 7 章 結論 .....	86
謝辞 .....	88
参考文献 .....	89
追補 1 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr Associated	

protein 9 (CRISPR/Cas9) を用いたサリドマイド一次標的分子 (Cereblon)	
ノックアウト細胞株の作製.....	96
S1.2 材料および方法.....	97
S1.2.1 guide RNA および CRISPR Nuclease Vector のデザイン.....	97
S1.2.2 CRISPR ベクターの切断効率の算定.....	98
S1.2.3 CRISPR ベクターの hiPSCs への導入.....	98
S1.3 結果.....	99
S1.3.1 5 つの guide RNA の作製による CRISPR Nuclease Vector のデザイン.....	99
S1.3.2 高い切断効率を示す 2 つのベクターの選定 .....	100
S1.3.3 CRISPR ベクター導入後に hiPSCs の細胞数が激減する .....	101
S1.4 考察.....	102
追補 2 hiPSCs の初期中胚葉および内胚葉への分化誘導プロトコルの検討 .....	103
S2.1 目的.....	103
S2.2 材料および方法.....	103
S2.2.1 hiPSCs の初期中胚葉および初期内胚葉分化 .....	103
S2.3 結果.....	106
S2.3.1 検討した 3 つのプロトコルでは、中胚葉・内胚葉の両分化マーカーの発現が 誘導される .....	106

S2.4 考察.....	108
--------------	-----

## 第1章 概要

サリドマイドは1960年代初頭までつわり止めとして世界中の妊婦に服用されていたが、強力な催奇形性を持つことが明らかとなり、一時は市場から撤退した。一方で近年、悪性腫瘍やハンセン病への薬効が認められ、再注目されている。しかし、薬害事件から50年以上経過した現在においてもサリドマイドの持つ催奇形性の作用機序の全容は不明である。これは、同薬の薬効が動物種間で異なり、ヒト胎児の発達に及ぼす影響を検出するための良い実験系がないことに起因する。

そこで、本研究では、hiPSCs (human induced pluripotent stem cells, ヒト人工多能性幹細胞)を用いた。hiPSCsは着床時の受精卵の胚盤葉上層に相当し、この部分は体の主な器官へと分化する。本研究では、hiPSCsの約1週間の分化誘導の過程を初期胎児発達の模倣と考えた。その過程にサリドマイド曝露を行うことでサリドマイドの影響を検出し、同薬がヒトの胎児発達に及ぼす影響について新たな知見を得ることを目的とした。

実験では、未分化なhiPSCs(将来の胎児の体)、胚体外胚葉(胎盤)および初期中胚葉(骨・血管)分化過程における細胞死およびマーカー発現への影響を調べた。4日間のサリドマイド曝露後、未分化なhiPSCsにおいて神経幹細胞マーカー・*FABP7*の著しい発現減少が認められ、サリドマイドと同遺伝子の発現に相関があることが本研究により初めて示された。また、高濃度曝露時には未分化なhiPSCsにアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。胚体外胚葉分化条件は、サリドマイドの影響の検出におけるネガティブコントロールとして設定した。予想と一致して、同薬による顕著な影響は見られなかった。また、初期中胚葉分化段階においては、サリドマイドの催奇形性の症状から予想されたアポトーシスの誘導ならびに心臓および血管分化マーカー発現の阻害が示された。このことは、胚体外胚葉分化における結果と総合して、最初に仮定した生体内における胎児発達の一期間を本研究の実験系により適切に模倣できたことを証明している。さらに、新たな知見とし



て，サリドマイド曝露によって初期中胚葉への分化が阻害されただけでなく，分化の方向性が外胚葉方向へと偏ることが示唆された。

本研究の成果は，サリドマイドの作用機序の解明および他薬の胎児毒性リスク評価への応用が可能と考える。

## 第2章 略語一覧

BSA (bovine serum albumin)	ウシ血清アルブミン
BMP-4 (bone morphogenetic protein-4)	骨形成タンパク質-4
CaAM (calcein AM)	カルセイン AM
CRBN (cereblon)	セレブロン
DMSO (dimethyl sulfoxide)	ジメチルスルホキシド
ESCs (embryonic stem cells)	胚性幹細胞
FBS (fetal bovine serum)	ウシ胎児血清
bFGF-2 (basic fibroblast growth factor)	塩基性繊維芽細胞成長因子
FCM (flowcytometry)	フローサイトメトリー
hiPSCs (human induced pluripotent stem cells)	ヒト人工多能性幹細胞
KSR (knockout serum replacement)	血清代替物質
LDH (lactate dehydrogenase)	乳酸脱水素酵素
MEF 細胞 (murine embryonic fibroblasts)	マウス胚性繊維芽細胞
mEST (mouse embryonic stem cells test)	マウス胚性幹細胞試験
PBS (phosphate buffered saline)	リン酸緩衝液
PI (propidium iodide)	プロピジウムアイオダイド
RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

## 第3章 序論

### 3.1 本研究の目的と概要

サリドマイドは難病への高い薬効が注目されているが、同薬の持つ催奇形性の作用機序の全容は未だに不明である。これは、サリドマイドの作用が動物種間で異なり、同薬がヒトの胎児発達に及ぼす影響を検出するための良い実験系がないことに起因する。

そこで、本研究では、hiPSCsを用いてサリドマイドの影響を検出し、同薬がヒトの胎児発達に及ぼす作用に関して新たな知見を得ることを目的として実験を行った。実験では、hiPSCsを約1週間の間異なる分化方向へと誘導し、この過程をヒトの初期胎児発達（受精後20日前後）の模倣と仮定した。この系を用いてサリドマイドが各細胞の分化段階に及ぼす影響（細胞傷害性およびマーカー発現への影響）を調べた。

第4章では、未分化なhiPSCs（将来の胎児の体）および初期胚体外胚葉（将来の胎盤）への分化過程にサリドマイド曝露を行い、細胞死およびマーカー発現への影響を調べた。未分化なhiPSCsは着床した受精卵の胚盤葉上層と同質性を有しており、この部分は将来、胎児の体へと発達する。この時期の胚は高い修復能力を有していることから、サリドマイド曝露による影響は少ないと予想した。対照的に、胚体外胚葉は胎児の体を構成しない方向への分化であり、同薬の催奇形性との関連は薄いと考えられる。したがって、サリドマイドの影響が検出されないネガティブコントロールとしての意味合いを含めてこの条件を設定した。

第5章では、初期中胚葉（将来の骨・血管）への分化過程にサリドマイド曝露を行い、細胞死およびマーカー発現への影響を調べた。初期中胚葉はサリドマイドの催奇形性と最も関連が深いと考えられる。本研究で模倣する胎児発達の期間において妊婦がサリドマイドを服用した場合に生じる催奇形性の症状から、まず、同薬による細胞傷害および中胚葉分化マーカー発現の阻害が検出されることを予想した。

最後に、第 6 章として、本研究を通して得られた成果についてまとめ、総合討論を行った。

さらに、追補 1 として、遺伝子編集技術 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr Associated protein 9) を用いたサリドマイドの一次標的分子・CRBN (cereblon, セレブロン) のノックアウト hiPS 細胞株の作製 (第 4 章に関連), 追補 2 として、hiPSCs の初期中胚葉および内胚葉分化誘導プロトコールについての検討 (第 5 章に関連) を行った結果について報告する。

### 3.2 サリドマイド

サリドマイドは、西ドイツのグリュネンタール社によって開発され、1957年に催眠剤として市販された (図 3-1)。妊娠した女性においては、つわり止めとして世界各国で服用されており、日本でも 1958 年から市販されるようになった (鎮静作用および催眠作用に関する詳細なメカニズムについては未解明である)。しかし、1960 年代初頭、胎児に重篤な先天性異常を引き起こすことが明らかとなり、市場から撤退した。この間に、全世界で数千人の胎児がサリドマイドによる被害にあったと推定されている (Franks, *et al.* 2004, Knobloch and Ruther 2008, Melchert and List 2007, Miller and Stromland 1999)。一方で近年、サリドマイドが多発性骨髄腫やハンセン病の治療に効果を発揮することが認められ、再注目されている (Knobloch and Ruther 2008, Melchert and List 2007, Sheskin 1965, Singhal, *et al.* 1999)。

サリドマイドの催奇形性は多岐に渡り、骨・血管および心臓 (中胚葉由来の組織) の発達異常、腸 (内胚葉由来の組織) や神経 (外胚葉由来の組織) の形成不全などがあげられる (Schardein J 2000)(図 3-2, 3-3)。表現型として最も多いのは、四肢の骨の短小や欠損を特徴とするアザラシ肢症である (図 3-2)。サリドマイドの催奇形性の仮説として代表的なものに、活性酸素種の発生によるアポトーシスの誘導 (Knobloch, *et al.* 2007, Parman, *et al.* 1999) および血管新生の阻害 (D'Amato, *et al.* 1994, Therapontos, *et al.* 2009) があり、ウサギやニワトリ胚を用いて実証された。2010 年には、サリドマイド催奇形性の一次標的分子として CRBN が同定された。CRBN は、ユビキチンリガーゼ複合体を構成するタンパク質の一つであり、サリドマイドがこのタンパク質の機能を阻害することで、四肢の形成に異常が生じることがヒヨコおよびゼブラフィッシュを用いた研究で実証された (Ito, *et al.* 2010)。しかし、組織特異性については未だに数多くの論争があり、その詳細については明らかになっていない (Vargesson 2015)。

サリドマイドの催奇形性の理解が立ち遅れている理由として、同薬のヒト胎児における影響を検出するための良い実験系がないことがあげられる。サリドマイドの作用は動物種によって異なり、特にげっ歯類では催奇形性が発現しないため、動物実験の結果のヒトへの外挿は難しい (Fratta, *et al.* 1965)。動物種間でサリドマイドに対する反応性が異なる原因としては、薬物代謝酵素・cytochrome P450 (CYP3A) の機能が異なることがあげられる。この酵素は主に肝臓や腸、また、胎盤においても発現している。サリドマイドの催奇形性はげっ歯類では発現しないが、ヒト化マウス (胎盤の機能をヒトと同一にした場合) においては、胎仔に四肢の形成異常が見られることが示唆されている (Kazuki, *et al.* 2016)。また、CRBN の構造がヒトとマウスでは異なることも報告されており (Kronke, *et al.* 2015)、サリドマイドに対する反応性に差が生じる一因となっていることが示唆されている。しかし、ヒト胎児を用いた薬効試験を行うことは、倫理的・技術的に不可能である。こうした理由から、薬害事件から 50 年以上経過した今日においてもサリドマイド催奇形性の作用機序の全容は明らかになっておらず、同薬の使用の妨げとなっている (Vargesson 2015)。サリドマイドの催奇形性の作用機序を理解し、安全な使用法の開発を進める上で、ヒトにおける同薬の影響を検出するための実験系を確立することは重要である。

サリドマイドの催奇形性は、受精後 20-36 日 (月経後 34 日-50 日、妊娠 2 週-7 週) に妊婦が服用した場合に現れることが報告されている (JL 2000, Nowack 1965) (図 3-8)。この期間は絶対過敏期と呼ばれ、細胞が分化し、胎児の体の重要器官が形成される時期である (図 3-8, 3-9)。また、妊婦がサリドマイドを服用した時期と胎児の催奇形性の症状には相関があり、例えば、耳の欠損や親指の重複、心臓の異常は受精後 20 日頃 (月経後 34 日頃、妊娠 2 週目) の早期の服用で生じるが、代表的な催奇形性の症状である四肢の形成異常はこれよりも遅く、受精後 24 日 (月経後 38 日、妊娠 5 週目) 以後の服用時に生じることがわかっている (Gilbert 2012, Nowack 1965) (図 3-4)。

サリドマイドは、抗血管新生作用、サイトカインの産生抑制および免疫調節作用を有し、米国において 1965 年にハンセン病の治療薬として、2006 年に多発性骨髄腫の治療薬として承認されている。日本においては、2008 年に再発または難治性多発性骨髄腫の治療薬として承認された。サリドマイドは現在、100 mg – 400 mg/日で使用されている。経口投与したサリドマイドは胃を通過して小腸から吸収され、さらに門脈を通り肝臓を経て（肝臓で代謝を受けて一部が薬理効果を失うが、その割合については該当資料なし）全身血へ移行し、15-30 分程度で患部に到達する。一般的に、薬は標的細胞に直接作用し、その多くは細胞表面の受容体と結合して細胞の反応を引き起こすが、サリドマイドは細胞内に入り、細胞質に存在する一次標的分子・CRBN に結合することで効果を発揮する。サリドマイドの誘導体・Lenalidomid を用いた *in vitro* 実験では、同薬が 6 時間程で細胞に取り込まれることを示唆している (Kronke, *et al.* 2015)。また、一般的な使用濃度である 200 mg/日 投与時の血中最大濃度は 2.7 µg/mL であることが報告されている (サリドマイドインタビューフォーム 改訂第 9 版 2014)。薬害事件発生時の記録から、催奇形の生じる最低濃度は 1 mg/kg と報告されており (JL 2000)、これは、体重 50 kg の女性に投与したと考えると、そのときの血中最大濃度は  $0.98 \pm 0.23$  µg/mL となる。サリドマイドは、それ自身が CRBN に結合することで薬効または催奇形性が生じることが報告されている一方で、不明な点も多い。同薬は生体内に投与後、加水分解、酵素的な酸化、非酵素的なキラル転換によって 20 種以上の代謝産物を与える (サリドマイドインタビューフォーム 改訂第 9 版 2014 年) が、それぞれに個別の薬理作用、毒性があると考えられており、その詳細は明らかになっていない。

サリドマイドの利用者は増加しているが、同薬の持つ強力な催奇形性のため、厳格な安全管理の下での使用が義務付けられている (サリドマイドインタビューフォーム 改訂第 9 版 2014)。

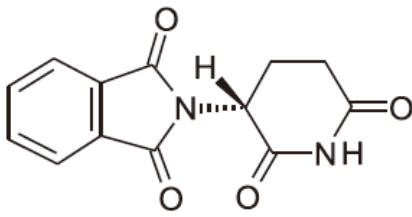


図 3-1 サリドマイドの構造

(サリドマイドインタビューフォーム改訂版 9 版, 2014)

サリドマイドは **S** (-) および **R** (+) の二つの光学異性体を持つグルタミン酸誘導体で、白色～淡黄色の結晶または結晶状の粉末である。**R** 体の方は鎮静・催眠作用があるが、**S** 体は催奇形性を示す。二つの構造異性体は生理的条件下で相互転換 (ラセミ化) される。

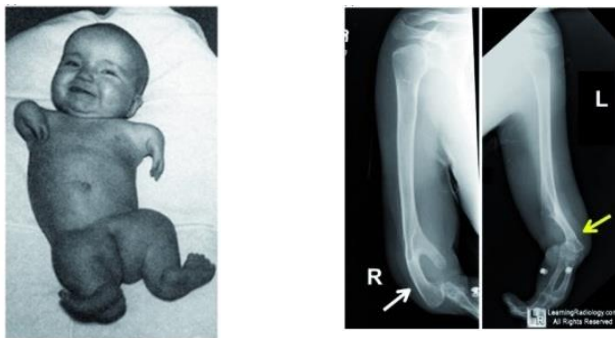


図 3-2 サリドマイドによる代表的な症状

(Rehman, *et al.* 2011)

四肢の骨の欠損および短小を特徴とするアザラシ肢症の幼児 (写真左) およびサリドマイドの子宮内曝露を受けた患者の上肢のレントゲン写真 (写真右)。



**TABLE 3-4** Malformations Comprising the Thalidomide Syndrome

System	Malformations
Ears	Anotia Microtia Abnormalities
Limbs <sup>a</sup>	Thumb aplasia Hip dislocation Femoral hypoplasia Girdle hypoplasia
Eyes	Microphthalmia, coloboma Refractive errors Cataracts, squint, pupillary abnormalities
Face	Hypoplastic nasal bridge Expanded nasal tip, choanal atresia
Central nervous system	Facial nerve paralysis Deafness Marcus Gunn or jaw-winking phenomenon Crocodile-tear syndrome Convulsive disorders?
Respiratory	Laryngeal and tracheal abnormalities
Heart and blood vessels	Abnormal lobulation of lungs Capillary hemangioma extending from dorsum of the nose to the philtrum in the midline Congenital heart disease (conotruncal malformations)
Abdominal and visceral	Inguinal hernia Cryptorchidism Intestinal atresias Absent gallbladder and appendix Abnormal kidney position Horseshoe kidney Double ureter Vaginal atresia Anal atresia, anal stenosis

*Source:* Brent and Holmes (1988), compiled from numerous sources.

<sup>a</sup> Other than those tabulated in Table 3-2.

### 図 3-3 サリドマイドによる代表的な症状 (JL 2000)

耳，四肢，眼，顔，中枢神経系および内臓に異常が現れる。

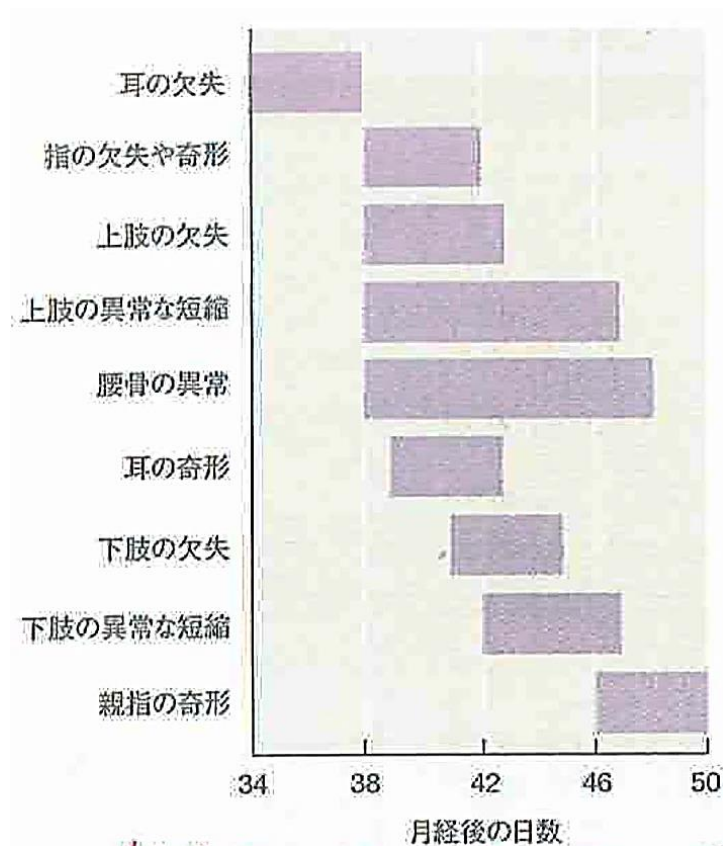


図 3-4 サリドマイドの服用時期と胎児に現れる催奇形性の症状 (Gilbert 2012)

月経後の日数から 14 日を引いたものが受精後の日数に相当する。受精後 20 日前後の服用では、耳の欠失、親指の重複、心臓の発達異常などが生じることが報告されている。

### 3.3 hiPSCs とヒトの胎児発達

ESCs (胚性幹細胞, embryonic stem cells) および iPSCs は, 様々な種類の組織細胞へと分化する多能性および自己と同じ性質を維持したまま無限に分裂・増殖できる自己複製能を有する細胞として定義される。これらの細胞は, 再生医療, 創薬および器官発生研究のソースとして, 広範な応用が期待されている。

ESCs は, 受精後数日の胚盤胞から内部細胞塊と呼ばれる細胞を取り出し, フィーダー上で培養することにより作製される (図 3-5)。1981 年にマウスで (Evans and Kaufman 1981), 1998 年にヒトで (Thomson, *et al.* 1998) それぞれ樹立された。ES 細胞には二つの大きな問題が指摘されている。その一つは, 倫理的, 宗教的な問題である。ヒト ES 細胞の樹立には不妊治療で生じた余剰胚を用いるため, 胚を破壊して作ることに對して生命の滅失との捉え方もある。もう一つは, 移植時の拒絶反応である。患者由来の ES 細胞を作ることは技術的に困難であり, 他人の ES 細胞から作った組織や器官を移植した場合, 遺伝情報の不一致から拒絶反応が起こる。この問題に對処すべく, 徐核した卵母細胞へ体細胞の核を移植することにより胚を作製する方法を用いて胚性幹細胞が作製された (Noggle, *et al.* 2011, Tachibana, *et al.* 2013)。しかし, ヒトの卵子を使用しているため, 倫理的な問題は依然として残っている。

ESCs における問題を解決したのが iPSCs である。2006 年にマウスで樹立され (Takahashi and Yamanaka 2006), 2007 年にはヒトでの成功が報告された (Takahashi, *et al.* 2007, Yu, *et al.* 2007)。マウス iPSCs はマウス ESCs で発現していた 4 つの遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) をレトロウイルスベクターを用いてマウスの繊維芽細胞に導入することで樹立された。同じ 4 つの転写因子を, ヒトの皮膚から採取された繊維芽細胞に導入することで樹立されたのが hiPSCs である (図 3-6)。

hiPSCs は受精卵の胚盤葉上層と同質性を有している (Nichols and Smith 2009) (図 3-7, 3-8)。生体内において、この受精卵の胚盤葉上層と呼ばれる細胞層は、原腸形成を経て、3 つの胚葉 (内胚葉、中胚葉および外胚葉) へと分化する (ただし、内胚葉および中胚葉へは、中内胚葉を経る)。各胚葉からは、個別の組織や器官が分化し、やがて胎児の体へと発達していく。これらの分化とは別に、ごく一部の細胞は胚体外胚葉へと分化するが、これは、胎児の体を構成せず、胎盤や臍帯となる (図 3-7)。これに対し、未分化な hiPSCs は、受精後 8-14 日の受精卵の胚盤葉上層と同質性を有しており、*in vitro* において 3 つ全ての胚葉へと分化することができる (Takahashi, *et al.* 2007, Yu, *et al.* 2007)。また、胚体外胚葉への分化誘導が可能であることも報告されている (Xu, *et al.* 2002) (図 3-7)。つまり、理論的には、hiPSCs を用いて様々な方向へと分化誘導を行うことで、ヒトの胎児発達を模倣することが可能となる。そこで、本研究では、hiPSCs を用いてヒトの初期胎児発達における細胞の分化を模倣し、サリドマイドの影響を調べた。

サリドマイドの催奇形性は、受精後 20-36 日に妊婦が服用した場合に現れることが報告されている (JL 2000, Nowack 1965) (図 3-8, 3-9)。この期間は絶対過敏期と呼ばれ、細胞が分化し、胎児の体の重要器官が形成される時期である (図 3-8, 3-9)。サリドマイドの影響が現れる最初期 (受精後 20 日前後) の胚において、胚盤葉上層は、原腸形成を経て各胚葉へと分化する段階にある (図 3-9)。このことから、私は、サリドマイドが細胞の初期分化を阻害することにより、胎児の発達に異常が生じると予想した。受精後 20 日前後の期間は、hiPSCs を約 1 週間分化させる期間に相当する。そこで、この過程にサリドマイド曝露を行えば、同薬の影響 (細胞死または分化マーカー発現の阻害) を検出できると仮説を立てて実験を行った。サリドマイドは、妊婦が服用した時期と胎児に現れる催奇形性の症状に相関があり、同薬の催奇形性で最も多く見られる四肢の形成異常は、受精後 24 日以降に妊婦が服用したときに現れる (図 3-4)。本研究においても、当初、hiPSCs を用いてこの期間を模倣し、

サリドマイドが四肢形成に及ぼす影響（細胞傷害性または骨分化マーカー発現の阻害）を調べることを考えた。しかし，分化誘導の期間が長期に及ぶことや技術的に困難であったことから，より早い時期におけるサリドマイドの影響に焦点を当てた。本研究で模倣する受精後 20 日頃の服用で胎児に現れる催奇形性の症状としては，耳の欠損や親指の重複（軟骨や骨，血管の形成不全），心臓の形成異常が含まれる（図 3-4）。これらはいずれも中胚葉から派生する組織であることから，初期の中胚葉分化を阻害することで発達に異常が生じていることが予想される。したがって，初期の中胚葉分化の過程を hiPSCs を用いて模倣し，サリドマイド曝露を行えば，同薬が及ぼす影響（中胚葉分化における細胞の傷害または中胚葉分化マーカー発現の阻害）を検出できると考えた。

本研究では，未分化な hiPSCs (将来の胎児の体)，hiPSCs を初期胚体外胚葉（未分化な hiPSCs と対照的に，胎児の体を構成しない分化方向：将来の胎盤や臍帯）および初期中胚葉（将来の骨・血管）へと分化させる過程にサリドマイド曝露を行い，各細胞分化段階における同薬の影響を調べた。

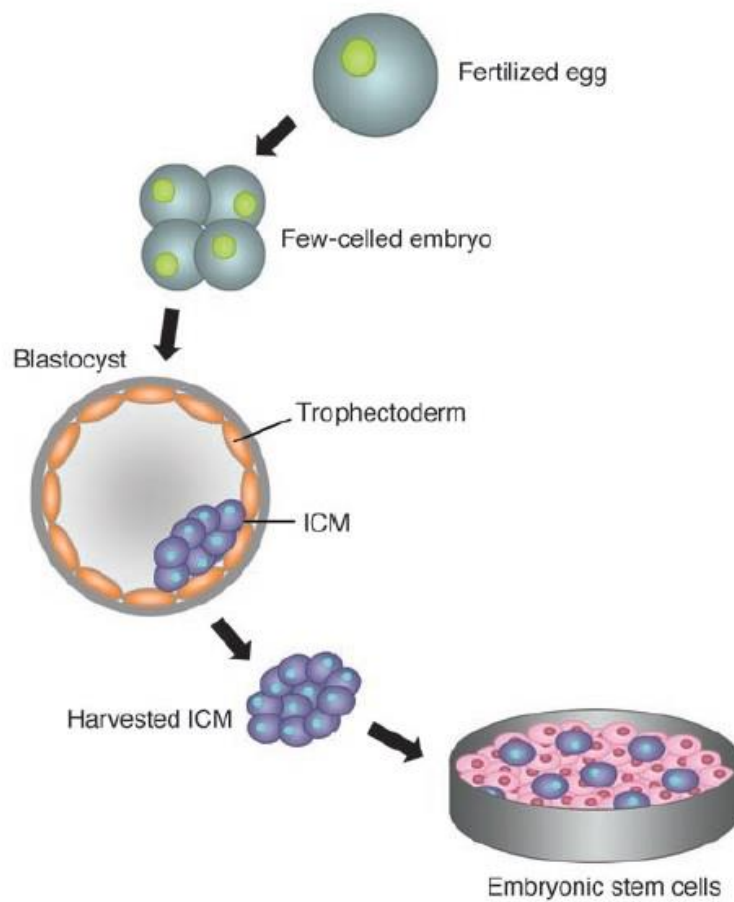


図 3-5 hESCs の概念図

(Landry and Zucker 2004)

hESCs は, 受精後数日の胚盤胞から内部細胞塊を取り出し, 培養することにより作製される。

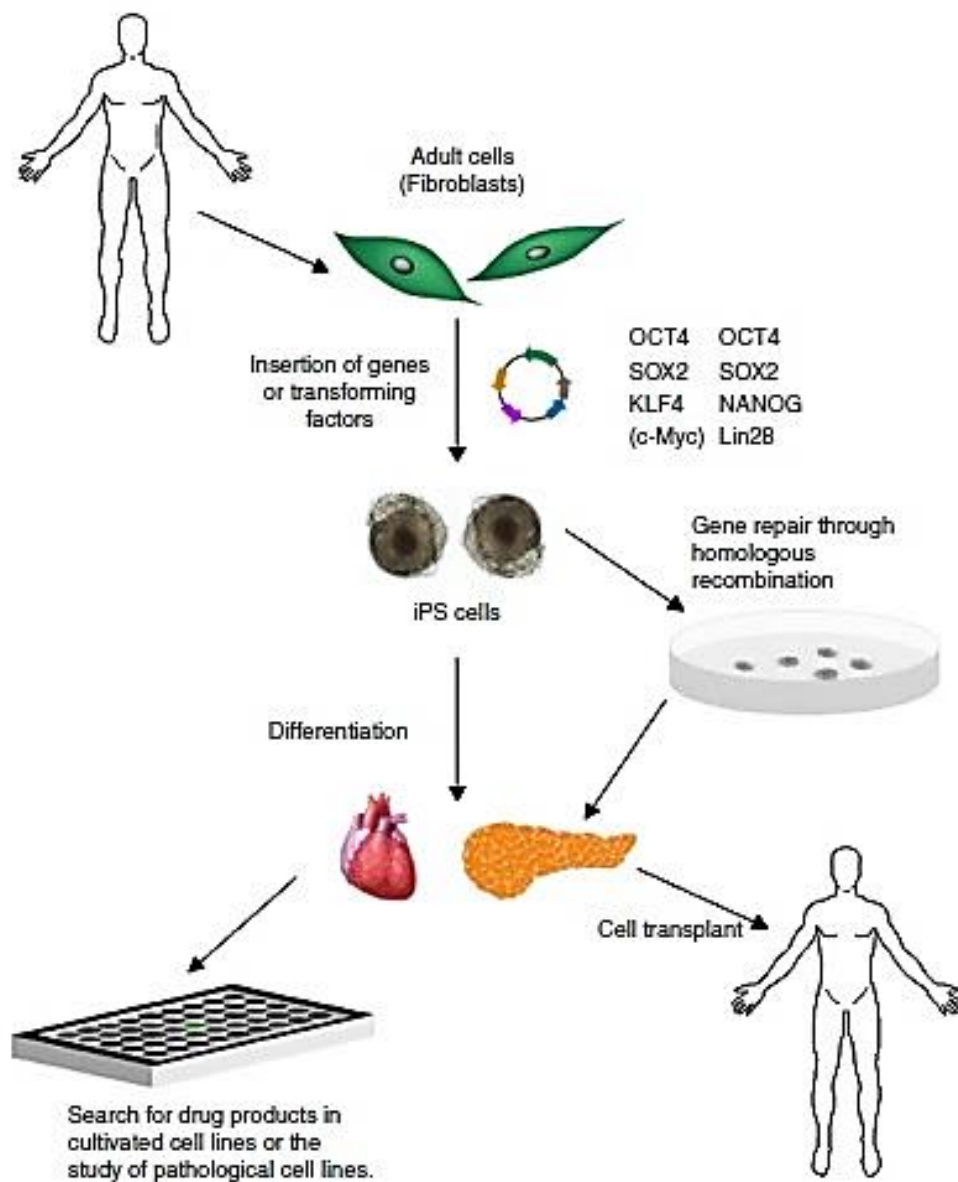


図 3-6 hiPSCs の作製法と応用例

(Aznar and Tudela 2017)

hiPSCs は、ヒトの体細胞（繊維芽細胞）に 4 つの転写因子を導入することで作製される。

hiPSCs を用いて様々な組織や器官の作製が可能であり、移植や遺伝子治療への応用のみならず、

薬剤の効果を調べるためのツールとしても使用される。

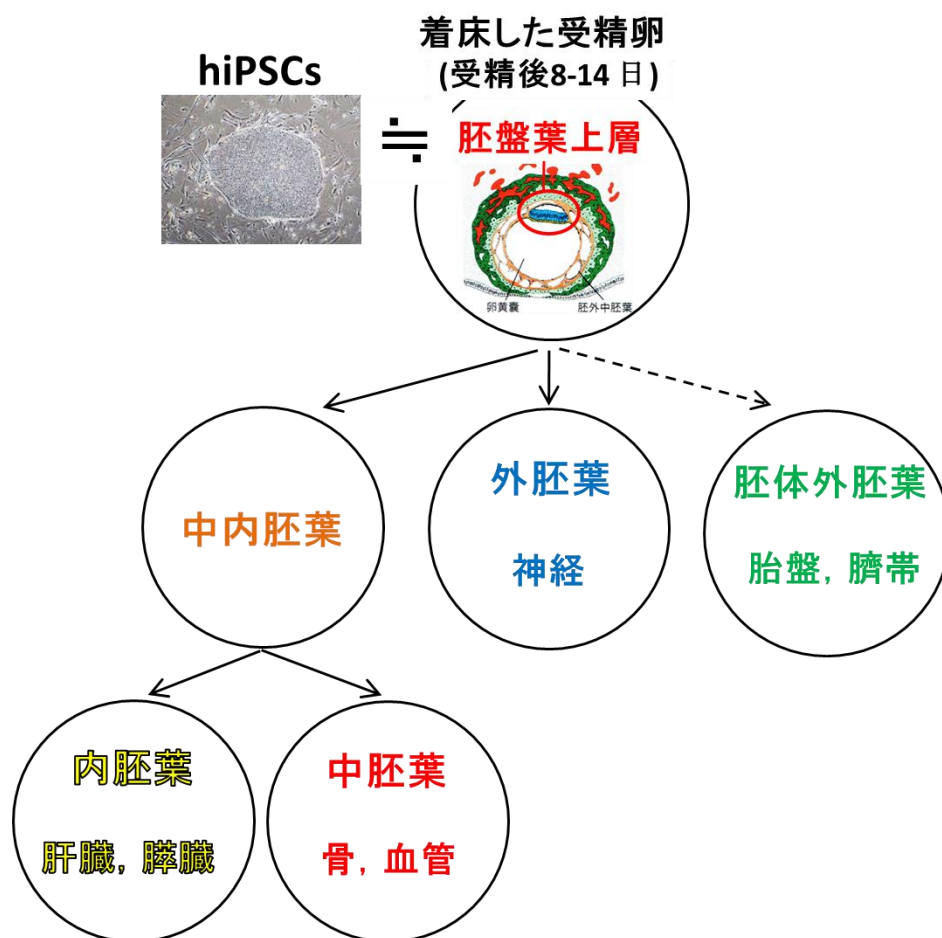


図 3-7 受精卵 (胚盤葉上層) および hiPSCs の分化

生体内において、受精卵の胚盤葉上層は、内胚葉 (将来的の肝臓や脾臓)，中胚葉 (将来の骨・血管)，外胚葉 (将来の神経) へと分化する (ごく一部は胚体外胚葉へと分化し，胎盤や臍帯を形成する)。hiPSCs は受精後 8-14 日の胚盤葉上層と同質性を有しており，*in vitro* で全胚葉への分化が可能である。



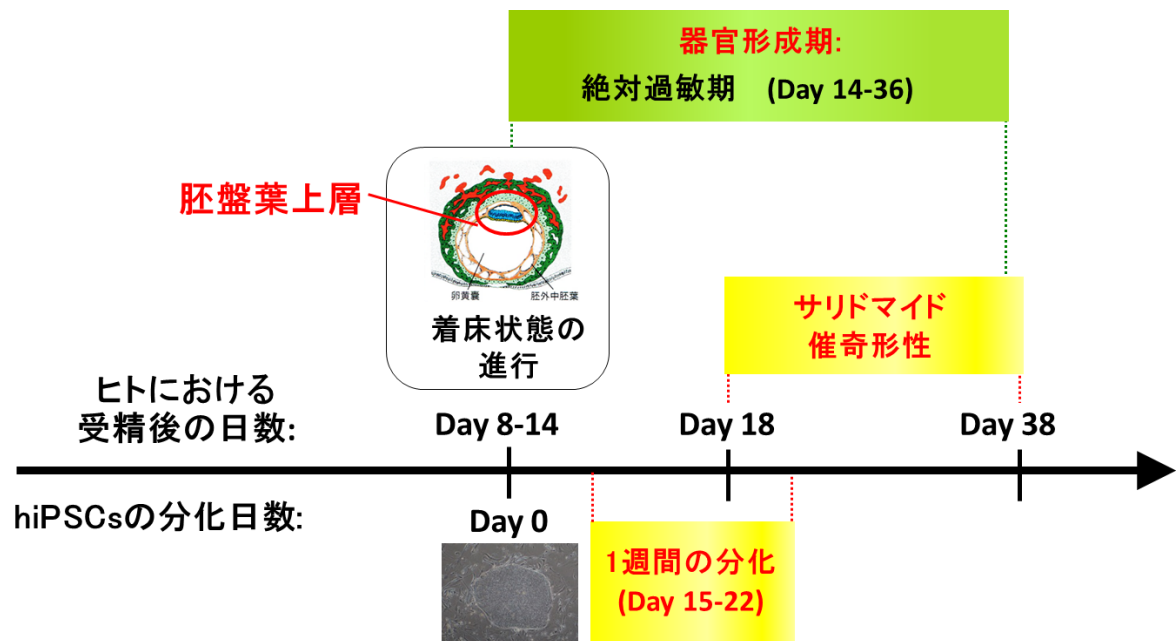
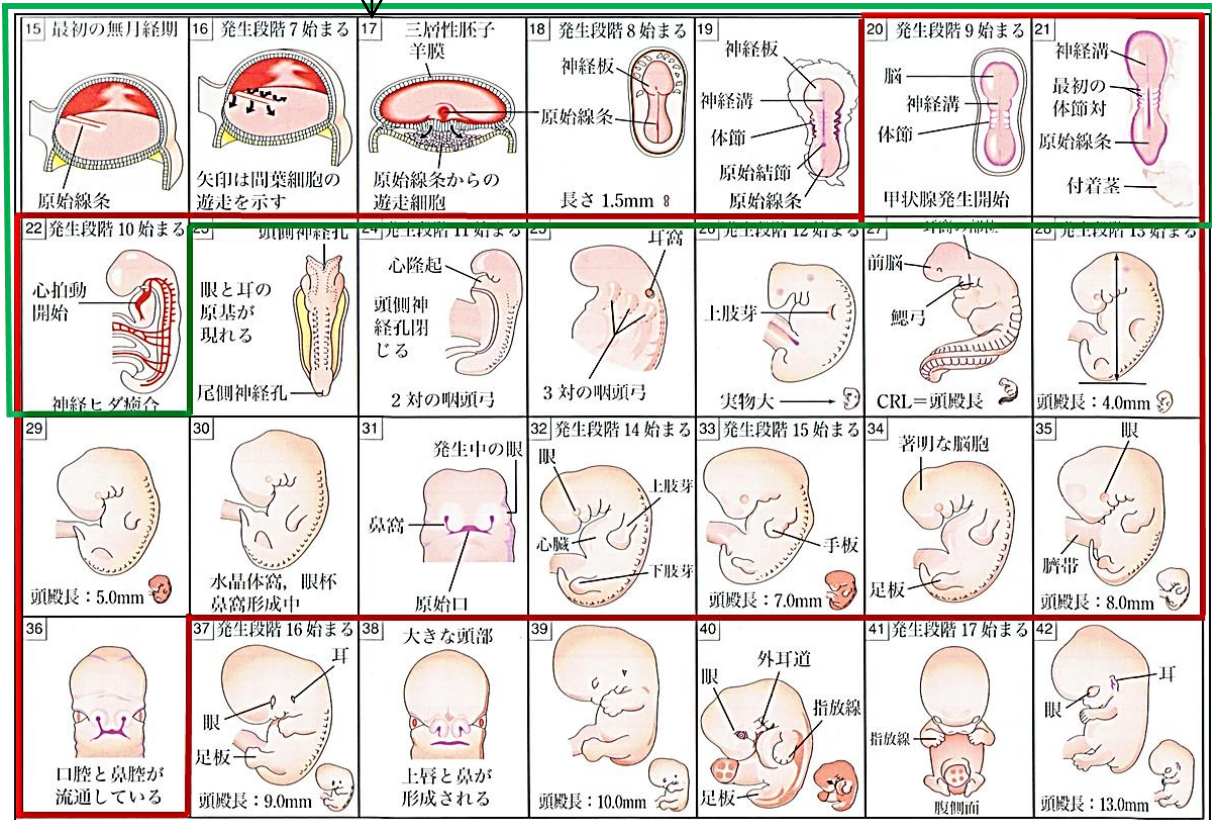


図 3-8 hiPSCs とヒトの胚発達

サリドマイドは受精後 20-36 日に妊婦が服用した場合に胎児に催奇形性が現れることが報告されている。hiPSCs を約 1 週間分化誘導する期間を観察することは、受精後 15-22 日の胚の観察と同義になる。

## hiPSCsの1週間の分化誘導に対応する期間

受精後 17 日：胚盤葉上層の細胞が遊走を始め、三胚葉が形成されていく。



## 妊婦が服用した場合に催奇形性が生じる期間

図 3-9 器官形成期 (受精後 15 日から 36 日) におけるヒトの胎児発達

(Keith I. Moore 2015)

赤枠はサリドマイドを妊婦が服用した場合に催奇形性が生じる期間 (受精後 20 日から 36

日), 緑枠は hiPSCs の 1 週間の分化誘導に対応する期間 (受精後 15 日から 22 日) を示す。

緑枠の期間 (hiPSCs の 1 週間の分化誘導に対応する期間) を模倣・観察することは、妊婦が

サリドマイドを服用した場合に胎児に催奇形性が現れる最初期の胚を観察することと同義

になると考えられる。この期間, 受精卵の胚盤葉上層の細胞は, 原始線条からの遊走 (原腸

形成: 受精後 17 日) を経て, 内胚葉・中胚葉・外胚葉へと分化する時期にあたる。

### 3.4 多能性幹細胞を用いた *in vitro* 胎児毒性試験

多能性幹細胞の分化能を利用することにより、胎児期の発達を模倣できるという考え方から、これらの細胞の胎児毒性試験への応用が進められている。その一つが、ヨーロッパの動物実験代替法の推進機関である European Center for the Validation of Alternative Methods が提唱するマウス胚性幹細胞試験 (mouse embryonic stem cell test, mEST) (Seiler and Spielmann 2011) である。mEST では、薬剤の胎児毒性リスクの主な指標として、mESCs の心筋分化を利用している。しかし、サリドマイドの作用は動物種間で異なるため、mEST のテスト結果からヒト胎児へのリスクを予想することは難しい。このような問題を解決するため、近年、mEST を hESCs および hiPSCs で代替する試みがなされている。サリドマイドについても、mEST を基礎として、hiPSCs を用いて細胞の生存および心筋分化への影響を調べた報告 (Aikawa, *et al.* 2014) や成熟した神経細胞への分化に対する影響を調べた報告 (Qin, *et al.* 2012) がある。しかし、細胞が特定の組織へと分化する前のより早期におけるサリドマイドの影響を調べたという報告は少ない (Kameoka, *et al.* 2014)。本研究においても、細胞の各胚葉への分化の最初期に注目し、サリドマイドの影響の検出を試みた。早期における薬剤の影響が検出可能となれば、特定の組織への影響を調べるよりも効率よく、各胚葉から発生する組織の発達への影響を予測することも可能となる。こうした理由から、本研究で用いた実験系は、他薬の胎児毒性リスク評価および新薬のスクリーニングにも応用可能と考える。

## 第4章 未分化な hiPSCs および hiPSCs の初期胚体外胚葉分化へのサリドマイドの影響

### 4.1 目的

hiPSCs は受精後 8-14 日の受精卵の胚盤葉上層と同質性を有する (Nichols and Smith 2009)。この細胞層は、生体内において、原腸形成を経て三胚葉 (内胚葉, 中胚葉, 外胚葉) へと分化し、やがて胎児の体へと発達していく (Keith I. Moore 2015)。したがって、理論的には、hiPSCs を用いて分化誘導を行うことで、ヒトの胎児発達を模倣することが可能となる。

また、サリドマイドの催奇形性は、妊婦が受精後の 20-36 日に服用した場合に生じることが報告されている。サリドマイドの影響が現れる最初期 (受精後 20 日前後) の胚において、胚盤葉上層は、各胚葉へと分化する段階にある (図 3-9)。このことから、サリドマイドが細胞の初期分化を阻害することにより、各胚葉から発生する胎児の組織・器官の発達に障害が引き起こされることが予想される。受精後 20 日前後の胚は、hiPSCs を約 1 週間分化させる期間に相当する。本研究では、この過程にサリドマイド曝露を行い、同葉がヒトの初期胎児発達 (細胞の初期分化) に及ぼす影響を調べた。

第4章では、未分化な hiPSCs (将来の胎児の体) および初期胚体外胚葉 (将来の胎盤) への分化過程にサリドマイド曝露を行うことで同葉の影響を検出し、胎児発達に及ぼす影響について新たな知見を得ることを目的として実験を行った。私は、未分化な hiPSCs において、服用されている濃度の範囲内ではサリドマイドの影響は少ないと予想した。これは、生体内におけるこの時期の細胞が高い修復能を有しており (Lewis Wolpert 2012)、ダメージが少ない場合、胚は修復されて正常発生に至るとの理由である。しかし、サリドマイドによる出生前の流産も多く (Schardein J 2000)、胚発生初期に胚が深刻なダメージを受けて修復できなかった場合、その胚は発生しないことも考えられる。このように、この時期の胚に

対するサリドマイドの影響は明らかになっておらず、本研究で用いた *in vitro* システムにより新たな知見を得ることを期待した。一方、胚体外胚葉への分化誘導は、未分化な hiPSCs とは逆に胎児の体にならない方向への分化を意味しており、サリドマイドの催奇形性とは関係しないと予想した。したがって、サリドマイドの影響が検出されないネガティブコントロールとしての意味合いを含めてこの条件を設定した。

hiPSCs の初期胚体外胚葉への分化誘導には 2002 年に報告された hESC の胚体外胚葉への分化方法を参考にして、骨形成タンパク質・BMP-4 (bone morphogenetic protein-4, 骨形成タンパク質-4) を用いた (Xu, *et al.* 2002)。本研究においては、4 日間の BMP-4 添加により、hiPSCs の分化誘導を行った。サリドマイド曝露は分化誘導と同時に行い、細胞傷害性および分化マーカー発現の解析によって同薬の影響を評価した。

4 章の大部分は論文「Thalidomide induces apoptosis in undifferentiated human induced pluripotent stem cells」(Tachikawa, *et al.* 2017) として公表している。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 hiPSCs の血清・フィーダー培養

本研究を通して、hiPSC 201B7-0063 株 (Takahashi, *et al.* 2007) を主な細胞株として用いた。hiPSC 201B7-0063 株は、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトを通して RIKEN BRC Cell Bank (ibaraki, japan) より入手した。hiPSC iSB7-M3 細胞株 (Ando, *et al.* 2015, Nishimura, *et al.* 2013) は、スタンフォード大学中内研究室より入手した。hiPSC OSKM4 細胞株は、奈良先端科学技術大学院大学栗崎研究室より入手した。

hiPSCs は表 4-1 に示すように DMEM/F12 (11330-032, Thermo Fisher Scientific) に KSR (knockout serum replacement, 血清代替物質, 10828-028, Thermo Fisher Scientific), MEM non-essential amino acids (11140050, Thermo Fisher Scientific), Penicillin-streptomycin (I550,

Sigma Aldrich), 2-mercaptoethanol (M6250, Sigma Aldrich, St. Louis MO USA), bFGF (basic fibroblast growth factor, 塩基性繊維芽細胞成長因子, 068-04544, Wako) を添加した KSR 培地を用いてフィーダー細胞 (MEF: mouse embryonic fibroblast, マウス胚性繊維芽細胞) 上で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> に設定したインキュベーター内で培養した。継代時にはディッシュから培地を除去し, PBS (phosphate buffered saline, リン酸緩衝液, pH7.4) で洗浄後, 0.5 U Dispase (7105-041, Life Technologies, Carlsbad CA USA) を加えて 3 分間 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) インキュベートした。Dispase を除去した後, KSR 培地を加えて洗浄し, ピペッティングにより 15 mL 遠沈管に回収した。細胞は 50 g, 1 分間遠心し, 上清を除いた後に KSR 培地に懸濁した。細胞死を防ぐため, ROCK 阻害剤 (Rho-associated coiled-coil forming kinase, Rho 結合キナーゼ, Y27632, 253-00513, Wako) を添加した (最終濃度 5  $\mu$ M)。フィーダー細胞は mytomycin C で処理したものを扱い, hiPSCs の継代の前日に 0.1% ゼラチンコートしたディッシュに播種し, DMEM-high glucose (043-30085 Wako) に 10% FBS (fetal bovine serum, ウシ胎児血清) および 1% Penicillin を添加した培地を用いて培養した。PBS で洗浄後, 調整した hiPSCs の懸濁液を添加した。

表 4-1 KSR 培地の組成

試薬	最終濃度
DMEM/F-12	
KSR	20%
MEM non-essential amino acids	1%
Penicillin-streptomycin	1%
2-mercaptoethanol	0.1 mM
bFGF	5 ng/mL

#### 4.2.2 hiPSCs の無血清・無フィーダー培養

血清・フィーダー培養した hiPSCs を無血清・無フィーダー培養に馴化させた。無血清・無フィーダー培養には mESF Basal Medium (130-17805, Wako) に Insulin (I-5500, Sigma Aldrich), Transferrin (T-1147, Sigma Aldrich), Ethanolamine (E-0135, Sigma Aldrich), Sodium selenite (S-9133, Sigma Aldrich), 2-mercaptoethanol, L-ascorbic acid-2-phosphate (013-19641, Wako), Oleic Acid-BSA (Oleic Acid : O-1383, Sigma Aldrich, bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン : A8806, Sigma Aldrich), Heparin sodium (H-3149, Sigma Aldrich), bFGF, Activin A (R&D systems, Minneapolis MN USA) を添加した ESF9a 培地 (表 4-2) を用いた (Hayashi, *et al.* 2010)。ディッシュはフィブロネクチン (F-1141, Sigma Aldrich,  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) で  $37^\circ\text{C}$ , 3 時間コートした。血清・フィーダー培養した hiPSCs から培地を除去し, PBS で洗浄後, 0.5 U Dispase を添加して 3 分間 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) インキュベートした。Dispase の除去後, ESF9a 培地を加えて洗浄し, セルスクレーパーを用いて細胞を剥離させ 15 mL 遠沈管に回収した。50 g, 1 分間遠心し, 上清を除いた後に ESF9a 培地に懸濁した。ROCK 阻害剤を培地に添加し (最終濃度  $5 \mu\text{M}$ ), フィブロネクチンを除去したディッシュに播種した。

実験に使用する際は, 無血清・無フィーダー培養条件下で 2 継代以上したものを用いた。

hiPSCs iSB7-M3 細胞株は, Essential 8 (A1517001, Thermo Fisher Scientific) 培地を用い, ビトロネクチン (A14700, Thermo Fisher Scientific,  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) でコートしたプレート上で維持・培養した。

表 4-2 E9a 培地の組成

試薬	最終濃度
mESF basal medium	
Insulin	10 µg/mL
Transferrin	5 µg/mL
Ethanolamine	10 µM
Sodium selenite	20 nM
2-mercaptoethanol	10 µM
L-ascorbic acid-2-phosphate	100 ng/mL
Oleic Acid-BSA	OA 9.4µg/mL, BSA 1mg/mL
Heparin	0.1µg/mL
bFGF	10 ng/mL
Activin A	2 ng/mL

#### 4.2.3 サリドマイドの調製

サリドマイド (+/-Thalidomide, 200-15131, Wako) は DMSO (dimethyl sulfoxide, ジメチルスルホキシド, D2650, Sigma Aldrich) に溶解後、遮光チューブに分注し、-80℃で保存した(ストック濃度 50 mg/mL)。DMSO の最終濃度は全実験において 0.1% となるように調整した。

#### 4.2.4 未分化な hiPSCs へのサリドマイド曝露

サリドマイド曝露のスケジュールは、図 4-1 に示した。

無血清・無フィーダー培養した hiPSCs から培地を除去し、PBS で洗浄した後に 0.02%



ethylenediaminetetraacetic acid -4NA (343-01883, Dojindo)-PBS を添加した。10 分間 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) のインキュベート後、ピペッティングにより細胞を剥離し、15 mL 遠沈管に回収した。細胞は 300 g, 3 分間遠心し、上清を除去後、ROCK 阻害剤 (最終濃度 5 μM) を添加した ESF9a 培地に懸濁した。プレートはフィブロネクチンでコートし (96 ウェルプレート : 5 μg/cm<sup>2</sup>, 12 ウェルおよび 6 ウェルプレート : 2 μg/cm<sup>2</sup>), 37°C, 3 時間インキュベートした。

フィブロネクチンを除去後、細胞を  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように播種した。24 時間後、培地を半量除去し、サリドマイドが最終濃度の 2 倍濃度となるように調整した ESF9a 培地 (サリドマイドの最終濃度 : 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 μg/mL) を添加した。Day 2 に培地を全量交換し、計 4 日間のサリドマイド曝露を行った。

#### 4.2.5 hiPSCs の初期胚体外胚葉への分化誘導およびサリドマイド曝露

サリドマイド曝露および分化誘導のスケジュールは、図 4-1 に示した。細胞は 4.2.4 と同様の方法で回収および播種した。細胞の播種から 24 時間後、サリドマイド (最終濃度 : 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 μg/mL) と同時に BMP-4 (314-BP-010, R&D Systems, 最終濃度 10 ng/mL) を添加し、初期胚体外胚葉への分化誘導を行った。BMP-4 はサリドマイド曝露とともに計 4 日間細胞に添加した。

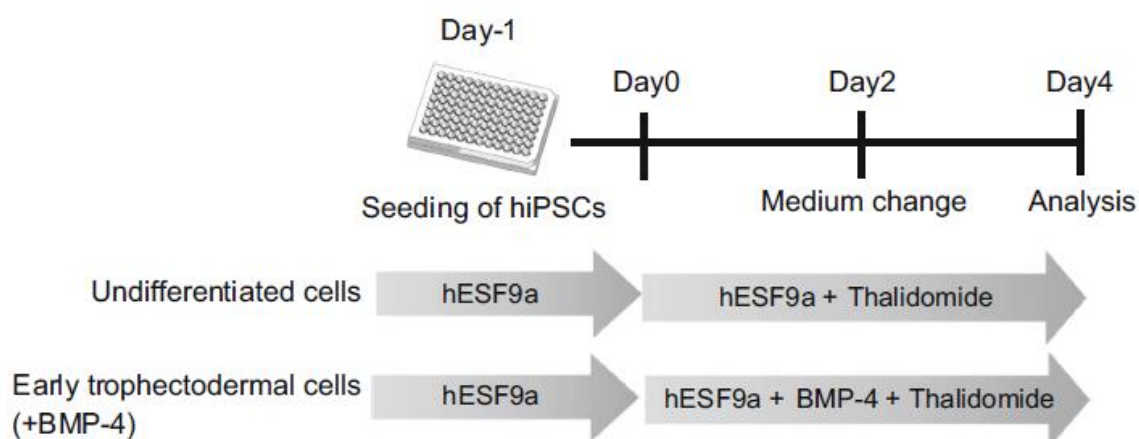


図 4-1 未分化な hiPSCs および hiPSCs の初期胚体外胚葉分化過程へのサリドマイド曝露のスケジュール (Reprint permission)

#### 4.2.6 免疫染色

96 ウェルプレートで培養した細胞から培地を除き、0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  および 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  含有 PBS (PBS+/+) で 2 回洗浄した後、4% Paraformaldehyde (163-20145, Wako, Osaka Japan) を用いて室温で 10 分間固定した。PBS+/+ で 2 回洗浄後、ブロッキングバッファー (10 mg/mL BSA 含有 PBS+/+) を添加し、室温で 60 分間ブロッキングした。細胞内抗原の染色には、ブロッキングバッファーに 0.2% TritonX (020-81152F, KISHIDA CHEMICAL, Osaka Japan) を添加し、ブロッキングと同時に透過処理を行った。ブロッキングバッファーを除去した後、一次抗体を添加して 4°C で一晩静置した。PBS+/+ で 3 回洗浄後、二次抗体を添加して室温で 1 時間半ブロッキングしながら反応させた。抗体の希釈には、ブロッキングバッファー (細胞内抗原の染色時には 0.2% Triton X を含むものを使用) を用いた。PBS+/+ で 3 回洗浄後、同緩衝液を満たし、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8000 (Keyence, Ohsaka, Japan) を用いて観察を行った。使用した一次抗体および二次抗体は表 4-3 に示した。

表 4-3 抗体情報

Markers	Primary antibody	Secondary antibody
SSEA1 初期分化	Anti-human SSEA-1(480) Mouse monoclonal IgM sc-21702, SantaCruz <sup>1</sup> Dilution 1/100	Goat anti-mouse IgM (μ chain) Alexa Fluor 546 A21045, Life Technology <sup>2</sup> Dilution 1/500
		Goat anti-mouse IgM (μ chain) Alexa Fluor 488 A21042, Life Technology <sup>2</sup> Dilution 1/500
SSEA4 未分化	Anti-human SSEA-4(813-70) Mouse monoclonal IgG3 sc-21704, SantaCruz <sup>1</sup> Dilution 1/100	Goat anti-mouse IgG3 (γ3) Alexa Fluor 488 A21151, Life Technology <sup>2</sup> Dilution 1/500
TRA-1-60 未分化	Anti-human TRA-1-60 Mouse monoclonal IgM sc-21705, SantaCruz <sup>1</sup> Dilution 1/300	Goat anti-mouse IgM (μ chain) Alexa Fluor 546 A21045, Life Technologies <sup>2</sup> Dilution 1/500
CYTOKERATIN 胚体外	Anti-human cytokeratin 7 (OV-TL 12/30) Mouse monoclonal IgG1 M7018, DAKO <sup>3</sup> Dilution 1/100	Goat anti-mouse IgG1 (γ1) Alexa Fluor 488 A21121, Life Technology <sup>2</sup> Dilution 1/500
CDX2 胚体外/ 初期中胚葉	Anti-human cdx2 (AMT28) Mouse monoclonal IgG1 ab15258, Abcam <sup>4</sup> Dilution 1/100	Goat anti-mouse IgG1 (γ1) Alexa Fluor 488 A21121, Life Technology <sup>2</sup> Dilution 1/500
BRACHYURY (T) 中内胚葉	Anti-human Brachyury Goat polyclonal IgG AF2085, R&D Systems <sup>5</sup> Dilution 1/20	Rabbit anti-goat IgG (H+L) Alexa Fluor 488 A21222, Life Technologies <sup>2</sup> Dilution 1/500

SOX17 内胚葉	Anti-human SOX17 Goat polyclonal IgG AF1924, R&D Systems <sup>5</sup> Dilution 1/100	Donkey anti-goat IgG (H+L) Alexa Fluor 546 A11056, Life Technologies <sup>2</sup> Dilution 1/500
FOXA2 内胚葉	Anti-HNF3β/FOXA2 Rabbit polyclonal IgG 03-633, Merck <sup>6</sup> Dilution 1/100	Chicken anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 A21441, Life Technologies <sup>2</sup> Dilution 1/500
Ki-67 細胞周期 関連	Anti-human Ki-67/MK167 Rabbit polyclonal IgG NB110-89717SS, Novus Biologicals <sup>7</sup> Dilution 1/100	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 A11034, Life Technology <sup>2</sup> Dilution 1/500

<sup>1</sup> SantaCruz Biotechnology, Inc., CA, USA.

<sup>2</sup> Life Technology Inc., Carlsbad, California, USA.

<sup>3</sup> DAKO, Glostrup, Denmark.

<sup>4</sup> Abcam, Cambridge, UK.

<sup>5</sup> R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

<sup>6</sup> Merk, Billerica, MA, USA

<sup>7</sup> Novus Biologicals, Littleton, CO, USA.

#### 4.2.7 フローサイトメトリー解析

6 ウェルプレートで培養した細胞から培地を除き，PBS で洗浄後 TrypLE™ select (12563-011, Thermo Fisher Scientific) を添加して 37℃で 3 分間インキュベートした。ピペッティングにより 15 mL 遠沈管に回収し，300 g，3 分間遠心した。上清を除き，4% Paraformaldehyde を用いて室温で 20 分間固定した。600 g，3 分間の遠心後，上清を除去し，ブロッキングバッファー (10 mg/mL BSA 含有 PBS) を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。細胞内抗原の染色には，ブロッキングバッファーに 0.2% TritonX を添加し，ブロッキングと同時に透過処理を行った。600 g，3 分間の遠心後，上清を除去し，一次抗体を

添加した。4℃一晩のインキュベート後、PBS で洗浄した。二次抗体を添加し、4℃で 30 分インキュベートした。抗体の希釈には、ブロッキングバッファー（細胞内抗原の染色時には 0.2% Triton X を含むものを使用）を用いた。PBS で洗浄後、アッセイバッファー（1 mg/mL BSA 含有 PBS）に再懸濁した。使用した一次抗体および二次抗体は表 4-3 に示した。解析には FACSCalibur (BD Bioscience, La Jolla, CA, USA) を用いた。

#### 4.2.8 生細胞数測定

生細胞数の測定のため、Cell Counting Kit-8 (343-07623, Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いた。本キットは、生細胞内脱水素酵素により生成される発色基質・水溶性ホルマザンの吸光度を測定することで生細胞数を計測する。

96 ウェルプレートで培養した細胞から培地を除去し、キットに付属しているアッセイ溶液と培地 (BSA を 1 mg/mL 含む DMEM-high glucose) を 1 : 9 で混合した溶液を各ウェルに添加した (100  $\mu$ L/well)。37℃, 3 時間インキュベートし、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて吸光度 (450 nm) を測定した。

#### 4.2.9 死細胞数測定

生細胞数の測定のため、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (CK12, Dojindo) を用いた。本キットは、死細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase, LDH) を指標として死細胞 (後期アポトーシスおよびネクローシス細胞) 数を計測する。

12 ウェルプレートで培養した細胞から培養上清を 100  $\mu$ L 採取し、96 ウェルプレートに移した。キットに付属しているアッセイ溶液を 100  $\mu$ L 混合し、プレートを遮光して室温で 3

時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (Model 680) を用いて吸光度 (490 nm) を測定した。

#### 4.2.10 アポトーシスアッセイ

6 ウェルプレートで培養した細胞から死細胞を含む培養上清を全量回収し、15 mL 遠沈管に移した。プレートに残った細胞を TrypLE™ select で剥離し、先に回収した培養上清と混合した。600 g, 3 分間の遠心後、上清を除去した。アポトーシス細胞の検出には、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (K101-100, Nacalai tesque, Fukuoka, Japan) を用いた。キットに付属しているアッセイバッファーに細胞を懸濁し、Annexin V および PI (169-26281, propidium iodide, プロピジウムアイオダイド, Wako) を添加して室温で 5 分間インキュベートした。インキュベートは遮光して行った。死細胞および生細胞の同時検出には、Calcein AM (C-3100, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), および PI の組み合わせを用いた。回収した細胞に Calcein AM を添加し (最終濃度 0.5  $\mu$ M), 37°C, 20 分インキュベートした。600 g, 3 分間の遠心後上清を除去し、アッセイバッファー (1 mg/mL BSA 含有 PBS) に再懸濁した。PI を添加し (最終濃度 5  $\mu$ g/mL), 室温で 5 分間インキュベートした。インキュベートは遮光して行った。解析には FACSCalibur (BD Bioscience, La Jolla, CA, USA) を用いた。

#### 4.2.11 細胞周期解析

細胞周期関連タンパク質 Ki-67 (G0 期の細胞には発現していない) の発現を免疫染色およびフローサイトメトリーを用いて解析した。免疫染色およびフローサイトメトリーの手順は 4.2.6 および 4.2.7 に示した。

#### 4.2.12 qPCR アレイ解析

##### (Quantitative polymerase chain reaction, 定量 PCR)

6 ウェルプレートを用いて hiPSCs を未分化条件 (図 4-1) または初期中胚葉分化条件 (図 5-2) で培養した。サリドマイド曝露は、最終濃度 5  $\mu\text{g/mL}$  で行った。4 日間 (未分化) または 5 日間 (初期中胚葉分化) の分化誘導およびサリドマイド曝露後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、TrypLE™ select (1 mL, 37°C, 3 分インキュベート) を用いて剥離した。続いて 300 g, 3 分の遠心を行い、細胞ペレットを作製した。ペレットは再度 PBS で洗浄し、RNeasy Mini Kit (74104, QUIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。cDNA 合成は RT<sup>2</sup> First Strand Kit (330401, QUIAGEN) を用いた。qPCR アレイプレートには、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays Human Induced Pluripotent Stem Cells (PAHS-092ZE-4, QUIAGEN) を用い、作製した cDNA および RT<sup>2</sup> CYBR Green ROX qPCR Mastermix (330404, QUIAGEN) を混合したものをプレートに添加した。続いて、リアルタイム PCR 装置 Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA) を用いてリアルタイム PCR を実施した。データ解析にはオンライン解析ツール (<https://www.qiagen.com/jp/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) を使用し、0.1%DMSO コントロールに対するサリドマイド曝露実験群の相対的な遺伝子発現の変化を調べた。

#### 4.3 結果

##### 4.3.1 サリドマイドは未分化および胚体外胚葉分化マーカーの発現に影響しない

本研究で用いたプロトコル (図 4-1) において適切に未分化維持および分化誘導ができたことを確認するため、また、サリドマイドによるマーカー発現への影響を調べるため、Day 4 において免疫染色およびフローサイトメトリーを行った。

免疫染色の結果、0.1% DMSO コントロールサンプルにおいて、未分化マーカー (SSEA4 : stage specific embryonic antigen 4) が未分化な hiPSCs でのみ、初期分化マーカー (SSEA1 : stage specific embryonic antigen 1) が初期胚体外分化条件でのみ発現していた (図 4-2 A)。各条件における両マーカーの陽性率を調べるため、フローサイトメトリーを用いた。未分化細胞における SSEA4 陽性細胞の割合は約 98%だった。同様に、初期胚体外胚葉分化条件においても SSEA4 陽性細胞の割合は 90%以上を示した。しかし、未分化細胞とは対照的に、初期胚体外胚葉分化条件下で培養した細胞は、SSEA4 の蛍光強度が低い細胞集団を含んでいた。このことから、初期胚体外胚葉への分化誘導によって SSEA4 の発現が減少したことが示唆された。また、未分化細胞における SSEA1 の陽性率は約 10%だったが、それらの割合は誘導の 4 日目までに約 60%に増加した (図 4-2 B)。

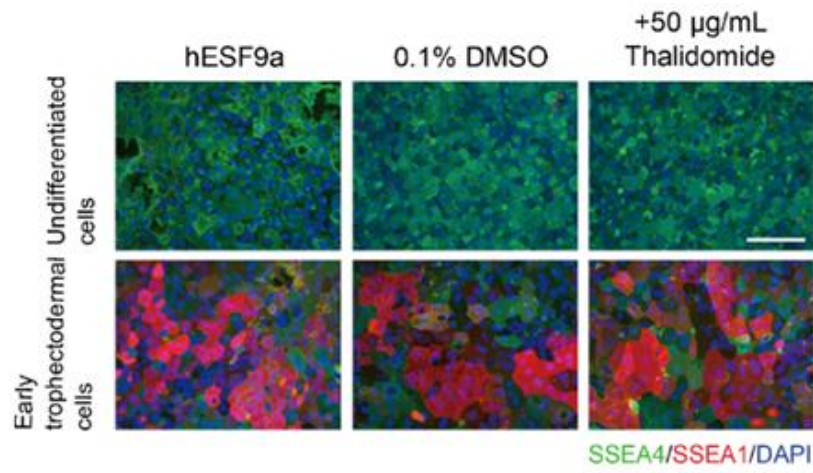
さらに、免疫染色により胚体外胚葉分化マーカー (CYTOKERATIN および CDX2 : caudal-type homeobox protein 2) の発現を調べた。CDX2 は胚体外胚葉分化の最初期に発現することが報告されている (Amita, *et al.* 2013)。0.1% DMSO コントロールサンプルにおいて、CDX2 は未分化・初期胚体外胚葉の両条件ともに発現しておらず、初期胚体外胚葉分化条件でのみ CYTOKERATIN が発現していた (図 4-3)。

以上のことから、本実験で用いたプロトコールにより、hiPSCs の未分化維持および初期胚体外胚葉への分化誘導が適切に行われたことが示された。また、4 日間の胚体外胚葉分化において、細胞は CDX2 が発現する最初期の胚体外胚葉分化を通り過ぎた状態にあることが示唆された。

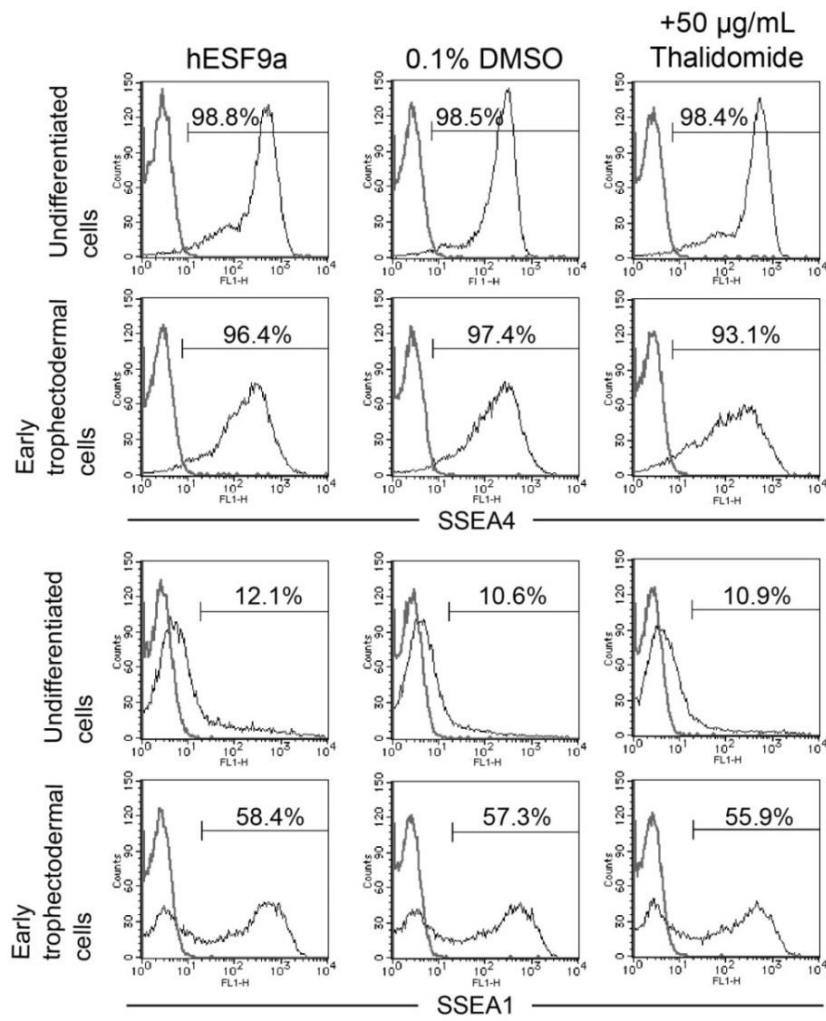
未分化および初期胚体外胚葉分化条件において 4 日間、50  $\mu$ g/mL のサリドマイド曝露を行った後も、未分化、初期分化および胚体外胚葉分化マーカーの発現は変化しなかった (図 4-2 および図 4-3)。このことから、サリドマイドは、細胞の未分化維持または初期胚体外胚葉への分化に影響を与えないことが示唆された。



A



B



**図 4-2 4 日間のサリドマイド曝露後の未分化細胞および初期胚体外胚葉分化細胞における  
初期分化マーカー発現の確認 (Reprint permission)**

(A) 免疫染色による未分化マーカー (SSEA4: 緑) および初期分化マーカー (SSEA1: 赤) の発現解析結果。青色は核 (DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole) , スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

(B) フローサイトメトリーによる未分化マーカー (SSEA4), 初期分化マーカー (SSEA1) の発現解析結果。ヒストグラムの縦軸は細胞数, 横軸は用いた抗体の蛍光強度を示す。灰色の線はネガティブコントロール (二次抗体のみ添加したもの), 黒色の線は各マーカーのシグナルを表す (一次抗体・二次抗体を添加したもの)。ネガティブコントロールのシグナルの陽性率が約 1% となる蛍光強度の範囲にゲート (水平の線) を設定し, 抗体のシグナルの陽性率を求めた。実験は 2 回行い, 同じ傾向が確認された。

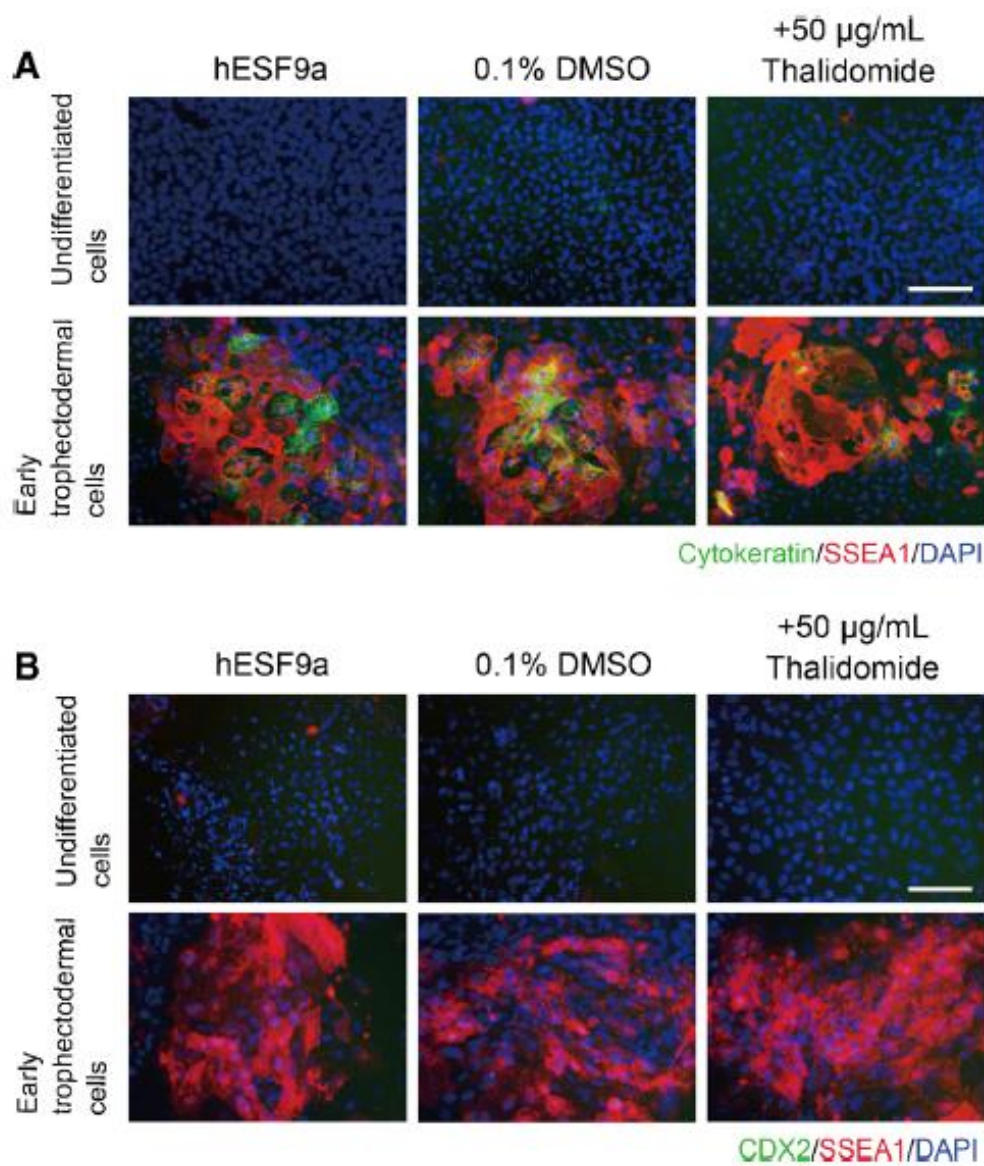


図 4-3 4 日間のサリドマイド曝露後の未分化細胞および初期胚体外分化細胞におけるマーカー発現の解析 (Reprint permission)

(A) 胚体外胚葉分化マーカー (CYTOKERATIN : 緑) および初期分化マーカー (SSEA1 : 赤) の発現解析結果。

(B) 初期胚体外胚葉分化マーカー (CDX2 : 緑) および初期分化マーカー (SSEA1 : 赤) の発現解析結果。両図において青色は核 (DAPI) , スケールバーは 100 µm を示す。

#### 4.3.2 サリドマイドは未分化な hiPSCs の生細胞数を減少させる

サリドマイドが未分化細胞および初期胚体外胚葉分化細胞の増殖に影響を及ぼすかどうかを調べるため、4 日間、7 段階の濃度のサリドマイド曝露後、生細胞数を測定した。その結果、未分化な細胞は、50  $\mu\text{g/mL}$  のサリドマイド曝露により有意に生細胞数が減少した (図 4-4 A)。一方、初期胚体外胚葉分化した細胞では生細胞数は減少しなかった (図 4-4 A)。異なる hiPS 細胞株においても同様の結果が得られた (図 4-4 B)。

これらのことから、未分化な細胞はサリドマイドによって細胞の増殖が阻害されるが、初期胚体外分化した細胞には同薬への耐性があることが示唆された。

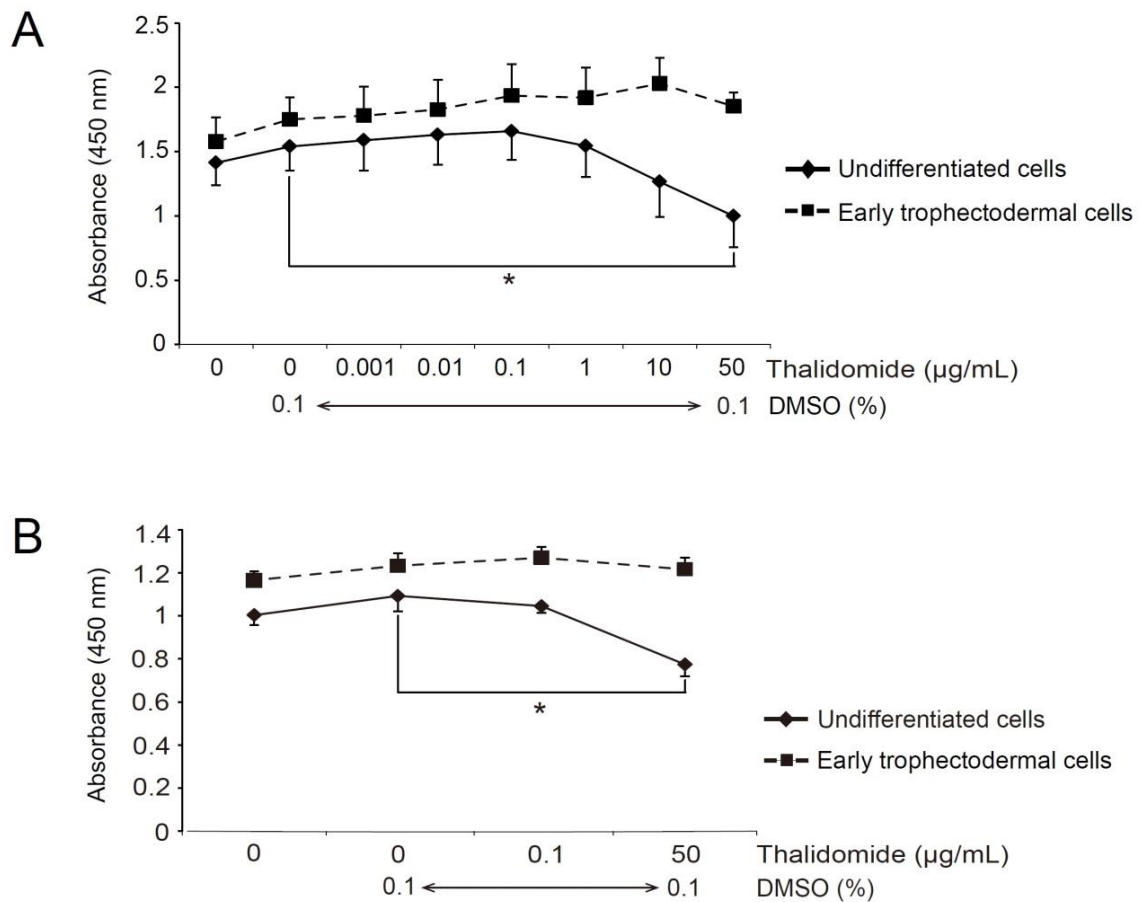


図 4-4 未分化および初期胚体外分化条件における 4 日間のサリドマイド曝露後の生細胞数測定結果 (Reprint permission)

グラフの縦軸は吸光度測定値 (生細胞数に値する) を示す。実線は未分化な hiPSCs, 破線は初期胚体外胚葉分化細胞を示す。

(A) hiPSC 201B7-0063 株, mean ± SE, \*P < 0.05, *t*-test, n=6

(B) hiPSC iSB7-M3 株, mean ± SE, \*P < 0.05, *t*-test, n=4

#### 4.3.3 サリドマイドは未分化な hiPSCs にアポトーシスを誘導する

4日間のサリドマイド曝露により,未分化なhiPSCsの生細胞数が有意に減少した(4.3.2)。この原因の一つに,サリドマイドによって細胞死が誘導されたことが考えられる。そこで,サリドマイド曝露2日目(day 2)および4日目(day 4)に死細胞数を測定した。

その結果, day 2において 50 µg/mL のサリドマイド曝実験群で死細胞数(後期アポトーシスおよびネクローシス細胞数)が有意に増加した(図 4-5 A)。しかし, day 4 では有意な差は見られなかった(図 4-5 B)。このことから, サリドマイド曝露後の早期において, 未分化な細胞に細胞死が誘導されていることが示唆された。Day 4 (day 2 から day 4 の間) においても死細胞の割合は増加している可能性があるが, サリドマイド曝露実験群では, day 2 の時点でプレートに残存している生細胞の数がコントロールに比して減少しているため, LDH 値の増加として反映されなかったのかもしれない。

そこで, サリドマイドによって細胞死が誘導された原因を特定するため, 死細胞数の測定に続いてアポトーシスアッセイを行った。Annexin V および PI 染色による解析の結果, day 2 のサリドマイド曝露実験群において, 初期アポトーシス細胞 (Annexin V 陽性/PI 陰性), 後期アポトーシス細胞およびネクローシス細胞 (Annexin V 陽性/PI 陽性) の割合の増加が認められた(図 4-6 A)。しかし, day 4 においては, これらの細胞集団の割合はコントロールと変わらなかった(図 4-6 B)。Calcein AM および PI 染色による解析からも, day 2 のサリドマイド曝露実験群において死細胞 (Calcein AM 陰性/PI 陽性, 後期アポトーシスおよびネクローシス細胞と同義) の増加が認められた(図 4-6 A)。また, day 4 においてこれらの細胞の割合はコントロールと変わらなかった(図 4-6 B)。

これらの結果から, サリドマイドが曝露後の早い段階 (day 0-2) において未分化な細胞の一部にアポトーシスを誘導するが, 生き残った細胞はサリドマイドに対する耐性を持つこ

とが示唆された。言い換えると、未分化な細胞にはサリドマイドに対して異なる感受性を持つ細胞集団が存在する可能性がある。

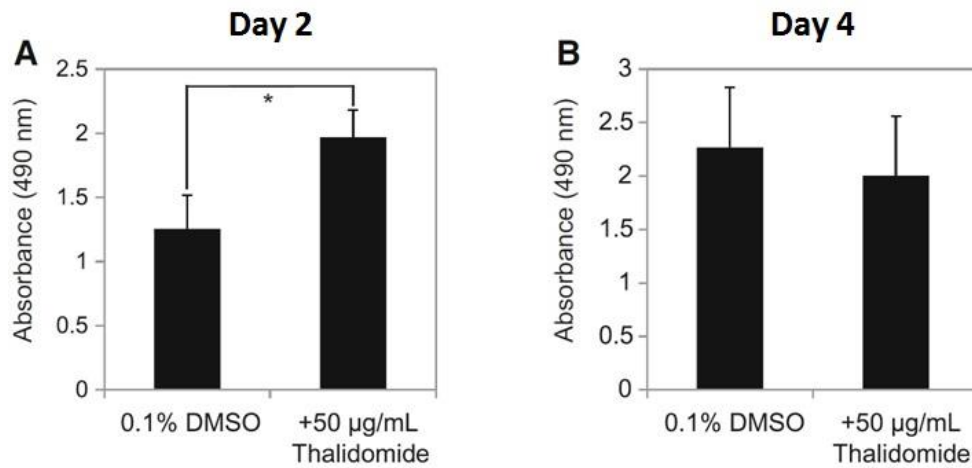


図 4-5 未分化な hiPSCs におけるサリドマイド曝露後の死細胞数測定結果 (Reprint permission)

グラフの縦軸は吸光度測定値 (死細胞数に値する) を示す。

(A) Day 2, mean  $\pm$  SE, \*P < 0.05, *t*-test, n=8

(B) Day 4, mean  $\pm$  SE, \*P < 0.05, *t*-test, n=3

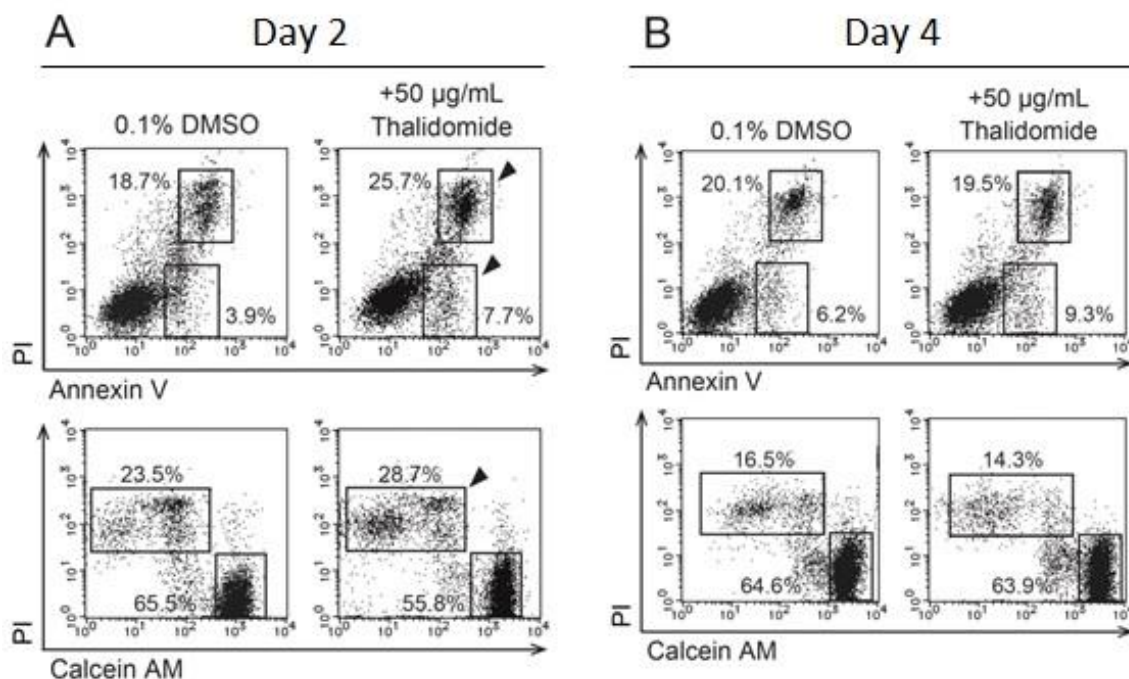


図 4-6 未分化な hiPSCs におけるサリドマイド曝露から (A) 2 日後 (day 2) および (B) 4 日後 (day 4) のアポトーシスアッセイ結果 (Reprint permission)

矢印はサリドマイドの影響が現れた細胞集団を示す。実験は 2 回行い、同じ傾向が確認された。各細胞集団の内容を以下に示す。

Annexin V 陽性/PI 陰性：初期アポトーシス細胞, Annexin V 陽性/PI 陽性：後期アポトーシスおよびネクローシス細胞, Calcein AM 陽性/PI 陰性：生細胞, Calcein AM 陰性/PI 陽性：死細胞 (後期アポトーシスおよびネクローシス細胞)



#### 4.3.4 サリドマイドは未分化な hiPSCs の細胞周期の停止に関与しない

4 日間のサリドマイド曝露により未分化な hiPSCs の生細胞数が有意に減少した (4.3.2)。この現象がサリドマイド曝露後早期におけるアポトーシスの誘導によって引き起こされることが示唆されたが (4.3.3), もう一つの要因として, サリドマイドによって細胞増殖が停止したことが考えられる。そこで, 細胞周期関連タンパク質・Ki-67 を用いて, サリドマイド曝露細胞の細胞周期を解析した。

Ki-67 は G0 期の細胞には発現しておらず, サリドマイドによって細胞周期が停止した場合, 発現が減少することになる。Ki-67 はコントロールおよびサリドマイド曝露実験群ともに高発現しており, 陽性率はサリドマイド曝露 2 日後および 4 日後で変わらなかった (図 4-7)。すなわち, サリドマイドは細胞周期の停止には関係していないことが示唆された。

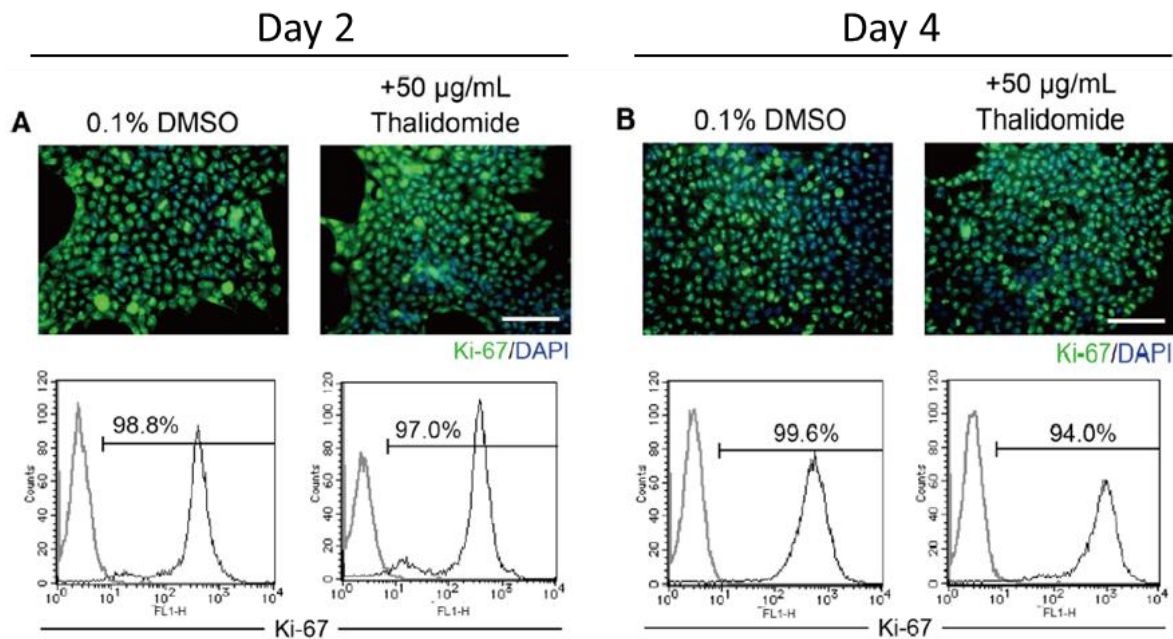


図 4-7 未分化な hiPSCs におけるサリドマイド曝露から (A) 2 日後および (B) 4 日後の細胞周期関連タンパク質・Ki-67 (緑) の発現解析 (Reprint permission)

免疫染色画像において、青色は核 (DAPI) , スケールバーは 100 µm を示す。実験は 2 回行い、同じ傾向が確認された。フローサイトメトリーのヒストグラムにおいて、灰色の線はネガティブコントロール (二次抗体のみ添加したもの) , 黒色の線は各マーカーのシグナルを表す (一次抗体・二次抗体を添加したもの)。ネガティブコントロールのシグナルの陽性率が約 1%となる蛍光強度の範囲にゲート (水平の線) を設定し、抗体のシグナルの陽性率を求めた。

#### 4.3.5 サリドマイドは未分化な hiPSCs の未分化マーカーの発現に顕著な影響を及ぼさないが、神経幹細胞マーカーに著しい発現減少を引き起こす

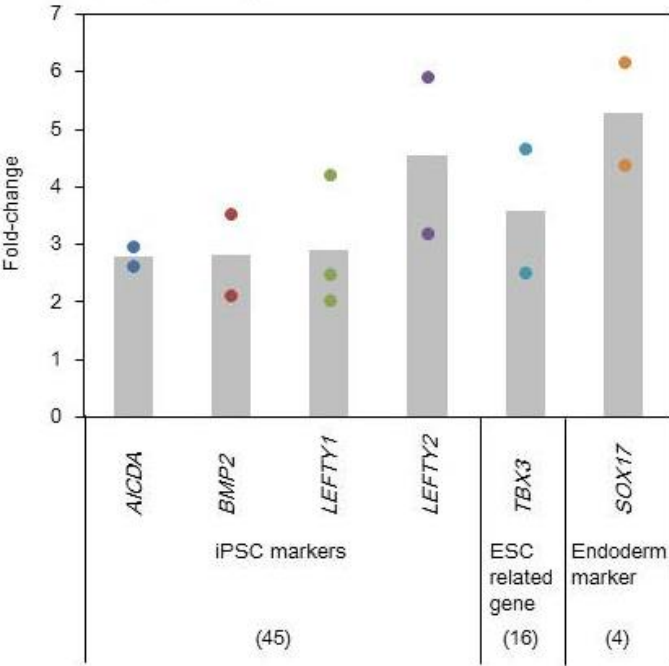
生体内において未分化な hiPSCs に相当する時期の胚がサリドマイド曝露を受けたとき、実際にどのような影響が現れるのかは明らかになっていない。そこで、qPCR アレイによる網羅的な遺伝子発現解析を用いて、サリドマイドの臨床での服用時における血中最大濃度に近い濃度条件 (5 µg/mL) で未分化な hiPSCs にサリドマイド曝露を行ったときの遺伝子発現への影響を明らかにすることを試みた。アレイプレートには 96 種類の遺伝子のプライマーが搭載されており、その内訳として iPSC マーカーが最も多く含まれているもの (45 種類) を使用した。

解析の結果、サリドマイド曝露実験群において、4 つの iPSC マーカー・*AICDA* (activation-induced cytidine deaminase : DNA の脱メチル化に関連する遺伝子), *BMP2* (bone morphogenetic protein-2 : 骨形成に関連するが、胚発生時の分化の制御など多様な機能を持つ遺伝子), *LEFTY1* (left-right determination factor 1 : 体の左右非対称性を決める遺伝子), *LEFTY2* (left-right determination factor 2 : 体の左右非対称性を決める遺伝子) および ESC 関連遺伝子・*TBX3* (T-Box : 胚発生に必須の遺伝子で心臓や血管形成にも関与する) の発現に 2-6 倍の増加が見られた (図 4-8 A)。減少した iPSC マーカーは *ACTC1* (alpha cardiac muscle actin 1 : サルコメア遺伝子) のみだった (図 4-8 B)。アレイプレートに含まれる iPSC マーカーおよび ESC マーカーは、それぞれ 45 種および 16 種あるが、この中で、増加したマーカーは 4 つ、減少したマーカーは 1 つと、少なかった。このことから、サリドマイドは未分化マーカーには顕著な影響を及ぼさないことが示唆された。

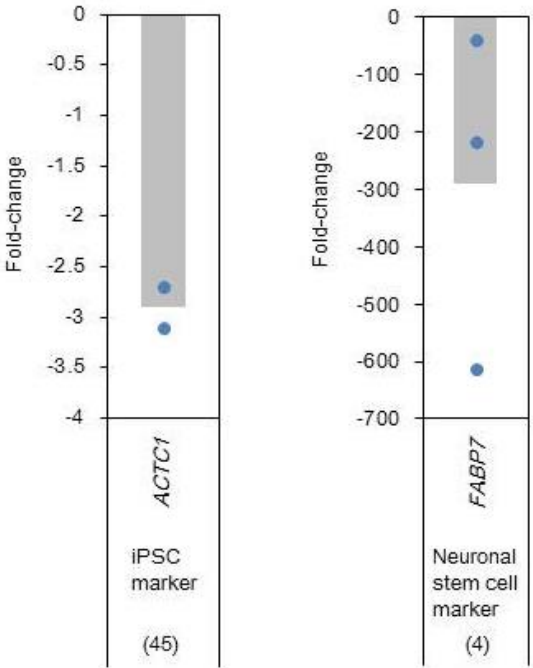
分化マーカーに関しては、内胚葉分化マーカー・*SOX17* (sex determining region Y-box 17) に 2-6 倍の上昇が見られた (図 4-8 A)。最も特徴的なのは神経幹細胞マーカー・*FABP7* (brain fatty acid binding protein 7 : 神経細胞の発達に関与する遺伝子) の発現であり、3 回の実験に

において、40-600 倍に激減することが示された (図 4-8 B)。これより、サリドマイドが未分化な hiPSCs において強力に *FABP7* の発現阻害を起こすことが示唆された。

**A Upregulated genes after thalidomide exposure**



**B Downregulated genes after thalidomide exposure**



**図 4-8 未分化な hiPSCs における 4 日間のサリドマイド曝露 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 後の網羅的な遺伝子発現解析**

0.1%DMSO コントロールに対する相対的な遺伝子発現の変化を調べた。実験は 3 回行い、2 回以上同じ傾向 (増加または減少) の見られた遺伝子をグラフに示した。0.1%DMSO コントロールは 3 回の実験で得られた cDNA を等量ずつ混合したものを用いた。グラフの縦軸は遺伝子の変動 (比) を示しており、各実験で得られた値を丸印でプロットした。また、各実験で得られた値の平均値を灰色の棒グラフで示した。括弧内の数字は、使用したアレイプレートに搭載されている各マーカー遺伝子の数を示している。

(A) サリドマイド曝露後に発現が増加した遺伝子

(B) サリドマイド曝露後に発現が減少した遺伝子

#### 4.4 考察

未分化な hiPSCs (将来の胎児の体) および hiPSCs を初期胚体外胚葉 (将来の胎盤) へと分化誘導する過程にサリドマイド曝露を行い、細胞傷害性およびマーカー発現における同薬の影響の検出を試みた。未分化な hiPSCs は着床した受精卵の胚盤葉上層と同質性を有する (Nichols and Smith 2009)。胚盤葉上層は将来胎児の体へと発達する細胞層であり、この時期の胚にサリドマイド曝露を行っても胎児に催奇形性は現れないとされている。しかし、大きなダメージを受けた胚が流産によって発生しないケースもあり、実際にはこの時期のヒト胚におけるサリドマイドの影響は明らかになっていない。そこで、本研究で用いた *in vitro* システムを用いてサリドマイドの新たな知見が得られることを期待した。また、未分化な hiPSCs とは対照的に、サリドマイドの影響が現れないと予想される初期胚体外胚葉分化条件を用いて、同薬の作用の検出におけるネガティブコントロールとした。

未分化な hiPSCs および初期胚体外胚葉分化過程において 7 段階の濃度のサリドマイド曝露を行った。その結果、スケジュールの最終日において、未分化な hiPSCs でのみ 50  $\mu\text{g/mL}$  のサリドマイド曝露時に生細胞数が有意に減少したが、初期胚体外胚葉分化条件ではコントロールとの有意な違いは認められず、サリドマイドに対して耐性を持つことが示唆された。免疫染色の結果からは、本研究で用いた実験系において適切に未分化維持または初期胚体外胚葉への分化誘導ができたことが示され、サリドマイド曝露を行っても主要なマーカー発現に影響は見られなかった。

今回未分化な hiPSCs で見られた生細胞数への影響は、サリドマイドの濃度に関係しているのかもしれない。通常、臨床では、多発性骨髄腫の患者に対し 100-200 mg/日で使用されており、200 mg/mL の投与時の血中最大濃度は  $2.71 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$  となる (サリドマイドインタビューフォーム改訂版 9 版, 2014)。さらに、ヒトにおいて催奇形性が生じることが報告されている濃度は、1 mg/kg とされており (Schardein J 2000)、これは、体重 50 kg の女性に投

与したと仮定すると、そのときの血中最大濃度は  $0.98 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$  である。これに対し、本研究で未分化な hiPSCs おいて細胞傷害性を示した濃度は  $50 \text{ mg/mL}$  であるため、臨床における作用濃度と比較するとかなり高濃度である。したがって、今回見られた結果は、生体内とは別の経路で生じている可能性がある。また、生体においては、薬物が臍帯において濃縮され、胎児は母体に存在する濃度よりも高濃度で薬物に曝露される可能性がある。サリドマイドの臍帯における濃縮率は不明であるが、例えば、代表的な催奇形性薬の一つであるバルプロ酸は、1.7 倍に濃縮されることが報告されている (Johannessen 2000, Kostrouchova, *et al.* 2007)。これと同様に、臍帯において濃縮されたサリドマイドに胚が曝されたとき、胚は発生に必要な細胞数が不足して補うことができなくなり、催奇形性として現れる前に流産に至るのかもしれない。

さらに、本研究では、本未分化な hiPSCs の生細胞数減少がサリドマイド曝露後早期 (day 0-day2) におけるアポトーシスの誘導に起因することを発見した。これは、未分化な hiPSCs にはサリドマイドに特に高い感受性を示す細胞が存在していることを示唆する。多能性細胞 (ESCs, iPSCs) の未分化マーカー・*Nanog*, *Hes1*, *Rex1* および *Zscan4* は、細胞内での発現が一定ではなく、継時的に変化していることが報告されている (Nakai-Futatsugi and Niwa 2016, Nakamura, *et al.* 2018)。すなわち、未分化性は安定しておらず、絶えず揺らいでいる状態にある。このことは、hiPSCs においても同様に起こり、その集団を不均一なものにする原因となっている。マーカー発現の変化は、細胞膜の構造を変化させ、サリドマイドに対する感受性の変化にもつながっていると推測する。また、サリドマイドによる四肢の形成異常は、肢芽付近の細胞にアポトーシスが誘導されることによって引き起こされとの報告がある (Knobloch, *et al.* 2007, Parman, *et al.* 1999)。加えて、iPSCs の培養は低酸素条件が適しているとされており (Guo, *et al.* 2013, Kumagai, *et al.* 2016, Yoshida, *et al.* 2009)、酸化状態

に弱いことが示唆されている。これらのことから、本研究で見られた現象もサリドマイドによる活性酸素の発生が原因となっていることが考えられる。

初期胚体外胚葉分化条件においては、サリドマイドの影響は現れないという予想の下で実験を行った。本研究では、同分化条件において、細胞傷害性、分化マーカー発現ともにサリドマイドの影響は現れず、予想した結果を得ることができた。臍帯は本来、異物の濃縮や解毒する機能を有しており (Syme, *et al.* 2004), こうした理由からサリドマイドの影響を受けないのかもしれない。これは、サリドマイドを含む薬物の代謝を行う酵素・CYP3Aの働きによる。CYP3Aは肝臓に発現する酵素であるが、胎盤および臍帯にも発現しており、サリドマイドの代謝に関与していることが示唆されている(Kazuki, *et al.* 2016)。したがって、サリドマイドの曝露後、細胞内に取り込まれた同薬を代謝することで自身に細胞死の誘導が起こらない機構を備えている可能性がある。

また、本研究では、臨床で服用されている濃度条件下における未分化な hiPSCs のサリドマイド曝露および qPCR アレイによる同サンプルの網羅的な遺伝子発現解析により、着床状態の胚におけるサリドマイドの影響を検出することができた。実験の結果、予想に反し、神経幹細胞マーカー・*FABP7* の発現がサリドマイド曝露によって著しく減少することが示された。*FABP7* は脂肪酸タンパク質 7 型と呼ばれ、様々な神経精神疾患との関連が示唆されている。特に、統合失調症や自閉症への関連が指摘されており、*Fabp7* ノックアウトマウスでは、統合失調症の生理学的な指標として用いられるプレパルス・インヒビション (驚愕刺激を与える直前に微弱な刺激を与えると驚愕刺激への反応が大幅に抑制される現象) の減少を示し、統合失調症および自閉症に特徴的な行動障害が現れることが報告されている (Iwayama, *et al.* 2010, Shimamoto, *et al.* 2014, Watanabe, *et al.* 2007)。一方、サリドマイドの服用により胎児に引き起こされる障害の一つに自閉症があることから、本研究で見られた *FABP7* の減少は、この現象を反映している可能性がある。しかし、サリドマイドの催奇形



性は、受精後 20 日以降の服用で生じるとされており (図 3-8, 3-9), これ以前の服用で、胚に大きなダメージが生じた場合、途中で死んでしまい、発生に至らないと考えられる。未分化な hiPSCs は受精後 8-14 日の受精卵の胚盤葉上層と同質性を有することから、今回の現象がサリドマイド児における自閉症の発症に必ずしも繋がるものとは言えないかもしれない。*FABP7* の発現減少と胚発生に関して、さらにもう一つ仮説を立てた。*FABP7* は、DHA (Docosahexaenoic acid, ドコサヘキサエン酸) の核内輸送を介して、レチノイド X 受容体  $\beta$  の活性制御を行うことが報告されている (Liu, *et al.* 2012)。レチノイド X 受容体  $\beta$  はレチノイン酸の受容体でもあり、胚発生において、レチノイン酸は初期肢芽における位置価の決定という重要な役割を持つ物質である。レチノイン酸は、肢芽の最も基部側から分泌され、基部側を指定する (Lewis Wolpert 2012)。DHA によるレチノイン酸受容体の活性化がレチノイン酸を介した時と同じ作用を示すかどうかは不明であるため、これは私の提唱する完全なる仮説となるが、サリドマイドによって *FABP7* が減少することにより、四肢の基部の形成が正常に行われなくなり、サリドマイド児に特徴的な四肢の形成異常の原因となっているのかもしれない。また、*FABP7* の減少は、サリドマイドを介した抗がん作用と関連している可能性もある。*FABP7* はレチノイド X 受容体の他、proliferator-activated receptor の活性を制御し、腫瘍細胞の増殖に関与していることが報告されている (Liu, *et al.* 2012)。サリドマイドは血管新生の阻害やサイトカインの産生抑制を介して腫瘍細胞の増殖を抑制することで抗がん作用を発揮する (サリドマイドインタビューフォーム 改訂第 9 版 2014)。細胞の増殖性などの観点からがん細胞と iPSCs を含む幹細胞には類似性があり、サリドマイドが *FABP7* の発現を阻害することで増殖が抑制される機構が働いていることも考えられる。これらの仮説を証明するためにはさらなる研究が必要となる。今回の発見の意義としては、サリドマイドと *FABP7* の発現に相関があるということが、本研究により初めて明らかになったということを強調したい。さらに、今後サリドマイドが引き起こす自閉症のメカニズ

ムを調べる上で、また、*FABP7* が胚発達に及ぼす生理的な機能を理解するために、本研究の実験系は有用なツールになり得ると考える。

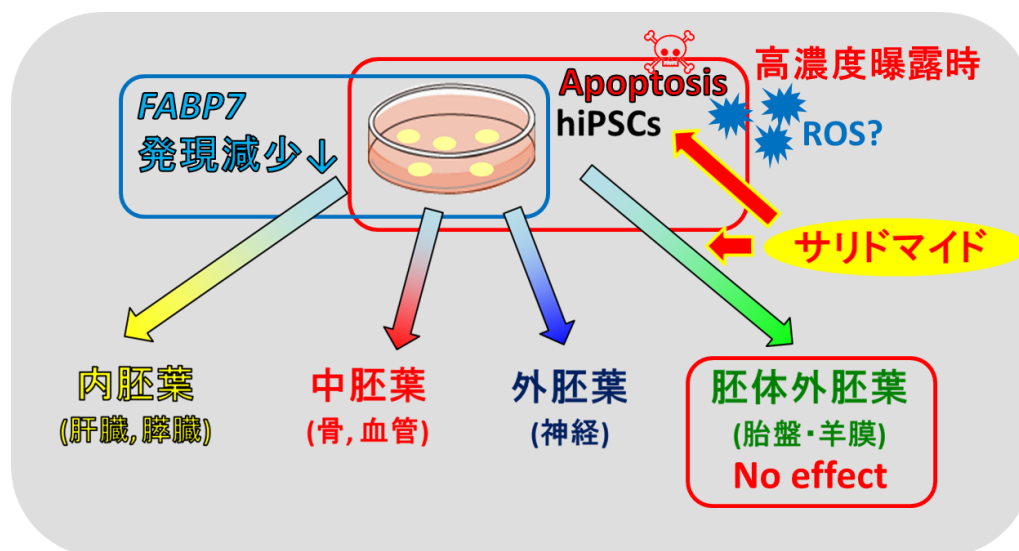


図 4-9 第 4 章の概略図

サリドマイドは、未分化な hiPSCs (将来の胎児の体) において神経幹細胞マーカー・*FABP7* の発現を著しく阻害し (臨床で服用されている濃度条件下)、また、一部の集団にアポトーシスを誘導する (高濃度曝露時) ことが明らかとなった。一方で、初期胚体外胚葉分化 (将来の胎盤) には影響しないことが示された。

## 第 5 章 hiPSCs の初期中胚葉分化過程へのサリドマイドの影響

### 5.1 目的

第 4 章では、未分化な hiPSCs (将来の胎児の体) および hiPSCs の初期胚体外胚葉への分化過程 (将来の胎盤) にサリドマイド曝露を行い、同薬が両分化条件に及ぼす細胞死およびマーカー発現への影響を調べた。

第 5 章では、hiPSCs を初期中胚葉 (将来の骨・血管) へと分化誘導する過程にサリドマイド曝露を行い、同薬がその分化に及ぼす影響の検出を試みた。サリドマイドの催奇形性は妊婦が受精後の 20-36 日に服用した時に生じることが報告されているが、受精後 20 日前後に妊婦がサリドマイドを服用した場合、耳の欠損や親指の重複 (骨や血管の形成不全)、心臓の異常を始めとする中胚葉由来の組織において異常が生じることが報告されている (JL 2000)。この時期の胚における胚盤葉上層は、原腸形成を経て三胚葉へと分化する段階にあることから (図 3-9)、サリドマイドが細胞の初期中胚葉への分化を阻害することにより、その後の中胚葉由来組織や器官の形成に異常が生じることが予想された。すなわち、受精後 20 日前後の期間を hiPSCs を用いて模倣し、サリドマイド曝露を行えば、まず、サリドマイドの影響 (細胞死または中胚葉分化マーカーの発現の阻害) を検出できると仮説を立てて実験を行った。

受精後 20 日前後における胚盤葉上層の中胚葉への分化段階は、hiPSCs を約 1 週間、中胚葉へと分化誘導する期間に相当する。本研究では、hiPSCs の初期中胚葉への分化誘導のため、生体内で起こるイベントを模倣した (図 5-1)。アフリカツメガエルの初期胚において、内胚葉および中胚葉は、ともに Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が主体となって発生することが知られている (De Robertis, *et al.* 2000, Schier 2003)。さらに、内胚葉および中胚葉への分化は、Nodal/Activin の濃度勾配によって決定付けられる。高濃度の Nodal/Activin の存在

下で、細胞は内胚葉へと分化し、これとは反対に、低濃度では中胚葉へと分化する (Ariizumi and Asashima 2001)。本研究では、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化のため、GSK3 (glycogen synthase kinase 3, グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3) 阻害剤として作用する小分子化合物・CHIR99021 を用いた (Ring, *et al.* 2003)。以前の研究では、hiPSCs の内胚葉および中胚葉への分化誘導のため、Wnt3A タンパク質が用いられてきたが、近年、CHIR99021 を使用することでより高効率での分化誘導が可能となることが報告されている (Kunisada, *et al.* 2012)。本研究では、CHIR99021 を3日間添加した。このとき、内胚葉への分化と明確に区別するため、Activin は用いずに分化誘導を行った (Ninomiya, *et al.* 2015)。サリドマイド曝露は分化誘導と同時に行い、細胞傷害性および分化マーカーの発現解析により、同薬の影響を調べた。

5章の大部分は論文「Thalidomide induces apoptosis in undifferentiated human induced pluripotent stem cells」(Tachikawa, *et al.* 2018)として公表している。

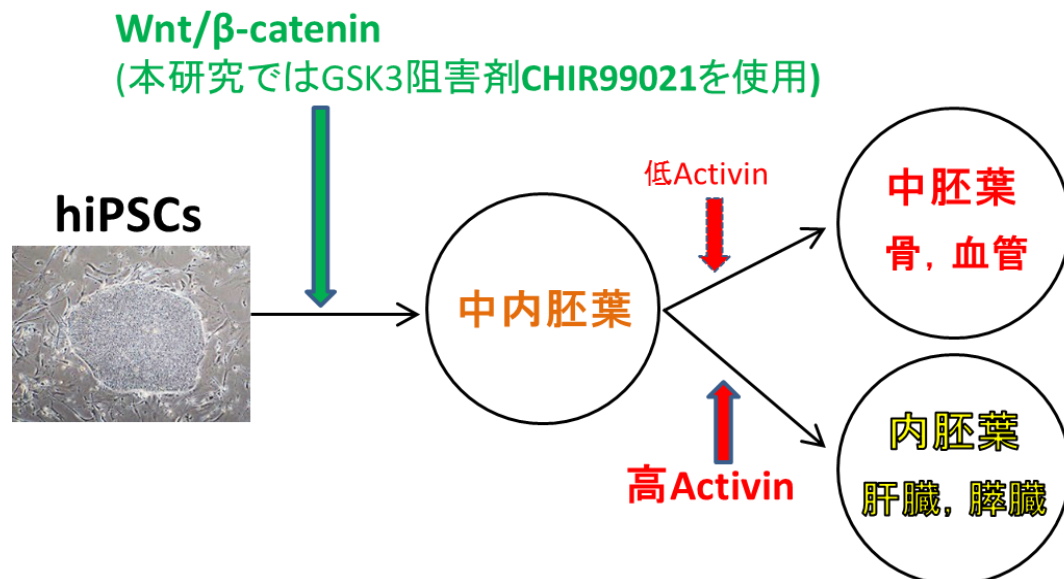


図 5-1 アフリカツメガエルの胚発生を模倣した hiPSCs の中胚葉および内胚葉への分化誘導の模式図

## 5.2 材料および方法

hiPSCs の前培養およびサリドマイド溶液の調整は、4 章-未分化な hiPSCs および hiPSCs の初期胚体外胚葉分化へのサリドマイドの影響と共通の方法で行った (4.2.1 : hiPSCs の血清・フィーダー培養, 4.2.2 : hiPSCs の無血清・無フィーダー培養および 4.2.3 : サリドマイドの調製を参照)。

解析は、4 章-未分化な hiPSCs および hiPSCs の初期胚体外胚葉分化へのサリドマイドの影響で記述した方法と同様に行った (4.2.6 : 免疫染色, 4.2.7 : フローサイトメトリ解析, 4.2.8 : 生細胞数測定, 4.2.9 : 死細胞数測定, 4.2.10 : アポトーシスアッセイ, 4.2.11 : 細胞周期解析, 4.2.12 : qPCR アレイ解析を参照)。

### 5.2.1 hiPSCs の初期中胚葉, 内胚葉への分化誘導およびサリドマイド曝露

hiPSCs の初期中胚葉への分化誘導およびサリドマイド曝露のスケジュールは、図 5-2 に示した。細胞は 4.1.4 と同様の方法で回収および播種した。播種濃度は  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> とした。細胞播種から 24 時間後、培地を全量除去し、mESF basal medium, Insulin, Transferrin, Ethanolamine, Sodium selenite, 2-mercaptoethanol, BSA を添加した ESF6 培地 (表 5-1) に交換した。分化誘導には GSK $\beta$  阻害剤 CHIR99021 (039-20831, Wako, 最終濃度 3  $\mu$ M) を用い、CHIR99021 による細胞死を防ぐため、ROCK 阻害剤を (最終濃度 5  $\mu$ M) 培地に添加した。サリドマイド曝露は分化誘導と同時に行った。サリドマイドの最終濃度は、臨床での服用時における血中最大濃度に近い 5  $\mu$ g/mL および臍帯で濃縮され、胎児に曝露された時の影響を考慮した高濃度条件・50  $\mu$ g/mL とした。3 日間の分化誘導後、CHIR99021 および ROCK 阻害剤を除いた ESF6 培地に交換し、さらに 2 日間培養した。サリドマイド曝露は分化誘導の開始と同時に 5 日間行った。

また、マーカー発現のコントロールサンプルを得るため、hiPSCsの初期内胚葉への分化誘導を行った(図5-3)。細胞は4.5と同様の方法で回収および播種した。播種濃度は、 $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>とした。細胞播種より24時間後、Activin A(最終濃度50 ng/mL)およびCHIR99021(最終濃度3  $\mu$ M)を添加したESF6を用いて培地を全量交換した。CHIR99021の添加は24時間とし、Activin AおよびROCK阻害剤は3日間継続して添加した。

### Early mesodermal differentiation

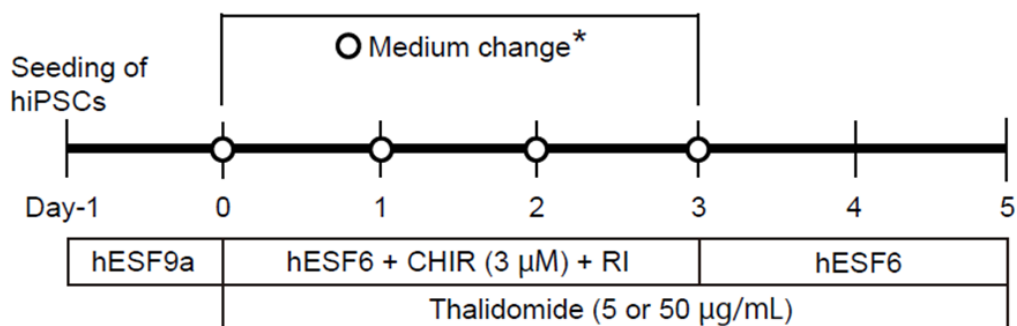


図5-2 初期中胚葉分化誘導およびサリドマイド曝露のスケジュール (Reprint permission)

\*: 培地交換のタイミングは実験により異なる。生細胞数測定および死細胞数測定は day 0, day 1 および day 3 で培地交換を行った。アポトーシスアッセイおよび免疫染色/RT-PCR は, day 0, day 2 および day 3 に培地を交換した。

### Early endodermal differentiation

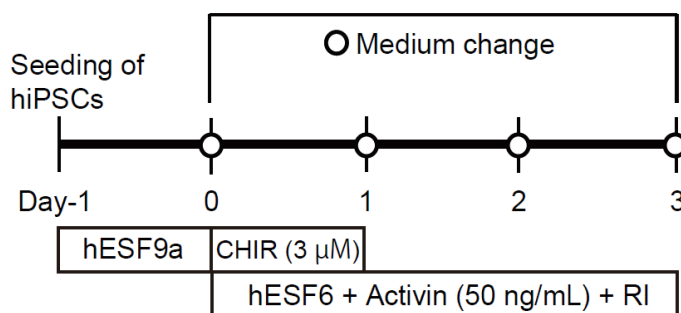


図5-3 初期内胚葉分化誘導のスケジュール (Reprint permission)

表 5-1 ESF6 培地の組成

試薬	最終濃度
mESF basal medium	
Insulin	10 µg/mL
Transferrin	5 µg/mL
Ethanolamine	10 µM
Sodium selenite	20 nM
2-mercaptoethanol	10 µM
BSA	500 µg/mL

### 5.2.2 RT-PCR

(Reverse transcription polymerase chain reaction, 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

プレートから培地を除いて ISOGEN II (311-07361, NIPPON GENE, Tokyo Japan) を添加し, ピペッティングで細胞を溶解した。0.4 倍量の RNase Free Water を添加後 15 秒間混和し, さらに室温で 15 分間静置した。12,000 g, 15 分間遠心し, 上清を回収した。等倍量のイソプロパノールを添加し, 室温で 10 分間静置した後 12,000×g, 10 分間の遠心により沈殿を得た。沈殿を 75%エタノールで 2 回洗浄した。単離した Total RNA は RNase Free Water に溶解した。

単離した Total RNA を PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (6110A, TaKaRa, Shiga Japan) を用いて逆転写した。逆転写反応は, 42℃ 60 分, 95℃ 5 分, 4℃ 5 分の順で行った。PCR は TaKaRa PCR Amplification Kit (R011, TaKaRa) および TAKARA PCR Thermal cycler Dice (TP650, TAKARA) を用いた。使用したプライマーおよび反応条件は表 5-2 に示した。PCR 産物は 0.001% 臭化エチジウムを含む 3% アガロースゲルで電気泳動を行った。

### 5.2.3 サリドマイド曝露開始期間の変更による初期中胚葉分化への影響についての解析

5.2.1 で示した初期中胚葉への分化誘導のスケジュールを変更し，day 3-5 までサリドマイド曝露を行った (図 5-4)。2 日間のサリドマイド曝露後，死細胞数測定およびアポトーシスアッセイを行い，サリドマイドの影響を調べた。

#### Early mesodermal differentiation (day 3-day 5 thalidomide exposure)

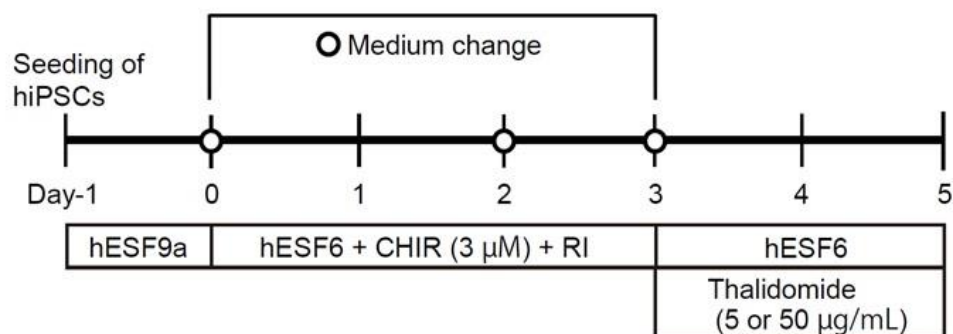


図 5-4 初期中胚葉分化後半 (day 3- day 5) におけるサリドマイド曝露実験のスケジュール

(Reprint permission)



表 5-2 プライマー情報

マーカー		配列 (5'→3')	サイズ (bp)	反応方法	サイクル数
<i>GAPDH</i>	F	TGACCTGCCGTCTAGAAAAACC	288	2 step	30
	R	TGGTCCAGGGGTCTTACTCCTT			
<i>OCT3/4</i>	F	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	144	2 step	30
未分化	R	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC			
<i>SOX2</i>	F	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	151	2 step	30
未分化	R	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG			
<i>BRACHYURY</i>	F	GCCCTCTCCCTCCCCTCCACGCACAG	274	2 step	30
中内胚葉	R	CGGCGCCGTTGCTCACAGACCACAGG			
<i>MSX1</i>	F	CGAGAGGACCCCGTGGATGCAGAG	280	2 step	40
初期中胚葉	R	GGCGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG			
<i>ISL1</i>	F	CACAAGCGTCTCGGGATT	202	3 step	30
初期中胚葉	R	AGTGGCAAGTCTTCCGACA			
<i>SOX17</i>	F	CCTGGGTTTTTGTGTTGCT	212	2 step	30
内胚葉	R	GAGGAAGCTGTTTTGGGACA			
<i>FOXA2</i>	F	TGGGAGCGGTGAAGATGGAAGGGCAC	216	2 step	30
内胚葉	R	TCATGCCAGCGCCACGTACGACGAC			

《反応方法》

2 step cycle : 94°C 30 sec → 68°C 30 sec (×30 cycle) → 72°C 5 min → 4°C ∞

3 step cycle : 94°C 30 sec → 58°C 30 sec → 72°C 40 sec (×30 cycle) → 72°C 5 min → 4°C ∞

## 5.3 結果

### 5.3.1 サリドマイドは主要な初期中胚葉分化マーカーの発現に影響しない

本研究で用いたプロトコル (図 5-2) において適切に初期中胚葉への分化誘導ができたことを確認するため、また、サリドマイド曝露によるマーカー発現への影響を調べるために RT-PCR および免疫染色を行った。

分化誘導から 5 日目 (day 5) における RT-PCR の結果、0.1% DMSO コントロールでは未分化マーカー・*OCT3/4* (octamer-binding transcription factor 3/4) が発現していたが、*SOX2* (sex determining region Y-box 2) の発現は見られなかった。また、同コントロールサンプルでは、中胚葉分化マーカー (*MSX1* : msh homeobox 1 および *ISL1* : insulin gene enhancer protein 1) が発現していた。一方、中内胚葉分化マーカー (*BRACHYURY*)、内胚葉分化マーカー (*SOX17* および *FOXA2* : forkhead box protein A2) は発現していなかった (図 5-5)。

分化誘導から 3 日目 (day 3) における免疫染色の結果、0.1% DMSO コントロールでは、*BRACHYURY* が発現していた。また、初期中胚葉への分化を証明するため、初期中胚葉分化マーカー・*CDX2* を用いたが、*CDX2* は初期胚体外分化マーカーとしても使用されることから、もう一つの代表的な胚体外分化マーカー・*CYTOKERATIN* の発現も調べた。*CDX2* は 3 日目に発現していたが、*CYTOKERATIN* は発現していなかった。また、*SOX17*, *FOXA2* の発現も見られなかった (図 5-6 A)。分化誘導から 5 日目 (day 5) になると、同コントロールサンプルにおける *BRACHYURY* の発現は消失し、*CDX2* のみ発現していた。*CYTOKERATIN*, *SOX2* および *FOXA2* は day 3 と同様に発現していなかった (図 5-6 B)。これらのことから、本研究で作成したプロトコルにより、細胞は 3 日目に中内胚葉へと分化し、5 日目には初期中胚葉へと適切に分化誘導できたことが示された。

サリドマイド曝露によるマーカー発現への影響を調べるため、分化誘導 5 日目の 5 または 50  $\mu\text{g/mL}$  のサリドマイド曝露サンプルにおいて RT-PCR 解析を行った結果、コントロー

ルと同様に *OCT3/4* が発現し、*SOX2* の発現の消失が見られた (図 5-5)。さらに、*MSX1* および *ISL1* の発現も確認された (図 5-5)。免疫染色においてもコントロールと同様に、3 日目において *BRACHYURY* および *CDX2* が発現していたが (図 5-6 A), 5 日目では *CDX2* の発現が減少していた (図 5-6 B)。これらのことから、サリドマイドによって *CDX2* の発現が阻害されることが示唆された。

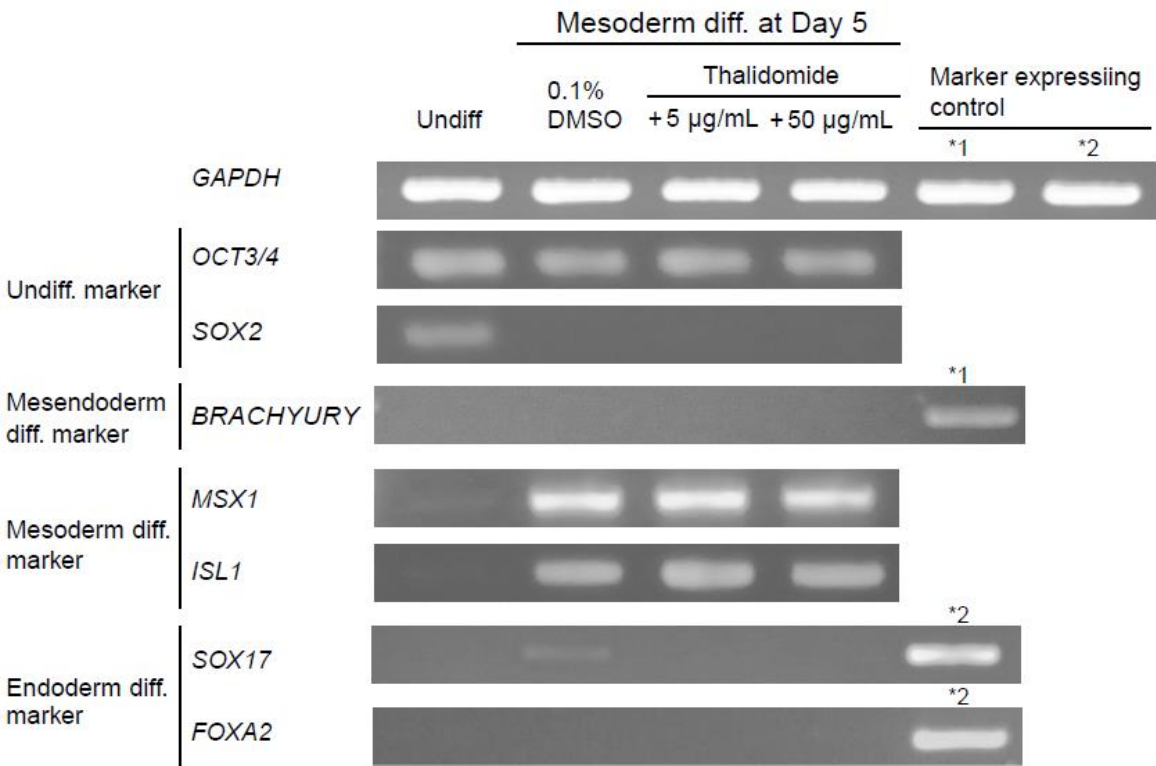
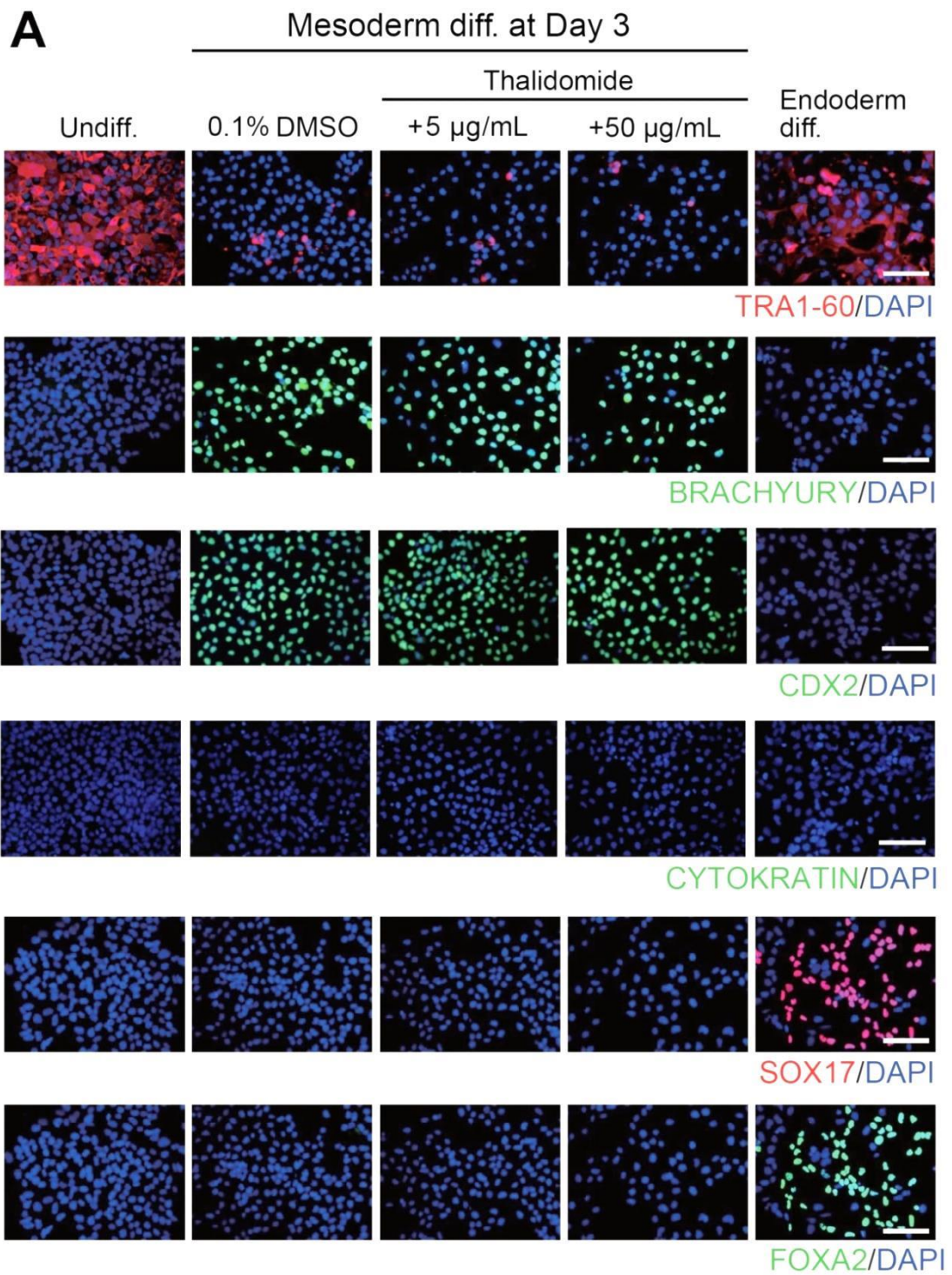


図 5-5 5 日間の初期中胚葉分化およびサリドマイド曝露後のマーカー発現の解析

(Reprint permission)

マーカー発現のコントロールとして \*1: 初期中胚葉分化 (day 1), \*2: 初期内胚葉分化 (day 3) サンプルを用いた。





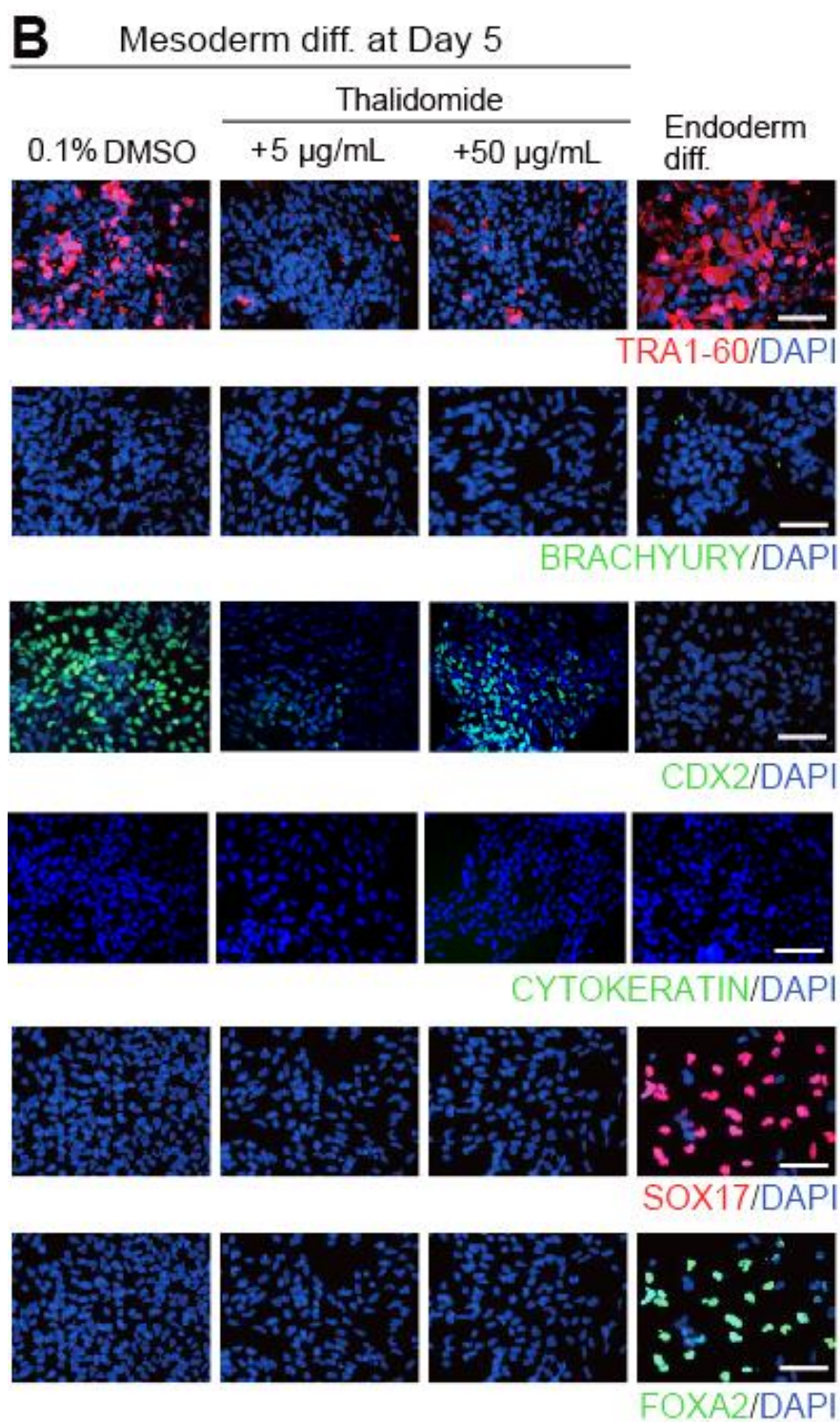


図 5-6 初期中胚葉分化およびサリドマイド曝露の開始から (A) 3 日目および (B) 5 日目のマーカー発現の解析 (Reprint permission)

全ての図において青色は核 (DAPI) , スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。各マーカーを以下に記す。

未分化マーカー (TRA1-60 : 赤), 中内胚葉分化マーカー (BRACHYURY : 緑), 初期中胚葉分化マーカー (CDX2 : 緑), 胚体外胚葉分化マーカー (CYTOKERATIN : 緑), 内胚葉分化マーカー (SOX17 : 赤, FOXA2 : 緑)

### 5.3.2 サリドマイドは一部の初期中胚葉分化マーカーの発現を減少させる

サリドマイド曝露した初期中胚葉分化サンプルにおいて、初期中胚葉分化マーカーCDX2の発現が減少していることが示唆された (5.3.1)。そこで、フローサイトメトリーを用いてCDX2の発現の定量解析を行った。ヒストグラムの解析では、CDX2の発現を3つに分類した。まず、未分化なhiPSCsではCDX2は発現していないと考え、未分化なhiPSCsのヒストグラムにおいて約99%が陰性、1%が陽性となるようにゲートを設定した (蛍光強度0-約40の範囲)。この範囲をCDX2陰性とした。次に、分化誘導3日目のコントロールにおけるCDX2の発現を強陽性として、ヒストグラムの約99%が陽性、1%が陰性となるようにゲートを設定した (蛍光強度約250以上)。陰性と強陽性の中間の蛍光強度を弱陽性とした。分化誘導から3日目のコントロール群では、99%の細胞がCDX2強陽性であり、この値はサリドマイド曝露しても変わらなかった。5日目になると、コントロール群におけるCDX2強陽性細胞の割合は約32%、弱陽性細胞が66.5%だった。サリドマイド曝露実験群においては、強陽性細胞の割合は10%以上減少し、約20%となっていた。一方、CDX2弱陽性細胞の割合が約6%、CDX2陰性細胞の割合も約5%増加した (図5-7)。これより、免疫染色での観察結果と同様、サリドマイド曝露によってCDX2発現が減少したことが明らかとなった。

また、前述の解析時には、細胞はほぼコンフルエントとなっている。細胞のコンフルエンスがマーカー発現に影響を与える可能性があることから、初期の細胞播種濃度をこれまで用いた $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>から $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>へと変更し、再度CDX2の発現解析を行った。細胞は、分化誘導から5日目の解析時には約70%コンフルエントだった。サリドマイド曝露実験群におけるCDX2強陽性細胞の割合は、コントロールと比べて20%減少し、反対に、弱陽性細胞の割合が6-7%増加した。CDX2陰性の細胞の割合も10-15%増加した (図5-7)。以上のことから、細胞密度が低い方がサリドマイド曝露によるCDX2発現の減少は顕著に現れるが、発現の増減の傾向は同じであることが示された。これは、細胞密度が低い

場合、高い場合と比べて細胞分泌物の量や細胞間相互作用が減少し、純粋な薬効が現れやすくなったためと考えられる。

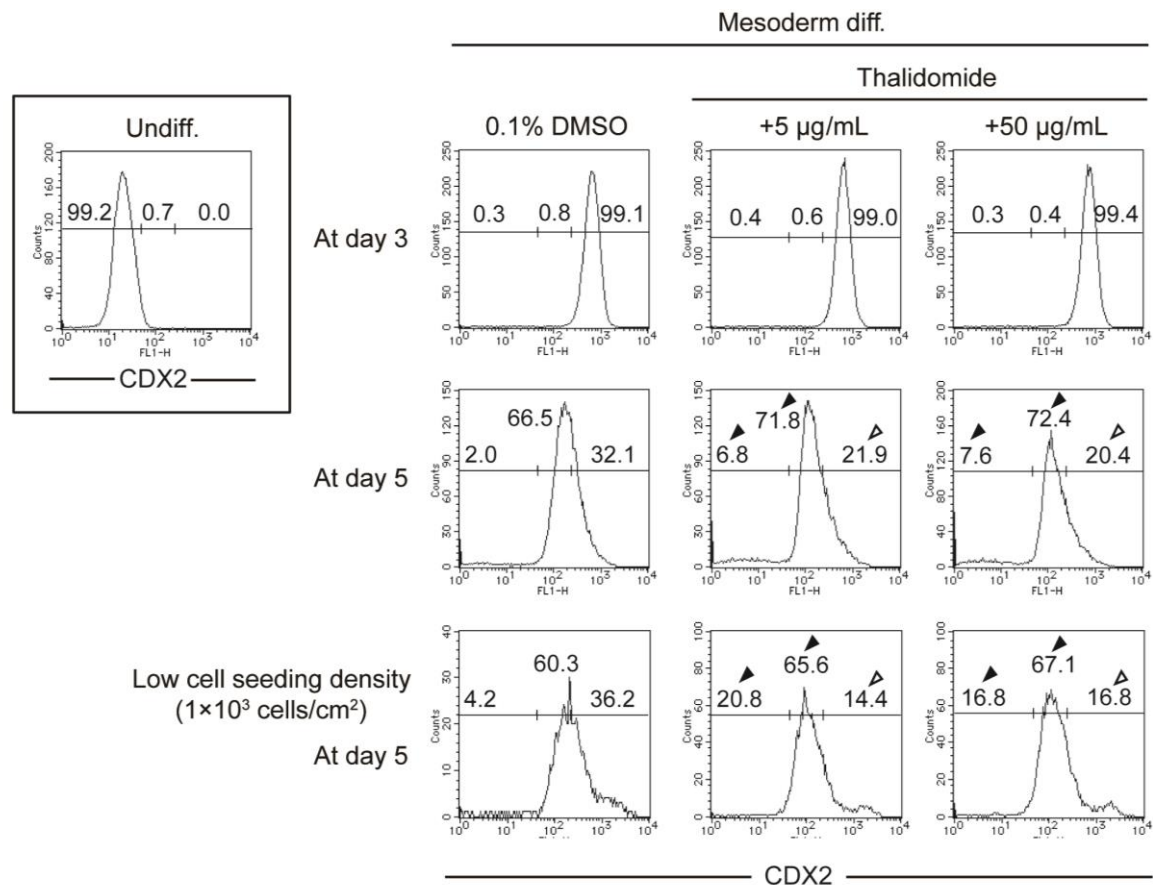


図 5-7 分化誘導およびサリドマイド曝露から 3 日目 (day 3) および 5 日目 (day 5) の

### CDX2 の発現解析

CDX2 の発現強度を次の 3 つに分類した。陰性：蛍光強度 0-40 の範囲，弱陽性：蛍光強度 40-250 の範囲，強陽性：蛍光強度 250 以上。ヒストグラム中の数字は各細胞集団の割合 (%) を示す。黒い矢印はサリドマイド曝露により増加した細胞集団，白い矢印は減少した細胞集団を示す。



### 5.3.3 サリドマイドは初期中胚葉分化 hiPSCs の生細胞数を減少させる

サリドマイドが初期中胚葉分化細胞の生細胞数に影響を及ぼすかどうかを調べるため、5 日間のサリドマイド曝露後、生細胞数を測定した。その結果、hiPSC 201B7-0063 株において、5  $\mu\text{g/mL}$  および 50  $\mu\text{g/mL}$  のサリドマイド曝露により、生細胞数が有意に減少することが示された (図 5-7 A)。異なる hiPS 細胞株においても同様の傾向が見られたが、50  $\mu\text{g/mL}$  の曝露でのみ有意差が得られた (図 5-8 B)。

これらのことから、細胞株によりサリドマイドに対する感受性に多少の違いが見られるが、サリドマイドは hiPSCs の初期中胚葉分化過程において細胞の増殖を阻害することが示唆された。

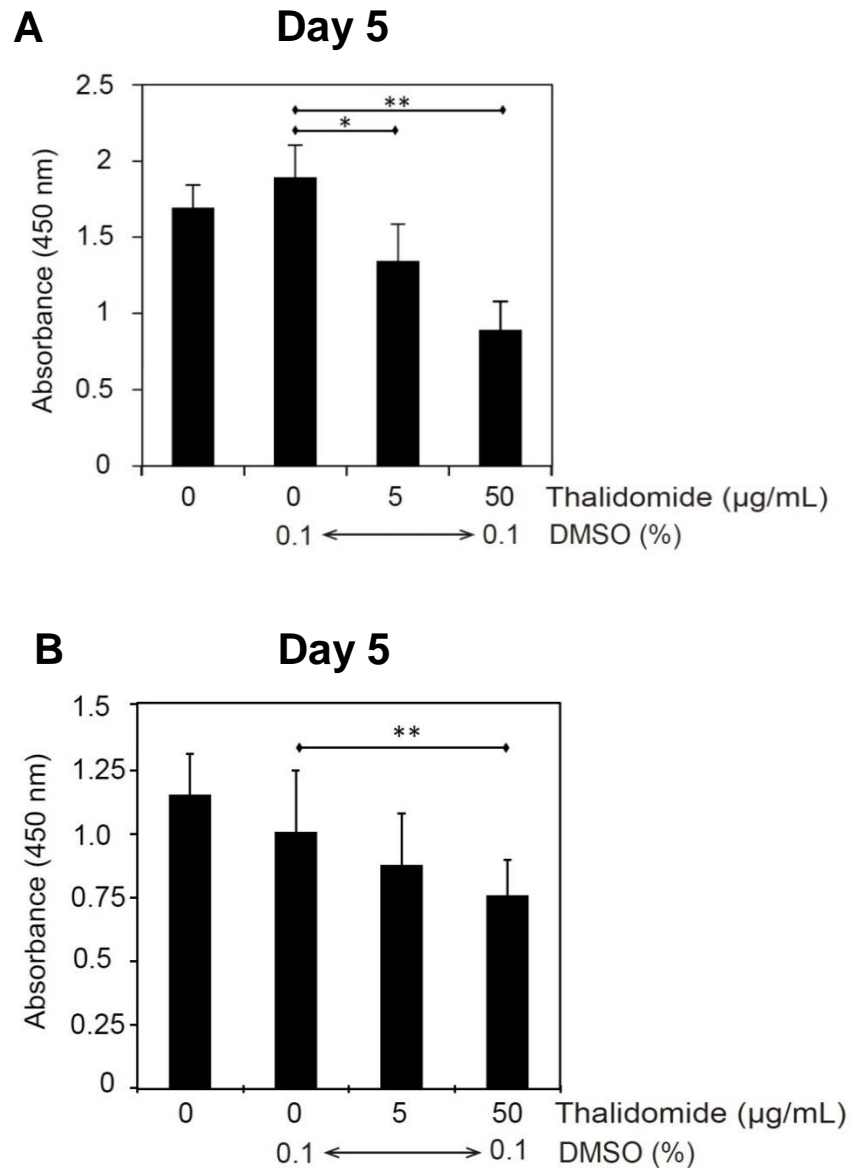


図 5-8 初期中胚葉分化過程における 5 日間のサリドマイド曝露後 (day 5) の生細胞数測定

結果 (Reprint permission)

グラフの縦軸は吸光度測定値 (生細胞数に値する) を示す。

(A) hiPSC 201B7-0063 株, mean  $\pm$  SE, \*\*P < 0.01, \*P < 0.05, Dunnet's test, n=3

(B) hiPSC OSKM4 株, mean  $\pm$  SE, \*\*P < 0.01, t-test, n=6, 0.1%DMSO コントロールの吸光度の平均値を 1 として統計処理を行った。

#### 5.3.4 サリドマイドは初期中胚葉分化過程においてアポトーシスを誘導する

5 日間のサリドマイド曝露により，初期中胚葉分化細胞の生細胞数が有意に減少した (5.3.3)。この原因の一つに，サリドマイドによって細胞死が誘導されたことが考えられる。そこで，5 日間の死細胞数を算定するため，サリドマイド曝露 1 日目 (day 1)，2 日目 (day 2) および 5 日目 (day 5) に死細胞測定を行い，各日の測定値を合計した。

その結果，コントロールおよびサリドマイド曝露実験群の間で死細胞 (後期アポトーシスおよびネクローシス細胞) の数に有意な違いは見られなかった (図 5-9)。実際は，死細胞の割合は増加していた可能性があるが，サリドマイド曝露実験群ではプレートに残存している生細胞数がコントロールよりも減少しているため，LDH 値の増加として反映されなかったのかもしれない。

そこで，死細胞数測定に続いてアポトーシスアッセイを行い，サリドマイドによる細胞死の誘導の可能性について言及した。Annexin V および PI 染色による解析の結果，分化誘導 2 日目のサリドマイド曝露実験群において，後期アポトーシス細胞およびネクローシス細胞 (Annexin V 陽性/PI 陽性) の割合の増加が認められた (図 5-10 A)。5 日目においては，サリドマイド曝露実験群において初期アポトーシス細胞 (Annexin V 陽性/PI 陰性) の割合がわずかに増加したものの，後期アポトーシスおよびネクローシス細胞集団の割合はコントロールと比べて減少した (図 5-10 B)。Calcein AM および PI 染色による解析からも，2 日目のサリドマイド曝露実験群において死細胞 (Calcein AM 陰性/PI 陽性，後期アポトーシスおよびネクローシス細胞と同義) の増加が (図 5-10 A)，5 日目のサリドマイド曝露実験群においてはこれらの細胞集団の減少が (図 5-10 B) 認められた。

これらの結果から，サリドマイドが初期中胚葉分化過程およびサリドマイド曝露後の早い段階 (day 0-2) においてアポトーシスを誘導し (おそらく未分化細胞と考えられる)，このことが 5 日目における生細胞数の減少を引き起こしたことが示唆された。

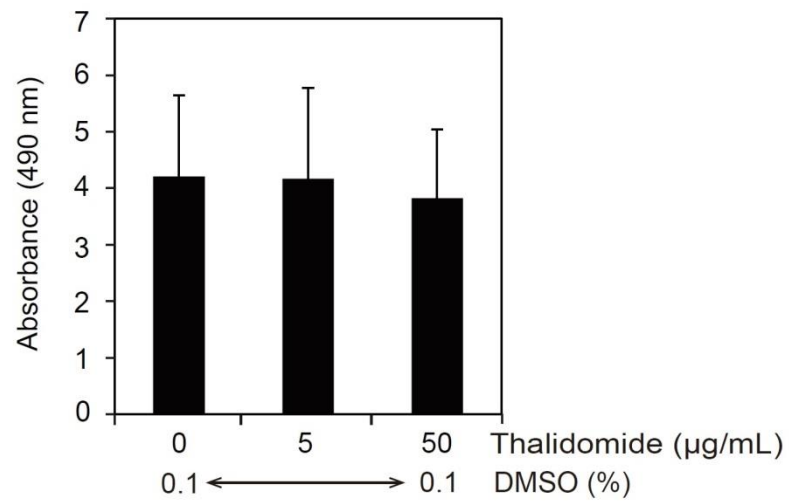


図 5-9 初期中胚葉分化過程における 5 日間のサリドマイド曝露後の死細胞数測定結果

(Reprint permission)

グラフの縦軸は吸光度測定値（死細胞数に値する）を示す。

mean ± SE, 有意差なし, *t-test*, n=3

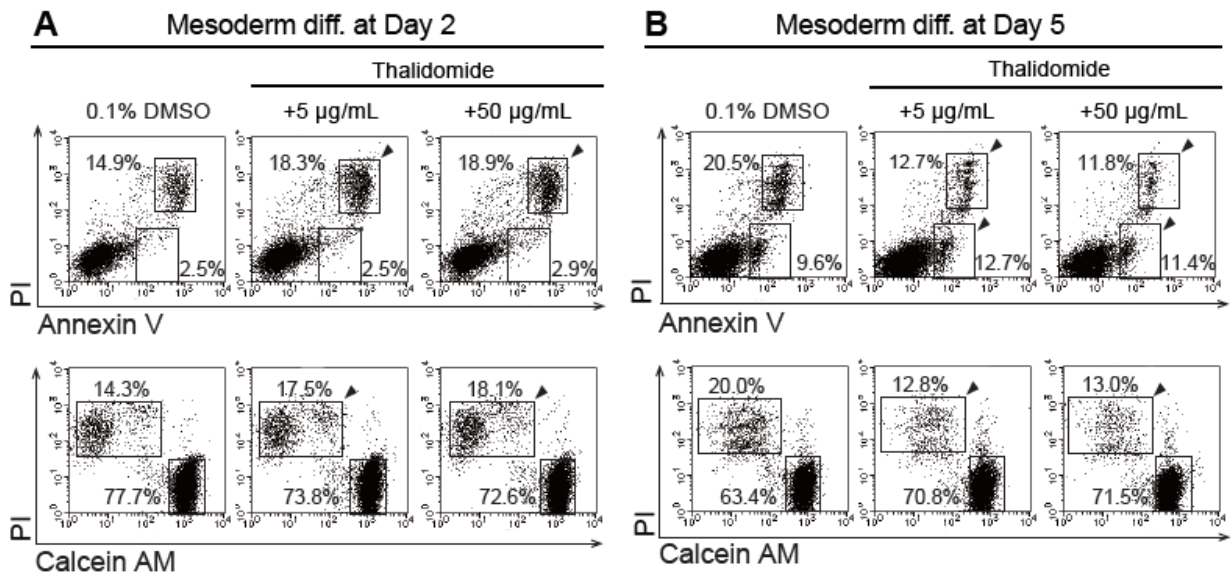


図 5-10 初期中胚葉分化における (A) 2 日間および (B) 5 日間のサリドマイド曝露後の生細胞数測定結果 (Reprint permission)

矢印はサリドマイドの影響が現れた細胞集団を示す。実験は 2 回行い、同じ傾向が確認された。各細胞集団の内容を以下に示す。Annexin V 陽性/PI 陰性：初期アポトーシス細胞，Annexin V 陽性/PI 陽性：後期アポトーシスおよびネクローシス細胞，Calcein AM 陽性/PI 陰性：生細胞，Calcein AM 陰性/PI 陽性：死細胞 (後期アポトーシスおよびネクローシス細胞)

### 5.3.5 サリドマイドは初期中胚葉分化 hiPSCs の細胞周期の停止に関与しない

5 日間のサリドマイド曝露により, 未分化な hiPSCs の生細胞数が有意に減少した (5.3.3)。この現象がサリドマイド曝露後早期において (おそらく未分化な細胞に) アポトーシスが誘導されることによって引き起こされることが示唆されたが (5.3.4), もう一つの要因として, サリドマイドによって細胞増殖が停止したことが考えられる。そこで, 細胞周期関連タンパク質 Ki-67 を用い, サリドマイド曝露細胞の細胞周期を解析した。

Ki-67 は, コントロールおよびサリドマイド曝露実験群ともに高発現しており, 陽性率はサリドマイド曝露 2 日後 (図 5-11 A) および 5 日後 (図 5-11 B) で変わらなかった。すなわち, サリドマイドは細胞周期の停止には関係していないことが示唆された。

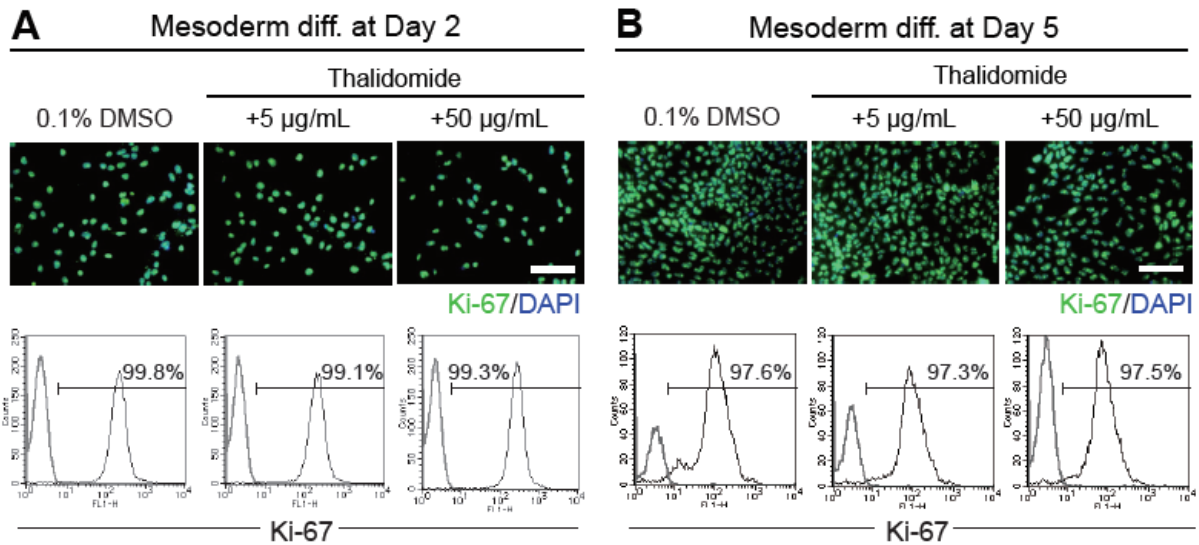


図 5-11 初期中胚葉分化誘導から (A) 2 日後および (B) 5 日後の細胞周期関連タンパク

質・Ki-67 (緑) 発現解析結果 (Reprint permission)

免疫染色画像において、青色は核 (DAPI) , スケールバーは 100 µm を示す。実験は 2 回行い、同じ傾向が確認された。フローサイトメトリーのヒストグラムにおいて、灰色の線はネガティブコントロール (二次抗体のみ) , 黒色の線は各マーカーのシグナルを表す (一次抗体・二次抗体あり)。抗体のシグナルの陽性率は、図 4-7 と同様の方法で求めた。

### 5.3.6 サリドマイド曝露の開始期間を変更しても 5 日目における同薬の影響は変わらない

分化誘導と同時にサリドマイド曝露を行った場合、細胞は day 5 までの間にサリドマイドに対する耐性を獲得しており、初期中胚葉分化の後半においてアポトーシスの誘導が見られなかった可能性がある (5.3.4)。そこで、サリドマイドの曝露開始時間を変更し、分化誘導スケジュールの後半 (day 3- day 5) にサリドマイド曝露を行い、day 5 におけるサリドマイドの影響を調べた (図 5-4)。

2 日間のサリドマイド曝露後、死細胞数測定を行った結果、死細胞数はサリドマイド曝露実験群において減少傾向にあったが、コントロールとの有意な違いは認められなかった (図 5-12 A)。アポトーシスアッセイでは、サリドマイド曝露により初期アポトーシス細胞の割合 (Annexin V 陽性/PI 陰性) がわずかに増加し、後期アポトーシスおよびネクローシス細胞の割合 (Annexin V 陽性/PI 陽性) が減少することが示された (図 5-12 B)。死細胞測定で検出される細胞は、アポトーシスアッセイにおける後期アポトーシスおよびネクローシス細胞と同義である。今回、2 つの解析方法において同じ傾向が示されたことから、解析結果の正当性を示すことができた。また、死細胞全体 (初期アポトーシス、後期アポトーシスおよびネクローシス) で見ると、サリドマイド曝露実験群において減少傾向にあることが示唆された。この結果は、分化誘導の開始とともにサリドマイド曝露を行った場合 (5.3.4) と同じだった。これより、サリドマイドの曝露期間を変更しても、day 5 におけるサリドマイドの影響は変わらない、すなわち、分化誘導の初期からサリドマイド曝露を行っても、細胞はサリドマイドに対する耐性を獲得しないことが示唆された。



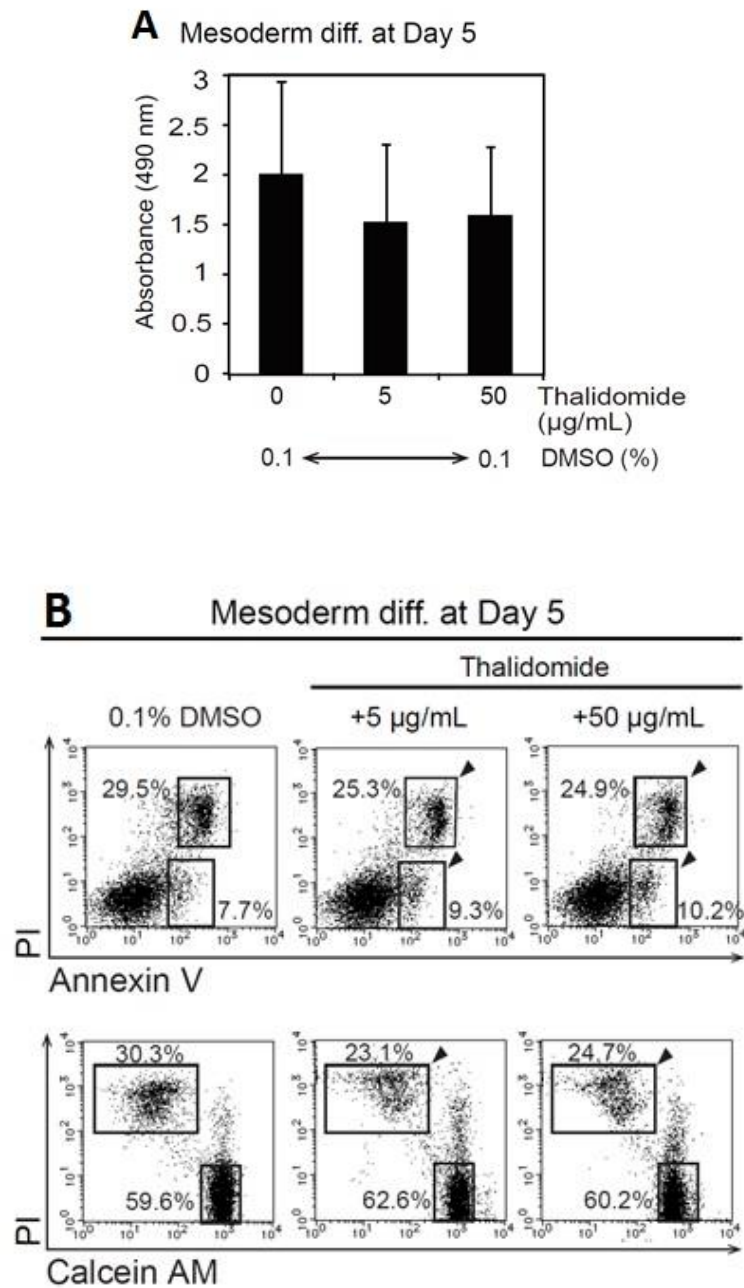


図 5-12 初期中胚葉分化後半の 2 日間 (day 3-day 5) のサリドマイド曝露後の (A) 死細胞数測定および (B) アポトーシスアッセイ結果 (Reprint permission)

(A) mean±SE, 有意差なし, *t-test*

(B) 矢印はサリドマイドの影響が現れた細胞集団を示す。実験は 2 回行い、同じ傾向が確認された。各集団の内容は、図 5-10 と同じである。

### 5.3.7 サリドマイドは血管および心臓分化マーカーの発現を阻害し、外胚葉分化マーカーの発現を増加させる

本研究で用いた *in vitro* でヒトの初期中胚葉分化を模倣するシステムが生体の環境を確かに反映している (サリドマイドの検出系として確かなものである) ことを示すため、さらに、その系を用いてサリドマイドの作用に関する新たな知見を得るため、qPCR アレイを用いてサリドマイド曝露した初期中胚葉分化 hiPSCs の網羅的な遺伝子発現解析を行った。アレイプレートは、4.2.12 と同じものを用いた。

解析の結果、サリドマイド曝露実験群において、3 つの iPSC マーカー・*AICDA*, *MYC* (がん遺伝子), *RUNX2* (runt-related transcription factor 2 : 骨芽細胞分化関連遺伝子) および ESC 関連遺伝子・*OTX2* (orthodenticle Homeobox 2 : 外胚葉および神経分化のマーカー遺伝子) に 2-5 倍の増加が見られた (図 5-13 A), 一方、6 つの iPSC マーカー・*ACTC1*, *FOXD3* (forkhead box protein D3 : 転写のリプレッサーとして作用する遺伝子), *LEFTY2*, *NR5A2* (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2 : 自己複製関連遺伝子である *OCT3/4* の転写活性化を担う遺伝子), *PODXL* (podocalyxin-like 1 : 細胞接着関連遺伝子), *FGF4* (fibroblast growth factor 4 : 発生において様々な役割を担い、肢芽の発生にも関与する遺伝子) に 2-14 倍の減少が見られた (図 5-13 B)。アレイプレートに含まれる iPSC マーカーおよび ESC 関連マーカーは、それぞれ 45 種および 16 種、計 61 種ある。この中で増加したマーカーは 4 つと少ないことから、サリドマイド曝露実験群においても細胞は未分化状態を失い、分化自体は進行していると考えられる。

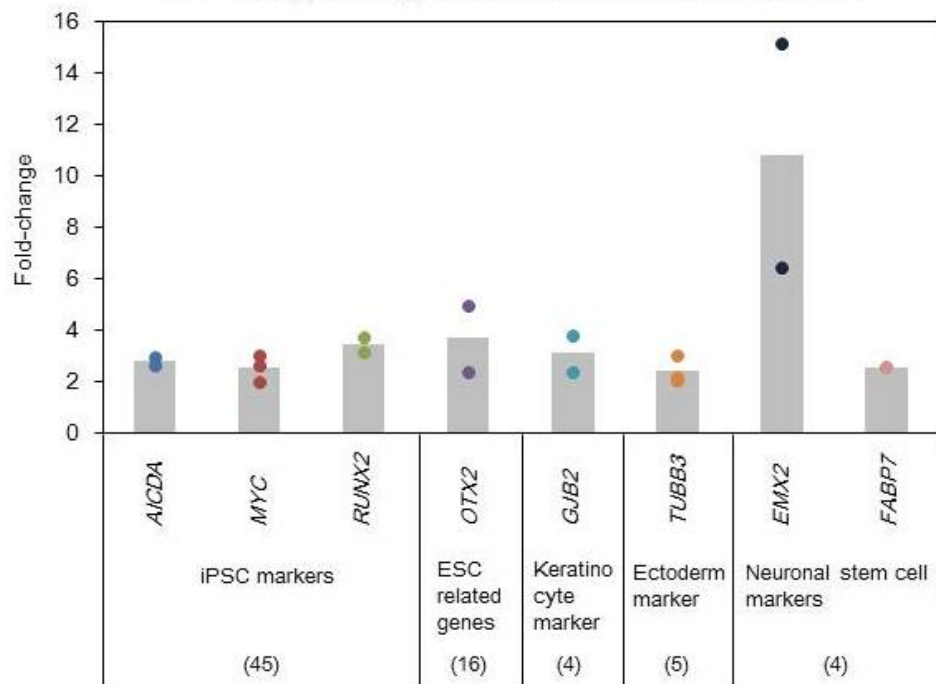
また、表皮細胞マーカー・*GJB2* (gap junction protein, beta-2 : ギャップ結合の構成成分であるコネキシン 26 をコードする遺伝子), 外胚葉マーカー・*TUBB3* (tubulin beta 3 class III : 微小管形成関連遺伝子, 神経分化マーカー遺伝子としても使用される) および神経幹細胞マーカー・*EMX2* (empty spiracles homolog 2 : 神経分化および脳における細胞増殖に関連する遺伝

子) および *FABP7* の発現が増加しており, 特に *EMX2* は 7-16 倍に増加していた (図 5-13 A)。このことから, サリドマイド曝露により, 分化の方向性が外胚葉 (神経) 方向へと偏っていることが示唆された。

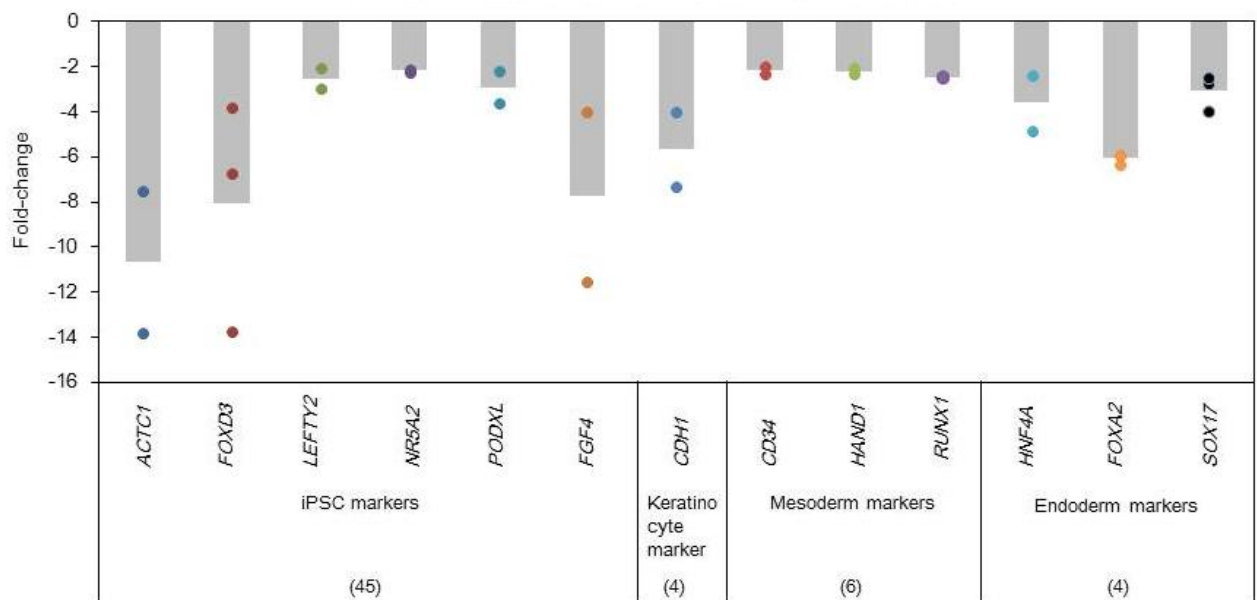
さらに, 3 つの中胚葉分化マーカー・*CD34* (cluster of Differentiation 34 : 造血幹細胞および血管内皮細胞マーカー遺伝子), *HAND1* (heart and neural crest-derived transcript-1 : 心筋マーカー遺伝子) および *RUNX1* (runt-related transcription factor 1 : 血液関連遺伝子) の減少が見られ, サリドマイドがこれらの分化を阻害していることが示唆された (図 5-13 B)。血管および心臓分化の阻害は, 本研究で模倣した期間において妊婦がサリドマイドを服用した場合に生じる催奇形性の症状から予想された結果であり, 本システムが生体内の環境を的確に模倣できたことが裏付けられた。また, 内胚葉分化マーカー・*HNF4A* (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha : 肝臓, 腎臓および腸の発達に重要な役割を持つ遺伝子), *FOXA2* (膵臓および肝臓の分化に関与する遺伝子) および *SOX17* (内胚葉形成に必須の遺伝子) の 2-6 倍の減少も見られた (図 5-13 B)。内胚葉および中胚葉分化マーカーについては, アレイに搭載されているそれぞれのマーカーの半数以上が減少しており, 増加しているマーカーはなかった。

以上の結果を総合すると, 本研究で用いたシステムが生体内の一期間を的確に模倣していることを証明するとともに, サリドマイドは中胚葉および内胚葉への分化を阻害し, 外胚葉 (神経) 方向へと分化の方向性を変えている可能性があることが示唆された。

### A Upregulated genes after thalidomide exposure



### B Downregulated genes after thalidomide exposure



**図 5-13 初期中胚葉分化過程における 5 日間のサリドマイド曝露 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 後の網羅的な遺伝子発現解析**

0.1%DMSO コントロールに対する相対的な遺伝子発現の変化を調べた。実験は 3 回行い、2 回以上同じ傾向 (増加または減少) の見られた遺伝子をグラフに示した。0.1%DMSO コントロールは 3 回の実験で得られた cDNA を等量ずつ混合したものを用いた。グラフの縦軸は遺伝子の変動 (比) を示しており、各実験で得られた値を丸印でプロットした。また、各実験で得られた値の平均値を灰色の棒グラフで示した。括弧内の数字は、使用したアレイプレートに搭載されている各マーカー遺伝子の数を示している。

(A) サリドマイド曝露後に発現が増加した遺伝子。

(B) サリドマイド曝露後に発現が減少した遺伝子。

## 5.4 考察

細胞が初期中胚葉へと分化する過程におけるサリドマイドの影響を検出し、新たな知見を得ることを目的として、hiPSCsを用いて5日間の分化誘導およびサリドマイド曝露を行った。サリドマイドの催奇形性は、中胚葉由来の組織（骨、血管、心臓など）において見られることから、初期中胚葉分化を阻害していることを予想した。

最終濃度を5 µg/mL（臨床での服用時における血中最大濃度に近い濃度）または50 µg/mL（サリドマイドが臍帯において濃縮され、胎児に曝露された場合を考慮した濃度）として5日間サリドマイド曝露を行った後、生細胞数が有意に減少した。さらに、アポトーシスアッセイの結果から、サリドマイドが分化誘導の早期（day 0-2）においてアポトーシスを誘導し、分化の後半（day 3-5）においては、死細胞の割合が減少することが示唆された。これらのことから、5日間のサリドマイド曝露後に見られた生細胞数の減少は、分化の早期（day 0-2）において細胞が死ぬことで引き起こされたと考えられる。第4章で得られた結果から、サリドマイドは未分化なhiPSCsにアポトーシスを誘導することが示唆された。したがって、分化の早期に死んだ細胞は、未分化な細胞と推測する。また、Day 0-2の期間の細胞は、未分化から中内胚葉への分化段階にある細胞が混在している。中内胚葉分化マーカー・BRACHYURYがほぼ100%発現しているday 3からサリドマイド曝露を始め、day 5でアポトーシスアッセイを行ったとき、day 5における死細胞の割合がコントロールと比べて減少傾向にあったことから、BRACHYURY陽性細胞～初期中胚葉分化細胞はサリドマイドによるアポトーシスの誘導を受けないと考えられる。この結果も、サリドマイドによって細胞死を引き起こされたのが未分化な細胞であることを示唆する。

さらに、本実験において、サリドマイドによって初期中胚葉分化マーカー・CDX2の発現が減少することが示唆された。これは、分化の後半において見られた現象で、このとき細胞にアポトーシスの誘導は起こらず、マーカー発現にのみ影響が現れたようだった。過去

の研究によると、初期中内胚葉分化細胞にサリドマイド曝露を行ったとき、細胞の生存の50%阻害濃度は200  $\mu\text{M}$  (約 50  $\mu\text{g/mL}$ ) 以上とされている。一方、このときの内胚葉分化マーカー・SOX17 発現の50%阻害濃度は0.5  $\mu\text{M}$  (約 0.13  $\mu\text{g/mL}$ ) と報告されており、細胞傷害性を示す濃度よりもかなり低濃度である (Kameoka, *et al.* 2014)。このことは、サリドマイドは初期中内胚葉へと分化した細胞に対して細胞傷害性を示さないが、マーカー発現を阻害する作用があることを示唆する。これは、本研究で得られた結果を支持している。

初期中内胚葉分化過程の後半においてサリドマイド曝露した実験群でアポトーシスが減少したのは、分化することによって細胞膜の構造が変わり、薬剤の取り込み方や排出方法が変化したことが原因となっている可能性がある。特に、薬剤の排出を行う排出トランスポーターの細胞膜上での産生量の増加は、一般的な薬剤耐性の主因となっており (加藤隆一, 山添康, 横井毅 2012), 本研究で示された現象との関連が予想される。また、サリドマイドの仮説の一つに、同薬が四肢の細胞においてアポトーシスを誘導することで催奇形性が生じるという説が提唱されている。サリドマイドによるアポトーシスの誘導は、細胞核内に発生した活性酸素が引き金となって標準 Wnt シグナルおよび Akt シグナルの抑制が起こり、これに続いて内因性のアポトーシス経路が活性化することによって引き起こされるとされている (Knobloch, *et al.* 2011)。同時に、Akt シグナルの抑制に抗う機構も働いており、サリドマイドは、PI3K (Phosphoinositide 3-kinase, ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ) を介して Akt シグナルを活性化し、細胞を生存させようとする相反する作用も持っている。この機構により、サリドマイドが神経細胞をアポトーシスから保護するという報告もあり (Zhang, *et al.* 2010), 細胞の種類の違いにより、アポトーシスに対して異なる反応を示すことが示唆されている。初期中内胚葉分化細胞においても同様に、サリドマイドによる PI3K/Akt シグナル経路の活性化が起こり、アポトーシス細胞の減少として現れたのかもしれない。これらのシグナル経路の活性化について調べることは今後の課題の一つである。

初期中胚葉分化 hiPSCs においては、サリドマイドの催奇形性の症状から予想される中胚葉分化マーカー（心臓や血管分化マーカー）の発現の阻害が検出できると予想し、実験を行った。網羅的な遺伝子発現解析の結果、サリドマイド曝露実験群で発現が増加した iPSC マーカーはごく少数であったことから、細胞は未分化状態を脱し、分化が進行していることが示唆された。また、予想した通り、*CD34*（血管内皮細胞マーカー）および *HAND1*（心筋マーカー）の発現の減少が見られた。先の RT-PCR による遺伝子発現解析から、サリドマイド曝露によって *CDX2* の発現が減少することが示唆されたが、*CDX2* は、hiPSCs の体節（骨を作る元となる構造）への分化誘導に必要な転写因子である(Mendjan, *et al.* 2014)。本研究で検出された *CDX2* 発現の減少は、サリドマイドによる骨分化の阻害を反映していると考えられる。これらのことは、本研究で作製したプロトコルが、最初に仮定した胎児発達の一期間における細胞分化を適切に模倣できたこと、すなわち、ここで用いたプロトコルが *in vitro* のサリドマイドの検出系として信頼のおけるものであることを示している。同時に、内胚葉分化マーカー・*SOX17* の減少も示された。これは、中内胚葉分化細胞にサリドマイド曝露を行った時、同遺伝子の発現が減少することを報告した過去の研究と一致している (Kameoka, *et al.* 2014)。さらに、初期中胚葉分化 hiPSCs においていくつかの外胚葉分化マーカーの発現増加が見られ、サリドマイドによって細胞の分化方向が神経方向へと偏っていることが示唆された。これは、*CHIR99021* の添加により増強していた Wnt/ $\beta$ -catenin のシグナルが、サリドマイドによって抑制されたことによると考えられる。前述した *CDX2* も Wnt シグナルの下流の遺伝子であるため(Rao, *et al.* 2016)、サリドマイド処理により、ここで示されたような現象が起きたと考えている。

この現象は、本研究により得られたサリドマイドの作用に関する新たな知見の一つである。しかし、サリドマイド児においてこの現象に直結するような臨床所見は報告されてお



らず，催奇形性との関連を論じるためには，今後，hiPSCs の初期外胚葉分化へのサリドマイドの影響を調べ，総合した考察を行う必要がある。

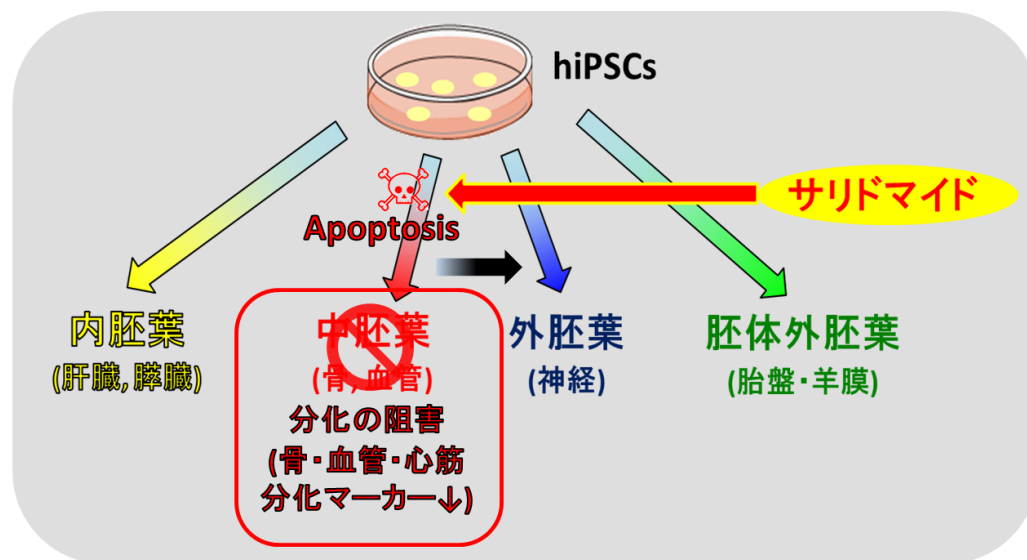


図 5-14 第 5 章の概略図

サリドマイドは，初期中胚葉（将来の骨・血管）分化過程の早い段階で未分化な細胞にアポトーシスを誘導する。また，分化過程の後期においては，中胚葉分化マーカー発現の阻害を示し，さらに，分化の方向性が外胚葉方向へと偏ることが示唆された。

## 第6章 総合討論

サリドマイドは難病への高い薬効が注目されているが、同薬の持つ催奇形性の作用機序の全容は未だに不明である。これは、同薬がヒトの胎児発達に及ぼす影響を検出するための良い実験系がないことに起因する。そこで、本研究では、hiPSCsを用いてヒトの初期胎児発達（細胞の初期分化）を模倣し、サリドマイドが及ぼす影響を調べた。実験では、妊婦がサリドマイドを服用したときに胎児に催奇形性が現れるとされる最初期（受精後20日前後）の細胞分化に焦点を当て、未分化なhiPSCs（将来の胎児の体）、hiPSCsの初期胚体外胚葉（将来の胎盤）および初期中胚葉（将来の骨・血管）分化過程にサリドマイド曝露を行い、それぞれの分化条件における細胞死およびマーカー発現への影響を調べた。

本研究を通して、サリドマイドに関するいくつかの新しい知見を得ることができた。まず、未分化なhiPSCs（将来の胎児の体）では、通常服用されているサリドマイド濃度において、同薬の影響は少ないと予想した。しかし、予想に反し、神経幹細胞マーカー・*FABP7*の発現が著しく減少することが示唆された。*FABP7*は精神疾患への関与が指摘されていることから（Iwayama, *et al.* 2010, Shimamoto, *et al.* 2014, Watanabe, *et al.* 2007）、サリドマイド児に見られる自閉症との関連が示唆された他、その受容体となるレチノイドX受容体 $\beta$ の性質（Lewis Wolpert 2012）から四肢形成の阻害の原因となっていることも考えられる。このように、*FABP7*はサリドマイド曝露によって未分化なhiPSCsにおいて激減することが明らかとなったが、初期中胚葉分化細胞では増加傾向にあった。初期中胚葉分化細胞においては分化の方向性がサリドマイドによって外胚葉方向へと変更されることが示唆されており、神経幹細胞マーカーである*FABP7*の発現が増加したのは、中胚葉分化のために刺激したWntシグナルがサリドマイドによって阻害されたことに関連すると考えられる。一方、未分化なhiPSCsでは分化状態（未分化性）に大きな影響は現れず、サリドマイドが*FABP7*に特

異的に作用している可能性がある。*FABP7* とサリドマイドの相関に関するそれぞれの仮説を確かなものにするためには、今後さらなる研究が必要である。

未分化な hiPSCs および初期中胚葉分化細胞の両方で影響を受けた遺伝子・*LEFTY* の発現変化は、サリドマイドが Activin/Nodal シグナルに関与している可能性を示唆する。未分化な hiPSCs では、*LEFTY1* および 2 が増加し、初期中胚葉分化細胞では *LEFTY2* が減少した。*LEFTY* は Activin/Nodal シグナルを調節する遺伝子であり (Lewis Wolpert 2012), このシグナル経路において負のフィードバックを行うことが知られている。マウスにおいて、*Lefty* は Nodal のブレーキとして働き、その局在を制御し、体の左右非対称性、前後の決定および中胚葉形成のパターン化を行っている (Lewis Wolpert 2012)。サリドマイドは *LEFTY* を介して Activin/Nodal シグナルを攪乱し、これら胚発生の重要な局面に異常を引き起こしていると推測する。*ACTC1* および *AICDA* も両分化条件に共通してサリドマイドの影響を受けた遺伝子としてあげられる。これらの遺伝子は iPSC マーカーであるが、*ACTC1* は心筋および骨格筋の  $\alpha$ -アクチンを形成する遺伝子であり、サリドマイド曝露により両分化条件で減少した。発生における *ACTC1* の変異は心臓の欠陥を引き起こす (Dirkx, et al. 2013)。サリドマイドの催奇形性の症状から心筋関連遺伝子の発現阻害は予想されており、*ACTC1* もサリドマイドによって影響を受ける遺伝子の一つであることが明らかとなった。一方、*AICDA* は DNA の脱メチル化に関与する遺伝子で、サリドマイド曝露後の両分化条件において発現が増加していた。脱メチル化の変更は発生において異常な遺伝子発現を引き起こす原因となり得ることから、サリドマイドによるエピジェネティック機構への関与が示唆された。

さらに、本研究において、未分化な hiPSCs において高濃度のサリドマイド曝露によりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。一方で、初期胚体外分化および初期中胚葉分化細胞はアポトーシスに対する耐性を示した。未分化な細胞および分化した細胞における根本的な原因として、細胞膜構造の変化による薬剤の取り込みおよび排出の違いが予

想される。今回得られた新しい知見は、今後サリドマイドによってアポトーシスが誘導される細胞の特徴やメカニズムを調べる上で役立てることが可能と思われる。

また、全体を通して重要なことは、初期胚体外胚葉分化および初期中胚葉分化細胞において、予想と一致したサリドマイドの影響が検出できたことである。特に、初期中胚葉分化においては、サリドマイドの臨床所見と一致した血管、骨および心臓分化マーカーの阻害が検出され、このことから、本研究で用いた分化プロトコールが最初に仮定した生体内における胎児発達の一期間を適切に模倣できており、ヒトの胎児発達におけるサリドマイドの作用の検出系として確かなものであることを証明できた。

以上のことから、本研究において、hiPSCsを用いてヒトの初期胎児発生を模倣し、同薬が及ぼす作用について新しい知見を得たことを報告する。今後、本研究で用いたプロトコールを基礎として、hiPSCsの初期外胚葉および内胚葉への分化誘導プロトコールを確立し、サリドマイドの影響の検出を行うことが課題としてあげられる。

本研究で用いたプロトコールは、ヒト胎児による薬効試験の代替としての可能性を示し、同薬の催奇形性の作用機序解明に役立てることが期待される。また、このプロトコールを他薬に適用することにより、対象とした薬剤の催奇形性リスク評価のために使用することも可能と考える。

## 第7章 結論

本研究では、hiPSCsの分化誘導の過程を初期胎児発達の模倣と仮定した。その過程にサリドマイド曝露を行うことで同薬の影響を検出し、サリドマイドがヒトの胎児発達に及ぼす影響について新たな知見を得ることを目的とした。実験では、未分化なhiPSCs(将来の胎児の体)、初期胚体外胚葉(将来の胎盤)、初期中胚葉(将来の骨・血管)分化過程における細胞死およびマーカー発現への影響を調べた。サリドマイドの催奇形性の症状から、服用されている濃度条件下において、未分化なhiPSCsでは同薬の影響は少なく、また、胎児の体にならない方向への分化である初期胚体外分化条件では同薬の影響は検出されないと考えた。一方、催奇形性と最も関係が深いと思われる初期中胚葉分化条件では、細胞死および分化(特に血管および心臓分化)マーカー発現の阻害が検出されることを予想した。

予想と一致して、初期胚体外胚葉分化細胞ではサリドマイド曝露による顕著な影響は見られなかった。初期中胚葉分化細胞においても予想した血管および心臓分化マーカーの阻害が認められ、これらのことから、本研究で用いたプロトコールが最初に仮定した胎児発達の一期間を適切に模倣できたことが示された。

この実験系を用い、サリドマイドの作用に関していくつかの新たな知見を得ることができた。まず、未分化なhiPSCsにおいて、神経幹細胞マーカー・*FABP7*の発現が著しく減少することが明らかになった。さらに、高濃度のサリドマイド曝露時、未分化なhiPSCsの一部にアポトーシスが誘導されることが示唆された。初期中胚葉分化過程においては、同薬が分化誘導の早期に未分化なhiPSCsにアポトーシスを誘導するが、分化した細胞には耐性があることが示された。また、サリドマイドは中胚葉への分化を阻害し、分化の方向性を神経方向へと変えていることが本研究により新たに示された。

本研究の成果は、サリドマイドの作用機序の解明および他薬の胎児毒性リスク評価に役立てることが可能と考える。

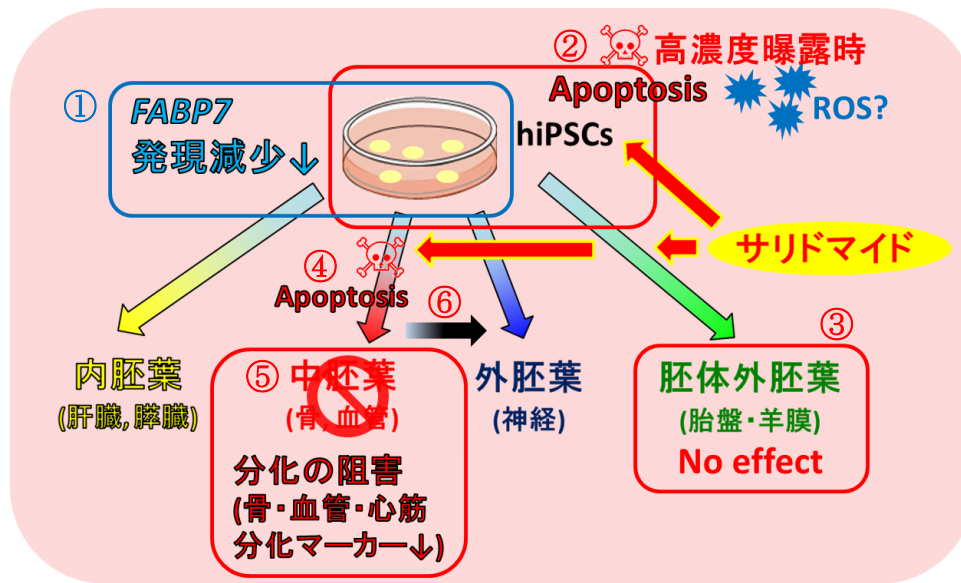


図 6-1 本研究の概略図

サリドマイドは未分化な hiPSCs において①*FABP7* の発現を阻害し，②アポトーシスを誘導するが，③初期胚体外胚葉分化には影響しない。初期中胚葉分化過程においては④未分化な細胞にアポトーシスを誘導し(分化早期)，⑤一部の中胚葉分化マーカーの発現を阻害する(分化後期)。⑥このとき，分化の方向性が外胚葉方向へ偏る。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，ご指導ご鞭撻を賜りました大沼清准教授に心より感謝申し上げます。

スタンフォード大学の中内啓光教授，西村聡修先生には，実験技術の習得およびディスカッションのため，貴重なお時間をいただきましたことを深謝いたします。

古江-楠田美保先生，菅三佳先生ならびに医薬基盤・健康・栄養研究所 ヒト幹細胞応用開発室研究室の皆様には，実験データの解析にあたり，大変お世話になりました。ここに感謝いたします。

また，実験の実施に際して，大沼研究室の皆様にご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。ありがとうございました。

## 参考文献

- Aikawa N, Kunisato A, Nagao K, Kusaka H, Takaba K, Ohgami K (2014) Detection of thalidomide embryotoxicity by in vitro embryotoxicity testing based on human iPS cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 124:201-207
- Amita M, Adachi K, Alexenko AP, Sinha S, Schust DJ, Schulz LC, Roberts RM, Ezashi T (2013) Complete and unidirectional conversion of human embryonic stem cells to trophoblast by BMP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E1212-1221
- Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H (2015) A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. *Stem Cell Reports* 5:597-608
- Ariizumi T, Asashima M (2001) In vitro induction systems for analyses of amphibian organogenesis and body patterning. *The International Journal of Developmental Biology* 45:273-279
- Aznar J, Tudela J (2017) Ten years since the discovery of iPS cells: The current state of their clinical application. *Revista Clinica Espanola* 217:30-34
- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research* 42:e168
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4082-4085
- De Robertis EM, Larrain J, Oelgeschlager M, Wessely O (2000) The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature Reviews Genetics* 1:171-181
- Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ (2013) Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832:2414-2424
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156
- Franks ME, Macpherson GR, Figg WD (2004) Thalidomide. *Lancet* 363:1802-1811
- Fratta ID, Sigg EB, Maiorana K (1965) TERATOGENIC EFFECTS OF THALIDOMIDE IN RABBITS, RATS, HAMSTERS, AND MICE. *Toxicology and Applied Pharmacology* 7:268-286
- Gilbert S (2012) 『成体進化発生学-エコ-エボ-デボの夜明け』(正木進三, 竹田真木生, 田中誠二訳) 東海大学出版会.



- Guo CW, Kawakatsu M, Idemitsu M, Urata Y, Goto S, Ono Y, Hamano K, Li TS (2013) Culture under low physiological oxygen conditions improves the stemness and quality of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 228:2159-2166
- Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M (2010) Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PloS ONE* 5:e14099
- Irie N, Weinberger L, Tang WW, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, Dietmann S, Hanna JH, Surani MA (2015) SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160:253-268
- Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science (New York, NY)* 327:1345-1350
- Iwayama Y, Hattori E, Maekawa M, Yamada K, Toyota T, Ohnishi T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Kikuchi M, Hashimoto K, Iyo M, Inada T, Kunugi H, Ozaki N, Iwata N, Nanko S, Iwamoto K, Okazaki Y, Kato T, Yoshikawa T (2010) Association analyses between brain-expressed fatty-acid binding protein (FABP) genes and schizophrenia and bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B, Neuropsychiatric Genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B:484-493
- Schardein J (2000) 『Chemically Induced Birth Defects』 (Third Edition) CRC Press.
- Johannessen CU (2000) Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochemistry International* 37:103-110
- Kameoka S, Babiarez J, Kolaja K, Chiao E (2014) A high-throughput screen for teratogens using human pluripotent stem cells. *Toxicological Sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 137:76-90
- Kazuki Y, Akita M, Kobayashi K, Osaki M, Satoh D, Ohta R, Abe S, Takehara S, Kazuki K, Yamazaki H, Kamataki T, Oshimura M (2016) Thalidomide-induced limb abnormalities in a humanized CYP3A mouse model. *Scientific Reports* 6:21419
- Keith I. Moore TVNP, Mark G. Torchia (2015) *The Developing Human 10th Edition, Clinically Oriented Embryology*. Elsevier
- Kim MS, Horst A, Blinka S, Stamm K, Mahnke D, Schuman J, Gundry R, Tomita-Mitchell A, Lough J (2015) Activin-A and Bmp4 levels modulate cell type specification during CHIR-induced cardiomyogenesis. *PloS ONE* 10:e0118670

- Knobloch J, Jungck D, Koch A (2011) Apoptosis induction by thalidomide: critical for limb teratogenicity but therapeutic potential in idiopathic pulmonary fibrosis? *Current Molecular Pharmacology* 4:26-61
- Knobloch J, Ruther U (2008) Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle* 7:1121-1127
- Knobloch J, Shaughnessy JD, Jr., Ruther U (2007) Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:1410-1421
- Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M (2007) Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica* 53:37-49
- Kronke J, Fink EC, Hollenbach PW, MacBeth KJ, Hurst SN, Udeshi ND, Chamberlain PP, Mani DR, Man HW, Gandhi AK, Svinkina T, Schneider RK, McConkey M, Jaras M, Griffiths E, Wetzler M, Bullinger L, Cathers BE, Carr SA, Chopra R, Ebert BL (2015) Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1alpha in del(5q) MDS. *Nature* 523:183-188
- Kumagai A, Suga M, Yanagihara K, Itoh Y, Takemori H, Furue MK (2016) A Simple Method for Labeling Human Embryonic Stem Cells Destined to Lose Undifferentiated Potency. *STEM CELLS Translational Medicine* 5:275-281
- Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M (2012) Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research* 8:274-284
- Landry DW, Zucker HA (2004) Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* 114:1184-1186
- Lewis Wolpert CT (2012) 『ウォルパート発生生物学 Principles of development』 (Fourth edition) (武田洋幸, 田村宏治訳) メディカル・サイエンス・インターナショナル
- Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A (2015) Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 4:143-154
- Liu RZ, Graham K, Glubrecht DD, Lai R, Mackey JR, Godbout R (2012) A fatty acid-binding protein 7/RXRbeta pathway enhances survival and proliferation in triple-negative breast cancer. *The Journal of pathology* 228:310-321
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, NY)* 339:823-826

Melchert M, List A (2007) The thalidomide saga. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:1489-1499

Mendjan S, Mascetti VL, Ortmann D, Ortiz M, Karjosukarso DW, Ng Y, Moreau T, Pedersen RA (2014) NANOG and CDX2 pattern distinct subtypes of human mesoderm during exit from pluripotency. *Cell Stem Cell* 15:310-325

Miller MT, Stromland K (1999) Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60:306-321

Nakai-Futatsugi Y, Niwa H (2016) Zscan4 Is Activated after Telomere Shortening in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 6:483-495

Nakamura S, Maruyama A, Kondo Y, Kano A, De Sousa OM, Iwahashi M, Hexig B, Akaike T, Li J, Hayashi Y, Ohnuma K (2018) Asymmetry between sister cells of pluripotent stem cells at the onset of differentiation. *Stem Cells and Development*, 10.1089/scd.2017.0113

Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA (2016) In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (New York, NY)* 351:403-407

Nichols J, Smith A (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4:487-492

Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, Miura T, Ohnuma K, Takahashi S, Asashima M, Michiue T (2015) Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 51:1-8

Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H (2013) Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell* 12:114-126

Noggle S, Fung HL, Gore A, Martinez H, Satriani KC, Prosser R, Oum K, Paull D, Druckenmiller S, Freeby M, Greenberg E, Zhang K, Goland R, Sauer MV, Leibel RL, Egli D (2011) Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* 478:70-75

Nowack E (1965) [The sensitive phase in thalidomide embryopathy]. *Humangenetik* 1:516-536

Parman T, Wiley MJ, Wells PG (1999) Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nature Medicine* 5:582-585

Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H (2012) Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal

differentiation of human neural progenitor cells: a combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology* 33:1375-1380

Rao J, Pfeiffer MJ, Frank S, Adachi K, Piccini I, Quaranta R, Arauzo-Bravo M, Schwarz J, Schade D, Leidel S, Scholer HR, Seebohm G, Greber B (2016) Stepwise Clearance of Repressive Roadblocks Drives Cardiac Induction in Human ESCs. *Cell Stem Cell* 18:554-556

Rehman W, Arfons LM, Lazarus HM (2011) The rise, fall and subsequent triumph of thalidomide: lessons learned in drug development. *Therapeutic Advances in Hematology* 2:291-308

Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD (2003) Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* 52:588-595

Rodriguez-Leal D, Lemmon ZH, Man J, Bartlett ME, Lippman ZB (2017) Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell* 171:470-480 e478

Schier AF (2003) Nodal signaling in vertebrate development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19:589-621

Seiler AE, Spielmann H (2011) The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nature Protocol* 6:961-978

Sheskin J (1965) THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRO REACTIONS. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 6:303-306

Shimamoto C, Ohnishi T, Maekawa M, Watanabe A, Ohba H, Arai R, Iwayama Y, Hisano Y, Toyota T, Toyoshima M, Suzuki K, Shirayama Y, Nakamura K, Mori N, Owada Y, Kobayashi T, Yoshikawa T (2014) Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. *Human Molecular Genetics* 23:6495-6511

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B (1999) Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine* 341:1565-1571

Syme MR, Paxton JW, Keelan JA (2004) Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clinical Pharmacokinetics* 43:487-514

Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanandomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153:1228-1238

- Tachikawa S, Nishimura T, Nakauchi H, Ohnuma K (2017) Thalidomide induces apoptosis in undifferentiated human induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* 53:841-851
- Tachikawa S, Shimizu M, Maruyama K, Ohnuma K (2018) Thalidomide induces apoptosis during early mesodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* 54:231-240
- 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
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676
- Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Lopes SM, Little MH (2016) Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 536:238
- Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N (2009) Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:8573-8578
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* 282:1145-1147
- Vargesson N (2015) Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Research Part C, Embryo Today : Reviews* 105:140-156
- Watanabe A, Toyota T, Owada Y, Hayashi T, Iwayama Y, Matsumata M, Ishitsuka Y, Nakaya A, Maekawa M, Ohnishi T, Arai R, Sakurai K, Yamada K, Kondo H, Hashimoto K, Osumi N, Yoshikawa T (2007) Fabp7 maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype. *PLOS Biology* 5:e297
- Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA (2002) BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature Biotechnology* 20:1261-1264
- Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2009) Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5:237-241
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)* 318:1917-1920

Zhang L, Qu Y, Tang J, Chen D, Fu X, Mao M, Mu D (2010) PI3K/Akt signaling pathway is required for neuroprotection of thalidomide on hypoxic-ischemic cortical neurons in vitro. *Brain Research* 1357:157-165

加藤隆一，山添康，横井毅 (2012) 『薬物代謝学 - 医療薬学・医薬品開発の基礎として』(第3版) 東京化学同人.

## 追補 1 CRISPR/Cas9 を用いたサリドマイド一次標的分子 (CRBN) ノックアウト hiPS 細胞株の作製

### S1.1 目的

第4章では、4日間のサリドマイド曝露により、未分化な hiPSCs の生細胞数が有意に減少したが、初期胚体外胚葉分化した細胞には耐性があることが示唆された (4.3.2)。私は、このような細胞の分化段階によるサリドマイドへの感受性の違いは、同薬の一次標的分子・CRBN の発現量に依存しているという仮説を立てた。すなわち、未分化な hiPSCs では CRBN が高発現しており、そのためにサリドマイドに対する高い感受性を示すが、CRBN の発現を取り除けば、同薬の曝露を行っても増殖の阻害は起こらなくなると予想した。CRBN は生体内において E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成要素として機能しており、その発現はユビキタスとされている。サリドマイドは CRBN に結合し、この酵素の働きを阻害することで、胎児の正常な発達が妨げられることが報告されている (Ito, *et al.* 2010)。

追補1では、仮説を実証するため、遺伝子編集技術・CRISPR/Cas9 を用いて CRBN ノックアウト hiPS 細胞株の作製を試みた。CRISPR/Cas9 は最新の遺伝子編集技術として注目されており、標的部位への高い特異性を特徴とする。このシステムでは、標的塩基配列に対して相補的な配列を含む guide RNA と、DNA 切断酵素・Cas9 タンパク質により、ゲノム上の任意の配列を切断することができる (Mali, *et al.* 2013)。さらに、切断部位に塩基の挿入、置換または欠失が生じることにより、目的遺伝子に変異を加えることが可能となる。近年、マウスモデルによる筋ジストロフィーの原因遺伝子の治療 (Nelson, *et al.* 2016) や農産物の改良 (Rodriguez-Leal, *et al.* 2017) など、多方面における応用が期待されている。実験を始める前に、第4章の結果を踏まえ、免疫染色を用いて未分化 hiPSCs および初期胚体外分化細胞における CRBN 発現の比較を試みたが、全ての細胞が一様に抗 CRBN 抗体により染色さ

れているように見え、同タンパクの発現量の違いに関して明確な結論を得ることができなかった。さらに、CRBN 発現のポジティブコントロールとなる細胞 (CRBN が高発現していることがわかっている細胞) を探したが、まず、CRBN の発現はユビキタスとされており、決定的な情報を得ることができなかった。そこで、CRBN をノックアウトさせた hiPSCs を作製することにより、CRBN 発現のネガティブコントロールとなる細胞を得るという目的も含め、本章の実験を行った。

## **S1.2 材料および方法**

実験は、次の 4 つのステップで構成される。本研究においては、1-3 まで達成した。

1. guide RNA および CRISPR Nuclease Vector のデザイン (S1.2.1)
2. CRISPR ベクターの切断効率の算定 (S1.2.2)
3. hiPSCs への CRISPR ベクターの導入 (S1.2.3)
4. ノックアウト hiPSCs のクローニング

### **S1.2.1 guide RNA および CRISPR Nuclease Vector のデザイン**

CRISPR/Cas9 ベクターの作製には GeneArt® CRISPR Nuclease Vector with GFP Reporter Kit (A21174, Thermo Fischer Scientific) を用いた。CRISPR design (<http://crispr.mit.edu/>) を使用し、guide RNA の配列を決定した。決定した配列に基づき、オリゴヌクレオチドを合成した (Integrated DNA Technologies に外注)。作製した gRNA を使用したキットのプロトコールに基づき、GeneArt CRISPR Nuclease Vector にクローニングした。



### S1.2.2 CRISPR ベクターの切断効率の算定

6.2.1 で作製した CRISPR ベクターの切断効率を調べるため、K562 細胞株 (human immortalised myelogenous leukemia line, RIKEN RBC Cell Bank) にリポフェクション 3000 (L3000001, Thermo Fisher Scientific) を用いて導入した。切断効率の算定は、ヒトの細胞であればどの細胞株を用いても構わないが、培養および遺伝子導入が容易であることから K562 細胞の使用を決めた。K562 細胞は 10%FBS および 1% Penicillin streptomycin を含む RPMI1640 (11875093, Thermo Fisher Scientific) 培地で培養した。

リポフェクションより 3 日後、ベクター導入細胞 (OFP 導入細胞: orange fluorescent protein により、赤色に蛍光する) をセルソーター (JSAN, Bay bioscience, Hyogo, Japan) を使ってソーティングした。DNeasy Blood & Tissue kit (69504, QUIAGEN, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA の抽出を行い、各ベクターのターゲット領域 (第一エクソンおよび第二エクソン) を PCR により増幅させた。電気泳動を行い、ゲルから DNA を抽出した後、シーケンス解析を行った (ユーロフィンジェノミクスに外注)。TIDE (<https://tide.nki.nl/>) により切断効率を調べた。

### S1.2.3 CRISPR ベクターの hiPSCs への導入

CRISPR ベクターの hiPSCs への導入を行った。導入にはエレクトロポレーション (Gene Pulsar Xcell, Bio Rad, Ca, USA, 条件: 250V, 950 $\mu$ F,  $2 \times 10^6$  cells/400 $\mu$ L, DNA 50 $\mu$ g) を用いた。エレクトロポレーション後、12 ウェルプレートに細胞を播種した。エレクトロポレーションから 1 および 3 日後、オールインワン蛍光顕微鏡で細胞を観察し、おおよその導入率を算定した。導入率の算定は、次のように行った。まず、1 視野に接着細胞 約 100 細胞が入るように観察画像を拡大した。OFP 陽性細胞をカウントし、1 視野の接着細胞数で割った。得られた値を 100 倍したものを導入率とした。導入率は、3-4 視野の平均とした。

## S1.3 結果

### S1.3.1 5つの guide RNA の作製による CRISPR Nuclease Vector のデザイン

最初に、guide RNA の配列を決定した。CRBN の第一エクソンをターゲットとした guide RNA を 3 つ (Vector name : No.1, 2, 3), 第二エクソンをターゲットとした guide RNA を 2 つ (Vector name : No.4, 5) 作製した (図 6-1 および表 6-1)。

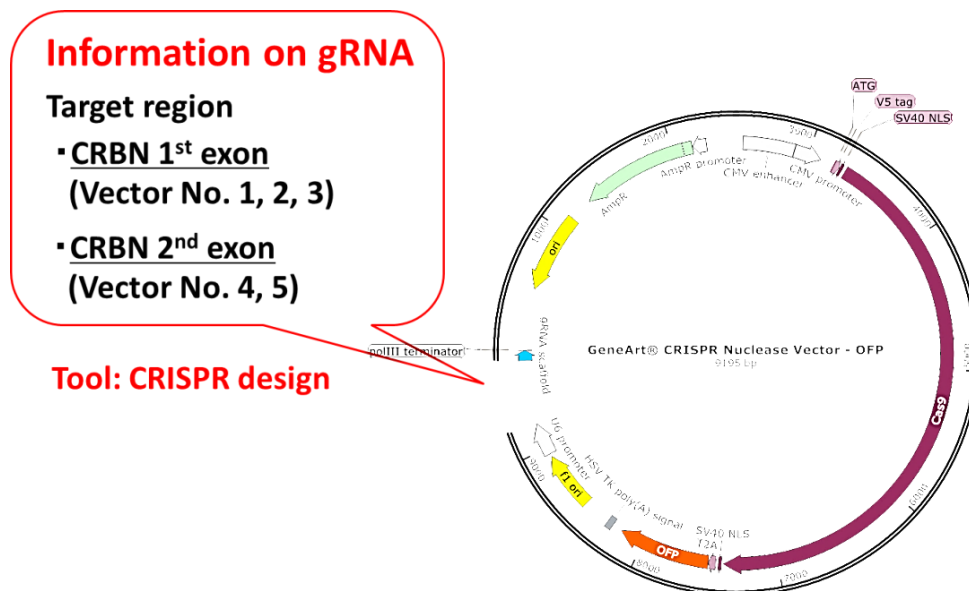


図 S1-1 guide RNA および CRISPR Nuclease Vector のデザイン

表 S1-1 guide RNA の配列情報

Vector name	gRNA 配列 (5'→3') 青色の文字は PAM 配列 (Cas9 が目印とする配列)
No.1	ACTCCGGGCGGTTACCAGGCAGG
No.2	CAGGACGCTGCGCACAACATGGG
No.3	GCAGGACGCTGCGCACAACATGG
No.4	TTTTGGCTTCTTTACTATCCTGG
No.5	GTGTCAAAATTTATGATGTTGG

### S1.3.2 高い切断効率を示す 2 つのベクターの選定

作製した 5 つの CRISPR ベクターの切断効率を調べ、今後の実験に使用可能なベクターを選定した。切断効率の解析にはフリーソフト TIDE を用いた (Brinkman, *et al.* 2014)。解析の結果、Vector No.1 および No.2 が高い切断効率を示した (表 S1-2)。また、これら二つのベクターは、DNA シークエンスの解析の結果から、ターゲット部位に変異が入っていることが確認できた。以上のことから、CRBN ノックアウト hiPS 細胞株の樹立においては Vector No.1 および No.2 を使用することとした。

表 S1-2 各 guide RNA の切断効率

Vector name	Cutting efficiency
No.1	82.8%
No.2	82.8%
No.3	53.7%
No.4	4.8%
No.5	14.0%

### S1.3.3 CRISPR ベクター導入後に hiPSCs の細胞数が激減する

作製した CRISPR ベクターを hiPSCs へ導入し、蛍光顕微鏡を用いて導入および時間経過に伴う GFP シグナルの変化を確認した。CRISPR ベクターの導入方法の検討も兼ねて、切断効率が低かったことから CRBN ノックアウト hiPS 細胞株の樹立においては使用しない Vector No. 3-5 を用いた。

この実験を行う前に、リポフェクションによる hiPSCs への CRISPR ベクターの導入を試した。しかし、導入率が 1%程度と低く、これより、エレクトロポレーションでの導入を採用した。エレクトロポレーションでベクターを導入し、24 時間後 (day 1) に観察したところ、細胞は 20%コンフルエント、導入率は 30%だった。72 時間後 (day 3) には細胞が増殖し、90%コンフルエントとなったが、導入細胞の割合は 2-3%に激減した (図 S1-2)。このとき、異なるベクター間で導入率に違いはなかった。培養日数を経るとベクター導入細胞が死滅してしまうため、この後に続くソーティング操作およびベクター導入細胞のクローニングが困難となった。

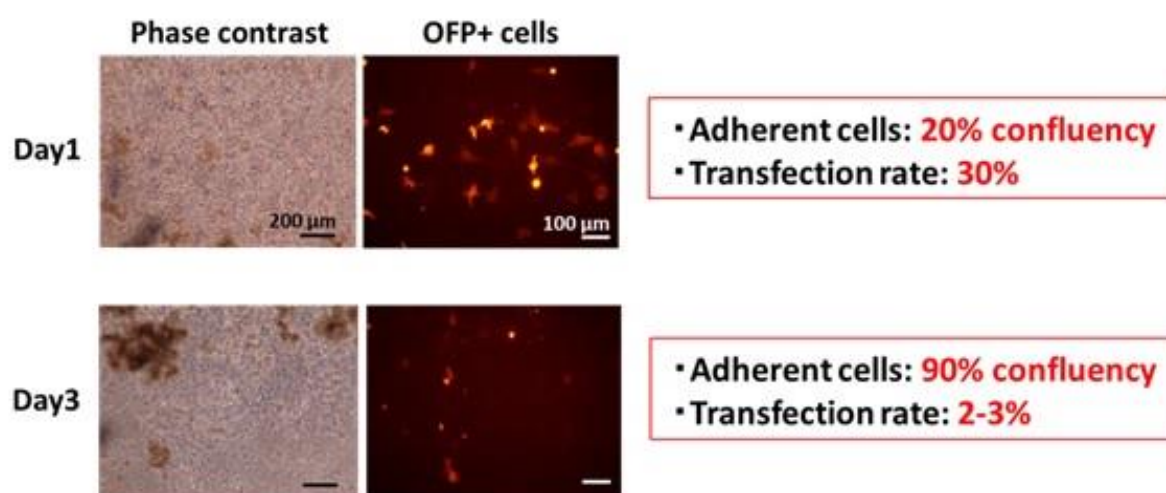


図 S1-2 hiPSCs への CRISPR ベクター導入後の観察

CRISPR ベクターが導入された細胞は、赤色に蛍光する (OFP+ cells)。

## S1.4 考察

追補-1 では、サリドマイドに対する耐性の違いが同薬の一次標的分子・CRBN の発現量に依存しているという仮説を証明するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて CRBN ノックアウト hiPS 細胞株の作製を試みた。

CRISPR/Cas9 システムは従来の遺伝子編集技術に比べて特異性が高く、また、デザインが簡便であることから、2013 年に報告されて以来広く使用されている。しかし、現状においては、同システムを用いた hiPSCs での遺伝子編集の成功例は世界的に見ても少ない (Irie, *et al.* 2015, Li, *et al.* 2015)。共同研究を行ったスタンフォード大学中内研究室の研究グループからの報告によると、CRISPR のプラスミドベクターが hiPSCs に対して毒性を持っている可能性がある (Personal communication)。また、同チームが 48 時間後に OFP 陽性細胞をソーティングし、それらをクローニングして DNA シークエンス解析を行ったところ、20 コロニーをピックアップしても目的の変異が入ったコロニーを見つけることはできなかった (Personal communication)。これらのことから、本実験においても実験の継続は困難と判断した。Cas9 の導入法には、本研究で用いた Cas9 発現プラスミドベクターに加え、Cas9 mRNA、Cas9 タンパク質の 3 つのタイプがある。使用したプラスミドベクターの発売元の情報では、最も編集効率が高いのは Cas9 をタンパク質で導入する方法とのことだった。そこで、今後、プラスミドベクターに代わり、他の方法で Cas9 を導入することで、細胞の生存率および遺伝子編集効率の改善が可能となるかもしれない。

## 追補 2 hiPSCs の初期中胚葉および内胚葉への分化誘導プロトコルの検討

### S2.1 目的

サリドマイドが初期中胚葉分化に及ぼす影響を調べるため (第 5 章), hiPSCs の初期中胚葉および初期内胚葉 (中胚葉分化のコントロールとして使用) への分化誘導プロトコルの作成および検討を行った。本研究では, hiPSCs の初期中胚葉への分化誘導プロトコルを 3 つ, 初期内胚葉への分化誘導プロトコルを 2 つ作成した。第 5 章では, その中で最も適したプロトコルを選定し, 使用した (詳細は 5.2.1 および 5.3.1 に示した)。追補 2 では, 第 5 章において使用しなかった 3 つのプロトコルについて記録する。

### S2.2 材料および方法

hiPSCs の前培養は, 4 章-未分化な hiPSCs および hiPSCs の初期胚体外胚葉分化へのサリドマイドの影響と共通の方法で行った (4.2.1: hiPSCs の血清・フィーダー培養, 4.2.2: hiPSCs の無血清・無フィーダー培養を参照)。

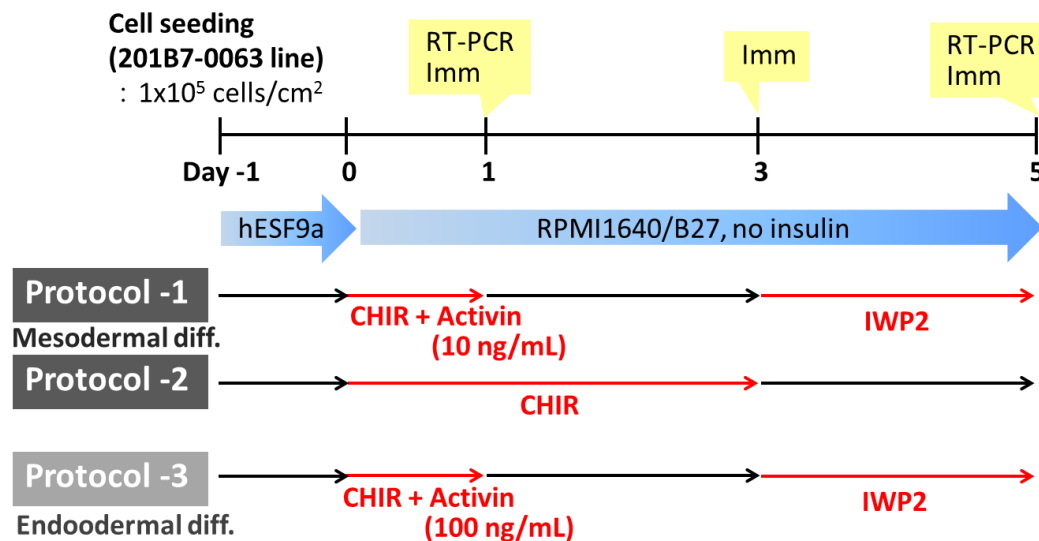
解析は, 4 章および 5 章-hiPSCs の初期中胚葉分化過程へのサリドマイドの影響で記述した方法と同様に行った (4.2.6: 免疫染色, 5.2.2: RT-PCR を参照)。追補 2 で用いた抗体情報は表 S2-1, プライマー情報は表 S2-2 に示した。

#### S2.2.1 hiPSCs の初期中胚葉および初期内胚葉分化

hiPSCs の初期中胚葉 (Protocol 1, 2) および初期内胚葉への分化誘導スケジュール (Protocol 3) は図 S2-1 に示した。細胞は 4.1.4 と同様の方法で回収および播種した。細胞播種濃度は  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> とした。細胞播種の翌日より, 全てのプロトコルにおいて基礎

培地を ESF9a から B27 supplement (17504044, ThermoFisher SCIENTIFIC, 最終濃度 : 1%) を添加した RPMI1640 (189-02025, Wako) に変更した。ROCK 阻害剤の添加は, day -1 から day 0 の間のみとした。Protocol 1, 3 では細胞播種の翌日に CHIR99021 および Activin (Protocol 1 では最終濃度 10 ng/mL, Protocol 3 では最終濃度 100 ng/mL) を添加した。24 時間後にこれらを除いた培地に交換し, さらに, 分化誘導の開始から 3 日目に Wnt/ $\beta$ -catenin 阻害剤・IWP2 (090-06241, Wako, 最終濃度 : 5  $\mu$ M) の添加を行った。Protocol 2 においては, 細胞播種の翌日から 3 日間 CHIR99021 を細胞に添加した。3 日目に CHIR99021 を除去した培地に交換した。全プロトコール共通して, CHIR99021 の最終濃度を 6  $\mu$ M とした。

分化スケジュールの day 1, 3 および 5 において RT-PCR および免疫染色を行い, 分化の状態を評価した。



- CHIR (GSK3 阻害剤) : final concentration 6  $\mu$ M
- IWP2 (Wnt/ $\beta$ -catenin 阻害剤): final concentration 5

図 S2-1 初期中胚葉および内胚葉への分化誘導スケジュール

Protocol 1 および 2 は初期中胚葉分化, Protocol 3 は内胚葉分化のスケジュールを示す。

表 S2-1 抗体情報

Markers	Antibody
HAND1	Anti-human HAND1 NL-637-conjugated goat IgG SC022, R&D systems Dilution 1/10
GATA4	Anti-human GATA4 NL-493-conjugated goat IgG SC022, R&D systems Dilution 1/10

TRA1-60, BRACHYURY, SOX17 抗体は表 4-3 と共通のものを使用した。

表 S2-2 プライマー情報

マーカー	配列(5'→3')		サイズ (bp)	反応方法	サイクル数
GSC 脊索	CGAGGAGAAAGTGGAGGTCTGG	F	261	2	30
	GCAGCGCGTGTGCAAGAAA	R			
NKX2.5 心筋分化	GCGATTATGCAGCGTGCAATGAGT	F	220	2	30
	AACATAAATACGGGTGGGTGCGTG	R			
MIXL1 原条	CAGAGTGGGAAATCCTTCCA	F	231	3	30
	TGAGTCCAGCTTTGAACCAA	R			

《反応方法》

2 step cycle : 94℃ 30 sec → 68℃ 30 sec (×30 cycle) → 72℃ 5 min → 4℃ ∞

3 step cycle : 94℃ 30 sec → 58℃ 30 sec → 72℃ 40 sec (×30 cycle) → 72℃ 5 min → 4℃ ∞

*GAPDH*, *OCT3/4*, *BRACHYURY*, *MSX1*, *FOXA2* のプライマーは表 5-2 と共通のものを使用した。



## S2.3 結果

### S2.3.1 検討した3つのプロトコルでは、中胚葉・内胚葉の両分化マーカーの発現が誘導される

サリドマイド曝露実験のための初期中胚葉および内胚葉分化プロトコルの作成および検討を行った。追補2では、中胚葉2つ、内胚葉1つの合計3つのプロトコルを作成し、RT-PCR および免疫染色を用いて分化誘導の評価を行った。

Day 5 サンプルの RT-PCR 解析において、Protocol 1, 3 の発現はほぼ同じだった。しかし、中内胚葉マーカー・*BRACHYURY* は Protocol 1 および 3 では消失しており (Day1 では全プロトコルで発現を確認している)、Protocol 2 でのみ発現していた (表 S2-3)。また、内胚葉マーカー・*FOXA2* は、Protocol 1, 2 と比較して Protocol 3 では発現がわずかに増加した (表 S2-3)。

免疫染色の結果、*BRACHYURY* は RT-PCR と同様、Day 5 サンプルにおいては Protocol 2 でのみ発現が見られた (表 S2-4)。また、内胚葉マーカー・*GATA4* および *SOX17* の発現が、Protocol 2 では Protocol 1, 3 と比較して減少しているように見えた (表 S2-4)。

これらの結果から、中胚葉分化マーカーの発現は、*CHIR99021* のみ長期間添加した場合 (Protocol 2)、アクチビンを添加した条件 (Protocol 1, 3) よりも増加することがわかった。一方、内胚葉分化マーカーの発現は、アクチビンの濃度が高い方 (Protocol 3) がより強いことが示された。

表 S2-3 RT-PCR によるマーカー発現解析結果

Day 5

	Undiff. marker	Mesendoderm diff. marker	Mesoderm diff. marker			Endoderm diff. marker
	<i>OCT3/4</i>	<i>BRACHYURY</i>	<i>GSC</i>	<i>MSX1</i>	<i>NKX2.5</i>	<i>FOXA2</i>
Undiff. hiPSCs	+++	-	-	-	-	-
Protocol 1 (CHIR99021 + Activin 10 ng/mL)	+++	-	++	++	++	++
Protocol 2 (CHIR 99021 3 days)	+++	+++	++	+++	++	++
Protocol 3 (CHIR99021 + Activin 100 ng/mL)	+++	-	++	+++	++	+++

‘+’ - little expression, ‘+++’ - most expression

‘-’ - No expression

表 S2-4 免疫染色によるマーカー発現解析結果

Day 5

	Undiff. marker	Mesendoderm diff. marker	Mesoderm diff. marker	Endoderm diff. marker	
	TRA1-60	BRACHYURY	HAND1	GATA4	SOX17
Undiff. hiPSCs	+	-	-	-	-
Protocol 1 (CHIR99021 + Activin 10 ng/mL)	+	-	+	++	++
Protocol 2 (CHIR 99021 3 days)	++	+	+	-	+
Protocol 3 (CHIR99021 + Activin 100 ng/mL)	++	-		++	++

‘+’ - little expression, ‘+++’ - most expression

‘-’ - No expression

## S2.4 考察

サリドマイド曝露実験のための初期中胚葉および内胚葉分化プロトコルの作成および検討を行った。追補 2 では、第 5 章で使用しなかった 3 つのプロトコルの評価結果について記録する。

Protocol 1 は、Kim M 等 (Kim, *et al.* 2015) が発表した CHIR99021 および IWP2 を用いた hiPSCs の心筋分化についての論文を参考にした。また、Protocol 2 は hiPSCs の腎臓への分化誘導プロトコル (Takasato, *et al.* 2016) を参考にした。Protocol 2 では、CHIR 添加時間を延長することで Protocol 1 よりも強力に中胚葉へと分化誘導されることを期待した。その結果、Day5 において内胚葉分化マーカーの発現はわずかに減少し、BRACHYURY の発現が確認できた。しかし、BRACHYURY は中内胚葉の分化マーカーであり、中胚葉分化の証明としては不十分だと考えられる。

Protocol 3 では、内胚葉分化を試みた。アクチビンの添加量を Protocol 1 の 10 倍にしたことで、RT-PCR 解析において FOXA2 の発現がわずかに増加したことが示された。しかし、その他のマーカー発現はどのプロトコルでも同様の結果となり、作成した 3 つのプロトコルでは、中胚葉、内胚葉の作り分けを明確に行うことはできなかった。

そこで、Ninomiya 等の論文 (Ninomiya, *et al.* 2015) を参考に、さらに各胚葉への分化誘導プロトコルに修正を加えることとした。初期中胚葉分化においては Protocol 2 をベースとして基礎培地を変更し、内胚葉分化マーカーの発現を抑える。また、内胚葉分化においては、高濃度 Activin の添加時間を延長し (3 日間)、IWP2 による強制的な Wnt シグナルの遮断を行わない。これにより、中胚葉分化とは反対に SOX17 および FOXA2 のような内胚葉マーカーの発現の増加を期待する。修正したプロトコルによる分化の確認の結果は、第 5 章 5.2.1 および 5.3.1 に示した。