

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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
(22KD1001)

ゲノム変化を指標としたオルガノイドによる化学物質の安全性評価法開発

研究代表者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学 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、実験動物を用いた反復投与試験等の結果が重視されることが多い。一方、動物愛護 3R(Replacement・Reduction・Refinement)の観点から、化学物質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。そこで、オルガノイドを用いて、化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価方法の開発を目指した。

まず、オルガノイドの安定性について 2 施設で同一プロトコールにより培養したオルガノイドについて、各種遺伝子発現（前駆肝細胞 (*Sox9*)、肝細胞 (*Hnf4a*, *Ttr*)、胆管細胞 (*Krt19*)、成熟肝細胞 (*Alb*, *Cyp*)) を指標に評価を行った。その結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、同一プロトコールを用いて試験を実施する限りは肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。そして、化学物質の曝露実験では、マウス肝臓オルガノイドに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)、アセトアミノフェン(APAP)を曝露したところ、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認できた。また遺伝毒性試験として小核試験を行った結果、遺伝毒性発がん物質曝露(EC, CMR, MCT)および肝毒性物質である APAP 曝露では小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質である PB 曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらに Error-Corrected NGS(ec-NGS) 解析では、MCT 曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。MCT は Ames 試験では陰性と判定される遺伝毒性肝発がん物質であることから、マウス正常肝組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法は動物実験代替法として有用であることが示すことができた意義は大きいと考える。

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3R(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、現在汎用されている *in vitro* 毒性試験はいずれも均質な細胞を用いての評価系であり、生体への外挿の点で限界があるため、その限界を突破するイノベーションが期待されている。

近年、3次元オルガノイド培養法の発展により様々な組織由来の正常細胞を長期培養することが可能となってきた。オルガノイドは *in vitro* 系で幹細胞から作ることができミニチュアの臓器とも言われており、幹細胞がもつ自己複製能と分化能を利用し自己組織化させることで臓器あるいは器官に特異的な3次元構造を形成し、その機能を再現することが可能である。このことから発生生物学、疾患病理学、細胞生物学、再生メカニズムといった基礎研究や創薬研究など多岐にわたる研究分野で使用されている。

申請者はこれまでに、レポーター遺伝子導入マウス由来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)。

本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法を確立するため、各施設で共通して使用する予定である市販のマウス肝臓由来オルガノイド(STEMCELL Technologies, ST-70932)及び既知の遺伝毒性化学物質、非遺伝毒性化学物質、肝毒性物質を用いて、①マウス肝臓オルガノイドの安定性評価、②細胞毒性試験、③小核試験、④Error-Corrected NGS(ec-NGS)によるゲノム変異解析について実施した。

B. 研究方法

⑤ マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

本研究では標準的な毒性試験法の開発を目指していることから、オルガノイドの品質が安定であることが望ましい。しかしながら、オルガノイドは培養条件などにより遺伝子発現に影響することが知られていることから、使用前にその品質について確認する必要があると考えた。そこで、2施設間（星薬科大学と国立がん研究センター）で同一の実験プロトコールに従い培養したオルガノイドの安定性について、各種遺伝子を分子マーカーとして評価した。

凍結日と継代数が異なる凍結マウス肝臓由来オルガノイド(2本)を各々ドーム型培養で播種し、1週間ごとに3週間継代を行った。播種ならびに継代時に形態学的観察を行い、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のためオルガノイドを回収した。遺伝子発現解析の対象として、肝細胞マーカー(*Hnf4a*, *Ttr*)、前駆肝細胞マーカー(*Sox9*)、成熟肝細胞マーカー(*Alb*, *Cyp3a11*)、胆管マ

ーカー (*Krt19*) の遺伝子発現量を播種時の発現量と比較して評価した。なお、内部標準遺伝子は *18S rRNA* を用いた。また、同じマーカー遺伝子を用いてマウス肝組織における遺伝子発現との比較も行った。

⑥ 細胞毒性試験

オルガノイドを播種後2時間培養し、S9mix存在下で被験物質として、フェノバルビタール(PB, 236, 472, 943 μ M)、カルバミン酸エチル(EC, 25, 50, 100 mM)、モノクロタリン(MCT, 125, 250, 500 μ M)、クマリン(CMR, 50, 100, 200 μ M)、アセトアミノフェン (APAP, 10, 20, 40 mM) を24時間曝露し洗浄後、トリプシンを用いてシングルセルにして、トリパンブルー色素排除法を用いて評価を行った。

⑦ 小核試験

オルガノイドを播種後3日間培養し、S9mix存在下被験物質として、PB(236, 943 μ M)、EC(25, 100 mM)、MCT(125, 500 μ M)、CMR(50, 200 μ M)、APAP(10, 40 mM) を24時間曝露し洗浄後、新しい培地で2日間培養し、シングルセルにして細胞を回収した。回収した細胞はサイトスピン法によりスライドガラスに固定後、ギムザ染色を行った。評価は、光学顕微鏡下で各スライドにつき2,000個の細胞を観察し、小核を保有する細胞数を計測し、算出した小核保有細胞の頻度(小核出現頻度)を指標に行った。

⑧ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

マウス肝臓オルガノイドにS9mix存在下で、MCTの3回曝露実験を行った。播種後3日間培養したオルガノイドへ1回目の曝露(24時間)を行い、洗浄した後に新しい培地を添加した。3日間培養した後、オルガノイドを回収し再播種を行った。3日後、2回目の曝露(24時間)を行い、洗浄後に新しい培地を添加した。6日間培養後、3回目の曝露(24時間)を行い洗浄した後、TrypLEを用いてオルガノイドを回収した。なお、化学物質の培地中最終濃度は125, 500 μ Mとした。回収したオルガノイドよりAllPrep DNA/RNA Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、ec-NGS(Nano-Seq)解析を行った。

C. 研究結果

③ マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

オルガノイドをドーム型培養法により培養し、継代時に形態学的変化を観察した結果、図1のように播種後3週間におけるオルガノイドの形態学的変化は認められなかった。

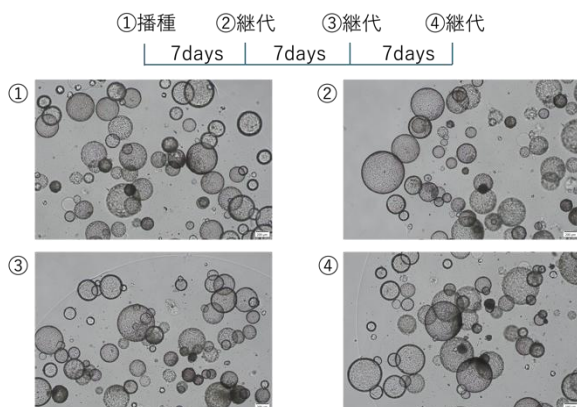


図1. オルガノイドの形態学的変化

オルガノイドの各種マーカー遺伝子発現は、同一プロトコルを用い、2施設で培養したオルガノイドにおける播種時と継代時で相対比較した。その結果、図2に示すように両施設において、*Sox9*(前駆肝細胞マーカー)、*Krt19*(胆管マーカー)、*Ttr*(肝細胞マーカー)は、継代を繰り返しても両施設間で大きな増減は認められなかった。一方、*Alb*(成熟肝細胞マーカー)、*Hnf4a*(肝細胞マーカー)および*Cyp3a11*(成熟肝細胞マーカー)に関しては、両施設ともに播種時と比較し、継代ごとにやや変動が認められた。

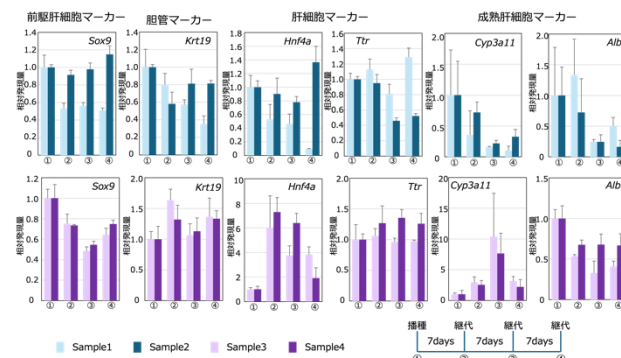


図2. 未分化オルガノイドの遺伝子発現 (上段: 星薬科大学, 下段: 国立がん研究センター)

⑤ 細胞毒性試験

化学物質を曝露させた結果、図3に示すように各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が減少した。

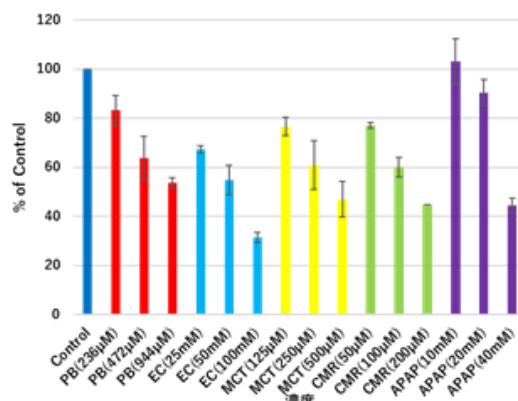
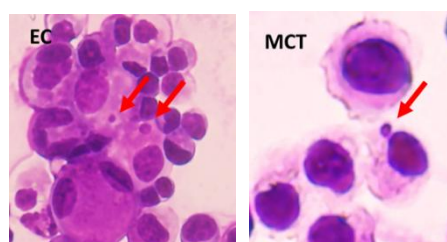


図3. 化学物質曝露による細胞毒性試験

⑥ 小核試験

化学物質を曝露させた結果、図4に示すような小核が出現し、小核出現頻度は、遺伝毒性発がん物質(EC, MCT, CMR)および肝毒性物質であるAPAPでは曝露により上昇していた(図5)。APAPは、細胞毒性が見られなかった低濃度曝露では小核発生頻度に大きな上昇は見られなかったが、細胞毒性が強く示された高濃度曝露では小核発生頻度が上昇し、細胞毒性と小核発生頻度の相関が認められた。なお、非遺伝毒性肝発がん物質であるPBはコントロールとほぼ同程度の小核出現頻度であった。



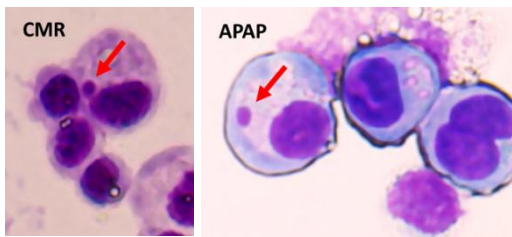


図4. 化学物質曝露による出現した小核

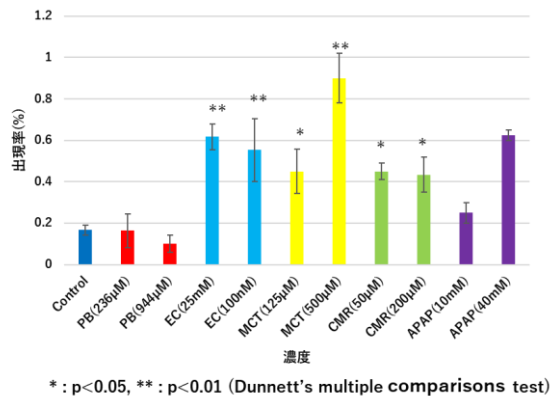


図5. 小核試験

⑦ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

小核試験で小核出現頻度が高かった MCT について ec-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その際の 1 塩基置換変異頻度を図 6 に示す。コントロール (DMSO) と比較して MCT を曝露することで変異頻度が上昇した。図 7 はゲノム変異データから変異シグネチャー解析を実施した結果を示す。コントロールのパターンと比較すると、C>A において変異シグネチャーパターンが異なることが認められた。

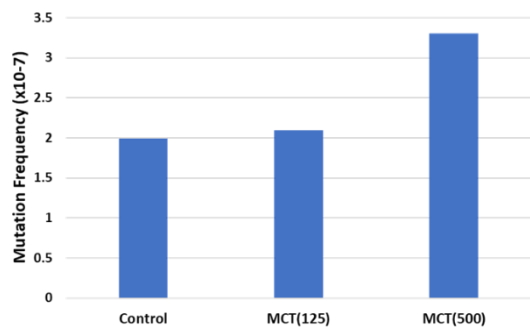


図 6. 1 塩基置換変異頻度

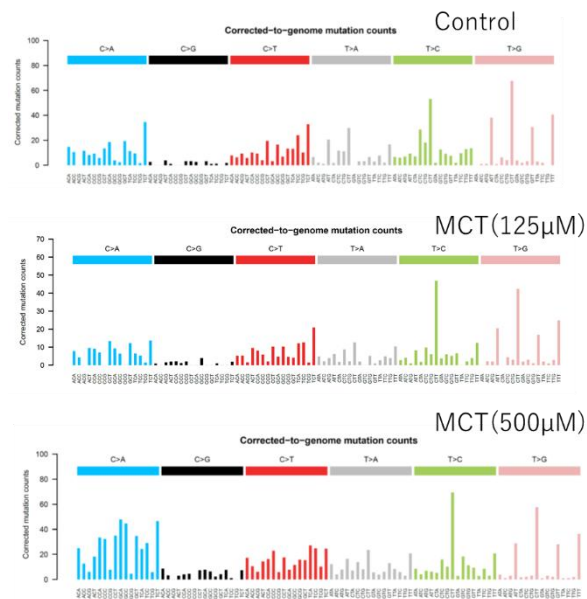


図 7. Error-Corrected NGS (Nano-Seq) による変異シグネチャーパターン

D. 考察

② マウス肝臓オルガノイドの安定性評価

マウス肝臓オルガノイドの安定性評価に係るマーカー遺伝子発現解析では、成熟肝細胞マーカー (*Alb*, *Cyp3a11*) や肝細胞マーカー (*Hnf4a*) の発現において、播種後に変動が認められたが、マウス肝組織のそれら遺伝子発現と比較すると、非常に低いものであり (data not shown)、これらの遺伝子の発現の変動はオルガノイドの安定性に影響をおよぼさない程度であると考えられる。図2は内部標準遺伝子に *18S rRNA* を用いて解析したが、*gapdh* を内部標準遺伝子に用いて解析を行った際も同様の結果であることを確認している (data not shown)。また、本研究ではオルガノイド播種後、3週間培養を行ったが、これは3回曝露実験を行う際に必要な期間である。そして、この期間においてオルガノイドの形態学的変化ならびに大きな遺伝子発現変化がみられなかったことから、本試験で用いるマウス肝臓由来オルガノイドは、同一プロトコルを用いて培養する限り、曝露実験期間を通して肝前駆オルガノイドとして安定であると考えられる。

④ 細胞毒性試験

初年度に確立したプロトコルで、被験物質に、PB, EC, MCT, CMR, APAPを用いて化学物質単回曝露実験を行った結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認され、小核試験ならびに ec-NGS 解析に使用する被験物質の曝露濃度の決定を行うことができた。また、確立したプロトコルの妥当性も確認できた。

⑤ 小核試験

化学物質曝露後に小核出現頻度をコントロールと比較したところ、遺伝毒性発がん物質および肝毒性物質では上昇したが、非遺伝毒性発がん物質ではコントロールと同程度であった。この結果から、オルガノイドを用いて小核を指標に化学物質の遺伝毒性評価が可能であること、肝毒性物質も評価できることが示唆され

た。また、本試験では出現する小核の大きさに違いがあることが確認できた(図8)。大きい小核は、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来、小さい小核は DNA 損傷により生じる構造異常由来とされており、小核形成のメカニズムが異なることを意味する。小核の出現頻度に加え、小核の大きさも考慮することで、遺伝毒性メカニズムを明らかにできる可能性がある。

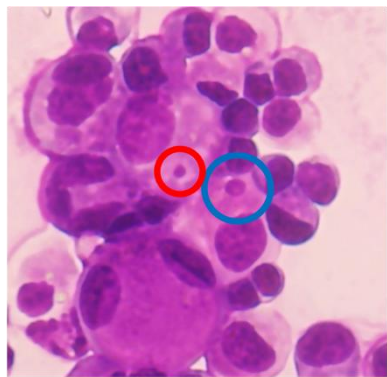


図8. MCT曝露により観察された大きさに違いのある小核。青○：大きい小核、赤○：小さい小核

④ Error-Corrected NGS によるゲノム変異解析

小核試験で小核出現頻度が高かった MCT について ec-NGS によりゲノム変異の解析を実施した。その結果、コントロールと比較し、曝露により 1 塩基置換変異頻度が上昇することがわかった。MCT は肝発がん性を示す遺伝毒性発がん物質であるが、Ames 試験では陰性となることが知られている。一方、マウス肝臓由来のオルガノイドを用いた本研究では、MCT の変異原性を陽性と捉えることができた。そのメカニズムについてはまだ詳細な検討をしていないが、おそらく、我々のアクリルアミドの先行研究で報告したものと同様に、MCT の代謝活性化に係る酵素がオルガノイドで誘導されたものと推測している。MCT は CYP により代謝活性化され、dG の DNA 付加体 (DHP-dG) の生成を介してゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、本研究で解析した MCT の変異シグネチャーパターンからも C:G to A:T の変異がコントロールと比べて増加していることから、マウスオルガノイドにおいてもこれら MCT の DNA 付加体を介してゲノム変異を誘発することが示唆された。Ec-NGS では変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。今回は、1 塩基置換のみの解析結果を報告したが、得られたゲノム情報からは 2 塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、ec-NGS では変異頻度による定量性のみならず、得られる変異パターン (変異シグネチャー) が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。本研究では、このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示すことができ、その意義

は大きいと考える。

E. 結論

2 施設でマウス肝臓オルガノイドの安定性について、各種遺伝子発現を指標に解析した結果、両施設ともに遺伝子発現の大きな変化は認められず、初年度に確立したプロトコルを用いて培養した際は肝前駆オルガノイドとして安定であると判断した。細胞毒性試験において、マウス肝臓オルガノイドに化学物質 (PB, EC, MCT, CMR, APAP) を曝露すると濃度依存的に細胞生存率が低下した。小核試験においては、遺伝毒性発がん物質 (EC, MCT, CMR) および肝毒性物質である APAP では小核出現頻度がコントロールと比較して上昇したが、非遺伝毒性発がん物質である PB 曝露ではコントロールと比較して同程度であったことから、マウス肝臓オルガノイドを用いた小核を指標とする化学物質の遺伝毒性評価の妥当性が確認できた。さらに ec-NGS 解析では、化学物質曝露により変異頻度の上昇と変異シグネチャーパターンの変化が認められた。同手法は、変異を持つ細胞の表現型によらず、網羅的かつノンバイアスな変異解析が可能であることから、従来の標的遺伝子上に起こる変異原性評価手法よりも優れていると考えられる。また、得られるゲノム情報からは 1 塩基置換のみならず、2 塩基置換やある程度大きな挿入・欠失変異についても検出が可能であることから、従来の変異原性評価法と比べ、得られる情報も多く、多面的な変異原性評価が可能になると考えられる。さらに、得られる変異パターン (変異シグネチャー) が変異導入の要因と紐づいていることから、これらの情報を用いることで、遺伝毒性メカニズムの推測も可能となる。このような新規かつ革新的な変異解析手法を動物試験代替法としてのオルガノイドに応用可能であることが示せた意義は大きいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

13. Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y.**, Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development, *Int. J. Mol. Sci.*, 2024;25(20):11191.
14. Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y.**, Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024 Oct;899:503821.
15. Imai T, Ishigamori R, **Naruse M.**, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y.** Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* 2024;49(10):425-434.

2. 学会発表

40. **戸塚ゆかり**, DNA 付加体研究の過去・現在・未来 東京、令和 6 年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム、2024 年 6 月 1 日
41. **Yukari Totsuka**, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 札幌、第 42 回札幌国際がんシンポジウム、2024 年

6月6-8日

42. Yukari Totsuka, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, 京都、2024年6月28-30日
43. 大橋 清佳、梶川 明音、前川 竜也、煙山 紀子、戸塚ゆ加里、美谷島克宏、カルバミン酸エチル(ウレタン)のマウス反復投与毒性試験における病態解析、第51回日本毒性学会学術年会(2024年7月、福岡)
44. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、煙山紀子、加藤 護、Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products、第83回日本癌学会総会、福岡、2024年9月19-21日
45. 戸塚ゆ加里、DNA付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム、東京、2024年10月25-26日
46. 戸塚ゆ加里、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索、Web開催、環境エピゲノミクス研究会(EEG)2024春季ネットシンポジウム、2024年11月9日
47. 戸塚ゆ加里、DNA付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、福岡、第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27-29日
48. 戸塚ゆ加里、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発 第85回MMS秋の定例会、岡山、2024年12月6日
49. 戸塚ゆ加里、石ヶ守里加子、牛山 明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子、加熱タバコ製品の吸入曝露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
50. 戸塚ゆ加里、永井桃子、加藤 護、次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
51. 石ヶ守里加子、今井正彦、大野彰子、戸塚ゆ加里、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
52. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏 民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚ゆ加里、N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
53. 渡部 浩平、三好 規之、戸塚ゆ加里、二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、岡山、第53回日本環境変異原ゲノム学会、2024年12月7-8日
54. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐淵 英機、美谷島 克宏、石ヶ守 里加子、加藤 孝一、戸塚 ゆ加里、日本薬学会第145年会、2025年3月27-29日

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