

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規*in vitro*有害性評価手法の確立

令和4年度～6年度 総合・分担研究報告書

研究代表者 戸塚 ゆ加里

令和7年（2025）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 <i>in vitro</i> 有害性評価手法の確立	
戸塚 ゆ加里	1
II. 分担総合研究報告	
1. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発	21
戸塚 ゆ加里	
2. 毒性評価・ゲノム発現解析	31
藤岡 正喜	
3. マウスオルガノイドを用いた一般毒性試験系構築	36
今井 俊夫	
4. オルガノイド培養・エピゲノム変異解析	39
成瀬 美衣	
5. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発	43
美谷島 克宏	
6. 一時線毛の各種化学物質による毒性評価への応用	45
渡邊 昌俊	
7. 一時線毛の各種化学物質による毒性評価への応用	47
広川 佳史	
8. 一次線毛の分子基盤解析	50
西村 有平	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

研究代表者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学 教授

研究要旨

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、従来は実験動物を用いた反復投与試験が広く行われてきたが、動物愛護の観点から代替法の導入が強く求められている。本研究では、マウス肝臓オルガノイドを用いた新たな *in vitro* 毒性評価系の確立を目的とし、安定した培養条件や解析手法の最適化を行った。

まず、マトリゲルとオルガノイドを混合してドーム状に播種し、専用培地（OGM）を用いることで、長期間にわたる安定培養が可能であることを確認した。評価法としては、発光測定法および生細胞数計測法のいずれでも適切な毒性判定が可能であり、細胞毒性試験の指標として活用できることが示された。さらに、2施設において同一プロトコルで培養されたオルガノイドの遺伝子発現を比較したところ、肝細胞や前駆細胞、胆管細胞のマーカー遺伝子において大きな差異は認められず、評価結果の再現性が高いことが確認された。被験物質として、フェノバルビタール（PB）、カルバミン酸エチル（EC）、モノクロタリン（MCT）、クマリン（CMR）、アセトアミノフェン（APAP）の5化合物を用いて曝露実験を実施した結果、いずれも濃度依存的に細胞生存率が低下することが確認された。小核試験では、EC、CMR、MCT、APAPにおいて小核出現頻度の上昇がみられ、特にMCTでは最も高い頻度を示した。一方、PBではコントロールと同程度であった。さらに、MCT曝露後のオルガノイドを対象に *ec*-NGS解析を行ったところ、1塩基置換変異の頻度上昇に加え、C>A変異の割合が顕著に増加し、変異シグネチャーの変化も検出された。MCTはAmes試験では陰性となるが、本研究では変異原性を陽性と捉えることができ、オルガノイドモデルの有効性が裏付けられた。また、マウス肝臓に同様の化学物質を投与した *in vivo* データとオルガノイドの遺伝子発現を比較した結果、炎症関連パスウェイやHepatic steatosisに関する応答に共通性が認められ、オルガノイド系が *in vivo* との相関性を持つことが示唆された。メチル化解析では大きな共通パターンは得られなかったが、一部に高メチル化領域が認められ、今後の解析精度向上が期待される。さらに、マウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛の形態解析法を確立し、フェノバルビタール曝露による中心小体の増加を観察した。中心小体の過剰複製は染色体不安定性と関連することから、発がん予測の新たな指標となる可能性が示された。

これらの結果から、マウス肝臓オルガノイドは、細胞毒性、ゲノム変異、エピゲノム、さらには細胞構造に至るまでの多面的な評価が可能な高度な *in vitro* 評価系であり、化学物質の安全性評価における動物実験代替法としての有用性が極めて高いことが明らかとなった。今後は、ヒトオルガノイドや免疫・間質細胞との共培養系への応用、さらには評価指標の標準化および自動化を通じて、より実用的で高精度な毒性評価法としての展開が期待される。

研究分担者

藤岡 正喜	大阪公立大学大学院 医学研究科 分子病理学 講師
今井 俊夫	国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 がんモデル開発部 部門長
成瀬 美衣	国立感染症研究所・ウィルス第一部 主任研究官 国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所 動物実験施設 研究員
美谷島克宏	東京農業大学応用生物科学部 食品安全健康学科 教授
渡邊 昌俊	三重大学大学院医学系研究科 教授
広川 佳史	三重大学大学院医学系研究科 准教授
西村 有平	三重大学大学院医学系研究科 統合薬理学 教授

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかしながら、現在汎用されている *in vitro* 毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界があるため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。近年、3次元オルガノイド培養法の発展により様々な組織由来の正常細胞を長期培養することが可能となってきた。オルガノイドは *in vitro* 系で幹細胞から作ることができミニチュアの臓器とも言われており、幹細胞がもつ自己複製能と分化能を利用し自己組織化させることで臓器あるいは器官に特異的な3次元構造を形成し、その機能を再現することが可能である。このことから発生生物学、疾患病理学、細胞生物学、再生メカニズムといった基礎研究や創薬研究など多岐にわたる研究分野で使用されている。申請者はこれまでに、レポーター遺伝子導入マウス由来のオルガノイドを用いて遺伝毒性試験を実施した結果、細菌や哺乳類細胞を用いる既存の試験法では検出できず、*in vivo* モデルでのみ検出できる化学物質の点突然変異をオルガノイドでは陽性と判定できることを明らかにした (Komiyama M, Totsuka Y et al., 2021)。

本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法を確立するため、市販のマウス肝臓オルガノイドを用いて、①培養ならびに化学物質曝露実験の至適条件の決定、②オルガノイドの安定性評価を行った。そして、既知の遺伝毒性化学物質、非遺伝毒性化学物質、肝毒性物質を用いて化学物質曝露実験を行い、③細胞毒性試験、④細胞形態変化評価、⑤小核試験、⑥Error-Corrected NGS (ec-NGS) によるゲノム変異解析について実施した。また、マウス肝臓オルガノイドに既知の肝発がん物質をはじめとした被験物質をばく露し、その遺伝子発現変化について検討することで、化学物質の毒性の有無およびその機序について予測可能かどうか、検討を行った。さらに、同様の被験物質を4週間あるいは13週間投与し得られたマウス肝臓を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、マウス肝臓オルガノイドと比較検討することで、*in vivo* (マウス肝臓) および *in vitro* (マウス肝臓オルガノイド) における相関性について検討を行った。そして、肝臓オルガノイド培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価系の確立を目指すため、実際にマウスを用いて *in vivo* 毒性評価を実施し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかにについて検証することを目的とした。

一次線毛は細胞膜上の突起物で、細胞内シグナルのハブと認識され、腫瘍細胞では発現が消失するなど各種生命現象への関与を報告している。一次線毛発現と既存の各種細胞株との関係を解明し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行う。これまで毒性評価に応用されていない一次線毛に着目し、化学物質と一次線毛との分子生物学的関連性および共培養系およびオルガノイドにおける細胞病理学的および機能解析を行い、一次線毛の発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的とする。

B. 研究方法

本研究では、各施設で使用する被検物質が同じになるように調整して研究を実施した。

各施設で使用した化学物質は以下の表にまとめる。

表1 各施設における評価方法と使用した化学物質

実験施設	評価方法	使用化学物質
星薬科大学	オルガノイドを用いた遺伝毒性	フェノバルビタール (PB)、カルバミン酸エチル (EC)、モノクロタリン (MCT)、クマリン (CMR)
国立がん研究センター (国立感染症研究所)	オルガノイドを用いたエピゲノム変化	PB
大阪公立大学	マウスおよびオルガノイドを用いた遺伝子発現変化	PB, EC, MCT, CMR, アセトアミノフェン (APAP)
東京農業大学	<i>In vivo</i> 毒性試験	PB, EC, MCT, CMR, APAP, アクリルアミド
三重大学	一次線毛の分子基盤解析とオルガノイド評価系への応用	PB, EC, MCT, CMR

1. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

a) 培地：Organoid Growth Medium (OGM, STEMCELL Technologies, ST-06030) と当施設で従来マウス肝臓由来オルガノイド培養に使用している調製培地を用いて24well plateで培養を行い、オルガノイドの増殖を比較した。なお、調製培地はAdvanced DMEM/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、A83-01、CHIR-99021、ITS-G supplement等を加えた。また継代時の播種密度は、OGMは1:30、調製培地は1:2~1:30にして検討を行った。

b) 培養方法：マトリゲルドーム内での培養が推奨されているが、当施設で従来オルガノイド培養に用いているMatrigel Bilayer Organoid Culture (MBOC) 法でも培養可能であるか検討を行った。なお、継代時の播種密度はドーム型培養では1:30とし、MBOC法は推奨培養方法ではないため1:10で行った。

c) シングルセル化の検討：トリプシンあるいはAccutaxを用いてオルガノイドをシングルセルにして培養した際のオルガノイドの増殖に及ぼす影響について比較した。

d) 化学物質曝露実験：メタンスルホン酸エチル (EMS) を用いて曝露実験を行った。ドーム型培養法ならびにMBOC培養法を用い、細胞を播種した2時間後から培地中最終濃度を0, 0.2, 2, 20mMとして24時間曝露後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega) ならびにトリパンプルー色素排除法を用い評価を行った。

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価：

本研究では標準的な毒性試験法の開発を目指しており、オルガノイドの品質が安定であることが望ましい。しかし、オルガノイドは培養条件などにより遺伝子発現に影響することが知られており、その品質について確認する必要があると考えた。そこで、2施設間 (星薬科大学と国立がん研究センター) で同一の実験プロトコルに従い培養したオルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を分子マーカーとして評価した。凍結日と継代数が異なる凍結マウス肝臓由来オルガ

ノイド(2本)を各々ドーム型培養で播種し、1週間ごとに3週間継代を行った。播種ならびに継代時に形態学的観察を行い、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のためオルガノイドを回収した。遺伝子発現解析の対象として、肝細胞マーカー(*Hnf4a*, *Ttr*)、前駆肝細胞マーカー(*Sox9*)、成熟肝細胞マーカー(*Alb*, *Cyp3a11*)、胆管マーカー(*Krt19*)の遺伝子発現量を播種時の発現量と比較して評価した。なお、内部標準遺伝子は *18S rRNA* を用いた。また、マウス肝組織における遺伝子発現との比較も同じマーカー遺伝子を用いて行った。

③ 細胞毒性試験：

オルガノイドを播種後2時間培養し、S9mix存在下で化学物質を236, 472, 943 μ M(フェノバルビタール(PB))、25, 50, 100 mM(カルバミン酸エチル(EC))、12.5, 250, 500 μ M(モノクロタリン(MCT))、50, 100, 200 μ M(クマリン(CMR))、10, 20, 40 mM(アセトアミノフェン(APAP))で24時間曝露し洗浄後、トリプシンを用いてシングルセルにして、トリパンブルー色素排除法を用いて評価を行った。

④ 細胞形態変化評価：

マウス肝臓オルガノイドに、化学物質の3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、セルリカバリーソリューションを用いてオルガノイドを回収した。なお、化学物質の培地中最終濃度は236, 943 μ M(PB)、25, 100 mM(EC)、125, 500 μ M(MCT)、50, 200 μ M(CMR)とした。

⑤ 小核試験：

オルガノイドを播種後3日間培養し、S9mix存在下で化学物質を236, 943 μ M(PB)、25, 100 mM(EC)、125, 500 μ M(MCT)、50, 200 μ M(CMR)、10, 40 mM(APAP)で24時間曝露し洗浄後、新しい培地で2日間培養後、シングルセルにして細胞を回収した。回収した細胞をサイトスピン法によりスライドガラスに固定後、ギムザ染色を行った。評価は、光学顕微鏡下で各スライドにつき2,000個の細胞を観察し、小核を保有する細胞数を計測し、算出した小核保有細胞の頻度(小核出現頻度)を指標に行った。

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析：

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、MCTの培地中最終濃度は125, 500 μ Mとした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS(Nano-Seq)解析を行った。

2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

表1の化学物質をそれぞればく露させたマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を星薬科大学 戸塚教授より供与いただいた。受領した mRNA を *in vitro* マウス肝臓 mRNA として用いて以降に記す解析を行った。さ

らに、4週間(PB、APAP)あるいは13週間(CMR)マウスに投与した肝臓を東京農業大学 美谷島教授より供与いただいた。受領した肝臓より mRNA を抽出し、*in vivo* マウス肝臓 mRNA として、以降に記す解析を行った。

〔網羅的遺伝子発現解析〕

回収したマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA のうち、対照群および高用量群をそれぞれ用いて(計8検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher)マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに *in vivo* マウス肝臓由来 mRNA のうち、PB、CMR および APAP 投与群における対照群および高用量群をそれぞれ用いて(計5検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher)マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Expression Console™ を用いて、数値化および正規化を行った。アルゴリズムは、SST-RMA を用いた。Annotation Level は、(Exon Level ではなく) Gene Level とした。得られた遺伝子発現パラメータを用いて Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて、パスウェイ解析及び各被験物質ばく露による影響について検討を行った。

加えて、昨年度実施したマウス肝臓オルガノイドを用いたマイクロアレイおよびパスウェイ解析で得られたデータを用いて、*in vivo* および *in vitro* 双方でどのような影響がみられたか、検討を行った。

3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

マウス臓器由来オルガノイドに化学物質を反復暴露した後、エピゲノム変化を同定し、*in vitro* 一般毒性試験法における指標を探索する。

①オルガノイドへのカルバミン酸エチル (EC) 処置
樹立したC57BL/6J背景p53(+/-)マウスの肺オルガノイドを融解、培養を行い使用した。オルガノイドはAccutase処置により細胞を分散させ、さらに40 μ mのフィルターを通し、細胞数測定を行い、マトリゲル(Corning)をゲル状にしてひいた12well plateに1x10⁵細胞/well播種した。2時間静置後、対照群(0 mM)、低用量(2.5mM)、高用量(10mM)を50 μ g/mlのS9 mixと共に添加し、5% CO₂, 37度のインキュベーターで24時間処置した。24時間後、化学物質を含む培地を除去し、マトリゲルを被せて培養した(サンドイッチ法)。これを1週間に一度3回繰り返した。

②EC処置オルガノイドのメチル化解析

EC 3回処置後 (0mM, 2.5mM, 10mM, 各N=2) 96時間のオルガノイドをCell Recovery Solutionによりマトリゲルを溶解し、細胞塊として回収しDNA抽出を行った。メチル化解析はRRBS法(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)を用いた。DNAを精製し、制限酵素MspIによる制限酵素消化を行い、フラグメントのサイズ選択を行うことでCpGの豊富な領域を選択したものをバイサルファイト処理し、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR増幅したものを、次世代シーケンスを行い、Bismarkを用いたアライメント及

びMethylKit Analysisによるメチル化解析を行い、対照群に対するメチル化率の変化の同定を行った (q-value<0.01, % methylation difference >25%)。同定した候補はIGV(Intergrative Genomics Viewer)を用いて確認を行った。

③オルガノイドへのフェノバルビタール (PB) 処置
研究代表者から分与を受けた Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932, C57BL/6 マウス肝臓由来) を用いた。PB暴露法については研究代表者が検討した方法に準じ、ドーム型培養法でオルガノイドを3日間培養し、1回目の24時間暴露を各対照群(0 μ M), 低用量(236 μ M), 高用量(943 μ M)の濃度で暴露した。24時間後培地の除去、洗浄後新しい培地を添加し、3日間培養を行った。3日間培養後、細胞を再播種し、3日間培養後に2回目の24時間暴露を行った。その後培地を除去、洗浄後、新しい培地を添加し、6日間培養後に、3回目の24時間暴露を行った。暴露後、培地を除去、洗浄後にセルリカバリーソリューションを用いてマトリゲルを溶解し、オルガノイドを細胞塊として回収し凍結した。

④PB処置オルガノイドのメチル化解析
PB 3回処置後 (0 μ M, 243 μ M, 943 μ M, 各N=3) のオルガノイドの細胞塊から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した。メチル化解析はRRBS法を用い、②と同様に行なった。

⑤PB処置マウス肝臓のメチル化解析
PBによるin vivo 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL/6マウスの凍結肝臓の一部を分担研究者:美谷島から分与を受け、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。その後のメチル化解析については②と同様の手順で行なった。

⑥肝臓オルガノイド-間質細胞の共培養系の構築
オルガノイドについては研究代表者から分与を受けたMouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932)、間質細胞の1つとして、理研BRCより不死化クッパー細胞の提供を受けた。共培養法については、コンパニオンプレートに、インサート (1.0 μ mメンブレン) (Corning)を組み合わせた非接触型を用い、どちら側にどちらの細胞を播種するか、また共培養時の培地の条件、オルガノイド培地: HepatiCult Organoids Growth Medium (Mouse)、クッパー細胞培地: DMEM (high glucose)+10% FBS+bovine Insulin 10 μ g/ml+monotiglycerol 250 μ Mを用い、観察及び cell titer gloを用いた生細胞数の測定を行い条件検討を行なった。

4. In vivo 毒性試験

分担研究者として、美谷島はオルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、毒性対照物質を用いてマウス in vivo 毒性試験を実施し、標

的臓器である肝臓についての毒性学的データを取得した。

1) In vivo 毒性試験

これまで本分担研究では、雄性 C57BL/6J マウスに、in vitro 試験と共通してフェノバルビタール (PB)、カルバミン酸エチル(EC)、クマリン(CMR)、モノクロタリン(MCT)を投与し、さらに、肝細胞壊死など顕著な肝毒性を示す化学物質としてアセトアミノフェン(APAP)を投与し、それぞれの化学物質の肝毒性プロファイルを明らかにしてきた。特に本年度のマウスへの投与は、CMR 並びに MCT について反復投与を行い、それぞれの肝臓毒性を評価した。

1-1) CMR を用いた検討

本分担研究では、マウスに CMR を短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスに、CMR を 5,000 ppm で4週間、2,500 ppm 並びに 5,000 ppm で13週間混餌投与した。対照群には標準飼料として粉末 CE-2 を与えた。給餌期間終了後に解剖し、採血並びに臓器の採取を行った。肝臓については病理組織学的解析並びに遺伝子発現解析を行った。

1-2) MCT を用いた検討

本分担研究では、マウスに MCT を2ないし4週間間歇的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。具体的な研究内容として、6週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスに pH を調製した生理食塩水に溶解して MCT を 200 mg/kg の用量で2ないし4週間にわたり週1回の間歇腹腔内投与を行った。対照群には同溶媒を投与した。飼料は固形標準食 (CE-2)を用いた。投与期間中に体重及び摂水量を測定した。投与期間終了後に解剖し、臓器重量、血液生化学的検査、病理組織学的解析及び遺伝子発現解析を行った。

5. 新規 in vivo 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

1) 一次線毛の形態変化の定量的評価

様々な細胞の一次線毛にEGFPを発現するゼブラフィッシュの組織切片を作製し、EGFPに対する抗体を用いた免疫染色により、一次線毛を可視化した。画像解析ソフト (CiliaQ) を用いて、一次線毛の形態を定量的に解析した。また、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンをゼブラフィッシュに曝露 (受精後3日目から7日目まで) し、脳における一次線毛の形態変化を解析した。

2) 各癌細胞株の一次線毛の免疫染色: ヒト膵臓癌細胞株 panc-1、ヒト前立腺癌細胞株 DU-145、PC-3 を選択した。細胞株は JCRB 細胞バンクより入手した。それぞれの細胞株は対応する添加物を加えた培養液を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 %

加湿インキュベーターで培養した。免疫細胞染色は、一次抗体（抗 ARL13B 抗体）、対比染色（DAPI）を行った。

3) 発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いた一次線毛の免疫染色：鰐渕班より提供を受けた、発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いて一次線毛を構成するタンパク質（抗 ARL13b 抗体）に対する蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

4) 発がん性化合物処理のマウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛およびその構造体の免疫染色：分担研究者より提供を受けた、発がん性化合物処理のマウス肝前駆細胞オルガノイド標本を用いて一次線毛を構成する軸糸（抗 α -acetylated tubulin 抗体）、中心小体（抗 γ -tubulin）に対する蛍光免疫染色をおこなった。また中心小体の増幅に関与する Polo-like kinase 4 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

（倫理面の配慮）

動物を用いるオルガノイド樹立実験は、国立がん研究センター研究所で行なっており、「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従って行った。動物福祉並びに動物実験倫理の観点から、適切なエンドポイントを設定し、安楽死させることにより苦痛軽減に配慮した。

また、マウスの使用は最少匹数に留め、東京農業大学動物実験委員会より承認を受けた申請内容に則り実施した。また、他実験で用いたサンプルも検討に用いるなど、使用動物数の低減に努めた。

C. 研究結果

1. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

- 培地：**OGMを用いて培養した場合と比べ、調製培地での培養は増殖性が低かった。OGM の場合は1:30の播種密度で長期継代培養が可能だったが、調製培地は、OGMと同じ播種密度では増殖性が著しく低下し、濃く播種する必要があることがあった。
- 培養方法：**MBOC法でも培養継続可能であったが、両培養法を比較すると、ドーム型培養法において増殖性が高いことがわかった。
- シングルセル化の検討：**トリプシンあるいはAccumaxともオルガノイドの増殖に大きな影響は及ぼさないことが分かった。
- 化学物質曝露実験：**両培養法ともに濃度依存的

に細胞毒性が示された（図1 A, B）。また、ドーム型培養に曝露した24時間後の細胞毒性については両評価法で同様の結果が得られた（図1 A, C）。

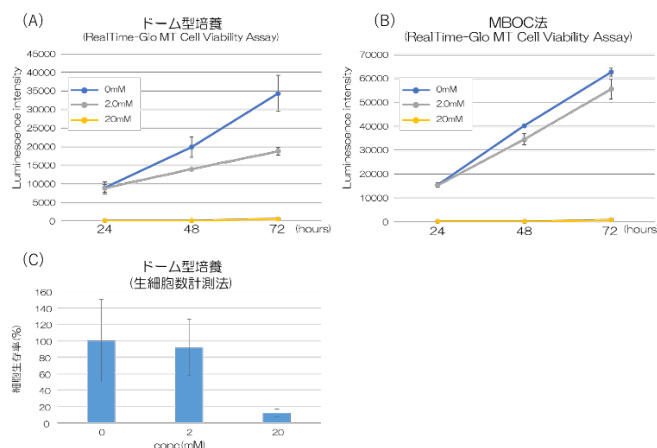


図1. EMS曝露による細胞毒性試験

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価： オルガノイドをドーム型培養法により培養し、継代時に形態学的変化を観察した結果、図2のように播種後3週間におけるオルガノイドの形態学的変化は認められなかった。

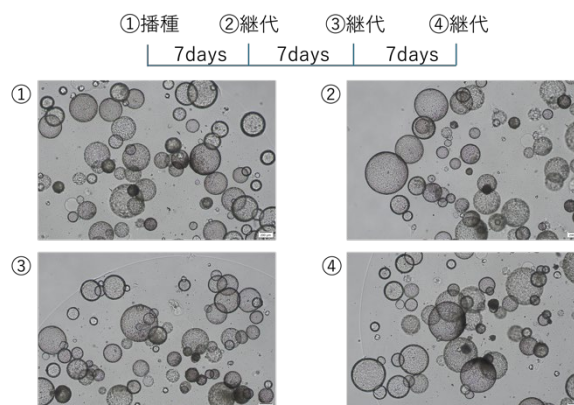


図2. オルガノイドの形態学的変化

オルガノイドの各種マーカー遺伝子発現は、同一プロトコルを用い、2施設で培養したオルガノイドにおける播種時と継代時で相対比較した。その結果、図3に示すように両施設において、*Sox9* (前駆肝細胞マーカー)、*Krt19* (胆管マーカー)、*Ttr* (肝細胞マーカー) は、継代を繰り返しても両施設間で大きな増減は認められなかった。一方、*Alb* (成熟肝細胞マーカー)、*Hnf4a* (肝細胞マーカー) および *Cyp3a11* (成熟肝細胞マーカー) に関しては、両施設ともに播種時と比較し、継代ごとにやや変動が認められた。

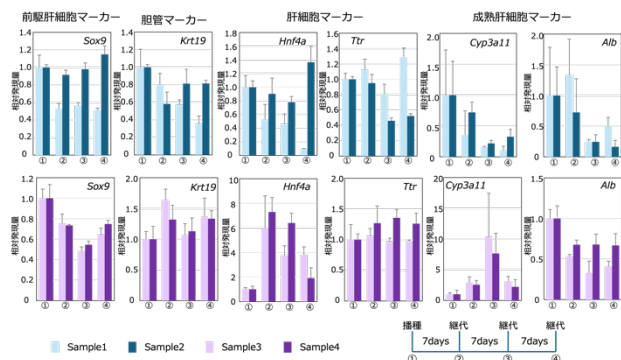
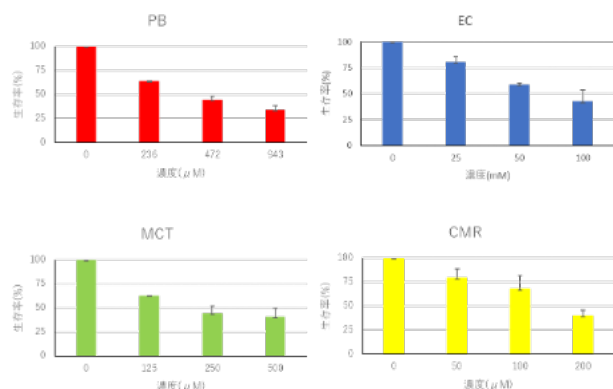


図3. 未分化オルガノイドの遺伝子発現
(上段：星葉，下段：NCC)

③ 細胞毒性試験：

化学物質を曝露させた結果、図4に示すように各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が低下した。

(A)



(B)

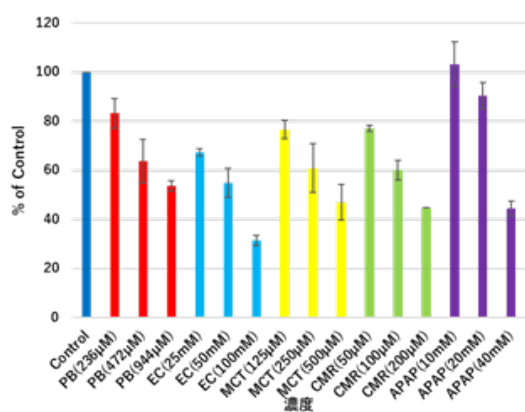


図4. 化学物質曝露による細胞毒性試験
(A) S9mix無、(B) S9mix有)

④ 細胞形態変化評価：

複数回曝露したオルガノイドから切片を作成し観察した結果、いくつかの形態変化が観察された。形態変化としては以下の図5-1～5-7に示すものを

形態変化として捉えた。

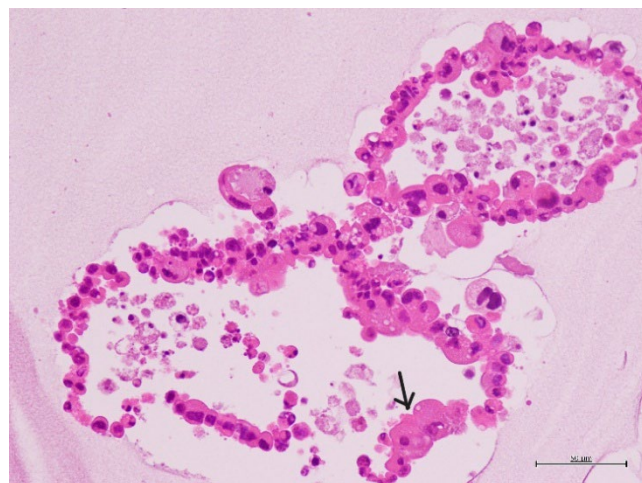


図 5-1. 細胞肥大



図 5-2. 核肥大

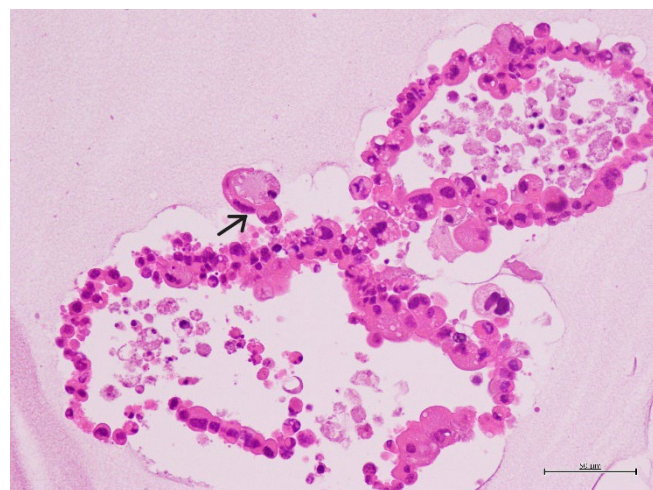


図 5-3. 核の変形



図 5-4. 多核



図 5-7. 空胞

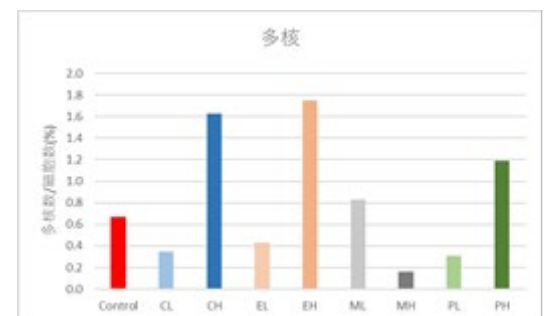
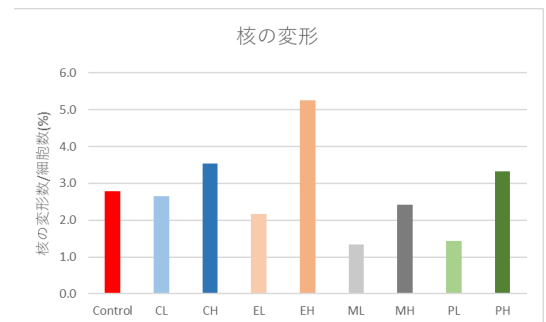
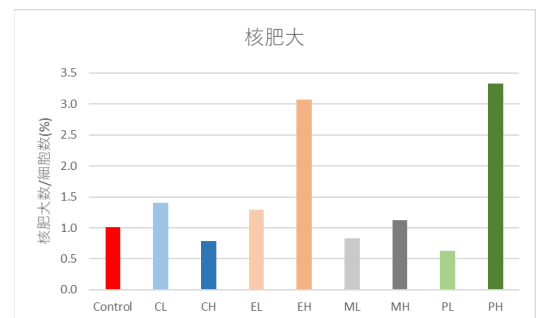


図 5-5. 核の淡明化



図 5-6. 核の凝集

上記の図 5-1～5-6 までの各形態変化を有す細胞数を全細胞数で割った結果を図 6 に示す。



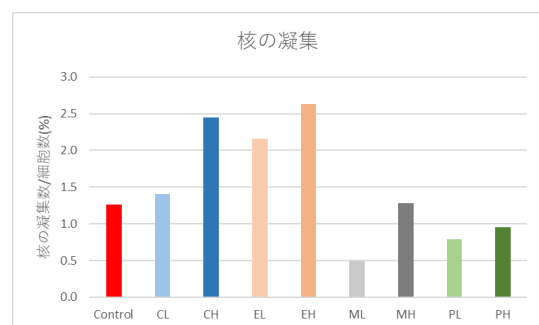
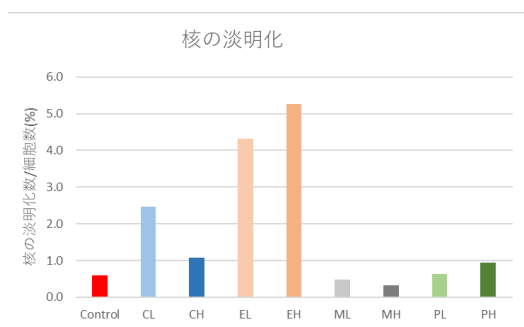


図 6. 形態変化を示した細胞の割合の比較

なお、本研究では空胞の形態変化は空胞の量をスコア化(なし:0, 少量:1, 多量:2)して図 7 に示す。空胞の評価法として細胞面積に対する割合で評価する方法が報告されているが、現在当施設では評価に必要なソフトウェアがないため今回は空胞の量をスコア化することで評価した。

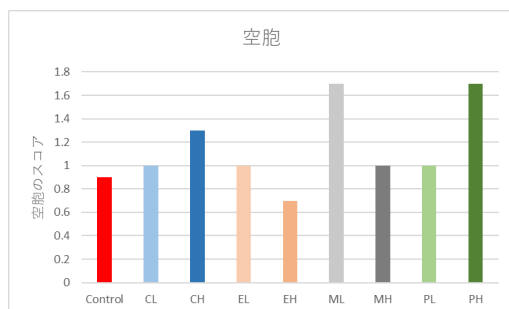


図 7. 空胞化を有する細胞スコアの比較

以上のスコアをまとめて表 1 に示す。

表 1 細胞形態変化の化学物質毎の比較

	CMR	EC	MCT	PB
細胞肥大	—	○	—	○
核肥大	—	○	—	○
核の変形	—	○	—	—
多核	○	○	—	○
核の淡明化	—	○	—	—
核の凝集	○	○	—	—
細胞空胞化	—	—	○	○

発がん性の標的臓器が肝臓ではない EC 曝露で多くの形態変化が観察された。肝臓が標的臓器ではあるものの、直接変異原性ではなく、プロモーター作用を持つ PB では中程度の形態変化が観察された。一方、代謝活性化条件下で DNA に作用し、肝臓の発がん性を示す CMR および MCT においては、ほとんど形態変化が観察されなかった。

⑤ 小核試験：

化学物質を曝露させた結果、図8に示すような小核が出現し、小核出現頻度は、遺伝毒性発がん物質 (EC, MCT, CMR) および肝毒性物質である APAP では曝露により出現頻度が上昇していた (図9)。APAP は、細胞毒性が見られなかった低濃度曝露では発生頻度に大きな上昇は見られなかったが、細胞毒性が強く示された高濃度曝露では発生頻度が上昇し、細胞毒性と小核発生頻度の相関が認められた。なお、非遺伝毒性肝発がん物質である PB はコントロールとほぼ同程度の小核出現頻度であった。

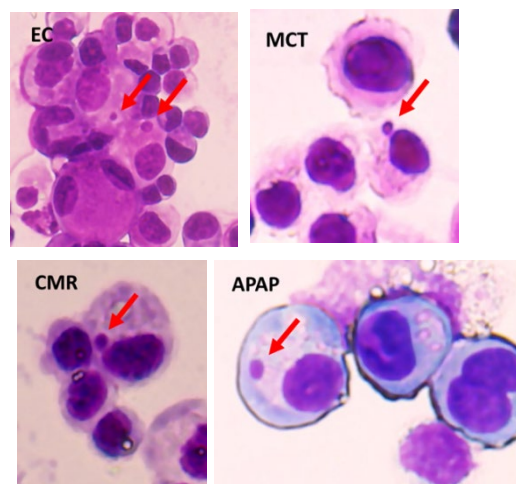
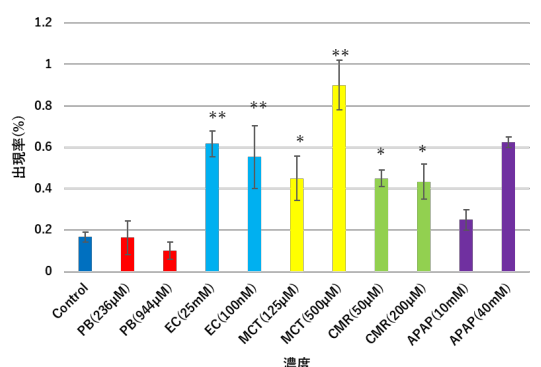


図8. 化学物質曝露による出現した小核



* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Dunnett's multiple comparisons test)

図9. 小核出現頻度

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析：

小核試験で最も強く陽性となった MCT について ec-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その際の 1 塩基置換変異頻度を図 10 に示す。コントロール (DMSO) と比較して MCT を曝露することで変異頻度が上昇した。図 11 はゲノム変異データから変異シグネチャー解析を実施した結果である。コントロールのパターンと比較すると、C>A において変異シグネチャーパターンが異なることが認められた。

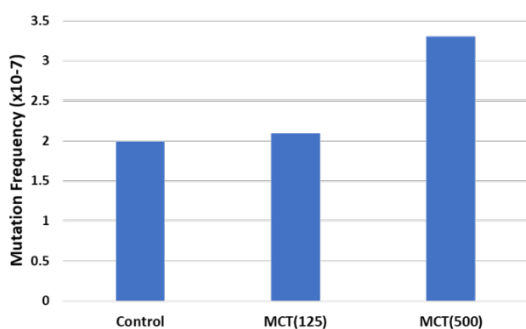


図 10. 1 塩基置換変異頻度

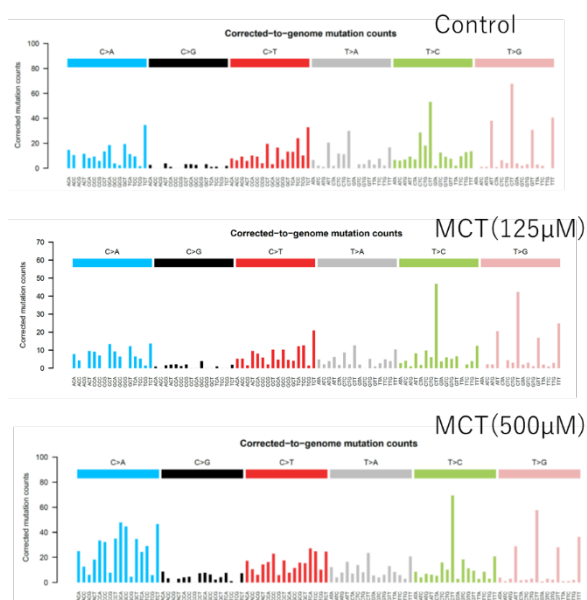


図 11. Error-Corrected NGS (Nano-Seq) による変異シグネチャーパターン

2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

in vitro マウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果 (表1)、PB 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 83、0.66 以下の遺伝子は 228 であった。同様に、CMR 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 187、0.66 以下の遺伝子は 132 であった。また MCT 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 108、0.66 以下の遺伝子は 186 であった。EC 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 261、0.66 以下の遺伝子は 544 であった。IPA ソフトウェアによる Tox Functions 結果、肝臓がん物質 (PB、CMR および MCT) で共通して活

性化が予測され、かつ遺伝毒性非肝臓がん物質 (EC) において不活性化が予測された機能として、Hepatic st atosis、Conjugation of glutathione が挙げられた。さらに、肝臓がん物質 (PB、CMR、MCT) で共通して発現変動がみられた遺伝子として、C1s、Fabp2、Gm20826、Ighv5-12、Mir3079、mir-467、Or9i14、Scgb2b27 および Vmn1r195 の 9 つが同定された。そのうち、非肝臓がん物質 (EC) で発現変動がみられなかった、すなわち本研究に用いた 3 つの肝臓がん物質特異的な変動を示した遺伝子として、C1s、Ighv5-12、Or9i14、Scgb2b27 および Vmn1r195 が同定された。さらに共通変動遺伝子でネットワーク解析した結果、肝臓がん物質共通上流因子として HNF4A (hepatocyte nuclear factor 4A) が同定された。

鰐淵班研究で構築された遺伝毒性肝臓がん物質検出モデルおよび非遺伝毒性肝臓がん物質検出モデルにて、検討を試みた結果、4 物質いずれも Negative の結果となった。

表1 *in vitro* (マウス肝臓オルガノイド) における網羅的遺伝子発現解析の結果

物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝臓がん物質	モノクロタリン (MCT)	1.50 以上 108
	0.66 以下	186
遺伝毒性肝臓がん物質	クマリン (CMR)	1.50 以上 187
	0.66 以下	132
非遺伝毒性肝臓がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上 83
	0.66 以下	228
遺伝毒性非肝臓がん物質	カルバマゼピル (EC)	1.50 以上 261
	0.66 以下	544

in vivo マウス肝臓 mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果 (表2)、CMR 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 305、0.66 以下の遺伝子は 213 であった。同様に、PB 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 398、0.66 以下の遺伝子は 302 であった。また APAP 投与に

表2 *in vivo* (マウス肝臓) における網羅的遺伝子発現解析の結果

物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝臓がん物質	クマリン (CMR)	1.50 以上 305
	0.66 以下	213
非遺伝毒性肝臓がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上 398
	0.66 以下	302
非遺伝毒性肝臓がん物質	アセトアミノフェン (APAP)	1.50 以上 341
	0.66 以下	318

において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 341、0.66 以下の遺伝子は 318 であった。IPA ソフトウェアによる Tox Functions 解析の結果、3 つの物質 (CMR、PB および APAP) で共通して活性化が予測された機能として、Conjugation of glutathione が挙げられた。これは昨年度に実施した *in vitro* マウス肝臓オルガノイドにおいて肝臓がん物質である CMR および PB、MCT の 3 つで共通して変動がみられた機能である。同様に、不活性化がみられた機能として Cell death of liver が挙げられた。

3 つの化学物質ばく露で共通して変動がみられた遺

伝子として55の遺伝子が同定され、KEGG_PATHWAY解析の結果、P450を介した代謝や異物代謝シグナル、活性酸素種(ROS)の産生に関わるシグナルに関連する遺伝子であることが明らかとなった。また3物質に共通する上流遺伝子について、Upstream regulator解析を実施した結果、NR1/3やNR1/2、AHRなどの異物代謝に関わる遺伝子の活性化が確認できた。また、肝発がん物質であるCMRおよびPBに共通する遺伝子セットについてTox Functions解析した結果、Hepatic steatosisの活性化が挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMR、PBおよびMCTの3つで共通して変動がみられた機能と一致する結果である。

*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおける網羅的遺伝子発現解析との比較の結果、PB投与においては共通して発現変動を示すシグナルとして、Liver Regeneration、Inflammation liver、Hepatic steatosisがみられ、*in vivo*(マウス肝臓)で得られた結果と*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)が良好に一致することが示された。一方、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。さらに、*in vivo*(マウス肝臓)および*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)の両方で発現が確認できた遺伝子(PBでは30遺伝子、CMRでは31遺伝子)について相関解析を実施した結果、PBでは0.142、CMRでは0.386と弱い正の相関が得られた。加えて、PBではHepatocellular carcinoma関連シグナルに属する遺伝子について相関解析を行った結果、0.516と正の相関が得られた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo*試験で得られた結果と相関することが確認できた。

3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

①EC処置オルガノイドのメチル化解析

EC 3回目処置後(0mM, 2.5mM, 10mM, 各N=2) 96時間のオルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。ゲノムを1kbの領域に分けた解析では、EC 0mM 3回処置オルガノイドと10mM 3回処置オルガノイドとの間で、メチル化変化領域は30箇所と非常に少なかった。IGVによる確認を行い、発現に影響を与える可能性の高いメチル化変化領域は同定されなかった。1塩基単位でのメチル化変化部位についてはメチル化低下、メチル化増加の両者に2000箇所程度の候補箇所があり、IGVによる確認においても、メチル化の変化があることが確認できた。また、染色体全体において、EC処理によりメチル化が亢進する傾向が見られた。

②PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB処置3回後の(0μM, 236μM, 943μM, 各N=3)オルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は各群で有意な差は見られなかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも各群を特徴づける有意な差は見られなかった。対照群と高用量間で統計的にメチル

化率に有意差がある塩基は479箇所、領域ベースで有意に差がある領域は1箇所であった。

③PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる*in vivo*毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウス肝臓のRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は群間における有意な差は見られなかったが、高用量5検体のうち1検体のみが他と異なり全体的に高いメチル化を示していることがわかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも同様に、群間の有意な差はないものの、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことがわかった。

対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所、領域ベースで有意に差がある領域は91箇所であった。有意差があるものについても、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことに依存している傾向が見られたため、高用量5検体のうちの1検体を除いた解析も行なった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は2箇所、領域ベースで有意に差がある領域は0箇所であった。

④PB処置オルガノイドとPB処置マウス肝臓のメチル化解析の比較

PB処置3回後の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所と、PB処置マウス肝臓の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所のうち、一致する塩基はなかった。また、領域ベースの比較で有意にメチル化が変化する領域1箇所(オルガノイド)と91箇所(肝臓)においても一致する領域はなかった。PB処置マウス肝臓の高用量5検体のうち1検体のみが全体にメチル化率が高く、2群間の比較に影響が出ているようであったため、その1検体を除く解析も行なったが、同様に一致する領域はなかった。

⑤肝臓オルガノイドと間質細胞の共培養系の構築

コンパニオンプレートとインサート(1.0μmメンブレン)を組み合わせ非接触型の共培養システムを行なった。検討の結果、コンパニオンプレート側にオルガノイドのドームを作ると、10μlまでマトリゲル量を減らしてもインサートに接触することがわかった。したがって、コンパニオンプレート側にクッパー細胞を接着培養することにした。同時に、インサート側のメンブレン上にクッパー細胞を接着させた場合、細胞増殖が一定になりづらく、やはり間質細胞をコンパニオンプレート側に培養するのが適していた。一方インサート側にオルガノイドを培養することは、オルガノイドの増殖には影響しない。培地については、共培養開始前の細胞播種時にはそれぞれ細胞に適した培地を用いることが可能であるが、共培養開始時から培地を共通なものにする必要がある。検討の結果、クッパー細胞培地:DMEM (high glucose)+10% FBS+bovine Insulin 10μg/ml+monotiglycerol 250μMにした場合、オルガノイドの増殖が著しく低下するが、逆にオルガノイド培地に合わせた場合、クッパー細胞は至適培地で培養時と同等に増殖し、共培養可能であった。

4. *In vivo* 毒性試験

1-1) CMRを用いた検討

CMRの反復投与により、体重は対照群に対し4及び13週間群ともに減少傾向にあった。肝臓重量は、対照群に対し13週間5,000 ppm群で増加傾向にあった。肝臓の病理組織学的検査では、4週間投与による明らかな変化は見られなかったが、13週間5,000 ppm群で、小葉周辺性の肝細胞肥大、巣状壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。血液生化学的検査では、対照群に対し5,000 ppm群でALT活性が増加ないし増加傾向にあった。FABP2の免疫組織化学染色では、全CMR投与群でより広範囲に陽性肝細胞が確認された。遺伝子発現解析では、肝細胞分化の指標となる因子であるHptr, Alb, CYP 3A11, Krt19, Hnf4aは4週間5,000 ppm群で減少傾向を示し、Sox9は4及び13週間5,000 ppm群で増加傾向を示した。

1-2) MCTを用いた検討

MCTの反復投与により、体重は、対照群に対し4週間投与群で減少傾向を示した。摂餌量は、対照群に対し2週間投与群で減少傾向を示した。血液生化学的検査では、対照群に対しALT及びASTが2週間投与群で増加傾向を示したが、4週間投与群では明らかな変化は見られなかった。臓器重量では、両投与期間で明らかな影響は見られなかった。病理組織学的解析では、2週間投与群で巣状性肝細胞壊死、4週間投与群で、主に小葉中心性肝細胞のグリコーゲン蓄積の減少が認められた。さらに、対照群に対し両投与期間において2核肝細胞の増加が見られた。さらに、細胞増殖に関わるPCNAの免疫組織化学染色において、対照群に対し両投与期間において陽性細胞が増加傾向を示し、それは2週間投与群でより顕著であった。これに加え、胆管上皮細胞の増殖も認められた。遺伝子発現解析では、TNF α が対照群と比較し、両投与期間において増加傾向を示した。

5. 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

近年、細胞膜から突出する不動性線毛である一次線毛は正常細胞やがんの増殖などに関与するシグナルハブであることが知られている。一次線毛には、受容体やエフェクターが存在し、ヘッジホッグ(Hh)、Wnt、Notch、mTOR、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)、Hippoシグナル伝達系に関わる。また、一次線毛は、半永久的に突出する構造物ではなく、正常細胞では細胞周期に関わり、G0/G1期で出現、分裂期では消失する。一次線毛の形成・消失は各種シグナル伝達と連動している。一次線毛は、細胞周期に関与するという単純なものではなく、発生・分化、細胞可塑性など多彩な生命現象に関与することが明らかにされつつある。分担研究者はこれまで毒性評価に応用されていない一次線毛に着目し、化学物質と一次線毛との分子生物学的関連性および共培養系およびオルガノイドにおける

細胞病理学および機能解析を行い、一次線毛の発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的とする。

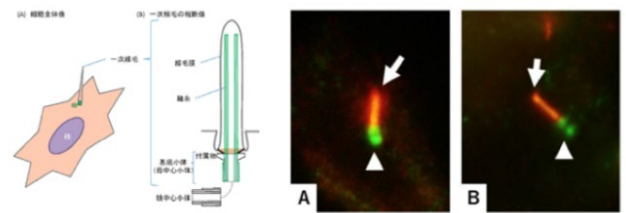


図1. 一次線毛について

1) 一次線毛の形態変化の定量的評価

一次線毛の形態を定量的に解析する手法を確立した。この手法を用いて、カルバミン酸エチル (10 mM)、トリクロロエチレン (760 nM)の曝露 (受精後3日目から7日目まで) により、ゼブラフィッシュ脳の細胞の一次線毛が短くなることを明らかにした。

2) 各癌細胞株の一次線毛の免疫染色

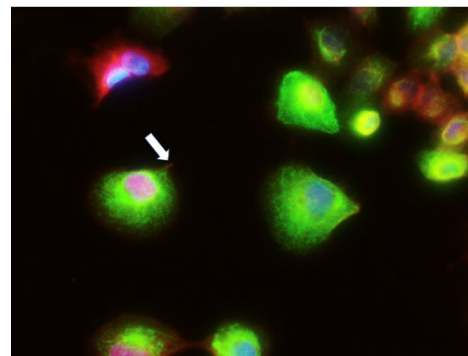


図2. DU-145におけるprimary ciliaの発現

PC-3、Panc-1では、通常培養では、primary ciliaは発現しておらず、DU-145においてprimary ciliaはわずかに発現していた。

3) 発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いた一次線毛の免疫染色

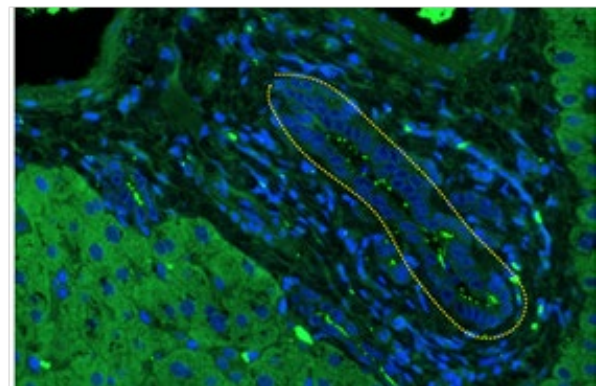


図3 無処理肝臓の一次線毛

黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が多数見られる。

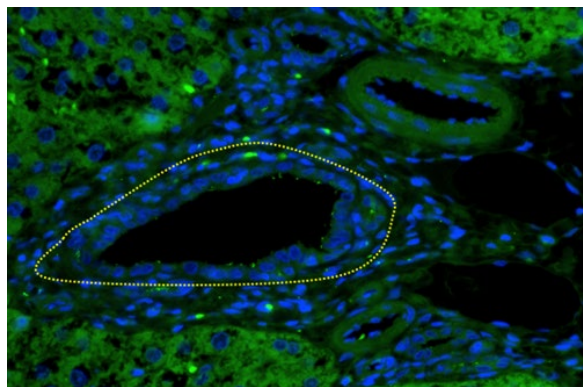


図4 2-Nitropropane処理肝臓の一次線毛

黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が見られる。シグナルは無処理肝臓と比較して減弱し、陽性細胞は減少している。

4) 発がん性化合物処理のマウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛およびその構造体の免疫染色

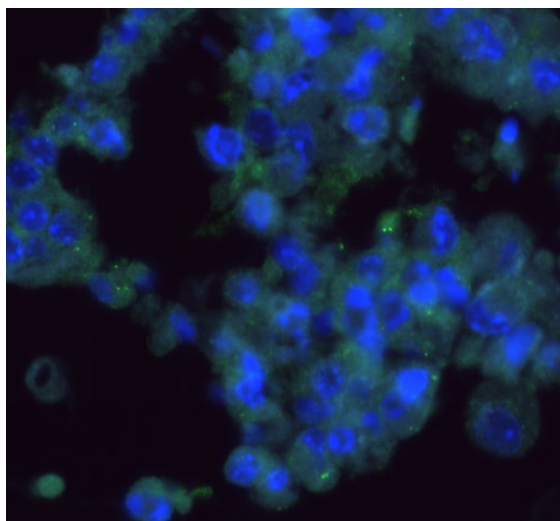


図5 コントロール (DMSO) オルガノイドの中心小体
細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個見られる。

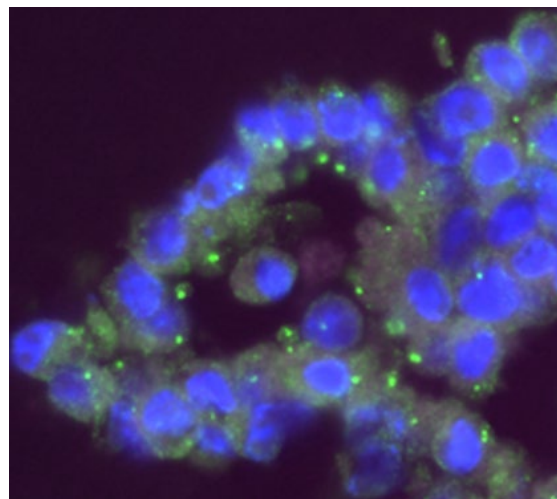


図6 フェノバルビタール (低濃度) オルガノイドの中心小体

細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個明瞭に見られる。

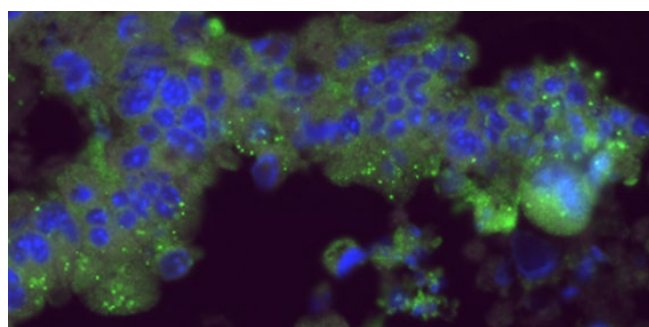


図7 フェノバルビタール (高濃度) オルガノイドの中心小体

細胞質に緑色の微細ドット状の中心小体が複数個見られる細胞がある。

D. 考察

1. ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

OGMを用いた培養では1:30の播種密度で1週間毎に継代を行うことで長期培養が可能であったが、調製培地の場合、OGMと同じ播種密度で培養すると増殖性が低下していったため、オルガノイドを観察し継代間隔と播種密度を決める必要があった。培養方法は、MBOC法を用いた培養でも播種量を多くすることで培養の維持が可能であると推察されたが、ドーム型培養のほうが、少ない播種量でも安定して増殖していた。また、ドーム型培養で播種し、1週間程度経過したオルガノイド数は1wellあたり1~5×10⁵個程度であり、24well plateを用いたドーム型培養でも、種々の実験に対応

可能な細胞数を得ることができると考える。シングルセル化の方法は、STEMCELL TechnologiesはTrypLEを推奨していることから、成分が似ているトリプシンの使用がよいと考える。化学物質曝露実験は、これまでにマウス由来の肝臓オルガノイドに曝露実験を行ったことがあるEMSを用いた。ドーム型培養法においてもMBOC法と同様に、濃度依存的に細胞毒性が示され、ドーム型培養法でも曝露実験が可能であると考えた。また評価方法については、細胞数計測法、発光測定法のいずれでも評価可能であったが、本課題では比較的操作が容易な細胞数計測法で細胞毒性試験を行うことを決定した。

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価：

マウス肝臓オルガノイドの安定性評価に係るマーカー遺伝子発現解析では、成熟肝細胞マーカー(*Alb*, *Cyp3a11*)や肝細胞マーカー(*Hnf4a*)の発現において、播種後に変動が認められたが、マウス肝組織のそれら遺伝子発現と比較すると、非常に低いものであり(data not shown)、これらの遺伝子の発現の変動はオルガノイドの安定性に影響をおよぼさない程度であると考えられる。図2は内部標準遺伝子に*18S rRNA*を用いて解析したが、*gapdh*を内部標準遺伝子に用いて解析を行った際も同様の結果であることを確認している(data not shown)。また、本研究ではオルガノイド播種後、3週間培養を行ったが、これは3回曝露実験を行う際に必要な期間である。そして、この期間においてオルガノイドの形態学的変化ならびに大きな遺伝子発現変化がみられなかったことから、本試験で用いるマウス肝臓由来オルガノイドは、同一プロトコルを用いて培養する限り、曝露実験期間を通して肝前駆オルガノイドとして安定であると考えられる。

③ 細胞毒性試験：

確立したプロトコルで、被験物質に、PB、EC、MCT、CMR、APAPを用いて化学物質単回曝露実験を行った。その結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認され、その後の実験に使用する各化学物質の曝露濃度の決定を行うことができ、確立したプロトコルの妥当性も確認できた。S9mixを添加していない曝露実験においても、細胞生存率が低下したことから使用した肝オルガノイドは幼若細胞であるにもかかわらずある程度の薬物代謝酵素が発現しているか、曝露により代謝酵素が誘導され、化学物質が代謝を受けたことで肝毒性を示したとも考えられる。

④ 細胞形態変化評価：

すべての化学物質で共通して観察される形態変化は認められず、ECのみで多くの形態変化のスコアが上昇した。

ECの発がん標的臓器は肺であるが、*in vitro*システムでは化学物質を直接細胞(オルガノイド)に曝露するため、毒性が観察されたと考えられる。その毒性発現メカニズムはCYP2E1によってカルバミン酸ビニルエポキシドへの代謝活性を受け、カルバミン酸ビニルエポキシドは、核酸やタンパク質に共有結合し毒性を示すと考えられている。

中程度の形態変化が観察されたPBは発がんプロモーターであり、直接、核酸やタンパク質に結合するわけではなく、ダメージを受けた細胞の増殖を亢進するなどして肝臓に発がん性を示す。多核細胞の出現は細胞分裂の異常により起こることが考えられ、したがってプロモーション作用を有するPBの曝露で多核細胞のスコアが上昇したことが示唆される。

一方、代謝活性化条件下でDNAに作用し、肝臓の発がん性を示すCMRおよびMCTにおいては、ほとんど形態変化

が観察されなかった。MCTは、肝臓の薬物代謝酵素により代謝され、活性代謝中間体(ピロール構造)がアルキル化剤として働き、DNAやタンパク質と結合して毒性を発現していると考えられている。CMRは、肝臓で代謝を受け3,4-エポキシマリン(CE)になり、肝毒性物質であるo-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド(o-HPA)になることで肝毒性を示すと考えられている。本実験で使用した肝オルガノイドは幼若細胞であり、薬物代謝酵素の発現が不十分であったことが考えられる。

⑤ 小核試験

化学物質曝露後に小核出現頻度をコントロールと比較したところ、遺伝毒性発がん物質および肝毒性物質では上昇したが、非遺伝毒性発がん物質ではコントロールと同程度であった。この結果から、オルガノイドを用いて小核を指標に化学物質の遺伝毒性評価が可能であることが示唆された。本試験では、出現する小核の大きさに違いがあることが確認できた(図12)。大きい小核は、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来、小さい小核はDNA損傷により生じる構造異常由来とされており、小核形成のメカニズムが異なることを意味する。小核の出現頻度に加え、小核の大きさも考慮することで、遺伝毒性メカニズムを明らかにできる可能性がある。

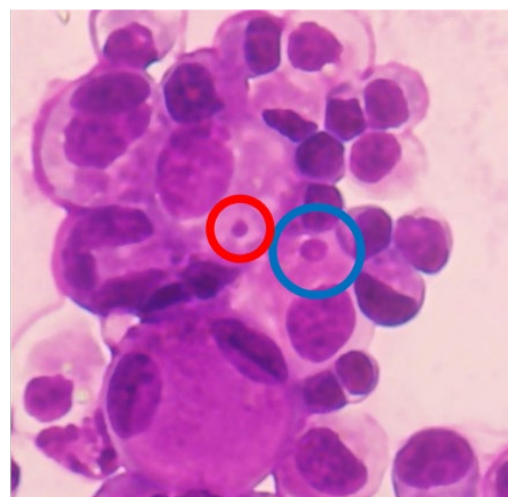


図12. MCT曝露により観察された大きさに違いのある小核。青○：大きい小核、赤○：小さい小核

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

小核試験で最も強く陽性となったMCTについてec-NGSによりゲノム変異の解析を実施した。その結果、コントロールと比較し、曝露により1塩基置換変異頻度が上昇することがわかった。MCTは肝発がん性を示す遺伝毒性発がん物質であるが、Ames試験では陰性となることが知られている。マウス肝臓由来のオルガノイドを用いた本研究では、MCTの変異原性を陽性と捉えることができた。そのメカニズムについてはまだ詳細な検討をしていないが、おそらく、我々のアクリルアミドの先行研究で報告したものと同様に、MCTの代謝活性化に係る酵素がオルガノイドで誘導されたものと推測している。MCTはCYPにより代謝活性化され、dGのDNA付加体(DHP-dG)の生成を介してゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、本研究で解析したMCTの変異シグネチャーパターンからもC:G to A:Tの変異がコントロールと比べて増加していることから、マウ

スオルガノイドにおいてもこれらMCTのDNA付加体を介してゲノム変異を誘発することが示唆された。Ec-NGSでは変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。今回は、1塩基置換のみの解析結果を報告したが、得られたゲノム情報からは2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、ec-NGSでは変異頻度による定量性のみならず、得られる変異パターン（変異シグネチャー）が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。本研究では、このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと考える。

2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

本研究では、マウス肝臓オルガノイドに対して肝発がん物質あるいは非肝発がん物質の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較解析を行うことで、*in vivo*マウス急性毒性試験の代替法となり得るかについて検討を行った。マウス肝臓オルガノイドに被験物質を投与した際に、肝発がん物質特異的にHepatic Steatosisなどの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかとなった。*in vivo*マウス肝臓を用いて比較検討を行った結果、P450を介した代謝や異物代謝誘導系、グルタチオン抱合の亢進などが共通してみられた。特に、PBばく露マウス肝臓と肝臓オルガノイドの比較では、肝傷害やそれらに伴う再生の亢進が、*in vitro*および*in vivo*の双方で共通して発現変動することが確認できた一方で、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。しかしながら、CMR投与において*in vitro*において活性化が示されたNecrosis of liverが*in vivo*では不活性化を示していることから、肝臓オルガノイドにおけるNecrosis of liverの活性化に伴う炎症誘導について、今後マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞との共培養系を用いることで、例えば肝細胞と肝星細胞との相関や肝細胞とクッパー細胞との相関など、より生体を模倣した影響が評価できると期待される。

3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

ECの*in vitro*処置により、マウス肺オルガノイドに1塩基レベルのメチル化変化が生じることを明らかにした。領域でのメチル化変化ではないため、既報にあるような遺伝子発現に影響を与えるかどうかについてはさらに検証を必要とする。染色体レベルでEC処置による亢進傾向が見られており、EC処置の回数を増やすことなどで、メチル化変化領域が同定される可能性もあると考える。

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル化変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域はなかった。*in vivo*

試験の高用量のうちの1検体のみが他と異なるメチル化状態を示していたため、その結果が影響した可能性を考え、1検体を除いての解析を行ったが、同様に共通したメチル化変化はなかった。組織学的な観察においては、この1検体においても他の高用量の検体と同様に全体的に肝細胞の肥大が見られているとのことで、単純にこの1検体の部分的なサンプリングされた細胞の違いがメチル化の違いに影響したということではないと思われるため、エピゲノムを解析するタイムポイントなど、検討が必要と思われる。*in vitro*、*in vivo*試験の両者において、顕著なメチル化変化が検出されておらず、暴露方法の検討、他の化学物質での検討が必要と考えられる。例えば、オルガノイドのPB処置後の解析においても、今回3回目暴露24時間後といった比較的早い段階で解析を行っており、継代を重ねた後など、何らかの細胞が濃縮される可能性が高くなった後には特定のメチル化変化が濃縮され検出されるということがあるかもしれない。

また、化学物質による毒性、発がん性は共存する間質細胞に依存することが報告されており、*in vitro*系で共培養を行うことで、異なった結果が出るかどうかの検証が必要である。インサートを用いた肝臓オルガノイドとクッパー細胞の共培養法の構築が進んでおり、それぞれの細胞の特性解析等行い、より*in vivo*に近い*in vitro*系のさらなる開発も必要であると思われる。

4. *In vivo* 毒性試験

1-1) CMRを用いた検討

CMRは、シナモンなど多くの植物に含まれる芳香物質であるが、過剰摂取により肝障害を引き起こすとの報告もある。本分担研究では、マウスにCMRを短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響について解析した。その結果、本実験条件において、4週間投与では明らかな組織学的変化は見られなかったが、肝細胞への分化の指標となる遺伝子発現に影響が見られた。一方、13週間投与では組織学的に明らかな肝障害が認められたが、Sox9を除き上記の遺伝子発現に明らかな変化は見られなかった。

1-2) MCTを用いた検討

MCTは、マウスやラットに投与することにより肺高血圧症を誘発することが知られている。肝臓の血流が障害されることで低酸素血症が生じ、肺高血圧症が誘発されるとされている。本分担研究では、マウスにMCTを2ないし4週間間歇的に反復投与することにより肝臓への影響を解析した。その結果、本実験条件において、MCTによる明らかな肝傷害は認められなかった。しかし、2核肝細胞並びにPCNA陽性肝細胞は増加傾向を示し、さらに、胆管増生を示唆する変化も認められ、MCT反復投与による肝臓への影響が見出された。これより、

両化合物のマウスへの反復投与により、いずれも異なる肝毒性プロファイルを示す結果が得られた。これは今後の*in vitro*毒性評価系の構築において、新たな評

価指標の確立するための研究支援材料が得られたものと考えられた。

5. 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンの曝露による胆管上皮細胞の一次線毛形態を評価可能と考えられる。また、今回用いた癌細胞株の通常培養では、一次線毛はほとんど発現していなかったが、文献[Cell Biol Int, 39, 1341-47, 2015; Mol Cells, 41, 224-33, 2018; EMO Rep, 18, 334-43, 2017; Cell Rep, 23, 3042-55, 2018]では、HeLa細胞、MG63、NIH3T3細胞での発現は報告されており、A549細胞では薬剤処理で、薬剤耐性を獲得するとともに、一次線毛発現すると報告されている。一次線毛は密接に細胞周期と関わるため、細胞培養環境が需要であり、またその形質が変化することより、毒性評価への応用の可能性は十分あると考えられる。

薬物や毒物などにより障害をうけた肝臓では、成熟した肝細胞自体の増殖が阻害される。このとき、未分化性をもつ特殊な肝前駆細胞の活性化が誘導され、これが増殖および分化することにより新たに細胞を供給し再生が行われると考えられている。一次線毛は静止期の細胞に出現することから、薬物投与後に出現する活性化肝前駆細胞には一次線毛がむしろ出ていないと推測される。発がん総論的には増殖期の細胞が障害を受ければ遺伝子異常の頻度高まり、細胞が形質転換する確率が上がるので、一次線毛陰性の活性化肝前駆細胞を定量すれば、化学発がんの評価につながると考えられる。

オルガノイドのフェノバルビタール高濃度処理では中心小体の増加が認められた。中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発し、がん化の初期課程に関与する。その機序としては細胞周期の停止や延長による中心体複製の制御破綻があるとされている (BMB Rep. 2023; 56, 216-224)。従って、フェノバルビタールの有害性評価の一つとして、中心小体の数的過剰が指標になりうると考える。

E. 結論

マウス肝臓オルガノイド(STEMCELL Technologies, ST-70932)の培養ならびに化学物質曝露実験方法は、培地に OGM(STEMCELL Technologies, ST-06030)を用いマトリゲルとオルガノイドを混ぜてドーム状に播種する培養方法で行い、シングルセルにする酵素はトリプシンを用いることにした。2施設でマウス肝臓オルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を指標に解析した結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、同一プロトコルを用いて培養した際には肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。

細胞毒性試験において、マウス肝臓オルガノイドに化学物質(PB, EC, MCT, CMR, APAP)を曝露すると濃度依存的に細胞生存率が低下した。化学物質の複数回曝露による細胞形態変化については、すべての化学物質で共通して観察される形態変化は認められず、ECのみで多くの形態変化のスコアが上昇した。

小核試験においては、遺伝毒性発がん物質(EC, MCT, CMR)および肝毒性物質であるAPAPでは小核出現頻度

がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質であるPB曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらに ec-NGS 解析では、化学物質曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。同手法は、変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。また、得られるゲノム情報からは1塩基置換のみならず、2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、得られる変異パターン(変異シグネチャー)が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと考える。

化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、*in vivo* マウス肝臓と同様に炎症関連シグナルの誘導やHepatic steatosisの亢進が観察できることが示唆された。また、マウス肝臓オルガノイドにおける化学物質ばく露による影響が弱いことが予想される場合には、マウス肝臓オルガノイドに加えて免疫/間質細胞共培養系を実施することで、炎症応答による再生の誘導などが観察できると期待される。*In vitro* 評価系において、EC処置により1塩基レベルのメチル化変化及び染色体全体でメチル化の亢進が起ることをRRBS解析により同定した。検証やデータの蓄積がさらに必要であるが、*in vivo*で同様のことが起こっている場合、*in vitro* 化学物質評価系における指標となり得る。PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル化変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする*in vitro*有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

オルガノイドのフェノバルビタール高濃度処理では中心小体の増加が認められた。中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発し、がん化の初期課程に関与する。その機序としては細胞周期の停止や延長による中心体複製の制御破綻があるとされている (BMB Rep. 2023; 56, 216-224)。従って、フェノバルビタールの有害性評価の一つとして、中心小体の数的過剰が指標になりうると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and

- Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol.* (2022) Sep 19;35(9):1625-1630.
2. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, **Totsuka Y**, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. (2022) Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. *In Vivo.* (2022) Mar-Apr;36(2):628-634.
 3. Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y**, Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development, *Int. J. Mol. Sci.*, (2024) 25(20):11191.
 4. Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y**, Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* (2024) Oct;899:503821.
 5. Imai T, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y**. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* (2024) 49(10):425-434.
 6. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the mechanisms involved in the development of bladder toxicity following exposure to occupational bladder cancer causative chemicals using DNA adductome analysis. *Biomolecules.* 14:36, 2023.
 7. Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA methylation aberrations in dimethylarsinic acid-Induced bladder carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2023;15, 5274.
 8. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology.* 2023; 488:153483.
 9. Imai K, Niwa R, Fujioka M, Ito K. Understanding the quality and safety of food production through the lens of The Microbiome of The Built Environment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 2023;0, 1-6
 10. Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J. Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. *Br J Cancer.* 2023; 128(12):2197-2205.
 11. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the mechanisms involved in the development of bladder toxicity following exposure to occupational bladder cancer causative chemicals using DNA adductome analysis. *Biomolecules* 2023; 14(1).
 12. Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett.* 2023; 384:128-135.
 13. Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol.* 2023; 36, 123-129.
 14. Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. *Arch Toxicol.* 2024; 98: 2711-2730.
 15. Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arch Toxicol.* 2024; 98: 2065-2084.
 16. Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. *Toxicol Sci.* 2024; 202: 210-219.
 17. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol.* 2025; 38: 59-67.
 18. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol.* 2025; 38: 147-54.
 19. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol.* 2025; 38: 161-5.
 20. Imai T, et al. Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett.* May 23;24(1):221.
 21. Ishigamori R, et al. The potential of organoids in toxicologic pathology: Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J Toxicol Pathol.* 2022 Jul;35(3):211-223.
 22. Imai, T. Naruse, M. Machida, Y. Fujii, G. Mutoh, M. Ochiai, M. Takahashi, M. Nakagama, H. Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer.* (2023) 75: 713-725
 23. Ono, R. Kuwagata, M. Naruse, M. Watanabe, A. Takano, M. Hasegawa, T. Takashima, H. Yoshioka, Y. Ochiya, T. Hirabayashi, Y. Kitajima, S. Extracellular

vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* (2024) vol11, No.1. 37-56.

2. 学会発表

1. **Yukari Totsuka** Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 12th AACR-JCA Joint Conference (2022 年 12 月、マウイ-ハワイ、米国)
2. **戸塚 ゆかり**, 小宮雅美, 永井桃子, 加藤 護, 松田知成 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 35 回 発癌病理研究会 (2022 年 11 月、新潟)
3. 帯金明日香, 小宮雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐淵英機, **戸塚 ゆかり** 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析 第 51 回 環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
4. 坪井理, 植嶋亜衣, 久富優太, 小田美光, 恒松雄太, 佐藤道大, 平山裕一郎, 三好規之, 岩下雄二, 吉川悠子, 梶村春彦, **戸塚 ゆかり**, 若林敬二, 渡辺賢二, 川西優喜 DNA 鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価 第 51 回 環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
5. **戸塚 ゆかり**, 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 1 回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022 年 11 月、東京)
6. **戸塚 ゆかり**, 小宮雅美, 松田知成, 加藤護 Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
7. 小宮雅美, 落合雅子, 今井俊夫, **戸塚 ゆかり** Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
8. 帯金明日香, 小宮雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐淵英機, **戸塚 ゆかり** Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
9. **Yukari Totsuka** New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer 13th ICEM (2022 年 8 月オタワ・カナダ)
10. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines 13th ICEM (2022 年 8 月オタワ・カナダ)
11. 小宮 雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐淵 英機, **戸塚 ゆかり** 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析 第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月 京都)
12. 小林 琢磨, 豊田 武士, 吉岡 泰淳, 岸本 真治, 松下 幸平, 赤根 弘敏, 小川 久美子, 渡辺 賢二, 高村 岳樹, **戸塚 ゆかり**, 若林 敬二, 三好 規之 細胞毒性を有する o-Toluidine と o-Anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する 第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月 京都)
13. **戸塚 ゆかり** 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望 第 49 回日本毒性学会 (2022 年 6 月 札幌)
14. 小宮雅美, 広田航太郎, 山口大雅, 石ケ守里加子, 稲葉洋平, **戸塚 ゆかり**, 加熱式タバコの遺伝毒性評価, がん予防学術大会 2023 (2023 年 9 月、金沢)
15. **Totsuka Y**, Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023 年 9 月、シカゴ・米国)
16. **Yukari Totsuka**, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
17. 小宮雅美, 広田航太郎, 山口大雅, 石ケ守里加子, 稲葉洋平, **戸塚 ゆかり**, 加熱式タバコの遺伝毒性評価, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
18. 石ケ守里加子, 澤田琉那, 前嶋愛美, 小宮雅美, 大野彰子, **戸塚 ゆかり**, アドバンストナノマテリアルの in vitro 遺伝毒性評価, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
19. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, **Yukari Totsuka**, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
20. 白鳥修平, 小宮雅美, 魏民, 鈴木周五, 鰐淵英機, Jiri Zavadil, 渡部浩平, **戸塚 ゆかり**, 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
21. 本橋実奈, 別役雄毅, 高村岳樹, 小宮雅美, 佐々彰, **戸塚 ゆかり**, アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
22. **Totsuka Y**, Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023 年 11 月、東京)
23. **戸塚 ゆかり**, ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析, 日本酸化ストレス学会 (2023 年 12 月、川崎)
24. **戸塚 ゆかり** 生体を模倣した in vitro 遺伝毒性評価法 日本薬学会 144 年会 (2024 年 3 月、横浜)
25. **戸塚 ゆかり**, DNA 付加体研究の過去・現在・未来 東京, 令和 6 年日本環境変異原ゲノム学会公開

シンポジウム、2024 年 6 月 1 日

26. Yukari Totsuka, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 札幌、第 42 回札幌国際がんシンポジウム、2024 年 6 月 6-8 日
27. Yukari Totsuka, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, 京都、2024 年 6 月 28-30 日
28. 大橋 清佳、梶川 明音、前川 竜也、煙山 紀子、戸塚ゆかり、美谷島克宏、カルバミン酸エチル（ウレタン）のマウス反復投与毒性試験における病態解析、第 51 回日本毒性学会学術年会（2024 年 7 月、福岡）
29. 戸塚ゆかり、小宮雅美、煙山紀子、加藤 護、Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products、第 83 回日本癌学会総会、福岡、2024 年 9 月 19-21 日
30. 戸塚ゆかり、DNA 付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム、東京、2024 年 10 月 25-26 日
31. 戸塚ゆかり、環境要因による DNA 付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索、Web 開催、環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024 春季ネットシンポジウム、2024 年 11 月 9 日
32. 戸塚ゆかり、DNA 付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、福岡、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27-29 日
33. 戸塚ゆかり、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発 第 85 回 MMS 秋の定例会、岡山、2024 年 12 月 6 日
34. 戸塚ゆかり、石ヶ守里加子、牛山 明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子、加熱タバコ製品の吸入曝露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
35. 戸塚ゆかり、永井桃子、加藤 護、次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
36. 石ヶ守里加子、今井正彦、大野彰子、戸塚ゆかり、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
37. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤 護、魏 民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚 ゆかり、N—ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
38. 渡部 浩平、三好 規之、戸塚ゆかり、二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
39. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐淵 英機、美谷島 克宏、石ヶ守 里加子、加藤 孝一、戸塚 ゆかり、日本薬学会第 145 年会、2025 年 3 月 27-29 日
40. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第 97 回日本産業衛生学会、広島（2024 年 5 月 22-25 日）
41. 鈴木周五、藤岡正喜、魏民、アルパマス ワチラアルンウオン、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸経胎盤ばく露肝発がんにおける脂質代謝異常の関与. 第 20 回日本病理学会カンファレンス、山形（2024 年 6 月 26-27 日）
42. Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an in vitro Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in Rat. 第 51 回日本毒性学会学術年会、福岡（2024 年 7 月 3-5 日）
43. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. ヒト化肝臓マウスモデルを用いたヒ素の代謝および毒性の評価. 第 37 回発癌病理研究会、鳥取（2024 年 8 月 20-22 日）
44. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による F1 マウスにおける肝発がん機序には DNA メチル化異常が関与する. 2024 年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、愛知（2024 年 8 月 29-31 日）
45. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、鈴木周五、野浦郁恵、アルパマス ワチラアルンウオン、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカーとして PRDX3 の検討. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡（2024 年 9 月 19-21 日）
46. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、Vachiraarunwon Arpamas、大石裕司、邱桂鈺、Praseatsook Kwanchanok、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の交配前期、交配期、妊娠期および授乳期ばく露による仔ラットに対する発がん性の検討. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡（2024 年 9 月 19-21 日）
47. Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Giuyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡（2024 年 9 月 19-21 日）
48. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、梯アンナ、鰐淵英機. 0-Toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変に対する NADPH 酸化酵素阻害剤 apocynin の抑制効果. 第

- 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
49. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwon, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 50. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第 83 回日本癌学会学術総会、福岡 (2024 年 9 月 19-21 日)
 51. 藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の in vitro 投与量設定法の開発. 第 51 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、東京 (2024 年 12 月 20 日 11 月 8-9 日)
 52. 邱桂鈺、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露による F1 ラット海馬神経新生に及ぼす影響. 第 29 回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024 年 12 月 7-8 日)
 53. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露による F1 マウス肝発がん機序における DNA メチル化異常の関与. 第 29 回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024 年 12 月 7-8 日)
 54. 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Vachiraarunwon Arpamas、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌における新規マーカーとしての 3 の解析及び発がん機序解明. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025 年 1 月 30-31 日)
 55. Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Anna Kakehashi, Arpamas Vachiraarunwon, Ikue Noura, Runjie Guo, Hideki Wanibuchi. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025 年 1 月 30-31 日) ワークショップ
 56. Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas Vachiraarunwon, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in F1 rats following maternal exposure from pre-mating to Lactation. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025 年 1 月 30-31 日)
 57. Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Hepatotoxicity of per-and polyfluoroalkyl substances on immortalized human hepatocytes. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025 年 1 月 30-31 日)
 58. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwon, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in rats. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025 年 1 月 30-31 日)
 59. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、梯アンナ、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスを用いた 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) のヒト化肝細胞での代謝と膀胱発がん性の検証. 2024 年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、滋賀 (2025 年 2 月 12-13 日)
 60. 1. 今井俊夫、石ヶ守里加子、成瀬美衣: オルガノイドを用いる化学発がんモデルによる発がん早期過程の分子機序解析. 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 61. Mie Naruse, Hiroe Nozaki, Toshio Imai, Kassai Hidetoshi, Ryuichi Ono; Faithful DNA methylation status of imprinted DMRs in colon-derived organoids. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6 横浜)
 62. Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023.7. Taiwan)
 63. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、葛西秀俊、今井俊夫; 大腸癌手術余剰検体由来のオルガノイドおよび CAF を用いたエピゲノムマーカーの探索. 第 82 回日本癌学会学術集会 (2023.9. 横浜)
 64. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がんにおけるがん-間質細胞相互作用を再現する in vitro 実験系の構築. 第 46 回日本分子生物学会年会 (2023.12. 神戸)
 65. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がん患者由来オルガノイドと同一症例由来線維芽細胞の共培養系を用いる評価系の確立. 日本薬学会 144 年会 (2024.3. 横浜)
 66. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊 「患者由来オルガノイド利用した個別化医療に対応した薬剤耐性原因遺伝子の探索」 第 83 回日本癌学会、一般口頭発表, 2024. (福岡)
 67. 大橋 清佳、田中 あかり、竹田 結菜、神野 涼平、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、美谷島 克宏. クマリンの反復投与毒性試験におけるマウス肝臓の病態解析, 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.31)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

研究代表者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学 教授

研究要旨

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。そこで、近年、多岐にわたる研究分野で使用されているオルガノイドを用いて、化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価方法の開発を目指した。まず、マウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の長期培養、化学物質曝露の条件について様々な検討を行った。その結果、マトリゲルとオルガノイドを混ぜてドーム状に播種し、培地に Organoid Growth Medium (OGM, STEMCELL Technologies, ST-06030) を用いた培養方法により安定した培養状態が維持できた。化学物質曝露実験方法は、ドーム型培養法を用いても Matrigel Bilayer Organoid Culture (MBOC) 培養法と同様な細胞毒性が示された。また評価法については発光測定法、生細胞数計測法のいずれにおいても評価可能であった。オルガノイドの安定性について 2 施設で同一プロトコールにより培養したオルガノイドを用いて、各種遺伝子発現 (前駆肝細胞 (*Sox9*)、肝細胞 (*Hnf4a*, *Ttr*)、胆管細胞 (*Krt19*)、成熟肝細胞 (*Alb*, *Cyp*)) を指標に評価を行った結果、両施設ともに大きな発現変化は認められず、同一プロトコールを用いて試験を実施する限りは肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。確立したプロトコールに従い、被験物質としてフェノバルビタール (PB)、カルバミン酸エチル (EC)、モノクロタリン (MCT)、クマリン (CMR)、アセトアミノフェン (APAP) を用いて曝露実験を行ったところ、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認できた。オルガノイドに被験物質を 3 回曝露した後、形態観察を行った結果、すべての化学物質で共通して観察される形態変化は認められず、EC のみで多くの形態変化のスコアが上昇した。また、遺伝毒性試験として小核試験を行った結果、遺伝毒性発がん物質曝露 (EC, CMR, MCT) および肝毒性物質である APAP 曝露では小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質である PB 曝露ではコントロールと比較して頻度が同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらに MCT を曝露させたオルガノイドを Error-Corrected NGS (ec-NGS) 解析した結果、変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。MCT は Ames 試験では陰性と判定される遺伝毒性肝発がん物質であることから、マウス正常肝組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法は動物実験代替法として有用であることを示せた意義は大きいと考える。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかしながら、現在汎用されている *in vitro* 毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界があるため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。近年、3次元オルガノイド培養法の発展により様々な組織由来の正常細胞を長期培養することが可能となってきた。オルガノイドは *in vitro* 系で幹細胞から作ることができミニチュアの臓器とも言われており、幹細胞がもつ自己複製能と分化能を利用し自己組織化させることで臓器あるいは器官に特異的な3次元構造を形成し、その機能を再現することが可能である。このことから発生生物学、疾患病理学、細胞生物学、再生メカニズムといった基礎研究や創薬研究など多岐にわたる研究分野で使用されている。申請者はこれまでに、レポーター遺伝子導入マウス由

来のオルガノイドを用いて遺伝毒性試験を実施した結果、細菌や哺乳類細胞を用いる既存の試験法では検出できず、*in vivo* モデルでのみ検出できる化学物質の点突然変異をオルガノイドでは陽性と判定できることを明らかにした (Komiya M, Totsuka Yら, 2021)。本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法を確立するため、市販のマウス肝臓オルガノイドを用いて、①培養ならびに化学物質曝露実験の至適条件の決定、②オルガノイドの安定性評価を行った。そして、既知の遺伝毒性化学物質、非遺伝毒性化学物質、肝毒性物質を用いて化学物質曝露実験を行い、③細胞毒性試験、④細胞形態変化評価、⑤小核試験、⑥ Error-Corrected NGS (ec-NGS) によるゲノム変異解析について実施した。

B. 研究方法

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

a) 培地：Organoid Growth Medium (OGM, STEMCELL Technologies, ST-06030) と当施設で従来マウス肝臓由来オルガノイド培養に使用している調製培地を用いて 24well plate で培養を行い、オルガノイド

の増殖を比較した。なお、調製培地はAdvanced DME M/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、A83-01、CHIR-990 21、ITS-G supplement等を加えた。また継代時の播種密度は、OGMは1:30、調製培地は1:2~1:30にして検討を行った。

b) 培養方法：マトリゲルドーム内での培養が推奨されているが、当施設で従来オルガノイド培養に用いているMatrigel Bilayer Organoid Culture (MBOC) 法でも培養可能であるか検討を行った。なお、継代時の播種密度はドーム型培養では1:30とし、MBOC法は推奨培養方法ではないため1:10で行った。

c) シングルセル化の検討：トリプシンあるいはAccumaxを用いてオルガノイドをシングルセルにして培養した際のオルガノイドの増殖に及ぼす影響について比較した。

d) 化学物質曝露実験：メタンスルホン酸エチル (EMS) を用いて曝露実験を行った。ドーム型培養法ならびにMBOC培養法を用い、細胞を播種した2時間後から培地中最終濃度を0, 0.2, 2, 20mMとして24時間曝露後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega) ならびにトリパンプルー色素排除法を用い評価を行った。

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価：

本研究では標準的な毒性試験法の開発を目指しており、オルガノイドの品質が安定であることが望ましい。しかし、オルガノイドは培養条件などにより遺伝子発現に影響することが知られており、その品質について確認する必要があると考えた。そこで、2施設間（星薬科大学と国立がん研究センター）で同一の実験プロトコールに従い培養したオルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を分子マーカーとして評価した。

凍結日と継代数が異なる凍結マウス肝臓由来オルガノイド (2本) を各々ドーム型培養で播種し、1週間ごとに3週間継代を行った。播種ならびに継代時に形態学的観察を行い、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のためオルガノイドを回収した。遺伝子発現解析の対象として、肝細胞マーカー (*Hnf4a*, *Ttr*)、前駆肝細胞マーカー (*Sox9*)、成熟肝細胞マーカー (*Alb*, *Cyp3a11*)、胆管マーカー (*Krt19*) の遺伝子発現量を播種時の発現量と比較して評価した。なお、内部標準遺伝子は *18S rRNA* を用いた。また、マウス肝組織における遺伝子発現との比較も同じマーカー遺伝子を用いて行った。

③ 細胞毒性試験：

オルガノイドを播種後2時間培養し、S9mix存在下で化学物質を236, 943 μ M (フェノバルビタール (PB))、25, 50, 100 mM (カルバミン酸エチル (EC))、125, 250, 500 μ M (モノクロタリン (MCT))、50, 100, 200 μ M (クマリン (CMR))、10, 20, 40 mM (アセトアミノフェン (APAP)) で24時間曝露し洗浄後、トリプシンを用いてシングルセルにして、トリパンプルー色素排除法を用いて評価を行った。

④ 細胞形態変化評価：

マウス肝臓オルガノイドに、化学物質の3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露 (24時間) を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露 (24時間) を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露 (24時間) を行い洗浄した後、セルリカバリーソリューションを用いてオルガノイドを回収した。なお、化学物質の培地中最終濃度

は236, 943 μ M (PB)、25, 100 mM (EC)、125, 500 μ M (MCT)、50, 200 μ M (CMR) とした。

⑤ 小核試験：

オルガノイドを播種後3日間培養し、S9mix存在下で化学物質を236, 943 μ M (PB)、25, 100 mM (EC)、125, 500 μ M (MCT)、50, 200 μ M (CMR)、10, 40 mM (APAP) で24時間曝露し洗浄後、新しい培地で2日間培養後、シングルセルにして細胞を回収した。回収した細胞をサイトスピン法によりスライドガラスに固定後、ギムザ染色を行った。評価は、光学顕微鏡下で各スライドにつき2,000個の細胞を観察し、小核を保有する細胞数を計測し、算出した小核保有細胞の頻度 (小核出現頻度) を指標に行った。

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析：

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露 (24時間) を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露 (24時間) を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露 (24時間) を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、MCTの培地中最終濃度は125, 500 μ Mとした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit (QIAGEN) を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS (Nano-Seq) 解析を行った。

C. 研究結果

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

a) 培地：OGMを用いて培養した場合と比べ、調製培地での培養は増殖性が低かった。OGMの場合は1:30の播種密度で長期継代培養が可能だったが、調製培地は、OGMと同じ播種密度では増殖性が著しく低下し、濃く播種する必要があった。

b) 培養方法：MBOC法でも培養継続可能であったが、両培養法を比較すると、ドーム型培養法において増殖性が高いことがわかった。

c) シングルセル化の検討：トリプシンあるいはAccumaxともオルガノイドの増殖に大きな影響は及ぼさないことが分かった。

d) 化学物質曝露実験：両培養法ともに濃度依存的に細胞毒性が示された (図1A, B)。また、ドーム型培養に曝露した24時間後の細胞毒性については両評価法で同様の結果が得られた (図1A, C)。

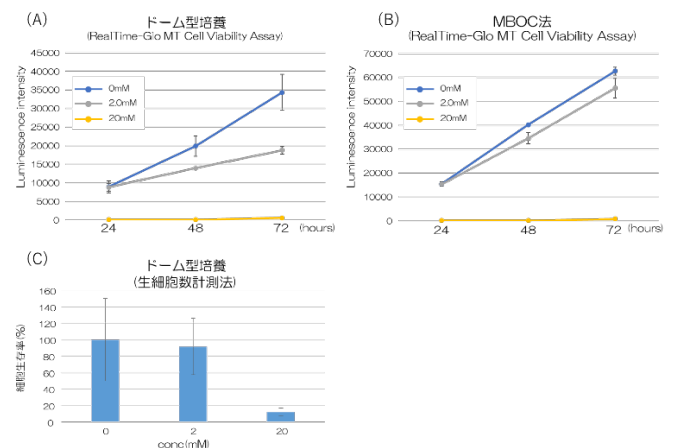


図1. EMS曝露による細胞毒性試験

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価：

オルガノイドをドーム型培養法により培養し、継代時に形態学的変化を観察した結果、図2のように播種後3週間におけるオルガノイドの形態学的変化は認められなかった。

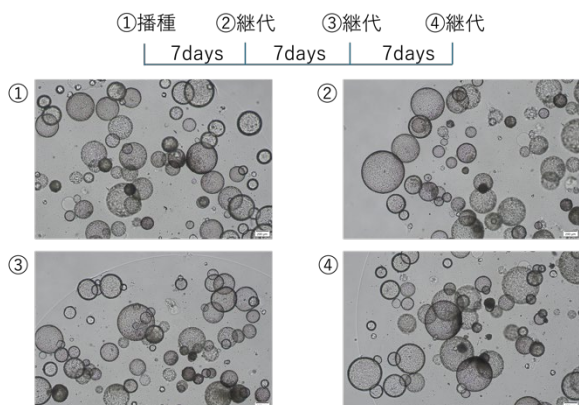


図2. オルガノイドの形態学的変化

オルガノイドの各種マーカー遺伝子発現は、同一プロトコルを用い、2施設で培養したオルガノイドにおける播種時と継代時で相対比較した。その結果、図3に示すように両施設において、*Sox9*(前駆肝細胞マーカー)、*Krt19*(胆管マーカー)、*Ttr*(肝細胞マーカー)は、継代を繰り返しても両施設間で大きな増減は認められなかった。一方、*Alb*(成熟肝細胞マーカー)、*Hnf4a*(肝細胞マーカー)および*Cyp3a11*(成熟肝細胞マーカー)に関しては、両施設ともに播種時と比較し、継代ごとにやや変動が認められた。

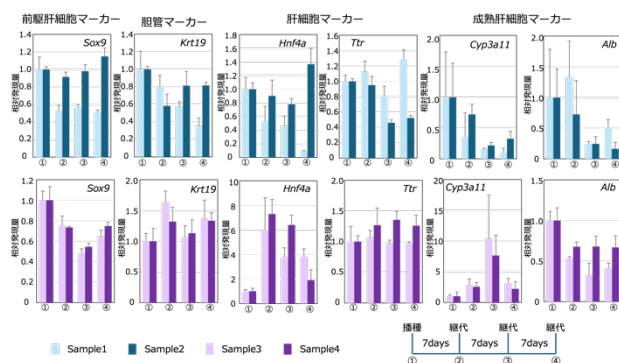
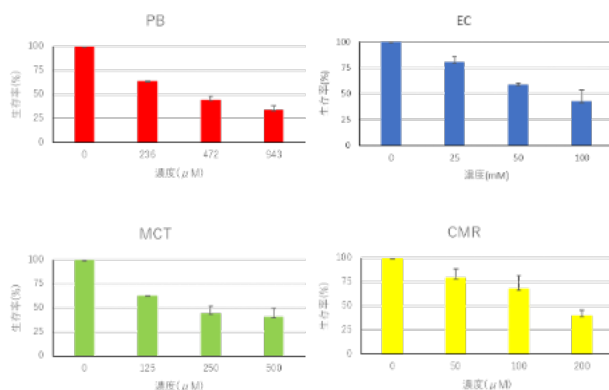


図3. 未分化オルガノイドの遺伝子発現
(上段：星葉，下段：NCC)

③ 細胞毒性試験：

化学物質を曝露させた結果、図4に示すように各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が低下した。

(A)



(B)

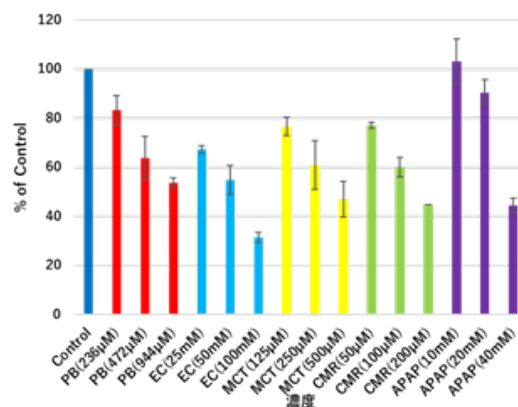


図4. 化学物質曝露による細胞毒性試験
(A) S9mix無、(B) S9mix有)

④ 細胞形態変化評価：

複数回曝露したオルガノイドから切片を作成し観察した結果、いくつかの形態変化が観察された。形態変化としては以下の図5-1～5-7に示すものを形態変化として捉えた。

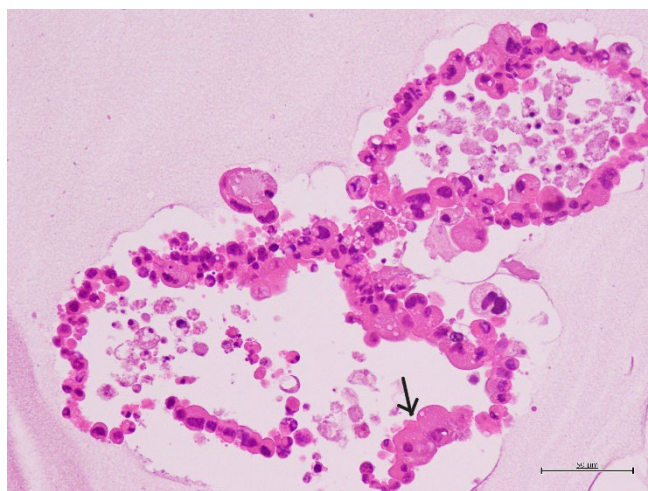


図 5-1. 細胞肥大

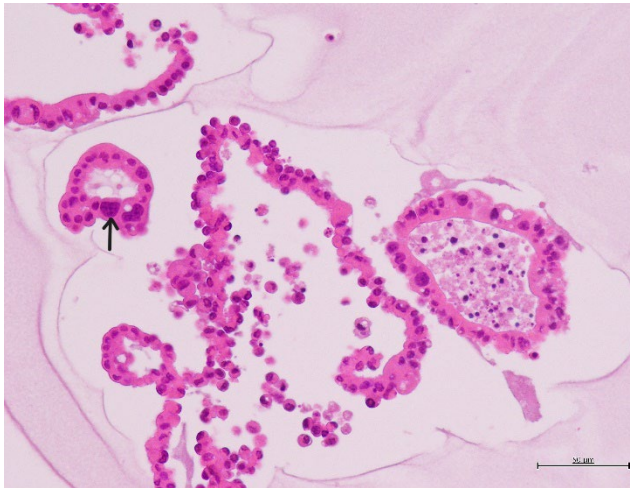


図 5-2. 核肥大



図 5-5. 核の淡明化

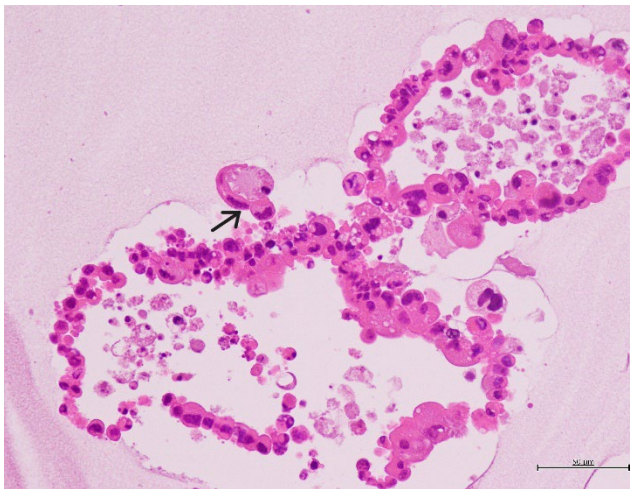


図 5-3. 核の変形



図 5-6. 核の凝集



図 5-4. 多核

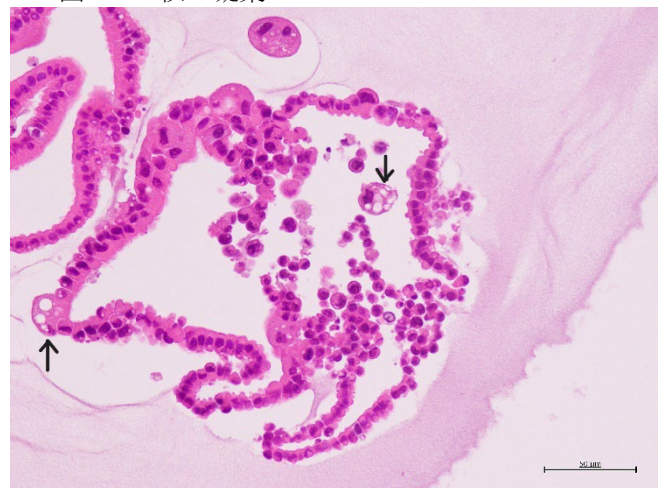


図 5-7. 空胞

上記の図 5-1～5-6 までの各形態変化を有す細胞数を全細胞数で割った結果を図 6 に示す。

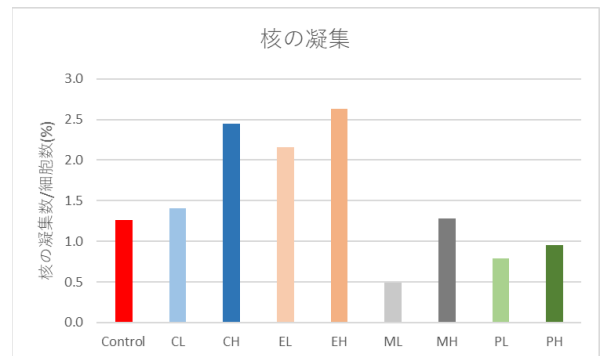
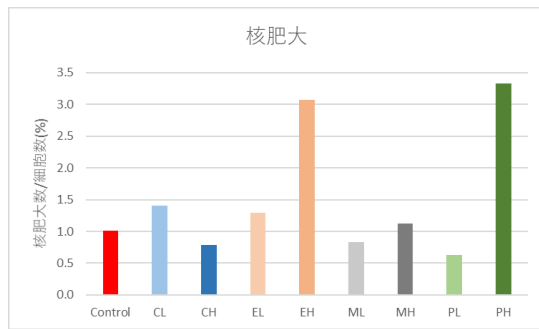
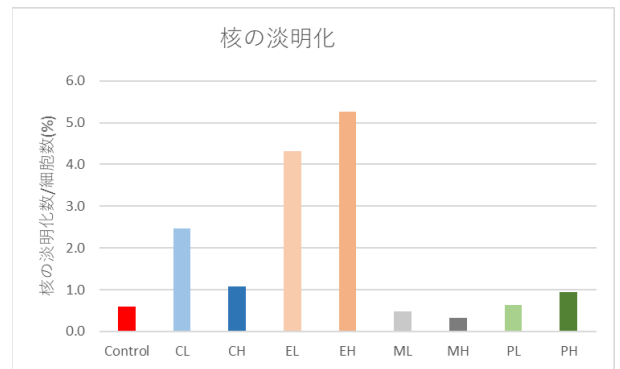
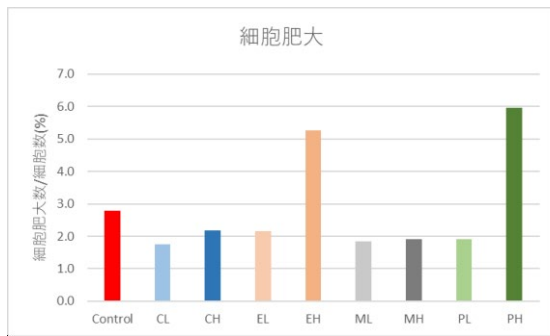


図 6. 形態変化を示した細胞の割合の比較

なお、本研究では空胞の形態変化は空胞の量をスコア化(なし:0, 少量:1, 多量:2)して図 7 に示す。空胞の評価法として細胞面積に対する割合で評価する方法が報告されているが、現当施設では評価に必要なソフトウェアがないため今回は空胞の量をスコア化することで評価した。

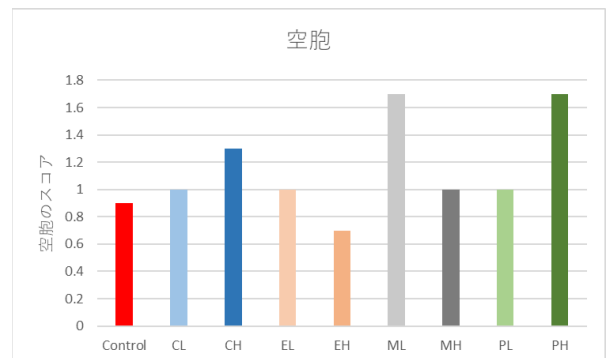
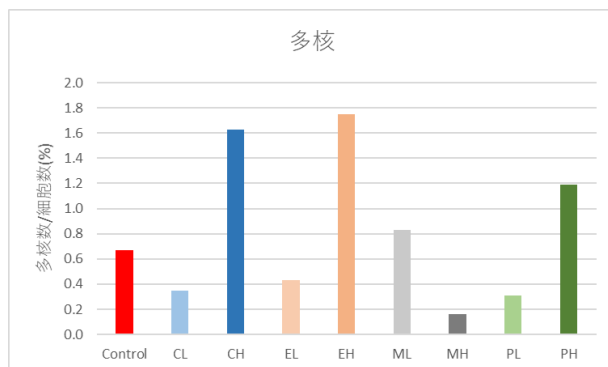
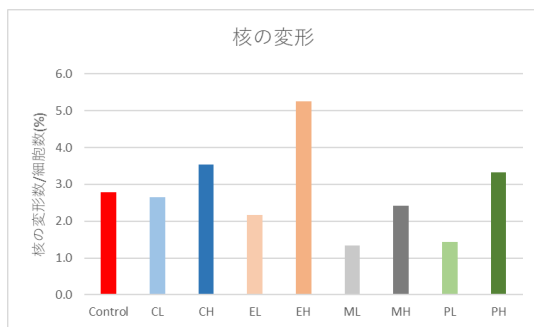


図 7. 空胞化を有する細胞スコアの比較

以上のスコアをまとめて表 1 に示す。

表 1 細胞形態変化の化学物質毎の比較

	CMR	EC	MCT	PB
細胞肥大	—	○	—	○
核肥大	—	○	—	○
核の変形	—	○	—	—
多核	○	○	—	○
核の淡明化	—	○	—	—
核の凝集	○	○	—	—
細胞空胞化	—	—	○	○

発がん性の標的臓器が肝臓ではないEC曝露で多くの形態変化が観察された。肝臓が標的臓器ではあるものの、直接変異原性ではなく、プロモーター作用を持つPBでは中程度の形態変化が観察された。一方、代謝活性化条件下でDNAに作用し、肝臓の発がん性を示すCMRおよびMCTにおいては、ほとんど形態変化が観察されなかった。

⑤ 小核試験：

化学物質を曝露させた結果、図8に示すような小核が出現し、小核出現頻度は、遺伝毒性発がん物質（EC, MCT, CMR）および肝毒性物質であるAPAPでは曝露により出現頻度が上昇していた（図9）。APAPは、細胞毒性が見られなかった低濃度曝露では発生頻度に大きな上昇は見られなかったが、細胞毒性が強く示された高濃度曝露では発生頻度が上昇し、細胞毒性と小核発生頻度の相関が認められた。なお、非遺伝毒性肝発がん物質であるPBはコントロールとほぼ同程度の小核出現頻度であった。

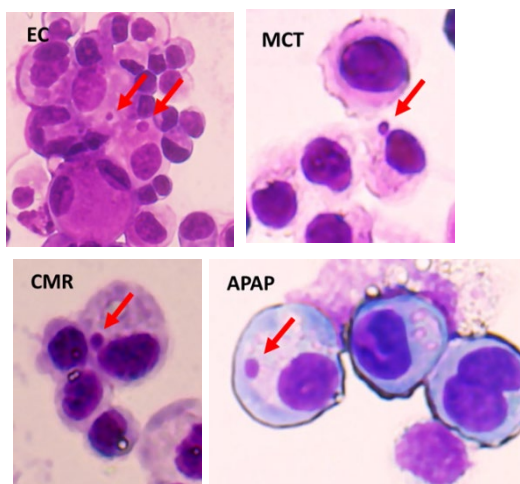


図8. 化学物質曝露による出現した小核

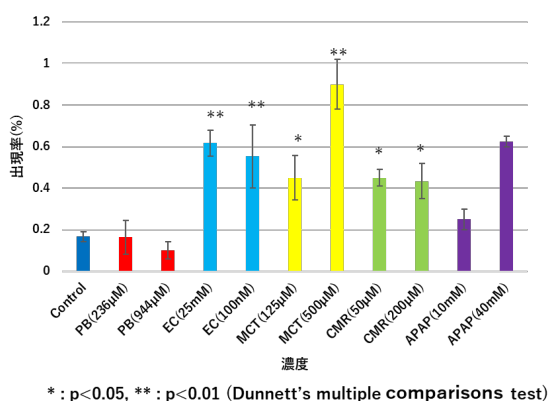


図9. 小核出現頻度

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析：

小核試験で最も強く陽性となったMCTについてec-NGSによりゲノム変異の解析を実施した。その際の1塩基置換変異頻度を図10に示す。コントロール（DMSO）と比較してMCTを曝露することで変異頻度

が上昇した。図11はゲノム変異データから変異シグネチャー解析を実施した結果である。コントロールのパターンと比較すると、C>Aにおいて変異シグネチャーパターンが異なることが認められた。

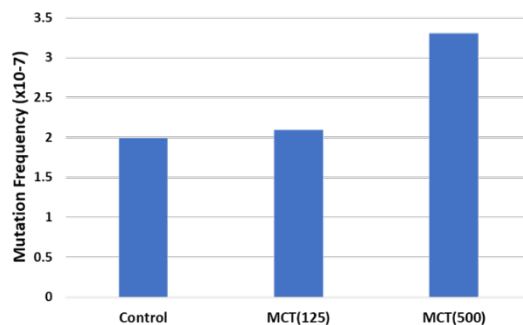


図10. 1塩基置換変異頻度

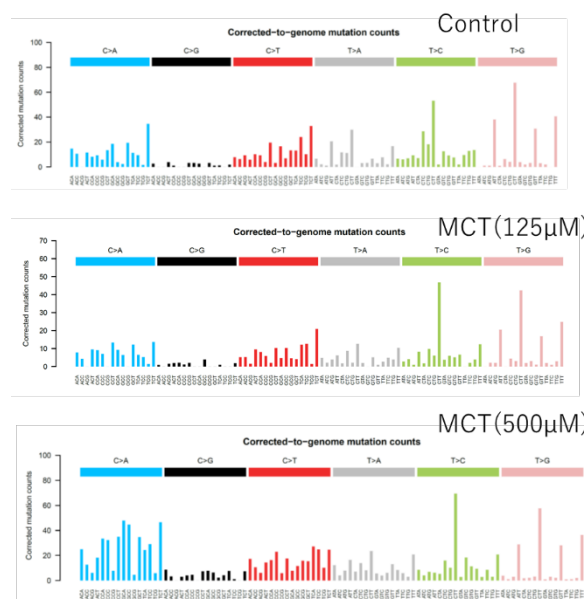


図11. Error-Corrected NGS (Nano-Seq)による変異シグネチャーパターン

D. 考察

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

OGMを用いた培養では1:30の播種密度で1週間毎に継代を行うことで長期培養が可能であったが、調製培地の場合、OGMと同じ播種密度で培養すると増殖性が低下していったため、オルガノイドを観察し継代間隔と播種密度を決める必要があった。培養方法は、MBOC法を用いた培養でも播種量を多くすることで培養の維持が可能であると推察されたが、ドーム型培養のほうが、少ない播種量でも安定して増殖していた。また、ドーム型培養で播種し、1週間程度経過したオルガノイド数は1wellあたり1~5×10⁵個程度であり、24well plateを用いたドーム型培養でも、種々の実験に対応可能な細胞数を得ることができると考える。シングルセル化の方法は、STEMCELL TechnologiesはTrypLEを推奨していることから、成分が似ているトリプシンの使用がよいと考える。化学物質曝露実験は、これまでにマウス由来の肝臓

オルガノイドに曝露実験を行ったことがあるEMSを用いた。ドーム型培養法においてもMBOC法と同様に、濃度依存的に細胞毒性が示され、ドーム型培養法でも曝露実験が可能であると考えた。また評価方法については、細胞数計測法、発光測定法のいずれでも評価可能であったが、本課題では比較的操作が容易な細胞数計測法で細胞毒性試験を行うことを決定した。

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価：

マウス肝臓オルガノイドの安定性評価に係るマーカー遺伝子発現解析では、成熟肝細胞マーカー (*Alb*, *Cyp3a11*) や肝細胞マーカー (*Hnf4a*) の発現において、播種後に変動が認められたが、マウス肝組織のそれら遺伝子発現と比較すると、非常に低いものであり (data not shown)、これらの遺伝子の発現の変動はオルガノイドの安定性に影響をおよぼさない程度であると考えられる。図2は内部標準遺伝子に *18S rRNA* を用いて解析したが、*gapdh* を内部標準遺伝子に用いて解析を行った際も同様の結果であることを確認している (data not shown)。また、本研究ではオルガノイド播種後、3週間培養を行ったが、これは3回曝露実験を行う際に必要な期間である。そして、この期間においてオルガノイドの形態学的変化ならびに大きな遺伝子発現変化がみられなかったことから、本試験で用いるマウス肝臓由来オルガノイドは、同一プロトコルを用いて培養する限り、曝露実験期間を通して肝前駆オルガノイドとして安定であると考えられる。

③ 細胞毒性試験：

確立したプロトコルで、被験物質に、PB, EC, MCT, CMR, APAPを用いて化学物質単回曝露実験を行った。その結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認され、その後の実験に使用する各化学物質の曝露濃度の決定を行うことができ、確立したプロトコルの妥当性も確認できた。S9mixを添加していない曝露実験においても、細胞生存率が低下したことから使用した肝オルガノイドは幼若細胞であるにもかかわらずある程度の薬物代謝酵素が発現しているか、曝露により代謝酵素が誘導され、化学物質が代謝を受けたことで肝毒性を示したとも考えられる。

④ 細胞形態変化評価：

すべての化学物質で共通して観察される形態変化は認められず、ECのみで多くの形態変化のスコアが上昇した。

ECの発がん標的臓器は肺であるが、*in vitro* システムでは化学物質を直接細胞 (オルガノイド) に曝露するため、毒性が観察されたと考えられる。その毒性発現メカニズムはCYP2E1 によってカルバミン酸ビニルエポキシドへの代謝活性を受け、カルバミン酸ビニルエポキシドは、核酸やタンパク質に共有結合し毒性を示すと考えられている。

中程度の形態変化が観察されたPBは発がんプロモーターであり、直接、核酸やタンパク質に結合するわけではなく、ダメージを受けた細胞の増殖を亢進するなどして肝臓に発がん性を示す。多核細胞の出現は細胞分裂の異常により起こることが考えられ、したがってプロモーション作用を有するPBの曝露で多核細胞のスコアが上昇したことが示唆される。一方、代謝活性化条件下でDNAに作用し、肝臓の発がん性を示すCMRおよびMCTにおいては、ほとんど形態変化が観察されなかった。MCTは、肝臓の薬物代謝酵素により代謝され、活性代謝中間体 (ピロール

構造) がアルキル化剤として働き、DNAやタンパク質と結合して毒性を発現していると考えられている。CMRは、肝臓で代謝を受け3, 4-エポキシマリリン (CE) になり、肝毒性物質であるo-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド (o-HPA) になることで肝毒性を示すと考えられている。本実験で使用した肝オルガノイドは幼若細胞であり、薬物代謝酵素の発現が不十分であったことが考えられる。

⑤ 小核試験

化学物質曝露後に小核出現頻度をコントロールと比較したところ、遺伝毒性発がん物質および肝毒性物質では上昇したが、非遺伝毒性発がん物質ではコントロールと同程度であった。この結果から、オルガノイドを用いて小核を指標に化学物質の遺伝毒性評価が可能であることが示唆された。本試験では、出現する小核の大きさに違いがあることが確認できた (図 12)。大きい小核は、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来、小さい小核はDNA損傷により生じる構造異常由来とされており、小核形成のメカニズムが異なることを意味する。小核の出現頻度に加え、小核の大きさも考慮することで、遺伝毒性メカニズムを明らかにできる可能性がある。



図12. MCT曝露により観察された大きさに違いのある小核。青○：大きい小核、赤○：小さい小核

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

小核試験で最も強く陽性となったMCTについてec-NGSによりゲノム変異の解析を実施した。その結果、コントロールと比較し、曝露により1塩基置換変異頻度が上昇することがわかった。MCTは肝発がん性を示す遺伝毒性発がん物質であるが、Ames試験では陰性となることが知られている。マウス肝臓由来のオルガノイドを用いた本研究では、MCTの変異原性を陽性と捉えることができた。そのメカニズムについてはまだ詳細な検討をしていないが、おそらく、我々のアクリルアミドの先行研究で報告したものと同様に、MCTの代謝活性化に係る酵素がオルガノイドで誘導されたものと推測している。MCTはCYPにより代謝活性化され、dGのDNA付加体 (DHP-dG) の生成を介してゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、本研究で解析したMCTの変異シグネチャーパターンからもC:G to A:Tの変異がコントロールと比べて増加していることから、マウスオルガノイドにおいてもこれらMCTのDNA付加体を介してゲ

ノム変異を誘発することが示唆された。Ec-NGSでは変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。今回は、1塩基置換のみの解析結果を報告したが、得られたゲノム情報からは2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、ec-NGSでは変異頻度による定量性のみならず、得られる変異パターン（変異シグネチャー）が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。本研究では、このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと考える。

E. 結論

マウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の培養ならびに化学物質曝露実験方法は、培地に OGM (STEMCELL Technologies, ST-06030) を用いマトリゲルとオルガノイドを混ぜてドーム状に播種する培養方法で行い、シングルセルにする酵素はトリプシンを用いることにした。2施設でマウス肝臓オルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を指標に解析した結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、同一プロトコルを用いて培養した際には肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。

細胞毒性試験において、マウス肝臓オルガノイドに化学物質 (PB, EC, MCT, CMR, APAP) を曝露すると濃度依存的に細胞生存率が低下した。化学物質の複数回曝露による細胞形態変化については、すべての化学物質で共通して観察される形態変化は認められず、EC のみで多くの形態変化のスコアが上昇した。

小核試験においては、遺伝毒性発がん物質 (EC, MCT, CMR) および肝毒性物質である APAP では小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質である PB 曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらに ec-NGS 解析では、化学物質曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。同手法は、変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。また、得られるゲノム情報からは1塩基置換のみならず、2塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、得られる変異パターン（変異シグネチャー）が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol*. (2022) Sep 19;35(9):1625-1630.
2. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, **Totsuka Y**, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. (2022) Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. *In Vivo*. (2022) Mar-Apr;36(2):628-634.
3. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, **Fujioka M**, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. (2024) 14:36.
4. Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y**. Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. *Int. J. Mol. Sci.*, (2024) 25(20):11191.
5. Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y**. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. (2024) Oct;899:503821.
6. Imai T, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y**. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci*. (2024) 49(10):425-434.

2. 学会発表

1. **Yukari Totsuka** Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 12th AACR-JCA Joint Conference (2022 年 12 月、マウイ-ハワイ、米国)
2. **戸塚 ゆ加里**, 小宮雅美, 永井桃子, 加藤 護, 松田知成 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 35 回 発癌病理研究会 (2022 年 11 月、新潟)
3. 帯金明日香, 小宮雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐渕 英機, **戸塚 ゆ加里** 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析 第 51 回 環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
4. 坪井理, 植嶋亜衣, 久富優太, 小田美光, 恒松雄太, 佐藤道大, 平山裕一郎, 三好規之, 岩下雄二, 吉川悠子, 相村春彦, **戸塚 ゆ加里**, 若林敬二, 渡辺賢二, 川西優喜 DNA 鎖間架橋修復欠損細胞を用

- いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価 第 51 回 環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
5. **戸塚 ゆかり**, 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 1 回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022 年 11 月、東京)
 6. **戸塚 ゆかり**, 小宮雅美, 松田知成, 加藤護 Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
 7. 小宮雅美, 落合雅子, 今井俊夫, **戸塚 ゆかり** Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
 8. 帯金明日香, 小宮雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐淵 英機, **戸塚 ゆかり** Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
 9. **Yukari Totsuka** New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer 13th ICEM (2022 年 8 月オタワ・カナダ)
 10. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines 13th ICEM (2022 年 8 月オタワ・カナダ)
 11. 小宮 雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐淵 英機, **戸塚 ゆかり** 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析 第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月 京都)
 12. 小林 琢磨, 豊田 武士, 吉岡 泰淳, 岸本 真治, 松下 幸平, 赤根 弘敏, 小川 久美子, 渡辺 賢二, 高村 岳樹, **戸塚 ゆかり**, 若林 敬二, 三好 規之 細胞毒性を有する o-Toluidine と o-Anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する 第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月 京都)
 13. **戸塚 ゆかり** 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望 第 49 回日本毒性学会 (2022 年 6 月 札幌)
 14. 小宮雅美, 広田航太郎, 山口大雅, 石ヶ守里加子, 稲葉洋平, **戸塚 ゆかり**, 加熱式タバコの遺伝毒性評価, がん予防学術大会 2023 (2023 年 9 月、金沢)
 15. **Totsuka Y**, Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023 年 9 月、シカゴ・米国)
 16. **Yukari Totsuka**, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 17. 小宮雅美, 広田航太郎, 山口大雅, 石ヶ守里加子, 稲葉洋平, **戸塚 ゆかり**, 加熱式タバコの遺伝毒性評
 - 価, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
 18. 石ヶ守里加子, 澤田琉那, 前嶋愛美, 小宮雅美, 大野彰子, **戸塚 ゆかり**, アドバンストナノマテリアルの in vitro 遺伝毒性評価, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
 19. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, **Yukari Totsuka**, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
 20. 白鳥修平, 小宮雅美, 魏民, 鈴木周五, 鰐淵英機, Jiri Zavadil, 渡部浩平, **戸塚 ゆかり**, 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバークタクト探索, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
 21. 本橋実奈, 別役雄毅, 高村岳樹, 小宮雅美, 佐々彰, **戸塚 ゆかり**, アルコール発がんにおけるドライバークタクトの探索と変異誘発メカニズムの解明, 第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
 22. **Totsuka Y**, Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023 年 11 月、東京)
 23. **戸塚 ゆかり**, ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析, 日本酸化ストレス学会 (2023 年 12 月、川崎)
 24. **戸塚 ゆかり** 生体を模倣した in vitro 遺伝毒性評価法 日本薬学会 144 年会 (2024 年 3 月、横浜)
 25. **戸塚 ゆかり**, DNA 付加体研究の過去・現在・未来 東京、令和 6 年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム, 2024 年 6 月 1 日
 26. **Yukari Totsuka**, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 札幌、第 42 回札幌国際がんシンポジウム, 2024 年 6 月 6-8 日
 27. **Yukari Totsuka**, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, 京都、2024 年 6 月 28-30 日
 28. 大橋 清佳, 梶川 明音, 前川 竜也, 煙山 紀子, **戸塚 ゆかり**, 美谷島克宏, カルバミン酸エチル (ウレタン) のマウス反復投与毒性試験における病態解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024 年 7 月、福岡)
 29. **戸塚 ゆかり**, 小宮雅美, 煙山紀子, 加藤 護, Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products, 第 83 回日本癌学会総会、福岡、2024 年 9 月 19-21 日
 30. **戸塚 ゆかり**, DNA 付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明, アンチエイジング研究シンポジウム, 東京、2024 年 10 月 25-26 日
 31. **戸塚 ゆかり**, 環境要因による DNA 付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索, Web

- 開催、環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024 春季
ネットシンポジウム、2024 年 11 月 9 日
32. 戸塚ゆ加里、DNA 付加体解析を基軸とした発がん
要因およびメカニズムの解明、福岡、第 47 回日本
分子生物学会年会、2024 年 11 月 27-29 日
 33. 戸塚ゆ加里、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価
法の開発 第 85 回 MMS 秋の定例会、岡山、2024 年
12 月 6 日
 34. 戸塚ゆ加里、石ヶ守里加子、牛山 明、稲葉洋平、
美谷島克宏、煙山紀子、加熱タバコ製品の吸入曝
露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、岡山、
第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月
7-8 日
 35. 戸塚ゆ加里、永井桃子、加藤 護、次世代シーケ
ンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明
する、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、
2024 年 12 月 7-8 日
 36. 石ヶ守里加子、今井正彦、大野彰子、戸塚ゆ加里、
マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマ
テリアルの毒性評価、岡山、第 53 回日本環境変異
原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
 37. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤
護、魏 民、鈴木周五、鰐渕英機、松田知成、戸塚
ゆ加里、*N*-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネ
チャーの解析、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノ
ム学会、2024 年 12 月 7-8 日
 38. 渡部 浩平、三好 規之、戸塚ゆ加里、二環芳香族ア
ミンにおける変異スペクトル解析、岡山、第 53 回
日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8
 39. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐渕 英機、美谷島 克宏、
石ヶ守 里加子、加藤 孝一、戸塚 ゆ加里、日本薬
学会第 145 年会、2025 年 3 月 27-29 日
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合分担研究報告書

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立
(22KD1001)

分担研究項目：毒性評価・ゲノム発現解析

研究分担者 藤岡 正喜 大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学 講師

研究要旨

化学物質の安全性評価には動物実験が必要とされるが、動物愛護の観点から代替法の開発が求められている。本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価方法の開発を目指した。マウス肝臓オルガノイドに対して Phenobarbital Sodium、Ethyl Carbanate、Monocrotaline、Coumarin を用いて研究を実施した結果、4 物質で共通して発現変動がみられた 9 つの遺伝子が同定された。そのうち、非肝発がん物質で発現変動がみられなかった 5 つの遺伝子 (C1s, Ighv5-12, Or9i14, Scgb2b27, Vmnlr195) は、本研究で用いられた肝発がん物質に特異的な変動を示すことが明らかになった。さらに、Tox Function 解析の結果、肝発がん物質では Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測されたことから、炎症に起因する疾患に関連する機能の亢進が示唆された。さらに、マウス 4 週間および 13 週間ばく露試験との相関解析を行った結果、マウス 4 週間および 13 週間ばく露試験においても、Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測された。さらに、炎症誘導や肝細胞の再生誘導に関連するパスウェイが肝オルガノイドおよびマウス肝臓の双方で変動していることが確認できた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo* 試験で得られた結果と相関することが確認できた。

A. 研究目的

マウス肝臓オルガノイドに既知の肝発がん物質をはじめとした被験物質をばく露し、その遺伝子発現変化について検討することで、化学物質の毒性の有無およびその機序について予測可能かどうか、検討を行った。

さらに、同様の被験物質を 4 週間あるいは 13 週間投与し得られたマウス肝臓を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、マウス肝臓オルガノイドと比較検討することで、*in vivo* (マウス肝臓) および *in vitro* (マウス肝臓オルガノイド) における相関性について検討を行った。

B. 研究方法

〔材料と方法〕

本研究で使用した被験物質について、下記に記す。

- ・Phenobarbital Sodium (PB) (CAS RN : 57-30-7)
- ・Coumarin (CMR) (CAS RN : 91-64-5)
- ・Acetoaminophen (APAP) (CAS RN : 103-90-2)
- ・Monocrotaline (MCT) (CAS RN : 315-22-0)
- ・Ethyl Carbanate (EC) (CAS RN : 51-79-6)

上記化学物質を用いて、加えて、PB、CMR、MCT オヨビ EC をそれぞればく露させたマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を星薬科大学 戸塚教授より供与いただいた。受領した mRNA を *in vitro* マウス肝臓 mRNA として用いて以降に記す解析を行った。さらに、4 週間 (PB、APAP) あるいは 13 週間 (CMR) マウスに投与した肝臓を東京農業大学 美谷島教授より供与いただいた。受領した肝臓より mRNA を抽出し、*in vivo* マウス肝臓 mRNA として、以降に記す解析を行った。

〔網羅的遺伝子発現解析〕

回収したマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA のうち、対照群および高用量群をそれぞれ用いて (計 8 検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに *in vivo* マウス肝臓由来 mRNA のうち、PB、CMR および APAP 投与群における対照群および高用量群をそれぞれ用いて (計 5 検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Expression Console™ を用いて、数値化および正規化を行った。アルゴリズムは、SST-RMA を用いた。Annotation Level は、(Exon Level ではなく) Gene Level とした。得られた遺伝子発現パラメータを用いて Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて、パスウェイ解析及び各被験物質ばく露による影響について検討を行った。

加えて、昨年度実施したマウス肝臓オルガノイドを用いたマイクロアレイおよびパスウェイ解析で得られたデーターを用いて、*in vivo* および *in vitro* 双方でどのような影響がみられたか、検討を行った。

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

in vitro マウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果 (表1)、PB 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 83、0.66 以下の遺伝子は 228 であった。同様に、CMR 投与において発現量比 1.50 以上

の遺伝子は187、0.66以下の遺伝子は132であった。またMCT投与において発現量比1.50以上の遺伝子は108、0.66以下の遺伝子は186であった。EC投与において発現量比1.50以上の遺伝子は261、0.66以下の遺伝子は544であった。IPAソフトウェアによるTox Functions結果、肝発がん物質(PB、CMRおよびMCT)で共通して活性化が予測され、かつ遺伝毒性非肝発がん物質(EC)において不活性化が予測された機能として、Hepatic statosis、Conjugation of glutathioneが挙げられた。さらに、肝発がん物質(PB、CMR、MCT)で共通して発現変動がみられた遺伝子として、C1s、Fabp2、Gm20826、Ighv5-12、Mir3079、mir-467、Or9i14、Scgb2b27およびVmn1r195の9つが同定された。そのうち、非肝発がん物質(EC)で発現変動がみられなかった、すなわち本研究に用いた3つの肝発がん物質特異的な変動を示した遺伝子として、C1s、Ighv5-12、Or9i14、Scgb2b27およびVmn1r195が同定された。さらに共通変動遺伝子でネットワーク解析した結果、肝発がん物質共通上流因子としてHNF4A (hepatocyte nuclear factor 4A) が同定された。

鰐渕班研究で構築された遺伝毒性肝発がん物質検出モデルおよび非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルにて、検討を試みた結果、4物質いずれもNegativeの結果となった。

表1 *in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)における網羅的遺伝子発現解析の結果

	物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝発がん物質	モノクロタリン (MCT)	1.50 以上	108
		0.66 以下	186
	クマリン (CMR)	1.50 以上	187
		0.66 以下	132
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	83
		0.66 以下	228
遺伝毒性非肝発がん物質	カルバシチン (C)	1.50 以上	261
		0.66 以下	544

*in vivo*マウス肝臓mRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果(表2)、CMR投与において発現量比1.50以上の遺伝子は305、0.66以下の遺伝子は213であった。同様に、PB投与において発現量比1.50以上の遺伝子は398、0.66以下の遺伝子は302であった。またAPAP投与において発現量比1.50以上の遺伝子は341、0.66以下の遺伝子は318であった。IPAソフトウェアによるTox Functions解析の結果、3つの物質 (CMR、PBおよびAPAP) で共通して活性化が予測された機能として、Conjugation of glutathioneが挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMRおよびPB、MCTの3つで共通して変動がみられた機能である。同様に、不活性化がみられた機能としてCell death of liverが挙げられた。

3つの化学物質ばく露で共通して変動がみられた遺伝子として55の遺伝子が同定され、KEGG_PATHWAY解析の結果、P450を介した代謝や異物代謝シグナル、活性酸素種(ROS)の産生に関わるシグナルに関連する遺伝子であることが明らかとなった。また3物質に共通する上流遺伝子について、Upstream regulator解析を実施した結果、

NR1/3やNR1/2、AHRなどの異物代謝に関わる遺伝子の活性化が確認できた。また、肝発がん物質であるCMRおよびPBに共通する遺伝子セットについてTox Functions解析した結果、Hepatic steatosisの活性化が挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMR、PBおよびMCTの3

表2 *in vivo*(マウス肝臓)における網羅的遺伝子発現解析の結果

	物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝発がん物質	クマリン (CMR)	1.50 以上	305
		0.66 以下	213
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	398
		0.66 以下	302
非遺伝毒性非肝発がん物質	アセトアミノフェン (APAP)	1.50 以上	341
		0.66 以下	318

つで共通して変動がみられた機能と一致する結果である。

*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおける網羅的遺伝子発現解析との比較の結果、PB投与においては共通して発現変動を示すシグナルとして、Liver Regeneration、Inflammation liver、Hepatic steatosisがみられ、*in vivo*(マウス肝臓)で得られた結果と*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)が良好に一致することが示された。一方、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。さらに、*in vivo*(マウス肝臓)および*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)の両方で発現が確認できた遺伝子(PBでは30遺伝子、CMRでは31遺伝子)について相関解析を実施した結果、PBでは0.142、CMRでは0.386と弱い正の相関が得られた。加えて、PBではHepatocellular carcinoma関連シグナルに属する遺伝子について相関解析を行った結果、0.516と正の相関が得られた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo*試験で得られた結果と関連することが確認できた。

D. 考察

本研究では、マウス肝臓オルガノイドに対して肝発がん物質あるいは非肝発がん物質の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較解析を行うことで、*in vivo*マウス急性毒性試験の代替法となり得るかについて検討を行った。マウス肝臓オルガノイドに被験物質を投与した際に、肝発がん物質特異的にHepatic Steatosisなどの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかとなった。*in vivo*マウス肝臓を用いて比較検討を行った結果、P450を介した代謝や異物代謝誘導系、グルタチオン抱合の亢進などが共通してみられた。特に、PBばく露マウス肝臓と肝臓オルガノイドの比較では、肝傷害やそれらに伴う再生の亢進が、*in vitro*および*in vivo*の双方で共通して発現変動することが確認できた一方で、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。しかしながら、CMR投与において*in vitro*において活性化

が示されたNecrosis of liverが*in vivo*では不活性化を示していることから、肝臓オルガノイドにおけるNecrosis of liverの活性化に伴う炎症誘導について、今後マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞との共培養系を用いることで、例えば肝細胞と肝星細胞との相関や肝細胞とクッパー細胞との相関など、より生体を模倣した影響が評価できると期待される。

E. 結論

本研究により、化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、*in vivo*マウス肝臓と同様に炎症関連シグナルの誘導やHepatic steatosisの亢進が観察できることが示唆された。また、マウス肝臓オルガノイドにおける化学物質ばく露による影響が弱いことが予想される場合には、マウス肝臓オルガノイドに加えて免疫/間質細胞共培養系を実施することで、炎症応答による再生の誘導などが観察できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA methylation aberrations in dimethylarsinic acid-Induced bladder carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2023;15, 5274.
- 2) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*. 2023; 488:153483.
- 3) Imai K, Niwa R, Fujioka M, Ito K. Understanding the quality and safety of food production through the lens of The Microbiome of The Built Environment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2023;0, 1-6
- 4) Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J. Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 2023; 128(12):2197-2205.
- 5) Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the mechanisms involved in the development of bladder toxicity following exposure to occupational bladder cancer causative chemicals using DNA adductome analysis. *Biomolecules* 2023; 14(1).

- 6) Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett*. 2023; 384:128-135.
- 7) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol*. 2023; 36, 123-129.
- 8) Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. *Arch Toxicol*. 2024; 98: 2711-2730.
- 9) Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arch Toxicol*. 2024; 98: 2065-2084.
- 10) Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. *Toxicol Sci*. 2024; 202: 210-219.
- 11) Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38: 59-67.
- 12) Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38: 147-54.
- 13) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38: 161-5.

2. 学会発表

- 1) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐渕英機. 遺伝毒性肝がん物質の超短期検出モデルの確立. 第 97 回日本産業衛生学会、広島(2024 年 5 月 22-25 日)

- 2) 鈴木周五、藤岡正喜、魏民、アルパマス ワチラアルンウオン、梯アンナ、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸経胎盤ばく露肝発がんにおける脂質代謝異常の関与. 第20回日本病理学会カンファレンス、山形 (2024年6月26-27日)
- 3) Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in Rat. 第51回日本毒性学会学術年会、福岡 (2024年7月3-5日)
- 4) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. ヒト化肝臓マウスモデルを用いたヒ素の代謝および毒性の評価. 第37回発癌病理研究会、鳥取 (2024年8月20-22日)
- 5) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露によるF1マウスにおける肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する. 2024年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、愛知 (2024年8月29-31日)
- 6) 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、鈴木周五、野浦郁恵、アルパマス ワチラアルンウオン、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカーとしてPRDX3の検討. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 7) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、Vachiraarunwon Arpamas、大石裕司、邱桂鈺、Praseatsook Kwanchanok、郭潤傑、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の交配前期、交配期、妊娠期および授乳期ばく露による仔ラットに対する発がん性の検討. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 8) Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 9) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、梯アンナ、鰐渕英機. *o*-Toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変に対するNADPH酸化酵素阻害剤apocyninの抑制効果. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 10) Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwon, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 11) 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、郭潤傑、梯アンナ、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 12) 藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐渕英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の *in vitro* 投与量設定法の開発. 第51回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、東京 (2024年12月20日 11月8-9日)
- 13) 邱桂鈺、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、梯アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるF1ラット海馬神経新生に及ぼす影響. 第29回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024年12月7-8日)
- 14) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露によるF1マウス肝発がん機序におけるDNAメチル化異常の関与. 第29回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024年12月7-8日)
- 15) 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Vachiraarunwon Arpamas、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膵管癌における新規マーカーとしての3の解析及び発がん機序解明. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
- 16) Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Anna Kakehashi, Arpamas Vachiraarunwong, Ikue Noura, Runjie Guo, Hideki Wanibuchi. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日) ワークショップ
- 17) Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in F1 rats following maternal exposure from pre-mating to Lactation. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
- 18) Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Hepatotoxicity of per- and polyfluoroalkyl substances on immortalized human hepatocytes. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
- 19) Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder

carcinogenesis in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡（2025年1月30-31日）

- 20) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスを用いた 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)のヒト化肝細胞での代謝と膀胱発がん性の検証. 2024年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、滋賀(2025年2月12-13日)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価手法の確立

オルガノイド培養・毒性評価

研究分担者： 今井 俊夫 国立がん研究センター 研究所 がんモデル開発部門長

研究要旨

B6 系統背景の *gpt delta* マウスの肺および肝臓オルガノイドを樹立し、継代回数の少ない状態で一部凍結保存した。B6 系統の野生型マウスの肺オルガノイドについては、凍結保存ストック細胞を融解、培養し、化学物質の一般毒性の評価系を構築するための検討に用いた。今年度は、従来の in vitro あるいは in vivo 遺伝毒性試験法および発がん性試験法で陽性を示すが、強い細胞毒性や急性毒性を示さないカルバミン酸エチル（ウレタン）を被験物質として検討を進めた。ウレタンの 2,500 μ M および 10,000 μ M 濃度処置により、対照（0 μ M）に比べてオルガノイドが不整形（発芽類似変化）を示す傾向がみられたが、引続き観察数を増やした検討が必要である。また、形態以外の毒性指標として、細胞分化マーカーを利用した細胞毎の増殖活性、構成細胞比率等について検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

化学物質の安全性評価において、実験動物を用いる反復投与毒性試験を始めとする各種試験が行われる。一方、動物実験における 3Rs (Re-placement・Reduction・Refinement) の観点から、動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかし、実験動物に一定期間繰返して被験物質を投与する反復投与毒性試験やがん原性試験等については、現在のところ確立された in vitro 試験法がなく、多数の被験物質のヒトでの毒性を予測するためにも、革新的な試験法の開発が期待されている。

申請者らは、マウス正常組織由来のオルガノイドに対して、被験物質を in vitro で処置する方法を用いて、比較的短期間にその発がん性を検出できる可能性を見出し、当該評価系が化学物質の発がん性に加え、反復投与毒性試験等、他の毒性評価への適用が期待されることを報告した (Naruse M, Imai T ら, Carcinogenesis, 2020)。また、化学物質による in vivo における毒性、発がん性は標的細胞に対する直接作用に加え、免疫細胞等の間質細胞の影響を受ける場合があり、間質細胞とオルガノイドとの共培養系を用いることで、より in vivo 試験法に近い条件下での評価法の確立にも取り組んでいる。

本研究では、これまで取組んできた、マウス正常組織由来オルガノイドを用いる化学物質の発がん性評価法に加え、その反復処置による一般（反復）毒性試験法の確立を目指した検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

(1) C57BL/6J マウスまたは *gpt delta* マウス（5週齢、雄）を安楽死させた後、肺と肝臓を摘出し、ハサミで細切した後にコラゲナーゼPを含む酵素混合液で処理、ポアサイズ40 μ m のフィルターにかけた後に培地に懸濁してマトリゲル（コーニング社）上に播種し、37℃で培養した。培地は、肺についてはAdvanced DMEM/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、A83-01、FGF10等を加えたものを基本とし、肝臓についてはAdvanced DMEM/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、CHIR-99021、ITS-G supplement等を

加えたものとした。各オルガノイドは、増殖の状態を確認しつつ、概ね1週間に1回、Accumaxを用いて細胞を単離した後に継代し、一部はLaboBanker2（トスク社）を用いて-80℃で凍結保存した。

(2) 肺オルガノイドに対する被験物質の in vitro 処置

今年度はカルバミン酸エチル（ウレタン）を被験物質とし、C57BL/6J マウスの肺由来オルガノイドを用いる検討を行った。ウレタンは注射用蒸留水に溶解し、培地中最終濃度を10,000 μ M から公比2で156 μ M までの濃度で24時間処置、RealTime-Glo MT Cell Viability Assay キット（プロメガ社）を用いて発光強度により生細胞数の推移を測定する予備実験を行った。被験物質処置は、オルガノイドの継代時、単離した細胞をマトリゲル上に播種した2時間後からの24時間とした。また、最高濃度の10,000 μ M については、マウスにウレタンを600 mg/kg 体重の用量で週1回、3回または10回腹腔内投与した際に肺がんが誘発されるとの報告 (Ma X ら, Toxicol Lett, 2016) を参考に設定した。

被験物質の代謝活性化のため、S9 mixを50 μ g/mL の濃度で培地に加えた。本実験では同様に、肺オルガノイドに対し、ウレタンを10,000、2,500、および0（対照） μ M で24時間1回または3回処置した。

(3) 肺オルガノイドの形態学的観察

ウレタンにて1回または3回処置したマウス肺オルガノイドは、（最終）処置72時間後にiPGe11（ジェノスタッフ社）を用いてパラフィン包埋し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行って病理組織学的に観察した。

また、肺オルガノイドの構成細胞を解析する目的で、パラフィン包埋切片を用いて、気道上皮細胞およびII型肺胞上皮細胞の特異マーカーに対する免疫組織化学染色を行った。用いた一次抗体は、抗Uteroglobulin/CC10ウサギポリクローナル抗体、抗Naspin Aマウスモノクローナル抗体（プロテインテック社）、抗proSFPcウサギポリクローナル抗体（アブカム社）、シグナルの検出には、ヒストファインシンブルステインマウスMAX-PO (R) または同MAX-PO (M)（ニチレイバイオサイエンス社）とDAB発色法を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、令和元年最終改正法律第51号）」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号）」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正）」を遵守した。また、「国立研究開発法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号、平成29年最終改正法律第41号）等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

C. 研究結果

(1) マウス正常組織からのオルガノイド樹立および樹立したオルガノイドの培養

C57BL/6Jマウス由来オルガノイドについては、昨年度までに樹立して凍結ストック細胞を解凍して今年度の被験物質を処置する予備実験および本実験を行った。また、*gpt delta*マウス由来の肺と肝臓由来オルガノイドについては、概ねスケジュール通りに培養することができ、継代回数の少ない状態で一部凍結保存した。

(2) ウレタンの濃度設定のための予備実験

C57BL/6Jマウス由来肺オルガノイドに対して10,000 μM から156 μM までの濃度で24時間処置した後の生細胞数を測定した結果、中間濃度の1,250と2,500 μM では対照（0 μM ）に比べて明らかな生細胞数の増加がみられ、5,000 μM 以上では対照と同等の値まで低下した（図1）。この結果より、当該オルガノイドに対するウレタンへの最大耐量は10,000 μM より高い濃度と判断された。

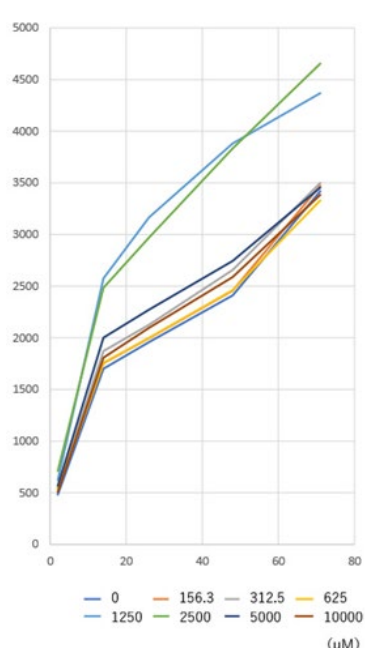


図1 ウレタン処置後のマウス肺オルガノイドの生細胞

数の推移

(3) ウレタンの24時間1回または3回処置による本実験

C57BL/6Jマウス由来肺オルガノイドに対して生細胞数を増加させる作用のあるウレタンの2,500 μM 濃度を低濃度群、その4倍量の10,000 μM を高濃度群とし、処置後のオルガノイドの形態学的変化をパラフィン包埋後のHE染色標本にて観察した。その結果、ウレタンの2,500 μM および10,000 μM 濃度処置により、対照（0 μM ）に比べてオルガノイドが不整形（発芽類似変化）を示す傾向がみられた（図2）。

パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学においては、マウス由来肺オルガノイドは、気道上皮のマーカーであるUteroglobin/CC10およびNaspin A陽性細胞が混在していたが、II型肺胞上皮細胞のマーカーであるppr oSFPC陽性細胞は認められなかった。

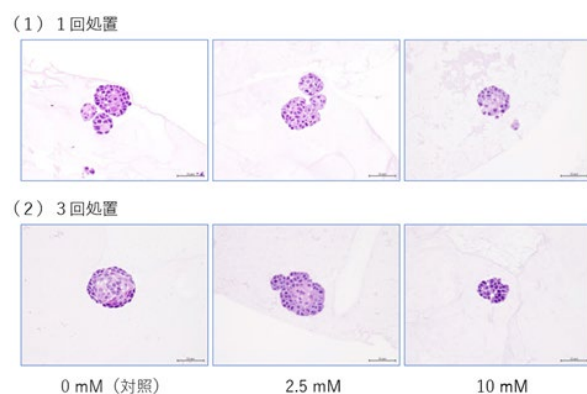


図2 ウレタン処置後のマウス肺オルガノイドの形態学的変化（Bar=50 μm ）

D. 考察

今年度、C57BL/6Jマウス由来オルガノイドについては、昨年度までに樹立して凍結ストック細胞を解凍して予備実験および本実験を行った。解凍時には速やかにPBSにて洗浄し、保存液であるLaboBanker2を除くことで問題なく起眠し、培養継続が可能であることを確認した。また、*gpt delta*マウス由来の肺と肝臓由来オルガノイドについては、これまで、C57BL/6Jマウスを含む複数系統の肺および肝臓オルガノイドを樹立する方法と同様に培養することで（Naruse M, Imai Tら、Carcinogenesis, 2020）、良好な培養成績が得られることを再確認した。なお、肺オルガノイドについては、これまでは肺の各葉の肺門部を除く末梢側組織のみを用いて培養したが、今回は肺葉の部位により形成されるオルガノイドの特性が異なるか否かを確認するため、肺門部のみを用いる培養も試みた。その結果、培養開始以降、細胞増殖が確認できるまでの時間が末梢側組織に比べて肺門部については時間を要し、得られたオルガノイドについては扁平上皮化生する傾向が確認された。マウスの末梢側組織にはヒト肺組織においては前駆細胞として位置づけられるCytokeratin 5 (CK5)などに陽性を示す基底細胞がなく、マウス肺オルガノイドにもCK5陽性細胞が認められないことから、今後、マウス肺の肺門部と末梢側組織由来のオルガノイドについて、各種化学物質に対する毒性感受性差などを検

討する必要があると考えられる。

マウス肺オルガノイドを用いてウレタンの毒性反応を解析する実験を行うため、マウスにウレタンを腹腔内投与した際に肺がんが誘発される用量を参考に設定した10,000 μM (Ma Xら、Toxicol Lett, 2016) を最高濃度として、1/64 倍の156.3 μM までの濃度幅で24時間、1回処置した際の70時間後までの生細胞数を測定した。中間濃度の2,500 および1,250 μM で示された生細胞数の増加が、ウレタンに関する既報にある遺伝毒性や発がん性に関連するか、あるいは毒性とは判断されない細胞の活性化に該当するののかについては今後の検討を要する。現段階においては、生細胞数を増加させる作用のあるウレタンの2,500 μM 濃度を低濃度群、その4倍量の10,000 μM を高濃度群として、1~3回処置した後、細胞分化/増殖マーカーに対する免疫組織化学を含む病理組織学的解析により毒性を評価することを目的として本実験を行った。

本実験では、ウレタンの2,500 μM および10,000 μM 濃度処置により、対照(0 μM) に比べてオルガノイドが不整形(発芽類似変化)を示す傾向がみられた。この変化は、予備実験で観察されたウレタン処置による生細胞数の増加と関連していることが示唆された。但し、当該観察については、(最終) 処置72時間後にオルガノイドを収集、パラフィン包埋、標本作製を行ったことから、オルガノイドの数が限定的であり、各オルガノイドを構成する細胞数も少なく、嚢胞状の形態を呈する前の段階の小型のものであったことから、引続き観察数を増やした検討が必要である。また、従前に我々がオルガノイドを用いる化学物質の発がん性を検出していた場合とことなり、反復投与毒性を含む一般毒性の検出に際しては被験物質処置後に時間経過と共に毒性が回復性を示すことを考慮することが必要であり、被験物質の(最終) 処置後の観察時点についても引続き検討が必要である。また、形態以外の毒性指標として、細胞分化マーカーを利用した細胞毎の増殖活性、構成細胞比率等についても更なる検討を要する。

以上、マウス正常組織由来オルガノイドを用いる一般(反復)毒性試験法として、被験物質をオルガノイドの継代時、単離した細胞をマトリゲル上に播種した2時間後からの24時間を1回および3回繰り返す方法により、少なくとも細胞増殖に対する影響を指標とする毒性評価には適用可能であることを示す結果が得られた。一方、幅広い被験物質の解析を可能とするために更に使用するマウス系統や対象臓器を絞り込む必要があり、引続き検討が必要と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai, T., Naruse, M., Machida, Y., Fujii, G., Mutoh, M., Ochiai, M., Takahashi, M., Nakagama, H.: Feeding a high-fat diet for a limited duration increases cancer incidence in a breast cancer model. *Nutr. and Cancer* 75, 713-725 (2023).
2. Kamimura, M., Sasaki, A., Otani, Y., Nakamura, Y., Nakamura, T., Kuramochi, K., Imai, T., Kubo, N., Okamoto, S.: Methylthioacetic acid, a derivative of

aroma compounds from *Cucumis melo* var. conomon dose-dependently triggers differentiation and apoptosis of RCM-1 human colorectal cancer cells. *J. Toxicol. Sci.* 48, 25-35 (2023)

3. OIshigamori, R., Naruse, M., Hirata, A., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T.: Featured Article : The Potential of Organoids in Toxicologic Pathology. Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J. Toxicol. Pathol.* 35 (3) 211-223 (2022)
4. OImai, T., Hippo, Y.: Editorial: Development of in vitro toxicology methods using organoid systems and toxicogenomic approaches. *Front Genet* 13, 1030580 (2022)
5. Imai, T., Naruse, M., Ochiai, M., Matsumoto, K., Ikeda, S., Kani, M., Kato, Y., Hirayama, A., Soga, T., Hori, Y., Yokoi, A., Ochiai, A: Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett* 24, 221 (2022)

2. 学会発表

1. 今井俊夫、石ケ守里加子、成瀬美衣：オルガノイドを用いる化学発がんモデルによる発がん早期過程の分子機序解析. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
2. 成瀬美衣、石ケ守里加子、今井俊夫：CRC患者由来の癌関連線維芽細胞を用いるゲノムワイドなDNAメチル化解析. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
3. 高橋真美、千脇史子、小松将之、松崎圭祐、平岡伸介、竹下文隆、佐々木博己、今井俊夫：患者由来膵がん細胞株におけるメラノコレチン4型受容体遺伝子近傍SNPのLOH及びアレル特異的遺伝子発現に関する解析. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
4. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
5. 今井俊夫;正常組織由来オルガノイドを用いる毒性試験の有用性について. 第39回日本毒性病理学会(2023年1月25日、東京)ランチョンセミナー(株式会社新日本科学共催)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

研究分担者 成瀬 美衣 国立感染症研究所 主任研究員

研究要旨

化学物質の開発には安全性評価が不可欠であり、実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護の観点から化学物質の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。私たちはこれまでに、マウス正常組織由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、化学物質の安全性評価に妥当・有用であることを見出している。またメチル化解析におけるオルガノイドの有用性を示してきた。

以上の背景よりオルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 評価手法のエピゲノム変化評価系の構築を目指す。カルバンサンエチル (EC)、フェノバルビタール (PB) を 3 回暴露した肝臓オルガノイド (*in vitro* 試験) と PB を反復投与したマウス肝臓 (*in vivo* 試験) のメチル化解析を行い、オルガノイドによる評価法の妥当性の検討のため、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験の比較解析を行った。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3Rs (Replacement・Reduction・Refinement) の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。本研究では、マウス肺及び肝臓オルガノイドを用いたエピゲノムを指標とした化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立を目指す。

B. 研究方法

マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

マウス臓器由来オルガノイドに化学物質を反復暴露した後、エピゲノム変化を同定し、*in vitro* 一般毒性試験法における指標を探索する。

① オルガノイドへのカルバミン酸エチル (EC) 処置
樹立した C57BL/6J 背景 p53 (+/-) マウスの肺オルガノイドを融解、培養を行い使用した。オルガノイドは Accutase 処置により細胞を分散させ、さらに 40 μ m のフィルターを通し、細胞数測定を行い、マトリゲル (Corning) をゲル状にしてひいた 12well plate に 1×10^5 細胞/well 播種した。2 時間静置後、対照群 (0 mM)、低用量 (2.5 mM)、高用量 (10 mM) を 50 μ g/ml の S9 mix と共に添加し、5% CO₂, 37 度のインキュベーターで 24 時間処置した。24 時間後、化学物質を含む培地を除去し、マトリゲルを被せて培養した (サンドイッチ法)。これを 1 週間に一度 3 回繰り返した。

② EC 処置オルガノイドのメチル化解析

EC 3 回処置後 (0 mM, 2.5 mM, 10 mM, 各 N=2) 96 時間のオルガノイドを Cell Recovery Solution によりマトリゲルを溶解し、細胞塊として回収し DNA 抽出を行った。メチル化解析は RRBS 法 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) を用いた。DNA を精製し、制限酵素 MspI による制限酵素消化を行い、フラグメントのサイズ選択を行うことで CpG の豊富な領域を選択したものをバイサルファイト処理し、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR 増幅したものを、次世代シーケンスを行い、Bismark を用いたアライメント及び MethylKit Analysis によるメチル化解析を行い、対照群に対するメチル化率の変化の同定を行った (q-value < 0.01, % methylation difference > 25%)。同定した候補は IGV (Intergrative Genomics Viewer) を用いて確認を行った。

③ オルガノイドへのフェノバルビタール (PB) 処置

研究代表者から分与を受けた Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932, C57BL/6 マウス肝臓由来) を用いた。PB 暴露法については研究代表者が検討した方法に準じ、ドーム型培養法でオルガノイドを 3 日間培養し、1 回目の 2 4 時間暴露を各対照群 (0 μ M)、低用量 (236 μ M)、高用量 (943 μ M) の濃度で暴露した。2 4 時間後培地の除去、洗浄後新しい培地を添加し、3 日間培養を行った。3 日間培養後、細胞を再播種し、3 日間培養後に 2 回目の 2 4 時間暴露を行った。その後培地を除去、洗浄後、新しい培地を添加し、6 日間培養後に、3 回目の 2 4 時間暴露を行った。暴露後、培地を除去、洗浄後にセルリカバリーソリューションを用いてマトリゲ

ルを溶解し、オルガノイドを細胞塊として回収し凍結した。

④PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB 3 回処置後 (0 μ M, 243 μ M, 943 μ M, 各N=3) のオルガノイドの細胞塊から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した。メチル化解析はRRBS法を用い、②と同様に行なった。

⑤PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる *in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウスの凍結肝臓の一部を分担研究者:美谷島から分与を受け、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。その後のメチル化解析については②と同様の手順で行った。

⑥肝臓オルガノイド-間質細胞の共培養系の構築

オルガノイドについては研究代表者から分与を受けた Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932)、間質細胞の1つとして、理研BRCより不死化クッパー細胞の提供を受けた。共培養法については、コンパニオンプレートに、インサート (1.0 μ m メンブレン) (Corning) を組み合わせる非接触型を用い、どちら側にどちらの細胞を播種するか、また共培養時の培地の条件、オルガノイド培地: HepatiCult Organoids Growth Medium (Mouse)、クッパー細胞培地: DMEM (high glucose)+10% FBS+bovine Insulin 10 μ g/ml+monotiglycerol 250 μ Mを用い、観察及び cell titer gloを用いた生細胞数の測定を行い条件検討を行なった。

(倫理面の配慮)

動物を用いるオルガノイド樹立実験は、国立がん研究センター研究所で行なっており、「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従って行った。動物福祉並びに動物実験倫理の観点から、適切なエンドポイントを設定し、安楽死させることにより苦痛軽減に配慮した。

C. 研究結果

①EC処置オルガノイドのメチル化解析

EC 3 回目処置後 (0mM, 2.5mM, 10mM, 各 N=2) 96 時間のオルガノイドの RRBS 解析によるメチル化解析を行った。ゲノムを 1kb の領域に分けた解析では、EC 0mM 3 回処置オルガノイドと 10mM 3 回処置オルガノイドとの間で、メチル化変化領域は 30 箇所と非常に少なかった。IGV による確認を行い、発現に影響を与える可能性の高いメチル化変化領域は同定されなかった。1 塩基単位でのメチル化変化部位についてはメチル化低下、メチル化増加の両者に 2000 箇所程度の候補箇所があり、IGV による確認においても、メチル化の変化があることが確認できた。また、染色体全体において、EC 処理によりメチル化が亢進する傾向が見られた。

② PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB処置 3 回後の (0 μ M, 236 μ M, 943 μ M, 各N=3) オルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。

その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は各群で有意な差は見られなかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも各群を特徴づける有意な差は見られなかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所、領域ベースで有意に差がある領域は1箇所であった。

③ PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる *in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウス肝臓のRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は群間における有意な差は見られなかったが、高用量5検体のうち1検体のみが他と異なり全体的に高いメチル化を示していることがわかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも同様に、群間の有意な差はないものの、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことがわかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所、領域ベースで有意に差がある領域は91箇所であった。有意差があるものについても、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことに依存している傾向が見られたため、高用量5検体のうちの1検体を除いた解析も行なった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は2箇所、領域ベースで有意に差がある領域は0箇所であった。

④ PB処置オルガノイドとPB処置マウス肝臓のメチル化解析の比較

PB処置 3 回後の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所と、PB処置マウス肝臓の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所のうち、一致する塩基はなかった。また、領域ベースの比較で有意にメチル化が変化する領域1箇所(オルガノイド)と91箇所(肝臓)においても一致する領域はなかった。PB処置マウス肝臓の高用量5検体のうち1検体のみが全体にメチル化率が高く、2群間の比較に影響が出ているようであったため、その1検体を除く解析も行なったが、同様に一致する領域はなかった。

⑤ 肝臓オルガノイドと間質細胞の共培養系の構築

コンパニオンプレートとインサート (1.0 μ m メンブレン) を組み合わせる非接触型の共培養システムを行なった。検討の結果、コンパニオンプレート側にオルガノイドのドームを作ると、10 μ l までマトリゲル量を減らしてもインサートに接触することがわかった。したがって、コンパニオンプレート側にクッパー細胞を接着培養することにした。同時に、インサート側のメンブレン上にクッパー細胞を接着させた場合、細胞増殖が一定になりづらく、やはり間質細胞をコンパニオンプレート側に培養するのが適していた。一方インサート側にオルガノイドを培養することは、オルガノイドの増殖には影響しない。培地については、共培養開始前の細胞播種時にはそれぞれ細胞に適した培地を用いることが可能であるが、共培養開始時から培地を共通なものにする必要がる。検討の結果、クッパー細胞培地: DMEM (high glucose)+10% FBS+bovine Insulin 10 μ g/ml+monotiglycerol 250 μ Mにした場合、オルガノイドの増殖が著しく低下するが、逆にオルガノイド培地に合わせた場合、クッパー細胞は至適培地で培養時と

同等に増殖し、共培養可能であった。

D. 考察

ECの*in vitro*処置により、マウス肺オルガノイドに1塩基レベルのメチル化変化が生じることを明らかにした。領域でのメチル化変化ではないため、既報にあるような遺伝子発現に影響を与えるかどうかについてはさらに検証を必要とする。染色体レベルでEC処置による亢進傾向が見られており、EC処置の回数を増やすことなどで、メチル化変化領域が同定される可能性もあると考える。

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル化変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域はなかった。*in vivo*試験の高用量のうちの1検体のみが他と異なるメチル化状態を示していたため、その結果が影響した可能性を考え、1検体を除いての解析を行ったが、同様に共通したメチル化変化はなかった。組織学的な観察においては、この1検体においても他の高用量の検体と同様に全体的に肝細胞の肥大が見られているとのことで、単純にこの1検体の部分的なサンプリングされた細胞の違いがメチル化の違いに影響したということではないと思われるため、エピゲノムを解析するタイムポイントなど、検討が必要と思われる。*in vitro*、*in vivo*試験の両者において、顕著なメチル化変化が検出されておらず、暴露方法の検討、他の化学物質での検討が必要と考えられる。例えば、オルガノイドのPB処置後の解析においても、今回3回目暴露24時間後といった比較的早い段階で解析を行っており、継代を重ねた後など、何らかの細胞が濃縮される可能性が高くなった後には特定のメチル化変化が濃縮され検出されるということがあるかもしれない。

また、化学物質による毒性、発がん性は共存する間質細胞に依存することが報告されており、*in vitro*系で共培養を行うことで、異なった結果が出るかどうかの検証が必要である。インサートを用いた肝臓オルガノイドとクッパー細胞の共培養法の構築が進んでおり、それぞれの細胞の特性解析等を行い、より*in vivo*に近い*in vitro*系のさらなる開発も必要であると思われる。

E. 結論

*In vitro*評価系において、EC処置により1塩基レベルのメチル化変化及び染色体全体でメチル化の亢進が起こることをRRBS解析により同定した。検証やデータの蓄積がさらに必要であるが、*in vivo*で同様のことが起こっている場合、*in vitro*化学物質評価系における指標となり得る。

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル化変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする*in vitro*有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai T, et al. Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett.* May

23;24(1):221.

2. Ishigamori R, et al. The potential of organoids in toxicologic pathology: Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J Toxicol Pathol.* 2022 Jul;35(3):211-223.

3. Imai T, et al. Feeding a High-Fat Diet for a Limited

Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer.* 2022 Oct 20:1-13.1.

4. Imai, T. Naruse, M. Machida, Y. Fujii, G. Mutoh, M. Ochiai, M. Takahashi, M. Nakagama, H. Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer.* (2023) 75: 713-725

5. Imai, T. Ishigamori, R. Naruse, M. Ochiai, M. Maru, Y. Hippo, Y. Totsuka, Y. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* (2024) 49(10):425-434.

6. Ono, R. Kuwagata, M. Naruse, M. Watanabe, A. Takano, M. Hasegawa, T. Takashima, H. Yoshioka, Y. Ochiya, T. Hirabayashi, Y. Kitajima, S. Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* (2024) vol111, No. 1. 37-56.

2. 学会発表

1. 今井俊夫、石ケ守里加子、成瀬美衣：オルガノイドを用いる化学発がんモデルによる発がん早期過程の分子機序解析。第81回日本癌学会学術総会（2022年9月、横浜）

2. Mie Naruse, Hiroe Nozaki, Toshio Imai, Kassai Hidetoshi, Ryuichi Ono; Faithful DNA methylation status of imprinted DMRs in colon-derived organoids. 第50回日本毒性学会学術年会（2023.6 横浜）

3. Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023.7. Taiwan)

4. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、葛西秀俊、今井俊夫；大腸癌手術余剰検体由来のオルガノイドおよびCAFを用いたエピゲノムマーカーの探索。第82回日本癌学会学術集会（2023.9. 横浜）

5. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊；大腸がんにおけるがん-間質細胞相互作用を再現する*in vitro*実験系の構築。第46回日本分子生物学会年会（2023.12. 神戸）

6. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊；大腸がん患者由来オルガノイドと同一症例由来線維芽細胞の共培養系を用いる評価系の確立。日本薬学会144年会（2024.3. 横浜）

7. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊「患者由来オルガノイド利用した個別化医療に対応した薬剤耐性原因遺伝子の探索」第83回日本癌学会、一

般口頭発表, 2024. (福岡)

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

研究分担者 美谷島 克宏
東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

研究要旨

本分担研究では、オルガノイドによる新規試験法との類似性を確認するため、肝毒性対照物質を用いてマウス *in vivo* 反復投与毒性試験を実施し、標的臓器における種々の毒性学的データを取得した。実際には、3年間にわたり肝臓を標的とした毒性発現化合物をマウスに反復投与し、病理組織学的観察並びに遺伝子発現解析を実施し、各種物質の毒性プロファイルを明確にした。

本分担研究により、*in vitro* オルガノイドを用いた試験より得られた毒性指標を比較検証するための毒性所見を呈する材料を得ることが出来た。本成果は、*in vitro* オルガノイド試験による新たな毒性指標の開発に寄与し得るものと考えられた。

A. 研究目的

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護3Rs（Replacement・Reduction・Refinement）の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。

本分担研究では、肝臓オルガノイド培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価系の確立を目指すため、実際にマウスを用いて *in vivo* 毒性評価を実施し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかにについて検証することを目的とした。

B. 研究方法

本分担研究では、肝臓由来オルガノイドによる新規試験と従来の *in vivo* 毒性試験との類似性について精査するため、マウスを用いて肝毒性陽性物質の反復投与毒性試験を実施した。

6週齢の雄性C57BL/6Jマウスに、*in vitro* 試験と共通してカルバミン酸エチル(EC)、アクリルアミド(AA)、フェノバルビタール(PB)、クマリン(CMR)、モノクロタリン(MCT)を反復投与した。さらに、肝細胞壊死など顕著な肝毒性を示す化学物質としてアセトアミノフェン(APAP)も反復投与した。

それぞれの化合物の投与用量並びに投与期間を以下に示す。

ECは、0, 300, 1000及び2000 ppmの用量で4週間飲水投与した（1群各5匹）。

AAは、0, 250, 500及び1000 ppmの用量で4週間飲水投与した（1群各5匹）。

PBは、0, 500及び1000 ppmの用量で混餌投与した。さらに、PBは、50 mg/kgの用量で腹腔内投与する群も設定し、いずれも4週間とした（1群各6匹）。

CMRは、5,000 ppmで4週間、2,500 ppm並びに5,000 ppmで13週間混餌投与した（1群各6匹）。

MCTは、pHを調整した生理食塩水に溶解して0, 200 mg/kgの用量で2ないし4週間にわたり週1回の間歇腹腔内投与を行った（1群各5匹）。対照群には同溶媒を投与した。

APAPは、0, 3100, 6200及び12400 ppmの用量で、い

ずれも4週間混餌投与した。

いずれも、対照群の飼料は標準食(CE-2)を用いた。投与期間中に体重及び摂水量を測定した。投与期間終了後に解剖し、血液並びに主要臓器を採取した。採取された臓器は、定法に従いHE染色標本を作製し、さらに未染パラフィン標本を用いて炎症関連の指標としてマクロファージ(F4/18)、FABP(Fatty Acid Binding Protein)の免疫組織化学的な染色を実施した。採取した凍結肝臓を用いて遺伝子発現解析を実施した。さらに解剖時の血清を用いて血液生化学検査を実施した。

（倫理面への配慮）

マウスの使用は最少匹数に留め、東京農業大学動物実験委員会より承認を受けた申請内容に則り実施した。また、他実験で用いたサンプルも検討に用いるなど、使用動物数の低減に努めた。

C. 研究結果

1) ECの反復投与により、対照群と比較し、体重、摂水量共に減少傾向を示した。血液生化学検査により、血清中AST及びT-BILの増加傾向、TGの減少傾向が見られた。病理組織学的検査により、肺及び肝臓に明らかな変化は観察されなかった。しかし、高用量投与群の免疫組織化学的染色において、両臓器共にF4/80陽性マクロファージの増加が観察された。遺伝子発現解析では、肺においてMCP-1及びIL-6が、肝臓においてIL-1 β 、TNF α 及びMCP-1が増加ないし増加傾向にあった。これよりEC投与が標的臓器において炎症の惹起に影響しているものと考えられた。

2) AAの反復投与により、投与用量に依存して体重、摂餌量、摂水量並びに一般状態への影響が認められた。血液生化学的検査では、肝障害の指標であるAST、ALTが500 ppmで高値を示したが、明らかな病理組織学的変化は伴っていなかった。これより肝障害は示唆されるものの明らかな毒性学的影響は捉えられなかった。

3) PBの反復投与により、体重並びに摂餌量に明らかな影響は見られなかった。用量依存的な肝重量増加、小葉中心性肝細胞肥大、血液生化学的検査による肝臓パラメータの上昇が認められた。

4) CMRの反復投与により、体重は対照群に対し4及び13

週間群ともに減少傾向にあった。肝臓重量は、対照群に対し13週間5,000 ppm群で増加傾向にあった。肝臓の病理組織学的検査では、4週間投与による明らかな変化は見られなかったが、13週間5,000 ppm群で、小葉周辺性の肝細胞肥大、巣状壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。血液生化学的検査では、対照群に対し5,000 ppm群でALT活性が増加しない増加傾向にあった。FABP2の免疫組織化学染色では、全CMR投与群でより広範囲に陽性肝細胞が確認された。遺伝子発現解析では、肝細胞分化の指標となる因子であるHptr, Alb, CYP 3 A11, Krt19, Hnf4aは4週間5,000 ppm群で減少傾向を示し、Sox9は4及び13週間5,000 ppm群で増加傾向を示した。5) MCTの反復投与により、体重は、対照群に対し4週間投与群で減少傾向を示した。摂餌量は、対照群に対し2週間投与群で減少傾向を示した。血液生化学的検査では、対照群に対しALT及びASTが2週間投与群で増加傾向を示したが、4週間投与群では明らかな変化は見られなかった。臓器重量では、両投与期間で明らかな影響は見られなかった。病理組織学的解析では、2週間投与群で巣状性肝細胞壊死、4週間投与群で、主に小葉中心性肝細胞のグリコーゲン蓄積の減少が認められた。さらに、対照群に対し両投与期間において2核肝細胞の増加が見られた。さらに、細胞増殖に関わるPCNAの免疫組織化学染色において、対照群に対し両投与期間において陽性細胞が増加傾向を示し、それは2週間投与群でより顕著であった。これに加え、胆管上皮細胞の増殖も認められた。遺伝子発現解析では、TNF α が対照群と比較し、両投与期間において増加傾向を示した。

6) APAPの反復投与により、高用量の12400 ppm投与により、体重増加抑制が認められた。肝臓重量には明らかな影響は見られなかった。同高用量群において、血液生化学的には、対照群に対しALT及びASTの顕著な上昇が見られた。病理組織学的には肝小葉中心性の壊死が広範囲にわたり認められた。さらに、壊死が無い領域においては肝小葉中心性の肝細胞肥大も伴っていた。

さらに、FABP (Fatty Acid Binding Protein)の免疫組織化学染色により、EC, PB, CMR, APAP投与群において染色性の増加が認められた。

D. 考察

肝臓に毒性が発現することが報告されている化合物についてマウスを用いた in vivo 反復投与毒性試験を実施した。

ECの反復投与では、肝臓並びに肺において炎症の惹起を示唆する影響が発現しているものと考えられた。

AAの反復投与では、肝障害は示唆される血液生化学データは得られたものの明らかな毒性学的影響は捉えられない状態にあるものと考えられた。

PB反復投与では、既報のとおり酵素誘導に伴う肝臓への影響が発現しているものと考えられた。

CMRは、シナモンなど多くの植物に含まれる芳香物質であるが、過剰摂取により肝障害を引き起こすとの報告もある。本分担研究の反復投与では、マウスにCMRを短期間反復投与することにより生じる肝臓への影響について解析した。その結果、本実験条件において、4週間投与では明らかな組織学的変化は見られなかったが、肝細胞への分化の指標となる遺伝子発現に影響が見られた。一方、13週間投与では組織学的に明らかな肝障害が認められたが、Sox9を除き上記の遺伝子発現に明らかな変化は見られなかった。

MCTは、マウスやラットに投与することにより肺高血圧症を誘発することが知られている。肝臓の血流が障害されることで低酸素血症が生じ、肺高血圧症が誘発されるとされている。本分担研究の反復投与では、マウスにMCTを2ないし4週間間歇的に反復投与することにより、明らかな肝傷害は認められなかった。しかし、2核肝細胞並びにPCNA陽性肝細胞は増加傾向認められた。さらに、胆管増生を示唆する変化も認められ、MCT反復投与による肝臓への影響が見出された。

APAPの投与では、既報のとおり明らかな肝障害が惹起されているものと考えられた。

以上より、AAを除くいずれの化合物もマウスへの反復投与により、それぞれ異なる肝毒性プロファイルを示す結果が得られた。これは今後の in vitro 毒性評価系の構築において、新たな評価指標の確立していくための研究支援材料が得られたものと考えられた。

E. 結論

本分担研究では、3年度にわたり肝毒性が報告されている陽性対照物質を実際にマウスに反復投与し、標的臓器である肝臓において、種々の毒性パターンを有する病態が得られた。本成果は、オルガノイド培養による in vitro 毒性評価系における新たな毒性指標の妥当性を検証していく上で重要な役割を担うものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 大橋 清佳、梶川 明音、前川 竜也、煙山 紀子、戸塚 ゆ加里、美谷島 克宏、カルバミン酸エチル（ウレタン）のマウス反復投与毒性試験における病態解析、第51回日本毒性学会学術年会、福岡（2024.7.3-5）

2. 大橋 清佳、田中 あかり、竹田 結菜、神野 涼平、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、美谷島 克宏、クマリンの反復投与毒性試験におけるマウス肝臓の病態解析、第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2025.1.31）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価手法の確立

一次線毛のオルガノイドへの応用

研究分担者： 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

本分担研究では、①既存の細胞を使用した一次線毛の発現状態および条件の確認、②入手されたオルガノイドでの一次線毛の発現状態および条件の確認、③対象物質による細胞株、オルガノイドによる毒性評価の解析を行う。初年度は、①既存の細胞を使用した一次線毛の発現状態および条件の確認を目指した。3種類の細胞株で、一次線毛発現を解析した。DU-145 細胞のみに一次線毛を認めた。一次線毛は密接に細胞周期と関わるため、細胞培養環境が需要であり、またその形質が変化することより、毒性評価への応用の可能性は十分あると考えられる。また、先行研究で、線維芽細胞は比較的安定して、一次線毛を発現しているので、細胞パネルに追加を考えるに至った。

A. 研究目的

化学物質の開発には、実験動物を用いた安全性評価が必要とされ、その結果が重視されている。一方、動物愛護3Rsの観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかしながら、現在汎用されている細胞を用いた in vitro 毒性試験は生体への外挿の点で限界があるため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。

また、分担研究者らは一次線毛は細胞膜上の突起物で、細胞内シグナルのハブと認識され、腫瘍細胞では発現が消失するなど各種生命現象への関与を報告している。

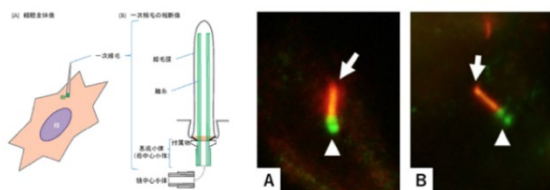


図1. 一次線毛について

本研究班の目的は、オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価手法の確立を目指す。また、一次線毛発現と既存の各種細胞株との関係を解明し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行う。

分担研究として、①既存の細胞を使用した一次線毛の発現状態および条件の確認、②入手されたオルガノイドでの一次線毛の発現状態および条件の確認、③対象物質による細胞株、オルガノイドによる毒性評価の解析を行う。

初年度は、①既存の細胞を使用した一次線毛の発現状態および条件の確認を目指した。既存の論文報告より、一次線毛発現が確認されている細胞株および毒性評価上必要と考えられる細胞より、一次線毛発現に関する細胞パネルの作成を目指した。

B. 研究方法

1) 細胞パネル用の細胞株選択：

文献[Cell Biol Int, 39, 1341-47, 2015; Mol Cell s, 41, 224-33, 2018; EMBO Rep, 18, 334-43, 2017; Cell Rep, 23, 3042-55, 2018]より、ヒト肺上皮癌細胞株A549、ヒト子宮頸癌細胞株HeLa、ヒト膵臓癌細胞株panc-1、ヒト前立腺癌細胞株DU-145、PC-3を選択した。細胞株はJCRB細胞バンクより入手した。それぞれの細胞株は対応する添加物を加えた培養液を用いて37℃、CO2濃度5%加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用した培養容器および培養条件：

8 well chamber slideを使用し、1well当たり、例えばP、PC-3では 1.5×10^4 cells/500 μ Lあるいは 2.0×10^4 cells/500 μ Lを2wellずつ、またPanc-1では 0.5×10^4 cells/500 μ L、 1.0×10^4 cells/500 μ Lを2Wellずつに播種し、24時間後に細胞形態、密度などを観察、48時間後に染色を行い、評価を行った。

3) 一次線毛の染色：

細胞固定は、中性ホルマリン200 μ Lで10分、洗い(PBS)は200 μ Lで5分3回、さらに0.1% Triyon-X-PBS200 μ Lで5分室温放置、最後に洗い(PBS)を5分3回行った。

免疫細胞染色は、ブロッキングバッファー100 μ Lで20分、一次抗体(ARL13B、カクテル)100 μ L 2時間、洗い(PBS)200 μ L 5分3回、二次抗体(ARL13B、カクテル)100 μ L 1時間、洗い(PBS)200 μ L 5分3回、対比染色(DAPI: 2 μ g/ml)100 μ L 20分を行った。

本研究では、既に樹立された細胞株を用いる in vitro 実験である。

C. 研究結果

現在までに、Panc-1, DU-145, PC-3 について、通常培養で、免疫細胞学的染色を用いて、一次線毛の発現について解析した。

DU-145

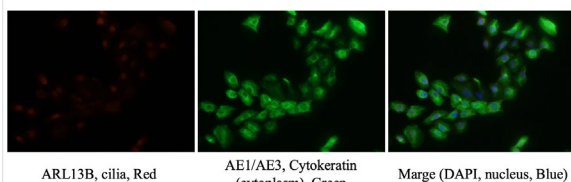


図 2. DU-145 における primary cilia の発現

Panc-1

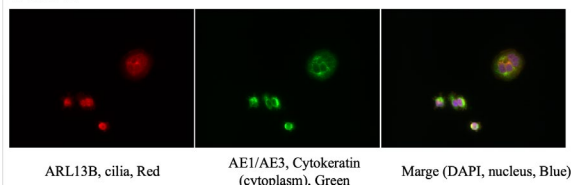


図 3. Panc-1 における primary cilia の発現

PC-3

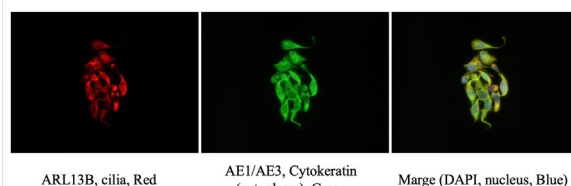


図 4. PC-3 における primary cilia の発現

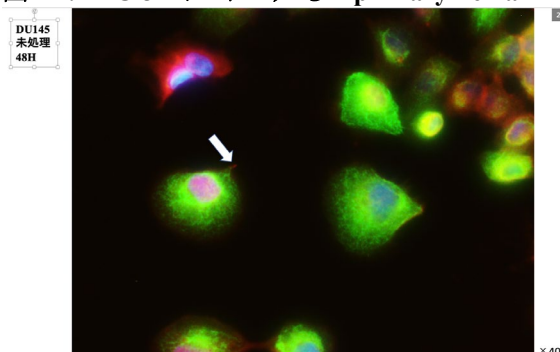


図 5. DU-145 における primary cilia の発現

PC-3、Panc-1 では、通常培養では、primary cilia は発現しておらず、DU-145 において primary cilia はわずかに発現していた。前立腺癌細胞株の結果は、我々の先行解析の結果と同じである。一方、文献[Cell Biol Int, 39, 1341-47, 2015; Mol Cells, 41, 224-33, 2018; EMBO Rep, 18, 334-43, 2017; Cell Rep, 23, 3042-55, 2018]では、HeLa 細胞、MG63、NIH3T3 細胞での発現は報告されており、A549 細胞では薬剤処理で、薬剤耐性を獲得するとともに、一次線毛発現すると報告されている。Primary cilia は密接に細胞周期と関わるため、細胞培養環境が需要であり、またその形質が変化することより、毒性評価への応用の可能性は十分あると考えられる。また、先行研究で、線維芽細胞は比較的安定して、一次線毛を発現しているので、細胞パネルに追加を考える。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamakawa D, Tsuboi J, Kasahara K, Matsuda C, Nishimura Y, Kodama T, Katayama N, Watanabe M, Inagaki M. Cilia-Mediated Insulin/Akt and

ST2/JNK Signaling Pathways Regulate the Recovery of Muscle Injury. Adv Sci (Weinh). 10(1):e2202632, 2022.

- (2) Amemiya T, Shibata K, Takahashi J, Watanabe M, Nakata S, Nakamura K, Yamaguchi T. Glycolytic oscillations in HeLa cervical cancer cell spheroids. FEBS J. 289(18):5551-5570, 2022.
- (3) Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, Tamai Y, Shigefuku R, Hasegawa H, Hirokawa Y, Hayashi A, Okuno K, Matsushita Y, Nakatsuka T, Enooku K, Sakaguchi K, Kobayashi Y, Yamaguchi T, Watanabe M, Takei Y, Nakagawa H. A new detection system for serum fragmented cytokeratin 18 as a biomarker reflecting histologic activities of human nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol Commun. 6(8):1987-1999, 2022.

2. 学会発表

該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

研究分担者 広川 佳史 三重大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

一次線毛発現を指標とする発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的として、①既存の細胞を使用した一次線毛の発現状態および条件の確認、②各種の発がん物質処理を施したラット肝臓およびマウス肝臓オルガノイドでの一次線毛の発現状態および条件の確認、③対象物質による細胞株、オルガノイドによる毒性評価の解析を目的とした。各種の発がん物質処理を施したマウス肝臓オルガノイドを用いて一次線毛の発現を検索した。

前立腺癌細胞 PC-3、膵癌細胞 Panc-1 では、通常培養では、primary cilia は発現しておらず、前立腺癌 DU-145 において primary cilia はわずかに発現していた。

ラット発がん物質処理の肝臓で肝細胞に一次線毛は観察されなかったが、胆管上皮細胞の一次線毛発現は、各種発がん物質でシグナルが減弱し、陽性細胞の減少が認められた。

マウス肝臓オルガノイドを用いて一次線毛の発現を検索したところ、一次線毛の軸糸は認められなかったが、一次線毛の構造体である中心小体の発現に変化がみられた。特にフェノバルビタール処理オルガノイドでは中心小体の数が増加した。がんの初期過程で中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発することが知られており、発がん物質のオルガノイドにおける有害性評価の指標になりうることを示唆された。

A. 研究目的

化学物質の開発には、実験動物を用いた安全性評価が必要とされ、その結果が重視されている。一方、動物愛護3Rsの観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかしながら、現在汎用されている細胞を用いた *in vitro* 毒性試験は生体への外挿の点で限界があるため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。

また、分担研究者らは一次線毛は細胞膜上の突起物で、細胞内シグナルのハブと認識され、腫瘍細胞では発現が消失するなど各種生命現象への関与を報告している。

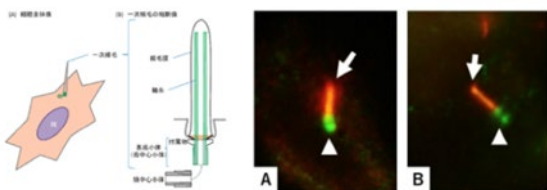


図1. 一次線毛について

本研究班の目的は、オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立を目指す。また、一次線毛発現と既存の各種細胞株との関係を解明し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行う。近年、細胞膜から突出する不動性線毛である一次線毛は正常細胞やがんの増殖などに関与するシグナルハブであることが知られている。一次線毛には、受容体やエフェクターが存在し、ヘッジホッグ (Hh)、Wnt、Notch、mTOR、受容体型チロシンキナーゼ (RTK)、Hippoシグナル伝達系が関わる。また、一次線毛は、

半永久的に突出する構造物ではなく、正常細胞では細胞周期に関わり、G0/G1期で出現、分裂期では消失する。一次線毛の形成・消失は各種シグナル伝達と連動している。一次線毛は、細胞周期に関与するという単純なものではなく、発生・分化、細胞可塑性など多彩な生命現象に関与することが明らかにされつつある。分担研究者はこれまで毒性評価に応用されていない一次線毛に着目し、化学物質と一次線毛との分子生物学的関連性および共培養系およびオルガノイドにおける細胞病理学および機能解析を行い、一次線毛の発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的とする。

B. 研究方法

1) 各癌細胞株の一次線毛の免疫染色：ヒト膵臓癌細胞株 panc-1、ヒト前立腺癌細胞株 DU-145、PC-3 を選択した。細胞株は JCRB 細胞バンクより入手した。それぞれの細胞株は対応する添加物を加えた培養液を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 % 加湿インキュベーターで培養した。免疫細胞染色は、一次抗体 (抗 ARL13B 抗体)、対比染色 (DAPI) を行った。

2) 発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いた一次線毛の免疫染色：鰐渕班より提供を受けた、発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いて一次線毛を構成するタンパク質 (抗 ARL13b 抗体) に対する蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

3) 発がん性化合物処理のマウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛およびその構造体の免疫染色：分担研究者より提供を受けた、発がん性化合物処理のマウス肝前駆細胞オルガノイド標本を用いて一次線毛を構成する軸糸 (抗 α -acetylated tubulin 抗体)、中心小体 (抗 γ -tubulin) に対する蛍光免疫染色をおこなった。また中心小体の増幅に関与する Polo-like kinase 4 に対す

る抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

C. 研究結果

1) 各癌細胞株の一次線毛の免疫染色

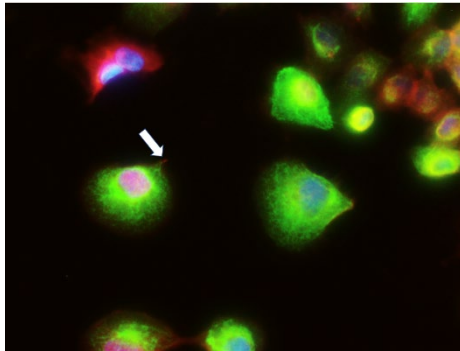


図2. DU-145におけるprimary ciliaの発現

PC-3、Panc-1では、通常培養では、primary ciliaは発現しておらず、DU-145においてprimary ciliaはわずかに発現していた。

2) 発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いた一次線毛の免疫染色

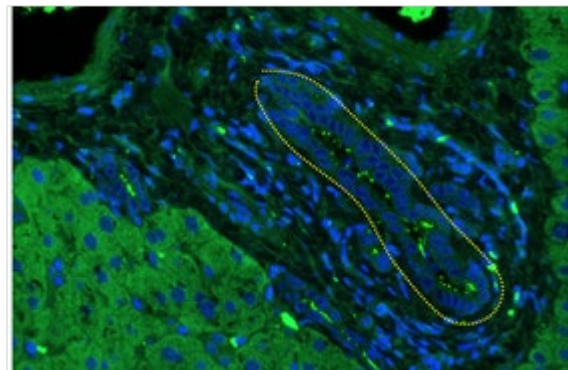


図3 無処理肝臓の一次線毛

黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が多数見られる。

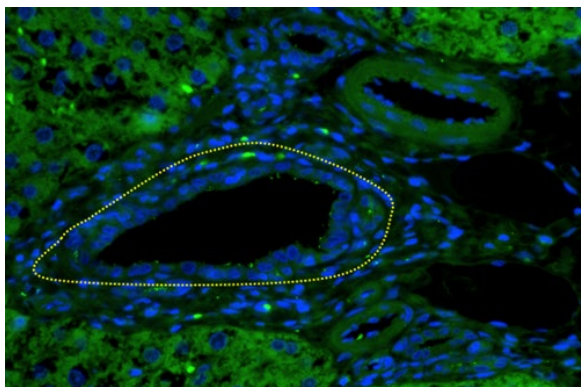


図4 2-Nitropropane処理肝臓の一次線毛

黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が見られる。シグナルは無処理肝臓と比較して減弱し、陽性細胞は減少している。

3) 発がん性化合物処理のマウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛およびその構造体の免疫染色

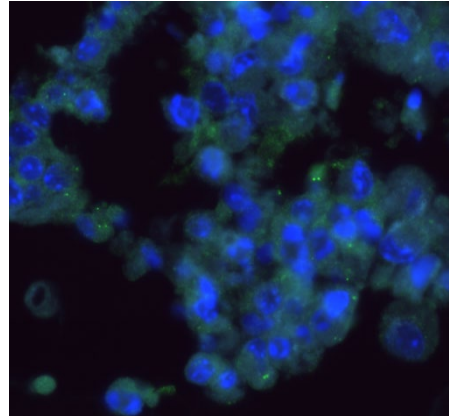


図5 コントロール (DMSO) オルガノイドの中心小体

細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個見られる。

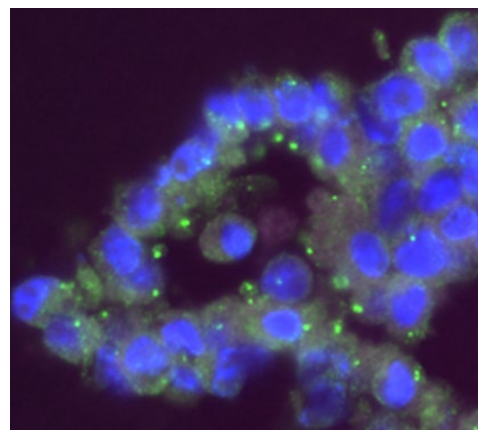


図6 フェノバルビタール (低濃度) オルガノイドの中心小体

細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個明瞭に見られる。

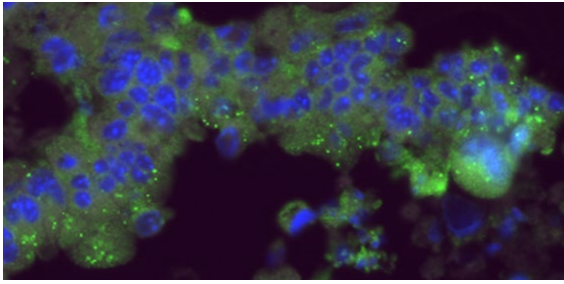


図7 フェノバルビタール（高濃度）オルガノイドの中心小体

細胞質に緑色の微細ドット状の中心小体が複数個見られる細胞がある。

D. 考察

今回用いた癌細胞株の通常培養では、一次線毛はほとんど発現していなかったが、文献[Cell Biol Int, 39, 1341-47, 2015; Mol Cells, 41, 224-33, 2018; EMBO Rep, 18, 334-43, 2017; Cell Rep, 23, 3042-55, 2018]では、HeLa 細胞、MG63、NIH3T3 細胞での発現は報告されており、A549 細胞では薬剤処理で、薬剤耐性を獲得するとともに、一次線毛発現すると報告されている。一次線毛は密接に細胞周期と関わるため、細胞培養環境が必要であり、またその形質が変化することより、毒性評価への応用の可能性は十分あると考えられる。薬物や毒物などにより障害をうけた肝臓では、成熟した肝細胞自体の増殖が阻害される。このとき、未分化性をもつ特殊な肝前駆細胞の活性化が誘導され、これが増殖および分化することにより新たに細胞を供給し再生が行われると考えられている。一次線毛は静止期の細胞に出現することから、薬物投与後に出現する活性化肝前駆細胞には一次線毛がむしろ出ていないと推測される。発がん総論的には増殖期の細胞が障害を受ければ遺伝子異常の頻度高まり、細胞が形質転換する確率が上がるので、一次線毛陰性の活性化肝前駆細胞を定量すれば、化学発がんの評価につながると考えられる。

オルガノイドのフェノバルビタール高濃度処理では中心小体の増加が認められた。中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発し、がん化の初期課程に関与する。その機序としては細胞周期の停止や延長による中心体複製の制御破綻があるとされている (BMB Rep. 2023; 56, 216-224)。従って、フェノバルビタールの有害性評価の一つとして、中心小体の数的過剰が指標になりうると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Semba R, Uchida K, Hirokawa Y, Shiraishi T, Onishi T, Sasaki T, Inoue T, Watanabe M, Miyamoto H. A simple risk stratification model for prostate cancer using histopathologic findings of radical prostatectomy. Am J

Clin Pathol. 2024 May 5;aqae049. doi: 10.1093/ajcp/aqa

2. Leventoux N, Morimoto S, Ishikawa M, Nakamura S, Ozawa F, Kobayashi R, Watanabe H, Supakul S, Okamoto S, Zhou Z, Kobayashi H, Kato C, Hirokawa Y, Aiba I, Takahashi S, Shibata S, Takao M, Yoshida M, Endo F, Yamanaka K, Kokubo Y, Okano H. Aberrant CHCHD2-associated mitochondriopathy in Kii ALS/PDC astrocytes. Acta Neuropathol. 2024 May 15;147(1):84. doi: 10.1007/s00401-024-02734-w.

3. Takeuchi Y, Wang Y, Sasaki K, Sato O, Tsuchikawa T, Wang L, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Hirokawa Y, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Kato T, Shiku H, Hirano S. Exhaustion, rather than lack of infiltration and persistence, of CAR-T cells hampers the efficacy of CAR-T therapy in an orthotopic PDAC xenograft model. Biomed Pharmacother. 2024 Jan;170:116052. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116052. Epub 2023 Dec 22.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

研究分担者 西村 有平 三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野 教授

研究要旨

ゼブラフィッシュの様々な細胞における一次線毛を蛍光免疫染色法により可視化し、画像解析ソフトを用いて定量化する手法を確立した。この手法を用いて、カルバミン酸エチル（10 mM）、トリクロロエチレン（760 nM）の四日間曝露（受精後3日目から7日目まで）により、ゼブラフィッシュ脳の細胞の一次線毛が短くなることを明らかにした。本手法を用いて、ゼブラフィッシュの様々な細胞において化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を評価することができる。

A. 研究目的

ゼブラフィッシュの一次線毛を免疫染色法により可視化し、解析ツールを用いて一次線毛の形態を定量化する手法を確立すること。その手法を用いて、化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を定量的に評価すること。

B. 研究方法

様々な細胞の一次線毛にEGFPを発現するゼブラフィッシュの組織切片を作製し、EGFPに対する抗体を用いた免疫染色により、一次線毛を可視化した。画像解析ソフト（CiliaQ）を用いて、一次線毛の形態を定量的に解析した。また、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンをゼブラフィッシュに曝露（受精後3日目から7日目まで）し、脳における一次線毛の形態変化を解析した。

C. 研究結果

一次線毛の形態を定量的に解析する手法を確立した。この手法を用いて、カルバミン酸エチル（10 mM）、トリクロロエチレン（760 nM）の曝露（受精後3日目から7日目まで）により、ゼブラフィッシュ脳の細胞の一次線毛が短くなることを明らかにした。

D. 考察

本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、カルバミン酸エチルやトリクロロエチレンの曝露による胆管上皮細胞の一次線毛形態を評価可能と考えられる。

E. 結論

本研究で確立した一次線毛の定量的解析手法を用いて、化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を様々な細胞において評価することができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito M, Otsu W, Miyadera K, Nishimura Y. Recent advances in the understanding of cilia mechanisms and

their applications as therapeutic targets. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2023,10:1232188.

2. Wakai E, Shiromizu T, Otaki S, Koiwa J, Tamaru S, Nishimura Y. Lansoprazole Ameliorates Isoniazid-Induced Liver Injury. *Pharmaceuticals* 2024,17:82.

3. 西村 有平, 一次纖毛を介した脂肪前駆細胞・間葉系前駆細胞の機能制御, 日本薬理学雑誌 159 巻4号

2. 学会発表

Yuhei Nishimura, **Exploration of therapeutic agents targeting trichoplein-mediated ciliogenesis**, *Anatomy-Physiology-Pharmacology Week in 2025 (APPW2025)* March 17.2025

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioaka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N	Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism	Chem Res Toxicol	35(9)	1625-1630	2022
Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Itawashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M	Induction of DNA Damage in Mouse Colonorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer	In Vivo	36(2)	628-634	2022
Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Watabuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, Totsuka Y	Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development	Int J Mol Sci	25(20)	11191	2024

Watanabe K, Komiyama M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikeda K, Hashigami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Totsuka Y	Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis	Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen	899	503821	2024
Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Totsuka Y	Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems	J Toxicol Sci	49(10)	425-434	2024
Suzuki S, Gi M, Komiyama M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H	Evaluation of the mechanisms involved in the development of bladder toxicity following exposure to occupational bladder cancer causative chemicals using DNA adductome analysis	Biomolecules	14	36	2023
Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H	DNA methylation aberrations in dimethylarsinic acid-induced bladder carcinogenesis	Cancers (Basel)	15	5274	2023
Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yamagata Y, Yonekura N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suehara H, Wanibuchi H	o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice	Toxicology	488	153483	2023
Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Ohtoshi T, Yamazaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J	Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma	Br J Cancer	128(12)	2197-2205	2023

Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H	Evaluation of the mechanisms involved in the development of bladder toxicity following exposure to occupational bladder cancer causative chemicals using DNA adductome analysis	Biomolecules	14(1)		2023
Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H	Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway	Toxicol Lett	384	128–135	2023
Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H	A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks	J Toxicol Pathol	36	123–129	2023
Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H	Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells	Arch Toxicol	98	2065–2084	2024
Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H	A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats	Arch Toxicol	98	2711–2730	2024
Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Sumizu H, Wanibuchi H	Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice	Toxicol Sci	202	210–219	2024

Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachira-arunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H	Metabolism and effects of acetoaceto- α -toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice	J Toxicol Pathol	38	59–67	2025
Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H	Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes	J Toxicol Pathol	38	147–154	2025
Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachira-arunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H	Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats	J Toxicol Pathol	38	161–165	2025
Imai T, et al.	Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs	Oncol Lett	24(1)	221	2023
Ishigamori R, et al.	The potential of organoids in toxicologic pathology: Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model	J Toxicol Pathol	35(3)	211–223	2022
Imai, T. Naruse, M. Machida, Y. Fujii, G. Murah, M. Ochiai, M. Takahashi, M. Nakagama, H	Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model	Nutr Cancer	75	713–725	2023

Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Teakashi H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S	Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice	Fundam Toxicol Sci	11(1)	37–56	2024
Yamakawa D, Tsuboi J, Kasahara K, Matsuda C, Nishimura Y, Kodama T, Katayama N, Watanabe M, Inagaki M	Cilia-mediated Insulin/Akt and ST2/JNK Signaling Pathways Regulate the Recovery of Muscle Injury	Adv Sci (Weinheim)		202202632	2022
Semba R, Uchida K, Hirokawa Y, Shiraishi T, Onishi T, Sasaki T, Inoue T, Watanabe M, Miyamoto H	A simple risk stratification model for prostate cancer using histopathologic findings of radical prostatectomy	Am J Clin Pathol		aqae049	2024
Leventoux N, Morimoto S, Ishikawa M, Nakamura S, Ozawa F, Kobayashi R, Watanabe H, Supakul S, Okamoto S, Zhou Z, Kobayashi H, Kato C, Hirokawa Y, Aiba I, Takahashi S, Shibata S, Takao M, Yoshida M, Endo F, Yamakawa K, Kokubo Y, Okano H	Aberrant CHCHD2-associated mitochondrial pathology in Kii ALS/PDC astrocytes	Acta Neuropathol	147(1)	84	2024
Takeuchi Y, Wang Y, Sasaki K, Sato O, Tsuchikawa T, Wang L, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Hirokawa Y, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Kato T, Shiku H, Hirano S	Exhaustion, rather than lack of infiltration and persistence, of CAR-T cells hampers the efficacy of CAR-T therapy in an orthotopic PDAC xenograft model	Biomed Pharmacother	170	116052	2024

Komada M, Nishimura Y	Epigenetics and Neuroinflammation Associated With Neurodevelopmental Disorders: A Microglial Perspective	Front Cell Dev Biol	10	852752	2022
Nishimura Y, Kuurosawa K	Analysis of Gene-Environment Interactions Related to Developmental Disorders	Front Pharmacol		10.3389	2022
Saito M, Otsu W, Miyadera K, Nishimura Y	Recent advances in the understanding of cilia mechanisms and their applications as therapeutic targets	Front Mol Biosci	10	1232188	2023
Wakai E, Shimizu T, Otaki S, Koiwa J, Tammaru S, Nishimura Y	Lansoprazole Ameliorates Isoniazid-Induced Liver Injury	Pharmaceuticals	17	82	2024
西村 有平	一次繊毛を介した脂肪前駆細胞・間葉系前駆細胞の機能制御	日本薬理学雑誌	159(4)		2024