

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

腫瘍性病変をエンドポイントとするオルガノイド系を用いる食品添加物等の
遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

研究代表者 今井 俊夫
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本研究は、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウス、レポーター遺伝子導入マウス等から調製したオルガノイド系あるいはそれらにshRNAを用いて発がん関連遺伝子の発現変化を加えたオルガノイド系につき、遺伝毒性試験法としての適用性と腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法としての妥当性を検証し、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目標としている。これまでは、マウス正常器官・組織を用いて、主に小腸や大腸、肺などのオルガノイド調製法の検討を行ってきた。今年度の本研究課題においては、大腸のオルガノイドに対しレンチウイルスを用いて種々のがん関連遺伝子発現の変化させることによる発がんへの影響を解析するとともに、大腸については2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)、肺については4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の発がん性を検討した。その結果、PhIPについては発がん性が確認され、NNKについては検証を継続している。遺伝毒性については、*gpt delta*マウス由来の肝臓及び膀胱のオルガノイドについて、背景データとしてのspontaneousな変異頻度について解析した。その結果、肝臓由来のオルガノイドにおける変異頻度は、肝臓組織から直接ゲノムDNAを抽出した場合の変異頻度と同程度であることを確認した。一方、膀胱由来の細胞は肝臓と同じ培養条件では殆ど増殖せず、引続きの条件検討を要する。また、オルガノイドを用いる試験法については調製条件の違いにより施設間で得られる試験結果のばらつきを生じさせない対策が必要であり、結果に重大な影響を及ぼす培養条件を明らかにする目的で、異なる条件下で調製したオルガノイドについて基盤的なデータを蓄積している。今年度は、4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓（胆管）由来のオルガノイドと*gpt delta*雄マウスの肺由来のオルガノイドについて発現遺伝子を比較した結果、前者では化学物質代謝に関連するCypファミリーやUDPGTファミリー関連遺伝子のほか、発がん進展に関連するとの報告があるtrefoil factor 2の発現において、後者では化学物質代謝に関連するN-acetyltransferase 1などの発現に週齢差がみられたことから、オルガノイド調製のためのマウスからの組織採取時期に注意を要することが示された。

研究分担者

今井俊夫・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

筆宝義隆・千葉県がんセンター・研究所・発がん制御研究部長

戸塚ゆ加里・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

落合雅子・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

A. 研究目的

食品添加物等の生体における遺伝毒性評価法として、レポーター遺伝子をマウス・ラットに導入し

た遺伝子突然変異検出系の開発により評価精度が向上したが、発がん性については長期試験の時間・使用動物削減・経費面の課題と短・中期試験からの予測による不確実性を克服する評価法の開発を要する。我々はマウスの大腸・肺等の正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製し、臓器毎の発がん機序に基づく遺伝子改変操作を加えてヌードマウスに皮下移植すると腫瘍様組織を形成し、既知の発がん物質処置により当該組織の増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする悪性化が誘導できることを見出した。本研究では、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウス、レポーター遺伝子導入マウス等から調製したオルガノイド系あるいはそれらにshRNAを用いて発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系

につき、遺伝毒性試験法としての適用性と腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法としての妥当性を検証し、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指す。また、最終的に多施設で実施可能な方法として確立できることが重要であるが、現在マウス正常組織から3次元培養法によりオルガノイドを調製する技術は幅広く行われてはならず、必要な試薬類にも高価なものが含まれる。しかし、経費面では長期発がん性試験に対比し十分な費用対効果が見込まれ、普及面では哺乳類培養細胞を用いる小核試験等のように、実施機関や技術者の基盤整備・技術訓練により普及した系も存在することから、本研究での成果は広く食品添加物等の安全性評価に活用可能と考えられる。一方、オルガノイドの調製条件の違いにより施設間で得られる試験結果のばらつきが生じないような対策が必要であり、本研究課題においては、結果に重大な影響を及ぼす培養条件を明らかにする目的で、異なる条件下で調製したオルガノイドについて基盤的なデータ蓄積も併せて行う。

B. 研究方法

(1) C57BL/6Jマウスを用いるオルガノイドの調製とヌードマウス皮下移植による造腫瘍性の確認

1) 大腸、肺及び膀胱由来のオルガノイドの調製
C57BL/6J(B6J)マウス(野生型またはLSL-*Kras*^{G12D})の肺、大腸及び膀胱からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は次の通りである。

[1日目]

-) 肺、大腸、膀胱摘出、細切、酵素処理
-) マトリゲル上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

-) 液体培地を除きマトリゲルを重層
-) マトリゲル上に液体培地を加え培養

[1週間目(オルガノイドの増殖程度で判断)]

-) マトリゲルを除きオルガノイドを軽く破碎して継代
-) 1日目、2日目と同様の操作により培養継続
-) 継代・培養を3回程度繰返し

[レンチウイルスによる遺伝子導入]

-) B6Jマウス由来オルガノイド: がん抑制遺伝子のshRNA(*Apc* shRNA(*shApc*), *Pten* shRNA(*shPten*), *p16*(*shp16*)など)を導入
-) LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイド: Cre recombinase遺伝子を導入して*Kras*を活性化した後、がん抑制遺伝子shRNAを追加導入

2) オルガノイドのヌードマウス皮下への移植

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

-) イソフルランによる軽麻酔下にて背部皮下左右2カ所に接種
-) 移植後4~6週後に頸椎脱臼による安楽死後、皮下腫瘍を摘出
-) 腫瘍を10%中性緩衝ホルマリンにて固定、常法に従いパラフィン包埋切片を作製しヘマトキリン・エオジン染色を行い病理組織学的に評価

3) オルガノイドへの化学物質暴露

-) オルガノイド: B6Jマウス大腸または肺由来
-) 被験物質: PhIP(0, 3, 10 μM)+S9 mix
NNK(0~5,000 μM)+S9 mix

PhIPとNNKは、げっ歯類において各々大腸と肺に発がん性が示されている陽性対照として選択した。

(2) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製とspontaneousな変異頻度についての検討

1) 肝臓、大腸及び膀胱由来のオルガノイドの調製
*gpt delta*マウス(日本エスエルシーより購入)の肝臓、大腸及び膀胱からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は(1)と同様とした。

2) DNA抽出、*in vitro*パッケージングと変異頻度解析

Masumuraらの方法(1999)に準じてオルガノイドから高分子ゲノムDNAを抽出し、*in vitro*パッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。

(3) 発がん性試験法としてオルガノイドを用いる際の最適化に関する解析

1) オルガノイドの調製

4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウス肺からオルガノイドを調製した。手順は(1)1)と同様に行ったが、レンチウイルスによる処置は行わなかった。4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)から調製したオルガノイドについては3~13日に1回、各々7、10、8回継代した。*gpt delta*マウスの肺から調製したオルガノイドについては7~10日に1回、各々7、7、6回継代した。

2) 総RNAの抽出

ISOGEN with Spin Column(日本ジーン製)を用いて肝臓(胆管)及び肺のオルガノイドから総RNAを抽出した。

3) DNAアレイによる遺伝子発現解析

Mouse Oligo chip 24k(東レ製)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。データ収集は東レに委託

し、解析は国立がん研究センター研究所動物実験部門においてGeneSpring (アジレント社製)により行った。

C. 研究結果

(1) C57BL/6Jマウスを用いるオルガノイドの調製とヌードマウス皮下移植による造腫瘍性の確認

1) B6Jマウス(野生型またはLSL-*Kras*^{G12D})大腸由来のオルガノイドの遺伝的再構成による発がん

マウス系統あるいはshRNA処置によりマウス皮下における増殖形態が異なっていた。組織判定は) マイナス(- ; 細胞を痕跡的に認める)、1+(細胞の増殖がみられるが異型性なし)、2+(異型性を伴う細胞増殖)、3+(周囲組織に浸潤性を認める)の4段階とした。

LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドについては、*Kras*活性化のみで(-)~(1+)、*shApc*を追加導入(*Kras*^{G12D} *shAPC*)しても同様であった。一方、*Kras*^{G12D} *shPten*で(2+)、*Kras*^{G12D} *shApc*+*shp53*あるいは*Kras*^{G12D} *shApc* +*shPten*にて(3+)を示した。

B6Jマウス由来大腸オルガノイドでは、*shApc*のみで(-)~(1+)、*shApc* *shPten*、*shApc* *shPten* +*shp53*により場合に(2+)を示し、*Kras*活性化と*Apc*の発現抑制に対し、更に*p53*あるいは*Pten*の発現抑制が加わることが発がん過程に効果的であることが示された。また、小腸オルガノイドの場合にはB6J由来オルガノイドの場合でも*shApc*のみで(2+)がみられるが、大腸では*shApc*のみの場合とMOCK(陰性対照ベクター)の場合とで組織学的な違いは認められず、小腸由来オルガノイドに比し大腸オルガノイドでは発がんするまでに、より多くの遺伝子変化を必要とすることが示唆された。*Apc*変異を片側アレルにもつ*APC*^{Min}マウスでは、小腸に多数の自然発生腫瘍が発生するが、大腸には少ないことと関連するものと考えられた。

B6Jマウス由来膀胱オルガノイドについては、MOCK(陰性対照ベクター)の場合と比較して、*shPten*の導入により腺管が大きくなるなど細胞増殖への影響を示唆する結果が得られたが、*in vitro*での培養の段階での増殖が遅く、引続きの培養条件検討を要する。

2) 大腸由来のオルガノイドに対するPhIPと肺由来のオルガノイドに対するNNKの影響

PhIPについては、培養プレート 1 well当り5,000~10,000個の細胞を播種した際、NADの還元能を指標とする細胞生存性測定試験において細胞数に応じた増殖曲線を示したことから、細胞増殖を反映していると判断された。PhIPをS9mix存在下、0.05~10 μMの濃度で24時間暴露し、暴露終了0~72時間まで測定した。PhIPは用量依存的に細胞生存性に影響を与え

ることが示され、今回は0、3、10 μM濃度の単回処置により発がんへの影響を検討した。その結果、MOCK PhIP-10 μM処置では(-)であったが、*shPten* PhIP-0、3、10 μM処置により、ヌードマウス皮下に形成された組織は各々(1+)、(2+)、(3+)であり、大腸オルガノイドに対する*in vitro*でのPhIP処置により発がん性が示された。

NNKについては、S9mix存在下、0~5,000 μM濃度の1~3回処置により発がんへの影響を検討した。その結果、shRNA未処理のオルガノイドではNNKにて処置しても(-)であったことから、現在、*shp16* *shPten*処置あるいは*Kras*活性化後のNNKの影響を検討している。一方、*shPten*処置後の肺オルガノイドは、通常であれば嚢胞状に増殖するところ充実性かつ乳頭状に変化し、オルガノイドの切片をヘマトキリシン・エオジン染色下で観察すると扁平上皮化生を示す変化がみられた。これらの所見より、発がん物質処置により扁平上皮がんを誘導できる可能性が示唆され、タバコが扁平上皮がんの原因の一つであることを考え合わせると、その発生機序の解析系に応用できるか否か引続き検討する。

(2) *gpt* deltaマウスを用いるオルガノイドの調製とspontaneousな変異頻度についての検討

肝臓由来オルガノイドから常法に従い高分子のゲノムDNAを抽出した。*In vitro*パッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った結果、変異頻度は 6.70×10^{-6} であり、マウス肝臓から直接抽出したゲノムDNAの変異頻度($4.26 \pm 2.10 \times 10^{-6}$)と同程度であることが明らかとなった。

(3) 発がん性試験法としてオルガノイドを用いる際の最適化に関する解析

1) 4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5 6週齢に従い持続的に2倍以上発現上昇した40遺伝子の中には、cytochrome P450ファミリーの2遺伝子とUridine 5'-diphosphoglucuronosyl-transferase2ファミリーの4遺伝子など化学物質代謝に関連するものの他、*trefoil factor 2*(*Tff2*)と*Tff3*が含まれていた。*Tff2*は腸管が発がん標的の*Apc*(*Min*/+)マウスにおいて発がん促進に関与する可能性が示され(Fujimoto Kら、2015)、ヒト胆管がんにおいても*TFF2*はEGFR/MAPKの活性化を介する増殖促進に寄与するとの報告もある(Kosriwong Kら、2011)ことから、オルガノイド調製のためのマウスからの組織採取時期に注意を要することが示された。

2) 4、5及び6週齢の*gpt* delta雄マウスの肺から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現

4 5 6 週齢に従い持続的に2倍以上発現上昇した62遺伝子の中には、化学物質代謝に関連するN-acetyltransferase 1や血管新生やがん細胞の浸潤に関連するmatrix metalloproteinase 2 (MMP2) が含まれていた。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成24年最終改正法律第50号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正)」を遵守した。また、「国立研究開発法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

D. 健康危険情報

該当なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, in press.
- (2) Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 16(2):3474-92 (2015)
- (3) Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci*. (2015)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫, 落合雅子, 松浦哲也, 中釜 斉, 筆宝義隆: 遺伝子改変マウス由来正常上皮細胞の3次元培養法を用いる新たな化学物質発がん性試験法の開発. 第32回日本毒性病理学会ワークショップ「発癌研究の最新の動向」(香川、2016年1月)
- (2) 筆宝義隆: 3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立. 第22回肝細胞研究会(米子、2015年6月)
- (3) 松浦哲也, 筆宝義隆: マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現. 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山、2015年6月)
- (4) 筆宝義隆: 3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立と個別化医療への応用. 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山、2015年6月)
- (5) 筆宝義隆, 松浦哲也, 落合雅子, 今井俊夫, 折橋郁, 丸喜明: 3次元初代培養を用いた膵管・胆道発がんモデルの確立. 第30回発がん病理研究会(小豆島、2015年8月)
- (6) 筆宝義隆: In vitroでの発がん再構成. お茶の水がん学アカデミア第117回集会(東京、2015年9月)
- (7) Yoshiaki Maru, Kaoru Orihashi, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor Induction from Murine Gastric Organoids. 第74回日本癌学会総会(名古屋、2015年10月)
- (8) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Direct transformation of primary murine pancreatic ductal cells in vitro. 第74回日本癌学会総会(名古屋、2015年10月)
- (9) Yoshitaka Hippo, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Toshio Imai. A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 第74回日本癌学会総会(名古屋、2015年10月)
- (10) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells. 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津、2016年2月)
- (11) Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor

Induction from Upper Gastrointestinal Tract 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津、2016年2月) 3.その他
該当なし。

- (12) 戸塚ゆ加里、中釜 斉：質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明 .第 42 回日本毒性学会学術大会(金沢、2015年7月)
- (13) Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) . 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋、2015年10月)
- (14) 戸塚ゆ加里 : ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索 .第 44 回日本環境変異原学会 .(福岡、2015年12月)
- (15) 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里 : 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響 .第 44 回日本環境変異原学会 .(福岡、2015年12月)
- (16) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫 : 正常上皮細胞の 3 次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研究への応用に向けて、がん予防学術大会 2015 さいたま (さいたま、2015年6月)
- (17) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫 : マウス正常腸管上皮の 3 次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用 .第 30 回発がん病理研究会 (小豆島、2015年8月)
- (18) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫 : マウス正常腸管上皮の 3 次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用 .第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋、2015年10月)
- (19) 落合 雅子、中釜 斉 : マウス正常上皮細胞の 3 次元培養法を用いる *in vitro* 発がんモデルの開発 .日本環境変異原学会第 44 回大会 (福岡、2015年11月)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

F . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。

