

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5783504号
(P5783504)

(45) 発行日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24)

(24) 登録日 平成27年7月31日 (2015. 7. 31)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	5/0793	(2010. 01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 S
C 1 2 Q	1/02	(2006. 01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	(2006. 01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 13 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2009-81497 (P2009-81497)	(73) 特許権者	501273886
(22) 出願日	平成21年3月30日 (2009. 3. 30)		国立研究開発法人国立環境研究所
(65) 公開番号	特開2010-227079 (P2010-227079A)		茨城県つくば市小野川16-2
(43) 公開日	平成22年10月14日 (2010. 10. 14)	(74) 代理人	110001508
審査請求日	平成24年3月21日 (2012. 3. 21)		特許業務法人 津国
前置審査		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100116528
			弁理士 三宅 俊男
		(74) 代理人	100146031
			弁理士 柴田 明夫
		(74) 代理人	100141357
			弁理士 鈴木 音哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記工程：

ウェルの直径が300 μmであり、ウェル間の距離（ピッチ）が330 μmであり、ウェルの深さが270 μmである、1020個の均一なウェルを枠内（10×10 mm）に有する取り外し可能な枠を有する24×24 mm角の枠分離型マイクロスフィアアレイを用いて、マイクロスフィアアレイ当たりES細胞懸濁液を1×10⁵ cells / 250 μlずつ加え、ES細胞からなるマイクロスフィアを神経誘導因子に暴露させ、ニューロスフィア前駆体を形成させること、

得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させることを含む、神経細胞系モデルの作成方法。

【請求項2】

上記神経細胞培養用容器が、オルニチン・ラミニンコートプレートである、請求項1に記載の神経細胞系モデルの作成方法。

【請求項3】

全工程が、20日間で終了する、請求項2に記載の神経細胞系モデルの作成方法。

【請求項4】

下記工程：

ウェルの直径が300 μmであり、ウェル間の距離（ピッチ）が330 μmであり、ウェ

ルの深さが270 μmである、1020個の均一なウェルを枠内(10×10mm)に有する取り外し可能な枠を有する24×24mm角の枠分離型マイクロスフィアアレイを用いて、マイクロスフィアアレイ当たりES細胞懸濁液を 1×10^5 cells / 250 μlずつ加え、ES細胞からなるマイクロスフィアとサンプルとを接触させること、上記マイクロスフィアからサンプルを分離すること、上記マイクロスフィアの一部を神経誘導因子に暴露し、ニューロスフィア前駆体を形成させるとともに、残りの一部からトータルRNAを回収し、遺伝子の発現量を測定すること、

得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させる、神経細胞系モデルを作成すること、

得られた神経細胞系モデルの細胞形態を測定すること

を含む、胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

【請求項5】

上記神経細胞培養用容器が、オルニチン・ラミニンコートプレートである、請求項4に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

【請求項6】

上記遺伝子が、下記：

ER、ER、AR、RAR及びRARからなる群より選択される1以上の核内レセプター遺伝子と、

DTNBP1、NRG1、DAO、DAOA、RGS4、CAPON、PPP3CC、TRAR4、VCF5、COMT、PRODH、DHHC、ZDHHC8、DISC1及びGRM5からなる群より選択される1以上の統合失調症の感受性遺伝子、

Tsc1、Tsc2、Fmr1、Ube3a、Reln、Nlgn3、Foxp2、Cntnap2、Slc6a4、Gabbr3、Mecp2及びEn2からなる群より選択される1以上の自閉症関連遺伝子、

EphrinB、EphB、Sema3A、PlexinA、Sema7A、Itgb1、Netrin1、Slit1、Robo2、Cxc12、Cxcr4、NetrinG、NGL1及びUnc5からなる群より選択される1以上の軸索ガイダンス関連遺伝子、

Foxg1、Emx1、Emx2、Nkx2.1、Otx1、Otx2、En1、Gbx2、Hoxb1及びHoxa2からなる群より選択される1以上の脳セグメンテーション関連遺伝子、

Snca、Uchl1、ApoE、Park7、Apbb1、Bcl2、Ube2l1、Ubqln1、Bax、Cdk5、Ubb、Als2、Gtf2a1、Bace1、App、Psen1、Ide、Ccs、Sod1及びGpx1からなる群より選択される1以上の神経疾患関連遺伝子、

Nanog、Klf4、Zfp42、Pou5f1、Fgfr1、Nestin、Tuj1、Map2、Olig2、Gfap、Raf1、Atbf1、Pla2g6、Cdy1、Mapk3、Shc1、Hras1、Rps6ka1、Mapk1、Smad1、Gbx2、Sal11、Map2k1、Fos及びRif1からなる群より選択される1以上の神経発達関連遺伝子、

Th、Slc6a3、Snca、Ube1、Ubch7、Park2、Uch1、Park7、Casp9、Casp3及びCasp7からなる群より選択される1以上のパーキンソン病関連遺伝子、及び/又は

App、Bace、Psen、ApoE、Ide、Mme、Il1r1、Tnfrsf1a、Casp3及びCasp7からなる群より選択される1以上のアルツハイマー病関連遺伝子との組合せである、請求項5に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

【請求項7】

10

20

30

40

50

上記細胞形態が、ニューロスフィアの面積、ニューロスフィアの真円率、ニューロスフィアの個数、細胞数、核の面積、ニューロスフィアの円周、神経突起の長さ、神経突起の交差点の個数及び神経突起の分岐点の個数である、請求項5に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

【請求項 8】

上記細胞形態の測定を、マルチチャンネル細胞画像解析装置によって行う、請求項7に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

【請求項 9】

下記工程：

ウェルの直径が $300\ \mu\text{m}$ であり、ウェル間の距離（ピッチ）が $330\ \mu\text{m}$ であり、ウェルの深さが $270\ \mu\text{m}$ である、 1020 個の均一なウェルを枠内（ $10 \times 10\ \text{mm}$ ）に有する取り外し可能な枠を有する $24 \times 24\ \text{mm}$ 角の枠分離型マイクロスフィアアレイを用いて、マイクロスフィアアレイ当たり ES 細胞懸濁液を $1 \times 10^5\ \text{cells} / 250\ \mu\text{l}$ ずつ加え、ES 細胞からなるマイクロスフィアとサンプルとを接触させること、

上記マイクロスフィアからサンプルを分離すること、

上記マイクロスフィアの一部を神経誘導因子に暴露し、ニューロスフィア前駆体を形成させるとともに、残りの一部からトータル RNA を回収し、遺伝子の発現量を測定すること

、
得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させる、神経細胞系モデルを作成すること、

得られた神経細胞系モデルの細胞形態を測定すること

得られた上記遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、サンプルで処理しない場合か又は胎生プログラミングに対する影響が知られている物質についての測定値と対比すること

、
を含む胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法。

【請求項 10】

上記胎生プログラミングに対する影響を、ベジアンネットワークシステムを用いて評価する、請求項9に記載の胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法。

【請求項 11】

下記工程：

ウェルの直径が $300\ \mu\text{m}$ であり、ウェル間の距離（ピッチ）が $330\ \mu\text{m}$ であり、ウェルの深さが $270\ \mu\text{m}$ である、 1020 個の均一なウェルを枠内（ $10 \times 10\ \text{mm}$ ）に有する取り外し可能な枠を有する $24 \times 24\ \text{mm}$ 角の枠分離型マイクロスフィアアレイを用いて、マイクロスフィアアレイ当たり ES 細胞懸濁液を $1 \times 10^5\ \text{cells} / 250\ \mu\text{l}$ ずつ加え、ES 細胞からなるマイクロスフィアとサンプルとを接触させること、

上記マイクロスフィアからサンプルを分離すること、

上記マイクロスフィアの一部を神経誘導因子に暴露し、ニューロスフィア前駆体を形成させるとともに、残りの一部からトータル RNA を回収し、遺伝子の発現量を測定すること

、
得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させる、神経細胞系モデルを作成すること、

得られた神経細胞系モデルの細胞形態を測定すること

遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、胎生プログラミングに対する影響が知られている物質についての測定値と対比すること

を含む、病変リスクを予測するためのデータを提供する方法。

【請求項 12】

下記工程：

ウェルの直径が $300\ \mu\text{m}$ であり、ウェル間の距離（ピッチ）が $330\ \mu\text{m}$ であり、ウェ

10

20

30

40

50

ルの深さが $270\ \mu\text{m}$ である、 1020 個の均一なウェルを枠内 ($10 \times 10\ \text{mm}$) に有する取り外し可能な枠を有する $24 \times 24\ \text{mm}$ 角の枠分離型マイクロスフィアアレイを用いて、マイクロスフィアアレイ当たり ES 細胞懸濁液を $1 \times 10^5\ \text{cells} / 250\ \mu\text{l}$ ずつ加え、 ES 細胞からなるマイクロスフィアとサンプルとを接触させること、

上記マイクロスフィアからサンプルを分離すること、

上記マイクロスフィアの一部を神経誘導因子に暴露し、ニューロスフィア前駆体を形成させるとともに、残りの一部からトータルRNAを回収し、遺伝子の発現量を測定すること

、
得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させる、神経細胞系モデルを作成すること、

10

得られた神経細胞系モデルの細胞形態を測定すること

を含む、上記遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、サンプルで処理しない場合の測定値と対比する、胎生プログラミングに対する影響を有する物質をスクリーニングするための方法。

【請求項 13】

上記胎生プログラミングに対する影響を有する物質が、環境化学物質、医薬品又は農薬である、請求項 12 に記載のスクリーニングするための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、神経細胞系モデルの作成方法、それに用いる ES 細胞に由来する細胞からなるニューロスフィア前駆体、上記神経細胞系モデルを用いる、胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法、胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法、病変リスクを予測するための方法及び胎生プログラミングに対する影響を有する物質をスクリーニングするための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

化学物質の生体影響を取りまく状況には、化学物質の情報不足、アレルギー疾患や神経系障害など旧来のリスク評価では見過ごされてきた健康影響の増加、さらには、これらの影響が胎児期曝露による晩発影響（胎生プログラミング）であるとの指摘などがある。生体リスク（生物の健康リスク）の管理のうえでは、これらの指摘事項をクリアすることが必要である。そのためには、多種多様な化学物質ばかりでなく、多種多様なエンドポイントの評価が可能であり、簡便かつ高速多験体を解析することができる毒性評価システムの構築が求められている。さらに、成体の各臓器の発生・発育段階を模倣するモデル細胞系の確立も所望されている。

30

【0003】

神経機能障害に及ぼす影響を評価するための方法として、神経芽細胞を用いる方法も報告されているが（特許文献 1）、胎生プログラミングを評価する方法は、いまだ開発されていない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2006 - 325551 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、簡便かつ高速多験体を解析することができる胎生プログラミングの評価システムを提供する。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、神経細胞系モデルの作成方法、それに用いるES細胞に由来する細胞からなるニューロスフィア前駆体、上記神経細胞系モデルを用いる、胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法、胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法、病変リスクを予測するための方法及び胎生プログラミングに対する影響を有する物質をスクリーニングするための方法を開発し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明は、下記のとおりである。

[1] 神経細胞系モデルを作成するための、ES細胞に由来する細胞からなるニューロスフィア前駆体。

10

[2] 上記ES細胞が、ヒトES細胞である、[1]に記載のニューロスフィア前駆体。

[3] 下記工程：

ES細胞からなるマイクロスフィアを神経誘導因子に暴露させ、ニューロスフィア前駆体を形成させること、

得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させることを含む、神経細胞系モデルの作成方法。

[4] 上記神経細胞培養用容器が、オルニチン・ラミニンコートプレートである、[3]に記載の神経細胞系モデルの作成方法。

20

[5] 全工程が、20日間で終了する、[4]に記載の神経細胞系モデルの作成方法。

[6] 下記工程：

ES細胞からなるマイクロスフィアとサンプルとを接触させること、

上記マイクロスフィアからサンプルを分離すること、

上記マイクロスフィアの一部を神経誘導因子に暴露し、ニューロスフィア前駆体を形成させるとともに、残りの一部からトータルRNAを回収し、遺伝子の発現量を測定すること

、

得られたニューロスフィア前駆体を、神経細胞培養用容器を用いて神経誘導培地中で培養することによってニューロスフィアを構成する細胞を成熟神経細胞に分化させる、神経細胞系モデルを作成すること、

30

得られた神経細胞系モデルの細胞形態を測定すること

を含む、胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

[7] 上記神経細胞培養用容器が、オルニチン・ラミニンコートプレートである、[6]に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

[8] 上記遺伝子が、下記：

ER、ER、AR、RAR及びRARからなる群より選択される1以上の核内レセプター遺伝子と、

DTNBP1、NRG1、DAO、DAOA、RGS4、CAPON、PPP3CC、TRAR4、VCF5、COMT、PRODH、DHHC、ZDHHC8、DISC1及びGRM5からなる群より選択される1以上の統合失調症の感受性遺伝子、

40

Tsc1、Tsc2、Fmr1、Ube3a、Reln、Nlgn3、Foxp2、Cntnap2、Slc6a4、Gabbr3、Mecp2及びEn2からなる群より選択される1以上の自閉症関連遺伝子、

EphrinB、EphB、Sema3A、PlexinA、Sema7A、Itgb1、Netrin1、Slit1、Robo2、Cxc112、Cxcr4、NetrinG、NGL1、Unc5からなる群より選択される1以上の軸索ガイダンス関連遺伝子、Foxg1、Emx1、Emx2、Nkx2.1、Otx1、Otx2、En1、Gbx2、Hoxb1及びHoxa2からなる群より選択される1以上の脳セグメンテーション関連遺伝子、

50

S n c a、U c h 1 1、A p o e、P a r k 7、A p b b 1、B c 1 2、U b e 2 1 1、U b q 1 n 1、B a x、C d k 5、U b b、A l s 2、G t f 2 a 1、B a c e 1、A p p、P s e n 1、I d e、C c s、S o d 1 及び G p x 1 からなる群より選択される 1 以上の神経疾患関連遺伝子、

N a n o g、K l f 4、Z f p 4 2、P o u 5 f 1、F g f r 1、N e s t i n、T u j 1、M a p 2、O l i g 2、G f a p、R a f 1、A t b f 1、P l a 2 g 6、C d y 1、M a p k 3、S h c 1、H r a s 1、R p s 6 k a 1、M a p k 1、S m a r c a d 1、G b x 2、S a l 1 1、M a p 2 k 1、F o s 及び R i f 1 からなる群より選択される 1 以上の神経発達関連遺伝子、

T h、S l c 6 a 3、S n c a、U b e 1、U b c h 7、P a r k 2、U c h 1、P a r k 7、C a s p 9、C a s p 3 及び C a s p 7 からなる群より選択される 1 以上のパーキンソン病関連遺伝子、及び / 又は

A p p、B a c e、P s e n、A p o E、I d e、M m e、I l 1 r 1、T n f r s f 1 a、C a s p 3 及び C a s p 7 からなる群より選択される 1 以上のアルツハイマー病関連遺伝子との組合わせである、[7] に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

[9] 上記細胞形態が、ニューロスフィアの面積、ニューロスフィアの真円率、ニューロスフィアの個数、細胞数、核の面積、ニューロスフィアの円周、神経突起の長さ、神経突起の交差点の個数及び神経突起の分岐点の個数である、[7] に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

[10] 上記細胞形態の測定を、マルチチャンネル細胞画像解析装置によって行う、[9] に記載の胎生プログラミングに対する影響を測定するための方法。

[11] [6] に記載の方法によって得られた上記遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、サンプルで処理しない場合か又は胎生プログラミングに対する影響が知られている物質についての測定値と対比する、胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法。

[12] 上記胎生プログラミングに対する影響を、ベジアンネットワークシステムを用いて評価する、[11] に記載の胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法。

[13] [6] に記載の方法によって得られた上記遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、胎生プログラミングに対する影響が知られている物質についての測定値と対比することを含み、病変リスクを予測するための方法。

[14] [6] に記載の方法によって得られた上記遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、サンプルで処理しない場合の測定値と対比する、胎生プログラミングに対する影響を有する物質をスクリーニングするための方法。

[15] 上記胎生プログラミングに対する影響を有する物質が、環境化学物質、医薬品又は農薬である、[14] に記載のスクリーニングするための方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明の方法を用いることによって、胎生プログラミングに対する影響を評価することができる。また、本発明の方法を用いて胎児期曝露による晩発影響のハイスループット解析を実施したならば、多種多様な化学物質についての生体（健康）影響を予見する情報の利用が可能となる。このことによって、生体（健康）影響予測が可能となり、化学物質曝露の被害を未然に防ぐことも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の方法の模式図である。

【図2】対照群（0.1% DMSO）のマルチ情報のネットワーク図である。

【図3】PCB（ 10^{-8} M）処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図4】E2（ 10^{-8} M）処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

10

20

30

40

50

【図5】PMT (10^{-5} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図6】DHT (10^{-8} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図7】TMD (10^{-5} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図8】BPA (10^{-10} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図9】DEHP (10^{-4} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図10】T3 (10^{-8} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図11】MPA (10^{-4} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図12】DEX (10^{-8} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図13】CPM (10^{-5} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

【図14】TCDD (10^{-8} M) 処置群のマルチ情報のネットワーク図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明において神経細胞系モデルとは、ニューロン (MAP2 陽性面積) が占める面積比が総細胞面積の20~50%程度であり、かつ、グリア細胞 (GFAP 陽性細胞の占める面積) が占める面積比が総細胞面積の50~80%程度のものであるものをいう。

【0011】

本発明においてES細胞とは、動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られ、分化多能性及び無限増殖能を有する細胞をいう。動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、マウス又はヒトであり、最も好ましくは、ヒトである。また、本発明では、ES細胞の代わりにiPS細胞を用いることもできる。

20

【0012】

本発明においてニューロスフィア前駆体とは、神経幹細胞マーカーや神経発生初期マーカーが発現するが、グリア細胞は発生していない細胞凝集体のことをいう。成熟神経細胞の分化のためには、ニューロスフィア前駆体の平均直径が640 μ mであることが好ましい。

【0013】

本発明においてマイクロスフィアとは、45~200個の細胞、好ましくは、50~150個の細胞、より好ましくは、98個の細胞が凝集した球状の塊をいう。成熟神経細胞の分化のためには、ニューロスフィア前駆体の平均直径が210 μ m (オルチニンラミニンコートに播く直前の直径が210 μ mであり、オルチニンラミニンコートで培養後の20日目はニューロスフィアの平均直径は640 μ mとなる)であることが好ましい。マイクロスフィアの平均直径は、好ましくは、100~300 μ m、より好ましくは、200~250 μ m、最も好ましくは、210 μ mである。

30

【0014】

本発明において神経誘導因子とは、未分化細胞を神経細胞に誘導する能力を有する物質をいい、例えば、レチノイン酸を挙げることができる。レチノイン酸の処理濃度は、好ましくは、高濃度 (10^{-6} M)、中濃度 (10^{-7} M) 又は極めて低濃度 (10^{-9} M) であり、より好ましくは、低濃度 (10^{-8} M) である。

【0015】

本発明において神経細胞培養容器とは、神経誘導前のES細胞を大きさや分化の速度を均一にし、ニューロスフィア前駆体を形成する培養する培養器具をいい、例えば、マイクロデバイス、を挙げることができる。好ましくは、10~60 mmディッシュ、より好ましくは、24ウェルプレート、最も好ましくは、3次元パターニング (あるいは、マイクロスフィアアレイ) である。

40

【0016】

本発明の神経細胞培養容器は、オルニチン・ラミニンでコートされていることが、好ましい。オルニチン・ラミニンコートプレートは、プレートにオルニチン溶液を加え、37で一昼夜放置し、水洗後、ラミニン溶液を加え、37で4時間以上放置することによって作製することができる。オルニチン・ラミニンコートプレートとして、BD Bio CoatTM poly-L-Ornithine/Laminin cell ware 24-well Plateが市販されている。しかし、こ

50

のプレートは、ニューロスフィア前駆体の接着性や成熟神経幹細胞への分化誘導や増殖が悪いため、自分でオルニチン・ラミニンでコートを行ったものを使用しなければならない。

【0017】

本発明において成熟神経細胞とは、下記の条件の全てを満たす細胞をいう。

- 1) ニューロンの一視野面積 ($33354547 \mu\text{m}^2$) 当たりの分岐点が1000個~3500個であり、一視野面積当たりの交差点が200~600個であり、かつ、一視野面積当たり ($33354547 \mu\text{m}^2$) のMAP2陽性ニューロンの神経突起の伸張の総計 (総伸張) が $10000 \mu\text{m} \sim 50000 \mu\text{m}$ であり、
- 2) グリア細胞の一視野面積当たりの分岐点が150個~2700個であり、一視野面積当たりの交差点が20個~500個であり、かつ、一視野面積当たり ($33354547 \mu\text{m}^2$) のGFAP陽性グリア細胞の細胞質突起の伸張の総計 (総伸張) が $90000 \mu\text{m} \sim 300000 \mu\text{m}$ であり、
- 3) ニューロン及びグリア細胞が10000個~50000個の細胞からなるニューロスフィア前駆体由来し、この細胞が遊走して広がったものであり、
- 4) MAP2陽性総面積は、 $10000 \mu\text{m}^2 \sim 200000 \mu\text{m}^2$ であり、GFAP陽性面積は $600 \mu\text{m}^2 \sim 400000 \mu\text{m}^2$ の範囲である。

【0018】

本発明においてトータルRNAは、従来公知の任意の方法を用いて回収することができる。たとえば、マイクロスフィアアレイ上で化学物質暴露48時間後のニューロスフィア前駆体からRNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN)の手法に従ってTotal RNAを精製することができる。詳細な手法は、マイクロスフィアアレイ上で培養したニューロスフィア前駆体をPBSで洗浄後、ピペティングして回収し、1000rpmで5分間の遠心後、PBSを取り除き 5×10^6 個のES細胞あたり $350 \mu\text{l}$ のRLT Bufferを加えて1mlのシリンジ23G (直径0.65mm) で10回出し入れして細胞を分散させる。この細胞を試験に供するまで -80°C に保存する。 $350 \mu\text{l}$ の70%エタノールを添加し白濁するまでピペティングする。さらに、 $700 \mu\text{l}$ のサンプルを2mlのコレクションチューブの上に乗せたRNeasy spin columnに入れる。次に、12000rpmで室温で1分間遠心する。下のカラムの溶液を捨てる。さらに、RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN)キット内にあるRW1バッファーを $700 \mu\text{l}$ 加え、12000rpmで室温で1分間遠心する。次に、 $80 \mu\text{l}$ のDNase I溶液を加えて、室温に15分間置く。次に、 $350 \mu\text{l}$ のRW1を加え、12000rpmで室温で1分間、遠心し、 $500 \mu\text{l}$ のRPEバッファーを添加し、12000rpmで室温で1分間遠心する。 $500 \mu\text{l}$ のRPEバッファーを添加し、12000rpmで室温で1分間遠心し、 15000rpm で室温で1分間遠心し、spin columnを新しい1.5mlのコレクションチューブに移す。次に、 $20 \mu\text{l}$ のRNaseフリー水を加え、10000rpmで室温で1分間遠心し、Total RNAを得る。

【0019】

本発明において遺伝子の発現量は、従来公知の任意の方法を用いて測定することができる。たとえば、イルミナのBead Arrayによって遺伝子発現レベルを解析することができる。抽出したTotal RNAの吸光度を測定後、Agilent 2100 bioanalyzerとRNA LabChip Kitにより微量サンプルのTotal RNA用の電気泳動分析を行った。イルミナBead Arrayを行うためには、サンプル量は1アレイにつき $500 \text{ng} / 10 \mu\text{l}$ 以上で、サンプル純度は $0.1 \sim 2.60 / 0.1 \sim 2.80 = 1.7 \sim 2.1$ であることが必要である。

【0020】

本発明において細胞形態とは、ニューロスフィアの面積、ニューロスフィアの真円率、ニューロスフィアの個数、細胞数、核の面積、ニューロスフィアの円周、神経突起の長さ、神経突起の交差点の個数及び神経突起の分岐点の個数である。この細胞形態は、マルチチャンネル細胞画像解析装置を用いて測定することができる。

【0021】

本発明に用いることができるマルチチャンネル画像解析装置は、たとえば、IN Cell Analyzer 1000 (GEヘルスケアバイオサイエンス社)であり、細胞形態計測の方法は、20日間の培養後、画像解析装置で形態解析を行うために4% PFA (パラホルムアルデヒド) - 0.2 M スクロース - 0.1 M PBS (pH 7.4) で約15分間の固定を行った。固定後、0.1 M PBS で3回洗浄後、透過処理として0.1% Triton X 100 - 0.1 M PBS で30分間の処理を行った。その後、0.1 M PBS で3回洗浄し、1% BSA (ウシ血清アルブミン) - 0.1 M PBS で10分間のブロッキング操作を行った。

【0022】

本発明に使用する一次抗体として神経幹細胞の特異的なマーカーであるマウス抗ネスチンモノクローナル抗体 (CHEMICON International)、グリア細胞のマーカーであるマウス抗グリア線維酸性タンパク質 (GFAP) モノクローナル抗体 (CHEMICON International) を選択し、4 で一昼夜反応させる。翌日、0.1 M PBS で3回洗浄を行い、2次抗体として標識ヤギ抗マウス Ig G 抗体 (Alexa Fluor 568, Invitrogen) で1時間室温の反応を行い、0.1 M PBS にて10分間で3回ずつ洗浄する。核染色として2 µg/ml のヘキスト33342 溶液 (Dojindo) にて15分間反応後、0.1 M PBS で5分間で3回ずつ洗浄する。IN Cell Analyzer 1000で解析を行うために各ウェルにPBS を80% くらいに満たし、乾燥を防ぐためにパラフィルムでカバーをしてディッシュの蓋で密閉し冷蔵庫内で保存する。マルチチャンネル細胞画像解析装置 (IN Cell analyzer 1000, GE) によって画像として取得後、ニューロスフィアの面積、ニューロスフィアの真円率、ニューロスフィアの個数、細胞数、核の面積、ニューロスフィアの円周、神経突起の長さ、神経突起の交差点の個数及び神経突起の分岐点の個数をパラメーターとして選定しマルチ解析ソフトウェアの一つであるDeveloper Tool Boxによって自動的に個々の神経細胞の形態を測定し数値情報へ変換、定量的・客観的な表現型データとして化学物質の神経細胞の分化への影響の比較解析を行う。

【0023】

本発明に用いることができる遺伝子は、下記：

Raf1 (GENBANK ID AK036317)、Atbf1 (NM_007496)、Plag6 (NM_016915)、Cdy1 (NM_009881)、Mapk3 (NM_011952)、Shc1 (NM_011368)、Hras1 (NM_008284)、Rps6ka1 (NM_009097)、Mapk1 (NM_011949)、Smad1 (NM_007958)、Gbx2 (NM_010262)、Sal1 (NM_021390)、Map2k1 (NM_008927)、Fos (NM_010234)、Rif1 (NM_175238)、Gfap (NM_010277)、Map2 (NM_008927)、ネスチン (NM_016701)、Tuj1 (NM_023279) からなる群より選択される1以上の神経分化遺伝子と、

Esr1 (AK054182)、Esr2 (NM_010157)、AR (NM_013476)、RARa (NM_031528)、RARb (Mm.259318)、RARg (NM_011244)、Nanog (NM_028016)、Klf4 (NM_010637)、Zfp42 (NM_009556)、Pou5f1 (NM_013633)、Fgfr1 (NM_010206)、ネスチン (NM_016701)、Tuj1 (NM_023279)、Map2 (NM_008927)、Olig2 (NM_016967)、Gfap (NM_010277) からなる群より選択される1以上の核内受容体遺伝子を含む分化段階マーカー遺伝子と、

Esr1 (AK054182)、Esr2 (NM_010157)、AR (NM_013476)、RARa (NM_031528)、RARb (Mm.259318)、RARg (NM_011244)、EphrinB (NW_001030882)、EphB (NM_173447)、Sema3A (NM_009152)、PlexinA (Mm.3789)、Sema7A (NM_011352)、Itgb1 (NM_010578)

10

20

30

40

50

)、Netrin1 (Mm.39095)、Slit1 (NM_015748)、Robo2 (NM_175549)、Cxcl12 (NM_013655)、Cxcr4 (NM_009911)、NetrinG (Mm.39262)、NGL1 (Mm.241682)、Unc5 (NM_153131) からなる群より選択される1以上の核内受容体遺伝子を含む軸索伸長と、

Esr1 (AK054182)、Esr2 (NM_010157)、AR (NM_013476)、RARa (NM_031528)、RARb (Mm.259318)、RARg (NM_011244)、Tsc1 (NM_022887)、Tsc2 (NM_011647)、Fmr1 (NM_008031)、Ube3a (NM_011668)、Reln (NM_011261)、Nlgn3 (NM_172932)、Foxp2 (NM_053242)、Cntnap2 (NM_001004357)、Slc6a4 (NM_010484)、Gabrb3 (NM_008071)、Mecp2 (NM_010788)、En2 (NM_010134) からなる群より選択される1以上の核内受容体遺伝子を含む自閉症関連遺伝子と、

Esr1 (AK054182)、Esr2 (NM_010157)、AR (NM_013476)、RARa (NM_031528)、RARb (Mm.259318)、RARg (NM_011244)、Th (NM_009377)、Slc6a3 (NM_010020)、Snca (NM_009221)、Uba1 (NM_001136085)、Ubch7 (NM_020569)、Park2 (NM_016694)、Uchl1 (NM_011670)、Park7 (NM_020569)、Casp9 (NM_015733)、Casp3 (NM_009810)、Casp7 (NM_007611) からなる群より選択される1以上の核内受容体遺伝子を含むパーキンソン病関連遺伝子と、

Esr1 (AK054182)、Esr2 (NM_010157)、AR (NM_013476)、RARa (NM_031528)、RARb (Mm.259318)、RARg (NM_011244)、App (NM_007471)、Bace (NM_011792)、Psen (NM_008943)、ApoE (NM_009696)、Ide (NM_031156)、Mme (NM_008604)、Il1r1 (NM_008362)、Tnfrsf1a (NM_011609)、Casp3 (NM_009810)、Casp7 (NM_007611) からなる群より選択される1以上の核内受容体遺伝子を含むアルツハイマー病関連遺伝子との組み合わせである。

【0024】

10

20

30

合か又は胎生プログラミングに対する影響が知られている物質についての測定値と対比する方法は、たとえば、ベイジアンネットワークシステムである。ベイジアンネットワークとは、不確実性を含む事象の予測や合理的な意思決定、障害診断などに利用することのできる確率モデルの一種である。ある確率分布を表現し、その確率分布を計算し、予測や最適な意思決定を行う。この確率分布の計算は、確率推論と呼ばれる。ベイジアンネットワークの特徴は、因果的な構造をネットワークとして表し、その上で確率推論を行うことで不確実な事象の起こりやすさやその可能性を予測するものである。例えば、「変数（パラメーター） X が x という値を取るならば（親ノード）、変数 Y は y となる（子ノード）」という関係が成立するとすと、 Y のとる値は X の値から独立ではない。つまり、 Y は X の値に依存していて共変関係があるといえる。TAOgenは、Toyoshibaら及びYamanakaらによって開発された非循環ネットワークの関係を線形回帰によってベイジアン理論に基づく計算を行い、遺伝子間のリンケージ（関係性）を明らかにするものである（Yamanaka T, Toyoshiba H, Sone H, Parham FM, Portier CJ.:「大腸菌におけるS O S修復への適用で遺伝子相互作用・ネットワークを識別するためのTAO-Genアルゴリズム」 Environ Health Perspect. 112巻16号、1614-1621頁（2004）、Toyoshiba H, Yamanaka T, Sone H, Parham FM, Walker NJ, Martinez J, Portier CJ.:「遺伝子相互作用・ネットワークは、ダイオキシンがアリアル炭化水素レセプターとレチノイン酸レセプター・ベータの間の重要なつながりを誘導することを示唆する。」 Environ Health Perspect. 112巻12号、1217-1224頁（2004）。）。このTAOgenを元に、独自にカスタマイズしたmulti-TAOgenというソフトウェアを用いて解析を行った。

【0026】

本発明において、遺伝子発現量及び上記細胞形態の測定値を、胎生プログラミングに対する影響が知られている物質についての測定値と対比するとは、multi-TAOgenのソフトウェアによって統合化ネットワークを構築することをいう。

【0027】

胎児期曝露後の晩発影響を評価するため、ES細胞の大きさを均一に培養制御できる微粒型溝を100 - 1020個有するアレイ上でES細胞から均一な胚葉体（EB、embryonic body）の形成を行い、その後、神経誘導基底膜上で培養して、成熟神経細胞へ分化誘導する培養法を確立した。

【0028】

たとえば、神経系誘導剤であるレチノイン酸（ 10^{-8} M）とともに、3次元パターンングアレイ上の培養開始から化学物質に一定時間（たとえば、48時間）曝露させ、その後、RNAを抽出し、遺伝子発現を測定する。さらに、神経誘導基底膜上で培養し、成熟神経細胞の形態を計測する。計測した遺伝子発現情報及び細胞形態情報をベイジアンアルゴリズムにより相互関係を確率的に示したネットワーク図で示し、ネットワークの構造の違いにより、影響の違いを示す。これら一連の手法が、本発明の、マルチプロファイリングによる化学物質の胎生プログラミングに及ぼす影響検出法である。

【0029】

以下、本発明について、実施例を示して具体的に説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。

【実施例1】

【0030】

1. ES細胞の調製

GFP発現ベクターにCAGプロモーターを繋いで作製したGreen mouse FM131マウス由来のマウス胚性幹細胞株（mES細胞）であるB6G-2細胞系（理研）を、増殖不活性化処理済みのマウス繊維芽細胞（MEF）上で十分に増殖させた。その後、0.1%ゼラチンをコートした60mmディッシュ上でDMEM（フェノールレッド不含、Invitrogen）、15%FBS（ウシ胎児血清、Invitrogen）、100 μ M NEAA（Non-essential amino acids、Invitrogen）、100 μ M 2-ME（2-メルカプトエタノール、Invitrogen）、及び1000 U/ml LIF（白血病抑制因子、ES

10

20

30

40

50

GRO、Invitrogen)を含むES培地で継代を行った。MEFの影響が最も少なく遺伝子の変異を抑えられる第2継代後、マイクロスフィアアレイ上にES細胞を播種した。

【0031】

2. ES細胞マイクロスフィアの調製

細胞を培養する環境を制御することは、細胞の挙動の理解や細胞機能を工学的に応用する際に極めて重要である。本研究では、細胞が付着する基板、その付着面の位置と形状、細胞周囲の流動場を全てマイクロメーターの精度でパターンニングを行う微細加工技術である(軟性リソグラフィ)を施したデバイスのマイクロスフィアアレイ上でマウスのES細胞の大きさや分化速度の均一化を行い、成熟神経細胞を誘導する3次元的培養法を確立した。本研究で使用した枠分離型マイクロスフィアアレイ(チップ300)の構造は、基板として材質は、アクリル樹脂性であり外形寸法は、 24×24 mm角、枠樹脂の材質は、PDMS樹脂で出来ており、形状は額縁型の形状で内側に $250 \mu\text{l}$ の培地が入る容積として設計されている。この枠はピンセットで容易に取り外しが可能である。更に、枠内(10×10 mm)には1020個の均一なウェルが形成されており、ウェルの直径は $300 \mu\text{m}$ であり、ウェル間の距離(ピッチ)は $330 \mu\text{m}$ であり、ウェルの深さは $270 \mu\text{m}$ である。

【0032】

この枠分離型マイクロスフィアアレイ(チップ300)を6ウェルプレートへ移し、ピペットマンで、枠内の滅菌水を全て吸引除去する作業後、直ちにEB培地を入れてPBS(-)と置換した。この作業を3回行った後、 $250 \mu\text{l}$ ずつのEB培地を入れて37°Cのインキュベーターに静置した。第2継代のES細胞懸濁液を 4×10^5 cells/mlになるように調整した。調整後、インキュベーター内のマイクロスフィアアレイを取り出しEB培地を吸引除去し、ES細胞懸濁液を 1×10^5 cells/ $250 \mu\text{l}$ ずつアレイの枠内に、枠の端から緩やかに注ぎインキュベーター内に4時間程静置した。アレイに播種したES細胞は10分以内には全てウェル内に均一に集積することが確認された。培養6時間後に化学物質を添加したEB培地と培地交換を行い、化学物質での48時間の暴露を行った。

【0033】

3. ニューロスフィア前駆体の調製

化学物質添加48時間後に、 10^{-8} Mのレチノイン酸を含むEB培地と培地交換を行った。培養4日目に、再び、 10^{-8} Mのレチノイン酸を含むEB培地と培地交換を行った。更に、培養6日目にEB培地のみに交換した。培養8日目にマイクロスフィアアレイをピンセットで取り出し、全てのニューロスフィア前駆体を完全に回収するために非接着性の35 mmディッシュ内で1 mlのピペットで軽くピPETTINGを行い、ニューロスフィア前駆体を1.5 mlのマイクロチューブに回収した。あらかじめ自作した24ウェルのオルチニン・ラミニンコートプレートに、回収したニューロスフィア前駆体を200マイクロのチップで均一に83個/ウェルになるように200マイクロのチップで播種した。この時のニューロスフィア前駆体の直径の平均は約 $210 \mu\text{m}$ であった。

【0034】

オルチニン・ラミニンコートの作成方法は、下記のとおりである。Poly-L-オルチニン溶液を蒸留水で2.5倍に希釈した。 $100 \mu\text{l}$ のラミニンを、12 mlのPBSで希釈した。2.5倍に希釈したPoly-L-オルチニン溶液を、24ウェルに $500 \mu\text{l}$ ずつ分注し、37°Cのインキュベーター内で一昼夜静置した。翌日、DWで3回洗浄した。希釈したラミニンを24ウェルに $500 \mu\text{l}$ ずつ分注し、37°Cのインキュベーター内で4~6時間静置した。アスピレーターでラミニンを完全に吸い取り、1 mlのEB培地を加え、37°Cのインキュベーター内で静置した。

【0035】

4. 神経細胞系モデルの調製

EB培地で24時間培養後、ニューロスフィア前駆体が完全にウェル内で接着し、短い神経突起の伸長を確認後、神経誘導培地(DMEM/F12(1:1)、N2、 $10 \mu\text{g}$

10

20

30

40

50

/ml bFGF)へ培地交換を行った。培地交換は3日おきに行った。オルチニン・ラミニンコート上にニューロスフィア前駆体を播種後、12日間の培養を行った(培養期間の総計は20日間となった。)。培養12日目(培養期間の総計として20日間)の細胞は、下記の条件の全てを満たした。

(1)ニューロスフィア前駆体の平均真円率は、0.49、(2)ニューロスフィア前駆体の平均円周は1551.7 μm 、(3)ニューロスフィア前駆体の平均総面積は、6654069.2 μm^2 (4)ニューロスフィア前駆体の平均個数は、84.7個、(5)ニューロスフィア前駆体の平均直径は、492.3 μm 、(6)ニューロスフィア前駆体から遊走する細胞の総数は、14468.4個、(7)MAP2陽性ニューロスフィア前駆体の平均総面積は、601939.8 μm^2 、(8)MAP2陽性ニューロスフィア前駆体から遊走するMAP2陽性ニューロンの神経突起の平均総伸張は、237214.1 μm 、(9)MAP2陽性ニューロンの交差点の平均総数は、1284.6個、(10)GFAP陽性ニューロスフィア前駆体の平均総面積は、719544.9 μm^2 、(11)ニューロスフィア前駆体から遊走するGFAP陽性細胞の細胞質突起の平均総伸張は、43151.3 μm (12)GFAP陽性細胞の交差点の平均総数は、227.4個、(13)GFAP陽性細胞の分岐点の平均総数は、1079.5個であった。

【0036】

5.1.2 化学物質での実験結果

マルチチャンネル画像解析装置のIN Cellアナライザー1000により、コントロール群と12種類の選定被験化学物質(それぞれ高用量として、10nMのトリオドチロキシン、10nMのデキサメタゾン、10nMの17 β -エストラジオール、10nMの5 α -ジヒドロテストステロン、10nMの2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン(テトラクロロジベンゾダイオキシン)、100 μM のメトプレン酸、10 μM のシクロパミン、10 μM のサリドマイド、10nMの4(OH)-2',3,3',4',5'-ペンタクロロビフェニル(水酸化ポリクロロビフェニル107)、10 μM のペルメトリン、100pMのビスフェノール-A、100 μM のビス(2-エチルヘキシル)フタル酸(フタル酸ジエチルヘキシル)の曝露影響の結果を下記に示す。

【0037】

(1)ニューロスフィア前駆体の真円率は、コントロール群は0.49、10nM Dexは0.54、10 μM PMTは、0.56、10nM E2は0.56、10nM TCDDは、0.50、10nM DHTは、0.53、100 μM DEHPは0.57、100pM BPAは、0.58、10nM PCBは、0.51、10nM T3は、0.52、10 μM TMDは0.51、10 μM CPMは、0.52、100 μM MPAは0.55であった。

【0038】

(2)ニューロスフィア前駆体の円周は、コントロール群は1551.7 μm 、10nM Dexは1436.7 μm 、10 μM PMTは、1187.8 μm 、10nM E2は1250.5 μm 、10nM TCDDは、1429.9 μm 、10nM DHTは1393.0 μm 、100 μM DEHPは1207.8 μm 、100pM BPAは1182.6 μm 、10nM PCBは、1565.8 μm 、10nM T3は、1362.5 μm 、10 μM TMDは1317.0 μm 、10 μM CPMは1353.6 μm 、100 μM MPAは1269.2 μm であった。

【0039】

(3)ニューロスフィア前駆体の面積は、コントロール群は6654069.2 μm^2 、10nM Dexは6746902.5 μm^2 、10 μM PMTは5540044.2 μm^2 、10nM E2は4909425.8 μm^2 、10nM TCDDは5446502.0 μm^2 、10nM DHTは6109497.7 μm^2 、100 μM DEHPは5031102.7 μm^2 、100pM BPAは2756341.9 μm^2 、10n

10

20

30

40

50

M PCBは、 $4488292.4 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM T3 は、 $6088273.9 \mu\text{m}^2$ 、 $10 \mu\text{M TMD}$ は $4142275.1 \mu\text{m}^2$ 、 $10 \mu\text{M CPM}$ は $4164921.6 \mu\text{m}^2$ 、 $100 \mu\text{M MPA}$ は $4197825.1 \mu\text{m}^2$ であった。

【0040】

(4) ニューロスフィア前駆体の個数は、コントロール群は84.7個、 10 nM Dex は83.2個、 $10 \mu\text{M PMT}$ は89.6個、 10 nM E2 は69.5個、 10 nM TCDD は72.9個、 10 nM DHT は76.3個、 $100 \mu\text{M DEHP}$ は73.6個、 100 pM BPA は42.3個、 10 nM PCB は、50.1個、 10 nM T3 は、81.7個、 $10 \mu\text{M TMD}$ は59.2個、 $10 \mu\text{M CPM}$ は54.6個、 $100 \mu\text{M MPA}$ は58.8個であった。

10

【0041】

(5) ニューロスフィア前駆体の直径は、コントロール群は $492.3 \mu\text{m}$ 、 10 nM Dex は $459.4 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{M PMT}$ は、 $374.8 \mu\text{m}$ 、 10 nM E2 は $400.9 \mu\text{m}$ 、 10 nM TCDD は、 $455.8 \mu\text{m}$ 、 10 nM DHT は $447.8 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{M DEHP}$ は $383.9 \mu\text{m}$ 、 100 pM BPA は $365.0 \mu\text{m}$ 、 10 nM PCB は、 $501.3 \mu\text{m}$ 、 10 nM T3 は、 $431.8 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{M TMD}$ は $418.1 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{M CPM}$ は $429.6 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{M MPA}$ は $402.4 \mu\text{m}$ であった。

【0042】

(5) ニューロスフィア前駆体から遊走する細胞の個数は、コントロール群は14468.4個、 10 nM Dex は35288.1個、 $10 \mu\text{M PMT}$ は33720個、 10 nM E2 は28912.1個、 10 nM TCDD は13155.1個、 10 nM DHT は32571.9個、 $100 \mu\text{M DEHP}$ は33674.4個、 100 pM BPA は10271.4個、 10 nM PCB は、10119.8個、 10 nM T3 は、32269.9個、 $10 \mu\text{M TMD}$ は22190.1個、 $10 \mu\text{M CPM}$ は20452.1個、 $100 \mu\text{M MPA}$ は26177.6個であった。

20

【0043】

(6) MAP2陽性ニューロスフィア前駆体の面積は、コントロール群は $601939.8 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM Dex は $1077594.6 \mu\text{m}^2$ 、 $10 \mu\text{M PMT}$ は $1049239.8 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM E2 は $732158.4 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM TCDD は $471940.7 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM DHT は $254330.6 \mu\text{m}^2$ 、 $100 \mu\text{M DEHP}$ は $570495.2 \mu\text{m}^2$ 、 100 pM BPA は $344525.8 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM PCB は、 $354876.3 \mu\text{m}^2$ 、 10 nM T3 は、 $96074.0 \mu\text{m}^2$ 、 $10 \mu\text{M TMD}$ は $76430.1 \mu\text{m}^2$ 、 $10 \mu\text{M CPM}$ は $100555.5 \mu\text{m}^2$ 、 $100 \mu\text{M MPA}$ は $198445.2 \mu\text{m}^2$ であった。

30

【0044】

(7) ニューロスフィア前駆体から遊走するMAP2陽性ニューロンの神経突起の総伸張は、コントロール群は $237214.1 \mu\text{m}$ 、 10 nM Dex は $380272.0 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{M PMT}$ は、 $3629334.0 \mu\text{m}$ 、 10 nM E2 は $250986.2 \mu\text{m}$ 、 10 nM TCDD は、 $183235.9 \mu\text{m}$ 、 10 nM DHT は $1414267.0 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{M DEHP}$ は $224278.9 \mu\text{m}$ 、 100 pM BPA は $125299.8 \mu\text{m}$ 、 10 nM PCB は、 $137283.3 \mu\text{m}$ 、 10 nM T3 は、 $80916.1 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{M TMD}$ は $25101.7 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{M CPM}$ は $26316.2 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{M MPA}$ は $42969.9 \mu\text{m}$ であった。

40

【0045】

(8) MAP2陽性ニューロンの交差点の個数は、コントロール群は1284.6個、 10 nM Dex は1404.3個、 $10 \mu\text{M PMT}$ は1482.5個、 10 nM E2 は955.6個、 10 nM TCDD は987.4個、 10 nM DHT は543.8個、 $100 \mu\text{M DEHP}$ は869.2個、 100 pM BPA は664個、 10 nM PCB は、725.8個、 10 nM T3 は、303.4個、 $10 \mu\text{M TMD}$ は130.4

50

個、 $10\ \mu\text{M}$ CPMは 141.4 個、 $100\ \mu\text{M}$ MPAは 245.2 個であった。

【0046】

(9) MAP2陽性ニューロンの分岐点の個数は、コントロール群は 4615.6 個、 $10\ \text{nM}$ Dexは 6548.9 個、 $10\ \mu\text{M}$ PMTは 6230.7 個、 $10\ \text{nM}$ E2は 43272.5 個、 $10\ \text{nM}$ TCDDは 3525.6 個、 $10\ \text{nM}$ DHTは 2157.3 個、 $100\ \mu\text{M}$ DEHPは 3630.8 個、 $100\ \text{pM}$ BPAは 2395.6 個、 $10\ \text{nM}$ PCBは、 2573.7 個、 $10\ \text{nM}$ T3は、 1127 個、 $10\ \mu\text{M}$ TMDは 448.1 個、 $10\ \mu\text{M}$ CPMは 481.4 個、 $100\ \mu\text{M}$ MPAは 806.6 個であった。

【0047】

(10) GFAP陽性ニューロスフィア前躯体の面積は、コントロール群は $719544.9\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \text{nM}$ Dexは $2029240\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \mu\text{M}$ PMTは $955109.9\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \text{nM}$ E2は $831347.6\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \text{nM}$ TCDDは $569219.1\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \text{nM}$ DHTは $1808531.8\ \mu\text{m}^2$ 、 $100\ \mu\text{M}$ DEHPは $1086888.7\ \mu\text{m}^2$ 、 $100\ \text{pM}$ BPAは $1100168.1\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \text{nM}$ PCBは、 $1129661.4\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \text{nM}$ T3は、 $207471.2\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \mu\text{M}$ TMDは $213093.5\ \mu\text{m}^2$ 、 $10\ \mu\text{M}$ CPMは $109251.6\ \mu\text{m}^2$ 、 $100\ \mu\text{M}$ MPAは $252321.3\ \mu\text{m}^2$ であった。

【0048】

(11) ニューロスフィア前躯体から遊走するGFAP陽性細胞の細胞質突起の総伸張は、コントロール群は $43151.3\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \text{nM}$ Dexは $125382.9\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ PMTは、 $44386.0\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \text{nM}$ E2は $38771.9\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \text{nM}$ TCDDは、 $34419.4\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \text{nM}$ DHTは $129023.1\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ DEHPは $57664.5\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \text{pM}$ BPAは $61513.8\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \text{nM}$ PCBは、 $65410.1\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \text{nM}$ T3は、 $40538.4\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ TMDは $8267.9\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ CPMは $57194.8\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ MPAは $49229.4\ \mu\text{m}$ であった。

【0049】

(12) GFAP陽性細胞の交差点の個数は、コントロール群は 227.4 個、 $10\ \text{nM}$ Dexは 407.9 個、 $10\ \mu\text{M}$ PMTは 136 個、 $10\ \text{nM}$ E2は 116.1 個、 $10\ \text{nM}$ TCDDは 184.3 個、 $10\ \text{nM}$ DHTは 404.7 個、 $100\ \mu\text{M}$ DEHPは 169.1 個、 $100\ \text{pM}$ BPAは 302.7 個、 $10\ \text{nM}$ PCBは、 322.6 個、 $10\ \text{nM}$ T3は、 123.2 個、 $10\ \mu\text{M}$ TMDは 24.8 個、 $10\ \mu\text{M}$ CPMは 256.1 個、 $100\ \mu\text{M}$ MPAは 247.4 個であった。

【0050】

(13) GFAP陽性細胞の分岐点の個数は、コントロール群は 1079.5 個、 $10\ \text{nM}$ Dexは 2616.5 個、 $10\ \mu\text{M}$ PMTは 886 個、 $10\ \text{nM}$ E2は 774.1 個、 $10\ \text{nM}$ TCDDは 868.2 個、 $10\ \text{nM}$ DHTは 2600.1 個、 $100\ \mu\text{M}$ DEHPは 1149.7 個、 $100\ \text{pM}$ BPAは 1514.1 個、 $10\ \text{nM}$ PCBは、 1607 個、 $10\ \text{nM}$ T3は、 816.4 個、 $10\ \mu\text{M}$ TMDは 160.3 個、 $10\ \mu\text{M}$ CPMは 1365.2 個、 $100\ \mu\text{M}$ MPAは 1211.2 個であった。

【0051】

10

20

30

40

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

10

20

30

40

突起の長さ（1視野における総伸張の平均値）を促進する化学物質は、10 nM Dex (380272 μm)、10 μM PMT (362934 μm)、10 nM E2 (250986.2)、100 μM DEHP (224279 μm)、10 nM T3 (80916.1 μm)、10 μM TMD (25101.7 μm)、10 μM CPM (26316.2 μm)、100 μM MPA (42969.9 μm)であった。

【0053】

一方で、GFAP陽性細胞の突起の1視野における総伸長の平均値がControl群(43151.3 μm)と比して促進するものは、10 μM PMT (44386.1 μm)、10 nM DHT (129023.1 μm)、100 μM DEHP (57664.5 μm)、100 pM BPA (61513.8 μm)、10 nM PCB (65410.1 μm)、100 nM CPM (597194.8 μm)、10 μM CPM (57194.8 μm)、100 μM MPA (49229.4 μm)であった。

【0054】

MAP2陽性ニューロンの交差点の1視野における総数は、Control群(1284.6個)と比して多いものは、10 nM Dex (1404.3個)、10 μM PMT (1404.3個)であった。MAP2陽性ニューロンの分岐点の1視野における総数の平均値に関しては、Control群(4615.6個)、10 nM Dex (6548.9個)、10 μM PMT (6230.7個)であった。

【0055】

同様にGFAP陽性グリア細胞の細胞質突起の交差点の1視野における総数の平均値はControl群(227.4個)に対して、10 nM Dex (407.9個)、10 nM DHT (404.7個)、100 pM BPA (302.7個)、10 nM PCB (322.6個)、10 μM CPM (256.1個)、100 μM MPA (247.4個)、そして、分岐点の1視野における総数の平均値は、コントロール群(1079.5個)に対して10 nM Dex (2616.5個)、10 nM DHT (2600.1個)、100 μM DEHP (1149.7)、100 pM BPA (1514.1個)、10 nM PCB (1607個)、10 μM CPM (1365.2個)、100 μM MPA (1211.2個)であった。

【0056】

さらに、MAP2陽性ニューロンの1視野における総面積の平均値を検討したところ、コントロール群(601940.8 μm^2)と比較して、10 nM E2 (732158.4 μm^2)であった。GFAP陽性グリア細胞の1視野における総面積の平均値は、Control群(719544.9 μm^2)と比較して、10 μM PMT (955110 μm^2)、10 nM E2 (831347.6 μm^2)であった。

【0057】

次に、ニューロスフィアの形態に影響を及ぼす化学物質は、(1)ニューロスフィアの1視野における総面積の平均値がコントロール群(601939.769 μm^2)と比較して大きい化学物質は、10 nM E2 (732158.4356 μm^2)であった。(2)ニューロスフィアの1視野における総数の平均値がコントロール群(84.6666667個)と比較して多い化学物質は、10 μM PMT (89.55555556個)、100 nM TMD (86.05555556個)、(3)ニューロスフィアの真円率の平均値は、いずれも化学物質に暴露されるとコントロール群(0.4865)と比較して全て真円に近い値を示した(0.50~0.57)。

【0058】

(4)ニューロスフィアから遊走する細胞総数(核の総数)の1視野における平均値をコントロール群(14468.3889個)と比較して促進する化学物質は、10 nM Dex (35288.11111個)、10 μM PMT (33720個)、10 nM E2 (28912.11111個)、10 nM DHT (32571.8889個)、100 μM DEHP (33674.44444個)、10 nM T3 (32269.8889個)、10 μM TMD (22190.0556個)、10 μM CPM (204

10

20

30

40

50

52.1111個)、100 μM MAP (26177.55556個)であった。

【0059】

(5)ニューロスフィアの1視野における円周の平均値がコントロール群(1551.69333 μm)と比較して大きい化学物質は、10 nM PCB (1565.81417 μm)のみであった。

【0060】

(6)ニューロスフィアから遊走する1視野における細胞群の総核面積の平均値がコントロール群(2129473.99 μm²)と比較して大きい化学物質は、10 nM Dex (4171362.276 μm²)、10 μM PMT (5146900.196 μm²)、10 nM E2 (3973015.467 μm²)、10 nM DHT (4485423.64 μm²)、100 μM DEHP (4591409.92 μm²)、10 nM T3 (4895906.56 μm²)、10 μM TMD (3360761.74 μm²)、10 μM CPM (3104536.89 μm²)、10 μM MPA (3872487.964 μm²)であった。

【0061】

このように、マルチチャンネル画像解析装置によって得られた数値情報を元にグラフ化は可能であるため、それぞれの化学物質暴露群における比較は可能であるが、形態情報と化学物質の相関性について簡便に明確に示す事は出来ない。そこで、これらの形態情報と神経分化に関連する上記遺伝子セット(集団)の変動情報を類型化するための指標として、一元配置し、各指標間の依存関係を確率的に推定する手法TAO-Genアルゴリズムを用いて、化学物質ごとの指標間ネットワークをマトリックスに表現した。このマトリックスは、化学物質によって、異なる得意な特徴をもつものが得られた(分類ができた)。

【0062】

TAO-Gen (Theoretical Algorithm for Optimal Gene interaction networks) は、最適遺伝子相互ネットワークを作成するための数値アルゴリズムである。この手法は、ベイズの定理に基づいたもので既知であるが、形態情報と遺伝子変動情報との融合による多次元化情報を用いた相互関係への応用は、本発明が初めてである。

【0063】

6. 実験結果の評価(対比方法、判断基準、分類方法等)

マルチ情報のネットワーク図として得られた個々の化学物質の特徴は、図2-図14に示すとおり、左端列の各指標が最上行頭の各指標に関係性があるとの関係である。黒セルが正の制御関係、網セルが負の制御関係で示している。例えば、DMSO群の1行目に着目すると、AR遺伝子がEsr2と正の制御関係にあることを示し、ARがNetrin1と負の制御関係にあることを示している。このように、20遺伝子と10形態パラメータを統合した30の指標に基づいて、30×30のマトリックスで表現されるネットワーク図に、化学物質の初期曝露から晩発影響を網羅することが可能となった。このネットワーク図をさらに、サブカテゴリー(遺伝子に関する3種のカテゴリーセットと形態で合計4サブ分類)にわけて、そのなかに配置される関係の類似度の基準を90%においた場合、12種の化学物質に分けることができた。

【0064】

下記のブロックについて、ブロックごとに、各セルを1とした類似頻度を算出し、0.1% DMSOを基準に90%以下を異なるブロックとして識別した(表3参照)。
 (AR, Esr1, Esr2, RARa, RARb, RARg) × (AR, Esr1, Esr2, RARa, RARb, RARg) のマトリックスからなるブロック1、
 (Cxcl12, Cxcr4, Itgb1, NGL1, NetrinG, Sema7A, Netrin1) × (AR, Esr1, Esr2, RARa, RARb, RARg) のマトリックスからなるブロック2、
 (EphB, EphrinB, PlexinA, Robo2, Sema3A, Slit1, Unc5) × (AR, Esr1, Esr2, RARa, RARb, RARg) のマトリックスからなるブロック3、

(EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) × (AR、Es r 1、Es r 2、R A R a、R A R b、R A R g) のマトリックスからなるブロック4、

(AR、Es r 1、Es r 2、R A R a、R A R b、R A R g) × (C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) のマトリックスからなるブロック5、

(C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) × (C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) のマトリックスからなるブロック6、

10

(EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) × (C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) のマトリックスからなるブロック7、

(EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) × (C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) のマトリックスからなるブロック8、

(AR、Es r 1、Es r 2、R A R a、R A R b、R A R g) × (EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) のマトリックスからなるブロック9、

20

(C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) × (EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) のマトリックスからなるブロック10、

(EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) × (EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) のマトリックスからなるブロック11、

(EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) × (EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) のマトリックスからなるブロック12、

30

(AR、Es r 1、Es r 2、R A R a、R A R b、R A R g) × (EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) のマトリックスからなるブロック13、

(C x c l 1 2、C x c r 4、I t g b 1、N G L 1、N e t r i n G、S e m a 7 A、N e t r i n 1) × (EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) のマトリックスからなるブロック14、

40

(EphB、EphrinB、PlexinA、Robo2、Sema3A、Slit1、Unc5) × (EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) のマトリックスからなるブロック15、

(EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch

50

__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) × (EB__Area、EB__FormFactor、EB__Perimeter、EB__count、Nuc__Area、Nuc__count、Posi__Area、Branch__Point、Crossing__Point、Neurite__Length) のマトリックスからなるブロック16

【0065】

表3 ネットワーク判別手法におけるDMSO群を基準とした場合のネットワークブロックの類似度

【0066】

フロントページの続き

- (72)発明者 曾根 秀子
茨城県つくば市小野川16-2 独立行政法人国立環境研究所内
- (72)発明者 永野 麗子
茨城県つくば市小野川16-2 独立行政法人国立環境研究所内
- (72)発明者 大迫 誠一郎
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 宮崎 航
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 今西 哲
茨城県つくば市小野川16-2 独立行政法人国立環境研究所内
- (72)発明者 赤沼 宏美
茨城県つくば市小野川16-2 独立行政法人国立環境研究所内

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 特表2004-500103(JP,A)
特開2004-248507(JP,A)
国際公開第2007/008758(WO,A2)
特表2001-526884(JP,A)
特表2002-518990(JP,A)
国際公開第2007/142449(WO,A1)
J. Neurosci. Res., 2008年 2月 1日, Vol.86, No.2, p.270-280
曾根秀子, 外2名, マルチプロファイリング技術による化学物質の胎生プログラミングに及ぼす影響評価手法の開発, 国立環境研究所の研究成果(年報), 2008年, 平成20年度
曾根秀子, 外2名, マルチプロファイリング技術による化学物質の胎生プログラミングに及ぼす影響評価手法の開発, 国立環境研究所の研究成果(年報), 2007年, 平成19年度
<<http://www.nies.go.jp/media/20081006.html>>, 2008年10月 6日

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Google Scholar