

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。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ため、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。

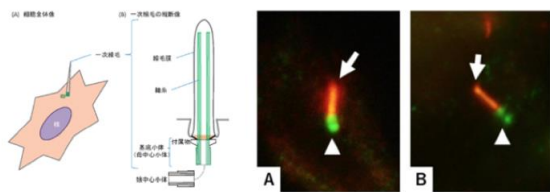


図1. 一次線毛について

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 Cells, 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 °C、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、1 well 当たり、例えば DU-145、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 2 well 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 2 Well 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-PBS 200 μ L で 5 分室温放置、最後に洗い (PBS) を 5 分 3 回行った。

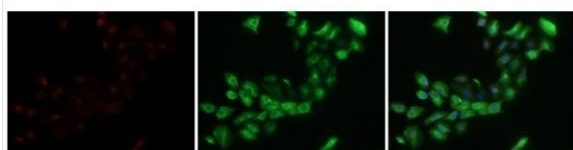
免疫細胞染色は、ブロッキングバッファー 100 μ L で 20 分、一次抗体 (ARL13B、カクテル) 100 μ L 2 時間、洗い (PBS) 200 μ L 5 分 3 回、二次抗体 (ARL13B、カクテル) 100 μ L 1 時間、洗い (PBS) 200 μ L 5 分 3 回、対比染色 (DAPI : 2 μ g/ml) 100 μ L 20 分を行った。

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. 研究結果およびまとめ

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。

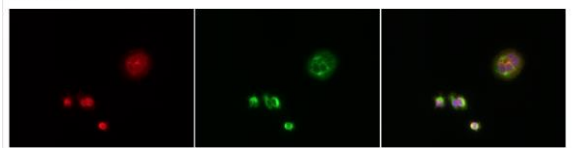
DU-145



ARL13B, cilia, Red AE1/AE3, Cytokeratin (cytoplasm), Green Marge (DAPI, nucleus, Blue)

図 2. DU-145 における primary cilia の発現

Panc-1



ARL13B, cilia, Red AE1/AE3, Cytokeratin (cytoplasm), Green Marge (DAPI, nucleus, Blue)

図 3. Panc-1 における primary cilia の発現

PC-3



ARL13B, cilia, Red AE1/AE3, Cytokeratin (cytoplasm), Green Marge (DAPI, nucleus, Blue)

図 4. PC-3 における primary cilia の発現

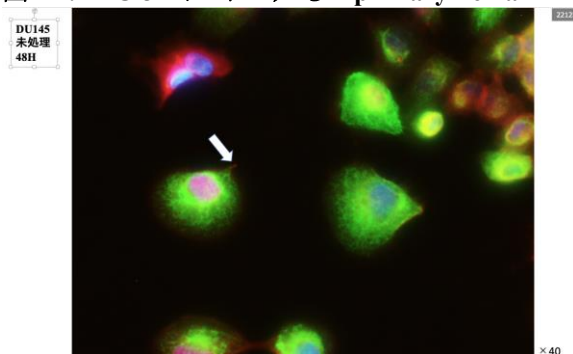


図 5. DU-145 における primary cilia の発現

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。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ため、細胞パネルに追加を考える。

F. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし