

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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

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。まず、マウス肝臓由来オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) を用い、化学物質の暴露実験を行った。今回使用した化学物質は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)、クマリリン (CMR) で、培地中に化学物質を添加し 24 時間暴露させた後、シングルセル化し、トリパンプルーによる生細胞計測法を用いて評価を行った。その結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認できた。化学物質暴露実験の結果より各化学物質の暴露濃度を決定し、複数回暴露実験を行った。連続して 3 回、オルガノイドに化学物質を暴露した後、オルガノイドの形態変化（細胞肥大、核肥大、核の変形、多核、核の淡明化、核の凝集、細胞の空胞化）の観察を行った。その結果、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。

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、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 および CMR は、毒性の発現には肝臓の薬物代謝酵素により代謝されることが必要であるが、本実験で使用した肝オルガノイドは幼若細胞であることから、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。しかしながら、単回曝露実験においてはいずれの化学物質曝露においても、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で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おり、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。

今後、成熟肝細胞へと分化させたオルガノイドを用いて同様の検討を実施するとともに、同化学物質を反復投与したマウス肝臓組織に観察される形態変化との比較を行う。また、化学物質により誘発される遺伝毒性の評価や遺伝子発現解析についても検討を行う予定である。

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及び既知の変異原性物質を用いて、①化学物質の暴露濃度の検討②複数回暴露実験を行った。

B. 研究方法

マウス肝臓由来オルガノイド(STEMCELL Technologies, ST-70932)の化学物質暴露実験を行った。

①化学物質暴露実験：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)を用いて暴露実験を行った。ドーム型培養法を用い、細胞を播種した2時間後から培地中最終濃度を236, 472, 943 μ M(PB)、25, 50, 100 mM(EC)、125, 250, 500 μ M(MCT)、50, 100, 200 μ M(CMR)として24時間暴露後、トリプシンを用いてシングルセル化し、トリパンブルーによる生細胞計測法を用いて評価を行った。

②複数回暴露実験：PB, EC, MCT, CMRを連続して3回暴露を行った。ドーム型培養法を用い、細胞を播種したのち3日間培養し1回目の暴露を行った。化学物質を培地中最終濃度で236, 943 μ M(PB)、25, 100 mM(EC)、125, 500 μ M(MCT)、50, 200 μ M(CMR)とした。24時間暴露後、培地を除去、洗浄したのち新しい培地を添加した。3日間培養したのち再度細胞を播種し、3日間培養したのち2回目の暴露を行った。24時間暴露後、培地を除去し洗浄したのち新しい培地を添加して6日間培養した。培養後3回目の暴露を行った。24時間暴露後、培地を回収、洗浄後セルリカバリーソリューション(Corning®)を用いてマトリゲルを除去して細胞を回収した。

複数回暴露実験を行った細胞を用いて切片を作成しHE染色後、顕微鏡を用いてオルガノイドを形成する細胞の形態変化の観察を行った。形態変化した細胞数を全細胞数で割って割合を求めることで評価した。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)して比較した。

C. 研究結果

①化学物質暴露実験：ドーム型培養法でPB, EC, MCT, CMRを暴露した24時間後の細胞毒性についてトリパンブルーによる生細胞計測法を用いて評価した結果、下図の結果が得られた。各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が低下した。

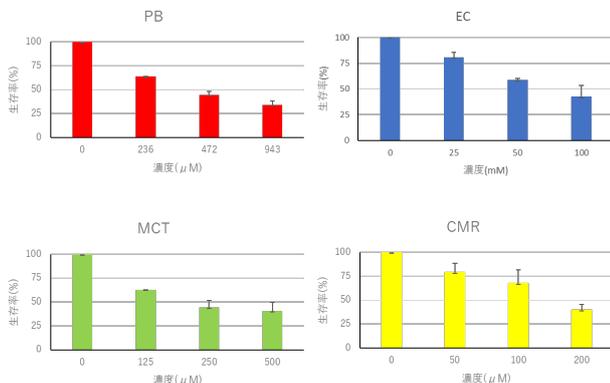


図1. 化学物質暴露による細胞毒性試験

②複数回暴露実験：複数回暴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2-1~2-7に示すものを形態変化として捉えた。

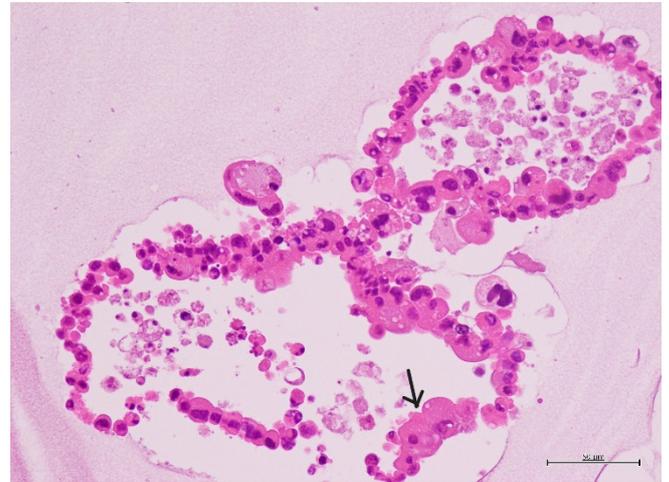


図2-1. 細胞肥大

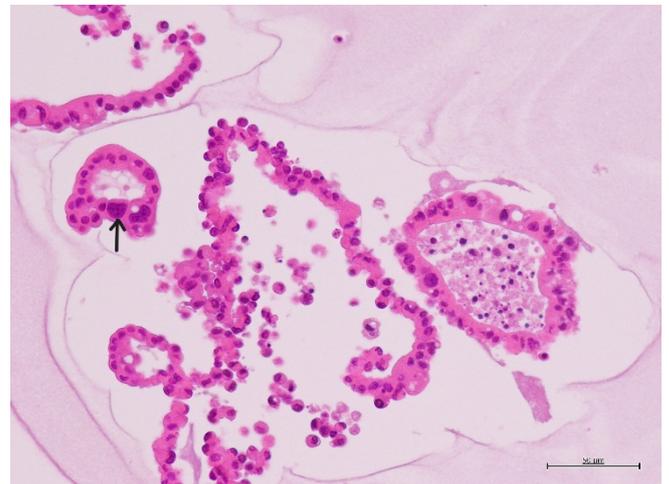


図2-2. 核肥大

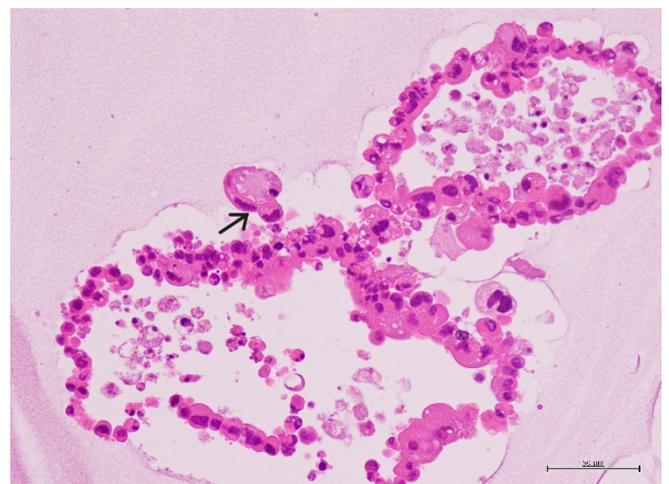


図2-3. 核の変形



図 2-4. 多核

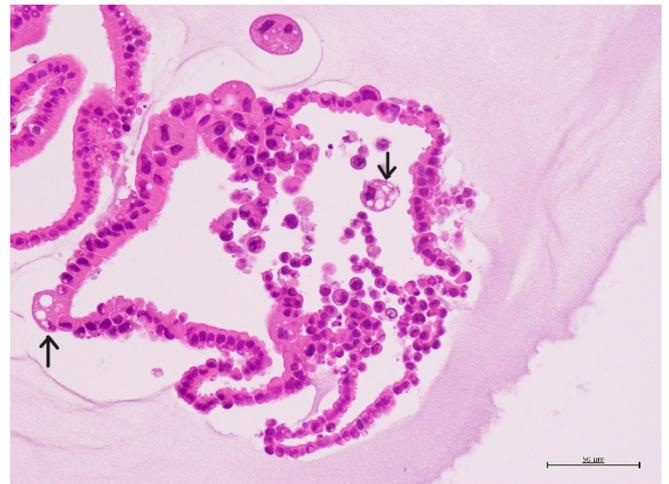


図 2-7. 空胞



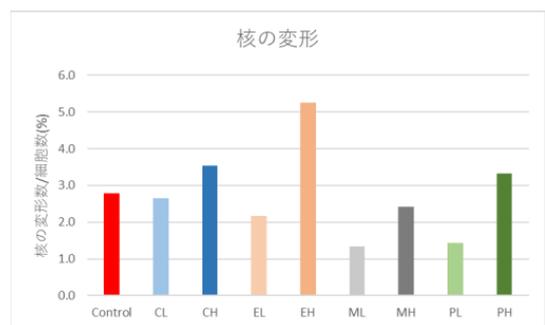
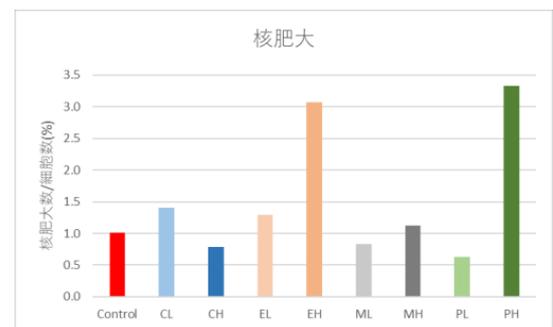
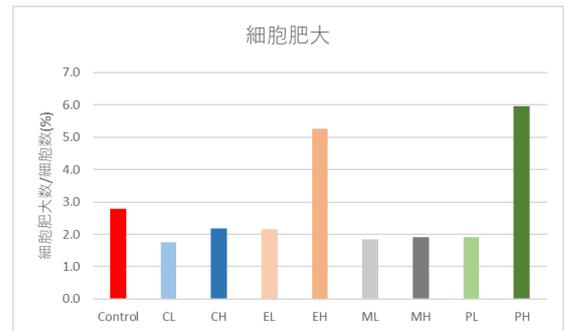
図 2-5. 核の淡明化

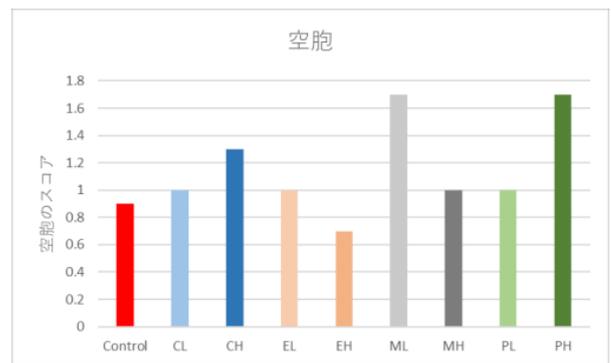
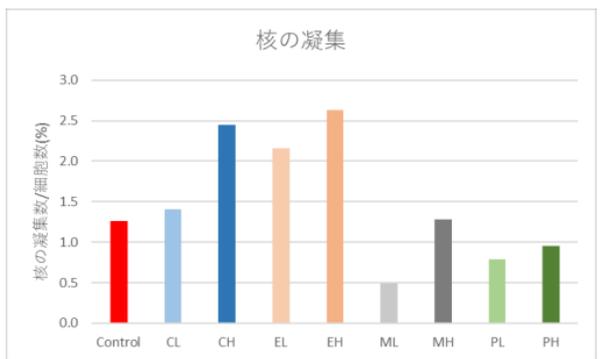
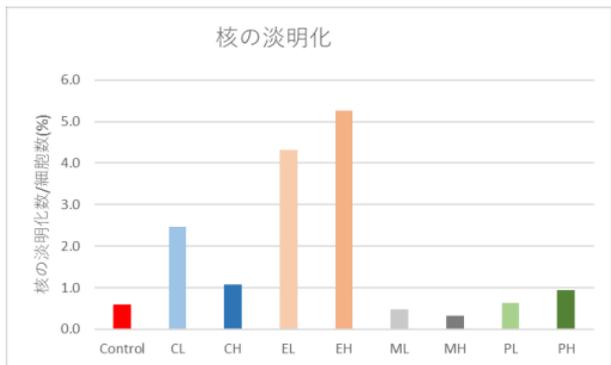
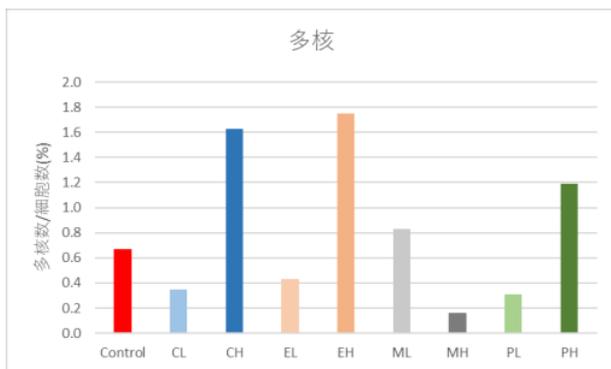


図 2-6. 核の凝集

上記の図 2-1～2-6 までの各形態変化を有する細胞数を全細胞数で割った結果を図 3 に示す。

図 3. 形態変化を示した細胞の割合の比較





これら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。

図 3. 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 4 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するため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 4. 空胞化を有する細胞スコアの比較

D. 考察

化学物質単回曝露実験は、PB, EC, MCT, CMR を用いて行った。結果より濃度依存的に細胞生存率の低下が確認された。また、IC50 はそれぞれ 448 μ M (PB)、76mM (EC)、279 μ M (MCT)、140 μ M (CMR) となった。この結果から複数回曝露に使用する濃度を 236, 943 μ M (PB)、25, 100 mM (EC)、125, 500 μ M (MCT)、50, 200 μ M (CMR) とした。

一方、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。

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-エポキシマリニン(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ることから、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。しかしながら、単回曝露実験においてはいずれの化学物質曝露においても、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で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おり、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。

今後、成熟肝細胞へと分化させたオルガノイドを用いて同様の検討を実施するとともに、同化学物質を反復投与したマウス肝臓組織に観察される形態変化との比較を行う。また、化学物質により誘発される遺伝毒性の評価や遺伝子発現解析についても検討を行う予定である。

E. 結論

マウス肝臓オルガノイドに4種の化学物質(PB, EC, MCT, CMR)を24時間曝露させた結果、濃度依存的に細胞生存率が低下した。一方、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。

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ピニルエポキシドへの代謝活性を受け、カルバミン酸ピニルエポキシドは、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およびCMRは、毒性の発現に肝臓の薬物代謝酵素により代謝されること

が必要であるが、本実験で使用した肝オルガノイドは幼若細胞であることから、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。しかしながら、単回曝露実験においてはいずれの化学物質曝露においても、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で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おり、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。

今後、成熟肝細胞へと分化させたオルガノイドを用いて同様の検討を実施するとともに、同化学物質を反復投与したマウス肝臓組織に観察される形態変化との比較を行う。また、化学物質により誘発される遺伝毒性の評価や遺伝子発現解析についても検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, 2024.

2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)

9. **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)
10. **Totsuka Y.** Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS(2023年9月、シカゴ・米国)
11. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆ加里**. 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)

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。