# ヒト未分化胎盤幹細胞を用いた 合成香料の安全性評価システムの開発

東北大学大学院医学系研究科

# 樋浦 仁

Recently mouse embryonic stem cells have been applied as system for toxicity testing in Europe. However, a mouse ES cell test (EST) may not be sufficiently rigorous for human toxicity testing, while the use of human ES cell presents an ethical problem. Tests using human trophoblastic stem (TS) cells, which are derived from the placenta, sidestep a potential to these issues. A test based on human TS cell would have relevance to the human embryo during pregnancy and could therefore be useful in testing low-dose toxic substances, which may alter the epigenome. The purpose of this study is to establish whether human TS cell have relevance to epigenetic teratogenicity testing. We have developed a new toxic screening methods using human TS cells to evaluate the effect of the synthetic perfume Hydroquinone (HQ), 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[g]-2-benzopyran solution (HHCB) and Methyl P-Hydroxybenzoate (MP) 1) the rate of cell growth: human TS cells were more sensitive in growth rate than human ES cells (IC50). 2) the rate of trophoblast differentiation: the differentiation marker, hCGB was increased with dose-dependent manner. 3) mRNA expression: micro RNAs (miR-1323, miR-518b) are sensitive, with the substance. 4) DNA methylation: DNA methylation of imprinted genes (*H19*, *PEG3*) are increased with dose-dependent manner. We concluded that we have first establishment human TST method and establishment of bioassay system of TST. We next will apply the TST method to human disease-specific TS cells.

# 1. 緒 言

合成香料は、難分解性で環境中に残出し、食物連鎖を介し、ヒト体内に蓄積される傾向にある。また、エストロゲン作用により、胎児の涙腺、肝臓、骨などの奇形の増加も報告されている「・・・」。これらの物質は、妊娠中胎盤を通して、長期間蓄積し、胎児に移行することで、胎児の発育や出生後の成長および精神・神経学的な発達に影響を及ぼす可能性もある。従来、動物実験で人体への有毒性を予測していたが、新法の制定に伴い、ヒト正常培養細胞等を用いて毒性試験を行う必要性が高まっている。しかしながら、ヒト胎児への細胞毒性機序や代謝動態をin vitroにおいて評価するための、国際基準に基づく毒性試験は未だ確立していない。

最近我々は、世界で初めてヒト胎盤由来未分化幹 (TS) 細胞の樹立に成功した<sup>3)</sup>。ヒトTS細胞は、通常分娩後破棄される胎盤組織を細胞源とするため、入手に伴う倫理的な問題、量的問題は比較的少ない。そのため、分化誘導系の確立したヒトTS細胞の特性を生かし、短期間に低コストで正確な細胞毒性を評価すること(TST法(図1))が可能であると期待される。本研究では、化学物質の低濃度かつ長期間ばく露による子宮内の有害性評価法として、TST



Development of cosmetics safety test using human trophoblast stem cells.

Hitoshi Hiura

Graduate School of Medicine, Tohoku University

法を確立することを目的とした。

# 2. 方 法

#### 2.1. 合成香料

- ・標準品:多環リスク (HHCB: Sigma-Aldrich社製)、メ チルパラベン (MP: Sigma-Aldrich社製)、ハイドロキ ノン(HQ: (株)和光純薬製)。
- ・標準溶液:標準品を精秤し、エタノール溶液に溶解、標準原液を調整した。

## 2.2. ヒト未分化幹細胞株

正常ヒトTS細胞(男児由来)を供した。

# 2.3. 細胞へのばく露濃度

HHCBの場合は、血中濃度 0 倍 (溶媒のみ、対照区)、(5 nM) の 100 倍 (500 nM)、500 倍 (2.5  $\mu$ M)、1,000 倍 (5  $\mu$ M)、5,000 倍 (25  $\mu$ M)、10,000 倍 (50  $\mu$ M) について検討した。

MP、HQの場合は、0 (溶媒のみ、対照区)、0.01、0.05、0.1、0.5、1  $\mu$ Mを、それぞれTS細胞培養液に添加した。

# 2.4. 培養条件

ガラス 4-well プレートは、2 種類 (BD Falcon 社製、Nunclon Surface 社製) で検討した。培養液には蒸散防止のため Sydney IVF culture oil (Cook 社) を無血清積層し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で細胞培養を実施した。1 ウェルあたり 5 × 10⁴ 個の TS細胞を、TS細胞培養液にて播種後、翌日に化学物質を含んだ TS細胞培養液に培地交換し、培

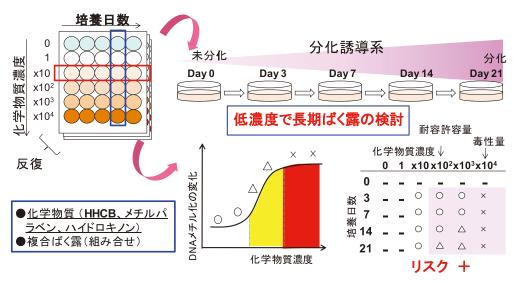


図 1 TST 法の概要 細胞増加抑制と化学物質濃度などの相関について検討し、安全域と危険域を設定する。

養を行った。

#### 2.5. 培養条件

培養液は血清無添加で、増殖因子は必要最小限とした。

#### 2.6. バイオアッセイ系の検討

# 2.6.1. 細胞増殖能

血球計算盤を用いて細胞数を計測し、50%阻害濃度 (IC50)を算出した。

## 2.6.2. 細胞分化能

10 視野における巨細胞 (合胞体性栄養膜細胞) の出現数 を測定した。また、分化マーカー遺伝子 (TP63、HLA-G、 hCGB) の発現量を定量化した。

#### 2.6.3. 遺伝子発現の解析

インプリント遺伝子および低分子RNA(miRNA)の遺伝子発現量を定量化した。*H19*, *IGF2*, *MEST*, *PEG3* およびヒト19 番染色体上のmiRNAクラスターC19MCを構成し、インプリンティングを受けるmiRNA(miR-520h, miR-1323 およびmiR-518b)の発現量を検討した。インプリント遺伝子には*GAPDHを、miRNAにはsnoRNAであるRNU44を*用いて内部補正した。インプリント遺伝子の発現アレルについては、gDNAおよびcDNAを用いてPCR-RFLP(制限酵素多型解析)を用いて定量解析した。

#### 2.6.4. DNAメチル化解析

5種類のインプリントを遺伝子の制御領域であるアレル特異的メチル化領域 (DMR) (H19, PEG3, MEST, C19MC, IG-DMR) について、COBRA法にてDNAメチル化レベルを定量した。また、ゲノムレベルのDNAメチル化解析には、LINE-1のメチル化について解析した。

#### (倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究にあたっては、関係法令と「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および各研究機関の規程に従い、東北大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の審査を経たのち、実施した。ヒト胎盤幹(TS)細胞は、試料提供者の利益・不利益を十分に説明した上で同意書を取得して実施した。法令、指針、規定を遵守し、試料管理・個人情報保護には細心の注意を払い、本研究を実施した。

#### 3. 結果

#### 3.1. バイオアッセイ系の検討(急性毒性試験)

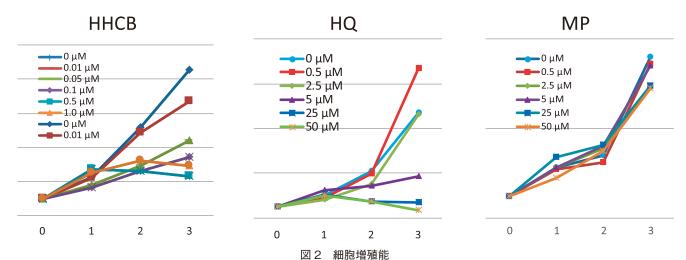
ヒトTS細胞(46XY) に血中濃度を参考に化学物質(HHCB、MPおよびHQ)を5段階の濃度で培養液に添加し、ガラス製培養ディッシュにて、3日間培養した。培養終了時に細胞形態を観察および細胞数を計測し、micro RNAを含むtotal RNAおよびゲノムDNAを抽出した。以下の4つのバイオアッセイ系で評価し、プロトタイプを開発した。

# 3.1.1. 細胞増殖能

TS細胞における50%阻害濃度(IC50) は、HHCB:  $0.06\,\mu\text{M}$ 、HQ:  $3.80\,\mu\text{M}$ であった。また、ヒトES細胞の HHCBのIC50 は  $0.5\,\mu\text{M}$  であり、HQ  $50\,\mu\text{M}$  で、TS細胞の方が高感変性であることが判明した。細胞の細胞数は対照区と比較して  $25.6\,\%$  しか減少しなかった(図 2)。

## 3.1.2. 細胞分化能

分化マーカーの遺伝子発現は、HHCB添加TS細胞では、hCGB(合胞体性栄養膜細胞マーカー)は濃度依存的に発現が亢進し、対照区と比較してhCGBは最大 4.62 倍まで亢進していた(図 3)。



50%阻害濃度(IC50): 0.06μM (HHCB), 3.80μM (HQ)

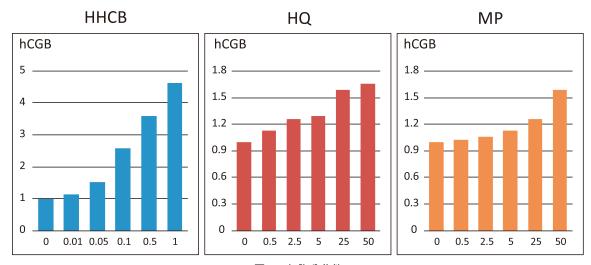


図3 細胞分化能 濃度依存的に分化能は亢進している。

#### 3.1.3. 遺伝子発現

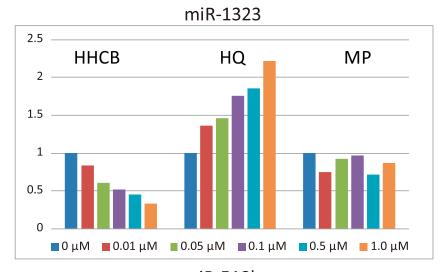
インプリント遺伝子の発現では、HHCB添加TS細胞では、miR-1323 およびmiR-518b は濃度依存的に発現減少し、miR-1323 は対照区と比較して最大 0.35 倍まで減少し、miR-518b は対照区と比較して最大 0.52 倍まで減少した。一方、HQ添加TS細胞では、miR-1323 は濃度依存的に発現亢進し、対照区と比較して最大 2.33 倍まで亢進していた(図 4)。また、ヒトTS細胞の遺伝子多型がいずれもホモ接合型であったため、発現アレルについては明らかにすることができなかった。

#### 3.1.4. DNAメチル化解析

HHCB 添加 TS 細胞 では LINE-1, H19, IG-DMR, PEG3, C19MCが濃度依存的にメチル化はわずかに亢進していた。一方、HQ添加 TS 細胞では LINE-1, H19 および PEG3 が濃度依存的にメチル化はわずかに亢進していた。

#### 3.2. 遅発性効果試験の検討

ヒト未分化幹細胞(TS細胞)に化学物質(HHCB, MP, HQ) を血液濃度を参考に 100 倍濃度までの単独で 5 段階希 釈法により培養した。TS細胞は、3日目、7日目、14日目、 21日目に回収し、ゲノム DNA を抽出した。細胞形態学 的特性と5種類のインプリンティングを受ける遺伝子のア レル特異的メチル化領域 (H19, PEG3, MEST, C19MC, IG-DMR) を対象としたエピゲノム (DNAメチル化) の定量 解析を行い、TST法による細胞毒性評価の有用性につい て検討した。基準値の100倍濃度の化学物質の添加では、 顕微鏡学的に細胞形態の変化や増殖能に著しい変化はみら れなかった。DNAメチル化の定量解析では、血中濃度お よび10倍濃度で培養の期間に関わらず、インプリント遺 伝子に顕著な変化はみられなかった。しかし、血中濃度の 100 倍濃度のHHCBを添加した場合には、培養期間が長 期に及ぶとIG-DMRのメチル化が低下することが確認さ れた(図5)。



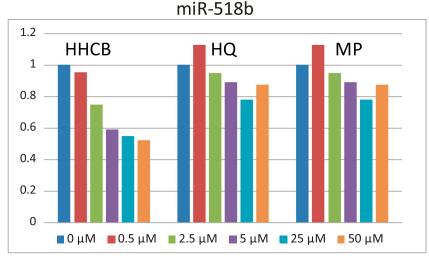


図 4 遺伝子発現解析 一部のインプリント遺伝子の発現は濃度依存的な変化を示す。

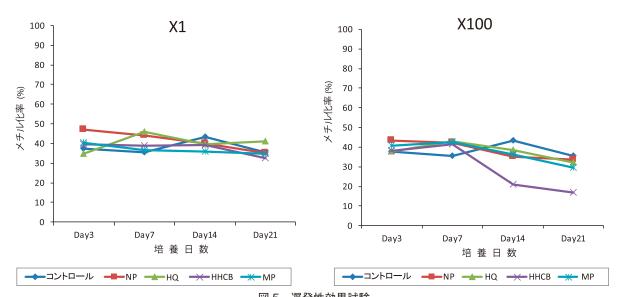


図 5 遅発性効果試験 血中濃度の 100 倍濃度のハイドロキノン (HQ) を添加した場合には、 培養期間が長期に及ぶと IG-DMR のメチル化が低下することが確認さ れた。

# 4. 考察

最近の毒性評価試験では、動物実験の代替法として、in vitro発生毒性試験法が求められている。本研究では、分化誘導型ヒト胎盤幹 (TS) 細胞を用い、単一な化学物質ばく露ではなく、低濃度でも長期間および複合ばく露による細胞毒性について、様々な異常に対する毒性評価法を確立することを目的とし、TST法のプロトタイプを開発した。特に、エピゲノム変異検出系は、低用量でも残留性、遅発性の有害事象の指標として、有用な子宮内環境評価法となる可能性がある。

急性、遅発性効果試験のメチル化の変化の結果のまとめを表1に示す。化学物質ばく露における急性、遅発性効果について、インプリント遺伝子のメチル化に変化がみられたことから、本法の有用性について確認することができた。しかし、複数の細胞での確認や、複合ばく露の影響については、さらなる検討を行う必要がある。TST法は、細胞を分化誘導することで異常が生じる過程を培養下に詳細に観察し、評価することが可能であるため、動物実験代換システムとして、医薬品、食品、化粧品開発においての毒性評価に大変有用であると期待される。

国内の新有効成分含有医薬品の承認数は、2005年で17 件であり、1994年のピーク時から半分以下に減少してい る。一方、研究開発費は1990年以降、年々上昇しており、 2005年は、1990年時の2.5倍の約9.000億円に達してい る (日本製薬工業協会 DATE BOOK 2007)。これは、臨 床段階における安全性や優位性の評価が問題となることが 原因といわれており、世界的にも同様の傾向を示している。 この問題を解決するためには、化学物質の安全性、有効性 を早期に確認することが重要であり、臨床試験の前段階と なる非臨床試験の結果により、薬剤の安全性が十分に確 保される必要がある。非臨床において、ヒトTS細胞を用 いた評価を行うことで、動物実験や従来のマウスES細胞 の試験 4,5) とは異なり、種による薬物反応の違いを解消し、 より生体内の反応を反映した検査を行うことが可能となる。 また、ヒトES細胞など、ヒト由来細胞を使用する場合は、 入手の難しさや倫理的問題が想定されるが、通常分娩後に 廃棄される胎盤より作り出されるTS細胞の場合は、これ らの問題が解消され、短時間で測定が可能となることから コスト面でも有用である。

医新有効成分医薬品の場合、毒性試験は(1)単回投与毒性試験、(2) 反復投与毒性試験、(3)遺伝毒性、(4)生殖発生毒性試験を実施することが求められる。1 つの開発品におけるこれらの毒性試験に要する費用は、最低でも10億円といわれている(平成16年度~平成17年度調査報告「ヒト等の細胞を使った化学物質の影響評価試験手法の現状と課題に関する調査(バイオ分野)」)。国内で臨床開発が進めら

表1 化学物質による DNA メチル化への影響

	血中濃度	急性試験効果	遅発性試験効果	
	<b>皿</b> 中	7	14	21
HHCB	1.9 ppb	$\rightarrow$	<b>A</b>	<b>A</b>
HQ	2.9 ng/ml	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$
MP	0.29 ng/ml	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$

三角(▲)は、メチル化の変化(15%以下)を示す。

れている開発品品目数は2004年度末で576品目(医薬産業政策研究所ニュースNo.19 2006年)であることから、年間5000億円以上の市場が見込まれる。加えて、動物福祉の観点からも現行の動物実験に代わるシステムの実用化が求められている。2007年時点で、動物実験代替システムの市場は6億円(日経バイオ年鑑2007年)と見積もられているが、今後急速な伸長が見込まれている。したがって、本研究開発により、TST法を用いた有用な毒性試験システムを構築することで、新有効成分含有医薬品の承認にかかる費用や期間が削減できることに加え、動物代替システムとして広く利用可能であり、今後、様々な研究の発展への貢献が期待できる。

# 5. 総 括

ヒト未分化胎盤幹細胞は、低用量でばく露された有害物質の影響を検出するための、新たな薬物毒性評価法の細胞源を提供する。同時に、ヒト疾患との関連性を解明していく上でも有用であると考えられる。さらに、エピゲノム変異は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動や発達障害(自閉症、ADHD等)にも影響を与えるため、TST法は、疾患の発症予防のための国際基準に適合する重要な解析法となりうる。今後はさらなる性能評価を行うとともに、EST法との比較を行う。また、可能であれば機能未知の化学物質についてもTST法による評価を加えていく。

ヒト胎盤幹細胞を用いたエピゲノム変異検出系による化学物質毒性評価法は、多様な非特定化学物質の影響を単一細胞の分化・形態変化および遺伝子修飾機構として鋭敏に反映するため、短時間かつ容易に解析が可能な信頼性の高い試験法と期待できる。また、単に個別物質の安全性評価を行うものではなく、低用量でかつ長期間ばく露された有害物質や複合ばく露汚染などの影響も検出可能な、体系的、統合的な胎児・胎盤の評価手法となる可能性が高い。今後、妊娠中の様々な基礎化粧品や植物オイルなどが胎児に及ぼす影響についても、応用することが可能となると考える。

#### (引用文献)

1) Eisenhardt S et al. Nitromusk compounds in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environ* 

Res. 87: 123-130.2001.

- 2) Kalfa N et al. Is Hypospadias Associated with Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors? A French Collaborative Controlled Study of a Cohort of 300 Consecutive Children Without Genetic Defect. *Eur Urol.* 68 (6): 1023–30. 2015
- 3) Okae H et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 22 (1): 50-63. 2018.
- 4) Buesen R et al. Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview. *ALTEX*. 21(1): 15–22. 2004.
- 5) Genschow E, et al. Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim.* 32 (3): 209-44. 2004.