

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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
令和5年度 分担研究報告書

毒性評価・ゲノム発現解析
研究分担者 藤岡 正喜
大阪公立大学大学院医学研究科 分子病理学 特任講師

研究要旨

化学物質の安全性評価には動物実験が必要とされるが、動物愛護の観点から代替法の開発が求められている。本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 in vitro 有害性評価方法の開発を目指した。マウス肝臓オルガノイドに対してフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンを用いて研究を実施した結果、4物質で共通して発現変動がみられた9つの遺伝子が同定された。そのうち、非肝発がん物質で発現変動がみられなかった5つの遺伝子(*C1s*, *Ighv5-12*, *Or9i14*, *Scgb2b27*, *Vmn1r195*)は、本研究で用いられた肝発がん物質に特異的な変動を示すことが明らかになった。さらに、ネットワーク解析の結果、肝発がん物質に共通する上流因子として HNF4A が同定された。Tox Function 解析の結果、肝発がん物質では Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測されたことから、炎症に起因する疾患に関連する機能の亢進が示唆された。以上より、化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、肝発がん物質に共通する発現変動遺伝子が同定された。

A. 研究目的

マウス肝臓オルガノイドに化学物質をばく露し、その遺伝子発現変化について検討することで、化学物質の毒性の有無およびその機序について予測可能かどうか、検討を行った。

B. 研究方法

[材料と方法]

本研究で使用した被験物質について、下記に記す。非遺伝毒性肝発がん物質

・ Phenobarbital Sodium (PB) (CAS RN : 57-30-7)
遺伝毒性肝発がん物質

・ Coumarin (CMR) (CAS RN : 91-64-5)
・ Monocrotaline (MCT) (CAS RN : 315-22-0)

遺伝毒性非肝発がん物質

・ Ethyl Carbanate (EC) (CAS RN : 51-79-6)

なお、培養細胞として Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies) を使用し、液体培地として CultureSur® Y-27632 および ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた HepatiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse) (STEMCELL Technologies) を使用した。

[被験物質の投与]

マウス肝臓オルガノイドに対して、対照群、低用量群、高用量群の3用量設定した。具体的には、PBSで溶解した Phenobarbital Sodium を最終濃度 0, 236uM, 938uM、Dimethyl Sulfoxide (DMSO) で溶解した Coumarin を最終濃度 0, 50uM, 200uM、DMSOで溶解した Monocrotaline を最終濃度 0, 125uM, 500uM、DMSOで溶解した Ethyl Carbanate を最終濃度 0, 25mM, 100mM でそれぞれ添加し、mRNAを回収した。

[網羅的遺伝子発現解析]

回収したマウス肝臓オルガノイド由来mRNAのうち、対照群および高用量群をそれぞれ用いて(計8検体)、

Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Expression Console™ を用いて、数値化および正規化を行った。アルゴリズムは、SST-RMA を用いた。Annotation Level は、(Exon Level ではなく) Gene Level とした。得られた遺伝子発現パラメータを用いて Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて、パスウェイ解析及び各被験物質ばく露による影響について検討を行った。加えて、網羅的遺伝子発現解析の結果を用いて、これまで鱈淵班研究(厚生労働科学研究(H29-R1およびR2-R4))にて構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルおよび非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルによる判定が可能かどうか検討を行った。

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

網羅的遺伝子発現解析の結果(表1)、PB投与において発現量比1.50以上の遺伝子は83、0.66以下の遺伝子は228であった。同様に、CMR投与において発現量比1.50以上の遺伝子は187、0.66以下の遺伝子は132であった。またMCT投与において発現量比1.50以上の遺伝子は108、0.66以下の遺伝子は186であった。EC投与において発現量比1.50以上の遺伝子は261、0.66以下の遺伝子は544であった。IPAソフトウェアによるTox Functions結果、肝発がん物質(PB, CMRおよびMCT)で共通して活性化が予測され、かつ遺伝毒性非肝発がん物質(EC)において不活性化が予測された機能として、Hepatic stosis, Conjugation of glutathioneが挙げられた。さらに、肝発がん物質(PB, CMR, MCT)で共通して発現変動がみられた遺伝子として、*C1s*, *Fabp2*, *Gm20826*, *Ighv5-12*, *Mir3079*, *mir-467*, *Or9i14*, *Scgb2b27*, *Vmn1r195*の9つが同定された(表2)。そのうち、非肝発がん物質(EC)で発現変動がみられなかった、すなわち本研究に用いた3つの

肝発がん物質特異的な変動を示した遺伝子として、*C1s*, *Ighv5-12*, *Or9i14*, *Scgb2b27*, *Vmn1r195*が同定された。さらに共通変動遺伝子でネットワーク解析した結果、肝発がん物質共通上流因子としてHNF4A (hepatocyte nuclear factor 4A)が同定された(図1)。

鰐淵班研究で構築された遺伝毒性肝発がん物質検出モデルおよび非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルにて、検討を試みた結果、4物質いずれもNegativeの結果となった。

表1 網羅的遺伝子発現解析の結果

物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数	
遺伝毒性肝発がん物質	モノクローリン (MCT)	1.50 以上	108
		0.66 以下	186
クマリン (CMR)		1.50 以上	187
		0.66 以下	132
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	83
		0.66 以下	228
遺伝毒性非肝発がん物質	カルバミン酸エチル (EC)	1.50 以上	261
		0.66 以下	544

表2 肝発がん物質 (MCT, CMR, PB) 特異的に発現変動がみられた遺伝子

Symbol	Entrez Gene Name	Expr Log Ratio (MCT C vs H)	Expr Log Ratio (CMR C vs H)	Expr Log Ratio (PB C vs H)
C1S	complement C1s	-0.888	-0.641	-1.021
Ighv5-12	immunoglobulin heavy variable 5-12	-0.724	0.607	-0.74
Or9i14	olfactory receptor family 9 subfamily I member 14	-0.828	-0.843	-0.851
Scgb2b27	secretoglobulin, family 2B, member 27	-0.806	0.988	-0.78
Vmn1r195	vomeranosal 1 receptor 195	-0.876	0.709	-0.923

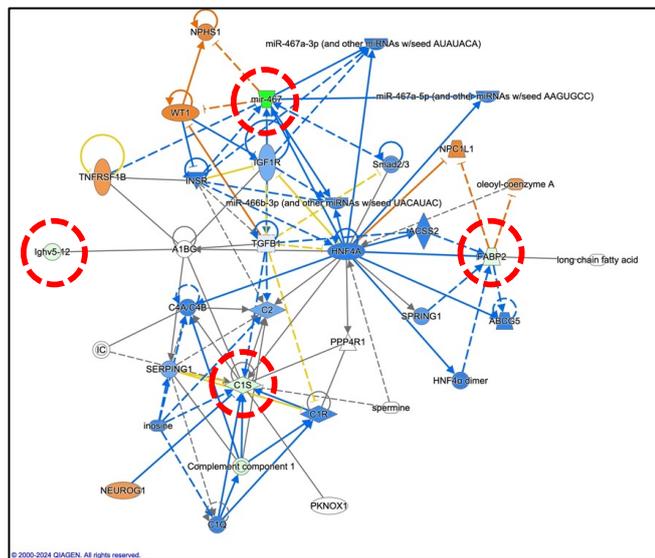


図1 肝発がん物質共通変動遺伝子のネットワーク解析による上流因子の探索結果

D. 考察

本研究では、マウス肝臓オルガノイドに対して非遺伝毒性肝発がん物質 1 種、遺伝毒性肝発がん物質 2 種および遺伝毒性非肝発がん物質 1 種の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較

解析を行った。その結果、肝発がん物質特異的に Hepatic Steatosis などの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかになった。今後、マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞との共培養系を用いることで、例えば肝細胞と肝星細胞との相関や肝細胞とクッパー細胞との相関など、より生体を模倣した影響が評価できると期待される。これまでに鰐淵班研究で構築された遺伝毒性肝発がん物質検出モデルおよび非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルにて、検討を試みた結果、4 物質いずれも Negative の結果となった点については、構築したモデルはラットの遺伝子発現データを元に構築されていることから、本オルガノイドの背景動物であるマウスとの発がん感受性や代謝経路などの違いが今回の結果となったと考えられる。今後、ラットにおける同じ化学物質に曝露した際の発現データと本オルガノイドにおける発現データをそれぞれ比較することで、モデルの最適化を検討する。

E. 結論

本研究により、化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、肝発がん物質に共通して発現変動がみられた遺伝子が同定された。今後、同定された遺伝子について、定量的PCR法による発現の確認および用量相関性について、検討を行う。加えて、今回得られた遺伝子発現パラメータを用いて数理モデルを構築することで、遺伝毒性・肝発がん性未知の化学物質に対する毒性スクリーニング法の構築を試みる。また、マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞共培養系における化学物質のばく露影響について、遺伝子発現変化を指標として検討することで毒性影響の有無および機序の予測が可能か試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Vachiraarunwong A., Gi M., Kiyono T., Suzuki S., Fujioka M., Qiu G., Guo R., Yamamoto T., Kakehashi A., Shiota M., Wanibuchi H., Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells, *Archives of Toxicology*, 2024, doi: 10.1007/s00204-024-03750-1.
- Gi M., Suzuki S., Kanki M., Yokohira M., Tsukamoto T., Fujioka M., Vachiraarunwong A., Qiu G., Guo R., Wanibuchi H., A Novel Support Vector Machine-Based One-Day, Single-Dose Prediction Model of Genotoxic Hepatocarcinogenicity in Rats, *Archives of Toxicology*, 2024, doi: 10.1007/s00204-024-03755-w.
- 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*, 2024, 14(1), 36.
- Imai K., Niwa R., Fujioka M., Ito K., Understanding

the quality and safety of food production through the lens of The Microbiome of The Built Environment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2023, 0, 1-6.

- 5 Yamamoto T., Gi M., Yamashita S., Suzuki S., Fujioka M., Vachiraarunwong A., Guo R., Qiu G., Kakehashi A., Kato M., Uchida J., Wanibuchi H., DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. *Cancers*, 2023, 15(21), 5274.
- 6 Suzuki S., Gi M., Fujioka M., Kakehashi A., Wanibuchi H., Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicology letters*, 2023, 384 128-135.
- 7 Yamamoto S., Kato M., Takeyama Y., Azuma Y., Yukimatsu N., Hirayama Y., Otsu T., Yamasaki T., Fujioka M., Gi M., Wanibuchi H., Uchida J., Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. *British journal of cancer*, 2023, 128(12) 2197-2205.

- 8 Yamaguchi T., Gi M., Fujioka M., Suzuki S., Oishi Y., Wanibuchi H., A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *Journal of toxicologic pathology*, 2023, 36(2) 123-129.

- 9 Yokota Y., Suzuki S., Gi M., Yanagiba Y., Yoneda N., Fujioka M., Kakehashi A., Koda S., Suemizu H., Wanibuchi H., o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*, 2023, 488 153483-153483.

2. 学会発表

該当なし

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