

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

研究分担者 成瀬 美衣 国立感染症研究所 主任研究員

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。カルバンサンエチル (EC)、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エピゲノムを指標とした化学物質の新規 *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。

① オルガノイドへのカルバミン酸エチル (EC) 処置
樹立したC57BL/6J背景p53(+/-)マウスの肺オルガノイドを融解、培養を行い使用した。オルガノイドはAccutase処置により細胞を分散させ、さらに40 μ mのフィルターを通し、細胞数測定を行い、マトリゲル (Corning) をゲル状にしてひいた12well plateに 1×10^5 細胞/well播種した。2時間静置後、対照群(0 mM)、低用量(2.5mM)、高用量(10mM)を50 μ g/mlのS9 mixと共に添加し、5% CO₂, 37度のインキュベーターで24時間処置した。24時間後、化学物質を含む培地を除去し、マトリゲルを被せて培養した(サンドイッチ法)。これを1週間に一度3回繰り返した。

②EC処置オルガノイドのメチル化解析

EC 3回処置後 (0mM, 2.5mM, 10mM, 各N=2) 96時間のオルガノイドをCell Recovery Solutionによりマトリゲルを溶解し、細胞塊として回収しDNA抽出を行った。メチル化解析はRRBS法 (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) を用いた。DNAを精製し、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したものをバイサルファイト処理し、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PCR増幅したものを、次世代シーケンスを行い、Bismarkを用いたアライメント及びMethylKit Analysisによるメチル化解析を行い、対照群に対するメチル化率の変化の同定を行った (q-value<0.01, % methylation difference >25%)。同定した候補はIGV(Intergrative Genomics Viewer)を用いて確認を行った。

③オルガノイドへのフェノバルビタール (PB) 処置

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。

④PB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法を用い、②と同様に行なった。

⑤PB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と同様の手順で行なった。

⑥肝臓オルガノイド-間質細胞の共培養系の構築

オルガノイドについては研究代表者から分与を受けた Mouse Hepatic Organoids (STEMCELL Technologies ST-70932)、間質細胞の1つとして、理研BRCより不死化クッパー細胞の提供を受けた。共培養法については、コンパニオンプレートに、インサート (1.0 μ mメンブレン) (Corning) を組み合わせる非接触型を用い、どちら側にもどちらの細胞を播種するか、また共培養時の培地の条件、オルガノイド培地: HepatiCult Organoids Growth Medium (Mouse)、クッパー細胞培地: DMEM (high glucose)+10% FBS+bovine Insulin 10 μ g/ml+monotioglycerol 250 μ Mを用い、観察及びcell titer gloを用いた生細胞数の測定を行い条件検討を行なった。

(倫理面の配慮)

動物を用いるオルガノイド樹立実験は、国立がん研究センター研究所で行なっており、「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従って行った。動物福祉並びに動物実験倫理の観点から、適切なエンドポイントを設定し、安楽死させることにより苦痛軽減に配慮した。

C. 研究結果

①EC処置オルガノイドのメチル化解析

EC 3 回目処置後 (0mM, 2.5mM, 10mM, 各 N=2) 96 時間のオルガノイドのRRBS解析によるメチル化解析を行った。ゲノムを1kbの領域に分けた解析では、EC 0mM 3 回処置オルガノイドと10mM 3 回処置オルガノイドとの間で、メチル化変化領域は30箇所と非常に少なかった。IGVによる確認を行い、発現に影響を与える可能性の高いメチル化変化領域は同定されなかった。1塩基単位でのメチル化変化部位についてはメチル化低下、メチル化増加の両者に2000箇所程度の候補箇所があり、IGVによる確認においても、メチル化の変化があることが確認できた。また、染色体全体において、EC処理によりメチル化が亢進する傾向が見られた。

② 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。

③ 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。

④ 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検体を除く解析も行なったが、同様に一致する領域はなかった。

⑤ 肝臓オルガノイドと間質細胞の共培養系の構築

コンパニオンプレートとインサート (1.0 μ mメンブレン) を組み合わせる非接触型の共培養システムを行なった。検討の結果、コンパニオンプレート側にオルガノイドのドームを作ると、10 μ l までマトリゲル量を減らしてもインサートに接触することがわかった。したがって、コンパニオンプレート側にクッパー細胞を接着培養することにした。同時に、インサート側のメンブレン上にクッパー細胞を接着させた場合、細胞増殖が一定になりづらく、やはり間質細胞をコンパニオンプレート側に培養するのが適していた。一方インサート側にオルガノイドを培養することは、オルガノイドの増殖には影響しない。培地については、共培養開始前の細胞播種時にはそれぞれ細胞に適した培地を用いることが可能であるが、共培養開始時から培地を共通なものにする必要がある。検討の結果、クッパー細胞培地: DMEM (high glucose)+10% FBS+bovine Insulin 10 μ g/ml+monotioglycerol 250 μ Mにした場合、オルガノイドの増殖が著しく低下するが、逆にオルガノイド培地に合わせた場合、クッパー細胞は至適培地で培養時と

同等に増殖し、共培養可能であった。

D. 考察

ECの *in vitro* 処置により、マウス肺オルガノイドに1塩基レベルのメチル化変化が生じることを明らかにした。領域でのメチル化変化ではないため、既報にあるような遺伝子発現に影響を与えるかどうかについてはさらに検証を必要とする。染色体レベルでEC処置による亢進傾向が見られており、EC処置の回数を増やすことなどで、メチル化変化領域が同定される可能性もあると考える。

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル化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回目暴露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。

また、化学物質による毒性、発がん性は共存する間質細胞に依存することが報告されており、*in vitro*系で共培養を行うことで、異なった結果が出るかどうかの検証が必要である。インサートを用いた肝臓オルガノイドとクッパー細胞の共培養法の構築が進んでおり、それぞれの細胞の特性解析等を行い、より*in vivo*に近い*in vitro*系のさらなる開発も必要であると思われる。

E. 結論

In vitro 評価系において、EC処置により1塩基レベルのメチル化変化及び染色体全体でメチル化の亢進が起こることをRRBS解析により同定した。検証やデータの蓄積がさらにならなければならないが、*in vivo*で同様のことが起こっている場合、*in vitro* 化学物質評価系における指標となり得る。

PB処置による肝臓由来オルガノイド(*in vitro*)と肝臓(*in vivo*)のメチル化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. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai T, et al. Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett.* May

23;24(1):221.

2. Ishigamori R, et al. The potential of organoids in toxicologic pathology: Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J Toxicol Pathol.* 2022 Jul;35(3):211-223.

3. Imai T, et al. Feeding a High-Fat Diet for a Limited

Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer.* 2022 Oct 20:1-13.1.

4. Imai, T. Naruse, M. Machida, Y. Fujii, G. Mutoh, M. Ochiai, M. Takahashi, M. Nakagama, H. Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer.* (2023) 75: 713-725

5. 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.

6. 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. 今井俊夫、石ヶ守里加子、成瀬美衣：オルガノイドを用いる化学発がんモデルによる発がん早期過程の分子機序解析。第81回日本癌学会学術総会（2022年9月、横浜）

2. Mie Naruse, Hiroe Nozaki, Toshio Imai, Kassai Hidetoshi, Ryuichi Ono; Faithful DNA methylation status of imprinted DMRs in colon-derived organoids. 第50回日本毒性学会学術年会（2023.6 横浜）

3. Mie Naruse; Analysis using organoids derived from colorectal cancer patients and paired CAFs. The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (2023.7. Taiwan)

4. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、葛西秀俊、今井俊夫；大腸癌手術余剰検体由来のオルガノイドおよびCAFを用いたエピゲノムマーカーの探索。第82回日本癌学会学術集会（2023.9. 横浜）

5. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊；大腸がんにおけるがん-間質細胞相互作用を再現する*in vitro*実験系の構築。第46回日本分子生物学会年会（2023.12. 神戸）

6. 成瀬美衣、関根茂樹、野崎弘枝、今井俊夫、葛西秀俊；大腸がん患者由来オルガノイドと同一症例由来線維芽細胞の共培養系を用いる評価系の確立。日本薬学会144年会(2024.3. 横浜)

7. 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)

G. 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