

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  
分担研究課題名：一次線毛のオルガノイドへの応用

研究分担者 広川 佳史 三重大学大学院医学研究科 准教授

**研究要旨：**本分担研究では、発がん性化学物質を曝露したラットの肝臓組織標本を用いた、一次線毛に対する蛍光免疫染色により、暴露肝臓での一次線毛発現差異が毒性評価に応用可能であるか検討した。化合物無処理の肝臓では肝細胞に一次線毛発現は見られず、胆管上皮細胞の管腔側に一次線毛発現が認められた。化合物処理の肝臓でも肝細胞に一次線毛は観察されなかったが、胆管上皮細胞の一次線毛発現は、いずれの化合物でもシグナルが減弱し、陽性細胞の減少が認められた。胆管に位置する前駆細胞が肝臓障害時に肝/胆管細胞に分化する現象との関連性、また肝前駆細胞での詳細な発現検討が必要との結論に至った。

### A. 研究目的

化学物質の発がん性予測等の安全性評価には動物実験が不可欠ではあるが、代替法の開発・導入が求められている。現在汎用されている細胞を用いた in vitro 毒性試験は生体への外挿において最適ではないため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。

また、分担研究者らは一次線毛（primary cilia, PC）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を報告している。近年、細胞膜から突出する不動性線毛である一次線毛は正常細胞やがんの増殖などに関与するシグナルハブであることが知られている。一次線毛には、受容体やエフェクターが存在し、ヘッジホッグ（Hh）、Wnt、Notch、mTOR、受容体型チロシンキナーゼ（RTK）、Hippoシグナル伝達系が関わる。また、一次線毛は、半永久的に突出する構造物ではなく、正常細胞では細胞周期に関わり、G0/G1期で出現、分裂期では消失する。一次線毛の形成・消失は各種シグナル伝達と連動している。一次線毛は、細胞周期に関与するという単純なものではなく、発生・分化、細胞可塑性など多彩な生命現象に関与することが明らかにされつつある。分担研究者は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、化学物質と一次線毛との分子生物学的関連性および共培養系およびオルガノイドにおける細胞病理学的および機能解析を行い、一次線毛の発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的とする。

### B. 研究方法

鱈洸班より提供を受けた、発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いて一次線毛を構成するタンパク質（抗 ARL13b 抗体）に対する蛍光免疫染色をおこなった。化合物は N-diethylnitrosamine、Monocrotaline、Phenobarbital、Coumarin、2-Nitropropane である。

### C. 研究結果

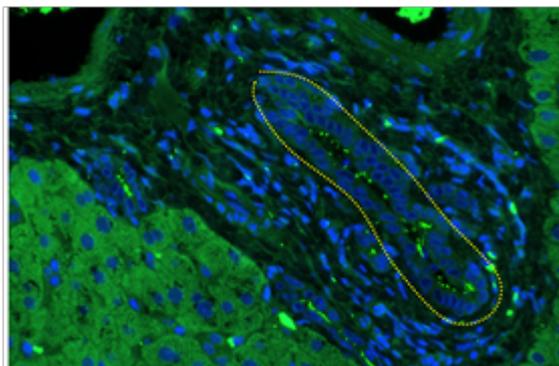


図1 無処理肝臓の一次線毛。黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が多数見られる。

化合物無処理の肝臓では肝細胞に一次線毛発現はほとんど見られず、グリソン鞘領域で陽性所見が観察された。特に胆管上皮細胞の管腔側に一次線毛発現が認められた（図1）。

化合物処理の肝臓では無処理と同様、肝細胞に一次線毛はほとんど観察されなかった。グリソン鞘の胆管上皮細胞の一次線毛発現は、いずれの化合物でもシグナルが減弱し、陽性細胞の減少が認められた（図2）。

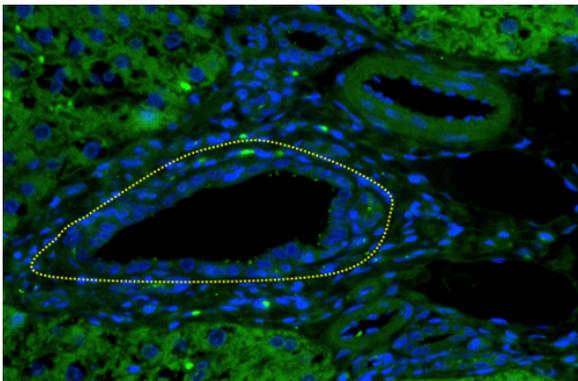


図2 2-Nitropropane処理肝臓の一次線毛。黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が見られる。シグナルは無処理肝臓と比較して減弱し、陽性細胞は減少している。

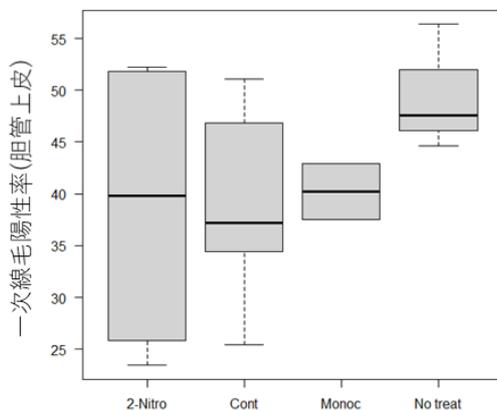


図3 各化合物処理肝臓の胆管上皮一次線毛陽性率。2-Nitro, 2-Nitropropane: Cont, control: Monoc, Monocrotaline: No treat, no treatment。無処理群に比べ化合物暴露群は陽性率が低い傾向にある(有意差なし)。

#### D. 考察

薬物や毒物などにより障害をうけた肝臓では、成熟した肝細胞自体の増殖が阻害される。このとき、未分化性をもつ特殊な肝前駆細胞の活性化が誘導され、これが増殖および分化することにより新たに細胞を供給し再生が行われると考えられている。肝前駆細胞の正確な由来はわかっておらず、活性化された肝前駆細胞は増殖し実質組織へと進展し、肝細胞および胆管上皮細胞へ二方向性に分化して再生に寄与すると考えられている(Tanaka, M. et al. *J. Biochem.*, 149, 231-239 (2011))。一次線毛は静止期の細胞に出現することから、薬物投与後に出現する活性化肝前駆細胞には一次線毛がむしろ出ていないと推測される。発がん総論的には増殖期の細胞が障害を受ければ遺伝子異常の頻度高まり、細胞が形質転換する確率が上がるので、一次線毛陰性の活性化肝前駆細胞を定量すれば、化学発が

んの評価につながると考えられる。マウス、ラット、ヒトの間で統一された肝前駆細胞マーカーは確立されていないが、ラットで最適とされるマーカーを選択し、一次線毛との二重染色を今後検討していく。

#### E. 結論

化合物処理肝臓で胆管上皮細胞の一次線毛発現が減弱していたことの意義は不明であるが、肝前駆細胞との関連について検索することが必要と考えた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Semba R, Uchida K, **Hirokawa Y**, Shiraishi T, Onishi T, Sasaki T, Inoue T, Watanabe M, Miyamoto H. A simple risk stratification model for prostate cancer using histopathologic findings of radical prostatectomy. *Am J Clin Pathol.* 2024 May 5:aqae049. doi: 10.1093/ajcp/aqae049.
- (2) Leventoux N, Morimoto S, Ishikawa M, Nakamura S, Ozawa F, Kobayashi R, Watanabe H, Supakul S, Okamoto S, Zhou Z, Kobayashi H, Kato C, **Hirokawa Y**, Aiba I, Takahashi S, Shibata S, Takao M, Yoshida M, Endo F, Yamanaka K, Kokubo Y, Okano H. Aberrant CHCHD2-associated mitochondriopathy in Kii ALS/PDC astrocytes. *Acta Neuropathol.* 2024 May 15;147(1):84. doi: 10.1007/s00401-024-02734-w.
- (3) Takeuchi Y, Wang Y, Sasaki K, Sato O, Tsuchikawa T, Wang L, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, **Hirokawa Y**, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Kato T, Shiku H, Hirano S. Exhaustion, rather than lack of infiltration and persistence, of CAR-T cells hampers the efficacy of CAR-T therapy in an orthotopic PDAC xenograft model. *Biomed Pharmacother.* 2024 Jan;170:116052. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116052. Epub 2023 Dec 22.

#### 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