

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
オルガノイド培養・エピゲノム変異解析
研究分担者 成瀬 美衣 国立がん研究センター研究所 研究員

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。

私たちはこれまでに、マウス正常組織由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、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。さらに、化学物質による毒性・発がん性は共存する免疫系細胞や間質細胞等の影響を受けることが知られていることから、それらの細胞群とオルガノイドとの共培養による生体微小環境の構築を目的とした試験系の樹立にも取り組んでいる。またオルガノイドを用いてゲノムワイドなメチル化解析を行い、メチル化解析におけるオルガノイドの有用性を示してきた。

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、またエピゲノム変化評価系の構築を目指す。本年度においては肺オルガノイドを用いてウレタン処置によるエピゲノム変化の解析を RRBS 法により行った。

A. 研究目的

肝臓をはじめとしたマウス正常組織由来オルガノイドを用いた in vitro 化学物質評価系の構築を行い、安全性評価の動物実験代替法の導入の実現を目指す。また、評価過程で、オルガノイドの形態的变化、エピゲノム変化の検出を行い、評価法のエンドポイントとなる新規の指標を決定する。

B. 研究方法

マウス臓器由来オルガノイドに化学物質を反復曝露した後、病理組織的な変化、エピゲノム変化、遺伝子発現変化を同定し、in vitro 一般毒性試験法における指標を探索する。

(1) オルガノイドへのウレタン(エチルカルバメート)処置

昨年度までに樹立したC57BL/6J背景p53(+/-)マウスの肺オルガノイドを融解、培養を行い使用した。オルガノイドはAccutase処置により細胞を分散させ、さらに40 μ mのフィルターを通し、細胞数測定を行い、マトリゲル(Corning)をゲル状にしてひいた12well plateに 1×10^5 細胞/well播種した。2時間静置後、対照群(0 mM)、低用量(2.5mM)、高用量(10mM)を50 μ g/mlのS9 mixと共に添加し、5%CO₂, 37度のインキュベーターで24時間処置した。24時間後、化学物質を含む培地を除去し、マトリゲルを被せて培養した。これを1週間に一度3回繰り返した。ウレタンの濃度については、昨年度の分担研究から得られた結果を用いた。メチル化解析、発現解析用、形態解析用に、1回目、2回目、3回目処置後から72時

間後にオルガノイドを回収した。

(2) ウレタン処置オルガノイドのメチル化解析

ウレタン3回目処置後(0mM, 2.5mM, 10mM, 各N=2)96時間のオルガノイドをCell Recovery Solutionによりマトリゲルを溶解し、細胞塊として回収しDNA抽出を行った。メチル化解析はRRBS法(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)を用いた。DNAを精製し、制限酵素MspIによる制限酵素消化を行い、フラグメントのサイズ選択を行うことでCpGの豊富な領域を選択したものをパイサルファイト処理し、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR増幅したものを、次世代シーケンスを行い、Bismarkを用いたアライメント及びMethylKit Analysisによるメチル化解析を行い、対照群に対するメチル化率の変化の同定を行った(q-value<0.01, % methylation difference >25%)。同定した候補はIGV(Intergrative Genomics Viewer)を用いて確認を行った。

(3) ウレタン処置オルガノイドの発現解析

メチル化解析と同様のサンプルでRNA抽出を行い、Bioanalyzerによる品質確認を行ったサンプルについて、PolyA選択法によるストランド特異的ライブラリの作製を行い、Novaseq(Illumina)を用いてシーケンスを行った。メチル化解析の結果と合わせ、Subioにより発現解析を行った。

(4) ウレタン処置オルガノイドの形態観察

ウレタン処置から96時間後のオルガノイドの写真撮影及びiP gel1を用いてパラフィン包埋を行った。常

法によりHE染色標本の作製を行った。

(5) 肝臓オルガノイドの準備と、間質細胞との共培養系の構築

前述の肺オルガノイドの他に肝臓オルガノイドを用いた化学物質処置の準備を進めており、オルガノイドについては研究代表者から分与を受けたMouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932)を融解し、HepatiCult Organoids Growth Medium (Mouse) (ベリタス)により培養し、化学物質処置を行うための準備を行った。培養法は戸塚班と同条件のドーム法を用いた。化学物質については研究分担者からフェノバルビタールナトリウム、クマリン、モノクロタリンの分与を受けた。また、肝臓オルガノイドとの共培養のため、理研BRCより不死化クッパー細胞の提供を受けた。共培養法については、コンパニオンプレート側にドーム法によるオルガノイド、インサート側(1.0 μ mメンブレン)にクッパー細胞を培養する方法を用いた。

(倫理面の配慮)

これらの実験は、「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従って行う。動物福祉並びに動物実験倫理の観点から、適切なエンドポイントを設定し、安楽死させることにより苦痛軽減に配慮している。

C. 研究結果

(1) ウレタン処置オルガノイドのメチル化解析

ウレタン3回目処置後(0mM, 2.5mM, 10mM, 各N=2)96時間のオルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。ゲノムを1kbの領域に分けた解析では、ウレタン0mM3回処置オルガノイドと10mM3回処置オルガノイドとの間で、メチル化変化領域は30箇所と非常に少なかった。IGVによる確認を行い、発現に影響を与える可能性の高いメチル化変化領域は同定されなかった。1塩基単位でのメチル化変化部位についてはメチル化低下、メチル化増加の両者に2000箇所程度の候補箇所があり、IGVによる確認においても、メチル化の変化があることが確認できた。また、染色体全体において、ウレタン処理によりメチル化が亢進する傾向が見られた。

(2) ウレタン処置オルガノイドの遺伝子発現解析

メチル化解析と同様のサンプルについてRNA-seq解析を行った。同定した一塩基レベルのウレタン処置によるメチル化変化が発現に影響を与えていると考えられる遺伝子の有無を明らかにするため、一塩基レベルのメチル化変化が大きい候補(増加のTop10, 減少のTop10)について周辺の転写産物を確認したが、ウレタン処理に伴い発現が変化する遺伝子は同定されなかった。そのほかの候補についても引き続き確認を行う。

(3) ウレタン処置オルガノイドの形態解析

ウレタン処置1回目、2回目、3回目の72時間後のオルガノイドの形態観察では、3群で同様の増殖、形態を示した。パラフィン包埋HE染色切片の観察からも、オルガノイドの層構造に変化は見られなかった。ウレタン処置によりユークロマチン状態の核の存在が増加する傾向が見られた。但し0 mMのコントロールにおいてもユークロマチン状態の核の存在は見られた。

(4) 肝臓オルガノイドと間質細胞の共培養系の構築
理研から不死化クッパー細胞の提供を受け、融解して培養した肝臓オルガノイドとの共培養を行った。肝臓オルガノイドをコンパニオンプレート側でドーム法により培養、インサート側にメンブレン状にクッパー細胞で共培養を行えることを確認した。最適な細胞数等の条件は引き続き検討を行う。共培養によるオルガノイドの変化を未分化、分化マーカーによる確認を行った後、共培養を利用して化学物質処置を行い、in vitro 評価系として有意であるか検証を行う。

D. 考察

ウレタンのin vitro 処置により、マウス肺オルガノイドに1塩基レベルのメチル化変化が生じることを明らかにした。領域でのメチル化変化ではないため、既報にあるような遺伝子発現に影響を与えるかどうかについてはさらに検証を必要とする。染色体レベルでウレタン処置による亢進傾向が見られており、ウレタン処置の回数を増やすことなどで、メチル化変化領域が同定される可能性もあると考える。一塩基レベルのメチル化変化部位のバイサルファイトシーケンス後のクローニングによる結果の確認、また進行中のRNA-seqの結果と合わせることで、より詳細な解析を行う。形態的な変化についても顕著な影響はなく、組織学的にもオルガノイドの層構造に変化は見られなかった。ウレタン処置に伴い、ユークロマチン状態の核が増加する傾向が見られたが、コントロールの0mMにもユークロマチン状態の核は見られるため、精査してウレタン処置との関連を結論づける必要がある。化学物質による毒性、発がん性は共存する間質細胞に依存することが報告されており、in vitro 系で共培養を行うことで、異なった結果が出るかどうかの検証が必要である。現在インサートを用いた肝臓オルガノイドとクッパー細胞の共培養法の構築を進めている。

E. 結論

In vitro 評価系において、ウレタン処置により1塩基レベルのメチル化変化及び染色体全体でメチル化の亢進が起こることをRRBS解析により同定した。サンガーシーケンスによる1塩基メチル化変化の検証を行い、評価系の指標となる変化があるか決定する。また、肝臓オルガノイドによる単独培養、共培養による化学物質処置の準備を進めており、これらのメチル化解析の結果と照らし合わせ、in vitro 化学物質評価系における指標となるメチル化変化の同定を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 Cancer.* (2023) 75: 713-725

2. 学会発表

1. Mie Naruse, Hiroe Nozaki, Toshio Imai, Kassai Hidetoshi, Ryuichi Ono; Faithful DNA methylation status of imprinted DMRs in colon-derived organoids. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023. 6. 横浜)

2. Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023. 7. Taiwan)

3. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、葛西秀俊、今井俊夫; 大腸癌手術余剰検体由来のオルガノイドおよびCAFを用いたエピゲノムマーカーの探索. 第82回日本癌学会学術集会 (2023. 9. 横浜)

4. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がんにおけるがん-間質細胞相互作用

を再現する in vitro 実験系の構築. 第46回日本分子生物学会年会 (2023. 12. 神戸)

5. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊; 大腸がん患者由来オルガノイドと同一症例由来線維芽細胞の共培養系を用いる評価系の確立. 日本薬学会 144 年会 (2024. 3. 横浜)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他