

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

In vivo と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援
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

本分担は、*in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援を目的とした。

本年度は、肝臓における代替法の検討として、肝線維化の AOP に作成支援のための組織学的基礎的データを得るとともに、培養細胞において、肝線維化関連因子の発現変動を解析したほか、正常または癌肝細胞において各脂肪酸の影響を評価した。

その結果、肝線維化モデル動物において SOX9 や CD44 発現が増加した。LX-2 細胞の TGFβ1 刺激では変化がみられなかったが、THP-1 細胞の LPS またはパルミチン酸刺激において SOX9 と CD44 の発現が上昇した。脂肪酸の影響では、本実験で使用した正常と腫瘍細胞株においては、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なる可能性が示唆された。

腸管に関する検討では、マウス、マウス空腸由来オルガノイド並びに Caco-2 細胞で、陽性物質である DSS の曝露により、早期からの MIP-2 の遺伝子発現増加が認められ、AOP の成立に寄与する可能性が示された。

以上、両実験系を通して動物モデルと *in vitro* 試験との相関性のある結果について、引き続き精査することにより、新たな毒性指標の開発へと繋がるものと考えられた。

A. 研究目的

本研究は、*in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援を目的として、肝臓および消化管を標的として以下の検討を行った。

肝臓における検討では、今年度は、肝障害、肝線維化の AOP 作成における基礎データ取得を目的とした。

肝線維化の検討として、肝線維化モデル動物の肝組織において特異的に発現する因子を検討し、さらに、肝線維化を誘導する種々の条件下での培養細胞において、それらの因子の発現変動を検討した。

肝障害の検討として化学物質による肝臓への影響を *in vitro* の実験系において評価することを目的とし、ヒト新鮮正常肝細胞ヒト肝癌由来細胞株を用いて各種脂肪酸曝露の影響を評価した。

腸管由来組織における代替法の検討として、今年度は、化学物質による腸管への影響を *in vitro* の実験系において評価することを目的とし、2次元培養として Caco-2 細胞を用い、3次元培養としてマウス空腸由来のオルガノイドを用いてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 曝露の影響を中心に評価した。

B. 研究方法

B-1. 肝線維化について、肝線維化モデル動物として、高度な線維化を誘発し得る非アルコール性脂肪性肝炎モデルであるコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食 (CDAA) を用いた。 雄性 F344 ラットならび C57BL/6J マウスに、それぞれに適した CDAA を 3 ヶ月与えて肝線維化を誘導した。病理組織切片を作製し、SRY-box9 (SOX9) および Cluster of Differentiation 44 (CD44) に着目して、免疫組織化学染色を行った。また、ヒト培養肝星細胞株 (LX-2) を TGF β 1 10ng/mL 48 時間刺激、あるいはヒト単球細胞株 (THP-1) を LPS 100 μ g/mL、パルミチン酸 250 μ M 24 時間刺激を行った際の SOX9 と CD44 の遺伝子発現について検討を行った。

肝障害について、新鮮ヒト肝細胞 PXB-cell と、ヒト肝癌由来細胞株 Huh7 を用い、各種脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸、エイジン酸、リノール酸、アラキドン酸、EPA、DHA) を 1-1600 μ M の濃度で 24 時間曝露し、WST-8 アッセイで細胞毒性を評価した。

B-2. 腸管由来組織における代替法の検討

B-2-1. DSS 誘発腸病変に対する背景メカニズムの検証

DSS (MP Biomedicals) を 7 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに 1.25, 2.5, 5.0% の濃度で 3 日から 2 週間飲水投与し、小腸及び大腸の病理組織学的解析、粘膜における炎症系ならびに細胞接着・機能に関する遺伝子発現解析を行った。対照群として、同様に溶媒を投与したマウスを用いて比較検討した。

B-2-2. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

正常 C57BL/6J マウスから作製した腸管オルガノイドに炎症を惹起させ、炎症関連

因子の変動について検証した。DSS で誘発された *in vivo* 実験より得られた成果をもとに、TNF α を起炎物質として検討した。実験は、通常のマウス由来腸管オルガノイドに TNF α を 0, 15, 30, 60 ng/mL の濃度で培地に添加し、0, 1, 3, 6, 24 時間後に培養組織を回収し、MIP-2 (IL-8 のマウスホモログ) の発現、細胞接着関連因子 (e-Cadherin, Tight junction protein-1 (Zo-1) への影響も解析した。

B-2-3. 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

DSS を通常培地 (DMEM: Low Glu に 10% 胎仔ウシ血清 (FBS)、1% 非必須アミノ酸溶液 (NEAA)、1% ペニシリン・ストレプトマイシン添加) にこれまでの検討から、1% 濃度 (w/v) で混じ、Caco-2 に 24 時間曝露した。蛍光免疫組織学的染色による観察を行うため、Cell culture slide (4-well タイプ) の各 well に Caco-2 を 1.3×10^5 cell/mL で播種した。培地は 400 μ L/well とした。2 日毎に培地交換を行い、約 2 ヶ月後に DSS を 1% の濃度で曝露した。DSS 処理後に 3% パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton-X100 で透過処理を行い、更に 1% FBS でブロッキング後、e-Cadherin Rabbit Polyclonal Antibody (ProteinTech) を添加し一晩処理し、Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) を反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 添加剤にて封入した試料について蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

マウスおよびラット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を使用して検討するなど、使用動物数の低減に努めた。さらに、腸管組織における検討においては、マウス回腸由来のオルガノイド培養組織を作製においてマウスを使用した、その使用は最少匹数に留めた。

C. 研究結果

C-1. SOX9 は、ラット・マウス共に、肝線維化に沿って著明な発現増加がみられた (図 1, 2)。マウス組織において種々の検討を行ったところ、SOX9 は Sirius Red 陽性部位と一致した。SOX9 は、活性化細胞星細胞である α -smooth muscle actin (α SMA) とは部分一致にとどまり、胆管上皮細胞である Cytokeratin 19 (CK19) との一致を認めた (図 3)。CD44 は、ラット CDAА において著明な遺伝子発現を示し、病理組織においては一部の胆管に陽性を示した。CD44 陽性胆管上皮周囲に、ヒアルロン酸結合タンパクの沈着を認めた (図 4)。一方、マウスの CDAА モデルにおいて CD44 は、マクロファージ様の細胞に著明な発現増加を認めた (図 5)。

LX-2 細胞においては、TGF β 1 の刺激でコラーゲン type1 および type4 の発現増加がみられたが、SOX9 および CD44 発現に変化はみられなかった (図 6)。THP-1 細胞において、LPS ならびにパルミチン酸刺激で TNF α の発現増加がみられ、SOX9 と CD44 は、LPS 刺激で発現の増加、パルミチン酸刺激で発現上昇傾向を示した (図 7)。

肝細胞の脂肪毒性評価において、PXB-cell と Huh7 では、飽和または一価不飽和脂肪酸の脂肪酸曝露による細胞毒性が生じる濃度は同程度であったが、多価不飽和脂肪酸は PXB-cell と比較して Huh7 の低濃度曝露で細胞毒性を示した (図 8)。

C-2. 腸管由来組織における代替法の検討

C-2-1. DSS 曝露によるマウス腸管への影響

DSS 投与により、試験期間中に、一般状態の悪化を呈する個体は安楽殺を施した。解剖時には腸管を摘出し、遺伝子発現解析並びに病理組織学的解析を行った。DSS_1.25%及び2.5%群では、2週間の試験期間中で瀕死個体や死亡個体が見られた一方で、大腸に明らかな病変を示さない個体も観察され、病態にばらつきが生じた。DSS_5%群では、投与3日で炎症パラメータの安定的な上昇が示され、投与7日によって大腸における明らかな炎症像を呈し、安定した病態発現が観察された。TNF α や IL1 β は、投与3日で顕著な発現上昇を示し、投与7日では投与3日と比較して減少傾向を示した。その一方で、MIP-2 や HMGB1 は投与3日から顕著な発現上昇を示し、投与7日でさらに増強した。以上のことから DSS_5%飲水投与が早期から安定した病態発現を誘導し、さらに炎症の増強に関与する因子が明らかとなった。病理組織学的に変化は見られなかったが、炎症関連因子として、MIP-2 (CXCR2) の遺伝子発現が顕著に増加することが見出された (図 9)。

C-2-2. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

TNF α 添加後1時間から MIP-2 の遺伝子発現は濃度依存的に増加した。DSS のいずれの濃度においても MIP-2 発現は TNF α 添加後1時間をピークとして24時間まで徐々に減弱した (図 10)。さらに、TNF α 添加後の e-Cadherin の免疫組織化学染色において、粘膜における染色性の低下が濃度依存的に認められた (図 11)。

C-2-3. 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

2週間 Pre 培養し 24 時間 DSS を培地に添加したところ、1%では細胞培養の状態に Control と明らかな差は見られなかったが、e-Cadherin の免疫組織化学染色では、細胞間の陽性部位における染色性の減弱が認められた (図 1 2)。

D. 考察

D-1. ラットおよびマウス CDAA モデルの組織学的検討により、SOX9 は線維上に著明に発現し、それは CK19 との一致を認めたことから、細胆管反応とよばれる現象が、従来からの活性化星細胞に加えて重要である可能性が示唆された。CD44 もラットにおいては胆管上皮細胞に発現がみられ、その周囲にヒアルロン酸結合タンパクが存在していたことより、胆管上皮細胞を介した肝線維化に寄与していると考えられた。一方で、マウスにおいてはマクロファージ様の細胞に発現がみられたため、同じげっ歯類においても、ラットとマウスでは発現様式が異なる可能性が示唆された。培養細胞において、SOX9 と CD44 は、LX2 を強力に活性化する TGFβ1 刺激には発現変動に関与せず、THP-1 への TLR4 を介した炎症性刺激において、発現の上昇が示唆された。

正常または腫瘍肝細胞における脂肪毒性に対する評価において、前年度と異なる細胞株で実験を実施した本年度も、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なることが明らかとなった。今後、その機序について精査する予定である。

D-2. 腸管由来組織における代替法の検討

腸管由来組織における動物実験代替法の確立を目的として、今年度はマウスへの DSS 投与の実験条件の最適化、分子病理学

的な病態プロファイルを解析した。さらに、*in vitro* の検討では、上記の *in vivo* 実験系から見出された炎症系関連遺伝子発現の変動より、TNFα をオルガノイド組織に添加した後に IL-8 のマウスホモログである MIP-2 の発現が急性期から濃度依存的に顕著な増加を示すことを見出した。これは、DSS 投与によりマウス腸上皮で認められた変化が *in vitro* オルガノイド実験系においても検証されたことを示すものと考えられた。さらに、腸管由来の株化細胞 Caco-2 を用いた 2 次元培養による検討では、昨年度までの先行研究に基づき陽性対照物質として DSS 1%濃度で検討した。DSS 1%曝露では、形態的に細胞の離開や、毒性が生じていないと考えられたが、本濃度において、細胞接着関連因子の変動が観察され、e-Cadherin, ZO-1 の発現が減弱した。これより粘膜上皮細胞のバリア機構に影響するという DSS が有する *in vivo* 試験における毒性兆候が、Caco-2 の 2 次元培養条件下においても検証されたものと考えられた。

以上、腸管関連のいずれの実験系においても DSS の曝露により炎症病態に先立ち MIP-2 遺伝子の発現が増加すること、炎症に起因して細胞接着関連因子が低下することが明らかとなった。これらの知見は *in vitro* 腸管毒性評価の確立に向け新たな AOP 確立にも寄与する成果となり得るものと考えられた。

E. 結論

本研究により、肝臓・腸管由来組織における動物実験代替法の確立に向けた検討を 2 次元培養ないし 3 次元培養条件下で実施し、それぞれ、代替法の開発に資する基礎的情報を得た。今後は、実験条件の精査や *in vivo* 試験で得られる結果との比較検討を進めると共に、表現型の背景メカニズムの

解析を充実させ、具体的な代替法開発に取り組み予定である。さらに、本研究を emergency technology にあたる人体模倣システム (MPS) の開発にも発展させたいと考えている。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Uno K, Miyajima K, Ogawa S, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D. Effects of *Siraitia grosvenorii* extract on nonalcoholic steatohepatitis-like lesions in Sprague Dawley rats fed a choline-deficient, methionine-lowered, l-amino acid-defined diet. *J Toxicol Pathol.* 2023 Jan;36(1):1-10.
2. Uno K, Miyajima K, Toma M, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D. CD44 expression in the bile duct epithelium is related to hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis rats induced by a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid diet. *J Toxicol Pathol.* 2022 Apr;35(2):149-157.

F-2 学会発表

1. 宇野 絹子, 美谷島 克宏, 当摩 茉莉花, グエン ハン ニユン, 煙山 紀子, 中江 大胆管上皮細胞におけるCD44発現のNASH肝線維化への寄与, 第49回日本毒性学会学術年会, 2022年6月30日～7月2日, 札幌コンベンショナルセンター.

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

図 1. ラット組織における SOX9 免疫組織化学染色

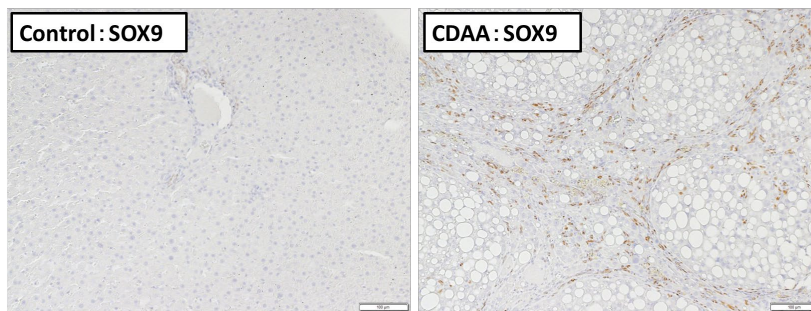


図 2. マウス組織におけるSOX9免疫組織化学染色

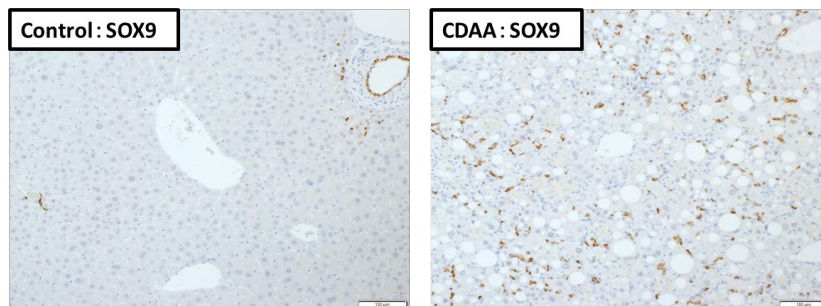


図 3. マウス組織におけるSOX9二重染色

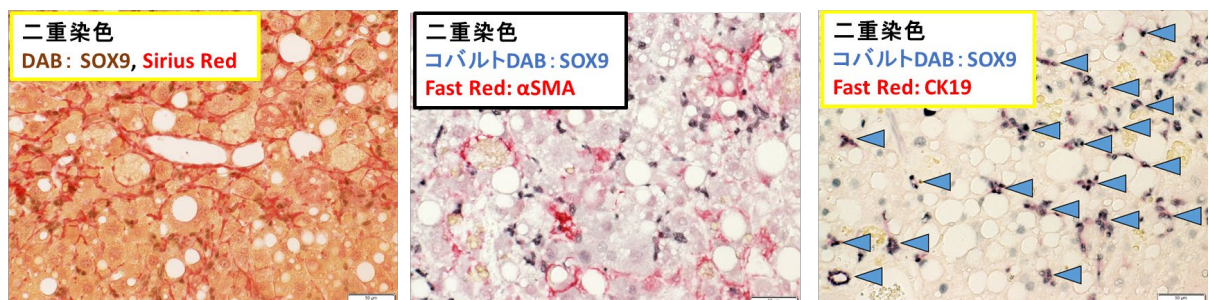
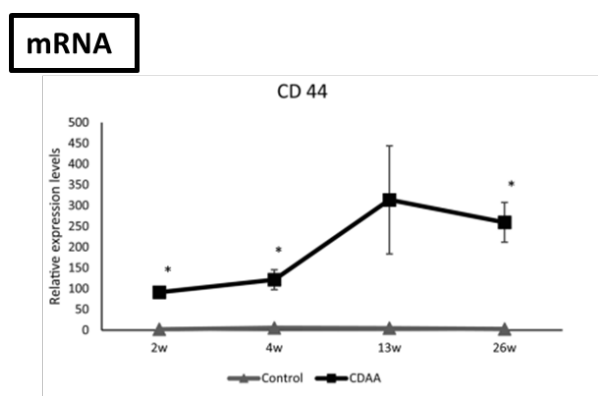


図 4. ラット組織におけるCD44発現



ラット組織におけるCD44発現

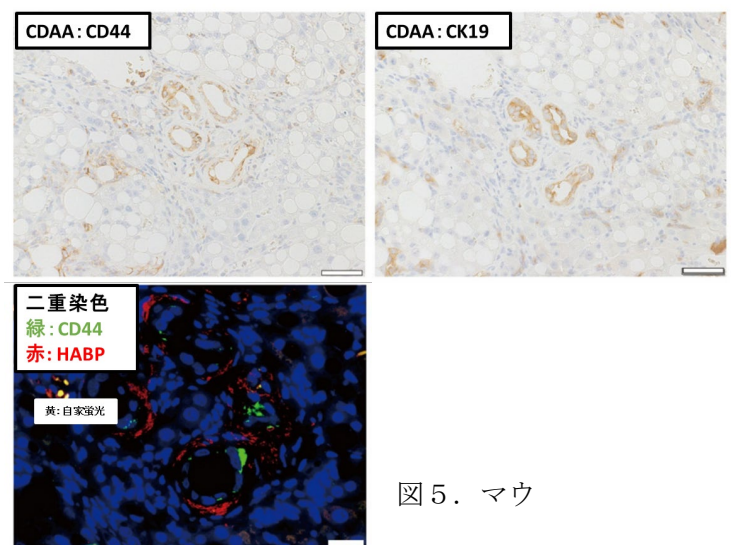


図 5. マウ

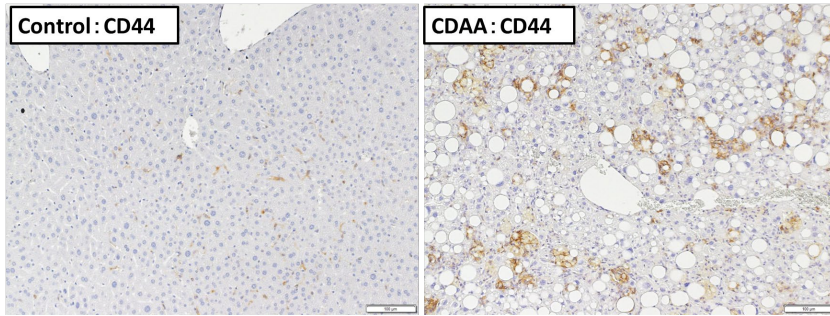


図6. LX2細胞におけるSOX9, CD44発現

SB431542 2 μM 2時間→TGF-β1 10 ng/mL 48時間

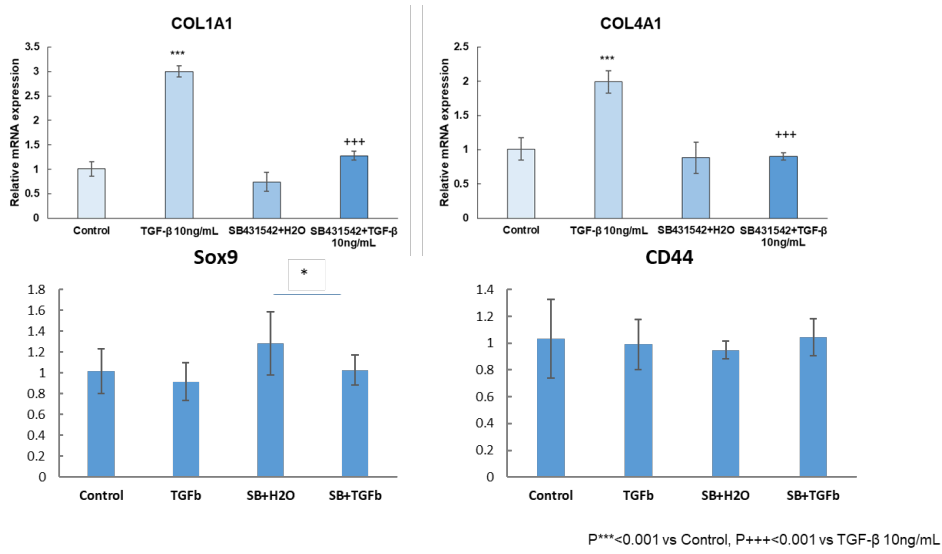


図7. THP-1細胞におけるSOX9, CD44発現

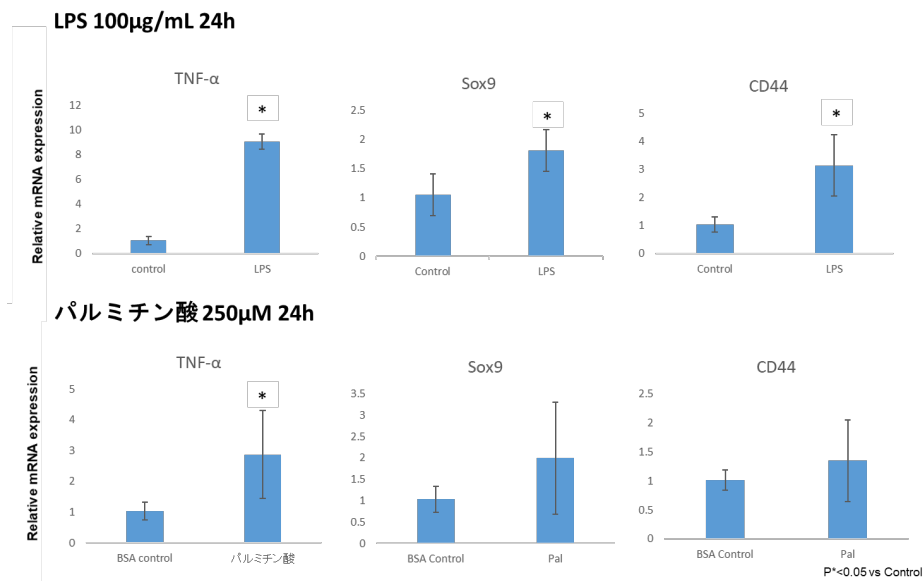


図8. 肝細胞の脂肪毒性評価

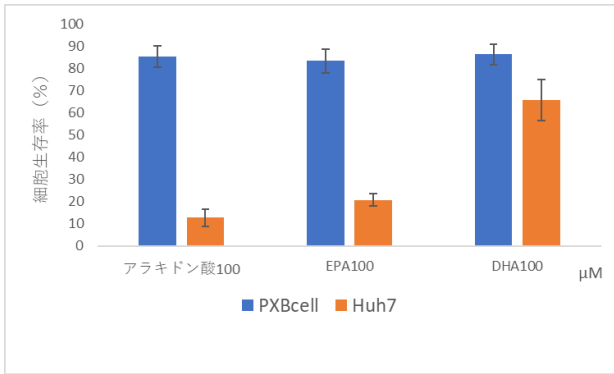


図9. 大腸の炎症関連遺伝子発現

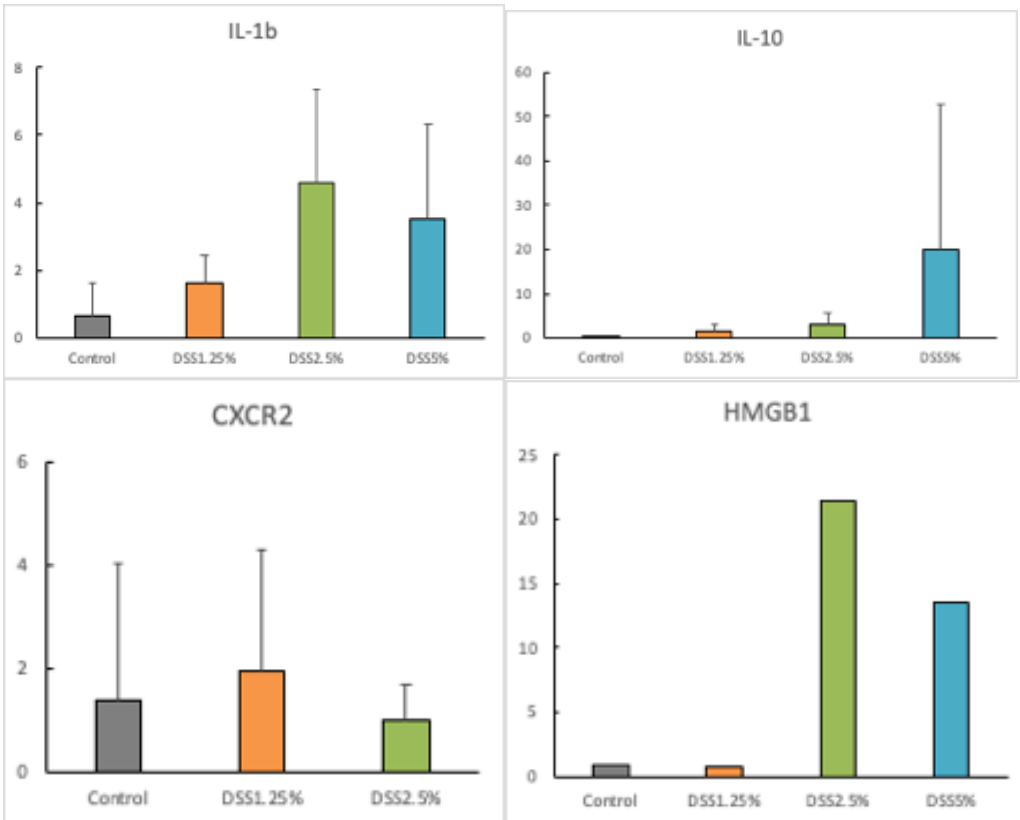


図10. マウス腸管由来オルガノイド MIP-2の遺伝子発現

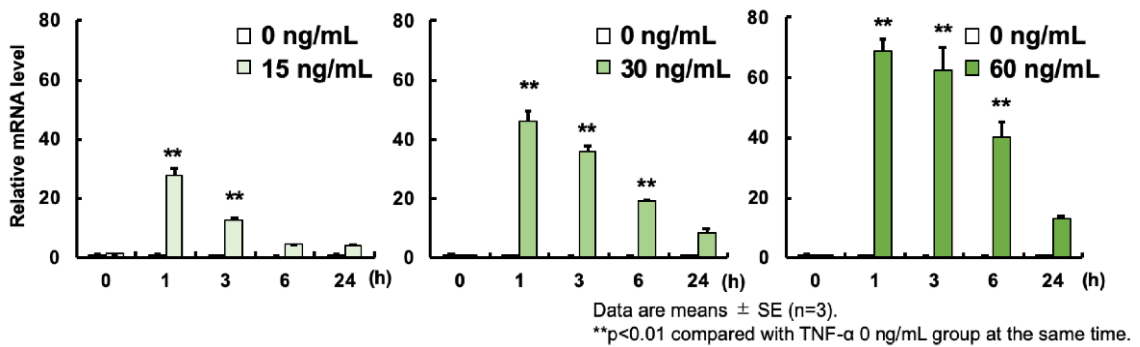


図 1 1. マウス腸管由来オルガノイド e-Cadherin の免疫組織化学染色

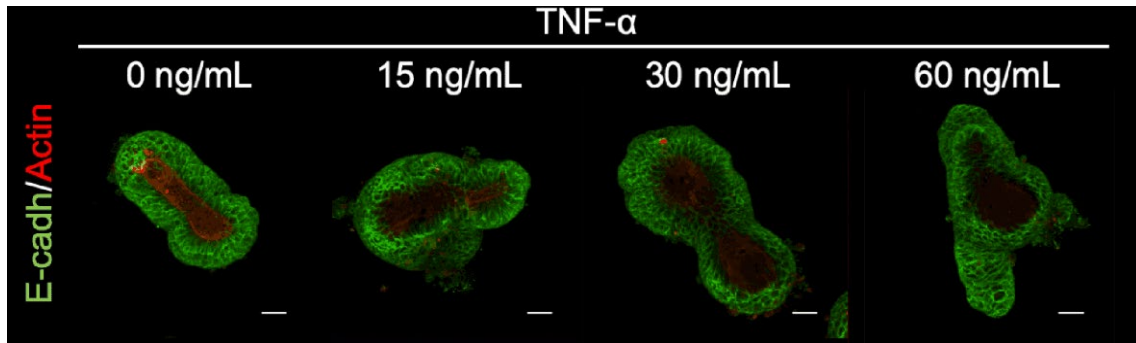
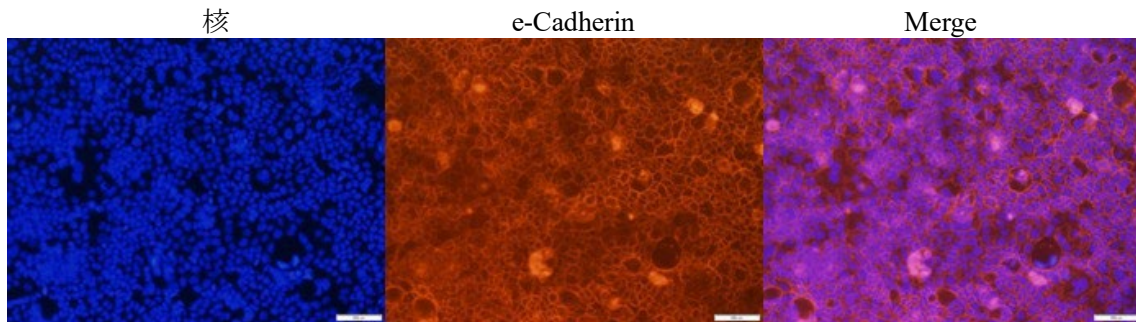


図 1 2. Caco-2細胞 e-Cadherinの免疫組織化学染色

Control



DSS 1%

