

氏名(本籍)	岩田 康 寛 (徳島県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第 436 号
学位授与年月日	令和 2 年 2 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 村 上 賢 (副査) 折 戸 謙 介 塚 本 篤 士

論 文 内 容 の 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 μ 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 (β 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 β 作用を持つイソプロテレノール 90 分処置において 0.1 μ 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 μ 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 μM 処置からみられたのに対し、cAMP の増加がみられたのは 10 μM 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 μM 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 μM 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 μM 処置による ROS 産生はみられなかったが、TAB の 50 μM 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的 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。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は、ヒト iPS 細胞から分化誘導された臓器別細胞を用い、ハイコンテンツスクリーニング (HCS) 及びハイスループットスクリーニング (HTS) 手法により、化学物質の毒性評価系を構築しようとした内容である。論文は3章から構成されている。第一章では、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、化学物質の毒性評価系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を用い、HCS を複合的に組み合わせた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 iPS 細胞由来心筋および肝細胞による複合的 HCS 評価系を利用して、21 個の石油化学物質の毒性を評価した。

本研究の成果である、iPS 細胞由来臓器別細胞を用いた HCS 及び HTS による毒性評価系の構築は、効率的及び効果的に化学物質の毒性を評価する上で有用な知見である。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は製薬企業の探索安全性研究部門に勤める研究員である。医薬品、工業用および環境中の様々な化学物質の毒性評価を効率的かつ効果的にする系を構築することを目的としている。動物愛護の観点からも社会的ニーズの高いテーマである。現場で直面している問題であり、実現可能な明確なテーマが設定されている。

2) 研究の背景

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、動物愛護の点で問題がある。近年、生体を構成するほぼすべての細胞に分化可能である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。ヒト iPS 細胞由来分化細胞は、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、生体の各種臓器細胞に近い生理学的機能を保持している、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、などの利点がある。

評価方法として、自動顕微鏡、画像処理、視覚化ツールなどを用いて細胞集団から定量的に多面的にデータを解析するハイコンテンツスクリーニング (HCS) が期待され、さらには HCS のハイスループットなサンプルの解析への応用も期待されている。

これらの背景を踏まえ、目的に向けて本研究に取り組んでいる。

3) 研究の方法

第一章では、これまでに応用報告のない iPS 細胞由来内皮細胞を用いて、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。第二章では、iPS 細胞由来心筋および肝細胞を用い、評価項目を組み合わせて測定する評価系の構築を目指した。すなわち、iPS 細胞由来心筋細胞では心毒性予測に有用とされる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を HCS で、その作用発現経路 (β 作用による細胞内 cAMP 増加) を ELISA による cAMP 濃度測定と組合せて検討した。また、iPS 細胞由来肝細胞では肝障害に関与しているとされる ROS 産生、ミトコンドリア障害性、細胞毒性の 3 つの評価項目について HCS による複合測定を行った。いずれも HTS に対応して実施した。第三章では、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。

このように、研究の目的とテーマにふさわしい複数の研究方法を用いて、分析している。

4) 研究の結果

第一章では、iPS 細胞由来内皮細胞を用いて、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血管様構造形成が阻害され、また細胞毒性物質である Tetrabutylammonium Bromide (TAB) 処置によって細胞数の減少 (細胞毒性) がみられることを確認した。既存の内皮細胞モデルであるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) との比較を行い、iPS 細胞由来細胞での評価系の改良点も示した。第二章では、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた HCS 拍動アッセイと ELISA による細胞内 cAMP 濃度測定において β 作用を持つイソプロテレノールは濃度依存的に有意な拍動増加と細胞内 cAMP 増加を示すことを確認し、組合せ測定ができることを示した。測定時点の検討も指摘した。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

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 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。第三章では、第二章での評価系を利用して、石油の精製過程により分類される軽油、重油、残渣からの 21 個の石油化学物質の毒性を評価を行い、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。いずれも十分なデータをまとめて解析している。

5) 考察と結論

改良点はあるものの、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た。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の HCS による評価系が構築でき、ELISA による細胞内 cAMP 濃度測定も組み合わせることができるとした。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た。この構築した複合 HCS 評価系を用いての 21 個の石油化学物質の毒性評価では、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、構築した評価系は石油化学物質の毒性予測できると考えた。

いずれも研究結果から明らかになったことを踏まえ、論理的に説明できている。

本研究で構築した、iPS 細胞由来臓器別細胞を用いた HCS 及び HTS による毒性評価系は、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有用な毒性予測を可能にし、動物試験の前段階として、化学物質を効果的に絞り込む役割が期待される。

6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容、専門分野及び外国語の学力と発表会での質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上、生物学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。