

miR-146b が重要な役割を演じていると報告している (*Genes Nutr* 8:69-78, 2013.)。

肝細胞への分化と比較して、iPS 細胞から腸管組織への分化誘導に関する知見は非常に乏しく、2010 年にマウス iPS 細胞から胚様体を形成し、腸管組織を作成したとの報告が最初である (*Biochem. Biophys Res Commun* 391:38-42, 2010)。その後、腸管上皮幹細胞の培養法を応用し、初めてヒト iPS 細胞から腸管様構造を形成させたとの報告がなされた (*Nature* 470:105-109, 2011)。ごく最近、Ogaki らは Wnt 及び Notch シグナルに影響する低分子化合物が腸管細胞系譜への分化を促進するとの報告を行った (*Stem Cells* 31:1086-1096, 2013)。しかし、これらの報告において、薬物動態の機能に関する解析は全くなされておらず不明である。

著者らは、ヒト iPS 細胞をアクチビン A にて内胚葉に、FGF2 にて腸管幹細胞に分化後、EGF にて腸管上皮細胞へと分化誘導する方法を確立した (Fig. 3, *Drug Metabol. Pharmacokin* 29:44-51, 2014)。本法にて分化した腸管上皮細胞において、腸管上皮細胞特異的に発現するマーカー mRNA の発現 (Fig. 4) 及び sucrase-isomaltase のタンパク質発現が認められた。また、本細胞はペプチドトランスポーターの基質の取り込み機能を有していることが明らかになった。これらの結果は、ヒト iPS 細胞が特徴的な機能を有する腸管上皮細胞に分化したことを意味するものである。しかし、本法において分化した場合、sucrase-isomaltase 抗体で染色されるのは 10%程であり、分化効率の低さが課題であった。そこで、肝細胞への分化誘導の場合と同様、サイトカイン類に加え、複数の低分子化合物を添加したところ、50%以上の細胞に sucrase-isomaltase のタンパク質発現が認められた。また、CYP の活性に加え、UGT 及び SULT 活性も認められた。さらに、腸管上皮細胞特徴的な機能として CYP3A4 の活性化型ビタミン D₃

による顕著な誘導も認められたことから、機能を有する細胞に分化したことが示唆された。本技術は、現在特許申請中であり、詳細な記載はできないが、これまでヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞で薬物動態機能を評価した初めての細胞である。

D. 考察

ヒト iPS 細胞から薬物代謝能および薬物輸送能を有する腸管上皮細胞が作製できれば、小腸における薬物動態研究に多大なる影響を与えることができる。また、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞及び腸管上皮細胞を用いて薬物動態の評価系が構築されれば、より優れた動態特性を有する医薬品の開発にも貢献できるものと考えられる。さらに、ヒト iPS 細胞由来肝細胞及び腸管上皮細胞の結果を、臨床研究から得られる初回通過バイオアベイラビリティの結果と比較し、そのギャップを *in silico* で補正できれば今後薬物動態試験での利用が期待できる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞由来の未熟な肝細胞の結果から、成熟した肝細胞における薬物動態あるいは安全性評価の結果を *in silico* の手法を用いて予測し、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞との組み合わせによる評価系ができれば、iPS 細胞の創薬研究への利用は加速するものと思われる。

F. 研究発表

1. 奥村 啓樹、鶴飼 茜、佐藤 大介、宮本 智美、三好 一郎、平林 真澄、中村 克徳、松永 民秀：ブラストシストインジェクションによるラット iPS 細胞由来細胞を持つキメラマウスの作出。日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本、30pmL-116S)
2. 小野里 太智、佐藤 大介、小枝 暁子、

中村 克徳、松永 民秀:カニクイザル皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立. 日本薬学会第 134 年会(2014, 3, 熊本、30pmL-117S)

3. 大手 万里子、佐藤 大介、前田 徹、中村 克徳、松永 民秀:糖原病 Ib 型患者由来 iPS 細胞を用いた好中球モデルにおける PKC を介した NOX2 活性化機序の解明. 日本薬学会第 134 年会(2014, 3, 熊本、30pmL-118S)

G. 知的所有権の取得状況

無し

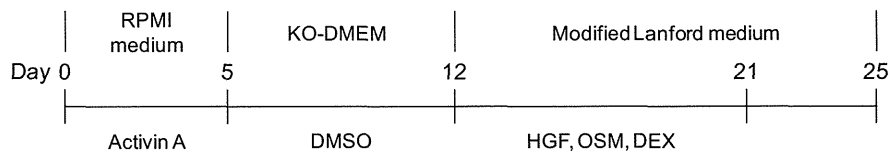


Fig. 1. Schematic of the protocol for the differentiation into hepatocytes from 2 human iPS cell lines. Two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were differentiated into endoderm cells by addition of 100 ng/mL activin A for 5 days, and then into hepatocytes by the addition of 1% DMSO for 7 days. The hepatocytes were then matured by the addition of 10 ng/mL HGF, 20 ng/mL OSM, and 100 nM DEX for 9 days. For the final 4 days, the cells were cultured in modified Lanford medium alone, without HGF, OSM, and DEX.

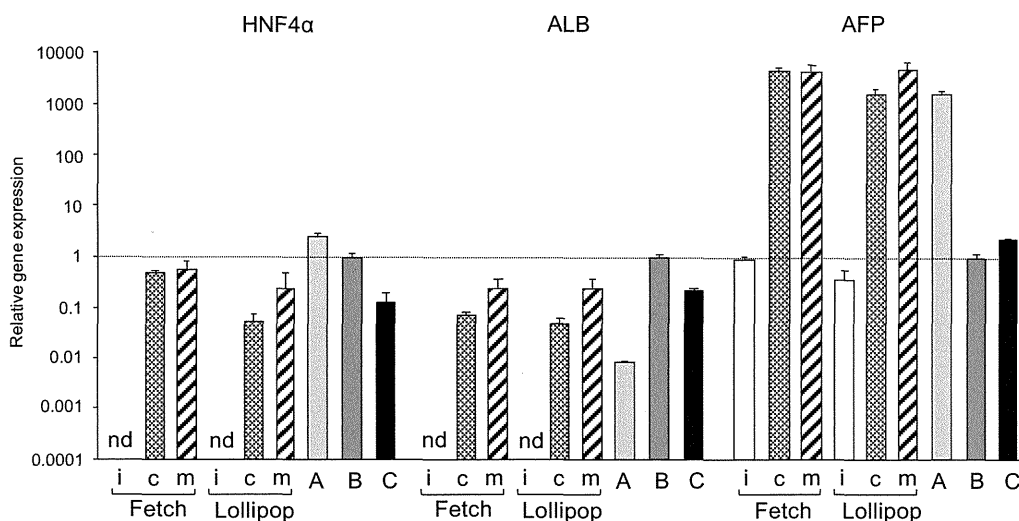


Fig. 2. Expression levels of liver marker protein mRNAs

The expression levels of HNF4α, ALB, and AFP mRNAs in undifferentiated human iPS cells (i) and hepatocyte-like cells differentiated from two human iPS cell lines (Fetch and Lollipop) were analyzed using real-time PCR. Collagen I (c) or Matrigel (m) was used for the differentiation as the extracellular matrix. A, B, and C present HepG2 cells, human adult liver, and hepatocytes, respectively, as positive controls. Each bar represents the mean \pm SD from triplicate experiments. Values were normalized to the level of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the liver was taken as 1. nd, not detected.

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
化粧品等の QSAR/in silico/インフォマテクス技術等の安全性評価応用
に関する調査研究
平成 25 年度分担研究報告

－毒性評価データベースに関する動向調査－

研究分担者：水口 賢司（(独)医薬基盤研究所 バイオインフォマテクスプロジェクト
プロジェクトリーダー）

研究要旨：インシリコでの毒性予測や毒性発現メカニズムの解明には、化学構造に加えて化合物暴露に対する遺伝子発現情報などの利用が有効であると考えられている。そのようなトキシコゲノミクス研究の進展には、大規模な遺伝子発現情報をコンピュータ解析可能な形で如何に整理して、他のデータと統合するかが鍵になる。本研究では、毒性評価の基礎となるデータベースの現状を調査し、毒性メカニズムのモデリングに向けた将来への展望を議論した。

キーワード：トキシコゲノミクス、遺伝子発現情報、データ統合、モデリング

A. 研究目的

化学構造と活性との関係をモデル化する定量的構造活性相関（quantitative structure-activity relationship; QSAR）は、結合親和性などの比較的単純なエンドポイントに対しては有効で、幅広く用いられているが、肝毒性などへの適用には限界がある。実際、Lowらは（Low *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* 24:1251-1262, 2011）、後述のトキシコゲノミクスプロジェクトによるデータを解析し、QSARによる化合物の肝毒性予測では、限られた精度しか達成できないことを報告している。そのため、化学構造以外の情報、特に実験的に取得した遺伝子発現情報を利用して毒性発現メカニズムの解明や毒性予測を目指すトキシコゲノミクスに期待が持たれている。遺伝子発現情報などの大規模データから経験則を抽出して現象をモデリングする試みは、工学、

医学、薬学を含む幅広い分野でさかんに研究が進められている。そのような研究の前提として、現象に関連するデータが、コンピュータ解析可能な形で整理されている、すなわちデータベースが整備されていることが重要である。そこで本研究では、毒性評価の基礎となるデータベースの現状を調査し、その展望と課題を明確化することを目的にした。

B. 研究方法

関連データベースは、文献検索やインターネット上の検索により調査した。我々自身が開発した、トキシコゲノミクス統合解析プラットフォーム Toxygates は、後述の Open TG-GATEs による公開データを元にして、セマンティックウェブ技術と key-value ストアと呼ばれるデータベース技術を用いて構築した（詳しくは、

Nystrom-Persson *et al.*, *Bioinformatics*, 29:3080-3086, 2013)。これらのデータベースをウェブ上の操作により比較、検討した。

C. 研究結果

(1)毒性評価に関連する既存データベース

官民共同研究としての日本のトキシコゲノミクスプロジェクト(以下、TGP と呼ぶ。<http://www.tgp.nibio.go.jp/index.html>)は、医薬品などの化合物をラット個体や細胞に暴露した際の毒性情報と遺伝子発現情報を網羅的に収集することで、創薬研究早期での毒性発現メカニズムの解明や毒性予測を目指したものである。Open TG-GATEs というデータベース名で、遺伝子発現データ、病理所見と高解像度病理画像、生化学データが公開されている(<http://toxico.nibio.go.jp>)。

一方、海外の関連するデータベースとしてまず、Comparative Toxicogenomics Database をあげることができる(<http://ctdbase.org>; Davis *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 41, D1104–D1114, 2013)。このデータベースは、文献情報のキュレーションにより、医薬品と遺伝子や疾患との関係性をまとめたものだが、実際の遺伝子発現データについては提供されていない。遺伝子発現データの大規模データベースとしては、Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Barrett *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 39, D1005–D1010, 2011) や ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>; Rustici *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 41, D987–D990, 2013)が存在する。これらには、化合物暴露に対する遺伝子発現の変

化についての実験データが多数格納されており、トキシコゲノミクス研究に大いに関連するデータベースと言える。但し、これらのデータベースは毒性学に特化したものではなく、遺伝子発現データ一般についてのレポジトリであるため、測定プラットフォーム、対象となる生物種、化合物の種類や投与方法、その他実験プロトコルについて、多種多様なデータが混在している。従って、毒性評価のためのデータ解析には、やや使いづらい面もある。DrugMatrix (<https://ntp.niehs.nih.gov/drugmatrix/index.html>; Ganter, *et al.*, *J. Biotechnol.*, 119, 219–244, 2005)は、600以上の化合物をラット個体に投与した際の遺伝子発現データをマイクロアレイにより収集したものである。上記のTGPデータは、化合物数としてはDrugMatrixに及ばないが、統一された実験デザインに基づいて、より多くの投与量や時点でのデータがあり、系統的なトキシコゲノミクス解析に有利な点を持っている。

The Connectivity Map(以下、cmapと呼ぶ。<http://www.broadinstitute.org/cmap/>; Lamb *et al.*, *Science*, 313, 1929–1935, 2006)は、生物活性を持つ化合物をヒト培養細胞に暴露した際の遺伝子発現情報を網羅的に収集して公開している。後述する、我々の開発したToxygatesと同様、遺伝子発現パターン類似度に応じて化合物をランキングするシステムを提供している。但し、cmapでは、複数のプラットフォームを用いた測定がなされているため、コルモゴロフスミルノフ検定によって化合物の順位付けを行なっているが、Toxygatesの場合は、元になるTGPデータが単一プラットフォームを採用しているため、より直接的な発現データ間の相関係数を用いたランキング

が可能になっている。

ToxBank (<http://toxbank.net>; Kohonen *et al.*, *Mol. Inform.*, 32, 47–63, 2013)は、毒性評価のための、より一般的なデータ統合プラットフォームを目指している。遺伝子発現データ解析に限らず、毒性学研究一般についてのデータが提供されている。

(2)トキシコゲノミクス統合データ解析プラットフォームとしての Toxygates

上で述べたように、TGP によるトキシコゲノミクスデータは、統一したプラットフォームとプロトコルを特徴とし、毒性評価の基礎データとして極めて重要なものである。但し、Open TG-GATEs データベースでは、マイクロアレイの生データのダウンロードを可能にしているだけで、データの統合や解析という機能は提供されていない。そこで我々は、セマンティックウェブと呼ばれる技術を用いて、Open TG-GATEs と KEGG データベースによるパスウェイ情報 (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.htm> 1)、Gene Ontology 機能注釈情報 (<http://www.geneontology.org/>)、ChEMBL データベースからの化合物ターゲット情報 (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)等の外部データとを統合し、化合物投与に反応する遺伝子の同定と絞り込みが可能なシステムを構築した。Toxygates と名付けたこのシステムは、トキシコゲノミクスデータ統合解析プラットフォームと位置づけることができる (<http://toxygates.nibio.go.jp>; Nystrom-Persson *et al.*, *Bioinformatics*, 29:3080-3086, 2013)。Toxygates を用いることで、特定の化合物投与後にどのよう

な遺伝子が発現変動したかを調べ、それと似たような反応を示す他の化合物をランキングすることが可能になった (図 1)。現在、このデータベースシステムを拡張して、アジュバント (免疫賦活剤) の有効性と安全性の指標となるバイオマーカー探索の基礎となるデータベースの構築を進めている (<http://adjuvantdb.nibio.go.jp>)。

D. 考察

本研究で調査したデータベースの中でも、TGP データ (Open TG-GATEs および Toxygates) は、統一したプラットフォームとプロトコルに基づく動物個体に対する大規模なデータとして貴重なものと言える。また、同じ化合物を細胞に暴露した際の遺伝子発現情報についても収集されているので、個体レベルと細胞レベルとの架け橋となる可能性も有している。但し、単純に発現量変動遺伝子を比較するという解析では、ラット個体と細胞でのデータには大きな差があり、両者を結びつけることは難しく思われる。化合物作用と遺伝子発現というエンドポイントの間には、シグナル伝達や転写制御など様々なプロセスが関与しており、それらに関して何らかのモデル化を試みることで、より抽象的なレベルで個体レベルと細胞レベルのデータを関連付けることが必要であろう。複雑なシグナル伝達プロセスのモデル化は容易ではないが、そのネットワーク構成要素に関しては、タンパク質間相互作用、化合物—タンパク質相互作用、転写因子—標的遺伝子相互作用などについて、多くのデータが公共データベース上に蓄積されつつある。Open TG-GATEs による遺伝子発現情報と公共データベース上のパスウェイや化合物情

報を統合する Toxygates は、そのようなデータ統合に向けた試みの最初のステップと位置づけることができる。また、170 程度という化合物の数は、化学構造に基づく毒性評価という目的には極めて少なく、今後大規模に動物個体による実験データを追加していくことは困難であろうから、上記のインシリコ解析により個体と細胞とを関連付けるモデル化を行ない、それに基づいて細胞レベルでの実験をデザインして遂行するという戦略が有効ではないかと考えられる。

E. 結論

本研究では、毒性評価の基礎となるデータベースの現状を調査することで、今後のインシリコ毒性予測への期待とその実現に向けた課題を明らかにした。考察で述べたように、ドライの解析が主導する形で実験をデザインし、より一層のデータの蓄積と統合を実現できるかが、今後のこの分野の進展の鍵になると考えられる。そのためには、ウェットとドライ研究の緊密な連携が必須であろう。

F. 研究発表

学会発表

1. 水口 賢司：データ統合とネットワーク解析による創薬初期研究の支援、第3回シスメックスプロテインカンファレンス (2013-10-18、品川プリンスホテル)
2. 水口 賢司：データ統合とネットワーク解析による創薬支援、第9回霊長類医科学フォーラム (2013-11-14、文部科学省研究交流センター)
3. 水口 賢司：創薬の初期研究におけるデータ統合：ターゲットと安全性

の評価、第345回 CBI 学会研究講演会 (2014-1-9、東京大学山上会館大会議室)

4. 水口 賢司：‘アジュバントゲノミクス’に向けた統合データベースの現状、第7回次世代アジュバント研究会 (2014-1-21、千里ライフサイエンスセンター)
5. 水口 賢司：データベースは、創薬初期でのターゲット評価と安全性の予測に役立つか？、MEDALS 第三回データベース講習会 (2014-1-24、産総研・関西センター)

G. 知的所有権の取得状況

無し

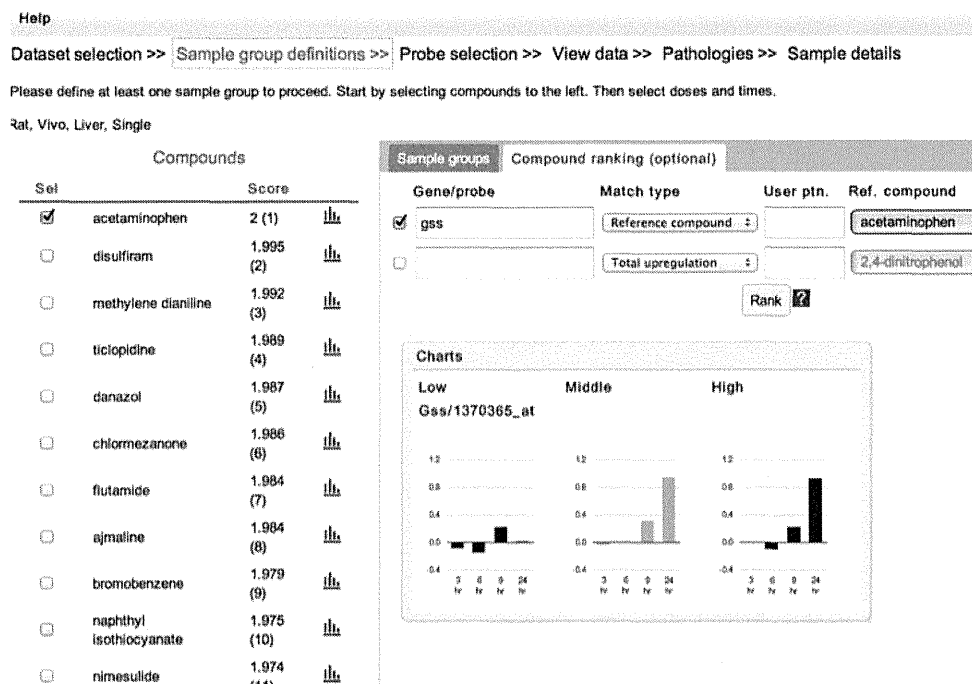
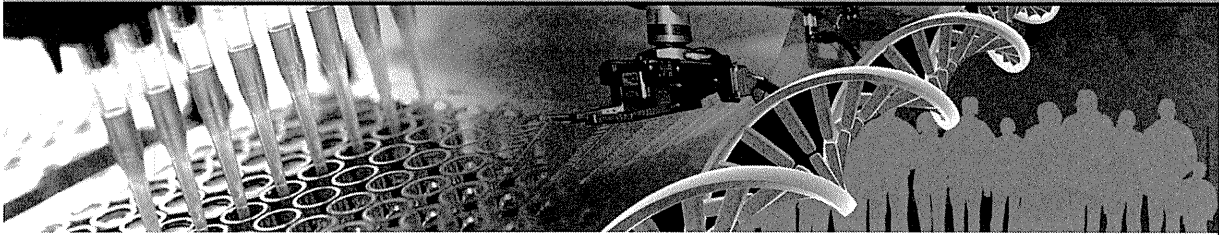


図1 トキシコゲノミクスデータ統合解析プラットフォーム Toxygates による、遺伝子発現パターンを用いた化合物ランキング

【添付資料】



NTP
National Toxicology Program



Tox21: A U.S. Federal Collaboration to Improve the Human Hazard Characterization of Chemicals

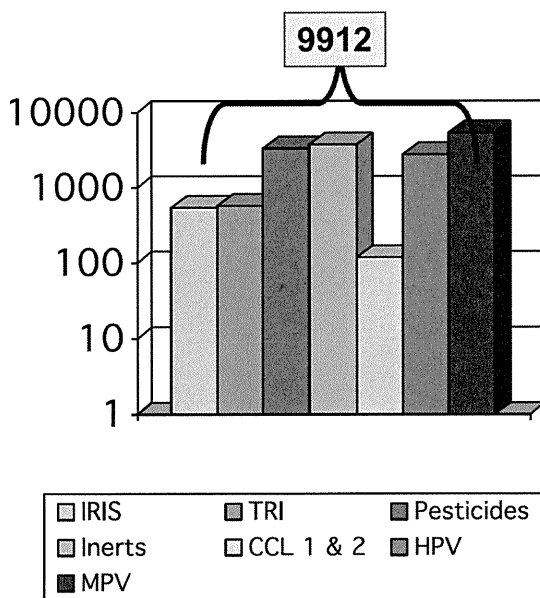
Raymond Tice, Ph.D.
Chief, Biomolecular Screening Branch
(tice@niehs.nih.gov)

BSRC Regulatory Science Symposium
Shinagawa, Japan

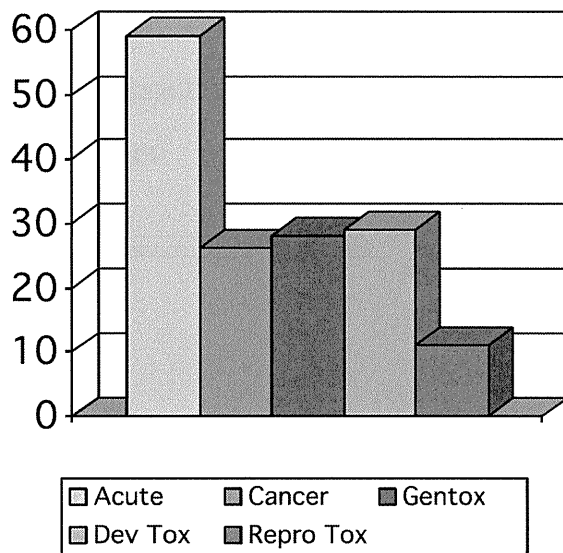
February 21, 2014

Our Need for Prioritization

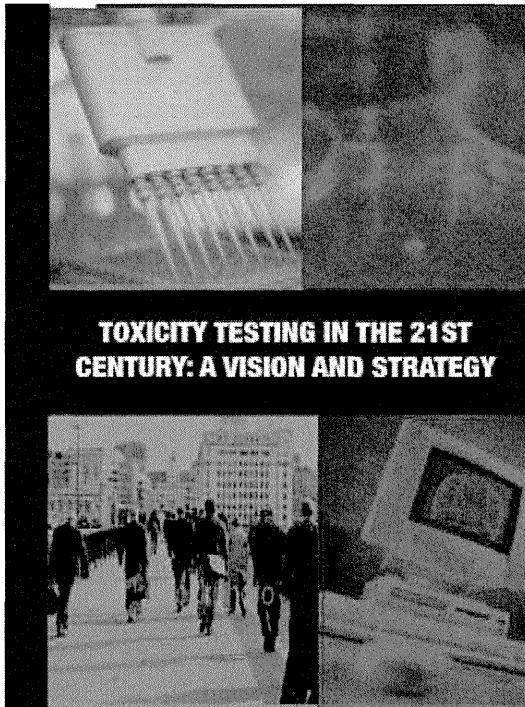
Too Many Chemicals



Too Little Data (%)



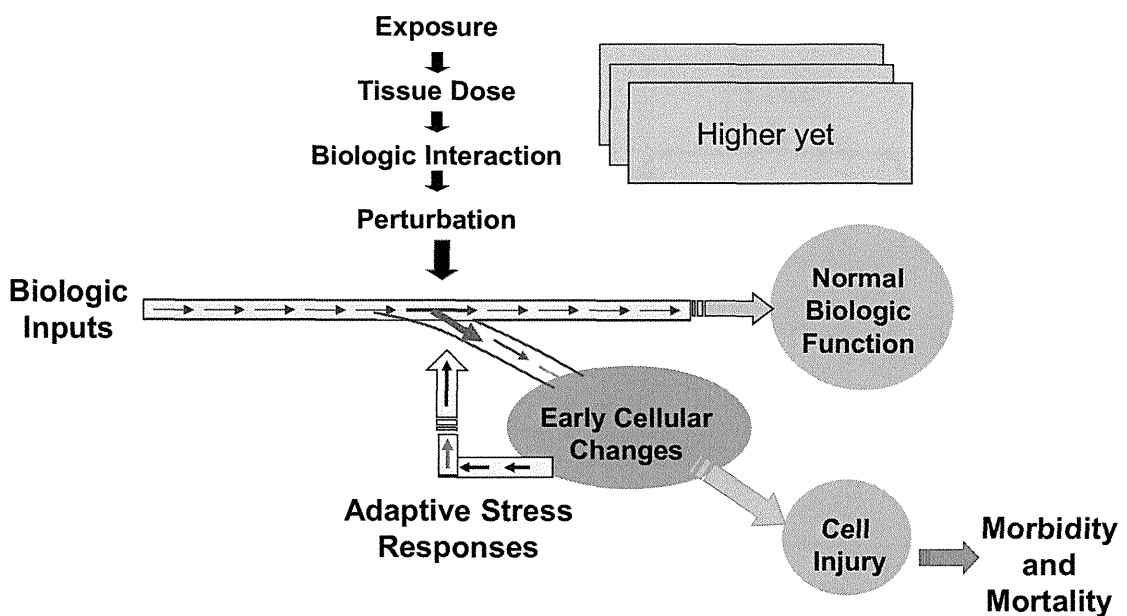
Toxicity Testing in the 21st Century



This 2007 National Academy of Science report envisions a **not-so-distant future** in which virtually all routine toxicity testing would be conducted *in vitro* in **human cells** or cell lines by evaluating **perturbations of cellular responses** in a **suite of toxicity pathway assays** using **high throughput robotic assisted methodologies**.

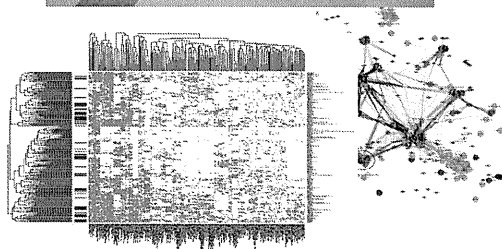
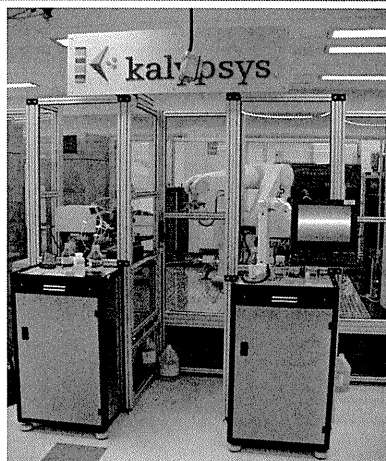
4

Activation of a Toxicity Pathway

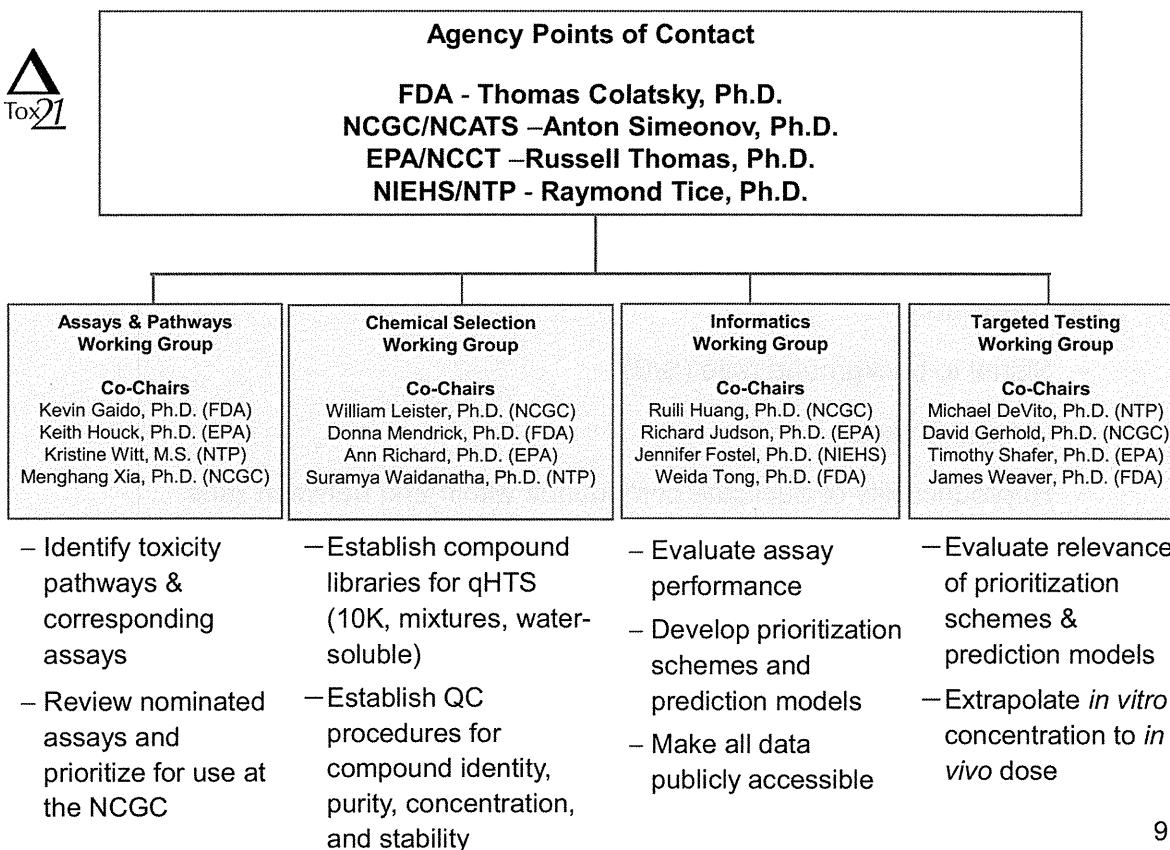


Tox21 Goals

- Identify patterns of compound-induced biological response in order to:
 - characterize toxicity/disease pathways
 - facilitate cross-species extrapolation
 - model low-dose extrapolation
- Prioritize compounds for more extensive toxicological evaluation
- Develop predictive models for biological response in humans



7



9

Tox21 Phase I – Proof of Principle (2005 – 2010)

- EPA via ToxCast™ screened 320 compounds (309 unique, primarily pesticide actives and some endocrine active compounds) in ~550 assays.
 - Data made public via ACToR (Aggregated Computational Toxicology Resource; <http://epa.gov/actor>)
- NCGC screened 1408 compounds (1353 unique) from NTP and 1462 compounds (1384 unique) from EPA in 140 qHTS assays representing 77 predominantly cell-based reporter gene endpoints.
 - Data made public via PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) and will be available in CEBS (Chemical Effects in Biological Systems; <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/databases/cebs/>)

10

Conclusions from Tox21 Phase I

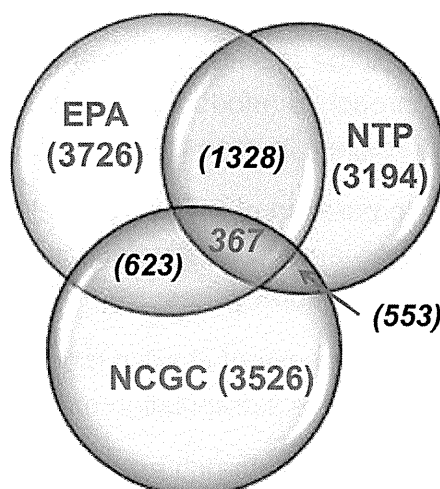
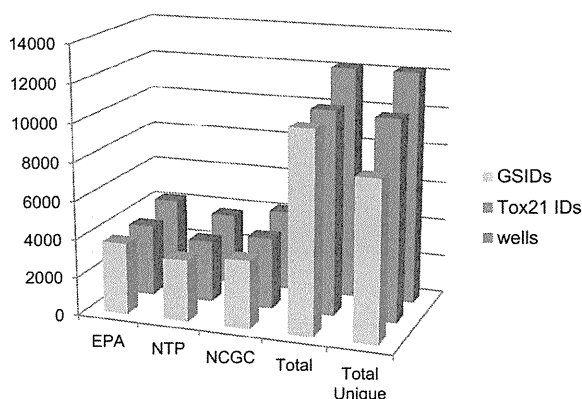
- qHTS can be used to screen libraries of environmental compounds against targets with known biological significance
- Cell lines are more suitable for qHTS assays than primary cells
- High quality data are essential for automated data analysis and interpretation
 - Signal to background ratio (S/B)
 - CV and Z' factor
 - Reproducibility of duplicate compounds within and between runs
- Biological relevance is critical: do the results make sense based on available standard toxicity test data and/or human data
 - Importance of reference compounds
- Significant limitation remains the lack of hepatic metabolic activation

Tox21 Phase II – Expanded Compound Screening (2011 – 2014)

- EPA's ToxCast™ Phase II: ~700 compounds in ~700 assays, ~1000 compounds in endocrine activity assays
- NCGC qHTS Phase II:
 - 10K compound library screened 3 times at 15 concentrations in each qHTS assay
 - qHTS assays focused on:
 - nuclear receptor activation or inhibition
 - induction of cellular stress response pathways
 - characterizing human variability in response
- Partner-lead projects
 - cardiotoxicity (FDA)
 - endocrine disruptors (EPA)
 - genotoxicity (NIEHS/NTP)
 - mitochondrial toxicity (NCATS)

14

Tox21 10K Compound Library



Library tested 3x in each assay

Unique	EPA	NTP	NCGC	Total	Total Unique
GSIDs	3726	3194	3524	10444	8307
Tox21 IDs	3729	3210	3733	10672	10496
wells	4224	3726	4224	12174	12174

unique substances
unique solution IDs
total number of test cmpd wells

88 single-sourced
cmpds in duplicate
on each plate

2255 replicate substances (GSIDs) across 3 inventories

Compound identity and structures available at http://www.epa.gov/ncct/dsstox/sdf_tox21s.html

15

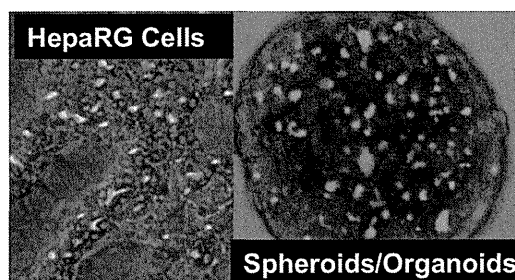
Tox21 Phase II Advantages and Limitations

- Extent of **pathway coverage**
- Focus on the use of **reporter gene assays** using immortal cell lines
- Focus on **single compounds**
- Limited capability for **xenobiotic metabolism**
- Focus on **simple** biological systems
- Limited to **acute exposure** scenarios
- Limited availability of **“big” data analysis tools**
- Limited availability of high quality **human toxicological data**

22

Tox21 Phase III – Improving on Biological Coverage and Relevance (2013 - ?)

- Goal to develop more physiologically-relevant /predictive in vitro and lower organism approaches (models/assays/data interpretation strategies) to assess chemical toxicity potential
- Incorporation of xenobiotic metabolism & longer-term cumulative exposures into current and new approaches
- Increased use of *in silico* models and quantitative extrapolation models
- Integrated, data-rich assay approaches capturing various molecular pathways & cellular phenotypes
- Mechanistic studies integrating to Adverse Outcome Pathways (AOPs)
- Expand collaborations and interactions



Near-Term Targeted Assays

- High Content screening
 - Hoechst: Cell loss & nuclear size
 - DHE: Oxidative stress/ROS
 - p53: DNA damage
 - pH2A.X: Genotoxicity
 - JC-10: Mitochondrial damage (MMP)
 - Caspase 3: Apoptosis
 - Lipitox: Steatosis & Phospholipidosis
 - Reactive metabolites/ROS: GSH depletion
- Gene expression assays
 - ~1000 genes, multiple species

23

In Silico Analysis of the 10k Library for Xenobiotic Metabolism

Identify Practicable Approaches for 10k chemicals

- Metabolite Structure Predictions (human enzymes)
- Extent of Metabolism Predictions (metabolic clearance)

Assess Predictivity of Approaches

- Assess accuracy via known substrates
- Do we predict true metabolites
- Assess extent of metabolism predictions

Analyze 8,307 Chemical Structures (10k Library)

- P450 & UGT Substrate Predictions
- CL_{INT} Predictions (combined via liver expression levels)

Predict Metabolite Structures

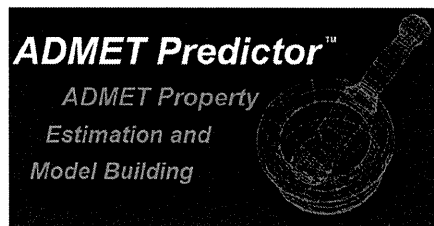
- Assess accuracy of metabolite structure predictions

Assess Predicted Structures via QSAR models

- Toxicity Predictions
- ADME/Permeabilities
- Physicochemical Properties

Rank/Prioritize Chemicals for Assays in Metabolically Competent Model Systems

- Predicted Toxicities via chemical structure alerts
- Extent of metabolism predictions
- Reactive Metabolites?



QSAR Predictions

Physicochemical

- LogP, Lipinski Rule of 5, pH, solubility (water, salt, GI), blood/plasma ratio

Human Metabolism

- Substrate, inhibitor, CL_{INT}, SOM, Metabolite Structures,

ADME

- Gut absorption & permeability, skin permeability, cornea permeability, blood-brain barrier permeability, uptake transport, efflux transport,

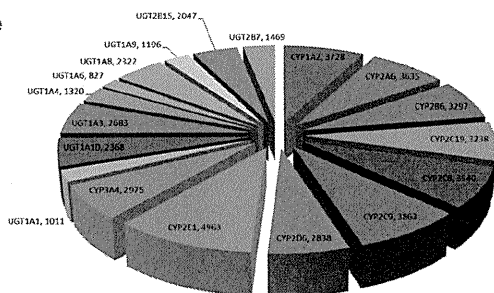
Toxicity

- 22 QSAR model toxicity predictions
- Human, Rat, Mouse, Aquatic
- LD50, Mutagenicity, ALT, AST, Alk. Phos., LDH, phospholipidosis, reproductive, ER binding, AR binding

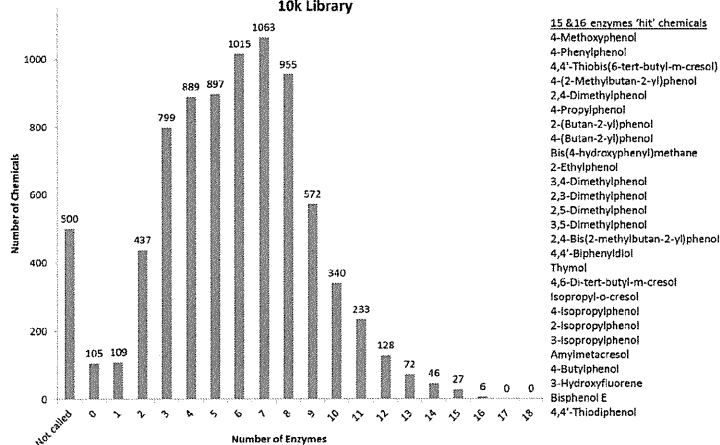
24

10k Library Xenobiotic Metabolism Predictions

Substrate Calls



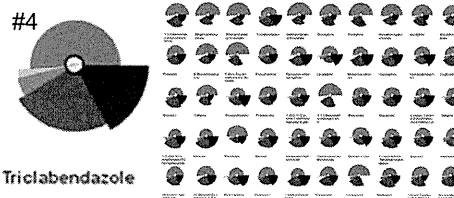
Histogram of the Substrate Calls from ADMET-Predictor for the Tox21 10k Library



Extent of Metabolism Predictions

- CL_{INT} predicted for 5 individual P450s
- Combined CL_{INT} from 5 Enzymes in ToxPi
- Weighted each enzyme CL_{INT} contribution by relative P450 expression levels

#4



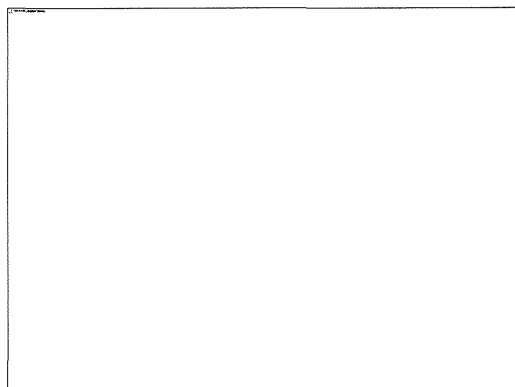
Triclabendazole

- 168,805 unique metabolites predicted
- Evaluating ability to predict known metabolites in library
- Assessing 10k library & 169k metabolites with various toxicity prediction models

25

The NCATS BioPlanet: the universe of biological pathways for assay selection and prioritization

- Hosts the universe of human pathways (~1600 unique)
- All pathway annotations from manually curated, public sources (e.g., KEGG, WikiPathways, Reactome, Science Signaling)
- Integrates pathways from >10 different data sources
- Annotates pathways by source, biological function/process, disease/toxicity relevance, assay availability
- Easy visualization, browsing, analysis of pathways
- Facilitates pathway assay selection/prioritization for Tox21 production phase
- Web version in process for public release

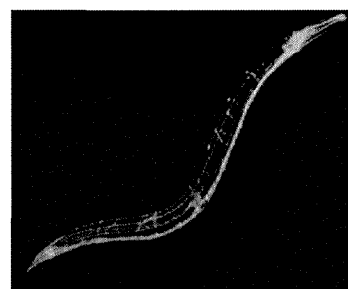


From Ruli Huang, NCATS 27

Alternative Organisms – *C. elegans* and Zebrafish

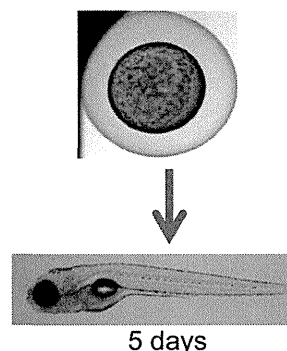
C. elegans (NIEHS/NTP)

- Screened ToxCast Phase II compounds in growth assay
- Screening subsets of compounds in assays that measure
 - feeding
 - larval lethality
 - reproduction



Zebrafish – R. Tanguay (Sinnhuber Aquatic Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, OR)

- Screened ToxCast Phase II compounds
- Screening 3455 NTP compounds at ~ 64 μ M
- Assays include
 - 1 day photo induced behavior
 - 1 day assessment of mortality/developmental progression
 - 5 day photo motor response
 - 5 day assessment of 20 morphological endpoints



28

Human Stem Cell Related Projects

- Collaboration with Cellular Dynamics and Molecular Devices to screen 80 compounds (focus on **neurotoxicants, cardiotoxicants, mitochondrial toxicants**) in:
 - Neurite outgrowth assay/mitochondrial membrane potential
 - Beating cardiomyocyte assay/mitochondrial membrane potential
- Collaboration with QPS, PhoenixSongs Biologicals, & the Hamner Institutes to evaluate biological activity of the 80-compound library in various human and rat neuronal cell culture systems (e.g., primary, embryonic stem cell–derived, induced pluripotent stem cell–derived, transformed neural cell lines)
- Collaboration with XCell to characterize response of **iPSC-derived neural populations (e.g., dopaminergic) from Parkinson’s disease** (familial & sporadic) using the 80-compound library
- Collaboration with the Buck Institution to screen the 80-compound library in hTERT astrocytic cell lines to identify **senescence-inducing agents** and verify results from the screen in primary human astrocytic cultures.
- Collaboration with the Univ. Konstanz to screen the 80-compound library in assays that evaluate **migration of neural crest cells/neurite outgrowth** in a human cell line.

29

Tox21 Phase III

- Greatly increased **pathway coverage**
- Focus on **high content screening** using normal human cells
- Focus is still on **single compounds but increased interest in mixtures**
- Expanded capability for **xenobiotic metabolism**
- Focus on **more complex** biological systems
- Potential for more **extended exposure** scenarios
- Expanded availability of **“big” data analysis tools**

32

Success depends on

- Robust scientific collaborations
- Well-characterized chemical libraries
- Well-characterized assays in terms of reliability and relevance, with broad biological coverage
- Incorporating xenobiotic metabolism into *in vitro* assays
- Informatic pipelines/tools that integrate and mine diverse data streams
- Understanding the relationships between pathways and disease in humans and animal models
- Making all data public
- Outreach to the scientific community on the usefulness and limitations of Tox21 data

37

What will success bring?

- Test methods for toxicity testing that are scientifically sound and more economically efficient
- An increased ability to evaluate the large numbers of chemicals that currently lack adequate toxicological evaluation
- Models for risk assessment that are more mechanistically based
- Reduction and/or replacement of animals in regulatory testing

38