

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」 事後評価分科会説明資料

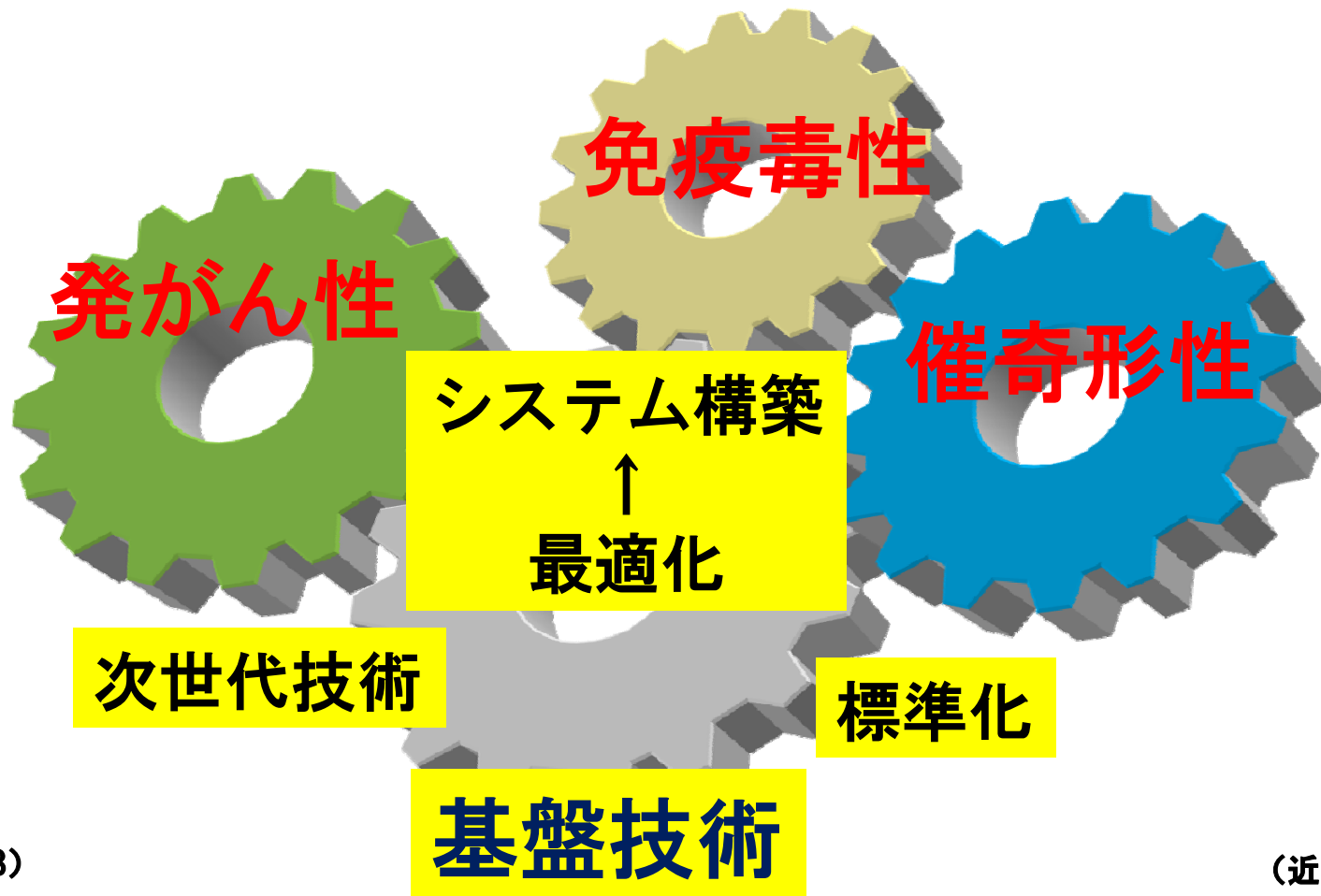
5. プロジェクトの詳細説明

5.1 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発の成果

(4) 基盤技術による成果

培養細胞を用いた有害性評価手法の開発のための基盤技術の形成

- ①多色発光システムの最適化と評価細胞の樹立（東洋紡&産総研）
- ②多色発光システムの測定法の標準化（産総研）
- ③ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築（鳥取大学）



多色発光システムとは

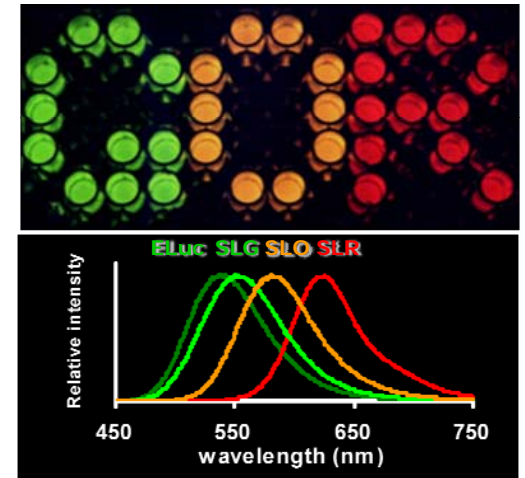
公開

マルチレポーターアッセイ法 (NEDO細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発の研究成果) の原理とそのメリット

ルシフェラーゼ	シンボル	λ max
エメラルドLuc	ELuc	538 nm
緑色発光Luc	SLG	550 nm
橙色発光Luc	SLO	580 nm
赤色発光Luc	SLR	630 nm

高強度ルシフェラーゼ
Emerald Luc System

3色ルシフェラーゼ
Multireporter Assay
System -Tripluc®-

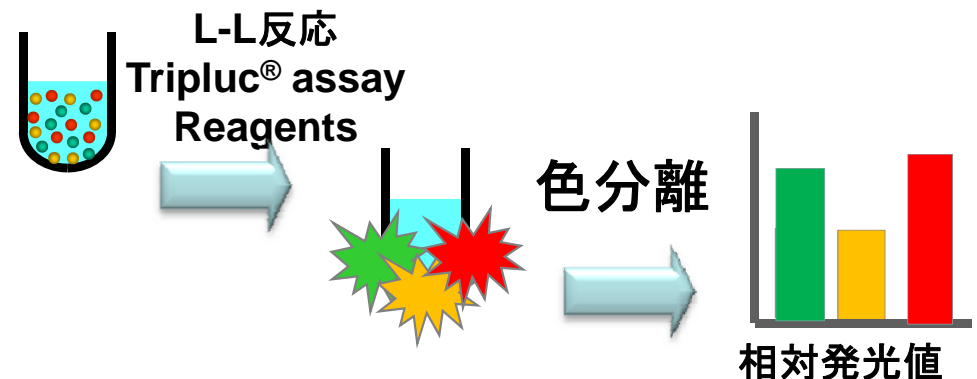
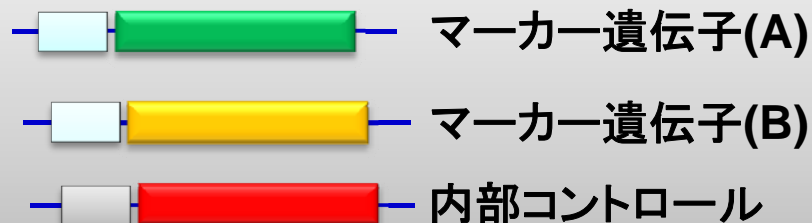


メリット1

同時に3つの遺伝子発現を検出できる

メリット2

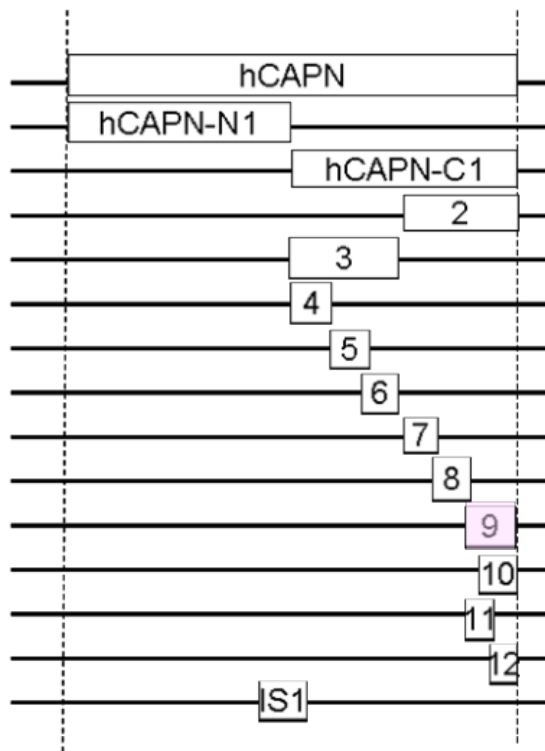
1基質で発する3色の光は色フィルターで分離、計測できる



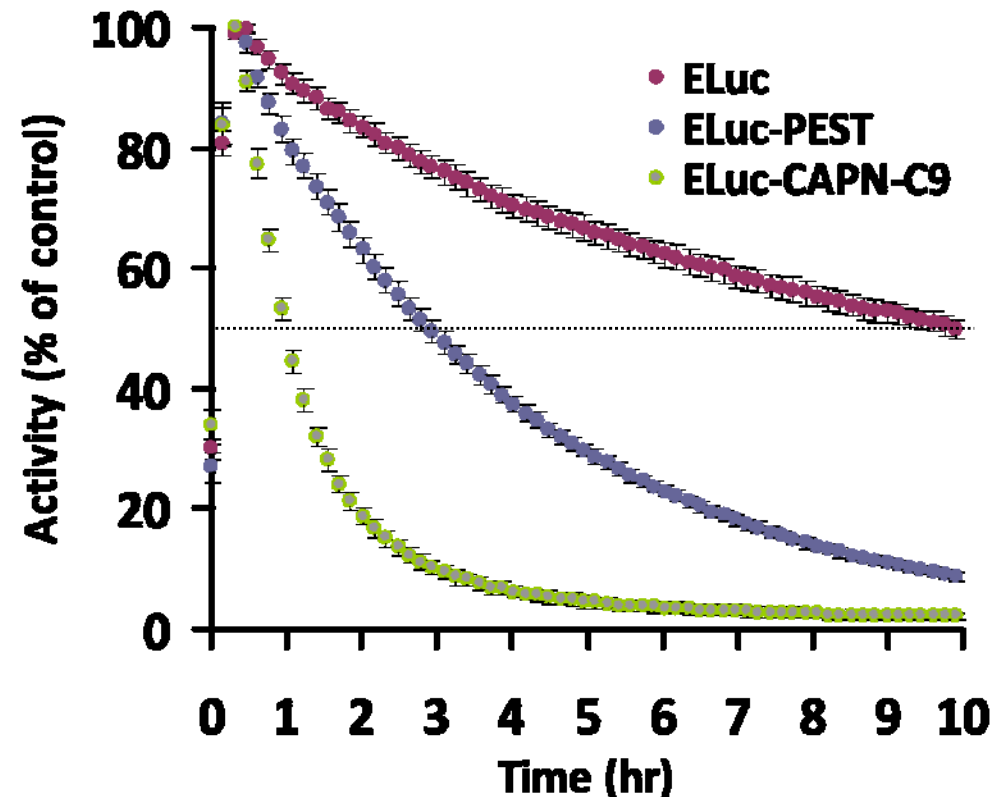
①多色発光システムの最適化と評価細胞の構築

公開

①-1-1 毒性評価用発光プローブの最適化：細胞内安定性制御



hCAPN	(410A.A.)
hCAPN-N1	(202A.A.)
hCAPN-C1	(317A.A.)
hCAPN-C2	(208A.A.)
hCAPN-C3	(109A.A.)
hCAPN-C4	(35A.A.)
hCAPN-C5	(33A.A.)
hCAPN-C6	(31A.A.)
hCAPN-C7	(33A.A.)
hCAPN-C8	(34A.A.)
hCAPN-C9	(42A.A.)
hCAPN-C10	(32A.A.)
hCAPN-C11	(20A.A.)
hCAPN-C12	(22A.A.)
hCAPN-IS1	(63A.A.)

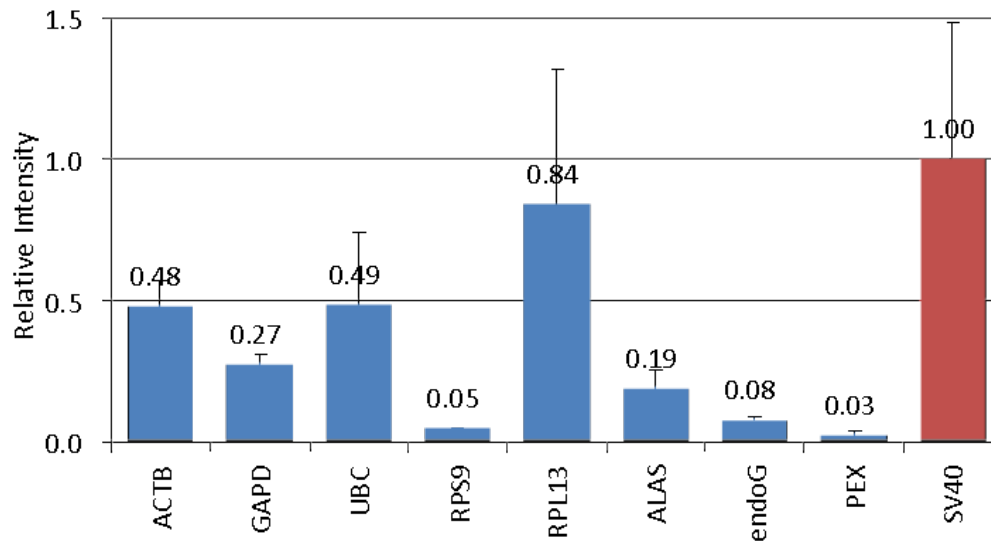


- Calpain3の部分配列(42アミノ酸)により短寿命型発光プローブを創出
- 応答性の速い遺伝子発現の検出精度を向上(特願2007-312466)

①多色発光システムの最適化と評価細胞の構築

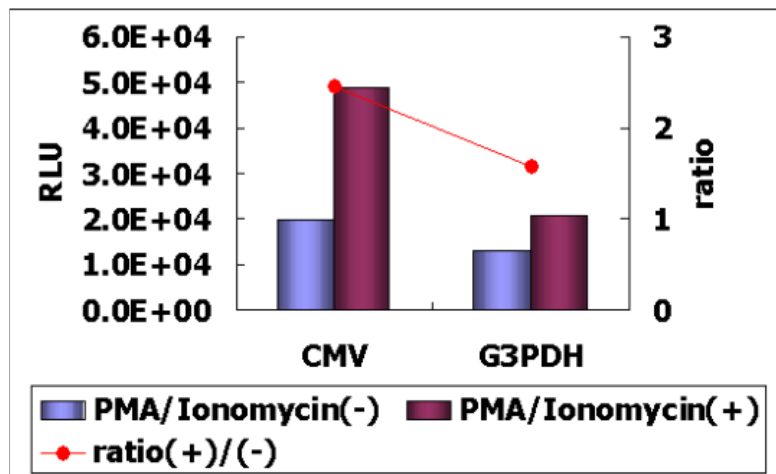
公開

①-1-2 毒性評価用発光プローブの最適化：免疫毒性評価コントロール用プロモーター配列の特定



汎用性ウイルス由来プロモーターはPMA/Ionomycin刺激に対してシグナルが大きく変動

各種内在性ハウスキーピング遺伝子プロモーターについて、シグナル強度及びPMA/Ionomycin刺激に対する安定性を比較



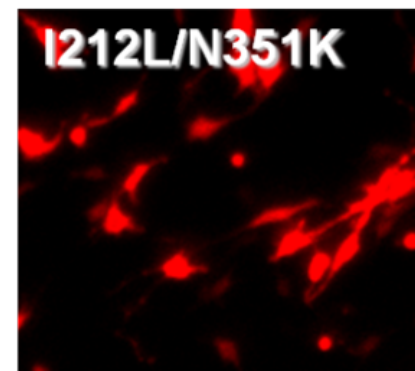
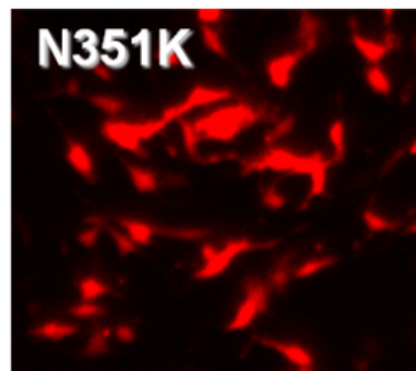
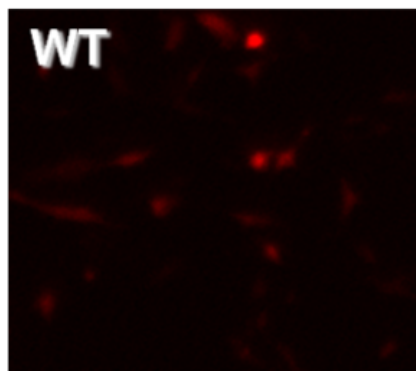
シグナル強度、安定性、発現解析の相関からG3PDHプロモーターをインターナルコントロールとして採用

①多色発光システムの最適化と評価細胞の構築

公開

①-1-3 毒性評価用発光プローブの最適化：赤色発光ルシフェラーゼの高機能化

Luciferases	λ_{\max} (nm)	Remaining activity (%)		Extract-based activity
		10 min	20 min	
WT	630 \pm 1	5.2	0.5	1.0
I212L	630 \pm 1	31.8	9.1	8.4
N351K	621 \pm 1	3.0	0.3	1.2
S463R	631 \pm 2	6.2	0.5	0.6
I212L/N351K	619 \pm 1	23.0	4.2	9.8
I212L/S463R	631 \pm 1	50.0	22.1	7.8



Li X. et al., Protein Science, **19**, 26-33 (2010)

(特願2009-199503、特願2009-199543)

①多色発光システムの最適化と評価細胞の構築

公開

①-2-1 免疫毒性評価用細胞の樹立

細胞種	T細胞	樹状細胞	
宿主細胞	Jurkat	U937	THP-1
-SLG(Hyg)	IL2	IL1 β	IL1 β
-SLO(Neo)	IFN γ	IL8	IL8
安定発現株			
免疫毒性	<ul style="list-style-type: none"> アレルギー誘発作用 (Th1/Th2バランス) 自己免疫誘発作用 免疫抑制作用 	<ul style="list-style-type: none"> 活性酸素ストレス 免疫賦活作用 自己免疫誘発作用 免疫抑制作用 	<ul style="list-style-type: none"> 活性酸素ストレス 免疫賦活作用 自己免疫誘発作用 免疫抑制作用
作製状況	作製済み	作製済み	作成済み

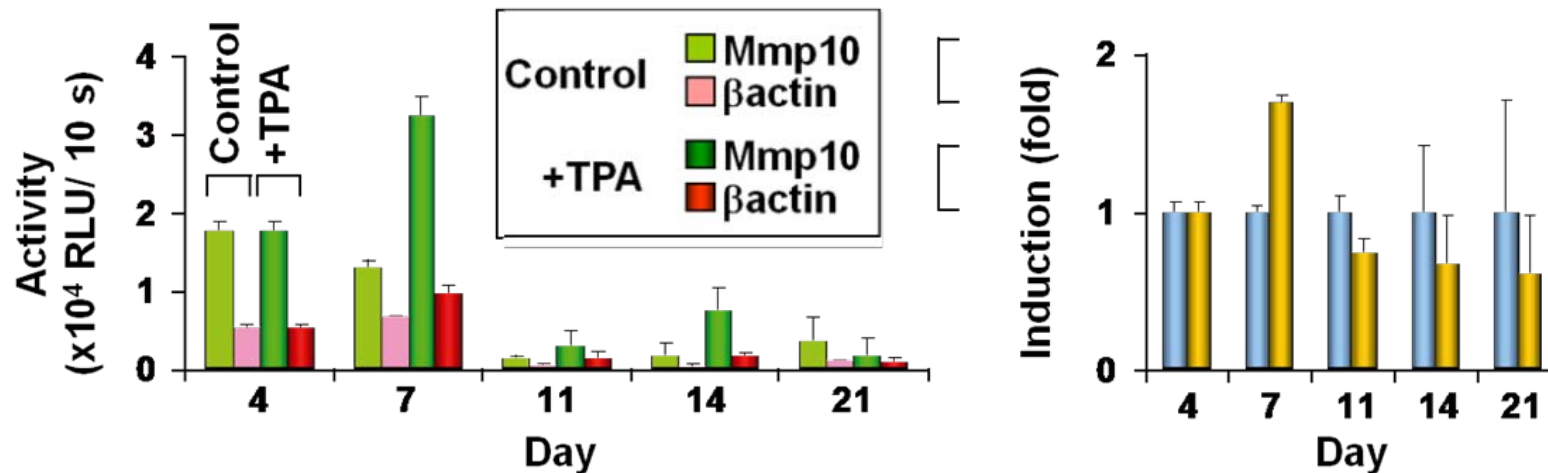
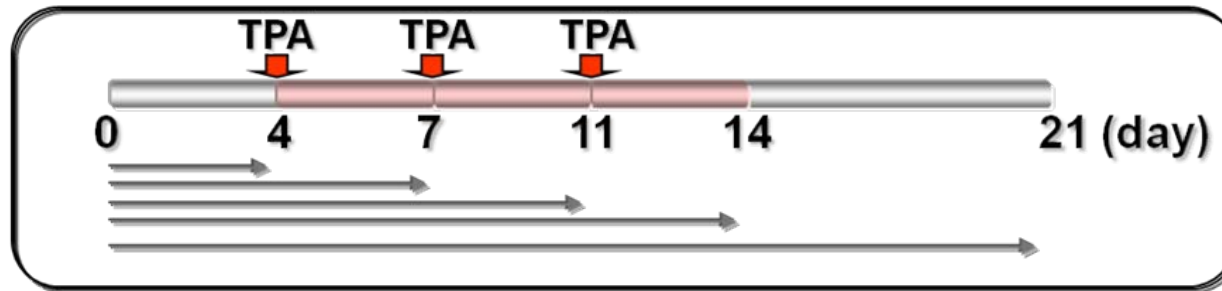
特願2010-151362

①多色発光システムの最適化と評価細胞の構築

公開

①-2-2 発がん性評価用細胞の樹立

Mmp10-SLG; β -actin-SLR/Bhas42安定株のTPA応答



- Bhas42多色発光細胞(Mmp10-SLG; β -actin-SLR)を樹立
- 予備実験的にアッセイ方法を確立

②多色発光システムの測定法の標準化

公開

課題の背景及びストラテジー

●光電子増倍管の感度(波長感度特性)は製品毎に異なる為、相対値測定しか出来ない。

- 異なる施設でのアッセイ結果の比較
- 細胞の継代安定性
- 細胞の品質管理
- 発光試薬、発光測定装置の再現性

標準光源による装置の絶対感度校正により解決

精製標品(ルシフェラーゼタンパク質)が標準光源として使えるかを検討



標準光源による校正



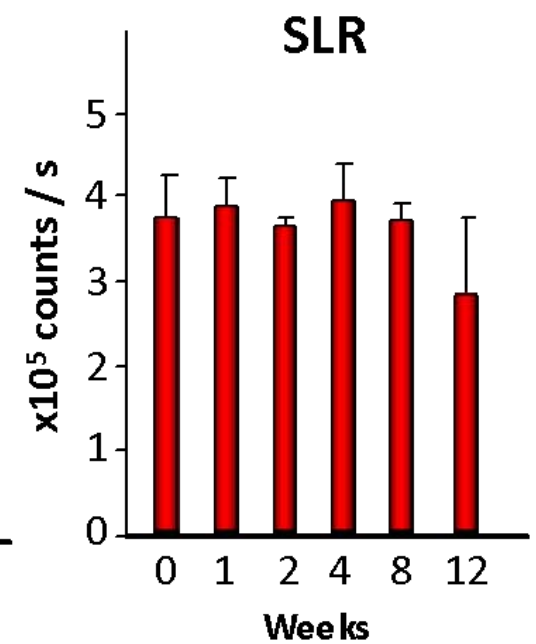
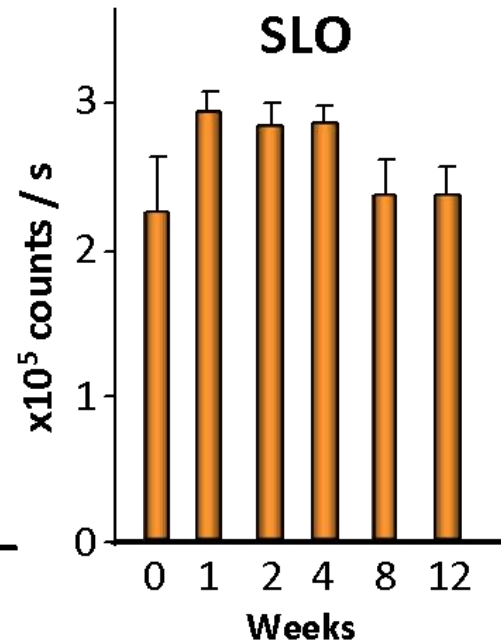
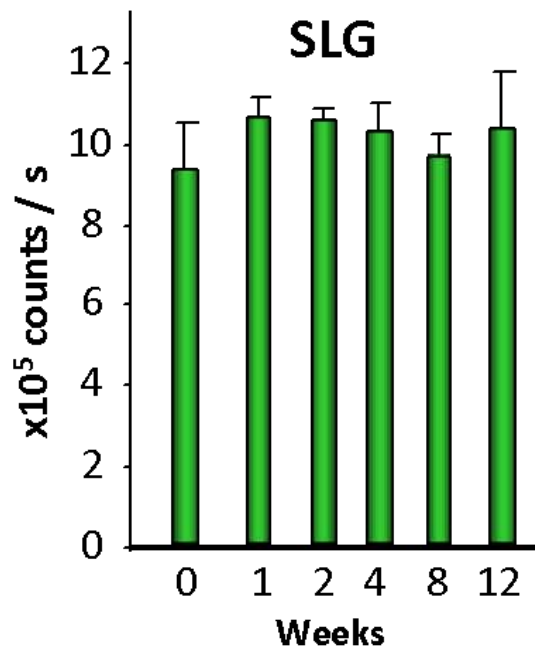
- 精製標品の値付け
- 精製標品の保存安定性
- 測定装置間の校正

②多色発光システムの測定法の標準化

公開

②-1 ルシフェラーゼ標品の調製と長期保存安定条件の検討

凍結乾燥品
4°C保存
↓
精製標品5 μl
Tripluc 50 μl
10分インキュベーション
後測定



②多色発光システムの測定法の標準化

公開

②-2 ルシフェラーゼ標品を用いた装置間感度校正



精製リコンビナント標品



同時測定
(MRA301)



絶対感度校正済み基準機

酵素	photons/count
SLG	1508
SLO	1909
SLR	3872



0.3%以下の誤差
範囲内で計測可能



未校正機

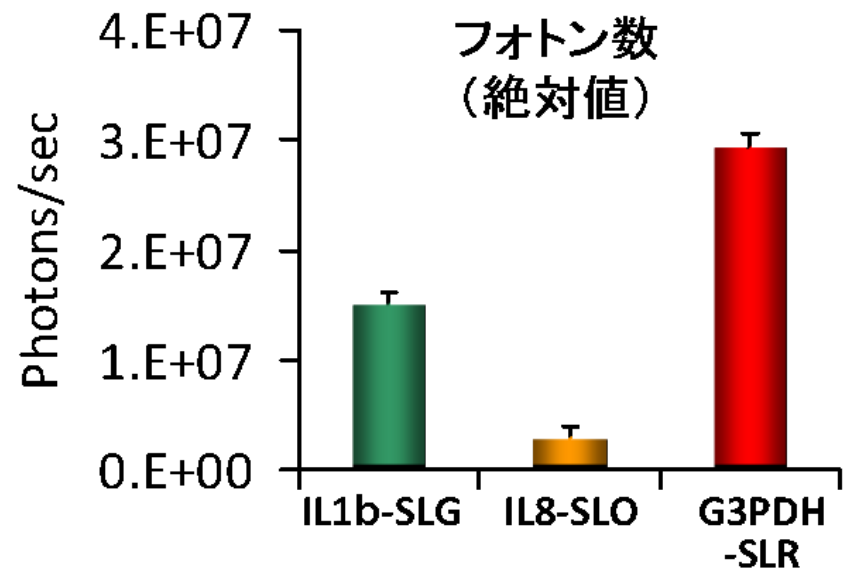
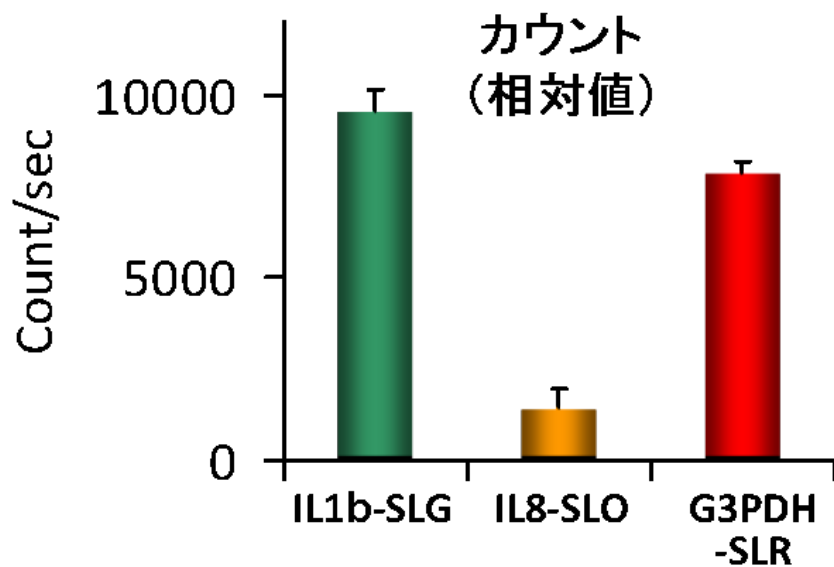
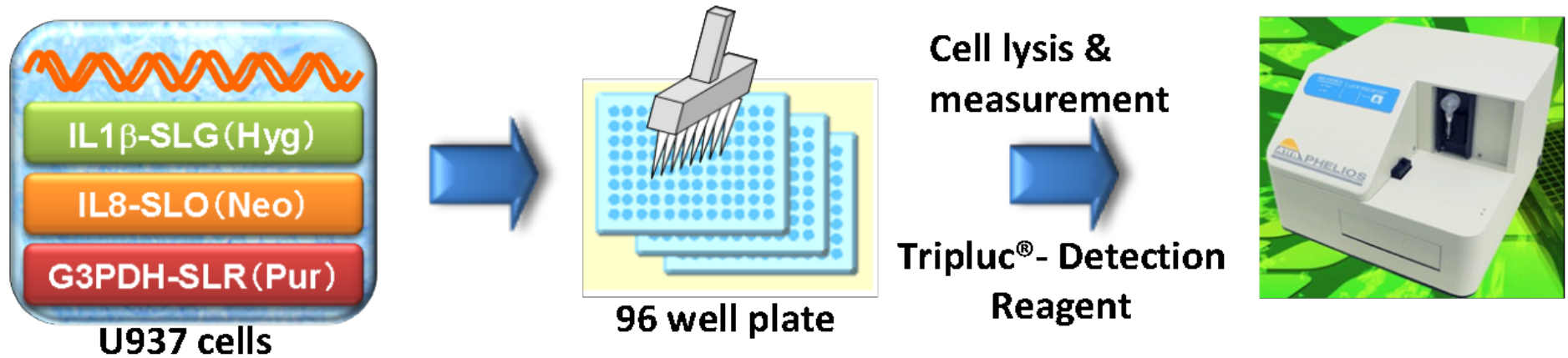
酵素	photons/count
SLG	1583
SLO	2004
SLR	3756

- 精製標品により高精度で装置間の感度校正が可能
- 施設間の測定結果の比較が可能

②多色発光システムの測定法の標準化

公開

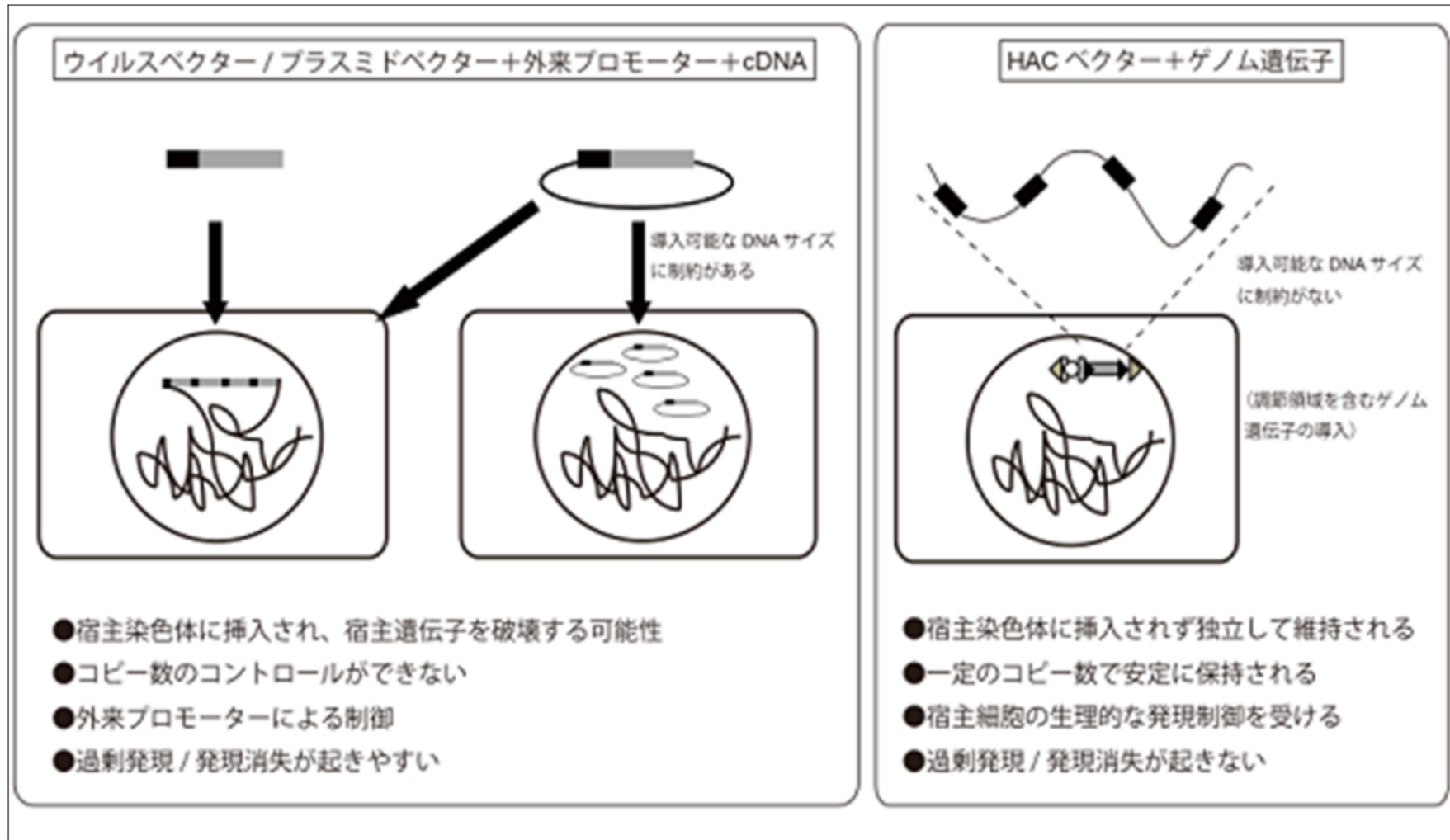
②-3 ルシフェラーゼ標品を用いた3色発光細胞の測定校正



③ ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築

公開

③-1 人工染色体ベクターの概略

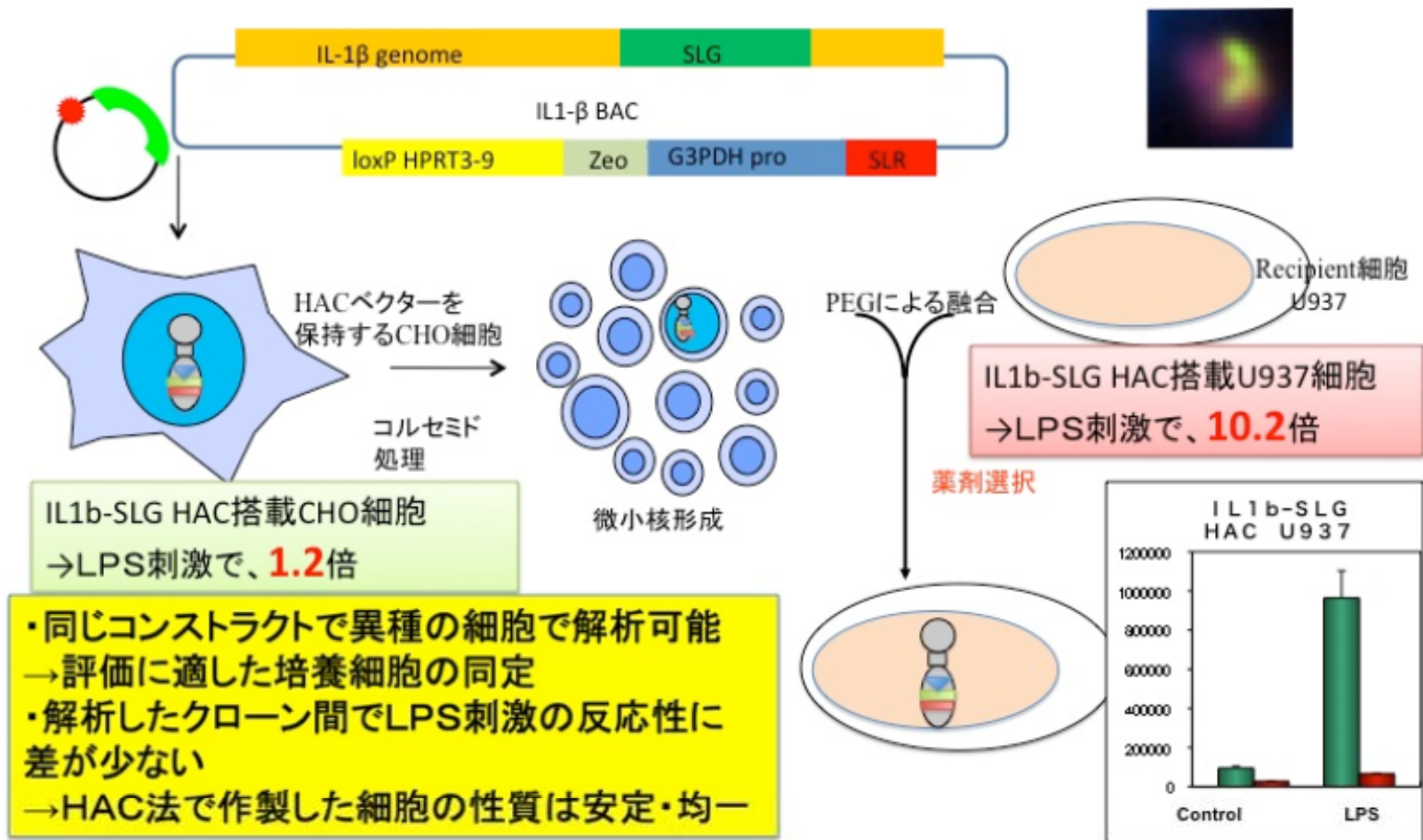


③ ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築

公開

③-2 ヒト人工染色体ベクターを用いた免疫毒性評価細胞の樹立

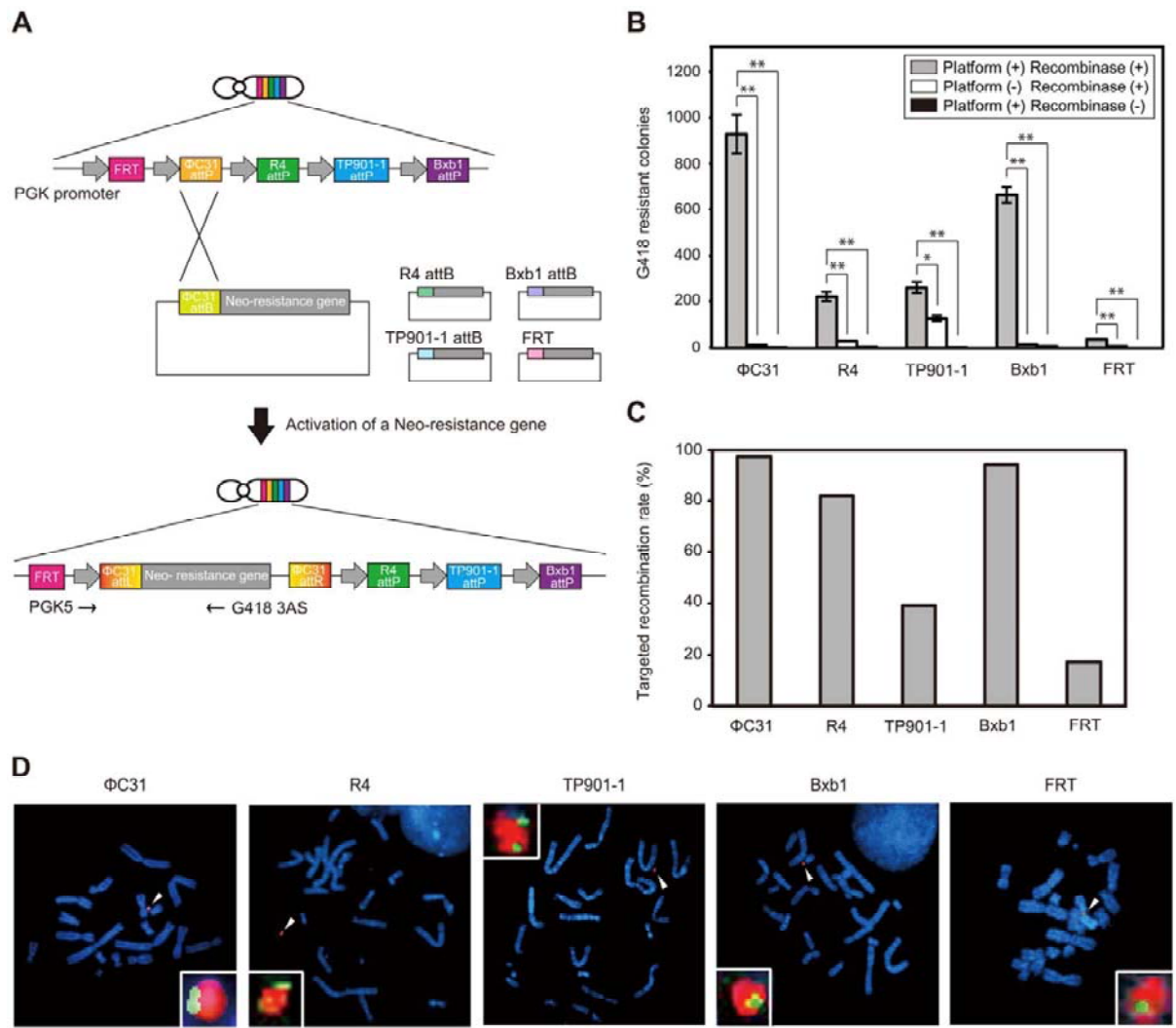
HACベクターを用いた毒性評価細胞の樹立法の開発



③ ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築

公開

③-3 ヒト人工染色体ベクターに複数遺伝子を導入するシステムの開発



最終目標と達成状況

公開

研究開発課題	最終目標(平成22年度末)	最終目標の達成状況	達成度
D 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発	遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、試験期間1か月程度で免疫毒性を予測評価できる試験方法を開発し、標準的な試験プロトコールを取りまとめる。	<p>① 多色発光システムの最適化と評価細胞の樹立：細胞内安定性や耐熱性が向上した各種発光プローブの改良に成功した。これらのプローブを基盤に免疫毒性評価3色発光細胞、発がん毒性評価2色発光細胞の樹立に成功した。</p> <p>② 多色発光システムの測定法の標準化：標準発光物質として値付けされたルシフェラーゼタンパク質の作製、これを標準光源の代替とした発光測定装置ルミノメーターの絶対感度校正法を確立した。</p> <p>③ ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築：毒性評価発光細胞の安定化及び効率的な作成法を確立するため、ヒト人工染色体(HAC)技術を活用、HAC発光ベクターを導入した免疫毒性評価用細胞を樹立した。また、多色発光プローブとHACベクターをマルチインテグレーションシステムで融合させた多色発光遺伝子導入システムの開発に成功した。</p>	<p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p>

多色発光細胞の標準化の国際展開

2011.1



ドイツ ZEBET

2011.6

米国 ICCVAM
TOX21

2011.7

韓国 KoCVAM

日本 JaCVAM

欧州政府 ECVAM



2011.1

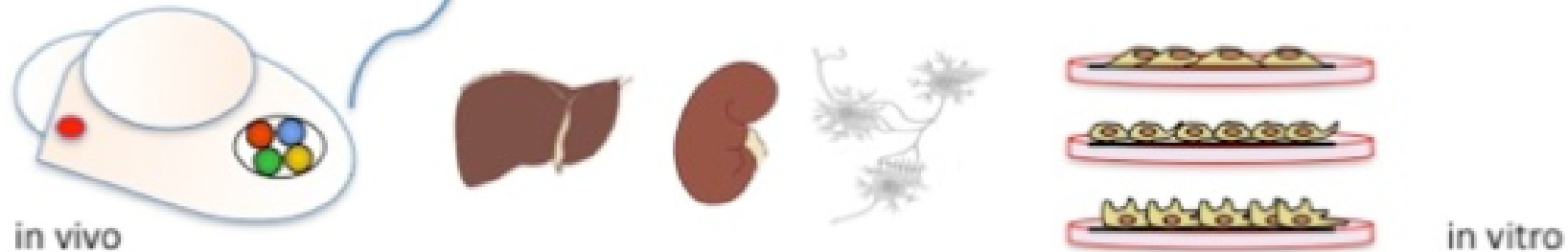
OECD化学物質管理ガイドラインのための
テクニカルノートを作成を目指す

今後の展開

公開

培養細胞を用いた代替法開発に必要な課題に対して
ヒト人工染色体ベクターが果たすべき次なる課題

人工染色体導入マウス (in vivo) /人工染色体導入培養細胞 (in vitro)を
相互評価できるシステムを開発し、培養細胞を用いたin vitro試験に
科学的なエビデンスをもたせることで、信頼性高める



動物を用いた実験 → 反応や精度(信頼性)は高いが、効率が悪い。
細胞を用いた実験 → 効率は良くHTS対応可能。個体での反応を反映させるのが困難

