

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 日本大学 薬学部 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。初年度は、本研究で共通して使用する市販のマウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の長期培養、化学物質暴露などの条件について様々な検討を行った。その結果、マトリゲルとマウス肝臓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を維持できることがわかった。化学物質の暴露方法については、メタンスルホン酸エチル (EMS) のように培地に対して可用性の物質であれば、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 RealTime-Glo MT Cell Viability Assay ならびに生細胞計測法のいずれの評価法においても確認できた。

### 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。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ている。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 有害性評価手法を確立するため、共通して使用する予定である市販のマウス肝臓オルガノイドを用いて、①培地、②培養方法、③シングルセル化、④化学物質の暴露方法の検討を行い長期培養ならびに化学物質暴露実験の至適条件を決定し、既知の変異原性物質を用いて化学物質暴露予備実験を行った。

### B. 研究方法

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暴露実験に関して、いくつかの検討を行った。

①培地の検討：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培地 (Liv-H・Liv-C) を用いて 24well plate で培養を行い、各培地におけるオルガノイドの増殖を比較した。なお、Liv-H培地は Advanced DMEM/F12培地に mEGF, BSA, Y27632, A83-01, CHIR-99021, ITS-G supplement 等を加え、Liv-C培地は Advanced DMEM/F12培地に mEGF, BSA, Y27632, Jagged1 等を加えたものを調製した。また継代時の播種密度は、OGMは 1:30、Liv-H培地ならびに Liv-C培地は 1:2 ~ 1:30 にして検討を行った。

②培養方法の検討：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) 法でも培養が可能であるか検討を行った。なお、継代時の播種密度はマトリゲルドーム状培養では 1:30 とし、MBOC法は推奨培養方法ではないため多めに播種したほうがよいと考え 1:10 で行った。

③シングルセル化の検討：継代時にトリプシンあるいは Accumax で酵素処理をし、オルガノイドをシングルセルにした後に培養を行った場合に酵素がオルガノイドの増殖に及ぼす影響について酵素を使用しない通常の継代時の増殖と比較した。

④化学物質暴露方法の検討：被験物質が非水溶性や高分子の場合、ドーム型培養法ではマトリゲル内に物質が浸透せず、オルガノイドへの被験物質の暴露が困難になると予想されるため、暴露時の培養方法について、オルガノイドを (1) チューブに回収、(2) well にマトリゲルを敷いて播種、(3) マトリゲル非存在下で well に播種と

いった3通りの方法を用いて37度、5%CO<sub>2</sub>下で24時間インキュベートした後、オルガノイドを回収し、ドーム型培養を再開した場合のオルガノイド増殖の様子を通常の培養方法と比較した。なお、本検討では暴露方法の違いがオルガノイド増殖に及ぼす影響を比較するため、化学物質非存在下で行った。

⑤化学物質暴露実験：メタンスルホン酸エチル(EMS)を用いて暴露実験を行った。ドーム型培養法ならびに当施設で従来行ってきた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時間暴露後、RealTime-Glo<sup>TM</sup> 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。

### C. 研究結果

①培地の検討：OGMを用いて培養した場合と比べ、Liv-H培地ならびにLiv-C培地での培養は、オルガノイドの増殖速度が遅いことがわかった。またOGM培地を用いた継代では、1:30の播種密度で長期継代培養が可能だったが、Liv-H培地を用いた場合は、播種密度が1:30では2回目の継代でオルガノイドの増殖が著しく低下し、濃く播種する必要があることがわかった。

②培養方法の検討：当施設でオルガノイド培養に用いているMBOC法でも培養を継続することは可能であった。ただ継代時の播種密度を推奨法であるドーム型培養法は1:30、MBOC法は1:10にして播種し、7日後のオルガノイド数を比較した結果、MBOC法はドーム型培養法より多く播種したにもかかわらず、オルガノイドの数はドーム型培養と比べて少なかった。

③シングルセル化の検討：オルガノイドを回収したチューブ内あるいは培養well内でトリプシンあるいはAccumaxによる酵素処理を行った後に播種した結果、両者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。また、酵素を使用しない通常の継代方法とwell内で酵素を用いてオルガノイドをシングルセルにした後に播種を行った場合を比較すると、播種3日後では酵素を使用したオルガノイドは若干成長が遅いようだったが、6日後では酵素の有無による大きな差はみられなくなった。さらに酵素の種類によりオルガノイドの成長に大きな影響を及ぼすこともなかった。

④化学物質暴露方法の検討：オルガノイドをwellにマトリゲルを敷いた上、あるいはマトリゲル非存在下でのチューブ内あるいはwellで37°C、5%CO<sub>2</sub>下で24時間インキュベートした後にオルガノイドを回収し、ドーム型培養を再開した結果、最初の播種から3日後では、マトリゲル存在下ではオルガノイドの増殖が確認できたが、マトリゲル非存在下では、明らかな増殖は認められなかった。ただ、マトリゲル非存在下での暴露方法においても培養日数が経つにつれてオルガノイドの増殖は認められた。また、マトリゲル存在下で培養したオルガノイドを回収しドーム型培養を再開させた場合は、ドームがうまく形成されない場合があった。

⑤化学物質暴露実験：EMS暴露による細胞毒性試験をRealTime-Glo MT Cell Viability Assayで評価した結果、ドーム型培養法で暴露した場合でも従来の暴露方法であるMBOC培養法と同じように濃度依存的に細胞毒性

が示された(図1A, B)。また、ドーム型培養法でEMSを暴露した24時間後の細胞毒性についてトリパンプルーによる生細胞計測法を用いて評価した結果、RealTime-Glo MT Cell Viability Assayと同様の結果が得られた(図1A, C)。これらの結果から、本実験で使用するマウス肝臓オルガノイドの化学物質暴露実験は被験物質によってはドーム型培養で行うことが可能であると考えられる。

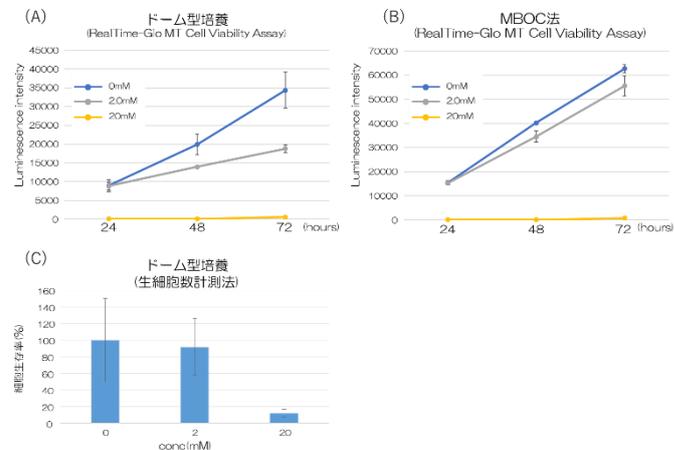


図1. EMS暴露による細胞毒性試験

### D. 考察

マウス肝臓オルガノイドの培養に関して、培地、培養方法、酵素の影響、化学物質の暴露方法などの検討を行った。培地に関しては、Liv-H培地やLiv-C培地を使用する場合、播種密度を濃くする必要があると考えられた。Liv-H培地を用い、播種密度1:5で培養を開始した検討では、次の継代は1:10、その次の継代は1:5の播種密度で行った。このことから、Liv-H培地での培養は常に同じ播種密度による継代ではなく、オルガノイドを観察しながら継代間隔と播種密度を決める必要がある可能性が示唆された。一方、OGMによる培養では1:30の播種密度で1週間毎に継代を行えば培養が維持されることがわかり、OGMを用いることで安定した連続培養が可能であると考えられる。

培養方法は、MBOC法を用いた培養も継代時にオルガノイドの播種量を多くすれば培養の維持が可能であると推察されたが、ドーム型での培養方法のほうが、少ない播種量でも安定して増殖し効率がよい培養方法であると考えられる。また、ドーム型培養で播種した後1週間程度経過したオルガノイド数は1wellあたり1~5×10<sup>5</sup>個程度で、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。

酵素によるシングルセル化の方法は、酵素反応をチューブ内で行う方法とwell内で行う方法の2種類で行ったところ、その後のオルガノイドの増殖に大きな差はみられなかった。well内で酵素反応を行う場合、酵素反応中に顕微鏡でシングルセル化の状況を確認できるだけでなく、チューブ内での酵素反応で必要となる酵素反応前にオルガノイドをチューブに回収して遠心し上清を除去する工程を省くことが可能なことから

well 内で酵素反応を行う方法がよいと考える。使用する酵素については、STEMCELL Technologies が推奨するシングルセル化の方法では TrypLE を使用していることからトリプシンの使用がよいと考える。

化学物質の暴露方法は、マトリゲル存在下と比べてマトリゲル非存在下では、ドーム型培養に戻した時に増殖開始がやや遅れることがわかったため、マトリゲルを敷いた上にオルガノイドを播種し化学物質を暴露する方法がよいと考えられる。ただし、この方法で培養したオルガノイドで、ドーム状培養を再開させた際にドームがうまく形成されない場合が認められた。これは、おそらく暴露時に well に敷いたマトリゲルをドーム状培養開始前に行った通常の洗浄方法では完全に除去できなかったことに起因するのではないかと考えた。そのため、この方法を暴露方法に使用する場合は、ドーム形成のためにさらなる検討が必要となる。

化学物質暴露実験は、予備実験として、これまでにマウス由来の肝臓あるいは肺オルガノイドに対して暴露実験を行ったことがある EMS を用いて行った。RealTime-Glo MT Cell Viability Assay で評価した場合、ドーム型培養法で EMS を暴露しても、従来の MBOC 法と同様に、濃度依存的に細胞毒性が示されたことから、培地に対して可用性の物質は、ドーム型培養法でも RealTime-Glo MT Cell Viability Assay を用いて暴露濃度の決定を行い、種々の実験を進めることが可能であると考えられる。また評価方法については、発光測定法だけでなく、トリパンプルー色素排除法でも可能なことが分かった。今後はドーム型培養法で暴露を行った場合のオルガノイドへの化学物質の取り込みについて解析し、種々の化学物質を用いて細胞毒性試験を行っていく予定である。

## E. 結論

マウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の培養は、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方法で行う。シングルセルにする方法は、効率よく行うため培養well内にトリプシンを加える方法で行う。オルガノイドを用いた化学物質暴露実験は、引き続き検討が必要となるが、培地に可溶性な物質を用いる場合は、ドーム状培養法を用いても化学物質を暴露させることができるのではないかと考えている。

## 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. (2022) 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.

### 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, 鰐淵 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, 梶村春彦, **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. **戸塚ゆ加里**, 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. **戸塚ゆ加里**, 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, **戸塚ゆ加里** 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 ゆ加里** 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 13<sup>th</sup> 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 13<sup>th</sup> 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 ゆ加里** 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 ゆ加里、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 ゆ加里 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)

#### 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