

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和5年度分担研究報告書

In vivo と相関性のある in vitro 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援

研究分担者 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

研究要旨

本分担研究は、in vivo と相関性のある in vitro 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援を目的として実施した。

本年度の腸管に関する検討では、マウス、マウス空腸由来オルガノイドを用いて、陽性物質である DSS を曝露し、より早期段階から生じる腸管の病態を探索するとともに、AOP の候補となり得る炎症関連因子をはじめ、腸管バリア機能、セロトニン関連因子（受容体）の変動について探索した。

本年度の肝臓における代替法の検討として、肝線維化の AOP に作成支援のための組織学的基礎的データを得るとともに、ヒト培養肝星細胞株並びにマウス肝オルガノイドにおいて、肝線維化関連因子の発現変動を解析した。その結果、肝線維化モデル動物において SOX9 や CD44 発現が増加し、重度の線維化モデルでは胆管線維症が観察された。マウス肝オルガノイドを用いて TGF β 1 刺激を行ったところ、星細胞でみられた α SMA 陽性、コラーゲンの産生に加え、SOX9 や CD44 も発現の上昇が確認された。

以上、両実験系を通して動物モデルと in vitro 試験との相関性のある結果については、新たな毒性指標の開発に寄与し得るものと考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進する経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme）において、日本で開発された種々の TG やガイダンス文書（GD: Guidance Document）、毒性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）などの世界各国が必要とする成果物を公

定化させるとともに、他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、その成果物に日本の主張を反映させ、これらから得られた成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生労働行政に反映させることを目的とする。

その中で、本分担研究においては、AOP の実験的基礎データの蓄積を目的として主に消化管毒性並びに肝線維化における AOP のための実験データを得ることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 腸管由来組織における代替法の検討

B-1-1. In vivo モデルにおいて AOP となり得る毒性所見の検討

7 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DSS (Dextran Sulfate, Sodium: MP Biomedicals, MW36,000~50,000 富士フィルム和光純薬(株)) を 5.0% の濃度で 3、5 または 7 日間飲水投与して、解剖後、小腸及び大腸を採取して、病理組織学的観察並びに遺伝子発現解析を実施した。この検討により早期段階から生じる腸管の病態を探索するとともに、AOP の候補となり得る炎症関連因子をはじめ、腸管バリア機能、セロトニン関連因子 (受容体) について探索した。

B-1-2. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

上記 B-1-1) より採取した C57BL/6J マウスより対照群並びに DSS 処置を施した動物由来の空腸オルガノイドを作製し、定法に従ってマトリゲルにて 4 日間培養した後、各条件のオルガノイドを回収し、遺伝子発現解析を実施した。この検討により in vivo と同様に、マウス小腸由来のオルガノイドにおいても AOP の候補となり得る因子 (腸管の炎症関連因子をはじめ、腸管バリア機能、セロトニン作用関連) について探索した

B-1-3. 腸管軸に着目した腸管傷害に起因した肝臓病態の修飾効果の検討

6 週齢の雄性 C57BL/6j マウスを用い、1.25% DSS 水を 1 週間毎の間歇飲水投与を 3 週間実施した。食餌はコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸 - 高脂肪食 (CDAA-HF 食) を与えた。解剖時には、大腸及び肝臓を採取し、遺伝子発現解析及び病理組織学的解析を実施した。この検討により腸管バリア機能の傷害による肝臓病態の増悪を探索し、肝線維化の AOP の候補となり得

る炎症関連因子の変動を探索した。

B-2. 肝臓における代替法の検討

肝線維化の AOP のための実験データを得るため、昨年度までに、肝線維化には星細胞の活性化とともに細胆管反応が重要であり、SRY-box9 (SOX9) 及び Cluster of Differentiation 44 (CD44) が関与していることを報告した。今年度は、肝線維化モデル動物における基礎データ取得と培養細胞における種々の検討を行った。

B-2-1. 肝線維化のモデル動物として、非アルコール性脂肪性肝炎モデルであるコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸高脂肪食 (CDAA-HF) を長期に投与した際の組織学的な観察ならびに RNA-Seq. によるシグナル変動を解析した。

B-2-2. 肝星細胞における線維化についての in vitro モデルとして、ヒト培養肝星細胞株 (LX-2) を用いた検討を行った。LX-2 に TGF β 1 10ng/mL 1 時間または 48 時間刺激後、形態学的観察、遺伝子あるいはタンパク発現について解析し、星細胞の活性化について検討した。また、TGF β 1 受容体阻害剤の前処置による同様の検討も行った。

B-2-3. 胆管上皮細胞における線維化についての in vitro モデルとして、マウス肝オルガノイド培養を用いた検討を行った。マウスから肝臓を単離し、コラゲナーゼ処理後にマトリゲル上にて三次元培養を行い、オルガノイドを得た。得られたオルガノイドに対して、Cytokeratin 19 (CK19)、SOX9、CD44 の免疫染色を行った。また、TGF β 1 30ng/mL 24 時間刺激を行い、形態学的観察と、CK19、SOX9、CD44 ならびに α SMA、Collagen Type 1、Collagen Type 4、Fibronectin 遺伝子発現の変動を検索した。

C. 研究結果

C-1. 腸管由来組織における代替法の検討

C-1-1. In vivo モデルにおいて AOP となり得る毒性所見の検討

DSS 飲水投与により、5.0%は7日間の投与で全例に粘膜のびらん・潰瘍、F4/80 陽性マクロファージの増加、炎症性細胞浸潤領域が認められた。一方、同条件の小腸においては、明らかな組織学的変化は認められなかった。しかし、小腸の遺伝子発現においては、5.0%は投与3ないし5日目には炎症関連遺伝子に加え、粘膜バリア機構、酸化ストレス関連、セロトニン作用に関連する受容体発現への影響が見られた。これより、小腸においては、明らかな組織学的変化が生じるのに先立ち、より早期の段階から種々の遺伝子発現に影響が生じていることが明らかとなった。

C-1-2. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

正常マウス並びに DSS 処置マウス由来の空腸オルガノイドにおける遺伝子発現を検討した。特にセロトニン作用関連因子に注目して観察したところ、より短時間の 5.0%DSS 3 日間投与から 5-HT₃ 受容体関連遺伝子が増加傾向を示した。他方、細胞接着並びに粘膜保護関連遺伝子については明らかな影響は認められなかった。

C-1-3. 腸管軸に着目した腸管傷害に起因した肝臓病態の修飾効果の検討

DSS 投与群の大腸において、炎症関連遺伝子発現の上昇及び病理組織学的な炎症が観察され、大腸炎の誘発が確認された。さらに、同群の肝臓においても炎症関連遺伝子発現が上昇傾向を示し、大腸炎の波及が示唆された。CDAA-HF 給餌群の肝臓において、炎症・線維化関連遺伝子発現の上昇及び病理組織学的な肝細胞の脂肪化並びに炎症が観察され、NASH 病態の惹起が

確認された。併用群では、肝臓において TLR4 を含む一部の炎症関連遺伝子発現が増強し、病理組織学的に CXCL16 陽性細胞が増加した。さらに、線維化関連遺伝子の発現が増強傾向を示した。腸管においては IL6 の遺伝子発現が増強し、病理組織学的に杯細胞と陰窩の拡張が観察された。

C-2. 肝臓における代替法の検討

C-2-1. CDAA-HF の長期投与において、マウス肝は全例で重篤な線維化を認め、組織学的にシリウスレッド陽性面積は 20%まで増加した。また、CDAA-HF 群において胆管線維症も認め、胆管への分化増強が示唆された。Control と比較して、CDAA-HF の線維化部位においては、Rho-family GTPase や Estrogen receptor signaling の活性化をはじめとした種々の変化を見出し、腫瘍の変化と併せて論文として報告した。

C-2-2. LX-2 を用いた検討では、TGF β 1 の刺激により、網目状の進展と紡錘形に形態学な変化を示し、 α SMA 蛋白陽性、Smad2, 3 のリン酸化、Collagen Type 1 および Type 4 の遺伝子発現増加を認めた。また、これらの変化は TGF β 1 受容体阻害剤で解除された。以上の結果より、星細胞における線維化の in vitro モデルとして有用であることが示された。

C-2-3. マウス肝オルガノイド培養を用いた検討では、得られたオルガノイドは CK19 が陽性であり、胆管の特徴を有していた。さらに、SOX9, CD44 が陽性であり、in vivo で観察された組織学的特徴を有した胆管上皮細胞である可能性が示唆された。TGF β 1 刺激においては、形態学的に、Control と比較して、小型で色調が暗色になるような変化がみられた。胆管関連として CK19, SOX9, CD44 遺伝子発現は TGF β 1 の刺激により Control と比較して有意に増

加した。線維化関連遺伝子発現は、 α SMA は Control では陰性であったのに対し陽性に転じた。Collagen Type 1, Fibronectin 発現は、Control と比較して有意に増加した。

D. 考察

D-1. 腸管由来組織における代替法の検討

今年度は腸管障害の評価における早期段階の毒性学的影響に関する情報を収集し、AOP となり得る変化を見出すための検討を行った。これまでの *in vivo* モデルにおける大腸の炎症病態誘発の条件検討結果を基に、組織学的変化が生じる前のより早期段階の影響について精査した。その結果、これまで注目してきた炎症関連遺伝子の変化に加え、嘔吐・下痢発現機序に深く関わるセロトニン作用に関連した 5-HT3 受容体遺伝子発現に対する影響が見出された。それは、同条件から *ex vivo* で作製した空腸由来オルガノイドにおいても 5-HT3 受容体遺伝子発現の増加が明らかとなった。これより、嘔吐・下痢などの消化器毒性を *in vitro* で評価する際の指標として、新たな AOP の提示に繋がる可能性があるものと考えられた。さらに、肝臓・腸管連関に対する影響を視野に入れた検討として、*in vivo* で DSS 投与によって惹起された大腸炎と、CDAA-HF 食給餌によって惹起された NASH 病態の相互作用を検討した。これにより、腸管傷害が生じる状況下において肝臓の炎症並びに線維化関連因子は、よりその発現が増強し惹起病態が進行することが明らかとなった。これより、今後の腸肝軸を視野に入れた毒性指標の構築につながる可能性があるものと考えられた。

D-2. 肝臓における代替法の検討

今年度は、マウス CDAA-HF の長期投与

において、全例で重篤な線維化を認めたことより、マウス CDAA-HF は肝臓の線維化モデルとしても有用であることが示された。胆管線維症も認められたことより、胆管への分化が亢進している可能性が示され、それら線維化には、Rho-family GTPase といった種々のシグナル変化の関与が示唆された。

LX-2 では TGF β 1 の刺激により α SMA や Collagen 産生といった種々の活性化指標が増強され、星細胞における線維化の *in vitro* モデルとして有用であることが示された。

マウス肝オルガノイド培養を用いた検討では、CK19 陽性より胆管の特徴を有していた。更に、SOX9, CD44 陽性であったことより、*in vitro* における胆管モデルとして有用である可能性が示唆された。さらに、TGF- β 1 刺激によって形態の変化、胆管への分化や線維化関連遺伝子発現の亢進がみられたことから、肝線維化における細胆管反応培養モデルとなり得る可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

本研究では、腸管並びに肝臓における *in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系指標を見出すため検討した。これにより、肝臓・腸管由来組織における動物実験代替法の確立に向けた検討を2次元培養ないし3次元培養条件下で実施し、それぞれ、代替法の開発に資する基礎的情報を得た。さらに、今後は、本成果を emergency technology にあたる人体模倣システム

(MPS) の開発にも発展させたいと考えている。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Suzuki-Kemuriyama N, Abe A, Nakane S, Yuki M, Miyajima K, Nakae D. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocarcinogenesis in mice fed a modified choline-deficient, methionine-lowered, L amino acid-defined diet and the role of signal changes. PLoS One. 2023 Aug 3;18(8):e0287657, 2023.

G-2 学会発表

1. 畑中 悠里、宇野 絹子、白井 陽月、柴田 朱衣、煙山 紀子、美谷島 克宏. DSS 大腸炎モデルマウスの短期試験至適条件の探索及びそれに伴う炎症パラメータの変動, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)
2. 宇野 絹子、名倉 かれん、畑中 悠里、煙山 紀子、中江 大、太田 毅、美谷島 克宏. デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎が NASH 病態進行に及ぼす影響, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし