

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

3次元培養系と次世代シーケンサーによる変異解析手法（ec-NGS）を組み合わせた
化学物質の遺伝毒性評価法の開発
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
に関する研究

研究代表者 戸塚 ゆかり 星薬科大学 教授

研究要旨

今年度は、実験動物を用いた安全性評価の 3Rs 推進とヒト外挿性の向上を目指し、マウス肝細胞由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性評価系の構築、およびヒト型代謝活性化系の導入に向けた検討を行った。初期 DNA 損傷の指標として γ -H2AX の発現を評価した結果、非遺伝毒性物質（PB）で陰性、遺伝毒性物質（EC、MCT、CMR）で陽性細胞率の増加が認められた。この結果は、同一条件で実施した小核試験の結果と整合性を示し、本評価系が化学物質の DNA 損傷評価において優れた予測能を有することが実証された。次いで、ヒト由来の代謝系を組み込んだ共培養系の構築に向け、マウス肝細胞由来オルガノイドとヒト肝キメラマウス由来の HepaSH 細胞の共培養に向けた培地条件の最適化を試みた。HepaSH においては、推奨培地である Cellatis を含む混合培地（OGM:Cellatis, 2:1 および 1:1）の使用により、主要な薬物代謝酵素（CYP1A2、2E1、3A4）の発現を 14 日間維持することが可能であった。一方、オルガノイドにおいては、Cellatis との混合培地で Hnf4a、CYP3A11、Alb といった肝成熟化マーカーの発現を増強させ、未分化な状態から成熟相への移行が促進されることが示唆されたが、OGM:Cellatis, 2:1 混合培地であれば、ある程度組織学的恒常性が維持可能であると判断した。現在、この条件下で MCT を含む被験物質の DNA 損傷性および遺伝毒性について検討を進めている。

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。ヒトへの外挿性が高い試験として、トランスジェニック（TG）動物を用いた変異原性評価が注目されているものの、現状ではヒト代謝を十分に加味した試験系とはなっていない。また、化審法などの対象となるすべての化学物質に対して、ヒトの発がん性リスクを動物実験で評価することは、昨今の動物愛護 3Rs（Replacement・Reduction・Refinement）の観点からも現実的でなく、新規の動物実験代替法の開発・導入が求められている。一方、汎用されている *in vitro* 遺伝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。これに加え、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験はいずれも化学物質の代謝活性化に齧歯類の代謝系（S9）を用いており、これを単純にヒト由来の S9 に変更するという手法だけでは十分にヒトの代謝を反映した結果を得ることが出来ないことに加え、ヒト由来の代謝系材料の調達にも課題がある。

このような背景から、本研究では化学物質の発がん性予測のための新規遺伝毒性評価手法として、3D 培養により作成したオルガノイドを用い、ヒトへの外挿性が高くかつ迅速で簡便な *in vitro* 遺伝毒性試験の開発を試みる。多くの化学物質が肝臓に対して毒性を示すことから、本研究では肝臓を対象とした評価系の構築を検討する。

今年度は、遺伝毒性の指標として DNA 二本鎖切断の指標である γ -H2AX を用いた評価法を検討した。また、これまで、代謝活性化系にラット S9 を使用してきた。しかし、化学物質によっては齧歯類とヒトで代謝様式が異なるものがあり、ヒトへの外挿性の点で課題が残る。そこで、ヒト肝キメラマウス由来の HepaSH 細胞を用い

ることでヒト型代謝活性化系の導入を検討した。

B. 研究方法

① γ -H2AX を指標とした DNA 損傷性評価の検討

オルガノイドを播種し 3 日間培養後、陽性対照としてエチルメタンスルフォネート（EMS, 250 μ g/mL）を、被験物質としてフェノバルビタール（PB, 1000 μ M）、カルバミン酸エチル（EC, 100 mM）、モノクロタリン（MCT, 500 μ M）およびクマリン（CMR, 200 μ M）を代謝活性化系であるラット S9 mix 存在下にて 24 時間曝露し、シングルセルにして細胞を回収した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、グリシン含有 PBS および PBS で洗浄を行った。細胞を PBS で再懸濁させ、スライドガラスに滴下し風乾させた。次いで、0.1% TritonX-100 を用いて透過処理を行い、一次抗体（Anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Rabbit mAb）で反応後洗浄した。次いで、二次抗体（Donkey anti rabbit IgG alexa fluor 647）で染色し再度洗浄を行った。最後に DAPI で核を染色し封入後、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて γ -H2AX foci の形成を観察した。

② マウス肝オルガノイドと HepaSH 共培養条件の検討

HepaSH 推奨培地：Cellatis Power Primary HEP Medium (Cellatis)

オルガノイド培地：HepatiCult Organoid Growth Medium (OGM)

1. HepaSH での培地の検討

HepaSH を播種後、培地を 1:0, 2:1, 1:1, 0:1 (OGM:Cellatis) で混合し 1 日おきに培地を交換した。培地を任意の培地に変更後 1, 7, 14 日目に細胞を回収した。RNA を抽出し RT-qPCR にて薬物代謝酵素である CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 の発現を指標に評価した。また、培地交

換の際に顕微鏡下で形態変化の観察を行った。

2. オルガノイドでの検討

オルガノイドを播種後3日間OGMで培養した。その後、培地を1:0, 2:1, 1:1 (OGM:Cellatis)の割合で混合した培地に交換し、1, 7, 14日目に細胞を回収した。なお、培地交換はHepaSH細胞と同様に1日おきに行った。回収した細胞からRNAを抽出し、RT-qPCR法を用いて各標的遺伝子の発現評価を行った。対象遺伝子にはHnf4a, Ttr (肝細胞マーカー)、Sox9 (肝前駆細胞マーカー)、Krt19 (胆管マーカー)、Alb, CYP3A11 (成熟肝細胞マーカー)およびKi67 (細胞増殖マーカー)を用いた。加えて、培地交換の際に顕微鏡下での形態観察を行い、培養環境の相違による細胞の経時的な変化を記録した。

(倫理面の配慮)

該当なし。

C. 研究結果

① γ -H2AXを指標としたDNA損傷性評価の検討

オルガノイドにポジティブコントロールとしてEMSを曝露し γ -H2AXを蛍光免疫染色した結果、 γ -H2AXの発現を観察することができた (図1)。

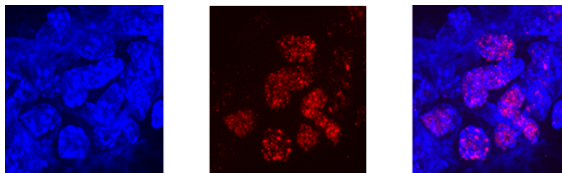


図1. EMS曝露後の γ -H2AX発現解析
(左:DAPI, 中央: γ -H2AX, 右:merge)

オルガノイドに被験物質を曝露し、蛍光免疫染色した結果を図2に示す。Control群およびPB曝露群では、DAPIによって核が明瞭に染色されている一方で、 γ -H2AXのシグナルはほとんど観察されず、DNA損傷が軽微であることが確認された。一方、EC、MCTおよびCMR曝露群では核内に γ -H2AXの発現が認められ、DNAへの影響が示唆された。特にMCT曝露群では、 γ -H2AXの強いシグナルが観察された。

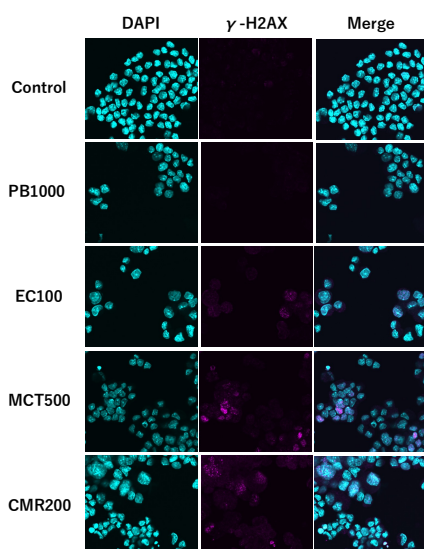


図2. 被験物質曝露後の γ -H2AX発現解析

γ -H2AX陽性細胞率の測定結果を図3に示す。非遺伝毒

性発がん物質であるPBを曝露した群では、陽性細胞数の割合はコントロールと比較して顕著な変化は認められなかった。一方で、遺伝毒性発がん物質であるEC、MCTおよびCMRを曝露した群では、いずれもコントロールよりも陽性細胞の割合が増加する傾向が確認された。特にMCT曝露群では、他の被験物質と比較して陽性細胞率が高く、顕著なDNA損傷の誘発が示唆された。また、これらの結果は、観察画像の所見とも一致していた。

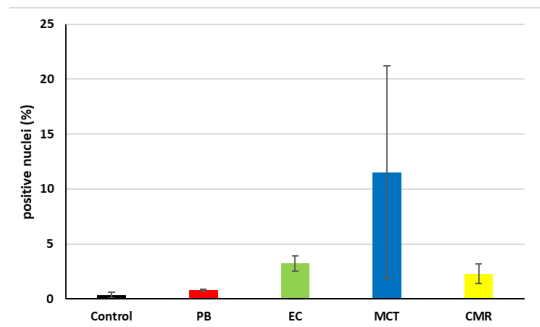


図3. 各種化学物質曝露によるオルガノイドの γ -H2AX陽性細胞率

② マウス肝オルガノイドとHepaSH共培養条件の検討

1. HepaSHでの培地の検討

遺伝子発現解析の結果、OGM単独では7日目にはCYP3A4やCYP1A2などが低下、消失していた。Cellatisを含む培地群では14日目までCYP1A2, CYP2E1, CYP3A4すべての発現を維持することができた (図4)。形態的变化は確認されなかった (図5)。

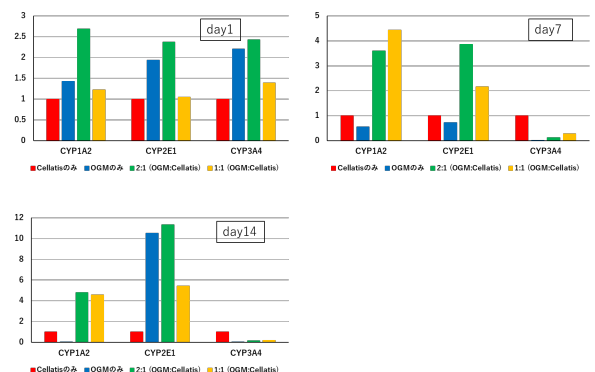


図4. HepaSH遺伝子発現解析

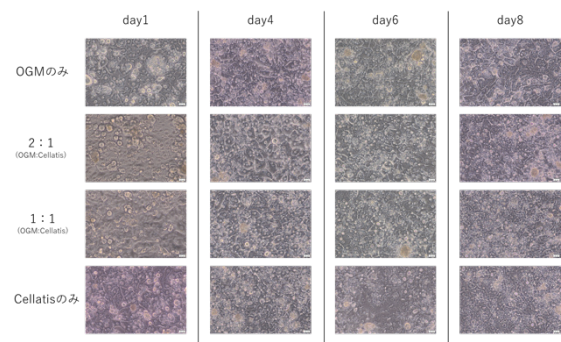


図5. HepaSH形態観察

2. オルガノイドでの検討

各種培地条件（OGMのみ、2:1混合、1:1混合）で培養したオルガノイドにおける、遺伝子発現変化を解析した結果を図6に示した。なお、day14の解析結果は、発現量が極めて高いHnf4aと、その他の指標を同一のスケールで比較することが困難であり、y軸スケールを変えた2つのグラフに分けて示した。肝細胞マーカーおよび成熟化指標の発現は、Hnf4aが培養日数の経過とともに混合培地群（2:1および1:1）で著しく上昇し、特にday14の2:1混合群は、OGMのみの群と比較して極めて高い発現が認められた。一方、Ttrはday1では培地の違いによる発現の差はみられなかったが、day7以降はOGMのみの群と比較してやや低下する傾向が確認された。成熟肝細胞マーカーであるCYP3A11およびAlbについては、day1で混合培地群において発現上昇が認められ、day14においてもこれらの遺伝子はOGMのみの群と比較して約1.5倍から2倍程度発現していた。分化および胆管マーカーの発現に関しては、肝前駆細胞マーカーであるSOX9の発現がいずれの混合培地群においてもday7以降に減少を示し、未分化性の低下が確認された。一方で、胆管マーカーであるKrt19の発現は、混合培地群においてOGMのみの群を上回る傾向がみられた。細胞増殖能の指標となるKi67の発現はOGM群と比較したところ、day1では混合培地群においてわずかに高い値を示したものの、day7以降は減少し、OGM群より低い値を示した。各種培地条件におけるマウス肝臓オルガノイドの形態変化を顕微鏡下で観察した結果を図7に示す。播種直後（day0）では、いずれの条件においても細胞が分散した状態であった。培養7日目（day7）では、すべての群でオルガノイドの形成が進み、サイズの増大が確認された。培養14日目（day14）においては、1:1混合培地群において、一部のオルガノイドで形態が崩れ始める細胞像が確認された。

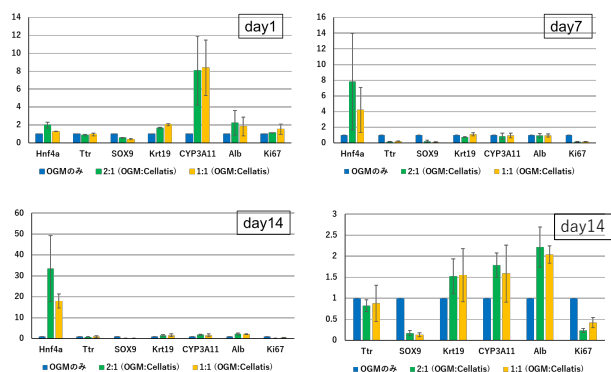


図6. オルガノイド遺伝子発現解析

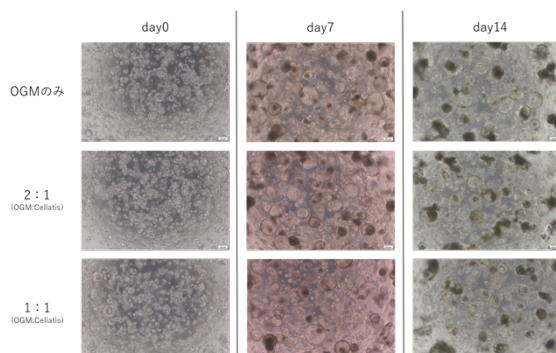


図7. オルガノイドの形態観察

D. 考察

DNA二本鎖切断の指標である γ -H2AXの発現を評価した結果、EMSの曝露により明確な γ -H2AXfociが確認され、マウス肝臓由来オルガノイドを用いて γ -H2AX発現解析が可能であることが示唆された。非遺伝毒性発がん物質であるPB曝露群においては陽性細胞率の上昇が認められなかったが、遺伝毒性発がん物質であるEC、MCTおよびCMR曝露群では、いずれも陽性細胞率が増加傾向を示した。この結果は、以前我々が同一のオルガノイドおよび曝露条件（化学物質・濃度）を用いて実施した小核試験の結果と同様の傾向であり、先行データとの整合性が確認された。このことから、本評価系が化学物質による初期DNA損傷を正確に捉えているだけでなく、その損傷がその後の染色体異常（小核形成）へと繋がることも考えられた。さらに、従来の遺伝毒性試験を補完できるだけでなく、迅速なスクリーニング指標となり得ることも示唆された。

マウス肝臓オルガノイドとHepaSH共培養条件の検討結果より、HepaSH細胞はOGM単独では7日目にはCYP3A4やCYP1A2などが消失、低下していた。Cellatisを含む培地群では14日目までCYP1A2、CYP2E1、CYP3A4すべての発現を維持することができた。そのため、HepaSHの薬物代謝酵素を長期的に維持するには2:1(OGM:Cellatis)あるいは1:1(OGM:Cellatis)の培地で培養することが妥当であると判断した。オルガノイドでは、混合培地群（2:1および1:1）で肝細胞マーカーであるHnf4aならびに成熟肝細胞マーカーであるCYP3A11やAlbの発現が増強されたことは、Cellatis培地の添加がオルガノイドの成熟化を促進したことが示唆された。これに並行して、肝前駆細胞マーカーであるSOX9の減少と増殖指標であるKi67の低下が認められた。これらのことから、成熟化の進行に伴い細胞増殖が抑制されたと考えられる。一方、形態観察の結果、1:1混合培地群ではday14において一部のオルガノイドで形態の崩壊が認められた。この現象は、Cellatis成分の濃度が過剰となり、オルガノイドの恒常性維持に負荷が生じた結果であると推察される。以上の結果から、共培養条件には2:1(OGM:Cellatis)の混合比率が妥当であると考えられる。

E. 結論

本研究では、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた γ -H2AX発現解析の検討、およびヒト肝細胞株HepaSHとの共培養に向けた至適培地条件の検討を行った。 γ -H2AX発現解析では、EMSによるDNA損傷を感度良く検出できることを確認した。被験物質を用いた検討では、非遺伝毒性物質(PB)が陰性で、遺伝毒性物質(EC、MCTおよびCMR)では陽性細胞率の増加傾向が認められ、先行する小核試験データとも整合性を示した。これにより、本評価系が従来の遺伝毒性試験の補完だけでなく、迅速なスクリーニング指標となり得ることが示唆された。共培養に向けた培地検討では、Cellatisを含む混合培

地の使用により、HepaSH における薬物代謝酵素 (CYP1A2, 2E1, 3A4) の発現維持、およびオルガノイドにおける肝成熟化マーカー (Hnf4a, Alb, CYP3A11) の増強が確認された。形態保持能の観点から、オルガノイド長期培養時に構造崩壊が認められた 1:1 混合条件に対し、組織学的恒常性を維持可能な 2:1 (OGM:Cellatis) 混合培地を至適条件と判断した。現在、この条件下で MCT を含む被験物質遺伝毒性試験の DNA 損傷性および遺伝毒性について検討を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., Totsuka Y. Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ.* 2025 48 (1): 2.
2. Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., Totsuka Y. Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde. *Biomolecules.* 2025 15 (6): 878.

2. 学会発表

1. 戸塚 ゆ加里 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
2. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水洋志、*in vitro* 薬剤誘発性リン脂質症評価における HepaSH 細胞の有用性、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
3. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会 (2025年8月、九十九里、千葉)
4. Yukari Totsuka¹, Momoko Nagai², Asmaa Elzawahari², Rikako Ishigamori¹, Shinya Hasegawa¹, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
5. 戸塚 ゆ加里 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
6. 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根 航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚 ゆ加里、有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
7. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling, 第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
8. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
9. 長谷川 晋也、渡部 光一、川口 駿、垣内伸之、小川 誠司、吉田 健一、戸塚 ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
10. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from

DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025年10月、ソウル、韓国)

11. 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とメカニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025年10月、大阪)
12. 戸塚 ゆ加里、次世代シーケンサー (NGS) とアダクトーム解析を用いた遺伝毒性物質の探索と発がんメカニズムに関する研究、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 学会賞受賞講演 (2025年11月、静岡)
13. 石ケ守 里加子、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ドマテリアルの包括的毒性評価、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
14. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
15. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、大野 麻理奈、吉田 健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株である 293FT 細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
16. 戸塚 ゆ加里、オルガノイド技術を用いた環境化学物質影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム (2025年12月、六本木、東京)
17. 戸塚 ゆ加里、ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in vivo* 代替型遺伝毒性評価法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
18. 小畑 悠樹、上原 正太郎、樋口 裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水 洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
19. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡 正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
20. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、高橋 賢吾、遠藤 瑞葵、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
21. 今井 正彦、小川 心音、川西 なつき、中山 瑞穂、大島 正伸、戸塚 ゆ加里、大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)

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

