

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

多色ルシフェラーゼアッセイの構築

研究分担者 中島芳浩 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門

研究要旨

化学物質が胚・胎児発生に及ぼす影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験を通じてヒトへの外挿性を高める手法が取られてきた。しかし、このような試験系は高コストであり、動物福祉の観点からも動物実験の代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは極めて困難であり、現在のところ実用に耐える *in vitro* 試験系は確立されていない。これまで我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に着目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基に発生毒性を評価する DynaLux/c を開発してきた。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、将来的に OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。

本分担研究では、DynaLux/c の更なる高精度化のため、従来の FGF シグナルのかく乱モニター用 Nluc に加え、測定ウェル間の補正および細胞毒性モニターとして用いる第二のルシフェラーゼ(内部標準ルシフェラーゼ)を導入する多色ルシフェレースアッセイ系の構築を行った。今年度は内部標準用のプロモーター、ルシフェレース、発光基質、光学フィルターの検討を行い、ヒト iPS 細胞においても多色ルシフェレースアッセイ系の構築が可能であることを確認した。

A. 研究目的

化学物質による胚・胎児発生への影響は、ヒトと実験動物の種差が大きいことが知られている。そのため、従来の発生毒性試験では複数の動物種を多数用いた動物実験によってヒトへの外挿性を高めてきた。しかしながら、このような試験系は高コストであるうえ、動物福祉の観点からも動物実験代替法の開発が強く求められている。一方で、受精卵から胎児に至るまでの複雑な発生過程を細胞レベルで正確かつ網羅的に再現することは非常に困難であり、現在のところ実用に耐える *in vitro* 試験系は確立されていない。

そこで、我々は、胚・胎児発生が少数のシグナル伝達相互作用によって制御される点に注目し、化学物質のシグナルかく乱作用を基盤とした発生毒性評価法「DynaLux/c」を開発してきた(*iScience* 等)。DynaLux/c は動物を用いた従来の発生毒性試験とは概念的に異なる細胞ベースの試験法であり、高い正確性と網羅性を有するだけでなく、96 穴プレートを用いて一週間程度で実験を完了できるため、高スループットかつ低コストという特徴を持つ。しかしながら、現在の段階ではハザード評価が主眼であり、化審法などの行政判断に必要なリスク評価に用いるには、毒性強度を定量評価できる指標を取得する必要がある。

本研究の目的は、DynaLux/c を改良し、ヒトへの外挿性が高くリスク評価にも活用できる新たな NAM (New Approach Method) を確立するとともに、公定化を目指すことである。具体的には、定量的な有害性評価指標を得る仕組みを構築し、OECD テストガイドライン(TG)として承認されるように研究を推進する。化審法の審査においては、一般毒性(28 日間反復投与毒性)に加えて生殖発生毒性試験や発がん試験の情報が要求されるが、GLP 準拠の発生毒性試験や発がん試験は高コストかつ長期間を要するため、既存情報が十分に整っているとは言い難い。そのため、低コスト・短期間で信頼性の高い生殖発生毒性情報を提供可能な試験法の開発が強く望まれている。

本研究では、発生毒性評価の専門家(桑形麻樹子)、公定化に関する専門家(平林容子: JaCVAM)、業界団体および国際的な合意形成に関わる専門家(小島肇: 日化協 LRI 顧問)らが連携し、さらに産業技術総合研究所の佐々木大輔博士(若手)や横浜国立大学の Seo Jieun 博士(若手・女性・国際性)などを含む研究体制を構築する。こうした専門知識を融合させることで、DynaLux/c の有害性評価値の導出を可能にし、最終的にはリスク評価が可能な *in vitro* 生殖発生毒性代替法として確立することを目指す。

この新たな試験法が公定化されれば、行政判断に必要な有害性データを効率的に取得できるようになり、動物実験の削減や審査コストの軽減につながるだけでなく、新規化学物質の適切なリスク管理の下での迅速な上市を促進することが期待される。さらに、化学産業や規制当局における国際競争力を強化し、産業界のイノベーションを支えながら社会の持続的発展に寄与する可能性がある。

本分担研究では、試験実施者や実施機関間での再現性の向上および DynaLux/c 法の更なる高精度化を目的とし、FGF シグナル(青色)に加えて、内部標準(赤色)を組み込んだ多色ルシフェラーゼアッセイの構築を目的とする。

B. 研究方法

ルシフェラーゼ導入 iPS 細胞の作製: 血清応答因子(serum response factor: SRF)の応答配列下(serum response element: SRE)で Nluc を、EF1 α プロモーター制御下で甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ(SLR3)が発現する 2 つの発現ユニットを連結したレポーターベクターを作製した。これをヒト 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、薬剤選択により安定細胞株(以下、2 色発光 iPS 細胞と記載する)を樹立した。

発光測定: マルチウェルプレート対応のリアルタイム発光測定装置(KronosHT、アトー社)を用い、96 ウェルプレートに播種した iPS 細胞の発光を、37℃、5%二酸化炭素雰囲気下、湿度飽和状態において、1 ウェル当たり 10 秒間、約 30 分間隔で 3 日間連続で測定を行った。ルシフェラーゼを発光させるための発光基質は、所定の濃度を培地に添加した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究成果および考察

C-1: 2 色発光 iPS 細胞の樹立

これまでの DynaLux/c では、シグナルかく乱モニター用のルシフェラーゼとして Endurazine を発光基質として青色に発光する Nluc を用いている。そこで多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築のため、第二のルシフェラーゼ(内部標準ルシフェラーゼ)には Nluc と最大発光波長が最も離れ、異なる発光基質(D-luciferin)で発光する甲虫由来赤色発光ルシフェラーゼ SLR3 を選定した。また赤色ルシフェラーゼを発現するためのプロモーターとして幹細胞において外来遺伝子の強制発現に汎用されている elongation factor1 α (EF1 α) プロモーターを選定した。SRE 制御下で Nluc が、また EF1 α プロモーター制御下で SLR3 が発現する 2 つの発現ユニ

ットを AAVS1 領域への相同組換え用ベクターに導入し、レポーターベクターを作製した。なお、内部および AAVS1 領域挿入後の外部からの転写の影響を排除するため、2 つの発現ユニットの間には、ユニ由来の HS4 インスレーターを配した(図 1)。

続いて、作製したレポーターベクターを CRISPR-Cas9 システムを用い AAVS1 領域にノックインし、薬剤選択により 8 クローンを単離した。続いて、各クローンのゲノム DNA を単離し、PCR によりベクターの挿入およびホモ体、ヘテロ体の確認を行った。その結果、いずれのクローンも想定した部位にベクターが挿入されていること、さらにクローン 1 および 5 がホモ体であり、残りの 6 クローンはヘテロ体であることが明らかとなった(図 2)。次に、ホモ体のクローン 1 と 5 の増殖を検証した。細胞を 6 ウェルプレートに播種し、細胞の増殖の様子を 4 日間観察した。対照として、当該プロジェクトのアッセイに使用している SRE 制御下で Nluc のみが発現する細胞(以下、SRE-Nluc 細胞と記載する)を用いた。その結果、クローン 1 は SRE-Nluc 細胞とほぼ同じ増殖を示したのに対し、クローン 5 は増殖が悪いことが明らかとなった(図 3)。このことより、以降の実験にはクローン 1 を使用することとした。

C-2: 2 色発光 iPS 細胞の発光測定法および作動性の検証

2 色発光 iPS 細胞の発光測定には、Nluc 用発光基質 Endurazine、また SLR3 用発光基質 D-luciferin で各々のルシフェラーゼを発光させる必要がある。両発光基質を共存させた例が iPS 細胞では報告されていないため、最初に、発光基質共存下での発光反応の交差反応と細胞毒性の有無について検討した。これまで樹立済みの EF1 α プロモーターの制御下で Nluc および SLR3 が発現する細胞(以下、それぞれを EF1-Nluc 細胞および EF1-SLR3 細胞と記載する)を 96 ウェルプレートに播種し、プロトコルに従い培養したのち、1% Endurazine、300 μ M D-luciferin、および両者を含む培地中で発光をリアルタイムに 72 時間測

定した(図 4)。その結果、EF1-Nluc 細胞では D-luciferin による発光は検出されず、Endurazine と D-luciferin を混合しても Endurazine のみの発光とほぼ同じ強度とキネティクスが得られることが確認された。一方、EF1-SLR3 細胞では Endurazine により数百カウントの微弱な発光が検出されたが、これは他のウェルからの発光の漏れ(クロストーク)によるものであり、実際には SLR3 による発光は検出されなかった。また両発光基質を混合した場合、Endurazine 単独よりも若干発光強度が低下した。これは Endurazine による細胞毒性に起因していることが示唆された。以上の結果から、両発光基質を共存させても発光反応の交差反応が生じないことが確認された。一方、使用する Endurazine の濃度については細胞毒性を生じる可能性があるため、今後、検討する必要があることが示唆された。

次に、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の発光測定方法と細胞の作動性について検証した。この細胞では青色の Nluc および赤色の SLR3 の発光が混合して光るため、2 枚の光学フィルターを用いて両者の発光を分離・検出する測定方法を想定した。具体的には、ショートパスフィルターである SPF500 により Nluc の 500 nm 以下の発光を、他方、ロングパスフィルターである R62 フィルターにより SLR3 の 600 nm 以上の発光を分離して測定する方法を設定した(図 5)。この方法により両ルシフェラーゼの発光を測定可能か検討するとともに、樹立した 2 色発光 iPS 細胞の作動性について、FGF 処理による SRF-SRE シグナルの増強(発光増加)を指標に検証した。

2 色発光 iPS 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、所定のプロトコルに従い培養し、1% Endurazine、500 μ M D-luciferin および FGF または溶媒を含む培地に交換した。発光測定はフィルターなし、SPF500 および R62 を通した発光を各々 10 秒間、約 30 分間隔で 70 時間リアルタイムに測定した(図 6)。その結果、SPF500 フィルターを通して測定した Nluc の発光強度は FGF 処理により急激に増加し、約 5 時間をピークとする活性

化キネティクスが測定された。一方、R62 フィルターを通して測定された SLR3 の発光強度は、FGF 処理により若干の増加は見られるものの、大きな変動は生じないことが確認された。FGF 処理による Nluc の活性化キネティクスは、Nluc のみが発現する SRE-Nluc 細胞でこれまで得られているパターンと一致していた。また、SLR3 については、SLR3 のみが発現する EF1-SLR3 細胞に FGF を処理しても顕著な発光強度の変化が生じないという予備実験のデータと一致していた(データ省略)。以上より、設定したフィルターにより両ルシフェラーゼの発光が正しく検出・定量化できること、さらに樹立した 2 色発光 iPS 細胞は想定通りに FGF に反応することが確認された。

D. 結論

試験法の精度向上を目的に、多色ルシフェラーゼアッセイ系の構築に取り組み、異なる発光基質を用いた 2 種のルシフェラーゼの同時リアルタイム測定法を確立した。これにより、試験精度が向上するとともに、細胞毒性や測定誤差を補正するための新たな内部基準が導入可能となった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyata, R., M. Suzuki, Y. Okazaki, D. Abe, Y. Nakajima. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activation by an Active Compound in *Lythrum anceps* (Koehne) Makino." *J. Cell Biochem.* 126, (2025): e70009.
2. Tomita, T., Nakajima, Y. Ohmiya, K. Miyazaki. "Novel three-dimensional live skin-like in vitro composite for bioluminescence reporter gene assay." *FEBS J.* 291, (2024): 4619-4632.
3. Tabei, Y., Y. Nakajima. "IL-1beta-activated PI3K/AKT and MEK/ERK pathways coordinately promote induction of partial epithelial-mesenchymal transition." *Cell Commun. Signal.* 22, (2024): 392.

4. Nakazawa, K., M. Matsuo, Y. Kikuchi, Y. Nakajima, R. Numano. "Melanopsin DNA aptamers can regulate input signals of mammalian circadian rhythms by altering the phase of the molecular clock." *Front. Neurosci.* 18 (2024): 1186677.

2. 学会発表

1. 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).
2. 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.
3. 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
4. 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
5. Kashi 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)
6. 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)

7. 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
8. 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
9. 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. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

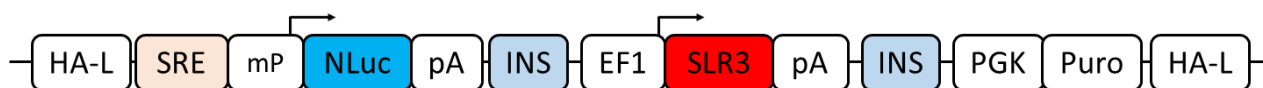


図 1: SRE 制御下で Nluc、EF1 α プロモーター制御下で赤色発光ルシフェラーゼ SLR3 が発現する iPS 細胞作製用のレポーターベクターの概略。図中の記号の詳細は以下の通りである。HA: AAVS1 相同配列、SRE: serum response element、mP: ミニプロモーター、Nluc: NanoLuc、pA: polyA シグナル、INS: HS4 インスレーター、EF1: EF1 α プロモーター、SLR3: 赤色発光ルシフェラーゼ、PGK: PGK プロモーター、Puro: ピューロマイシン耐性遺伝子

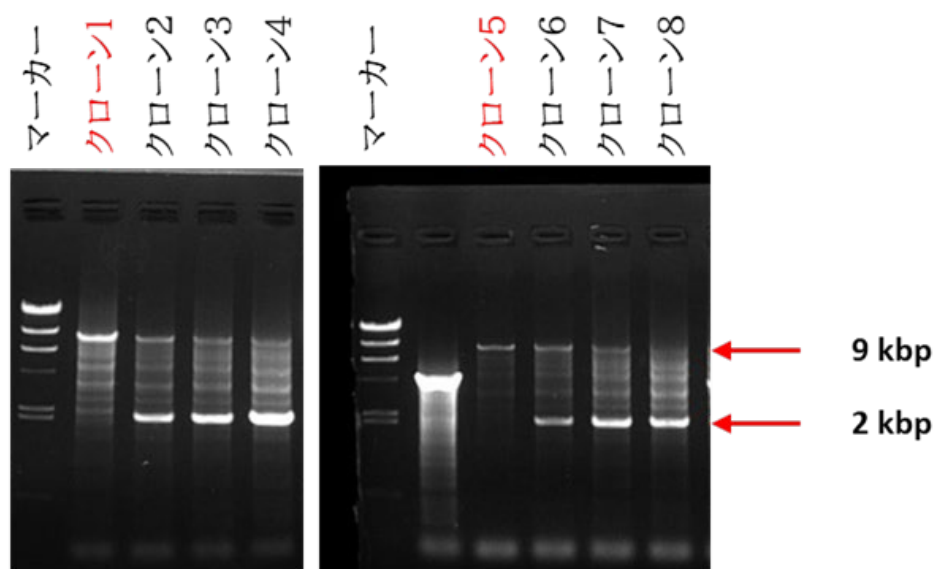


図 2: 薬剤選択により得られたクローンのゲノム PCR の電気泳動の結果。ホモ体は 9 kbp、ヘテロ体は 9 kbp と 2 kbp の PCR 産物が増幅される。分子量マーカーには λ /HindIII を使用した。

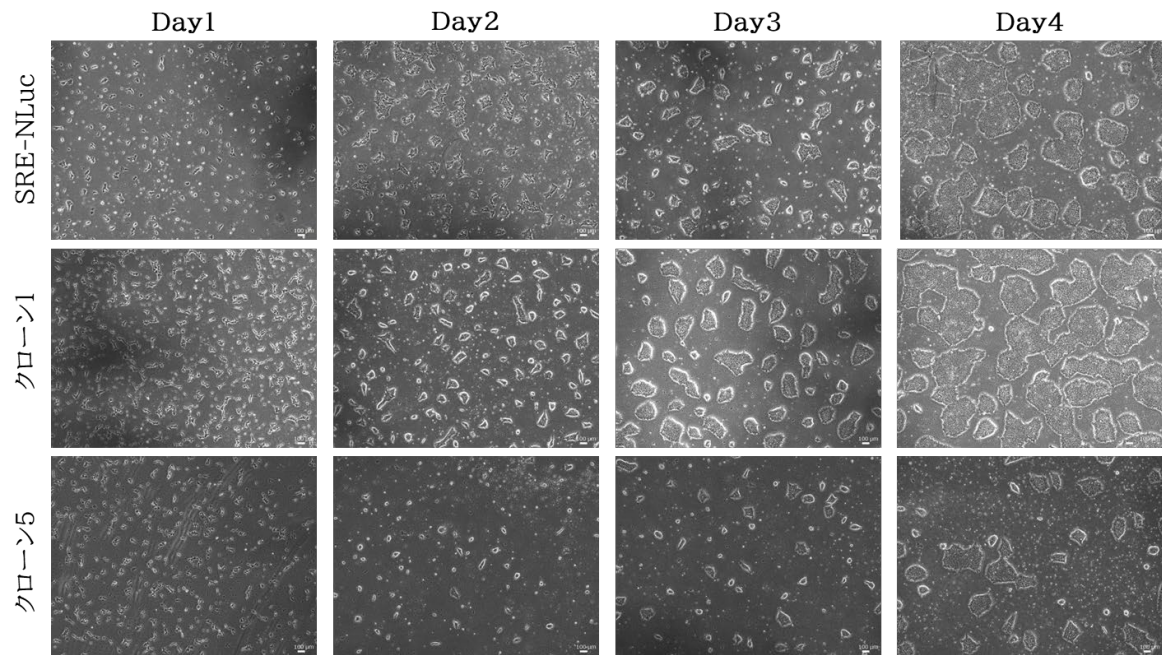
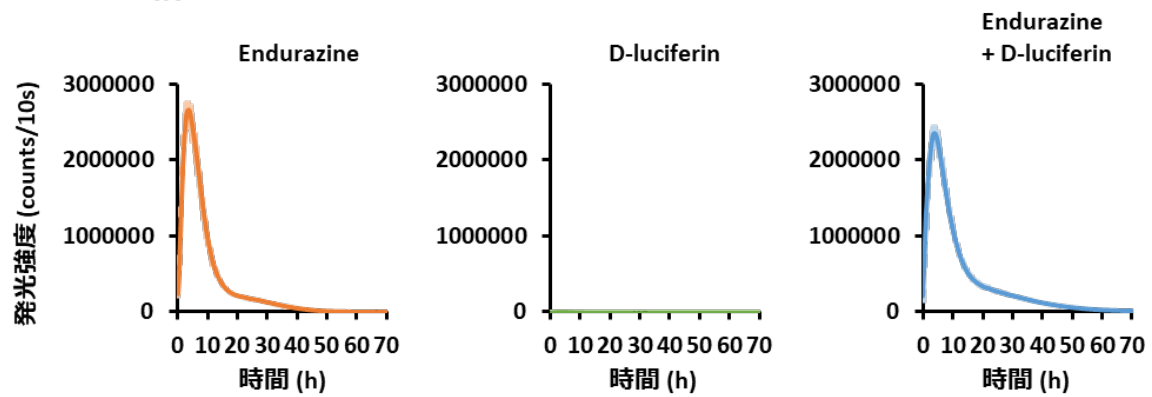


図 3: 樹立した細胞の増殖の様子。各種細胞を 6 ウェルプレートに播種し、1 日毎、4 日間観察した。クローン 1 の増殖は良好である一方、クローン 5 の増殖は遅いことが明らかとなった。

EF1-NLuc細胞



EF1-SLR3細胞

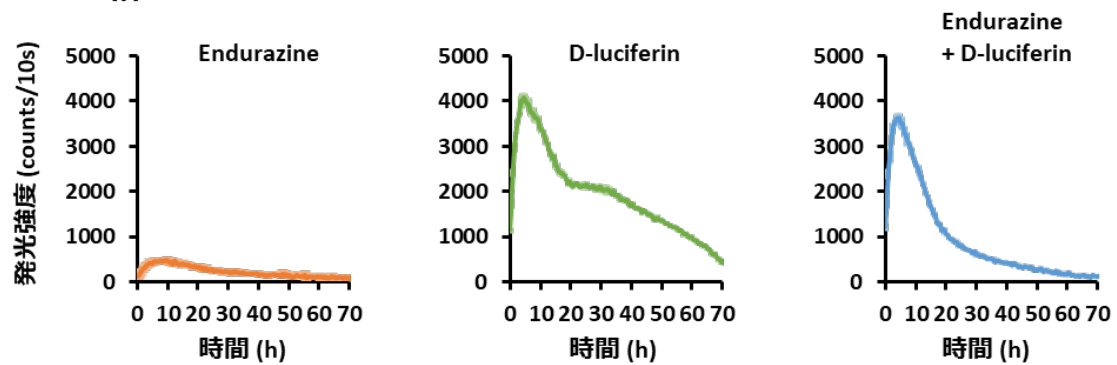


図 4: 発光基質 Endurazine と D-luciferin の反応交差性の検証。Endurazine は 1%, D-luciferin は 300 μ M を用いた。

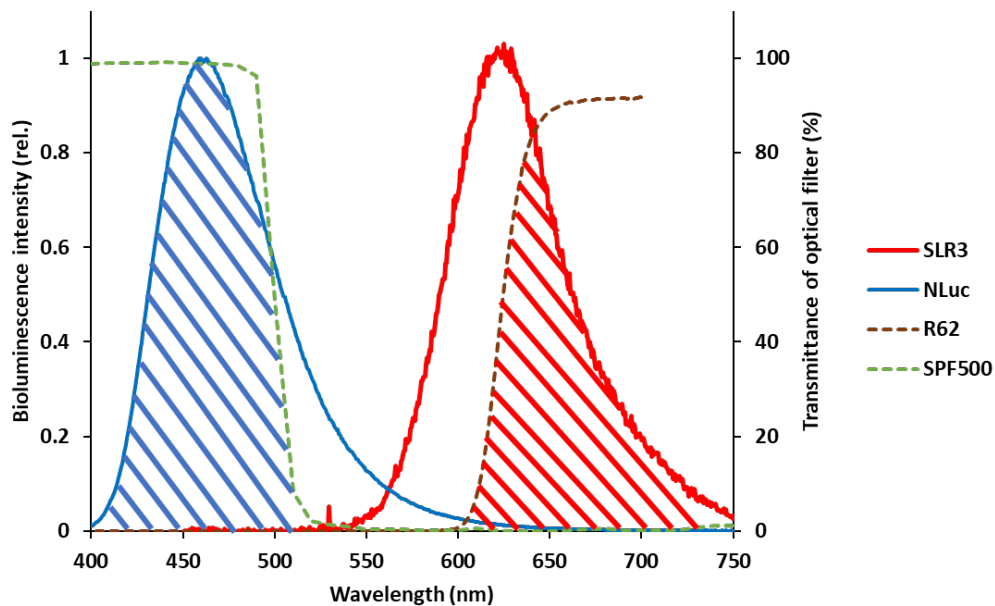


図 5: Nluc と SLR3 の発光スペクトル、および Nluc 分離用フィルター SPF500 と SLR3 分離用フィルター R62 の透過スペクトル。

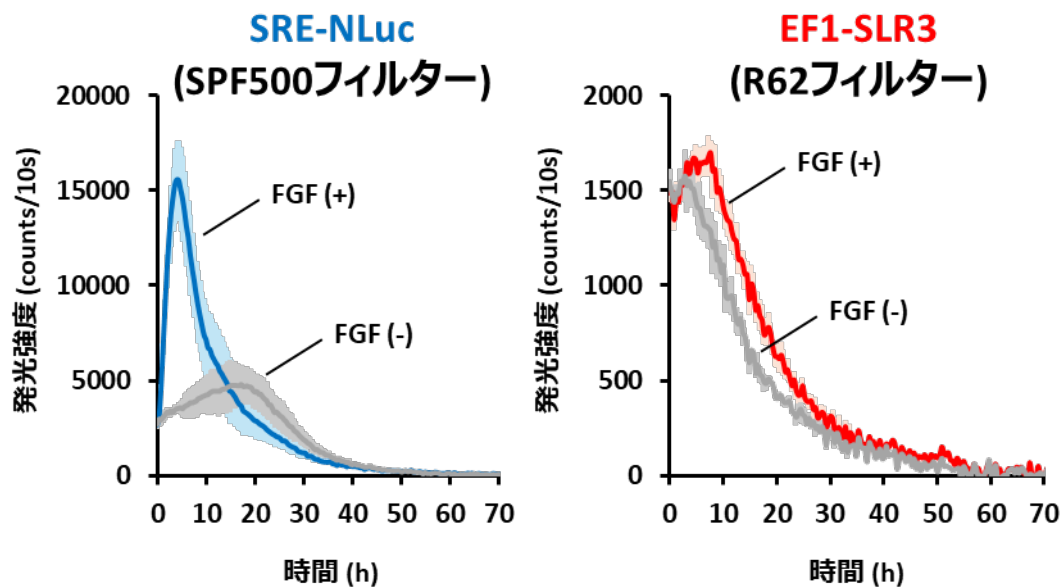


図 6: 2 色発光 iPS 細胞の発光測定方法および作動性の検証。Nluc は SPF500 フィルター、SLR3 は R62 フィルターを用い測定した。FGF 処理による SRF-SRE シグナル活性化を指標に細胞の作動性を検証した。