

日本学術会議主催学術フォーラム

「環境化学物質の健康影響、その理解と健康をまもる生活環境の維持に向けて:

1. 環境化学物質の健康影響とは」

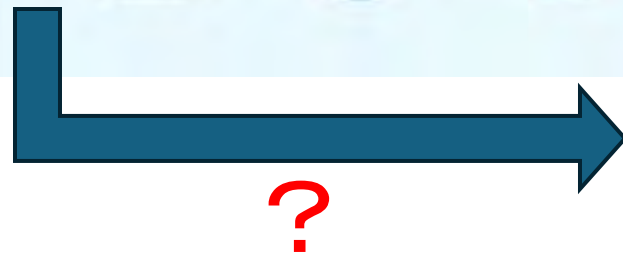
2025. 12. 18

オルガノイド技術を用いた環境化学物質の影響評価

星薬科大学
衛生化学研究室
戸塚ゆ加里

研究の背景

ENVIRONMENTAL CHEMICALS



安全性評価

*in vivo*試験法



- 一般毒性試験
- 特殊毒性試験
(発がん性、遺伝毒性、
催奇形性など)

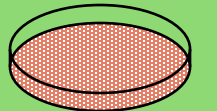
人への外挿性が高い試験として、トランスジェニック動物を用いた遺伝毒性試験が注目

動物愛護
3R (Replacement,
Reduction,
Refinement)

ヒトに外挿

*in vivo*試験
代替法

*in vitro*試験法



ヒトに外挿?

研究の背景

培養哺乳類細胞を用いた従来の *in vitro* 遺伝毒性試験

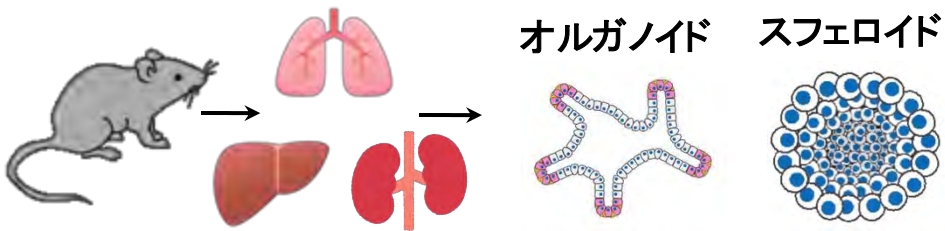
ENVIRONMENTAL CHEMICALS



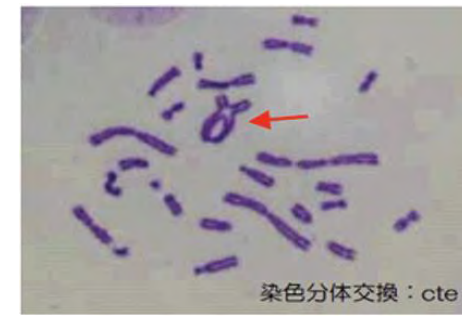
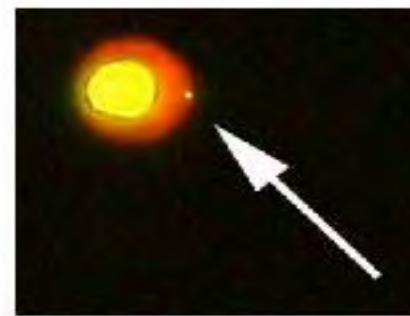
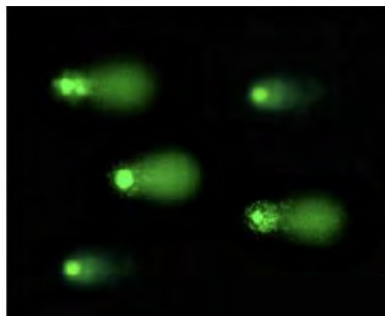
	DNA 傷害性	遺伝子突然変異	染色体異常 誘発性
<i>in vitro</i>	recアッセイ , コメット試験, UDS試験	Ames試験 MLA HPRT / TK	CHL, ヒト末梢血 MLA 小核試験

進化型の *in vitro* 試験法

生体を模倣した評価系; 3次元培養法

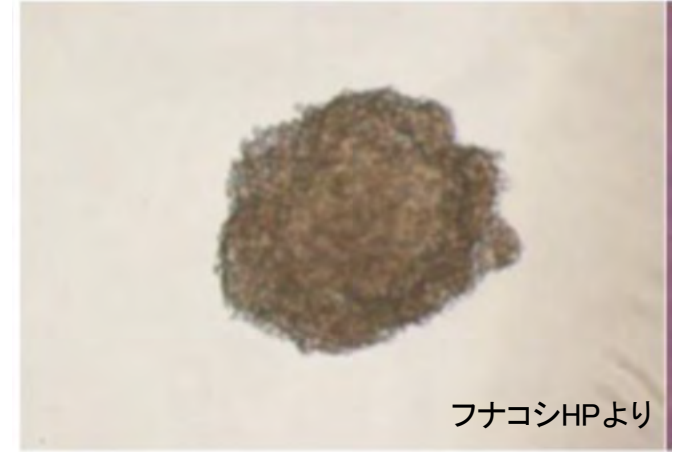
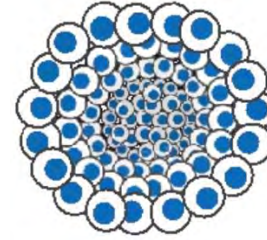
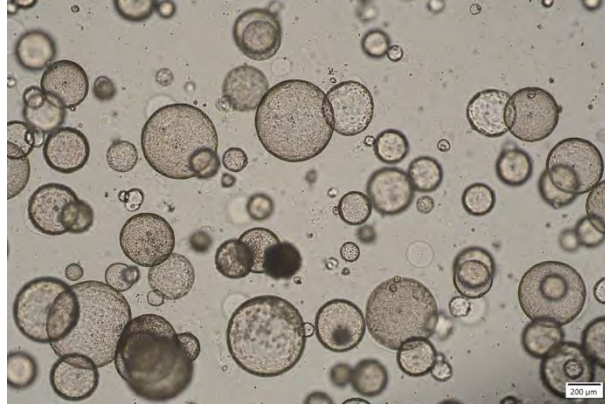
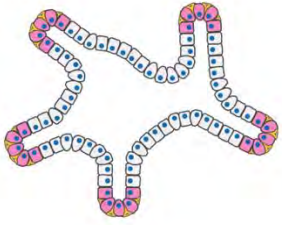


従来の評価システムを補完することができ、
実験動物に代わる評価方法として期待されている



- 生体の複雑さを反映しない単一細胞株を使用
- 生体内に共存する他の細胞成分の影響を評価できないため、
生体への外挿という点では限界がある

オルガノイドとスフェロイド



定義

幹細胞 (ES/iPS、成体幹細胞) や腫瘍組織から、自己組織化してミニ臓器様構造を形成した3D構造体

機能性

高い: 臓器特異的機能 (代謝、分泌、吸収など) を保持

作成方法

Matrigel など ECM + 特定の分化誘導因子により自己組織化

がん細胞や細胞株を立体的に凝集させた単純な球状細胞塊

限定的: 腫瘍微小環境や薬剤感受性の再現にとどまる

U底プレート、ハンギングドロップなどで細胞が凝集

スフェロイドを用いた遺伝毒性評価

Toxicology 517 (2025) 154242



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol



Computerized predictive approaches of genotoxicity and mutagenesis in 3D Hepoid of normal and transformed human hepatocytes

Sophie Rose^a, Frédéric Ezan^a, Ludovic Huot^c, Thierry Pécot^b, Medjda Bellamri^d, Robert Turesky^d, Fabrice Nessler^c, Anne Platel^c, Sophie Langouët^{a,*}

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, Rennes 35000, France

^b Rennes University, SFR Biosit (UMS 3480-US 018), Rennes, France

^c Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, ULR 4483, IMPECS-IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé, Lille F-59000, France

^d Masonic Cancer Center and Department of Medicinal Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, United States

使用細胞: HepaRG, Primary Human Hepatocyte (PHH)



Collagen 3D culture

- Hepoid-HepaRG
- Hepoid-PHH

遺伝毒性の指標:

- γ -H2AX
- Comet assay
- Micronuclei (HepaRGのみ)
- DNA adduct formation

被験物質:

Genotoxic hepatocarcinogens

AFB1, DMH, MMC, MMS, Vinblastine, Colchicine, A α C, IQ, MeIQx

Non genotoxic hepatocarcinogens

DEHP, Methylcarbamate,

Non hepatocarcinogens

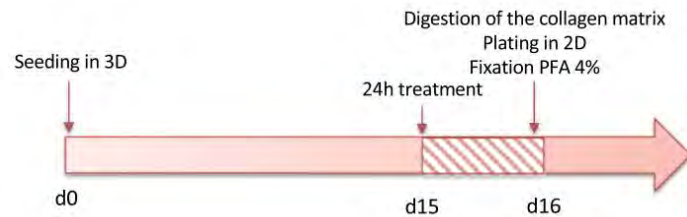
Ethionamide, PhIP

スフェロイドを用いた遺伝毒性評価 (Comet assay)

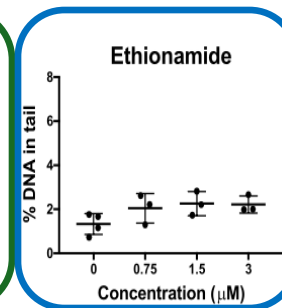
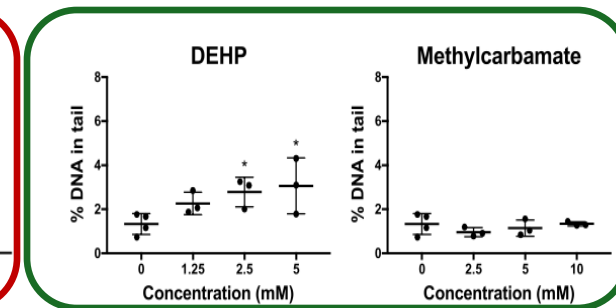
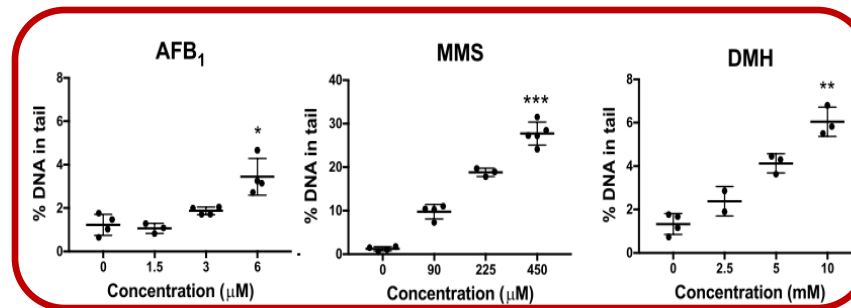
Genotoxic hepatocarcinogens

Non. genotoxic hepatocarcinogens

Non hepatocarcinogens



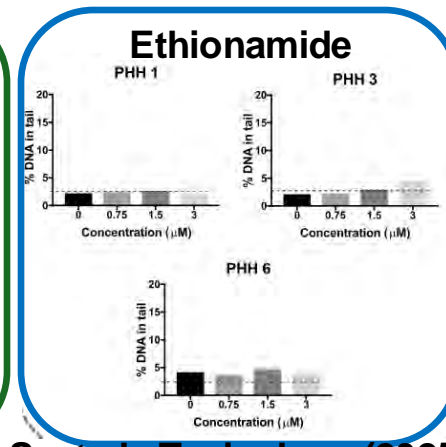
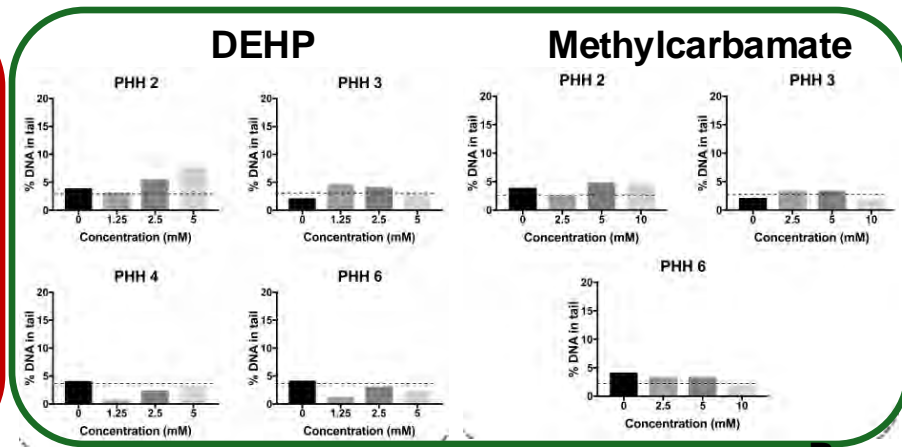
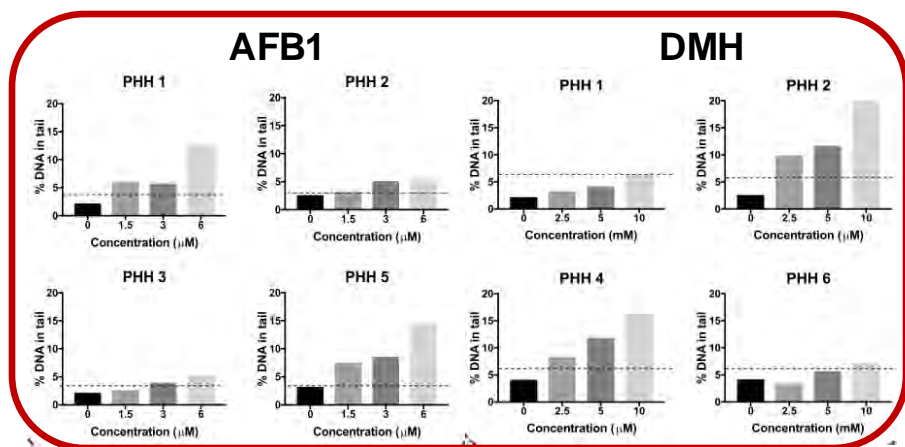
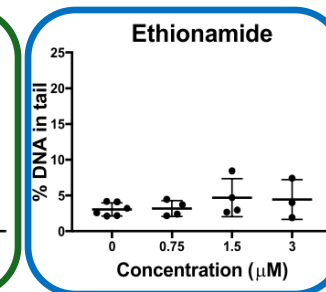
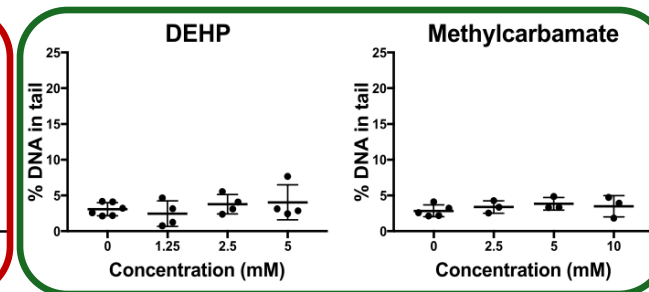
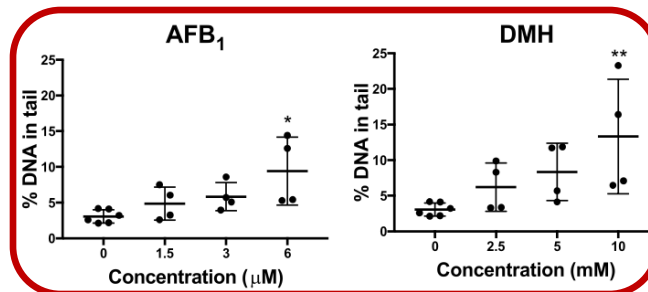
Hepoid-HepaRG



Hepoid-PHH

Clinical characteristics of primary human hepatocytes (PHH) samples.

Case	Age	Gender	Liver pathology	Smoker	Diabetic
PHH 1	50	F	Liver metastasis	No	N/A
PHH 2	58	F	None	Yes	N/A
PHH 3	50	F	N/A	N/A	N/A
PHH 4	72	F	Liver metastasis	No	Yes
PHH 5	79	F	Cholangiocarcinoma	No	No
PHH 6	74	F	Cholangiocarcinoma	No	No



スフェロイドを用いた遺伝毒性評価 (Comet assay & DNA adduct)

Comet assay

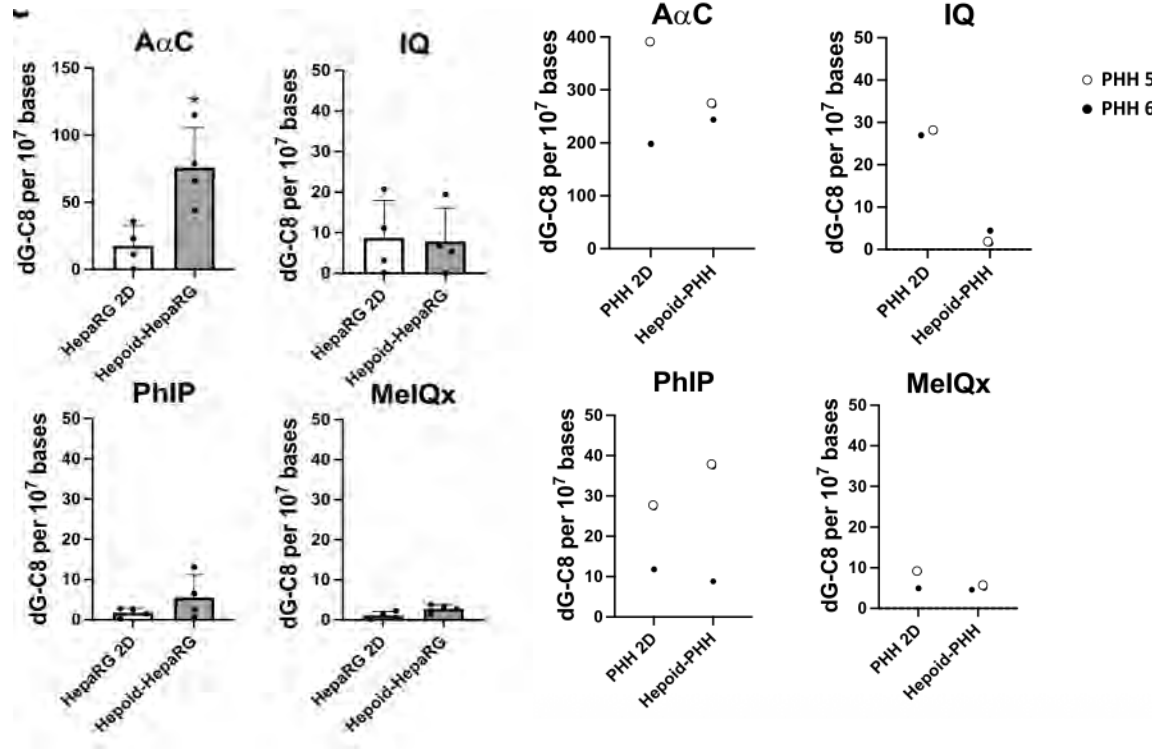
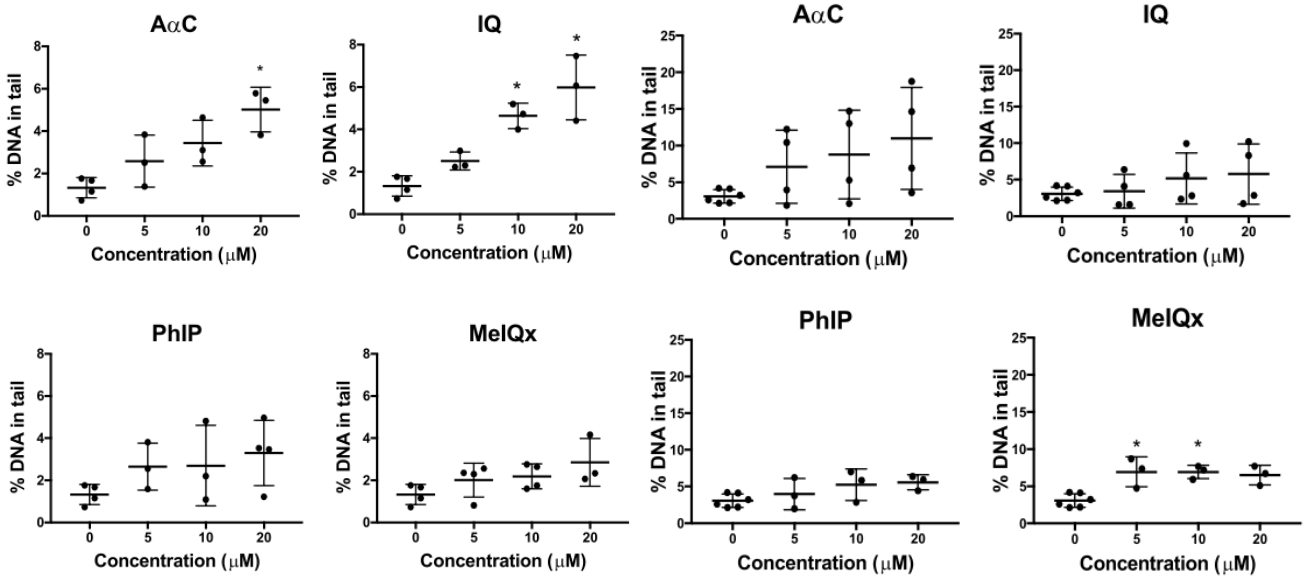
DNA adduct

Hepoid-HepaRG

Hepoid-PHH

Hepoid-HepaRG

Hepoid-PHH



スフェロイドを用いた遺伝毒性評価 (小核& ec-NGS)

Mutagenesis, 2025, 1–10
<https://doi.org/10.1093/mutage/geaf015>
 Advance access publication 6 August 2025
 Original Manuscript

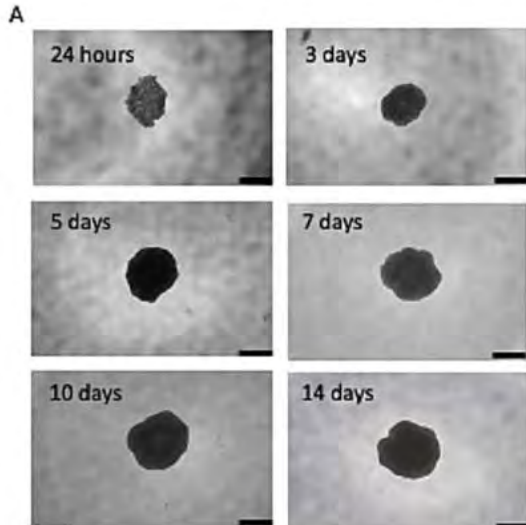


Original Manuscript

Harnessing the power of an advanced *in vitro* 3D liver model and error-corrected duplex sequencing for the detection of mutational signatures

Gillian E. Conway¹, Bérénice Chavanel², François Virard^{2,3}, Ume-Kulsoom Shah¹, Michael J. Burgum¹, Stephen J. Evans¹, Michael Korenjak², Laura E. Thomas¹, Gareth J. Jenkins¹, Jiri Zavadil^{2,*}, Sharen H. Doak^{1,*}

¹In Vitro Toxicology Group, Institute of Life Science, Swansea University Medical School, Swansea, Wales SA2 8PP, United Kingdom
²Epigenomics and Mechanisms Branch, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon 69007, France
³Cancer Research Center, INSERM U1052–CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, University Claude Bernard Lyon 1, Lyon 69008, France

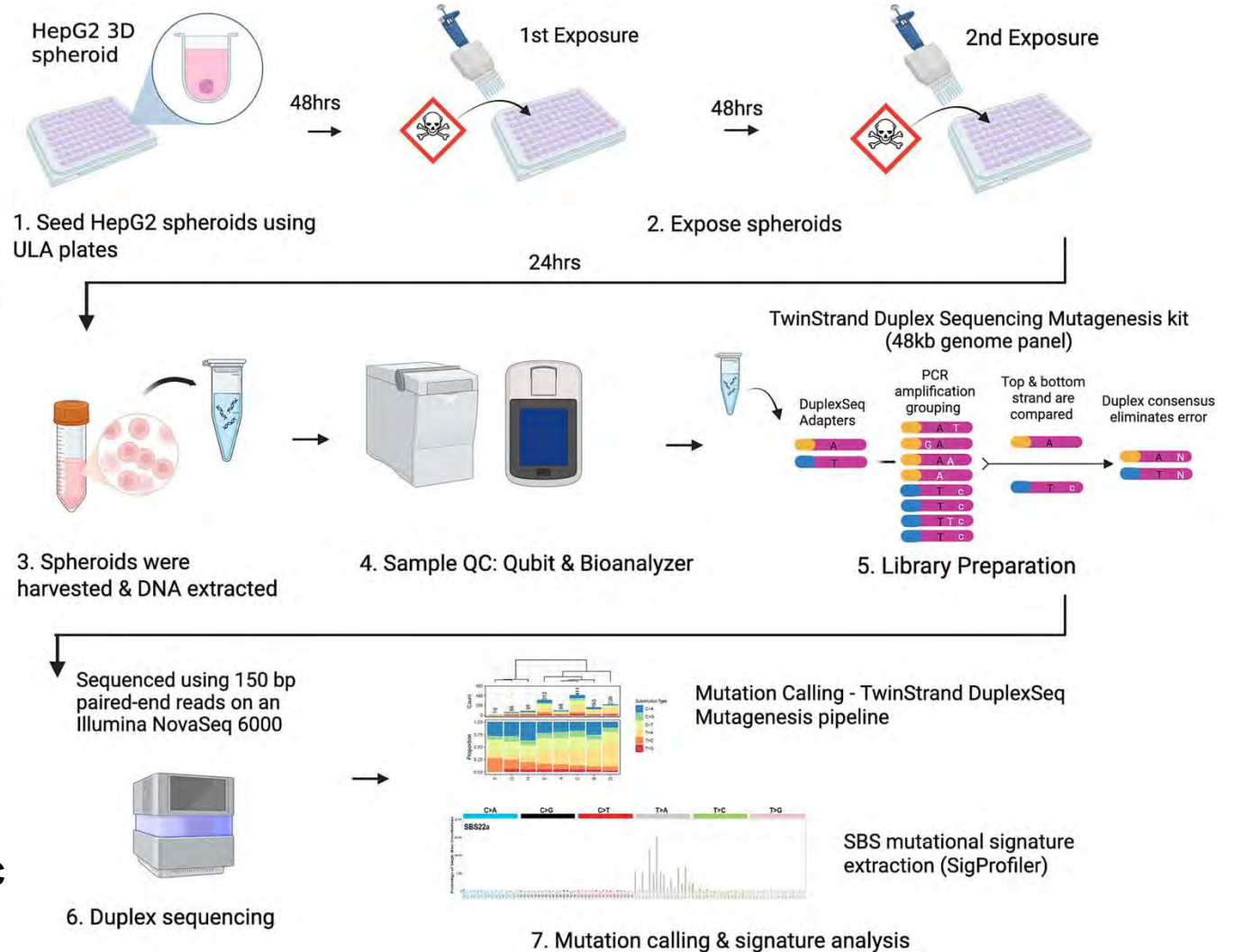


使用細胞: HepG2

遺伝毒性の指標:

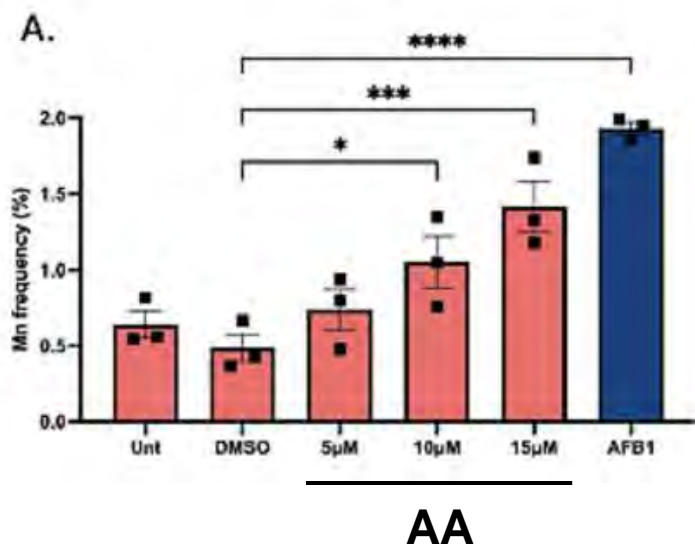
- Micronuclei
- DuplexSeq

被験物質: Aristolochic acid (AA)

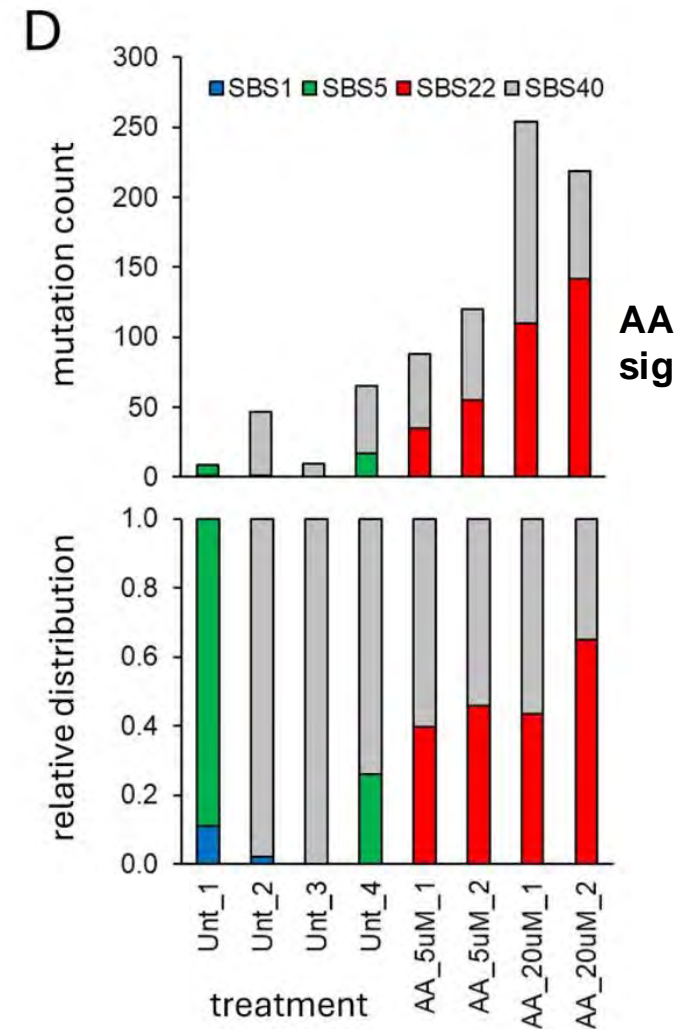
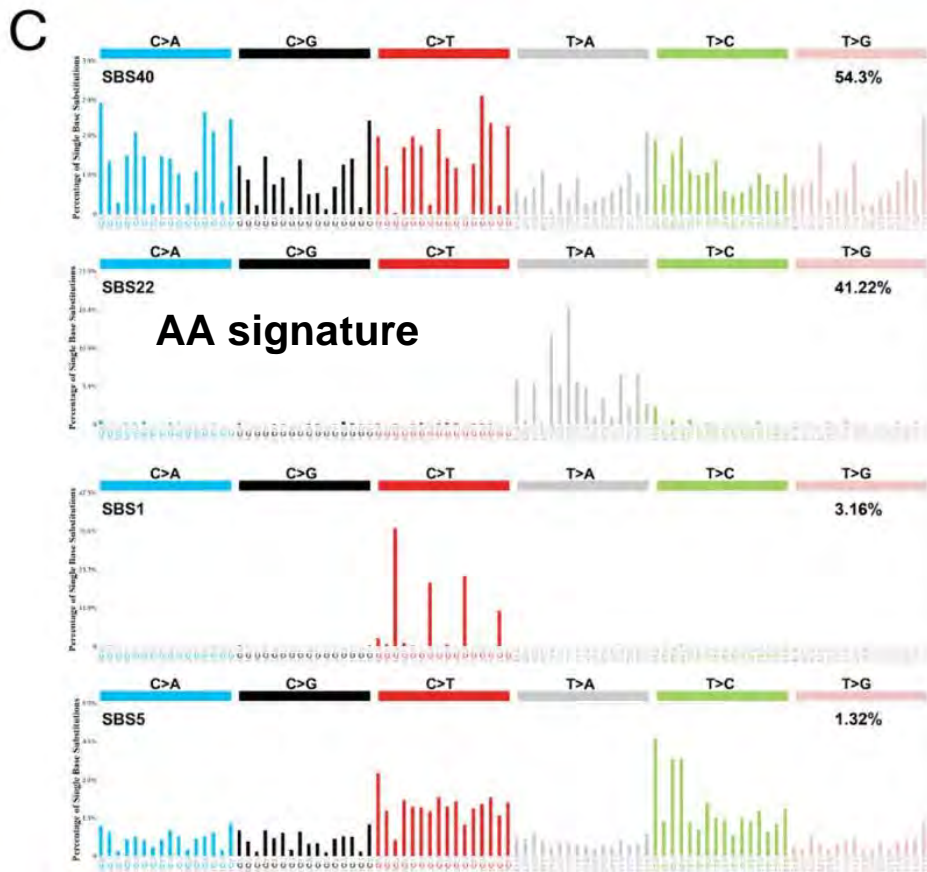


スフェロイドを用いた遺伝毒性評価(小核& ec-NGS)

小核試験



DupSeq



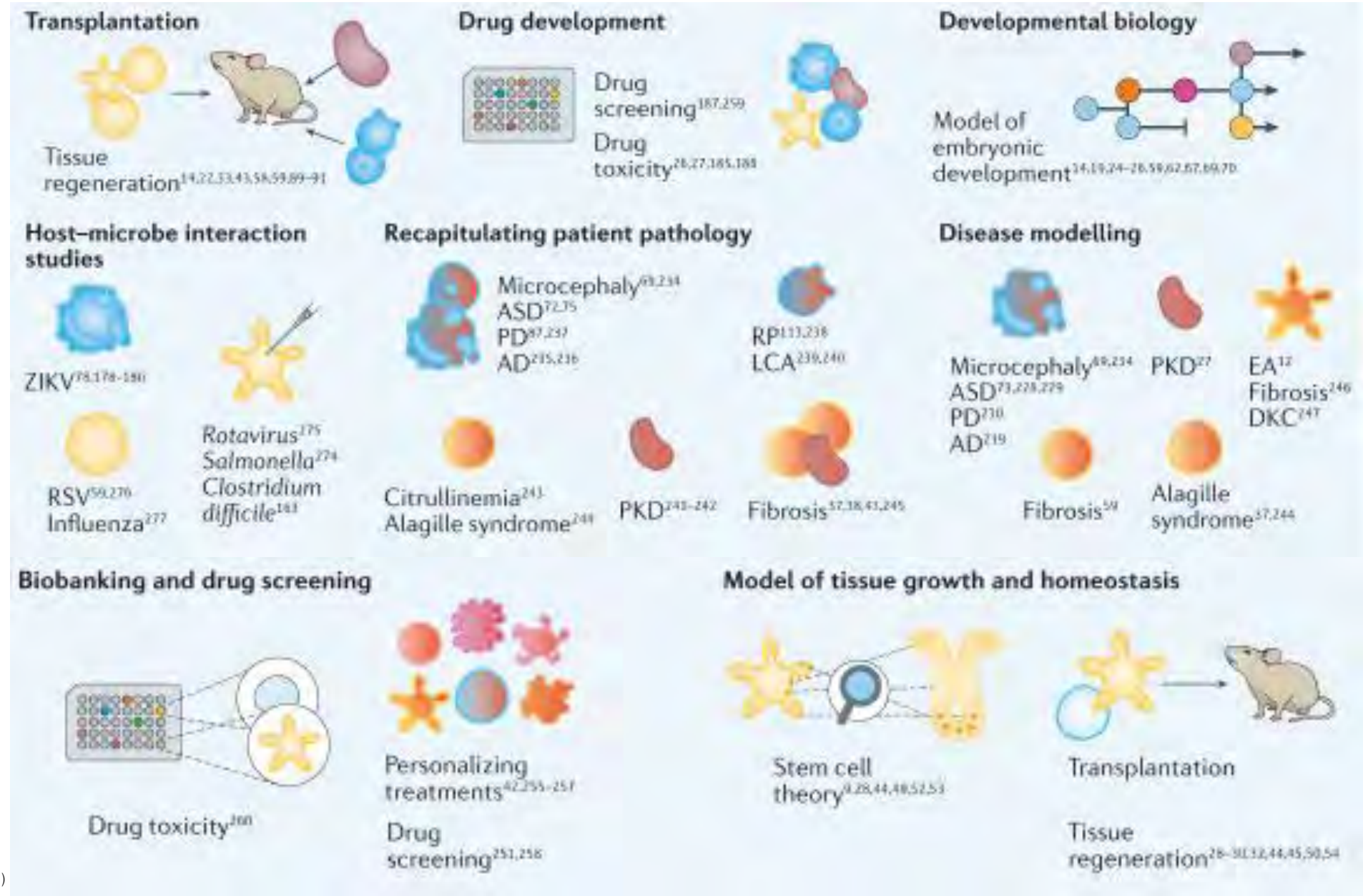
小括 1

- 株化された正常肝および肝がん細胞由来のスフェロイドは薬物代謝酵素活性を有することが確認できた
- ヒト由来の初代培養肝細胞由来のスフェロイドでは、薬物代謝酵素活性を有するものの、ドナーによる違いが大きいことがわかった
- 細胞増殖能をもつ正常肝および肝がん細胞株由来のスフェロイドでは、DNA損傷性に加えて小核の観察も可能である
- 細胞増殖能を持たないヒト初代培養肝細胞由来のスフェロイドでは、DNA付加体形成およびDNA損傷性の観察が可能である

→株化細胞由来の3D 肝スフェロイドは、2D 培養よりもより生理的な応答が得られるモデルとして有用と考えられる。一方で、ヒト初代培養肝細胞由来のスフェロイドは、細胞増殖能を持たず、ドナーによるばらつきも大きいことなどから、遺伝毒性試験への応用は限定的だと思われる。

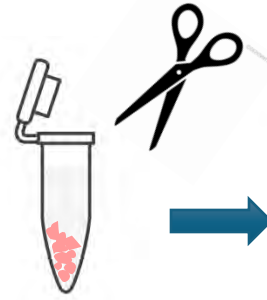
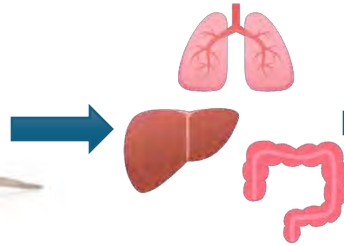
オルガノイド技術の活用例

・発生生物学、疾患病理学、細胞生物学、再生メカニズムなどの基礎研究や、疾患の病態理解や薬物の毒性および有効性試験、薬物動態などの創薬研究など幅広い分野で使われている。

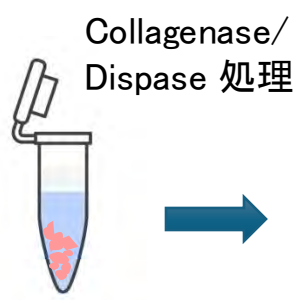


トランスジェニックマウス(*gpt* delta mouse) 正常組織由来オルガノイドの作成 (遺伝毒性試験に特化したオルガノイドの作成)

Mouse strain
gpt delta mouse
(3-6 week old)

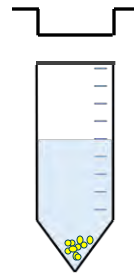


細切
(4°C)

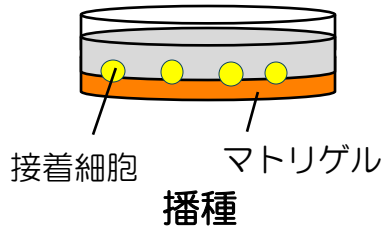


酵素処理
(30分・37°C)

Collagenase/
Dispase 処理



濾過処理

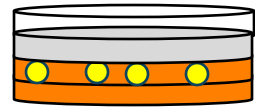


接着細胞

マトリゲル
播種



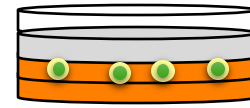
翌日



マトリゲル重層



約1週間

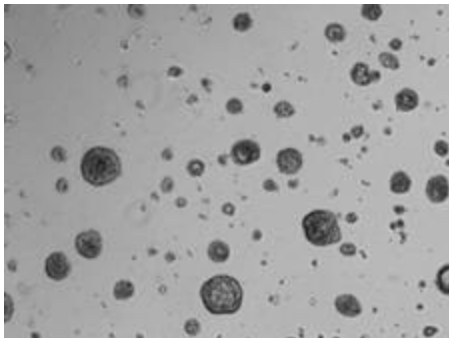


オルガノイド形成

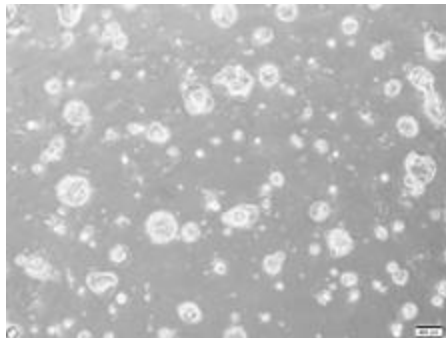


継代

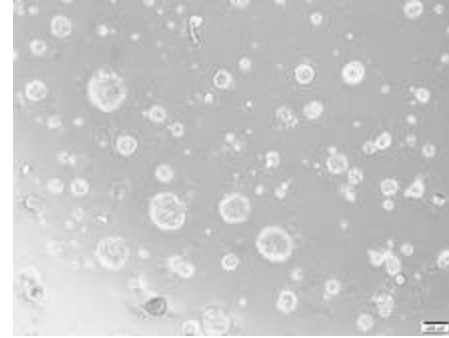
Lung



Liver

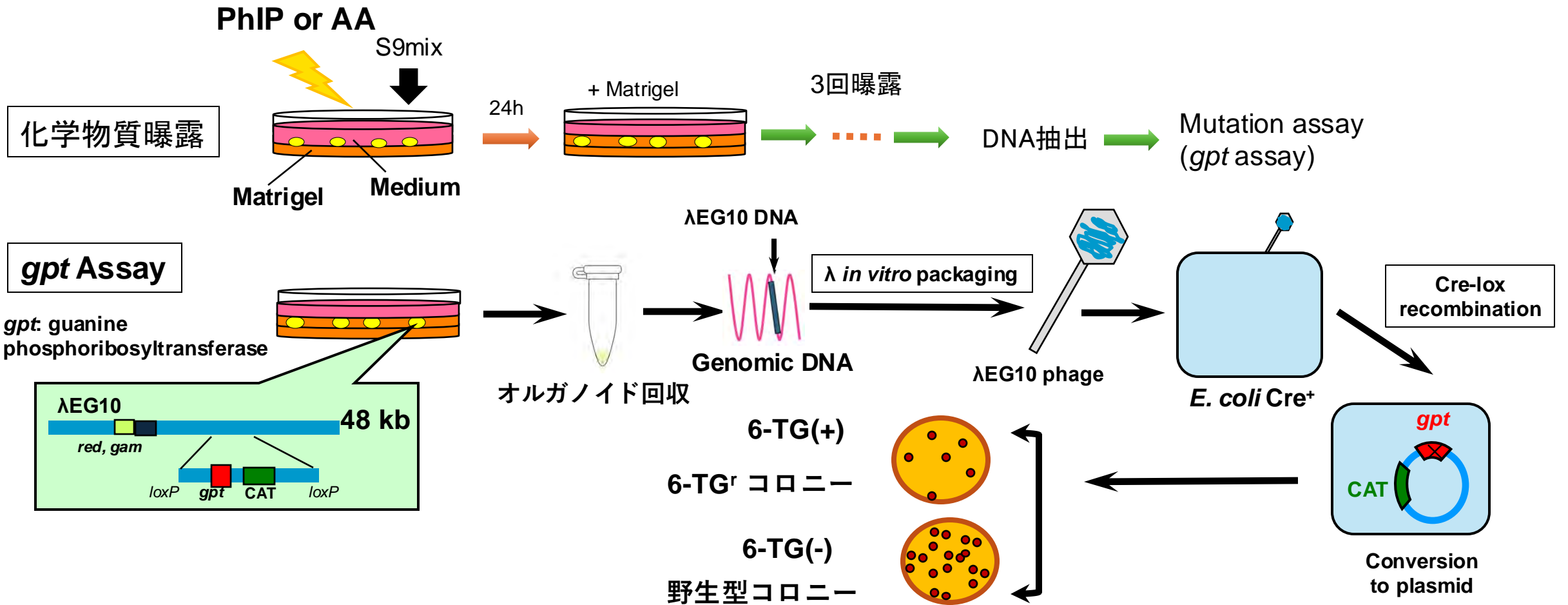


Colon

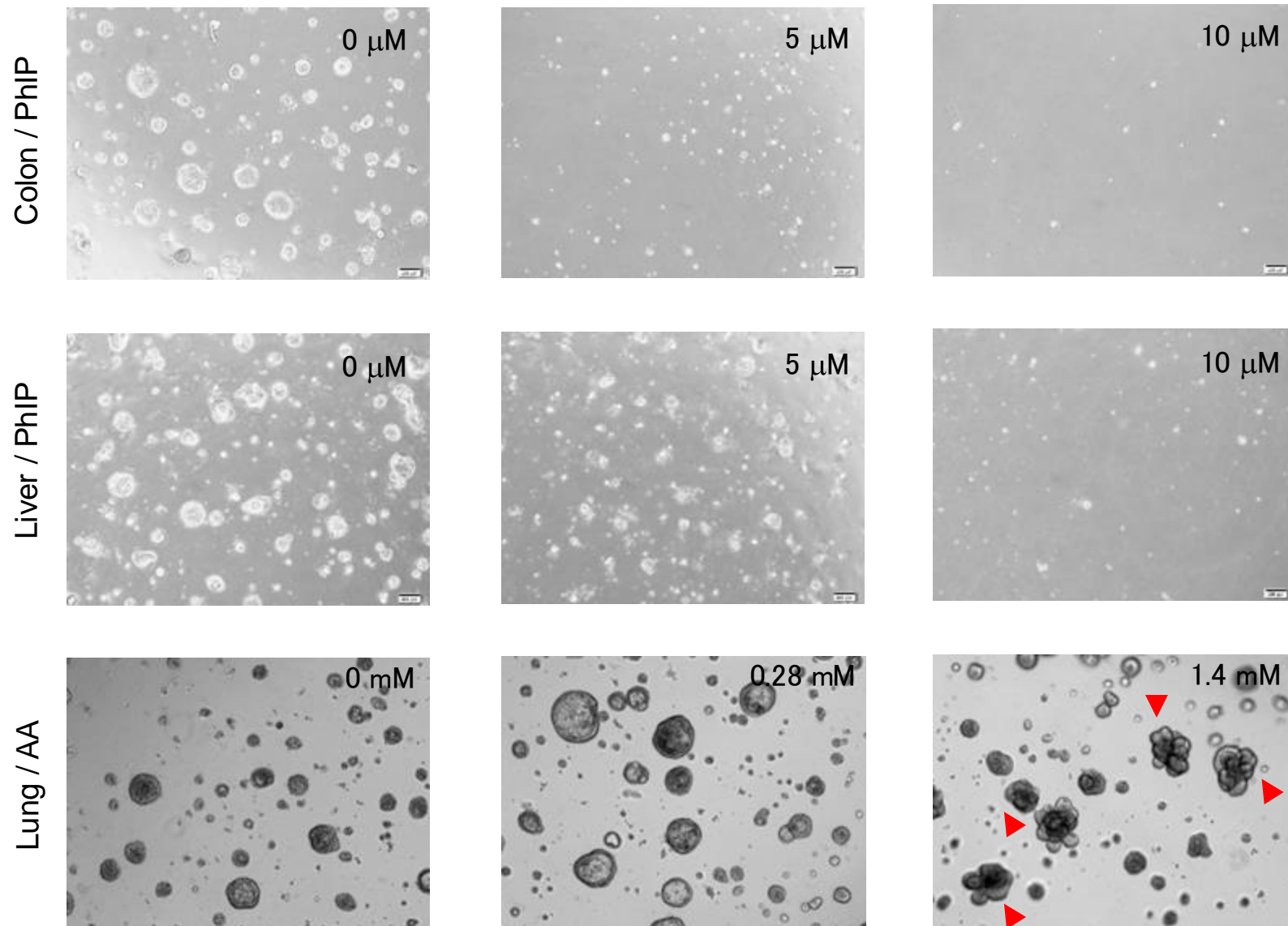


TGマウス由来正常組織オルガノイドを用いた遺伝毒性評価

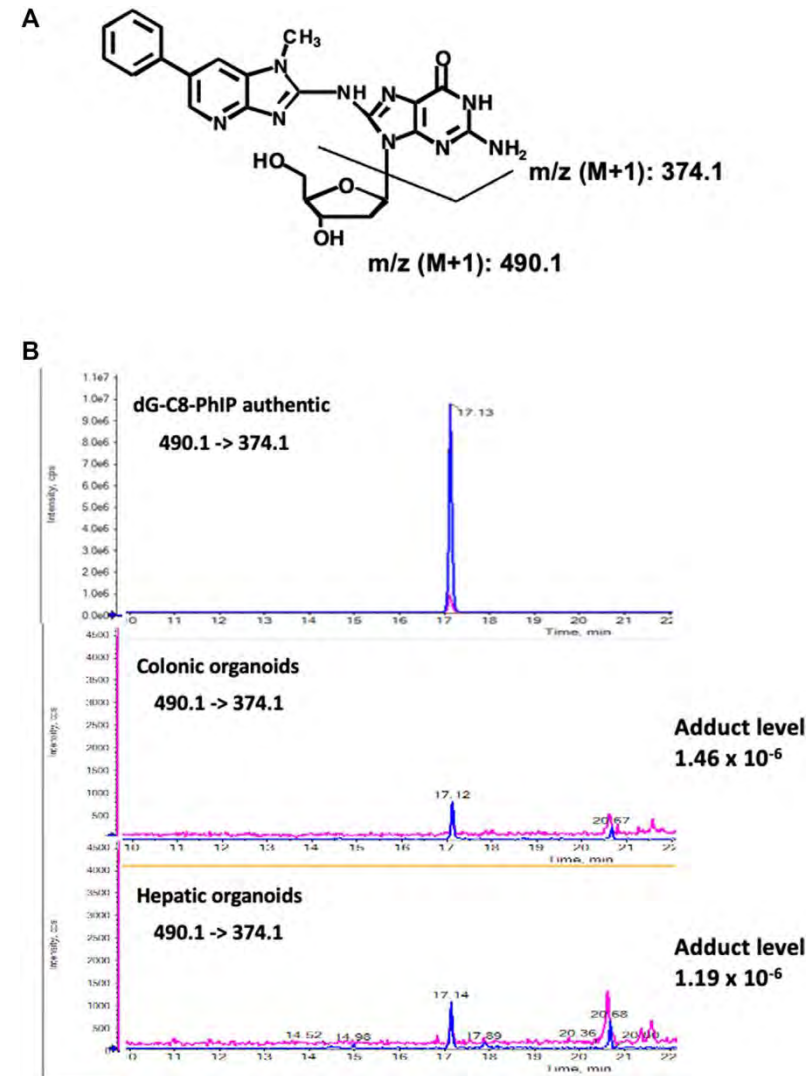
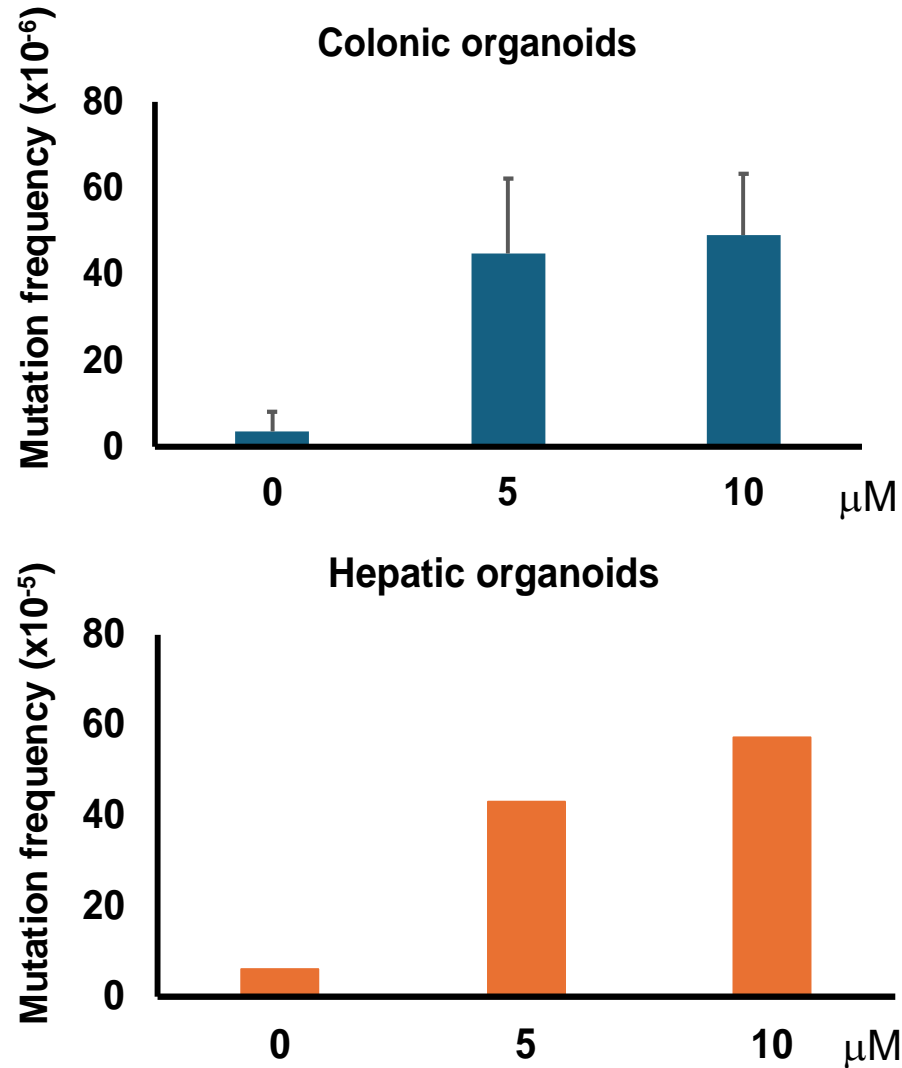
被検物質	遺伝毒性	発がん性	使用したオルガノイド
PhIP	あり	あり (大腸・乳腺・前立腺)	大腸・肝臓
アクリルアミド(AA)	あり	あり (肺)	肺



PhIP/AA曝露によるオルガノイドの形態変化(3回曝露後)



PhIP曝露による大腸および肝臓由来オルガノイドの変異頻度とDNA付加体レベル



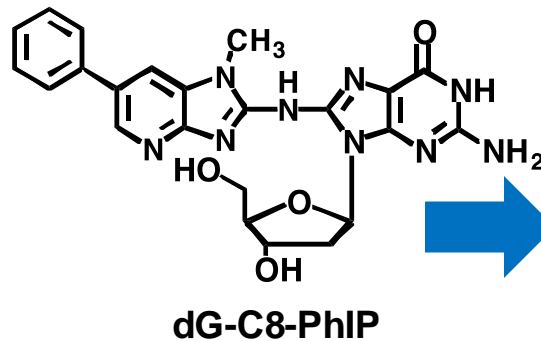
PhIP曝露により大腸オルガノイドに誘発された変異パターン

Type of mutation		Control		Control-2 ^a		PhIP		
		Number of mutants (%)	Specific MF ^c (10 ⁻⁶)	Number of mutants (%)	Specific MF ^c (10 ⁻⁶)	Number of mutants (%)	Specific MF ^c (10 ⁻⁶)	
Base substitution	Transition	G:C to A:T	0 (0)	0	31 (43.1)	2.62	13 (37.1)	6.40 *
		A:T to G:C	0 (0)	0	8 (11.1)	0.67	0 (0)	0
	Transversion	G:C to T:A	3 (100)	3.34	19 (26.4)	1.60	15 (42.9)	7.39 *
		G:C to C:G	0 (0)	0	0 (0)	0	1 (2.9)	0.49
		A:T to T:A	0 (0)	0	4 (5.6)	0.34	0 (0)	0
		A:T to C:G	0 (0)	0	3 (4.2)	0.25	0 (0)	0
Insertion		0 (0)	0	4 (5.6)	0.34	0 (0)	0	
Deletion		0 (0)	0	3 (4.2)	0.25	6 (17.1)	2.95 *	
Others		0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	
Total		3 (100)	3.34	72 (100)	6.08	35 (100)	17.2 *	

^a *in vivo* data (Masumura et al. 2000, Carcinogenesis)

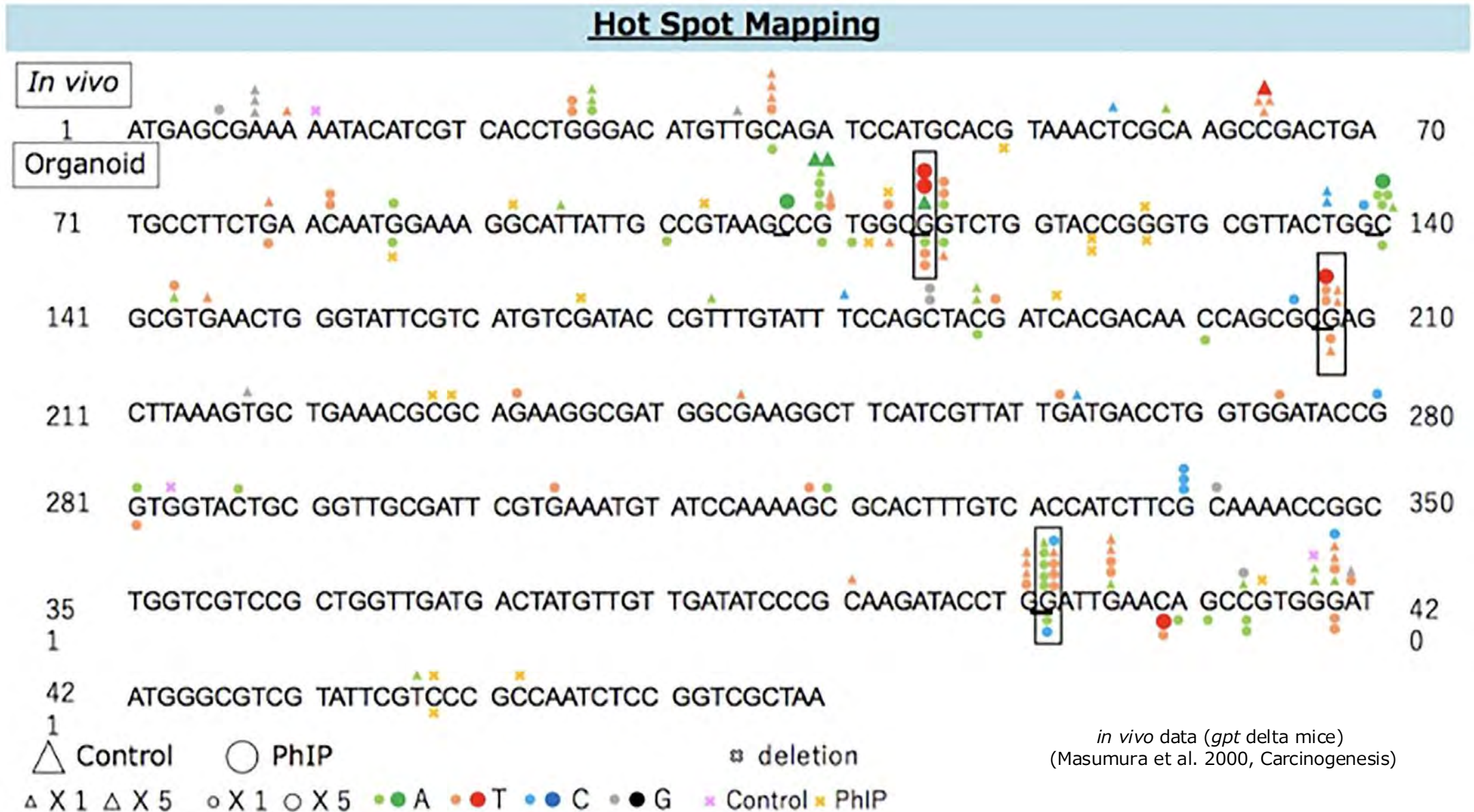
^b PhIP vs control.

^c PhIP vs control-2.



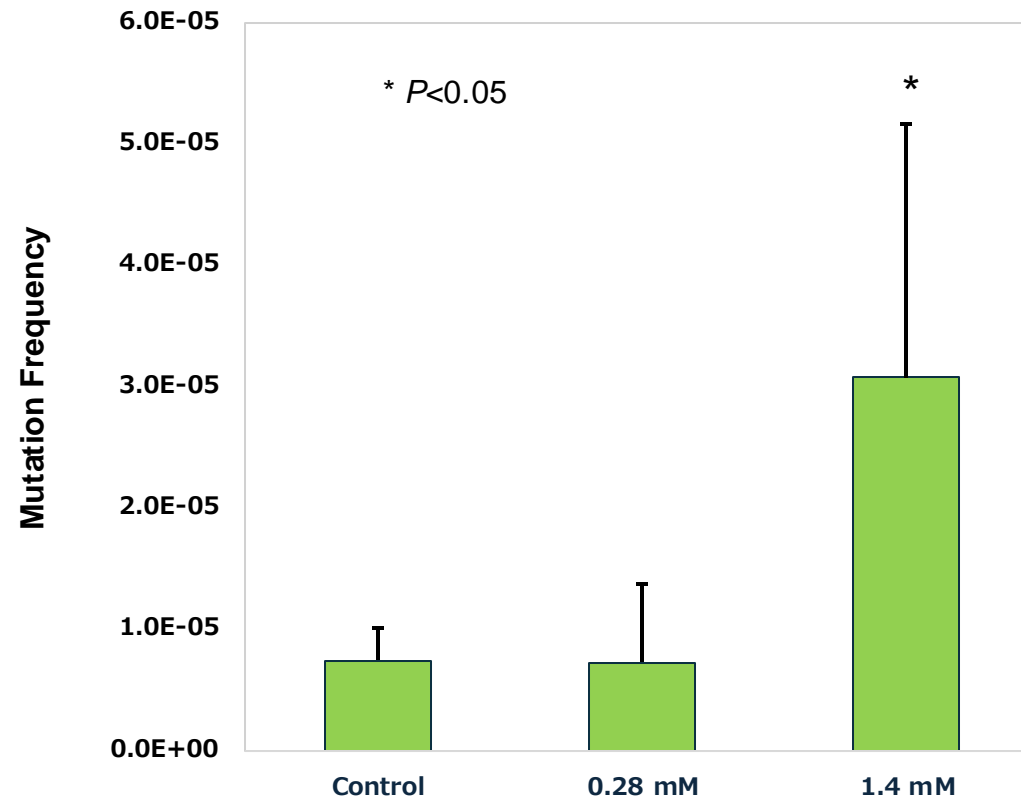
G:C → T:A,
G:C → A:T,
-1G del

大腸オルガノイドにおけるHot Spot Mapping (*gpt* gene)



in vivo data (*gpt* delta mice)
(Masumura et al. 2000, Carcinogenesis)

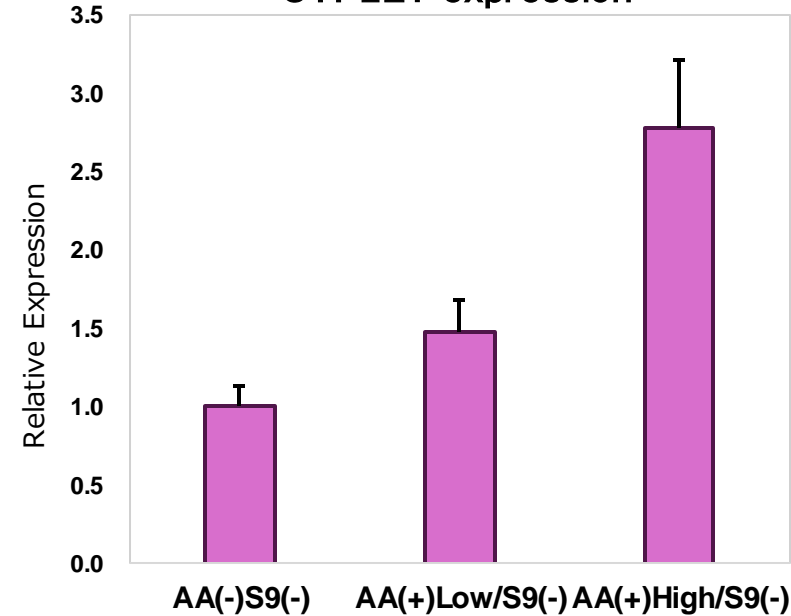
AA曝露による肺オルガノイドの変異頻度



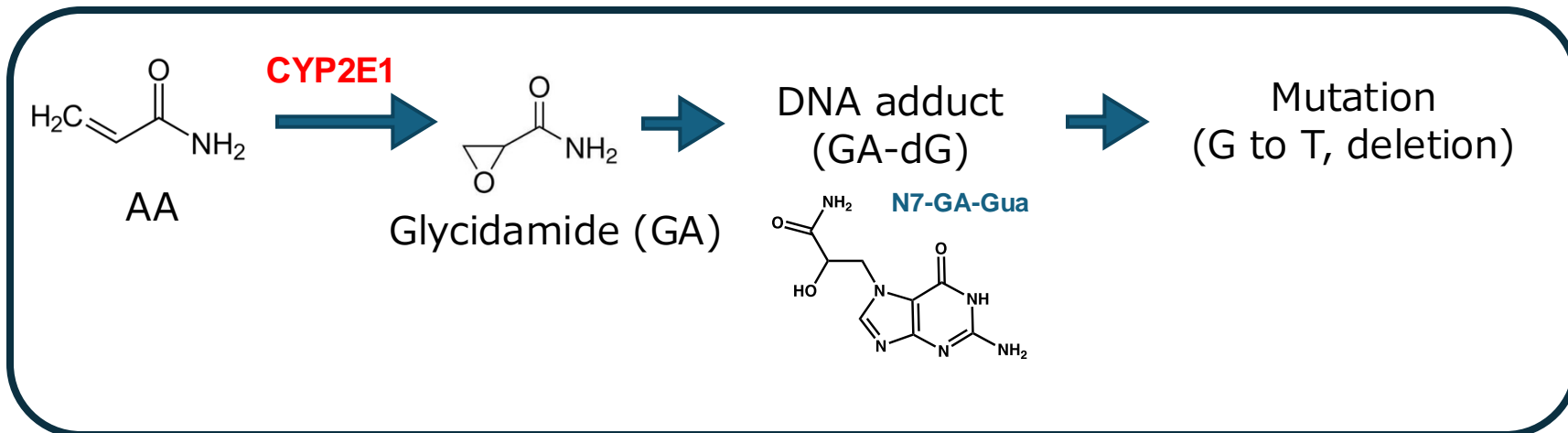
AAはAmes試験では陰性となるが*in vivo*試験では陽性となる

変異原性試験	標的遺伝子	判定
<i>In vitro</i>		
Ames	hisG46	陰性
<i>In vivo</i>		
<i>gpt</i> deltaマウス (肺)	<i>gpt</i>	陽性
	Spi-	陽性

マウス肺オルガノイドにおける
CYP2E1 expression



AAの変異原性発現メカニズム



AA曝露により肺オルガノイドに誘発された変異パターン

Type of mutation		Control		Control-2 ^a		AA		
		Number of mutants (%)	Specific MF ^c (10 ⁻⁶)	Number of mutants (%)	Specific MF (10 ⁻⁶)	Number of mutants (%)	Specific MF ^c (10 ⁻⁶)	
Base substitution	Transition	G:C to A:T	1 (16.7)	1.28	6 (60.0)	0.15	8 (16.0)	5.19 *
		A:T to G:C	0 (0)	0	0	0	0 (0)	0
	Transversion	G:C to T:A	2 (33.3)	2.57	1 (10.0)	0.02	4 (8.0)	2.59 *
		G:C to C:G	0 (0)	0	1 (10.0)	0.03	0 (0)	0
		A:T to T:A	0 (0)	0	0	0	3 (6.0)	1.95 *
		A:T to C:G	0 (0)	0	0	0	5 (10.0)	3.24 *
Insertion		0 (0)	0	0	0	3 (6.0)	1.95	
Deletion		3 (50.0)	3.85	2	0.06	27 (54.0)	17.51 *	
Others		0 (0)	0	0	0	0 (0)	0	
Total		6 (100)	7.71	10 (100)	0.26	50 (100)	32.43	

^a in vivo data (Ishii et al. Mutagenesis, 2015, 30 227-235)

^b AA vs control.

^c AA vs control-2.

AAの*in vivo*遺伝毒性結果
(*gpt* delta mice)

・ G:C → T:A, 1塩基欠失が有意
Ishii et al, Mutagenesis, 2015

小括 2

【PhIP曝露】

- 大腸・肝臓オルガノイドとも、PhIP曝露によって*gpt*変異頻度は同程度に上昇した。*gpt delta mouse*を用いた試験では、PhIPの発がん標的臓器である大腸、非標的臓器の肝臓ともに変異頻度の上昇が報告されているが、大腸の方がより変異頻度が高いことが報告されている。
- 大腸・肝臓オルガノイドにおけるdG-C8-PhIPの生成レベルを比較したところ、ほぼ同じレベルでDNA付加体の生成が認められた。
- 大腸オルガノイドの変異スペクトルを解析した結果、G:C→T:AおよびDeletionが主要なスペクトルであり*in vivo*の結果と同じ傾向を示した。
→臓器特異性が観察されない理由として、オルガノイドに直接PhIPを曝露していることによると考えられた。

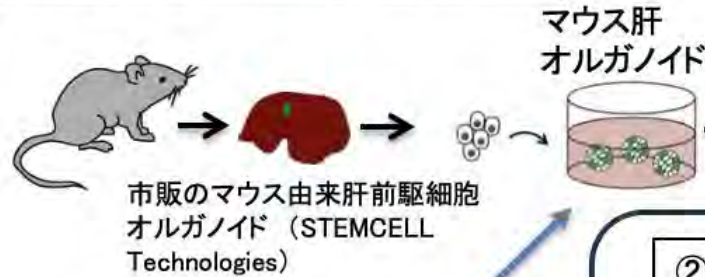
【AA曝露】

- *gpt*遺伝子の変異頻度を解析した結果、コントロールと比べAA高濃度群で優位に増加した。
- 肺オルガノイドのCYP2E1遺伝子の発現を調べたところ、肺オルガノイド自身にCYP2E1が存在し、さらに、AAの高濃度曝露により発現が誘導されることが明らかとなった。
- 変異スペクトルを解析した結果、*in vivo*と同様の傾向を示した。
→オルガノイド自身の代謝酵素によりAAが代謝されることで、Ames試験では検出できない変異原性を本試験法では観察できることがわかった。

オルガノイドを用いた遺伝毒性試験の今後の展望

in vitro試験法

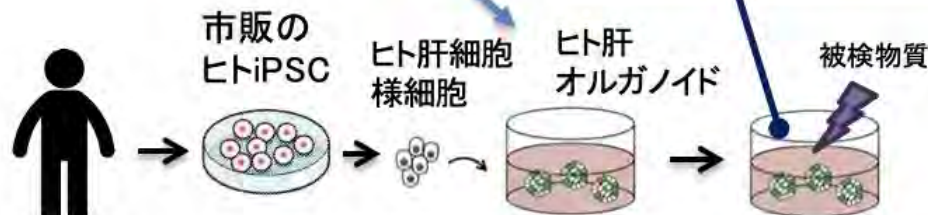
① マウス正常肝臓由来のオルガノイド



マーカー遺伝子発現による安定性評価

② ヒト代謝活性化系の導入

ヒト肝キメラマウス由来の肝細胞 (HepaSH細胞) とオルガノイドの共培養



③ ヒト肝臓由来のオルガノイド

ヒトと齧歯類で代謝が異なる化学物質

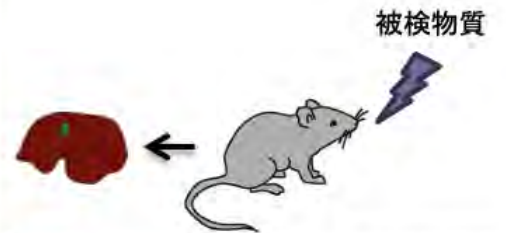
- アクリルアミド
- 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA)
- アミノアントラセン
- ジメチルニトロサミン

in vivo試験法

評価項目

- 小核出現頻度
- Ec-NGSによる変異頻度/変異シグネチャー

比較



野生型マウス / ヒト肝キメラマウス

動物試験代替法の妥当性について検証

発がん標的臓器

化学物質毎に発がん性を示す臓器が異なる

◆ オルガノイドを用いた遺伝毒性評価系として適切な組み合わせについて検討