

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

一次線毛発現を指標とする発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的として、各種の発がん物質処理を施したマウス肝臓オルガノイドを用いて一次線毛の発現を検索した。一次線毛の軸糸は認められなかったが、一次線毛の構造体である中心小体の発現に変化がみられた。特にフェノバルビタール処理オルガノイドでは中心小体の数が増加した。がんの初期過程で中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発することが知られており、発がん物質のオルガノイドにおける有害性評価の指標になりうることを示唆された。

A. 研究目的

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、各種のシグナル伝達系に関わる。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に、鰐渕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の軸糸を構成するタンパク質（ α -acetylated tubulin）の発現を検索したが、肝細胞に一次線毛はわずかに発現するのみであった。肝臓では幹細胞に一次線毛が発現するという報告があるため、本班研究で用いられているマウス肝臓オルガノイドに各種の発がん物質処理を施した組織を用いて、一次線毛の発現を評価した。

B. 研究方法

分担研究者より提供を受けた、発がん性化合物処理のマウス肝前駆細胞オルガノイド標本を用いて一次線毛を構成する軸糸（抗 α -acetylated tubulin 抗体）、中心小体（抗 γ -tubulin）に対する蛍光免疫染色をおこなった。また中心小体の増幅に関与する Polo-like kinase 4 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。化合物はフェノバルビタール、カルバミン酸エチル、モノクロタリン、クマリンである。

C. 研究結果

一次線毛のいわゆる“毛”に相当する軸糸に存在する α -acetylated tubulin はオルガノイドで検出できなかった。そこで一次線毛の構成成分で基部に存在する中心小体の検出を試みた。

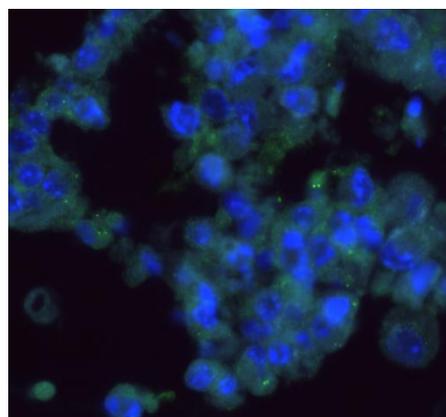


図1 コントロール（DMSO）オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個見られる。

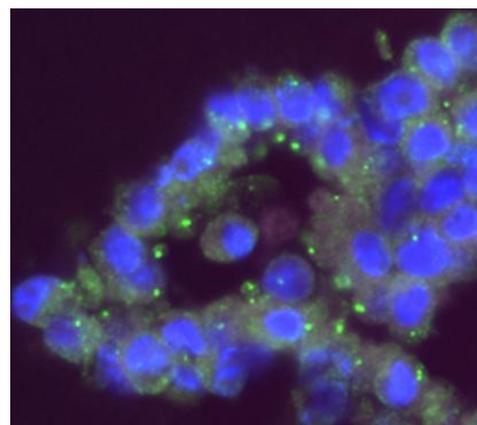


図2 フェノバルビタール（低濃度）オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色のドット状の中心小体が1個ないし2個明瞭に見られる。

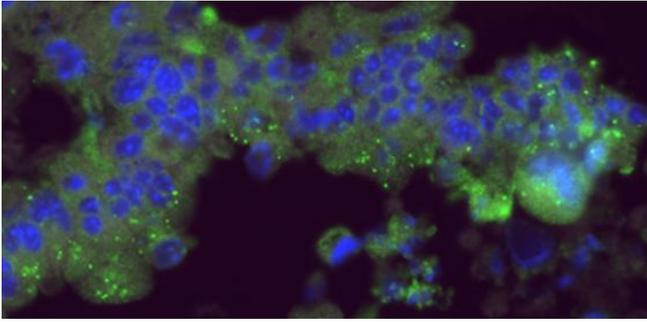


図3 フェノバルビタール（高濃度）オルガノイドの中心小体。細胞質に緑色の微細ドット状の中心小体が複数個見られる細胞がある。

中心小体の変化が最も顕著に見られたのはフェノバルビタール処理オルガノイドであった。特に高濃度フェノバルビタール処理では、細胞内に中心小体が過剰に増幅しているのが認められた（図1, 2, 3）。他の化合物処理では中心小体の細胞内局在の変化が、細胞の変性などによる影響を除外できなかった。

Polo-like kinase 4 (PLK4) は中心小体複製の主要な調節因子であり、腫瘍での過剰発現が報告されている。また *in vitro* では PLK4 の過剰発現が中心体の過剰複製を引き起こすことが知られているため、中心小体と PLK4 の共発現を各化合物処理オルガノイドで検討した。中心小体と PLK4 共局在は観察されず、各オルガノイドは中心小体が複製される時期の細胞ではないことが示唆された。

D. 考察

生体の肝臓では少数ながら一次線毛は観察され、肝障害時の再生に一次線毛陽性の前駆細胞が関与する（*Journal of Hepatology* 2013 vol. 60, 143-151）。今回用いた各化合物処理のオルガノイドでは完成された一次線毛は観察されなかったが、生体とは異なる環境条件によるものと考えられる。一次線毛の軸糸が伸びる基部に相当する中心小体はオルガノイドの細胞にも発現しており、フェノバルビタール高濃度処理では中心小体の増加が認められた。中心体の過剰複製は染色体不安定化を誘発し、がん化

の初期課程に関与する。その機序としては細胞周期の停止や延長による中心体複製の制御破綻があるとされている（*BMB Rep.* 2023; 56, 216-224）。従って、フェノバルビタールの有害性評価の一つとして、中心小体の数的過剰が指標になりうるを考える。その他の化合物で明瞭な中心小体の過剰が観察されなかったのは、細胞の変性などが影響し、中心小体検出の至適条件ではなかった可能性が考えられる。今後は各化合物で中心小体が検出される至適条件の検討、また濃度依存性の有無などを検証する必要があると考える。

E. 結論

一次線毛の構造体である中心小体はフェノバルビタール処理により過剰複製された。このことは染色体不安定化を誘発してがん化に関与するため、有害性評価の指標になりうることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanayama K, Imai H, Hashizume R, Matsuda C, Usugi E, Hirokawa YS, Watanabe M. Extrachromosomal DNA dynamics contribute to intratumoural receptor tyrosine kinase genetic heterogeneity and drug resistance in gastric cancer. *Mol Cancer Res.* 2025 Feb 19. doi: 10.1158/1541-7786. MCR-24-0741.

2. 学会発表

該当なし

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