

令和6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：「構成的手法に基づいた発生期の in vitro DNT 試験法の開発 (in vitro)」

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 試験法の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説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、血清応答因子(Serum response factor (SRF))シグナルレポーターを導入した未分化ヒト iPSC 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 シグナルへのかく乱作用を連続計測する。適用濃度は、最大溶解量(一部 IC50)を最大濃度とし、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し、正確度、特異度、精度といった性能指標を求め、評価する。昨年度はスループット性と再現性を高めるために細胞培養をしながら連続の発光測定が可能な Kronos HT 装置を用いた 72 時間以上のリアルタイム計測法を開発した。その結果、測定時間及び時間解像度が上昇し、DynaLux/c へ適用が可能なことを確認した。

本年度の研究では、昨年度構築した KronosHT を用いたリアルタイム in vitro 発生毒性試験法を用いて、昨年度分担研究者の桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。これまでに、未分化のヒト iPS 細胞を用いた試験により、陽性対照物質 7 種、陰性対照物質 5 種類を 100%の正確度で分類可能であった。また、従来の未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加え、神経伝達物質受容体を介した DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞まで分化させた試験の構築を進めた。

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。

昨年度は、スループット性と再現性を高めるためにリアルタイム計測法による DynaLux/c を構築した。本年度の研究では、昨年度構築したリアルタイム in vitro 発生毒性試験法を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施する。また、従来の未分化ヒト iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加え、神経伝達物質受容体(Neurotransmitter Receptors :NR)を介した DNT 陽性物質のシグナルかく乱作用を検出するために、ヒト iPS 細胞を神経前駆細胞(Neural Precursor cells (NPCs))まで分化させた試験の構築を進める。

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。昨年度の研究では、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。

今年度は、上記の Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、昨年度桑形が精査した DNT 陽性対照化学物質の試験を実施した。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。上記の DynaLux/c では未分化のヒト iPS 細胞を用いることで、発生期の神経系を対象とした試験系を想定している。一方で、生後発達期の神経系に対する影響 NR を介したものは少なくない。そこで、生後発達期の NR を介したシグナルかく乱を検出するために、NPCs に分化させたヒト iPS 細胞によるリアルタイムシグナルかく乱計測法を開発する。

C. 研究結果及び考察

昨年度は、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。

今年度は、昨年開発した Kronos HT を用いた DynaLux/c を用いて、桑形が精査した DNT 陽性対照物質 7 種 (サリドマイド (THA)、バルプロ酸 (VPA)、メトトレキサート (MTX)、ハイドロキシウレア (HU)、レチノイン酸 (RA)、フルオウラシルウラシル (5FU)、ブロモデオキシウリジン (BrdU)) 及び陰性対照物質 5 種 (ペニシリン (PenG)、サッカリン (SAC)、シメチジン (CM)、D カンファール (CAM)、ジフェンヒドラミン (DHM)) のシグナルかく乱作用を $n=3$ で取得した。適用濃度は、最大溶解量 (一部 IC50) を最大濃度とし、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した。その結果、陽性物質と陰性物質を感度、特異度、正確度 100% で分類可能であった (図 1)。

上記の DynaLux/c は未分化のヒト iPS 細胞を用いて FGF-SRF シグナルに対する化学物質のかく乱作用をもとめており、対象は発生期の DNT である。一方で、生後発達期の DNT を検出するために NR が発現する細胞を用いた DynaLux/c の構築を試みた。文献検索や企業への問い合わせから、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を用いて分化させた NPCs がアセチルコリン受容体 (ニコチン受容体)、グルタミン酸受容体 (NMDA 型、AMPA 型、カイニン酸型)、ヒスタミン受容体、ドーパミン受容体、GABA 受容体を発現すること、そして、再現性や NPCs の保存に関してもデータがそろっていることを確認した。そこで、レポーターヒト iPS 細胞を上記の kit を用いて NPCs へ分化誘導を行った。qPCR により、マーカー遺伝子の mRNA の発現を調べた。その結果、未分化マーカーである *OCT4* の発現低下及び、神経マーカー *PAX6*、*NESTIN* の発現上昇を確認した。次に、NPCs を用いた DynaLux/c の構築のために、SRF シグナル活性化するリガンドを探索した。未分化細胞におけるリガンドである bFGF、そして NPCs への反応性が想定される、SRF の上流として知られる IGF、EGF、BDNF をリアルタイムルシフェーラスアッセイにより確認した (図 2)。その結果、NPCs においても bFGF が最も SRF を活性化させることが明らかになった。また、未分化 iPS 細胞と異なり、NPCs において SRF シグナルは二

峰性を示さなかった。次に、bFGF の濃度を検討したところ、0.2 ng/mL、2 ng/mL、20 ng/mL の濃度で同等の SRF 活性化能を示した(図 3)。

D. 結論

令和 5 年度(初年度)は、I) 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。

今年度(令和 6 年度)は、昨年開発した in vitro DNT 評価手法を用いて、DNT 陽性対照物質 7 種及び陰性対照物質 5 種を正確度 100%で分類に成功した。これらは物質毎にシグナルかく乱の方向性や強さ、時間が異なることから、シグナルかく乱を引き起こす標的が異なることが考えられる。今後、試験物質数を増やすことで、DNT の発現機序にも迫れる可能性がある。

併せて、NR を介した DNT の評価に関して、使用の細胞を検討した。まずは、既存のヒト iPS 細胞を分化させるもしくは NR

発現細胞にレポーター遺伝子をノックインすることを検討し、分化させる場合はどの神経細胞にどの手法で分化させるかについても情報を集めた。今回我々は上記の手法を用いることで、1.再現性良く、2.安定的に、3.多種の NR を発現している、4.多くの、NPCs の誘導法を選定した。文献情報や企業への問い合わせにより、STEMCELL Technologies 社の STEMdiff SMADi Neural Induction Kit を選定し、NPCs への分化を試みた。NPCs の分化誘導に関しては、未分化マーカーの減少及び NPC マーカーの上昇を確認した。今後、免疫細胞化学を用いて、NPCs の特性を明らかにしていく必要がある。並行して、NPCs における、リガンドを探索し、bFGF が最も SRF シグナルの誘導能が高いことを明らかにした。次年度は未分化 iPS 細胞を用いた DynaLux/c に加えて、NPCs を用いた DynaLux/c による DNT 評価法を開発する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

西村拓也, 直田みさき, 大久保佑亮, 平林容子. ICH S6 バイオ医薬品の非臨床安全性評価の見直しについて 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2024, 55, 423-425

Yusuke Okubo, Yoko Hirabayashi, Junji Fukuda. Advances in Genomic Toxicology: In vitro Developmental Toxicity Test based on Signal Network Disruption Dynamics. *Current Opinion in Toxicology* 2024; Volume 39, 100489.

2. 学会発表

Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: in vitro developmental toxicity testing based on real-time monitoring for signal disruption. EUROTOX 2024, Copenhagen, Denmark, (Sep. 9th, 2024).

Yusuke Okubo, Kasu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda: Developmental toxicity testing in human iPS cells through disruption of signal interaction. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Jun. 19, 2024. Kyoto.

大久保 佑亮、溝田 華柊、大原 凜太郎、松浦 利絵子、平林 容子、中島 芳浩、福田 淳二：リアルタイム発光法を用いたシグナルかく乱を基にした in vitro 発生毒性評価法の開発。第 64 回日本先天異常学会学術集会 (2024 年 7 月 27 日) 東京

大久保 佑亮：シグナルかく乱作用を基にした in vitro 発生毒性試験法の開発とその検出機構の解明に向けて。第 51 回日本毒性学会学術年会。2024 年 7 月 3 日

大久保 佑亮：生殖発生毒性試験代替法の in vitro 発生毒性試験法について。2023 年度安研協定期総会及び講演会。2024 年 11 月 8 日

Rieko Matsuura, Rintaro Ohara, Kashi Mizota, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Junji Fukuda, Yusuke Okubo: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs Based on the Wnt Signal Disruption. 第 51 回日本毒性学会学術年会。2024 年 7 月 3 日

Kashu Mizota, Rintaro Ohara, Rieko Matsuura, Yoko Hirabayashi, Yoshihiro Nakajima, Yusuke Okubo, Junji Fukuda: Developmental Toxicity Assessment Using Human iPSCs by Automated Measurement of FGF Signaling Disruption. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024. 9. 9)

三ヶ島史人、真木一茂、小島肇、栗形麻樹子、大久保佑亮、星野裕紀子、片桐龍一、石黒司、渡部一人、角崎英志、下村和裕：医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査。第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)

溝田華柊、大原凜太郎、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱の自動測定による発生毒性評価。第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月 3 日)

村山航己、溝田華柊、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いたシグナルかく乱作用を基にした発生毒性評価法における補完的なシグナル経路の検討。日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮

溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱作用の自動測定による発生毒性評価。日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 宇都宮

溝田華柊、村山航己、松浦利絵子、平林容子、中島芳浩、大久保佑亮、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いた FGF シグナルかく乱を指標とした発生毒性評価。日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024 仙台

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

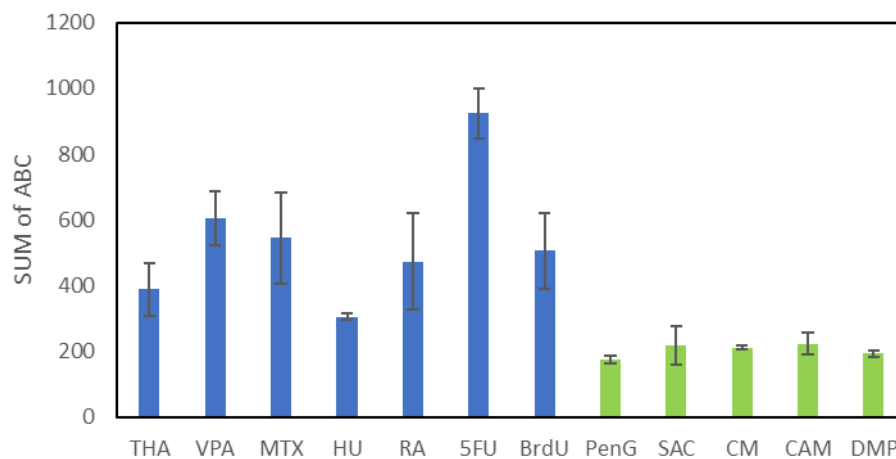


図1：未分化の iPS 細胞を用いた DynaLux/c の結果

DNT 陽性対照物質(青色)、陰性対照物質(緑色)。サリドマイド(THA)、バルプロ酸(VPA)、メトトレキサート(MTX)、ハイドロキシウレア(HU)、レチノイン酸(RA)、フルオウラシルウラシル(5FU)、ブロモデオキシウリジン(BrdU)、ペニシリン(PenG)、サッカリン(SAC)、シメチジン(CM)、D カンファー(CAM)、ジフェンヒドラミン(DHM)。n=3。 エラーバー：標準偏差。

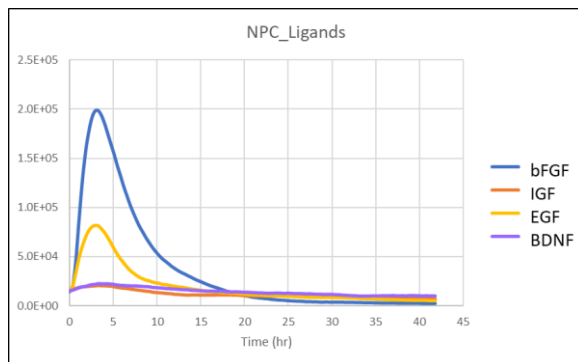


図2：NPCs における各種リガンド刺激による SRE-Nluc の活性

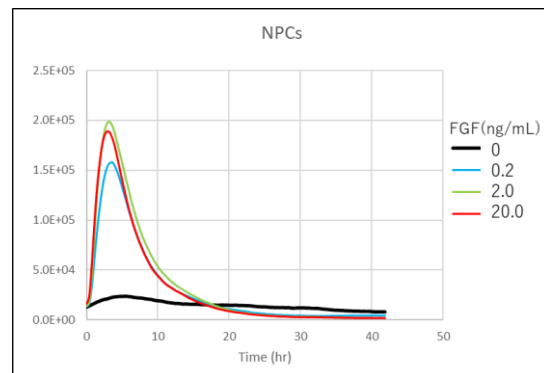


図3：NPCs における各種 bFGF 濃度による SRE-Nluc の活性