

2021年度 日化協LRI研究報告会

2021年8月20日

ヒト幹細胞試験による迅速・正確・低コストの 化学物質ハザードAI評価法の開発

(研究期間: 2019年3月～2021年2月)

京都大学iPS細胞研究所

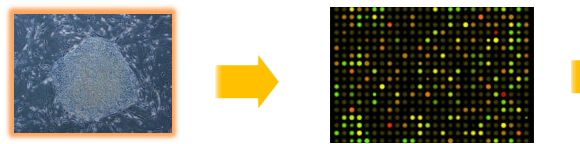
山根 順子・藤渕 航

研究の概要

Prediction of developmental chemical toxicity based on gene networks of human embryonic stem cells.

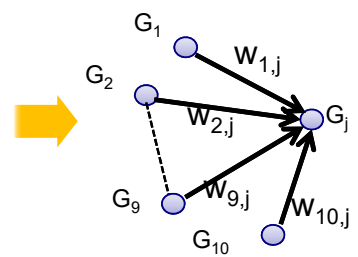
Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, Sone H, Ohsako S and Fujibuchi W.

Nucleic Acids Res. 44(12): 5515-5528, 2016.



ヒト ES細胞 → マイクロアレイ

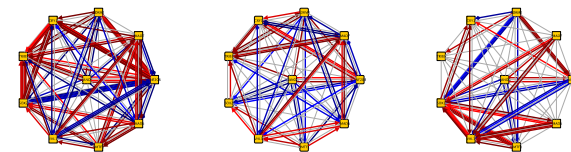
10 遺伝子 (+ b-actin)
x 5 濃度 x 4 時点
= 200 qRT-PCRs



遺伝子ネットワーク

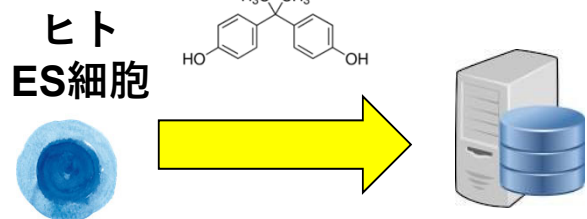
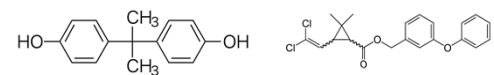
機械学習

神経毒性 (9 物質) 遺伝的発ガン性 (5 物質) 非遺伝的発ガン性 (6 物質)

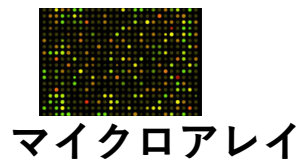


毒性カテゴリー	遺伝子ネットワークを用いた手法
神経毒性	95.0 %
遺伝的発ガン性	100 %
非遺伝的発ガン性	95.0 %

神経毒性 (9 物質) 遺伝的発ガン性 (5 物質) 非遺伝的発ガン性 (6 物質)



化合物反応遺伝子データベース



マイクロアレイ



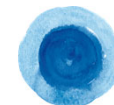
次世代シーケンサー

発達毒性物質



成人毒性物質

ヒト ES細胞



本日の内容

1. 本毒性予測系の成人毒（肝毒性物質）への適用
2. ヒトiPS細胞を用いた予測の検討

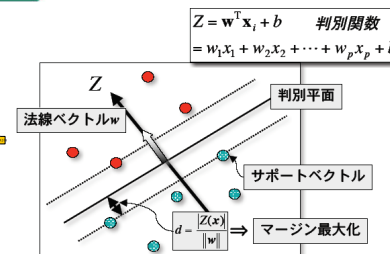
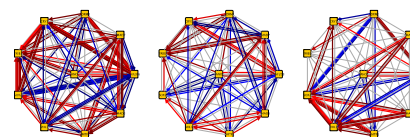
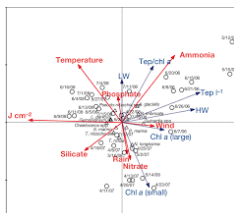
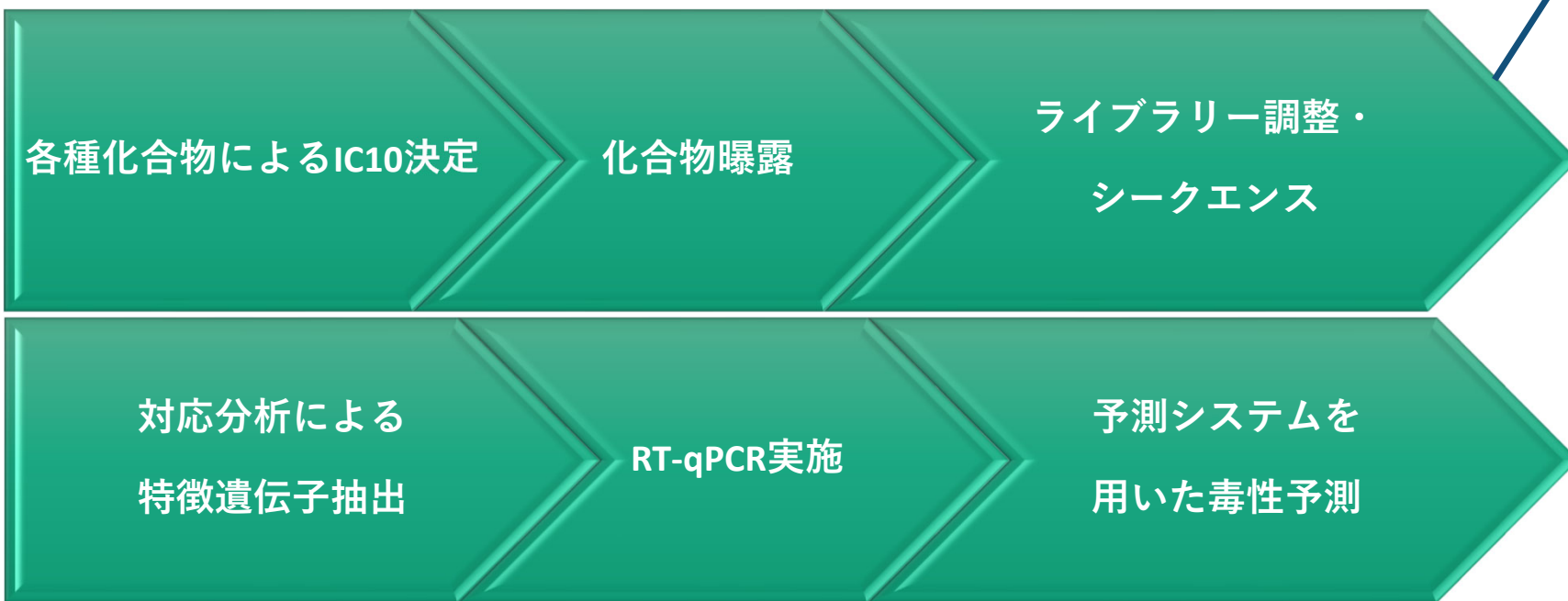
本日の内容

1. 本毒性予測系の成人毒（肝毒性物質）への適用
2. ヒトiPS細胞を用いた予測の検討

本研究のゴール: 30 物質でのRT-qPCRを用いた予測システムの開発



プロトタイプ
作成



30 物質のうち、LRI研究2年間で検討した 21 物質 一覧

LRI選定肝毒性対象物質 (10 物質)

Amiodarone	DILI:8
Cyclosporin A	DILI:7
Atorvastatin	DILI:5
Clotrimazole	DILI:3
Ibuprofen	DILI:3
Chlorpromazine	DILI:2
Aspirin	DILI:0
Chlorpheniramine	DILI:0
Carbon Tetrachloride	Group 2B
2, 4-DNT	Group 2B

我々が選別した対照物質 (11 物質)

Axitinib (腎毒性)	LiverTox (Likelihood score: E)
Pamidronate (腎毒性)	DILI:3
Gentamicin (腎毒性)	LiverTox (Likelihood score: E)
Cisplatin (腎毒性)	DILI:3
Valproic acid (神経毒性)	DILI:8
Phenytoin (神経毒性)	DILI:8
Acrylamide (神経毒性)	x
Hexanedione (神経毒性)	x
Cyclopamine (神経毒性)	x
Lithocholic acid (非遺伝的発ガン性)	x
Thioacetamide (非遺伝的発ガン性)	x



肝毒性有り



肝毒性無し



(暫定的) 肝毒性無し

肝毒性物質 10 物質のリスト・曝露濃度

肝毒性物質は日化協と合同で選定

(μM)

	DILI rank	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4	Dose 5	Dose 6	Dose 7	Dose 8	Dose 9	Dose 10
Amiodarone	DILI: 8	0.01	0.02	0.05	0.1	0.4	1.2	3.7	11.1	33.3	100
Cyclosporin A	DILI: 7	0.003	0.008	0.02	0.07	0.2	0.6	1.8	5.6	16.7	50
Atorvastatin	DILI: 5	0.001	0.002	0.005	0.01	0.04	0.12	0.37	1.1	3.3	10
Clotrimazole	DILI: 3	0.003	0.008	0.02	0.07	0.2	0.6	1.8	5.6	16.7	50
Ibuprofen	DILI: 3	0.04	1.1	3.2	9.6	28.8	86.4	259	777	2333	7000
Chlorpromazine	DILI: 2	0.02	0.05	0.1	0.4	1.2	3.7	11.1	33.3	100	300
Aspirin	DILI: 0	1	2	5	14	41	123	370	1111	3333	10000
Chlorpheniramine	DILI: 0	0.1	0.2	0.5	1.4	4.1	12.3	37	111	333	1000
Carbon Tetrachloride	Group2B	1	3	8	23	68	205	615	1844	5533	16600
2,4-DNT	Group2B	0.01	0.03	0.09	0.2	0.8	2.4	7.4	22.2	66.6	200

ATP assay: 公比3で10濃度検討 N=4で実施

MTT assay: 公比3で8濃度検討 N=4で実施

最高曝露濃度 (Dose 10) は最大可溶量を適用
溶媒は全てDMSO

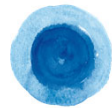
Controlとして0.01% DMSO添加

MTT/ ATP assayの実施条件

	MTT assay	ATP assay
細胞種	KhES-3細胞（男性株）	KhES-3細胞（男性株）
培地/コーティング剤	StemFit medium/ i-Matrix-511	StemFit medium/ i-Matrix-511
化合物曝露時間	24 hrs	24 hrs
Assay reagent kit	Cell Counting Kit-8 (Dojindo)	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega)
測定機器	PE Envision 2104 Multilabel Reader1 (PerkinElmer) 吸光度(450nm)測定	PE Envision 2104 Multilabel Reader1 (PerkinElmer) 発光測定
IC10決定 ソフトウェア	R package “drc” from CRAN model. LL4 (4 parameters log-logistic) $f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$ R version 3.6.3 (2020-02-29)	R package “drc” from CRAN model. LL4 (4 parameters log-logistic) $f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$ R version 3.6.3 (2020-02-29)
IC10計算式	IC10<- 1/b * log ((d-c)/(0.9-c)-1)+log (e) IC10<- exp (IC10) b<- coefficients (model. LL4) c<- coefficients (model. LL4) d<- coefficients (model. LL4) e<- coefficients (model. LL4)	IC10<- 1/b * log ((d-c)/(0.9-c)-1)+log (e) IC10<- exp (IC10) b<- coefficients (model. LL4) c<- coefficients (model. LL4) d<- coefficients (model. LL4) e<- coefficients (model. LL4)

シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析と 予測プロトタイプシステムの開発

KhES-3  



19 物質 (成人毒) : 試験物質以外

1 濃度 (1/4 IC10),
2 時点 (24, 48h)

ライブラリー調整



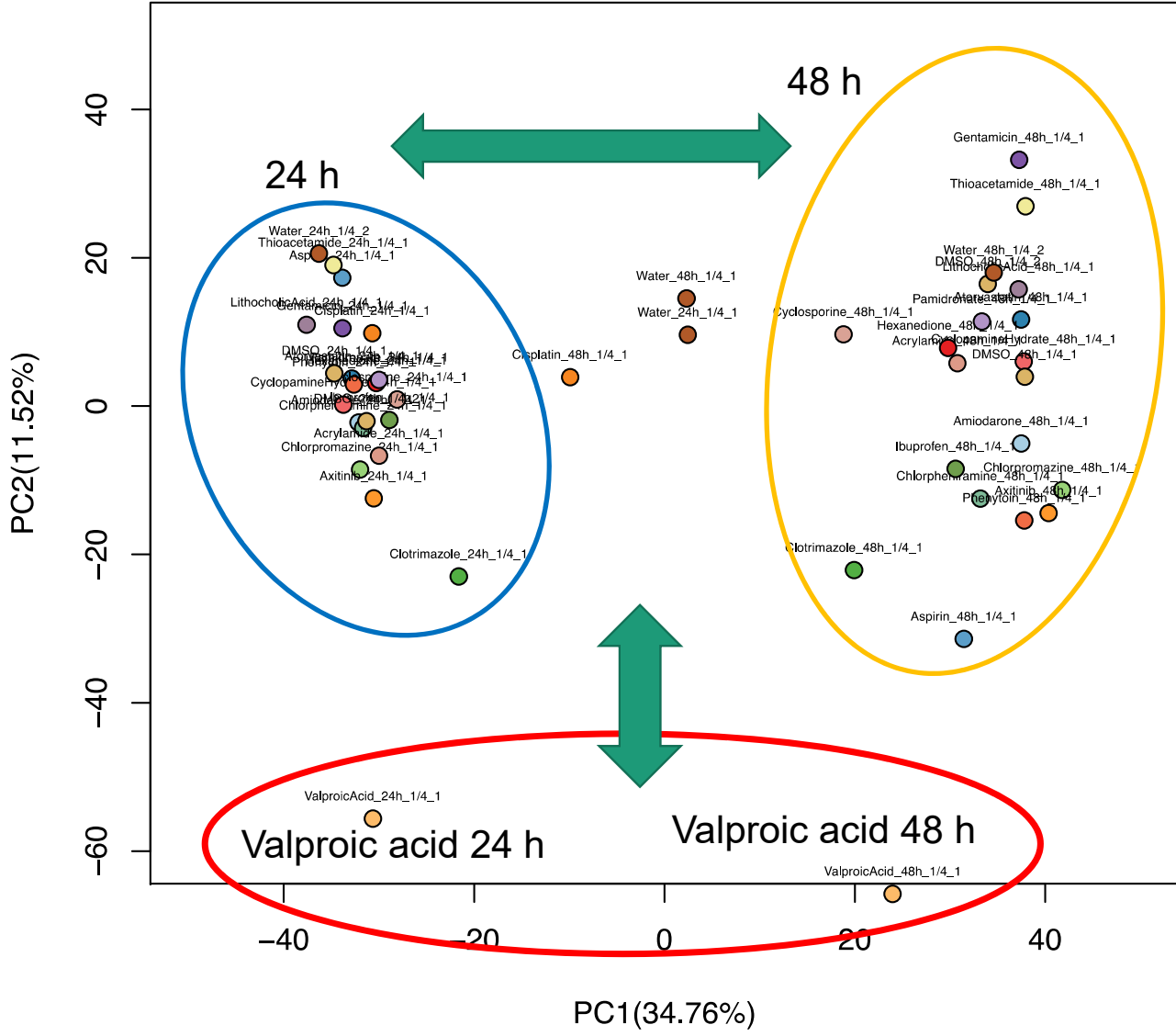
シーケンス (NextSeq500)



&

2,993 genes (転写因子) を解析に使用

転写因子 2,993 遺伝子によるPCA 解析



- Amiodarone
- Aspirin
- Atorvastatin
- Chlorpheniramine
- Chlorpromazine
- Clotrimazole
- Ibuprofen
- Acrylamide
- CyclopamineHydrate
- Hexanedione
- Phenytoin
- ValproicAcid
- Axitinib
- Cisplatin
- Cyclosporine
- AcrylamideHydrate
- Pamidronate
- Gentamicin
- LithocholicAcid
- Thioacetamide
- DMSO
- Water

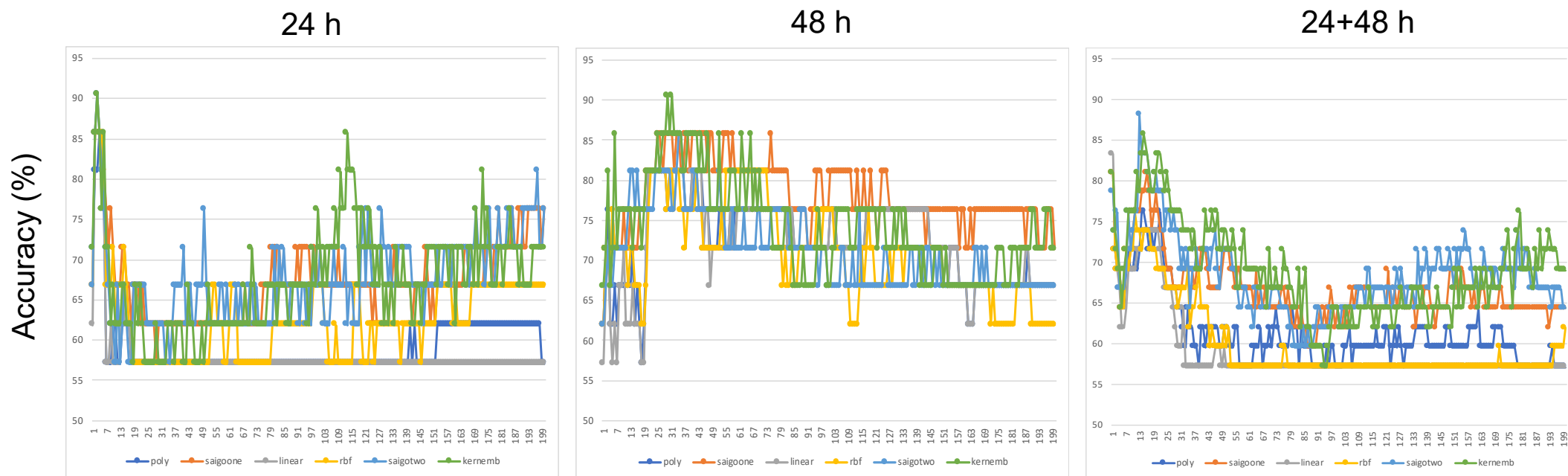
Valproic acid は他の化合物とは異なる遺伝子発現パターンを示す。

ただし、遺伝子発現パターンのみで肝毒性の有無を判断する事は困難である。



機械学習が必要

2,993 転写因子を用いたSVMによる19 物質の肝毒性LOCOP予測



入力データ	Accuracy (%)
24 h	90.5
48 h	90.5
24+48 h	88.1

肝毒性予測の精度が時間毎データの方が良かった。

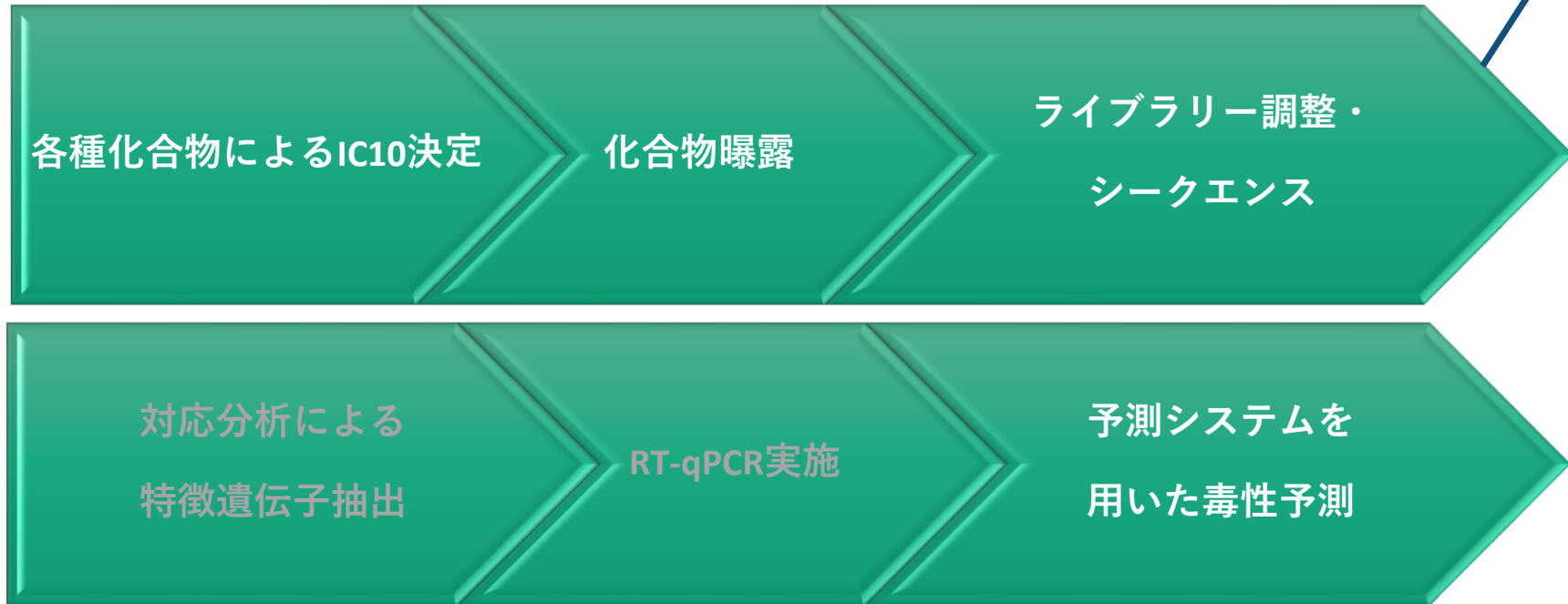
↓ 今後の改善点

- ・ 時間軸の影響を排除することによる精度の向上
- ・ 特徴遺伝子の抽出、遺伝子ネットワーク構築で改善

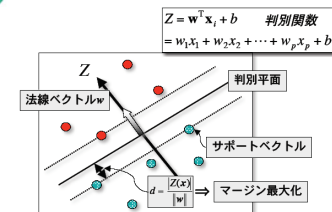
19 物質でのNGSを用いた予測システム



プロトタイプ
作成



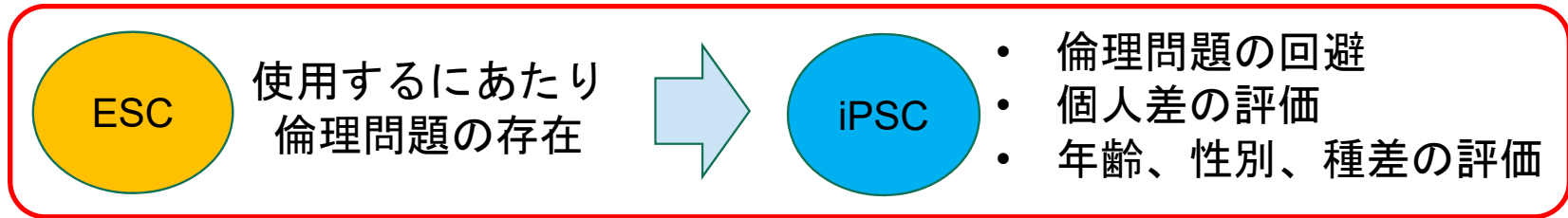
今回は19 物質でのNGSを用いた予測システムのプロトタイプ作成までで終了。



本日の内容

1. 本毒性予測系の成人毒（肝毒性物質）への適用
2. ヒトiPS細胞を用いた予測の検討

ヒトESCからiPSCへの移行の取り組み



	ESC IC ₁₀ (nM)	iPSC IC ₁₀ (nM)	iPSC/ESC IC ₁₀
腎毒1	50	10	0.2
腎毒2	30	100	26
腎毒3	5x10 ³	1x10 ³	0.2
腎毒4	15	200	13.3
腎毒5	1.5x10 ⁶	1x10 ⁶	0.67
神経毒1	2x10 ³	3x10 ⁴	15
神経毒2	2x10 ³	5x10 ³	2.5
神経毒3	2x10 ³	3x10 ³	1.5
神経毒4	1x10 ⁴	1.5x10 ⁵	15
神経毒5	2x10 ³	2x10 ⁵	100

ESC: KhES-3

iPSC: アジア人女性、単球由来

ESCとiPSCでは化合物に対する細胞反応の差が存在



iPSCをESCのような高感受性に近づけられないか？

完全なiPS細胞のリプログラミングのためのナイーブ化手法の検討

	Primed	Naïve
多能性状態	着床後	着床前
形態	Flat型	Dome型
維持に必要な supplement	bFGF, TGF-beta	LIF, 4or 5 inhibitors/ Activin
維持コンディション	Non-hypoxia	Hypoxia

5i/LAF (Theunissen 2014)	i2iLGoY (Takashima 2014)	XAV939 (Zambidis 2016)	YAP signal (Qin 2016)	5i/LAF (Theunissen 2014)	i2iLGoY (Takashima 2014)	XAV939 (Zambidis 2016)	YAP signal (Qin 2016)
1	2	3	4	5	6	7	8
DMEM/F12:N2 B27 + 0.5% KSR 1% NEAA, 1mM GlutaMax 0.2 mM B-mercaptoethanol	DMEM/F12:N2 B27 + 0.5% KSR 1% NEAA, 1mM GlutaMax 0.2 mM B-mercaptoethanol	DMEM/F12 + 20% KSR 1% NEAA, 1mM GlutaMax 0.2 mM B-mercaptoethanol	DMEM/F12:N2 B27 + 1% NEAA, 1mM GlutaMax 0.2 mM B-mercaptoethanol	TeSR – E8	TeSR – E8	TeSR – E8	TeSR – E8
10 ng/mL FGF	10 ng/mL FGF	10 ng/mL FGF		10 ng/mL FGF	10 ng/mL FGF	10 ng/mL FGF	
50 µg/mL BSA	50 µg/mL BSA			50 µg/mL BSA	50 µg/mL BSA		
10 µM Y-27632	10 µM Y-27632	10 µM Y-27632	10 µM Y-27632	10 µM Y-27632	10 µM Y-27632	10 µM Y-27632	10 µM Y-27632
10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF	10 ng/mL LIF
0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901	0.5-1 µM PD0325901
	1 µM CHIR 99021	3 µM CHIR 99021	3 µM CHIR 99021		1 µM CHIR 99021	3 µM CHIR 99021	3 µM CHIR 99021
20 ng/mL Activin A	50 µg/mL Ascorbic acid	10 µM Forskolin	10 µM Forskolin	20 ng/mL Activin A	50 µg/mL Ascorbic acid	10 µM Forskolin	10 µM Forskolin
0.5 µM IM-12				0.5 µM IM-12			
0.5 µM SB590885	2.5 µM Go6983	4 µM XAV939	10 µM LPA	0.5 µM SB590885	2.5 µM Go6983	4 µM XAV939	10 µM LPA
1 µM WH-4-023		2 µM Purmorphamine		1 µM WH-4-023		2 µM Purmorphamine	

Takashima et al. を一部改変

ヒト多能性幹細胞のナイーブ化状態の安定維持には
フィーダー細胞（マウス）が必要



フィーダー細胞を用いないナイーブ誘導を既報の
4手法から更に改良し、検討

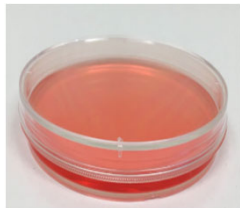


改良YAP法を暫定的に使用

EOS システムを用いたナীব化マーカー細胞の構築

EOS: Early transposon, Oct-4, Sox2

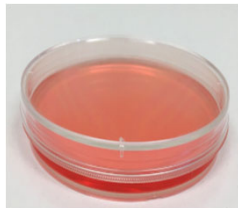
Seed cells in at least 3cm dish



Day 1



Transfection*

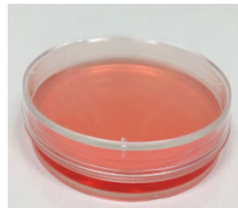


Day 2

*Extremely important to have high efficiency



Puromycin selection**

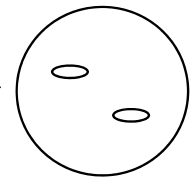


Days 3-6

** Will explain separately



Normally only 2-3 cells remain

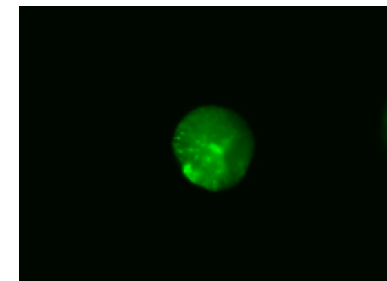


Grow for 7 days

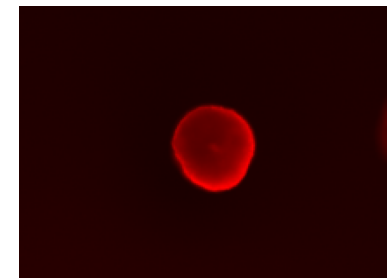
Colony



ナীব化マーカーでの発現確認

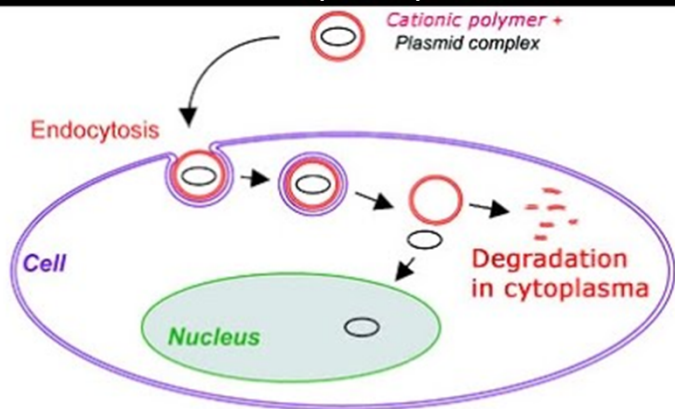


EOS GFP

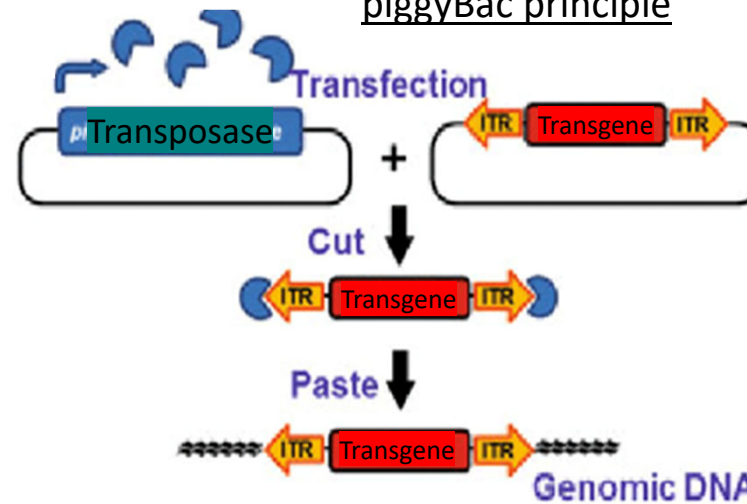


SUSD2

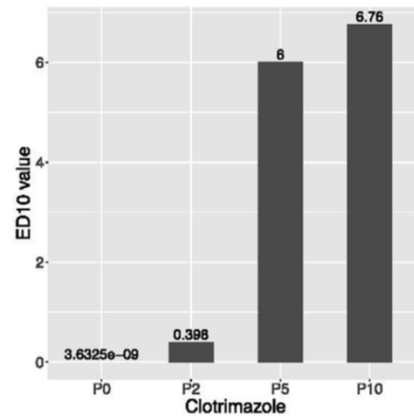
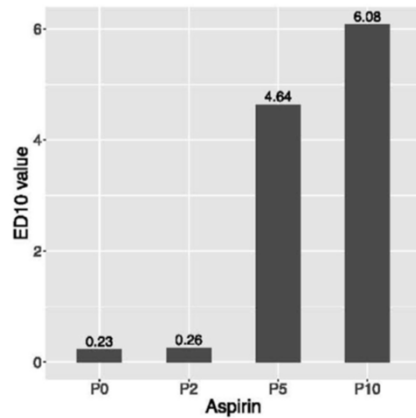
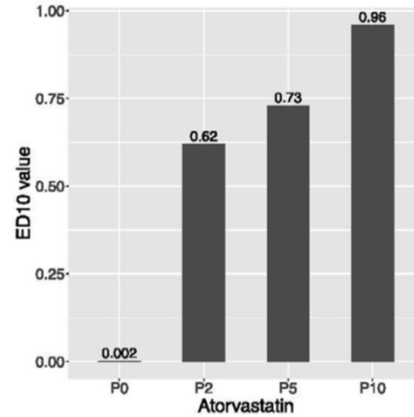
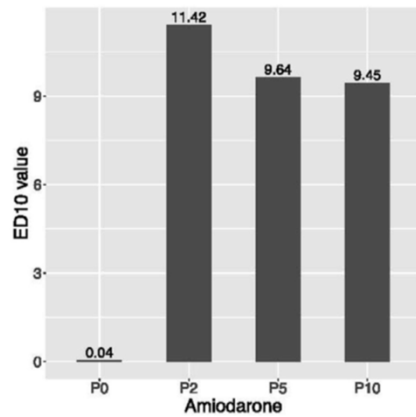
Transfection principle



piggyBac principle



ナイーブ状態誘導による多能性幹細胞の薬剤感受性の変化



ナイーブ状態誘導によりいずれの化合物も顕著に感受性が上昇

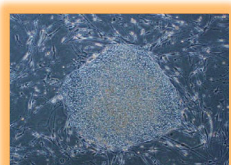


5継代程度で誘導前のRIKEN-2Aとほぼ同等の薬剤感受性となった。

	RIKEN-2A-EOS-YAP	RIKEN-2A-EOS-YAP P2	RIKEN-2A-EOS-YAP P5	RIKEN-2A-EOS-YAP P10
Amiodarone, μM	0.04	11.42	9.64	9.45
Atorvastatin, μM	0.002	0.62	0.73	0.96
Aspirin, mM	0.23	0.26	4.64	6.08
Clotrimazole, μM	3.63E-09	0.40	6.00	6.76

将来の展望

1)



ヒトES細胞

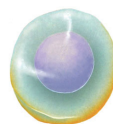


ヒトES細胞での曝露 遺伝子発現データベース

- ・肝毒性
- ・腎毒性
- ・神経毒性
- ・心毒性
- ・非遺伝的発ガン性
- ・抗ウイルス薬 等

2)

ヒトES細胞に代わるヒトiPS細胞の選別



3)

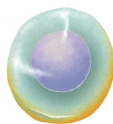
マイiPS細胞



ナイーブ化



リセットiPS細胞



個別化
毒性予測を
可能に

毒性試験に使用するための
標準iPS細胞を作成



ESC (DB) と
iPSC (試験対象) の
ブリッジング



hESTから
hiPSTへの発展