

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

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

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。本研究では、マウス肺及び肝臓オルガノイドおよび免疫系や間質細胞等と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を目指す。さらに、一次線毛発現がオルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行った。今年度は昨年度検討した継代・培養方法を用い、各施設で使用する被検物質が一部同じになるように調整して研究を実施した。共通して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)、クマリン(CMR)である。まず、一般毒性および遺伝毒性評価系構築と遺伝子発現変化を指標とした化学物質の毒性評価に関しては、昨年度開発したドーム型培養法で市販のマウス肝臓由来オルガノイドに PB, EC, MCT, CMR を連続して 3 回曝露を行い検討した。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。本試験により回収した RNA を用いた遺伝子発現解析の結果、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、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についても検討を行う予定である。エピゲノムに対する影響については、マウス肺由来オルガノイドに EC 処置を行い、1 塩基レベルのメチル化変化及び染色体全体におけるメチル化の亢進傾向を RRBS 解析により同定した。オルガノイドによる評価法の妥当性検討のための in vivo 毒性試験として、今年度は肝臓並びに肺毒性の陽性対照物質を用いた in vivo 毒性試験を実施した。得られた毒性学的所見が、in vitro 試験で新たに得られる事象との相関性や、一次線毛の発現への影響などについて検討可能であると考えられる。一方、一次線毛の分子基盤解析とオルガノイド評価系への応用検討に関しては、化学物質の曝露による一次線毛の形態変化を、様々な組織において評価できるゼブラフィッシュを作製し、その定量的解析法を確立した。この手法を応用することで、化学物質が一次線毛に与える影響の分子基盤を解析し、オルガノイドやラットなどの化学発がんモデルにおける一次線毛の影響評価に有用な情報を提供しうると考えられる。さらに、発がん性化学物質を曝露したラットの肝臓組織標本の一次線毛に対する蛍光免疫染色の結果、化学物質無処置の胆管上皮細胞の管腔側に一次線毛発現が認められ、いずれの化学物質処理によりこの陽性シグナルの減弱と陽性細胞の減少が認められた。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思われる。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。

### 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  
成瀬 美衣 国立研究開発法人  
国立がん研究センター研究所  
動物実験施設 研究員  
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  
広川 佳史 三重大学大学院医学系研究科 准教授

西村 有平 三重大学大学院医学系研究科  
統合薬理学教授

### 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、実験動物に一定期間繰返して被験物質を投与する反復投与毒性試験やがん原性試験等については、現在のところ確立された *in vitro* 試験法がなく、多数の被験物質のヒトでの毒性を予測するためにも、革新的な試験法の開発が期待されている。

申請者らはこれまでに、マウス正常組織(肺、肝臓、乳腺等)由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、当該評価系が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。具体的には、オルガノイドに化学発がん物質を暴露後ヌードマウスの皮下に接種する方法で、病理組織学的変化をエンドポイントとする *in vitro* 化学発がんモデルを諸外国に先駆けて提案した(Naruse M, Imai Tら、2020)。また、レポーター遺伝子導入マウス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)。さらに、化学物質による *in vivo* における毒性、発がん性は標的細胞に対する直接作用に加え、共存する免疫系細胞や間質細胞等の影響を受ける場合があり、それらの細胞群とオルガノイドとの共培養系を用いることで、生体微小環境の構築を目的とした評価系、またエピゲノム変化評価系の構築にも取り組んでいる。

本研究においては、これらに加え、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、化学物質の安全性評価法構築への応用も検討する。一次線毛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が報告されている。申請者らはこれまでに、一次線毛の動態と細胞周期制御の分子レベルでの解析や、一次線毛の存在を特異的抗体により定量手法する検討も開始している。発がん性スクリーニングである各種発がん性中期試験法において、前がん病変マーカーが重要な役割を果たしているが、この一次線毛の発現は、それに匹敵する発がん予測マーカーとなる可能性に加えて、臓器横断的に応用が可能であると期待できる。

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マウス肺及び肝臓オルガノイドおよび免疫系や間質細胞等と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を目指す。さらに、一次線毛発現がオルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行う。

## B. 研究方法

### 1. マウスオルガノイドの化学物質暴露

前年度検討した培養条件下で、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  $\mu$ M(PB)、25, 50, 100 mM(EC)、125, 250, 500  $\mu$ M(MCT)、50, 100, 200  $\mu$ 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  $\mu$ M(PB)、25, 100 mM(EC)、125, 500  $\mu$ M(MCT)、50, 200  $\mu$ 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。

## 2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

今年度は下記の被験物質について検討した。

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。

#### ① 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, 236 $\mu$ M, 938 $\mu$ M, Dimethyl Sulfoxide (DMSO)で溶解したCoumarinを最終濃度0, 50 $\mu$ M, 200 $\mu$ M, DMSOで溶解したMonocrotalineを最終濃度0, 125 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 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。

## ② 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、これまで鰐淵班研究(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であるかどうか検討を行った。

## 3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

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40μm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1x10<sup>5</sup>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50μg/mlのS9 mixと共に添加し、5%CO<sub>2</sub>, 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バ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 gel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(1.0μmメンブレン)にクッパー細胞を培養する方法を用いた。

## 4. In vivo毒性試験

オルガノイドによる新規試験と従来のin vivo毒性試験との類似性について精査するため、マウスを用いて毒性陽性物質の反復投与毒性試験を実施した。

① 6週齢の雄性C57BL/6Jマウスに、カルバミン酸エチル(EC:ウレタン)を0, 300, 1000及び2000 ppm、アクリルアミドを0, 250, 500及び1000 ppmの用量で28日間飲水投与した(1群各5匹)。さらに、アセトアミノフェン(APAP)を0, 3100, 6200及び12400 ppmの用量で、フェノバルビタール(PB)を0, 500及び1000 ppmの用量で混餌投与した。さらに、

PBは50 mg/kgの用量で腹腔内投与する群も設定した。いずれも28日間の投与期間終了後に解剖し、血液並びに主要臓器を採取した。採取された臓器は、定法に従いHE染色標本を作製し、さらに未染パラフィン標本を用いて炎症関連の指標としてマクロファージ(F4/18)免疫組織化学的な染色を実施した。採取した凍結臓器を用いて肝臓及び肺の遺伝子発現解析を実施した。さらに解剖時の血清を用いて血液生化学検査を実施した。

#### 観察及び測定項目…

〔一般状態〕実験開始後、1日2回、すべての動物について一般状態、臨床症状、生死などを観察し、個体別に記録した。

〔体重〕実験開始時及びその後、毎週2回、全動物について個体別に体重を測定した。また、計画屠殺時に各動物の体重(剖検日体重)を測定した。

〔摂水量〕実験開始後、毎週1回、2日間の摂水量をケージ単位で測定し、1日平均摂水量(mL/animal/day)を算出した。なお、1日平均摂水量より、1日平均被験物質摂取量(mg/kg/day)を算出した。

〔血液生化学的検査〕投与期間終了後の全動物について、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、総ビリルビン(T-BIL)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、グルコース(GLU)、総コレステロール(T-CHO)、トリグリセリド(TG)の検査を実施した。検査試料(血液)の採取は、実験小動物用簡易吸入麻酔装置を用いてイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から行なった。採取した血液を遠心分離して得た血清を用いた。

〔剖検〕全生存動物について、全身諸器官・組織の肉眼的病理学観察および摘出を実施し、10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。肝臓及び肺の組織の一部は液体窒素中で急速冷凍し、保存した。さらに、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、胸腺の器官については重量を測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比(相対重量)を算出した。

〔病理組織学的検査〕定法に従い肝臓、肺、腎臓、脾臓、胸腺、小腸、大腸、腸間膜リンパ節についてHE(ヘマトキシリン・エオジン)染色標本を作製し、組織学的に観察した。さらに、未染パラフィン標本を用いて免疫組織化学的な染色を施した。

### 5. 新規in vivo有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

#### ① 新規in vivo有害性評価手法の確立：

一次線毛の分子基盤解明のため、前年度に作製した二光子励起顕微鏡を用いて全身の線毛を可視化できるゼブラフィッシュであるTg(ubb:Ar113bT35N-EGFP)を用いた解析を実施した。Tgには、ゼブラフィッシュのユビキチン遺伝子(ubb)のプロモーター遺伝子配列の下流に、一次線毛のマーカーであるAr113b遺伝子とeGFP遺伝子のアミノ酸配列をコードしている領域を連結したコンストラクトを合成し、トランスポゾンを用いてゼブラフィッシュのゲノムに挿入してある。Tgに、肝臓と腎臓の発がん性があり、線毛への

影響も報告されているオクラトキシンAを曝露し、二光子励起顕微鏡を用いて、一次線毛の蛍光ライブイメージングを実施し、線毛の形態変化を解析した。

#### ② 一次線毛のオルガノイド評価系への応用：

鱒潤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。ラットに投与された化合物はN-diethylnitrosolamine、Monocrotaline、Phenobarbital、Coumarin、2-Nitropropaneである。

#### (倫理面の配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「国立研究開発法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。また、東京農業大学、三重大学および受託試験実施施設においても動物実験計画書が審査され、承認を受け遂行した。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号、平成29年最終改正法律第41号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、各施設の機関承認を得た後に実施した。

### 研究結果

#### 1. マウスオルガノイドの化学物質曝露

① 化学物質曝露実験：ドーム型培養法でPB, EC, MCT, CMRを曝露した24時間後の細胞毒性についてトリパンプル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。

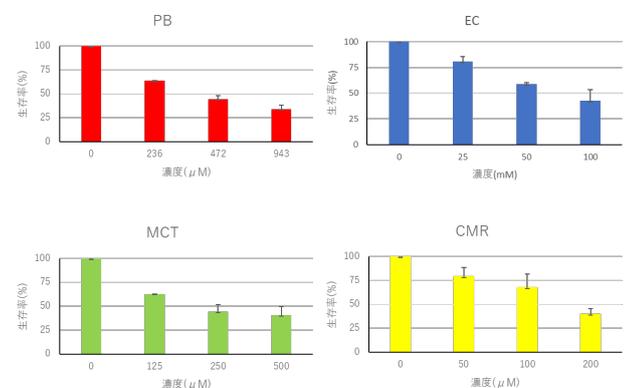


図1. 化学物質曝露による細胞毒性試験

② 複数回曝露実験：複数回曝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。

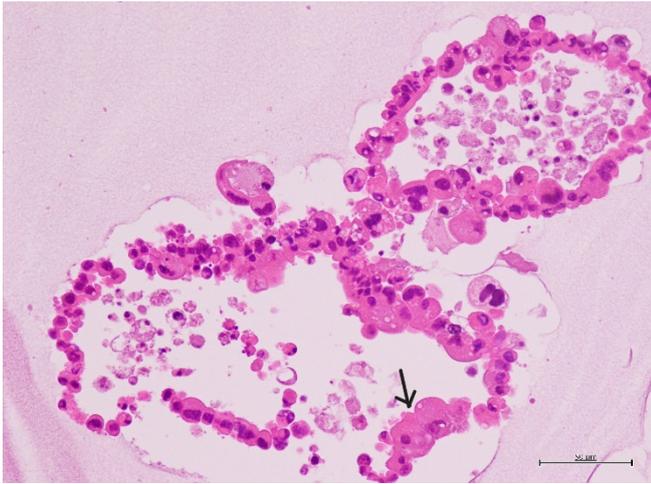


図 2-1. 細胞肥大



図 2-2. 核肥大

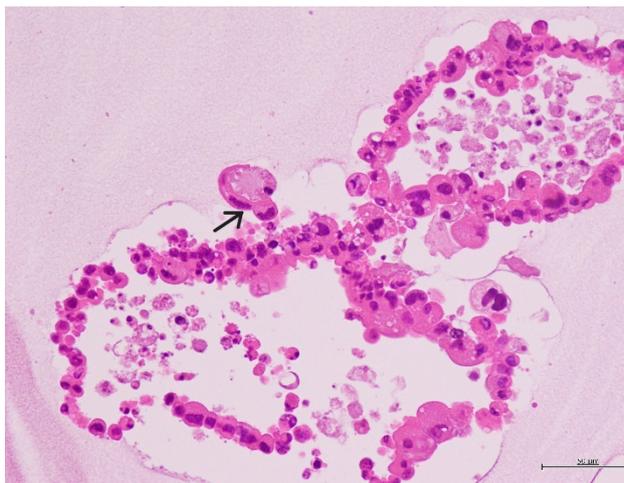


図 2-3. 核の変形

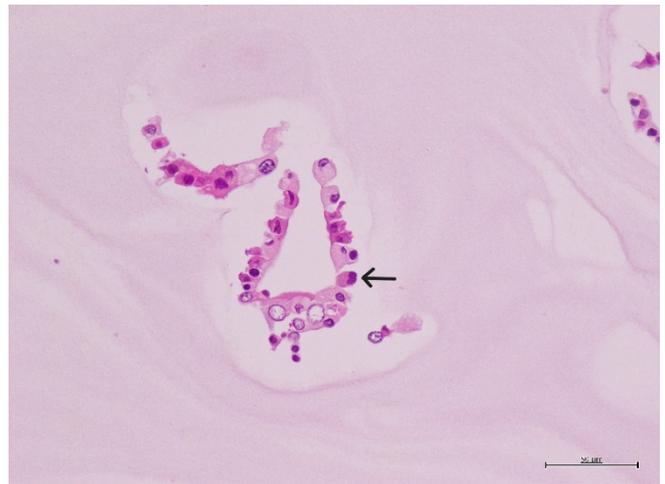


図 2-4. 多核



図 2-5. 核の淡明化



図 2-6. 核の凝集



図 2-7. 空胞

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

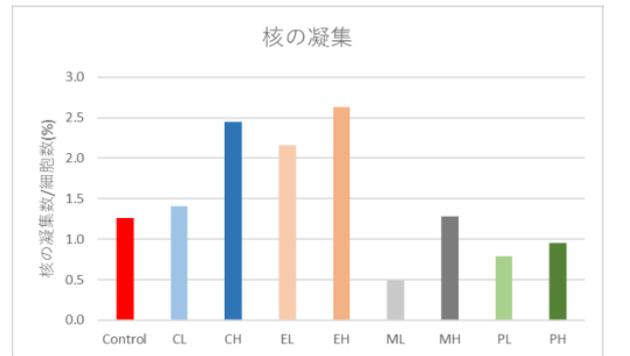
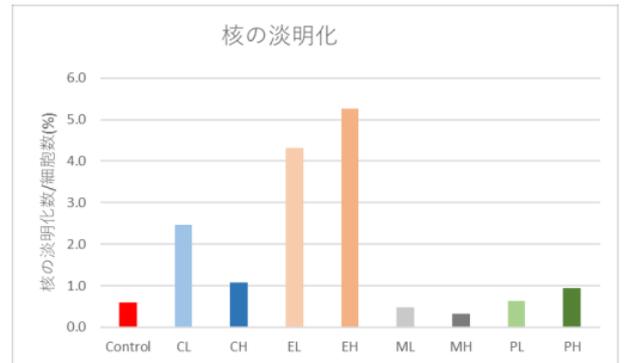
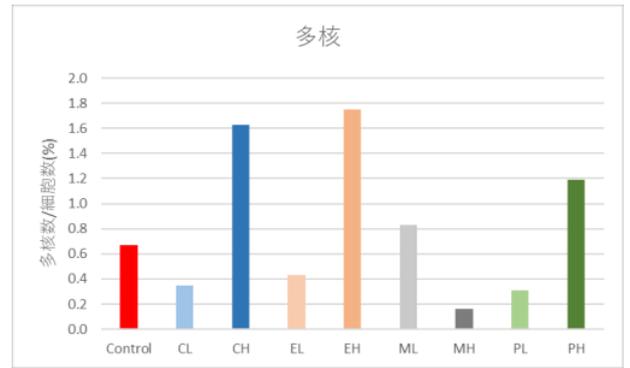
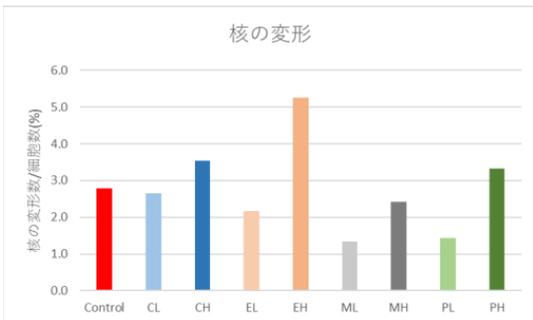
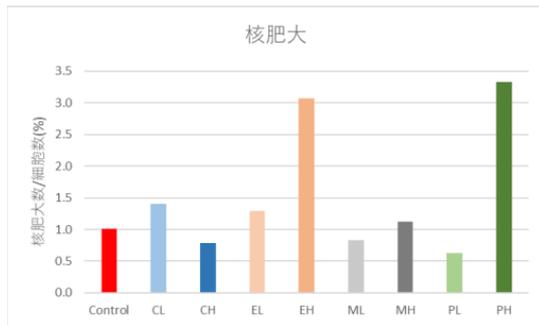
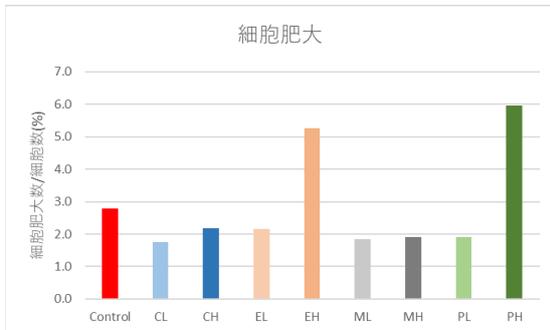


図 3. 形態変化を示した細胞の割合の比較

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。

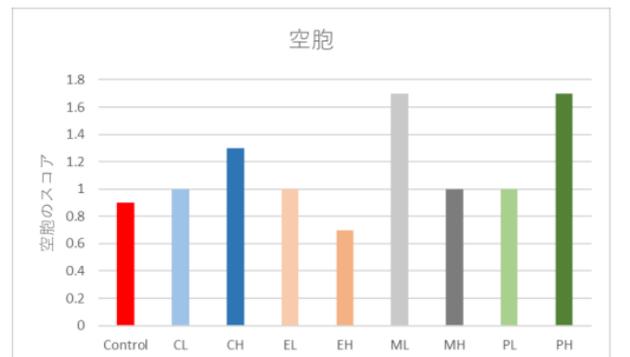


図4. 空胞化を有する細胞スコアの比較

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。

## 2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

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 statorsis, 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	モノクロタリン (MCT)	1.50 以上	108
		0.66 以下	186
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 1 member 14	-0.828	-0.843	-0.851
Scgb2b27	secretoglobulin, family 2B, member 27	-0.806	0.988	-0.78
Vmn1r195	vomerinasal 1 receptor 195	-0.876	0.709	-0.923

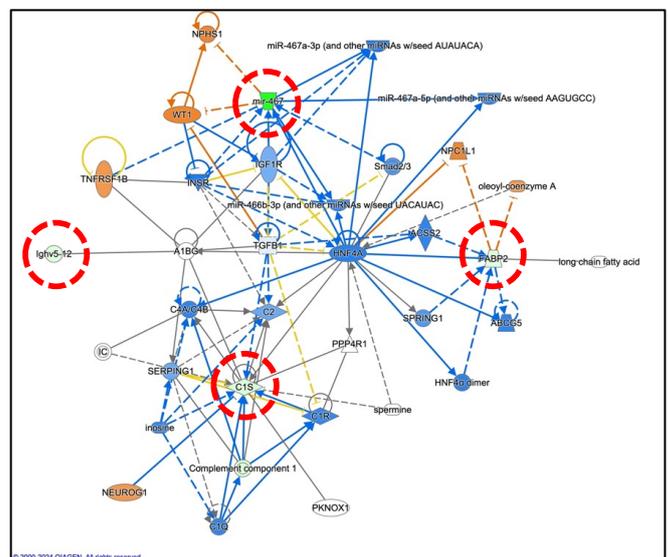


図1 肝発がん物質共通変動遺伝子のネットワーク解析による上流因子の探索結果

## 3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評価系の構築

### 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。

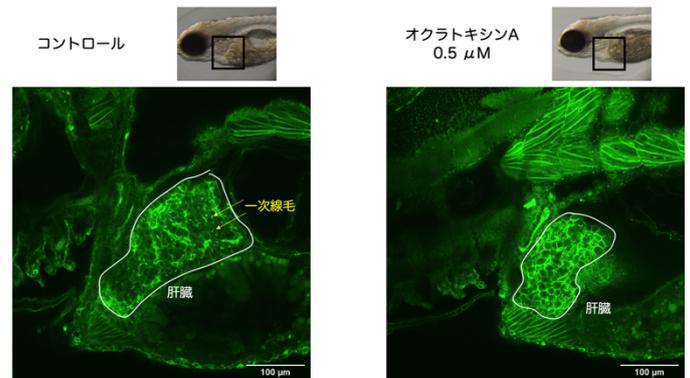
- ④ 肝臓オルガノイドと間質細胞の共培養系の構築  
理研から不死化クッパー細胞の提供を受け、融解して培養した肝臓オルガノイドとの共培養を行った。肝臓オルガノイドをコンパニオンプレート側でドーム法により培養、インサート側にメンブレン状にクッパー細胞で共培養を行えることを確認した。最適な細胞数等の条件は引き続き検討を行う。共培養によるオルガノイドの変化を未分化、分化マーカーによる確認を行った後、共培養を利用して化学物質処置を行い、*in vitro* 評価系として有意であるか検証を行う。

#### 4. In vivo毒性試験

EC及びアクリルアミドの反復投与実験において、投与用量に依存して体重、摂餌量、摂水量並びに一般状態への影響が認められた。EC投与により、対照群と比較し、体重、摂水量共に減少傾向を示した。血液生化学検査により、血清中AST及びT-BILの増加傾向、TGの減少傾向が見られた。病理組織学的検査により、肺及び肝臓に明らかな変化は観察されなかった。しかし、高用量投与群の免疫組織化学的染色において、両臓器共にF4/80陽性マクロファージの増加が観察された。遺伝子発現解析では、肺においてMCP-1及びIL-6が、肝臓においてIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 及びMCP-1が増加ないし増加傾向にあった。一方、アクリルアミド投与により、血液生化学的検査では、肝障害の指標であるAST、ALTが500 ppmで高値を示したが、明らかな組織学的変化は伴っていなかった。さらに、APAPの反復投与により血液生化学的影響と肝臓における巣状壊死が認められた。PBの反復投与により肝臓重量の増加と病理組織学的に肝細胞肥大が観察された。

#### 5. 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

- ① 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立：  
蛍光ライブイメージングを用いて、ゼブラフィッシュの肝臓、尿細管、腸管、脳など、様々な組織における線毛の形態を解析する手法を確立した。この解析法を用いて、オクラトキシンA曝露による腎臓の線毛形態変化を検出することができた。



オクラトキシンAを曝露したゼブラフィッシュの肝臓では一次線毛の形成が抑制される

- ② 一次線毛のオルガノイド評価系への応用：  
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)。これらの各化合物処理肝臓の胆管上皮一次線毛陽性率を図3に示した。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が、有意な差は認めなかった。

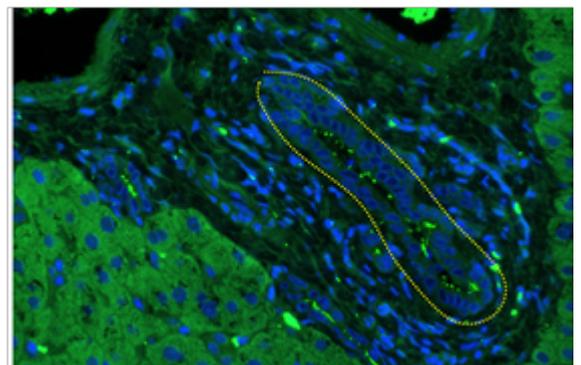


図1 無処理肝臓の一次線毛。黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が多数見られる。

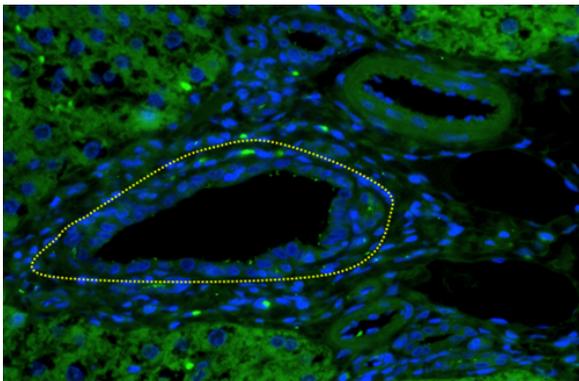


図2 2-Nitropropane処理肝臓の一次線毛。黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が見られる。シグナルは無処理肝臓と比較して減弱し、陽性細胞は減少している。

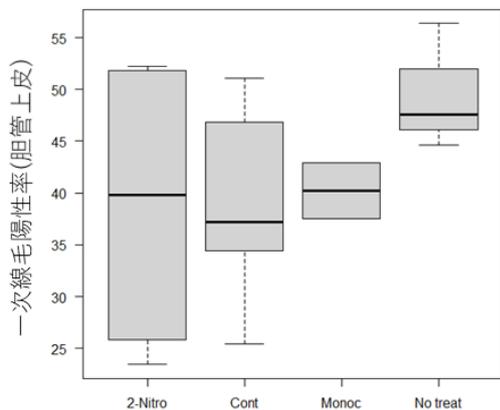


図3 各化合物処理肝臓の胆管上皮一次線毛陽性率。2-Nitro, 2-Nitropropane: Cont, control: Monoc, Monocrotaline: No treat, no treatment. 無処理群に比べ化合物暴露群は陽性率が低い傾向にある(有意差なし)。

## D. 考察

### 1. マウスオルガノイドの化学物質暴露

化学物質単回暴露実験は、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  $\mu$ M (PB)、76mM (EC)、279  $\mu$ M (MCT)、140  $\mu$ M (CMR) となった。

この結果から複数回暴露に使用する濃度を 236, 943  $\mu$ M (PB)、25, 100 mM (EC)、125, 500  $\mu$ M (MCT)、50, 200  $\mu$ M (CMR) とした。

一方、化学物質の複数回暴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) に暴露するため、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暴露においても、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。

### 2. マウスオルガノイドを用いた毒性評価と遺伝子発現解析

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。

### 3. マウスオルガノイドを用いたエピゲノム変化評

## 価系の構築

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。

## 4. In vivo 毒性試験

今年度は肝臓並びに肺に毒性を発現することが報告されている 4 化合物についてマウスを用いた *in vivo* 反復投与毒性試験を実施した。EC 投与では肝臓並びに肺において炎症の惹起を示唆する影響が発現しているものと考えられた。アクリルアミド投与では、肝障害は示唆される血液生化学データは得られたものの明らかな毒性学的影響は捉えられない状態にあるものと考えられた。APAP 投与により、既報のとおり明らかな肝障害が惹起されているものと考えられた。PB 投与により、既報のとおり酵素誘導に伴う肝臓への影響が発現しているものと考えられた。

## 5. 新規 *in vivo* 有害性評価手法の確立と一次線毛のオルガノイド評価系への応用検討

ゼブラフィッシュを用いて、化学物質の曝露による線毛の形態変化を、様々な組織を対象に解析することができると考えられる。Tg (ubb:Ar113bT35N-EGFP) を用いた全身の蛍光イメージングに加えて、Ar113b 抗体を用いた組織切片の免疫蛍光染色による評価も可能であり、これらを併用することにより、化学物質の曝露による線毛への影響をさらに詳細に解析できると考えられる。

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

昨年度に確立したマウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の維持・培養・培養・化学物質曝露・細胞毒性試験法などに関する条件下で各研究分担者が実験を行った。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 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臓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、使用した肝臓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。

化学物質を曝露したマウス肝臓オルガノイドのマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析では、肝臓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・肝臓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。また、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。

今年度はマウスを用いた in vivo 毒性試験を実施しており、陽性対照物質の投与により標的臓器である肝臓において、いくつかの毒性パターンを有する病態が得られた。今後はオルガノイド試験より新たに得られた指標についても評価して、in vitro 評価系の妥当性を検証していく予定である。また、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。

一方、一次線毛の分子基盤解析とオルガノイド評価系への応用検討に関しては、今年度確立したゼブラフィッシュの線毛形態の定量的解析法を用いて、化学物質の曝露による線毛の形態変化を、様々な実験動物などの組織に応用して観察することができると考えられる。

さらに、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の結果、化学物質の処置/無処置に関係なく肝細胞では一次線毛発現はほとんど見られなかったが、化学物質無処置の胆管上皮細胞の管腔側に一次線毛発現が認められ、いずれの化学物質処理によりこの陽性シグナルの減弱と陽性細胞の減少が認められた。薬物や毒物などにより障害を受けた肝臓では、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思われる。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。

## F. 健康危険情報

特になし

### 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. 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.
3. 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.
4. 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., Otoshi 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.

10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Wakai E, Shiromizu T, Otaki S, Koiwa J, Tamaru S, Nishimura Y: Lansoprazole Ameliorates Isoniazid-Induced Liver Injury. *Pharmaceuticals* 2024,17:82.
  15. Saito M, Otsu W, Miyadera K, Nishimura Y: Recent advances in the understanding of cilia mechanisms and their applications as therapeutic targets. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2023,10:1232188.
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、戸塚ゆかり. 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)
  12. 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年6月、横浜)
  13. Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10<sup>th</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology (2023年7月、Taiwan)
  14. 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會 (2023年9月、横浜)
  15. 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年12月、神戸)
  16. 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年3月、横浜)
  17. 神野 涼平、上地 哲平、当摩 茉莉花、煙山 紀子、笹瀬 智彦、前川 竜也、中江 大、美谷島克宏. マウス肝線維化病態の進行と血中Mac-2 binding protein (Mac-2bp) 濃度の関連についての解析, 第40回日本毒性病理学会学術集會 (2024.01.23 川崎)
  18. 西村 有平 新たなin vivoイメージング評価法の開発を目指して 第63回日本先天異常学会学術集會 (2023年7月、茨城)
- 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