参考資料5

【参考資料】

<事業成果(詳細版)>

染色体工学技術及び細胞発光技術等の先端技術を活用し、以下の(1)~(6)の研究開発戦略のも と、反復投与毒性試験における肝臓毒性、腎臓毒性、および神経毒性を評価可能な in vitro 試 験法を開発するため、(a)~(d)の4課題を実施した。当該事業は、安全性評価を実施している国 内化学企業等への技術移転、さらには国際規格化を見据え、論文発表等での成果発信・特許出願 による知財確保に加え、開発した肝臓・腎臓・神経における各々の in vitro 毒性試験法の標準 的プロトコールの作成を目的とする。

<研究開発の流れ>

- (1) <u>毒性評価のためのマーカー遺伝子の選定</u> 文献情報等をもとに肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性のマーカーとなる遺伝子を選定する。
- (2) <u>毒性評価に資する人工染色体ベクターの作製</u> 複数の発光遺伝子及びマーカー遺伝子等を導入した人工染色体ベクターを効率的に作製する。
- (3) <u>毒性評価に資する ES 細胞の作製</u> 人工染色体ベクターを用い、複数の発光遺伝子及びマーカー遺伝子等を導入したマウス ES 細胞 を効率的に作製する。
- (4) <u>毒性評価に資する遺伝子改変動物の作製</u> 複数の発光遺伝子及びマーカー遺伝子等を導入したマウス ES 細胞を用い、遺伝子改変マウスを 作製する。
- (5) <u>毒性評価可能な培養細胞の作製</u> 臓器細胞の培養方法を確立し、発光遺伝子等を導入した遺伝子改変マウスからターゲット臓器 の培養細胞を樹立する。
- (6) <u>毒性評価可能な in vitro 試験法の開発</u>
 当該培養細胞による試験系を確立し、当該試験系のプロトコール案を作成する。

く実施テーマン

- (a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発
- (b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発
- (c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発
- (d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発

実施テーマ

(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発

目的

研究開発の流れ(1)~(6)をもとに、肝臓毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発する。具体的に は、文献情報等をもとにマーカー遺伝子を選定し、当該マーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、 人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスの順に作製する。作製した遺伝子改変マ ウスから肝臓細胞を採取し、三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、 肝臓毒性を評価できる in vitro 試験法を開発する。

中間目標

肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。また、野生型マウスの肝臓細胞を用い、培養条件を見出す。

最終目標

肝臓毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発するため、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、 遺伝子改変マウスを作製し、肝臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養 細胞を用い、肝臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコール案を作成する。

	目標	成果	達成度
中間時点	(1) マーカー選定およ	(1) 肝毒性および組織特異的マーカープロモ	
	び人工染色体ベク	ーターとして α-Fetoprotein (AFP)等およ	
	ター作製	び Albumin プロモーターを、内部標準マ	
		ーカープロモーターとして Hprt および	
		CAG プロモーターを選定。さらに選定プ	
		ロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子	ほぼ
		を挿入した人工染色体ベクターを各種作	達成
		製。	
	(2) ES 細胞作製	(2) 肝毒性評価用人工染色体ベクターを保持	
		するマウス ES 細胞を作製するとともに、	
		野生型マウスを用い、肝細胞単離法、三	
		次元培養の基盤を確立。	
最終時点	(3) 肝毒性評価用遺伝	(3) 6種類のキメラ或は transchromosomic	
	子改変動物の作製	マウスを作製し、アッセイ精度、発光測	
		定感度等を勘案し CAG-ELuc;	法式
		Albumin-GLuc(KDEL)マウスを毒性評価	连风
		用マウスとして選定。	
	(4) 毒性評価可能な培	(4)約1ヵ月間の反復処理が可能な肝細胞の	

<目標、成果、達成度>

養細胞の作製	三次元培養系および発光測定系を確立。	
(5) in vitro 肝毒性プロ	(5) 三次元培養による in vitro 肝毒性試験法の	
トコールの作成	プロトコールを作成。	
(6) 国際標準化に向け	(6) 平成28年度化学物質安全対策事業で実施	
た取り組み	中。	

研究開発の内容

■ 肝臓毒性 in vitro 試験に用いるトランスクロモソミックマウスの選定

本プロジェクトでは、人工染色体ベクターが導入された遺伝子改変マウスより単離した肝細胞を3 次元培養に供し、発光レポーターの発光強度の変動を指標にハイスループットアッセイが可能な in vitro 肝毒性試験系の構築を目的としている。そこで、当該試験に最適な発光レポーター導入トラン スクロモソミック(Tc)マウスを選定した。(1)CAG プロモーター制御下で Pyrearinus termitilluminans 由来緑色発光ルシフェラーゼ(ELuc)が発現する Tc マウス、(2) CAG プロモーター制御下で ELuc および nuclear factor-кB 応答配列依存的に Phrixothrix hirtus 由来赤色発光ルシフェラーゼ(SLR3) が発現する Tc マウス、(3) CAG プロモーター制御下で ELuc およびアルブミンプロモーター制御下 で Gaussia princeps 由来分泌型ルシフェラーゼ GLuc(具体的には小胞体移行配列が C 末端に付加さ れた GLuc、以下 GLuc(KDEL))が発現する Tc マウスを作製した。続いて、各 Tc マウスの肝臓から初 代肝細胞を単離、2 次元および3 次元培養に供し、アセトアミノフェン、アフラトキシン B1 等の代 表的な肝毒性物質を処理し、各々のルシフェラーゼの経時的発光測定を行った。いずれの Tc マウス の肝細胞を用いた場合においても、想定した発光の変化が観察されたが、肝毒性物質に対する応答 性、発光強度、発光測定の安定性および簡便さ等を勘案し、上記(3)の ELuc および GLuc (KDEL) が発現する Tc マウス (CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウス)を in vitro 肝毒性試験に用いることとし た (図 A-1)。





図 A-1.

CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウスの概要及び発光活性測定方法

■ 初代肝細胞単離法の確立

肝臓毒性試験に用いる肝細胞の調製法については、コラゲナーゼ灌流とパーコール処理を組合せ た方法を確立したものの、1 匹のマウスから調製できる肝細胞数は、96 ウェルマルチプレートに 1 ウェル当たり 2 × 10⁴ 個播種した場合、1 枚程度と極めて少なかった。これは、コラゲナーゼ灌流で 調製した際の生細胞数が非常に少ないことに起因すると考えられたため、生細胞の収率を向上させ た肝細胞調製法を再検討した。具体的には、コラゲナーゼのメーカーおよびロット、コラゲナーゼ の溶解方法、保存方法、前灌流の速度・容量・温度、肝細胞の濾過方法、洗浄バッファーの種類・ 容量等について最適化することで、生存率 80~90%の品質の高い肝細胞が調製可能となり、収量も 1 匹当たり 96 ウェルプレート約 50~80 枚分と飛躍的に改善することに成功した。調製法の概要を 図 A-2 に示す。



図 A-2. 最適化した肝細胞調製方法の概要および調製した肝細胞の解析結果

■ 肝細胞の品質検証

確立した方法に基づき調製した肝細胞を 3 次元培養に供し、当該毒性試験系に使用できる品質を 維持しているかを検証した。CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウスより調製した肝細胞を 3 次元培養し、 アルブミンタンパク質の分泌量、さらに ELuc および GLuc (KDEL)の発光活性を経時的に測定した(図 A-3)。ELuc 活性は、CO₂インキュベータから取り出したプレートを 37°Cに設定したルミノメーター で、1 ウェル当たり 3 秒間発光測定した。GLuc 活性は、凍結保存した培養上清を室温に戻し、攪拌 後、96 well black bottom プレートに 10 µl /well 移し、ルミノメーターの分注ポンプを用いて発光基 質 (2.5 µM Coelenterazine (native), 20 mM Tris/HCI (pH 8.0), 50 mM MgCl₂)を 40 µl / well 添加しな がら室温で 5 秒間測定した。なお、発光測定の前には基準光源プレート TRIANT (アトー社製)を用 いルミノメーターの測定精度を確認した。その結果、アルブミンタンパク質の分泌、細胞内の ELuc 活性および培養液中の GLuc (KDEL)活性は約 1 ヶ月間持続することが明らかとなり、長期間の反復暴 露処理が可能であることが示唆された。また、培養 17 日後の細胞を Periodic acid – Schiff (PAS) 染 色したところ、明瞭なグリコーゲンの蓄積が認められ、確立した肝細胞調製方法および 3 次元培養 方法により長期間肝機能が維持されていることが確認された(データ省略)。さらに、培養 7 日目の スフェロイドを用いた DNA マイクロアレイ解析および定量的 PCR 解析により、毒性発現に関与す る Phase I、Phase II およびトランスポーター遺伝子群の発現も確認した(データ省略)。



図 A-3 3次元培養した CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウス肝細胞のアルブミンタンパク質分泌量、 ELuc および GLuc (KDEL)発光強度の経時測定

ELucの発光強度の変化と細胞毒性およびGLuc (KDEL)の細胞外漏出と細胞死の種類の関連性の 検証

毒性物質処理により起こる ELuc および GLuc (KDEL)の発光強度の変化が細胞毒性の発現や細胞死 と相関しているかを確認した。まずELucの発光低下と細胞毒性発現の関連性について検証するため、 CAG プロモーター制御下で ELuc が発現する MI-MAC/A9 細胞および CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マ ウス肝細胞を2次元培養に供し、非特異的毒性物質である SDS を処理し、48 時間後の ELuc の発光 強度と WST-1 による細胞生存率を測定した(図 A-4)。その結果、A9 細胞および肝細胞ともに、SDS 濃度に依存した ELuc の発光強度の低下は WST-1 で評価した細胞生存率と良く一致することが明ら かとなり、想定通り、ELuc の発光測定により細胞毒性(細胞活性)を簡便にモニターできることが 確認された。



ELuc の発光低下と細胞毒性の相関性。(左図)A9細胞、(右図)肝細胞

次に、GLuc (KDEL)の培養液中への漏出と細胞死について検討した。毒性発現による典型的な細胞 死であるアポトーシスでは、danger signal となりうる細胞内容物の漏出は殆ど起こらないと考えら れる。一方、ネクローシスでは細胞膜障害に伴う細胞内容物が漏出されることが予想される。即ち、 GLuc (KDEL)の培養液中への漏出の有無を測定することにより、被験物質がアポトーシスを誘導する か、或いはネクローシスを誘導するかを評価できると予想した。そこで、CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL) マウスの肝細胞を 2 次元培養に供し、ネクローシス或いはアポトーシスを誘導する物質を処理した 際の 24 時間後の ELuc および GLuc (KDEL)活性を測定した。図A-5 に示すように、ネクローシス誘導 剤として知られている oligomycin を処理すると ELuc の発光はほぼ消失するが、培地中の GLuc (KDEL)の発光強度は 2 倍に増加した。また、細胞膜に障害を与える界面活性剤 SDS を処理すると、 同様の傾向が観察された。一方、アポトーシス誘導剤である mitomycin C を処理すると、 ELuc の発 光の低下に伴い、培地中の GLuc (KDEL)の発光強度も低下することが明らかとなった。更に詳細な解 析は必要であるが、これらの結果から、GLuc (KDEL)の発光強度の変化により、化学物質により誘導 される細胞死の種類、即ち物質の有する細胞死誘導の種類が推定できることが示唆された。



■ 代表的な肝臓毒性物質を用いた 3 次元培養における in vitro 肝毒性試験の検証

3 次元培養した肝細胞に代表的な肝毒性物質であるアセトアミノフェンおよびアフラトキシンを 反復処理し、実際に発光測定による肝毒性試験が実施できるかを検討した。被験物質を 2~3 日毎に 反復処理し、ELuc の発光活性測定を非破砕的に毎日実施した結果、アセトアミノフェンおよびアフ ラトキシンともに、経時的な ELuc 活性の低下が認められ、反復暴露処理による in vitro 肝毒性試験 が可能であることが示唆された(図 A-6)。



次に、上記のアセトアミノフェン処理により観察された ELuc 活性の低下が、代謝酵素によるアセ トアミノフェンの代謝に関連した毒性発現であるかを検討するため、CYP 阻害剤を用い検証した。 CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウスより単離した肝細胞を3次元培養に供し、培養4日目に3mMの アセトアミノフェンおよび CYP 阻害剤を処理し、2~3日毎の反復暴露を12日間行った。CYP 阻害 剤はユニバーサル阻害剤である1-aminobenzotriazole(100 µM)および CYP1A2, 2A4, 2C38, 3A11 を阻害する isoniazid(100 µM)を用いた。その結果、図A-7に示すように、アセトアミノフェン処 理により ELuc の発光強度は経時的に減衰したが、1-aminobenzotriazole 存在下では発光の減衰は認 められず、また isoniazid では部分的に発光の減衰が抑制されることが明らかとなり、ELuc の発光の 減衰は CYP によるアセトアミノフェンの代謝と連動した現象であることが確認された。また、培養 液中の GLuc (KDEL)の発光強度はアセトアミノフェン処理により増加したが、1-aminobenzotriazole および isoniazid では抑制されることも確認された。

以上の結果より、本研究で確立した肝細胞調製方法および3次元培養方法により、肝機能を長期 間維持した培養が可能であること、また、当該プロジェクトにおける主目的の一つである代謝によ り毒性が発現する化学物質の毒性評価が可能であることが確認された。



<mark>図 A-7</mark>. CYP 阻害剤によるアセトアミノフェン毒性発現の抑制

■ 被験物質の選定

肝臓毒性 in vitro 試験に用いる被験物質は、HESS、LiverTox 等のデータベース、ToxOmics、有害 性評価書等の報告書、或いは論文から約 60 種類選択した。続いてこれらの物質の全てを発光レポー ター導入 MI-MAC HepG2 細胞を用い、発光測定およびニュートラルレッドによる細胞毒性試験に供 し、発光強度の変化および細胞生存率に加え、沈殿、プレート底面の腐食性、揮発性、また培養液 の着色等から、肝毒性試験での使用の可否を決定した。肝臓毒性 in vitro 試験に用いる被験物質には、 一般化学物質として 14 種類、Tox-Omics で実施した 7 種類、医薬品 11 種類、農薬 1 種類、その他 の物質として 5 種類を選定した。このうち動物或いはヒトにおいて肝毒性が明らかとなっている肝 毒性物質は 30 種類、肝臓には毒性を示さないが他の臓器等で毒性を示す非肝毒性物質は 7 種類、い ずれの臓器においても毒性が認められない非毒性物質は 1 種類である。各物質の詳細を表A-1 に記 す。

<mark>表 A-1</mark>. 選定した被験物質

(1) 肝毒性物質

物質名	肝毒性	分類
2-Amino-4-nitrophenol	28-day,小葉周辺性肝細胞肥大, くもり硝子 変性, 類洞内色素沈着	一般化学物質
3-Aminophenol	28-day, 肝細胞の単細胞壊死	一般化学物質
4-Aminophenol	肝絶対及び相対重量増加(腎:近位票再勘定 日の凝固壊死、好塩基性尿細管、ヒトで皮膚 感作性あり) ¹⁾	一般化学物質
o-Anisidine Hydrochloride	28-day,小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子 変性	一般化学物質
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	28-day, hepatocyte necrosis at 150 mg/kg	一般化学物質
3,4-Dimethylaniline	28-day, necrosis at 250 mg/kg	一般化学物質
3,5-Dimethylaniline	28-day, hepatocyte necrosis at 360 mg/kg	一般化学物質
N,N-Dimethyl-p-toluidine	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	一般化学物質
4-Isopropylaminodiphenylamine	28-day, necrosis hepatocyte at 100 mg/kg	一般化学物質
4,4'-Methylene-bis (2-chloroaniline)	42-day, necrosis at 50mg/kg	一般化学物質
4,4'-Methylenedianiline	中毒性肝障害 ²⁾ ,胆管過形成,肝細胞変性,脂肪 肝,肝細胞壊死 ³⁾	一般化学物質
o-Nitroanisole	28-day、小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子 変性	一般化学物質
(+)-Pulegone	91-day, necrosis at 150mg/kg	一般化学物質
Sodium dodecyl sulfate	肝重量増加、ALT 増加(ラット 28 日) ⁴⁾	一般化学物質
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg 反復・生殖、 肝臓重量の増加,小葉中心性の肝細胞肥大, 胆管内の好塩基性物, 空胞変性	一般化学物質
Thiourea dioxide	反復・生殖、肝臓重量の増加,小葉中心性の 肝細胞肥大,胆管内の好塩基性物,空胞変性	一般化学物質
Tris(2-chloroethyl) phosphate	肝絶対及び相対重量増加(ラット16日,16週, 66週, マウス16週) ⁵⁾	一般化学物質
Acetaminophen	解熱鎮痛剤, 中毒性, 肝細胞障害型肝障害 necrosis hepatocyte at 25000 ppm (91-day, HESS, ver 3.0)	医薬品
Acetylsalicylic acid	中毒性肝障害、通常はほぼ無症状、ひどい場 合は小葉中心の巣状壊死、門脈域の軽度の炎 症、高濃度でミトコンドリアの機能を阻害 ⁶⁾	医薬品
Amiodarone HCl	抗不整脈薬、ミトコンドリアに対する障害に よる脂肪肝炎、中毒性+代謝特異体質(日本 医科大学麻酔科学講座より)、idiosyncratic toxicity, hypersensitivity ⁶⁾	医薬品

Benzbromarone	尿酸排泄薬、劇症肝炎の報告あり、原体また は代謝物によるミトコンドリア機能障害が 考えられる ⁶⁾	医薬品
Carbamazepine	イミノスチルベン系薬物、抗てんかん薬、混 合型、 hypersensitivity か代謝物の薬剤-タン パク複合体に対する免疫反応によると考え られる ⁶⁾	医薬品
Cisplatin	抗がん剤、腎毒性物質、肝障害の報告あり ⁶	医薬品
Clozapine	抗精神病薬, 肝障害の機序は不明, 肝臓で代 謝(CYP1A2も関与), 急性肝障害, 死亡等の報 告あり ⁶⁾	医薬品
Flutamide	抗がん剤、非ステロイド性アンドロゲン受容 体拮抗薬、劇症肝炎、代謝物によると考えら れる ⁶⁾	医薬品
Pyrazinamide	抗真菌薬、肝細胞障害型肝障害、ミトコンド リア障害、おそらく代謝物が作用、一部は直 接的な毒性作用 ⁶⁾	医薬品
(±)-Verapamil hydrochloride	カルシウム拮抗薬、肝細胞障害型肝障害、脂 肪肝炎、おそらく hypersensitivity ⁶⁾	医薬品
Alachlor	相対及び絶対肝重量の増加(90日、マウス)、 胆管増生(6ヶ月、イヌ)、小葉中心性肝細 胞壊死等(2年慢性、ラット)	農薬
	·	
Aflatoxin B1	カビ毒(陽性対象に使用)	その他
3-Methylcholanthrene	多環芳香族炭化水素	その他

(2) 非肝毒性物質

物質名	肝毒性	分類
Anthranilic Acid	肝毒性なし	一般化学物質
2,2-Bis(bromomethyl)-1,3- propanediol	肝毒性なし	一般化学物質
Phenolphthalein	肝毒性なし	一般化学物質
Trisodium nitrilotriacetate monohydrate	肝毒性なし	一般化学物質
Dimethyl fumarate	多発性硬化症薬 肝毒性は特になし ⁶	医薬品
Caffeine	アルカロイド, ヒトに対して興奮作用	その他
3-Nitropropionic acid	神経毒性物質	その他
D-Mannitol	糖アルコール(陰性対象物質)	その他

1) OECD 化学物質対策の動向第 19 報, 第 30 回 OECD HPV 化学物質初期評価会議(2010, パリ)

- 2) 労働基準法施行規則の規定に基づき労働大臣が指定する単体たる化学物質及び化合物(合金を 含む。)並びに労働大臣が定める疾病を定める告示
- 3) 有害性評価書 ver. 1.0, No.42, 化学物質排出把握管理促進法政令号番号: 1-340, NEDO
- 4) SIDS Initial Assessment Report for SIAM 5, Belgirate, Italy, 28-30 October 1995, OECD SIDS
- 5) 有害性評価書 ver. 1.0, No.205, 化学物質排出把握管理促進法政令号番号: 1-352, NITE、NTP Technical Report Series No. 391, F344/N RATS and B6C3FI MICE (GAVAGE STUDIES), NIH
- 6) LiverTox (http://livertox.nlm.nih.gov/index.html)、重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性肝 障害 平成 20 年 4 月 厚生労働省

■ In vitro 肝毒性試験

選定した 38 物質について、CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウスの肝細胞を用いた 2 次元および 3 次元培養による in vitro 肝毒性試験を実施した。2 次元培養では化合物添加後、1 日毎に 3 日目まで ELuc および GLuc (KDEL)活性を測定、一方、3 次元培養では 2~3 日毎に化合物添加後、最長 26 日目 まで両ルシフェラーゼの活性を測定した。概要を図 A-8 に記載した。



図 A-8. CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウスの肝細胞を用いた 2 次元および 3 次元培養による in vitro 肝毒性試験の概要

2 次元培養による肝毒性試験法の詳細を以下に、また概要を図A-9 に記載した。前述の方法に従 い CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウスより肝細胞を単離し、細胞ペレットを肝細胞メンテナンス培地 (Promocell C-25210,以下 HMM 培地)で8 x 10⁵ cells / ml に懸濁した。コラーゲンコート済み96 ウェルプレートを100 µl / well の PBS で2回洗浄し、最終濃度の2倍濃度に調製した化合物を含む HMM 培地を 50 µl / well 分注した。その直後に、広径チップを用いて肝細胞懸濁液を 50 µl / well 分 注し CO₂ インキュベータで培養を開始した。ELuc および GLuc (KDEL)の発光は1日1回、3日間ま で前述の方法に従い測定した。



in vitro 肝毒性試験の概要

3 次元培養による肝毒性試験法の詳細を以下に、また概要を図A-10 に記載した。96 ウェルプレート Cell-able の各ウェルにフィーダー細胞として培養液に懸濁した 3T3-Swiss Albino (JCRB9019)を2 x 10⁴ cells / 100 µl / well となるように播種し、CO₂インキュベータにて一晩培養した。培養上清を吸引除去した後、広径チップを用いて肝細胞懸濁液を 2 x 10⁴ cells / 100 µl / well 分注し、培養開始 4日目に化合物添加を開始した。化合物は、最高添加濃度の 500 倍のストック溶液を調製し、添加直前に溶媒を用いて希釈系列を作製し、培養液を用いて 1/10 希釈した。この希釈系列をさらに 1/10、1/5 と 3 段階希釈し、広径チップを用いて肝細胞に添加した。最後の 1/5 希釈に用いる培地には、375 µM D-luciferin を添加した(最終濃度 300 µM)。その後 2~3日毎に培地交換を行った。ELuc の発光測定は培地交換の直前に、また、GLuc 活性は培地交換の際に回収した培養上清を用い測定した。



<mark>図 A-10</mark>. CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウスの肝細胞を用いた 3 次元培養による in vitro 肝毒性試験の概要

2 次元および 3 次元培養ともに、HepG2 細胞を用いた予備実験の結果から決定した化合物毎の最 高濃度を用い、公比 3、5 濃度、4 反復により実施した。図 A-11 に概略を記載した。



図 A-11. 2 次元および 3 次元培養試験での化合物の希釈系列およびプレートデザイン

CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウスの肝細胞を用いた 2 次元および 3 次元培養による in vitro 肝毒 性試験の全結果を<mark>表 A-2</mark>に記載した。

2 次元培養の試験結果では、殆どの物質で処理後1日目以降の ELuc および GLuc (KDEL)の発光の 変動が認められなかったため、1日目のみの結果を採用することとした。表には、ELuc の発光の変 動の増減および IC₅₀ 値、および GLuc (KDEL)の発光の増減を記載した。3 次元培養の試験結果につい ては、ELuc の発光の変動の増減、IC₅₀ 値および IC₅₀ 値が最初に得られた処理日数を、また GLuc (KDEL) については発光の変動の増減を記載した。

その結果、培養液中の GLuc (KDEL)の発光の増加、即ち細胞内からの GLuc (KDEL)の漏出は多くの 被験物質処理により認められたものの、処理開始直後のみ、或いは特定の処理日のみで漏出が観察 されるなど、今回の実験結果のみではその挙動と細胞毒性発現の関連性が明確化できないため、GLuc (KDEL)については今後の判定基準の設定に用いないこととした。一方 ELuc の発光低下に着目すると、 陽性対象として用いた aflatoxin B1、また acetaminophen、3-methylcholanthrene 等の肝臓内での代 謝により毒性が発現する物質による発光低下は3次元培養では生じたが、2次元培養では観察され なかった。その他、肝毒性物質である N,N-dimethyl-p-toluidine、o-nitroanisole でも同様に、3次元 培養では顕著な低下が認められたが、2次元培養での発光低下は起こらなかった。一方、非肝毒性 物質については、2次元培養では3-nitropropionic acid および phenolphthalein 処理により ELuc の 発光が低下したが、3次元培養での低下は認められなかった。なお、非毒性物質である D-mannnitol では両培養系においても ELuc および GLuc (KDEL)の発光の変化は生じなかった。

以上の結果より、ELuc の発光低下を指標とした場合、3次元培養系が感度および特異性ともに2次元培養よりも高いことが明らかとなった。また前述のように、現段階では GLuc (KDEL)の発光の増加の解釈が困難であるため、以降の判定基準の設定には3次元培養系における ELuc の発光の低下を 指標とすることとした。

<mark>表 A-2</mark>. CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウスの肝細胞を用いた 2 次元および 3 次元培養による in vitro 肝毒性試験結果

肝毒性物質

物香夕	肝毒性	分類	2D culture (Day 1)			3D culture (~Day 26)				
10,21	11 4 12	77.8	CAG- ELuc	IC ₅₀ (μΜ)	Alb- GLuc		CAG- ELuc	ÌC₅₀ (μΜ)	IC ₅₀ (day)	Alb- GLuc
Aflatoxin B1 (1st)			\rightarrow	N.D.	\rightarrow		\checkmark	5	з	1
Aflatoxin B1 (2nd)	カビ毒(陽性対象に使用)	その他					\mathbf{A}	10	3	↑
Aflatoxin B1 (3rd)							$\mathbf{+}$	9	3	↑
Acetaminophen	necrosis hepatocyte at 25000 ppm (91-day, HESS, ver 3.0)	医薬品	↑	N.D.	→		\checkmark	2500	5	↑
Acetylsalicylic acid	中毒性肝障害、ひどい場合は小葉中心の巣 状壊死、門脈域の軽度の炎症	医薬品	↓	3000	>		\checkmark	7000	3	↑
Alachlor	肝重量(相対及び絶対、90日、マウス)	農薬	\downarrow	30	1		\checkmark	40	3	↑
Amiodarone	ミトコンドリアに対する障害による脂肪肝炎	医薬品	\downarrow	9	↑		1	60	3	↑
2-Amino-4-nitrophenol	小葉周辺性肝細胞肥大, くもり硝子変性, 類洞内色素沈着	CERI	↓	50	1		\checkmark	1000	3	↓
3-Aminophenol	28-day, 肝細胞の単細胞壊死	一般	\downarrow	1520	↑		\checkmark	4500	5	\rightarrow
4-Aminophenol	肝絶対および相対重量	一般	\downarrow	150	¢		1	370	3	\rightarrow
o-Anisidine	小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子変性	CERI	\downarrow	70	\downarrow		1	1900	19	\downarrow
Benzbromarone	劇症肝炎の報告あり	医薬品	\downarrow	<4	¥		\checkmark	50	3	\downarrow
2-Bromo-2-nitro-1,3- propanediol	28-day, hepatocyte necrosis at 150 mg/kg	一般	≁	90	¢		\checkmark	110	3	↑
Carbamazepine	hypersensitivityか代謝物の薬剤-タンパク複 合体に対する免疫反応	医薬品	↓	200	→		\checkmark	200	14	↓
Cisplatin	抗がん剤、腎毒性物質	その他	\downarrow	20	1		\checkmark	50	3	↑
Clozapine	急性肝障害	医薬品	\downarrow	50	\rightarrow		\checkmark	50	3	↑
3,4-Dimethylaniline	28-day, necrosis at 250 mg/kg	一般	\downarrow	1000	1		\checkmark	1000	7	\rightarrow

物晉名	肝毒性		20) cultu Day 1	ire)	3D culture (~Day 26)			
W.R.L			CAG- ELuc	IC ₅₀ (μΜ)	Alb- GLuc	CAG- ELuc	iC ₅₀ (μΜ)	IC ₅₀ (day)	Alb- GLuc
3,5-Dimethylaniline	28-day, hepatocyte necrosis at 360 mg/kg	一般	\checkmark	1570	\rightarrow	\checkmark	6650	7	1
N,N-Dimethyl-p-toluidine	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	一般	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\checkmark	8000	14	1
Flutamide	劇症肝炎、代謝物によると考えられる	医薬品	\downarrow	30	\rightarrow	\checkmark	90	3	↑
4-Isopropylamino- diphenylamine	28-day, necrosis hepatocyte at 100 mg/kg	一般	\checkmark	15	↑	\checkmark	60	3	↑
3-Methylcholanthrene	多環芳香族炭化水素	その他	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\checkmark	6	3	\downarrow
4,4'-Methylene-bis(2-chlorc aniline)	42-day, necrosis at 50mg/kg	一般	≁	20	↑	↓	70	5	微増
4,4'-Methylenedianiline	中毒性肝障害,胆管過形成, 肝細胞変性,脂 肪肝,肝細胞壊死	一般	\checkmark	250	→	\checkmark	580	3	↑
o-Nitroanisole	小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子変性	CERI	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\checkmark	1500	11	1
(+)-Pulegone	91-day, necrosis at 150mg/kg	一般	\checkmark	60	\rightarrow	\checkmark	1000	10	微増
Pyrazinamide	肝細胞障害型肝障害、ミトコンドリア障害	医薬品	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\rightarrow	N.D.	N.D.	\rightarrow
Sodium dodecyl sulfate	肝重量増加、ALT増加 (ラット28日)	一般	\downarrow	20	1	\checkmark	200	3	1
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m- cresol)	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	一般	≁	32	↑	\checkmark	29	3	↑
Thiourea dioxide	反復・生殖、肝臓重量の増加,小葉中心性の 肝細胞肥大胆管内の好塩基性物, 空胞変性	一般	\checkmark	2400	→	\checkmark	6040	3	微増
Tris (2-chloroethyl) phosphate	肝絶対及び相対重量増加	一般	\checkmark	1000	↑	\checkmark	4400	3	↑
(±)-Verapamil	肝細胞障害型肝障害、脂肪肝炎	医薬品	\checkmark	30	1	\checkmark	50	5	1

非肝毒性物質および非毒性物質

🔤 : 肝毒性物質

🔜 : 非肝毒性物質

:非毒性物質

柳菇々	肝毒性		2C () cultu Day 1	ire)	3D culture (~Day 26)				
10111			CAG- ELuc	IC ₅₀ (μΜ)	Alb- GLuc	CAG- ELuc	IC ₅₀ (μΜ)	IC₅₀ (day)	Alb- GLuc	
Anthranilic acid	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\rightarrow	N.D.	N.D.	\rightarrow	
2,2-Bis(bromomethyl)-1,3- propanediol	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	≁	500	↑	\checkmark	2500	3	↑	
Caffeine	アルカロイド, ヒトに対して興奮作用	その他	\checkmark	9000	\rightarrow	\checkmark	5000	3	\downarrow	
Dimethyl fumarate	多発性硬化症薬,肝毒性は特になし	その他	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\checkmark	100	5	1	
3-Nitropropionic acid	神経毒性物質	その他	♦	650	\rightarrow	\rightarrow	N.D.	N.D.	\rightarrow	
Phenolphthalein	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	\downarrow	60	↑	\rightarrow	N.D.	N.D.	\rightarrow	
Trisodium nitrilotriacetate	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	\checkmark	2220	↑	\checkmark	2860	3	1	
D-Mannitol	糖アルコール	その他	\rightarrow	N.D.	\rightarrow	\rightarrow	N.D.	N.D.	→	

● 3次元培養は2次元培養よりも精度が高い(3次元培養を採用)

● 非肝毒性物質のELucのIC50値は2000 μM以上の物が多い

■ 判定基準の設定

表 A-2 に記したように、3 次元培養系においても非肝毒性物質である 2,2-bis(bromomethyl)-1,3propanediol、caffeine、dimethyl fumarate、trisodium nitrilotriacetate により ELuc の発光低下が観察 された。しかし、dimethyl fumarate を除く 3 物質の IC₅₀ 値はいずれも 2000 μM 以上であること、 また肝毒性物質の中でも IC₅₀ 値が 2000 μM 以上を示す物質が認められるものの、非肝毒性物質の ELuc 活性の低下の速度は肝毒性物質によるそれと比較し緩やかではないかと考え、IC₅₀ 値が 2000 μM であった物質について ELuc の IC₅₀ 値の経時的変化に着目することとした。

図 A-12 に示すように、予想通り、非肝毒性物質処理による ELuc の IC₅₀ 値の経時的な低下は肝毒 性物質と比較し緩やかであることが明らかとなった。そこで、判定基準として、初回に得られる ELuc の IC₅₀ 値が 2000 μM 以下である場合は陽性物質(肝毒性物質)、さらに、初回に得られる ELuc の IC₅₀ 値が 2000 μM 以上であっても、その後1週間以内に IC₅₀ 値が 2000 μM 以下に低下する場合、陽性 と判定することとした。



最初にELucの発光が半減してから1週間以内にIC50値が2000 μM以下に低下するか

<mark>図 A-12</mark>. CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウス肝細胞を用いた 3 次元培養試験において、 ELuc の IC₅₀ 値が 2000 μM 以上であった物質の IC₅₀ 値の経時的変化

設定した基準に基づき、表 A-2 の 3 次元培養系の結果について陽性・陰性の判定を行った(表 A-3)。 その結果、30 種類の肝毒性物質のうち、最初に観察された ELuc の IC₅₀ 値が 2000 μ M 以上であり、 その後 1 週間経過しても IC₅₀ 値が 2000 μ M 以下に低減しなかった acetylsalicylic acid、 2-amino-4-nitrophenol、*N*,*N*-dimethyl-*p*-toluidine、pyrazinamide、thiourea dioxide の 5 物質につい ては陰性と判定されたが、その他の 25 物質は陽性と判定された。一方、7 種類の非肝毒性物質のう ち、最初に観察された ELuc の IC₅₀ 値が 2000 μ M 以下であった dimethyl fumarate は陽性と判定され たが、その他の 6 物質については陰性と判定された。

以上の結果を統合し、CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウス肝細胞を用いた 3 次元培養系の予測能を 表A-4にまとめた。38 物質を用いた結果より、当該試験系は感度 83%、特異性 88%、陽性予測率 96%、 陰性予測率 58%、精度が 84%であることが明らかとなった。



<mark>表 A-3</mark>. 被験物質の陽性および陰性判定結果

:	肝毒性物質
:	非肝毒性物質
:	非毒性物質

			3D culture						
物質名	肝毒性	分類	CAG- ELuc	IC₅₀ (μΜ)	IC₅₀ (day)	Alb- GLuc	Judge		
Aflatoxin B1 (1st)			\downarrow	5	3	1	Р		
Aflatoxin B1 (2nd)	カビ毒(陽性対象に使用)	その他	\downarrow	10	3	1	Р		
Aflatoxin B1 (3rd)			\checkmark	9	3	↑	Р		
Acetaminophen	necrosis hepatocyte at 25000 ppm (91-day, HESS, ver 3.0)	医薬品	≁	2500	5	↑	Р		
Acetylsalicylic acid	中毒性肝障害、ひどい場合は小葉中心の巣 状壊死、門脈域の軽度の炎症	医薬品	\checkmark	7000	3	↑	N		
Alachlor	肝重量(相対及び絶対、90日、マウス)	農薬	\downarrow	40	з	1	Р		
Amiodarone	ミトコンドリアに対する障害による脂肪肝炎	医薬品	\downarrow	60	3	↑	Р		
2-Amino-4-nitrophenol	小葉周辺性肝細胞肥大, くもり硝子変性, 類洞内色素沈着	CERI	≁	1000	3	\checkmark	Р		
3-Aminophenol	28-day, 肝細胞の単細胞壊死	一般	\downarrow	4500	5	\rightarrow	Ν		
4-Aminophenol	肝絶対および相対重量	一般	\downarrow	370	3	\rightarrow	Р		
o-Anisidine	小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子変性	CERI	\downarrow	1900	10	\downarrow	Р		
Benzbromarone	劇症肝炎の報告あり	医薬品	\checkmark	50	3	\downarrow	Р		
2-Bromo-2-nitro-1,3- propanediol	28-day, hepatocyte necrosis at 150 mg/kg	一般	≁	110	3	↑	Р		
Carbamazepine	hypersensitivityか代謝物の薬剤-タンパク 複合体に対する免疫反応	医薬品	↓	200	14	≁	Р		
Cisplatin	抗がん剤、腎毒性物質	その他	\downarrow	50	3	1	Р		
Clozapine	急性肝障害	医薬品	\downarrow	50	3	1	Р		
3,4-Dimethylaniline	28-day, necrosis at 250 mg/kg	一般	\downarrow	1000	7	\rightarrow	Р		

	肝毒性		3D culture						
物質名			CAG- ELuc	IC ₅₀ (μΜ)	IC ₅₀ (day)	Alb- GLuc	Judge		
3,5-Dimethylaniline	28-day, hepatocyte necrosis at 360 mg/kg	一般	\checkmark	665 0	7	1	Р		
N,N-Dimethyl-p-toluidine	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	一般	\downarrow	8000	14	1	N		
Flutamide	劇症肝炎、代謝物によると考えられる	医薬品	\downarrow	90	3	1	Р		
4-Isopropylamino- diphenylamine	28-day, necrosis hepatocyte at 100 mg/kg	一般	\checkmark	60	3	↑	Ρ		
3-Methylcholanthrene	多環芳香族炭化水素	その他	\downarrow	6	3	\downarrow	Р		
4,4'-Methylene-bis(2-chloro aniline)	42-day, necrosis at 50mg/kg	一般	≁	70	5	微増	Р		
4,4'-Methylenedianiline	中毒性肝障害,胆管過形成, 肝細胞変性,脂肪 肝,肝細胞壊死	一般	\checkmark	580	3	↑	Р		
o-Nitroanisole	小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子変性	CERI	\downarrow	1500	11	↑	Р		
(+)-Pulegone	91-day, necrosis at 150mg/kg	一般	\downarrow	1000	10	微増	Р		
Pyrazinamide	肝細胞障害型肝障害、ミトコンドリア障害	医薬品	\rightarrow	N.D.	N.D.	\rightarrow	Ν		
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m- cresol)	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	一般	↓	29	3	↑	Р		
Sodium dodecyl sulfate	肝重量増加、ALT増加 (ラット28日)	一般	\downarrow	200	3	1	Р		
Thiourea dioxide	反復・生殖、肝臓重量の増加,小葉中心性の肝 細胞肥大胆管内の好塩基性物, 空胞変性	一般	↓	6040	3	微増	N		
Tris(2-chloroethyl) phosphate	肝絶対及び相対重量増加	一般	1	4000	3	↑	Р		
(±)-Verapamil	肝細胞障害型肝障害、脂肪肝炎	医薬品	\downarrow	50	5	1	Р		
				25,	/30 (8	3%)			

:	肝毒性物質
:	非肝毒性物質
:	非毒性物質

			3D culture				
物質名	肝毒性		CAG- ELuc	IC₅₀ (μΜ)	IC ₅₀ (day)	Alb- GLuc	Judge
Anthranilic acid	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	\rightarrow	N.D.	N.D.	¢	N
2,2-Bis(bromomethyl)- 1,3-propanediol	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	≁	2500	3	↑	N
Caffeine	アルカロイド, ヒトに対して興奮作用	その他	\checkmark	5000	3	¢	N
Dimethyl fumarate	多発性硬化症薬,肝毒性は特になし	その他	\checkmark	100	5	→	Р
3-Nitropropionic acid	神経毒性物質	その他	\rightarrow	N.D.	N.D.	¢	N
Phenolphthalein	肝毒性なし(28日反復投与)		\rightarrow	N.D.	N.D.	¢	N
Trisodium nitrilotriacetate	肝毒性なし(28日反復投与)	CERI	≁	2860	3	↑	N
	6/7 (87%)						
D-Mannitol	糖アルコール		\rightarrow	N.D.	N.D.	\rightarrow	N
	1/1 (100%)						

<mark>表 A-4</mark>. CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウス肝細胞の 3 次元培養による in vitro 肝毒性試験系の予測能

	in vitro		
in vivo	Positive	Negative	
Positive 30	25	5	
Negative 8	1	7	

Sensitivity	83%	(25/30)
Specificity	88%	(7/8)
Positive predict values	96%	(25/26)
Negative predict values	58%	(7/12)
Accuracy	84%	(32/38)

続いて、当該試験結果と動物実験データの相関性について検証した。供試した肝毒性物質のうち、 病理組織学的検査により肝臓に対する最小影響量(LOEL)が明らかとなっている 20 種類について、 LOEL と 3 次元培養の ELuc の発光測定から得られた IC₅₀ 値をプロットしたところ、図 A-13 に示すよ うに、陽性と判定された 3,5-dimethylaniline を除き、IC₅₀ 値と LOEL が良い相関性を示すことが明ら かとなり、本プロジェクトで構築した in vitro 肝毒性試験系は陽性・陰性の判定のみならず、動物に 対する肝毒性の強弱も推定できることが示唆された。



28~91日ラット反復投与試験における肝臓(病理組織学的検査) に対する最小影響量とELucのIC50値を比較



■ プロトコール案の作成

これまで検討した肝細胞調製法、発光測定法、また3次元培養試験法等の条件および実験結果を 考慮し、in vitro 肝毒性試験法のプロトコールを以下の様に設定した。

化合物の最高濃度については、ELuc のIC₅₀値2000 μM を基準に陽性・陰性の判定を行うことから、 3000 μM に設定した。溶媒や水等で3000 μM に溶解する場合は、そのまま試験を開始、一方溶解し ない場合は、溶解する最も高い濃度を最高濃度として試験を開始する(図A-14)。処理濃度は検討 した最高濃度から公比3で5濃度設定する。

肝細胞の培養を開始してから3日目に処理を開始し、2~3日毎に培地交換により反復処理を実施し、都度 ELuc および GLuc (KDEL)の発光値を測定する。

試験結果を受け入れるための条件として、調製直後の肝細胞の生存率(80%以上)であり、且つ ELuc の発光値が 10,000 細胞あたり 10,000 counts/sec 以上であること、また 3 次元培養開始後 3 日目の 無処理スフェロイドの ELuc の発光値が 10,000 counts/sec 以上であることとした。陽性対照の許容 値として、処理開始 5 日後、陽性対象(アフラトキシン B1)10 μM 群の ELuc が 50%以下となるこ ととした(図A-15)。

1. 培養液中の溶解性検討(最高処理濃度の決定)



図 A-15. 試験成立条件

処理開始 14 日以内に ELuc の発光が 2000 µM 以下で半減した場合は陽性(肝毒性物質)と判定す る。一方、14 日以内に半減しない場合は陰性(非肝毒性物質)と判定する。14 日以内に発光が半減 するが、IC₅₀ 値が 2000 µM 以上の場合は更に 1 週間培養を継続し、1 週間以内に 2000 µM 以下の IC₅₀ 値が得られた場合は陽性、得られない場合は陰性と判定する。以上の判定のスキームを図 A-16 にま とめた。また、当該プロジェクトで確立した CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウス肝細胞の 3 次元培養 による in vitro 肝毒性試験系のプロトコールを添付資料に示す。

- 処理濃度:溶解性の検討で決定した最高濃度から公比3で濃度を設定(5濃度)
- 肝細胞の培養開始から3日目に処理開始
- 2~3日毎に培地交換により反復処理実施と同時にELucおよびGLuc活性測定





CAG-ELuc; Albumin-GLuc (KDEL)マウス肝細胞を 用いた in vitro 肝毒性試験プロトコール

Ver. 1.01

一般財団法人食品薬品安全センター 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

平成 28 年 2 月 12 日

1. 試験の目的

この試験は、レポーター遺伝子を導入した初代肝細胞を用いて肝毒性物質をスクリーンし、 28 日間反復投与試験を実施すべき既存化学物質の優先度を判定することを目的とする。

2. 試験の原理

初代肝細胞の肝機能を維持した 3 次元培養条件下で化学物質を処理し、経時的に発光レポー ターの活性を測定することにより、化学物質による肝細胞に対する傷害を検出する。

発光レポーター遺伝子には、ガウシア由来 GLuc に小胞体保留シグナル KDEL を付加した GLuc (KDEL)およびヒカリコメツキムシ由来 ELuc を用い、それぞれをアルブミンプロモーター および GAG プロモーターの下流に連結したレポーターベクターをマウス人工染色体ベクター 内に導入している。アルブミンプロモーターの制御下で発現する GLuc は小胞体にターゲティン グされ、細胞膜傷害に伴い細胞外に放出されることにより発光として検出することができる。 一方、CAG プロモーター制御下で発現する ELuc はペルオキシソームに存在し、細胞毒性に伴 う転写活性の低下の指標および内部標準レポーターとしてその発光量を測定する。

この2種類の発光量を指標として初代肝細胞の毒性作用を評価する。

3. 使用動物

CAG-ELuc; Albumin-GLuc (KDEL) Transchromosomic マウス(鳥取大学作製)

4. 試薬類の調製法

- 4-1. 肝細胞調製および細胞培養関連試薬
 - □前灌流液(EGTA buffer)
 - KCl
 - KH₂PO₄
 - NaHCO₃
 - NaCl
 - D-Glucose
 - EGTA
 - HEPES

□ 灌流用溶液 (コラゲナーゼ溶液)

- DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11054-020)
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン (100x, Thermo Fisher Scientific, Cat. No 15140-122)
- ・ コラゲナーゼ Type3 (Worthington, Cat. No. CLS3)
- ・ コラゲナーゼ Type4 (Worthington, Cat. No. CLS4)
- HEPES

□肝細胞洗浄溶液(Wash medium)

- William's medium E (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A12176-01)
- Fetal bovine serum

□その他

- ・ トリパンブルー
- ・ イソフルラン (Wako, Cat. No. 099-06571)

〈試薬調製方法〉

- ① 前灌流液 (EGTA buffer)
 - 900 ml 超純水 に以下の物質を添加: 0.4g KCl, 0.06g KH₂PO₄, 0.35g NaHCO₃, 8.0g NaCl, 1.0g D-Glucose, 6.0g HEPES, 0.191g EGTA
 - ・ 十分に撹拌した後、pH 7.4 に調整、1 L にメスアップした後、0.22 um filter 濾過、4℃保存。
- ② 灌流用溶液 (コラゲナーゼ溶液)
 - コラゲナーゼ溶解液調製; DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11054-020) 500 ml に 1 M HEPES (pH 7.2-7.5) を 3 ml、1.25 ml ペニシリン・ストレプトマイシン (100x) を添加し、 4℃保存。
 - コラゲナーゼ溶解液 100 ml に 7.5% (w/v) BSA を 0.5 ml 添加し、Worthington 社製の collagenase Type III と Type IV の比活性が各々50 U/ml になるように添加する。
 (コラゲナーゼ重量計算方法)
 コラゲナーゼは「U/mg」という単位で納品され、lot によって値は異なる。Y U/mg の場 合、以下の計算を行い、XX 量必要となる。
 50 U/ml of each type, = 50/ Y (U/mg of lot) = X mg/ml
 - 100 ml で溶解するので, 100 * X mg = XX mg @ 50 U/ml
 - コラゲナーゼを 37℃で 90 分間温めて溶解し、最終濃度 100 U/ml コラゲナーゼ溶液にする。
- ③ 肝細胞洗浄溶液(Wash medium)

Williams' E Medium (Thermo Fisher Scientific, Cat No. A12176-01) 95ml に FBS 5ml を添加、撹拌する。

- 4-2. 発光測定関連試薬
 - ・ D-ルシフェリン カリウムまたはナトリウム塩(TOYOBO、Promega、Resem BV など)
 - ・ セレンテラジン(和光、Poromega、Resem BV など)

5. 試験に必要な機器類

- 5-1. 消耗品
 - ・ 肝細胞 3 次元培養用 96 ウェルプレート Cell-able (東洋合成工業 BP-96-R800, Black wall clear bottom)
- 5-2. 測定機器
 - ・ 96 ウェルマルチプレートに対応し、シリンジポンプが装備されたルミノメーター (ATTO

社製 Phelios など)

基準光源プレート(ATTO 社製 TRIANT など)

6. 試験化合物の調製方法

培養液(最高濃度:3 mM)または水溶性溶媒(蒸留水、培地)に溶解させる。これらの溶媒 に溶解しない場合には、ジメチルスルホキシドに溶解させる(最高濃度:3 mM)。これらの溶 媒に最高濃度で溶解しない場合には、溶解する濃度で化合物溶液を調製する。

7. 動物の飼育方法および肝細胞調製方法

CAG-ELuc; Albumin-GLuc (KDEL) Tc マウスは SPF 動物として飼育し、8~30 週齢のマウスから 灌流法により初代肝細胞を得る。得られた初代肝細胞を 3 次元培養に供する。肝細胞の調製例 を以下に示す。

7-1. 灌流の準備

DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11054-020) 500 ml に 1 M HEPES (pH 7.2-7.5) 3 ml、ペ ニシリン・ストレプトマイシン (100x) 1.25 ml を添加した溶液 100 ml に対し、Worthington 社 製のコラゲナーゼ 2 種を最終比活性が 100 U/ml (Type 3 と Type 4 各々50 U/ml) になるよう に添加する。40℃のウォーターバスで、前灌流液は少なくとも 30 分、調製したコラゲナーゼ 溶液は 90 分間温めておく。コラゲナーゼ溶液のうち 10 ml を灌流直前に分取し、別容器にて 保温しておく。ペリスタポンプにシリコンチューブをつなぎ、先端に 26G 注射針を取り付け、 ライン全体を前灌流液で満たしておく。

7-2. 肝細胞調製

イソフルラン深麻酔下にてマウスを開腹し、肝臓下部の門脈をむき出しにする。ペリスタポ ンプのラインにつないだ注射針を門脈に挿入する。この時、空気の混入を避けるため、ペリス タポンプを 0.5 ml / min 程度の速度で作動させておく。前灌流液が肝臓に流入して脱血が始ま ったことを確認したのち、下大静脈を切断、放血する。下大静脈の切断とほぼ同時にペリスタ ポンプの出力を段階的かつ速やかに 8 ml / min まで上げる。8 分間前灌流を行ったのち、灌流 液をコラゲナーゼ溶液に置き換え、約 11 分かけて 90 ml を流す。灌流後、肝臓を分取しておい たコラゲナーゼ溶液 10 ml を入れたシャーレに取り出す。ピンセットで表面の膜を破り、本体 をつまんで振り洗いをするように素早く振り、溶解した組織をほぐす。膜および消化されなか った組織片などを取り除き、3~5 回おだやかにピペッティングする。以下の操作は可能な限り 氷上で行う。

得られた懸濁液を φ 100 µm セルストレイナーに通し、スルー液を 50 ml 遠沈管に回収する。 さらに Wash medium 40 ml でシャーレを洗い出し、セルストレイナーに通してスルー液を回収 する。スルー液を遠心し(50 x g, 2 min、4°C)、上清を廃棄する。以下全ての遠心操作は正確に バランスを取って行う。細胞ペレットを、Wash medium 50 ml に懸濁し遠心(50 x g, 2 min、4°C)、 上清を廃棄する。細胞ペレットを、Wash medium 50 ml に懸濁し、再度遠心洗浄する(50 x g, 2 min、4°C)。 細胞ペレットは、肝細胞用培地(東洋合成工業 RM-101)10~15 mlに懸濁し、トリパンブル ー染色にて細胞数と生存率を算定する。この際、肝細胞は広径チップを装着したマイクロピペ ットで取り扱い、細胞にストレスを与えないように注意する。また肝細胞は沈みやすいため、 操作直前によく振り混ぜる。肝細胞懸濁液を肝細胞用培地で2x10⁵ cells / ml に希釈し、最終濃 度 300 µM となるように D-luciferin を添加する。

8. 被験物質の処理濃度と処理方法

被験物質の最高処理濃度は、3 mM を上限とし、培養液に溶解可能な最高濃度とする。ただし、 培養容器を溶解する物質および揮発性物質は適用外とする。

被験物質が水に溶解する場合には、水または培養液に溶解する。水に難溶の場合には、ジメ チルスルホキシド (DMSO) に溶解する。被験物質を培養液に溶解した場合にはそのまま、水 に溶解した場合には 10 vol%を越えない量を培養液に添加し、DMSO に溶解した場合には 0.2 vol%を越えない量を培養液に添加し、被験物質を添加した培養液と培地交換して処理を行う。

9. 試験方法(群構成を含む)

3次元培養における肝毒性試験においては、以下の群を設定する。

- 陰性(溶媒)対照
- ・ 被験物質処理群:最高処理濃度から公比3で計5群
- ・ 陽性対照 (アフラトキシン B1)
- 一群4ウェルを用いる。
- プレートデザインは以下の通りとする(図1)。

被験物質は、培養開始後4日目に処理を開始し、2~3日毎、週3回の培地交換により処理を 繰り返す。処理期間は、最初の測定から2週間とし、ELucのIC₅₀値が2mM以上の場合は引き 続き1週間培養と測定を継続する。なお、陽性判定ができた段階で処理を終了することができ る。



図1 初代肝細胞3次元培養試験のプレートデザイン

9-1. 3次元培養

9-1-1. フィーダー細胞の準備

96 ウェルプレート Cell-able の各ウェルにフィーダー細胞として培養液に懸濁した 3T3 Swiss Albino (JCRB9019)を2 x 10⁴ cells / 100 µl / well となるように播種し、CO₂インキュベータにて一 晩培養する。培養液には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium に 10%ウシ胎児血清、1 x 抗生物 質 (Gibco 15240-062) を添加したものを用いる。

9-1-2. 肝細胞の播種

前日フィーダー細胞をまいておいた Cell-able の培養上清を吸引廃棄し、広径チップを用いて 肝細胞懸濁液を2x10⁴ cells /100 μl / well 分注する。CO₂インキュベータにて培養を開始する。 培養開始後2日目(48時間後)に培地交換を行う。培地交換時には古い培養上清を回収・凍結 保存しておく。

培養開始後4日目に培地交換と同時に化合物を添加する。化合物は、最高添加濃度の500倍のストック溶液を調製し、50μl ずつ分注して-30℃で凍結保管しておく。添加直前にストックを室温に戻し、溶媒を用いて公比3の希釈系列を作る。この希釈系列を、培養液を用いて1/10 希釈する。この希釈系列をさらに1/10、1/5と3段階希釈し、広径チップを用いて肝細胞に添加する。最後の1/5希釈に用いる培地には、375μMD-luciferinを添加しておく(最終濃度300μM)。

その後2日又は3日おき、週に3回培地交換を行う。培地交換の直前にルミノメーターを用い発光量を測定し(3 sec / well、37[°]C)、ELucの発光量を測定する。また、培養上清は全て回収して-30[°]Cで保存し、後述のGLucの発光測定に供する。培地交換の際には化合物と 300 μ M D-luciferin を新たに添加しなおしておく。

9-1-3. 発光測定

発光測定の前には基準光源プレート TRIANT を用いルミノメーターの測定精度を確認する。 ELuc 活性は、CO₂インキュベータから取り出したプレートを 37[°]Cに設定したルミノメーター で、1 ウェル当たり 3 秒間発光測定する。GLuc 活性は、凍結保存しておいた培養上清を室温に 戻し、攪拌する。この上清を 96 well black bottom プレートに 10 µl /well 移し、ルミノメーター の分注ポンプを用いて発光基質 (2.5 µM Coelenterazine (native), 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl₂) を 40 µl / well 添加しながら発光量を測定する (F0, 5 sec /well, ディレイなし, 室温)。

10. 初代肝細胞の品質基準および試験成立条件

得られた初代肝細胞の適合基準として、以下の基準を満たす必要がある。

- ・ 灌流後に得られた肝細胞の生存率が 80%以上であること。
- ・ 灌流後に得られた肝細胞の ELuc の発光値が 1 x 10⁴ cells あたり 10,000 counts/sec 以上であること。
- 3次元培養開始後3日目の無処理スフェロイドのELucの発光値が10,000 counts/sec以上であること。

試験成立基準として、以下の基準を満たす必要がある。

 ・ 陽性対照群(Aflatoxin B1)の10 μM 濃度群で処理開始5日後のELucの発光値が陰性対照 群の50%以下に低下していること。

11. 試験結果の判定基準

S

この試験系の陽性判定、すなわち、被験物質が肝毒性物質であると判定する基準は以下の通りとする。

初代肝細胞の品質基準および試験成立条件を満たした場合、処理開始14日を経過しても、被験物質処理群の ELuc の発光量が溶媒対照群の発光量の 50%以上を維持する場合は陰性と判定する。一方、処理開始14日以内に被験物質処理群の ELuc の発光量が溶媒対照群の発光量の 50% 以下となり、その際の IC₅₀ 値が2mM 以下である場合を陽性と判定する。IC₅₀ 値が2mM 以上である場合、さらに培養および測定を継続し、1週間以内に IC₅₀ 値が2mM 以下となった場合、陽性と判定、IC₅₀ 値が2mM 以上である場合は陰性と判定する。

IC₅₀値を求めることができない被験物質のうち、培養液に対する溶解度の観点から処理濃度が 2 mM に満たない場合には、判定不能とする。判定のスキームを以下に示す。



図 2. 初代肝細胞 3 次元培養試験における判定スキーム

改訂履歷

Ver. 1.00	2015.10.07	Ver.1.00 作製
Ver. 1.01	2016.2.11	物質溶解方法を修正(最高濃度を 3 mM に設定)
		2 次元培養方法を削除
		試験成立条件を修正
		判定方法を記載

(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発

目的

研究開発の流れ①~⑥をもとに、腎臓毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発する。 具体的には、文献情報等をもとにマーカー遺伝子を選定し、当該マーカー遺伝子と発光遺伝子等を 用い、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスの順に作製する。当該マーカー遺伝 子と発光遺伝子を導入したラット腎臓細胞等を用いて、三次元培養等により培養細胞を樹立する。 樹立した培養細胞を用い遺伝子改変マウスとの毒性評価結果について比較検証を行い、腎臓毒性を 評価できる in vitro 試験法を開発する。

中間目標

腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、それらを評価できる人工染色体ベクタ ーを導入したマウス ES 細胞やマウスを作製する。

最終目標

腎臓毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発するため、人工染色体ベクター、ラット KS 細胞を作製 し、KS 細胞の分化誘導及び培養等によりネフロン様の 3 次元腎構造体を作製する。作製した 3 次元 腎構造体を用い、腎臓毒性を評価可能な試験系を構築する。腎臓近位尿細管障害の代表的な化学物 質であるシスプラチンによる腎毒性を評価できる試験法のプロトコール案を作成する。

		目標	成郹		達成度
中間時点	(1)	腎臓毒性に関連する	(1)	腎臓毒性マーカーを選定した Kim1(近位	
		と考えられるマーカ		尿細管障害), Aqp1(組織特異性), HPRT(内	
		ー遺伝子の選定と人		部標準腎臓毒性マーカー遺伝子)の発現	
		工染色体ベクター作		をモニターできるレポーター遺伝子を	
		製		作製して人工染色体ベクターに導入し	達成
				<i>t</i> =。	
	(2)	人工染色体ベクター	(2)	腎毒性評価用人工染色体ベクターを保	
		導入マウス ES 細胞		持するマウス ES 細胞を作製した。	
		作製			
最終時点	(3)	人工染色体ベクター	(3)	腎毒性評価用マウス ES 細胞からキメラ	
		導入遺伝子改変マウ		マウスを作成し、目的のマーカー遺伝子	
		ス作製		が生体内(in vivo)で機能していることを	
				確認した。	
	(4)	ラット腎臓細胞の三	(4)	定の品質のラット腎臓細胞由来三次元	達成
		次元培養等による腎		構造体を作製できるプロトコールを作	
		様構造体の樹立		製した。	
	(5)	樹立した腎様構造体	(5)	シスプラチンによる近位尿細管障害を	
		等を用いた腎臓毒性		検出し、定量化できる試験法のプロトコ	

<目標、成果、達成度>

を評価可能な試験系	ールを作製した。	
の構築と試験法プロ		
トコール案作成		

研究開発の内容

基本計画に記載された研究開発の流れ①~⑥に従い研究を進め、表に示す4つのプロトコールを作 製した。いずれの試験法も腎近位尿細管障害を引き起こすシスプラチンによる障害を検出し定量化 できることを示している。

	試験法	細 胞 / 培	評価方法	特徴
		養方法		
腎毒性	未標識 rKS56 細胞	ラットKS	3D 解析ソフトによ	経時的変化観察可能、非破壊
試験 1)	三次元構造体を利	細胞/ 3D	る形態、表面積、体	全サンプル品質検査が可能、
	用した腎毒性試験		積変化、細胞死	ハイスループット化は困難
腎毒性	EGFP 発現人工染色	EGFP	3D 解析ソフトによ	経時的変化観察可能、既存の
試験 2)	体を搭載した	MAC-KS	る形態、表面積、体	蛍光プローブ(毒性メカニズ
	rKS56 細胞三次元	細胞/ 3D	積変化、細胞死	ム)との併用が可能、ハイス
	構造体を利用した			ループット化は困難
	腎毒性試験			
腎毒性	発光レポーター搭	3 色	プレートリーダーに	ハイスループット化が可能、
試験 3)	載 rKS 細胞の2次	MAC-KS	よる Kim1 発光上昇	安価
	元培養での腎毒性	細胞/ 3D	(近位尿細管障害)、	
	評価		蛍光減少(細胞死)	
腎毒性	発光レポーター搭	2 色	プレートリーダーに	ハイスループット化が可能、
試験 4)	載マウス近位尿細	MAC-マ	よる Kim1 発光上昇	最も安価
	管 S3 由来不死化細	ウス S3	(近位尿細管障害)、	
	胞の2次元培養で	細胞/ 3D	蛍光減少(細胞死)	
	の腎毒性評価			

■ 腎毒性試験1)未標識 rKS56 細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験

要旨

腎臓は 200 万以上のネフロンと 20 種以上の細胞から構成されている複雑な組織であり、薬剤の 影響を受けやすい臓器である。腎障害試験は、主にラットを用いた尿検査や血液検査、腎臓の病理 検査で行われている。しかしながら時間的にもコスト的にも動物愛護の観点からも、培養細胞を用 いた in vitro 腎毒性評価法の開発が必要になってきている。腎臓の構造の複雑性により、培養細胞を 用いて腎臓の機能を in vitro で評価することは困難であると予測された。しかしながら岡山大学の 喜多村らは、ラット腎臓近位尿細管 S3 領域から腎前駆/幹細胞を単離し、 3次元培養によりネフロ ン構造をもつネフロン様構造体を再構築することに成功した。 この再構成 3次元ネフロン様構造体を用いた新規 in vitro 腎毒性評価法の開発を目指した。まず 均一な性質の再構成 3次元ネフロン様構造体を複数同時に作成するプロトコールを確立した。次に、 経時的に 3次元ネフロン様構造体が再構成される様子を観察し、化学物質を曝露する時期および方 法を検討した。再構成 3次元ネフロン様構造体は培養14日後の 3次元ネフロン様構造体にシス プラチンを投与したところ細胞死が誘導されて近位尿細管様構造の伸長の阻害が観察できた。この 阻害を定量化することで腎毒性を評価するシステムを開発し、腎毒性試験法のプロトコールを作成 した。

背景

創薬開発における非臨床試験と化学物質の安全性試験では腎毒性試験は必須である。腎毒性試験 は、主にラットを用いた尿検査や血液検査、腎臓の病理検査で行われている。しかしながら今後は 時間的にもコスト的にも動物愛護の観点からも、培養細胞を用いた in vitro 腎毒性試験法の開発が必 要になってきている。

腎臓は 200 万以上のネフロンと 20 種以上の細胞から構成されている複雑な組織である。ネフロ ンは遠位尿細管や近位尿細管、初期のヘンレループ、腎糸球体で構成されている。近位尿細管はそ の表面に薬物を取り込むさまざまなトランスポーターを発現しているため薬剤のもつ毒性におかさ れやすい。

再生医療や創薬開発の為に iPS 細胞、ES 細胞の分化誘導をすることで種々の組織の in vitro 再構築 が行われている。腎臓は、構造が複雑なため再構築が最も難しい組織であると予想されている。最 近、iPS 細胞、ES 細胞といった未分化幹細胞を分化誘導することで腎ネフロン構造体が再構成され た。岡山大学の喜多村らは、ラットの腎臓近位尿細管 S3領域から ラット成体腎臓幹前駆細胞(KS) 細胞の同定に成功し、 3次元培養によりネフロン様構造体を作製した。この腎臓構造体は本物の腎 臓の構造の最小構成単位である腎ネフロン構造を有しており、機能も一部確認された。iPS 細胞、ES 細胞と比較して、KS 細胞は腎臓独自の分化能力を保持しているため高品質の腎臓構造体を効率良く 作成できる。

シスプラチンは多くのがんに有効性が認められている抗がん剤であるが、投与量依存性で、 20-30%の症例で1-2週間後に 急性腎障害 (AKI) がおきる。シスプラチンによる AKI ではアポトー シスにより近位尿細管細胞が壊死して脱落する。近位尿細管が再生する場合は腎機能の回復が見込 まれるが、再生しない場合は近位尿細管萎縮と間質の線維化が誘導される。脱落した尿細管細胞を 補うために新規に尿細管細胞が再生されるメカニズムとしては、近位尿細管 S3 セグメントに存在す る腎臓幹細胞が関与することが示唆されている。我々は、腎障害の発症メカニズムに基づき近位尿 細管様構造を持つネフロン様構造体における細胞死の誘導と近位尿細管の再生阻害を再現した in vitro 腎毒性試験法を開発することにした。

31



<mark>図 B1-1.</mark> 岡山大学ラット KS 細胞の概要を用いた試験法開発の課題

結果

<u>同時に構築した複数のネフロン様構造体は均一な性質である。</u>

腎毒性評価に用いるためには、複数の施設で品質が均一なネフロン様構造体を同時に複数作製し なくてはならない。岡山大学喜多村博士より、ラット KS 細胞を分与してもらい、鳥取大学にて 3 次元ネフロン様構造体の再構築を試みた。2次元培養で増殖した KS 細胞を1サンプル当たり 1 x10*5 個の細胞になるように調整して増殖因子を加えた培地を含むマトリゲル中に埋め込み培養を 開始し、3週間培地交換を行うことなく培養した。さらに一定の品質のネフロン様構造体が再構築 できるように岡山大学で作成したプロトコの改善を行った。具体的には、ハンギングドロップで均 ーな細胞塊を作成する操作およびマトリゲルに埋め混んだ後で細胞塊から外れた細胞を除去する操 作を追加した。その結果、岡山大学に続き鳥取大学でも KS 細胞由来のネフロン様構造体を作成する ことができた。12サンプル同時に4週間 3次元培養した結果、すべてのサンプルで類似のネフロ ン様構造体が再構成された。



図 B1-2. ラット KS 細胞から構築したネフロン様構造体

<u>疑似的に作成した2次元画像にて3次元構造体の大きさを定量化できる</u>

3次元構造を観察するために、セクショニング機能を持つ顕微鏡(キーエンス)にて、ネフロン 様構造体の上端から下端まで厚さ 10um の間隔で撮影し、Decombolution analysis により擬似的に 2次元画像を作成した。この2次元画像の面積を定量化した。12サンプルの面積のばらつきの平均 値を100%とした場合に、標準偏差は±10%の範囲であった。この結果より、品質が均一なネフロン 様構造体を同時に複数作製できるプロトコルを確立することができた。



rKS56 WT 3D area (day 14)

<u>ネフロン様構造体は21日間の3次元培養で形成される。</u>

次に 3次元培養によりネフロン様構造体が再構築される様子を経時的に観察した。再現性の確認 の為に 10回以上実験をくり返した。9回目試験の結果の画像を示す。 Day0に2次元培養していた 細胞を集めてハンギングドロップにより細胞クラスターを形成させた後で増殖因子を含むマトリゲ ルに埋め込み培養を開始した。培養5日目に cyst構造が観察されるようになり、培養8日目から尿 細管様の管状構造が観察される。近位尿細管様の管構造は、培養2週間から3週間の間に急速に伸 長した。

培養 21 日目から 28 日目では、ネフロン様構造体の形態はそれほど変化しないことから、この構造 体は培養 3 週間で成熟し、その後 1 週間は機能し得ることが示唆できた。

ネフロン様構造体はシスプラチンにより管状構造の伸長が阻害される

腎毒性試験法としてプロトコール化するためにはネフロン様構造体における細胞死や形態形成不 全を定量化する必要がある。3次元培養開始14日目のネフロン様構造体にシスプラチンを投与して 3次元構造の形態の変化を解析した。

解析には、シスプラチン未投与(コントロール)、シスプラチン 10μM 投与、シスプラチン 20μM 投与の 3 群でそれぞれ 4 サンプルを用いた。 コントロールの 4 サンプルに関して総面積の変化を 測定したところ、培養 14 日目から 20 日の間で 1.6 倍増加していた。この 6 日間における総面積の 増加率を測定したところ、その増加率はコントロールと比較して、シスプラチン 10μM、20μM 投与 群ともに約 20%減少していることが測定できた。

腎毒性試験法としてプロトコール化するためにはネフロン様構造体における細胞死や形態形成 不全を定量化する必要がある。 ArrayScan High-content system (サーモフィッシャーサイエンティ フィック社)は国際的に最も普及している細胞画像解析システムであるが3次元構造体の画像取得に は適していない。 BZ-X700(キーエンス)は3次元構造の撮影のために適したセクショニング機能を 有した蛍光顕微鏡である。ネフロン様構造体の上部から底部まで10μmの間隔で撮影した後、デコ ンボリューション機能を用いて擬似的な2次元画像を作成した。その後、専用のソフトウェアなど を用いて、明視野における腎構造体の総面積および PI を取り込んだ総面積を測定した。

area change (CisPt for 6 days)

sample; rKS56 WT cell; 1 x 10⁵ cells/well (cultured for 14 days) -> CisPt for 6 days seed; 160121 (day 14 -> CisPt (6 days) -> day 20) KEYENCE B2-X700 1/7500 sec (bright field) z stacks (pitch); 10 µm -> full focused relative growth rate = {(day 20)/(day 14)}/((con. day 20)/(con. day 14))x100





つぎに シスプラチンによる細胞死を定量化するために死細胞に取り込まれる Propidium Iodide (PI) 核染色を行った。解析に用いたネフロン様構造体から作成した擬似的な 2 次元画像を下図に 示す。シスプラチン投与群で はコントロールと比較して、細胞死が誘導されていた。細胞死を定量 化するために、キーエンスの専用の解析ソフトにて PI 陽性面積を定量化した。まずそれぞれの群の PI 陽性面積を測定した(棒グラフ右)。その結果、PI の取り込み面積は、コントロールと比較して、 シスプラチン10μM 投与群で6倍、20μM 投与群で7倍であった。また3次元腎構造体の中心部(core) ではシスプラチン投与の有無に関わらず PI の取り込みが観察されることから3次元での長期培養中 に中心部で細胞死が起きていることが予想された。近位尿細管様の環状構造は中心部の外側に存在 しているため、画像解析により中心部を除いた部分での PI の取り込みを測定した。その結果、PI の 取り込み面積は、コントロールと比較して、シスプラチン10μM、20μM 投与群ともに5倍以上であ った。これらの結果から、KS 細胞由来の3次元腎構造体を用いてシスプラチンによる腎障害を定量 化することが可能であることを示した。さらに、別紙に示した「KS 細胞由来の3次元腎構造体を in vitro 腎毒性試験法のプロトコール(1)」を作成した。

area change (CisPt for 6 days)

sample; rKS56 WT cell; 1 x 10⁵ cells/well (cultured for 14 days) -> CisPt for 6 days seed; 160121 (day 14 -> CisPt (6 days) -> day 20) KEYENCE B2-X700 1/7500 sec (bright field) z stacks (pitch); 10 μm -> full focused relative growth rate = {(day 20)/(day 14)}/{(con. day 20)/(con. day 14)}x100



図 B1-5. ネフロン様構造体のシスプラチンによる細胞死の誘導

まとめ

化学物質の in vitro 安全性試験法として普及させるには、①試験に供する細胞を簡便に作成できる、 ②複数の施設で再現できる、③一定品質のサンプルを作成できる、④生体の障害機序を再現する、⑤ 障害を定量的に計測できるシステムであることが重要である。

今回、確立したプロトコールに従い培養することで、一定の品質を保持した3次元ネフロン様構 造体を効率良く作成することができた。シスプラチンの投与により3次元ネフロン様構造体の近位 尿細管様環状構造の細胞死と管構造の伸長の阻害が観察され、その状態を定量化し計測することが できた。ラットを用いた動物実験においてシスプラチンは近位尿細管細胞、特にS3セグメントの細 胞のアポトーシスを誘発することが知られている。ラット近位尿細管S3セグメント由来の腎幹前駆 細胞である KS 細胞の3次元ネフロン様構造体をもちいた in vitro 試験においても同様にシスプラチ ンによる細胞死が観察された。

急性腎障害(AKI)で脱落した尿細管細胞を補うために新規に尿細管細胞が再生されるメカニズム としては、近位尿細管 S3 セグメントに存在する腎臓幹細胞が関与することが示唆されている。近位 尿細管の再生による回復が認められない場合、腎障害は不可逆的となり慢性化するリスクが高まる。 本実験では in vitro にてシスプラチンにて近位尿細管様管構造の伸長が阻害された。この現象は、生 体内における近位尿細管の再生の阻害を反映しているかもしれない。

ヒト iPS 細胞を分化誘導することでネフロン様構造体を樹立できることが報告されている。ヒト iPS 細胞由来ネフロン様構造体はマーカー遺伝子の発現などから生体における腎機能を再現してい ることが示唆されているが、生体のネフロン構造は再現していない。 KS 細胞由来のネフロン様構 造体では近位尿細管様の管状構造の形成、伸長といった形態変化を経時的に観察できる。今回の試 験法では、化学物質によるネフロン様構造体の形態変化を擬似的に作成した 2 次元画像で測定して 定量化したが、3 次元構造野形態変化を直接撮影して分析するシステムを構築できれば、より優れ たハイコンテントスクリーニングシステムを提案できる。

今後は動物実験にて毒性が知られている複数の化合物質を用いた解析を行うことで、この試験法が OECD テストガイドラインなどに提案できるか検証する。

■ 腎毒性試験2)EGFP 発現人工染色体を搭載した rKS56 細胞三次元構造体を利用した腎毒性試 験

要旨

我々はラット腎幹前駆細胞(KS)細胞をマトリゲル内で 3 次元培養して再構築したネフロン様構造 体がシスプラチンによる腎障害に応答し形態が変化することを示した。創薬開発や安全性試験では 蛍光プローブを用いたハイコンテント解析が行われている。蛍光プローブを用いた細胞イメージン グを行うことでネフロン様構造体の詳細な形態変化を効率良く観察することができる。鳥取大学で 開発してきたマウス人工染色体ベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入した KS 細胞を樹立した。この KS 細胞をマトリゲル内で 3 次元培養することで緑色蛍光を発するネフロン様構造体を再構築するこ と、シスプラチンによる腎障害に応答し近位尿細管様の環状構造の伸長が阻害されることを確認し た。以前報告した擬似的な 2 次元画像による定量化システムでシスプラチンによる腎障害の程度を 計測したところ、EGFP を蛍光プローブとすることで効率良く定量化することができた。さらに 3 次 元構造を観察するために開発されたライトシート顕微鏡と 3 次元構造変化を定量化できるソフトウ ェアを用いた解析を行った。その結果、ネフロン様構造体の詳細な立体構造を明らかにするととも にシスプラチンの投与による近位尿細管様環状構造の伸長阻害を定量化することができた。

背景

細胞イメージ解析は、細胞の形状や細胞動態の変化を数値化することで、定量的かつ客観的にハ イスループットで細胞解析を行う技術であり、安全性試験、創薬研究、再生医療の分野において普 及している。より高度な細胞イメージ解析手法を行う為に、多検体処理可能な顕微鏡と専用のソフ トウェアにより構成されるハイコンテントアナライザーが開発されている。これまで細胞イメージ
解析する為に多くの蛍光プローブが開発されてきた。 EGFP は細胞イメージ解析に最も利用されて いる蛍光タンパク質であり、 EGFP 遺伝子をレポーター遺伝子として様々な遺伝子導入細胞や遺伝 子導入動物が作成されている。最近ではレポーター遺伝子の遺伝子導入細胞が創薬開発や安全性試 験のスクリーニングシステムで利用されている。

マウス人工染色体ベクターは、鳥取大学の染色体工学を発展させて開発してきた技術である。マ ウス人工染色体ベクターは、哺乳類培養細胞にて独立した染色体として長期間安定に保持される。 さらに搭載できる遺伝子情報のサイズに制限がない、様々な細胞に移入することができる、人工 染色体導入動物の作製が可能であるといった利点がある。遺伝子導入細胞は長期間培養を行うと 導入した遺伝子発現が消失されやすい。しかしマウス人工染色体ベクターを用いた EGFP 遺伝子導 入細胞は継代 100 回を超えても安定に発現していることを示してきた。

平面培養と比較して生体の組織の3次元構造を反映した3次元培養は in vivo のフェノタイプを再 現できる。ハイコンテントアナライザーでの細胞イメージング解析は主に平面培養で行われている。 3 次元培養で再構築した組織様構造体を対象としたハイコンテントスクリーニングシステムは、動 物実験を代替する in vitro 試験としての今後重要になることが予測される。そのためには、生体の組 織の3次元構造の蛍光プローブを解析する為の専用の顕微鏡システム、ソフトウェアの開発が必要 になる。

最近、iPS 細胞、ES 細胞といった未分化幹細胞を分化誘導することで腎ネフロン構造体が再構成 された。我々はラット腎幹前駆細胞(KS)細胞をマトリゲル上で3次元培養して再構築したネフロン様 構造体がシスプラチンによる腎障害に応答することを示した。

今回、 人工染色体ベクターを用いて EGFP 遺伝子を導入した KS 細胞から再構築した腎臓様構造 体を用いた in vitro 腎毒性試験法の開発に取り組んだ。

結果

ラット腎幹前駆細胞(KS)細胞に微小核融合法を用いて、 恒常的に EGFP タンパク質が発現し緑色 蛍光が観察できるようにデザインした CAG-EGFP 遺伝子をを持つマウス人工染色体 (MAC) ベク ターを導入した。 MAC にはネオマイシン耐性遺伝子も搭載されているため、MAC が導入された KS 細胞はネオマイシン耐性になる。ネオマイシン耐性細胞をクローニングし、7 種の増殖因子を含む マトリゲル内にて 3 次元培養した。その結果、クローン #2 で図に示すような 3 次元腎様構造が再 構築できた。

ラット KS 細胞に人工染色体ベクターを導入

1色CAG-EGFP MAC1導入ラット KS 細胞



<mark>図 B2-1</mark>. 微小核融合法によるラット KS 細胞への CAG-EGFP MAC の導入

BZ-X700(キーエンス)は3次元構造の撮影のために適したセクショニング機能を有した蛍光顕微鏡 である。ネフロン様構造体の上部から底部まで 10µm の間隔で撮影した後、デコンボリューション 機能を用いて擬似的な2次元画像を作成した。この2次元画像の面積を定量化したところ、12サン プルの面積の差は極めて少ないことを確認した。この結果より、EGFP が恒常的に発現するマウス人 工染色体を保持する KS 細胞を用いても、品質が均一な腎臓様構造体を同時に複数作製できることを 示した。次に4サンプルに関して総面積の変化を測定したところ、培養14日目から20日の間で1.6 倍増加していた。



つぎに 3 次元培養 14 日後にシスプラチンを投与して、EGFP の蛍光を指標にしてネフロン様構造 体の形態の変化を測定した。14 日から 20 日までのネフロン様構造体の総面積の変化を測定した。 その結果、コントロール群と比較して、6日間での面積の変化はシスプラチン 10μM 投与群で 33%、 20μM 投与群で 50%減少していた。

rKS56 green 3D area change (EGFP) (CisPt for 6 days)

sample; rKS56 MAC1 #B3 cell; 1 x 10⁵ cells/well (cultured for 14 days) -> CisPt for 6 days seed; 160121 (day 14 -> CisPt (6 days) -> day 20) KEVENCE BZ-X700 1/7500 sec (bright field) 1/35 sec (EGFP) 1/20 sec (Pl) 1/50 sec (Hoechest33324) z stacks (pitch); 10 μ m -> full focused relative growth rate = {(day 20)/(day 14)}/{(con. day 20)/(con. day 14)}x100



(**p<0.01)

図 B2-3. CAG-EGFP MAC を保持するラット KS 細胞のネフロン様構造体形成時の
 管構造の経時的な伸長とシスプラチンによる伸長阻害

シスプラチンによる細胞死を定量化するために死細胞に取り込まれる Propidium Iodide (PI) 核染 色を行った。ネフロン様構造体の上部から底部まで 10µm の間隔で撮影した後、デコンボリューシ ョン機能を用いて擬似的な 2 次元画像を作成した。オリジナルのKS細胞と同様に、 MAC を導入 したKS細胞でもシスプラチン投与群で はコントロールと比較して、細胞死が誘導されていた。細 胞死を定量化するために、キーエンスの専用の解析ソフトにて PI 陽性面積を定量化した。その結果、 PI の取り込み面積は、コントロールと比較してシスプラチン 10µM 投与群で 230%、20µM 投与群 で 250%に上昇した (左グラフ)。これを EGFP 蛍光プローブで算出した面積を用いて、総面積当た りでの PI 陽性面積の割合を算出したところ、コントロールと比較してシスプラチン 10µM 投与群で 400%、20µM 投与群で 600%に上昇した (右グラフ)。これらの結果から、 EGFP を蛍光プローブと して活用することで KS 細胞由来の3次元腎構造体を用いたシスプラチンによる腎障害の定量化を 効率よくできることを示した。さらに、別紙に示した「KS 細胞由来の3次元腎構造体を in vitro 腎 毒性試験法のプロトコール案(2)」を作成した。

rKS56 green 3D area change (PI) (CisPt for 6 days)

sample; rKS56 MAC1 #B3 cell; 1 x 10⁵ cells/well (cultured for 14 days) -> CisPt for 6 days seed; 160121 (day 14 -> CisPt (6 days) -> day 20) KEYENCE BZ-X700 1/7500 sec (bright field) 1/35 sec (EGFP) 1/20 sec (PI) 1/50 sec (Hoechest33324) z stacks (pitch); 10 µm -> full focused



図 B2-4. CAG-EGFP MAC を保持するラット KS 細胞のネフロン様構造体の シスプラチンによる細胞死の誘導

ネフロン様構造体は、直径4mm、厚さ2mm程度でありトランスウェル内で培養されているため、 通常の共焦点顕微鏡や蛍光顕微鏡では詳細な立体構造を撮影することは困難であった。また3次元 画像をする為に定量化するためには専用のソフトウェアが必要である。そのため、これまでネフロ ン様構造体はスライス画像を合成し作成した擬似的な2次元画像で解析した。最近、3次元構造体 を立体的に撮影することができるライトシート顕微鏡が開発された。この顕微鏡を用いて EGFP が発 現しているネフロン様構造体の立体画像を撮影したところ、中心部から近位尿細管用の管構造が伸 長し、糸球体様の嚢胞構造に接続している様子が観察できた。またマルチアングルから撮影した画 像を合成することで影となる部分を除いたシャープな画像を構築することができた。

さらに専用のソフトウェアにより表面積、体積、形状などを定量化できた。

まとめ

マウス人工染色体ベクターを用いることで目的の遺伝子を導入したrKS細胞を樹立することが できた。導入できた。マウス人工染色体ベクターを保持したKS細胞はオリジナルのKS細胞同様に、 3次元培養にてネフロン様構造体を作成することができた。このネフロン様構造体は、 EGFP が蛍 光プローブとして機能していることから、構造体の大きさの測定や形態の変化を効率良く測定す ることができた。オリジナルのKS細胞を用いた腎毒性試験法では、形態変化は明視野画像を用いて 解析しているためバックグランドが高い。一方でEGFPが発現しているネフロン様構造体の形態変 化を解析する為の画像は蛍光プローブを用いて取得していることから低バックグランドであり正 確に測定できる。実際にシスプラチンによる形態変化を測定することができた。これらのことか ら腎毒性評価in vitro試験法としては、オリジナルのKS細胞よりもEGFPが発現しているKS細胞を用 いたほうが良い試験法になることが期待できる。

■ 腎毒性試験法3)発光レポーター搭載rKS細胞の2次元培養での腎毒性評価

要旨

Kidney injury molecule-1 (Kim-1)は急性腎障害のバイオマーカーであり、腎臓近位尿細管障害を誘 導する腎毒性物質であるシスプラチンの投与により mRNA の発現が上昇する。アクアポリン1は腎 臓では近位尿細管特異的に発現している。腎毒性試験を開発するために、① CAG-EGFP, ② Aqp1-mCherry, ③ Kim1-Luciferase の3つのレポーター遺伝子を作製し、マウス人工染色体ベクタ ーに導入した。微小核融合応により、これを保持する KS 細胞を作製した。MAC ベクターを保持す る KS 細胞の2次元培養でも、シスプラチンやバシトラシンといった腎毒性物質による腎障害を発光 で評価することができた。

背景

実験動物を用いた反復投与毒性試験は、一般毒性に関する知見を得る方法として広く用いられて きている。しかし、この試験法は多くの実験動物を犠牲にするため動物愛護を取りまく社会的かつ 倫理的な問題がある。また経済・産業的な面からも、経費や時間がかかるといった課題がある。そ のため、この試験法を代替した新たな試験法を開発することが重要である。体内(in vivo)で機能 している細胞の働きを試験管内(in vitro)で再現できているか比較して評価するための科学的な証 拠や説明(エビデンス)が不足しているため生じているためではないかと考えた。これらの疑問や 課題を克服するためには、鳥取大学で開発してきた「人工染色体ベクター」を用いた最先端の遺伝 子改変・導入細胞作製技術が極めて有効である。この人工染色体ベクターを用いると、従来では困 難であった複数の遺伝子の導入した細胞の樹立が可能になる。毒性評価をイメージング解析で可能 にする発光・蛍光プローブとして活用できるレポーター遺伝子の開発が進んでいる。複数のレポー ター遺伝子を人工染色体ベクターに導入することで、新しい毒性試験法を開発することが可能にな る。

結果

腎毒性試験法の為に3つの発光レポーター遺伝子を選定した。

図に示す3つのレポーター遺伝子がそれぞれ in vivo で機能することを示した。本年度は、それぞれのレポーター遺伝子が in vitro で機能することを示すとともに、これら3つのレポーター遺伝子が 搭載されたマウス人工染色体を作成し、これを保持する KS 細胞を作製することとした。



<mark>図 B3-1</mark>. 3 色腎毒性レポーター遺伝子の概要

これまでマウス人工染色体ベクターに搭載したCAG-EGFPレポーター遺伝子が、マウス胎児全身 で発現しており、ものマウスから作成した線維芽細胞でEGFPが発現していることを報告した。 KS 細胞に導入したCAG-EGFPの発光値により生細胞を測定できるか検討した。アラマーブルーは生細 胞の代謝により蛍光を発するインジケーター色素であり、細胞の増殖を定量的に測定される際に 利用されている。1×10⁴から6×10⁴の細胞数でEGFPの発光値を測定して、アラマーブルーアッ セイの結果と比較したところ、非常に高い相関性がみられた。この結果から、CAG-EGFPレポータ ーを用いることで、KS細胞の数や増殖を測定できることを示した。



Aqp1-mCherryレポーター遺伝子を導入したキメラマウスを作製したところ腎臓近位尿細管上 皮細胞で特異的に発現していることを確認した。CHO細胞はチャイニーズハムスター卵巣由来細 胞である。Aqp1-mCherryレポーター遺伝子と CAG-EGFPが搭載されたマウス人工染色体ベクター を保持するCHO細胞ではEGFPの緑色蛍光は観察されるが、mCherryの赤色蛍光は観察されなかっ た。一方で、この人工染色体ベクターを保持するKS細胞では緑色蛍光、赤色蛍光ともに検出され た。このことからAqp1-mCherryレポーターの赤色蛍光により腎臓細胞特異的な細胞の性質を規定 できることを示した。



Agp1mCherry: 腎臓では近位尿細管に特異的に発現

→ 腎近位尿細管細胞の性質を保持していることを規定

図 B3-3. mAqp1-mCherry レポーターの有効性の検証

Kim1-SLGキメラマウスを用いた解析において、シスプラチンの投与により腎臓での発光が検出 されることを示した。さらに後述するマウス近位尿細管由来不死化細胞においてKim1-ルシフェラ ーゼ遺伝子がシスプラチンにより障害を検出することを示した。これらの解析結果から、① CAG-EGFP, ②Aqp1-mCherry, ③ Kim1-Luciferaseの3つのレポーター遺伝子がそれぞれin vitroで 機能することを示すことができた。次に、 CHO細胞にて、これら3つのレポーター遺伝子が搭載 されたマウス人工染色体を作成した。Kim1に関しては従来使用していた SLG からより明るい Eluc(Eluc型)と培地での解析が可能な分泌型 Cluc(Cluc型)に改変した。さらに微小核融合法により これらを保持するKS細胞を作製した。



<mark>図 B3-4</mark>. 3 色腎毒性レポーター遺伝子が導入されたラット KS 細胞

これら細胞が腎毒性評価試験に利用できるか検討した。これまでの解析では、マトリゲルでの 3 次元培養にてネフロン様構造体を作成し試験に用いた。本プロジェクトではハイスループットの試 験法の開発が目標に掲げられている。3 次元培養で作成するネフロン様構造体を用いた試験法は作 成までに手間とコストがかかるため、ハイスループット化することは困難である。また Aqp1-mCherry レポーター遺伝子の結果から、KS 細胞は 2 次元培養においても近位尿細管様の性質 野一部が維持されていることを示した。そこで下図に示す 3 つのレポーター遺伝子が搭載されてい る AKE-rKS56 細胞の 2 次元培養による腎毒性試験を検討した。毒性物質として、シスプラチンとバ シトラシンを用いた。 Kim1-Eluc は腎障害が生じると活性が上昇される。CAG-EGFP は細胞が障害 されるとその活性が低下する。Kim1-Eluc の活性を CAG-EGFP の活性で補正することで、化学物質 が与える傷害の程度を定量化した。その結果、シスプラチンで最大 10 倍、バシトラシンで最大 5 倍 程度の腎障害が活性化されていることを示すことができた。



<mark>図 B3-5</mark>. 3 色腎毒性レポーターラット KS 細胞の 2D 毒性試験

まとめ

複数のレポーター遺伝子を搭載したマウス人工染色体ベクターを作成することができた。微小核融合法によりマウス人工染色体ベクターをターゲットの培養細胞に移入することで、腎毒性試験法に利用できる細胞株を樹立することができた。① CAG-EGFP, ② Aqp1-mCherry, ③ Kim1-Luciferaseの3つのレポーター遺伝子が機能するKS細胞が新しいin vitro 腎毒性試験法に活用できる可能性を示すことができた。

■ 腎毒性試験法4)発光レポーター搭載マウス近位尿細管S3由来不死化細胞の2次元培養での 腎毒性評価

要旨

Kidney injury molecule-1 (Kim-1)は急性腎障害のバイオマーカーであり、腎臓近位尿細管障害を 誘導する腎毒性物質であるシスプラチンの投与によりmRNAの発現が上昇する。HPRT遺伝子はハ ウスキーピング遺伝子であり、遺伝子発現を測定する際の内部標準遺伝子として利用されている。 Kim-1遺伝子の発現を緑色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子とHPRT 遺伝子の発現を赤色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子をそれぞれ開 発した。2つのレポーター遺伝子をマウス人工染色体(MAC)ベクターに導入した。この2色発 光MACベクターをマウス近位尿細管由来不死化細胞に移入することで腎障害レポーター遺伝子導 入マウス近位尿細管由来不死化細胞を作成した。この細胞にシスプラチンを投与したところそれ ぞれのレポーター遺伝子により腎障害を検出することができた。

結果

今回用いたマウス近位尿細管S3由来不死化細胞は獨協医科大学の安西尚彦らが作製した不死化 細胞であり、シスプラチンに対する感受性が高いことが知られている。Kim-1遺伝子の発現を緑色 発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子とHPRT遺伝子の発現を赤色発光ル シフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子をそれぞれ作成し、A9細胞で保持されて いるマウス人工染色体ベクターに導入し、2色毒性評価レポーターマウス人工染色体ベクターを 構築した。このMACベクターを微小核融合法により、マウス近位尿細管S3由来不死化細胞に移入し た。

45



<mark>図 B4-1</mark>. 微小核融合法によルマウス S3 細胞への 2 色毒性レポーターMAC の導入

この細胞がシスプラチンによる腎障害をモニターできるか検証した。シスプラチン濃度依存的に 細胞死が誘発されるが同じようにHPRT-SLRの発光が減少した。シスプラチン濃度が2.5mg/ml, 5.0mg/mlの際にKim1-SLGの発光が上昇した。HPRT-SLRの値を内部標準としてKim1-SLGの値を補正 することで腎障害を定量化したところ、その活性はシスプラチンにより最大40倍上昇した。また 食薬センターに樹立した細胞を分与し施設間での再現性の確認を実施した。

シスプラチン投与の条件を基にして、毒性評価レポーター遺伝子導入マウス近位尿細管S3不死化 細胞による腎毒性評価のプロトコルを作製した。



46

まとめ

Kim-1遺伝子の発現を緑色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子と HPRT 遺伝子の発現を赤色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子をそれ ぞれ開発した。2つのレポーター遺伝子をマウス人工染色体(MAC)ベクターに導入した。この 2色発光MACベクターをマウス近位尿細管由来不死化細胞に移入することで腎障害レポーター遺 伝子導入マウス近位尿細管由来不死化細胞を作成した。この細胞にシスプラチンを投与したとこ ろそれぞれのレポーター遺伝子により腎障害を検出することができた。KS細胞の3次元培養によ るネフロン様構造体を用いた腎毒性試験法と比較して、この腎毒性試験は安価で簡便に実施する ことができる。特に96wellプレートで大量のサンプルを調整することが可能なため、ハイスループ ットスクリーニング試験法に発展することが期待できる。

今後は動物実験にて毒性が知られている複数の化合物質を用いた解析を行うことで、この細胞 を用いた試験法が OECDテストガイドラインなどに提案できるか検証する。

添付資料2 腎臓毒性 in vitro 試験法プロトコールー①

rKS56 細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験

1. 背景·目的

腎臓は生体において、血液から老廃物や過剰の水分・電解質をろ過、排出、また原尿から水の再 吸収といった機能を行っている臓器であり、これらの最小機能単位としてネフロンと呼ばれる構造 を多数持つ。また、腎臓はその重量に比して心臓から組織に送り出される血液量は全体の2割以上 を占める。このようなことから、血液中の毒物が腎臓において高濃度になりやすいため、障害が現 れやすい臓器であると言える。また特に原尿から再吸収を行う尿細管においては、トランスポータ 一の発現部位であることからも腎毒性物質の重要な標的部位となる。

産業界における毒性学では、腎毒性の最終的な評価は in vivo での研究に頼っているが、近年では動物愛護の観点からの動物実験の規制の高まりや長期動物毒性試験でのコストの増大といった問題をはらんでいると言える。また腎毒性の臨床的、化学的、病理的な判定基準は腎臓の機能的及び形態的な障害を持って判断されている。

現在の *in vitro* 腎毒性試験系では、ほとんどの場合腎臓由来の細胞を用いた二次元の試験系であり、 腎臓の機能単位として十分であるとは言えない。また、より生体に近いと考えられる三次元の系で は precision-cut kidney slices (PCKS)と呼ばれる *ex vivo* の系、及び ES 細胞や iPS 細胞といった幹細胞か ら腎臓様構造体を再構成した系を用いた研究が行われているが、前述した動物愛護やコストの問題 を解決するには至らない。これらのことから腎毒性試験の一部であってでも、*in vivo* 試験系の判定基 準を模倣した *in vitro* 試験系に代替する必要があると考えられる。

2. 試験の概要

生物試料として用いる rKS56 細胞は、適当な成長因子の存在下かつ培養方法によって分化し、ネ フロンを構成している糸球体様、近位尿細管様、遠位尿細管様の種々の構造を三次元で形成する。 成長因子の添加は胚性幹細胞を用いた腎臓分化で見られるようなマルチステップの系とは異なり、 ワンステップで三次元構造体を形成し試料間の品質の維持が容易である。

また、死細胞を染色する場合に一般的に用いられているヨウ化プロピジウム (PI)はカチオン性の 蛍光色素で、一般に生細胞の細胞膜は透過せずに損傷を受けた細胞のみ細胞膜を透過し、塩基対間 にインターカレートすることで赤色の蛍光を呈する。

In vivo 腎毒性試験で行われている判定基準である機能的及び形態的な障害を、rKS56 細胞から分化 させたネフロン様三次元構造体における近位尿細管様部分の細胞死を赤色蛍光で定量的に画像解析 することによって、近位尿細管の機能障害を引き起こす損傷として捉え、検出する試験法である。

3. 材料および試薬

3.1 生物材料

rKS56 細胞(岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 喜多村真治先生より分与)(継代数は 40回を超えるものは用いない。)

48

- 3.2.1 器具・機器(継代及び構造体の作製)
 - 6.5mm Transwell® with 0.4µm Pore Polyester Membrane Insert
 - Corning® BioCoatTM Cellware, Collagen Type IV, 100 mm Culture Dishes
 - ・ 24 ウェルプレート
 - ・ 6ウェルプレート
 - ・ 96 ウェルプレート
 - ・ ピンセット
 - · 実体顕微鏡
 - ・ その他一般的な細胞培養機器一式
- 3.2.2 器具·機器 (毒性試験)
 - * 6.5 mm Transwell® with $0.4 \mu \text{m}$ Pore Polyester Membrane Insert
 - ・ 24 ウェルプレート
 - ・ 蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700 のような Z スタック画像をフルフォーカスの画像として出 力できるもの。また、Z スタック画像の蛍光ボケを軽減する機能が搭載されているものに限る。
 本プロトコールでは BZ-X700 を例示するが、同等の機能をもつ蛍光顕微鏡を用いる場合においてはその機能でもって代用する。)
 - ・ その他一般的な細胞培養機器一式
- 3.3.1 試薬(継代及び構造体の作製)
 - D-PBS (-)
 - 0.25%トリプシン-EDTA
 - DMEM/F-12, HEPES
 - FBS
 - Nicotinamide
 - Insulin-Transferrin-Selenium-X (Gibco, 51500-056)
 - Dexamethasone
 - Penicillin
 - Streptomycin
 - Epidermal Growth Factor, Rat (R & D systems, 3214-EG-100)
 - Glial Derived Neurotrophic Factor, Rat (R & D systems, 512-GF-010)
 - FGF-2, Basic, Human (Clbiochem, 341595-25UGCN)
 - BMP-7, Human (R & D systems, 354-BP-010)
 - Hepatocyte Growth Factor, Human (Sigma, H1404-5UG)
 - ・ Corning®マトリゲル 基底膜マトリックス 10 mL (Corning, 354234)
- 3.3.2 試薬 (毒性試験)
 - D-PBS (-)
 - DMEM/F-12, HEPES

- FBS
- Penicillin
- Streptomycin
- Epidermal Growth Factor, Rat (R & D systems, 3214-EG-100)
- Glial Derived Neurotrophic Factor, Rat (R & D systems, 512-GF-010)
- FGF-2, Basic, Human (Clbiochem, 341595-25UGCN)
- BMP-7, Human (R & D systems, 354-BP-010)
- Hepatocyte Growth Factor, Human (Sigma, H1404-5UG)
- ・ Corning®マトリゲル 基底膜マトリックス 10 mL (Corning, 354234)
- ・ ヨウ化プロピジウム溶液 (Sigma, P4864-10ML)
- 3.4 画像解析ソフトウェア
 - 画像解析ソフトウェア(本プロトコールでは BZ-X Analyzer (KEYENCE)を例示するが、HCS Studio Cell Analysis Software (ThermoFisher SCIENTIFIC)などの同等の機能を持つ解析ソフトウェ アを用いることができ、その機能でもって代用する。)
 - (Photoshop (Adobe))

3.4 培地の調整

3.4.1 維持培地

最終濃度	
DMEM/F-12, HEPES	45%
Conditioned medium*	50%
FBS	5%
Nicotinamide	2.5 mM
Insulin-Transferrin-Selenium-X, 100x	200x
Dexamethasone	62.5 μM
HGF	1.25 ng/mL
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

表1 維持培地の組成

(*; マウス間葉系細胞に由来する10% FBS含有DMEM 調製培養液 (シミック株式会社・菅谷健氏より分与))

	最終濃度	
DMEM/F-12, HEPES	90%	
FBS	10%	
HGF	250 ng/mL	
EGF	500 ng/mL	
GDNF	250 ng/mL	
FGF-2	250 ng/mL	
BMP-7	250 ng/mL	
Penicillin	100 U/mL	
Streptomycin	100 µg/mL	

表2 分化培地の組成

(用時に調製する。)

3.4.3マトリゲル/分化培地

マトリゲルと分化培地を1:1で混合し、トランスウェルに 180 µL 入れて 37℃ に設定した 5% CO₂ インキュベータ内で固化させる。

4. 継代培養

- (1) セミコンフルエントになった q10 cm dish に対して、PBS で 2 回洗浄
- (2) 1 mL の 0.25% trypsin-EDTA を加え、37°C、5~8分処理 (剥がれなかった細胞は分化が進んで いるものとして使用しない)
- (3) 遠心分離、1,200 rpm、3 分
- (4) 10% FBS DMEM/F-12 に懸濁
- (5) 1/10~1/100になるように維持培地で調整
- (6) コラーゲン IV コートした q10 cm dish に播種
- (7) 37°Cの5%CO2インキュベータで培養

5. 試験方法

5.1 rKS56 三次元構造体の作製



図1. rKS56 細胞の三次元構造体作製のスキーム

5.1.1 ハンギングドロップ法による rKS56 細胞シートの作製

- (1) セミコンフルエントになった q10 cm dish に対して、PBS で 2 回洗浄
- (2) 1 mL の 0.25% trypsin/EDTA を加え、37℃、5~8分処理(剥がれなかった細胞は分化が進んでいるものとして使用しない)
- (3) 遠心分離、1,200 rpm、3 分
- (4) 10% FBS DMEM/F-12 に 40 x 10⁵ cells/mL となるよう調整
- (5) 6ウェルプレートにPBSをウェルの底面が浸る程度張り、96ウェルプレートの蓋に1x10⁵ cell/25 uLでハンギングドロップを作製(それぞれのドロップが隣接しないウェルで、かつ6ウェルプ レートに接触しない96ウェルの蓋の部分で作製)
- (6) プレートの四方の角を培地が透明になり、細胞シートの輪郭がはっきりするまで 100 回ずつく らい軽く叩き、ドロップの中心に細胞を集める
- (7) 37℃の5%CO2インキュベータで5~6時間培養

5.1.2rKS56細胞シートのマトリゲルへの包埋

(1) ハンギングドロップに作製したrKS56細胞シートをピンセットの先ですくいとるようにつまみ、 実体顕微鏡下でトランスウェルの中心に位置させる(つまんだ際に細胞塊の状態を維持できないものは破棄すること。三次元培養時に散らばった細胞から小さな構造体が形成されるのを防 ぐため。)

- (2) ピンセットの先でマトリゲルに切れ込みを入れ、rKS56 細胞シートを押し込むように入れて細 胞塊をまとめていく
- (3) 充填したマトリゲルの中程に位置するまでピンセットの先で押し込む
- (4) 400 µL の分化培地を入れた 24 ウェルプレートにトランスウェルをのせ、底面と培地が接触していることを確認する(培地の蒸発を防ぐために、一番外周のウェルは PBS を張っておく。図2)
- (5) 検鏡し細胞塊の形状を確認する。三次元培養時に細胞塊から散らばった細胞をピンセットで取り除く。細胞塊がトランスウェルの中心から外れたサンプル、細胞塊の形状が崩れたサンプル、細胞塊から多くの細胞が散らばってしまったサンプルは破棄する。
- (6) 37℃の5%CO2インキュベータで2週間培養する。



図 2. 三次元構造体作製のプレートの配置

5.2 rKS56 三次元構造体の品質管理

- (1) 三次元構造体作製開始から7日目のサンプルを検鏡し、三次元構造体の形状を確認する。
- (2) 三次元構造体作製開始から14日目のサンプルを検鏡し、均一性を確認するために蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700(対物レンズ; CFI Plan Fluor lambda 4x (Nikon))を用いて明視野のZスタ ック画像を取得し、解析アプリケーションでフルフォーカス画像を生成する。(トランスウェ ルの構造が写りこむなど、必要がある場合は Photoshop などの画像編集ソフトウェアで三次元 構造体のある部分のみの画像を生成する。)
- (3) 細胞のある範囲をマスク機能で選択し、その面積を求める。一定のサンプルを試験に供するために、それら面積のばらつきの平均値を100%とした場合に、標準偏差が±10%の範囲にあることものを被験物質曝露試験に用いる。
- 5.3 被験物質曝露
- (1) 被験物質を添加した 400 µL の分化培地へと rKS56 細胞三次元構造体の培養液交換し、37℃の 5% CO2インキュベータで5日間続ける。(1 群 4 構造体以上)(試験の終了まで培地の交換は行 わない。)
- (2) 5日間処理後、最終濃度が1µg/mLとなるように1.0 mg/mLのヨウ化プロピジウム (PI)溶液を 液相培地に添加する。
- (3) PI 溶液を添加してから 24 時間後(被験物質添加より 6 日後)、被験物質の曝露を終了する。



図1 被験物質曝露のスキーム

- 5.4 顕微鏡検査と画像処理・解析
- 三次元構造体作製開始から14日目(被験物質曝露前)にトランスウェルを24ウェルプレートから 取り出し、24ウェルプレートの蓋ないしはディッシュ上に直接トランスウェルのメンブレンを 下にして置き、KEYENCE BZ-X700(対物レンズ; CFI Plan Fluor lambda 4x (Nikon))を用いて明 視野のZスタック画像を撮像する。
- (2) 三次元構造体作製開始から 21 日目にトランスウェルを 24 ウェルプレートから取り出し、24 ウェルプレートの蓋ないしはディッシュ上に直接トランスウェルのメンブレンを下にして置き、 KEYENCE BZ-X700(対物レンズ; CFI Plan Fluor lambda 4x (Nikon))を用いて明視野及び取り込まれた PI の蛍光(蛍光フィルタ; BZ-X フィルタ TexasRed (ex. 560/em. 630) (KEYENCE))の Z スタック画像を撮像する。
- (3) 連続した明視野Zスタック画像および赤色蛍光Zスタック画像は解析アプリケーションでフル フォーカス画像を生成する。
- (4) 明視野フルフォーカス画像の細胞のある範囲を Photoshop のマスク機能で選択し、その面積を 求める。
- (5) PIで染色された範囲を Photoshop のマスク機能で選択し、その面積を求める。
- (6) 管構造伸長比は以下の計算で求める。
 - 三次元構造体被験物質曝露サンプル 14 日目明視野フルフォーカス画像マスク範囲;B14 三次元構造体被験物質曝露サンプル 21 日目明視野フルフォーカス画像マスク範囲;B21 三次元構造体溶媒対照サンプル 14 日目明視野フルフォーカス画像マスク範囲; controlB14 三次元構造体溶媒対照サンプル 21 日目明視野フルフォーカス画像マスク範囲; controlB21

管構造伸長比 =
$$\frac{B21/B14}{controlB21/controlB14}$$

(7) 細胞死比は以下の計算で求める。

三次元構造体被験物質曝露サンプル 21 日目 PI フルフォーカス画像マスク範囲; P21 三次元構造体溶媒対照サンプル 21 日目 PI フルフォーカス画像マスク範囲; controlP21

細胞死比 =
$$\frac{P21/B21}{controlP21/controlB21}$$

6. データ採用条件

被験物質曝露試験試験前の品質管理

(1) 三次元構造体作製開始から7日目に1回目の品質検査を行う。三次元構造体がトランスウェルの 中心から外れたサンプル、管構造が形成されていないサンプル、中心以外に複数の三次元構造体が 形成してしまったサンプルは除外する。

(2) 被験物質曝露試験試験直前(三次元構造体作製開始から14日目)に2回目の品質検査を行う。 サンプル群の面積のばらつきの平均値を100%とした場合に、標準偏差が±10%の範囲にあるサンプ ルを被験物質曝露試験試験に用いる。

(3) 三次元構造体作製 14 日目からから21日目に3回目の品質検査を行う。この期間内での溶媒対 照群(コントロール)の面積の変化を解析し、その増加率が 1.5 倍以上 2.0 倍未満であり、その変化 にサンプル間で統計的な優位差が無い場合に限り一連の試験結果をデータとして採用する。

7. 試験結果の判定基準

以下の①②いずれかの場合は腎毒性有りと判定する。

- ① 管構造伸長阻害:管構造伸長比が 0.8 以下の場合
- ② 死細胞増加:細胞死比が 2.0 以上の場合

8. 参考文献

Morin, J.-P., De Broe, M. E., Pfaller, W. & Schmuck, G. (1997). Nephrotoxicity testing in vitro: the current situation. *ATLA* **25**, 497-504.

Tiong, H. Y., Huang, P., Xiong, S., Li, Y., Vathsala, A., and Zink, D. (2014). Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm* **11**, 1933-1948.

Poosti, F., Pham, B. T., Oosterhuis, D., Poelstra, K., van Goor, H., Olinga, P., and Hillebrands, J. L. (2015). Precision-cut kidney slices (PCKS) to study development of renal fibrosis and efficacy of drug targeting ex vivo. *Dis Model Mech* **8**, 1227-1236.

Kitamura, S., Yamasaki, Y., Kinomura, M., Sugaya, T., Sugiyama, H., Maeshima, Y. & Makino, H. (2005). Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *EASEB J.* **19**, 1789-1797.

Kitamura, S., Sakurai, H. & Makino, H. (2015). Single adult kidney stem/progenitor cells reconstitute three-dimensional nephron structures in vitro. *Stem Cells.* **33**, 774-784.

株式会社 バイオリンクインク. 喜多村 真治. 腎臓幹細胞/前駆細胞、腎臓幹細胞/前駆細胞の分離 方法、及び腎疾患の治療方法. 特開 2004-275079. 2004-10-07.

株式会社 オーガンテクノロジーズ. 喜多村 真治. バイオ人工臓器作成方法. 特開 WO2011-021558. 2013-01-24.

添付資料2 腎臓毒性 in vitro 試験法プロトコールー②

EGFP 発現人工染色体を搭載した rKS56 細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験

1. 背景·目的

腎臓は生体において、血液から老廃物や過剰の水分・電解質をろ過、排出、また原尿から水の再 吸収といった機能を行っている臓器であり、これらの最小機能単位としてネフロンと呼ばれる構造 を多数持つ。また、腎臓はその重量に比して心臓から組織に送り出される血液量は全体の2割以上 を占める。このようなことから、血液中の毒物が腎臓において高濃度になりやすいため、障害が現 れやすい臓器であると言える。また特に原尿から再吸収を行う尿細管においては、トランスポータ 一の発現部位であることからも腎毒性物質の重要な標的部位となる。

産業界における毒性学では、腎毒性の最終的な評価は *in vivo* での研究に頼っているが、近年では動物愛護の観点からの動物実験の規制の高まりや長期動物毒性試験でのコストの増大といった問題をはらんでいると言える。また腎毒性の臨床的、化学的、病理的な判定基準は腎臓の機能的及び形態的な障害を持って判断されている。

現在の *in vitro* 腎毒性試験系では、ほとんどの場合腎臓由来の細胞を用いた二次元の試験系であり、 腎臓の機能単位として十分であるとは言えない。また、より生体に近いと考えられる三次元の系で は precision-cut kidney slices (PCKS)と呼ばれる *ex vivo* の系、及び ES 細胞や iPS 細胞といった幹細胞か ら腎臓様構造体を再構成した系を用いた研究が行われているが、前述した動物愛護やコストの問題 を解決するには至らない。これらのことから腎毒性試験の一部であってでも、*in vivo* 試験系の判定基 準を模倣した *in vitro* 試験系に代替する必要があると考えられる。

2. 試験の概要

生物試料として用いる rKS56 細胞は、適当な成長因子の存在下かつ培養方法によって分化し、ネフロンを構成している糸球体様、近位尿細管様、遠位尿細管様の種々の構造を三次元で形成する。 成長因子の添加は胚性幹細胞を用いた腎臓分化で見られるようなマルチステップの系とは異なり、 ワンステップで三次元構造体を形成し試料間の品質の維持が容易である。

また、死細胞を染色する場合に一般的に用いられているヨウ化プロピジウム (PI)はカチオン性の 蛍光色素で、一般に生細胞の細胞膜は透過せずに損傷を受けた細胞のみ細胞膜を透過し、塩基対間 にインターカレートすることで赤色の蛍光を呈する。

rKS56 細胞は人工染色体上に CAG プロモーターによってドライブされる緑色蛍光タンパク質 EGFP を搭載しており、生細胞の判定を簡便に行うことができる。

In vivo 腎毒性試験で行われている判定基準である機能的及び形態的な障害を、rKS56 細胞から分化 させたネフロン様三次元構造体においては近位尿細管様部分の細胞死を赤色蛍光で検出することで、 細胞死を近位尿細管の機能障害を引き起こす損傷として捉え、また全細胞を緑色蛍光で定量的に画 像解析することによって数値化し、単位細胞あたりの死細胞の割合を算出し毒性を検出する試験法 である。

- 3. 材料および試薬
- 3.1 生物材料

MAC1-rKS 細胞(rKS56 細胞に EGFP が発現するマウス人工染色体ベクターMAC1 を導入した細胞:rKS56 細胞は岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 喜多村真治先生より分与)(継代数は50回を超えるものは用いない。)

3.2.1 器具・機器(継代及び構造体の作製)

- 6.5mm Transwell® with 0.4µm Pore Polyester Membrane Insert
- Corning® BioCoatTM Cellware, Collagen Type IV, 100 mm Culture Dishes
- ・ 24 ウェルプレート
- ・ 6ウェルプレート
- ・ 96 ウェルプレート
- ・ ピンセット
- · 実体顕微鏡
- ・ その他一般的な細胞培養機器一式

3.2.2 器具·機器 (毒性試験)

- 6.5mm Transwell® with 0.4µm Pore Polyester Membrane Insert
- ・ 24 ウェルプレート
- ・ 蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700 のような Z スタック画像をフルフォーカスの画像として出 力できるもの。また、Z スタック画像の蛍光ボケを軽減する機能が搭載されているものに限る。
 本プロトコールでは BZ-X700 を例示するが、同等の機能をもつ蛍光顕微鏡を用いる場合においてはその機能でもって代用する。)
- その他一般的な細胞培養機器一式
- 3.3.1 試薬(継代及び構造体の作製)
 - D-PBS (-)
 - 0.25%トリプシン-EDTA
 - DMEM/F-12, HEPES
 - FBS
 - Nicotinamide
 - Insulin-Transferrin-Selenium-X (Gibco, 51500-056)
 - Dexamethasone
 - Penicillin
 - Streptomycin
 - Epidermal Growth Factor, Rat (R & D systems, 3214-EG-100)
 - Glial Derived Neurotrophic Factor, Rat (R & D systems, 512-GF-010)
 - FGF-2, Basic, Human (Clbiochem, 341595-25UGCN)
 - BMP-7, Human (R & D systems, 354-BP-010)

- Hepatocyte Growth Factor, Human (Sigma, H1404-5UG)
- Corning®マトリゲル 基底膜マトリックス 10 mL (Corning, 354234)
- 3.3.2 試薬 (毒性試験)
 - D-PBS (-)
 - DMEM/F-12, HEPES
 - FBS
 - Penicillin
 - Streptomycin
 - Epidermal Growth Factor, Rat (R & D systems, 3214-EG-100)
 - Glial Derived Neurotrophic Factor, Rat (R & D systems, 512-GF-010)
 - FGF-2, Basic, Human (Clbiochem, 341595-25UGCN)
 - BMP-7, Human (R & D systems, 354-BP-010)
 - Hepatocyte Growth Factor, Human (Sigma, H1404-5UG)
 - ・ Corning®マトリゲル 基底膜マトリックス 10 mL (Corning, 354234)
 - ・ ヨウ化プロピジウム溶液 (Sigma, P4864-10ML)
- 3.4 画像解析ソフトウェア
 - ・ 画像解析ソフトウェア(本プロトコールでは BZ-X Analyzer (KEYENCE)を例示するが、HCS
 Studio Cell Analysis Software (ThermoFisher SCIENTIFIC)などの同等の機能を持つ解析ソフトウェ
 アを用いることができ、その機能でもって代用する。)
- 3.4 培地の調整
- 3.4.1 維持培地

	最終濃度	
DMEM/F-12, HEPES	45%	
Conditioned medium*	50%	
FBS	5%	
Nicotinamide	2.5 mM	
Insulin-Transferrin-Selenium-X, 100x	200x	
Dexamethasone	62.5 μM	
HGF	1.25 ng/mL	
Penicillin	100 U/mL	
Streptomycin	100 μg/mL	
G418	400 μg/mL	

表1 維持培地の組成

(*; マウス間葉系細胞に由来する10% FBS含有DMEM 調製培養液 (シミック株式会社・菅谷健氏より分与))

	最終濃度	
DMEM/F-12, HEPES	90%	
FBS	10%	
HGF	250 ng/mL	
EGF	500 ng/mL	
GDNF	250 ng/mL	
FGF-2	250 ng/mL	
BMP-7	250 ng/mL	
Penicillin	100 U/mL	
Streptomycin	100 µg/mL	

表2 分化培地の組成

(用時に調製する。)

3.4.3マトリゲル/分化培地

マトリゲルと分化培地を1:1で混合し、トランスウェルに 180 µL 入れて 37℃ に設定した 5% CO₂ インキュベータ内で固化させる。

4. 継代培養

セミコンフルエントになった φ10 cm dish に対して、PBS で 2 回洗浄

1 mL の 0.25% trypsin-EDTA を加え、37°C、5~8分処理 (剥がれなかった細胞は分化が進んでいる ものとして使用しない)遠心分離、1,200 rpm、3分

(1) 10% FBS DMEM/F-12 に懸濁

(2) 1/10~1/100になるように維持培地で調整

(3) コラーゲン IV コートした q10 cm dish に播種

(4) 37°Cの5%CO2インキュベータで培養

5. 試験方法

5.1 MAC1-rKS 細胞三次元構造体の作製



図1 MAC1-rKS 細胞の三次元構造体作製のスキーム

5.1.1 ハンギングドロップ法による rKS56 細胞シートの作製

- (1) セミコンフルエントになった g10 cm dish に対して、PBS で 2 回洗浄
- (2) 1 mL の 0.25% trypsin/EDTA を加え、37℃、5~8分処理(剥がれなかった細胞は分化が進んでいるものとして使用しない)
- (3) 遠心分離、1,200 rpm、3 分
- (4) 10% FBS DMEM/F-12 に 40 x 10⁵ cells/mL となるよう調整
- (5) 6ウェルプレートにPBSをウェルの底面が浸る程度張り、96ウェルプレートの蓋に1x10⁵ cell/25 uLでハンギングドロップを作製(それぞれのドロップが隣接しないウェルで、かつ6ウェルプ レートに接触しない96ウェルの蓋の部分で作製)
- (6) プレートの四方の角を培地が透明になり、細胞シートの輪郭がはっきりするまで 100 回ずつく らい軽く叩き、ドロップの中心に細胞を集める
- (7) 37°Cの5%CO2インキュベータで5~6時間培養

5.1.2 MAC1-rKS 細胞シートのマトリゲルへの包埋

(1) ハンギングドロップに作製した MAC1-rKS 細胞シートをピンセットの先ですくいとるようにつ まみ、実体顕微鏡下でトランスウェルの中心に位置させる(つまんだ際に細胞塊の状態を維持 できないものは破棄すること。三次元培養時に散らばった細胞から小さな構造体が形成される のを防ぐため。)

- (2) ピンセットの先でマトリゲルに切れ込みを入れ、MAC1-rKS 細胞シートを押し込むように入れて細胞塊をまとめていく
- (3) 充填したマトリゲルの中程に位置するまでピンセットの先で押し込む
- (4) 400 µL の分化培地を入れた 24 ウェルプレートにトランスウェルをのせ、底面と培地が接触していることを確認する(培地の蒸発を防ぐために、一番外周のウェルは PBS を張っておく。図2)
- (5) 37°Cの5%CO2インキュベータで2週間培養



図2 三次元構造体作製のプレートの配置

5.2 MAC1-rKS 細胞三次元構造体の品質管理

- (1) 三次元構造体作製開始から7日目のサンプルを検鏡し、三次元構造体の形状を確認する。
- (2) 三次元構造体作製開始から14日目のサンプルを検鏡し、均一性を確認するために蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700(対物レンズ; CFI Plan Fluor lambda 4x (Nikon))を用いて明視野および緑 色蛍光のZスタック画像を取得し、解析アプリケーションでフルフォーカス画像を生成する。 (トランスウェルの構造が写りこむなど、必要がある場合は Photoshop などの画像編集ソフト ウェアで三次元構造体のある部分のみの画像を生成する。)
- (3) 細胞のある範囲をマスク機能で選択し、その面積を求める。一定のサンプルを試験に供するために、それら面積のばらつきの平均値を100%とした場合に、標準偏差が±10%の範囲にあることものを被験物質曝露試験に用いる。
- 5.3 被験物質曝露
- (1) 被験物質を添加した 400 µL の分化培地へと rKS56 細胞三次元構造体の培養液交換し、37℃の 5% CO2インキュベータで5日間続ける。(1 群 4 構造体以上)(試験の終了まで培地の交換は行 わない。)
- (2) 5日間処理後、最終濃度が1µg/mLとなるように1.0 mg/mLのヨウ化プロピジウム (PI)溶液を 液相培地に添加する。
- (3) PI 溶液を添加してから 24 時間後(被験物質添加より 6 日後)、被験物質の曝露を終了する。



図1 被験物質曝露のスキーム

5.4 顕微鏡検査と画像処理・解析

- (1) 三次元構造体作製開始から14日目(被験物質曝露前)にトランスウェルを24ウェルプレートから 取り出し、24 ウェルプレートの蓋ないしはディッシュ上に直接トランスウェルのメンブレンを 下にして置き、KEYENCE BZ-X700(対物レンズ; CFI Plan Fluor lambda 4x (Nikon))を用いて緑 色蛍光のZスタック画像を撮像する。
- 三次元構造体作製開始から 21 日目にトランスウェルを 24 ウェルプレートから取り出し、24 ウ (2)ェルプレートの蓋ないしはディッシュ上に直接トランスウェルのメンブレンを下にして置き、 KEYENCE BZ-X700 (対物レンズ; CFI Plan Fluor lambda 4x (Nikon))を用いて EGFP の緑色蛍光 及び PI の赤色蛍光の Z スタック画像を撮像する。
- 連続した緑色蛍光Zスタック画像および赤色蛍光Zスタック画像を専用アプリケーションで解 (3)析して、それぞれのフルフォーカス画像を生成する。
- それぞれのフルフォーカス画像の細胞のある範囲の面積を求める。 (4)
- 管構造伸長比は以下の計算で求める。 (5)

三次元構造体被験物質曝露サンプル 14 日目 EGFP フルフォーカス画像: E14 三次元構造体被験物質曝露サンプル 21 日目 EGFP フルフォーカス画像; E21 三次元構造体溶媒対照サンプル 14 日目 EGFP フルフォーカス画像 ; controlE14 三次元構造体溶媒対照サンプル 21 日目 EGFP フルフォーカス画像: controlE21

細胞死比は以下の計算で求める。 (6)

三次元構造体被験物質曝露サンプル 21 日目 PI フルフォーカス画像マスク範囲: P21

三次元構造体溶媒対照サンプル 21 日目 PI フルフォーカス画像マスク範囲; controlP21

P21/E21 細胞死比 = controlP21/controlE21

6. データ採用条件

被験物質曝露試験試験前の品質管理

(1) 三次元構造体作製開始から7日目に1回目の品質検査を行う。三次元構造体がトランスウェルの 中心から外れたサンプル、管構造が形成されていないサンプル、中心以外に複数の三次元構造体が 形成してしまったサンプルは除外する。

(2) 被験物質曝露試験試験直前(三次元構造体作製開始から14日目)に2回目の品質検査を行う。 サンプル群の面積のばらつきの平均値を100%とした場合に、標準偏差が±10%の範囲にあるサンプ ルを被験物質曝露試験試験に用いる。

(3) 三次元構造体作製 14 日目からから21日目に3回目の品質検査を行う。この期間内での溶媒対 照群(コントロール)の面積の変化を解析し、その増加率が 1.5 倍以上 2.0 倍未満であり、その変化 にサンプル間で統計的な優位差が無い場合に限り一連の試験結果をデータとして採用する。

7. 試験結果の判定基準

以下の①②いずれかの場合は腎毒性有りと判定する。

- ① 管構造伸長阻害:管構造伸長比が 0.8 以下の場合
- ② 死細胞増加:細胞死比が 2.0 以上の場合

8. 参考文献

Morin, J.-P., De Broe, M. E., Pfaller, W. & Schmuck, G. (1997). Nephrotoxicity testing in vitro: the current situation. *ATLA* **25**, 497-504.

Tiong, H. Y., Huang, P., Xiong, S., Li, Y., Vathsala, A., and Zink, D. (2014). Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm* **11**, 1933-1948.

Poosti, F., Pham, B. T., Oosterhuis, D., Poelstra, K., van Goor, H., Olinga, P., and Hillebrands, J. L. (2015). Precision-cut kidney slices (PCKS) to study development of renal fibrosis and efficacy of drug targeting ex vivo. *Dis Model Mech* **8**, 1227-1236.

Kitamura, S., Yamasaki, Y., Kinomura, M., Sugaya, T., Sugiyama, H., Maeshima, Y. & Makino, H. (2005). Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *EASEB J.* **19**, 1789-1797.

Kitamura, S., Sakurai, H. & Makino, H. (2015). Single adult kidney stem/progenitor cells reconstitute three-dimensional nephron structures in vitro. *Stem Cells.* **33**, 774-784.

株式会社 バイオリンクインク. 喜多村 真治. 腎臓幹細胞/前駆細胞、腎臓幹細胞/前駆細胞の分離 方法、及び腎疾患の治療方法. 特開 2004-275079. 2004-10-07.

株式会社 オーガンテクノロジーズ. 喜多村 真治. バイオ人工臓器作成方法. 特開 WO2011-021558. 2013-01-24.

添付資料2 腎臓毒性 in vitro 試験法プロトコールー③

発光レポーター搭載 rKS 細胞の2次元培養での腎毒性評価試験

1. 背景・目的

腎臓は生体において、血液から老廃物や過剰の水分・電解質をろ過、排出、また原尿から水の再 吸収といった機能を行っている臓器であり、これらの最小機能単位としてネフロンと呼ばれる構造 を多数持つ。また、腎臓はその重量に比して心臓から組織に送り出される血液量は全体の2割以上 を占める。このようなことから、血液中の毒物が腎臓において高濃度になりやすいため、障害が現 れやすい臓器であると言える。また特に原尿から再吸収を行う尿細管においては、トランスポータ 一の発現部位であることからも腎毒性物質の重要な標的部位となる。

産業界における毒性学では、腎毒性の最終的な評価は in vivo での研究に頼っているが、近年では動物愛護の観点からの動物実験の規制の高まりや長期動物毒性試験でのコストの増大といった問題をはらんでいると言える。また腎毒性の臨床的、化学的、病理的な判定基準は腎臓の機能的及び形態的な障害を持って判断されている。

現在の *in vitro* 腎毒性試験系では、ほとんどの場合腎臓由来の細胞を用いた二次元の試験系であり、 腎臓の機能単位として十分であるとは言えない。また、より生体に近いと考えられる三次元の系で は precision-cut kidney slices (PCKS)と呼ばれる *ex vivo*の系、及び ES 細胞や iPS 細胞といった幹細胞か ら腎臓様構造体を再構成した系を用いた研究が行われているが、前述した動物愛護やコストの問題 を解決するには至らない。これらのことから腎毒性試験の一部であってでも、*in vivo* 試験系の判定基 準を模倣した *in vitro* 試験系に代替する必要があると考えられる。

2. 試験の概要

生物試料として用いる rKS56 細胞は、適当な成長因子の存在下かつ培養方法によって分化し、ネフロンを構成している糸球体様、近位尿細管様、遠位尿細管様の種々の構造を三次元で形成することが可能である。

しかしながらこの3次元培養は試薬コストが高い、サンプル作成に時間がかかる(1 サンプル当た り5分程度)、24ウェルプレートを用いるため多検体の同時解析が困難であるといった問題から、多 検体を同時に解析するハイスループットスクリーニング(HTS)解析には適していない。そのため HTS 解析のためには2次元培養での試験法が必要になる。

ルシフェラーゼや蛍光遺伝子を導入した培養細胞をルミノメーターやプレートリーダーで解析することで効率的で感度の高い HTS 解析行うことが可能になる。

AKE rKS56 細胞は CAG プロモーターでドライブされる緑色蛍光タンパク質 EGFP、Aqp1 と赤色 蛍光タンパク質 mCherry との融合タンパク、および Kim1 プロモーター下にルシフェラーゼ Eluc を 発現する遺伝子群を保持している。

In vivo 腎毒性試験の臨床でも腎障害マーカーとして利用されている Kim 1 遺伝子の発現の変動を、 マルチカラーのレポーター遺伝子を保持する rKS56 細胞のレポーター遺伝子の変動で検出する。こ の試験法では、Kim 1 レポーター遺伝子の発光の上昇を近位尿細管障害の誘導として捉え、CAG プ ロモーターでドライブされる緑色蛍光タンパク質 EGFP の減少を生細胞の減少として捉え、対象と なる化学物質を投与した後の細胞の発光値および緑色蛍光値を定量的に解析することで腎毒性を検 出する。

- 3. 材料および試薬
- 3.1 生物材料

AKE rKS56 細胞(rKS56 細胞は岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 喜多村真治先生より 分与されたものにマウス人工染色体ベクターを導入したもの)(継代数は 50 回を超えるものは用い ない。)

- 3.2.1 器具·機器(継代)
 - Corning® BioCoatTM Cellware, Collagen Type IV, 100 mm Culture Dishes
 - ・ その他一般的な細胞培養機器一式
- 3.2.2 器具·機器 (毒性試験)
 - ・ クリアボトム培養用 96 ウェルプレート(黒)
 - ・ 発光および蛍光測定機器 (ルミノメーター、プレートリーダー)
 - ・ その他一般的な細胞培養機器一式
- 3.3.1 試薬(継代)
 - D-PBS (-)
 - 0.25%トリプシン-EDTA
 - DMEM/F-12, HEPES
 - FBS
 - Nicotinamide
 - Insulin-Transferrin-Selenium-X (Gibco, 51500-056)
 - Dexamethasone
 - Penicillin
 - Streptomycin
 - Epidermal Growth Factor, Rat (R & D systems, 3214-EG-100)

3.3.2 試薬 (毒性試験)

- D-PBS (-)
- DMEM/F-12, HEPES
- FBS
- Penicillin
- Streptomycin
- Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo (TOYOBO, ELA-301, 現行品) ※Emerald Luc Luciferase Assay Reagent (TOYOBO, ELA-101)は現在販売中止
- 3.4 培地の調整
- 3.4.1 維持培地

最終濃度	
DMEM/F-12, HEPES	45%
Conditioned medium*	50%
FBS	5%
Nicotinamide	2.5 mM
Insulin-Transferrin-Selenium-X, 100x	200x
Dexamethasone	62.5 μM
HGF	1.25 ng/mL
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 μg/mL
G418	400 μg/mL

表1 維持培地の組成

(*; マウス間葉系細胞に由来する10% FBS含有DMEM 調製培養液 (シミック株式会社・菅谷健氏より分与))

3.4.2 基本培地

表2 基本培地の組成

	最終濃度
DMEM/F-12, HEPES	90%
FBS	10%
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

4. 継代培養

セミコンフルエントになった q10 cm dish に対して、PBS で2回洗浄

1 mL の 0.25% trypsin-EDTA を加え、37℃、5~8分処理 (剥がれなかった細胞は分化が進んでいる ものとして使用しない)遠心分離、1,200 rpm、3分

- (1) 10% FBS DMEM/F-12 に懸濁
- (2) 1/10~1/100になるように維持培地で調整
- (3) コラーゲン IV コートした q10 cm dish に播種
- (4) 37°Cの5%CO2インキュベータで培養

5. 試験方法

5.1 細胞の播種

- (1) .セミコンフルエントになった q10 cm dish に対して、PBS で 2 回洗浄
- (2) 1 mL の 0.25% trypsin/EDTA を加え、37℃、5~8分処理(剥がれなかった細胞は分化が進んでいるものとして使用しない)

- (3) 遠心分離、1,200 rpm、3 分
- (4) 維持培地に 1 x 10⁵ cells/mL となるよう懸濁
- (5) クリアボトム 96 ウェルプレートに 200µL を播種する (細胞数は 2 x10⁴ cells/ウェル)

5.2 被験物質曝露とアッセイ

- (1) 播種から 24 時間後、被験物質を添加した 200 µL の維持培地へと培養液交換し、37℃ の 5% CO₂
 インキュベータで 5 日間培養する。(1 試験につき 3 ウェル以上)(試験の終了まで培地の交換は行わない。)
- (2) 5日間の培養後、各ウェルを PBS で 2回洗浄する。
- (3) 50µLの基本培地を加える。
- (4) プレートリーダー(TECAN など)で EGFP の蛍光強度を測定する(EGFP の蛍光波長が測定で きる機器なら何でもよいが、強度が飽和しないパラメータを予め検討しておくことが望ましい)。
- (5) 50µLの(室温に戻しておいた) Emerald Luc Luciferase Assay Reagent を加える。
- (6) 直ちにルミノメーター(ATTO, PHELIOS など)で発光を測定する。測定条件は1秒カウントを100回繰り返す(合計100秒の積算)。



図1 被験物質曝露のスキーム

- 5.3 蛍光・発光データ処理
- (7) EGFPの蛍光データ:バックグラウンドを引いた値を各処理群における EGFP 蛍光を発する生存細胞数として算出する。溶媒対照群(被験物質濃度0)の値 [control FLU^{egfp}]を基にして各処理(濃度)群の値 [FLU^{egfp}]の相対蛍光強度を算出する。
- (8) Eluc の発光データ:バックグラウンドを引いた値を各処理群における Eluc の発光強度として算 出する。溶媒対照群(被験物質濃度0)の値[control KIM^{eluc}]を基にして各処理(濃度)群の値 [KIM^{eluc}]の相対発光強度を算出する[KIM^{eluc}]。
- (9) 補正相対発光強度: [KIM^{eluc}]/[FLU^{egfp}]の値を各群での補正相対発光強度とする。
 被験物質曝露サンプル EGFP 蛍光強度; [FLU^{egfp}]
 被験物質曝露サンプル Kim1-Eluc 発光強度; [KIM^{eluc}]
 溶媒対照サンプル EGFP 蛍光強度; [control FLU^{egfp}]
 溶媒対照サンプル Kim1-Eluc 発光強度; [control KIM^{eluc}]
- 6. 陽性基準
- 以下の場合は腎毒性有りと判定する。

被験物質曝露サンプル補正相対発光強度と溶媒対照サンプル補正相対発光強度の比が2.0以上 の場合

7. 参考文献

Morin, J.-P., De Broe, M. E., Pfaller, W. & Schmuck, G. (1997). Nephrotoxicity testing in vitro: the current situation. *ATLA* **25**, 497-504.

Tiong, H. Y., Huang, P., Xiong, S., Li, Y., Vathsala, A., and Zink, D. (2014). Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm* **11**, 1933-1948.

Poosti, F., Pham, B. T., Oosterhuis, D., Poelstra, K., van Goor, H., Olinga, P., and Hillebrands, J. L. (2015). Precision-cut kidney slices (PCKS) to study development of renal fibrosis and efficacy of drug targeting ex vivo. *Dis Model Mech* **8**, 1227-1236.

Kitamura, S., Yamasaki, Y., Kinomura, M., Sugaya, T., Sugiyama, H., Maeshima, Y. & Makino, H. (2005). Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *EASEB J.* **19**, 1789-1797.

Kitamura, S., Sakurai, H. & Makino, H. (2015). Single adult kidney stem/progenitor cells reconstitute three-dimensional nephron structures in vitro. *Stem Cells.* **33**, 774-784.

株式会社 バイオリンクインク. 喜多村 真治. 腎臓幹細胞/前駆細胞、腎臓幹細胞/前駆細胞の分離 方法、及び腎疾患の治療方法. 特開 2004-275079. 2004-10-07.

株式会社 オーガンテクノロジーズ. 喜多村 真治. バイオ人工臓器作成方法. 特開 WO2011-021558. 2013-01-24.

添付資料2 腎臓毒性 in vitro 試験法プロトコールー④

発光レポーター搭載マウス近位尿細管 S3 由来不死化細胞の

2次元培養での腎毒性評価試験

1. 背景·目的

腎臓は生体において、血液から老廃物や過剰の水分・電解質をろ過、排出、また原尿から水の再 吸収といった機能を行っている臓器であり、これらの最小機能単位としてネフロンと呼ばれる構造 を多数持つ。また、腎臓はその重量に比して心臓から組織に送り出される血液量は全体の2割以上 を占める。このようなことから、血液中の毒物が腎臓において高濃度になりやすいため、障害が現 れやすい臓器であると言える。また特に原尿から再吸収を行う尿細管においては、トランスポータ ーの発現部位であることからも腎毒性物質の重要な標的部位となる。

産業界における毒性学では、腎毒性の最終的な評価は in vivo での研究に頼っているが、近年では動物愛護の観点からの動物実験の規制の高まりや長期動物毒性試験でのコストの増大といった問題をはらんでいると言える。また腎毒性の臨床的、化学的、病理的な判定基準は腎臓の機能的及び形態的な障害を持って判断されている。

現在の *in vitro* 腎毒性試験系では、ほとんどの場合腎臓由来の細胞を用いた二次元の試験系であり、 腎臓の機能単位として十分であるとは言えない。また、より生体に近いと考えられる三次元の系で は precision-cut kidney slices (PCKS)と呼ばれる *ex vivo* の系、及び ES 細胞や iPS 細胞といった幹細胞か ら腎臓様構造体を再構成した系を用いた研究が行われているが、前述した動物愛護やコストの問題 を解決するには至らない。これらのことから腎毒性試験の一部であってでも、*in vivo* 試験系の判定基 準を模倣した *in vitro* 試験系に代替する必要があると考えられる。

2. 試験の概要

Kidney injury molecule-1 (Kim-1)は急性腎障害のバイオマーカーであり、腎臓近位尿細管障害を誘導 する腎毒性物質であるシスプラチンの投与により mRNA の発現が上昇する。HPRT 遺伝子はハウス キーピング遺伝子であり、遺伝子発現を測定する際の内部標準遺伝子として利用されている。Kim-1 遺伝子の発現を緑色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子と HPRT 遺伝子 の発現を赤色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子をそれぞれ開発した。 2つのレポーター遺伝子をマウス人工染色体 (MAC) ベクターに導入した。この2色発光 MAC ベ クターをマウス近位尿細管 S3 由来不死化細胞に移入することで腎障害レポーター遺伝子導入マウス 近位尿細管由来不死化細胞を作成した。この細胞にシスプラチンを投与したところそれぞれのレポ ーター遺伝子により腎障害を検出することができる。

マウス近位尿細管 S3 由来不死化細胞はシスプラチンに対する感受性が高い不死化細胞である。 Kim-1 遺伝子の発現を緑色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子と HPRT 遺伝子の発現を赤色発光ルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター遺伝子をそれぞれ開発 した。2つのレポーター遺伝子をマウス人工染色体 (MAC) ベクターに導入した。この2色発光 MAC ベクターをマウス近位尿細管由来不死化細胞に移入することで腎障害レポーター遺伝子導入マウス 近位尿細管由来不死化細胞を作成した。

In vivo 腎毒性試験の臨床でも腎障害マーカーとして利用されている Kim 1 遺伝と内部標準マーカー として用いられる HPRT 遺伝子の発現の変動をマウス近位尿細管 S3 由来不死化細胞で保持されて いるレポーター遺伝子の変動で検出する。この試験法では、Kim1レポーター遺伝子の緑色発光の上 昇を近位尿細管障害の誘導として捉え、HPRT プロモーターでドライブされる赤色発光の減弱を生 細胞の減少として捉える。この試験では、対象となる化学物質を投与した後の細胞の発光値を定量 的に解析することで腎毒性を検出する。

3. 材料および試薬

3.1 生物材料

マウス近位尿細管 S3 由来不死化細胞

- 3.2.1 器具·機器(継代)
 - Corning® BioCoatTM Cellware, Collagen Type IV, 100 mm Culture Dishes
 - ・ その他一般的な細胞培養機器一式

3.2.2 器具·機器 (毒性試験)

- ・ クリアボトム培養用 96 ウェルプレート(黒)
- ・ 発光および蛍光測定機器 (ルミノメーター、プレートリーダー)
- ・ その他一般的な細胞培養機器一式
- 3.3.1 試薬(継代)
 - D-PBS (-)
 - 0.25%トリプシン-EDTA
 - DMEM/F-12, HEPES
 - FBS
 - Nicotinamide
 - Insulin-Transferrin-Selenium-X (Gibco, 51500-056)
 - Dexamethasone
 - Penicillin
 - Streptomycin
 - Epidermal Growth Factor, Rat (R & D systems, 3214-EG-100)

3.3.2 試薬 (毒性試験)

- D-PBS (-)
- DMEM/F-12, HEPES
- FBS
- Penicillin
- Streptomycin
- Emerald Luc Luciferase Assay Reagent Neo (TOYOBO, ELA-301, 現行品) ※Emerald Luc Luciferase Assay Reagent (TOYOBO, ELA-101)は現在販売中止

	最終濃度	
DMEM/F-12, HEPES	95%	
FBS *	5%	
insulin	1 μg/mL	
transferrin	10 μg/mL	
hEGF	10 ng/mL	
FBS *	5%	

表1 培地の組成

4. 継代培養

セミコンフルエントになった φ10 cm dish に対して、PBS で2回洗浄

1 mL の 0.25% trypsin-EDTA を加え、室温、1分処理して遠心分離、1,200 rpm、3分

- (5) 10% FBS DMEM/F-12 に懸濁
- (6) 1/4~1/10になるように培地で調整
- (7) 37°Cの5%CO2インキュベータで培養

5. 試験方法

<Day0> 準備

- (1) 対数増殖期にある細胞を 96-well plate に 2 x 10⁴ cells/well で播種する (発光測定用白プレート: white flat bottom white plate または clear flat bottom white plate)。
- (2) インキュベーター中 (33°C)、約24時間培養する。

<Day1> 被験物質曝露

- (3) 化学物質を溶媒(DW または DMSO)に溶解後、適当な希釈列を作製する(例:公比2で8濃 度)。
- (4) 不死化 S3 細胞培養培地 (培地) に 0.5 vol%となるよう添加し、処理培地を作製する。
- (5) 各ウェルの培地を除去後、処理培地を 100 µL/well で添加する。
- (6) インキュベーター中、約72時間培養する。

<Day4> 発光測定

- (7) 細胞の状態や沈殿の有無等を観察する。
- (8) 各ウェルから培地を 50 µL/well 除去する。
- (9) Tripluc Luciferase Assay Reagent (with 1% Brij[®] 58)を 50 µL/well 添加する (final 0.5% Brij[®] 58)。
- (10) プレートは 10 秒振盪後、10 分室温、暗所で静置する。
- (11) 2 色発光が測定可能なルミノメーター(Phelios luminometer)で2 枚の光学フィルター、510±30 nm フィルター、660±50 nm フィルターを用いて測定する。
- (12) 試験サンプルの他に、各ルシフェラーゼを単独に発現させてサンプルを準備し、それぞれフィ ルター非存在下(全光)及び各フィルターの透過光を測定し、各フィルター透過光の割合を決定 する(Tij:i=1,2(フィルター①、②)、j=g,r(ルシフェラーゼ SLG、SLR))。

(13) 試験サンプルについて、2枚のフィルターの透過光(F1、F2)を測定し、測定値から Microsoft[®] Excel などを用いて下式を計算し、試験サンプル中の各ルシフェラーゼの発光量(G、R)を算出する。

G		T _{1g}	ר₁,	[F1]
[R]	=	T _{2g}	T _{2r}	F ₂

- (14) SLG 発光量 [G]: 近位尿細管障害マーカーKim 1 遺伝子のプロモーターによる緑色発値。溶媒 対照群(被験物質濃度0)の値は[controlG]とする。
- (15) SLR の発光量[R]: 内部標準マーカー HPRT 遺伝子のプロモーターによる赤色発値。溶媒対照
 群(被験物質濃度0)の値は[control R]とする。
- (16) 補正相対発光強度: [G]/[R]の値を各群での被験物質曝露サンプル補正相対発光強度、[control G]/ [control R]の値を各溶媒対照サンプル補正相対発光強度とする。
- 6. 陽性基準

以下の場合は腎毒性有りと判定する。

被験物質曝露サンプル補正相対発光強度と溶媒対照サンプル補正相対発光強度の比が2.0以上 の場合

<u> 数数物質課標サンプル補正相対発光強度</u> > 2.0 溶媒対照サンプル補正相対発光強度

7. 参考文献

Lim AI, Tang SCW, Lai KN, Leung JCK. Kidney injury molecule-1: more than just an injury marker of tubular epithelial cells? *J Cell Physiol* 2013; **228**: 917–924. doi:10.1002/jcp.24267

Sohn S-J, Kim SY, Kim HS, *et al.* In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicol Lett* 2013; **217**: 235–242. doi:10.1016/j.toxlet.2012.12.015

Hosoyamada M, Obinata M, Suzuki M, Endou H. Cisplatin-induced toxicity in immortalized renal cell lines established from transgenic mice harboring temperature sensitive SV40 large T-antigen gene. *Arch Toxicol* 1996; **70**: 284–292.

Takeda M, Kobayashi M, Shirato I, Osaki T, Endou H. Cisplatin-induced apoptosis of immortalized mouse proximal tubule cells is mediated by interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) family of proteases but inhibited by overexpression of Bcl-2. *Arch Taxicol* 1997; **71**: 612–621.

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, *et al.* Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**: 666–671. doi:10.1124/jpet.102.034330 Takiguchi M, Kazuki Y, Hiramatsu K, *et al.* A novel and stable mouse artificial chromosome vector. *ACS Synth Biol* 2014; **3**: 903–914. doi:10.1021/sb3000723

Oshimura M, Uno N, Kazuki Y, Katoh M, Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. *Chromosome Res* 2015; **23**: 111–133. doi:10.1007/s10577-014-9459-z

Endo T, Noda N, Kuromi Y, *et al.* Evaluation of an Hprt-Luciferase Reporter Gene on a Mammalian Artificial Chromosome in Response to Cytotoxicity. *Yonago Acta medica* 2016; **59**: 174–182.Nakajima Y, Kimura T, Sugata K,
et al. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *BioTechniques* 2005; **38**: 891–894. 国立研究開発法人産業技術総合研究所. 中島 芳浩. 人工染 色体ベクター及び形質転換哺乳類細胞. 特開2015-119643

(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発

目的

研究開発の流れ(1)~(3)、(5)、(6)をもとに、神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発する。 具体的には、ES 細胞から神経細胞への分化誘導の手法を整備し、その分化誘導した神経細胞を用 いて、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認し、マーカー 遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクター、マウ ス ES 組み換え細胞の順に作製する。作製したマウス ES 細胞を分化誘導し、神経細胞の培養細胞 を用いて、神経毒性を評価できる in vitro 試験法を開発する。

中間目標

ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用い、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形 態変化及び発現等を確認しマーカー遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等 を用い、人工染色体ベクターを作製する。

最終目標

神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発するため、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞を 作製し、当該 ES 細胞の分化誘導及び培養等により神経細胞の培養細胞を作製する。作製した培養 細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコール案を作成する。

	目標	成果	達成度
中間時点	(1) 神経毒性に関連す	(1) 神経毒性マーカーを選定し(Tubb3, Reln,	
	ると考えられるマ	MAP2, GFAP)、人工染色体ベクターを作	
	ーカー遺伝子の選	製した(Tubb3_SLG, GFAP_SLG+GFP)。	達成
	定と人工染色体ベ		
	クター作製		
最終時点	(2) 遺伝子導入マウス	(2) 神経毒性評価用の遺伝子導入マウス ES	
	ES 細胞作製	細胞を作製した(Tubb3_Luc ES, Reln_Luc	
		ES, MAP2_Luc ES, GFAP_SLG ES,	
		MAP2_SLR ES)。	
	(3) 遺伝子導入マウス	(3) 遺伝子導入マウス ES 細胞の分化誘導お	
	ES 細胞の分化誘導	よび神経毒性評価用の神経細胞培養法を	
	及び培養等により	確立した。	達成
	神経細胞の培養細		
	胞の樹立		
	(4) 樹立した培養細胞	(4) 遺伝子導入マウス ES 細胞由来の神経細	
	を用い神経毒性を	胞を用いて神経毒性を評価する3種の試	
	評価可能な試験系	験系構築と試験法プロトコール案を作成	
	の構築と試験法プ	した。	

<目標、成果、達成度>

ロトコール案作成		
(5) 国際標準化にむけ	(5) 外部研究機関への技術移転検討および共	
た取り組み	同研究を開始した。	

研究開発の内容

マウスES細胞から神経細胞への発達分化過程および分化後の成熟神経細胞を用いて in vitro 神経/発達神経毒性試験法を開発した。発達神経毒性試験法は神経分化および神経突起伸展への化 学物質曝露による影響を評価する in vitro 試験法、成熟期の神経毒性試験法は、神経細胞とアストロサイトの共培養における神経細胞とアストロサイトへの影響を調べる簡便な神経毒性試験法を 開発した(図C-1)。



図 C-1. 神経/発達神経毒性を評価するための 3 種の in vitro 試験系

最初に、試験法開発に先がけて、マウス ES 細胞から毒性評価に適した安定した神経細胞分化誘 導法を検討した。具体的には、無血清培地を用いて、96 ウエルプレートでマウス ES 細胞から、 胚様体を作製し、大脳への神経分化培地により神経細胞へと分化誘導させた。播種する ES 細胞数 や分化因子を添加するタイミング等の検討を行い、4 種類の細胞株から最も高効率に分化する細胞 株(KOB1)を選抜し、安定した神経分化誘導法を確立した。

次に、この分化誘導法により作製した神経毒性評価用の分化神経細胞の性状解析を行った。DNA マイクロアレイで分化誘導 12 日目の胚様体を分散させた分化神経細胞とそのステージに対応す る胎生 16 日齢のマウス大脳初代培養との遺伝子発現を網羅的に比較解析した。結果、ES 由来神 経細胞の培養と大脳の初代培養とでは非常に類似した遺伝子発現を示すことが確認された。特に、 NMDA や GABA 等の神経伝達物質レセプターや軸索ガイダンスレセプター等、毒性発現と関連す るレセプターの mRNA 発現について、マイクロアレイのデータを比較したところ、ES 由来神経細 胞は発現レベルおよび発達推移ともに初代培養と同等レベルであることが確認された。また、免 疫染色法により、ES 由来神経細胞は GABA 作動性およびグルタミン酸作動性の神経細胞が存在し ていることも明らかになった。さらに、アストロサイトが分化するステージまで培養を継続し、 分散するタイミングや添加する誘導因子等の検討により神経細胞とアストロサイトの共培養系を 構築した。この共培養系で多点電極アレイによる機能解析を行ったところ、分散 7 日目以降で、 自発的な活動電位の発現を確認でき、NMDA や GABA 等の薬物に応答できる機能的な神経細胞で あることも明らかにした。

これら評価用神経細胞を使って、神経細胞の分化・成熟度の異なる発達ステージに化学物質を 曝露させることで、それぞれのステージで起きているイベントに対する 3 つの毒性機序に対応し た試験法の開発を行った。すなわち、①発達の初期では分化 0 日から 6 日まで、化学物質を曝露 させて化学物質の神経分化への影響を調べる神経分化アッセイ(Test1)、②発達の後期では分化 12 日の胚様体を酵素で分散し、分散培養開始 3 時間後から 24 時間、化学物質を曝露させて、化学物 質の神経突起伸長への影響を調べる神経突起伸展アッセイ(Test2)、また、③成熟期では分化誘導 19 日で胚様体を分散し、さらに 1 週間の成熟後、神経細胞とアストロサイトの細胞骨格タンパク への影響を調べる簡便な神経毒性試験法(Test3)の開発を行った。詳細は以下に記す。

■ Test1.神経分化アッセイ

化学物質の神経分化への影響を評価するため、神経細胞の発達初期から発現し、かつ神経細胞 特異的に発現することが知られている細胞骨格蛋白Tubb3遺伝子および2006-2010年に実施され たNEDOプロジェクト「高機能簡易型有害性評価手法の開発/培養細胞を用いた有害性評価手法 の開発/催奇形性予測試験法の開発」において、発生毒性化合物で共通して変動し、かつ神経発 生に係ることが報告されているReln遺伝子をマーカー遺伝子として、ルシフェラーゼアッセイの 開発を行った。

Reln_ESおよびTubb3_ES細胞は、それぞれの遺伝子の発現変動をレポーター遺伝子で検出でき るようにリポフェクトアミン試薬を用いてゲノムへのランダムインテクレーションにより安定 形質転換株を作製した。これらの細胞をテスト化合物存在下で大脳神経細胞へと分化誘導させ、 その分化過程で、テスト化合物が神経分化へ影響を及ぼすかどうか検討した。陽性対照物質とし て催奇形性が報告されている15化合物および陰性対照物質17化合物を用いて、合計32化合物のア ッセイを行った。代表的な結果では、神経への分化促進作用が報告されているレチノイン酸を曝 露した場合、細胞毒性が認められない濃度でルシフェラーゼ活性が増加した。一方、催奇形性が 報告されているジメタジオンを曝露した場合では、細胞毒性より低い濃度からルシフェラーゼ活 性が低下した(図C-2)。これらの結果は、本試験方法が神経分化の促進と抑制の両方向への影 響を検出できる可能性を示唆するものと考えられた。





図 C-2. Reln-ES および Tubb3-ES 細胞を神経に分化誘導し、分化誘導後 6 日間、ジメタジオン およびレチノイン酸を曝露させた時の細胞毒性およびルシフェラーゼ活性 (左図: Reln-ES、右図:Tubb3-ES)

32 化合物は、細胞毒性の 50%阻害値(IC₅₀)および分化毒性の 50%阻害値(ID₅₀)を算出し、表 C - 1にまとめた。

			_									
				Rein (d0-6)				Tubb3 (d0-6)				
			_									
			linear		regression model		el		linear	regression mod		lel
	Chemicals	MD (mg/mL)	IC	50(µg/mL)	ID:	50(µg/mL)	IC50/ID50	IC	C50(µg/mL)	ID	50(µg/mL)	IC50/ID50
	5-FU	0.125		0.03		0.01	2.22		0.04		0.03	1.11
	Imipramine HCI	1		4.78		3.02	1.58		1.32		0.50	2.64
	Papaverin HCI	0.078125		7.20		5.12	1.41		5.85		2.71	2.16
	Warfarin	0.25	>	100.00	>	100.00	1.00	>	100.00	>	100.00	1.00
	Methylmercury	>0.0251		0.0025		0.0011	2.24		0.0012		0.0012	0.98
	d-penicillamine	1		642.97		342.25	1.88		434.05		352.80	1.23
	Methylazoxymethanol	1		94.83		53.86	1.76		37.26		25.22	1.48
PC	Propranolol HCI	0.5		13.70		8.35	1.64		7.32		2.02	3.63
	Boric acid	0.5		166.40		38.93	4.27		61.51		31.90	1.93
	Lithium chloride	1		577.57		354.53	1.63		424.13		154.76	2.74
	Methoxyacetic acid	1		372.78		270.30	1.38		279.76		202.12	1.38
	Dimethadione	1	>	1000.00	>	1000.00	1.00	^	1000.00		472.10	2.12
	VPA	1		141.16		92.14	1.53		81.51		77.66	1.05
	Phenytoin	0.0625	>	500.00	>	500.00	1.00	^	500.00	>	500.00	1.00
	all-trans Retinoic acid	0.03125	>	1.000	>	1.000	1.00	^	1.000		0.599	1.67
	Doxylamine succinate salt	1		128.36		105.34	1.22		108.14		127.87	0.85
	Penicillin G	1		766.05		447.63	1.71		426.38		344.11	1.24
	Saccharin sodium salt	1	>	1000.00	>	1000.00	1.00	٧	1000.00	^	1000.00	1.00
	Metformin HCI	1		879.64		580.66	1.51		365.21		203.83	1.79
	Lidocain HCI	1		476.01		170.97	2.78		69.81	>	15.63	4.47
	Pravastatin sodium	1		17.36		10.01	1.73		5.01		4.17	1.20
	Ascorbic Acid	1		706.70		461.67	1.53		557.44		405.53	1.37
	D-(+)-Camphor	0.25	>	250.00	>	250.00	1.00	۷	250.00	^	250.00	1.00
NC	Cefotaxime	1		369.36		284.46	1.30		172.73		152.90	1.13
NC	Hydrochlorothiazide	0.25	>	250.00	>	250.00	1.00		122.82		83.90	1.46
	Enalapril	0.25	>	250.00	>	250.00	1.00		224.48		190.03	1.18
	Ethylene glycol methyl ether			4000.00		4000.00	4.00		1000.00		4000.00	1.00
	(EGME)	1	>	1000.00	>	1000.00	1.00	>	1000.00	>	1000.00	1.00
	cimetidine	0.25	>	250.00	>	250.00	1.00	>	250.00	>	250.00	1.00
	Amoxicillin trihydrate	0.25	>	250.00	>	250.00	1.00	>	250.00	>	250.00	1.00
	Glufosinate Ammonium	1	>	1000.00	>	1000.00	1.00	>	1000.00	>	1000.00	1.00
	Isoniazid	1		593.87		286.76	2.07		377.42		95.72	3.94
	Acrylamide	1		96.50		57.07	1.69		54.80		58.80	0.93

<mark>表 C-1</mark>. Tubb3_ES および Reln_ES 細胞を用いて、in vivo 陽性化合物 15 剤と陰性化合物 17 剤 を分化誘導 0-6 日に曝露した時の細胞毒性 IC50 値および分化毒性(ID50)

PC:Positive control (陽性対照), NC:Negative control (陰性対照)

次に各化合物の IC₅₀ 値、ID₅₀ 値および最大溶解濃度(MD)をパラメータとして、以下の予測式を 構築した。

Tubb3_ES

```
Score=2.353 \times log(IC_{50}/ID_{50})+0.822 \times log(MD/IC_{50})-1.082
Cut-off(a): 0.52
```

<u>Reln_ES</u>

 $Score=1.665 \times log(IC_{50}/ID_{50})+0.899 \times log(MD/IC_{50})-0.868$ Cut-off 16: 0.55

すべての化合物について上記の式を用いてスコアを算出し、それを逆ロジット変換で 0~1 表 記に変換した (probability 計算)。その変換した probability が Cut-off 値以上であれば陽性と判 定し、Cut-off 値未満であれば陰性と判定した。その結果、Tubb3_ES 細胞は、感度 60%、特異度 82%、正確度 72%、Reln_ES 細胞は、感度 60%、特異度 88%、正確度 75%の予測結果を得た(表 C-2 および 3)。

		in	vitro	
in vivo		Р	N	
Positive	15	9	6	
Negative	17	3	14	
Sensitivity			60%	9/15
Specificity			82 %	14/17
Positive predict values			75%	9/12
Negative predict values			70%	14/20
Accuracy			72%	23/32

<mark>長 C-2</mark> . Tubb ES 細胞の神経分化アッセイの予
--

		in	vitro	
in vivo		Р	N	
Positive	15	9	6	
Negative	17	2	15	
Sensitivity			60%	9/15
Specificity		88%	15/17	
Positive predict values			82%	9/11
Negative predict values			71%	15/21
Accuracy		75%	24/32	

<mark>表 C-3</mark>. Reln ES 細胞の神経分化アッセイの予測能

■ Test2:神経突起伸展アッセイ

化学物質の神経細胞の成長への影響を調べるために、神経突起の長さをハイコンテントアナ リシスにより評価する試験系の開発を行った。評価用の神経細胞は、マウス ES 細胞から分化誘導 した神経細胞を用いた。方法は、Test1 と同様に無血清培地を用いて胚様体を作製し、大脳へと分 化誘導させた。神経突起の形態を観察しやすいよう、分化誘導 12 日目で胚様体を分散し、 poly-d-lysin コートの 96 ウェル皿上で神経分散培養を行った。

まず、ハイコントイメージングシステムを使って、Tubb3 抗体で染色した神経細胞の神経突起 や生存神経細胞を自動で識別するパラメータの設定を行い、自動定量化を行った。そして、化合 物の神経突起伸展への影響をとらえるための化合物曝露期間、細胞播種濃度などの試験方法の最 適化を行った。次に、ES 由来の分化神経細胞が、大脳の初代細胞と同等の反応性を有しているか 確認するために、ES 由来神経細胞の分散培養とその時期に相当する胎生 16 日齢のマウス大脳初 代培養を用いて、化合物曝露による神経突起伸展への影響を比較した。

被験化合物は、表 C-4 に示したとおり、陽性対照化合物は in vitro で神経突起伸展への影響が報告され薬理作用が明確な化合物、陰性対照物質は一般的な細胞毒性物質や神経毒性が報告されていない化合物を選択した。また、神経毒性が報告されている産業化学物質の検討も追加した。

1							
陽性対照化合物(突起抑制)	シクロヘキシミド(蛋白合成阻害)、コルヒチン(tubulin 重合阻害)、						
	U0126(MEK 阻害)、スタウロスポリン(PKC 阻害)、メチル水銀						
陽性対照化合物(突起促進)	ブレビスタチン(ミオシン II 阻害)						
一般的な細胞毒性物質	水酸化カリウム、SDS						
非神経毒性化合物	サッカリン、アスヒ゜リン						
その他(産業化学物質)	アクリルアミド、3 ニトロプロピオン酸、グリシドール						

<mark>表 C-4</mark>. 評価化合物の選定

ES 由来の分化神経細胞と大脳の初代細胞の化合物反応性を比較した結果、各化合物の濃度で同等の影響が認められ、両培養において非常に類似した結果を得ることができた(図 C-3)。

Mouse Primary Culture (E16)



iNeurons from mES



Mouse Primary Culture (E16)



iNeurons from mES







Saccharin

120

100

80

60

40

20

0



0 118 177 266 400 600 uM uM uM uM uM uM

Mouse Primary Culture (E16)



iNeurons from mES









0 uM0 uM1 uM 10

100 1000

uM uM uM



Mouse Primary Culture (E16)



図 C-3. 胎生 16 日の大脳初代分散培養および分化誘導後 12 日で分散したマウス ES 細胞由来 神経分散培養において、分散後 0 日から 24 時間の化合物曝露後での神経突起総量お よび生存神経細胞数への影響比較(上段:初代培養、下段: ES 細胞由来神経細胞)

次に、2014 年に Grandjean らが報告した疫学的にヒトで発達神経毒性を引き起こす化合物の中から(Lancet Neurol 2014;13:330-338)、NaAsO₂、MnCl₂, Dieldrin, DDE, MeHg, Tetrachloroethylene について ES 由来神経細胞を用いたアッセイを行った。これら、6 化合物のうち NaAsO₂、MnCl₂, Dieldrin、MeHg および DDE は神経細胞死が生じない濃度より低濃度から神経突起総量が減少する傾向が認められたが、Tetrachloroethylene は両パラメータ間で影響の程度に差は認められなかった(図 C-4)。



神経毒性化合物でなくとも細胞毒性があればそれに伴い神経突起総量は減少するため、特異的な 神経突起への影響と一般的な細胞毒性による神経突起総量の減少を区別することが必要である。 そこで、一般的な細胞毒性物質と発達神経毒性物質の挙動を比較した。例えば、発達神経毒性物 質と報告されている亜ヒ酸(NaAsO₂)と一般的な細胞毒性物質の SDS について図C-5 に示すと、亜 ヒ酸の神経突起総量の影響は同じ濃度でも細胞毒性の影響より強く影響が認められたのに対して、 SDS では神経突起総量と細胞毒性では同程度の影響であった。そこで、表C-5 に示した化合物に ついて、化合物ごとに神経突起総量と生存神経細胞数の対照群に対する 75%の値を示す平均濃度 (平均 IC₇₅ 値)を算出し、定量的に評価した(表C-6)。



<mark>図 C-5</mark>. 代表的な発達神経毒性懸念化合物(NaAsO2)と一般的な細胞毒性物質(SDS)の 神経突起総量および生存神経細胞数への影響結果

神経突起伸展 影響化合物	発達神経毒性 懸念化合物	細胞毒性、陰性化合物
Cycloheximide	NaAsO2	Saccharin
Colchicine	MnCl ₂	Aspirin
Staurosporine	Dieldrin	Sorbitol
U0126	DDE	SDS
Blebbistatin	MeHg	Etoposide
	Tetrachloroethylene	Buthionine sulfoximine
	Acrylamide	Bromohexane
	3-NP	Diethylene glycol
	Lead	Warfarin
		Cyclamen aldehyde
		Methylphenylpiperazine

<mark>表 C-5</mark>. 神経突起伸展アッセイを行った化合物一覧

結果、in vitro で神経突起伸展影響ありの化合物は5 剤中4 剤で、既知神経毒性物質は3 剤中2 剤で、ヒト発達神経毒性懸念化合物では6 剤中5 剤で神経突起総量と生存神経細胞数の平均 IC₇₅ 値に有意差が認められた。一方、これまでに発達神経毒性が報告されていない細胞毒性物質や陰 性対照化合物では 11 剤中 10 剤で神経突起特異的な影響ではないと判定された。神経毒性化合物 も発達神経毒性陽性対照としてまとめると、表 C-7 のとおり、感度 79%、特異度 91%、正確度 84% の予測率となった。今後、より多くの化合物で検証が必要である。

		IC ₇₅ val	ues (µM)	Comparison ^{a)}	Prediction b)
	Chemicals	Neuron counts	Total neurite length		
	Staurosporine	0.8317	0.0002	<i>p</i> <0.01	\checkmark
Compounds known to affect	Cycloheximide	1.00	0.27	<i>p</i> <0.01	\checkmark
neurite outgrwth in vitro	Colchicine	0.21	0.03	<i>p</i> <0.05	\checkmark
	U0126	>50	>50	n.a.	(→)*
	Blebbistatin	>30	-	n.a.	(个) [#]
	NaAsO2	1.6	1.2	<i>p</i> <0.01	4
Compounds likely to	MnCl2	112.8	59.8	<i>p</i> <0.05	\checkmark
cause DNT in humans	Dieldrin	42.1	24.2	p<0.05	\checkmark
	DDE	16.9	11.9	p<0.01	\checkmark
	MeHg	0.203	0.104	<i>p</i> <0.01	\checkmark
	Tetrachloroethylene	>1000	>1000	n.a.	(→)*
Neurotoxic compounds	Acrylamide	>1000	825	n.a.	(↓)*
	3-NP	>1000	174	n.a.	(↓)*
	Lead	16	17	n.s.	\rightarrow
	SDS	404	398	n.s.	→
Non-neurotoxic compounds	Etoposide	0.85	0.83	n.s.	\rightarrow
	Warfarin	304	252	n.s.	\rightarrow
	Cyclamen aldehyde	64	22	<i>p</i> <0.01	\checkmark
	Bromohexane	383	273	n.s.	\rightarrow
	Methylphenylpiperazine	>1000	>1000	n.a.	(→)*
	Saccarine	>1000	>1000	n.a.	(→)*
	Aspirine	>1000	>1000	n.a.	(→) [#]
	Buthionine-sulfoximine	>1000	>1000	n.a.	(→) [#]
	Diethylene glycol	>1000	>1000	n.a.	(→)*
	Sorbitol	>1000	>1000	n.a.	(→)#

<mark>表 C-6</mark>. 神経突起総量と生存神経細胞数の平均 IC75 を算出

^{a)}: Statistical comparison between neuron conts and neurite length by t-tests

n.a.: statistical comparison not analyzed

n.s.: not significant

^{b)}: Predictive effects of neurite outgrowth without cytotoxicity

*: Judeged from effectrs on neurite length because of no cytotoxicity at the highest dose

-: promoted neurite outgrowth

<mark>表 C-7</mark> . 神経突起伸展アッセイの予測								
	Γ	in	vitro	7				
in vivo		Р	N					
Positive	14	11	3					
Negative	11	1	10					
Sensitivity			79%	11/14				
Specificity			91%	10/11				
Positive prec	lict valu	ies 92%		11/12				
Negative pre	les	77%	10/13					
Accuracy			84%	21/25				

一方、ハイコンテトイメージングによるアッセイをより簡便で汎用性の高いルシフェラーゼアッ セイにおきかえるため、神経突起の長さと相関して変動する新規マーカー遺伝子の探索を行った。 細胞毒性より早く神経突起への長さを減少させた化合物に共通して変動する遺伝子群を DNA マ イクロアレイを使って網羅的に解析を行った。その中で、大脳皮質の発生との関連が報告されて いる sfpq (splicing factor proline/glutamine rich)を候補遺伝子のひとつとして選抜し解析を進めた。

Sfpq 遺伝子の有用性検証のために、人工染色体ベクターでの細胞作製を行う前にリポフェクトア ミン試薬を用いたゲノムへのランダムインテグレーションによる組み換え ES 細胞の作製を試みた。 市販のルシフェラーゼが搭載している pGL4.17 vector(プロメガ社)に Sfpq 遺伝子の推定プロモ ーター領域として約 5kbp の DNA 配列を導入後、マイトマイシンC による薬剤耐性株 67 株を得 た。次に、導入配列を検出する 3 か所のプライマーを用いて PCR 法によるゲノムへの組み込みを 確認した。3 か所すべてで導入ベクターの増幅が検出できた細胞 17 株の中から、十分に活性を維 持した株を選抜するために、それぞれの株を大脳神経へと分化誘導させ、神経突起伸展アッセイ 法のプロトコールに従い、誘導 12 日で、96 ウエルプレートに規定量の細胞を播種し、翌日、1 ウ エルあたりのルシフェラーゼ活性を測定した。結果、比較的高いルシフェラーゼ活性(7000~9000 カウント/ウエル)を示す 2 種の株(No.20 および No.31 株)を得た。

次に、プロモーターが正しく作動しているか調べるために、候補株 No.20 および No.31 から作製 した分化神経細胞に Sfpq 遺伝子の mRNA 発現を減少させる化合物(3-NP)を曝露させ、ルシフェラ ーゼ活性と Sfpq mRNA 発現の挙動を比較した。3-NP 曝露により No.31 株でより顕著に Luc 活性 の減少が認められたため、Sfpq mRNA 発現と Luc 活性、内部コントロールの HPRT mRNA 発現と 細胞毒性アッセイ(Cell titer flour)の挙動を比較した(図C-6)。結果、残念ながら、Luc 活性の減少 は Sfpq mRNA の挙動と比べて鋭敏ではなく、期待したような細胞毒性との乖離も認められなかっ た。よって、本プロジェクトでは、突起伸展のアッセイはマーカー遺伝子によるルシフェラーゼ アッセイではなく、ハイコンテントアナリシスを用いた形態観察法でプロトコールを提案するこ ととした。





■ Test3:神経毒性アッセイ

神経細胞の細胞骨格タンパク MAP-2(Microtubule-associated protein 2)とアストロサイトの中間

系フィラメントG FAP(Glial fibrillary acidic protein)の発現変動をルシフェラーゼ活性でモニター できる組み換え細胞を作製し、神経細胞変性などの神経への特異的な影響を検出する簡便な神経 毒性アッセイ系の開発を行った。この細胞は、SLG あるいは SLR の発光ルシフェラーゼと Ac-GFP あるいは mcherry の蛍光タンパク質の配列を 2A 配列で連結して、マーカー遺伝子の発現を発光と 蛍光の両方でモニターできるように工夫した(図C-7)。

MAP2_GFAP細胞



<mark>図 C-7</mark>. 人工染色体ベクター技術と既知神経マーカーを活用した神経毒性評価用の組換え ES 細 胞の概要

アッセイに用いる評価用神経細胞は、Test1 および Test2 と同様の方法で mES 細胞から大脳へと 神経分化誘導後、誘導 19 日で分散させて、1 週間培養したものを用いた。この培養標本では、神 経細胞とアストログリア細胞が混在し、自発発火を有する機能的に成熟した神経細胞に分化して いることを確認した。

MAP-2 はプロモーター領域が 50kbp 以上と非常に長く、細胞作製の難易度が高いと予想された ので、人工染色体ベクターによる方法、ノックイン法、リポフェクトアミンによる DNA へのラン ダムインテグレーションによる方法など、複数の方法で検討した。

結果、GFAP 細胞は人工染色体による方法、MAP2 細胞はリポフェクトアミンおよびノックイン 法で、それぞれ数個の候補クローンを得ることに成功した。

【GFAP 細胞について】

薬剤耐性株としてクローニングされた GFAP_ES 細胞 19株(マウス人工染色体ベクターにより作 製)について、分化誘導後のルシフェラーゼ活性(SLG)と GFAP mRNA 発現の推移を比較した。 C-8 のとおり、両パラメータとも分化誘導 10 日以降に徐々に上昇し、全体的に推移が類似した 2 株を得ることに成功した。このうち、よりルシフェラーゼ活性が高かった#H1-9 株を選抜した。



<mark>図 C-8</mark>. GFAP_Luc ES 細胞の分化誘導後のルシフェラーゼ活性および GFAP 遺伝子の mRNA 発現推移 (横軸:分化誘導後日数)

【MAP2 細胞について】

MAP2 細胞の 5'非翻訳領域が長く、プロモーター領域は 50kbp 以上の非常に長い領域が予想され た。そのため、プロモーター解析に関する文献情報を参考に転写開始点より上流の約 5kbp の配列 を使ってレポータープラスミドを構築し、従来法のリポフェクトアミンによるゲノムへのランダ ムインテグレーションによる方法を利用して MAP2_SLG+AcGFP 組換え ES 細胞を作製した。また、 内在ゲノムにレポーター遺伝子を導入するノックイン法により、MAP2_SLR+mCherry 組換え細胞 の作製も行った。ランダムインテグレーションによる方法で作製した候補 3 株と、ノックイン細 胞 5 株について、分化誘導後のルシフェラーゼ活性推移を調べた。

ランダムインテグレーションによる方法で作製した MAP2 細胞では、3 株ともに誘導 6 日から mRNA 発現が上昇し、15 日あたりでプラトーに達した。いずれの細胞株でもルシフェラーゼ活性 推移は mRNA 発現と同様なパターンを示し、プロモーター活性が機能していることが示唆された (図 C-9)。よって、3 株の中で最もルシフェラーゼ活性が高かった#1-7 株を選抜した。

MAP2 ノックイン細胞では、PCR で遺伝子の導入を確認された 5 株について解析を行ったと ころ、すべての株で分化誘導とともに SLR 活性が上昇することが確認できた(図 C-10)。



図 C-9. 従来法により作製された MAP2_SLG ES 細胞の分化誘導後のルシフェラーゼ活性および MAP2 遺伝子の mRNA 発現推移(横軸:分化誘導後日数)



GFAP_ES 細胞(#H1-9 株)と MAP2_ES 細胞(#1-7 株)を用いて、簡便な神経毒性アッセイを行った。 方法は、GFAP_ES 細胞と MAP2_ES 細胞をそれぞれ、神経細胞へと分化し、誘導 19 日で、胚様体 を分散させ、poly-d-lysin コートの 96well 白色透明ボトムプレート(BD) に 6.4x10^4 個/well で細胞を播種した。分散培養 7 日に表 8 に示した被験化合物を添加し、48 時間の曝露後、Cell-titer fluor (Promega)により細胞生存率を測定し、Triple Luc 試薬(TOYOBO)を用いて SLG 活性を測定 した。

神経毒性物質	NMDA, MnCl ₂ , Acrylamide (ACR), Methylmurcury (MeHg), NaAsO ₂ ,				
	Lead, Kainic acid, Trimethytin (TMT), 3-Nitropropionic acid (3-NP)				
非神経毒性物質	5-FU, Cisplatin, Aspirin, Sorbitol, CCl ₄ , Aniline, SDS, Bromohexane,				
	KOH, Acetoaminophen, Etoposide				
	表 C-8. 神経毒性アッセイに用いた化合物一覧				

図C-11 に示したとおり、メチル水銀は細胞毒性を引き起こすより低い濃度で MAP2 を減少させ、 GFAP は増加させた。一方、鉛では、MAP2 および GFAP の両方を減少させた。神経毒性物質曝露 によるアストロサイトの活性化はよく知られており、本培養系で認められた GFAP 増加はこれを反 映しているのかもしれない。一般的に GFAP 減少の意味については明らかにされていないが、細胞 毒性を引き起こす濃度より低い濃度で減少する GFAP の転写抑制は直接的なアストロサイトへの 毒性影響を反映している可能性が考えられた。



図 C-11. MAP2_ES 細胞(左図)と GFPA_ES 細胞(右図)由来の評価用神経細胞にメチル水銀(a) および鉛(b)を 48 時間曝露した場合の細胞毒性およびルシフェラーゼアッセイの結果 神経毒性化合物 9 剤および非神経毒性化合物 11 剤の結果を元に、神経毒性の判定方法について 検討した。細胞毒性の IC₅₀ 値と SLG 活性が 50%減少する SLG_IC₅₀ 値を算出し(表 C-9)、その割 合(Ratio)を神経毒性化合物と非神経毒性化合物とに分けてプロットした(図 C-12)。細胞毒性と SLG 活性の IC₅₀ 値の割合が 1.75 倍以上、および MAP2 細胞の SLG 活性が 75%以下で、かつ GFAP 活性が増加した場合(GFAP_SLG 活性を細胞毒性(生存細胞数)で除した値が 1.25 倍以上)を、神経 毒性と判定することにした。この判断基準での 20 化合物の予測能は、感度 100%、特異度 73%、 正確度 85%であった(表 C-10)。



図 C-12. テスト化合物による MAP2_ES 細胞の細胞毒性の IC50 値と SLG 活性の IC50 値の割合 (Ratio)



<mark>表 C-9</mark>. テスト化合物 20 剤に対する MAP2 細胞の SLG 活性と細胞毒性の IC₅₀ 値の割合および GFAP 細胞の細胞毒性に対する SLG 活性の割合

			MAP2_ES		MAP2_ES	GFAP_ES	
	被験化合物	SLG_IC ₅₀	Cytotoxicity_IC ₅₀	Ratio 🗸	SLG<75%	SLG/Cytotoxicity	判定
NC	5-FU	>250	>250	1.00	↓	4.62	Р
NC	Cisplatin	>100	>100	1.00	-	1.15	N
NC	Aspirin	>1000	>1000	1.00	_	1.14	N
NC	Sorbitol	>1000	>1000	1.00	-	1.26	N
NC	CCl₄	>1000	>1000	1.00	-	1.36	N
NC	Aniline	>1000	>1000	1.00	_	1.22	N
NC	SDS	537.6	562	1.05	Ļ	1.44	Р
NC	Bromohexane	516.6	597.8	1.16	Ļ	0.84	N
NC	КОН	19.06	22.14	1.16	Ļ	1.08	N
NC	Acetoaminophen	>1000	>1000	1.00	-	2.13	N
NC	Etoposide	6.582	15.6	2.37	Ļ	0.91	Р
PC	NMDA	309.5	384	1.24	Ļ	1.31	Р
PC	MnCl₂	241.1	344.2	1.43	↓	1.26	Р
PC	ACR	>1000	>1000	0.80	Ļ	1.31	Р
PC	MeHg	2.149	4.998	2.33	Ļ	2.24	Р
PC	NaAsO2	2.257	7.257	3.22	Ļ	0.97	Р
PC	Pb	364.6	>1000	2.74	Ļ	0.77	Р
PC	Kainic acid	21.84	68.12	3.12	Ļ	1.22	Р
PC	ТМТ	1.634	12.47	7.63	Ļ	2.74	Р
PC	3-NP	137.90	>1000	7.25	Ļ	2.34	Р

NC:Negative Control, PC:Positive Control, P:Positive, N:Negative

		in v	vitro
in vivo		Р	N
Positive	9	9	0
Negative	11	3	8

<mark>表 C-10</mark>. Test3: 簡便な神経毒性アッセイの予測能

Sensitivity	100%	9/9
Specificity	73%	8/11
Positive predict values	75%	9/12
Negative predict values	10%	8/8
Accuracy	85%	17/20

以上、3種の試験法の開発を行い、プロトコールの作成を行った。今後、より多くの化合物を 用いた検証が必要と考える。

添付資料3 神経毒性 in vitro 試験法プロトコール-①

Test1:

Tubb3-ES/Reln-ES 細胞を利用した

神経分化アッセイ プロトコール

Ver. 1.00

住友化学株式会社 生物環境科学研究所

平成 28 年 2 月 29 日

1. 試験の目的

この試験は、マウス ES 細胞から神経細胞へ分化誘導する過程で、化学物質の神経分化への影響を検出し、発達神経毒性評価に有効な情報を取得することを目的とする。

2. 試験の原理

神経分化マーカー遺伝子である Tubb3 あるいは Reln 遺伝子の発現量をルシフェラーゼ活性で 簡便にモニター可能なマウス組換え ES 細胞株 (Tubb3-ES あるいは Reln-ES 細胞)を用いたレポ ータージーンアッセイで、ES 細胞から神経細胞へと分化する過程で化学物質を曝露し、曝露終 了時に細胞毒性アッセイと発光レポーターのルシフェラーゼ活性を測定することにより、化学 物質が有する神経分化阻害作用を検出する。

3. 試薬・材料

3-1. 細胞 Tubb3-ES 細胞あるいは Reln-ES 細胞

3-2.試薬および調整法

- PBS(-) [Cat No. 10010-023(500mL), Invitrogen]
- 0.25% Trypsin /1mM EDTA 溶液 [Cat.35554-64, Nacalai]
- G418 Disulfate Aqueous Solution [Cat.16513-84, Nacalai]
- ・ラボバンカー1 [BLB-1(100mL), 十慈フィールド]
- ・Steady-glo ルシフェラーゼアッセイシステム (Cat No. E2510, E2520, E2550, Promega)
- CellTiter-Fluor TM Cell Viability Assay (Cat No. G6080, G6081, G6082, Promega)
- ・DMSO 生化学用 (和光純薬、SIGMA 等)

·超純水

・Neo 耐性 MEF 細胞(北山ラベス等から購入し、2回継代して細胞を増やした後、マイトマイシン C 処理し、1~5×10⁶/tube でストックしたもの、もしくはリプロセル等から処理済みの細胞を購入できる。)

<調整法>

▼木刀化框持店套店地 104mL 詞裂の場百/4℃床目						
試薬名	必要量	Cat No(メーカー)				
GMEM	90 mL	11710-035 (Invitrogen)				
KSR (未分化用)	10.5 mL	10828028 (Invitrogen)				
FBS(非働化済み)	1.1 mL	SH30070.03 (Hyclone)				
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	0.9 mL	26252-94(Nacalai)				
100mM NEAA	0.9 mL	11140-050(Invitrogen)				
100mMSodium Pyruvate	0.9 mL	S8636(SIGMA)				
100mM 2-ME 溶液 90 μL						
ESGRO (10 ⁷ unit) (=LIF) 10 µL ESG1107(Millipore)						
注意点						
調整後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。						
100mM 2-ME 溶液および ESGRO は、溶解後は 4℃保存。						

◆未分化維持培養培地 104mL 調製の場合/4℃保管

(注意) Tubb3-ES または Reln-ES 細胞の維持培養には終濃度 100µg/mL になるように G418 を添加する。

◆大脳分化用培地 100mL 調製の場合/4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)				
GMEM	86.9 mL	11710-035 (Invitrogen)				
KSR(分化用 Lot)	10 mL	10828028 (Invitrogen)				
100mM NEAA	1 mL	11140-050(Invitrogen)				
100mMSodium Pyruvate	1 mL	S8636(SIGMA)				
200mM L-グルタミン酸	1 mL	G7513(SIGMA)				
100mM 2-ME 溶液	100 µL					
10mM SB431542	10mM SB431542 10 μL					
注意点						
調整後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。						
100mM 2-ME 溶液および 10mM SB 溶液は、溶解後は 4℃保存。						

KSR は事前にロットチェックして、神経への分化効率が高いロットを使用する。

◆0.1%ゼラチン溶液 500mL 調製の場合/冷蔵保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)				
Gelatin	0.5 g	G2500 from porcine skin(SIGMA)				
純水	500 mL	W3500 (SIGMA)				
調整方法						
・上記を混合し、オートクレーブ。冷蔵で保管する。						
・ ディッシュのゼラチンコートは底面を覆う程度の液量にて 37℃, 30 分以上						
で使用可能。使用前にゼラチンを吸引除去し、洗浄は不要。						

◆100mM 2-メルカプトエタノール溶液 /-80℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)				
2-メルカプトエタノール(原液=14.3M)	70 µL	指定なし				
純水	10 mL	W3500 (SIGMA)				
調整方法						
上記を混合し、0.22µm フィルターで滅菌する。0.5mL ずつ分注し、-80℃保存。						
一度溶解した場合、冷蔵保存で1ヶ月以内に使用。						

◆10mM SB431542 溶液 /-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)				
SB431542	5mg	S4317(SIGMA)				
DMSO	1.30mL	生化学用				
調整方法						
上記を混合し、50~100 µL ずつ分注し、-20℃保存。一度溶解した場合、冷蔵						
保存で1ヶ月以内に使用。						

◆非働化牛胎児血清 /-20℃保存

試薬名		
FBS		
調整方法		
冷凍保存の FBS を 37℃温浴にて溶解後、	56°C,	30 分間非働化処理を行う。

処理後は 50mL もしくは 15mL チューブに小分けして-20℃で保存。溶解後は 冷蔵保存する。

◆MEF 細胞用培地 100mL 調製の場合/4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)			
DMEM (High glucose)	90 mL	08459-35(Nacalai)			
FBS(非働化済み)	10 mL				
ペニシリンストレプトマイシン溶液 1 mL 26252-94(Nacalai)					
調整方法					
調整後は冷蔵保存し、1ヶ月以内に使用する。					

4. 試験に必要な機器類

- 4-1. 消耗品
 - ・ 6cm セルカルチャーディッシュ イージーグリップ[Falcon Cat.353004]
 - ・ 96 ウェルアッセイブロック[Corning-Coster, #3960]
 - U底プレート(白色)
 - スミロン Prime Surface96U白色プレート[住友ベーク, MS-9096W]
 - ・プレートシール: TopSeal-A Plus [PerkinElmer No. 6050185]
- 4-2. 測定機器

・96 ウェルマルチプレートに対応したルミノメーター (Envision など)

5. 方法

- 5-1. ES 細胞培養
 - 5.1.1 MEF 播種

Tubb3-ES または Reln-ES 細胞の起眠前日までに 6cm dish に Neo 耐性 MEF 細胞を 6×10⁵cell/dish で播種しておく。MEF 播種用にあらかじめゼラチンコートを準備する。 10mL の MEF 用培地に、37℃温浴にて解凍した Neo 耐性 MEF 細胞液 (ラボバンカー液) を添加し、低回転数(5分間,室温)にて細胞を集める。上清を廃棄後、新たな MEF 用 培地 5mL 程度に細胞を分散し、必要な細胞量を準備しておいたゼラチンコート dish に 播種する。播種した MEF 細胞は 1 週間使用できる。

5.1.2 起眠

10mLの未分化維持培養培地に、37℃温浴にて解凍した Tubb3-ES または Reln-ES 細胞 液(ラボバンカー液)を添加し、低回転数(5分間,室温)にて細胞を集める。上清を廃 棄後、新たな未分化維持培養培地 5mL 程度に細胞を分散し、播種しておいた Neo 耐性 MEF 細胞を PBS(-)で洗浄した後、Tubb3-ES または Reln-ES 細胞を播種する。翌日培地交 換する。

5.1.3 継代培養

培地を吸引除去した後、PBS(-)で洗浄する。0.25% Trypsin/1mM EDTA 溶液 1mL を添

加し、全体に行き渡らした後、すぐに除去する。37℃、2分静置。

未分化維持培地 2mL を添加し、1000 µL ピペットマンを用いて細胞を分散した後、遠心 操作により細胞を集める。新たな未分化維持培養培地 2mL 程度に細胞を分散し、 1/3~1/5 程度の細胞を、PBS(-)で洗浄済みの新しい Neo 耐性 MEF 細胞上に播種する。 2~3 日後にコンフルエントとなる。コロニー同士が接触する前が継代のタイミング。基 本的に1ヶ月以内に細胞を交換する。

5-2. アッセイプロトコール(群構成を含む)

スケジュールは以下のとおり。

- Day0-6 に化合物曝露
- Day0 播種·化合物処理

 細胞
 細胞+化合物

5.2.1 被験化合物の調製

被験化合物を PBS(-)または DMSO で溶解し、限界溶解濃度を決定する。被験化合物 が水溶性であれば PBS(-)を溶媒として 100mg/mL より、水溶性でなければ DMSO を溶 媒として 1000mg/mL より徐々に希釈し、完全に溶解する濃度を決定する。溶媒濃度は 終濃度で PBS(-)は 1%、DMSO は 0.1%。

Day6 測定

被験化合物の終濃度における設定最大濃度は1000μg/mLとする。最大決定濃度より、 適宜、希釈して7濃度段階的に希釈する。

5.2.2 Day 0 プレート準備

Prime Surface96U 白色プレートの最も外側の well は培地等の蒸発量が多いことから細 胞培養には使用せず、事前に PBS(-)を 200μL/well 入れておく。(内側の well の培地蒸発 を抑えるため。)

5.2.3 Day 0 細胞播種

1. MEF 除去操作をおこなう。6cm dish のゼラチンコートを準備する。未分化維持した Tubb3-ES または ReIn-ES 細胞を基本操作に従って 5mL の大脳分化培地に分散させ、 準備したゼラチンコート dish に播種する。37℃、30 分静置し、MEF 細胞のみがゼラチンに接着したことを確認したら、底面の MEF 細胞を剥がさないように 1000 µL ピペットマンを用いてゆっくりと培地を回収する。Tubb3-ES または ReIn-ES 細胞は MEF 細胞よりも接着に時間がかかるため、回収した培地中に多く含まれる。この培地をセルストレーナー40µm に通して、細胞塊を除去し single cell に分散する。一部の細胞懸濁液により細胞数を計算後、大脳分化培地にて 6000 cell/ 80µL となるように細胞懸濁液を調整する。

 リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、8 チャンネル自動ピペットを使用して 80μl ず つ横方向 2-10 の 9 列×縦方向 B-G の 6 列に添加する。BG は大脳分化培地のみを添加す る。

- 5.2.4 Day 0 試験化合物の添加
 - 1. 溶解した被験化合物を準備する。
 - Tubb3-ES または Reln-ES 細胞を播種してから2時間以降、下記の記載の方法に従って、Tubb3-ES または Reln-ES 細胞を播種した Prime Surface96U 白色プレートに、被験化合物を含む培地 80µL を添加する。MC および BG は大脳分化培地のみを添加する。
 - 3. 被験化合物数に応じ、96well アッセイブロック(Corning-Coster, #3960)に化合物に 合わせて必要量の980~998 µLの大脳分化培地を予め加えておく。希釈調製した化 合物を96well アッセイブロック A-H 列の各 well に必要量 2~20µL を添加する。この 時、チップの先を培地に浸けて注入する(チップの先を側壁に付けても良い。いず れにせよ、一定の操作を実施する)。一連(例えば、96 ウェル培養プレートの1枚 分)の試料添加が終了したら、8 連電動ピペットで試料添加済み培地の吸引→吐出 の繰り返しにより混合した後、Tubb3-ES または Reln-ES 細胞を播種した Prime Surface96U白色プレートに 80µL/well の割合で添加する。B-G の 6well ずつに同じ試 料を添加する。

プレートデザインは以下の通りとする。

Low

High

	被験化合物1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
В	Р	MC	VC	濃度 1	濃度 2	濃度 3	濃度 4	濃度 5	濃度6	濃度 7	BG	Р
С	Р	\leftarrow	\rightarrow	\leftarrow	Р							
D	Р	\rightarrow	\downarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\downarrow	\rightarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	Р
Е	Р	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	\downarrow	\rightarrow	\rightarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	Р
F	Р	\rightarrow	Р									
G	Р	\downarrow	Р									
Н	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р

MC: Medium control

VC: Vehicle control (DMSO or PBS(-))

BG: Background

P: PBS(-)のみ

4. 37℃CO2インキュベーターで6日目まで培養する。

5.2.5 Day6 発光測定

1. CellTiter-Fluor [™] Cell Viability Assay (Cat No. G6080,G6081,G6082, Promega) Ø Assay

buffer および、Steady-glo Luciferase assay system (Promega, Cat.E2510 等)を水浴にて溶解し、室温にする。

- 2. 培養したプレートから、ゆっくりと 60μL ずつ培地のみを抜き取る。(well の液量を 100μl に調製するため)
- 3. CellTiter-Fluor TM Cell Viability Assay を遮光しながら調製し、1well あたり 10µL ずつ添加する。前項のプレートの培地の入った全 well に 8 チャンネルピペットを使用して添加する。
- 4. 軽くボルテックスをおこない、37℃で1時間静置する。
- 5. プレートリーダーで細胞生存活性を測定する。
- Steady-glo Luciferase assay system を、遮光しながら 1well あたり 100µL ずつ添加する。 前項のプレートの培地の入った全 well に 8 チャンネル自動ピペットを使用して 100µL ずつ添加する。
- 7. 遮光のためにアルミホイルで全体を覆った後、30分ボルテックス。
- 8. プレートシールを貼り、プレートリーダーで Luciferase 活性を測定する。

6. 試験結果を受け入れるための条件(品質基準など)

試験成立基準として、Day6で測定した溶媒対照群の平均値を以下のとおり設定する。

Tubb-ES 細胞

- ・ Cell'Titer-Fluor [™] Cell Viability Assay のカウント>900,000。
- ・Steady-glo Luciferase assay のカウント>40,000

Reln-ES 細胞

- ・CellTiter-Fluor ™ Cell Viability Assay のカウント>900,000。
- Steady-glo Luciferase assay のカウント>15,000

7. 試験結果の判定基準

各被験化合物の結果を下記の式を用いてスコアを算出し、それを逆ロジット変換で 0~1 表記に変換する(probability 計算)。その変換した probability が Cut-off 値以上であれば陽性と判定する。

Tubb3-ES 細胞

 $\begin{aligned} & \text{Score} = 2.353 \times \log(\text{IC}_{50}/\text{ID}_{50}) + 0.822 \times \log(\text{MD}/\text{IC}_{50}) = 1.082 \\ & \text{Cut-off} \text{($1:0.52$)} \end{aligned}$

<u>Reln-ES細胞</u>

Score= $1.665 \times \log(IC_{50}/ID_{50}) + 0.899 \times \log(MD/IC_{50}) - 0.868$ Cut-off (i: 0.55)

- IC₅₀: CellTiter-Fluor ™ Cell Viability Assay により算出した 50% 生存率の濃度
- ID₅₀: Steady-glo Luciferase assay により算出した分化を 50%阻害する濃度
- MD:被験化合物の最大溶解濃度

Test2:

マウスES細胞由来神経細胞を利用した 神経突起伸展アッセイ プロトコール

Ver. 1.00

住友化学株式会社 生物環境科学研究所

平成 28 年 2 月 29 日

99

1. 試験の目的

この試験は、マウス ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、化学物質の神経突起伸展への影響を検出し、発達神経毒性評価に有効な情報を取得することを目的とする。

2. 試験の原理

マウスES細胞由来の神経分散培養標本に化学物質を曝露し、曝露終了時に、ヘキストによる核染色とTubb3 および MAP2 抗体染色を行った後、ハイコンテントアナリシスを用いて、神経突起と生存神経細胞を認識させ、神経突起総量および生存神経細胞数を自動的に定量する。 これら2つのパラメータを用いて、化学物質が有する神経突起伸展の阻害あるいは促進作用を評価する。

3. 試薬・材料

3-1. 細胞

凍結 mES 細胞(KOB1)由来神経細胞(分化誘導 12 日目の神経細胞) 3-2.試薬および調整法

- PBS(-) [Cat No. 10010-023(500mL), Invitrogen]
- ・DMSO 生化学用 (和光純薬、SIGMA 等)
- ・ブロッキング液 10×TBS-TritonX100をdH₂Oで10倍希釈

◆分化神経培養培地(NB 培地)	100mL	調製の場合	∕4℃保管
				· • • • •

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)				
Neurobasal Medium	96 mL	12348-017 (Invitrogen)				
200mM L-グルタミン酸	1 mL	G7513 (Sigma)				
ペニシリンストレプトマイシン溶液	1 mL	26252-94 (Nacalai)				
B-27 supplement without Vitamine A	2 mL	12587-010 (Invitrogen)				
注意点						
調整後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。						
使用時に、終濃度が 10ng/mL BDNF, 10ng/mL NT-3 となるように添加して使用						
する。						

◆50µg/mL BDNF 溶液/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
BDNF	10µg	#020-12913 (Wako)
0.1% BSA	200µL	
調整方法		
上記を混合し、20~50 µL ずつ分注し、-	20℃保存。	一度溶解した場合、冷蔵保
存で1ヶ月以内に使用。		

◆50µg/mL NT-3 溶液/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)		
NT-3	10µg	#450-03 (Pepro Tech)		
0.1% BSA	200µL			
調整方法				
上記を混合し、20~50 µL ずつ分注し、-	20℃保存。	一度溶解した場合、冷蔵保		
存で1ヶ月以内に使用。				

◆10×TBS-TritonX100/室温保存

(250mM Tris-HCl, 1.4M NaCl, pH7.5+1%Triton-X100)

試薬名	必要量				
Tris-HCl	30.3 g				
NaCl	81.8 g				
HCl					
Triton-X100	10 mL				
dH ₂ O					
調整方法					
Tris-HClと NaClを dH2O で溶解させ、HClで pH7.5 に調整する。Triton-X100					
を加えて、dH ₂ O で 1L にメスアップ。					

4. 試験に必要な機器類

4-1. 消耗品

- 96 ウェルアッセイブロック[Corning-Coster, #3960]
- ・ 96 ウエルのポリ-D-リシンコート(BD) [BD, #356461]
- ・ プレートシール: TopSeal-A Plus [PerkinElmer No. 6050185]

4-2. 測定機器

• Array Scan VTI HCS Reader high-content imaging system (ThermoFisher Scientific K.K.)

5. 方法

5-1. mES 細胞由来神経細胞の解凍

15mL 遠沈管に細胞 1mL を入れた後、37℃にあたためた培地を 1mL 入れる。30 秒静置した後、 培地 2mL を入れ、軽くピペッティングする。30 秒静置後、培地 5mL を入れて、800 rpm で 3min 遠心後、上清を捨てる。培地を加えて細胞数をカウントする。

5-2.アッセイプロトコール

スケジュールは以下のとおり。

Day1 測定(24 時間曝露)

5.2.1 被験化合物の調製

被験化合物を PBS(-)または DMSO で溶解し、限界溶解濃度を決定する。被験化合物 が水溶性であれば PBS(-)に、水溶性でなければ DMSO を溶媒として 1000mM より徐々 に希釈し、完全に溶解する濃度で化合物溶液を調製する。溶媒濃度の終濃度は PBS(-) は 2%まで、DMSO 0.5%までを許容可能とする。

被験化合物の終濃度における設定最大濃度は1000µMとする。最大決定濃度より、適 宜、希釈して5濃度段階的に希釈する。

5.2.2 プレート準備

96 ウエルの透明ボトム ポリ-D-リシンコート(BD)の細胞播種ウエルの外側のウエ ルに事前に PBS(-)を 200µL/well 入れておく。(内側の well の培地蒸発を抑えるため。)

5.2.3 細胞播種

5-1 に従って解凍した分化神経細胞を、42.67×10⁻⁴ cells/mL となるように BDNF, NT-3 を添加した NB 培地で懸濁する。リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、8 チャンネル自 動ピペットを使用して、96 ウエルの透明ボトム ポリ-D-リシンコート(BD)に 150µL ず つ、横方向 4-9 の 9 列×縦方向 B-G の 6 列に添加する(6.4×10⁻⁴ cells/ 150µL)。播種後 30 分、室温で静置した後、インキュベータ(37℃, CO₂ 5%)に移す。

5.2.4 試験化合物の添加

- 5. 溶解した被験化合物を準備する。
- 6. 分化神経細胞を播種してから3時間後、細胞を播種したプレートに、被験化合物を 含む培地を 50μL 添加する。
- 7. 被験化合物数に応じ、96well アッセイブロック(Corning-Coster, #3960)に被験化合物の溶媒濃度(DMSO:0.1-0.5%, PBS:0.1-2%)に合わせて460~498 µLのBDNF, NT-3を添加した NB 培地を予め加えておく。希釈調製した化合物(1次希釈液)を96well アッセイブロック A-H列の各 wellに被験化合物に応じて必要量2~20µLを添加する。この時、チップの先を培地に浸けて注入する(チップの先を側壁に付けても良い。いずれにせよ、一定の操作を実施する)。1次希釈液の添加が終了したら、8 連ピペットで混合した後、細胞を播種したプレートに 50µL/well の割合で添加する。B-D あるいは E-G の各 well ずつに同じ試料を添加する(n=3)。

プレートデザインは以下の通りとする。

Low

High

	被験化合物1および2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А			Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р		
В			Р	VC	濃度	濃度 2	濃度 3	濃度 4	濃度 5	Р		
					1							
С			Р	\rightarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	Р		
D			Р	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	Р		
Е			Р	VC	濃度	濃度 2	濃度 3	濃度 4	濃度 5	Р		
					1							
F			Р	\rightarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	\rightarrow	Р		
G			Р	\downarrow	Ļ	Ļ	\downarrow	\downarrow	\downarrow	Р		
Н			Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р		

VC: Vehicle control (DMSO or PBS(-))

P: PBS(-)のみ

8. 37℃CO2インキュベーターで翌日(24時間後)まで培養する。

5.2.5 細胞の固定、免疫染色

- プレートの培地を8連ピペットで、細胞を剥がさないようにゆっくりと全量抜く。
 以降、繰り返し、液交換を行うので、チップの先はウエル底の外周の1か所だけに あたるように位置を決めておく。
- 4%パラホルムアルデヒド溶液を 100μL/well となるように添加し、室温で 15 分、静置する(固定)。
- 3. パラホルムアルデヒド溶液を全量抜き、PBS(-)を 200µL/well で添加する(洗浄)。
- PBS(-)を全量抜き、0.1%Triton を入れたブロッキング液を 100µL/well で添加する。室 温で 30 分、静置する。
- 0.1%Triton を入れたブロッキング液を全量抜き、以下の1次抗体/ブロッキング液を 50µL/well で添加する。蒸発をふせぐために、ビニールテープでプレートの周囲を覆 う。4℃で一晩あるいは室温で2時間、静置する。
 - Anti-Tuj1 antibody (mouse): 1/400 (Sigma, CatNo.T8660)
 - ・Anti-MAP2 antibody (rabbit): 1/400 (ミリポア, CatNo.AB5622)
- 6.1 次抗体液を全量抜き、PBS(-)で2回洗浄する。200μL/well で室温10分を2回。
- 7. 以下の 2 次抗体/ブロッキング液を 50μL/well で添加する。室温遮光で 30 分、静置する。
 - Alexa488 donkey Anti-Mouse IgG: 1/400 (Invitrogen, CatNo.A21202)

- Alexa594 donkey Anti-Rabbit IgG: 1/400 (Invitrogen, CatNo.A21207)
- Hoechst 33342 solution (1mg/mL) 1/1000 (同仁化学, 346-07951)
- 8.2次抗体液を全量抜き、PBS(-)で2回洗浄する。200uL/well で遮光室温10分を2回。
- プレートシールをしてハイコンテントアナリシスで解析あるいはビニールテープで プレートの周囲を覆い、遮光 4℃保存(1週間以内)。

5.2.6 ハイコンテントイアナリシス

染色したプレートを ArrayScan VTI HCS リーダー(Thermo Fisher Scientific K.K.)に取り 込み、励起波長 386, 485, 549 nm (それぞれ Ch1, Ch2, Ch3 で撮影)で、倍率 10 倍の対物レ ンズを用いてウエルの中心位置から 16 視野を自動で画像撮影を行う。

サンプルの画像撮影と同時に、付属の解析アルゴリズム Neuronal Profiling v4.1 の BioApplication を用いて、画像解析による定量化を行った。この一連の実験の流れは、 ハイコンテントアナリシスと呼ばれる。解析では、まず Ch1(核 ヘキスト染色)画像で 認識された核の明るさと大きさを制限することで、生細胞と死細胞を識別する。 Ch2(Tubb3 抗体染色)画像では、バックグラウンドより明るい領域であり、さらに生存し ている核 (Ch1 の情報) が 1 つ以上含まれている領域を細胞体と認識させる。また、神 経突起はなるべく多くを捉えられるように神経突起の平均蛍光量 Neurite Average Intensity による選別を行わず、神経突起の蛍光量に対する Threshold を設定する Neurite Identification Ch2 および、神経突起の太さを定義する Neurite Detect Radius Ch2 の項目な どを中心としたパラメータ設定により、突起の明るさや突起の Gap についても突起の 連続性を考慮した補正を加えることで、最適な神経突起を認識させる。Ch3 では、より 厳密に生存神経細胞のみを識別するために、Ch2 で認識された細胞体のうち、Ch3(MAP2 抗体染色)で認識されていない細胞体を除く処理を行う。すなわち、Ch3 における細胞 体の MAP2 平均蛍光量 Average Intensity Ch3 の項目で、ある一定の明るさ以上の領域を 生存神経細胞と認識するように適切な数値を入れて調整する。

上記のアルゴリズムで自動的に解析された Neurite Total length per well Ch2 (1 ウェル内 における神経突起総量)および Event type 3 Neuron Count (生存神経細胞数、1 細胞内の MAP2 平均蛍光量が一定値以上を示すポジティブ細胞数)をデータとして採用する。

6. 試験結果を受け入れるための条件

試験成立基準として、ハイコンテントイメージングで測定した溶媒対照群の平均値を以下の とおり設定する。

- ・神経突起総量>25,000
- ·生存神経細胞数>2,000

7. 試験結果の判定基準

プレートの横一列のデータ毎に神経突起総量および生存神経細胞数が溶媒対照と比較して 75%に阻害される IC₇₅ 値を算出する。そして、神経突起総量と生存神経細胞数の IC₇₅ 値を t 検 定で比較し(n=3)、有意な差があれば神経突起伸展の阻害ありと判定する。また、細胞毒性が認められず IC₇₅ 値を算出できない場合には、神経突起総量が対照群と比較して統計学的有意 (Dunnett検定, p<0.05)に減少あるいは増加していれば神経突起伸展の阻害あるいは促進影響あり と判定する。

Test3:

MAP2-ES および GFAP- ES 細胞を利用した 簡便な神経毒性アッセイプロトコール

Ver. 1.00

住友化学株式会社 生物環境科学研究所

平成 28 年 2 月 29 日

1. 試験の目的

この試験は、マウス ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、神経毒性物質のポテンシャルを検出し、化学物質の全身毒性評価の有効な情報を取得することを目的とする。

2. 試験の原理

神経細胞の細胞骨格タンパク MAP-2(Microtubule-associated protein 2)とアストロサイトの中間 系フィラメント GFAP(Glial fibrillary acidic protein)の発現変動をルシフェラーゼ活性でモニターで きる組み換えマウス ES 細胞株(MAP2-ES, GFAP-ES)から分化誘導した神経細胞に化学物質を曝 露し、曝露終了時に細胞毒性アッセイと発光レポーターのルシフェラーゼ活性を測定すること により、化学物質が有する神経細胞変性など神経細胞への毒性作用を評価する。

3. 試薬・材料

3-1. 細胞

凍結 mES 細胞(KOB1)由来神経細胞(分化誘導 19 日目の神経細胞) 3-2.試薬および調整法

- PBS(-) [Cat No. 10010-023(500mL), Invitrogen]
- ・DMSO 生化学用 (和光純薬、SIGMA 等)
- CellTiter-Fluor TM Cell Viability Assay (Cat No. G6080, G6081, G6082, Promega)
- ・Triple Luc 試薬(Toyobo, #MRA-301)

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)		
Neurobasal Medium	96 mL	12348-017 (Invitrogen)		
200mM L-グルタミン酸	1 mL	G7513 (Sigma)		
ペニシリンストレプトマイシン溶液	1 mL	26252-94 (Nacalai)		
B-27 supplement without Vitamine A	2 mL	12587-010 (Invitrogen)		
注意点				
調整後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。				
使用時に、終濃度が 10ng/mL BDNF, 10ng/mL NT-3, 50ng/mL BMP-4, 10^3 unit				
LIF となるように各 Stock 溶液の 1/1000 量を添加し使用する。				

◆分化神経培養培地(NB 培地) 100mL 調製の場合/4℃保管

◆50µg/mL BDNF 溶液/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)		
BDNF	10µg	#020-12913 (Wako)		
0.1% BSA	200µL			
調整方法				
上記を混合し、20~50 µL ずつ分注し、-	20℃保存。	一度溶解した場合、冷蔵保		
存で1ヶ月以内に使用。				

◆50µg/mL NT-3 溶液/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)			
NT-3	10µg	#450-03 (Pepro Tech)			
0.1% BSA	200µL				
調整方法					
上記を混合し、20~50 µL ずつ分注し、-	-20℃保存。	一度溶解した場合、冷蔵保			
存で1ヶ月以内に使用。					

◆50µg/mL BMP-4 溶液/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)			
BMP-4	50µg	#314BP-050 (R and D)			
0.1% BSA	1 mL				
調整方法					
上記を混合し、20~50 µL ずつ分注し、-	20℃保存。	一度溶解した場合、冷蔵保			
存で1ヶ月以内に使用。					

◆LIF 溶液 (10⁶unit)/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)		
ESGRO (107unit) (=LIF)	50 µL	ESG1107(Millipore)		
NB 培地	450µL			
調整方法				
上記を混合し、冷蔵保存で1ヶ月以内に使用。				

4. 試験に必要な機器類

4-1. 消耗品

- ・96 ウェルアッセイブロック (Corning-Coster, #3960)
- ・白色透明ボトム ポリ-D-リシンコート 96well (BD, CatNo.356651)
- ・プレートシール: TopSeal-A Plus (PerkinElmer No. 6050185)
4-2. 測定機器

・96 ウェルマルチプレートに対応したルミノメーター (Phelios, Envision など)

5. 方法

5-1. mES 細胞由来神経細胞の解凍および播種

15mL 遠沈管に細胞 1mL を入れた後、37℃にあたためた培地を 1mL 入れる。30 秒静置した後、 培地 2mL を入れ、軽くピペッティングする。30 秒静置後、培地 5mL を入れて、800 rpm で 3min 遠心後、上清を捨てる。培地を加えて細胞数をカウントする。

5-2.アッセイプロトコール

スケジュールは以下のとおり。

・細胞播種後 Day7-9 に化合物曝露

Day0 播種	Day7 化合物処理Day9 測定	
		<u> </u>
		-/

5.2.1 試験化合物の調製

被験化合物を PBS(-)または DMSO で溶解し、限界溶解濃度を決定する。被験化合物が 水溶性であれば PBS(-)に、水溶性でなければ DMSO を溶媒として 1000mM より徐々に 希釈し、完全に溶解する濃度で化合物溶液を調製する。溶媒濃度の終濃度は PBS(-)は 2% まで、DMSO 0.5%までを許容可能とする。

被験化合物の終濃度における設定最大濃度は 1000µM とする。最大決定濃度より、適 宜、希釈して 5 濃度段階的に希釈する。

5.2.2 プレート準備

96well 白色透明ボトム ポリ-D-リシンコートの細胞播種ウエルの外側のウエルに事前に PBS(-)を 200µl/well 入れておく。(内側の well の培地蒸発を抑えるため。)

5.2.3 細胞播種および培養維持

5-1 に従って解凍した分化神経細胞を、42.67×10⁻⁴ cells/mL となるように BDNF, NT-3, BMP-4, LIF を添加した NB 培地で懸濁する。リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、8 チャンネル自動ピペットを使用して、96 ウエルの透明ボトム ポリ-D-リシンコート (BD)に150µLずつ、横方向4-9の9列×縦方向B-Gの6列に添加する(6.4×10⁻⁴ cells/150µL)。 播種後 30 分、室温で静置した後、インキュベータ(37℃, CO₂ 5%)に移す。

播種後5日に BDNF, NT-3 を添加した NB 培地で半量交換する。

5.2.4 試験化合物の添加

9. 溶解した被験化合物を準備する。

10. 分化神経細胞の播種後7日目に、被験化合物を含む培地を50µl/well で添加する(詳細は3.に記載)。

11. 被験化合物数に応じ、96well アッセイブロック(Corning-Coster, #3960)に被験化合物の溶媒濃度(DMSO:0.1-0.5%, PBS:0.1-2%)に合わせて460~498 µLのBDNF, NT-3 を添加した NB 培地を予め加えておく。希釈調製した化合物(1 次希釈液)を96well アッセイブロック A-H列の各 wellに被験化合物に応じて必要量2~20µLを添加する。この時、チップの先を培地に浸けて注入する(チップの先を側壁に付けても良い。いずれにせよ、一定の操作を実施する)。1 次希釈液の添加が終了したら、8 連ピペットで混合した後、細胞を播種したプレートに 50µL/well の割合で添加する。B-D あるいは E-G の各 well ずつに同じ試料を添加する(n=3)。

プレートデザインは以下の通りとする。

Low

High

	被験化合物1および2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А			Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р		
В			Р	VC	濃度	濃度 2	濃度 3	濃度 4	濃度 5	Р		
					1							
С			Р	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	Р		
D			Р	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	Р		
Е			Р	VC	濃度	濃度 2	濃度 3	濃度 4	濃度 5	Р		
					1							
F			Р	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\rightarrow	Р		
G			Р	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	Р		
Н			Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р		

VC: Vehicle control (DMSO or PBS(-))

P: PBS(-)のみ

12.37°CCO2インキュベーターで2日間(48時間)培養する。

5.2.5 発光測定

- 9. CellTiter-Fluor [™] Cell Viability Assay (Cat No. G6080,G6081,G6082, Promega) の Assay buffer および Triple Luc 試薬(Toyobo)を水浴にて溶解し、室温にする。
- 10. 培養したプレートから、ゆっくりと 100μL ずつ培地のみを抜き取る。(well の液量を 100μL に調製するため)
- 11. CellTiter-Fluor TM Cell Viability Assay を遮光しながら調製し、1well あたり 10µL ずつ添加する。前項のプレートの培地の入った全 well に 8 チャンネルピペットを使用して添加する。
- 12. 軽くボルテックスをおこない、37℃で1時間静置する。

- 13. プレートリーダー(Envision)で細胞生存活性を測定する。
- 14. Triple Luc 試薬を、遮光しながら 1well あたり 100μL ずつ添加する。前項のプレートの培地の入った全wellに8チャンネル自動ピペットを使用して100μL ずつ添加する。
- 15. 遮光のためにアルミホイルで全体を覆った後、5分ボルテックス。
- 16. プレートシールを貼り、ルミノメーター(Pherios)で SLG 活性を測定する。

6. 試験結果を受け入れるための条件

試験成立基準として、測定した溶媒対照群の平均値を以下のとおり設定する。

MAP2-ES 細胞

- ・CellTiter-Fluor TM Cell Viability Assay のカウント>2,500,000
- Triple Luc SLG のカウント>20,000

GFAP-ES 細胞

- ・CellTiter-Fluor TM Cell Viability Assay のカウント>2,500,000
- Triple Luc SLG のカウント>5,000

7. 試験結果の判定基準

以下の①②いずれかの場合は神経毒性有りと判定する。

- MAP2-ES 細胞の細胞生存率が 50%となる Cytotoxicity_IC₅₀ 値と SLG 活性が 50%減少する SLG_IC₅₀ 値の割合(Cytotoxicity_IC₅₀/ SLG_IC₅₀)が 1.75 倍以上の場合
- ② MAP2-ES 細胞で、試験化合物群の SLG 活性が溶媒対照に比べて 75%以下に低下し、かつ、 GFAP-ES 細胞の細胞あたりの SLG 活性(対照群比の SLG 活性/細胞生存率)が 1.25 倍以 上の場合

(ただし、細胞生存率が 30%以下の場合はみかけ上の SLG 活性が著しく増加する場合が あるので除外する。) (d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発

目的

本事業では、多色多様発光レポーター技術と染色体工学技術を融合し、28日間反復投与毒性試 験において毒性が発現する可能性の高い肝臓、腎臓、神経の各臓器における毒性発現を簡便かつ高 感度で評価可能な in vitro アッセイ系構築に向け、研究開発戦略の基盤技術となる発光技術等の開発 を行う。具体的には、複数種の発光遺伝子等を導入した人工染色体ベクターの性能、当該ベクター 及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光検出等について検証し、最適な測定条件について各試 験法のプロトコールに反映する。

中間目標

人工染色体ベクターの性能及び発光検出の検証を行い、試験系の設計試案を作成する。

最終目標

人工染色体ベクターの性能を検証するとともに、当該ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓 器等の発光検出を検証し、試験系の測定条件を最適化する。最適な測定条件について各試験法のプ ロトコール案に反映する。

目標目標			成果		
中間時点	(1) 人工染色体ベクター	(1)	1~2 種の発光レポーターをマウス人		
	の性能及び発光検出		工染色体ベクターに挿入した安定細		
	の検証		胞株を用い、従来法で作製した安定細		
			胞株と比較して発光強度および継代	法式	
			安定性が高いことを実証。	连风	
	(2) 試験系の設計試案を	(2)	上記の結果より、各試験系において		
	作成		96 ウェルプレートベースの in vitro 毒		
			性試験系を設計。		
最終時点	(3) 人工染色体ベクターの	(3)	3 種の発光レポーターをマウス人工		
	性能検証		染色体ベクターに導入した安定細胞		
			株を樹立し、従来法と比べて樹立期間		
			を 1/6 程度に短縮可能であること、ま		
			た長期間継代を重ねても、細胞の発光		
			強度と人工染色体ベクターが極めて	运式	
			長期間安定に維持されることを実証。	连风	
	(4) 当該ベクター及び遺伝	(4)	発光レポーター導入株化培養細胞或		
	子改変マウスの個体・		は遺伝子改変マウスの臓器由来細胞		
	臓器等の発光検出の検		等を用い、発光強度の検証・測定方法		
	証および試験系の測定		の最適化を行い、各試験法のプロトコ		
	条件の最適化		ール案に反映した。		

<目標、成果、達成度>

(5) 国際	祭標準化に向けた取 ((5)	経済産業省平成 28 年度国際標準化加	
り糸	且み		速事業(発光株化培養細胞の保存管理	
			法に関する国際標準化)で実施中。	

研究開発の内容

■ マルチインテグレース搭載マウス人工染色体(MI-MAC)ベクターの性能検証

本プロジェクトでは、MI-MAC ベクターに分泌型発光レポーターおよび多色発光レポーターを搭載し、毒性マーカー、臓器マーカーおよび内部標準用遺伝子の各転写活性を各種発光レポーターで 計測可能な、肝臓および腎臓由来細胞の作製と、これに特化したハイスループット(HTP)試験シ ステムの構築を試みている。そこで最初に、MI-MAC ベクターのレポーターベクターとしての基本 性能を検証するため、各種プロモーターの制御下で発光レポーターが発現する種々の MI-MAC 導入 A9 発光細胞を作製し、各種の発光性能について検討した。

 従来法(ランダムインテグレーション法)と MI-MAC ベクターへの導入により樹立した安定細 胞株の発光特性の比較

人工染色体ベクターを使用する利点の一つとして、導入したい遺伝子を標的部位に1コピーのみ 挿入できる点が挙げられる。一方、哺乳類細胞における従来の安定細胞株作製では、ES 細胞を用い たターゲティングやzinc finger nuclease、TALEN 等の手法を適用しない限り、導入遺伝子の挿入部 位とコピー数の制御は不可能であり、従来法(ランダムインテグレーション法)で樹立した細胞で は、ゲノムに挿入された位置やコピー数の違いにより、クローン間の発現レベルの差は著しい。そ こで MI-MAC ベクターの基本性能の検証として、従来法であるランダムインテグレーション法、お よび MI-MAC ベクターへの挿入により A9 安定細胞株を樹立した場合の各々のクローン間の発光強 度、遺伝子発現プロファイルについて検証した。

安定細胞株の樹立には、時計遺伝子 mPer2 のプロモーターに短寿命型緑色発光レポーター (ELuc::PEST)を連結したカセットを用いた。ランダムインテグレーション法による安定細胞株の樹 立では、mPer2-ELuc::PEST を配したレポーターベクター、あるいは mPer2-ELuc-PEST の上流・下流 に HS4 インスレーターを配したレポーターベクターを A9 細胞にリポフェクションにより導入し、 ネオマイシンにより選択した。一方、MI-MAC への挿入(φC31 サイトへの挿入)による安定細胞株 の樹立では、mPer2-ELuc::PEST の上流・下流に HS4 インスレーターを配したレポーターベクターと φC31 インテグレース発現ベクターを A9 細胞にコトランスフェクションし、ネオマイシンにより選 択した。各々の方法により得たシングルコロニーを単離し、各6~8クローンを樹立した。ランダ ムインテグレーション法による導入遺伝子のゲノムへの挿入、および MI-MAC ベクターへの導入遺 伝子の挿入は、fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析により確認した (図D-1)。

発光測定は以下の手順により実施した。各細胞を 35mm 培養ディッシュに播種し、1 晩培養しコンフルエントに到達した段階で 100 nM デキサメタゾンで 2 時間処理し、発光基質である D-luciferin (100 μM)を含む DMEM 培地に交換した。発光は、ディッシュ型リアルタイム発光測定装置

ランダムインテグレーション

MI-MACベクター



<mark>図 D-1</mark>. FISH 解析による導入遺伝子の確認

(Kronos、ATTO 社製)を用い、1分間露光、10分間隔で7日間リアルタイム測定した。

その結果、ランダムインテグレーション法により樹立した細胞にでは、HS4 インスレーターを配 していない mPer2-ELuc::PEST を導入した場合、各クローンの発光強度および発光リズムのバラツキ は非常に大きく(図D-2、上図)、インスレーターを配した場合、それらのバラツキは若干減少した (図D-2、中図)。一方、MI-MAC ベクターの φC31 部位にインスレーターを配した mPer2-ELuc::PEST を挿入した場合、ランダムインテグレーション法により樹立した細胞と比較し、発光強度と発光リ ズムのバラツキは有意に小さいことが明らかとなった(図D-2、下図)。

次に各細胞の発光強度を定量化したところ、興味深いことに、MI-MAC への挿入により樹立した 細胞の発光強度は、ランダムインテグレーション法で樹立した細胞の強度と比較し、有意に高いこ とが明らかとなった(図D-3、左図)。また各々の細胞の発光リズムの周期を解析したところ、ラン ダムインテグレーション法により樹立した細胞では、インスレーターを配置していないレポーター ベクターを導入した細胞の周期が25~27時間とバラツキが非常に大きく、インスレーターを配した 場合、26~27時間とバラツキが減少する傾向が認められた。一方、MI-MAC に導入した細胞では、 発光リズムの周期のバラツキはランダムインテグレーション法で樹立した細胞の周期と比較し有意 に小さく、また線維芽細胞の Per2 遺伝子の周期が約25時間であるという過去の報告とも一致する 結果が得られた(図D-3、右図)。

以上の結果より、MI-MAC ベクターへの発光レポーターの挿入により樹立した安定細胞株は、ランダムインテグレーション法で樹立した細胞よりも高い発光強度を有すること、更に内因性の遺伝 子発現をより正確に検出できることが明らかとなった。



図 D-2. ランダムインテグレーション法および MI-MAC 導入により樹立した A9 安定細胞株の 各クローンの発光リズム



図 D-3. ランダムインテグレーション法および MI-MAC 導入により樹立した A9 安定細胞株の 各クローンの発光強度と発光リズムの解析結果

② MI-MAC 導入安定細胞株の均一性の検証

上記の通り、MI-MAC ベクターに発光レポーターを挿入して樹立した細胞は、ランダムインテグ レーション法により樹立した細胞と比較し、より均一な発光特性を示すことが明らかとなった。そ こで、この均一性について更に詳細に検討するため、基底発現レベルが安定している恒常的プロモ ーターCAG の制御下で緑色発光レポーターが発現する MI-MAC 導入 A9 細胞を樹立し、クローン間 の発光強度を比較した。CAG プロモーター下流に緑色発光レポーター (SLG)を配したレポーター ベクターを、φC31 リコンビネースの発現ベクターとともに MI-MAC ベクター導入 A9 細胞にコトラ ンスフェクションし、ネオマイシンで選択した。得られたネオマイシン耐性細胞を全て混合して回 収 (バルク)した後、再度、希釈して播種し、1 細胞由来のコロニーを単離し9クローンの安定細 胞株を樹立した。樹立細胞の発光強度の均一性を検討するため、バルクおよび9クローンの細胞を、 96 ウェルプレートに播種 (n=6)し、1日培養後 Tripluc Assay Reagent (東洋紡社製)で処理し、 マルチプレート対応ルミノメーター(Phelios、ATTO 社製)を用い5秒間測定した。その結果、 D-4 に示すように、9つのクローン間での発光強度のバラツキは12%であり、また各々の発光強度 はバルクで樹立した発光強度と比較し有意な差は認められなかった。以上の結果より、MI-MAC ベ クターへの発光レポーターの挿入により樹立した安定細胞株は、大部分が均一な発光強度を示すこ とが明らかとなった。また、非常に高い効率で発光レポーターが MI-MAC ベクター上の標的部位に 1 コピー挿入されることも示唆された。

上記(a)の結果もあわせると、MI-MAC ベクターへのレポーターの挿入により安定細胞株を樹立 する場合、少なくとも今回樹立した細胞のように、小さなサイズのプロモーター(CAG プロモータ ーは約1.2 kbp)と発光レポーターを導入する場合には、ランダムインテグレーション法で必須のス テップであるシングルコロニーの単離は必要とせずバルクで使用できること、さらにシングルコロ ニー単離の必要が無いことから、樹立に要する期間を大幅に短縮できることが示唆された。また、 MI-MAC ベクターの利用により極めて効率的に、発光強度が高く且つ正確な遺伝子発現を評価可能 な細胞を樹立できることも示唆された。



図 D-4. MI-MAC ベクターに CAG-SLG を挿入して樹立した A9 安定細胞株の各クローンの 発光強度

③ MI-MAC 導入 A9 発光細胞を用いた長期継代安定性の検証

人工染色体ベクターをレポーターベクターとして用いる利点として、人工染色体ベクターが細胞 内で安定に維持されること、また MI-MAC の導入遺伝子挿入部位にはインスレーターが配置されて いることから、導入遺伝子の経時的なサイレンシングが回避されるという点が挙げられる。このた め、本プロジェクトにおいて実施する培養細胞を用いた in vitro 毒性評価試験において、従来問題と なっていた長期間の継代培養中のサイレンシング等による導入遺伝子の発現抑制(本プロジェクト においては発光レポーターの発光消失)が回避できることが期待される。そこで、時計遺伝子プロ モーター制御下、あるいは炎症や免疫反応等の重要な転写因子である nuclear factor-kappa B (NFκB) に応答して発光する MI-MAC 導入 A9 細胞を用い、長期継代培養における発光強度や反応応答性の 安定性について検証した。

最初に、ランダムインテグレーションで樹立した安定細胞株と、MI-MAC 導入細胞の長期の継代 安定性について比較するため、樹立した時計遺伝子 mPer2 プロモーター制御下で短寿命型緑色発光 レポーター(ELuc::PEST)が発現する A9 細胞を用い検討した。発光測定は前述の方法により行った。 その結果、HS4 インスレーターをプロモーターとレポーターの上流・下流に配したカセットをゲノ ムにランダム導入した 2 種のラインにおいては、継代培養を重ねるごとに発光強度が著しく減少す ることが明らかとなった(図D-5、上図)。一方、MI-MAC の φC31 部位に上記カセットを挿入した A9 細胞では、passage20 においても有意な発光強度の減少は認めらなかった(図D-5、下図)。



<mark>図 D-5</mark>. ランダムインテグレーション法および MI-MAC を用い樹立した A9 安定細胞株の長期継代 培養中の発光強度の変化

次に、本プロジェクトの最終アッセイ系を想定したモデルケースとして、NFκBに応答して発光す る MI-MAC 導入 A9 細胞を用い、長期継代培養における tumor necrosis factora(TNFα)に対する応 答性の変化について検討した。発光細胞は、NFkB の応答配列の下流に HSV TK プロモーター、さら にその下流に短寿命型緑色発光レポーター(SLG::PEST)を配したレポーターベクターを、φC31 イ ンテグレースの発現ベクターと MI-MAC 導入 A9 細胞コトランスフェクションし、ネオマイシンに よる選択で樹立した。細胞を 96 ウェルプレートに播種し、一晩培養後、0、1、10 ng/ml の TNFα を含む DMEM 培地に交換し、さらに 6 時間培養した後、Tripluc Assay Reagent により細胞を破砕し、 発光を 5 秒間ルミノメーター(Phelios)で測定した。その結果、TNFα を処理しないコントロール においては、50 回の継代培養を繰り返しても、発光強度の有意な低下は認められず、前述と同様、 MI-MAC に挿入した発光レポーターの発現は、極めて安定に保たれることが明らかとなった(図D-6)。 一方、TNFα 処理群においては、1 ng/ml、10 ng/ml ともに 32 回までの継代中に、TNFα に対する反 応応答性が徐々に高くなり、その後低下した。長期継代培養中の反応応答性の増加の原因について は詳細は不明であるが、細胞老化による炎症応答性の増加、或いは継代培養による NFkB 応答配列 への NFkB 複合体の結合の増加が報告されていることから、これらの現象を反映した結果であるこ とが示唆された。他方この結果は、人工染色体にレポーターベクターを導入した場合、長期継代培 養による僅かな細胞状態の変化をモニターしていることも示唆されることから、化学物質毒性評価 という観点では、継代培養による細胞応答の変化を補正する方法を提案できる可能性も示唆された。



<mark>図 D-6</mark>. NFκB 応答配列を挿入した MI-MAC 導入 A9 安定細胞株の長期継代培養中の発光強度 および TNFα に対する反応応答性の変化

■ MI-MAC 導入 A9 発光細胞を用いた多色発光レポーターの発光強度および発光強度比の検証

多色発光測定を高精度で行うための条件として、各々の発光レポーターの発光強度が高いこと、 また各々の発光強度比ができるだけ近いことが挙げられる。そのため、各発光レポーターの強度お よび強度比の正確な把握は、当該プロジェクトで実施するアッセイ系を設計するうえでの基本情報 として極めて重要となる。これまでこれらの発光特性について、発光レポーターを一過的に発現さ せるトランジェントトランスフェクションや、ランダムインテグレーション法により樹立した安定 細胞株、或いは精製ルシフェラーゼタンパク質を用い検証してきたものの、特に発光強度比につい ては安定した結果が得られなかった。そこで、前述のとおり導入遺伝子の細胞内でのコピー数と挿 入部位が保障(均一である)されている MI-MAC 導入安定細胞株を用い、緑・橙・赤色発光レポー ターの発光強度およびそれらの強度比を検証した。

検証には、CAG プロモーターの制御下で緑色(SLG)、橙色(SLO)あるいは赤色(SLR)発光レポ ーターが発現する 3 種の MI-MAC 導入 A9 細胞(φC31 サイトに挿入)を用いた。発光測定は、各細

胞を 96 ウェルマルチプレートに播種後、絶対値校正(装置のカウント値を絶対値であるフォトン数 に換算できるよう校正)したルミノメーター(Phelios、アトー社製)を用いた。最初に、発光基質 である D-luciferin を培地に添加し、非破砕的に発光を測定したとこと、SLG は 6.2 x 10⁵ photons/sec、 SLOは1.5 x 10⁵ photons/sec、SLRは3.5 x 10⁵ photons/secの発光強度を示し、各々の比は、SLG: SLO: SLR=100:24:57 と算出された(図 D-7、左図)。続いて、本研究における最終アッセイ系を想定 し、各細胞を発光試薬 Tripluc Assay Reagent (東洋紡社製) で細胞を破砕し発光を測定したところ、 SLG は 9.4 x 10^7 photons/sec、SLO は 2.6 x 10^7 photons/sec、SLR は 2.6 x 10^7 photons/sec であり、 上記の非破砕計測よりも2桁高い発光強度を示し、また発光強度比は、SLG: SLO: SLR=100:28: 28 であった(図 D-7、中図)。この際に実際に測定結果としてルミノメーターに表示されるカウント 値は、SLG は 6.2 x 10⁴ count/sec、SLO は 1.4 x 10⁴ count/sec、SLR は 7.0 x 10³ count/sec であり、強 度比は SLG: SLO: SLR=100:22:11 と算出され(図 D-7、右図)、SLG と SLR の発光強度比が約 10 倍異なることが明らかとなった。過去の実験結果から、本実験で算出された発光強度比でも定量 的に2色ないし3色の発光を測定できることは確認されているが、使用するプロモーターによって は(例えば SLR を非常に弱いプロモーターで発現させる場合等)、各発光強度の差がさらに大きくな ることになり、定量性の低い測定となることが懸念される。そのため本プロジェクトにおいては、 上記の発光特性を踏まえ、使用するマーカー遺伝子のプロモーター活性と発光レポーターの組合せ を考慮することが望ましい。一方、SLR の改良により発光強度を増加させることができれば、測定 の精度低下を招くリスクを低下させられることから、現状よりも数倍以上の高い発光強度の SLR を 作出することとした。





■ 発光レポーター遺伝子の改良

① 赤色発光レポーター遺伝子の改良

本プロジェクトで想定している多色発光レポーターを用いたエンドポイントアッセイをより高い 精度で実施するには、赤色発光レポーター(SLR)の発光強度が若干不十分であり、細胞内の発現量 を更に向上させる必要性が示唆された。これまで我々のグループでは、SLR の cDNA 配列を改変し た十種類以上の改良型 SLR を保有している。そこで、現在使用している SLR よりも、細胞に発現さ せた際に数倍以上高い発光強度を示す改良型 SLR を選定するため、代表的な 3 種類の改良型 SLR を 抽出し、これらを発現する MI-MAC 導入 A9 細胞を樹立した。実験に供した改良型 SLR は以下の通 りである。

・SLR2: アミノ酸配列を変えないように、SLRの転写因子結合配列を大幅に削減した第二世代の SLR

- ・SLR (I212L/S463R): SLR の 212Ile を Lue、463Ser を Arg に置換した部位特異的変異体
- ・SLR (I212L/N351K): SLR の 212Ile を Lue、351Asn を Lys に置換した部位特異的変異体

安定細胞株は、時計遺伝子 mPer2 のプロモーターと各種の改良型 SLR を連結したカセットを、 MI-MAC 導入 A9 細胞の φC31 部位に挿入し、ネオマイシンの選択により樹立した。これらの細胞を エンドポイントアッセイおよびリアルタイム発光測定に供した結果、SLR2 の発光強度はいずれの測 定でも SLR と比較して顕著な差がないこと、また I212L/S463R および I212L/N351K は2~3 倍高い 発光強度を示すことが明らかとなり、特に I212L/N351K の変異が発光強度の増強に有用であること が確認された(図 D-8)。現在、SLR2 に I212L/N351K 変異を導入した SLR3 を作製し、発光強度を確 認した後、これを本プロジェクトで用いる赤色発光レポーターに変更する予定である。





② 発光レポーターの不安定化による反応応答性および発光強度の変化

発光レポーターを導入した細胞に化学物質を暴露し、c-fos に代表される immediate early gene 等の急激な遺伝子発現の変化を測定する場合、細胞内での安定性の高い発光レポーターを用いると暴露前に細胞内で合成された発光レポーターが残存しているため、化学物質に対する応答を高感度に 検出できない場合がある。このため、見かけ上の反応応答性は低下し、アッセイ系の精度の低下を 招く可能性がある。この問題を克服するため、発光レポーターの細胞内安定性を低くする手法が用 いられている。一般的には、発光レポーターにオルニチンデカルボキシラーゼの PEST 配列を融合 する方法が用いられており、我々の発光レポーターにも以前より適用している。また最近、我々は PEST よりも更に発光レポーターの細胞内安定性を低下させるカルパインホモログ(CAPN3)の部分 配列(CAPN3-C9)を見出している(表 D-1)。

<mark>表 D-1</mark>. 各短寿命化シグナルを融合させた場合の ELuc の半減期

	t _{1/2} (hr)
ELuc	9.8
ELuc-PEST	2.8
ELuc-CAPN3	1.0

PEST: ornithine decarboxylase CAPN3: calpain3 homologue

ー方で、発光レポーターの細胞内安定性を低下させると、検出される発光強度も低下し、アッセ イ系の精度低下の原因となるため、実際に使用するアッセイ系では、発光レポーターの安定性と発 光強度のバランスをとることが重要である。前身の NEDO プロジェクトにおいて、PEST と CAPN3-C9 による発光レポーターの不安定化について、マウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いた一過的発現実験に より詳細に解析してきたが、人工染色体ベクターへこれらの不安定化させた発光レポーターを搭載 した際の発光強度や反応応答性に対する効果は不明である。そこで、TNFα に対する NFκB の応答反 応をモデルとし、PEST および CAPN3-C9 の効果について解析した。

発光細胞は、NFkB 応答配列の下流に HSV-TK プロモーターを配し、さらにその下流に PEST また は CAPN3-C9 を融合させた緑色発光レポーター(ELuc)を配したレポーターベクターを、MI-human artificial chromosome (HAC) 導入 A9 細胞に φC31 発現ベクターとコトランスフェクションし、ネオ マイシンの選抜により樹立した。導入遺伝子の MI-HAC への挿入は FISH 解析により確認した(図 D-9)。各細胞を 35mm ディッシュに播種し一晩培養後、0、10 ng/ml の TNFα で 15 分間処理し、 D-luciferin を含む DMEM 培地に交換した。発光は、ディッシュ型ルミノメーター (Kronos)を用い、 1 分間露光、10 分間隔で連続測定した。その結果、図 D-9 に示すように、TNFα による NFκB の転 写活性化は、不安定化させていないレポーターではピークに達するまでの時間が最も遅く、また 5 倍程度の活性化であった。一方、PEST を融合させたレポーターでは、ピーク時間は約6時間で転写 活性化は 10 倍であり、CAPN3-C9 ではピーク時間は更に早い 3 時間で、転写活性化は最も高い約 15 倍であった。この結果より、見かけ上の反応応答性は、最も細胞内の不安定性を高めた CAPN3-C9 を融合させたレポーターで高いことが明らかとなったが、この際の発光強度は不安定化させていな いレポーターの 0.5%まで低下していた。一方で PEST を融合させた場合の発光強度は 48%に留まっ ていることから、人工染色体ベクターを用いた一過性の発現応答を検出するレポーターアッセイで は、見かけ上の反応応答性の検出に優れ、且つ発光強度の低下も少ない PEST を融合させた発光レポ ーターを用いることが適切であることが示唆された。



図 D-9. 異なる細胞内安定性を示す発光レポーターを用いた場合の TNFα に対する反応応答性 および発光強度の比較

■ MAC ベクターのマルチインテグレース部位の検証

ルシフェラーゼ等の外来遺伝子を導入する MAC 上の 3 種類の導入サイトへ各々レポーターベクタ ーを挿入し、いずれのサイトに導入しても同様に細胞応答がモニターできるかを検証した。

NF-кB 応答配列(5'-CGGAAAGTCCCA-3'の6回繰り返し配列)の下流に HSV-TK(以

下 TK) プロモーター、さらにその下流に短寿命型緑色発光レポーターSLG::PEST を配したレポータ ーカセット(NFκB-TK-SLG::PEST)を、MI-MAC ベクターの φC31 attP 部位、R4 attP 部位、Bxb1 attP 部位に各々挿入した A9 安定細部株をバルクで樹立した。続いて各細胞を 96 ウェルプレートに播種 し、各濃度の TNFα を処理した際の発光を測定した。その結果、図D-10 に示すように、いずれの部 位にレポーターベクターを導入した細胞においても、全く同様の TNFα 濃度に依存した活性化が認 められた。以上の結果より、少なくとも本実験で検証した φC31 attP 部位、R4 attP 部位、Bxb1 attP 部位のいずれにレポーターを導入しても同様のアッセイが可能であり、細胞応答性等は挿入部位に 依存しないことが確認された。



TNFα concentration (log ng/ml)

図 D-10. MI-MAC ベクター上の 3 種類の導入部位にレポーターベクターを挿入し樹立した A9 安定細胞株の TNFα による濃度依存的活性化

3 種類の発光レポーター導入安定細胞株の樹立とそれらを用いた人工染色体ベクターの性能 検証

① 炎症シグナル可視化用3色発光細胞の樹立と均一性の検証

本プロジェクトでは、MI-MAC ベクターに多色発光ルシフェラーゼ或いは分泌型発光ルシフェラー ゼが導入された各種毒性評価用細胞の構築、およびこれらを用いた HTP アッセイシステムの構築を 目指している。そこで、3種の多色ルシフェラーゼ(緑色、橙および赤色ルシフェラーゼ)を MI-MAC ベクター上に導入した3色に発光する A9 安定細胞株を樹立し、細胞作製の効率、細胞応答性、長期 安定性について検証した。

3 色発光細胞株の作製に当たり、炎症シグナルを対象とし、その応答を可視化する安定細胞株の 樹立を試みた。代表的な炎症シグナルである nuclear factor-кB(NF-кB)経路において、IkBα は細胞 質内で p50 と RelA で構成される NF-кB に結合し、非ストレス下で NF-кB を安定化させているが、 代表的な炎症性サイトカインである TNFα 等の刺激により IkBα は速やかにリン酸化され、プロテア ソーム系を介して分解される。IkBα と解離した NF-кB はその後核内に移行し、NF-кB 応答配列を有 する標的遺伝子の転写を活性化させることが知られている(図 D-11)。本実験では、橙色ルシフェ ラーゼ SLO と IkBα を融合させることにより、細胞内の IkBα タンパク質量の変化を橙色ルシフェラ ーゼ SLO の発光量で、また NF-кB 依存的転写活性化を緑色ルシフェラーゼ SLG の発光量で、さらに これらのルシフェラーゼの発光量を内部標準用ルシフェラーゼである SLR3 で補正可能な炎症シグ ナル評価用細胞の樹立を試みた。



図 D-11. NF-κB カスケードの古典経路、および 3 色ルシフェラーゼによる炎症シグナルの可視 化のスキーム。IκBα は細胞質内で NF-κB に結合し非ストレス下での NF-κB を安定化させているが、 TNFα 等の刺激により IκBα は速やかにリン酸化されプロテアソーム系を介して分解される。IκBα と 解離した NF-κB は核内に移行し、標的遺伝子を転写活性化させる。本実験では、橙色ルシフェラー ゼ SLO と IκBα cDNA を融合させることにより、細胞内の IκBα タンパク質量の変化を橙色ルシフェ ラーゼ SLO の発光量で、また NF-κB 依存的転写活性化を緑色ルシフェラーゼ SLG の発光量で評価可 能な発光細胞を樹立した。

まず、NF-κB 応答配列(5'-CGGAAAGTCCCA-3'の 6 回繰り返し配列)の下流に HSV-TK (以下 TK) プ ロモーター、さらにその下流に短寿命型緑色発光レポーターSLG::PEST を配したレポーターカセット (NFκB-TK-SLG::PEST) を、改良型 Bxb1 インテグレースの発現ベクターと伴に、MI-MAC を搭載し た A9 細胞にコトランスフェクションし、ゼオシンによる選択で細胞を樹立した。続いて TK プロモ ーターの下流に赤色ルシフェラーゼ SLR3 を配したレポーターカセット (TK-SLR3) を、改良型 R4 インテグレースの発現ベクターと伴に先に作製した緑色発光細胞にコトランスフェクションし、ブ ラストサイジンによる選択で 2 色発光細胞を樹立した。続いて、CAG プロモーターの下流に橙色ル シフェラーゼ SLO と IκBα を in-frame で融合した cDNA を配したレポーターカセット (CAG-SLO:: IκBα) を 2 色発光細胞に φC31 インテグレースの発現ベクターと伴にコトランスフェクションし、 G418 による選択で細胞を樹立した(図D-12)。なお、ゼオシンおよびブラストサイジンでの選択後 は、シングルコロニー単離は行わず、生育してきた全ての細胞を次のステップに用い、最終段階の G418 での選択後にシングコロニー単離を行い、7 クローンを樹立した。

続いて単離した各クローンの均一性を検証するため、各細胞の発光活性を測定した。発光測定は、

細胞を 96 ウェルプレートに播種後一晩培養し、発光試薬 Tripluc Luciferase Assay Reagent (東洋紡) を培地と等量添加し、10 分間室温で撹拌した後、色分離用光学フィルターが装備されているマルチ プレート対応ルミノメーター (Phelios、AB-2350、アトー社)を用い測定した。各ルシフェラーゼ の発光強度は、全光 (F0)、O56 ロングパスフィルターを通した発光 (F1) および R60 ロングパス フィルターを通した発光 (F2) を各 5 秒間測定し、計測した F0、F1、F2 値から次式により算出した。



MI-MAC/A9細胞

図 D-12. 炎症シグナル可視化用 3 色発光細胞樹立のスキーム。MI-MAC ベクターを搭載した A9 細胞に NFκB-TK-SLG::PEST ベクターを導入しゼオシンにより選択、続いて TK-SLR3 ベクターを導入し ブラストサイジンにより選択、最後に CAG-SLO::ΙκBα ベクターを導入し G418の選択により 3 色発 光細胞を樹立した。

$$\begin{pmatrix} FO\\FI\\F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1\\\kappa Gos6 & \kappa Oos6 & \kappa Ros6\\\kappa GR60 & \kappa OR60 & \kappa Rr60 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G\\O\\R \end{pmatrix} \qquad \textbf{I} \textbf{I} \textbf{4} \textbf{-1}$$

(κG56、κO56、κR56 は O56 ロングパスフィルターに対する緑色、橙色および赤色ルシフェラーゼ の透過係数、κG60、κO60、κR60 は R62 ロングパスフィルターに対する緑色、橙色および赤色ルシ フェラーゼの透過係数、G、O、R は緑色、橙色および赤色ルシフェラーゼの発光強度を示す。) その結果、単離したいずれのクローンでも 3 種類のルシフェラーゼ活性が認められ、また各々の発 光強度は概ね同程度であることが明らかとなった(図 D-13-A)。更に、緑色ルシフェラーゼ SLG 活 性および橙色ルシフェラーゼ SLO 活性を内部標準用レポーターである赤色ルシフェラーゼ SLR3 活 性で補正すると、各クローンの発光強度比は極めて均一な値を示す事が判明した(図 D-13-B)。

続いて、各クローンの TNFα に対する反応応答性を検証するため、各細胞を 96 ウェルマルチプレ ートに播種し、1日培養後 10 ng/ml TNFα または滅菌水(対照コントロール)を含む DMEM 培地に 交換し 2 時間培養した。各発光レポーターの発光強度は、前述の方法に従い測定した。各クローン の緑色および赤色発光レポーターの発光強度から、TNFα による NF-κB 依存的な転写活性化を以下 の計算により算出した。



図 D-13. 炎症シグナル可視化用 3 色発光細胞の各クローンの発光強度の均一性の検証。シングル コロニー単離により 7 クローンを樹立し、各細胞を 96 ウェルプレートに播種した後、発光試薬 Tripluc を用い各ルシフェラーゼの発光強度を測定した。(A) 各クローンにおける緑色 (SLG)、橙色 (SLO) および赤色 (SLR3) の発光強度。(B) 各クローンの緑色および橙色ルシフェラーゼの発光 強度を内部標準用赤色ルシフェラーゼの発光強度で除した相対値。

NF-
$$\kappa$$
Bの活性化 = $\frac{(TNF\alpha処理群のSLG値/TNFα処理群のSLR3値)}{(コントロール群のSLG値/コントロール群のSLR3値)}$ 式4-2

その結果、樹立した各クローンにおいて、TNFα処理によりいずれも約2倍のNF-κB依存的転写 活性化が誘導されることが明らかとなった(図 D-14-A)。次に、各クローンの橙色および赤色発光 レポーターの発光強度から、TNFαによるIκBα量の変化を以下の計算により算出した。

$$I\kappa B \alpha 量の変化 =$$
 (TNF α 処理群のSLO値/TNF α 処理群のSLR3値)
(コントロール群のSLO値/コントロール群のSLR3値) 式4-3

その結果、TNFα処理群では橙色ルシフェラーゼの発光強度は有意に低下し、想定通りにTNFα処理、 即ち NF-κB 経路の活性化による IκBα タンパク質の減少をモニターできることが明らかとなった。ま たこの発光強度の低下は、いずれのクローンでもほぼ均一であることも明らかとなった(図D-14-B)。



図 D-14. 炎症シグナル可視化用 3 色発光細胞の各クローンにおける TNFα に対する反応応答性の 均一性の検証。96 ウェルプレートに播種した細胞を 10 ng/ml の TNFα で 2 時間処理した後、発光試 薬 Tripluc を用い各ルシフェラーゼの発光強度を測定した。(A)各クローンにおける TNFα による NF-κB の転写活性化。(B)各クローンにおける TNFα による IκBα タンパク質の減少。

続いて、ネガティブコントロール用細胞として、TNFα処理によりNF-κB 経路が活性化されない3 色発光細胞を樹立した。IκBα のリン酸化部位である 32 番目および 36 番目のセリン残基をアラニン に置換したドミナントネガティブ体は、TNFα 等の刺激によっても IκBα はリン酸化されず、プロテ アソーム系による分解は受けない。その結果、NF-κB は細胞質内で安定に IκBα との複合体を形成し 続けるため NF-κB は核内移行せず、標的遺伝子の転写活性化が生じないことが知られている(D-15)。そこで、NF-κB 経路が活性化されないネガティブコントロール用細胞として、橙色ルシフェ ラーゼ SLO と IκBα のドミナントネガティブ体 cDNA を融合させ、細胞内の IκBα タンパク質量を橙 色ルシフェラーゼ SLO の発光量で評価しつつ、NF-κB 経路を遮断する細胞の作製を試みた。



図 D-15. ΙκBα ドミナントネガティブ体による NF-κB 経路の遮断および 3 色ルシフェラーゼを用 いた可視化スキーム。IκBα のリン酸化部位に変異を導入したドミナントネガティブ体 (S32A、S36A) では、TNFα等の刺激によっても IκBα は分解せず、その結果、NF-κB 複合体は細胞質内で安定に IκBα との複合体を形成し続けるため、NF-κB の標的遺伝子の転写活性化が生じない。本実験では、橙色 ルシフェラーゼ SLO と IκBα ドミナントネガティブ体の cDNA を融合させることにより、細胞内の IκBα タンパク質量の変化を橙色ルシフェラーゼ SLO の発光量で、また NF-κB 依存的転写活性化を緑 色ルシフェラーゼ SLG の発光量で評価可能な発光細胞を樹立した。

具体的には、前述で樹立した NFκB-TK-SLG::PEST および TK-SLR3 が導入された 2 色発光細胞に、 CAG プロモーターの下流に橙色ルシフェラーゼ SLO と IκBα ドミナントネガティブ体の融合遺伝子 (SLO:: ΙκBα DN)を配したレポーターベクターを、φC31 インテグレースの発現ベクターと伴にコ トランスフェクションした (図 D-16)。その後、G418 により選択し、シングルコロニー単離により 6 クローン樹立した。



MI-MAC/A9細胞

図 D-16. NF-κB 経路が活性化されないネガティブコントロール用 3 色発光細胞樹立のスキーム。 MI-MAC ベクターを搭載した A9 細胞に NFκB-TK-SLG::PEST ベクターを導入しゼオシンにより選択、 続いて TK-SLR3 ベクターを導入しブラストサイジンにより選択、最後に CAG-SLO::IκBα DN ベクタ ーを導入し G418 の選択により 3 色発光細胞を樹立した。

各クローンの発光活性を図 D-13 と同様の方法で測定した結果、単離したいずれのクローンにおいて も3種類のルシフェラーゼ活性を有すること、また各々の発光強度は若干のバラツキはあるものの、 概ね同程度であることが明らかとなった(図 D-17-A)。また緑色ルシフェラーゼ SLG 活性および橙 色ルシフェラーゼ SLO 活性を内部標準用レポーターである赤色ルシフェラーゼ SLR3 活性で補正す ると、各クローンの発光強度比はほぼ均一であることが判明した(図 D-17-B)。



図 D-17. 橙色ルシフェラーゼ SLO とドミナントネガティブ型 IκBα 融合タンパク質を発現させた3 色発光細胞の各クローンの発光強度の均一性の検証。シングルコロニー単離により6クローンを樹 立し、各細胞を96ウェルプレートに播種した後、発光試薬 Tripluc を用い各ルシフェラーゼの発光 強度を測定した。(A) 各クローンにおける緑色(SLG)、橙色(SLO) および赤色(SLR)の発光強度。 (B) 各クローンの緑色および橙色ルシフェラーゼの発光強度を内部標準用赤色ルシフェラーゼの発 光強度で除した相対値。

続いて、各クローンの TNFα に対する反応応答性を図 D-13 と同様の方法で検証した。各細胞を 96 ウェルマルチプレートに播種し、1日培養後 10 ng/ml TNFα または滅菌水(対照コントロール) を含む DMEM 培地に交換し 2 時間培養後、発光試薬 Tripluc Luciferase Assay Reagent を用い各ルシ フェラーゼの発光強度を測定した。TNFα による NF-κB 依存的な転写活性化および IκBα タンパク質 の変動は、前述の式 4-2 および式 4-3 より算出した。その結果、IκBα ドミナントネガティブ体を導 入した細胞では、TNFα を処理しても、いずれのクローンにおいても顕著な NF-κB 依存的転写活性 化は観察されなかった(図 D-18-A)。また同様に、TNFα を処理しても IκBα の急速な分解(発光強 度の減衰)はいずれのクローンにおいても観察されなかった(図 D-18-B)。

以上の結果より、樹立したいずれのクローンにおいても、各ルシフェラーゼの発光強度および細胞応答性がほぼ均一であることから、3種類のルシフェラーゼを MI-MAC ベクター上に導入し、薬剤選択で順次細胞株を樹立する場合、細胞樹立の過程で最も時間と作業量を要するシングルコロニー単離を必要とせずに、従来法と比較し簡便且つ短期間で発光安定細胞株を樹立できることが検証できた。



図 D-18. 橙色ルシフェラーゼ SLO とドミナントネガティブ型 IκBα 融合タンパク質を発現させた3 色発光細胞の各クローンにおける TNFα に対する反応応答性。96 ウェルプレートに播種した細胞を 10 ng/ml の TNFα で 2 時間処理した後、発光試薬 Tripluc を用い各ルシフェラーゼの発光強度を測定 した。(A)各クローンにおける TNFα 処理による NF-κB の転写活性化。(B)各クローンにおける TNFα 処理 による IκBα タンパク質の変化。

炎症シグナル可視化3色発光細胞を用いた細胞応答性の検証

続いて、上記で樹立した橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 IκBα、或いはドミナントネガティブ型 IκBα の融合タンパク質を発現させた 3 色発光細胞を用い、TNFα を処理した際の IκBα タンパク質お よび NF-κB 依存的な転写活性化の変化を測定した。各細胞を 96 ウェルプレートに播種し、一晩培 養後、10 ng/ml TNFα または滅菌水 (対照コントロール)を含む DMEM 培地に交換し、0、1、2、6、 8 時間後に、TripLuc Assay Reagent を添加し、ルミノメーター (Phelios)を用い発光を測定した。 緑色、橙色および赤色ルシフェラーゼの発光強度は式 4-1 より算出した。また TNFα による NF-κB 依存的な転写活性化および IκBα 量の変化は式 4-2 および式 4-3 より算出した。

その結果、図 D-11 に示す橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 IκBα のタンパク質を発現させた細胞で は、TNFα 添加後、SLO でモニターした IκBα の急激な減少が観察され、一方、緑色ルシフェラーゼ SLG でモニターした NF-κB の急激な転写活性化が認められた(図 D-19)。またこの際、内部標準用 レポーターである SLR3 の発光強度には顕著な変化は認められなかった。なお、TNFα 処理による橙 色ルシフェラーゼを融合した IκBα タンパク質の減少は、TNFα 処理 2 時間後の細胞の western 解析 においても確認した。



図 D-19. 橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 IκBα 融合タンパク質を発現させた 3 色発光細胞の TNFαに対する反応応答性の経時変化。96 ウェルプレートに播種した細胞を 10 ng/ml の TNFα で処 理した後、各時間で発光試薬 Tripluc を用い各ルシフェラーゼの発光強度を測定した。

続いて、図 D-15 に示す橙色ルシフェラーゼ SLO と IкBα ドミナントネガティブ体の融合タンパク 質を発現させた細胞に TNFα を添加した結果、SLO でモニターした IkBα ドミナントネガティブ体の 急激な減少は認められなかった(図 D-20)。なお、TNFα 処理 2 時間後の細胞の western 解析でも IkBα ドミナントネガティブ体と SLO の融合タンパク質の減少は観察されなかった。また、緑色ルシフェ ラーゼ SLG でモニターした NF-кB の有意な転写活性化も生じないことが確認された。一方、内部標 準用レポーターである赤色ルシフェラーゼ SLR3 は図 D-19 の結果とは異なり、時間依存的に減少し た。これは、通常 NF-кB 経路が活性化される場合、抗アポトーシス遺伝子である Bcl-2 等が発現し、 TNFα によって誘導されるアポトーシスを抑制するが、IkBα ドミナントネガティブ体により NF-кB 経路が遮断されたためアポトーシスが誘導され、生細胞数および細胞活性を反映する内部標準用レ ポーターSLR3 の発光強度が経時的に低下したものと考えられる。



図 D-20. 橙色ルシフェラーゼ SLO とドミナントネガティブ型 IκBα 融合タンパク質を発現させた 3 色発光細胞の TNFα に対する反応応答性の経時変化。96 ウェルプレートに播種した細胞を 10 ng/ml の TNFα で処理した後、各時間で発光試薬 Tripluc を用い各ルシフェラーゼの発光強度を測定した。

続いて図D-19 および図D-20 の緑色ルシフェラーゼ SLG および橙色ルシフェラーゼ SLO の発光 強度を内部標準用レポーターSLR3 の発光強度で補正し、TNF 処理による IKB タンパク質の細胞内 変動および NF-KB 依存的な転写活性化を算出した。図D-21 に 0 時間の値を 1 としてプロットした 図を示す。左図に示す橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 IKB の融合タンパク質を発現させた細胞で は、TNF の添加直後から IKB タンパク質の分解が進行する一方、IKB による抑制を解除された NF-KB の核内移行に伴う転写活性化が急激に起こり、そのピークは TNF 添加後、約 6 時間である ことが明らかとなった。一方、右図に示す橙色ルシフェラーゼ SLO をドミナントネガティブ型 IKB の融合タンパク質を発現させた細胞では、TNF を添加しても IKB タンパク質の分解は進行せず、 徐々に細胞内で蓄積されることが示唆された。またこのタンパク質安定化により NF-KB の核内移行 が抑制され続けるため、NF-KB 依存的転写活性化も誘導されないことが確認された。なお、この細 胞における NF-KB 依存的転写活性化は、TNF 処理後 6 および 10 時間で若干認められ、これは図 D-19 に示す古典的経路とは異なる、IKB を介さない非古典的経路と呼ばれるパスウェイにより活性 化されているものと考えられる。

以上の結果より、3 種類のルシフェラーゼ遺伝子を MI-MAC ベクターに挿入した安定細胞株を樹 立し、各々の発光強度を測定することで、細胞内シグナルトランスダクションの上流と下流のシグ ナルの変化量を同時且つ経時的に評価可能であることが明らかとなり、細胞応答性という観点にお いても人工染色体ベクターの有用性が証明された。



図 D-21. 図 D-19 および D-20 における橙色ルシフェラーゼ SLO と緑色ルシフェラーゼ SLG の活 性を内部標準用赤色ルシフェラーゼ SLR3 で補正し、0 時間の値を 1 とした際の経時変化。野生型 ΙκBα 融合タンパク質を発現させた細胞の結果を左図に、ドミナントネガティブ型 ΙκBα 融合タンパク 質を発現させた細胞の結果を右図に示す。

③ 炎症シグナル可視化3色発光細胞を用いた継代安定性の検証

次に、上述の橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 IκBα の融合タンパク質を発現させた 3 色発光細胞 (図 D-11) を用い、長期の継代培養における各ルシフェラーゼの基底活性と TNFα に対する反応応 答性の変化を検証した。細胞は図 D-13 で樹立した 7 クローンの中からランダムに 2 クローンを選択 した。なお継代培養中は、MI-MAC ベクターの細胞からの脱落の有無についても検討できるよう、 培地には抗生物質を添加せず、選択圧をかけない状態で約 1 年間継代培養を行った。各ルシフェラ ーゼの発光強度および転写活性化は、各継代時の細胞を 96 ウェルプレートに播種し一晩培養後、10 ng/ml の TNFα または滅菌水(対照コントロール)含む DMEM 培地に交換し、さらに 6 時間培養し た後、Tripluc Luciferase Assay Reagent により細胞を破砕し測定し、各ルシフェラーゼの発光強度は 式 4-1 により算出した。

図 D-22 に結果を示す。図中左のパネルは橙色ルシフェラーゼ SLO、緑色ルシフェラーゼ SLG、 赤色ルシフェラーゼ SLR3 の各パッセージ時における基底活性(対照コントロールでの発光強度)、 中央パネルは 10 ng/ml の TNFα を 6 時間処理した際の各ルシフェラーゼの発光強度、右パネルは橙 色ルシフェラーゼ SLO および緑色ルシフェラーゼ SLG の発光強度を赤色ルシフェラーゼ SLR3 の発 光強度で補正し、式 4-2 および 4-3 より算出した値を示す。IκBα を融合した橙色ルシフェラーゼ SLO の基底活性は継代を重ねる毎に若干減少、また NF-κBの活性化モニター用の緑色ルシフェラーゼ SLG の基底活性はパッセージ 80 回程度まで概ね安定していた。また内部標準用赤色ルシフェラーゼ SLR3 の発光強度も同様に 80 回程度までは安定に維持された。10 ng/ml の TNFα を処理した場合、IкBα を融合した橙色ルシフェラーゼ SLO の発光は、初回を除きパッセージ 100 回まで検出限界以下であ り、NF-κB の活性化モニター用の緑色ルシフェラーゼ SLG はパッセージ 80 回程度まで概ね安定した 発光強度の増加が観察された。また内部標準用赤色ルシフェラーゼ SLR3 も同様に 80 回程度まで一 定の発光強度が保持されることが明らかとなった。SLR3 で SLO を補正した値では、パッセージ 100 回で異常値を示したものの、長期間に渡り TNFα 処理による IκBα の分解がモニターできることが明 らかとなった。また、SLR3 で SLG を補正した値より、パッセージ 80 回程度まで安定した NF-κB の 活性化がモニターできることが判明した。



図 D-22. 橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 IκBα 融合タンパク質を発現させた 3 色発光細胞の長 期継代培養における各ルシフェラーゼの基底活性(左パネル)、TNFαに対する反応応答性(中央パ ネル)。橙色ルシフェラーゼ SLO および緑色ルシフェラーゼ SLG の発光強度を内部標準用赤色ルシ フェラーゼ SLR3 の発光強度で補正した値を右パネルに示す。

続いて、パッセージ 80 回を超えた細胞におけるルシフェラーゼの基底活性の低下および TNFa に対する反応応答性の異常が MI-MAC ベクターのゲノムへの転座や細胞からの脱落に起因するのか を検討するため、50、80、100 回パッセージした細胞の FISH 解析を行った(図 D-23)。その結果、 パッセージ 100 回の細胞においても、MI-MAC ベクターのゲノムへの転座および挿入遺伝子(ルシ フェラーゼ)の脱落は認められず、細胞内に安定に保持されていることが明らかとなり、パッセー ジ 80 回を超えた際の異常は細胞そのものの品質の低下に起因する可能性が示唆された。 以上の結果より、3 種のルシフェラーゼを MI-MAC ベクターに導入した安定細胞株においても、パ

ッセージ 80回程度(約10カ月間)はルシフェラーゼの基底活性と反応応答性が安定に維持され、 長期に継代培養しても極めて安定な発光レポーターアッセイが実施できることが確認された。

Line 1



<mark>図 D-23</mark>. 橙色ルシフェラーゼ SLO と野生型 ΙκBα 融合タンパク質を発現させた 3 色発光細胞の FISH 解析。核を DAPI で染色(青色)、MI-MAC ベクターをマウスマイナーサテライト(赤色)およ びルシフェラーゼを含む NFкB-TK-SLG-Bxb1-Zeo ベクター(緑色)をプローブに用いた。図中矢印 は MI-MAC ベクターを、インセットは MI-MAC ベクターの拡大を、また数字はパッセージ回数を示 す。

P100

■ 発光測定系の最適化

本プロジェクトで実施する各種発光細胞を用いた HTP 毒性試験系では、緑色および赤色ルシフェ ラーゼである ELuc、SLG、SLR 等の細胞内に存在するルシフェラーゼを専用の発光試薬を用いて細胞 を破砕し、発光を測定することで化学物質の毒性を評価する。使用する専用発光試薬には、細胞破 砕のための種々の界面活性剤と、長時間発光のキネティクスを安定化させるための物質が含まれて おり、メーカーのプロトコールでは培地と等量の発光試薬を添加し、10 分攪拌した後、発光キネテ ィクスは 30 分程度安定であるとされている。発光キネティクスの安定性は HTP 発光試験において は極めて重要であり、測定中に発光キネティクスが上昇あるいは減衰するとアッセイ系の測定精度 が著しく損なわれる。 これまで予備実験的に代表的な株化培養細胞である NIH3T3、HEK293、THP-1 細胞等を用い、発光試薬添加後の発光キネティクスを測定したところ、プロトコール通り、試薬添 加後約 10 分から 30 分間程度は発光キネティクスが安定していることを確認してきた。しかし、本 プロジェクトで使用する A9 細胞、HepG2 細胞、さらにはプライマリー細胞において、想定通りの 発光キネティクスが得られるかは確認していない。そこで、緑色ルシフェラーゼ SLG を発現させた 細胞における発光キネティクスの検証と、それを安定化させるための測定条件の最適化を行った。

最初に、これまで人工染色体ベクターの性能検証に用いているマウス線維芽細胞 A9 について検討 した。CAG プロモーター制御下で緑色ルシフェラーゼ SLG が発現する MI-MAC 導入 A9 細胞を 96 ウェルマルチプレートに播種し、一晩培養後、SLG の専用発光試薬である Tripluc Luciferase Assay Reagent を培地と等量添加し、直ちにルミノメーター(Phelios)を用い発光キネティクスを測定した(図D-24)。その結果、試薬添加後約40分まで発光が増加し、その後安定することが判明した。 この結果から、A9細胞の場合 Tripluc Luciferase Assay Reagent に含まれる界面活性剤では細胞溶解 力が弱く、細胞を完全に溶解するまでに従来のプロトコールで指定されているよりも長い時間を要 すると考えられた。そこで、非イオン性界面活性剤である Brij58 を 0.05~0.5% Tripluc Luciferase Assay Reagent に添加し、同様に発光キネティクスを測定した。その結果、Brij58 が 0.3%以上含まれ る場合は試薬添加後急激に発光が上昇、約10分でプラトーに達し、その後50分間発光が安定に持 続することが明らかとなった。また 0.5%の Brij58 を添加しても発光活性には影響しないことも確認 された。



図 D-24. 緑色ルシフェラーゼ SLG が発現する MI-MAC 導入 A9 細胞を Tripluc Luciferase Assay Reagent で処理した際の発光キネティクス。細胞を 96 ウェルマルチプレートに 2 x 10⁴ cells/well 播 種し、三日間晩培養後、Tripluc Luciferase Assay Reagent のみ(control)、および 0.05~0.5%の Brij58 を含む Tripluc Luciferase Assay Reagent を添加し、直ちに室温で発光を 2 秒、2 分間隔で 60 分間測 定した。

次に、肝臓のモデル細胞として肝毒性評価用レポーターの検証に用いているヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞について検証した(図D-25)。CAG プロモーター制御下で緑色ルシフェラーゼ SLG が発 現する MI-MAC 導入 HepG2 細胞を 96 ウェルマルチプレートに播種し、一晩培養後、Tripluc Luciferase Assay Reagent を培地と等量添加し、発光キネティクスを測定したところ、A9 細胞と同様に発光が 安定するまでに試薬添加後 20 分以上を要することが判明した。一方 0.5%の Brij58 を Tripluc Luciferase Assay Reagent に添加した場合、約5分で発光はほぼプラトーに達し、また Brij58 は発光 反応には影響しないことが明らかとなり(図D-25-A)、HepG2 細胞においても Tripluc Luciferase Assay Reagent をそのまま使用した場合、細胞は完全に溶解されず、0.5%の Brij58 を添加することで 安定に発光測定できることが判明した。 続いて、A9 細胞や HepG2 細胞よりも発光試薬による細胞溶解が困難と想定される ES 細胞やプラ イマリー細胞を想定し、モデルとして HepG2 細胞の凝集塊を用い発光キネティクスを測定した。SLG が発現する HepG2 細胞を PrimeSurface96U プレート(住友ベークライト)に播種し2日間培養して 凝集塊を形成させた(図D-25-B、写真)。培地と等量の Tripluc Luciferase Assay Reagent を添加し発 光キネティクスを測定したところ、発光キネティクスはプラトーに達することなく、測定中徐々に 上昇することが明らかとなり、試薬添加 1 時間経過しても細胞の凝集塊を完全に溶解できないこと が示唆された。次に 0.5% Brij58 を Tripluc Luciferase Assay Reagent に添加したところ、コントロー ルと比較して発光強度は増加したものの、徐々に上昇する発光キネティクスを示した(図D-25-B)。 次に凝集塊の安定な発光キネティクスを得るため、凍結融解の効果について検証した(図D-25-C)。 前述と同様の方法で形成した凝集塊に Tripluc Luciferase Assay Reagent を添加し、-80°Cで 10 分間静 置して凍結した後、室温で引き続き静置し、培養液が室温に戻ってから発光キネティクスを測定し たところ、測定開始約 10 分後にプラトーに達する安定なキネティクスを示すことが明らかとなった。 さらに 0.5% Brij58 を Tripluc Luciferase Assay Reagent に添加し、同様に凍結融解させたところ、発 光強度はコントロールの約 2 倍に増加し、また測定開始 10 分後には安定なキネティクスをとること が明らかとなった。



図 D-25. 緑色ルシフェラーゼ SLG が発現する MI-MAC 導入 HepG2 細胞を Tripluc Luciferase Assay Reagent で処理した際の発光キネティクス。(A) 細胞を 96 ウェルマルチプレートに 5 x 10⁴ cells/well 播種し、一晩培養後、Tripluc Luciferase Assay Reagent のみ(control)および 0.5%の Brij58 を含む Tripluc Luciferase Assay Reagent を添加し、10 秒間撹拌後の発光キネティクス。(B) HepG2 細胞を PrimeSurface に 5 x 10³ cells/well 播種し 3 日間培養して凝集塊を形成させた。培地と等量の Tripluc Luciferase Assay Reagent のみ(control)および 0.5%の Brij58 を含む Tripluc Luciferase Assay Reagent を添加し、10 秒撹拌後、2 秒露光、2 分間隔で 60 分間測定した発光キネティクス。(C) 凝 集塊を形成させた HepG2 細胞を凍結融解させた際の発光キネティクス。発光キネティクスは B と同 様に測定した。 以上の結果より、溶解性の低い細胞を Tripluc Luciferase Assay Reagent を用い測定する場合、0.5% の Brij58 を添加し、10 分後に測定することで安定な発光測定が可能であること、また、より溶解が 困難な細胞を使用する場合は、Tripluc Luciferase Assay Reagent に 0.5% Brij58 を添加し、さらに凍 結融解させることで発光強度の確保と安定な測定が可能であることが明らかとなった。

続いて、腎毒性で使用する S3 細胞および神経毒性で使用する ES から分化させた神経細胞につい ても同様に検討したところ、Tripluc 試薬に添加されている界面活性剤では細胞溶解が不十分であり、 試薬添加後安定な発光キネティクスを得るのに長時間を要することが明らかとなり、Brij58 を 0.5% 程度 Tripluc Luciferase Assay Reagent に添加することで安定な発光キネティクスが得られた(デー タ省略)。

続いて、in vitro 肝毒性評価系に使用する予定の分泌型ルシフェラーゼ GLuc の発光特性について 検討した。CAG プロモーター下流に GLuc (KDEL)-2A-CLuc を配したレポーターカセットを MI-MAC ベクターの ΦC31 部位に導入した A9 安定細胞株を樹立、細胞を 96 ウェルプレートに播種して 2 日 間培養し、培養液を回収した。まず、GLuc 専用の発光試薬である BioLux Gaussia Luciferase Flex Assay Kit(以下 BioLux と省略、NEB 社製)を用いた際の発光キネティクスを測定した。BioLux には、GLuc の発光基質であるセレンテラジンの他、発光キネティクスを安定化させるための Stabilizer 試薬が添 付されており、メーカーのプロトコールではこの試薬を混合して測定することとなっている。そこ で、GLuc を含む先の細胞培養液と Stabilizer を含む BioLux を混合し発光キネティクスを測定したと ころ、図D-26-A(赤丸)に示すように比較的安定なキネティクスを示すことが明らかとなった。一 方、Stabilizer を混合せずに BioLux 試薬のみを使用した場合、急激に減衰するキネティクスを示し、 その半減期は約5分であった(青丸)。また、セレンテラジンのみを使用した場合、更に急激にキネ ティクスが減衰することが明らかとなった。以上より Stabilizer を用いることで 30 分程度は安定な 発光測定が可能であることが判明した。次に、前述の組合せの試薬で測定した際の GLuc の発光強度 を検討した(図D-26-B)。Stabilizer 試薬を使用した際の発光強度を1として表示)。その結果、Stabilizer を使用した場合、セレンテラジンのみで反応させた場合と比較し、発光強度は約1/1000に減少し、 また BioLux 試薬に Stabilizer を添加することで発光強度が 1/100 以下に減少することが明らかとな った。以上の結果より、Stabilizer 試薬を混合した BioLux を用いる場合、発光キネティクスは安定す るものの、発光強度は著しく低下することが判明した。そのため実際の細胞アッセイで発光強度が 十分である場合は、NEB 社の BioLux 試薬をプロトコール通りに Stabilizer を混合して使用すること で安定な発光測定が可能であることが示唆された。一方、発光強度が不十分な場合、GLuc の発光基 質であるセレンテラジンのみを使用することでアッセイが可能であるが、生成物阻害に起因すると 考えられるキネティクスの急激な減衰が起こることから、分注ポンプを装備したルミノメーターを 用い、セレンテラジンの分注と発光測定を繰り返し行う発光測定により、高い精度の測定が可能で あることが示唆された。



図 D-26. 分泌型ルシフェラーゼ GLuc-KDEL が発現する MI-MAC 導入 A9 細胞の培養液を用いた GLuc の発光特性。(A) Stabilizer 試薬有(赤)、なし(青)での BioLux Gaussia Luciferase Flex Assay 試薬、および coelenterazine のみ(橙)で測定した際の GLuc の発光キネティクス。Stabilizer 試薬 有での測定は、添付の Buffer 1ml に Stabilizer 160 µl、Substrate 10 µl を混合した。Stabilizer 試薬な しでの測定は、添付の Buffer 1ml に Stabilizer Substrate 10 µl を混合した。Coelenterazine のみでの 測定は 20 mM Tris/HCI (pH8.0)、50 mM MgCl₂、coelenterazine 2.5 µM を調製した。調製した発光 溶液 50 µl と培養液 5 µl を混合し、Stabilizer 試薬有の場合は 35 秒間撹拌後、Stabilizer 試薬なし、 および coelenterazine のみの場合は混合直後に発光を測定した。発光キネティクスは 2 秒露光、1 分間隔で 30 分間測定した。(B) Stabilizer 試薬有(赤)、なし(青)での BioLux Gaussia Luciferase Flex Assay 試薬、およびセレンテラジンのみ(橙)で測定した際の GLuc の発光強度。発光強度は 2 秒間 の積算値を示す。発光反応液の調製、混合等は A と同様に行った。

■ 甲虫由来ルシフェラーゼ発光基質(D-ルシフェリン)の培地中での長期安定性の検証

D-ルシフェリンは、ホタルルシフェラーゼを始めとする甲虫由来ルシフェラーゼの発光基質であ り、セレンテラジンやウミホタルルシフェリン等の他の発光基質と比較し、速やかに細胞内に浸透・ 移行することから、本プロジェクトで実施している肝毒性試験系のように非破砕的な発光測定に適 している。また D-ルシフェリンは培養液中で長期間安定であるとされていることも非破砕計測に有 利な点と考えられるが、これまで培養液中の安定性について詳細に解析された例はない。そこで、 長期間の培養条件下での D-ルシフェリンの絶対量およびラセミ化の進行速度等について解析するこ ととした。

緑色発光ルシフェラーゼ ELuc が TK プロモーター制御下で発現するマウス線維芽細胞 NIH3T3 の 安定細胞株を 96 ウェルプレートに播種し、200 µM の D-ルシフェリンを含む培地に交換後、1 日毎 に培地を回収し、D-ルシフェリンおよび L-ルシフェリン量を HPLC により解析した。その結果、興 味深いことに 5 日間の培養においても、D 体および L 体の絶対量は全く減少しないことが明らかと なり、細胞内のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応で消費される D-ルシフェリンは HPLC で検出でき ない程度の極僅かな量であることが明らかとなった(<mark>図 D-27</mark>)。

一方、D-ルシフェリンのラセミ化は徐々に進行し、L-ルシフェリン量が相対的に緩やかに増加、 培養開始5日後にはD体は20%減少し、L体が20%増加することが明らかとなった。細胞を播種し てない培地のみにD-ルシフェリンを添加しても、全く同じ結果が得られたことから、D-ルシフェリ ンのラセミ化は細胞依存的ではなく、培地中の環境、恐らく pH が原因で進行するものと考えられ た(図D-27)。

D-ルシフェリンは甲虫由来ルシフェラーゼの発光基質として利用される一方、L-ルシフェリンは 発光反応阻害をすることが知られている。そこで、上述の長期培養中のラセミ化により生じた L-ル シフェリンが細胞内のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を阻害しないかを検討した。細胞内の発光 反応への影響は、時計遺伝子プロモーターPer2 制御下で緑色発光レポーターELuc が発現する MI-MAC A9 細胞を用い、測定開始時に予め 20%の L-ルシフェリンを混合した際の発光を 5 日間リア ルタイムに計測した。その結果、予め 20%の L 体が混合された培地での発光キネティクスは、測定 開始時に D 体が 100% (L 体が 0%)の発光キネティクスと全く同一であったことから、20%程度の L 体は細胞内のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応には全く影響しないことが明らかとなった(図 D-27)。精製ルシフェラーゼ酵素を用いた発光測定では、L 体が 20%混入することにより完全に発光 が阻害される結果を得ている(データ省略)。この結果を考慮すると、前述の細胞実験の結果は、細 胞内に移行した L 体が恐らくルシフェラーゼにより D 体へと変換、さらに発光基質として利用され ることにより発光阻害が生じず、安定な発光キネティクスが得られたと考えらえる。

以上の結果から、D-ルシフェリンは培地中で緩やかにラセミ化されるものの、長期培養中の D-お よび L-ルシフェリンの消費は極僅かであり、絶対量としてはほぼ変化がないこと、またラセミ化さ れた L-ルシフェリンが 20%程度混入しても、細胞内の発光反応には全く影響しないことが明らかと なり、D-ルシフェリンはリアルタイム或いは非破砕的な経時的発光測定に極めて適した発光基質で あることが確認された。



培地:DMEM+200 µM D-luciferin

■ 初代肝細胞の発光特性の検証

① 2次元培養

CAG プロモーターと緑色ルシフェラーゼ ELuc の発現カセットが MI-MAC 上に導入された transchromosomic (Tc) マウス (以下、CAG-ELuc Tc マウス)より、前述の 2. に記述した方法に従 い肝細胞を調製し、96 ウェルプレートを用い発光測定した。0.5% Brij58 を添加した ELuc 専用発光 試薬 ELuc Assay Reagent (東洋紡)を用い、ルミノメーター (Phelios)で発光キネティクスを測定 したところ、21,000 counts/sec という高い発光強度を示し、また 30 分以上安定な発光キネティクス を示したことから、CAG-ELuc Tc マウスを用いた in vitro アッセイが十分に可能であることが示唆さ れた (図 D-28-A)。続いて、細胞数と発光強度の相関性について検討したところ、非常に高い直線 性を示すことも明らかとなった (図 D-28-B)。次に、肝細胞内での ELuc タンパク質の細胞内安定性 を検討するため、調製した肝細胞をコラーゲンコートした 35 mm ディッシュに8 x 10⁵ cells/dish 播 種し、肝細胞がディッシュ底面に接着してから、200 µM D-luciferin およびタンパク生合成阻害剤で ある cycloheximide (100 µM)を含む培地に交換し、ディッシュ型ルミノメーター (Kronos)を用 いリアルタイム発光測定を行った。その結果、肝細胞内での ELuc タンパク質の半減期は約 2.5 時間 と比較的短いことが明らかとなり、急激な転写活性化或いは不活性化も高い感度でモニターできる ことが示唆された (図 D-28-C)。



図 D-28. CAG プロモーター制御下で緑色ルシフェラーゼ ELuc が発現する MI-MAC ベクター導入 Tc マウス (CAG-ELuc Tc マウス)の肝細胞の発光特性の検証。(A) 肝細胞を 0.5% Brij58 を含む ELuc Assay Reagent を用い測定した発光キネティクス。(B) 肝細胞数と発光強度の相関性。(C) 肝細胞 内での ELuc タンパク質の安定性。

続いて、実際に肝細胞が発光しているかを検証するため、シングルセル発光イメージングを行った。CAG-ELuc Tc マウスより調製した肝細胞を 300 µM D-luciferin を含む HMM 培地に懸濁し、コラ ーゲンコートした 35 mm ディッシュに播種して 6 時間培養した。その後、発光イメージング装置 (CellGraph、ATTO)を用い発光イメージングを行った。イメージングは 5.3 倍レンズでビニングを かけずに 2 分間撮影した。その結果、2 核の肝細胞が明瞭な発光を放つことが確認された(図 D-29)。 以上の発光強度、発光キネティクスの検証結果より、CAG-ELuc Tc マウスから調製した肝細胞を用 いる場合、96 ウェルマルチプレートを用いたエンドポイントアッセイによる in vitro 毒性評価が実 施可能であることが示唆された。さらにはこの肝細胞の発光強度の高さから 384 ウェルマルチプレ ートでのエンドポイントアッセイ、および 96 ウェルマルチプレートを用いたリアルタイム発光測定 での毒性評価も十分可能であると考えられた。



図 D-29. CAG プロモーター制御下で緑色ルシフェラーゼ ELuc が発現する MI-MAC ベクター導入 Tc マウス(CAG-ELuc Tc マウス)の肝細胞のシングルセル発光イメージング。発光イメージングは 5.3 倍レンズでビニングをかけずに 2 分間撮影した。

② 3次元培養

次に CAG-ELuc Tc マウスより調製した肝細胞の三次元培養による in vitro 毒性評価の可能性につい て検討した。CAG-ELuc Tc マウスより、前述の 1.2.3 に記述した方法に従い肝細胞を調製し、TRP 培 地に懸濁した。3T3-Swiss albino をフィーダー細胞として播種した Cell-able(東洋合成)に肝細胞を 4 x10⁴ cells/well 撒き、2~3 日毎に培地交換を行い、アルブミンの分泌量が最大となる 6 日後に発光 を測定した。発光は、0.5% Brij58 を含む ELuc Assay Reagent を培地と等量添加し、10 分撹拌後、ル ミノメーター (Phelios) で測定した。その結果、17,000 counts/sec という高い発光強度を示すこと、 さらに約 1 時間に渡り安定な発光キネティクスを示すことが明らかとなった(図 D-30)。

続いて、化学物質の長期暴露試験を考慮し、非破砕的に発光測定が可能かを検討した。前述と同様に 300 µM D-luciferin を含む TRP 培地に懸濁した肝細胞を Cell-able に播種し、2~3 日毎に培地交換を行いながら、1 日 1 回、ルミノメーター(Phelios) で肝細胞の発光を非破砕的に 1 ヶ月間連続測定した。その結果、培養 5 日目から発光強度が上昇し、7~14 日目のピーク時には 7,000 counts/secという高い発光強度を示すことが明らかとなった(図D-31)。発光はその後徐々に減衰するものの、1 ヶ月間は in vitro 毒性評価に十分な発光強度を維持することが明らかとなり、96 ウェルプレートを用いた長期間の繰り返し暴露試験に十分使用可能であることが示唆された。また、発光強度の強さから 384 ウェルプレートでの三次元培養のアッセイも可能であると考えられた。



図 D-30. CAG-ELuc Tc マウスより調製した肝細胞の三次元培養における発光キネティクス。 Cell-able に播種し6日後、0.5% Brij58 を含む ELuc Assay Reagent を添加し、10分撹拌後、ルミノ メーター(Phelios)を用い発光キネティクスを測定した。



図 D-31. CAG-ELuc Tc マウスより調製した肝細胞の三次元培養における非破砕的な発光測定。300 µM D-luciferin を含む TRP 培地に懸濁した肝細胞を Cell-able に播種し、1 日 1 回ルミノメーター (Phelios)を用い、非破砕的に肝細胞の発光を測定した。

③ 発光イメージング

将来的なアッセイ系の大規模化を見据え、スループット性の向上と測定時間の短縮化が可能かを CCD カメラを備えた発光イメージング装置により一回のイメージングで全ウェルの発光が同時に測 定できないかを検討した。

CAG-ELuc; Alb-GLuc (KDEL)マウスから単離した肝細胞を三次元培養に供し、4 種類の被験物質を 2 週間処理した際の ELuc の発光を、発光イメージング装置を用い測定した。イメージングは 30 秒 露光で行った。その結果、被験物質の濃度に依存した明瞭な発光の減衰が観察され、発光イメージ ングにより毒性評価が可能であることが示唆された。本実験では 30 秒間の露光によりイメージング 画像を取得したが、発光強度を考慮すると、さらに露光時間の短縮は可能であり、また 384 ウェル プレートへの応用も十分可能であることも明らかとなった (図 D-32)。



<mark>図 D-32</mark>. CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウス肝細胞の 3 次元培養の ELuc 発光イメージング像
論文発表、特許出願状況等

論文	学会発表				⋫≠⋽∕⋷	立中	国民と
	国際学会 招待	国際学会 一般発表	国内学会 招待	国内学会 一般発表	1寸 āT	文員	の対話
28	7	9	31	37	1	1	61

■ 論文

 S. Wakuri, K. Yamakage, Y. Kazuki, K. Kazuki, M. Oshimura, S. Aburatani, M. Yasunaga, Y. Nakajima. Correlation between luminescence intensity and cytotoxicity in cell-based cytotoxicity assay using luciferase.

Submitted to Anal. Biochem.

- M. Yasunaga, Y. Fujita, R. Saito, M. Oshimura and Y. Nakajima. Continuous long-term cytotoxicity monitoring in 3D spheroids of beetle luciferase-expressing hepatocytes by nondestructive bioluminescence measurement. Submitted to BMC Biotechnol.
- K. Kokura, Y. Kuromi, T. Endo, N. Anzai, Y. Kazuki, M. Oshimura, T. Ohbayashi.
 A kidney injury molecule-1 (Kim-1) gene reporter in a mouse artificial chromosome: the responsiveness to cisplatin toxicity in immortalized mouse kidney S3 cells.
 J. Gene Med. in press
- T. Endo, N. Noda, Y. Kuromi, K. Kokura, Y. Kazuki, M. Oshimura, T. Ohbayashi. Evaluation of an Hprt-luciferase reporter gene on a mammalian artificial chromosome in response toc ytotoxicity. Yonago Acta Med. 59, 174-182 (2016).
- S. Tsuji, T. Ohbayashi, K. Yamakage, M. Oshimura, M. Tada, A cytoplasmic form of gaussia luciferase provides a highly sensitive test for cytotoxicity. PLoS One. 11, e0156202 (2016).
- T. Suzuki, Y. Kazuki, M. Oshimura, T. Hara, Highly efficient transfer of chromosomes to a broad range of target cells using chinese hamster ovary cells expressing murine leukemia virus-derived envelope proteins. PLoS One. 11, e0157187 (2016).
- 丹羽一樹、中島芳浩、近江谷克裕
 発光甲虫プローブを用いた細胞機能解析
 生化学、87、675-685(2015).

- Y. Kimura, C. Fujimura, Y. Ito, T. Takahashi Y. Nakajima, Y. Ohmiya, and S. Aiba. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. Toxicol In Vitro. 29, 1816-1830 (2015).
- Y. Yoshimura, K. Nakamura T. Endo, N. Kajitani, K. Kazuki, Y. Kazuki, H. Kugoh, M. Oshimura, T. Ohbayashi,
 Mouse embryonic stem cells with a multi-integrase mouse artificial chromosome for transchromosomic mouse generation.

Transgenic Res. 24, 717-727 (2015).

- M. Oshimura, N. Uno, Y. Kazuki, M. Katoh, T. Inoue, A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. Chromosome Res. 23, 111-133 (2015).
- Y. Nakayama, N. Uno, K. Uno, Y. Mizoguchi, S. Komoto, Y. Kazuki, E. Nanba, T. Inoue, M. Oshimura, Recurrent micronucleation through cell cycle progression in the presence of microtubule inhibitors. Cell Struct Funct. 40, 51-59 (2015).
- M. Yasunaga, K. Murotomi, H. Abe, T. Yamazaki, S. Nishii, T. Ohbayashi, M. Oshimura, T. Noguchi, K. Niwa, Y. Ohmiya and Y. Nakajima, Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3. J Biotechnol. 194:115-123 (2015).
- S. Kitamura, H. Sakurai and H. Makino, Single adult kidney stem/progenitor cells reconstitute three-dimensional nephron structures in vitro.
 Stem Cells 22, 774, 784 (2015)

Stem Cells 33, 774-784 (2015).

- M. Takiguchi, Y. Kazuki, K. Hiramatsu, S. Abe. Y. Iida, S. Takehara, T. Nishida, T. Ohbayashi, T. Wakayama and M. Oshimura, A novel and stable mouse artificial chromosome vector. ACS Synth Biol. 3, 903-914 (2014).
- 15. T. Suzuki, Y. Kazuki, M. Oshimura and T. Hara,
 A novel system for simultaneous or sequential integration of multiple gene-loading vectors into a defined site of a human artificial chromosome.
 PLoS One 9, e110404 (2014)
- M. Yasunaga, Y. Nakajima and Y. Ohmiya, Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution.

Anal. Bioanal. Chem. 406, 5735-5742 (2014).

- S. Suzuki, K. Murotomi, Y. Nakajima, K. Ohta, K. Warita, T. Miki, and Y. Takeuchi. Development of an artificial calcium-dependent transcription factor to detect sustained intracellular calcium elevation. ACS Synth Biol. 3, 717-722 (2014).
- Y. Iida, Y. Kazuki, M. Hayashi Y. Ueda, M. Hasegawa, N. Kouprina, V. Larionov, M. Oshimura, Bi-HAC vector system toward gene and cell therapy. ACS Synth. Biol. 3, 83-90 (2014).
- N. Horimoto, S. Kitamura, K. Tuji, H. Makino, Mizoribine inhibits the proliferation of renal stem / progenitor cells by G1/S arrest during renal regeneration. Acta Med. Okayama 68, 7-15 (2014).
- M. Oshimura, Y. Kazuki, Y. Iida, N. Uno, New vectors for gene delivery: Human and mouse artificial chromosomes. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. http://www.els.net (2013).
- Y. Yamada, S. Nishide, Y. Nakajima, T. Watanabe, Y. Ohmiya, K, Honma, and S. Honma. Monitoring circadian time in rat plasma using a secreted Cypridina luciferase reporter. Anal Biochem. 439, 80-87 (2013).
- S. Kitamura, N. Horimoto, K. Tsuji, A. Inoue, K. Takiue, H. Sugiyama, H. Makino, The selection of peritoneal mesothelial cells is important for cell therapy to prevent peritoneal fibrosis.
 Tissue Free Part A 20, 520, 520 (2014)

Tissue Eng. Part A 20, 529-539 (2014).

- F. Yang, I. Inoue, M. Kumagai, S. Takahashi, Y. Nakajima, and M. Ikeda. Real-time analysis of the circadian oscillation of the Rev-Erbβ promoter. J. Atheroscler Thromb.20, 267-276 (2013).
- T. Noguchi, M. Ikeda, Y. Ohmiya, Y. Nakajima.
 A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands.
 PLoS One 7, e37093 (2012).
- J. Myung, S. Hong, F. Hatanaka, Y. Nakajima, E,D. Schutter, and T. Takumi, Period coding of Bmal1 oscillators in the suprachiasmatic nucleus. J. Neurosci. 32, 8900-8918 (2012).
- Y. Tahara, H. Kuroda, K. Saito, Y. Nakajima, Y. Kubo, N. Ohnishi, Y. Seo, M. Otsuka, Y. Fuse, Y. Ohura,
 T. Komatsu, Y. Moriya, S. Okada, N. Furutani, A. Hirao, K. Horikawa, T. Kudo and S. Shibata,

In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. Curr. Biol. 22, 1029-1034 (2012).

- E. Miyako, T. Deguchi, Y. Nakajima, M. Yudasaka, Y. Hagihara, M. Horie, M. Shichiri, Y. Higuchi, F. Yamashita, M. Hashida, Y. Shigeri, Y. Yoshida and S. Iijima, Photothermic regulation of gene expression triggered by laser-induced carbon nanohorns. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (2012) 109, 7523-7528.
- T. Takahashi, Y. Kimura, R. Saito, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Yamasaki and S. Aiba, An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8.

Toxicol Sci. 124, 359-369 (2011).

■ 学会・国際<招待講演>

- M. Yasunaga, and Y. Nakajima, A multicolor luciferase assay system for monitoring multiple gene expressions.
 5th Symposium on Applications of Light and Materials for the Innovation of Technology and Life (2015).
- 2. Y. Nakajima,

Cell-based assay using bioluminescent reporters. AIST-TISTR-NSTDA conference (2015)

3. M. Oshimura,

Toward the development of in vitro assay for hazard assessment using human/mouse artificial chromosomes.

The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014)

4. K. Saito,

Development of novel in-vitro neurotoxicity screening tests using mouse ES cells-derived neurons.

The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014)

5. H. Kojima, M. Oshimura and N. Imatanaka,

Japanese project "ARCH-Tox" for the future chemicals management policy:research and development of in vitro and in vivo assays for internationally leading hazard assessment and test methods.

The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014)

6. Y. Nakajima,

Generation of reporter cell lines by combined use of multicolor luciferases and artificial chromosome vector.

The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014)

7. Y. Nakajima,

Development of multicolor luciferase assay system and analysis of clock gene expressions.

BfR-ZEBET Work shop (2013)

■ 学会·国際<一般発表>

- K. Saito, K. Kobayashi and N. Suzuki, Development of novel in vitro neurotoxicity screening tests using mouse ES cells-derived neurons. The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014).
- S. Wakuri, R. Saito, K. Sasaki, M. Gondo, N. Endo H. Sui and K. Yamakage, Comparison of mouse primary hepatocyte spheroids formation on Cell-able plates with various feeder cells.

The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014).

- M. Yasunaga, Y. Ohmiya, Y. Nakajima, Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution.
 14th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, (2014).
- Y. Nakajima, K. Murotomi, M. Yasunaga, T. Ohbayasi, M. Oshimura, Development of artificial chromosome vector-based luciferase assay system.
 14th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, (2014).
- 5. K. Kobayashi,

Neurite outgrowth assay using high content imaging system and analysis of neurotoxicity marker genes.

The 50th Congress of the European Societies of Toxicology (2014)

6. K. Kobayashi,

An in vitro method for neurotoxicity using neuronal cells derived from mouse embryonic stem cells.

14th international neurotoxicology association meeting (2013)

 K. Tsuji, S. Kitamura, H. Sugiyama and H. Makino, Hypoxia inducible factor-1alpha regulates branching morphogenesis in kidney development without ureteric bud cell proliferation. ASN Kidney Week 2013 (2013)

- S. Tsuji, F. Kawamura, T. Ohbayashi, Y. Kazuki, M. Oshimura, M. Tada, Dual-color system for monitoring hepatic differentiation and drug-mediated induction based on CYP3A4 and CYP3A7 expression. CiRA International Symposium (2013)
- Y. Nakajima, S. Nishii, K. Niwa, Y. Ohmiya, Development of multicolor luciferase assay system for in vitro chemical risk analysis. The 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2011)

■ 学会・国内<招待講演>

1. 斎藤 幸一

「ES/iPS 細胞を用いた安全性評価研究の現状と課題」 シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来(2016.1)

2. 中島 芳浩

「人工染色体ベクターおよび発光レポーターを用いたセルベースアッセイシステムの基盤開 発」

日本動物実験代替法学会 28 回大会(2015.12)

- 山影 康次
 「遺伝子導入マウス初代肝細胞による in vitro 肝毒性試験」
 日本動物実験代替法学会第 28 回大会(2015.12)
- 小林 久美子、鈴木 紀之、斎藤 幸一
 「マウスES細胞を用いた in vitro 神経毒性試験」
 日本動物実験代替法学会第 28 回大会(2015.12)
- 5. 大林 徹也、喜多村 真治、押村 光雄
 「哺乳類人工染色体ベクターを用いた in vitro 腎毒性試験」
 日本動物実験代替法学会第 28 回大会(2015.12)
- 5. 大林 徹也
 「哺乳類人工染色体ベクターを用いた in vitro 腎毒性試験」
 日本動物実験代替法学会 28 回大会 (2015.12)
- 7. 中島芳浩
 「染色体工学技術と生物発光レポーター技術の融合」
 鳥取大学染色体工学研究センター 産総研分室設置記念セミナー(2015.10)
- 8. 大林 徹也 「ゲノムプログラム&コントロールによる新しい遺伝子改変マウス」

第5回 合成生物工学シンポジウム(2015.8)

- 斎藤幸一
 「ES/iPS 細胞を利用した新規安全性評価技術の開発」
 第4回 CSJ フェスタ(日本化学会)、(2014.10)
- 10. 斎藤幸一

「ES/iPS 細胞の応用研究:安全性評価研究への活用」 第 28 回研究セミナー(2014.10)

11. 押村 光雄

「染色体工学による薬学への応用」 日本薬学会第134回年会(2014.3)

12. 大林 徹也

「発光遺伝子によるマルチレポーターシステムの開発と創薬スクリーニングへの応用」 日本薬学会第134回年会(2014.3)

13. 多田 政子

「染色体工学技術による簡便高感度な in vitro 肝毒性評価システムの開発」 日本薬学会第 134 年会(2014.3)

14. 押村 光雄

「人工染色体ベクターを用いた新しい in-vitro 細胞毒性評価システム」 日本実験動物代替法学会第 26 回大会(2013.12)

15. 多田 政子

「In-vitro 肝毒性評価系の構築」 日本動物実験代替法学会第 26 回大会(2013.12)

16. 喜多村 真治

「In vivo 腎毒性評価系の構築」 日本動物実験代替法学会第 26 回大会(2013.12)

17. 小林 久美子

「マウス ES 細胞を用いた in vitro 神経毒性評価系構築の検討」 日本動物実験代替法学会第 26 回大会(2013.12)

18. 大林 徹也

「人工染色体ベクター導入発光マウス由来細胞を用いた毒性評価システム」 日本実験動物代替法学会第26回大会(2013.12)

19. 中島 芳浩

「人工染色体ベクターをプラットフォームとしたルシフェラーゼアッセイシステムの構築」

日本動物実験代替法学会第26回大会(2013.12)

- 20. 喜多村 真治
 「腎臓領域再生医療の方向性~腹膜透析再生を中心に~」
 山陰 PD セミナー(2013.11)
- 21. 大林 徹也

「マルチインテグレースシステムを用いた遺伝子導入細胞・マウス作製技術」 第3回ゲノム編集研究会(2013.10)

22. 喜多村 真治

「臨床現場での腎毒性評価の現状」 第40回日本毒性学会学術年会(2013.6)

23. 喜多村 真治

「人工染色体を用いた腎臓幹細胞からの臓器作製技術による HTS 毒性評価法の開発」 第 40 回日本毒性学会学術年会(2013.6)

24. 喜多村 真治

「腎臓幹細胞からの腎臓構造再構築技術を用いた新たな評価法の開発」 第40回日本毒性学会学術年会(2013.6)

25. 多田 政子

「2 色蛍光を用いた Cell-based CYP3A4/7 遺伝子発現誘導評価法の開発」 秦野研究所研究講演会(2013.6)

26. 喜多村 真治

「成体腎臓幹/前駆細胞からの腎臓再構築時における経時的な遺伝子発現の検討」 第56回日本腎臓学会学術総会(2013.5)

27. Y. Nakajima.

「Development of artificial chromosome-based multi-color luciferase assay system.」 第 90 回日本生理学会大会 (2013.3)

28. 中島 芳浩

「生物発光技術と染色体工学の融合研究の展開」 とっとりバイオフロンティア人材育成セミナー(2012)

29. 中島 芳浩

「生物発光技術による細胞機能解析の新展開」 山形大学遺伝子実験施設第30回テクニカルセミナー(2012)

30. 中島 芳浩

「生物発光技術による細胞情報解析の新展開」

生物発光化学発光研究会第28回学術講演会特別講演(2011.10)

- 31. 喜多村 真治
 「包括的な腎臓領域再生治療~臨床応用に向けて」
 日本医工学治療学会シンポジウム(2011.4)
- 学会・国内<一般発表>
- 安永 茉由、室冨 和俊、安部 博子、山崎 友実、西井 重明、大林 徹也、押村 光雄、野口 貴子、丹羽 一樹、近江谷 克裕、中島 芳浩 「CAPN3 由来新規分解促進配列の同定と人工染色体ベクター導入細胞を用いたルシフェラーゼ アッセイの高感度化」 日本分子生物学会第 38 回大会(2015.12)
- 佐々木 澄志,若栗 忍,権藤 麻衣子,遠藤 伸子,須井 哉,山影 康次
 「マウス初代肝細胞 2 次元培養系の Cyp 遺伝子発現及び細胞毒性作用を指標とした評価.」
 日本動物実験代替法学会第 28 回大会(2015.12)
- 若栗 忍, 佐々木 澄志, 権藤 麻衣子, 遠藤 伸子, 須井 哉, 山影 康次 「In vitro 肝毒性試験の評価に適している化学物質の探索.」
 日本動物実験代替法学会第 28 回大会(2015.12)
- 若栗 忍, 齋藤 るみ子, 佐々木 澄志, 権藤 麻衣子, 遠藤 伸子, 須井 哉, 山影 康次
 「フィーダー細胞の違いによる Cell-able プレート上のマウス初代肝細胞スフェロイドにおける 肝機能の検討」
 日本動物実験代替法学会第 28 回大会(2015.12)
- 5. 辻 咲織、多田 政子
 「2 色蛍光による CYP3A7 から CYP3A4 への発現シフト評価による肝細胞毒性評価系の開発: ヒト肝がん由来細胞 HepaRG と HepG2 の利用」
 第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6)
- 6. 辻 咲織、大林 徹也、山影 康次、押村 光雄、多田 政子
 「安定型強発光レポーター発現 HepG2 細胞を用いた肝毒性のハイスループット評価系の構築」
 第 22 回肝細胞研究会(2015.6)
- 7. 中島 芳浩、安永 茉由、室冨 和俊、大林 徹也、押村 光雄
 「人工染色体ベクターを用いたレポータージーンアッセイ用発光安定細胞株の樹立」
 日本動物実験代替法学会第 27 回大会(2014.12)
- 7. 押村 光雄、中島 芳浩、香月 康宏、大林 徹也
 「人工染色体ベクターによる遺伝子導入細胞を用いた in vitro 安全性試験法の有意性」

日本実験動物代替法学会第27回大会(2014.12)

- 5. 大林 徹也、黒見 靖、吉村 祐貴、中村 和臣、遠藤 猛、中島 芳浩、近江谷 克裕、 押村 光雄 「人工染色体を用いた蛍光・発光遺伝子導入マウス ES 細胞の樹立法」 日本実験動物代替法学会第 27 回大会(2014.12)
- 若栗 忍、佐々木 澄志、権藤 麻衣子、遠藤 伸子、須井 哉、山影 康次 「in vitro 肝毒性試験の評価に適している化学物質の探索」
 日本実験動物代替法学会第 27 回大会(2014.12)
- 11. 安永 茉由、近江谷 克裕、中島 芳浩
 「甲虫由来緑色及び赤色発光ルシフェラーゼを用いた2色発光シングルセルイメージング」
 日本分子生物学会第37回大会(2014.11)
- 12. 安永 茉由、近江谷 克裕、中島 芳浩 「デュアルカラー1 細胞発光イメージングによる炎症応答反応の可視化」 生物発光化学発光研究会第 31 回学術講演会(2014.11)
- 13. 押村 光雄
 「染色体工学技術による医学・薬学への応用」
 鳥取大学染色体工学研究センター研究成果発表会(2014.2)
- 14. 大林 徹也 「マルチインテグレースシステムの開発と染色体工学技術への応用」 鳥取大学染色体工学研究センター研究成果発表会(2014.2)
- 15. 多田 政子

「染色体工学技術による in vitro 肝毒性評価システムの開発」 鳥取大学染色体工学研究センター研究成果発表会(2014.2)

- 16. 若栗 忍、斉藤 るみ子、佐々木 澄志、権藤 麻衣子、遠藤 伸子、須井 哉、山影 康次 「フィーダー細胞の違いによる Cell-ableTM プレート上のマウス初代肝細胞スフェロイドにお ける肝機能の検討」 日本動物実験代替法学会第26回大会(2013.12)
- 17. 小林 久美子, 鈴木 紀之, 桑原 篤, 安藤 覚, 住田 佳代, 斎藤 幸一
 「神経毒性評価系の In-vitro の構築」
 日本動物実験代替法学会第 26 回大会(2013.12)
- 18. 辻 憲二、喜多村 真治、井上 章子、前島 洋平、杉山 斉、槇野 博史 「成体腎臓幹/前駆細胞産生の分泌因子は急性腎障害を改善させる」 第4回分子腎臓フォーラム(2013.9)
- 19. 辻 憲二、喜多村 真治、井上 章子、前島 洋平、杉山 斉、槇野 博史

「成体腎臓幹/前駆細胞産生の分泌因子は急性腎障害を改善させる」 第12回腎保護・再生研究会(2013.7)

20. 大林 徹也

「発光・蛍光プローブ遺伝子を導入したマルチカラー細胞/マウスを迅速に作製するシステム」 光学イメージング(2013.6)

- 21. 辻 憲二、喜多村 真治、井上 章子、前島 洋平、杉山 斉、槇野 博史
 「Hypoxia-inducible factor (HIF) は尿管芽細胞増殖を介さずに尿管芽分岐を促進する」
 第 56 回日本腎臓学会学術総会(2013.5)
- 22. 川村 文彦、辻 咲織、大林 徹也、香月 康宏、押村 光雄、多田 政子
 「2 色蛍光による CYP3A4 遺伝子発現誘導性と肝細胞分化過程のライブイメージング系の開発」
 第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3)
- 小林 久美子、鈴木 紀之、桑原 篤、安藤 覚、斎藤 幸一
 「ES 細胞由来神経細胞を用いた in vitro 神経毒性試験の検討」
 日本動物実験代替法学会第 25 回大会(2012.12)
- 24. 富松 航佑、香月 康宏、押村 光雄、大林 徹也
 「細胞系譜を追跡する発光と蛍光を組み合わせた多色イメージングシステムの開発」
 第 35 回日本分子生物学会年会(2012.12)
- 25. Fumihiko Kawamura, Saori Tsuji, Tatsuya Ohbayashi, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura, Masako Tada.

「Dual-color fluorescent imaging of human CYP3A7 and CYP3A4 expression upon developmental switching and drug-mediated induction.」 第 35 回日本分子生物学会年会(2012.12)

26. Saori Tsuji, Fumihiko Kawamura, Tatsuya Ohobayashi, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura, Masako Tada.

[[]Dual-color fluorescent imaging of CYP3A4 and CYP3A7 in the human hepatic carcinoma HepG2.]

第35回日本分子生物学会年会(2012.12)

- 27. 大林 徹也、富松 航佑、中村 和臣、押村 光雄 「哺乳類人工染色体ベクターを活用した新たな遺伝子導入細胞/動物作製システム」 「細胞を創る」研究会 5.0 (2012.11)
- 28. 富松 航佑、押村 光雄、大林 徹也 「細胞系譜を追跡する、多色発光/蛍光を用いたイメージングシステムの開発」 「細胞を創る」研究会 5.0 (2012.11)

29. 大林 徹也、押村 光雄

「毒性試験法開発における人工染色体ベクターの応用」 第 39 回日本毒性学会学術年会(2012.7)

- 30. 中村 和臣、吉村 祐貴、西田 直史、香月 康宏、押村 光雄、大林 徹也 「バイオコントローラー人工染色体による次世代型遺伝子導入モデル動物の作成法の開発」 第 59 回日本実験動物学会総会(2012.5)
- 31. 吉村 祐貴、中村 和臣、中島 芳浩、香月 康宏、近江谷 克裕、押村 光雄、大林 徹也
 「発生中期マウス胎児のライブイメージングシステムの開発」
 第 34 回日本分子生物学会年会(2011.12)
- 32. T Nishida, Y Yoshimura, K Sasaki, Y Nakajima, R Saito, Y Kazuki, S Nishii, Y Ohmiya, S Aiba, M Oshimura T Ohbayashi
 「 Development of a highly sensitivity test system using chromosome engineering and bio-luminescence technology.」
 第 34 回日本分子生物学会(2011.12)
- 33. 富松 航佑,森 大吾,香月 康宏, 押村 光雄,大林 徹也
 「発光と蛍光を組み合わせた多色イメージング細胞/動物の開発」
 第 34 回日本分子生物学会(2011.12)
- 34. 佐々木 勝崇,成田 匡志,富松 航佑,西田 直史,香月 康宏,押村 光雄,大林 徹也 「ヒト人工染色体ベクターを用いた活性型 p53 モニタリング細胞の樹立」 第 34 回日本分子生物学会(2011.12)
- 35. 西田 直史、吉村 祐貴、佐々木 勝崇、中島 芳浩、齋藤 るみ子、香月 康宏、西井 重明、近江 谷 克裕、相場 節也、押村 光雄、大林 徹也 「ヒト人工染色体ベクターを用いた高感度毒性評価システムの開発」 日本実験動物代替法学会 第 24 回大会(2011.11)
- 36. 吉村 祐貴、中村 和臣、中島 芳浩、香月 康宏、近江谷 克裕、押村 光雄、大林 徹也
 「ヒト人工染色体ベクターを用いた in vitro / in vivo デュアルバイオイメージングシステムの
 開発」
 日本実験動物代替法学会 第 24 回大会(2011.11)
- 37. 大林 徹也、吉村 祐貴、西田 直史、中島 芳浩、香月 康宏、近江谷 克裕、押村 光雄 「人工染色体ベクターと多色・多様発光システムを融合した細胞アッセイシステムの開発」 日本実験動物代替法学会 第 24 回大会(2011.11)

■ 国民との科学・技術対話

1. 「大学での研究成果を企業化する試み ージェイファーマ(株)を例としてー」

大学での研究成果を如何に知財化し、起業するかについての自験例紹介および考察(2016.2)

- 「新規バイオ事業の立ち上げ戦略 一技術をもとに事業をつくるー バイオ技術を活用した、海外における新規事業立ち上げの要諦を掴み、今後のビジネスチャン スを探る。(2015.12)
- 「新規バイオ事業の立ち上げ戦略 一技術をもとに事業をつくるー バイオ技術を活用した、海外における新規事業立ち上げの要諦を掴み、今後のビジネスチャン スを探る。(2015.12)
- 「技術習得セミナー」
 iPS 細胞を中心とした染色体解析技術講習会(2015.11)
- 5. 「生物工学講座」 生物工学の基本となる細胞遺伝子、生物化学、生物環境について広く学ぶ(2015.9)
- 「食品の機能性と安全性評価法」
 食品表示法における食品の機能性と安全性評価、およびヒト培養細胞 3 次元再構築モデルを用いた安全性試験について学ぶ(2015.9)
- 「抗体医薬の来し方行く末」
 抗体医薬研究開発の歴史を技術の視点から振り返るとともに、この領域における次なるイノベ ーションについて(2015.6)
- 「医薬品の創製・開発研究の動向と展望-Right Target, Right」
 今後の医薬品の創製・開発研究の動向と展望 Molecule, Right Patient-(2015.6)
- 「バイオ分野におけるプレゼンテーションスキル向上セミナー」
 研究者・技術者にも必須のビジネスプレゼンスキル。共感でツカミ、論理で納得を得る。(2014.4)
- 「創薬の最新トレンドとクラスター形成の可能性」
 創薬業界のグローバル状況、時代の流れ、今後の業界動向についての最新事情を交えながら、
 今後のビジネスチャンスを探る。(2015.3)
- 「技術習得セミナー」
 化学物質管理研修会(2015.3)
- 12. 「肝臓ストレスとストレス応答(傷害と再生)の分子機構の解析と動向理解の試み」 肝臓(肝細胞)に対する参加ストレスとストレス応答(防御機構)の分子メカニズムと光による生体 イメージング法による解析成果を理解する(2014.12)
- 13. 「部位特異的ヌクレアーゼを用いた培養細胞や動物でのゲノム編集」 ゲノム編集技術の動向および最先端の知見を学ぶ(2014.12)
- 14. 「地方で新しいライフサイエンスビジネスを成功させるには」

シーズ発掘、人材獲得、資金調達、臨床開発等の観点から考察した講義(2014.10)

- 15. 「技術士第一次試験対策講座(生物工学講座)」
 技術士第一次試験対策を目的とした生物工学講座(2014.9)
- 16. 「Carl Zeiss 相談会」 とっとりバイオフロンティアの開放機器「染色体解析専用顕微鏡」の使用方法説明会(2014.8)
- 17.「染色体工学セミナー」ヒト iPS 細胞の染色体標本作製、ヒト染色体解析の技術講座(2014.7)
- 18.「出会いと共感が産みだすイノベーション~20年後を創る皆さんに期待すること~」 効率的な分泌タンパク発現トランスジェニックキメラマウス作製技術および人材育成に関する 講義(2014.6)
- 「温故知新 ~がんの兵糧攻め~」
 研究人生を振り返り、今後のがん研究への指針を提案する(2014.5)
- 20. 「鳥取大学染色体工学研究センター研究成果発表会」 鳥取大学染色体工学研究センターの研究成果を東京で発表し、染色体工学技術を活用した実例 を紹介。(2014.2)
- 21. 「知的財産を守る・活かす勉強会」 県外から講師を招き知的財産について学ぶ。医学博士を取得された弁理士による、ライフサイ エンスの観点から知的財産をどのように活用していくかを学ぶ(2013.10)
- 22. 「染色体工学セミナー」
 染色体工学研究に必要な各種解析法について実験手技・手法および観察・解析法習得を目指す
 実践的な講座(2013.9)
- 23. 「研究開発戦略のための人脈づくり講座」 「製薬企業が置かれている環境と将来展望」をテーマに、多方面から考察。人工染色体工学技術の創薬研究についてもディスカッションを行った(2013.7)
- 24. 「共焦点レーザー顕微鏡個別相談会」 メーカーの担当者により実験者個々のニーズに合わせた使用方法を説明した(2013.7)
- 25. 「バイオフロンティアセミナー」 創薬関連企業研究者の育成事業を専門に行う研究機関の協力のもとに開催し、創薬研究のほか 就職、キャリアマネジメントについても紹介(2013.6)
- 「ライフサイエンスにおける新たな電子顕微鏡技術の展開」
 ライフサイエンスにおける電子顕微鏡技術のトレンドを概説すると共に、注目されている①
 FIB/SEM Volume 3 D Imaging、②Correlative Microscopy(蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の相関顕微 鏡法)、Cryo 電子顕微鏡法を事例とともに紹介(2013.4)

- 27. 「実験動物技術セミナー」採卵、体外受精、凍結保存、胚移植などの技術習得を目指す実習形式の講座(2012.12)
- 28. 「研究開発戦略セミナー」 医薬品開発研究における戦略としてどのようなものか効果的か、さまざまな視点から分析し、 有効な戦略を選択することができる人材を育成することを目指した講座(2012.11)
- 29. 「食品・医薬品・化学薬品の毒性勉強」 安全性・毒性評価の現場で実際に活躍する専門家を講師とした様々な場面における安全性評価の現状と今後の展開について講義(2012.11)
- 30. 「バイオビジネス戦略入門」 「製品を開発するだけでなく、ビジネスとして成功させるためには何が必要か」など販売戦略・ 製品開発戦略について、地方のバイオ中小企業をモデルとした事例に対してグループディスカ ッションで挑むビジネススクール形式の講座(2012.9)
- 31. 「バイオベンチャー起業化のための人材育成講座」
 医薬品開発を支援するバイオベンチャー企業を立ち上げるための人脈の作り方、起業化精神の
 養成、医薬品開発の知識について解説する講座(2012.8~10、計3回)
- 32. 「染色体工学セミナー」 染色体工学研究に必要な各種解析法についての実験手技・手法および観察・解析法の習得を目 指す実践的な講座(2012.8)
- バイオフロンティアってなあに?」
 施設見学を兼ねて開催したとっとりバイオフロンティアについて広く知ってもらうための講座。
 染色体工学やバイオビジネスについて一般向けのわかりやすい講義を行なった(2012.7)
- 34. 「食品・医薬品・化学薬品の毒性勉強」 安全性・毒性評価の現場で実際に活躍する専門家を講師とした様々な場面における安全性評価の現状と今後の展開について講義(2012.6)
- 35. 「バイオフロンティアセミナー」 鳥取県外から講師を招いて行なった創薬に必要な薬物動態のメカニズムから創薬関連ベンチャ 一の起業についてなど幅広い内容の講義(2012.6)
- 36. 「染色体工学技術講座」

染色体工学研究を行う上で必要となる基本的な実験操作を教えることで、適切な染色体工学実 験を行える人材の育成を目指す講座(平成23年度、計6回)

37. 「バイオビジネス講座」

新製品開発戦略のポイントとは何か、技術開発と市場戦略をどう組み合わせるのか、単に製品 を開発するだけでなく、ビジネスとして成功させるためには何が必要か」―地方のバイオ中小 企業をモデルとした事例研究(ケーススタディ)によるビジネススクール形式の講座(平成 23 年度、計4回)

38. 「バイオ実験技術講座」

バイオ実験の基本となる細胞・遺伝子を用いた基本的な実験手法を教えることで、鳥取県のバ イオ産業の発展に寄与できる人材の育成を目指す講座(平成 23 年度、計6回)

39. 「バイオ基礎知識講座」

生命現象の基礎となる生体内の種々の構造・機能・反応から、遺伝子・染色体・細胞や代謝の 概念について幅広く教えることで、バイオに関しての知見を深めると共に、バイオ研究に興味 を持って取り組める人材の育成を目指す講座(平成 23 年度、計4回)

40. 「実験機器使用説明講座」
 とっとりバイオフロンティアに設置してある機器の操作方法や解析方法などについて説明を行う講座(平成 23 年度、計4回)

■ 特許

 中島 芳浩、室冨 和俊、安永 茉由、大林 徹也、押村 光雄 人工染色体ベクター及び形質転換哺乳類細胞 特願 2013-263910、特開 2015-119643

■ 受賞

1. 中島 芳浩

The award for the most innovative and highest quality scientific presentation in 18th International Symposium of Bioluminescence and Chemiluminescence (2015)