

令和5年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）（23KD1003）
達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究

分担研究報告書

分担研究課題：「In vitro DNT 評価手法の開発」

研究分担者 大久保 佑亮 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTのin vitro試験法が開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。本研究では、DNTを発生期と生後発達期とに分け、2つの独自技術による課題の解決を試みる。本分担研究課題は、そのうちの発生期のin vitro試験法の開発であり、独自開発したヒトiPS細胞を用いたin vitro発生毒性試験法(DynaLux/c)のDNT試験への改良を目的とする。DynaLux/cは、まず、FGFシグナルレポーター導入ヒトiPS細胞を、96穴プレートに播種し、被験物質によるFGF誘導性のSRFシグナル影響を、24時間計測する。次に、溶媒対照に対する各物質のシグナルかく乱作用を求め、ROC曲線解析によって閾値を設定する。適用実験後、その正確度、特異度、精度といった性能指標を求め、化学物質のシグナルかく乱作用を評価する。

本年度の研究では、DynaLux/cのスループット性と再現性を高めるために、リアルタイム自動計測法への改良を試みた。従来の生細胞FGFシグナル計測は、実験者がCO₂インキュベーターにおいて96穴プレートで培養している細胞を計測ごとにルミノメーターに設置し、測定後にCO₂インキュベーターに戻すという手作業で計測を行っていた。この手法は、定点観察であるため、特に夜間のシグナルかく乱作用を正確に計測できないこと、及び、細胞の移動によるiPS細胞への物理的影響が課題であった。事実、従来法では夜間の不自然な波形や標準偏差の大きさがみられている。そこで、今年度は96穴プレートで細胞を培養しながら発光測定が可能なKronosHT (ATTO社)を本試験系に導入し、スループット性と再現性を向上させた。

A. 研究目的

本研究では、DNT を発生期と生後発達期とに分け、2 つの独自技術による課題の解決を試みる。本分担研究課題は、そのうちの発生期の *in vitro* 試験法の開発であり、独自開発したヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法(DynaLux/c)の DNT 試験への改良を目的とする。

従来の生細胞ルシフェレースアッセイ法を用いた FGF-SRF シグナル計測は、実験者が CO₂ インキュベーターにおいて 96 穴プレートで培養している細胞を計測ごとにルミノメーターに設置し、測定後に CO₂ インキュベーターに戻すという手作業で計測を行っていた。この手法は、定点観察であるため、特に夜間のシグナルかく乱作用を正確に計測できないこと、及び、細胞の移動による iPS 細胞への物理的影響が課題であった。事実、従来法では夜間の不自然な波形や標準偏差の大きさがみられている。

本年度の研究では、DynaLux/c の正確性やスループット性、再現性を高めるために、リアルタイム自動計測法への改良を試みた。

B. 研究方法

これまでに我々は、胚発生過程において重要な役割を果たすシグナルとして FGF シグナルについて検討し、その下流で発現する血清応答因子 (serum response factor : SRF) の応答配列下で NanoLuc (Nluc) を発現する FGF-SRF シグナルレポーターコンストラクトを作製した。それをヒト iPS 細胞のゲノム上のセーフハーバー領域の一つである AAVS1 領域に CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集によりノックインし、SRF シグナルレポーター-iPSCs 株を樹

立した。本研究では、FGF-SRF シグナル計測を自動化するために、細胞培養をしながらリアルタイム発光計測が可能な KronosHT (ATTO 社) を導入した。KronosHT を用いて、FGF-SRF シグナル計測法を最適化すると共に、数種の発生毒性物質を用いてその正確性を検証した。

C. 研究結果及び考察

KronosHT を用いた DynaLux/c 法の開発に成功した。まず、KronosHT を用いて 72 時間以上のリアルタイムルシフェレース計測を行ったところ、FGF シグナルは 2 回振動することを発見した。しかしながら、この振動の周期、ピークは計測ごとに異なることが明らかになった。数々の条件検討を行い、96 穴プレートに播種する以前の iPS 細胞の培養法を厳格に規定すること及び、96 穴プレートにおけるエッジ効果を抑制するためのガス透過性の不織レーヨン性のシールを用いて培養することにより、再現性のある波形パターンの取得に成功した。

KronosHT の導入により、シグナル計測条件が従来の 24 時間の定点観測 (0、2、4、6、8、10、24 時間後) から 72 時間以上のリアルタイム計測へと改良され、測定時間及び時間解像度が上昇した。その結果、手動計測では FGF-SRF シグナルは 6 時間をピークとした一過性の活性を示すと考えられていたが、リアルタイム計測により 2 回ピークを示すことが明らかになった。従来法での 10 時間目から 24 時間目の間に 1 回目の振動の底があり、24 時間目の計測は 2 回目の振動のシグナルが上昇している途中を捉えていたことが明らかになった。また、振動の長さが 1 回目と 2 回目で異なることも

判明した。

本法を用いて、発生毒性陽性物質であるバルプロ酸ナトリウム(抗てんかん剤：**DNT陽性物質**)、5-FU(抗がん剤)、陰性物質であるサッカリン ナトリウム(人工甘味料)、シメチジン(ヒスタミン H₂受容体拮抗薬)のFGF-SRFシグナルかく乱作用を調べた。その結果、バルプロ酸はFGF-SRFシグナルの振動ピークにおいて1回目(5時間前後)よりも2回目(30時間前後)の方が強くかく乱作用を示すことが明らかになった。また、5-FUは濃度依存的にシグナルかく乱作用を示す時間が早まることが明らかになった。陰性物質はいずれもシグナルかく乱作用を示さなかった。

D. 結論

発生期の *in vitro* DNT 評価手法の開発に向け、従来の手動計測から自動測定を検討した結果、72時間以上の再現性のあるシグナルかく乱作用の取得が可能となった。また、従来の24時間計測では明らかにできなかったバルプロ酸の24時間以降の大きなシグナルかく乱作用を発見した。バルプロ酸はHDAC阻害剤としても知られており、ヒストンの脱アセチル化を阻害することで転写を活性化するエピジェネティック作用が知られている。この結果は、DNTの発生毒性発現機序にはエピジェネティック毒性も関与する可能性が示唆された。一方で、数日間のリアルタイム計測が可能となったことで、データ量が増え、シグナルかく乱作用の算出法は様々な視点で解析が可能になるなど複雑化した。次年度は神経幹細胞を用いた、DynaLux/cを開発すると共にシグナルかく乱作用の算出法に関しても取り組む

予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

大久保 佑亮、福田 淳二：生細胞ルシフェラーゼアッセイを用いた FGF シグナルかく乱作用解析による発生毒性評価 生化学みにれびゅう 第 95 巻第 2 号, pp. 1-6 (2023)

2. 学会発表

大久保 佑亮：「ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱作用のダイナミクスに基づく発生毒性試験法の開発」, 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム 2023 年度年会「多能性幹細胞を用いた薬剤安全性評価への挑戦と課題」特別講演 2023 年 6 月 2 日

大久保 佑亮：「シグナルかく乱作用のダイナミクスに基づくヒト発生毒性の評価法とその発達神経毒性への応用」, 第 63 回日本先天異常学会学術集会「若手ピックアップシンポジウム」, 2023 年 7 月 29 日

大久保 佑亮：「生細胞リアルタイム発光システムを用いた高精度・ハイスループットな新規発生毒性試験法」, AMED キャタリストユニット 第 11 回 Top Runners in TRS, 2023 年 8 月 22 日

Okubo Y., Mizota K., Shibata M., Ohara R., Kitajima S., Hirabayashi Y., Nakajima Y., Fukuda J.: DEVELOPMENTAL TOXICITY TEST USING HUMAN IPS CELLS BASED ON SIGNAL

DISRUPTIONS INDUCED BY
CHEMICAL SUBSTANCES. 12th World
Congress on Alternatives and Animal Use in
the Life Sciences (WC12), Niagara Falls,
Canada. (Aug. 30, 2023).

Yusuke Okubo: 「Developmental toxicity
detection via dynamics of FGF-SRF signal
disruption in human iPSC-based assay」.
13TH Global Summit on Regulatory Science
(GSRS23) In-Person Annual conference.
Sep. 27, 2023.

大久保 佑亮:「シグナルかく乱のリアルタ
イム計測を基にした in vitro 発生毒性試験」.
第 9 回 日本医療研究開発機構レギュラ
トリーサイエンス公開シンポジウムレギュラ
トリーサイエンスにおける動物試験代替法
の発展～細胞培養技術の進化と展望～.
2023 年 12 月 6 日

大久保 佑亮:「シグナルかく乱作用のダイ
ナミクスを基にした in vitro 発生毒性試験
法」.「生殖発生毒性試験代替法の現状」シン
ポジウム. 主催：基礎研究部会 安全性評価
技術課題対応チーム・代替法課題検討タス
クフォース. 2024 年 2 月 8 日

F. 知的所有権の取得状況
該当なし