

ヒトES細胞からの網膜色素上皮細胞(RPE)作製、及び *in vitro* 光毒性試験法への応用



住友化学株式会社 生物環境科学研究所

中 野 徳 重
小 林 諒 太

はじめに

化学物質の中には、光エネルギーの吸収によって反応性の高い化合物に変化するものや、生体に悪影響を及ぼす活性酸素の放出を促すものがある。このような化学物質が人の体内に取り込まれた後に太陽光を浴びると、皮膚炎などの光刺激性や光アレルギー性といった毒性症状を示すことが知られている。更に、このような毒性を有する化学物質の中には、光発がん性や光遺伝毒性（化学物質と光の複合暴露によって誘発される発がんや不可逆的な遺伝子変異）といった重篤な毒性を示すものもあり、光毒性ポテンシャル（化学物質が潜在的に当該毒性を有しているかどうか）評価の重要性は年々高まってきている¹⁾。薬の服用中に日に当たった際、皮膚に日焼け様症状が生じる光線過敏症が薬剤の光毒性に因るものと判明したことに端を発し、医薬品分野では国際的な規制の枠組みの下で光毒性ポテンシャルを評価するガイダンスが制定されている²⁾。また農業化学品分野では、農薬の主要な使用場面が太陽光暴露を受ける屋外であることから、作業安全の観点から光毒性に対する懸念が高まりつつある。現時点では欧州の農薬規制においてのみ光毒性ポテンシャル評価が必須要件となっているが³⁾、今後、同要求が他地域での規制にも広がっていくことが予想される。

化学物質の光毒性ポテンシャルの有無を効率的に評価するスクリーニング試験法としては、マウス線維芽細胞由来のBalb/c 3T3細胞を用いた「*In vitro*（試験管内）3T3 NRU 光毒性試験」⁴⁾がある。光毒性ポテンシャルの評価に通常用いられる同試験は、2004年にOECD（経済協力開発機構）ガイドラインとして採択されたが、偽陽性率が高い、即ち実際の生体では光毒性を示さない化学物質を光毒性ありと誤って検出してしまう率の高いことが報告されている¹⁾。その原因として、本来Balb/c 3T3細胞は光の

当たらない条件下での培養を前提として作製された細胞のため、眼や皮膚において太陽光の悪影響に対する防御機構の役割を担うメラニン色素を全く含有していないことが考えられる。加えて、ヒト安全性を精緻に予測するという観点では、マウス細胞よりもヒト細胞を用いることが望ましい。そこで我々は、既存 *in vitro* 光毒性試験の問題点を解決するために、光照射を常に受ける眼の構成細胞に着目し、メラニン色素を豊富に含有する網膜色素上皮細胞（Retinal Pigment Epithelial Cells, 以下 RPE）をヒトES細胞（Embryonic Stem Cells）から作製し、新規な *in vitro* 光毒性試験法の開発検討を行った⁵⁾。本稿では、①ヒトES細胞からのRPE作製法の確立、②RPEの品質評価、③RPEを用いた *in vitro* 光毒性試験法の開発、について順を追って概説する。

ヒトES細胞からのRPE作製法の確立

幹細胞の一種であるES細胞は、試験管内で様々な種類の細胞へと変化させることができる。各種の化合物やサイトカインといったタンパク質などを幹細胞に作用させることによって目的の細胞を作製する技術は分化誘導と称され、再生医療や化合物評価に有用な細胞を作製する上での基盤技術となっている。我々は、ヒトES細胞から試験に必要なRPEを効率よく作製する分化誘導法の確立に取り組んだ。

近年、幹細胞培養技術の発展によって、ヒトES/iPS細胞から立体的な網膜組織を作製することが可能になった。当社において上記分化誘導法を基に各種条件を検討したところ、最初に骨形成タンパク質4（BMP4）というサイトカインを用いて立体的な網膜組織を作製後、胚発生とガンに関連するタンパク質のネットワークであるWntシグナル伝達経路を活性化させる低分子化合物（GSK3阻害剤）を作用させることにより、RPEからなる細胞塊を大量に作製できる

ことを見出した (Fig. 1 (a), (b))。さらに上記細胞塊を細かく分散後、細胞接着タンパク質の活性部位の部分構造を有した合成高分子でコートした培養ディッシュ上で二次元培養することで、RPEを効率的かつ大量に作製することに成功した (Fig. 1 (b), (c))。同細胞は凍結保存が可能であり、大量に作製した同一

ロットのRPEを必要に応じて解凍し、試験に用いることが出来るようになった。

ヒトES細胞由来RPEの品質評価

作製したヒトES細胞由来RPEを、細胞生物学および分子生物学的手法により解析した。目視及び光学顕微

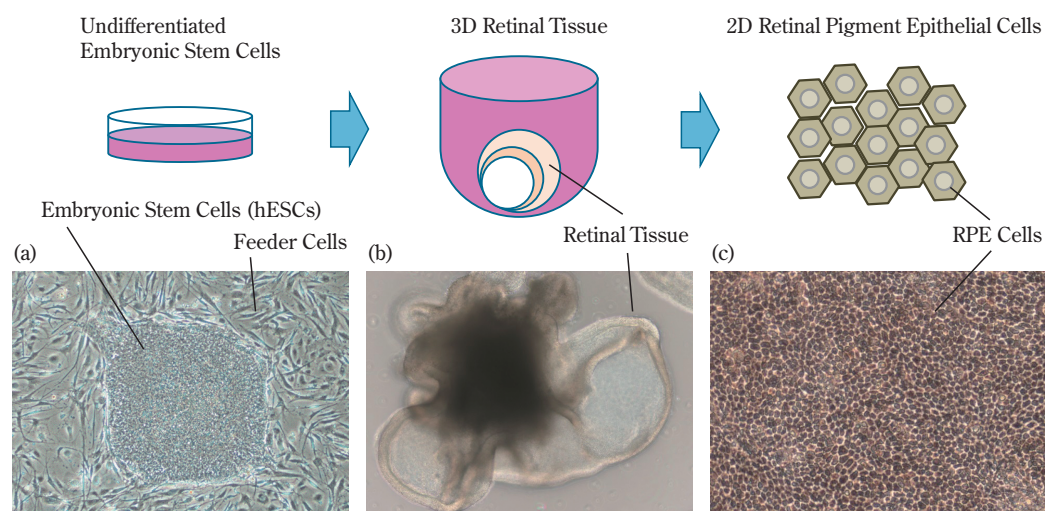


Fig. 1 Schema of Retinal Pigment Epithelial Cells (RPE) production from human Embryonic Stem Cells (hESCs) Microscopic image of (a) undifferentiated Human Embryonic Stem Cells, (b) hESC-derived 3D Retinal Tissue and (c) hESC-derived RPE.

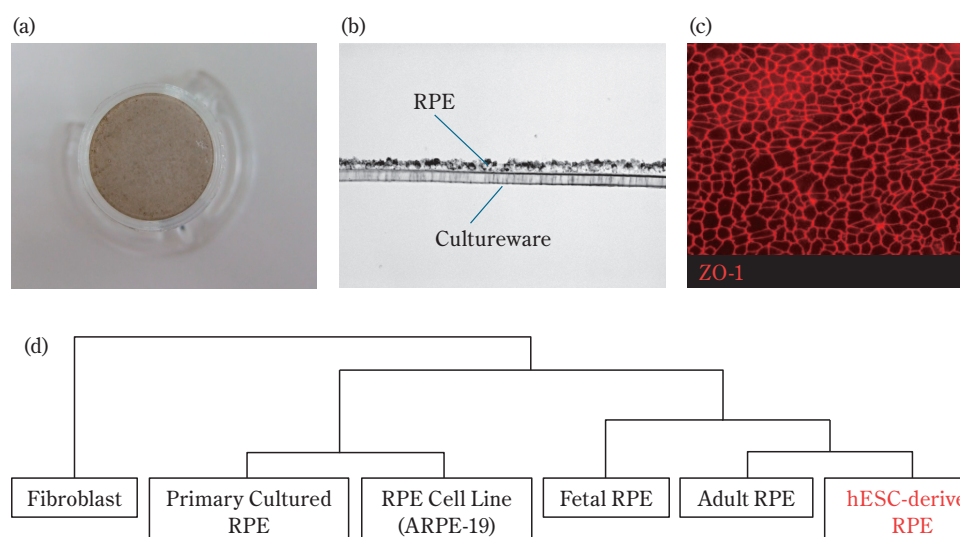


Fig. 2 hESC-derived cells showed the features of RPE.
(a) Macroscopic image of hESC-derived RPE
(b) Cross section of hESC-derived RPE on cultureware
(c) hESC-derived RPE stained with anti-ZO-1 antibody
(d) Result of Clustering analysis using RPEs-specific gene expression profiles

鏡の明視野による観察では、RPEが産生するメラニン色素が蓄積している為に培養中の細胞が黒く変化しており、加えて小さな細胞が隙間なく密集した上皮様の構造が認められた (Fig. 2 (a), (b))。細胞間の密着結合を検出する抗体 (抗ZO-1抗体) を用いて培養したヒトES細胞由来RPEに対し免疫染色を行ったところ、密着結合による細胞間接着が形成されており、RPEの特徴である密集した多角形状の細胞の形態が観察された (Fig. 2 (c))。加えて、生体のRPEとの類似性を調べるため、作製したヒトES細胞由来RPEの遺伝子発現を網羅的に解析し、階層的クラスター分析を行った。結果をFig. 2 (d)に示す。本分析では、遺伝子発現プロファイルについて、より類似性の高いものが樹形図で近くに示される。ヒトES細胞由来RPE (hESC-derived RPE) の遺伝子発現プロファイルは、線維芽細胞 (Fibroblast) やRPE由来の株化細胞 (RPE Cell Line (ARPE-19))、あるいはRPEの初代培養細胞 (Primary Cultured RPE) よりも、成人のRPE (Adult RPE) に、より近似していた。上記の結果から、今回確立したヒトES細胞由来RPEの分化誘導法によって、生体に近い高品質な細胞を作製できることが分かった。

ヒトES細胞由来RPEを用いた *in vitro* 光毒性試験法の開発

続いて、作製したヒトES細胞由来RPEを用いて *in vitro* 光毒性試験を行った。*In vitro* 光毒性試験では、化合物の存在下、擬似太陽光照射装置 (Fig. 3) を用いて細胞に一定条件の光 (可視光および紫外線 (主にUVA)) を照射し、その細胞生存率を非照射の場合と比較することで光毒性影響の有無を評価する。同手法において、より生体に近い高品質なRPEが *in vitro* 光毒性試験に適用可能かどうかを検証する為、従来の試験細胞をRPEに置き換え、既知の光毒性物質 (クロルプロマジン) を用いた *in vitro* 光毒性試験を実施した。その結果、クロルプロマジン存在下、光照射群のRPEの細胞生存率は非照射条件と比較して有意に低下し (Fig. 4)、クロルプロマジンの光毒性ポテンシャルを適正に検出できることが確認された。一方、光毒性物質ではないドデシル硫酸ナトリウムでは、光照射/非照射の細胞生存率に有意な差は認められず、光毒性ポテンシャルを有さない物質についても正しく評価できることを確認した。また、Balb/c 3T3細胞と比較してRPEはより強い光照射量

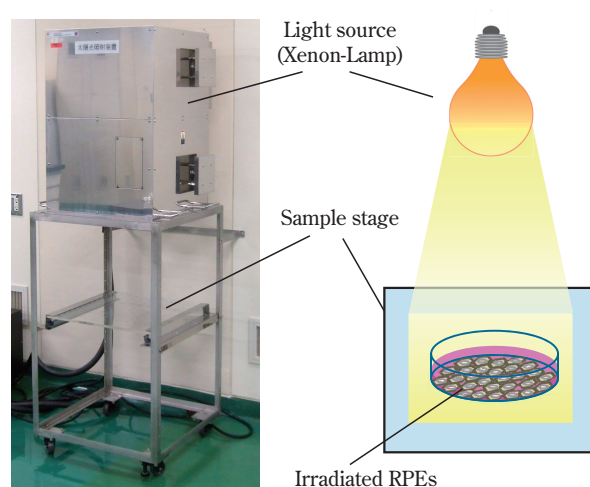


Fig. 3 Solar Simulator for phototoxicity assay

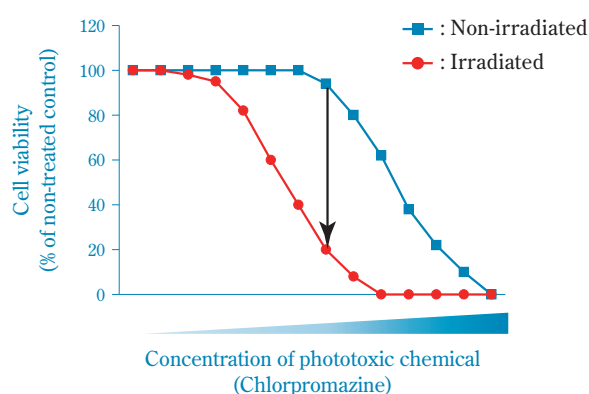


Fig. 4 hESC-derived RPEs were treated with phototoxic chemical (chlorpromazine) in the presence or absence of irradiation.

に対しても生存可能であることが確認された為、既存 *in vitro* 光毒性試験で予測不能の化合物群などにも活用できる可能性がある。

おわりに

本稿では、ヒト生体中のRPEと類似の特徴を有するヒトES細胞由来RPEの作製、品質評価、及びRPEを用いる *in vitro* 光毒性試験法の開発について概説した。本試験法はヒト正常細胞を用いた試験法であるため、生体における光毒性反応をより忠実に再現でき、精緻な光毒性ポテンシャルの評価や毒性メカニズムの考察にも有用と考えられる。加えて、本RPEは同一ロットでの大量作製が可能であることから、

多数の開発化合物を同一条件で評価することができる。従って、今後の安全性評価研究において本試験法を積極的に活用し、安全性の高い当社製品の開発に貢献してゆきたい。

引用文献

- 1) A. M. Lynch and P. Wilcox, *Exp Toxicol Pathol.*, **63**(3), 209 (2011).
- 2) ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), “S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry.” (2015).
- 3) COMMISSION REGULATION (EU), “No 283/2013 of 1 March 2013 Setting out the Data Requirements for Active Substances, in Accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market” (2013).
- 4) OECD, “Test No. 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS” (2004).
- 5) T. Mori *et al.*, *Toxicology*, **378**, 1 (2017).