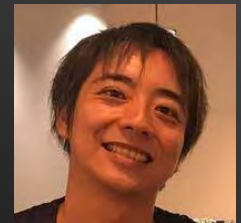


# ヒトiPSレポーター細胞を用いたシグナル かく乱を指標とする発生毒性試験法

研究代表者 福田 淳二 横浜国立大学、KISTEC

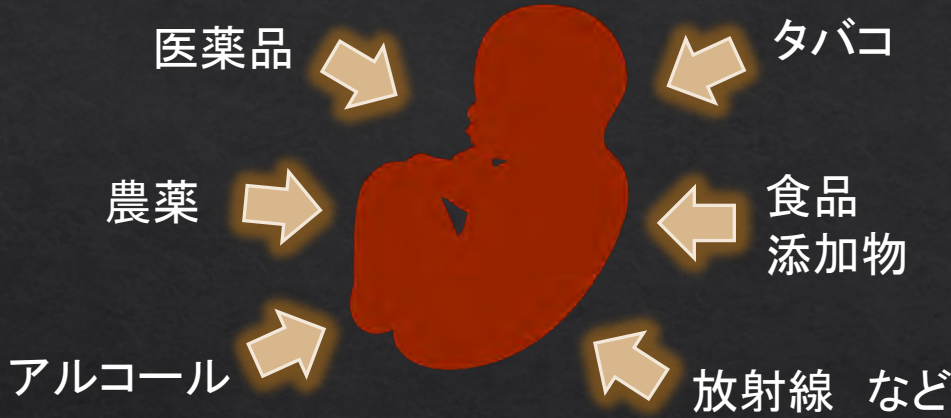
共同研究者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所

共同研究者 中島 芳浩 産業技術総合研究所

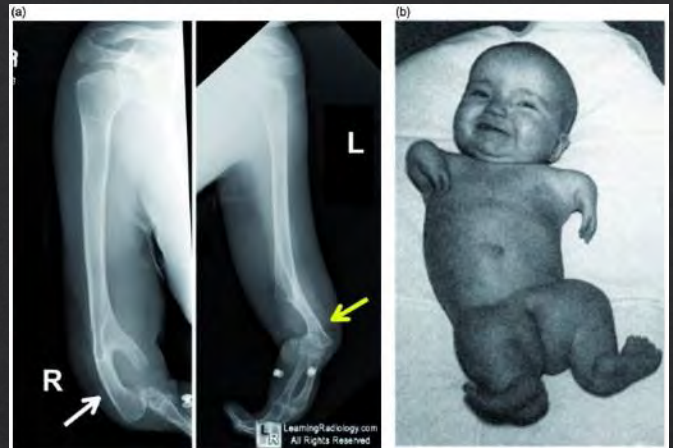


# 催奇形性と発生毒性試験

## 胎児に暴露される種々の化学物質



## サリドマイドによる悲劇



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

## 発生毒性試験



- × コスト・試験数
- × 動物の犠牲 (3Rs)
- × 種差

## in vitro 発生毒性試験



Multi-well plate

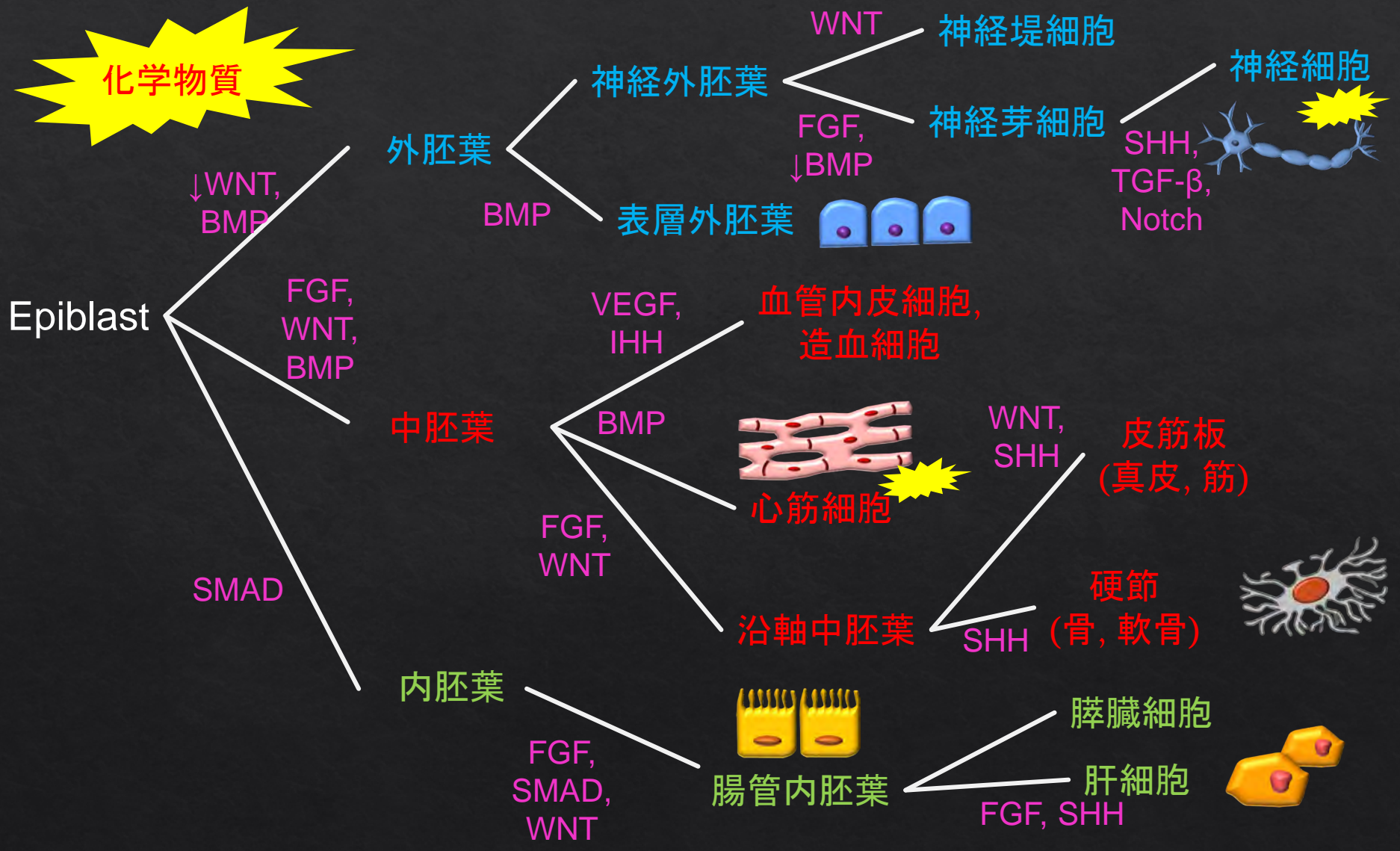


MPS, Body on a chip

- ハイスループット
- 動物実験代替
- ヒト細胞の利用

# 先行研究 (mEST\* & Hand1-EST\*\*)と本研究

\*Baek, D. H. et al. J. Appl. Toxicol. 32, 617–626 (2012)    \*\*Suzuki, N. et al. Toxicol. Sci. 124, 460–471 (2011)

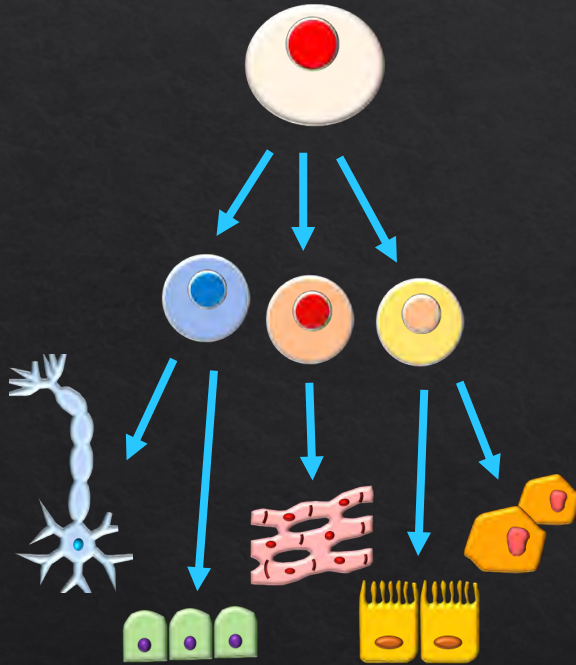


化学物質がシグナル伝達経路へ及ぼす影響を評価し、発生毒性物質を予測



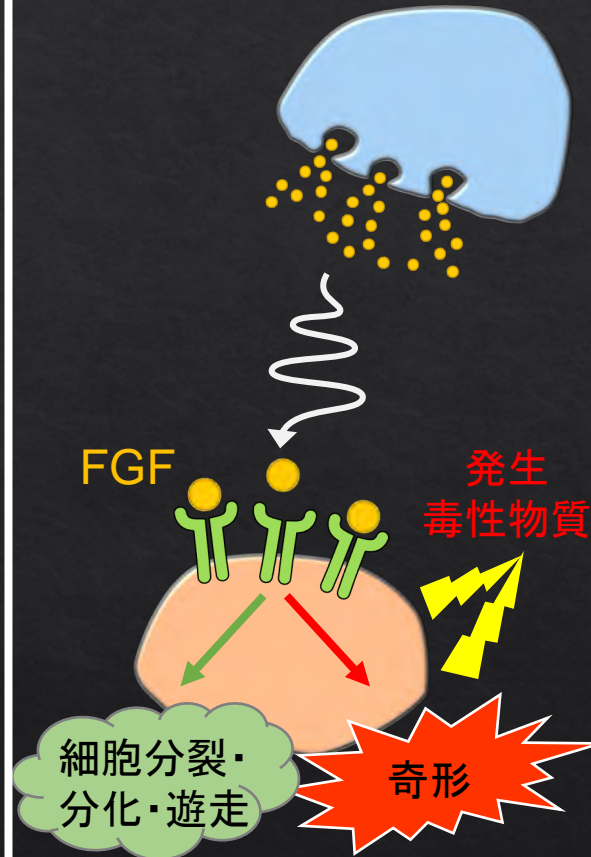
# 本研究のアプローチ

種差を考慮し  
ヒトiPS細胞を利用

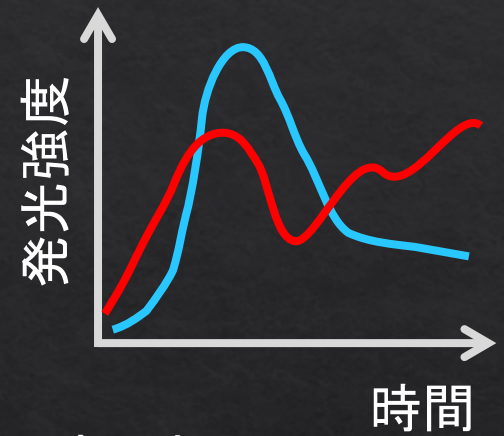


発生過程における  
シグナルに応答

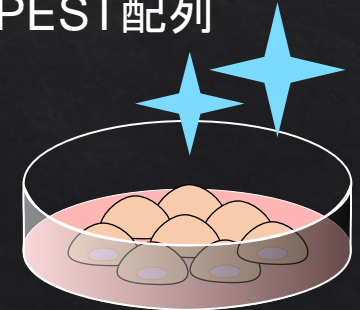
シグナルかく乱を検出  
するレポーター細胞を樹立



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



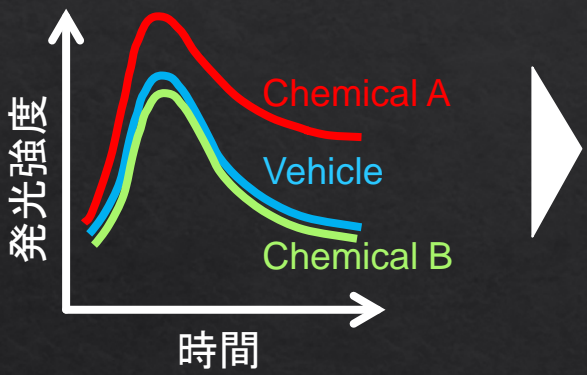
ヒトにおける発生毒性物質を予測可能なスクリーニング法の開発

# データ処理

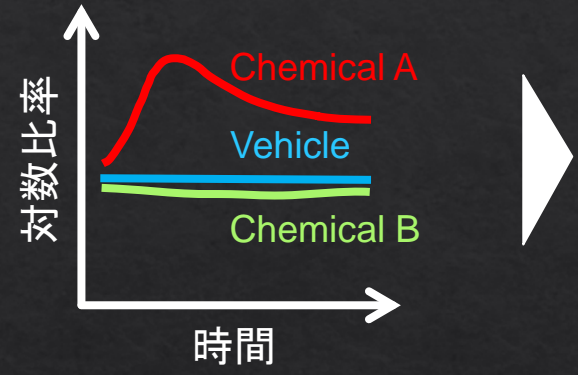


S. Kanno, et al., *iScience*, 2022  
S. Kanno, et al., *StarProtocol*, 2022  
S. Kanno, et al., *JBB*, 2022

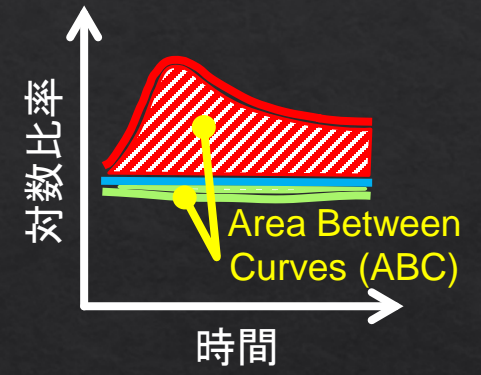
### 発光強度の 時間変化



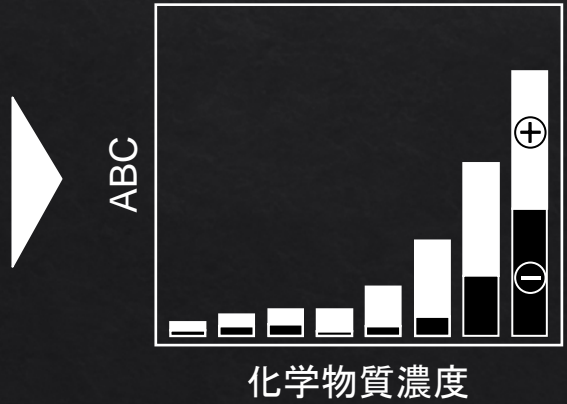
### 溶媒対照群による 標準化



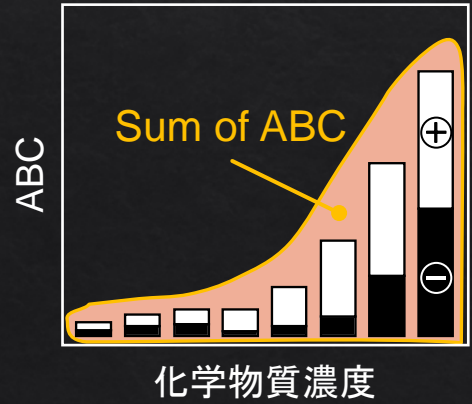
### ABC算出



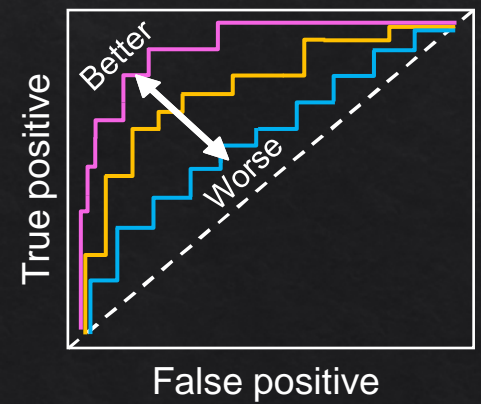
### Chemical A 濃度-ABCの関係



### Chemical A Sum of ABCの算出



### Chemical A-Z ROC曲線解析



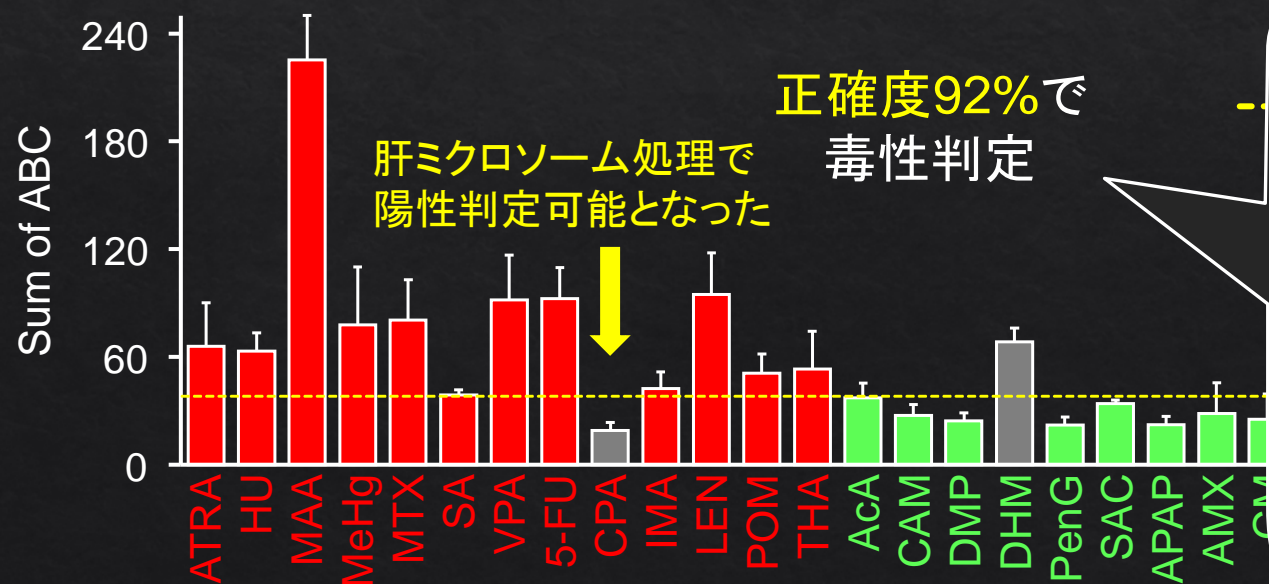
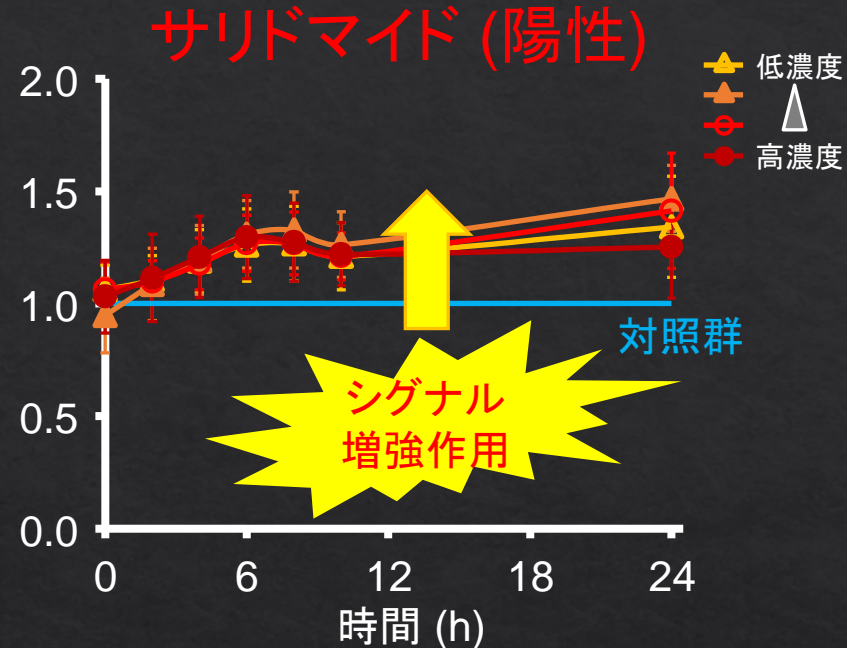
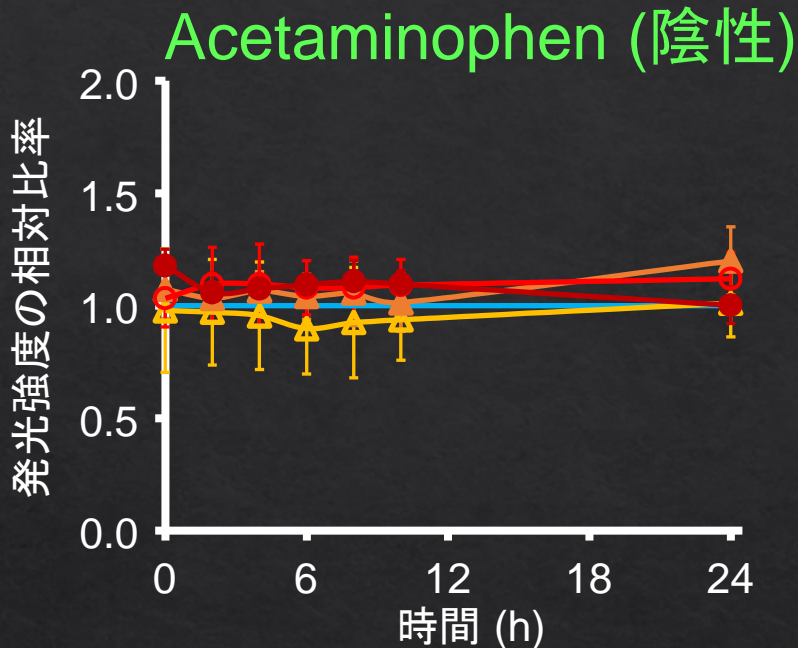


## ECVAM、ICHに記載の化学物質

| 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                    |                               |



# FGFシグナルかく乱試験の結果



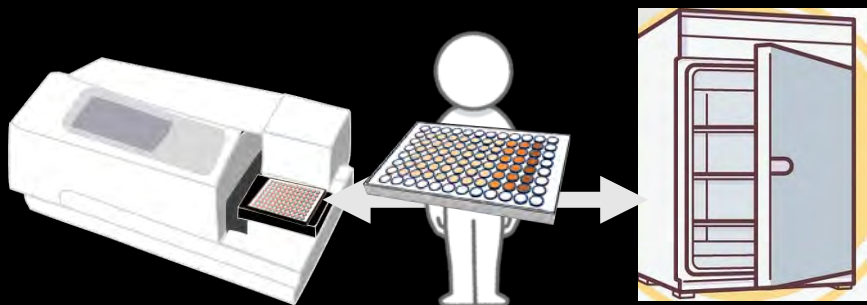
| 試験法        | 正確度 (%)   |
|------------|-----------|
| mEST       | 78-83     |
| Hand1-EST  | 83        |
| ラット全胚培養    | 80        |
| ReProGlo   | 76        |
| ゼブラフィッシュ胚  | 72        |
| ラットマイクロマス  | 70        |
| <b>本研究</b> | <b>92</b> |

# リアルタイム発光測定による高精度検出

## 手作業による発光計測

発光プレートリーダー

インキュベータ



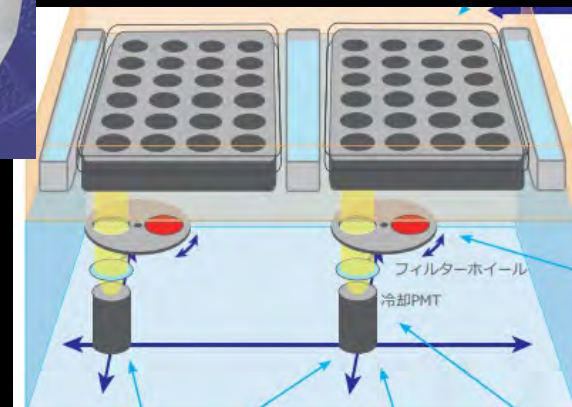
## リアルタイム発光測定装置



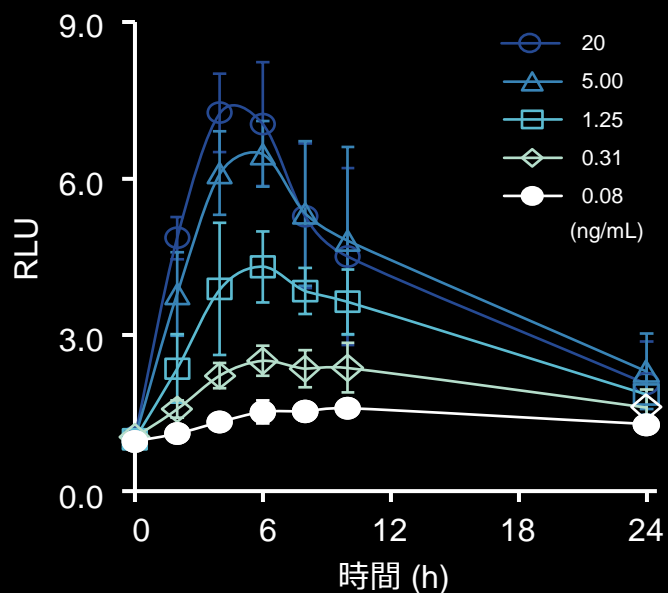
ATTO社 Kronos-HT



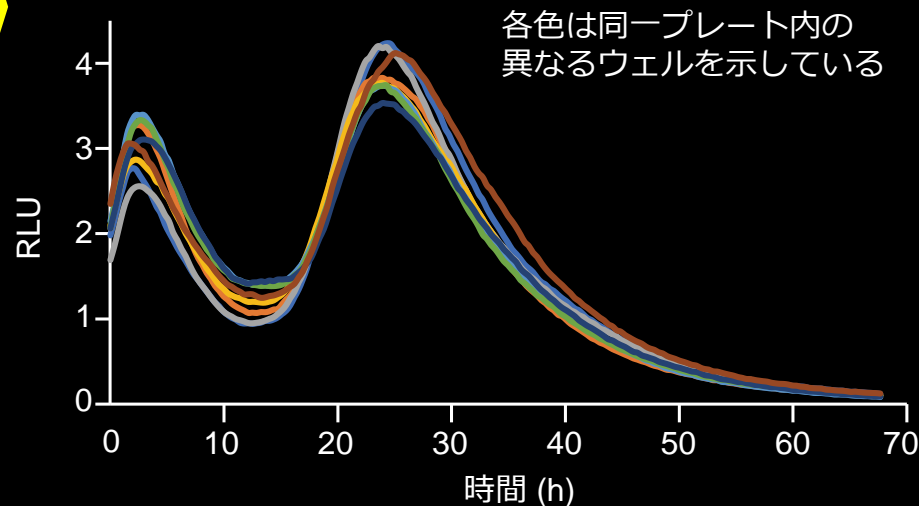
産総研・中島



bFGF



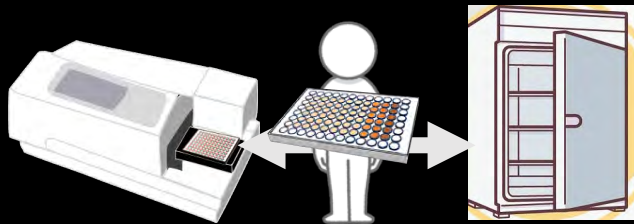
bFGF



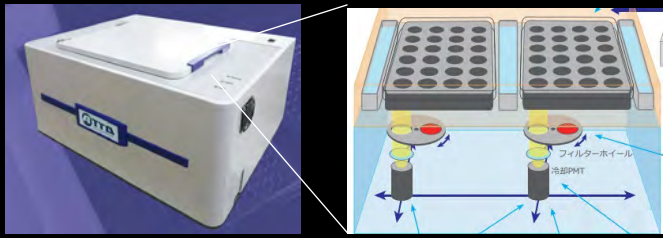


# 濃度依存的なシグナル攪乱ダイナミクス

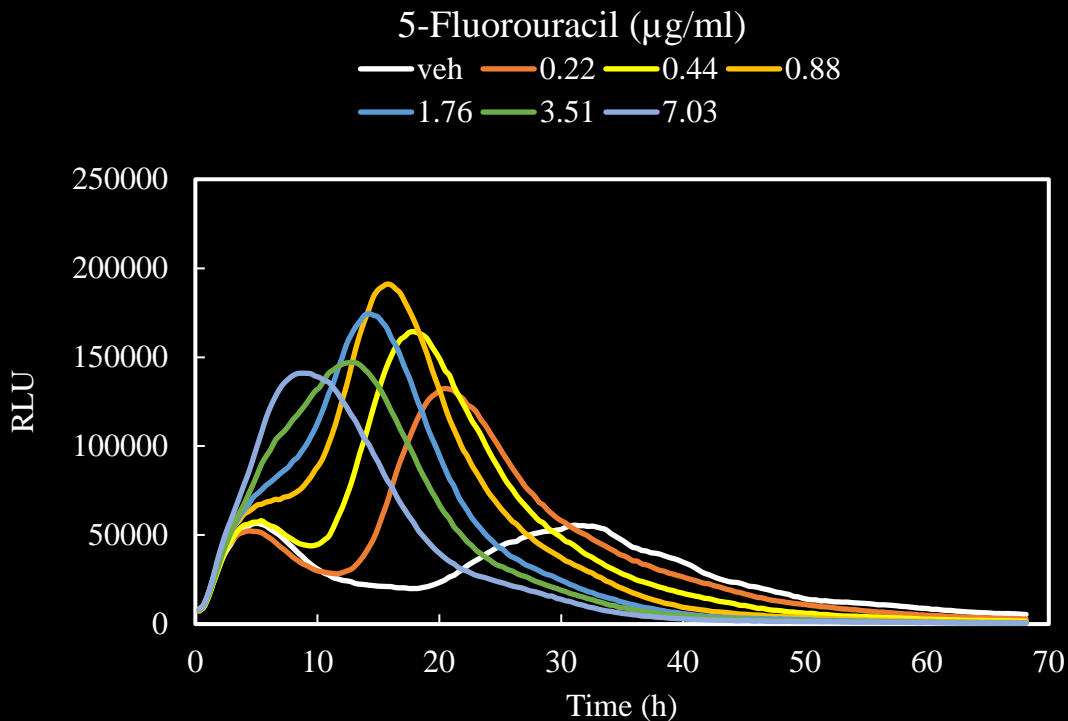
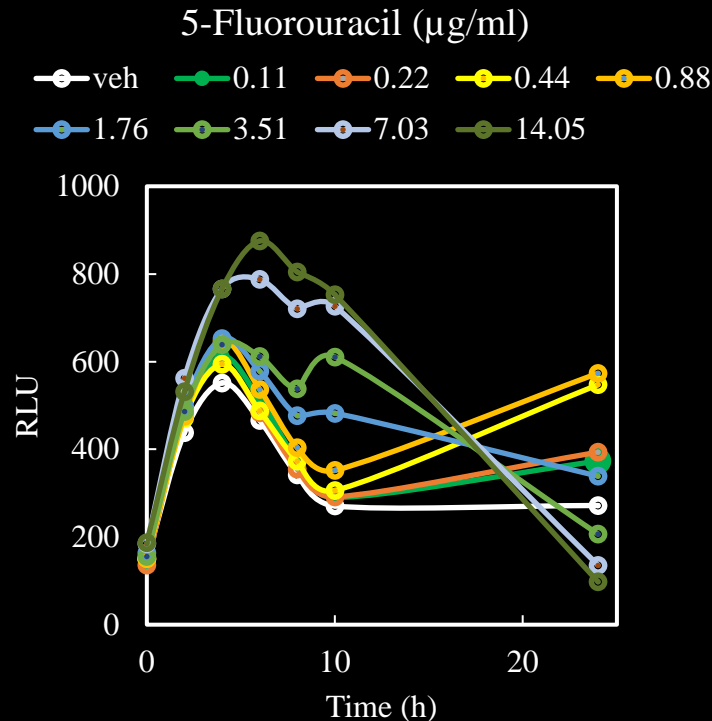
手作業による発光計測



リアルタイム発光測定装置

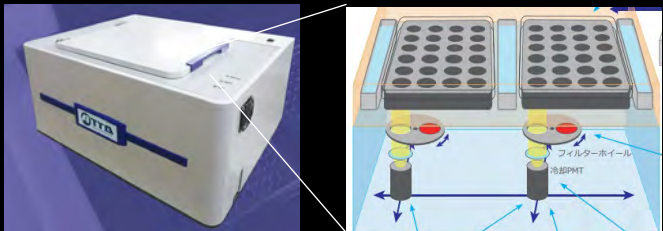


## 発生毒性物質 (5-Fluorouracil) による攪乱



# 濃度依存的なシグナル攪乱ダイナミクス

## リアルタイム発光測定装置

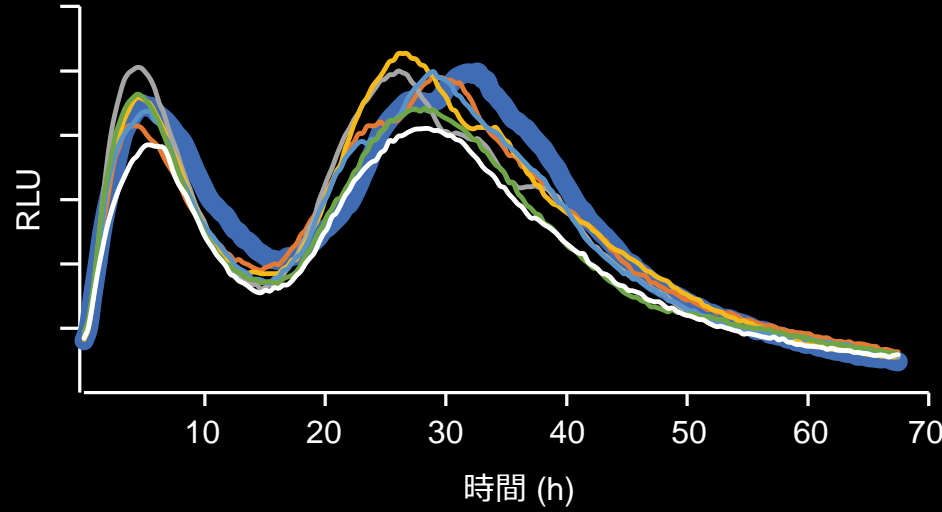
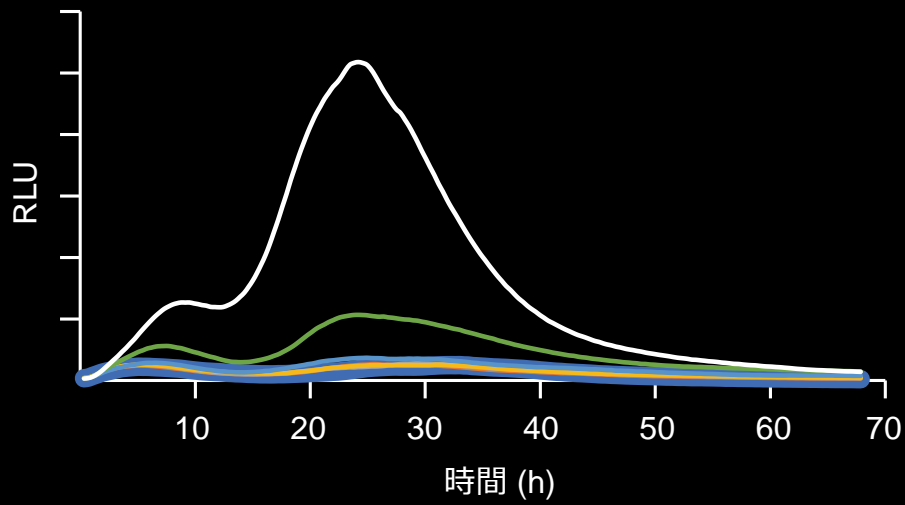


### 発生毒性物質 (Valproic Acid)

### 非発生毒性物質 (Cimetidine)

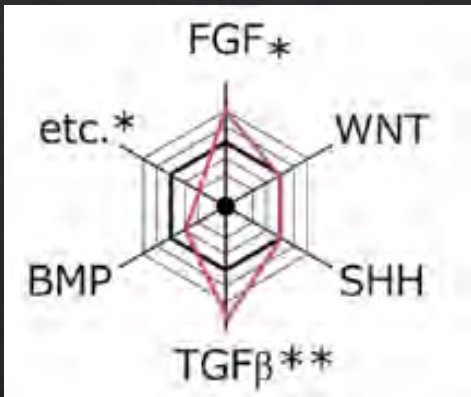
- veh
- 1.6  $\mu\text{g/ml}$
- 3.1  $\mu\text{g/ml}$
- 6.3  $\mu\text{g/ml}$
- 12.5  $\mu\text{g/ml}$
- 25  $\mu\text{g/ml}$
- 50  $\mu\text{g/ml}$

- veh
- 0.23  $\mu\text{g/ml}$
- 0.47  $\mu\text{g/ml}$
- 0.94  $\mu\text{g/ml}$
- 1.88  $\mu\text{g/ml}$
- 3.75  $\mu\text{g/ml}$
- 7.50  $\mu\text{g/ml}$



# FGFシグナル以外のヒトiPSレポーター細胞株の樹立

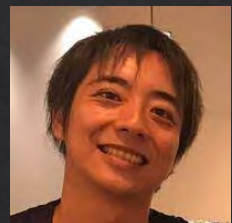
## バッテリー試験構築



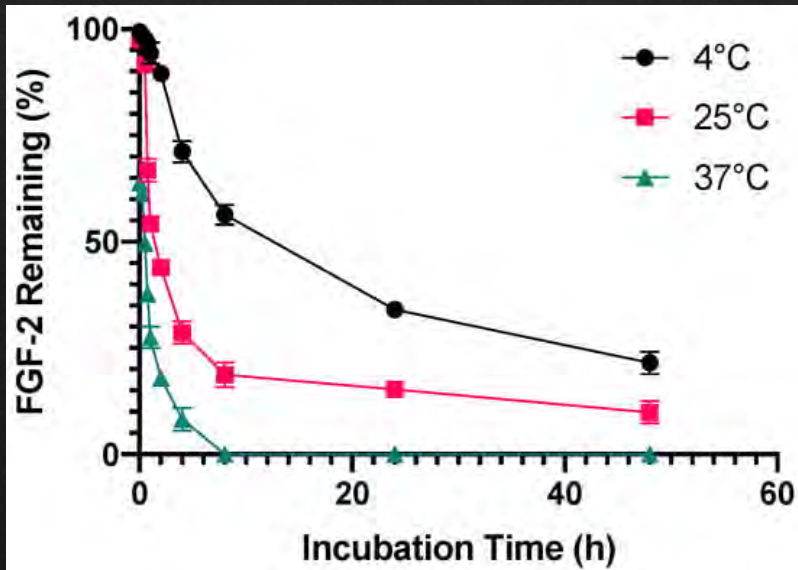
WNT、SHH、BMP、TGF- $\beta$ などのレポーター細胞は樹立済み。

問題は、シグナルを刺激するリガンド探索。

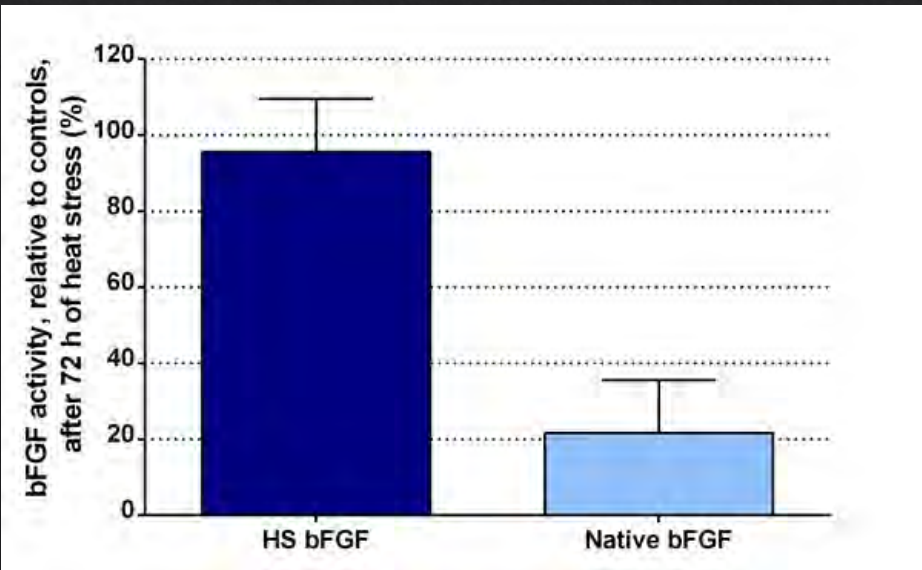
国衛研・大久保



## Native bFGFの安定性



## Human Heat Stable bFGF

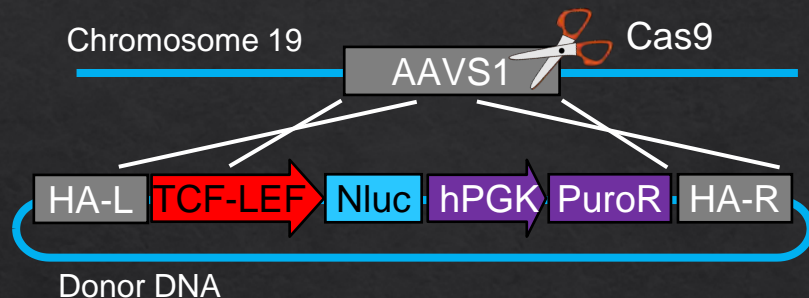


L.R. Benington, et al., *Pharmaceutics*, 2021

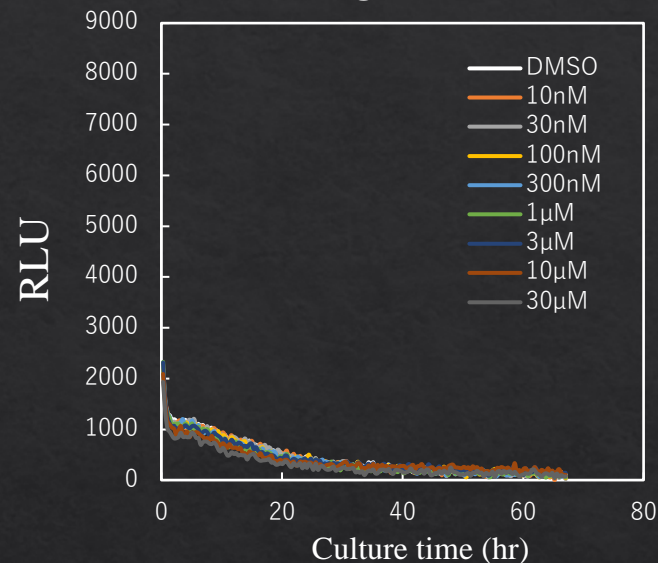


# WntシグナルiPSレポーター細胞

## Wntレポーター細胞の作出

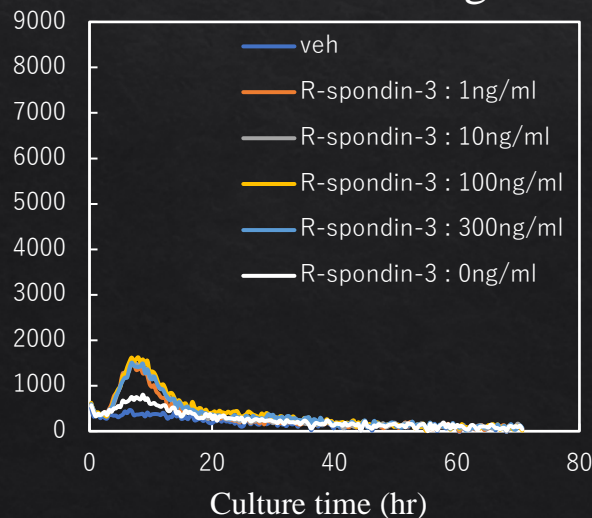


## CHIR

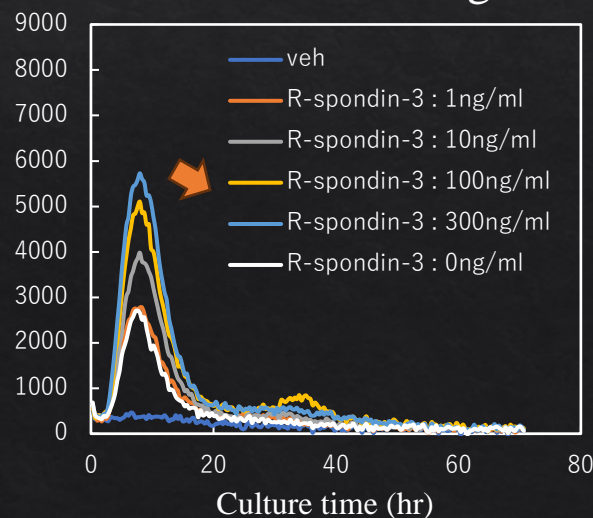


## Afamin-Wnt3aとR-spondin-3の組み合わせ

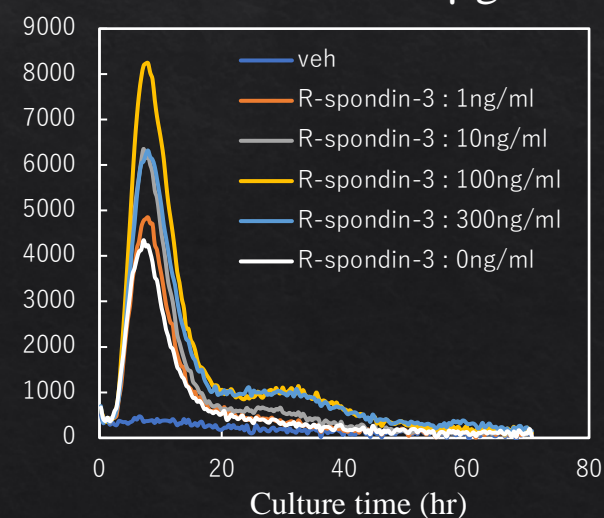
### Afamin-Wnt3a 30 ng/ml



### Afamin-Wnt3a 300 ng/ml



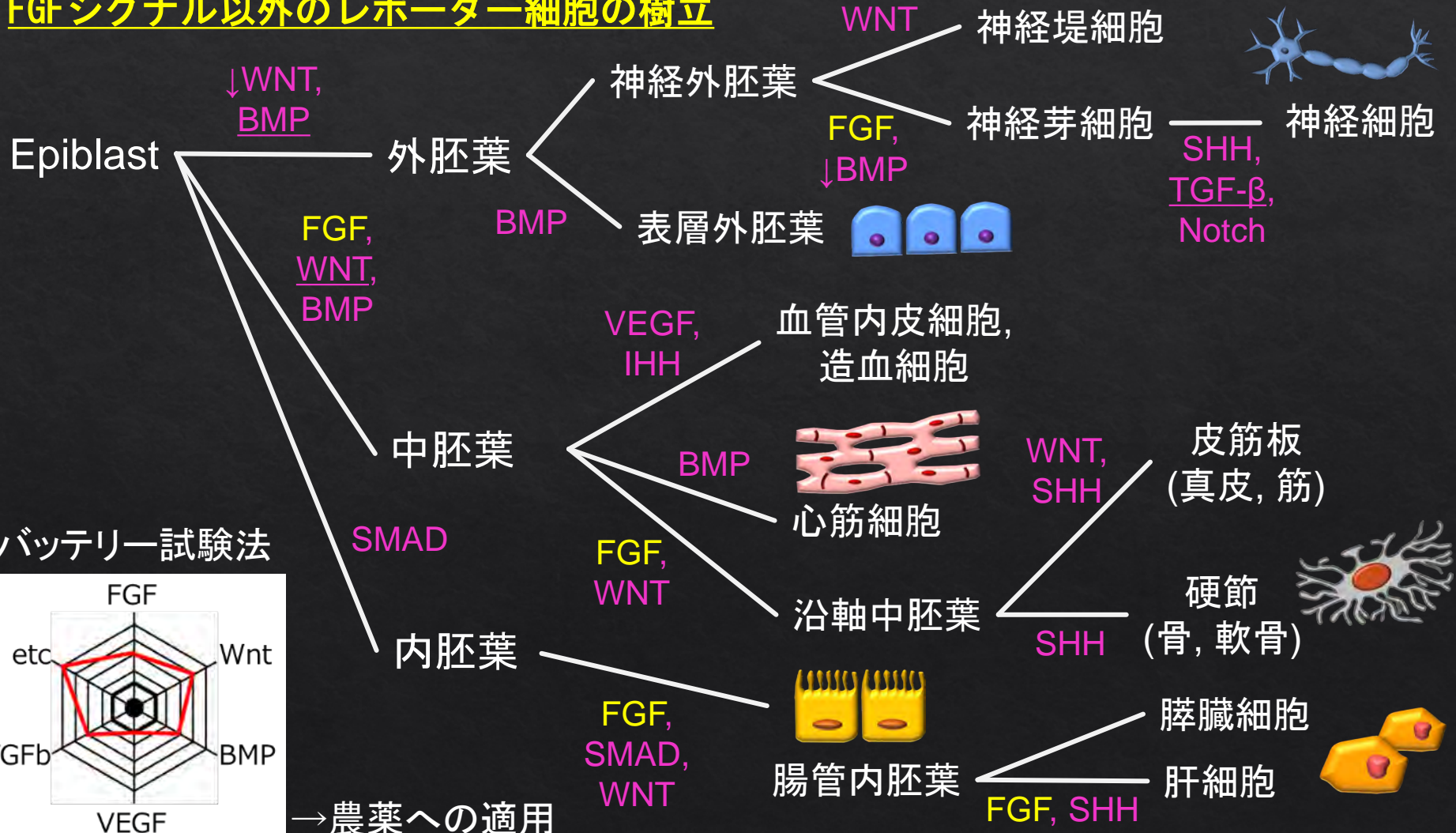
### Afamin-Wnt3a 3 µg/ml



# まとめと今後

- 1)リアルタイム発光測定により、詳細なカイネティックアッセイができることを示した。
- 2)Wntシグナルレポーター細胞を樹立し、使用可能なリガンドを見出した。

## FGFシグナル以外のレポーター細胞の樹立

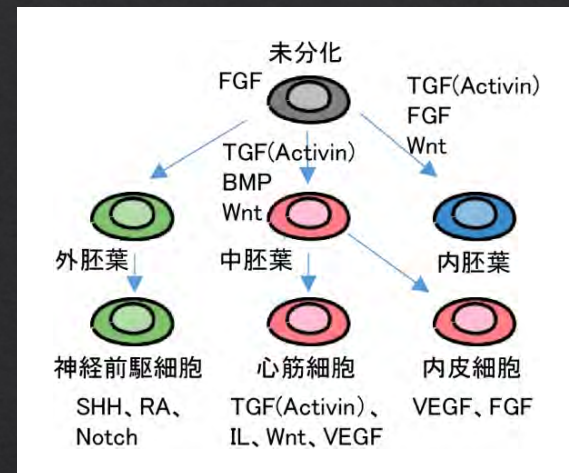




# その他の研究計画

## 胚葉分化細胞を用いたレポーターアッセイ

未分化iPS細胞では、レセプターの発現そのものが低い場合がある。そこで、3胚葉程度まで分化誘導する。または胚様体の形成させる。



## 多色化による内部標準の利用

被験物質による試験系自体への影響（例：ルシフェラーゼ活性の阻害）を検出し、実験アーティファクトを排除する。

## シグナルネットワークの解析

この試験法の分子メカニズムをより詳細に理解するため、トランスクリプトーム解析を行う。

