

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

大久保 佑亮¹, 福田 淳二²

1. はじめに

我々の身の回りには化学物質があふれている。たとえば、自ら摂取する医薬品や、受動的に摂取する農薬、無意識に摂取する可能性のある化学物質などである。過去にはそれらの化学物質は、薬害や公害などの多くの悲劇を引き起こした。しかしながら、問題が生じるたびに人類はそれらの安全性を評価する毒性試験法を発展させ、適切な規制をしくことで安全安心な生活を維持してきた。現在は、新規物質の毒性を予測し、事前に危険性を予測する毒性試験法が開発されるなど、毒性試験法は発展し続けている。

数ある毒性試験の中でも、妊婦が摂取することで胚・胎児への影響を評価する発生毒性試験は、ヒトと動物の種差が大きいことが知られている。最も有名な事例として、サリドマイド禍があげられる。サリドマイドはげっ歯類を用いた動物試験では発生毒性を見つけれず、アザラシ肢症と呼ばれる、奇形を生じさせてしまった¹⁾。そのため、発生毒性はげっ歯類に加えて、非げっ歯類を用いた試験を要し、供与動物数、試験期間、コストが必要な試験系である²⁾。一方、近年の動物福祉精神の高まりを受け、供与動物数の削減、さらには動物試験の廃止が求められている。したがって、ヒトの発生毒性を適切に評価可能な、動物を使用しないハイスループットな試験系が求められている。

2. 発生毒性試験の動物実験代替法

動物試験では化学物質の発生毒性を肉眼所見等により評価している(図1a)。これに対して、代表的な動物試験の代替法としては、細胞分化を指標とした化学物質の組織・器官への発生毒性作用を評価する試験法が開発されている(図1b)。

①マウス胚性幹細胞(mouse embryonic stem cells:mESCs)を用いた試験系(mESCs test:mEST):mESCsを用いた試験法であるmESTは、mESCsから作製した胚様体を心筋細胞に分化させる際に評価物質を適用させ、細胞分化に対する影響を評価する³⁾。この手法では、心筋細胞への分化指標として細胞の拍動を採用しており、スループット性および試験実施者間の評価のばらつきが課題としてあげられている。また、心筋細胞以外の分化細胞への毒性を捉えることは難しく、動物試験に対して網羅性の低さを解決する必要がある。mESTのスループット性の低さと評価者間のばらつきを軽減する手法として、心筋細胞の分化マーカー遺伝子である*Hand1*を用いたプロモーターアッセイ(*Hand1*-EST)が開発された⁴⁾。その評価方法は*Hand1*のプロモーター下でルシフェラーゼを発現するレポータートランスジェニックmESCsを樹立し、評価物質の心筋細胞分化に対する影響をルシフェラーゼアッセイにより評価する。この手法では、mESTと比較スループット性や定量性は向上した。また、種差を軽減する方法として、*Hand1*-EST法をヒト人工多能性幹細胞(human induced pluripotent stem cells:hiPSCs)に変更した試験系も開発されている⁵⁾。しかしながら、これらの手法では網羅性の課題は残ったままである。

②ReProGlo法:胚発生過程では、FGF、Wnt/ β -catenin、TGF- β 、Hedgehog、Notchなど限られたシグナル伝達経路が胚発生の異なる時期に異なる組織で繰り返し利用され、細胞分化・増殖および形態形成を制御している⁶⁻⁸⁾。このシグナル伝達経路に対する化学物質の影響を計測することで発生毒性の評価を試みるReProGloと呼ばれる手法も開発されている(図1b)。ReProGloはWnt/ β -cateninシグナルに着目し、その活性を計測するために7×TCF/LEF結合配列下でルシ

¹ 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部(〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26)

² 横浜国立大学大学院工学研究院機能の創生部門(〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5)

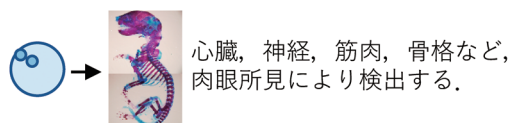
Evaluation of developmental toxicity analyzing by dynamics of signal disruption

Yusuke Okubo¹ and Junji Fukuda² (¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Kawasaki-ku Tonomachi, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan, ²Faculty of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama, Kanagawa 240-8501, Japan)

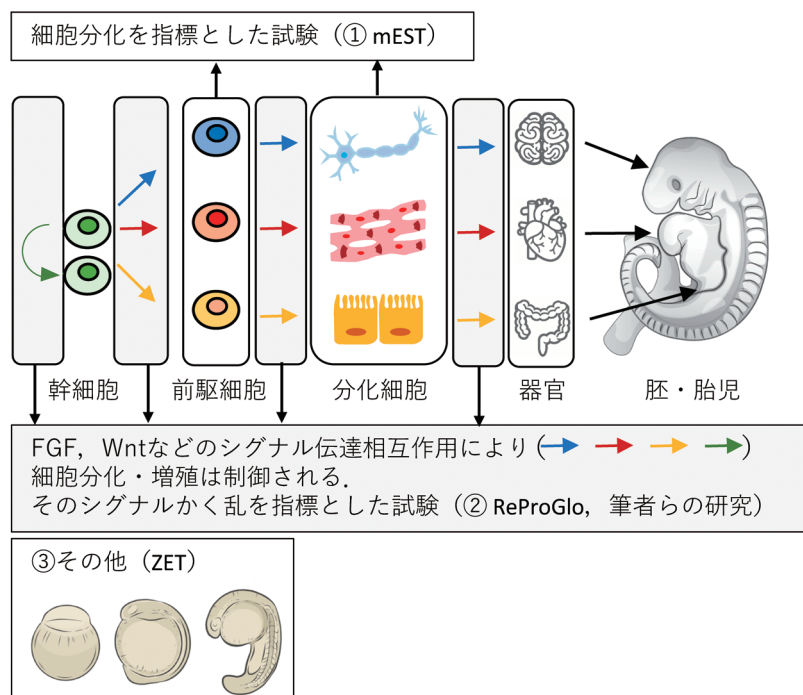
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950243

© 2023 公益社団法人日本生化学会

a 動物を用いた発生毒性試験法



b 動物試験代替法



c シグナルレポーターアッセイの検出法

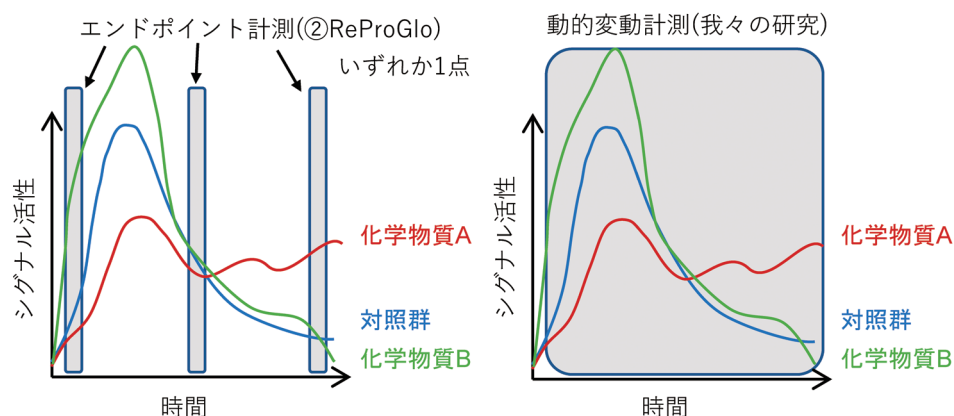


図1 発生毒性試験法

(a) 動物を用いた試験法. 試験動物は受精卵から化学物質に曝露され，肉眼所見により発生毒性を検出する. (b) 細胞を用いた動物実験代替法. 例として，細胞分化を指標とした試験や発生過程を制御するシグナル伝達のかく乱作用を指標とした試験法を上げる. (c) シグナルレポーターアッセイの検出法. エンドポイントアッセイや生細胞計測による動的変動アッセイがある.

フェラーゼを発現するトランスジェニック mESCs を用いる. 96穴プレートにレポーター細胞を播種し，24時間培養する. その後，評価物質を24時間適用し，

Wnt/ β -cateninシグナル活性を測定する. そして，評価物質のWnt/ β -cateninシグナルに対する影響を基に発生毒性の評価を試みている. しかしながら，ReProGlo

は予測性が低いことが指摘されており、シグナルレポーターアッセイを利用した発生毒性代替法はさらなる改良が必要である⁹⁾。その理由に関しては、3節において、詳細を述べる。

- ③その他 [ゼブラフィッシュ胚毒性試験 (zebrafish embryonic toxicity test : ZET)] : 欧州ではゼブラフィッシュ胚を用いる試験は動物を用いた試験とはみなされない¹⁰⁾。そのため、発生毒性の動物実験代替法として、ゼブラフィッシュを用いた試験系が開発されている¹¹⁾ (図1b)。透明かつ胎外で発生が進むゼブラフィッシュ胚は観察が容易であるため、スループット性の向上が期待される。しかしながら、魚類を用いた試験では発生毒性の大きな課題である種差を解決できない。

以上のことをまとめると、*in vitro*発生毒性試験法では、ヒトを対象とした網羅的、ハイスループットそして正確性の高い試験の開発が求められている。

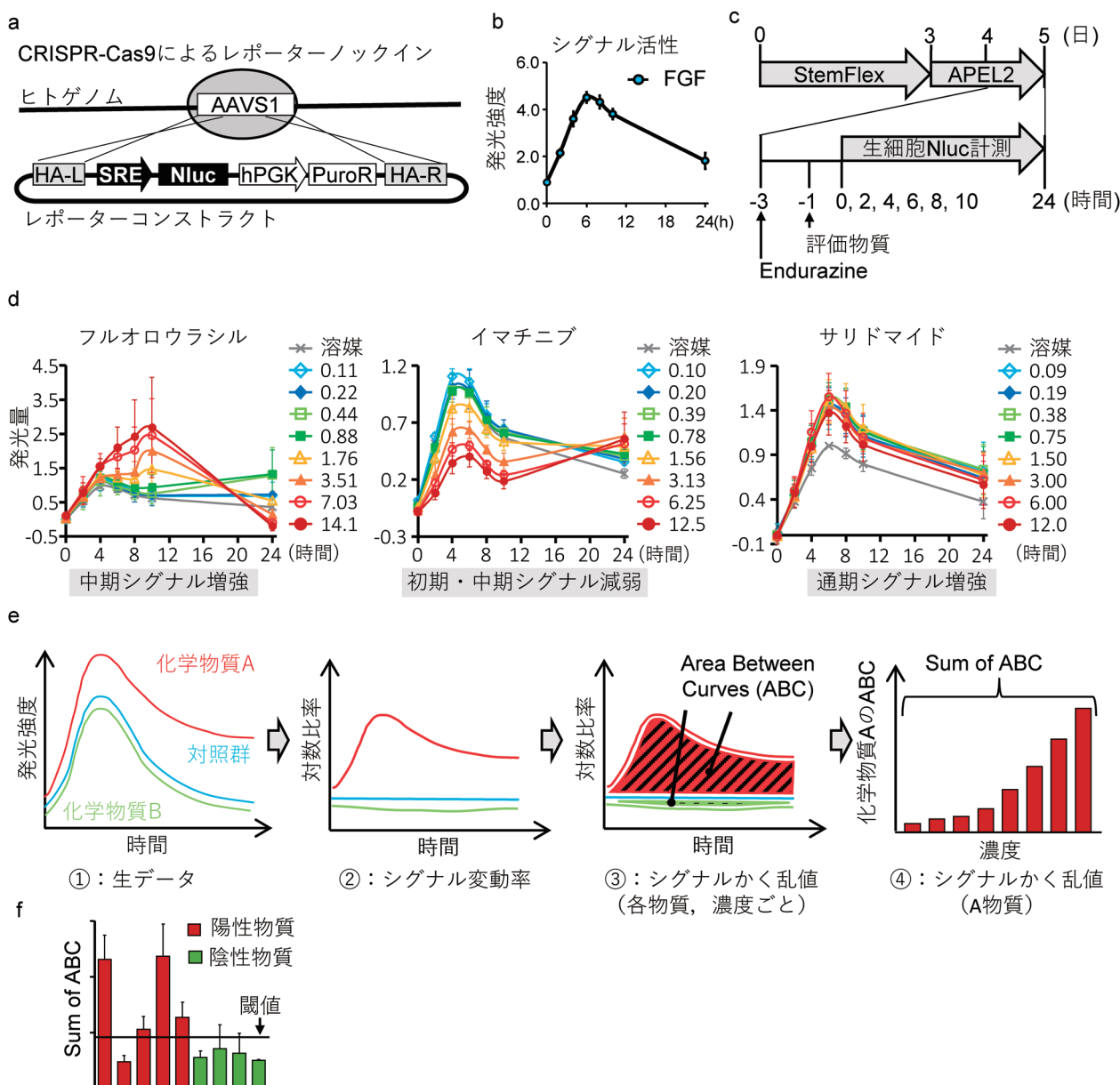
3. 発生毒性の結果の評価から過程の評価への視点の変更

上述した研究の課題を受け、我々は網羅的な試験法を開発するためには、心臓や神経など個別の組織・器官に対する毒性評価法は*in vitro*試験には適さないと考えた。したがって、発生過程に対する化学物質の影響を評価するReProGloを発展させた試験系の構築を試みた。その際に、まず発生毒性がどのように生じるか思考した。発生毒性はアザラシ肢症に代表されるように器官・組織の形成不全によるものである。胚発生はシグナル間相互作用により制御されているため、発生毒性はシグナル伝達がかく乱された結果として生じたと考察できる。したがって、直接間接を問わず、化学物質のシグナルかく乱作用を適切に検出することで発生毒性を評価可能であると考えた (図1b)。これらを踏まえてReProGloの問題点を抽出すると、ReProGloはエンドポイントで評価していたため、複雑なシグナル間相互作用のかく乱までは検出できていない可能性がある (図1c)。たとえば、化学物質によるシグナルAのかく乱は別のシグナルBのかく乱を引き起こすことや、さらにシグナルBがシグナルCまでもかく乱することも考えられる。一方で、シグナルAのかく乱はシグナルBにより回復する可能性もある。つまり、シグナル伝達の動的変化の計測により、化学物質のシグナルネットワークのかく乱作用を検出することで、網羅性と正確性の向上が期待されるのではないかと考えた (図1c)。

4. シグナルかく乱作用のダイナミクスの検出による発生毒性の評価

今回、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hiPSCs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hiPSCs株を樹立した (図2a)。シグナル伝達の動的変化を計測するために、長期間の生細胞ルシフェラーゼアッセイを可能とするプロメガ社のEndurazineを用いた。なお、多くのタンパク質は37°Cの培地中で生物活性が低下してしまうことが知られているが、37°Cの培地中においても長期間活性が保たれるThermo Fisher Scientific社のHeat stable bFGFを活性化リガンドとして利用することで、この問題を回避した。これらを用いて24時間のFGF-SRFシグナルの生細胞リアルタイムアッセイを行った。レポーター細胞は、bFGF刺激により約6時間で発光がピークに達した後、減少する挙動を示すことが明らかになった (図2b)。

このFGF-SRFシグナルレポーターシステムを用いて、化学物質のシグナルかく乱作用の動的変化の検出を試みた。96穴プレートにレポーター細胞を播種しThermo Fisher Scientific社のStemFlex培地にて3日間コンフルエントまで培養した。その後、FGF不含有のSTEMCELL Technologies社のSTEMdiff APEL2培地で1日培養した。bFGF刺激の3時間前にEndurazineを添加し、1時間前から評価物質を適用した。FGF刺激後、0, 2, 4, 6, 8, 10, 24時間後にNluc発光を計測した (図2c)。評価物質は表1に示す陽性物質18種類、陰性物質11種類計29種類を用いた。評価物質は、細胞毒性IC₅₀以下、もしくは最大溶解量を最高濃度として2倍希釈系列を作製し8濃度を評価した。また、上限濃度は1000 µg/mLとした。FGF-SRFシグナルに対する各化学物質のシグナルかく乱作用を計測した結果、評価物質ごとに異なるタイムポイントでシグナルの増強作用や減弱作用を示すことが明らかになった (図2d)。この結果は、従来のエンドポイント計測だけでは適切な評価が困難であることを示唆している。そこで、シグナル活性の動的変動を解析することで、化学物質のシグナルかく乱作用の定量化を試みた。まず、溶媒対照群に対する評価物質群のシグナル変動率を濃度ごとに算出した。通常の変化率では、増強作用と減弱作用を対称に扱えないため評価物質のシグナルかく乱作用の定量化には向かない。そのため、本解析では、シグナル変動を対数変化率で表した (図2e①, ②)。次に、この対数変化率のグラフから溶媒対照と評価物質間



ROC曲線解析による閾値設定

図2 FGF-SRFシグナルかく乱作用の動的変化解析による発生毒性評価法

(a) SRFシグナルレポーターヒトiPSCsのターゲティングベクターマップ。CRISPR-Cas9システムを用いて、ヒトゲノムのAAVS1領域にSRF応答配列下でNanoLuc (Nluc)を発現するコンストラクトをノックインした。(b) FGF-SRFシグナル活性の動的変化。bFGF刺激により約6時間で発光がピークに達した後、減少する。(c)我々が開発したSRFレポーターhiPSCsを用いた発生毒性試験法の手順。(d)化学物質によるシグナルかく乱作用。化学物質により、異なるタイミングでシグナルをかく乱する。評価濃度： $\mu\text{g/mL}$ 。(e)我々が開発した*in vitro*発生毒性試験法のシグナルかく乱作用の評価法。文献12より引用

の面積 (area between curves : ABC) をもとめ、シグナルかく乱の値とした (図2e③)。毒性試験において用量反応関係は重要な指標である。そのため、各濃度のABCを積算したSum of ABCを求めることで、用量反応関係を加味した評価物質のシグナルかく乱作用を定量化した (図2e④)。

上記の定量化手法を用いて、表1の評価物質のシグナルかく乱値を求めた。この値を基にreceiver operating characteristic (ROC) 曲線解析により閾値を算出し、その予測性を評価した (図2f)。その結果、感度0.83、特異度1.00、正確度0.93で発生毒性を評価可能であった (表1)¹²⁻¹⁴。文献12では過去の分類に則り、6-アミノニコチンアミ

表1 評価物質リスト

化学物質名	最大試験濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	判定の正誤
陽性物質		
トレチノイン	0.010	正
ヒドロキシカルバミド	149	正
メトキシ酢酸	683	正
塩化メチル水銀	1.20	正
メトトレキサート	5.00	正
サリチル酸ナトリウム	666	正
バルプロ酸	100	正
ホウ酸	250	誤
5-ブromo-2'-デオキシ-ウリジン	50.0	正
ジメタジオン	840	正
塩化リチウム	250	誤
ジフェンヒドラミン	262	正
フルオロウラシル	14.1	正
シクロホスファミド	400	誤
イマチニブ	12.5	正
レナリドミド	35.0	正
ボマリドミド	2.50	正
サリドマイド	12.0	正
陰性物質		
アクリルアミド	454	正
d-カンフル	50.0	正
フタル酸ジメチル	100	正
ベニシリンG	1000	正
サッカリン	1000	正
アセトアミノフェン	20.0	正
アモキシシリン	25.0	正
シメチジン	30.0	正
エリスロマイシ	15.0	正
ヒドロクロロチアジド	20.0	正
サラゾスルファピリジン	100	正

ドは陽性物質、ジフェンヒドラミンは陰性物質に分類していたが、本稿の試験成績の計算では、6-アミノニコチンアミドの試験結果は評価物質から除外し、ジフェンヒドラミンは陽性物質とした。その理由として、追試されていない昔の試験結果は信頼性に欠け見直しが進められていることおよび、詳細な文献検索の結果、ジフェンヒドラミンは発生毒性を有することが示唆されたためである。また本試験法において、サリドマイドやその誘導体である、レナリドミドやボマリドミドは陽性判定された。このことは発生毒性試験法の大きな課題であった種差が軽減可能である可能性を示している。これらの結果は、化学物質のシグナルかく乱作用の動的変化を検出することで、正確・網羅的に発

生毒性が検出可能であることを示している。

今回、FGF-SRF シグナルのみで高い正確度を判別可能であったことは我々にとっても驚きであった。この理由として、FGF-SRF シグナルを直接の標的としない化学物質においても、シグナルかく乱作用の動的変化を計測することで、シグナルネットワークへの影響を捉えられたと考えられる。また、従来法とは異なり、外因性のFGF刺激による、細胞全体への同期したシグナル活性化誘導により、シグナルかく乱作用が検出しやすくなった可能性もある。今回試験に用いたhiPSCsの分化状態は、分化初期段階と考えられ、実際に発生毒性が生じる組織や器官とは異なる。このことは発生の時期・部位にかかわらず、シグナルネットワークを強力にかく乱する物質が発生毒性を引き起こす可能性を示唆している。つまり、発生毒性の生じる部位は胎児に化学物質が曝露されたタイミングにより決定されているかもしれない。

今回、陽性判定されなかったシクロホスファミドは代謝物が毒性を示すことが知られており、*in vitro* 代謝系と組み合わせることで発生毒性を検出可能となることが期待される。また、その他の化学物質に関しても発生毒性に関わる他のシグナル伝達経路が関与している可能性があるため、こうしたシグナル伝達経路のレポーターアッセイを行うことで網羅性の向上が期待される。現在我々はいくつかのシグナル伝達経路の検出を組み合わせたシグナルレポーターバッテリー試験系の構築に取り組んでいる。

5. おわりに

現行の発生毒性試験は複数種かつ大多数の動物を用いる必要があるため、動物実験代替法が積極的に開発されている。医薬品規制当局と製薬業界の代表者が協働して、医薬品規制に関するガイドラインを科学的・技術的な観点から作成する国際会議である International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH；医薬品規制調和国際会議)においても、動物実験代替法の利用が推奨されている。事実、2021年に改訂された医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン [ICH S5 (R3)] においても、動物実験代替法の利用に関して言及された。しかしながら、胚・胎児発生に限ったとしても動物実験の代替として使用できる試験系がないのが現状である。ICH S5 (R3) においては代替法の適格性確認のための陽性対照物質がリスト化されており、今後はこれらの物質の評価を通じて、動物実験代替法の実用化を進めていきたい。また、近年開発が急速に進んでいる、ヒトのゲノムを基にした核酸医薬品や抗体医薬品など新規モダリティと呼ばれる医薬品はその特性上ヒトに対する特異性が高く、動物を用いた毒性試験だけではその安全性を十

分に検出できない可能性が指摘されている。そのため、ヒトを対象とした新規モダリティ医薬品の安全性を評価する試験系の創出が求められている。本手法はヒト細胞を用いており、高い正確性、網羅性、スループット性を有している。今後は、本手法を新規モダリティ医薬品の発生毒性評価に適用することで、新たな科学技術に対する安全性評価にもつなげていきたい。

謝辞

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センターの平林容子センター長および北嶋聡毒性部長のご協力のもと行われました。心より感謝申し上げます。

文 献

- Smithells, W.R. & Newman, G.C. (1992) Recognition of thalidomide defects. *J. Med. Genet.*, **29**, 716–723.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Guideline, Detection Of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals S5 (R3), Final version Adopted on 18 February 2020.
- Estevan, C., Romero, C.A., Pamies, D., Vilanova, E., & Sogorb, A.M. (2011) Chap.12. Embryonic stem cells in toxicological studies. *Embryonic Stem Cells* (Kallos, M.S. ed.), pp. 213–230, IntechOpen.
- Suzuki, N., Ando, S., Yamashita, N., Horie, N., & Saito, K. (2011) Evaluation of novel high-throughput embryonic stem cell tests with new molecular markers for screening embryotoxic chemicals in vitro. *Toxicol. Sci.*, **124**, 460–471.
- Aikawa, N., Kunisato, A., Nagao, K., Kusaka, H., Takaba, K., & Ohgami, K. (2014) Detection of thalidomide embryotoxicity by in vitro embryotoxicity testing based on human iPS cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **124**, 201–207.
- Manzari-Tavakoli, A., Babajani, A., Farjoo, H.M., Hajinasrollah, M., Bahrami, S., & Niknejad, H. (2022) The cross-talks among Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling and other prominent pathways involved in neural differentiation. *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 827275.
- Okubo, Y., Sugawara, T., Abe-Koduka, N., Kanno, J., Kimura, A., & Saga, Y. (2012) Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling. *Nat. Commun.*, **3**, 1–9.
- Okubo, Y., Ohtake, F., Igarashi, K., Yasuhiko, Y., Hirabayashi, Y., Saga, Y., & Kanno, J. (2021) Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and-independent pathways. *Development*, **148**, dev193664.
- Uibel, F., Mühleisen, A., Köhle, C., Weimer, M., Stummann, C.T., Bremer, S., & Schwarz, M. (2010) ReProGlo: A new stem cell-based reporter assay aimed to predict embryotoxic potential of drugs and chemicals. *Reprod. Toxicol.*, **30**, 103–112.
- Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*.
- Inoue, A., Nishimura, Y., Matsumoto, N., Umamoto, N., Shimada, Y., Maruyama, T., Kayasuga, K., Morihara, M., Katagi, J., Shiroya, T., et al. (2016) Comparative study of the zebrafish embryonic toxicity test and mouse embryonic stem cell test to screen developmental toxicity of human pharmaceutical drugs. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **3**, 79–87.
- Kanno, S., Okubo, Y., Kageyama, T., Kitajima, S., & Fukuda, J. (2022) Establishment of a developmental toxicity assay based on human iPSC reporter to detect FGF signal disruption. *iScience*, **25**, 103770.
- Kanno, S., Okubo, Y., Kageyama, T., Yan, L., & Fukuda, J. (2022) Integrated fibroblast growth factor signal disruptions in human iPS cells for prediction of teratogenic toxicity of chemicals. *J. Biosci. Bioeng.*, **133**, 291–299.
- Kanno, S., Mizota, K., Okubo, Y., Kageyama, T., Yan, L., & Fukuda, J. (2022) Luciferase assay system to monitor fibroblast growth factor signal disruption in human iPSCs. *STAR Protoc.*, **3**, 101439.

著者寸描

●大久保 佑亮 (おおくぼ ゆうすけ)

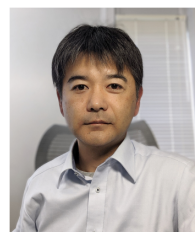


国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部主任研究官。博士(理学)。

■略歴 2005年埼玉大学理学部卒業。07年同大学院理工学研究科修了。10年総合研究大学院大学生命科学研究科修了。10年国立医薬品食品衛生研究所研究員。14年より現職。16～18年日本学術振興会海外特別研究員、カリフォルニア大学バークレー校客員研究員。

■研究テーマと抱負 医薬品や農薬、化学物質による胎児影響の評価法や、小型実験動物用のマルチバイタルサイン測定機器を開発しています。これらの研究を通じ、安全安心な生活の実現に貢献したいです(毒性学・規制科学)。

●福田 淳二 (ふくだ じゅんじ)



横浜国立大学大学院工学研究院教授、KISTECプロジェクトリーダー。博士(工学)。

■略歴 1998年九州大学工学部卒業。2000年同大学院修士課程修了。03年同大学院博士課程修了。03年北九州市立大学招聘研究員。05年MIT Postdoctoral fellow。06年筑波大学講師。13年横浜国立大学准教授。18年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞組織培養法について、形態形成に関わる基礎的研究から化学物質の安全性評価や再生医療への応用研究に取り組んでいます。特に工学的なアプローチで細胞周囲の微小環境を制御する技術の確立を目指しています(生物工学)。

■ウェブサイト <http://www.fukulab.ynu.ac.jp/>