

**iPS 細胞由来心筋，肝および内皮細胞を用いた  
複合的ハイコンテンツ毒性スクリーニング系の構築  
(Establishment of Multiplex High-Content Assay for  
Toxicity Screening in Induced Pluripotent Stem Cell-  
Derived Cardiomyocytes, Hepatocytes, and Endothelial  
Cells)**

**2020 年 2 月**

**岩田康寛**

# 目次

緒言	4
第一章: iPS 細胞由来内皮細胞および HUVEC を用いたハイコンテンツ血管新生アッセイおよび毒性スクリーニング系の構築	
1. はじめに	6
2. 実験材料および実験方法	7
3. 結果	10
4. 考察	13
5. 小括	15
第二章: iPS 細胞由来心筋細胞および肝細胞を用いた複合ハイコンテンツ毒性スクリーニング系の構築	
1. はじめに	16
2. 実験材料および実験方法	17
3. 結果	23
4. 考察	26
5. 小括	30
第三章: iPS 細胞由来心筋細胞および肝細胞を用いた複合ハイコンテンツ毒性スクリーニング系の石油化学物質の安全性評価への応用	
1. はじめに	32
2. 実験材料および実験方法	33
3. 結果と考察	35

4. 小括	38
総括	39
謝辞	40
Figures and Tables	41
引用文献	57
出典	62
要旨	63

## 緒言

医薬品、工業用化合物および環境中化学物質の毒性評価は主に動物を用いた試験により行われている。動物試験による毒性評価は最も信頼性の高い評価法とされており各国の規制当局の審査に必要な一方、コストや時間がかかり効率が悪い点、愛護の観点からは毒性評価を行う上で問題とされている<sup>1-3</sup>。近年、これらの問題を解決するために、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化誘導した細胞を用いた毒性評価系への期待が高まっている<sup>4,5</sup>。iPS 細胞は生体を構成するすべての細胞に分化可能であり、iPS 細胞から分化誘導した細胞は生体の各種臓器細胞に近い機能を保持しているとされる。実際、iPS 細胞由来の心筋および肝細胞の利用によって様々な化合物の心および肝臓に対する副作用を検出できる可能性が数多く報告されている<sup>6-8</sup>。したがって、ヒト iPS 細胞由来のこれら臓器別細胞を化学物質の毒性評価に応用することで、動物試験による毒性評価の問題点を回避することが期待されている。

遺伝的背景が同一の細胞を繰り返し作製できるため、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）のような正常初代培養細胞と比較して、細胞の機能等のロット間差が少なく、細胞の供給が安定的である点も iPS 細胞の利点と考えられている。また倫理的な問題から初代培養による入手が難しいヒト由来細胞を安定的に入手できる点も大きな利点である<sup>9,10</sup>。例えば、創薬研究において cell-based assay と呼ばれる様々な細胞機能評価試験は、簡便かつ迅速に細胞の機能評価が可能であることから、スクリーニングに多用されているが<sup>11</sup>、生理学的な機能が正常に近いヒト細胞（初代培養細胞）の入手が現在の創薬スクリーニングで求める規模では困難であり、長期間にわたり実施される試験において安定的な細胞材料を確保するには限界があった。また通常よく使用される株化細胞は無限に増殖可能であることから、安定的な細胞供給は可能なものの、株化の過程で本来の分化機能を失うことが多く、動物実験の結果とは大きな乖離がある。iPS 細胞由来細胞はこれらの初代培養細胞や株化細胞の持つ問題点を克服するツールとして期待されており、実際、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は市販レベルで利用され、不整脈評価を含む心毒性評価への応用が検討されている<sup>7</sup>。また創薬研究への応用のみならず、工業製品を中心とした化学物質の毒性スクリーニング法としての検討も始まっている。通常、これら化学物質の安全性評

価は動物実験で実施されるが、全ての化学物質を網羅的に評価することはスループット性・コスト・時間の面から不可能である。そこで、各国の規制当局は動物試験の前段階において、様々な毒性発現の可能性を評価するため細胞を用いた毒性試験による評価物質の絞込みを推奨しており<sup>12</sup>、高い生理学的機能を有し、生体に近い反応が得られるため様々な毒性を予測できる可能性のある iPS 細胞由来細胞は細胞ソースとして有望であると考えられている。また測定手法として本研究では、ハイコンテンツスクリーニング (HCS) への有用性を検討した。HCS は自動高分解能顕微鏡を基にしたイメージング装置によってオルガネラや核の形態変化、細胞内タンパク質等の細胞イメージングを自動的に測定できる手法であり、その高いスループット性から毒性評価系への応用が注目されている<sup>9</sup>。

本研究では高い生理学的機能を有し、倫理面の問題が少ない iPS 細胞由来細胞とスループット性の高い測定法である HCS や、1つの毒性に関して複数の毒性評価項目を組み合わせ、予測性や効率性を高める複合測定といった効率的な評価手法を組み合わせ、効率的かつ精度の高い評価系の構築を目的とした。第一章では、これまで化合物毒性評価への応用報告の少ないヒト iPS 細胞由来内皮細胞を用いて、内皮細胞の HCS として一般的な血管新生アッセイと細胞毒性評価系の構築を試みた。第二章ではすでに化合物の毒性評価に一部利用され、その有用性が報告されている iPS 細胞由来肝および心筋細胞の評価系を組み合わせ、今までより効率的に評価できる HCS の構築を行った。第三章では第二章で構築した評価系の応用性を検討するため、その一部を利用して 21 個の石油化学物質の iPS 心筋細胞と肝細胞への反応性を評価した。

## 第一章: iPS 細胞由来内皮細胞および HUVEC を用いたハイコンテンツ血管新生アッセイ および毒性スクリーニング系の構築

### 1.はじめに

内皮細胞は心血管系の主要な構成要素の1つであり、その機能維持にも重要な役割を果たしている。様々な化学物質暴露が内皮細胞の機能や心血管系の発達に悪影響を与えることが知られているにも関わらず、石油化学物質等の工業製品や環境中化学物質はこれらの心血管系への作用を評価されてはいない<sup>13</sup>。これらの点から内皮細胞を用いたハイスループットな HCS による毒性スクリーニング系の構築、またそれを用いた工業製品および環境中化学物質の毒性予測が求められている。

従来、内皮細胞の機能評価には初代培養細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) が一般的に用いられている。HUVEC は内皮細胞としての生理学的な機能を有しているが<sup>14</sup>、初代培養細胞であるためにハイスループットな毒性スクリーニングに用いるには問題点がある<sup>15,16</sup>。最も重要な問題点はロット間差であり、これを補うために通常複数のドナー細胞をプールし実験に供しているが、複数ドナー細胞間においても遺伝学的・生物学的な差異を含んでいることから、試験結果の再現性に影響を与える可能性を否定することはできない<sup>17</sup>。それに加えて、初代培養細胞は大規模なスクリーニングには供給源という観点からも問題である。本研究では iPS 細胞由来細胞がこれらの問題点を解決し、かつヒト内皮細胞に近い生理学的機能を有すると考え<sup>9,10</sup>、iPS 細胞由来内皮細胞を用いた化学物質による内皮細胞の血管形成能の変化および内皮細胞への毒性に対する評価系構築を行った。具体的には HCS による血管新生アッセイ並びに核染色による細胞毒性評価アッセイをおこなった。HUVEC においても同様のアッセイを行い、iPS 細胞由来内皮細胞との反応性の違いを比較した。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1. 使用細胞および試薬

iPS 細胞由来内皮細胞である iCell 内皮細胞 (Catalog No. ECC-100-010-001; Lot No. 1825866) および培地添加物はセルラー・ダイナミクス・インターナショナル (Madison, WI) より購入した。VascuLife® VEGF Medium Complete Kits は Lifeline Cell Technology (Frederick, MD) より購入した。Pooled HUVECs in EGM-2 media (Catalog No. CC2519A; Lot No. 0000409274) および EGM™-2 BulletKits™ はロンザ (Walkersville, MD) より購入した。ノコダゾール, スラミン, およびテトラオクチルアンモニウムブロミド (TAB) はケイマシケミカル(Ann Arbor, MI)より購入した。ホルムアルデヒド溶液はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO) より購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO) はサンタクルーズバイオテクノロジー(Dallas, TX)より購入した。カルセイン AM, CellMask™ Green, フィブロネクチン, Geltrex™ LDEV-Free reduced growth factor basement membrane, Hoechst 33342 および TrypLE Express™ はライフテクノロジーズ (Grand Island, NY) より購入した。

### 2.2. iPS 細胞由来内皮細胞の培養

iCell 内皮細胞はセルラー・ダイナミクス・インターナショナルから提供されたプロトコールに従い, T75 フラスコ上で維持培養を行った。フラスコには  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるようにフィブロネクチンをコートし 1-2 時間静置した。液体窒素の気層中から iCell 内皮細胞のバイアルを取り出し, 直ちに  $37^\circ\text{C}$  ウォーターバスに 3 分間浸し細胞を融解させた。融解した細胞は iCell 内皮細胞培地サプリメントおよび VascuLife VEGF Medium Complete Kit を含む維持培地 (FBS 非添加) に懸濁した。培地の最終的な組成は VascuLife® 基本培地中に FGF (5 ng/mL), アスコルビン酸(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), コハク酸ヒドロコルチゾン (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), L-グルタミン (4 mM), IGF-1 (15 ng/mL), EGF (5 ng/mL), VEGF (5 ng/mL), 硫酸ヘパリン (0.75 U/mL), 10 % iCell 内皮細胞培地サプリメントを加えた。懸濁液中の細胞数は血球計算板を用いてトリパンブルー染色により求めた。求められた細胞数に基づいて最終の播種生存細胞数は  $1 \times 10^4$  個/ $\text{cm}^2$  になるように播種培地により調製した。フィブロネクチン溶液は細

胞播種直前に T75 フラスコからアスピレートした。細胞は 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 下で維持し, 2 日毎に培地交換, 3-4 日毎に TrypLE Express™ を用いて継代した。実験には 1-5 継代目の細胞を供した。

### 2.3.HUVEC の培養

HUVEC は EGM™-2 BulletKits™ 含有 Medium199 を用い T75 フラスコ上で維持培養を行った。EGM™-2 BulletKits™ には hEGF, ヒドロコルチゾン, GA-1000 (ゲンタマイシンアンホテリシン-B), FBS, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, アスコルビン酸およびヘパリンが含まれていた。細胞は 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 下で維持し, 3-4 日毎に TrypLE Express™ を用いて継代した。懸濁液中の細胞数はトリパンブルー染色により求めた。実験には 1-5 継代目の細胞を用いた。

### 2.4.被験化合物の準備

DMSO を用いて試験に用いる 200 倍濃度の被験物質をストック溶液として調製した。被験物質を秤量し, DMSO を加えて溶解させ, ガラスコートされた 96 ウェルプレート上で段階希釈を行った。96 ウェルプレートは -20 °C で使用まで保管した。実験日に 200 倍濃度ストック溶液を解凍後, 96 ウェルプレート内で 2 もしくは 4 倍濃度の希釈標準溶液を作成した。DMSO 最終濃度は 0.5 % になるようにした。希釈標準溶液は実験開始まで 37 °C および 5% CO<sub>2</sub> の条件下で保存した。

### 2.5.血管新生アッセイ

生物学的細胞外マトリクスである Geltrex™ を用いた血管新生アッセイは iCell 内皮細胞および HUVEC の両細胞において 384 ウェルプレート上で行い, ハイコンテントイメージングによる測定を行った。iCell 内皮細胞は 4 mM L-グルタミン LifeFactor および 0.1 %



iCell 内皮細胞培地サプリメント含有 Vasculife® 基礎培地にて培養した。Medium199 に VEGF を除く 2 倍濃度の EGM™-2 BulletKits™ を添加し、R & D systems から購入した VEGF を 12.5 ng/mL の濃度になるように添加した培地を作成し“2 x アッセイ用培地”とした。この培地を用いて HUVEC を培養した。Geltrex™ は 4 °C で一晩かけて解凍し、氷上でプレートに 10 µL/well で加えた。プレートを 37 °C で 1 時間静置した後、基礎培地によって作成された 2 倍濃度の被験化合物の希釈標準溶液を 25 µL/well で加え、iCell 内皮細胞および HUVEC をそれぞれ前述した培地にて懸濁後、25 µL/well でプレートに加えた。その際の細胞密度は iCell 内皮細胞が 7500 cells/well、HUVEC が 3500 cells/well であった。細胞は 37 °C および 5 % CO<sub>2</sub> の条件下で化合物と 18 時間反応させた。化合物と反応後、3 倍濃度のカルセイン AM 溶液 (25 µL/well, 6 µmol/L) で 15 分間細胞を染色し、その後測定を行った。

## 2.6. 細胞毒性評価系

細胞毒性評価系は 384 ウェルプレート上で行った。iCell 内皮細胞播種プレートには 30 µg/mL のフィブロネクチン溶液を 10 µL/well で加え、2 時間静置した。その後 TrypLE Express™ を用いて T75 フラスコ上の iCell 内皮細胞を剥離し、フィブロネクチン溶液をウェルから吸引した後、750 cells/well で細胞を播種した。HUVEC も iCell 内皮と同様に TrypLE Express™ を用いて細胞を剥離し、384 ウェルプレート上に 750 cells/well で細胞を播種した。両細胞ともに単層細胞が形成されるまで 37 °C・5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。アッセイ開始前に培地を 37.5 µL/well の新鮮な培地に交換した。その後 4 倍濃度の被験化合物の希釈標準溶液を 12.5 µL/well で加え、37 °C・5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。24 時間培養後、細胞を 4 倍濃度の Hoechst 33342 (1 µg/mL) で染色した。

## 2.8. ハイコンテンツ細胞イメージング

細胞イメージングは ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging system (モレキュラーデバイス) を用いた。血管新生アッセイは Calcein AM で染色した細胞を 4 倍もしくは

は 10 倍の対物レンズおよび FITC フィルターを使用して画像を取得した。画像は MetaXpress ソフトウェア（モレキュラーデバイス）中の血管新生解析モジュールおよびカスタムモジュールを用いて解析した。カスタムモジュールでの解析では全体から結節部位（Node）を取り除き、管腔部位（Tube）の測定を行った（Figure 1-1）。細胞毒性アッセイに使用した画像取得には DAPI (Hoechst 33342) および FITC フィルターを用いた。取得した画像は MetaXpress ソフトウェア（モレキュラーデバイス）の multiwavelength cell scoring application モジュールによって解析した。

## 2.9. データの処理およびアッセイ性能の管理

化合物処置サンプルデータは溶媒対象サンプル（0.5 % DMSO）のデータで正規化された。正規化されたデータから統計言語ソフトウェアである R を用いて四係数ロジスティックモデルにより濃度反応曲線を作成した。Point-of-departure（POD）値は濃度反応曲線中で陰性対照の標準偏差を超えた値の濃度と定義した。日間・プレート間誤差は正規化されたデータを用いて評価した。サンプル間のばらつきを評価するための変動係数（%CV）は溶媒対象サンプルの標準偏差値から求めた。アッセイの最適度を示す Z' 値は正規化された化合物処置サンプルデータおよび溶媒対象サンプルより次式を使って求めた。

$$Z'\text{-factor} = 1 - [(3 \times (\text{SDP} + \text{SDN}) / (\text{AvP} + \text{AvN}))]$$

（SDP と SDN は陽性対照および陰性対照の各標準偏差を、AvP と AvN は陽性対照と陰性対照の各平均値を示す。）

## 3. 結果

### 3.1 内皮細胞を用いた血管新生アッセイの評価

Geltrex™ 上の iPS 細胞由来内皮細胞および HUVEC は播種後 18 時間で血管様の網目構造を示した（Figure 1-2）。この構造は HUVEC および iPS 細胞由来内皮細胞の間で類似していた。血管新生阻害物質であるノコダゾールおよびスラミン処置によって濃度依存的な血管新生阻害作用が両細胞で観察された（Figure 1-2）。

溶媒対象サンプルの%CV, プレート間および実験間再現性は血管新生に関係する3つの形態パラメーター(管の長さの総和: total tube length, 管の長さの平均値: mean tube length, および管の全面積: total tube area)によって評価した。溶媒対象サンプルの%CVはHUVEC(6.1-14)の方がiPS細胞由来内皮細胞(14-15)よりやや低値であった。また, 血管新生阻害物質処置時の%CVは特にノコダゾール処置時に, HUVECは概ね5%以下の良好な結果を示したのに対し, iPS細胞由来内皮細胞は18%と高い値であった。再現性評価のために実験は3回行い, 少なくとも1実験は日を変えて実施した。実験結果から3つの形態パラメーターのピアソンおよびスピアマンの相関係数を求めた。HUVECにおいては, 実験においてピアソンのrおよびスピアマンのp値はそれぞれ0.54-0.86と0.56-0.84の範囲になった(Table 1-1)。iPS細胞由来内皮細胞においては, これに対しそれぞれ0.63-0.84と0.53-0.75の範囲となった(Table 1-1)。したがって相関係数の値から, iPS細胞由来内皮細胞はHUVECと同程度の再現性を示すことがわかった。また血管新生阻害物質であるノコダゾールとスラミン処置によって濃度依存的な血管新生阻害が起こることが測定した形態パラメーターからわかった。この結果は本アッセイによって血管新生を評価できる可能性を示した。

ハイコンテンツイメージング解析ソフトウェアから算出された管形成に関連する3つのパラメーターが算出可能であったが, 反応性および精度の観点から評価系には用いないものがあつた。mean tube lengthに関しては化合物処置によって濃度依存的な反応は認められなかった。Z'値に関してもmean tube lengthは使用した両細胞で0.5を大きく下回っており良好なアッセイ指標とはいえなかった。(Table 1-1)。これに対し, total tube length, total tube areaの2つのパラメーターはiPS由来内皮細胞およびHUVECを用いた実験のスラミン処置によって0.5付近の良好なZ'値(iPS細胞由来内皮細胞:ともに0.5, HUVEC:0.5および0.4)を示した。ノコダゾールとスラミン処置による反応性および統計的な有意差の観点からもこの2つのパラメーターはin vitro血管新生の評価により適していることがわかった(Figure 1-3)。またノコダゾール処置の際のZ'値は2つの形態パラメーターともにHUVECの方が良好である点(iPS細胞由来内皮細胞:-1.5および-1.9, HUVEC:ともに0.4)からもHUVECの方がより本評価系により適していることがわかった。

### 3.3. 内皮細胞を用いた細胞毒性アッセイの評価

本アッセイで様々な化合物の細胞毒性が評価可能かどうかを判断するために核数（細胞数）の指標による評価を実施した。核は Hoechst33342 による核染色をおこなった。評価系の再現性に関しては血管新生アッセイと同様にプレート間および実験間再現性を評価した。その結果、両細胞ともに相関係数の値から高い再現性を示すことがわかった。相関係数の範囲は 0.51 から 0.97 の間であったが大半は 0.8 を超えていた（Table 1-2）。溶媒対象サンプルの%CV に関しては両細胞ともにアッセイ系として許容できる範囲であったが、TAB 処置時の iPS 細胞由来内皮細胞の%CV は 11.1 であり、HUVEC の 4.9 と比較すると高値であった。50  $\mu$ M TAB 処置した場合には、Z' 値に関しては HUVEC が 0.6 であったの対し、iPS 細胞由来内皮細胞は 0.2 であった。（Table 1-2）。

#### 4. 考察

本研究は iPS 細胞由来内皮細胞の化学物質評価への有用性を検討するため、内皮細胞を用いた HCS で一般的な血管新生アッセイと細胞毒性評価系の構築を試みた。また内皮細胞を用いた評価系で一般的に使用される初代培養細胞である HUVEC と iPS 細胞由来内皮細胞の細胞モデルとしての比較を行った。血管新生アッセイにおいては使用した血管新生阻害物質処置によって iPS 細胞由来内皮細胞で血管新生阻害作用を、管の長さの総和および全面積の 2 つのパラメーターで確認することができたことから、iPS 細胞由来内皮細胞を用いた HCS 血管新生アッセイは構築できたと考えられた。細胞比較という観点ではスラミン処置においては両細胞ともに 0.5 付近の良好な Z' 値が得られたが、ノコダゾール処置では HUVEC の方が良好であり、より精度が高い傾向がみられた。細胞毒性評価系では核数の変化の細胞毒性指標によって評価した。細胞毒性物質である TAB 処置によって核数の変化がみられたことから、iPS 細胞由来内皮細胞を用いた HCS 血管新生アッセイは構築できたと考えられた。実験の再現性は比較に用いた HUVEC と同程度であったが、50  $\mu$ M TAB 処置時の Z' 値に関しては HUVEC が 0.6 であったの対し、iPS 細胞由来内皮細胞は 0.2、%CV は HUVEC の 4.9 に対し 11.1 と HUVEC の方が良好な値を示した。これら反応性の違いはその他の iPS 細胞由来細胞で報告されているように、HUVEC に比べると細胞が発現タンパク質およびその機能等の観点から未成熟な性質を保持していることが 1 つの可能性として考えられた<sup>18-20</sup>。例えば内皮細胞は生体内では大および小血管型の 2 つの型に分化することが知られており<sup>14</sup>、この 2 つの分化型は機能的な違いを持つことが過去の報告において言及されている。HUVEC は大血管型であるとされている一方、iPS 細胞由来内皮細胞が最終的にどちらの分化型に属するかについて検証された報告はなされていない。また細胞の性質以外にもアッセイの中で化合物の処置時間を変更する、測定を経時的に行い反応性が同程度になるようなポイントを探すなど実験条件の変更によって改善できる可能性も考えられた。

第一章においては内皮細胞の一般的な機能である血管形成能および細胞毒性指標のハイスループットな評価系構築、また評価系に用いた HUVEC および iPS 細胞由来内皮細胞の有用性の比較・検討を行った。その結果、iPS 細胞由来内皮細胞を用いた HCS による評価

構築系構築ができたと考えられた。iPS 細胞由来内皮細胞，HUVEC ともに評価系に利用可能であったものの，HUVECの方が細胞モデルとして優れていることが、血管新生アッセイと細胞毒性評価系の Z'値や%CV といった指標から示唆された。研究利用可能になって間もなく，未だ開発途上である iPS 細胞由来内皮細胞と比較して，HUVEC は初代培養細胞である点，過去数十年にわたって培地組成や継代回数等を含めた培養およびアッセイ条件検討が数多く行われている点を考慮すると，これらの結果は現時点においては妥当であると考えられる。しかしながら将来的には iPS 細胞由来内皮細胞はロット間差が少なく同一個体から大量の細胞が供給できる利点があることから，iPS 細胞由来内皮細胞を利用して研究を継続していくことは重要であると考えられた。384 ウェルプレートフォーマットでの評価系構築ができたことを考慮にいと、将来的には動物による毒性試験を予測するためのハイスループットな化学物質のスクリーニングに利用できることも考えられた。さらに多角的に化合物の毒性を評価するために，トランスクリプトミクスやメタボロミクスといったハイコンテンツイメージング以外の毒性発現機序解析に関連した新規毒性評価技術を組み合わせることも重要であると考えられた。

## 5. 小括

内皮細胞は血管形成および機能に重要な役割を果たしている。化学物質が内皮細胞の機能および血管系の発達に悪影響を及ぼす可能性が示されている一方、環境中に存在している大部分の化学物質はその潜在的な内皮細胞への作用についての評価が十分になされておらず、問題となっている。近年ヒトの内皮細胞と非常に近い生理学的機能をもつ細胞として iPS 細胞由来内皮細胞が利用可能となり、ハイスループットな HCS 毒性スクリーニングへの応用が期待されている。化合物の内皮細胞に対する作用を評価する際の iPS 細胞由来内皮細胞の有用性を検討するため、iPS 細胞由来内皮細胞および一般的な内皮細胞として知られる初代培養細胞である HUVEC に血管新生阻害および細胞毒性物質を 16-24 時間、384 ウェルプレート上で処置した。化合物の血管新生阻害作用を評価するために細胞外基質上での血管新生アッセイを行った。細胞毒性評価系は HCS による細胞数の変化の測定をおこなった。その結果、使用した両細胞ともに再現性と反応性は概ね良好であったことから、iPS 細胞由来内皮細胞による HCS 評価系構築が構築できたと考えられた。血管新生アッセイにおいては iPS 細胞由来内皮細胞、HUVEC とともに血管様の網目構造を形成し、ノコダゾール、スラミンといった血管新生阻害物質の処置による阻害作用が確認された。細胞毒性評価系においても細胞毒性物質である TAB 処置によって iPS 細胞由来内皮細胞、HUVEC とともに反応がみられた。また細胞間の比較という観点では HUVEC の方が本研究での評価系においては精度が優れていた。結論として、本研究によって iPS 細胞由来内皮細胞および HUVEC を用いて内皮細胞に対する化合物の作用を評価できる複合的かつハイスループットな評価系を構築することができた。しかしながら、既存の細胞モデルである HUVEC が評価系での精度がより高かったため、iPS 細胞由来内皮細胞に関しては細胞や試験系のさらなる改良を行う必要があると考えられた。

## 第二章: iPS 細胞由来心筋細胞および肝細胞を用いた複合ハイコンテンツ毒性スクリーニング系の構築

### 1. はじめに

iPS 細胞由来細胞を用いた毒性評価系は生体に起こる毒性を予測できる *in vitro* 評価系となることが期待されている。その中でもヒト iPS 細胞由来心筋細胞はこれまでの動物による毒性試験では不十分であった心毒性を予測できる点、ヒト iPS 細胞由来肝細胞は初代培養肝細胞に近い代謝能を有しており化学物質で多く起こる肝毒性を予測できる点から注目されており、これらの細胞を用いた様々な毒性評価系が報告され、その有用性が示されている<sup>6-8</sup>。特に細胞内カルシウム濃度の測定、細胞間インピーダンス測定といった心筋細胞の自動拍動能を利用した各種のアッセイは不整脈リスクを予測できる系として注目されている<sup>6</sup>。また薬剤性の肝障害においては活性酸素種 (ROS)、ミトコンドリア障害性障害を原因とした細胞障害、脂質代謝異常など様々な機序によって引き起こされることが知られている<sup>21-24</sup>。特に肝障害に関しては評価項目を単一で測定するだけでは生体の毒性発現を十分に予測できず、ミトコンドリア障害性障害、ROS 産生など数個の評価項目を組み合わせることが予測に重要とされている。したがって、毒性評価項目を同時かつ複合的に HCS で測定・評価できることは毒性予測に重要であると考えられる。本研究では心毒性予測に有用とされる iPS 細胞由来心筋細胞を用い、細胞内カルシウム濃度の測定による心筋細胞拍動アッセイをおこなった。アッセイ後細胞を融解し、心筋拍動増加を引き起こすシグナル伝達物質である cAMP の測定を競合 ELISA により行い、これらの評価項目の組み合わせ測定の有用性を検討した。iPS 細胞由来肝細胞による実験では肝障害予測のために心筋細胞と同様に ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の HCS による複合測定を行い、さらに細胞毒性と細胞骨格障害、ミトコンドリア障害性と中性脂肪蓄積の組み合わせ評価を実施し、その有用性を検討した。また評価系の応用性を検討するため 2 つの石油化学物質の心筋細胞拍動アッセイと細胞内 cAMP の組み合わせ測定での評価を行った。



## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1. 使用細胞および試薬

iCell 心筋細胞 (Catalog No. CMC-100-010-001; Lot No. 1031999) および肝細胞 (Catalog No. PHC-100-020-001; Lot No. 1636 and 1208), 播種培地および維持培地はセルラー・ダイナミクス・インターナショナル (Madison, WI) より購入した。EarlyTox Cardiotoxicity Kits, CatchPoint cAMP GPCR Assay Kits はモレキュラーデバイス (Sunnyvale, CA) より購入した。リファレンス化合物であるイソプロテレノールは EarlyTox Cardiotoxicity Kit 付属品を使用した。B-27 サプリメント, CellROX Deep Red, ゲンタマイシン (50 mg/mL), ハンクス平衡塩溶液, HCS LipidTOX Deep Red, Hoechst 33342, MitoTracker Orange CMTMRos, ペニシリン/ストレプトマイシン溶液および RPMI 1640 はライフテクノロジーズ (Grand Island, NY) より購入した。アミオダロン塩酸塩, ホルムアルデヒド溶液, フォルスコリン, クレブス-リンガー炭酸水素バッファー (KRBG), 炭酸水素ナトリウムおよびテトラオクチルアンモニウムブロミド (TAB) はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO) より購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO), デキサメサゾン, 過酸化水素水 (3%), メナジオン, 組み換えオンコスタチンはフィッシャーサイエンティフィック (Waltham, MA) より購入した。

### 2.2. 心筋細胞の培養

iCell 心筋細胞はセルラー・ダイナミクス・インターナショナルから提供されたプロトコールに従い, 384 ウェルプレート上で播種・維持を行った。プレートには細胞播種前に 0.1%ゼラチン溶液を 25  $\mu$ L/well で加え, 37  $^{\circ}$ C および 5%  $\text{CO}_2$  の条件下で 2 時間静置した。液体窒素の気層中から iCell 心筋細胞のバイアルを取り出し, 直ちに 37  $^{\circ}$ C ウォーターバスに 4 分間浸し細胞を融解させた。融解した細胞は室温で 10 ml の 1:500 (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン含有播種培地に再懸濁した。懸濁液中の細胞数は血球計算板を用いてトリパンブルー染色により求めた。求められた細胞数に基づいて最終の生存細胞数は  $2 \times 10^5$  個/mL になるように播種培地により調製した。その後プレートからゼラチン溶液を

除去し、調製した細胞懸濁液を 25  $\mu\text{L}/\text{well}$  (5000 cells/well) で播種した。播種後プレートを室温で 30 分間静置後、37  $^{\circ}\text{C}$  および 5 %  $\text{CO}_2$  で培養した。48 時間培養後、播種培地を 30  $\mu\text{L}/\text{well}$  の 1:500 (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン含有維持培地に交換した。維持培地は 1 日毎に 12 日間交換した。実験を行う前日の夕方に、維持培地を 25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の新鮮な培地に交換した。

### 2.3.肝細胞の培養

iCell 肝細胞は心筋細胞と同様にセルラー・ダイナミクス・インターナショナルから提供されたプロトコールに従い、コラーゲンコートされた 384 ウェルプレート上で播種・維持を行った。培養開始前に 0.1  $\mu\text{M}$  デキサメサゾン、2 % (v/v) B27 サプリメント、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ゲンタマイシン、20  $\text{ng}/\text{mL}$  オンコスタチン M、2 % (v/v) iCell 肝細胞サプリメント含有 RPMI を播種培地として作成した。液体窒素の気層中から凍結 iCell 肝細胞のバイアルを取り出し、直ちに 37 $^{\circ}\text{C}$  ウォーターバスに 3 分間浸し細胞を融解させた。融解後、播種培地で細胞密度が  $7.2 \times 10^5$  cells/mL になるように懸濁した。細胞密度は心筋細胞と同様にトリパンブルー染色により計算した。調製した細胞懸濁液を 25  $\mu\text{L}/\text{well}$  ( $1.8 \times 10^4$  cells/well) で播種した。播種後プレートを室温で 30 分間静置し、その後 37  $^{\circ}\text{C}$  ・5%  $\text{CO}_2$  で培養した。維持培地は播種後 4 時間で交換を行い、その後 4 日間は毎日交換した。4 日間培養後、0.1 mM デキサメサゾン、2 % (v/v) B27 サプリメント、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ゲンタマイシン、2 % (v/v) iCell 肝細胞サプリメント含有 RPMI を維持培地として作成し、播種培地と交換した。維持培地の交換は測定日まで 1 日おきに行った。

### 2.4.被験化合物の準備と iCell 心筋・肝細胞への処置

試験に用いる 100 倍濃度の被験物質をストック溶液として調製した。被験物質を秤量し、DMSO を加えて溶解させた。最高濃度のストック溶液を DMSO で 3 もしくは 10 段階希釈して全てのストック溶液を調製した。さらに 2 つの石油化学物質 (Gas Oil) においても評価を行うためサンプル調製をおこなった。調製は米国材料試験協会の標準手順に従

い、5 ml の抽出物に 20 ml の DMSO を添加し、溶媒の揮発後に秤量し再度 4 ml の DMSO に溶解させた。この DMSO 溶解物を 100 % とし、ログスケールで 5 段階の希釈を実施し、ストック溶液を作成した (100 %, 10 %, 1 %, 0.1 %, 0.01 %, 0.001 %)。これらのストック溶液は -20 °C で使用まで保管した。実験日に 100 倍濃度ストック溶液を解凍後、384 ウェルプレート内で 95  $\mu$ L の培地に 5  $\mu$ L のストック溶液を添加することで 5 倍濃度の希釈標準溶液を作成した。希釈標準溶液は実験開始まで 37 °C  $\cdot$  5 % CO<sub>2</sub> の条件下で保存した。

## 2.5. 心筋内カルシウム濃度測定

心筋内カルシウム測定はモレキュラーデバイスの EarlyTox Cardiotoxicity Kit のプロトコールに従い、行った。25  $\mu$ L/well の培地中の細胞に 37 °C  $\cdot$  25  $\mu$ L/well のカルシウム染色溶液を加え、37 °C で 2 時間静置した。被験物質を処置する前にモレキュラーデバイスの FLIPR tetra プレートリーダーを用い 470–495 nm で励起後、515–575 nm の波長で 0.125 秒の間隔で 100 秒間細胞内カルシウム濃度変化を測定した。測定条件は露光時間：0.05 秒/read, ゲイン：2000, 励起蛍光強度：30%, 機器内温度：37 °C に設定した。被験化合物 (12.5  $\mu$ L/well の 5 倍濃度希釈標準溶液) は FLIPR の自動分注装置によって添加した。添加後 10, 30, 60 および 90 分で測定を行い、その間細胞は 37 °C  $\cdot$  5% CO<sub>2</sub> で培養した。

## 2.6. cAMP 測定のための細胞ライセート作成

細胞内カルシウム測定後、カルシウム染色溶液を含んだ培地を除去し、80  $\mu$ L/well の KRBG (pH 7.5) で洗浄し、15  $\mu$ L/well の刺激バッファー (800 nM IBMX 含有 KRBG) を添加した。10 分間室温で静置後、7.5  $\mu$ L/well の PBS を被験物質処置および陰性対照サンプルに加えた。また 60  $\mu$ M のフォルスコリン処置サンプルを作成し陽性対照とした。37 °C で 15 分間反応後、CatchPoint GPCR assay kit 中の溶解バッファーを 7.5  $\mu$ L/well で加え、プレートシェーカー上で 10 分間反応させた。

## 2.7.cAMP測定アッセイ

iCell 心筋細胞中の cAMP はモレキュラーデバイスの CatchPoint cAMP Fluorescent Assay Kit により測定した。20  $\mu\text{L}/\text{well}$  の iCell 心筋細胞ライセートおよび cAMP 標準溶液を抗ウサギ IgG 固相化プレート上に添加した。cAMP 標準溶液の濃度範囲は 0-3300 nM になるように調製した。その後 20  $\mu\text{L}/\text{well}$  の抗ウサギ cAMP 抗体をバックグラウンド測定用以外の全てのウェルに加えた。バックグラウンド測定用ウェルには抗体の代わりにアッセイ用バッファーを加えた。プレートを 5 分間攪拌後、20  $\mu\text{L}/\text{well}$  のホースラディッシュペルオキシダーゼ標識 cAMP を加え、2 時間室温で反応させた。反応後、80  $\mu\text{L}/\text{well}$  の洗浄バッファーで 4 回洗浄し、50  $\mu\text{L}/\text{well}$  の発色液を加えた。30 分室温・遮光で反応後、530 nm 励起し 590 nm の波長を FLIPR によって測定した。サンプル中の cAMP 濃度は標準曲線より算出された。標準曲線には四係数ロジスティックモデルを用いた。標準曲線の算出には Prism 5.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA)を用いた。

## 2.8.ハイコンテンツ細胞イメージング

iCell 肝細胞の ROS 産生、ミトコンドリア障害性および細胞毒性を検出・評価するために被験化合物に細胞を 30 分および 24 時間反応させた。化合物処置に続き、2 倍濃度染色液 (10  $\mu\text{M}$  CellROX DeepRed, 0.4  $\mu\text{M}$  MitoTracker Orange, および 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst33342 含有維持培地) を添加し、30 分間 37°C で反応させた。反応後、細胞を維持培地で洗浄し、25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の 3.7% ホルムアルデヒド溶液を 15 分間反応させ細胞を固定した。固定後 PBS で細胞を 3 回洗浄し、25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の PBS を添加し細胞イメージングを行った。細胞イメージングは ImageXpress Micro XL system (モレキュラーデバイス) を用いた。Hoechst33342 による核染色には DAPI フィルター、MitoTracker によるミトコンドリア染色には Cy3 フィルター、CellROX による ROS 染色には Cy5 フィルターを用いた。iCell 肝細胞の細胞骨格および細胞内脂質蓄積を検出・評価するために被験化合物に細胞を 48 時間反応させた。25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の 3.7%ホルムアルデヒド溶液を 15 分間反応させ細胞を固定した。PBS によって

細胞を3回洗浄後、25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の0.02%サポニンおよび2%ウシ胎児血清含有PBSを加え、室温で1時間反応させた。反応後PBSを除去し、25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の165 nM AlexaFluor<sup>®</sup>488 ファロイジン溶液を添加し室温で2時間反応させた。その後、溶液を除去し25  $\mu\text{L}/\text{well}$  の4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst33342 溶液を20分間反応させ核染色を行った。核染色後PBSで細胞を2回洗浄し、PBSで1000倍希釈した25  $\mu\text{L}/\text{well}$  のLipidTOX Deep Red 溶液によって中性脂肪染色を行った。溶液を添加し約1時間後に、DAPI (Hoechst 33342) , FITC (AlexaFluor<sup>®</sup>488 ファロイジン) , Cy5 (LipidTOX) フィルターによってイメージングを行った。取得した画像はMetaXpress ソフトウェア (モレキュラーデバイス) の multiwavelength cell scoring application モジュールによって解析した。

## 2.9.アッセイ性能の管理

アッセイ性能および被験化学物質がコントロール化合物として機能するかを評価するため、変動係数(%CV)およびZ'値(Z'-factor)を計算した。本研究では溶媒対象(1%DMSO 処置) サンプルを陰性対照とし化合物処置サンプルを陽性対照とした。Z'-factorは細胞毒性、ミトコンドリア障害性、細胞骨格障害性の解析データから計算された。Z'-factorは次式で計算された。 $Z' \text{-factor} = 1 - [(3 \times (\text{SD}_P + \text{SD}_N)) / (\text{Av}_P + \text{Av}_N)]$

( $\text{SD}_P$ と $\text{SD}_N$ は陽性対照および陰性対照の各標準偏差を、 $\text{Av}_P$ と $\text{Av}_N$ は陽性対照と陰性対照の各平均値を示す。)

それぞれのアッセイでの陰性対照数は9から28、陽性対照数は3から28サンプルであった。溶媒が細胞へ作用しないことを確認するために、培地のみで培養した未処置細胞と溶媒対象細胞との間で比較を行った。

## 2.10.カーブフィッティングおよび Point-of-Departure の算出

cAMP 測定以外の測定データはそれぞれの実験の陰性対照サンプルの平均値によって正規化された。それぞれの実験の濃度反応性を評価するために、正規化されたデータから四

係数ロジスティックモデルによる濃度反応曲線を作成した。Point-of-departure (POD) 値はこの濃度反応曲線中で陰性対照の標準偏差を超えた値の濃度と定義した。

### 3. 結果

#### 3.1.iPS 細胞由来心筋細胞内カルシウムおよび cAMP 測定の組み合わせ測定

化合物処置による心筋細胞の拍動数変化は細胞内カルシウム濃度変化測定によって評価した。 $\beta$  作動薬（イソプロテレンール）を評価化合物として用いた。操作後 90 分での未処置および陰性対照細胞の間で拍動数に差異は認められず、またこれらの拍動数データは過去の報告と類似していた<sup>6,7</sup>。操作後 90 分での拍動数の陰性対照サンプルの% CV は 6% であった（Table 2-1）。評価化合物処置によってリファレンス化合物処置サンプルでは予想していた拍動の濃度依存的な変化が認められた。イソプロテレンール処置では  $\beta$  作用に基づく濃度依存的な拍動数増加が認められた（Figure 2-1A）。0.1-10  $\mu\text{M}$  の処置濃度域で最大溶媒対照の 1.8 倍の増加であった。イソプロテレンール処置による心筋細胞の拍動数増加（拍動数/分）は 0.1  $\mu\text{M}$  の濃度以上で統計的に有意（ $P < 0.001$ ）であった。測定後、 $\beta$  作用に関連した細胞内 cAMP 測定のために細胞を融解し、競合的 ELISA を行った。cAMP の増加は GPCR 活性の指標であり、 $\beta$  作用によって心筋拍動数を増加させるシグナル伝達因子として知られている。操作後 90 分での陰性対照群の%CV は 12% であり、イソプロテレンール 10  $\mu\text{M}$  処置によって細胞内 cAMP は 9 倍増加した（Figure 2-1B）。

#### 3.2 iPS 細胞由来肝細胞の ROS 産生、ミトコンドリア障害性および細胞毒性の HCS 複合測定

iPS 細胞由来肝細胞の ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性は化合物処置後 30 分および 24 時間の時点でハイコンテンツイメージングにより同時測定した。ROS 産生のリファレンス化合物としてメナジオン、細胞毒性のリファレンス化合物として界面活性作用を持つ TAB を選んだ。ROS 産生評価のために CellROX Deep Red による ROS 染色、ミトコンドリア障害性評価のために MitoTracker Orange によるミトコンドリア染色、細胞毒性評価のために Hoechst 33342 による核染色を行った（Figure 2-2, Figure 2-5）。それぞれの染色に陽性だった細胞を ROS 産生細胞数、活性ミトコンドリア保有細胞数および細胞数とし、ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の指標とした。化合物処置 30 分でメナジオン 100  $\mu\text{M}$  処置による ROS 産生（ $P < 0.01$ ）、TAB 50  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンド

リア障害性 ( $P < 0.01$ ) と細胞毒性 ( $P < 0.01$ ) を確認することができた。メナジオン処置による ROS 産生の程度は溶媒対照群と比較しての 60 倍程度の増加, TAB 処置によるミトコンドリア障害性と細胞毒性はともに溶媒対照群と比較して 40% 程度の減少がみられた。メナジオン 100  $\mu\text{M}$  処置による ROS 産生の Z' 値は 0.7 と 0.5 以上の良好な値を示し, TAB 50  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性と細胞毒性はそれぞれ 0.1 と 0.2 であった (Figure 2-2)。化合物処置 24 時間ではメナジオン処置による ROS 産生はみられなかったが, TAB 処置によるミトコンドリア障害性と細胞毒性は 30 分間処置では確認できなかった 10  $\mu\text{M}$  からみられ ( $P < 0.01$ ), またメナジオン 100  $\mu\text{M}$  においても細胞毒性がみられたことから ( $P < 0.01$ ), 処置時間を延長することで, ミトコンドリア障害性と細胞毒性は増強することがわかった。TAB 10 $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性と細胞毒性はともに溶媒対照群と比較して 80% 程度の減少, メナジオン 100  $\mu\text{M}$  処置でみられた細胞毒性は溶媒対照群と比較して 70% 程度の減少であった (Figure 2-2)。TAB 50  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性と細胞毒性の Z' 値はともに 0.7 であった (Table 2-2)。

### 3.3.iPS 細胞由来肝細胞の細胞骨格障害性および細胞毒性, ミトコンドリア障害性および脂質代謝異常の複合測定

iPS 細胞由来肝細胞の細胞骨格障害性と細胞毒性, ミトコンドリア障害性と脂質蓄積の同時測定を化合物処置後 48 時間の時点でハイコンテンツイメージングにより測定した (Figure 2-3, Figure 2-6)。細胞骨格障害性と細胞毒性のリファレンス化合物として肝障害物質であるアフラトキシン B1, ミトコンドリア障害性と細胞毒性のリファレンス化合物として細胞毒性物質である TAB, 脂質蓄積のリファレンス化合物としてアミオダロンを選んだ。細胞骨格障害性評価のために AlexaFluor<sup>®</sup>488 ファロイジンによるアクチン染色, ミトコンドリア障害性評価のために MitoTracker Orange によるミトコンドリア染色, 脂質蓄積評価のために LipidTOX による中性脂肪染色, 細胞毒性評価のために Hoechst 33342 による核染色を行った。それぞれの染色に陽性だった細胞をアクチン保有細胞数, 活性ミトコンドリア保有細胞数, 脂質蓄積細胞数および細胞数とし, それぞれ細胞骨格障害性, ミトコンドリア障害性, 脂質蓄積, 細胞毒性の指標とした。細胞骨格障害性と細胞毒性の同時測定はアフラトキシン B1 3  $\mu\text{M}$  と TAB 1  $\mu\text{M}$  処置から良好な細胞骨格障害性と



細胞毒性の濃度依存的な反応を示した（ともに  $P < 0.01$ ）。アフラトキシン B1 3  $\mu\text{M}$  と TAB 1  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性は溶媒対照群と比較してともに 50%程度の減少であった。アフラトキシン B1 10  $\mu\text{M}$  および TAB 10  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性および細胞毒性の Z'値は 0.7-0.9 であった。

ミトコンドリア障害性と脂質蓄積の同時測定では、アミオダロン 10  $\mu\text{M}$  と TAB 1  $\mu\text{M}$  処置から濃度依存的なミトコンドリア障害性（ともに  $P < 0.01$ ）がみられた。TAB 1  $\mu\text{M}$  およびアミオダロン 10  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性はと溶媒対照群と比較してそれぞれ 90%と 60%程度の減少であった。アミオダロン 10  $\mu\text{M}$  処置から脂質蓄積細胞数が全体の 70%程度まで増加する濃度依存的な中性脂肪蓄積が確認された（ $P < 0.01$ ）。これに対し、TAB の中性脂肪蓄積は 1  $\mu\text{M}$  まで増加と、その後の 10  $\mu\text{M}$  以上の濃度域での減少がみられ、濃度依存的な増加はみられなかった。アミオダロン 10  $\mu\text{M}$  処置による脂質蓄積の Z'値は 0.5 であった。アミオダロン 30  $\mu\text{M}$  および TAB 1  $\mu\text{M}$  処置によるミトコンドリア障害性の Z'値はそれぞれ 0.9 と 0.8 であった。アミオダロン 10  $\mu\text{M}$  処置による脂質蓄積の Z'値は 0.5 であった。

#### 3.4.石油混合物質の iPS 細胞由来心筋細胞内カルシウムおよび cAMP 測定の組み合わせ測定への応用

石油混合物質の毒性評価への複合 HCS アッセイの応用性を評価するために、軽油に分類される 2 つの石油化学物質の DMSO 抽出物の心筋細胞への影響を調べた。心筋細胞への作用評価を上述した心筋内カルシウムおよび細胞内 cAMP の複合測定によって行った。その結果、2 つの石油化学物質は非常に類似した濃度依存的な反応性を示した（Figure 2-4）。10  $\mu\text{g/mL}$  以下の濃度では心筋細胞の拍動数は濃度依存的に増加したが、それ以上の濃度では拍動数の減少と停止がみられた。また細胞内 cAMP の濃度は拍動数の変化と同じ傾向を示したことから cAMP の増減が拍動数の変化に関与している可能性が示唆された。

#### 4. 考察

iPS 細胞は生体を構成するすべての細胞に分化可能であり、かつ分化誘導した細胞は各種臓器細胞に近い機能を保持しているとされる。iPS 細胞由来のこれら臓器別細胞を毒性評価に応用することで、動物による毒性試験の前段階で毒性予測を行ない、効率的に化合物を絞り込むことで、動物実験を補完することが期待されている。そこで、我々は本章では iPS 細胞由来心筋および肝細胞を用いて複合的に毒性評価を行う新規性の高い HCS 評価系を構築した。iPS 細胞由来心筋および肝細胞の評価系構築を目指した理由として従来のげっ歯類を用いた化学物質の評価では心毒性のリスク評価は不十分であり、大動物（多くの場合イヌ）を用いた評価が行われているが、倫理およびコスト面から大きな問題がある<sup>25,26</sup>点やまた一般的に化学物質の多くは肝臓で代謝され肝毒性を多く示すことが知られている点が挙げられる。

また様々な細胞機能評価項目を同時および複合的に測定、評価できる新規 HCS 評価系の構築はコスト・スループット性を考慮すると、多くの化学物質の評価を行う上で非常に有用であり、新規性のある研究である。また、コスト・スループット性といった効率面に加えて、肝毒性に関する評価項目を単一で測定するだけでは生体の毒性発現を十分に予測できず、数個の評価項目を組み合わせることが予測に重要とされており<sup>27</sup>、この点からも評価項目の複合測定は有用性があると考えられる。

本章ではまず、イソプロテレノール処置時の心筋細胞の拍動変化を細胞内カルシウム濃度変化測定による心筋細胞拍動アッセイおよび競合的 ELISA による細胞内 cAMP の組み合わせ測定を検討した。心筋の  $\beta$  作用を含む GPCR 活性の指標である細胞内 cAMP の増加はイソプロテレノール刺激によって起こることが知られている<sup>28</sup>。本実験では 10  $\mu\text{M}$  のイソプロテレノール処置で心筋内 cAMP レベルは溶媒対照群のおよそ 9 倍になり心筋拍動数もおよそ 2 倍に増加していた。イソプロテレノール増加による心筋内 cAMP レベルに関しては濃度依存的な増加はみられ、過去のマウス心筋細胞を用いた報告では、10  $\mu\text{M}$  イソプロテレノール処置によって同程度の 5-10 倍程度の増加がみられていることから、これらの変化はイソプロテレノール刺激による  $\beta$  作用を反映しているものと考えられた<sup>29</sup>。しかしながら、cAMP の増加がみられないイソプロテレノール 0.1  $\mu\text{M}$  の濃度から拍動数の増

加がみられ、別のマウス心筋細胞を用いた報告でも、10 nM といった低濃度から cAMP の増加反応がみられている<sup>30</sup>。マウス心筋細胞や HEK293 細胞を用いた報告から<sup>30-32</sup>、イソプロテレノール処置を含む GPCR 活性による cAMP の増加は処置後数分内で増加の割合はピークを迎え、その後は減少することが知られている。これらの報告を考慮すると、本実験では心筋の拍動評価との同時測定を目的として化合物処置 90 分後以降に測定を行ったため、すでに細胞内 cAMP が減少しており低濃度処置においては増加を検出できなかった可能性が考えられた。したがって、今後、心筋拍動と関連した cAMP 増加 ( $\beta$  作用) 評価の最適化を実施する場合は、化合物処置から cAMP 測定までの時点を短縮し、増加の割合がより高い時点を調べる必要があると考えられた。また本試験と同じ条件でも、心筋の拍動評価を行う場合、高濃度の化合物処置により強い心筋拍動増加作用がみられれば、同時検出が可能であると考えられた。イソプロテレノールによる拍動数変化は過去の iPS 細胞由来心筋細胞を用いた報告 (Sirenko et al.) と一致しており評価系としての再現性を確保できていると考えられた<sup>6</sup>。また *in vivo* の反応との整合性という観点では、過去のイソプロテレノール 15 mg をイヌに投与した報告によると、通常時に比べ 1.7 倍程度の心拍動数の増加がみられた際のイソプロテレノール血中暴露が 0.5 $\mu$ M であった。これは本実験で見られた心筋細胞の拍動増加がみられた濃度である 0.1-1 $\mu$ M と近く、暴露面では *in vivo* の反応と心筋細胞拍動アッセイとの間に整合性はあると考えられた<sup>33</sup>。

また本試験系の応用性を検討するため、2つの石油化学物質の評価を実施した。石油化学物質は、精製過程が多岐にわたり、軽油のように身近な製品も多いのにも関わらず、これまでリスク評価が十分に行われていなかったことから、毒性研究の領域において重要な研究課題の1つとされている。本実験では比較的高濃度の DMSO (1%) を石油抽出物の溶媒として使用し、 $\mu$ g/mL の濃度域で実験を行った。興味深いことに心筋細胞拍動アッセイでは、低濃度域の拍動数の増加および 10  $\mu$ g/mL 超える高濃度域での消失という 2 相性の変化が認められた。拍動数増加と cAMP 濃度増加は明確に一致しており、2つの石油化学物質は  $\beta$  作用によって拍動数を増加させている可能性が示唆された。

iPS 細胞由来肝細胞を用い、肝毒性を効率的に予測することを目的として肝障害に関連した評価項目の HCS 複合測定の構築を検討した。第一に ROS, ミトコンドリア, ミトコ

ンドリアおよび核の特異的な染色を組み合わせ、化合物処置による ROS 産生、ミトコンドリア障害性および細胞毒性を評価した。実験結果から、化合物処置 30 分のメナジオン 100  $\mu\text{M}$  処置で ROS 産生、TAB 50  $\mu\text{M}$  処置でミトコンドリア障害性と細胞毒性がみられたことから ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の複合測定は可能であると考えられた。さらに化合物 24 時間処置によって TAB 10  $\mu\text{M}$  処置からミトコンドリア障害性と細胞毒性、メナジオン 100  $\mu\text{M}$  処置での細胞毒性がみられたことから、ミトコンドリア障害性と細胞毒性のみを検出するには 24 時間処置の方がより反応性が高いことがわかった。また ROS 産生、ミトコンドリア障害性および細胞毒性の反応性の程度は過去の報告で Caco-2 および HepG2 細胞で認められたものと同程度であった<sup>34,35</sup>。

これら 3 つの測定評価項目に加えて、さらに肝障害に関連した評価項目の HCS 複合測定の有用性を検討するために、化合物処置 48 時間後の iPS 由来肝細胞にアクチンおよび核染色、ミトコンドリアおよび中性脂肪染色を行い、細胞毒性と細胞骨格障害、ミトコンドリア障害性と脂質蓄積の組み合わせ評価を検討した。アフラトキシン B1 と TAB の両処置によって細胞毒性と同じ処置濃度で同等の細胞骨格障害性が認められていることから、細胞骨格障害性と細胞毒性の同時評価は可能であると考えられた。HCS を用いたアフラトキシン B1 の細胞骨格障害性の評価に関しては過去に報告されており、濃度依存曲線から本試験と同程度の反応を示していることが考えられた（本試験での POD 値：1.9  $\mu\text{M}$ 、過去報告での IC50 値：1.9  $\mu\text{M}$ ）<sup>8</sup>。iPS 細胞由来肝細胞のミトコンドリア障害性および脂質蓄積は、アミオダロン処置において一致した濃度依存的な増加が認められ、同時測定が可能であることを示した。アミオダロンは臨床上脂肪肝を引き起こすことが知られており、本実験においても 10  $\mu\text{M}$  の濃度では 80 % 以上の肝細胞に顕著な蓄積が認められた<sup>36</sup>。またアミオダロンの濃度依存反応曲線およびそこから算出された POD 値は 6.4  $\mu\text{M}$  であり、過去の iPS 由来肝細胞および HepaRG 細胞を用いた中性脂肪蓄積評価の報告と同程度の結果であった<sup>8,37</sup>。また TAB 処置ではミトコンドリア障害性は良好な濃度依存性が確認できるのに対して、中性脂肪蓄積では十分な濃度依存性はみられず、細胞毒性は非常に強くみられる 30  $\mu\text{M}$  以上の濃度で顕著な蓄積がみられた。これは染色試薬によって細胞膜の脂質成分の染色一部染色されてしまうことから、細胞毒性によって、収縮した細胞の細胞膜が染色され、見た目上、脂質が蓄積しているように解析している可能性が考えられた。したがっ

て細胞毒性がみられる濃度域では中性脂肪蓄積評価は偽陽性を示すことが考えられ、評価には濃度依存性の反応であること、および細胞毒性の有無を考慮する必要があることがわかった。

以上の結果から、iPS細胞由来心筋細胞の測定では、心筋細胞の拍動の増加とcAMPの測定は測定時点の変更といった検討が必要なものの、組み合わせて測定できることがわかった。iPS細胞由来肝細胞の測定ではROS産生とミトコンドリア障害性と細胞毒性の3項目の同時測定、ミトコンドリア障害性と細胞毒性の2項目の同時測定、さらにミトコンドリア障害性と中性脂肪蓄積の2項目の同時測定が可能であったことから複合的なHCSを構築ができたと考えられた。これらの複合的なHCSによって動物による毒性試験の前段階で心および肝毒性を予測することで化学物質の効率的なリスク評価に貢献できる可能性を示唆した。本研究ではHCSによる評価系を複合することに主に焦点を置いたが、HCSやその他*in vitro*評価系には技術的な限界があるため、包括的な毒性予測を行うためには将来的にトランスクリプトミクスやメタボロミクスといったその他の新規毒性評価技術とHCSの複合にも注目する必要があると考えられた。

## 5. 小括

iPS 細胞由来の臓器細胞を用いた評価系は工業製品中の化学物質や医薬品開発の安全性評価の領域において既存の *in vitro* 毒性評価の代替評価系として注目されている。これまでの初代培養細胞を用いた *in vitro* 評価系に比べると、細胞の生理学的な機能を保持しつつも、よりスループット性の高い *in vitro* 評価系を構築することが可能であり、化学物質の毒性予測への利用が期待されている。本実験では iPS 細胞由来心筋および肝細胞を用い、様々なハイコンテントおよびシグナル評価アッセイを組み合わせ、化合物の心および肝毒性を予測する複合評価系の構築を行った。心筋拍動への作用は化合物処置 90 分後の心筋細胞拍動アッセイによって評価した。その後心筋細胞内 cAMP 濃度を行い、心筋拍動変化と  $\beta$  作用のシグナル伝達因子が組み合わせて測定できるかについて検討した。これらの組み合わせ評価に加えて、iPS 細胞由来肝細胞を用いた HCS による ROS 産生、ミトコンドリア障害性および再簿毒性の同時複合測定を行った。さらに肝細胞を用いて細胞骨格障害性と細胞毒性、ミトコンドリア障害性障害と中性脂肪蓄積の複合測定を同様に HCS によって行った。

心筋細胞拍動アッセイに関してはイソプロテレノール処置によって拍動増加が過去の報告と同様に起こることがわかり、再現性は確保できていると考えられた。細胞内 cAMP 測定に関しては  $\beta$  作用を持つイソプロテレノール処置によって増加することがわかり組み合わせ測定が可能であることがわかった。本試験では心筋細胞の拍動アッセイの増加を細胞内 cAMP が検出できた濃度に 100 倍程度の乖離がみられたが、今後測定時点の変更などの条件検討を行えば心筋拍動との同濃度域での同時測定が可能であると考えられた。また軽油を処置した結果から、これらの評価系は石油化学物質の評価に応用できる可能性を示唆した。HCS による複合測定ではメナジオンと TAB 処置によって肝細胞の ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の 3 項目が同時測定可能であることがわかった。ROS 産生に関してはメナジオン処置 30 分後が最も顕著であることがわかった。これに対しミトコンドリア障害性、細胞毒性は処置 24 時間後で顕著であった。これらの結果から測定項目によって処置時間を考慮することも重要であることがわかった。

またアフラトキシン B1 と TAB 処置によって肝細胞の細胞毒性と細胞骨格障害性，TAB とアミオダロン処置によってミトコンドリア障害性障害と中性脂肪蓄積が同時に測定可能であることがわかった。中性脂肪の蓄積に関してはアミオダロン処置 48 時間後に最も顕著にかつ濃度依存的に認められたが，TAB のような細胞毒性物質によって偽陽性を示すこと可能性があるため，細胞毒性のない濃度域での評価が有用であると考えられた。ROS，ミトコンドリア障害性，細胞毒性の 3 項目，細胞骨格障害性と細胞毒性の 2 項目，ミトコンドリア障害性と脂質蓄積の 2 項目の同時測定が可能であったことから，化学物質の肝毒性予測に有用な HCS 複合評価系を構築できたと考えられた。

### 第三章: iPS 細胞由来心筋細胞および肝細胞を用いた複合ハイコンテンツ毒性スクリーニング系の石油化学物質の安全性評価への応用

#### 1. はじめに

動物実験で全ての化学物質の毒性を網羅的に評価することはスループット性・コスト・時間の面から不可能である。これらの動物実験の持つ問題点を補完するために代替法の研究開発が進められている。その1つとして *in vitro* 毒性スクリーニングが重要性を増しており、各国規制当局は工業製品に含まれる化学物質の安全性評価に関する規制上の意思決定において、将来的な *in vitro* 毒性試験による毒性予測の利用を推奨している<sup>38</sup>。例えば EU では化合物の登録・評価・認可および制限に関する規制 (REACH 規制) によって EU 域内で流通している既存の 3 万に及ぶ化合物の安全性評価が事業者には義務付けられており、これら化合物の評価には構造活性相関等による *in silico* やハイスループットな *in vitro* 毒性試験での毒性予測が推奨されている<sup>12</sup>。

そこで、第二章で構築した評価系の有用性を示す実際の応用例として石油化学物質の評価を実施した。石油化学物質は先述した EU の REACH 規制によって、その一部物質の安全性評価が推奨されており、また石油化学物質は消費者の身近で使用される製品が多く、精製過程において作業従事者への暴露が懸念されるものの、多様な物質によって構成され化学的に未定義なことなどが原因となり有害性情報が明らかになっていない物質が数多く存在している<sup>39-41</sup>。しかしながら、これら物質のすべての安全性評価を動物試験によって評価することは、前述のようにスループット性・コスト・時間の面から不可能である。したがって、効果的かつ効率的に動物試験が実施できるよう、評価すべき石油化学物質と評価項目を代替法によって絞り込むことが重要と考えられる。したがって本研究で構築した複合的な HCS によって、様々な評価項目で毒性発現の可能性をハイスループットに取得し、動物による毒性試験の前段階で毒性予測に利用することは有用であると考えられる。

本章では精製過程によって石油の精製過程による分類で軽油、重油、残渣とされる既知の 21 個の石油化学物質の評価を、iPS 由来細胞心筋細胞の心筋細胞拍動アッセイと第二章で構築した iPS 細胞由来肝細胞の複合 HCS 一部の評価系を用いて実施した。



## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1. 使用細胞および試薬

iCell 心筋細胞および肝細胞, それらの播種培地および維持培地, EarlyTox Cardiotoxicity Kits, B-27 サプリメント, ゲンタマイシン (50mg/mL), Hoechst 33342, MitoTracker Orange CMTMRos, ジメチルスルホオキシド (DMSO) は第二章と同様のものを使用した。

### 2.2. 心筋細胞の培養

第二章と同様の方法で培養を行った。

### 2.3. 肝細胞の培養

第二章と同様の方法で培養を行った。

### 2.4. 石油化学物質の準備と iCell 心筋・肝細胞への処置

製造過程によって軽油 (SRGO – Straight Run Gas Oils, OGO – Other Gas Oils, VHGO – Vacuum & Hydrotreated Gas Oils), 重油 (HFO – Heavy Fuel Oils), 残渣 (RAE – Residual Aromatic Extracts) に分類される石油化学物質の抽出物は CONCAWE (Conservation of Clean Air and Water in Europe) から取得した。試験に用いる 100 倍濃度の石油化学物質をストック溶液として調製した。調製は第二章と同様に米国材料試験協会の標準手順に従い, 5mL の抽出物に 20 ml の DMSO を添加し, 溶媒の揮発後に秤量し再度 4mL の DMSO に溶解させた。この DMSO 溶解物を 100% とし, ログスケールで 3 段階の希釈を実施し, ストック溶液を作成した (100%, 10%, 1%)。これらのストック溶液は -20°C で使用まで保管した。実験日に 100 倍濃度ストック溶液を解凍後, 384 ウェルプレート内で 95  $\mu$ L の培地に 5  $\mu$ L のストック溶液を添加することで 5 倍濃度の希釈標準溶液を作成し, これ

を心筋および肝細胞に添加した。希釈標準溶液は実験開始まで 37 °C・5 % CO<sub>2</sub> の条件下で保存した。

## 2.5.心筋内カルシウム濃度測定

第二章と同様の方法で測定を行った。測定データは Screenworks 4.0 software(Molecular Devices LLC., Sunnyvale, CA)によって解析した。

## 2.6.ハイコンテンツ細胞イメージング

第二章と同様の方法で測定を行った。iCell 心筋および肝細胞の細胞毒性およびミトコンドリア障害性を検出・評価するために石油化学物質に細胞を 24 時間反応させた。化学物質処置に続き、2 倍濃度染色液 (4 μg/mL Hoechst33342, 0.4 μM MitoTracker Orange 含有維持培地) を添加し、30 分間 37 °C で反応させた。反応後、細胞を維持培地で洗浄し、細胞イメージングを行った。細胞イメージングは ImageXpress Micro XL system (モレキュラーデバイス) を用いた。Hoechst33342 による核染色には DAPI フィルター, MitoTracker によるミトコンドリア染色には Cy3 フィルターを用いた。取得した画像は MetaXpress ソフトウェア (モレキュラーデバイス) の multiwavelength cell scoring application モジュールによって解析した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1. 評価石油化学物質の選択

原油はその精製過程において、物理化学的および構造的な特徴によって分けられ多種多様な石油化学物質となる。本研究においては3つの精製過程の異なる軽油（SRGO – Straight Run Gas Oils, OGO – Other Gas Oils, VHGO – Vacuum & Hydrotreated Gas Oils）、重油（HFO – Heavy Fuel Oils）、残渣（RAE – Residual Aromatic Extracts）の計21個の石油化学物質の評価を行った（Table 3-1）<sup>42</sup>。評価に用いた軽油（5個のSRGO, 9個のVHGO, 2個のOGO）は精製過程における沸点（~150–500 °C）が比較的近いこと化学的性状は類似していると考えられた。これら物質は主に直鎖、分岐および環状アルカンや芳香族と、それぞれが多様な物質から構成されるが、炭素鎖長は類似している（SRGO : C9-C25, OGO : C9-C36, VHGO : C9-C30）。さらに軽油とは化学的性状の異なる3つの重油および2つの残渣の評価も行った。HFOは原油蒸留過程で生成される残渣成分や触媒反応もしくは水素化分解による生成物から構成される。RAEは残渣成分の溶媒抽出物から構成されている。HFOおよびRAEは軽油と比較すると高分子量物質であり、炭素鎖長はC14-C98（HFO）とC25-95（RAE）であり、軽油と比較すると高い沸点（低い揮発性）を持つ（HFO: 265–715 °C, RAE : 403–702 °C）。

#### 3.2. iPS 心筋細胞および肝細胞を用いたハイコンコンテントスクリーニング

第二章で構築したHCSの一部を利用した評価系を用いて21個の石油化学物質の評価を行った。細胞にはログスケールで3段階希釈を行った石油化学物質を処置した。これら物質の処置最高濃度は100 - 1000 µg /mLの範囲であった。化合物の処置前および処置後90分の時点で心筋細胞の拍動変化を心筋内カルシウム濃度変化測定によって評価した。次にミトコンドリア障害性に関する評価をMitoTracker Orange（活性ミトコンドリア染色）、細胞毒性に関する評価をHoechst 33258（核）染色によって評価した。化合物は24時間処置を行った。化合物処置による両細胞の反応性は、全体として軽油（VHGO, SRGO, OGO）に分類される石油化学物質はHFOおよびRAEより強い反応性を示した。心筋細胞の心筋拍動に関しては軽油およびHFO処置によって10 µg /mL付近の濃度で溶媒対照と比

較して 1.4-1.8 倍程度の拍動数の頻度 (peak frequency) の増加が認められ、その後の 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  付近拍動数が減少もしくは停止するという 2 相性の変化が認められた。これらに対し、RAE に関しては心筋拍動の反応はほとんどみられなかった。また肝細胞におけるミトコンドリア障害性では 100-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の高濃度域で活性ミトコンドリア細胞数が 20% 以下になる強い反応性が軽油で見られ、軽油と比較すると HFO では 40-60% の中程度の反応、RAE は 60-80% の弱い反応がみられた。肝細胞における細胞毒性では 100-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の高濃度域で細胞数が 40% 以下になる強い反応性が軽油で見られ、軽油と比較すると HFO では 20-80% の弱い反応、RAE ではこのような細胞毒性の反応はみられなかった (Figure 3-1)。したがって、石油化学物質処置による心筋拍動変化と肝細胞におけるミトコンドリア障害性と細胞毒性の傾向は軽油で強く、HFO は軽油と同程度もしくは弱い、RAE では弱いという傾向がみられた。石油の主成分である炭化水素は、一般的に低分子のものほど毒性が高い、つまり低分子成分を多く含む揮発性の高い石油化学物質ほど毒性が高い傾向にあることが知られている。特にその成分中に含まれる多環芳香族炭化水素 (PAH) は魚類の発達期に不整脈、心収縮力の低下といった心毒性や肝がんなどを示すことが報告されている<sup>43,44</sup>。心毒性の機序の詳細は不明ではあるが、過去のマグロの心室筋細胞を使った細胞内カルシウム濃度測定による心拍動測定の報告では、原油成分の処置によって波形の振幅 (本実験の評価項目の peak amplitude に相当) が減少し、その程度は三環タイプの PAH を持つ原油成分が強いことが報告されている<sup>45</sup>。また、一般的に三環タイプを含む PAH は、RAE のような残渣に比べると、精製度および揮発性の高い軽油や一部の重油に多く含まれていることが知られている<sup>46</sup>。したがって、本実験で見られた心筋細胞に対する作用は魚に認められた心毒性と同様の傾向を示し、原油成分中の三環タイプ PAH の心毒性が一部関連している可能性が考えられた。今回の評価系の結果においても、実際の生体への心および肝毒性が強い可能性のある軽油で他の 2 分類の物質より強い反応がみられたことから、評価系の反応性と生体への毒性の強さの間には関連性があり、石油化学物質の毒性予測に構築した複合的 HCS を利用できる可能性が考えられた。

したがって、HCS による心筋拍動アッセイと本研究によって構築した肝細胞を用いた HCS の複合測定によって、動物による毒性試験の前段階で心および肝毒性を予測し、毒性を示す可能性が強い物質群を前もって予測し、重点的に動物での毒性試験を実施する等、

化学物質群の絞込みに利用できる可能性が考えられた。今後はさらなる予測に利用可能な毒性データを取得・拡充するため、神経細胞などのその他 iPS 細胞由来の臓器別細胞を加えた HCS による複合評価を行い、評価化合物に関してもガソリンなど、さらなる種類の石油化学物質を網羅的に評価することが必要であると考えられた。また、ハザード評価の研究に併せて、実際の生産量や排出量データ、石油化学物質の物理化学的特性、環境中の挙動等の情報を収集し、シミュレーションなどを用いて実際の暴露量を推測し、将来的なリスク評価につなげる試みも必要であると考えられた。

#### 4. 小括

石油化学物質は、その精製過程において作業従事者への暴露が懸念されるものの、有害性情報が明らかになっていない物質が数多く存在しており、その毒性情報を *in vitro* 毒性試験レベルで取得することは、動物による毒性試験の前段階での毒性予測で有用であると考えられる。本章では第二章で構築した評価系を利用し、軽油、重油、残渣に分類される既知の 21 個の石油化学物質の評価を行った。その結果、評価系の反応性と生体への毒性の強さの間には関連性があり、石油化学物質の心・肝毒性予測に構築した複合的 HCS を利用できる可能性が考えられた。本評価系の利用によって、これら石油化学物質の心および肝毒性が類推できれば、動物試験の前段階で心および肝毒性を予測することで、効率的な化合物の絞り込みを行うことができ、石油化学物質リスク評価のための動物実験の補完ができると考えられる。したがって本研究で得られた知見は化学物質の効率的なリスク評価に寄与できる可能性があると考えられた。

## 総括

本研究では高い生理学的機能，スループット性を有し，様々な組織に分化可能であるヒト iPS 細胞由来の臓器別細胞の種々の化合物毒性評価への有用性を検討するため，第一章では iPS 細胞由来内皮細胞および HUVEC を用い，HCS による血管新生アッセイおよび細胞毒性評価系の構築，第二章ではヒト iPS 細胞由来肝および心筋細胞を用いた複合ハイコンテント毒性スクリーニング系の構築，第三章では第二章での評価システムの応用性検討のための石油化学物質の評価を行った。第一章では今後のさらなる検討は必要であるが，iPS 細胞由来内皮細胞を用いて一般的な内皮細胞の機能および細胞毒性を評価できる評価系を構築することができた。第二章では iPS 細胞由来心筋細胞を用い，測定時点の変更といった検討が必要なものの，心筋細胞の拍動の増加と cAMP の測定は組み合わせて測定できることがわかった。iPS 細胞由来肝細胞の測定は ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の同時測定が可能な複合 HCS 評価系の構築をすることができた。また，肝細胞の細胞骨格障害性と細胞毒性，およびミトコンドリア障害性障害と中性脂肪蓄積の複合評価系の構築もすることができ，効率的に肝毒性を予測できる可能性を示した。第三章では実際に第二章の評価系の一部を利用することで，石油化学物質の心及び肝毒性を予測し，動物試験の前段階で物質の絞込みを行える可能性を示した。石油化学物質評価に関してはさらなる毒性データを取得・拡充するため，第一および二章で利用した細胞に加えて，さらに現在利用可能なその他 iPS 細胞由来の臓器別細胞を加えた多臓器細胞による HCS 複合評価系が必要であると考えられた。評価化合物に関しては，今後さらなる種類の石油化学物質を網羅的に評価することが必要であると考えられた。将来的には本研究が石油化学物質を中心とした化学物質の毒性予測に利用され，効率的なリスク評価に寄与することで工業製品の安定的供給に世界的な貢献をすることが期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部 分子生物学研究室の村上賢教授，生理学第二研究室の折戸謙介教授，実験動物学研究室の塚本篤士准教授，テキサス A&M 大学獣医学部 Ivan Rusyn 教授に深謝いたします。これまでの研究活動を支援していただきました大塚製薬株式会社徳島研究所 檜山英二所長に謹んで感謝の意を表します。最後に，実験にご協力いただきましたテキサス A&M 大学環境ゲノミクス研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。



## Figures and Tables

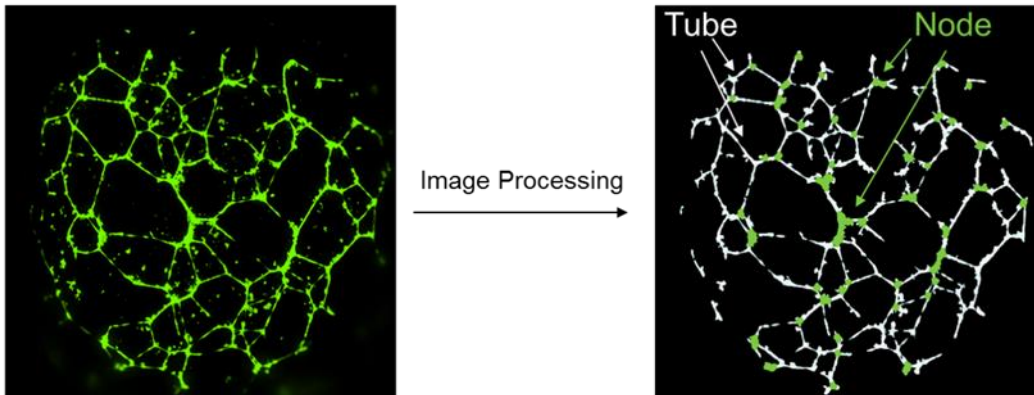


Figure 1-1: Image processing for the angiogenesis experiments.

For image processing, the node area is shown in green and tubes are shown in white.

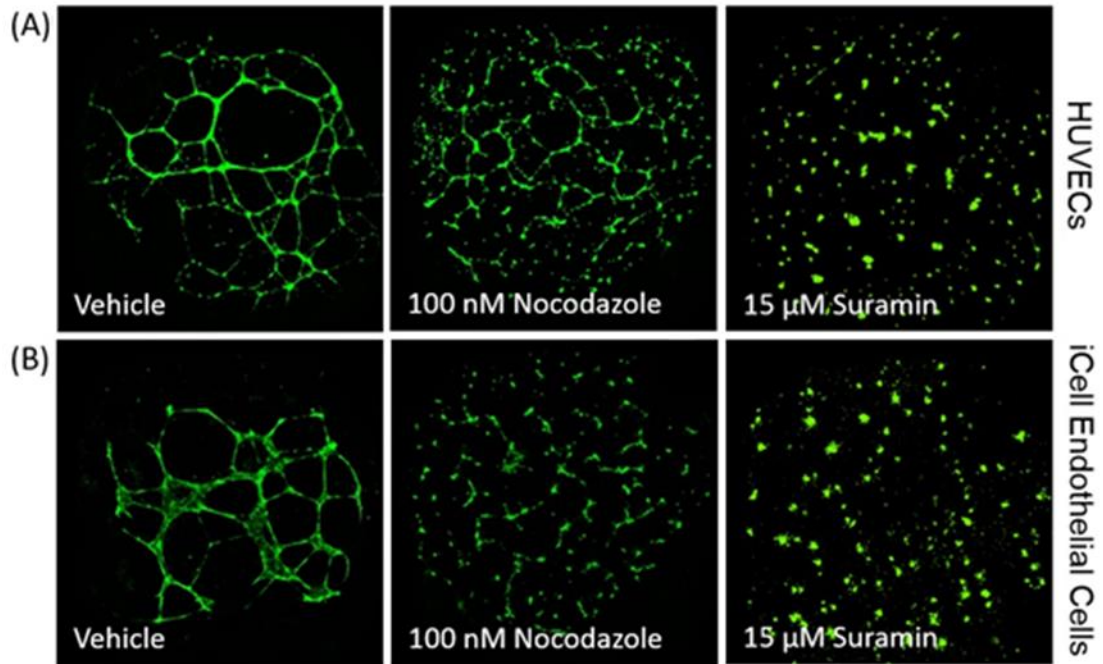


Figure 1-2: Representative images for HUVECs (A) and iPSC-derived endothelial cells (B) with treatment of vehicle (0.5% DMSO), 100 nM nocodazole, and 15 μM suramin after 18 hours.

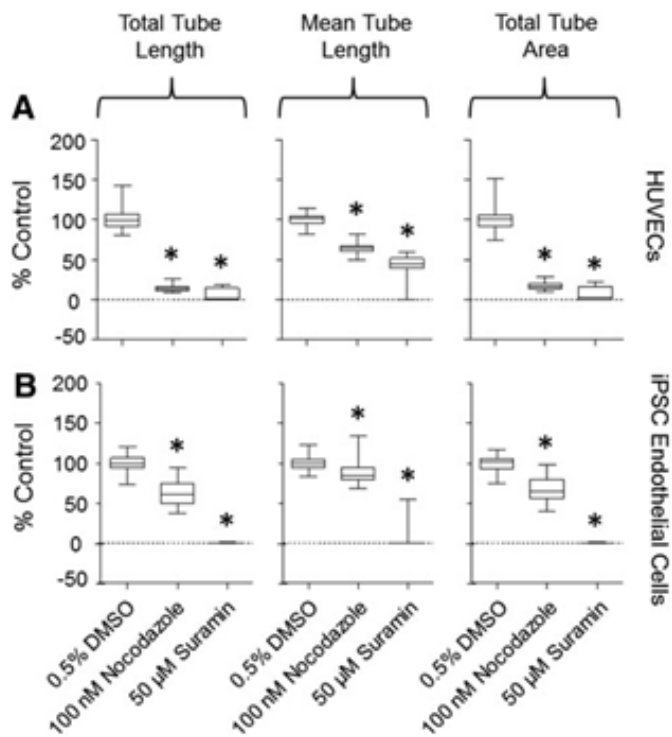


Figure 1-3: Effect of positive control chemicals on angiogenesis using HUVECs (A) and iPSC-derived ECs (B). Positive control chemicals used for the calculation of  $Z'$ -factor are shown, including 100 nM nocodazole and 50  $\mu$ M suramin. Whiskers indicate the Max and Min of data. Sample size ranges from 18 to 36. Statistical significance,  $P$  value  $<0.05$  is notated with \*. Statistics based on one-way ANOVA with a Dunnett's test. EC, endothelial cell; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; iPSC, induced pluripotent stem cell.

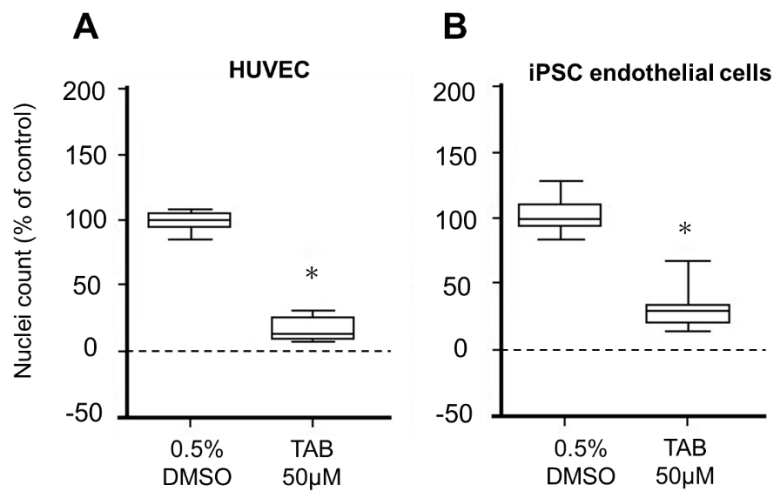


Figure 1-4: Effect of positive control chemicals on cytotoxicity using HUVECs (A) and iPSC-derived ECs (B) after 24 hours chemical treatment, 50  $\mu$ M TAB. Whiskers indicate the Max and Min of data. Sample size ranges from 12 to 36. Statistical significance, P value <0.05 is notated with \*. Statistics based on two-tailed unpaired t-test.

Table 1-1: Assay Quality Control – Angiogenesis Assays.

Metric	Cells	Interday Reproducibility <sup>a</sup>		%CV of neg. controls <sup>b</sup>	Chem	Z'-factor <sup>b</sup>	%CV of Chem
		S: 0.70 (<0.0001)	S: 0.72 (<0.0001)				
Total Tube Length	HUVEC	P: 0.66 (<0.0001)	P: 0.86 (<0.0001)	12	Nocodazole 100 nM	0.35	2.3
		S: 0.61 (<0.0001)	S: 0.55 (<0.0001)		Suramin 50 µM	0.46	4.7
	iCell Endo <sup>d</sup>	S: 0.61 (<0.0001)	S: 0.55 (<0.0001)	15	Nocodazole 100 nM	-1.5	18.3
		P: 0.70 (<0.0001)	P: 0.63 (<0.0001)		Suramin 50 µM	0.49	1.7
Mean Tube Length	HUVEC	S: 0.82 (<0.0001)	S: 0.80 (<0.0001)	6.1	Nocodazole 100 nM	-0.011	3.5
		P: 0.80 (<0.0001)	P: 0.84 (<0.0001)		Suramin 50 µM	-1.5	13.2
	iCell Endo <sup>d</sup>	S: 0.72 (<0.0001)	S: 0.75 (<0.0001)	14	Nocodazole 100 nM	-7.0	20.1
		P: 0.84 (<0.0001)	P: 0.83 (<0.0001)		Suramin 50 µM	-3.4	15.2
Total Tube Area	HUVEC	S: 0.56 (<0.0001)	S: 0.70 (<0.0001)	14	Nocodazole 100 nM	0.44	3.1
		P: 0.54 (<0.0001)	P: 0.83 (<0.0001)		Suramin 50 µM	0.35	4.5
	iCell Endo <sup>d</sup>	S: 0.61 (<0.0001)	S: 0.53 (<0.0001)	15	Nocodazole 100 nM	-1.9	18.7
		P: 0.71 (<0.0001)	P: 0.63 (<0.0001)		Suramin 50 µM	0.51	1.5

<sup>a</sup>S: Spearman's r, P: Pearson's r. Correlation analysis sample size ranged from n = 60–72. P values provided below correlation values.

<sup>b</sup>Sample size ranges from n = 18–36.

<sup>d</sup>iPSC-Endo: iCell endothelial cells from Cellular Dynamics International.

Table 1-2: Assay Quality Control – Cytotoxicity Assay.

Metric	Cells	Interplate Reproducibility <sup>a</sup>		Interday Reproducibility <sup>a</sup>		%CV of neg. controls	Z'-factor <sup>b</sup> (N=12-36)	%CV of TAB <sup>b</sup>
		S: 0.81 (<0.0001)	S: 0.72 (<0.0001)	S: 0.79 (<0.0001)	S: 0.71 (<0.0001)			
Nuclei Content	HUVEC	P: 0.84 (<0.0001)	P: 0.89 (<0.0001)	P: 0.88 (<0.0001)	P: 0.90 (<0.0001)	6.6	0.6	4.9
		S: 0.81 (<0.0001)	S: 0.78 (<0.0001)	S: 0.71 (<0.0001)	S: 0.58 (<0.0001)			
	iCell Endo <sup>c</sup>	P: 0.83 (<0.0001)	P: 0.89 (<0.0001)	P: 0.77 (<0.0001)	P: 0.80 (<0.0001)	7.4	0.2	11.1
		S: 0.81 (<0.0001)	S: 0.78 (<0.0001)	S: 0.71 (<0.0001)	S: 0.58 (<0.0001)			

<sup>a</sup>S: Spearman's r, P: Pearson's r. Correlation analysis sample size ranged from n = 96. P values provided below correlation values.

<sup>b</sup>Treatment with TAB at 50  $\mu$ M.

<sup>c</sup>iPSC-Endo: iCell endothelial cells from Cellular Dynamics International.

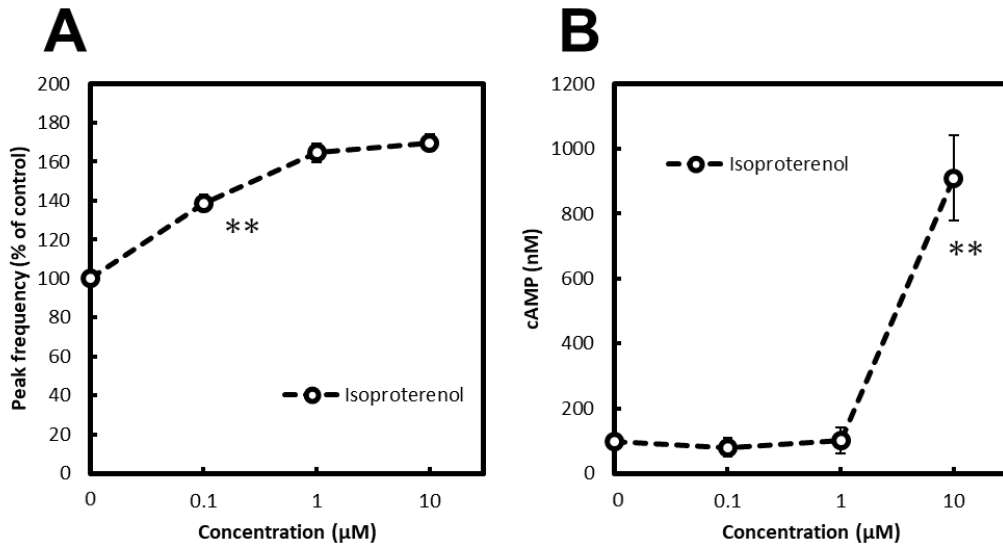


Figure 2-1: Assessment of cardiophysiological effects of isoproterenol by combined calcium flux monitoring and cAMP formation. (A) Concentration-response plots showing effects of drugs on cardiomyocyte beat frequencies after 90 min. The potential for G-protein coupled-receptor activation was assessed by measuring intracellular cAMP levels by competitive ELISA. (B) Concentration-response plots of isoproterenol that significantly ( $\geq$  ninefold) increased cAMP formation in cardiomyocytes. Data points in all plots represent means and  $\pm$  SEM of at least three replicates. Statistical significance, P value  $<0.01$  is notated with \*\*. Statistics based on Dunnett's test.

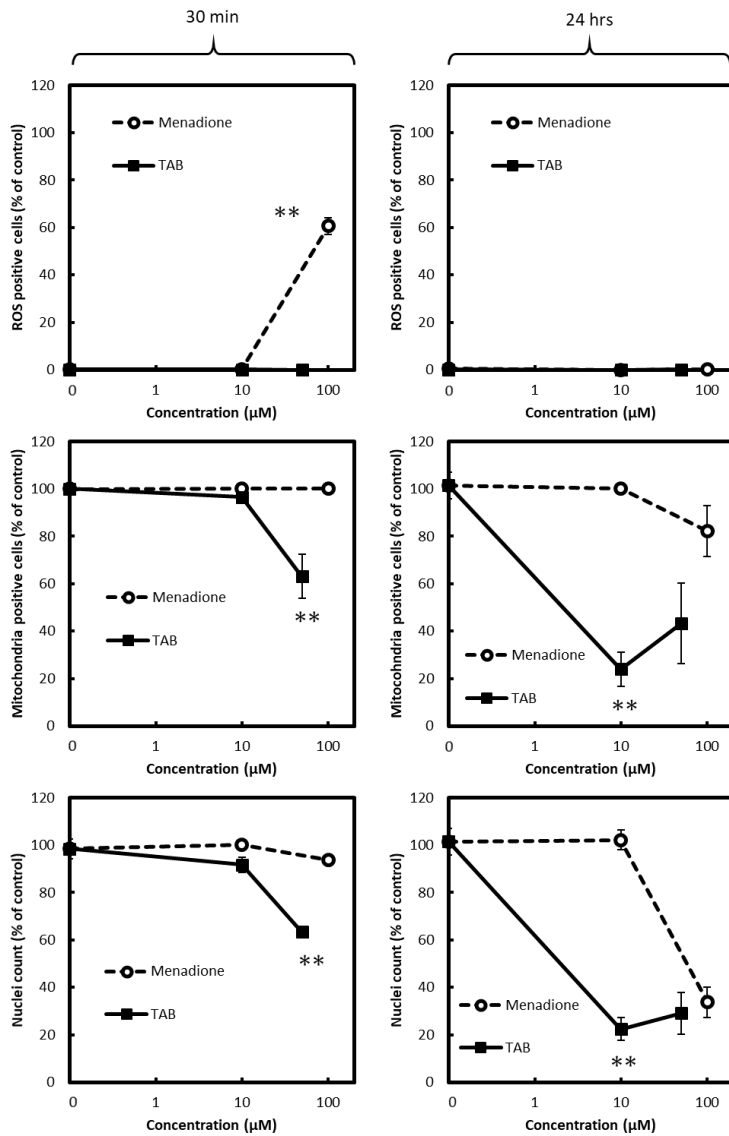


Figure 2-2: Combined assessment of reactive oxygen species (ROS) formation, cytotoxicity, and mitochondrial integrity in iPSC hepatocytes. The first row summarizes results on reactive oxygen species formation, the second and third rows depict data derived from mitochondria and nuclear imaging for evaluation of cytotoxicity and mitochondrial integrity. The left and right columns show concentration-response plots for menadione, and tetraoctyl ammonium bromide after 30 min and 24 hours incubation. All data points represent means  $\pm$  SEM. P value  $<0.01$  is notated with \*\*.

Statistics based on Dunnett's test.



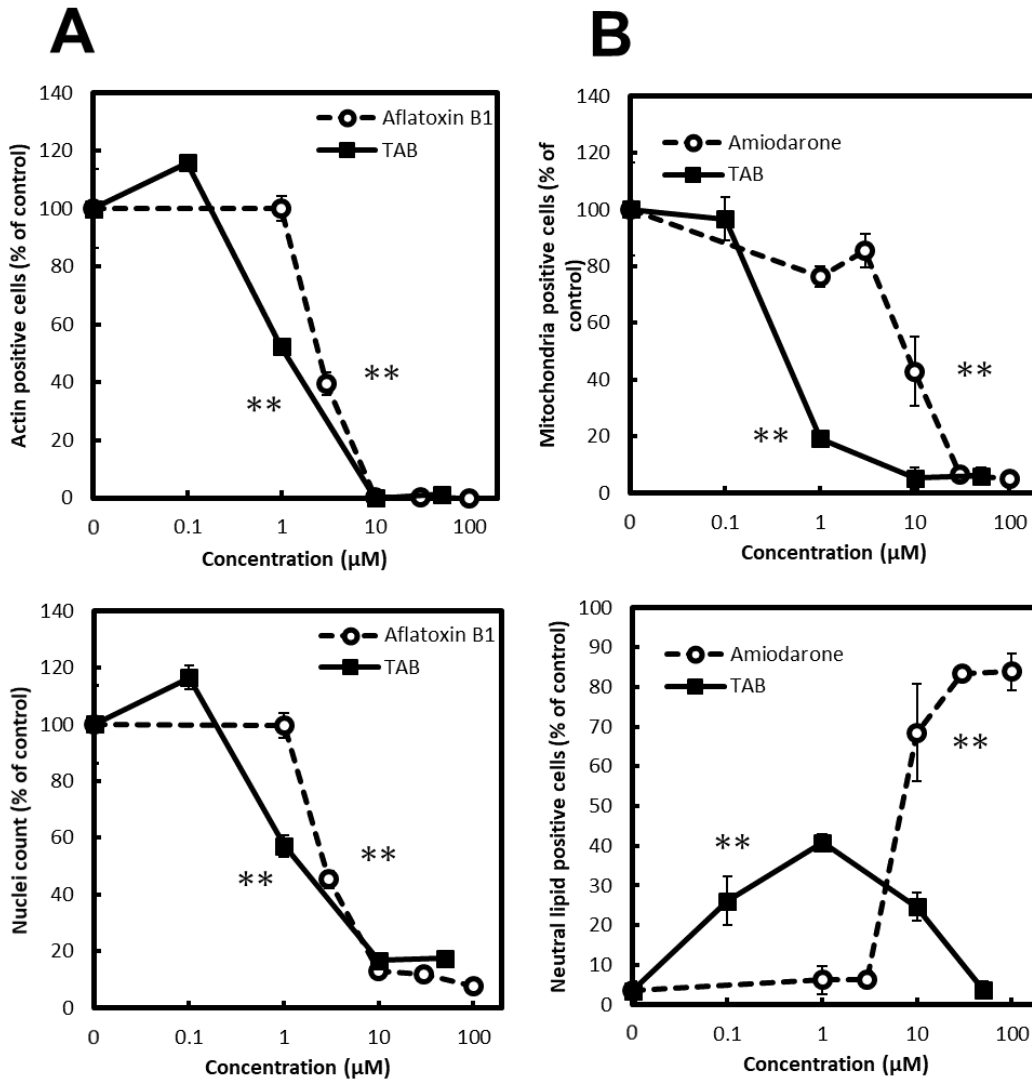


Figure 2-3: Combined assessment of cytoskeletal integrity and cytotoxicity (column A), mitochondrial integrity and lipid accumulation (column B) in iPSC hepatocytes. Concentration-response plots of hepatocytes treated with aflatoxin B1, tetraoctyl ammonium bromide, and amiodarone for 48 hours. Data points represent means  $\pm$  SEM. P value  $<0.01$  is notated with \*\*. Statistics based on Dunnett's test.

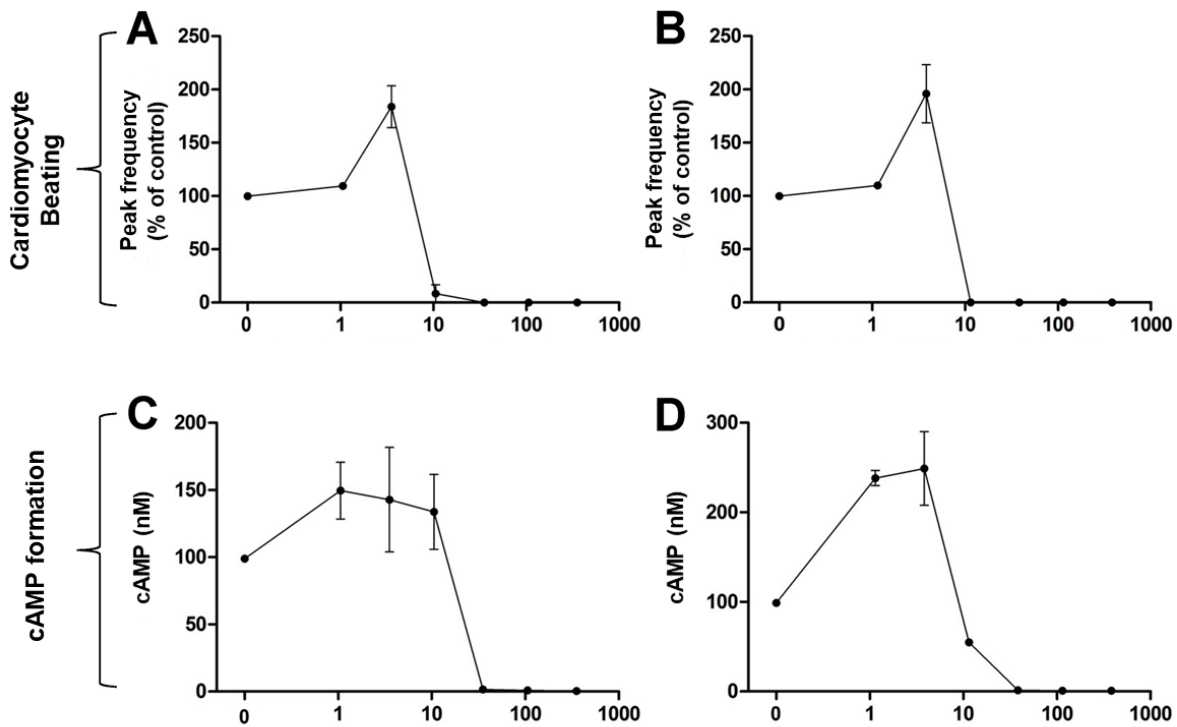


Figure 2-4: Application of combinatorial high-content cardiotoxicity screening assays for descriptive and mechanistic toxicity profiling of petroleum substances. Plots show (A-B) cardiomyocyte beating (Peak frequency) and (C-D) cAMP formation concentration-response profiles for two (A and C; B and D) DMSO extracts of commercial gas oils. Individual data points and means  $\pm$  SEM are indicated for each concentration. Cardiac peak frequency profiles demonstrate initial chronotropic effects followed by total inhibition of cardiomyocyte beating. Moreover, cardiac chronotropic effects correlate well with cAMP formation, a cellular indicator of G-protein coupled receptor stimulation.

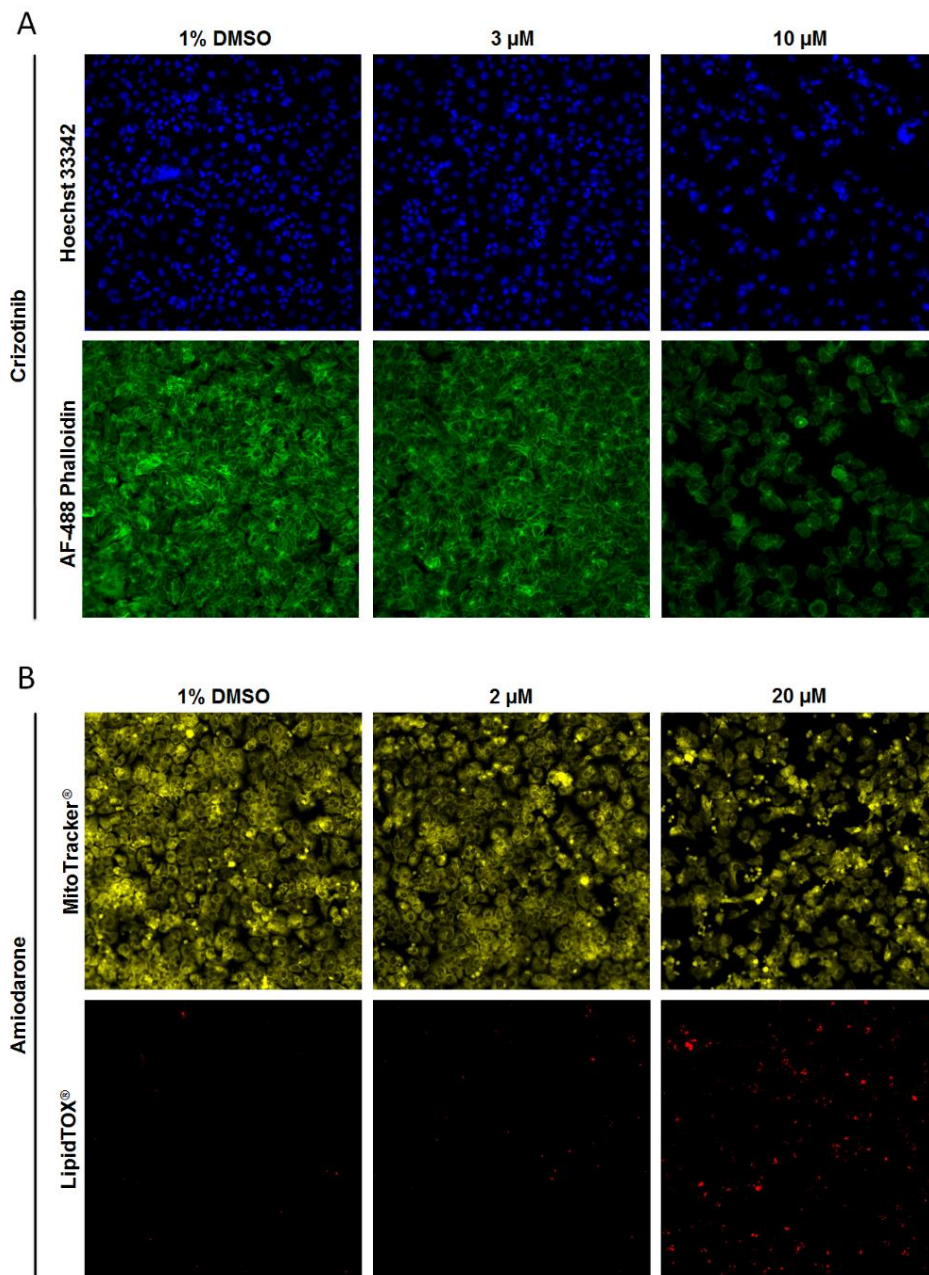


Figure 2-5: High-content imaging of iPSC hepatocytes. (A) Treatment with Crizotinib (3, 10  $\mu\text{M}$ ). Top panels show Hoechst33342 staining (blue) and bottom panels show phalloidin (green) staining. (B) Treatment with Amiodarone (2, 20  $\mu\text{M}$ ). Top panels show MitoTracker<sup>®</sup> (yellow) staining and bottom panels show LipidTOX<sup>®</sup> (red) staining. Left panels of each group show treatment with vehicle (1 % DMSO).

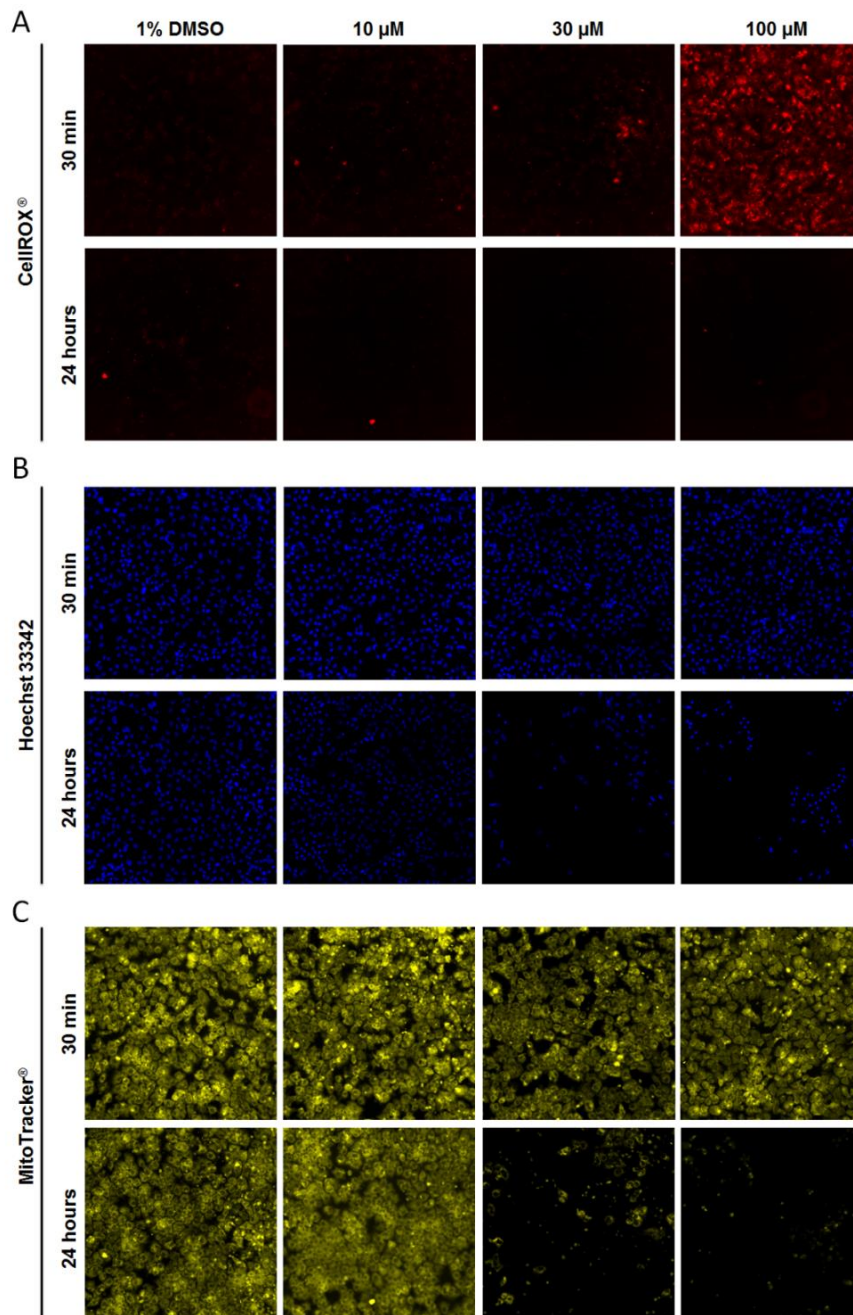


Figure 2-6: High-content imaging of iPSC hepatocytes. iCell Cardiomyocytes were treated with Menadione (10, 30, 100 μM) or vehicle (1 % DMSO). (A) CellROX<sup>®</sup> staining (red). (B) Hoechst33342 (blue). (C) MitoTracker<sup>®</sup> (yellow). Top panels of each group shows treatment for 30 min and bottom panels of each group show treatment for 24 hours.

Table 2-1: Assay Quality Control – iCell Cardiomyocytes.

<b>Assay</b>	<b>Description</b>	<b>Time</b>	<b>Control</b>	<b>%CV<sup>a</sup></b>
Calcium Flux	Cardiomyocyte beating assay	90 min	1% DMSO in media	6%
cAMP formation	GPCR activation	90 min	1% DMSO in media	12%

<sup>a</sup>Standard deviation expressed as percentage of the mean of vehicle-treated controls, calculated from 28 calcium flux, 12 cAMP formation, and 9 ROS formation replicates, respectively.

<sup>b</sup>Calculated from 9 negative and 3 positive control replicates.

In the case of menadione, a Z'-factor was determined after 24 hours only. CV, coefficient of variation.

Table 2-2: Assay Quality Control – iCell Hepatocytes.

Combination	Assay	Description	t	Control	%CV <sup>a</sup>	Z' – factor <sup>b</sup>
1	ROS formation	Cytotoxicity measurement	30 min	Menadione (100 µM)	1%	0.7
	Mitochondrial Integrity	Cytotoxicity measurement	30 min,	TAB <sup>a</sup> (50 µM)		0.1, 0.7
			24 hrs	Menadione (100 µM)		-0.9 (24hrs)
Cytotoxicity	Cytotoxicity measurement	30 min,	TAB <sup>a</sup> (50 µM)		0.2, 0.7	
			24 hrs	Menadione (100 µM)		0.5 (24hrs)
2	Cytoskeletal Integrity	Cytotoxic Agents / Cytoskeletal Poisons	48 hrs	TAB <sup>a</sup> (50 µM)		0.7
				Aflatoxin B1 (100 µM)		0.9
2	Cytotoxicity	Cytotoxic Agents / Cytoskeletal Poisons	48 hrs	TAB <sup>a</sup> (50 µM)		0.7
				Aflatoxin B1 (100 µM)		0.8
3	Mitochondrial Integrity	Cytotoxicity measurement	48 hrs	TAB <sup>a</sup> (50 µM)		0.9
				Amiodarone <sup>a</sup> (30 µM)		0.8
3	Lipid Accumulation	Steatosis Inducer	48 hrs	Amiodarone <sup>a</sup> (10 µM)	2.5 %	0.5

<sup>a</sup>Standard deviation expressed as percentage of the mean of vehicle-treated controls, calculated from nine ROS formation or six lipid accumulation replicates, respectively.

<sup>b</sup>Calculated from 3 positive control replicates and 9 cytotoxicity, 9 mitochondrial integrity, or 18 cytoskeletal integrity and lipid accumulation negative controls, respectively.

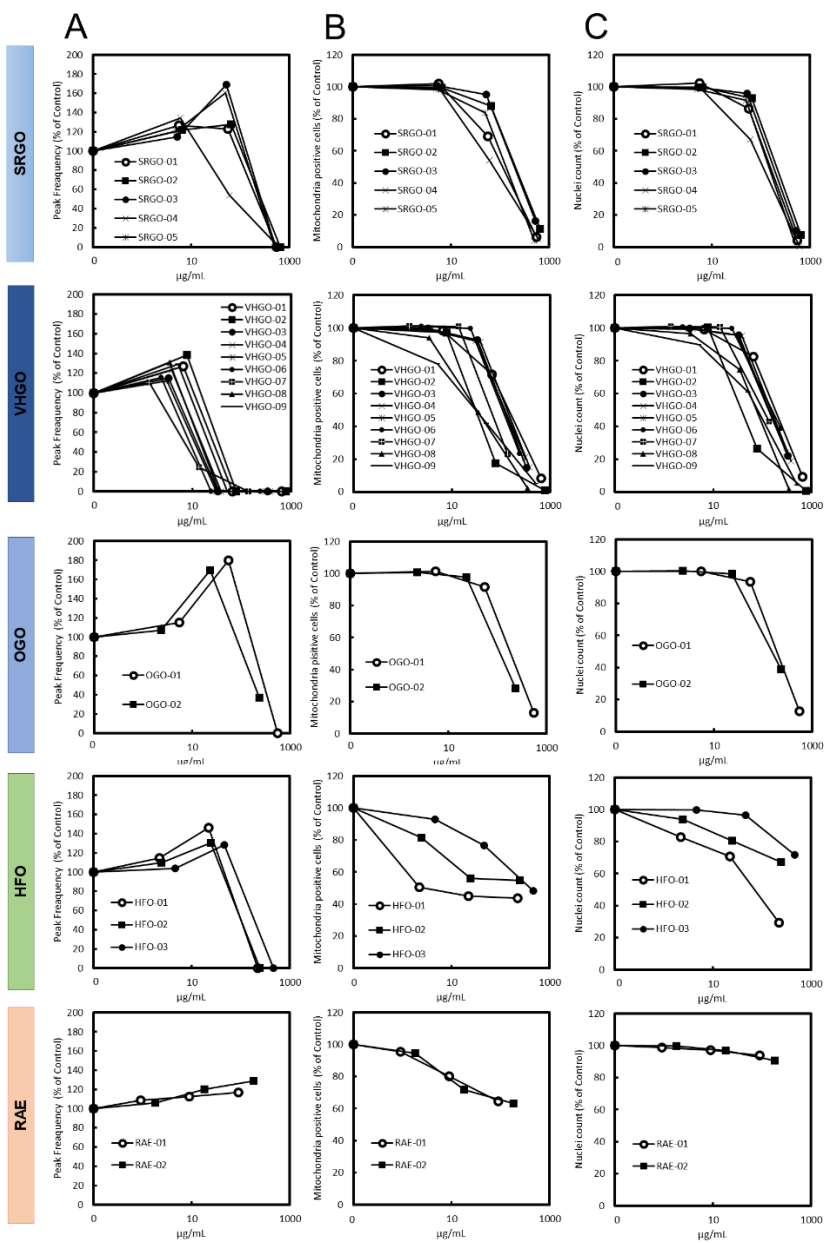


Figure 3-1: Category-specific biological effects of petroleum substances.

Petroleum substance product group-specific concentration-response plots for representative phenotypes cardiomyocyte peak frequency (A), hepatocyte mitochondria positive cells (B), and nuclei count (C) are shown. Data points represent means of duplicate determinations (n=2).

[SRGO = Straight Run Gas Oils; VHGO = Vacuum & Hydrotreated Gas Oils; OGO = Other Gas Oils; HFO = Heavy Fuel Oils; RAE = Residual Aromatic Extracts]

Table 3-1: Petroleum substances in chapter 3.

#	Sample	Category	CAS
1	CON-01	SRGO <sup>a</sup>	64741-43-1
2	CON-02	SRGO <sup>a</sup>	68814-87-9
3	CON-03	SRGO <sup>a</sup>	68814-87-9
4	CON-04	SRGO <sup>a</sup>	68915-96-8
5	CON-05	SRGO <sup>a</sup>	64741-43-1
6	CON-07	OGO <sup>b</sup>	64742-46-7
7	CON-09	OGO <sup>b</sup>	64742-80-9
8	CON-12	VHGO <sup>c</sup>	64741-49-7
9	CON-13	VHGO <sup>c</sup>	64741-58-8
10	CON-14	VHGO <sup>c</sup>	64741-77-1
11	CON-15	VHGO <sup>c</sup>	64742-87-6
12	CON-16i	VHGO <sup>c</sup>	68334-30-5
13	CON-16ii	VHGO <sup>c</sup>	68334-30-5
14	CON-17	VHGO <sup>c</sup>	68476-30-2
15	CON-18	VHGO <sup>c</sup>	68476-31-3
16	CON-20	VHGO <sup>c</sup>	92045-24-4
17	CON-26	RAE <sup>d</sup>	64742-10-5
18	CON-27	RAE <sup>d</sup>	91995-70-9
19	A083/13	HFO <sup>e</sup>	-
20	A087/13	HFO <sup>e</sup>	-
21	A092/13	HFO <sup>e</sup>	-

<sup>a</sup>Straight Run Gas Oil

<sup>b</sup>Other Gas Oil

<sup>c</sup>Vacuum & Hydrotreated Gas Oil

<sup>d</sup>Residual Aromatic Extract

<sup>e</sup>Heavy Fuel Oil



## 引用文献

1. McPartland J, Dantzker HC, Portier CJ: Building a robust 21st century chemical testing program at the U.S. Environmental Protection Agency: recommendations for strengthening scientific engagement. *Environ Health Perspect.* 2015;123:1–5.
2. Settivari RS, Ball N, Murphy L, Rasoulpour R, Boverhof DR, Carney EW: Predicting the future: opportunities and challenges for the chemical industry to apply 21st-century toxicity testing. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54:214–223.
3. Landrigan PJ, Goldman LR: Chemical safety, health care costs and the Affordable Care Act. *Am J Ind Med.* 2014;57:1–3.
4. Jennings P: The future of in vitro toxicology. *Toxicol In vitro.* 2014;1217–1221.
5. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R: Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:1–18.
6. Sirenko O, Crittenden C, Callamaras N, et al.: Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. *J Biomol Screen.* 2013;18:39–53.
7. Sirenko O, Cromwell EF, Crittenden C, Wignall JA, Wright FA, Rusyn I: Assessment of beating parameters in human induced pluripotent stem cells enables quantitative in vitro screening for cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;273:500–507.
8. Sirenko O, Hesley J, Rusyn I, Cromwell EF: High-content assays for hepatotoxicity using induced pluripotent stem cell-derived cells. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12:43–54.
9. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R: Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:2.

10. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, et al :Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. 2011;8(5):424-429.
11. An WF, Tolliday N: Cell-based assays for high-throughput screening. *Mol Biotechnol*. 2010;45:180–186.
12. Louekari K, Sihvonen K, Kuittinen M, Sømnes V: In vitro tests within the REACH information strategies. *Altern Lab Anim*. 2006;34(4):377-86.
13. Eckers A, Haendeler J: Endothelial cells in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(14):1209-1211.
14. Smith EJ, Staton CA.:Tubule Formation Assays: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
15. Sarkanen JR, Mannerstrom M, Vuorenpaa H, Uotila J, Ylikomi T, Heinonen T:Intra-Laboratory Pre-Validation of a Human Cell Based in vitro Angiogenesis Assay for Testing Angiogenesis Modulators. *Front Pharmacol*. 2010;1:147.
16. Jennings P:"The future of in vitro toxicology". *Toxicol In vitro*. 2015;29(6):1217-1221.
17. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N:Angiogenesis Assays A Critical Overview. *Clinical Chemistry*. 2003;49(1):32-40.
18. Robertson C, Tran DD, George SC: Concise review: Maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells*. 2013;31: 829–837.
19. Sauer V, Roy-Chowdhury N, Guha C, Roy-Chowdhury J: Induced pluripotent stem cells as a source of hepatocytes. *Curr Pathobiol Rep*. 2014;2:11–20.
20. Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I: Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Sci Rep*. 2016;6:26181.

21. Hahn VS, Lenihan DJ, Ky B: Cancer therapy-induced cardiotoxicity: basic mechanisms and potential cardioprotective therapies. *J Am Heart Assoc.* 2014;3:e000665.18.
22. Njoku DB: Drug-induced hepatotoxicity: metabolic, genetic and immunological basis. *Int J Mol Sci.* 2014;15:6990–7003.19.
23. Sturgill MG, Lambert GH: Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem.* 1997;43:1512–1526.
24. Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I: Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem.* 2009;16:3041–3053.
25. Ferri N, Siegl P, Corsini A, Herrmann J, Lerman A, Benghozi R: Drug attrition during pre-clinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity. *Pharmacol Ther.* 2013;138:470–484.28.
26. Roberts RA, Kavanagh SL, Mellor HR, Pollard CE, Robinson S, Platz SJ: Reducing attrition in drug development: smart loading preclinical safety assessment. *Drug Discov Today.* 2014;19:341–347.
27. Pradip A, Steel D, Jacobsson S, et al.: High Content Analysis of Human Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocytes Reveals Drug Induced Steatosis and Phospholipidosis. *Stem Cell Int.* 2016;2:1–14.
28. Casartelli A, Lanzoni A, Comelli R, et al: A novel and integrated approach for the identification and characterization of drug-induced cardiac toxicity in the dog. *Toxicol Pathol.* 2011;39:361–371.
29. Li X, Nooh MM, Bahouth SW: Role of AKAP79/150 protein in beta1-adrenergic receptor trafficking and signaling in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2013;288:33797–33812.

30. Xiang Y, Naro F, Zoudilova M, Jin SL, Conti M, Kobilka B: Phosphodiesterase 4D is required for beta2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 18;102(3):909-14.
31. Gravning J, Ahmed MS, Qvigstad E, et al: Connective tissue growth factor/CCN2 attenuates  $\beta$ -adrenergic receptor responsiveness and cardiotoxicity by induction of G protein-coupled receptor kinase-5 in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol*. 2013;84(3):372-83.
32. Goulding J, May LT, Hill SJ: Characterisation of endogenous A2A and A2B receptor-mediated cyclic AMP responses in HEK 293 cells using the GloSensor™ biosensor: Evidence for an allosteric mechanism of action for the A2B-selective antagonist PSB 603. *Biochem Pharmacol*. 2018 ;147:55-66
33. 医薬品インタビューフォーム イソメニールカプセル 7.5 mg 2019 年 10 月改訂（第 5 版） 13P
34. Briede JJ, van Delft JM, de Kok TM, et al: Global gene expression analysis reveals differences in cellular responses to hydroxyl- and superoxide anion radical-induced oxidative stress in caco-2 cells. *Toxicol Sci*. 2010;114:193–203.
35. Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, et al: Cytometric analysis for drug- induced steatosis in HepG2 cells. *Chem Biol Interact*. 2009;181:417–423.
36. Raja K, Thung SN, Fiel MI, Chang C: Drug-induced steatohepatitis leading to cirrhosis: long-term toxicity of amiodarone use. *Semin Liver Dis*. 2009;29: 423–428.
37. Antherieu S, Rogue A, Fromenty B, Guillouzo A, Robin MA: Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up- regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology*. 2011;53:1895–1905.
38. Adeleye Y, Andersen M, Clewell R, et al.: Implementing Toxicity Testing in the 21st Century (TT21C): Making safety decisions using toxicity pathways, and progress in a prototype risk assessment. *Toxicology*. 2014;332:102–111.

39. National Research Council: A Framework to Guide Selection of Chemical Alternatives. *The National Academies Press, Washington, DC*, 2014, DOI: 10.17226/18872.
40. ECHA, European Chemicals Agency, Helsinki, 2012, [http://echa.europa.eu/documents/10162/13643/substance\\_id\\_en.pdf](http://echa.europa.eu/documents/10162/13643/substance_id_en.pdf).
41. P. Tsitou, M. Heneweer and P. J. Boogaard: Toxicogenomics in vitro as an alternative tool for safety evaluation of petroleum substances and PAHs with regard to prenatal developmental toxicity. *Toxicol. In vitro.* 2015, 29, 299–307.
42. D. M. Reif, M. Sypa, E. F. Lock, F. A. Wright, A. Wilson, T. Cathey, R. R. Judson and I. Rusyn: ToxPi GUI: an interactive visualization tool for transparent integration of data from diverse sources of evidence. *Bioinformatics.* 2013, 29, 402–403
43. CONCAWE REACH – Analytical characterisation of petroleum UVCB substances, Brussels, Belgium, 2012.
44. F. Brette, B. Machado, C. Cros, J. P. Incardona, N. L. Scholz and B. A. Block: Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science.* 2014, 343, 772–776.
45. J. H. Jung, C. E. Hicken, D. Boyd, B. F. Anulacion, M. G. Carls, W. J. Shim and J. P. : Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish.: Incardona. *Chemosphere.* 2013, 91, 1146–1155.
46. Kamelia L, Louisse J, de Haan L et al. Prenatal developmental toxicity testing of petroleum substances: Application of the mouse embryonic stem cell test (EST) to compare in vitro potencies with potencies observed in vivo. *Toxicol In vitro.* 2017;44:303-312.

## 出典

本論文の一部は以下に公表した。

1. Grimm FA, Iwata Y (Co-first), Sirenko O, Bittner M, Rusyn I: High-Content Assay Multiplexing for Toxicity Screening in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Hepatocytes. *Assay Drug Dev Technol.* 2015; 13(9):529-46.
2. Grimm FA, Iwata Y, Sirenko O, Chappell GA, Wright FA, Reif DM, Braisted J, Gerhold DL, Yeakley JM, Shepard P, Seligmann B, Roy T, Boogaard PJ, Ketelslegers HB, Rohde AM, Rusyn I. A Chemical-Biological Similarity-Based Grouping of Complex Substances as A Prototype Approach for Evaluating Chemical Alternatives. *Green Chem.* 2016; 18(16):4407-4419.
3. Iwata Y, Klaren WD, Lebakken CS, Grimm FA, Rusyn I. High-Content Assay Multiplexing for Vascular Toxicity Screening in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Assay Drug Dev Technol.* 2017 15(6):267-279.

## 要旨

医薬品、工業用および環境中の化学物質の毒性評価は主に動物を用いた試験により行われている。化学物質の毒性評価において動物試験は最も信頼性の高い評価法とされる一方、コストや時間がかかり効率が悪い点、動物愛護の観点で問題がある。これらの問題を解決するために、近年、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化誘導した細胞を用いた毒性評価系への期待が高まっている。iPS 細胞は生体を構成する全ての細胞に分化可能であるとされる。ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞は生体の各種臓器細胞に近い生理学的機能を保持しており、これら臓器別細胞を化学物質評価に用いることで、動物試験の問題点を回避することが期待されている。

遺伝的背景が同じ細胞を繰り返し作製できるため、ロット間差が少なく、細胞の供給が安定的である点も iPS 細胞の利点と考えられている。これらの利点から、再現性の高い評価が安定的に実施できると考えられ自動顕微鏡を用いたスループット性の高いハイコンテンツスクリーニング（HCS）への応用も期待されている。また心筋細胞など、倫理的な問題から初代培養による入手が難しいヒト由来細胞を安定的に入手できる点も大きな利点である。

本研究ではヒト iPS 細胞由来の臓器別細胞を用い、高いスループット性を有し、複数の生理学的機能の測定ができる毒性評価系を構築するため、第一章では、これまで化学物質の毒性評価への応用報告のないヒト iPS 細胞由来内皮細胞を用いて HCS によるアッセイを行い、ヒト iPS 細胞由来内皮細胞の細胞モデルとしての有用性を検討した。第二章ではすでに毒性評価に一部応用され、その有用性が報告されている iPS 細胞由来心筋および肝細胞の HCS による評価系を組み合わせ、ハイスループットな評価系の構築を行った。第三章では第二章で構築した HCS の応用例として、第二章で構築した評価系を利用し、21 個の石油化学物質の iPS 細胞由来心筋および肝細胞への反応性を評価した。

### 第一章: iPS 細胞由来内皮細胞を用いた血管新生アッセイおよび細胞毒性評価系の構築

iPS 細胞由来内皮細胞の化学物質評価への有用性を検討するため、HCS による血管新生アッセイおよび細胞毒性評価系の構築を試みた。また既存の内皮細胞モデルであるヒト臍

帯静脈内皮細胞 (HUVEC) との比較を行った。血管新生阻害および細胞毒性物質を 18-24 時間細胞に反応させ、血管新生阻害作用を評価するための血管新生アッセイと細胞毒性評価系の構築を行った。その結果、血管新生アッセイでは iPS 細胞由来内皮細胞および HUVEC とともに播種後 18 時間で、細胞外基質上に血管様の網目管様構造を形成した。これらの構造形成は血管新生阻害作用を持つノコダゾールとスラミン処置によって阻害された。ノコダゾールでは 100 nM 処置によって iPS 細胞由来内皮細胞で 50%、HUVEC で 90 % の管様構造形成が阻害された。また細胞毒性評価系においても細胞毒性物質である Tetrabutylammonium Bromide (TAB) 50  $\mu$ M の 24 時間処置によって iPS 細胞由来内皮細胞で 70%、HUVEC で 80 % の細胞数の減少 (細胞毒性) がみられた。これらの結果から、iPS 細胞由来内皮細胞を用いて内皮細胞に対する化合物の作用を評価できる HCS 評価系の構築ができたと考えられた。細胞の比較という観点では血管新生アッセイにおいて HUVEC の方がノコダゾール処置による反応性がより高い傾向があり、細胞毒性評価系においても iPS 細胞由来内皮細胞より HUVEC の方が TAB 処置時のサンプル間のばらつきが少ないことがわかった。しかしながら、HUVEC は初代培養細胞であるため、機能保持できる継代数が限られる、ロット間差が存在するといった欠点がある。したがって iPS 細胞由来細胞で試験系のさらなる改良を行い反応性やサンプル間のばらつきを改善できれば、初代培養細胞の持つこれらの欠点を解決する評価系になると考えられた。

## 第二章: iPS 細胞由来心筋細胞および肝細胞を用いた HCS による複合的毒性評価系の構築

従来のげっ歯類を用いた化学物質の評価では心毒性のリスク評価は不十分である。また一般的に化学物質は肝毒性を多く示すことが知られている。したがって本章では効率的に心・肝毒性を予測するために、iPS 細胞由来心筋および肝細胞を用い、心および肝毒性に関する毒性予測では評価項目を組み合わせることで測定する評価系の構築を目指した。肝毒性に関する評価項目を単一で測定するだけでは生体の毒性発現を十分に予測できず、数個の評価項目を組み合わせることが予測に重要とされており、評価項目の複合測定は有用性があると考えられる。iPS 細胞由来心筋細胞では心毒性予測に有用とされる心筋細胞拍動変化とその作用発現経路 ( $\beta$  作用による細胞内 cAMP 増加) の組み合わせ測定を検討するため、細胞内カルシウム濃度測定による心筋細胞拍動アッセイ後、cAMP 濃度測定を ELISA



によって行い、この2項目を組み合わせることで測定できるか検討した。iPS細胞由来肝細胞では肝障害に関与しているとされる評価項目を組み合わせるため、HCSによるROS産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の3項目の複合測定を行った。その結果、心筋細胞拍動アッセイでは $\beta$ 作用を持つイソプロテレノール90分処置において0.1  $\mu\text{M}$ の濃度から濃度依存的に溶媒対照群と比較して統計的に有意な拍動増加がみられた。細胞内cAMPに関してはイソプロテレノール10  $\mu\text{M}$ 処置時に溶媒対照群と比べて9倍程度の増加を確認でき、組み合わせ測定ができることがわかった。しかしながら、拍動数増加は0.1  $\mu\text{M}$ 処置からみられたのに対し、cAMPの増加がみられたのは10  $\mu\text{M}$ 処置であった。マウス心筋細胞などではイソプロテレノール処置によるcAMPの増加は処置後数分内で増加のピークを迎え、その後は減少することが知られている。したがって、今後の評価系の構築には測定時点を早期にする変更を行い、cAMP測定の反応濃度が心筋細胞拍動アッセイと同程度になるような検討をする必要があると考えられた。iPS細胞由来肝細胞のROS産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の3つの複合測定では、ROS産生物質であるメナジオン100  $\mu\text{M}$ の30分処置で60%程度の細胞がROS産生陽性になり、また細胞毒性物質であるTAB 50  $\mu\text{M}$ の30分処置でミトコンドリア障害性および細胞毒性が確認できたことから、ROS産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の複合測定は可能であると考えられた。24時間処置ではメナジオン100  $\mu\text{M}$ 処置によるROS産生はみられなかったが、TABの50  $\mu\text{M}$ 処置によるミトコンドリア障害性および細胞毒性は30分処置時より反応が強く、ミトコンドリア障害性と細胞毒性の測定には24時間処置の方が適していることがわかった。したがってiPS細胞由来肝細胞を用いたHCSによるROS産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の3つの項目を複合的に測定できる評価系の構築ができたと考えられた。ROS産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性は生体の肝毒性予測に重要な評価項目とされていることから、効率的に複数の毒性情報を取得できる本評価系によって肝毒性の予測ができる可能性を示した。

### 第三章: 構築した複合ハイコンテンツ毒性スクリーニング系による石油化学物質の安全性評価への応用

第二章で構築した評価系の有用性を示す応用例として既知の 21 個の石油化学物質の毒性を調べた。石油化学物質は消費者の身近で使用される製品が多く、また、その精製過程において作業従事者への暴露が懸念されるが、動物試験による有害性情報が明らかでない物質が数多く存在している。したがって動物試験の前段階で代替法により、生命に直接関係する重篤な毒性である心毒性や、化学物質の毒性として報告の多い肝毒性などの毒性予測を行い、評価すべきと考えられる物質および評価項目を絞り込んだ後に効果的かつ効率的に動物試験を実施することが重要である。第三章では、iPS 細胞由来心筋細胞の心筋細胞拍動アッセイと、iPS 細胞由来肝細胞のミトコンドリア障害性と細胞毒性の複合 HCS 測定を利用し、石油の精製過程による分類で軽油、重油、残渣とされる 21 個の石油化学物質を処置した。その結果、軽油と重油では心筋細胞拍動アッセイにおいて低、中濃度処置での拍動増加、高濃度処置での拍動減少と停止の反応がみられ、残渣ではこれらの反応はみられなかった。肝細胞のミトコンドリア障害性と細胞毒性の複合測定では高濃度処置での反応が、軽油で最も強く、重油で中程度、残渣で最も弱かった。したがって利用した評価系での反応は軽油で最も強く、重油で中程度、残渣で最も弱い傾向を示すことがわかった。

軽油には重油や残渣より毒性物質が多く含まれることが知られており、生体への毒性がより強いと考えられている。今回の評価系の結果においても、実際の生体への毒性が強い可能性のある軽油で他の 2 分類の物質より強い反応がみられたことから、評価系の反応性と生体への毒性の強さの間には関連性があり、石油化学物質の毒性予測に構築した複合 HCS を利用できる可能性が考えられた。

本研究では iPS 細胞由来臓器別細胞の化合物評価への有用性を検討するため、第一章では iPS 細胞由来内皮細胞を用い HCS による毒性評価系の構築を行った。第二章ではヒト iPS 細胞由来心筋・肝細胞を用い、HCS による複合測定の評価系構築を試み、肝細胞では肝毒性予測への応用が可能な複合 HCS 評価系の構築ができた。第三章では第二章で構築した評価系の応用性を検討するために石油化学物質の評価を行った。将来的には iPS 細胞由来の様々な臓器別細胞を用いることで評価系をさらに拡充し、石油化学物質を含む種々の化学物質等、未知の毒性プロファイルを持つ物質の毒性予測を動物試験の前段階で構築

した評価系を用いて行い、効果的に化学物質を絞り込むことで、動物試験を補完する役割が期待される。

## **Abstract**

To date, toxicity testing of pharmaceutical and industrial chemicals, as well as environmental agents, relies primarily on data derived from animal studies.

While animal toxicity testing is still widely regarded as the most acceptable systems, it is costly and time-consuming and has for animal welfare concerns. Significant advances in stem cell engineering have now resulted in the availability of human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cells, a physiologically relevant, organotypic in vitro model that promises to overcome these animal model key limitations. iPSC differentiates into almost any cell type, and the organotypic cells derived from iPSC are physiologically relevant and chemical toxicity testing using these organotypic cells promise to avoid problems for animal toxicity testing. Furthermore, iPSC genetic homogeneity and unlimited proliferation provide high quality per isolated batch and stable supply for in vitro toxicity testing. From these advantages, there is increasing demand that iPSC derived organotypic cells apply high-throughput and high content screening (HCS) using automated microscopy system. In terms of conflict with human ethical principles, iPSC-derived cells are easily available compared with primary cell culture models.

This study used iPSC derived organotypic cells to establish in vitro toxicity assays which are high-throughput and can measure multiple physiological functions. In the chapter 1, by using HCS, we developed functional vascularization and cellular toxicity evaluation in iPSC-endothelial cells (ECs) which fully has not been reported on applications to toxicity testing. In the chapter 2, we developed the high-throughput multiplex HCS systems to obtain effectively toxicity profiling, using iPSC cardiomyocytes and hepatocytes which has been reported on availability to prediction of cardio- and hepato-toxicity. In the chapter 3, we applied the HCS system developed in the chapter 2 to evaluation of toxicity profiling of 21 petroleum substances, as a case study.

**Chapter 1: Establishment of a vascularization and cellular toxicity assay in induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells**

In the chapter 1, in order to test the efficiency of iPSC-ECs for toxicity evaluation of chemicals, we demonstrated a vascularization and cellular toxicity assay. We conducted a side-by-side performance comparison of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) and iPSC-derived ECs with the hypothesis that the iPSC-derived ECs would be similar or better in performance.

Both iPSC-ECs and HUVECs were exposed to selected angiogenesis inhibitors and cytotoxic agents in response for either 18 or 24 hours for the purpose of establishing vascularization and cellular toxicity assay. Both type of cells formed tube-like structures in vascularization assay. Exposure to a known chemical inhibitor of angiogenesis, nocodazole and suramin, resulted in decrease or disruption of angiogenic growth in both cell types. 100 nM nocodazole treatment showed 90% inhibition of angiogenic growth in HUVEC and 50 % inhibition in iPSC-ECs, compared with vehicle treatment. A cytotoxic agent treatment, 50  $\mu$ M Tetrabutylammonium Bromide (TAB), revealed a decrease in the number of nuclei in both cell types (HUVEC: 80%, iPSC-ECs: 50 %).

Altogether, we established an HCS approach to evaluate chemical effects on the angiogenesis potential and general cytotoxicity of ECs in a high throughput compatible format, using iPSC-ECs and HUVECs. In terms of a comparison of the cell model, HUVECs performed better particularly for the angiogenesis assays, because the reactivity of the nocodazole-treated samples was higher for HUVECs as compared with iPSC-ECs. In the cellular toxicity assay, the variability of the TAB-treated samples was lower for HUVECs as compared with iPSC-ECs. However, HUVECs have problems that the number of passages keeping cellular functions is limited, and batch-to-batch variations. Therefore, once these problems of iPSC-ECs are improved, they should be a model that promises to overcome the key limitations associated with traditional primary cell culture systems.

## **Chapter 2: Establishment of multiplex high-content assay for toxicity screening in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and Hepatocytes**

In the rodent risk assessment of chemicals, cardiotoxicity evaluation is insufficient and hepatotoxicity is one of the most prevalent toxicity. Therefore, in the chapter 2, we used two human iPSC types, cardiomyocytes and hepatocytes, to test various high-content assay combinations for

cardiotoxicity and hepatotoxicity prediction in a multiparametric format. It has been reported that conventional in vitro hepatotoxicity assays which measure only one parameter have poor prediction to in vivo toxicity. A greater predictive power could be achieved when several parameters regarding hepatotoxicity are combined. Thus, simultaneous detection of various parameters through combination of HCS is useful for toxicity prediction. We tested the combination of cardiomyocyte beating assay and measurement of intracellular cAMP in iPSC cardiomyocytes to determine if the effects on cardiac physiology were  $\beta$ -adrenergic action dependent. Effects on cardiomyocyte beating were characterized by calcium flux measurements. Subsequently, intracellular cAMP levels were measured by ELISA. In addition, we utilized high-content cell imaging to simultaneously determine reactive oxygen species (ROS) formation, mitochondrial integrity, and cytotoxicity which are related to hepatotoxicity in iPSC hepatocytes. As a result, cardiac concentration–response beating changes were observed in isoproterenol treatment for 90 min. The changes were statically and consistent with previous observations reported before (e.g. beat frequency increase induced by isoproterenol, a  $\beta$ -adrenergic agonist, at more than 0.1  $\mu$ M). Isoproterenol treatment at 10  $\mu$ M increased intracellular cAMP levels nine fold. This result indicate that a combination of the calcium flux and intracellular cAMP assays is applicable in a same screening format. However, beat frequency increase was seen at more than 0.1  $\mu$ M, whereas intracellular cAMP increase was only confirmed at 10  $\mu$ M. For example, in the experiment using mouse cardiomyocytes, it has been reported that intracellular cAMP increase reach a peak within a few minutes after isoproterenol stimulation. Therefore, we need to examine the earlier time point at which both beat frequency and intracellular cAMP increase is detectable at the same concentration. The feasibility of combining ROS formation, mitochondria integrity and cytotoxicity, for high-content imaging of iPSC hepatocytes was evaluated by incubating cells for 30 min and 24 hrs in the presence of TAB and menadione. ROS formation was observed after 30min in cells treated with 100  $\mu$ M menadione, increasing the number of cells with detectable ROS formation to above 60%. After 30 minutes TAB treatment at 10  $\mu$ M, mitochondria injury and cytotoxicity was observed. Thus, it was found that ROS formation, mitochondria integrity and cytotoxicity was simultaneously detectable. Although ROS formation in cells treated with menadione had decreased to basal levels after 24 hrs,

Mitochondria injury and cytotoxicity in the treatment with TAB at 50  $\mu\text{M}$  was more apparent than after 30 minutes. Altogether, we established a multiplex assay which detects simultaneously ROS formation, mitochondria integrity, and cytotoxicity in iPSC hepatocyte HCS format. This three parameters are considered to be important for hepatotoxicity prediction. Therefore the assay we developed potentially shows high predictability for hepatotoxicity.

### **Chapter 3: An application of the developed multiplex high-content assay to evaluation of petroleum substances**

In the chapter 3, we applied the HCS system we developed to the evaluation of petroleum substances. The aim of this study was to test the applicability of our combinatorial HCS approaches. The risks of petroleum substance exposure to human need to be concerned in their refining process and daily life of consumer. However, most petroleum substances lack traditional animal study-derived data that can be used to evaluate their safety.

Therefore, it is important to conduct animal testing effectively after the selection of substances and parameters considered to be evaluate by using alternative methods including in vitro toxicity testing. Especially, we need to predict severe and prevalent type of toxicity, such as, cardiotoxicity potentially resulting in death, and hepatotoxicity often reported as toxicity of chemicals.

In the chapter 3, we assessed 21 petroleum substances from three product groups (gas oils, heavy fuel oils, residues) in iPSC cardiomyocytes and hepatocytes using HCS systems established in the chapter 2. As a result, gas oils and heavy fuel oils contributed the most bioactive petroleum substances in the cardiomyocyte beating assay. Gas oils and heavy fuel oils increased cardiomyocyte beat frequency at lower concentrations, resulting in a biphasic appearance of the respective concentration-response plots, i.e. initial increases in the beat rate at low concentrations, followed by decreasing beat rate at high concentrations. In contrast to gas oils and heavy fuel oils, residues did not show these bioactivities in cardiomyocytes. Bioactivity trends observed in hepatocytes correlated well within cardiomyocytes. Gas oils constituted the most bioactive trend of tested petroleum substances. However, Treatment of hepatocytes with heavy fuel oils and residues resulted in moderate to low bioactivity. It has been reported that gas oils contain more highly toxic

substances than heavy fuel oils and residues. In this study, gas oils showed higher bioactivity than heavy fuel oils and residues. Hence, there is a relationship between the bioactivities of in our HCS and in vivo toxicity, and the multiplex HCS potentially is applicable to the prediction of petroleum substance toxicity.

In this study, in in the chapter 1, in order to examine the applicability of iPSC-derived organotypic cells to assess toxicity of chemicals, we established HCS using iPSC-derived ECs. In the chapter 2, we used two human iPSC types, cardiomyocytes and hepatocytes, to test several HCS combinations for their applicability to in vitro toxicity screening. In iPSC hepatocytes, we developed multiplex HCS for prediction of hepatotoxicity. In the chapter 3, to test the applicability of the developed system, we evaluate toxicity of petroleum substances. In addition, the assays presented here could be further enhanced by incorporating other type of iPSC-derived organotypic cells to increase data generated and further refine the toxicity profile of the chemicals including petroleum substances. In the future, toxicity prediction by our multiplex HCS system will be expected to effectively select chemicals which have unknown toxicity profiles for complementation of toxicity testing using animals.