

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 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、①既存の細胞を使用した一次線毛の発現状態および条件の確認、②各種の発がん物質処理を施したラット肝臓およびマウス肝臓オルガノイドでの一次線毛の発現状態および条件の確認、③対象物質による細胞株、オルガノイドによる毒性評価の解析を目的とした。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。

前立腺癌細胞 PC-3、膵癌細胞 Panc-1 では、通常培養では、primary cilia は発現しておらず、前立腺癌 DU-145 において primary cilia はわずかに発現していた。

ラット発がん物質処理の肝臓で肝細胞に一次線毛は観察されなかったが、胆管上皮細胞の一次線毛発現は、各種発がん物質でシグナルが減弱し、陽性細胞の減少が認められた。

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ところ、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

化学物質の開発には、実験動物を用いた安全性評価が必要とされ、その結果が重視されている。一方、動物愛護3Rs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細胞を用いた *in vitro* 毒性試験は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。

また、分担研究者らは一次線毛は細胞膜上の突起物で、細胞内シグナルのハブと認識され、腫瘍細胞では発現が消失するなど各種生命現象への関与を報告している。

半永久的に突出する構造体ではなく、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毒性評価に応用されていない一次線毛に着目し、化学物質と一次線毛との分子生物学的関連性および共培養系およびオルガノイドにおける細胞病理学および機能解析を行い、一次線毛の発がん予測、安全性評価法構築への応用を目的とする。

B. 研究方法

1) 各癌細胞株の一次線毛の免疫染色：ヒト膵臓癌細胞株 panc-1、ヒト前立腺癌細胞株 DU-145、PC-3 を選択した。細胞株は JCRB 細胞バンクより入手した。それぞれの細胞株は対応する添加物を加えた培養液を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 % 加湿インキュベーターで培養した。免疫細胞染色は、一次抗体（抗 ARL13B 抗体）、対比染色（DAPI）を行った。

2) 発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いた一次線毛の免疫染色：鱈鰯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を構成するタンパク質（抗 ARL13b 抗体）に対する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。

3) 発がん性化合物処理のマウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛およびその構造体の免疫染色：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

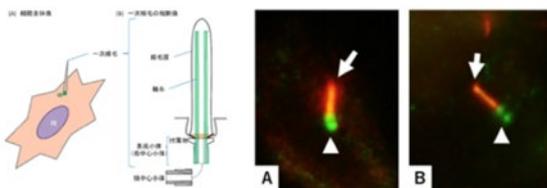


図1. 一次線毛について

本研究班の目的は、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を目指す。また、一次線毛発現と既存の各種細胞株との関係を解明し、オルガノイドを用いた新規評価系の有用なエンドポイントとなり得るかどうかについても検討を行う。近年、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、ヘッジホッグ (Hh)、Wnt、Notch、mTOR、受容体型チロシンキナーゼ (RTK)、Hippo シグナル伝達系が関わる。また、一次線毛は、

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

1) 各癌細胞株の一次線毛の免疫染色

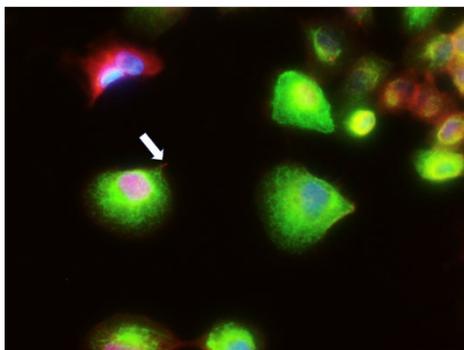


図2. DU-145におけるprimary ciliaの発現

PC-3、Panc-1では、通常培養では、primary ciliaは発現しておらず、DU-145においてprimary ciliaはわずかに発現していた。

2) 発がん性化合物被曝ラットの肝臓組織標本を用いた一次線毛の免疫染色

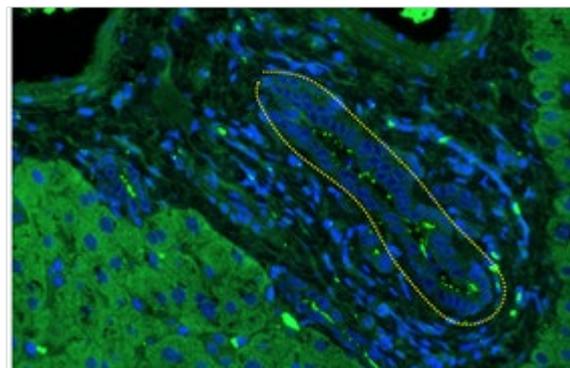


図3 無処理肝臓の一次線毛

黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が多数見られる。

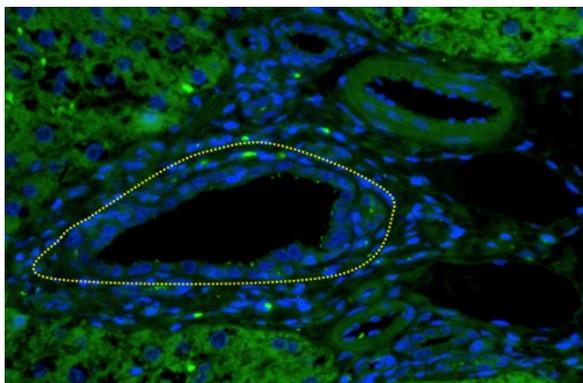


図4 2-Nitropropane処理肝臓の一次線毛

黄色点線で囲った胆管上皮細胞の管腔側にドット状の一次線毛が見られる。シグナルは無処理肝臓と比較して減弱し、陽性細胞は減少している。

3) 発がん性化合物処理のマウス肝臓オルガノイドを用いた一次線毛およびその構造体の免疫染色

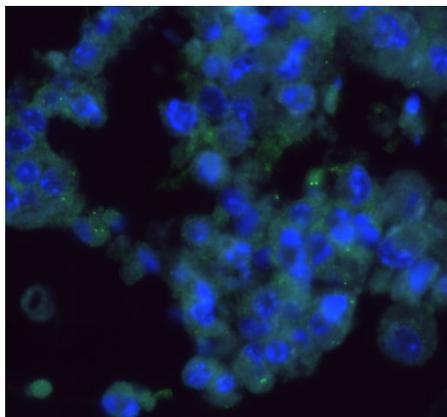


図5 コントロール (DMSO) オルガノイドの中心小体

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。

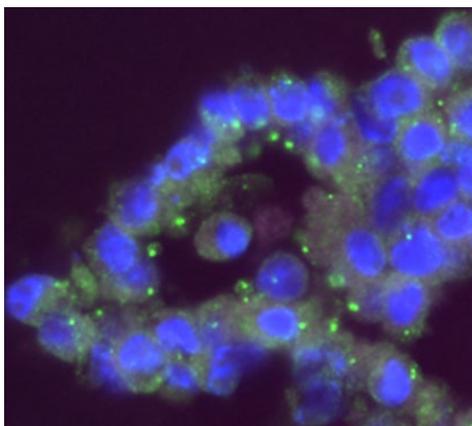


図6 フェノバルビタール (低濃度) オルガノイドの中心小体

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。

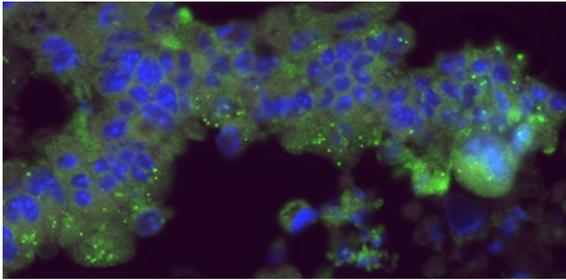


図7 フェノバルビタール（高濃度）オルガノイドの中心小体

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。

D. 考察

今回用いた癌細胞株の通常培養では、一次線毛はほとんど発現していなかったが、文献[Cell Biol Int, 39, 1341-47, 2015; Mol Cells, 41, 224-33, 2018; EMBO Rep, 18, 334-43, 2017; Cell Rep, 23, 3042-55, 2018]では、HeLa 細胞、MG63、NIH3T3 細胞での発現は報告されており、A549 細胞では薬剤処理で、薬剤耐性を獲得するとともに、一次線毛発現すると報告されている。一次線毛は密接に細胞周期と関わるため、細胞培養環境が必要であり、またその形質が変化することより、毒性評価への応用の可能性は十分あると考えられる。薬物や毒物などにより障害をうけた肝臓では、成熟した肝細胞自体の増殖が阻害される。このとき、未分化性をもつ特殊な肝前駆細胞の活性化が誘導され、これが増殖および分化することにより新たに細胞を供給し再生が行われると考えられている。一次線毛は静止期の細胞に出現することから、薬物投与後に出現する活性化肝前駆細胞には一次線毛がむしろ出ていないと推測される。発がん総論的には増殖期の細胞が障害を受ければ遺伝子異常の頻度高まり、細胞が形質転換する確率が上がるので、一次線毛陰性の活性化肝前駆細胞を定量すれば、化学発がんの評価につながると考えられる。

オルガノイドの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と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Semba R, Uchida K, Hirokawa Y, Shiraishi T, Onishi T, Sasaki T, Inoue T, Watanabe M, Miyamoto H. A simple risk stratification model for prostate cancer using histopathologic findings of radical prostatectomy. Am J

Clin Pathol. 2024 May 5;aqae049. doi: 10.1093/ajcp/aqa e049.

2. Leventoux N, Morimoto S, Ishikawa M, Nakamura S, Ozawa F, Kobayashi R, Watanabe H, Supakul S, Okamoto S, Zhou Z, Kobayashi H, Kato C, Hirokawa Y, Aiba I, Takahashi S, Shibata S, Takao M, Yoshida M, Endo F, Yamanaka K, Kokubo Y, Okano H. Aberrant CHCHD2-associated mitochondriopathy in Kii ALS/PDC astrocytes. Acta Neuropathol. 2024 May 15;147(1):84. doi: 10.1007/s00401-024-02734-w.

3. Takeuchi Y, Wang Y, Sasaki K, Sato O, Tsuchikawa T, Wang L, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Hirokawa Y, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Kato T, Shiku H, Hirano S. Exhaustion, rather than lack of infiltration and persistence, of CAR-T cells hampers the efficacy of CAR-T therapy in an orthotopic PDAC xenograft model. Biomed Pharmacother. 2024 Jan;170:116052. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116052. Epub 2023 Dec 22.

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