

. 統括研究報告書

ヒト未分化胎盤幹（TS）細胞を用いた新規細胞評価システムの開発

課題番号：H29-食品-若手-011

主任研究者：岡江 寛明（東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野・助教）

研究要旨

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、単一の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する。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子宮内環境評価法となる可能性がある。

本研究では、新規細胞毒性試験（TST）法を確立させることを目的とする。初年度は、ヒト未分化幹細胞（TS細胞）に化学物質（BPA, PAE (DEHP, MEHP), NP）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液（フェノールレッド非添加、無血清培地）に添加し、ガラス製培養ディッシュにて培養した。細胞は3日目、7日目、14日目、21日目に回収し、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法の有用性について検討した。前述の濃度では、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。また、DNAメチル化の定量解析でも顕著な変化はみられなかった。しかし、血中濃度の100倍濃度のフタル酸エステル（DEHP）を添加し、長期の培養の場合、IG-DMR遺伝子のメチル化が急激に低下することが確認された。化学物質暴露における急性、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見られたことから、本法の有用性が一部確認された。しかし、複数の細胞での確認の必要性や遅発性効果に関しては、細胞培養によるメチル化の変化や細胞特性の変化について、考慮する必要がある。また、今後低用量の複合曝露について考慮する必要性を認識した。

研究分担者

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

助教 樋浦 仁

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

技術補佐員 宮内 尚子

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

技術補佐員 北村 茜

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

教授 有馬 隆博

A. 研究目的

妊娠中あるいは周産期の異常によって引き起こされる小児疾患（注意欠陥・多動症候群（ADHD）、学習障害（LD）、自閉症、先天奇形等）は近年増加傾向にあり、内分泌かく乱物質、重金属、残留農薬などの環境汚染を原因とする説もあるが、その因果関係は未だ明らかではない。そのため、化学物質に対して脆弱な胎児に対し、個々の化学物質だけでなく、低用量でも長期間あるいは複合ばく露に対し厳密な毒性評価法が必須である。最近の毒性評価試験では、動物実験の代替法として、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）が用いられ、その有用性が報告されている。この EST 法は、ES 細胞の分化障害を指標とした *in vitro* 発生毒性試験法で、ヨーロッパの研究機関（ECVAM）にてバリデーションテストが終了し、高い相関性や再現性が認められている。しかし、本法は、必ずしもヒトに適用出来ない場合がある。ヒト由来 ES 細胞も期待されるが、細胞の入手方法や倫理的問題など課題も多い。

一方、ヒト胎盤は子宮内環境を評価できる有用な材料で、通常分娩後には破棄され、入手に伴う倫理的問題、量的問題も少ない。申請者は、世界で初めてヒト TS 細胞の樹立に成功した（Cell Stem Cell 2018, 特願 2015-47236 東北大学）。この TS 細胞は、長期間（70 代以上）未分化状態を維持することが可能な胎盤栄養膜細胞で、容易に分化誘導することができる。また、この TS 細胞は未分化状態で低メチル化状態を維持するエピゲノム特性を有することを明らかにした。

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子宮内環境評価法となる可能性がある。しかし、毒性プロフィールとして直接評価できるか明白ではない。本研究では、分化誘導型ヒト TS 細胞を用い、単一の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する。

B. 研究方法

(1) 新規細胞毒性試験 (TST 法) のバイオアッセイ系の確立

- 化学物質**：既に食品摂取により、毒性濃度が明らかかな物質で評価する。
標準品：BPA、PAE (DEHP, MEHP) および NP
標準溶液：各標準品 20 mg を精秤し、エタノール溶液に溶解、標準原液を調整。
- 未分化幹細胞**：使用する細胞株：正常ヒト胎盤幹細胞 (HTS 細胞) (添付図 1)。対照として、ヒト乳癌細胞株 (MCF7) とヒト胎児肺腺維芽細胞株 (IMR-90) を用いる。
- 細胞へのばく露濃度**：EST 法の毒性基準臍帯血濃度 (エコチル調査) を参考に、5 段階希釈法を用い、化学物質を複数添加し、7-21 日間長期培養。さらに化学物質の組み合わせにより複合ばく露について検討する。
- 培養条件**：ガラス製培養ディッシュで検討する。37 °C、5% CO₂ 条件下で実施。
- 培養液の調整**：培養液は血清無添加で、増殖因子は必要最小限とする。
- バイオアッセイ系の検討**：
 - (A) 細胞増殖能：50 % 毒性発現濃度データ (IC₅₀) をもとに、バイオアッセイ系の毒性値を比較し、測定感度を比較する。
 - (B) 細胞分化能：10 視野の巨細胞の出現細胞数を測定する。
 - (C) DNA 合成能：細胞増殖時の新たに合成される DNA への BrdU 取り込みを定量する。
 - (D) アポトーシス：ApoAlert Annexin V アッセイ (タカラ) を用いて測定。アポトーシスを非常に初期の段階で効率良く検出することが可能である。
 - (E) 代謝関連遺伝子発現と SNP 解析：薬物代謝活性を *in vitro* で再現させる薬物代謝酵素 (CYP) 遺伝子群の発現量を半定量 PCR 法で解析。

(F) 標的遺伝子領域の DNA メチル化の変異：解析するインプリント遺伝子は 5 種類 (H19, PEG3, MEST, C19MC, IG-DMR) で、DNA メチル化について定量解析した。DNA メチル化の解析は、COBRA 法とシーケンス法を用いて、5 つのヒトインプリント遺伝子のアレル特異的メチル化領域 (DMRs) で行われた。各細胞 DNA サンプルは、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) によりバイサルファイト処理され、PCR が行われた。PCR 反応液は、各 0.5μM プライマー、200μM dNTPs、1x PCR バッファーが、1.25U の EX Taq Hot Start DNA Polymerase (TaKaRa Bio) を含む、20 マイクロリットルの用量に調整された。シーケンスの結果が、クローニングによるバイアスの影響がないことを確認するために、DNA で制限酵素処理解析 (COBRA) が行われた。制限酵素処理によりメチル化しているテンプレート DNA (バイサルファイト処理済み) のみが切断された。制限酵素反応後、2.5-3% アガロースゲルで電気泳動した。制限酵素で切断された断片はメチル化、切断されなかった断片はメチル化していないテンプレートであることを示す。各遺伝子でのメチル化の割合は Agilent 2200 TapeStation と TapeStation Analysis Software (Agilent technologies) で定量化された。そして、制限酵素認識部位における各々のゲノムサンプルのメチル化のパーセンテージは、酵素で切断された PCR 産物量と PCR 産物総量との比率から計算された。確認のために一部サンプルは、PCR 産物を pGEM-T ベクター (Promega) によりクローニングされた。そして各クローンは M13 Reverse プライマーとオートメーション化した ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) を用いてシーケンスされた。約 20 クローンずつがシーケンスされた。これらの実験は 2 つ以上の異なる DNA サンプル (バイサルファイト処理) を用いて行われ、そして 3 回以上の独立した PCR 実験により解析された。

(2) EST 法との比較及び評価

TST 法により得られた結果と化学物質濃度との相関について、EST 法の結果と比較検証する。また、培養細胞内の化学物質濃度とエピゲノム解析結果を踏まえ、一部はモデル動物実験系で詳細な検討する。研究実施者の主観が入らないように、生物統計を専門とする研究者に依頼し、結果にばらつきが見られた場合はバイオアッセイ系を再評価する。

(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、実施する。胎盤幹細胞は、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する。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う。つまり、臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作製されたものについては保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管する。

C. 研究結果

(1) 化学物質単独投与

ヒト未分化幹細胞(TS細胞)に化学物質(BPA, DAE (DEHP, MEHP), NP)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液(フェノールレッド非添加、無血清培地)に添加し、ガラス製培養ディッシュにて培養した。細胞は3日目、7日目、14日目、21日目に回収し、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(図1)。しかし、血中濃度の100倍濃度のフタル酸エステル(DEHP)を添加した場合には、培養期間が長期に及ぶとIG-DMR遺伝子のメチル化が低下することが確認された(図2)。

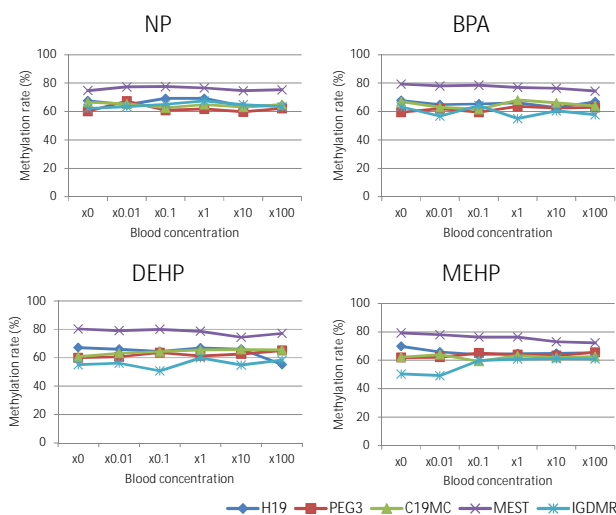


図1. 急性効果試験(3日間)

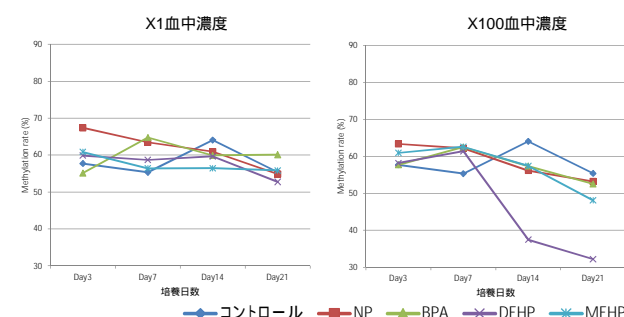


図2. 遅発性効果試験(IG-DMR 遺伝子)

D. 考察

今年度は、およそ80%の目標達成がされた。急性、遅発性効果試験の結果のまとめを以下に示す(表1)。化学物質暴露における急性、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見られたことから、本法の有用性が一部確認された。しかし、複数の細胞での確認の必要性や遅発性効果に関しては、細胞培養によるメチル化の変化や細胞特性の変化について、検討する必要があると考えられた。また、低用量の場合においても複合暴露に関して考慮しなければならないと考えられた。

血中濃度	急性試験効果			遅発性試験効果		
	X1	X10	X100	7	14	21
NP 2.9 ng/ml	→	→	→	→	→	→
BPA 0.29 ng/ml	→	→	→	→	→	→
DEHP 1.9 ppb	→	→	→	→		
MEHP 1.9 ppb	→	→	→	→	→	→

表 1. 化学物質による DNA メチル化への影響

ピンクの三角 (▲) は、メチル化の変化 (15%以下) を示す。赤の三角 (▲) は、大きなメチル化の変化 (15%以上) を示す。

E. 結論

ヒト未分化胎盤幹細胞は、新たな薬物毒性評価法の細胞源を提供し、低用量で曝露された有害物質の影響を検出し、同時にヒト疾患との関連性を解明していくことが可能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、性格異常 (自閉症、多動児、アレルギー等) にも影響を与えるため、今後疾患予防のための国際基準に通用する重要な解析法となりうる。次年度はさらなる性能評価を行い、さらに EST 法との比較を行う。可能であれば未知の化学物質についても TST 法の評価を加える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, Kabayama Y, Suyama M, Sasaki H, Arima T. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 22(1):50-63. 2018.
- Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima, Hashiyada Y, Kaneda M, Kan S, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. *Scientific Reports*. 7(1):6815. 2017.
- Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Okae H, Chiba

H, Miyauchi N, Kitamura A, Kikuchi H, Yoshida H, Arima T. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from frozen-thawed blastocyst transfer. *Clinical Epigenetics*. 9:79. 2017.

- Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Arima T. Therapeutic approaches to imprinting diseases. *Epigenetics in Human Disease*, Second Edition. Elsevier. in press. 2018
- 濱田裕貴, 岡江寛明, 有馬隆博. インプリントング疾患の解析と診断. 産科と婦人科. 診断と治療社. 84(1): 64-68, 2017.12.
- Miyauchi N, Kitamura A, Hiura H, Okae H, Kobayashi N, Hattori H, Takahashi S, Arima T. Epigenetic Alterations in Human Sperm. *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*. Springer. 1-16. 2017.6.

2. 学会発表

- Arima T, Okae H. IHEC Science Days & Annual Meeting 2017 「Derivation of Human Trophoblast Stem Cells from Blastocysts and Villous Cytotrophoblast Cells」 Berlin, Germany. 13/10/2017.
- 岡江寛明. 京大医学部セミナー 「Trophoblast stem cells from human placenta」 京都. 9/4/2017
- 岡江寛明, 有馬隆博. 第 25 回日本胎盤学会学術集会、「ヒト胎盤栄養膜幹細胞の樹立とエピゲノム特性」長崎. 11/15/2017

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

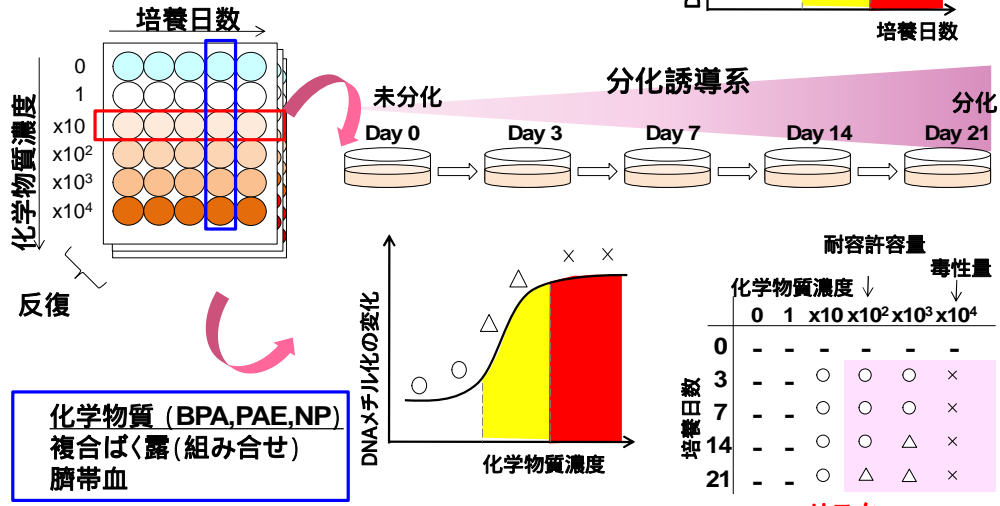
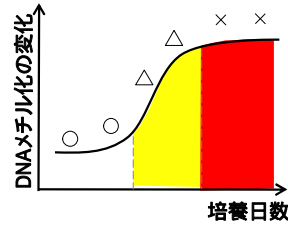
特になし

3. その他

特になし

- 細胞：TS細胞
細胞培養条件：
- ・血液濃度を参考に5段階希釈法により化学物質を添加
 - ・無血清培地を使用する
 - ・ガラス製培養ディッシュを使用する
 - ・21日間まで培養する
 - ・フィダー細胞は使用しない
 - ・37℃、5%CO₂

低濃度で長期ばく露の検討



添付図 1. 研究の概要 (TST 法)