

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。本研究では、マウス肺及び肝臓オルガノイドおよび免疫系や間質細胞等と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。さらに、一次線毛発現が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。今年度は、まず、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)の維持・培養、化学物質暴露などの条件に関して検討を行った。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)を用いた培養方法で行うことで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は、メタンスルホン酸エチルのような培地に対して可用性の物質であれば、ドーム型培養法でも Matrigel Bilayer Organoid Culture(MBOC)法でも同様な細胞毒性が確認できた。一方、B6J 雄マウスの肺由来オルガノイドにカルバミン酸エチル(ウレタン)を 2,500 μM および 10,000 μM 濃度で処置することにより、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。また、in vitro 発がん DEN 誘発肝腫瘍と in vitro DNA 発がん性試験の WES による DNA 変異の比較において、同じ DNA 部位の SNP が生じ、DEN 処置オルガノイドを皮下に移植して生じた皮下増殖性病変や、肝腫瘍でその SNP が濃縮されていることを明らかにした。オルガノイド評価系でのエンドポイント候補探索のための in vivo 毒性試験に関しては、ウレタンやアクリルアミドを毒性陽性対照物質としてマウスを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施し、標的臓器に毒性学的変化が惹起されることを確認した。さらに、マウス正常組織を用いて、一次線毛の検出方法を確立した。in vitro においても免疫細胞学的染色を用いて DU-145 において一次線毛の発現を確認している。また、蛍光ライブイメージングを用いて、ゼブラフィッシュの肝臓、尿細管、腸管、脳など、様々な組織における一次線毛の形態を観察することができ、作製した同ゼブラフィッシュモデルを用いて、化学物質の暴露による一次線毛の形態変化を様々な組織を対象に観察することができると考えている。

研究分担者

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
西村 有平 三重大学大学院医学系研究科
統合薬理学教授

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。

申請者らはこれまでに、マウス正常組織(肺、肝臓、乳腺等)由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、当該評価系が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。具体的には、オルガノイドに化学発がん物質を暴露後ヌードマウスの皮下に接種する方法で、病理組織学的変化をエンドポイントとする in vitro 化学発がんモデルを諸外国に先駆けて提案した(Naruse M, Imai Tら、2020)。また、レポーター遺伝子導入マウス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)。さらに、化学物質による in vivo における毒性、発がん性は標的細胞

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、実験動物に一定期間繰返して被験

に対する直接作用に加え、共存する免疫系細胞や間質細胞等の影響を受ける場合があり、それらの細胞群とオルガノイドとの共培養系を用いることで、生体微小環境の構築を目的とした評価系、またエピゲノム変化評価系の構築にも取り組んでいる。

これらに加え、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、化学物質の安全性評価法構築への応用も検討する。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が報告されている。申請者らはこれまでに、一次線毛の動態と細胞周期制御の分子レベルでの解析や、一次線毛の存在を特異的抗体により定量手法する検討も開始している。発がん性スクリーニングである各種発がん性中期試験法において、前がん病変マーカーが重要な役割を果たしているが、この一次線毛の発現は、それに匹敵する発がん予測マーカーとなる可能性に加えて、臓器横断的に応用が可能であると期待できる。

以上の背景より、本研究では、これら先行研究により有用性が示された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。さらに、一次線毛発現が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。

B. 研究方法

1. マウスオルガノイドの継代・維持、化学物質暴露方法の条件検討

市販のマウス肝臓オルガノイド(STEMCELL Technologies, ST-70932)の培養に関して、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。Liv-HならびにLiv-C培地の組成は表1に示した通りである。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で検討を行った。

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きた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。

① 培地の検討

Basal medium* : Advanced DMEM/F12 (500mL)
+Penicillin-Streptomycin (5mL)
+Amphotericin B Suspension(1mL)
+L-Glutamic Acid (5mL)

	Final concentration		
	Liv-H	Liv-C	
		Oday	1 day~
EGF	10ng/mL	50ng/mL	50ng/mL
Y27632	10uM	1uM	
A83-01	0.5uM		
CHIR-99021	3uM		
HEPES	5mM		
ITS-G	5mM		
BSA	0.05%	1%	0.1%
Nicotinamide	10mM		
Proline	30ug/mL		
Dexamethasone	39.2ng/mL		
AA2P	1mM		
Jagged-1		1uM	1uM

表1 培地の組成

③ シングルセル化の検討：

オルガノイドをトリプシンあるいはAccumaxを用いて酵素処理をすることで、シングルセルにした後に培養を行った場合、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と比較した。

④ 化学物質暴露方法の検討：

本検討では実際に化学物質を暴露するとオルガノイドの増殖の違いが暴露方法によるのか、化学物質の影響によるのか判別困難となるため、化学物質非存在下で3通りの培養方法で検討を行った。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)wellに播種した後、各々37度、5%CO₂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場合のオルガノイドの様子を通常の培養と比較した。

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、マウス肝臓オルガノイドを播種した2時間後から培地中最終濃度を0, 0.2, 2, 20mMとして24時間暴露させた後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega)ならびにトリパンブルー色素排除法を用い評価を行った。

2. マウスオルガノイドを用いた一般毒性試験系構

策

今年度は市販のマウスオルガノイド培養に必要な試薬(マトリゲル)の供給が安定せず、各種毒性評価方法検討のために本研究で使用するマウス肝オルガノイドの供給が遅れた。そのため、既存のC57BL/6J(B6J)系統で作成した肺オルガノイドを用いて、毒性評価の準備を行なった。

① マウス正常組織からのオルガノイド樹立および培養:

1) オルガノイド樹立

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、肺と肝臓を摘出した。摘出した臓器は氷冷下にて剪刀で細切し、中性緩衝生理食塩水で洗浄、Dispase II/Collagenase Pで37°C、30分間処置した後にポアサイズ40 µmのフィルターにかけ、培地に懸濁し、12ウェルプレートに滴下し37°Cで静置してゲル状にしたマトリゲル(コーニング社)上に播種し、37°Cで培養した。その後1日間は培地で静置培養し、2日目に培地を除いてマトリゲルを重層した。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。各オルガノイドの形成・増殖状態を確認しつつ、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培養を継続した。安定した増殖が確認できたオルガノイドについては、CELLBANKER 2(タカラバイオ社)を用いて液体窒素にて凍結し、-80°Cまたは液体窒素にて凍結保存した。

2) オルガノイドの形質解析

肺由来オルガノイドについて、培養後に回収してiPGe11(ジェノスタッフ社、東京)にて包埋、常法に従ってパラフィン切片を作製した。オルガノイドを形成する細胞の気道および肺胞上皮への分化を検出する目的で、1次抗体として抗Uteroglobin/CC10ウサギポリクローナル抗体(プロテインテック社、ローズモント、イリノイ州、米国)と抗Prosurfactant Ptotein Cウサギポリクローナル抗体(アブカム社、ケンブリッジ、英国)を用いて、ポリマー法(シンプルステインMAX-PO、ニチレイバイオサイエンス社、東京)による免疫組織化学染色を行っている。なお、当該解析については、将来的にヒト組織由来オルガノイドを用いる試験法への展開を見据え、手術切除した肺非がん部由来のオルガノイドについても対比しつ

つ解析を進めている。

② 一般毒性評価:

1) 被験物質の選定

化審法対象学物質のうち、今年度は肺、肝臓、腎臓など多臓器に対して毒性あるいは発がん性を示すカルバミン酸エチル(ウレタン)を選択した。

2) 肺オルガノイドに対する被験物質のin vitro 処置

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 µMから公比2で156 µMまでの濃度で処置し、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 µM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 µg/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) µM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Uteroglobin/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プルステインマウス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。

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

- ① DEN誘発肝腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較：

C57BL/6Jマウスへのジエチルニトロソアミン(DEN)の投与により誘発した肝腫瘍試料を作製し、これまでに行なったin vitro発がん性試験の試料との比較をWESにより行った。腫瘍の誘発については、2週齢C57BL/6J雄マウスへのジエチルニトロソアミンの投与(生食コントロール飲水1回投与3匹、DEN飲水1回投与6匹)を行った。in vitro系については、Trp53ヘテロノックアウトマウス(C57BL/6J)の肝臓由来無処置のオルガノイド、DNE処置(0.2 nM)したオルガノイドおよびヌードマウス皮下に形成された増殖性病変(Naruse M, Imai Tら、2020)を用いた。それぞれからDNA抽出を行い、WES解析については、SureSelect(Agilent Technology)を用いてライブラリを作製し、150bp ペアエンドシーケンスをHiSeqを用いて行った。マウスmm10ゲノムをリファレンスゲノムとしてマッピングを行い、それぞれのSNVを検出し、無処置オルガノイドをコントロールとし、コントロールにないSNVをDEN処置オルガノイド、ヌードマウス皮下増殖性病変、DEN誘発肝腫瘍それぞれについて抽出し、それらの結果を比較した。結果の確認はIGVを用いて確認を行った。

- ② ベンゾ[α]ピレン誘発肺腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較：

Trp53ヘテロノックアウトマウスにベンゾ[α]ピレン投与により誘発した肺腫瘍と、in vitro発がん性試験のサンプルの比較のための肺腫瘍の試料を作製した。6-7週齢雄Trp53ヘテロノックアウトマウスおよび野生型マウスへのベンゾ[α]ピレン投与(各ゴマ油control 8回投与3匹、ベンゾ[α]ピレン8回投与3匹)を行った。

- ③ in vitro 一般毒性試験法におけるエピゲノム解析のための検討：

メチル化解析の手法はRRBS法(Reduced representation of bisulfite sequencing)を用いることとした。エピゲノム変化のためのサンプリングの条件検討を、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について行った。ウレタンの2,500 μMおよび10,000 μM、対照(0 μM)について、3回処置後72時間のメチル化解析を行う予定で、1回処置後72時間のサンプル量で検討を行った。

4. In vivo毒性試験

今年度は、in vivo毒性評価実験として6週齢雄性C57BL/6Jマウス28日間投与毒性試験を実施した。実験で得られたサンプルを用いて病理組織学的に毒性学的影響を観察し、一次線毛の発現への影響を解析した。さらに、別途実施したマウスを用いた毒性試験より得られた正常組織について、パラフィン包埋未染色標本作製し、一次線毛の免疫組織化学的染色法の確立に向けた検討を実施した。

- ① ウレタンのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験：

6週齢(入荷時5週齢)の雄性C57BL/6Jマウス、1群各5匹、合計20匹にウレタンを0, 300, 1000及び2000 ppmの用量で28日間飲水投与した。投与量は、参考資料(National Toxicology Program, Toxicology Report Series #52)より、13週間の飲水投与で、3300, 10000 ppmでは死亡動物が認められ、330, 1100 ppmでは肺病変が観察されていたことから、本試験系が4週間投与ということとを考慮し、若干濃度を上げ、毒性兆候が捉えられると考えられる用量2000 ppmを最大投与量とした。以下、300, 1000 ppmを設定した。投与液の調製は、必要量のウレタンを秤量し、水道水を加え、スターラーで攪拌して溶解させた後にメスアップした。調製は3ないし4日に1回の頻度で行なった。観察及び測定項目…

一般状態は、実験開始後、1日2回、すべての動物について一般状態、臨床症状、生死などを観察し、個体別に記録した。

体重は、実験開始時及びその後、毎週2回、全動物について個体別に体重を測定した。また、計画屠殺時に各動物の体重(剖検日体重)を測定した。摂水量は、実験開始後、毎週1回、2日間の摂水量をケージ単位で測定し、1日平均摂水量(mL/animal/day)を算出した。なお、1日平均摂水量より、1日平均被験物質摂取量(mg/kg/day)を算出した。

血液生化学的検査は、投与期間終了後の全動物について、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、総ビリルビン(T-BIL)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、グルコース(GLU)、総コレステロール(T-CHO)、トリグリセリド(TG)の検査を実施した。検査試料(血液)の採取は、実験小動物用簡易吸入麻酔装置を用いてイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から行なった。採取した血液を遠心分離して得た血清を用いた。

肺胞洗浄液(BALF) …

採血後に放血致死させた動物について、BALFを採取した。採取は、開胸後、左肺の気管支を木綿糸で結紮した後、気管よりチューブをカニューレションし、常

温の滅菌生理食塩液 1 mLをチューブから右肺に、自然落下により注入・排出する操作を2回行って採取した。採取したBALFについて乳酸脱水素酵素 (LDH) 及びマイクロ蛋白 (μ -TP) を測定した。

剖検は、全生存動物について、全身諸器官・組織の肉眼的病理学観察を実施し、心臓、脾臓、リンパ節 (頸部、腸間膜)、胸腺、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、鼻腔 (鼻甲介)、副腎、気管、肺 (気管支を含む)、舌、唾液腺 (顎下腺、舌下腺)、食道、胃 (前胃、腺胃)、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、前立腺 (凝固腺、腹葉、背側葉)、精嚢、精巣上体、脳 (大脳、小脳)、脊髄 (胸部)、坐骨神経 (右)、大動脈、眼球 (視神経を含む)、ハーダー氏腺、涙腺、皮膚 (右鼠径部)、骨及び骨髄 (右大腿骨、胸骨)、骨格筋 (大腿筋、右) を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。

さらに、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、胸腺の器官については重量を測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比 (相対重量) を算出した。

病理組織学的検査は、定法に従い肝臓、肺、腎臓、脾臓、胸腺、小腸、大腸、腸間膜リンパ節についてHE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色標本作製し、組織学的に観察した (進行中)。

さらに、未染パラフィン標本を用いて一次線毛関連因子に対する一次抗体を用いて免疫組織化学的な染色を施している (進行中)。

②アクリルアミドのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験：

6週齢 (入荷時5週齢) の雄性C57BL/6Jマウス (日本エスエルシー株式会社)、1群各5匹、合計20匹にアクリルアミド (富士フィルム和光純薬 (株)) を0, 250, 500及び1000 ppmの用量で28日間飲水投与した。投与量は、同物質の毒性情報より設定した。投与液の調製は、必要量のアクリルアミドを秤量し、蒸留水を加え、スターラーで攪拌して溶解させた後にメスアップした。調製は週2回の頻度で行なった。

観察及び測定項目…

上記のウレタンの実験と同項目を設定した。

病理組織学的検査では、定法に従い肝臓、肺、腎臓、脾臓、胸腺についてHE染色標本の作製、一次線毛関連因子に対する一次抗体を用いて免疫組織化学的な染色をしている (組織標本作製中)。

③マウス正常組織を用いた一次線毛の免疫染色系の確立：

上記の毒性物質より得られた臓器において一次線毛の免疫組織化学染色を実施するのに先立ち、マウス正常組織を用いて、一次線毛発生・線毛形成に関するタンパク質であるAcetylated Tubulin (Lys40, Proteintech: No.66200-1-1g), IFT88 (Proteintech: No.13967-1-A), ADCY3 (Proteintech: No.19492-1-AP), ARL13B (ARL2L1, Proteintech: No.17711-1-AP)

の免疫染色系の確立を試みた (いずれもProteintech Group, Inc)。

本検討では、いずれもマウスの実験の正常対照群から得られた脳、肺、腎臓、心臓、小腸、大腸及び肝臓についてのパラフィン包埋切片を用いた。

5. 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検討

①一次線毛の分子基盤解明：

一次線毛の分子基盤解明のため、ゼブラフィッシュを用いた解析を実施した。ゼブラフィッシュのユビキチン遺伝子 (ubb) のプロモーター遺伝子配列の下流に、一次線毛のマーカであるAr113b遺伝子とeGFP遺伝子のアミノ酸配列をコードしている領域を連結したコンストラクトを合成し、トランスポゾンを用いてゼブラフィッシュのゲノムに挿入した。二光子励起顕微鏡を用いて、一次線毛の蛍光ライブイメージングを実施した。

②オルガノイド評価系への応用：

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 1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 (P

BS)は200 μ Lで5分3回、さらに0.1% Triyon-X-PBS200 μ Lで5分室温放置し、最後に洗い(PBS)を5分3回行った。

免疫細胞染色は、ブロットティングバッファー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。

(倫理面の配慮)

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。また、東京農業大学および受託試験実施施設においても動物実験計画書が審査され、承認を受け遂行した。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、各施設の機関承認を得た後に実施した。

研究結果

1. マウスオルガノイドの継代・維持、化学物質暴露方法の条件検討

① 培地の検討:

OGMを用いて培養した場合と比べ、Liv-H培地と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、播種密度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法を用いた培養法でも培養の継続は可能であった。ただ継代時の播種密度をドーム型培養法は1:30に、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、両方でオルガノイドの増殖に違いは認められなかった。オルガノイドの成長に関して酵素を使用しない通常の継代方法とwell内でAccumaxあるいはトリプシン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う培養方法とを比較すると、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%CO₂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、マトリゲル存在下のオルガノイドは増殖が確認できたが、マトリゲル非存在下では、明らかな増殖が認められなかった。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が認められた。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。

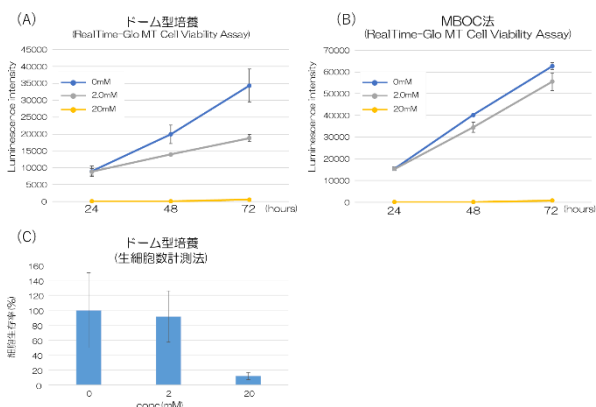


図1. EMS暴露による細胞毒性試験

2. マウスオルガノイドを用いた一般毒性試験系構築

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、継代回数少ない状態で一部凍結保存した。

② 一般毒性評価:

1) 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2)。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。

2) 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3)。

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Uteroglobulin/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proSPC陽性細胞は認められなかった。

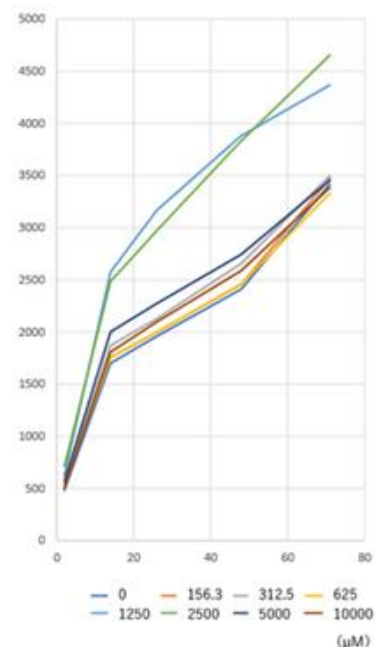
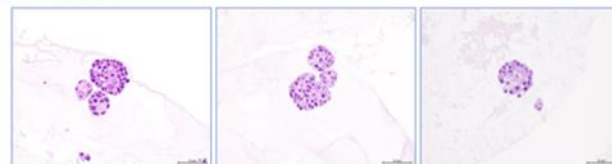


図2. ウレタン処置後のマウス肺オルガノイドの生細胞数の推移

(1) 1回処置



(2) 3回処置

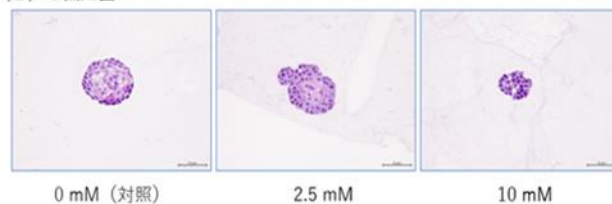


図3. ウレタン処置後のマウス肺オルガノイドの形態学的変化 (Bar=50 μm)

③ 発がん性およびそのメカニズム評価:

無処置のオルガノイド、B[a]P処置したオルガノイドおよびヌードマウス皮下に形成された増殖性病変からDNAを抽出する準備を進めている。

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

- ① DEN誘発肝腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較：

マウスへのDEN引水投与後およそ9ヶ月経過し、DEN飲水群で1匹肝腫瘍の形成が見られ、以降のWES解析に用いた。肝臓由来無処置オルガノイド、DNE処置オルガノイド、DNE処置オルガノイドを移植しヌードマウス皮下に形成された増殖性病変、DEN誘発肝腫瘍のWES解析を行い、SNPの抽出を行った。無処置オルガノイドをコントロールとし、コントロールにないSNPを抽出した(各1サンプル)。それぞれ、161, 17983, 1588箇所のSNPがコントロールに対して検出された。そのうち、少なくとも2サンプルに共通するSNPについてIGVを用いた目視による確認を行い、DNE処置オルガノイド、DNE処置オルガノイドを移植しヌードマウス皮下に形成された増殖性病変に共通するSNP1箇所、DNE処置オルガノイド以外に共通するSNP4箇所、全てに共通するSNP7箇所を同定した。

- ① ベンゾ [α] ピレン誘発肺腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較：

およそ1年でTrp53K0マウスとWTマウス各1匹に肺結節発生を確認した。WTは途中死亡、死後硬直ありの状態であった。

- ② in vitro 一般毒性試験法におけるエピゲノム解析のための検討：

ウレタン1回処置後72時間のサンプルで1 we11から見積もり、3回処置後72時間ではRRBS解析、その確認実験に必要なDNA量の不足が見込まれた。

4. In vivo毒性試験

マウス28日間反復投与実験において、ウレタンでは投与用量に依存した毒性学的影響が肺並びに肝臓に認められた。アクリルアミドでは、体重、摂水量並びに一般状態に顕著な影響が認められたが、それに伴うストレスに起因する変化が主体であった。これよりさらに低用量群を設定したマウスの反復投与実験を追加した(解析中)。さらに、マウス正常組織を用いて一次線毛関連因子の発現についての免疫組織化学法を確立した。その結果、特定の組織において陽性像を示すことを確認した。

- ① ウレタンのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験：

死亡例は認められなかった。一般状態に明らかな変化は認められなかった。

体重は、高用量の2000 ppm投与群において投与20日

目以降から対照群に対し有意な減少が認められた。

摂水量は、投与3週目の300及び2000 ppm投与群において有意に低下した。摂水量から算出されたウレタン投与量の平均は、300 ppm : 82.9 mg/kg/day, 1000 ppm : 280.0 mg/kg/day, 2000 ppm : 555.7 mg/kg/dayであった。

血液生化学的検査では、対照群に対し2000 ppm投与群において有意なALTの増加、T-BIL, BUNの増加傾向、TGの減少傾向が見られた。

BALF上清を使用した生化学的解析では、対照群に対し2000 ppm投与群においてLDHの減少傾向、 μ -TPの有意な増加が認められた。

剖検では、肉眼的な異常所見は認められなかった。臓器重量では、対照群に対し2000 ppm投与群において心臓、肝臓、脾臓及び胸腺の有意な減少が見られた。相対重量では、対照群に対し2000 ppm投与群において脾臓及び胸腺で減少、肝臓では全被験物質投与群で減少、さらに肺では1000 ppm以上の投与群で有意な増加が見られた。

- ② アクリルアミドのマウスを用いた28日間反復投与毒性試験：

投与7日目以降に1000 ppm群で死亡例が認められ(2例)、投与9日目に同群の残動物の切迫解剖を実施した。投与14日目以降に500 ppm群で死亡例が認められ(1例)、投与21日目に同群の切迫解剖を実施した。250 ppmについては、最終的に28日間まで投与されたものの、対照群に対して明らかな体重減少並びに摂水量の減少が認められ、歩行異常など一般状態への影響も認められた。投与期間終了後の剖検において250 ppmでは、個体の消瘦、ストレスに関連すると考えられる胸腺の萎縮、脾臓、精囊及び前立腺の小型化が認められた。

これより本実験系では、アクリルアミド自体の毒性学的変化のみでなく、一般状態の悪化に伴うストレス性の変化が伴うと考えられたことから、一次線毛の発現を観察する条件を見出すため、新たに低用量群を追加設定した28日間試験を追加することとした。よって、病理組織標本作製以外の各種解析については一旦中断することとした。

- ③ マウス正常組織を用いた一次線毛の免疫染色系の確立：

下記の一次線毛に関連する因子に対する免疫組織化学染色法を確立し、検索した各種臓器における特定組織において陽性反応が見られた。

1) Acetylated Tubulin (Lys40)

α -チューブリンのK40残基のアセチル化は、正常な

微小管の特徴であり、正常な繊毛の免疫蛍光染色を行う際のコントロール実験にも選択される。 α -チューブリンのアセチル化残基はK40 (40番目のリジン残基) であり、 α -チューブリンアセチルトランスフェラーゼ (α -TAT) によって触媒される。後述のIFT88と併用して、繊毛の退縮を評価することが可能とされている。

本抗体を用いて検討したところ、脳 (海馬)、肺 (気管支上皮)、腎臓 (尿細管上皮)、心臓 (心筋細胞)、肝臓 (胆嚢上皮)、小腸 (上皮、筋層神経)、大腸 (筋層神経) で陽性所見が認められた。

2) IFT88 :

鞭毛内輸送タンパク質88 (別名: TG737、TTC10) は、線毛の形成に必要なIFT粒子の構成要素とされている。多くの生物において、IFT88はその他の分子モーターやIFT粒子と共に、一次線毛、運動性線毛、鞭毛の形成や維持に必須の重要なプロセスである線毛内輸送を仲介する。また、IFT88は、有糸分裂の際に紡錘体極に局在し、紡錘体の配向に必要とされている。IFT88の欠損は、進行性嚢胞の発生と両腎の肥大を特徴とする、多発性嚢胞腎を引き起こす。本因子は、免疫蛍光染色でIFT88抗体をアセチル化チューブリンと共に線毛の退縮を観察するマーカーとして利用されている。IFT88のシグナルが、繊毛の形状を可視化し、アセチル化チューブリンのシグナルが、微小管の長さを可視化していると報告されている。

本抗体を用いて検討したところ、脳 (海馬)、肺 (気管支上皮)、腎臓 (尿細管上皮)、心臓 (心筋細胞)、肝臓 (小葉中心部)、大腸 (粘膜基底部分、筋層・筋層神経) で陽性所見が認められた。

3) ADCY3 :

本遺伝子は、膜結合型酵素であり、二次メッセンジャーである環状アデノシンリン酸 (cAMP) の形成を触媒するアデニルシクラーゼ3をコードしている。本因子は、ヒトの様々な組織で広く発現しており、多くの生理的及び病態生理学的な代謝過程に関与している可能性があり、この遺伝子は、異なるアイソフォームをコードする2つの転写バリエーションが見つかっている。

本抗体を用いて検討したところ、脳 (海馬)、肺 (気管支上皮)、腎臓 (尿細管上皮)、心臓 (心筋細胞)、肝臓 (胆嚢上皮)、小腸 (粘膜上皮、筋層)、大腸 (粘膜上皮、筋層) で陽性所見が認められた。

4) ARL13B (別名: ARL2L1) :

Rasスーパーファミリーに属する低分子量繊毛Gタンパク質であり、繊毛に局在し、繊毛の形成やソニッ

クヘッジホッグシグナル伝達に必要とされる因子で、ARL13Bを標的とする抗体は線毛の標識に使用されている (PMID: 22072986)。ARL13Bの欠損は、小脳の異常を特徴とする常染色体劣性疾患であるジュベール症候群 (JBTS) を引き起こすことが知られている。

本抗体を用いて検討したところ、脳 (海馬) 及び肺 (気管支上皮) で陽性所見が認められた。

5. 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検討

① 一次線毛の分子基盤解析 :

蛍光ライブイメージングを用いて、ゼブラフィッシュの肝臓、尿細管、腸管、脳など、様々な組織における一次線毛の形態を観察することができた。今年度に作製した一次線毛をライブイメージングできるゼブラフィッシュを用いて、化学物質の暴露による一次線毛の形態変化を、様々な組織を対象に観察することができると考えられる。また、このゼブラフィッシュから得られる情報を、オルガノイドや齧歯類などの化学発がんモデルにおける一次線毛評価に活用できると考えられる。現在、肝臓と腎臓の発がん性があり、線毛への影響も報告されているオクラトキシンをゼブラフィッシュに暴露し、肝臓や腎臓の線毛の形態に与える影響を検討中である。

② オルガノイド評価系への応用 :

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。

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。

DU-145

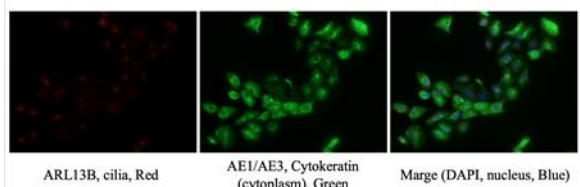


図4. DU-145におけるprimary ciliaの発現

Panc-1

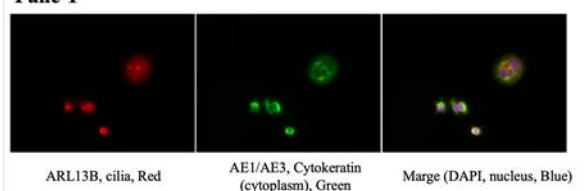


図5. Panc-1におけるprimary ciliaの発現

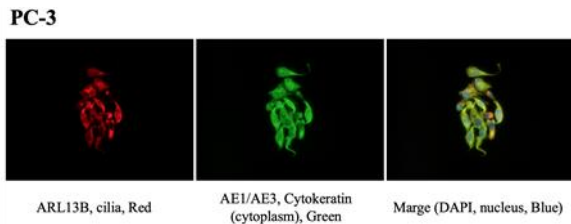


図6. PC-3におけるprimary ciliaの発現

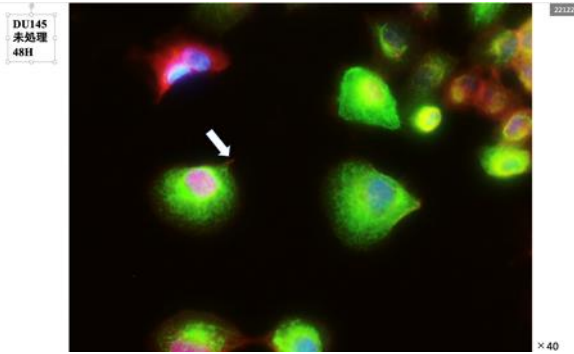


図7. DU-145におけるprimary ciliaの発現

D. 考察

1. マウスオルガノイドの継代・維持、化学物質暴露方法の条件検討

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、ドーム型の培養のほうが、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 $1\sim 5 \times 10^5$ 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は得られると考えられる。

酵素によるシングルセル化の方法については、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は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を使用するのがよいと考える。

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。

2. マウスオルガノイドを用いた一般毒性試験系構築

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 $10,000 \mu\text{M}$ (Ma Xら、Toxicol Lett、2016)を最高濃度として、1/64倍の $156.3 \mu\text{M}$ 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 $1,250 \mu\text{M}$ 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と関連するか、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 μ M濃度を低濃度群、その4倍量の10,000 μ M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 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。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異なり、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。また、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。

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

(1) DEN誘発肝腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

オルガノイドをDENで処置する段階、および処置後のオルガノイドをヌードマウス皮下への移植後の段階の各々で誘発・選択される遺伝子異常の中で、オルガノイドを用いたin vitro発がん試験系と、in vivoで同じDNA部位のSNPがあることを明らかにした。サンプル数が限られた中での結果であるため、追試が必要と思われるが、この結果は、オルガノイドを用いたin vitro発がん性試験が動物実験の代替法として用い得ることを示すデータである。今後DNA変異部位の詳細な解析を進め、関連遺伝子の機能との関連、発がんメカニズムの解明につながるよう、解析を進める予定である。

(2) ベンゾ[α]ピレン誘発肺腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

Trp53K0マウスとWTマウス各1匹に肺結節発生を確認した。WTは途中死亡、死後硬直ありの状態であったため、DNAの品質チェックを行い、WESに用いることが可能かを確認する必要がある。in vitro発がん性試験の有効性の確認、発がんメカニズム解明のために試料を揃えてin vivoとin vitroの比較を引き続き行う。

(3) in vitro 一般毒性試験法におけるエピゲノム解析のための検討

評価法のエンドポイントとなる指標の同定のため、エピゲノム変化領域を同定する。化学物質処理とエピゲノムの変化については不明な点が多いため、変化を精査するため、効率よくゲノムワイドにCpG領域のシーケンスを行うことが可能なRRBS法を用いる。本年度はウレタン処置の肺オルガノイドについてメチル化解析を行う予定であったが、継代毎の3回処置後72時間のタイムポイントではDNA量の不足が見込まれる結果となった。エピゲノムの変化は回復までの時間がかかると思われるため、72時間後ではなく、オルガノイドのサイズを大きくした後に回収して検出することもふまえて、次年度条件検討を引き続き行う。通常一般毒性の動物実験でのサンプリングは、投与後の回復が生じることを考慮して速やかに行われるため、処置後のサンプリングの時間を長くできるのであれば、エピゲノムを指標とする試験法を用いる利点ともなり条件検討が重要である。

4. In vivo毒性試験

陽性対照物質であるウレタンを用いたマウスin vivo毒性試験を実施し、標的臓器において毒性病変が惹起されることが確認された。さらに、一次線毛の発現を検出可能とする免疫組織化学染色を確立し、in vivo正常組織において線毛関連因子が種々の組織に発現していることが確認された。

5. 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検討

今年度で作製した一次線毛をライブイメージングできるゼブラフィッシュを用いて、化学物質の暴露による一次線毛の形態変化を、様々な組織を対象に観察することができると考えられる。

また、免疫細胞学的染色を用いて、既存の細胞株を使用した一次線毛の発現について解析したところ、前立腺癌細胞株の結果は、申請者らの先行解析の結果と同じであった。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細胞での発現が報告されており、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ため、細胞パネルに追加を考えている。

E. 結論

今年度は、本研究で共通に使用するマウス肝臓オルガノイド(STEMCELL Technologies, ST-70932)の維持・培養、化学物質暴露、細胞毒性試験法などに関する条件検討を実施し、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OGMを用いた培養方法で行うことで安定した培養状態を長期間維持できることがわかった。今後は、マウス肝臓オルガノイドを研究分担者に分与し、各施設において同一条件で維持を行いつつ、ウレタンなどの被検物質の暴露を開始する。一方、B6Jマウス由来の肺オルガノイドを用いた反復毒性試験法として、ウレタン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回繰り返した結果、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。今後は、幅広い被験物質の解析を可能とするために、使用するマウス系統や対象臓器を絞り込むなど、引き続き検

討が必要となる。また、in vitro 発がんDEN誘発肝腫瘍とin vitro DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較において、同じDNA部位のSNPが生じ、DEN処置オルガノイドを皮下に移植して生じた皮下増殖性病変や、肝腫瘍でそのSNPが濃縮されていることを明らかにした。この結果は、オルガノイドを用いたin vitro発がん性試験が動物実験の代替法として利用可能なことを支持するデータであり、今後DNA変異部位の詳細な解析を進め、関連遺伝子の機能との関連や発がんメカニズムの解明につながるよう解析を進める。In vivo毒性試験については、マウスを用いた毒性陽性対照物質の28日間投与毒性試験を実施し、明確な毒性学的変化が認められることを明らかにした。また、新たな毒性学的指標になり得る一次線毛の発現について、免疫組織化学的染色法を確立し、マウスの正常組織において一次線毛の発現を確認できた。今後は、マウス毒性試験より得られた病態組織において一次線毛の発現への影響を観察し、一次線毛発現への影響の有無が、新たな毒性指標となり得る可能性について追求する。さらに、化学物質暴露による一次線毛の形態変化を、様々な組織において評価できるゼブラフィッシュを作成したので、まずは既知物質を用いた一次線毛への影響を解析する。そして、細胞における一時線毛の発現解析法を確立し、DU-145細胞において一次線毛の発現が確認できたため、他の細胞でも解析を行い、線毛の発現に関する細胞パネルを作成し、オルガノイドについても一次線毛の発現解析を進める。

F. 健康危険情報

特になし

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. 35(9):1625-1630 (2022)
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: Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. In Vivo. 36(2):628-634 (2022)
3. 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(2): 713-725

- (2023)
4. 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(1): 25-35 (2023)
 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(1): 221 (2022)
 6. Ishigamori 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)
 7. Imai T, Hippo Y: Editorial: Development of *in vitro* toxicology methods using organoid systems and toxicogenomic approaches. Front Genet. 13: 1030580 (2022)
 8. 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): e202202632 (2022)
 9. 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)
 10. Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, Tamai Y, Shigefuku R, Hasegawa H, Hirokawa Y, Hayashi A, Okuno K, Matsushita Y, Nakatsuka T, Enokubo K, Sakaguchi K, Kobayashi Y, Yamaguchi T, Watanabe M, Takei Y, Nakagawa H: A new detection system for serum fragmented cytokinin 18 as a biomarker reflecting histologic activities of human nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol Commun. 6(8):1987-1999 (2022)
 11. Komada M, Nishimura Y: Epigenetics and Neuroinflammation Associated With Neurodevelopmental Disorders: A Microglial Perspective. Front Cell Dev Biol. 10:852752 (2022)
 12. Nishimura Y, Kurosawa K: Analysis of Gene-Environment Interactions Related to Developmental Disorders. Front Pharmacol. 10:3389 (2022)
- 2. 学会発表**
1. Totsuka Y. 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. Totsuka Y. 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)
 6. 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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. Totsuka Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer 13th ICEM (2022年8月オタワ・カナダ)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. 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 東京)ランチョンセミナー(株式会社新日本科学共催)

16. 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)
17. 成瀬美衣、石ヶ守里加子、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年9月 横浜)
18. 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：患者由来腫瘍がん細胞株におけるメラノコルチン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年9月 横浜)
19. 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年9月 横浜)
20. 今井俊夫；乳がんモデルを活用した予防研究. がん予防学術大会2022 KYOTO、第6回認定セミナー(2022年7月 京都)
21. 西村 有平 ゼブラフィッシュを用いた発達神経毒性評価の現状と課題 日本動物実験代替法学会第35回大会(2022年11月 静岡)

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