

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合分担研究報告書

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)

分担研究項目：毒性評価・ゲノム発現解析

研究分担者 藤岡 正喜 大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学 講師

研究要旨

化学物質の安全性評価には動物実験が必要とされるが、動物愛護の観点から代替法の開発が求められている。本研究では、オルガノイドを用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価方法の開発を目指した。マウス肝臓オルガノイドに対して Phenobarbital Sodium、Ethyl Carbanate、Monocrotaline、Coumarin を用いて研究を実施した結果、4 物質で共通して発現変動がみられた 9 つの遺伝子が同定された。そのうち、非肝発がん物質で発現変動がみられなかった 5 つの遺伝子 (C1s, Ighv5-12, Or9i14, Scgb2b27, Vmnlr195) は、本研究で用いられた肝発がん物質に特異的な変動を示すことが明らかになった。さらに、Tox Function 解析の結果、肝発がん物質では Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測されたことから、炎症に起因する疾患に関連する機能の亢進が示唆された。さらに、マウス 4 週間および 13 週間ばく露試験との相関解析を行った結果、マウス 4 週間および 13 週間ばく露試験においても、Hepatic steatosis 関連パスウェイの活性が予測された。さらに、炎症誘導や肝細胞の再生誘導に関連するパスウェイが肝オルガノイドおよびマウス肝臓の双方で変動していることが確認できた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo* 試験で得られた結果と相関することが確認できた。

A. 研究目的

マウス肝臓オルガノイドに既知の肝発がん物質をはじめとした被験物質をばく露し、その遺伝子発現変化について検討することで、化学物質の毒性の有無およびその機序について予測可能かどうか、検討を行った。

さらに、同様の被験物質を 4 週間あるいは 13 週間投与し得られたマウス肝臓を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、マウス肝臓オルガノイドと比較検討することで、*in vivo* (マウス肝臓) および *in vitro* (マウス肝臓オルガノイド) における相関性について検討を行った。

B. 研究方法

〔材料と方法〕

本研究で使用した被験物質について、下記に記す。

- ・Phenobarbital Sodium (PB) (CAS RN : 57-30-7)
- ・Coumarin (CMR) (CAS RN : 91-64-5)
- ・Acetoaminophen (APAP) (CAS RN : 103-90-2)
- ・Monocrotaline (MCT) (CAS RN : 315-22-0)
- ・Ethyl Carbanate (EC) (CAS RN : 51-79-6)

上記化学物質を用いて、加えて、PB、CMR、MCT オヨビ EC をそれぞればく露させたマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を星薬科大学 戸塚教授より供与いただいた。受領した mRNA を *in vitro* マウス肝臓 mRNA として用いて以降に記す解析を行った。さらに、4 週間 (PB、APAP) あるいは 13 週間 (CMR) マウスに投与した肝臓を東京農業大学 美谷島教授より供与いただいた。受領した肝臓より mRNA を抽出し、*in vivo* マウス肝臓 mRNA として、以降に記す解析を行った。

〔網羅的遺伝子発現解析〕

回収したマウス肝臓オルガノイド由来 mRNA のうち、対照群および高用量群をそれぞれ用いて (計 8 検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに *in vivo* マウス肝臓由来 mRNA のうち、PB、CMR および APAP 投与群における対照群および高用量群をそれぞれ用いて (計 5 検体)、Clariom™ D Assay, Mouse (ThermoFisher) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Expression Console™ を用いて、数値化および正規化を行った。アルゴリズムは、SST-RMA を用いた。Annotation Level は、(Exon Level ではなく) Gene Level とした。得られた遺伝子発現パラメータを用いて Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて、パスウェイ解析及び各被験物質ばく露による影響について検討を行った。

加えて、昨年度実施したマウス肝臓オルガノイドを用いたマイクロアレイおよびパスウェイ解析で得られたデーターを用いて、*in vivo* および *in vitro* 双方でどのような影響がみられたか、検討を行った。

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

in vitro マウス肝臓オルガノイド由来 mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果 (表1)、PB 投与において発現量比 1.50 以上の遺伝子は 83、0.66 以下の遺伝子は 228 であった。同様に、CMR 投与において発現量比 1.50 以上

の遺伝子は187、0.66以下の遺伝子は132であった。またMCT投与において発現量比1.50以上の遺伝子は108、0.66以下の遺伝子は186であった。EC投与において発現量比1.50以上の遺伝子は261、0.66以下の遺伝子は544であった。IPAソフトウェアによるTox Functions結果、肝発がん物質(PB、CMRおよびMCT)で共通して活性化が予測され、かつ遺伝毒性非肝発がん物質(EC)において不活性化が予測された機能として、Hepatic steatosis、Conjugation of glutathioneが挙げられた。さらに、肝発がん物質(PB、CMR、MCT)で共通して発現変動がみられた遺伝子として、C1s、Fabp2、Gm20826、Ighv5-12、Mir3079、mir-467、Or9i14、Scgb2b27およびVmn1r195の9つが同定された。そのうち、非肝発がん物質(EC)で発現変動がみられなかった、すなわち本研究に用いた3つの肝発がん物質特異的な変動を示した遺伝子として、C1s、Ighv5-12、Or9i14、Scgb2b27およびVmn1r195が同定された。さらに共通変動遺伝子でネットワーク解析した結果、肝発がん物質共通上流因子としてHNF4A (hepatocyte nuclear factor 4A) が同定された。

鰐渕班研究で構築された遺伝毒性肝発がん物質検出モデルおよび非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルにて、検討を試みた結果、4物質いずれもNegativeの結果となった。

表1 *in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)における網羅的遺伝子発現解析の結果

	物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝発がん物質	モノクロタリン (MCT)	1.50 以上	108
		0.66 以下	186
	クマリン (CMR)	1.50 以上	187
		0.66 以下	132
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	83
		0.66 以下	228
遺伝毒性非肝発がん物質	カルバマゼピル (CBZ)	1.50 以上	261
		0.66 以下	544

*in vivo*マウス肝臓mRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果(表2)、CMR投与において発現量比1.50以上の遺伝子は305、0.66以下の遺伝子は213であった。同様に、PB投与において発現量比1.50以上の遺伝子は398、0.66以下の遺伝子は302であった。またAPAP投与において発現量比1.50以上の遺伝子は341、0.66以下の遺伝子は318であった。IPAソフトウェアによるTox Functions解析の結果、3つの物質 (CMR、PBおよびAPAP) で共通して活性化が予測された機能として、Conjugation of glutathioneが挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMRおよびPB、MCTの3つで共通して変動がみられた機能である。同様に、不活性化がみられた機能としてCell death of liverが挙げられた。

3つの化学物質ばく露で共通して変動がみられた遺伝子として55の遺伝子が同定され、KEGG_PATHWAY解析の結果、P450を介した代謝や異物代謝シグナル、活性酸素種(ROS)の産生に関わるシグナルに関連する遺伝子であることが明らかとなった。また3物質に共通する上流遺伝子について、Upstream regulator解析を実施した結果、

NR1/3やNR1/2、AHRなどの異物代謝に関わる遺伝子の活性化が確認できた。また、肝発がん物質であるCMRおよびPBに共通する遺伝子セットについてTox Functions解析した結果、Hepatic steatosisの活性化が挙げられた。これは昨年度に実施した*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおいて肝発がん物質であるCMR、PBおよびMCTの3

表2 *in vivo*(マウス肝臓)における網羅的遺伝子発現解析の結果

	物質名	Expression ratio (かつ Z score > 2)	遺伝子数
遺伝毒性肝発がん物質	クマリン (CMR)	1.50 以上	305
		0.66 以下	213
非遺伝毒性肝発がん物質	フェノバルビタール (PB)	1.50 以上	398
		0.66 以下	302
非遺伝毒性非肝発がん物質	アセトアミノフェン (APAP)	1.50 以上	341
		0.66 以下	318

つで共通して変動がみられた機能と一致する結果である。

*in vitro*マウス肝臓オルガノイドにおける網羅的遺伝子発現解析との比較の結果、PB投与においては共通して発現変動を示すシグナルとして、Liver Regeneration、Inflammation liver、Hepatic steatosisがみられ、*in vivo*(マウス肝臓)で得られた結果と*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)が良好に一致することが示された。一方、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。さらに、*in vivo*(マウス肝臓)および*in vitro*(マウス肝臓オルガノイド)の両方で発現が確認できた遺伝子(PBでは30遺伝子、CMRでは31遺伝子)について相関解析を実施した結果、PBでは0.142、CMRでは0.386と弱い正の相関が得られた。加えて、PBではHepatocellular carcinoma関連シグナルに属する遺伝子について相関解析を行った結果、0.516と正の相関が得られた。以上の結果から、マウス肝臓オルガノイドで得られた知見は、*in vivo*試験で得られた結果と関連することが確認できた。

D. 考察

本研究では、マウス肝臓オルガノイドに対して肝発がん物質あるいは非肝発がん物質の添加による影響について、網羅的遺伝子発現解析による比較解析を行うことで、*in vivo*マウス急性毒性試験の代替法となり得るかについて検討を行った。マウス肝臓オルガノイドに被験物質を投与した際に、肝発がん物質特異的にHepatic Steatosisなどの炎症に起因する疾患の機能が亢進している事が明らかとなった。*in vivo*マウス肝臓を用いて比較検討を行った結果、P450を介した代謝や異物代謝誘導系、グルタチオン抱合の亢進などが共通してみられた。特に、PBばく露マウス肝臓と肝臓オルガノイドの比較では、肝傷害やそれらに伴う再生の亢進が、*in vitro*および*in vivo*の双方で共通して発現変動することが確認できた一方で、CMR投与においては共通して発現変動を示すシグナルはみられなかった。しかしながら、CMR投与において*in vitro*において活性化

が示されたNecrosis of liverが*in vivo*では不活性化を示していることから、肝臓オルガノイドにおけるNecrosis of liverの活性化に伴う炎症誘導について、今後マウス組織由来オルガノイドおよび免疫/間質細胞との共培養系を用いることで、例えば肝細胞と肝星細胞との相関や肝細胞とクッパー細胞との相関など、より生体を模倣した影響が評価できると期待される。

E. 結論

本研究により、化学物質にばく露したマウス肝臓オルガノイドにおいて、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、*in vivo*マウス肝臓と同様に炎症関連シグナルの誘導やHepatic steatosisの亢進が観察できることが示唆された。また、マウス肝臓オルガノイドにおける化学物質ばく露による影響が弱いことが予想される場合には、マウス肝臓オルガノイドに加えて免疫/間質細胞共培養系を実施することで、炎症応答による再生の誘導などが観察できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA methylation aberrations in dimethylarsinic acid-Induced bladder carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2023;15, 5274.
- 2) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*. 2023; 488:153483.
- 3) Imai K, Niwa R, Fujioka M, Ito K. Understanding the quality and safety of food production through the lens of The Microbiome of The Built Environment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2023;0, 1-6
- 4) Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J. Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 2023; 128(12):2197-2205.
- 5) 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* 2023; 14(1).

- 6) Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett*. 2023; 384:128-135.
- 7) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol*. 2023; 36, 123-129.
- 8) Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. *Arch Toxicol*. 2024; 98: 2711-2730.
- 9) Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arch Toxicol*. 2024; 98: 2065-2084.
- 10) Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. *Toxicol Sci*. 2024; 202: 210-219.
- 11) Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38: 59-67.
- 12) Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product ploomTECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38: 147-54.
- 13) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38: 161-5.

2. 学会発表

- 1) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐渕英機. 遺伝毒性肝がん物質の超短期検出モデルの確立. 第97回日本産業衛生学会、広島(2024年5月22-25日)

- 2) 鈴木周五、藤岡正喜、魏民、アルパマス ワチラアルンウオン、梯アンナ、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸経胎盤ばく露肝発がんにおける脂質代謝異常の関与. 第20回日本病理学会カンファレンス、山形 (2024年6月26-27日)
- 3) Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in Rat. 第51回日本毒性学会学術年会、福岡 (2024年7月3-5日)
- 4) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. ヒト化肝臓マウスモデルを用いたヒ素の代謝および毒性の評価. 第37回発癌病理研究会、鳥取 (2024年8月20-22日)
- 5) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露によるF1マウスにおける肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する. 2024年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、愛知 (2024年8月29-31日)
- 6) 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、鈴木周五、野浦郁恵、アルパマス ワチラアルンウオン、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカーとしてPRDX3の検討. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 7) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、Vachiraarunwon Arpamas、大石裕司、邱桂鈺、Praseatsook Kwanchanok、郭潤傑、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の交配前期、交配期、妊娠期および授乳期ばく露による仔ラットに対する発がん性の検討. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 8) Arpamas Vachiraarunwon, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 9) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon、梯アンナ、鰐渕英機. *o*-Toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変に対するNADPH酸化酵素阻害剤apocyninの抑制効果. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 10) Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwon, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 11) 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、郭潤傑、梯アンナ、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質の超短期検出モデルの確立. 第83回日本癌学会学術総会、福岡 (2024年9月19-21日)
- 12) 藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐渕英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の *in vitro* 投与量設定法の開発. 第51回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、東京 (2024年12月20日 11月8-9日)
- 13) 邱桂鈺、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、梯アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるF1ラット海馬神経新生に及ぼす影響. 第29回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024年12月7-8日)
- 14) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、ワチラルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露によるF1マウス肝発がん機序におけるDNAメチル化異常の関与. 第29回ヒ素シンポジウム、徳島 (2024年12月7-8日)
- 15) 梯アンナ、鈴木周五、西土井悠作、邱桂鈺、Vachiraarunwon Arpamas、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膵管癌における新規マーカーとしての3の解析及び発がん機序解明. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
- 16) Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Anna Kakehashi, Arpamas Vachiraarunwong, Ikue Noura, Runjie Guo, Hideki Wanibuchi. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日) ワークショップ
- 17) Masaki Fujioka, Min Gi, Shugo Suzuki, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi. Lack of carcinogenicity of diphenylarsinic acid in F1 rats following maternal exposure from pre-mating to Lactation. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
- 18) Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Runjie Guo, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Hepatotoxicity of per- and polyfluoroalkyl substances on immortalized human hepatocytes. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡 (2025年1月30-31日)
- 19) Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder

carcinogenesis in rats. 第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会、静岡（2025年1月30-31日）

- 20) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスを用いた 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)のヒト化肝細胞での代謝と膀胱発がん性の検証. 2024年度文部科学省学術変革領域研究学術研究支援基盤形成先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、滋賀(2025年2月12-13日)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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。