

ヒトiPSレポーター細胞を用いたシグナル かく乱を指標とする発生毒性試験法

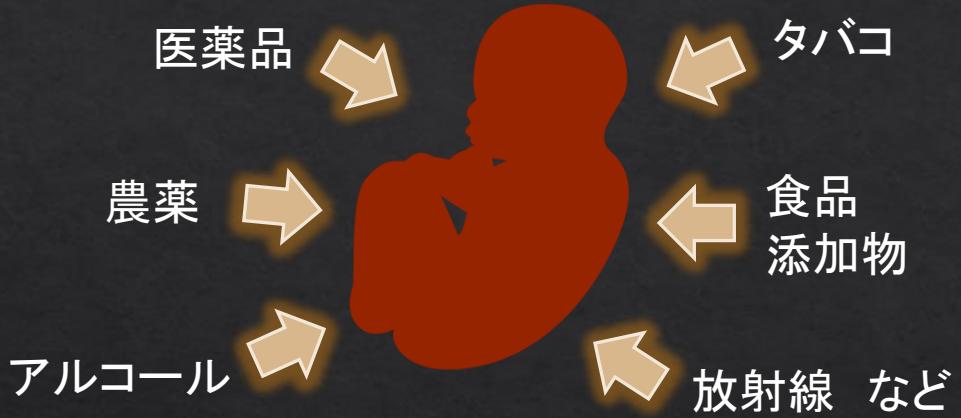
研究代表者 福田 淳二 横浜国立大学、KISTEC

共同研究者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所

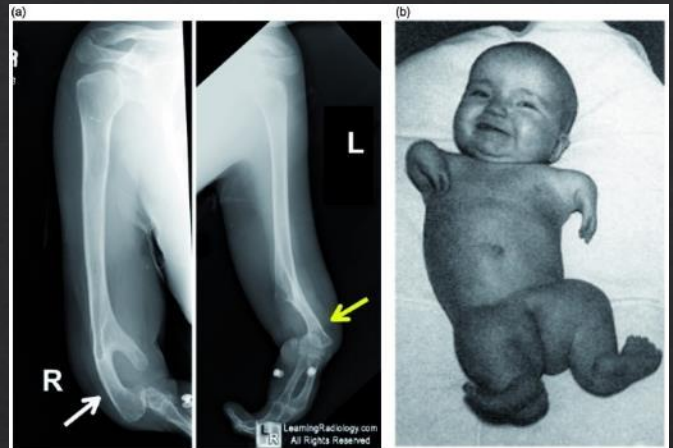
共同研究者 中島 芳浩 産業技術総合研究所

催奇形性と発生毒性試験

胎児に暴露される様々な化学物質



サリドマイド曝露による催奇形性発現



Rehman, W., Arfons, L. M. & Lazarus, H. M. *Ther. Adv. Hematol.* 2, 291 (2011)

発生毒性試験

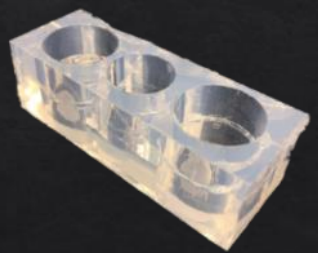


- × スループット性が低い
- × 多くの動物を必要とする
- × 種差

in vitro 発生毒性試験

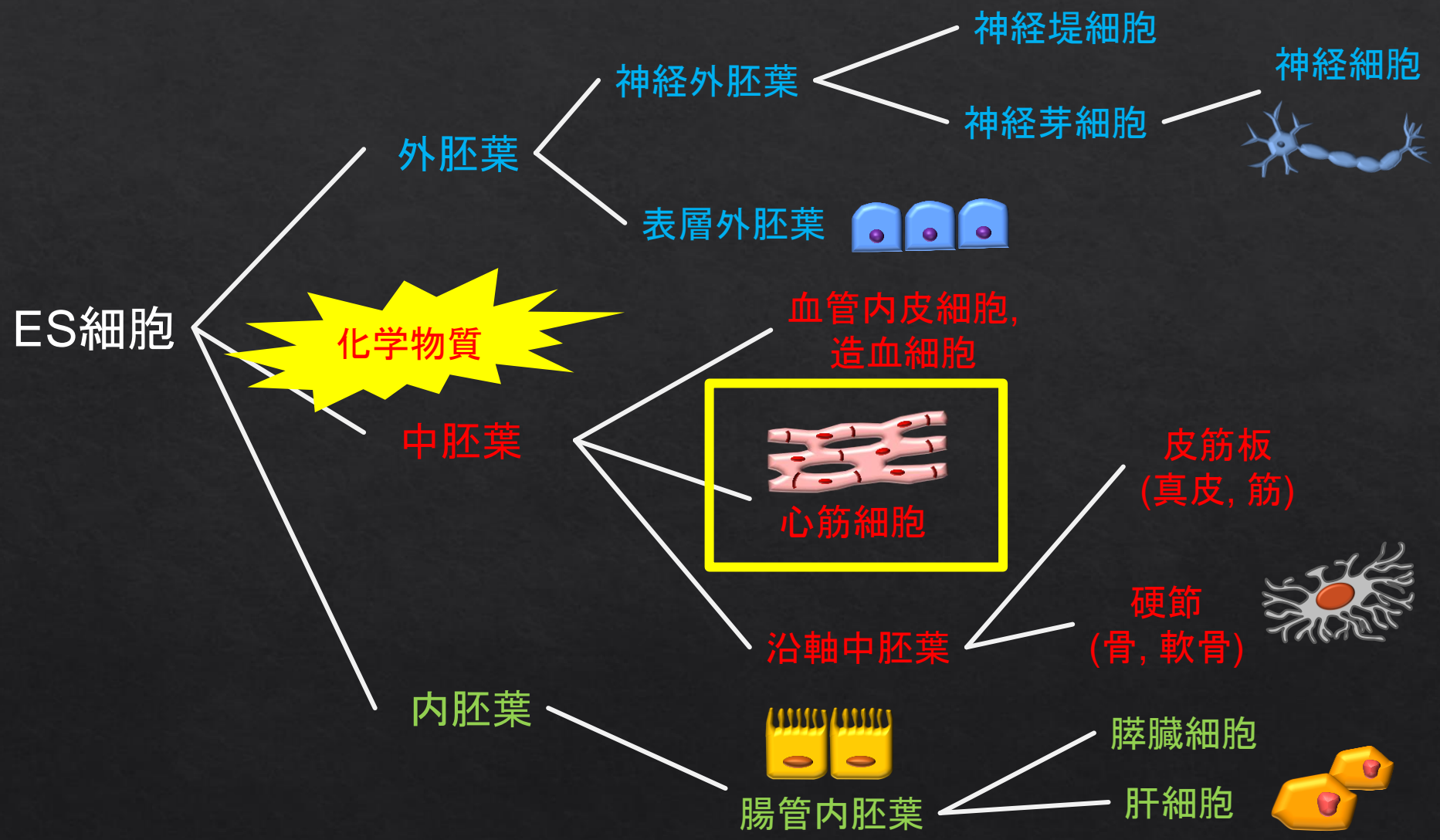


Multi-well plate



MPS, Body on a chip

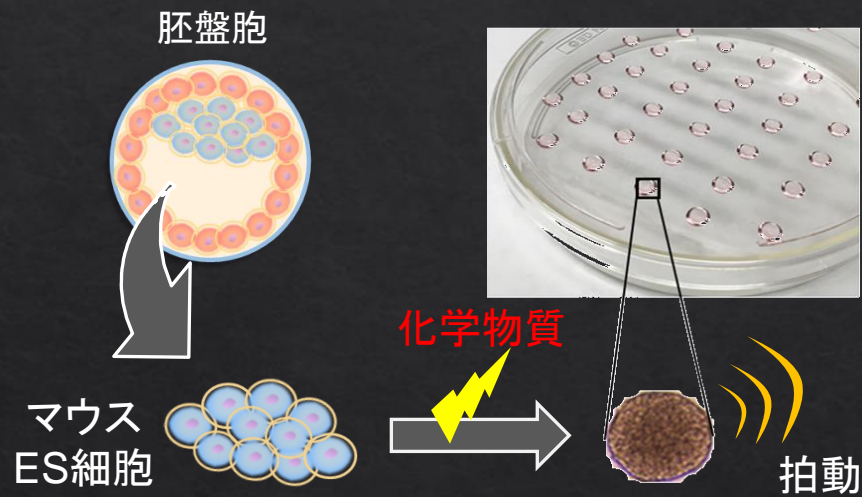
- ハイスループット
- 動物を必要としない
- ヒト細胞を使用することで種差を考慮



化学物質が分化へ及ぼす影響を評価し、発生毒性物質を予測

mEST & Hand1-ESTのアッセイ方法

mouse Embryonic Stem cell Test (mEST)



心筋細胞の拍動を観察評価
→発生毒性物質を予測

- 最も報告の多い試験法
- × スループット性が低い(観察)
- × ヒトとの反応性の違い

Baek, D. H. *et al.* *J. Appl. Toxicol.* 32, 617–626 (2012)

Luz, A. L. & Tokar, E. J. *Toxicol. Sci.* 165, 31–39 (2018)

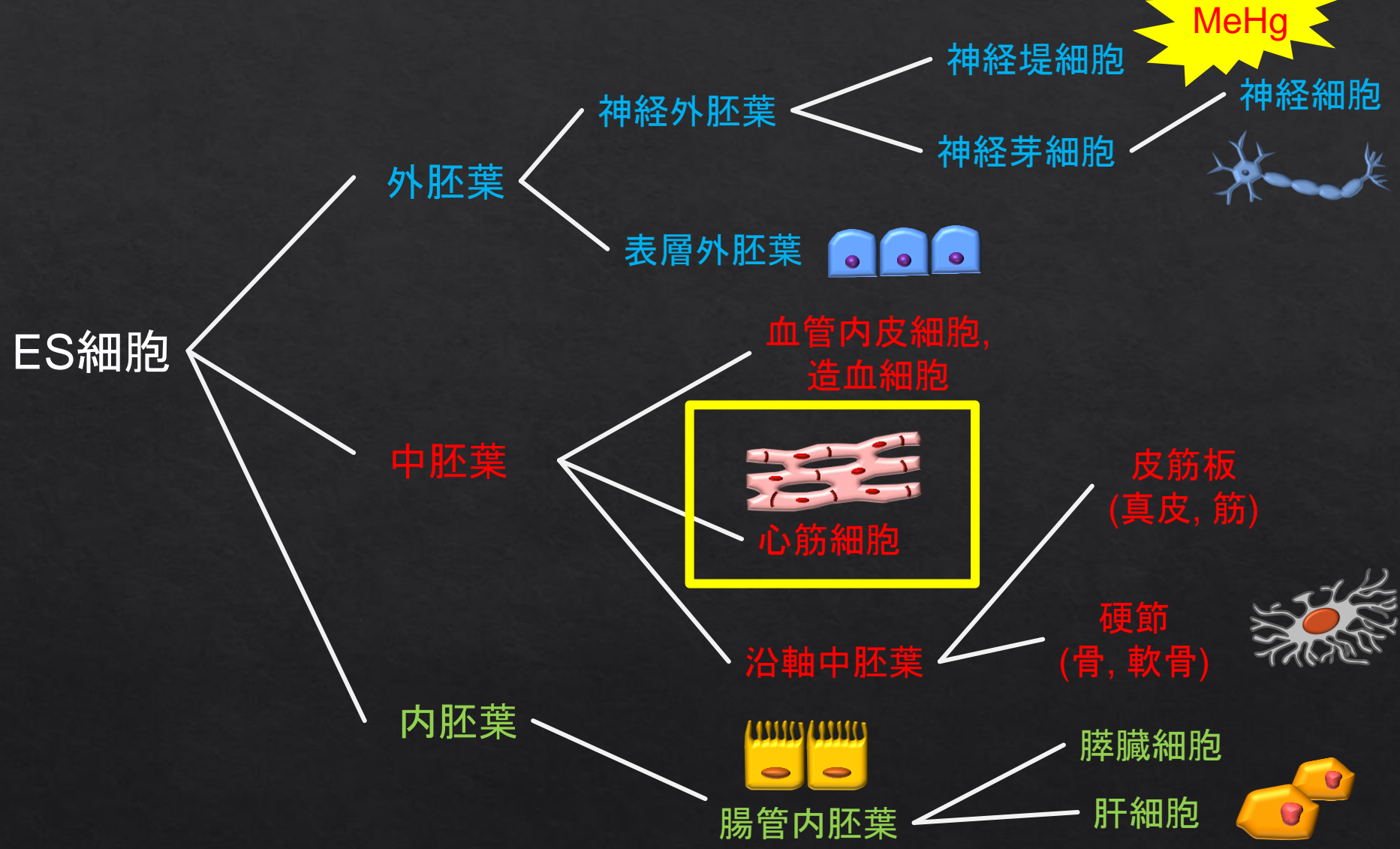
Hand1-EST



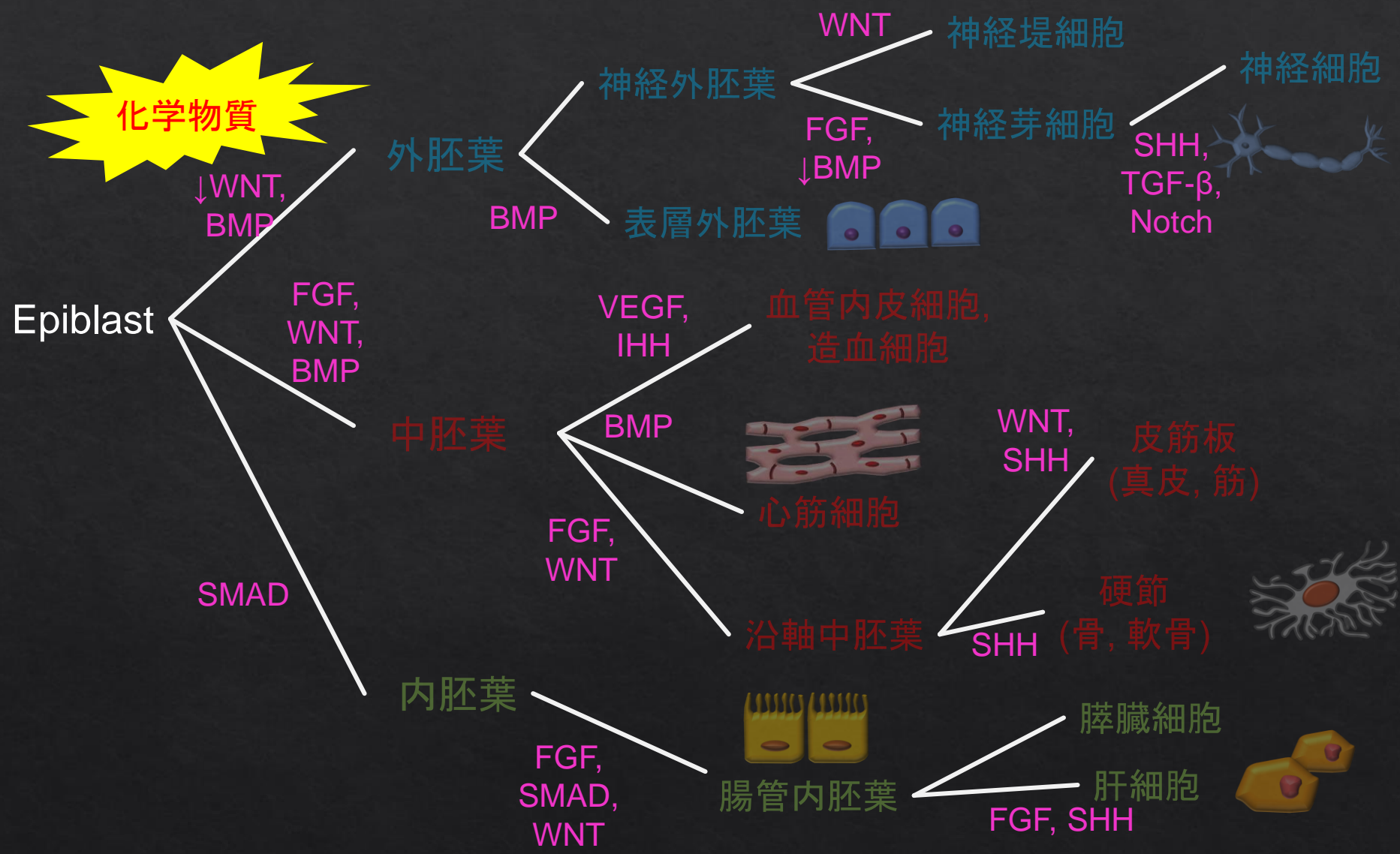
心筋の分化マーカーHand1のプロモーター
活性をレポーターアッセイで評価

- 定量性・スループット性向上
- × ヒトとの反応性の違い

Suzuki, N. *et al.* *Toxicol. Sci.* 124, 460–471 (2011)

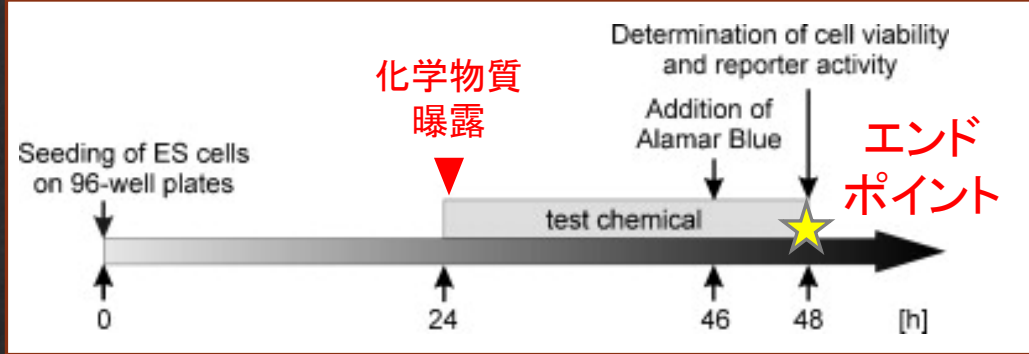
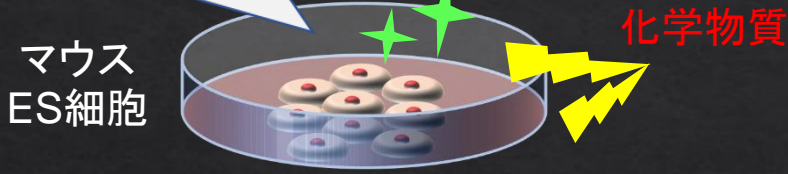
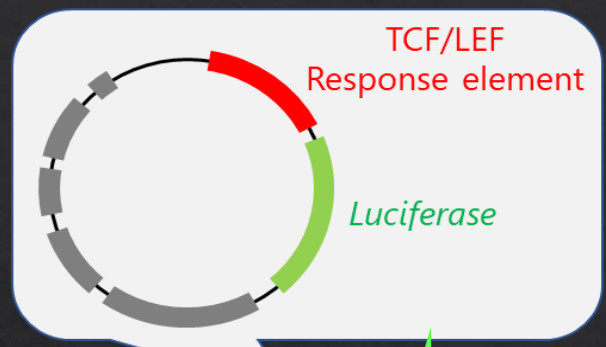


△ 心筋以外の細胞分化へ影響を及ぼす化学物質も存在する。
他の分化マーカーとの組み合わせも検討する必要がある。



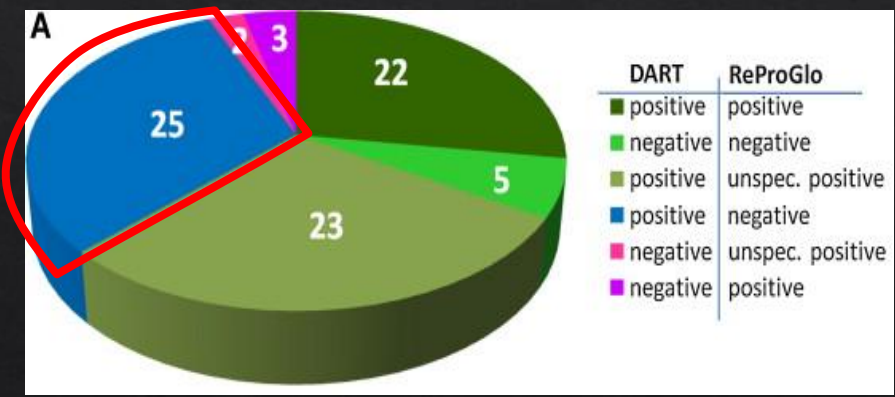
化学物質がシグナル伝達経路へ及ぼす影響を評価し、発生毒性物質を予測

Wnt/ β -cateninシグナル攪乱を検出

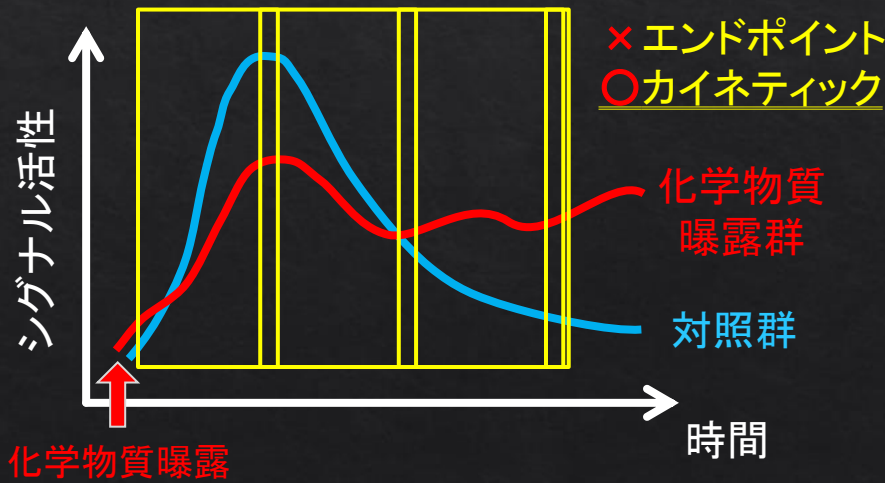


Uibel, F. et al. *Reprod. Toxicol.* 30, 103–112 (2010)

化学物質曝露によるWnt/ β -cateninシグナルかく乱を検出



Uibel, F. & Schwarz, M. *Reprod. Toxicol.* 55, 30–49 (2015)

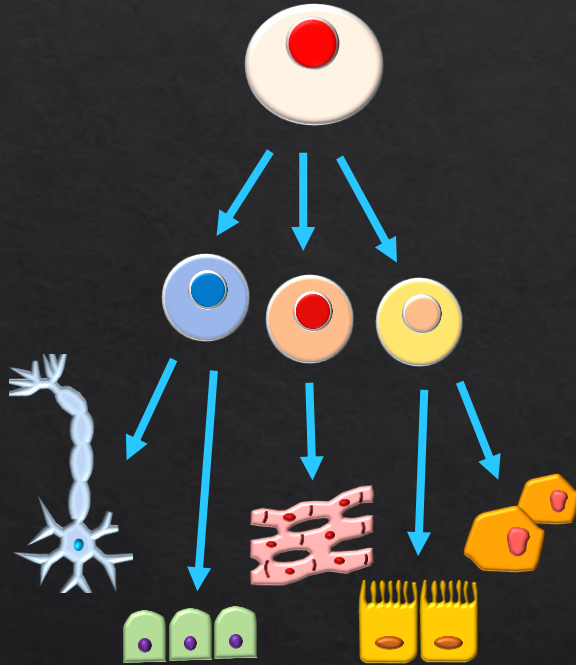


偽陰性率の高さが指摘された。
→ エンドポイントアッセイが原因の一つ？

シグナル活性は時間変化が大きい
→ エンドポイントアッセイでは
→ シグナルかく乱を見逃す恐れ

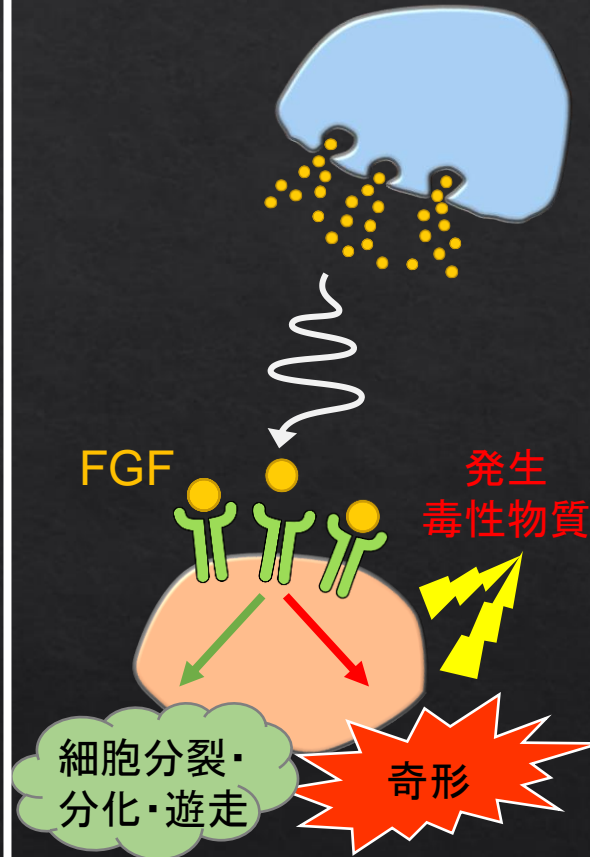
研究のポイント

種差を考慮し
ヒトiPS細胞を利用

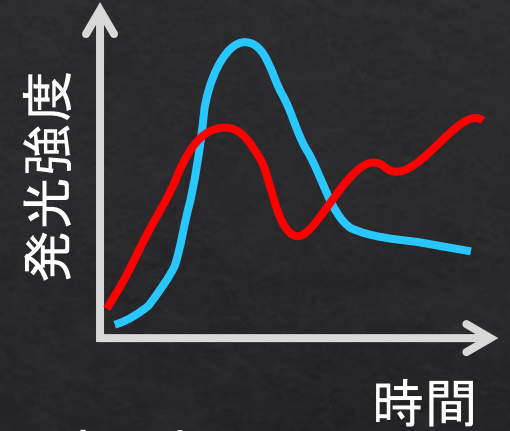


発生過程における
シグナルに応答

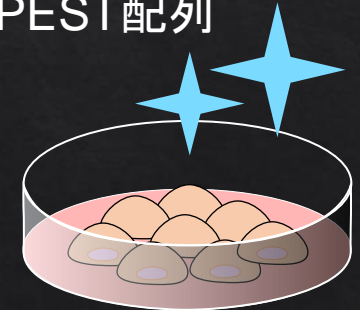
シグナルかく乱を検出
するレポーター細胞を樹立



シグナルかく乱を見逃さない
カイネティックアッセイ



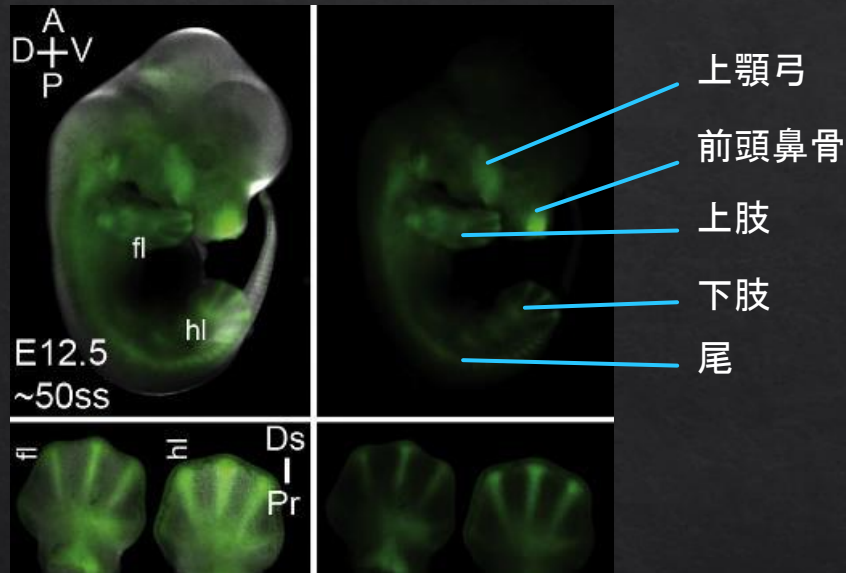
高輝度Nluc
PEST配列



ヒトにおける発生毒性物質を予測可能なスクリーニング法の開発

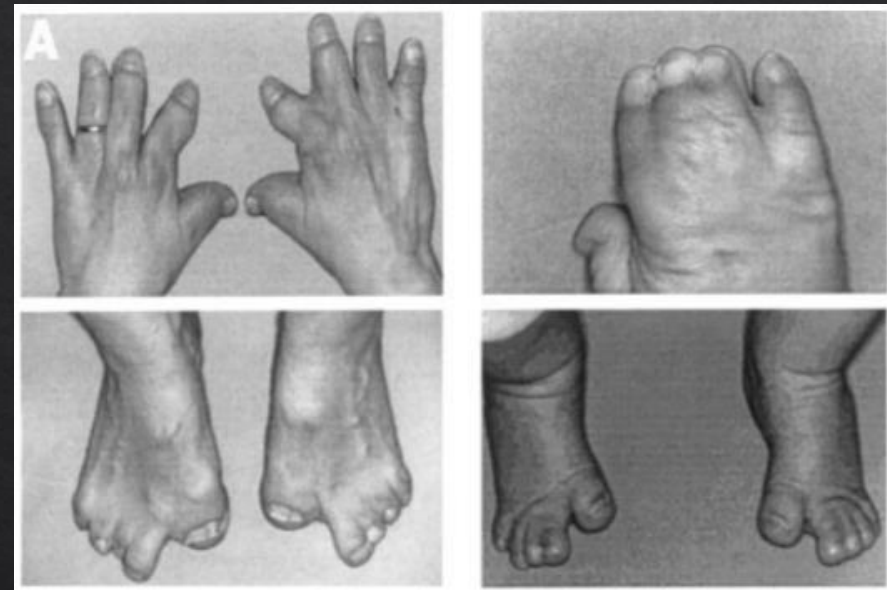
FGFシグナル伝達経路に注目

器官形成期におけるFGFシグナル活性



Morgani, S. M. et al. Dev. Biol. 441, 104–126 (2018)

FGFR2 遺伝子疾患

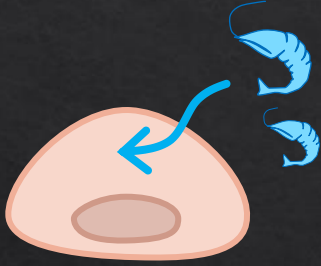


Wilkie, A. O. M. et al. Med. Genet. 112, 266–278 (2002)

実験手順

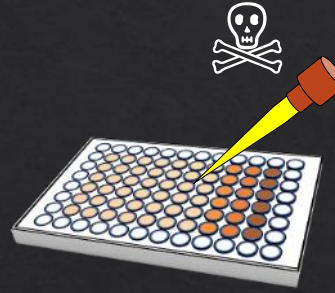
S. Kanno, et al., *iScience*, 2022
S. Kanno, et al., *StarProtocol*, 2022
S. Kanno, et al., *JBB*, 2022

発光基質添加



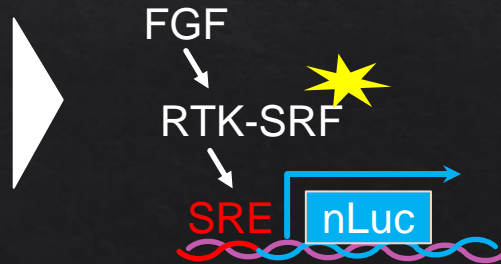
iPSレポーター細胞

化学物質添加

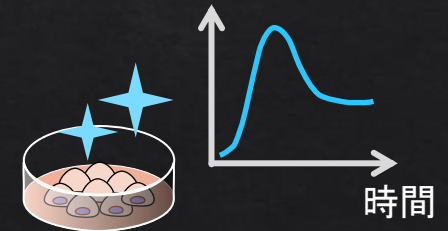


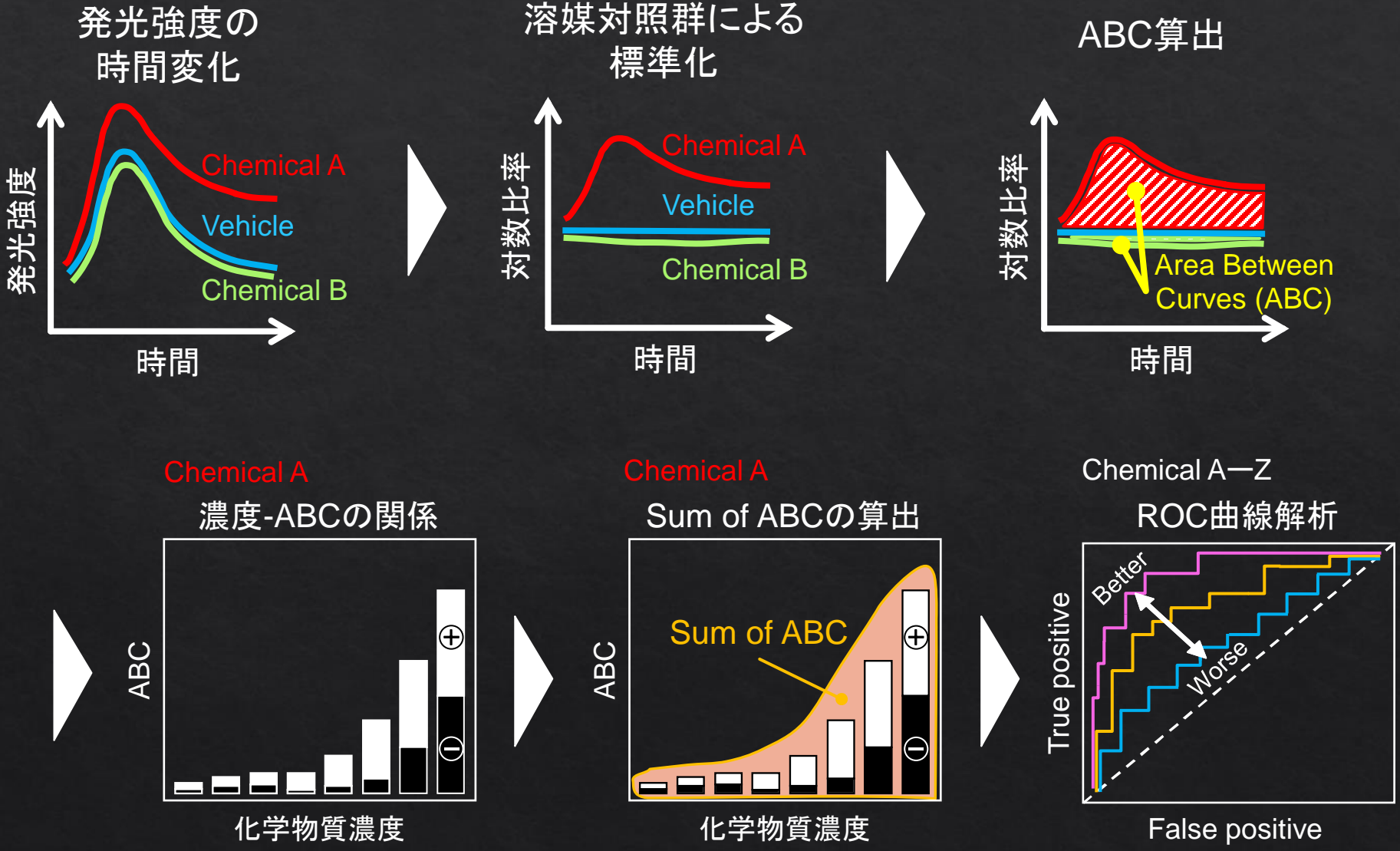
Multi-well plate

FGF刺激



経時的な発光測定

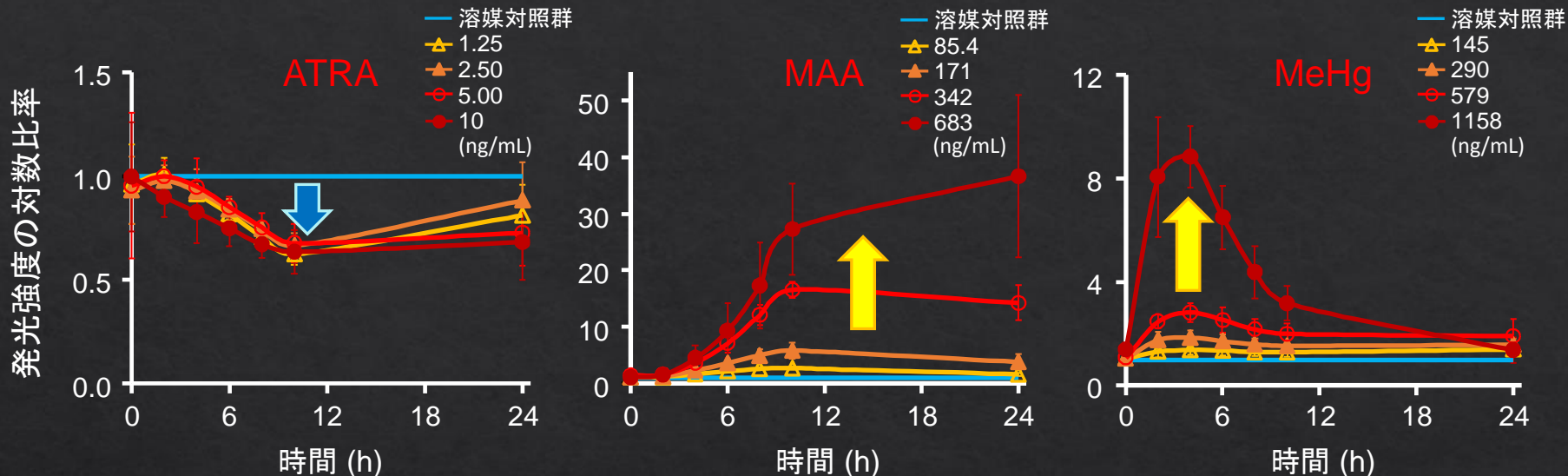




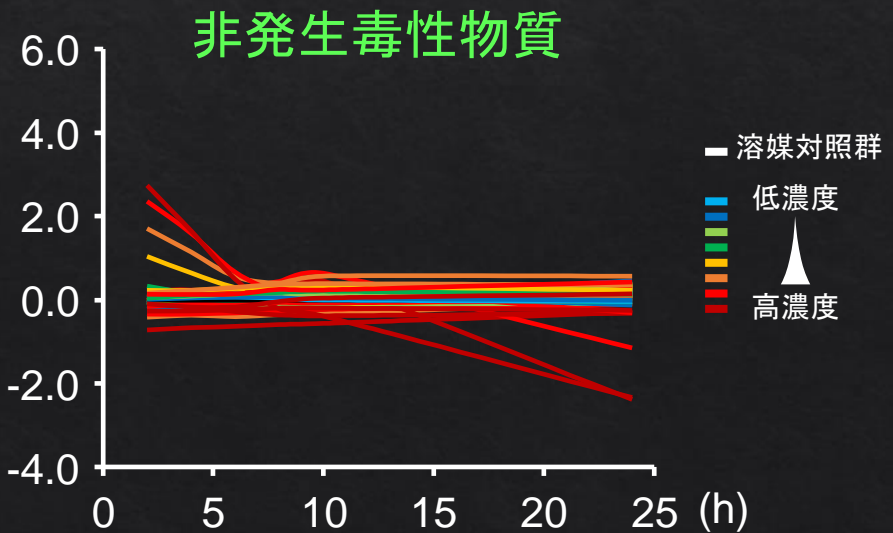
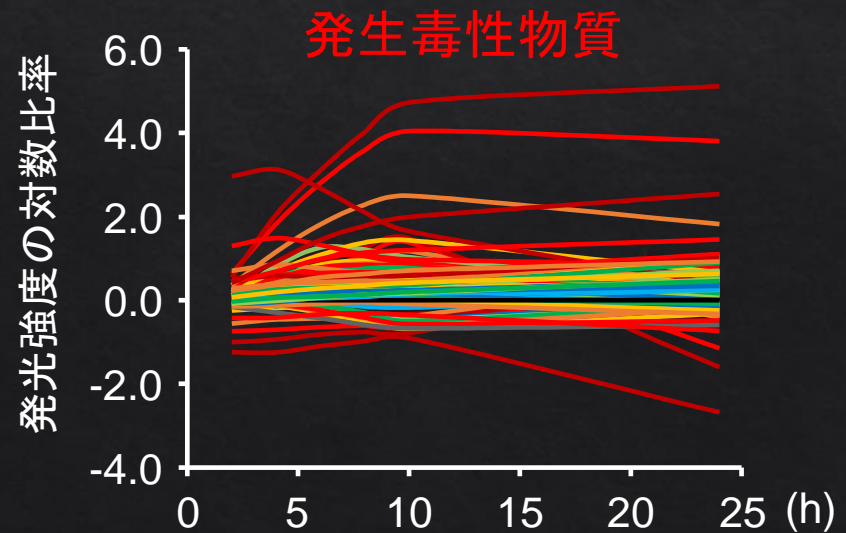
ECVAM、ICHに記載の化学物質

発生毒性物質	非発生毒性物質
all-trans-Retinoic Acid (ATRA)	Acrylamide
Hydroxyurea	D-Camphor
Methotrexate Hydrate	Dimethyl Phthalate
Methoxyacetic Acid (MAA)	Diphenhydramine Hydrochloride
Methylmercuric Chloride (MeHg)	Penicillin G Sodium Salt
Sodium Salicylate	Sodium Saccharin
Valproic Acid	Acetaminophen
5-Fluorouracil	Amoxicillin
Cyclophosphamide (CPA)	Cimetidine
Imatinib	Erythromycin
Lenalidomide	Hydrochlorothiazide
Pomalidomide	Sulfasalazine
Thalidomide	

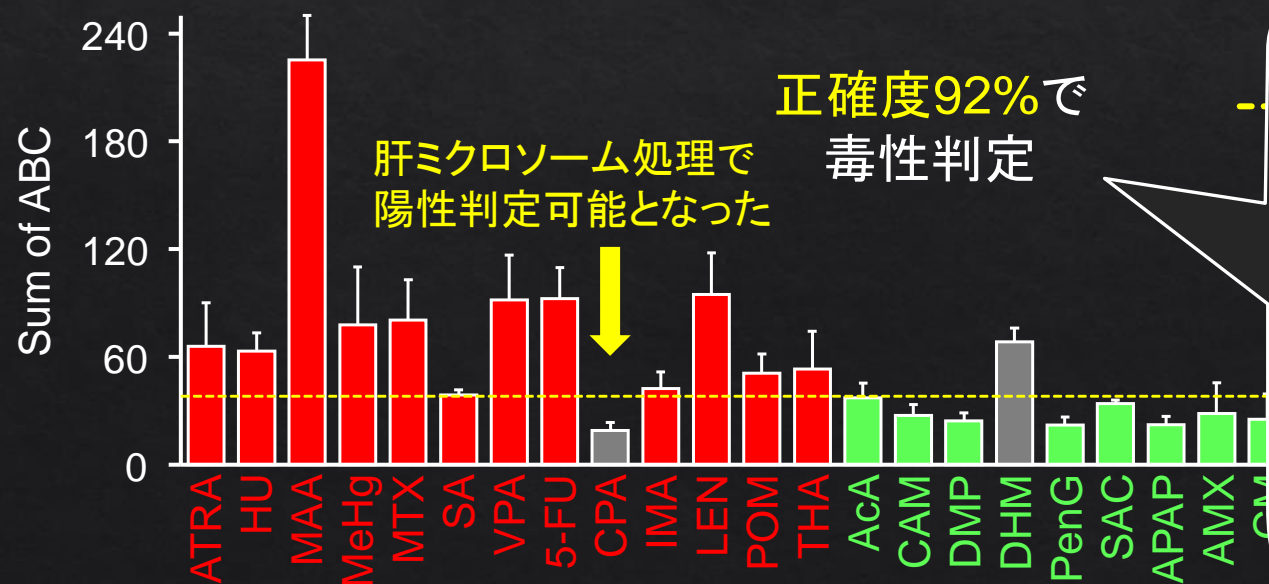
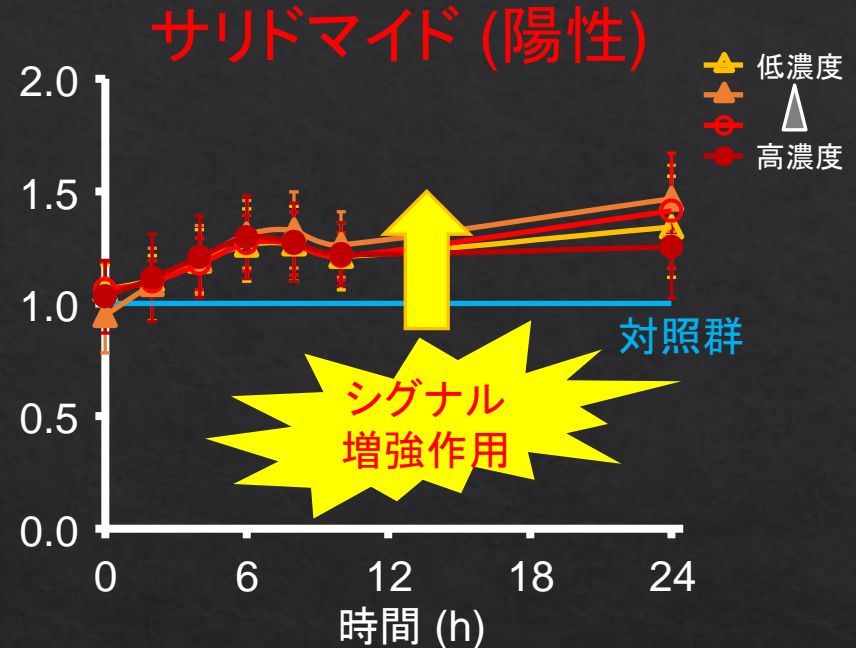
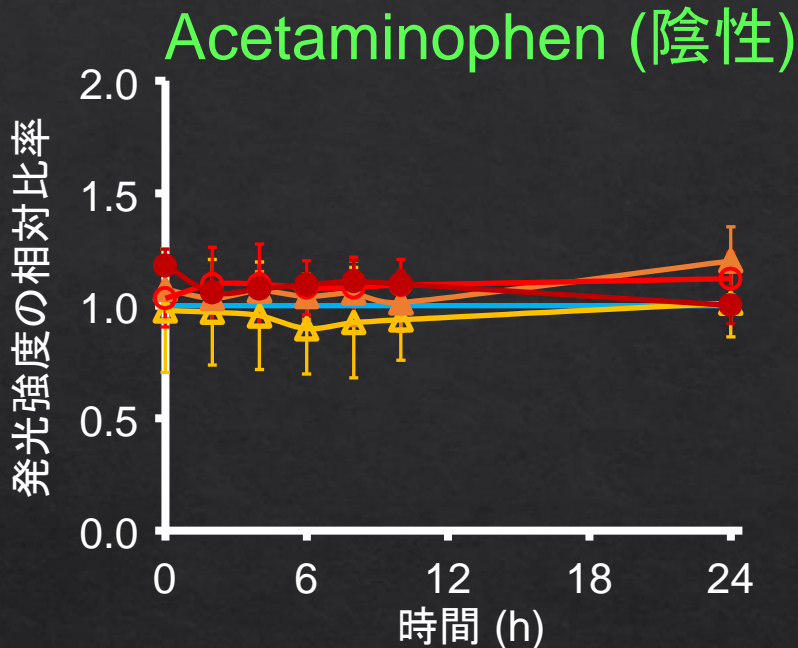
化学物質のシグナル攪乱作用



化学物質によって、FGFシグナル活性へ及ぼす**影響・タイムポイント**が大きく異なる



FGFシグナルかく乱試験の結果



試験法	正確度 (%)
mEST	78-83
Hand1-EST	83
ラット全胚培養	80
ReProGlo	76
ゼブラフィッシュ胚	72
ラットマイクロマス	70
本研究	92

まとめと今後

ヒトiPSレポーター細胞を用いてシグナルかく乱を指標とした発生毒性試験法の可能性を実験的に示した。

FGFシグナル以外のレポーター細胞の樹立

