

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  
分担研究項目：ゲノム変異解析

研究分担者 長谷川 晋也 ……………星薬科大学・講師

## 研究要旨

本研究では、化学物質の発がん性予測に資する新規 *in vitro* 遺伝毒性評価法の開発を目的として、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドおよびマウス個体肝臓を用い、Error-Corrected NGS (NanoSeq) によるゲノム変異解析を実施した。Monocrotaline (MCT) 曝露では、オルガノイドおよびマウス肝臓のいずれにおいても変異頻度の上昇が認められ、特に C>A 変異の顕著な増加が観察された。さらに、変異シグネチャー解析により、MCT 処理に伴って濃度依存的に増加する SBS 成分が検出され、C>A 変異には strand bias も認められたことから、MCT による DNA 損傷形成および修復過程が変異導入に関与している可能性が示唆された。

一方、Ethyl carbamate (EC) については、マウス肝臓において T>A を中心とした変異パターンの変化および変異頻度の上昇が認められ、*in vivo* 条件下で明確な変異誘導が確認された。しかし、同条件で処理したオルガノイドでは変異頻度および変異スペクトラムに明確な変化は認められず、*in vitro* と *in vivo* の結果に差異がみられた。また、Coumarin では、オルガノイドおよびマウス肝臓のいずれにおいても顕著な変異頻度の増加は観察されなかった。これらの結果から、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価系は、MCT のような化学物質に対しては *in vivo* と対応する変異シグネチャーを検出できる一方、化学物質によっては曝露条件の最適化が必要であると考えられた。今後は、曝露時間の延長、反復曝露回数の検討、低濃度長期曝露条件の導入などにより、変異蓄積をより適切に評価できる実験系を構築し、次世代遺伝毒性評価法としての有用性を高めることが重要である。

## 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。

## B. 研究方法

### Error-Corrected NGSによるゲノム変異解析

マウス由来肝前駆細胞オルガノイド (STEMCELL Technologies) を用い、*in vitro* において化学物質の曝露試験を実施した。オルガノイドは一定期間培養後、ラット由来 S9 mix を用いた代謝活性化条件下で MCT を処理した。

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  $\mu$ M、Ethyl carbamate (EC) の最終濃度は 25、100 mM、Coumarin (CMR) の最終濃度は 50  $\mu$ M、200  $\mu$ 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。

上記化学物質を用いて、4週間 (EC, MCT) 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 genome DNA を抽出し、*in vivo* マウス肝臓 genome DNA として、ec-NGS 解析を行った。

(倫理面の配慮)  
該当なし

## C. 研究結果

### ① マウス由来肝前駆細胞オルガノイドにおける Mono crostaline (MCT) の変異シグネチャー

マウス由来肝前駆細胞オルガノイドに対し、Monocro taline (MCT) を 125  $\mu$ M または 500  $\mu$ M の条件で処理し、ラット S9 mix による代謝活性化条件を組み合わせた *in vitro* 曝露系を構築した。曝露後に DNA を抽出し、error-corrected NGS (NanoSeq) による変異解析を実施し、Mutational burden、および Trinucleo tides mutation pattern を解析した。NanoSeq 解析の結果、MCT 処理により Mutational burden の増加が認められた。また、高濃度の MCT 処理群では C>A 変異の増加が観察された。

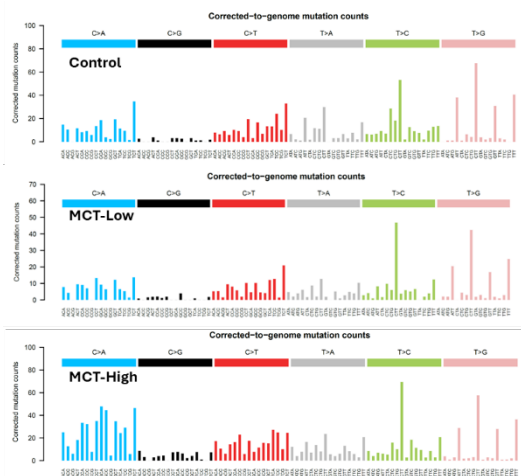


図 1. オルガノイドにおける MCT の変異シグネチャー

### ② マウス肝臓における MCT の変異シグネチャー

MCT を 20 mg/kg または 200 mg/kg 投与したマウス個体の肝臓を用いて NanoSeq 解析を行った。その結果、*in vitro* オルガノイド系と同様に、MCT 投与群において C>A 変異の増加が認められた (図 2)。この増加は投与量依存的であり、高用量群 (200 mg/kg) でより顕著であった。

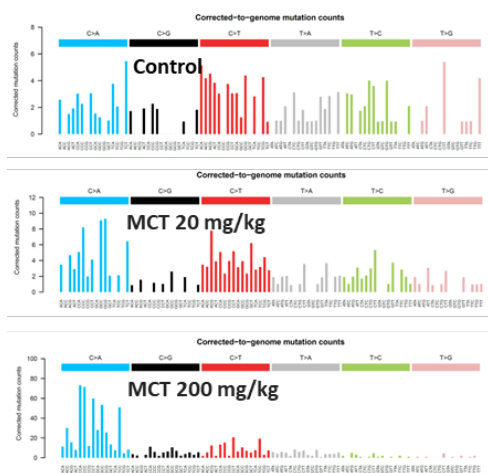


図 2. マウス肝臓における MCT の変異シグネチャー

### ③ MCT の変異シグネチャー解析

変異シグネチャーの抽出を行った結果、MCT 処理条件下で増加する SBS96B と、対照群にも認められる SBS 96A が同定された。SBS96B は MCT 濃度依存的に増加しており、MCT 処理により誘導される変異成分である可能性が高い。一方、SBS96A は培養条件等に由来する背景シグネチャーであると考えられた (図 3、上)。さらに、SBS288 系列の解析では、MCT 処理により SBS288B が増加し、このシグネチャーにおいて C>A 変異が転写鎖側に偏って増加する strand bias が認められた (図 3、下)。この結果は、MCT による DNA 損傷形成および修復過程が転写活性と関連している可能性を示唆するものである。

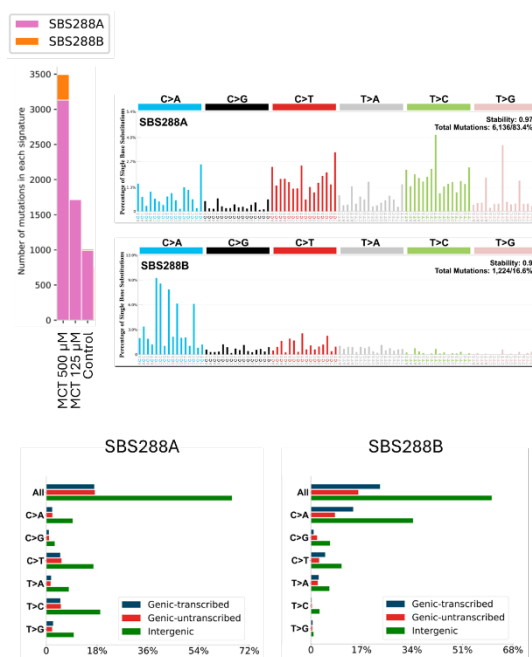


図 3. MCT の変異シグネチャー解析

### ④ マウス由来肝前駆細胞オルガノイドにおける Ethyl carbamate (EC) の変異シグネチャー

EC について、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドを用いて低用量および高用量条件で処理し、同様に Nano Seq 解析を実施した。その結果、EC 処理オルガノイドでは、変異頻度は対照群と同程度であり、明確な増加は認められなかった。

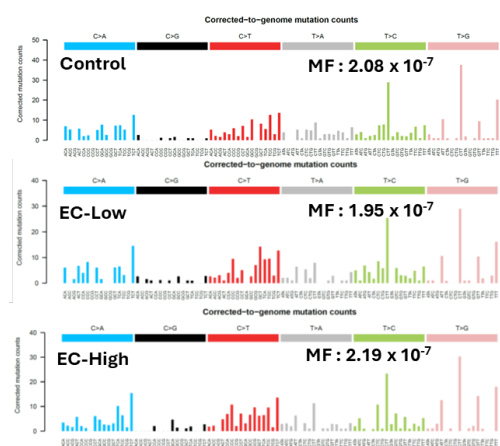


図 4. オルガノイドにおける EC の変異シグネチャー

### ⑤ マウス肝臓における EC の変異シグネチャー

一方、EC を投与したマウス個体の肝臓では、対照群と比較して変異頻度の顕著な増加が認められた。Trinucleotides mutation pattern では、T>A を中心とした塩基置換の増加が観察された。抽出された変異シグネチャーは MCT 由来の SBS 構成とは異なり、EC 特有の変異導入機構を反映している可能性が示唆された。さらに、ストランドバイアス解析の結果、EC 投与マウス肝臓においては、T>A や T>C の塩基置換において 転写鎖と非転写鎖の間で非対称な分布が認められた。この結果は、EC が *in vivo* 条件下で DNA 付加体形成により変異導入が生じている可能性を示唆するものである。



図5. マウス肝臓における EC の変異シグネチャー

#### ⑥オルガノイドにおける Coumarin の変異シグネチャー

マウス由来肝前駆細胞オルガノイドに低用量および高用量条件で処理し、NanoSeq による変異解析を行った。その結果、mutation frequency は対照群と同程度であり、用量依存的な増加は認められなかった。Trinucleotides mutation pattern においても、特定の塩基置換の増加は観察されず、全体として対照群と類似した変異パターンを示した (図6)。

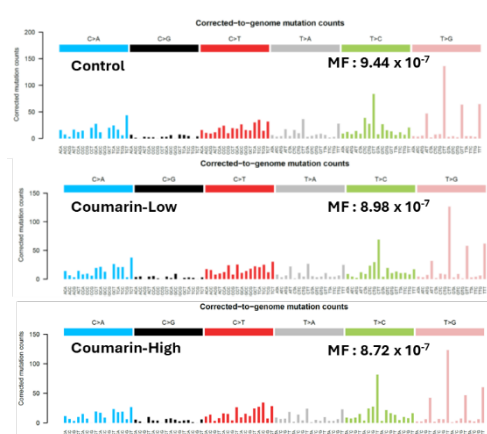


図6. オルガノイドにおける Coumarin の変異シグネチャー

#### ⑦ マウス肝臓における Coumarin の変異シグネチャー

同様に、クマリンを投与したマウス個体の肝臓におい

ても、変異頻度および変異スペクトラムに顕著な変化は認められなかった (図7)。

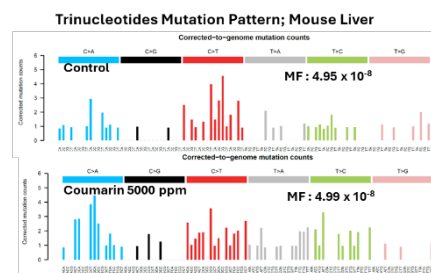


図7. マウス肝臓における Coumarin の変異シグネチャー

## D. 考察

本研究では、マウス由来肝前駆細胞オルガノイドおよびマウス個体を用いて ec-NGS (NanoSeq) 解析を行い、Monocrotaline (MCT) に特異的な変異シグネチャーを検出した。一方で、EC の解析結果に示されるように、*in vivo* 条件では明確な変異誘導が観察されるにもかかわらず、オルガノイド系では同様の変異シグネチャーが検出されなかった。

この *in vitro-in vivo* 間の差異の一因として、オルガノイドにおける化学物質の曝露時間が相対的に短いことが影響している可能性が考えられる。本研究で用いたオルガノイド条件では、細胞生存性や培養維持を考慮し、比較的短期間の曝露時間を採用した。しかし、変異シグネチャーの形成は、DNA 損傷の蓄積、修復過程の反復、さらには細胞分裂を介した変異の固定化といった時間依存的プロセスを必要とするため、曝露時間が不十分な場合には変異導入が検出限界に達しない可能性がある。

したがって、今後はオルガノイドを用いた遺伝毒性評価において、曝露時間を延長した条件設定や、反復曝露の回数を検討する実験系の構築が重要になると考えられる。例えば、低濃度条件での長時間曝露や、培養時間の短縮により細胞毒性を抑制しつつ、変異蓄積を評価できる可能性がある。

## E. 結論

MCT については、オルガノイドおよびマウス肝臓において C>A 変異の増加を伴う特徴的な変異シグネチャーが検出され、*in vitro* と *in vivo* で変異の増加が確認された。一方、EC では、マウス個体の肝臓において明確な変異頻度の増加が認められたのに対し、オルガノイド系では同様の変異誘導は検出されず、coumarin はオルガノイドとマウス個体、両者で変異の増加が観察されなかった。

EC における *in vitro* と *in vivo* の差異については、オルガノイド条件における曝露時間や回数が相対的に短かったことが影響している可能性が考えられる。これらの結果は、オルガノイドを用いた遺伝毒性評価において、曝露条件、特に曝露時間が変異シグネチャー形成に重要な因子であることを示唆している。

今後、曝露時間を含む実験条件の最適化を進めることで、本手法は次世代遺伝毒性評価法としての有用性をさらに高める予定である。

## 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. Ando Y., Takeshima H., **Hasegawa S.**, Watanabe C., Hara-Kudo Y., Oku T. Dual regulation of coronin-1 expression by the core promoter and intronic regions. J Immunol. 2026 215(3):vkaf349.

## 2. 学会発表

1. 宮崎 飛翔, 石ヶ守 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)
2. Yukari Totsuka<sup>1</sup>, Momoko Nagai<sup>2</sup>, Asmaa Elzawahari<sup>2</sup>, Rikako Ishigamori<sup>1</sup>, Shinya Hasegawa<sup>1</sup>, 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)
3. 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)
4. 宮崎 飛翔, 石ヶ守 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)
5. 長谷川 晋也, 石ヶ守 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 293 FT 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)
6. 長谷川 晋也, 石ヶ守 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) .

## 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

