

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

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、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。そこで、近年、多岐にわたる研究分野で使用されている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、マウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の長期培養、化学物質曝露の条件について様々な検討を行った。その結果、マトリゲルとオルガノイドを混ぜてドーム状に播種し、培地に Organoid Growth Medium (OGM, STEMCELL Technologies, ST-06030) を用いた培養方法により安定した培養状態が維持できた。化学物質曝露実験方法は、ドーム型培養法を用いても Matrigel Bilayer Organoid Culture (MBOC) 培養法と同様な細胞毒性が示された。また評価法については発光測定法、生細胞数計測法のいずれにおいても評価可能であった。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を用いて、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結果、両施設ともに大きな発現変化は認められず、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。確立したプロトコールに従い、被験物質として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) を用いて曝露実験を行ったところ、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認できた。オルガノイドに被験物質を 3 回曝露した後、形態観察を行った結果、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。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頻度が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 MCT を曝露させたオルガノイドを Error-Corrected NGS (ec-NGS) 解析した結果、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を示せ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 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、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、市販のマウス肝臓オルガノイドを用いて、①培養ならびに化学物質曝露実験の至適条件の決定、②オルガノイドの安定性評価を行った。そして、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化学物質曝露実験を行い、③細胞毒性試験、④細胞形態変化評価、⑤小核試験、⑥ Error-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

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

a) 培地：Organoid Growth Medium (OGM, STEMCELL Technologies, ST-06030) と当施設で従来マウス肝臓由来オルガノイド培養に使用している調製培地を用いて 24well plate で培養を行い、オルガノイド

の増殖を比較した。なお、調製培地はAdvanced DME M/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、A83-01、CHIR-990 21、ITS-G supplement等を加えた。また継代時の播種密度は、OGMは1:30、調製培地は1:2~1:30にして検討を行った。

b) 培養方法：マトリゲルドーム内での培養が推奨されているが、当施設で従来オルガノイド培養に用いているMatrigel Bilayer Organoid Culture (MBOC) 法でも培養可能であるか検討を行った。なお、継代時の播種密度はドーム型培養では1:30とし、MBOC法は推奨培養方法ではないため1:10で行った。

c) シングルセル化の検討：トリプシンあるいはAccumaxを用いてオルガノイドをシングルセルにして培養した際のオルガノイドの増殖に及ぼす影響について比較した。

d) 化学物質曝露実験：メタンスルホン酸エチル (EMS) を用いて曝露実験を行った。ドーム型培養法ならびにMBOC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0, 0.2, 2, 20mMとして24時間曝露後、RealTime-GloTM MT Cell Viability Assay (Promega) ならびにトリパンプルー色素排除法を用いて評価を行った。

② 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おり、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、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おり、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、各種遺伝子発現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、マウス肝組織における遺伝子発現との比較も同じマーカー遺伝子を用いて行った。

③ 細胞毒性試験：

オルガノイドを播種後2時間培養し、S9mix存在下で化学物質を236, 943 μ M (フェノバルビタール (PB))、25, 50, 100 mM (カルバミン酸エチル (EC))、125, 250, 500 μ M (モノクロタリン (MCT))、50, 100, 200 μ M (クマリン (CMR))、10, 20, 40 mM (アセトアミノフェン (APAP)) で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、トリパンプルー色素排除法を用いて評価を行った。

④ 細胞形態変化評価：

マウス肝臓オルガノイドに、化学物質の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、セルリカバリーソリューション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236, 943 μ M (PB)、25, 100 mM (EC)、125, 500 μ M (MCT)、50, 200 μ M (CMR) とした。

⑤ 小核試験：

オルガノイドを播種後3日間培養し、S9mix存在下で化学物質を236, 943 μ M (PB)、25, 100 mM (EC)、125, 500 μ M (MCT)、50, 200 μ M (CMR)、10, 40 mM (APAP) で24時間曝露し洗浄後、新しい培地で2日間培養後、シングルセルにして細胞を回収した。回収した細胞を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。

⑥ 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、MCT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

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

a) 培地：OGMを用いて培養した場合と比べ、調製培地での培養は増殖性が低かった。OGMの場合は1:30の播種密度で長期継代培養が可能だったが、調製培地は、OGMと同じ播種密度では増殖性が著しく低下し、濃く播種する必要があった。

b) 培養方法：MBOC法でも培養継続可能であったが、両培養法を比較すると、ドーム型培養法において増殖性が高いことがわかった。

c) シングルセル化の検討：トリプシンあるいはAccumaxともオルガノイドの増殖に大きな影響は及ぼさないことが分かった。

d) 化学物質曝露実験：両培養法ともに濃度依存的に細胞毒性が示された (図1A, B)。また、ドーム型培養に曝露した24時間後の細胞毒性については両評価法で同様の結果が得られた (図1A, C)。

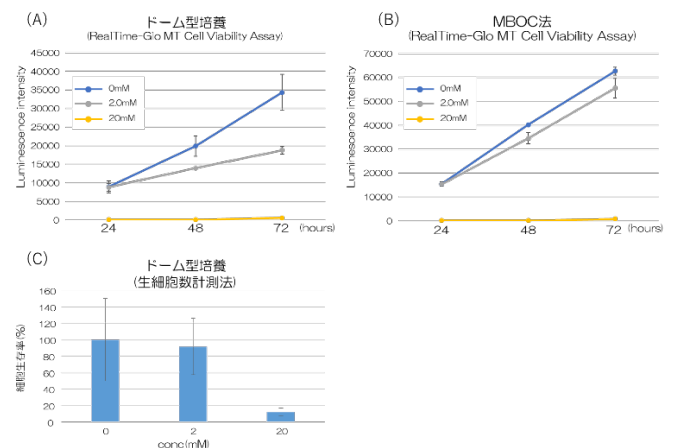


図1. EMS曝露による細胞毒性試験

② 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2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。

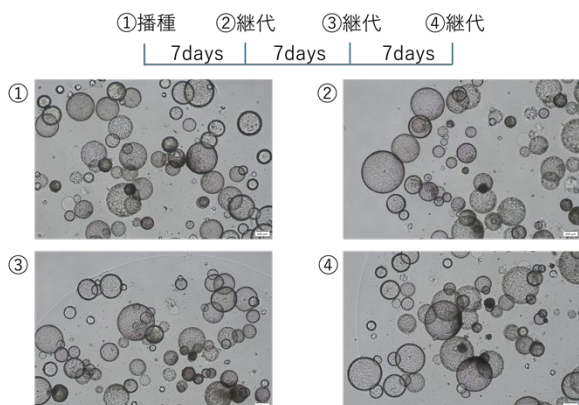


図2. オルガノイドの形態学的変化

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3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。

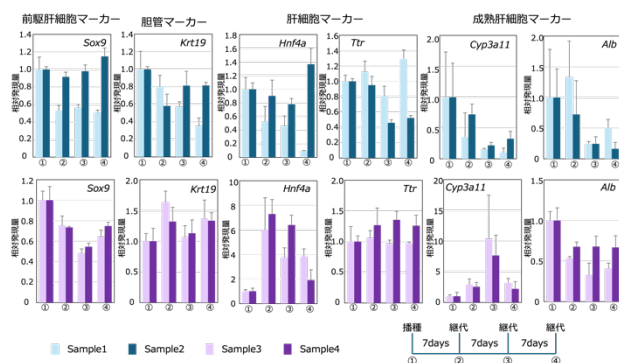
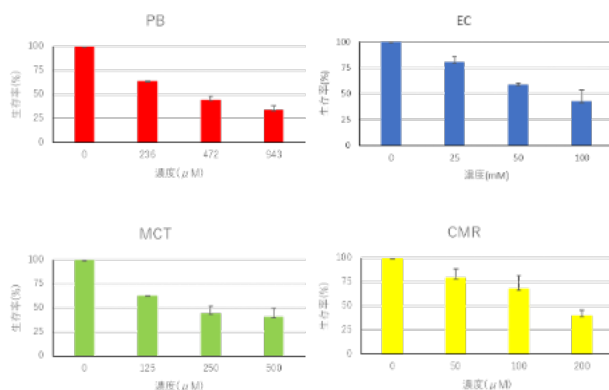


図3. 未分化オルガノイドの遺伝子発現
(上段：星葉，下段：NCC)

③ 細胞毒性試験：

化学物質を曝露させた結果、図4に示すように各化合物とも濃度依存的に細胞生存率が低下した。

(A)



(B)

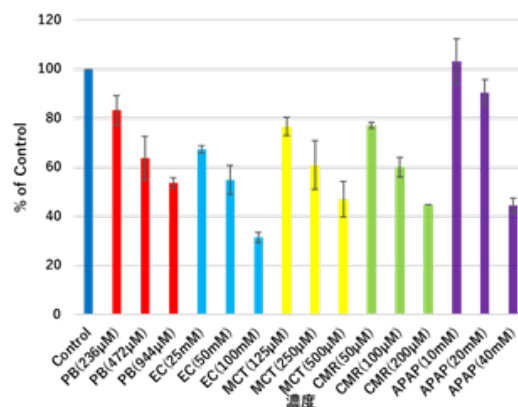


図4. 化学物質曝露による細胞毒性試験
(A) S9mix無、(B) S9mix有)

④ 細胞形態変化評価：

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5-1～5-7に示すものを形態変化として捉えた。

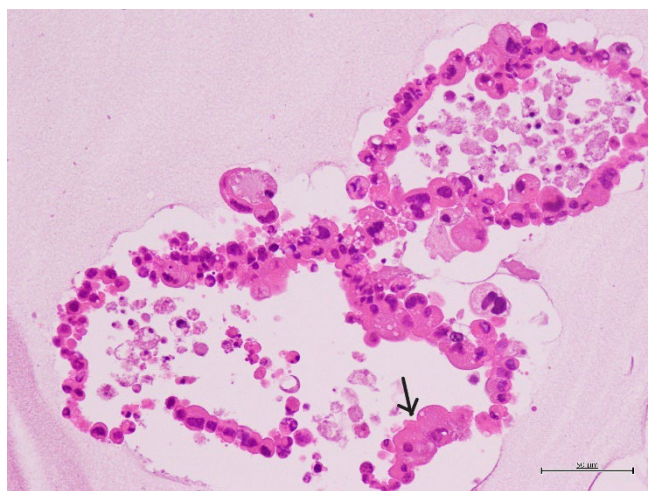


図 5-1. 細胞肥大

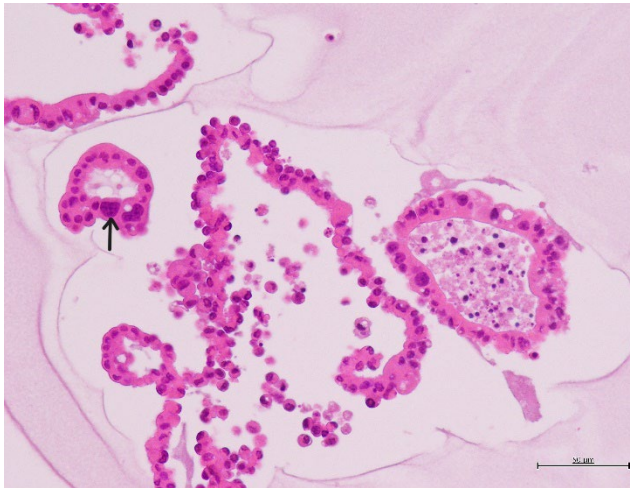


図 5-2. 核肥大



図 5-5. 核の淡明化

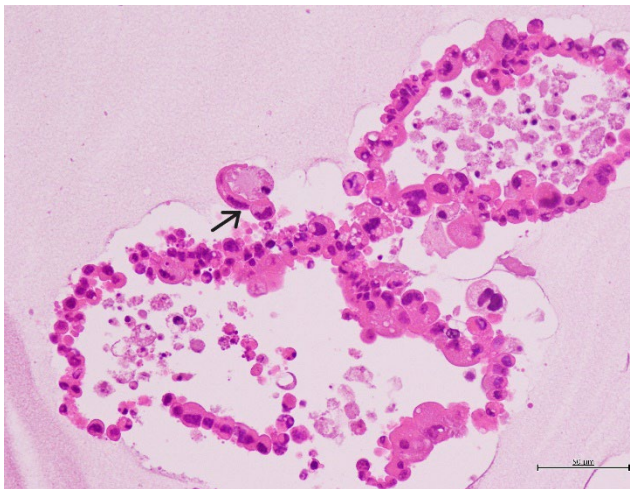


図 5-3. 核の変形



図 5-6. 核の凝集



図 5-4. 多核

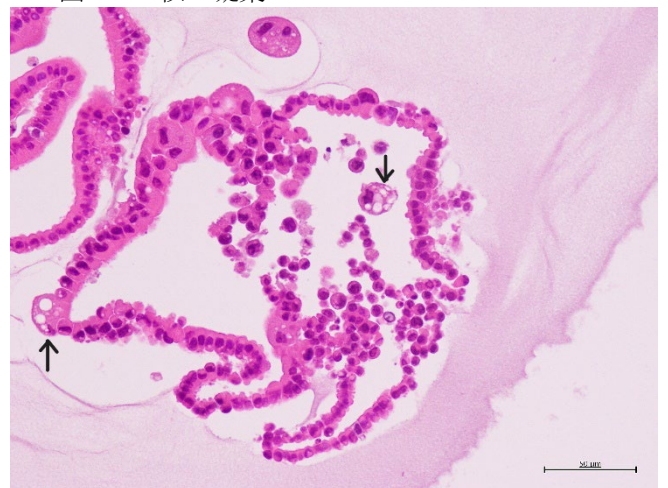


図 5-7. 空胞

上記の図 5-1～5-6 までの各形態変化を有す細胞数を全細胞数で割った結果を図 6 に示す。

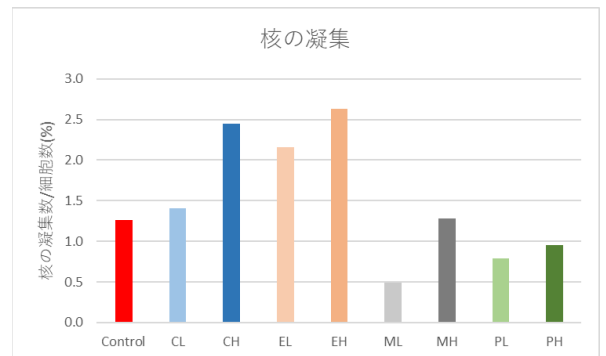
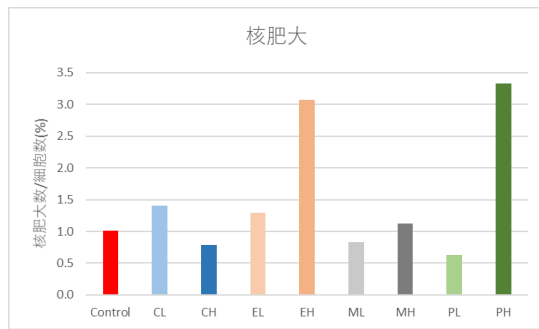
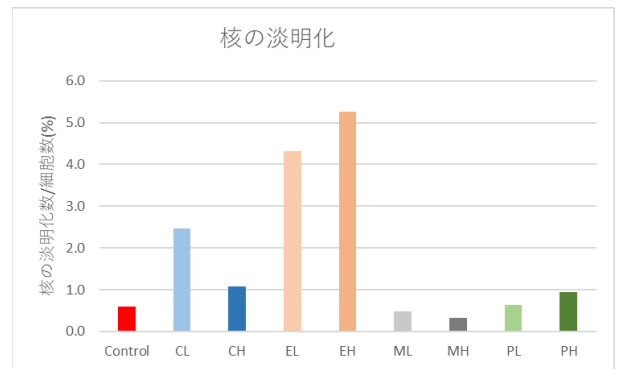
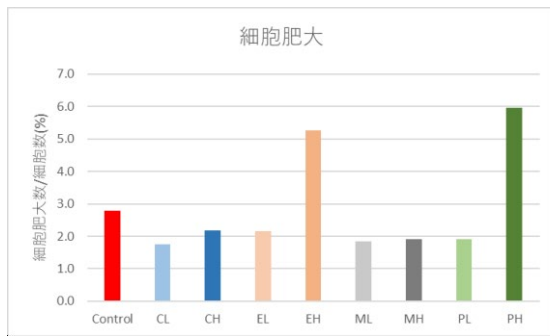


図 6. 形態変化を示した細胞の割合の比較

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 7 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、現当施設では評価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。

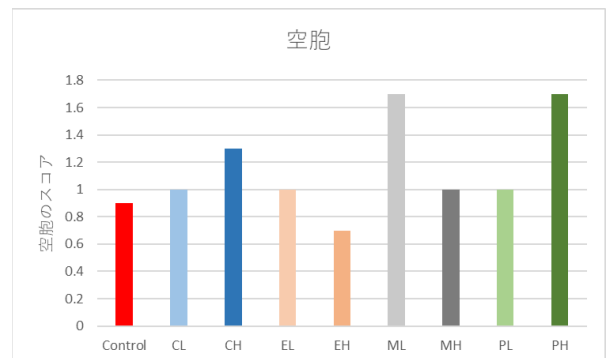
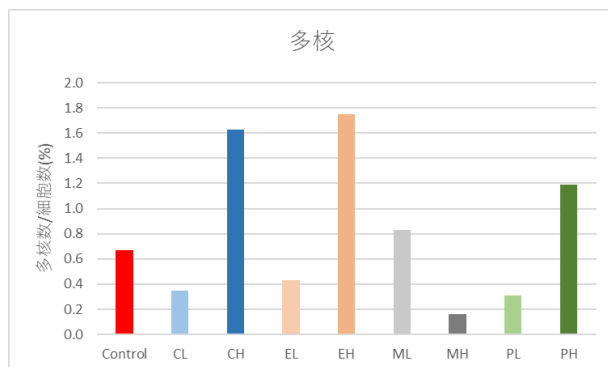
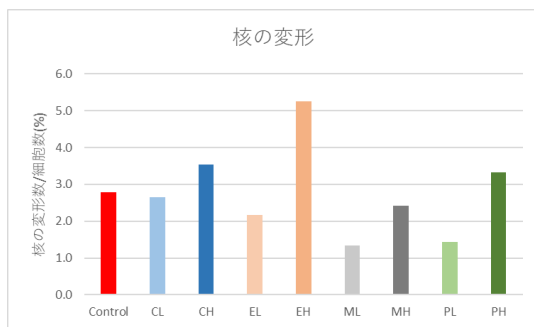


図 7. 空胞化を有する細胞スコアの比較

以上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。

⑤ 小核試験：

化学物質を曝露させた結果、図8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では曝露により出現頻度が上昇していた（図9）。APAPは、細胞毒性が見られなかった低濃度曝露では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。

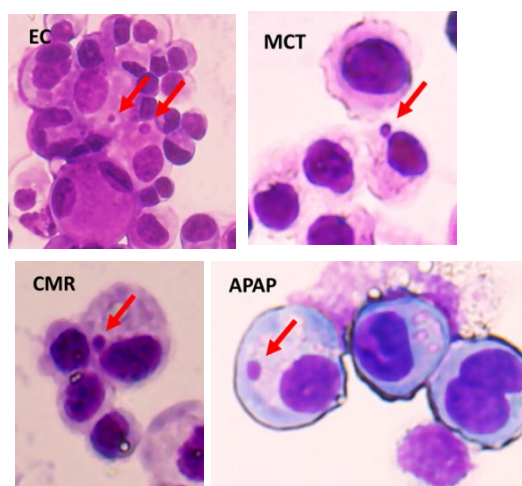


図8. 化学物質曝露による出現した小核

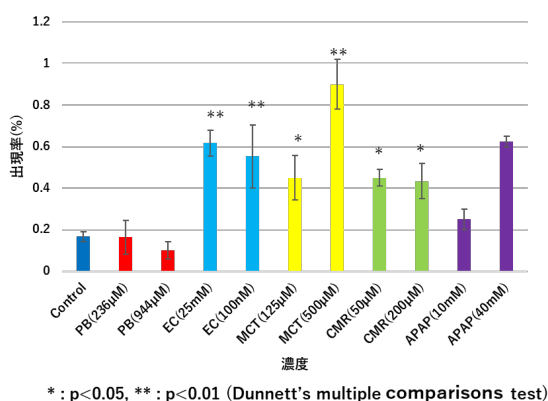


図9. 小核出現頻度

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析：

小核試験で最も強く陽性となった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10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11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である。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。

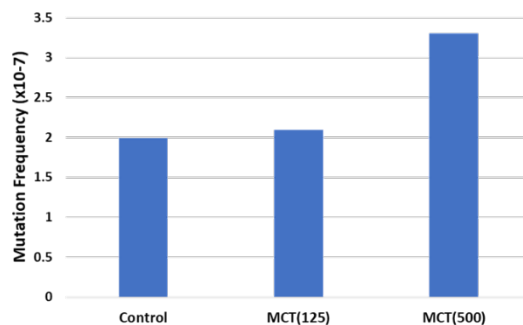


図10. 1塩基置換変異頻度

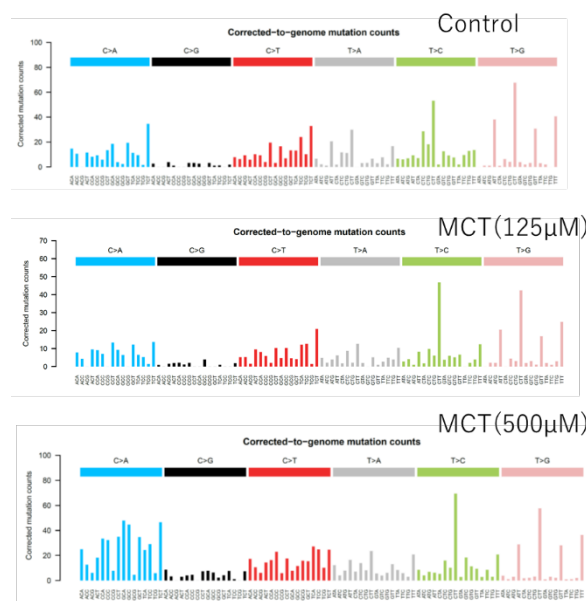


図11. Error-Corrected NGS (Nano-Seq)による変異シグネチャーパターン

D. 考察

① 培養・化学物質曝露実験方法の検討：

OGMを用いた培養では1:30の播種密度で1週間毎に継代を行うことで長期培養が可能であったが、調製培地の場合、OGMと同じ播種密度で培養すると増殖性が低下していったため、オルガノイドを観察し継代間隔と播種密度を決める必要があった。培養方法は、MBOC法を用いた培養でも播種量を多くすることで培養の維持が可能であると推察されたが、ドーム型培養のほうが、少ない播種量でも安定して増殖していた。また、ドーム型培養で播種し、1週間程度経過したオルガノイド数は1wellあたり1~5×10⁵個程度であり、24well plateを用いたドーム型培養でも、種々の実験に対応可能な細胞数を得ることができると考える。シングルセル化の方法は、STEMCELL TechnologiesはTrypLEを推奨していることから、成分が似ているトリプシンの使用がよいと考える。化学物質曝露実験は、これまでにマウス由来の肝臓

オルガノイドに曝露実験を行ったことがあるEMSを用いた。ドーム型培養法においてもMBOC法と同様に、濃度依存的に細胞毒性が示され、ドーム型培養法でも曝露実験が可能であると考えた。また評価方法については、細胞数計測法、発光測定法のいずれでも評価可能であったが、本課題では比較的操作が容易な細胞数計測法で細胞毒性試験を行うことを決定した。

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。

③ 細胞毒性試験：

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。その結果、濃度依存的に細胞生存率の低下が確認され、その後の実験に使用する各化学物質の曝露濃度の決定を行うことができ、確立したプロトコルの妥当性も確認できた。S9mixを添加していない曝露実験においても、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いるか、曝露により代謝酵素が誘導され、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。

④ 細胞形態変化評価：

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り、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。

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が示唆された。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 12)。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12. 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

⑥ Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

小核試験で最も強く陽性となった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。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せた意義は大きいと考える。

E. 結論

マウス肝臓オルガノイド (STEMCELL Technologies, ST-70932) の培養ならびに化学物質曝露実験方法は、培地に OGM (STEMCELL Technologies, ST-06030) を用いマトリゲルとオルガノイドを混ぜてドーム状に播種する培養方法で行い、シングルセルにする酵素はトリプシンを用いることにした。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、同一プロトコルを用いて培養した際に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。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。

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

1. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol*. (2022) Sep 19;35(9):1625-1630.
2. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, **Totsuka Y**, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. (2022) Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. *In Vivo*. (2022) Mar-Apr;36(2):628-634.
3. 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*. (2024) 14:36.
4. 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.
5. 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.
6. 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

1. **Yukari Totsuka** Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 12th AACR-JCA Joint Conference (2022 年 12 月、マウイ-ハワイ、米国)
2. **戸塚 ゆ加里**, 小宮雅美, 永井桃子, 加藤 護, 松田知成 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 35 回 発癌病理研究会 (2022 年 11 月、新潟)
3. 帯金明日香, 小宮雅美, 鈴木 周五, 魏民, 鰐渕 英機, **戸塚 ゆ加里** 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析 第 51 回 環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
4. 坪井理, 植嶋亜衣, 久富優太, 小田美光, 恒松雄太, 佐藤道大, 平山裕一郎, 三好規之, 岩下雄二, 吉川悠子, 相村春彦, **戸塚 ゆ加里**, 若林敬二, 渡辺賢二, 川西優喜 DNA 鎖間架橋修復欠損細胞を用

- いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価 第 51 回 環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
5. 戸塚ゆ加里、集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 1 回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022 年 11 月、東京)
 6. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護 Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
 7. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里 Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
 8. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木 周五、魏民、鰐淵 英機、戸塚 ゆ加里 Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer 第 81 回癌学会 (2022 年 9 月、横浜)
 9. Yukari Totsuka New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer 13th ICEM (2022 年 8 月オタワ・カナダ)
 10. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines 13th ICEM (2022 年 8 月オタワ・カナダ)
 11. 小宮 雅美、鈴木 周五、魏民、鰐淵 英機、戸塚 ゆ加里 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析 第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月 京都)
 12. 小林 琢磨、豊田 武士、吉岡 泰淳、岸本 真治、松下 幸平、赤根 弘敏、小川 久美子、渡辺 賢二、高村 岳樹、戸塚 ゆ加里、若林 敬二、三好 規之 細胞毒性を有する o-Toluidine と o-Anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する 第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月 京都)
 13. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望 第 49 回日本毒性学会 (2022 年 6 月 札幌)
 14. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆ加里、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)
 15. Totsuka Y. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023 年 9 月、シカゴ・米国)
 16. 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)
 17. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆ加里、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)
 18. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、戸塚ゆ加里、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)
 19. 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)
 20. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、戸塚ゆ加里、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クタクト探索、第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
 21. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、戸塚ゆ加里、アルコール発がんにおけるドライバークタ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)
 22. 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)
 23. 戸塚ゆ加里、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)
 24. 戸塚ゆ加里 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)
 25. 戸塚ゆ加里、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
 26. 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
 27. 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
 28. 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)
 29. 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
 30. 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
 31. 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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
36. 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トマ
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
37. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤
護、魏 民、鈴木周五、鰐渕英機、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
38. 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
39. 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐渕 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