

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和6年度分担研究報告書

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)

研究分担者 成瀬 美衣 国立感染症研究所 主任研究官

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。また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。

以上の背景よりオルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 評価手法のエピゲノム変化評価系の構築を目指す。本年度は、フェノバルビタール(PB)を3回暴露した肝臓オルガノイド(*in vitro* 試験)とPBを反復投与したマウス肝臓(*in vivo* 試験)のメチル化解析を行い、オルガノイドによる評価法の妥当性の検討のため、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験の比較解析を行った。

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。本研究では、マウス肺及び肝臓オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立を目指す。

B. 研究方法

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暴露した後、エピゲノム変化を同定し、*in vitro*一般毒性試験法における指標を探索する。

④ オルガノイドへのフェノバルビタール (PB) 処置

昨年度研究代表者から分与を受けた Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932, C57BL/6 マウスの肝臓由来)を用いた。PB 暴露法については研究代表者が検討した方法に準じ、ドーム型培養法でオルガノイドを3日間培養し、1回目の24時間暴露を各対照群(0 μ M), 低用量(236 μ M), 高用量(943 μ M)の濃度で暴露した。24時間後培地の除去、洗浄後新しい培地を添加し、3日間培養を行った。3日間培養後、細胞を再播種し、3日間培養後に2回目の24時間暴露を行った。その後培地を除去、洗浄後、新しい培地を添加し、6日間培養後に、3回目の24時間暴露を行った。暴露後、培地を除去、洗浄後にセルリカバリーソリューションを用いてマトリゲルを溶解し、オルガノイドを細胞塊として回収し凍結した。

(倫理面への配慮)

本年度は分与されたオルガノイドを使用して実験を進めており、動物実験は行っていない。

⑤ PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB 3回処置後 (0 μ M, 243 μ M, 943 μ M, 各N=3) のオルガノイドの細胞塊から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。メチル化解析はRRBS法 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)を用いた。RRBS法では、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することで効率的にCpGサイトのシーケンスを行っている。バイサルファイト処理により、サイズ選択したDNAの非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR増幅を経て次世代シーケンスを行い、Bismarkを用いてMouse genome (mm10)にアライメントした。次にMethylKit Analysisによるメチル化解析を行い、対照群に対し有意にメチル化率が変化する塩基または領域の同定を行った (q-value<0.01, % methylation difference >25%)。領域ベースの解析についてはゲノムを任意の1kbpに区切り比較を行った。同定した候補はIGV(Integrative Genomics Viewer)を用いて確認を行った。

⑥ PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる*in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウスの凍結肝臓の一部を分担研究者:美谷島から分与を受け、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。その後のメチル化解析については②と同様の手順で行った。

C. 研究結果

① PB処置オルガノイドのメチル化解析

PB処置3回後の (0 μ M, 236 μ M, 943 μ M, 各N=3) オルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。

その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は各群で有意な差は見られなかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも各群を特徴づける有意な差は見られなかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所、領域ベースで有意に差がある領域は1箇所であった。

② PB処置マウス肝臓のメチル化解析

PBによる *in vivo* 毒性試験(対照群 PB 0ppm, 高用量 PB 1000ppm, 各N= 5)を行ったC57BL6マウス肝臓のRRBS解析によるメチル化解析を行った。その結果、染色体毎のメチル化レベルの差は群間における有意な差は見られなかったが、高用量5検体のうち1検体のみが他と異なり全体的に高いメチル化を示していることがわかった。CpGサイト全体のメチル化率によるPCA解析からも同様に、群間の有意な差はないものの、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことがわかった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所、領域ベースで有意に差がある領域は91箇所であった。有意差があるものについても、高用量5検体のうちの1検体が他との差が大きいことに依存している傾向が見られたため、高用量5検体のうちの1検体を除いた解析も行なった。対照群と高用量間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は2箇所、領域ベースで有意に差がある領域は0箇所であった。

⑦ PB処置オルガノイドとPB処置マウス肝臓のメチル化解析の比較

PB処置3回後の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は479箇所と、PB処置マウス肝臓の対照群と高用量群の間で統計的にメチル化率に有意差がある塩基は4007箇所のうち、一致する塩基はなかった。また、領域ベースの比較で有意にメチル化が変化する領域1箇所(オルガノイド)と91箇所(肝臓)においても一致する領域はなかった。PB処置マウス肝臓の高用量5検体のうち1検体のみが全体にメチル化率が高く、2群間の比較に影響が出ているようであったため、その1検体を除く解析を行なったが、やはり

D. 考察

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓¹(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域はなかった。*in vivo*試験の高用量のうちの1検体のみが他と異なるメチル化状態を示していたため、その結果が影響した可能性を考え、1検体を除いての解析を行ったが、同様に共通したメチル化変化はなかった。組織学的な観察においては、この1検体においても他の高用量の検体と同様に全体的に肝細胞の肥大が見られているとのことで、単純にこの1検体の部分的なサンプリングされた細胞の違いがメチル化の違いに影響したということではないと思われるため、エピゲノムを解析するタイムポイントなど、検討が必要と思われる。*in vitro*、*in vivo*試

験の両者において、顕著なメチル化変化が検出されておらず、暴露方法の検討、他の化学物質での検討が必要と考えられる。例えば、オルガノイドのPB処置後の解析においても、今回3回暴露24時間後といった比較的早い段階で解析を行っており、継代を重ねた後など、何らかの細胞が濃縮される可能性が高くなった後には特定のメチル化変化が濃縮され検出されるということがあるかもしれない。

E. 結論

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル変化の比較では共通する1塩基レベルの変化部位、また変化領域は同定されなかった。メチル化を指標とする*in vitro*有害性評価手法の確立において、暴露方法、共培養の活用などさらなる条件検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Ono, R. Kuwagata, M. Naruse, M. Watanabe, A. Takano, M. Hasegawa, T. Takashima, H. Yoshioka, Y. Ochiya, T. Hirabayashi, Y. Kitajima, S. Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* (2024) vol111, No. 1. 37-56.

2. 学会発表

1. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊「患者由来オルガノイド利用した個別化医療に対応した薬剤耐性原因遺伝子の探索」第83回日本癌学会、一般口頭発表、2024。(福岡)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし