

オルガノイド皮下移植系の病理学的評価

研究分担者 今井俊夫 国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本分担研究課題においては、主に腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法に関連し、(1)オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的特性に関する解析と、(2)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を進めた。具体的に(1)については、大腸と膀胱のオルガノイド調製法について検討し、更に大腸については2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)の影響を評価した。(2)については4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウスの肺からオルガノイドを調製し、臓器採取時週齢の違いによるオルガノイドの発現遺伝子の違いを検索し、化学物質の発がん性を検出する目的に則した採取条件の検討を行った。(1)の結果として、大腸由来オルガノイドは、オルガノイド調製に用いるマウス系統あるいはshRNA処置によりヌードマウス皮下における増殖形態が異なり、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段階に分類可能であった。膀胱由来オルガノイドは増殖性が弱く、培養条件検討の継続を要すると判断した。(2)の結果として、肝臓(胆管)由来オルガノイド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や発がん進展に関連するとの報告があるtrefoil factor 2の発現に、肺由来オルガノイド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。

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、最終的に妥当性が検証されるとともに、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。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、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。

本分担研究課題においては、主に腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法に関連し、(1)オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的特性に関する解析と、(2)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を進めている。今年度は、大腸と膀胱のオルガノイド調製法について検討し、更に大腸については2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)の発がん性について検討した。(2)については4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウスの肺を用いてオルガノイドを調製し、臓器

採取時週齢の違いによるオルガノイドの発現遺伝子の違いを検索し、化学物質の発がん性を検出する目的に則した採取条件の検討を行った。

B. 研究方法

(1) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的解析

1) オルガノイドの調製

C57BL/6J (B6J) マウスおよびLSL-*Kras*^{G12D}マウスの大腸と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]

-) 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*) 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シリン・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マウス大腸由来
-) レンチウイルス処置：sh*Pten*遺伝子導入
-) 被験物質：PhIP (0, 3, 10 μM) +S9 mix
-) 処置：レンチウイルス処置16日後、継代時に被験物質を6時間1回処置
-) ヌードマウス皮下接種：被験物質処置後48日後
-) 皮下腫瘍採取：皮下接種60日後

(2) 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) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的解析

1) 大腸オルガノイドのマウス皮下増殖形態

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+)、*Kras*^{G12D} sh*Pten*で(2+)、*Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*p53*あるいは*Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*Pten*にて(3+)を示した。一方、B6Jマウス由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみで(-)~(1+)、sh*Apc* sh*Pten*、sh*Apc* sh*Pten* +sh*p53*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。

2) 膀胱オルガノイドのマウス皮下増殖形態

B6Jマウス由来膀胱オルガノイドに対し、*Pten* shRNAを導入し、ヌードマウス皮下に移植後、大腸より長期間の8週間後に病理組織学的解析を行った。その結果、*Pten* shRNAを導入したオルガノイドではshRNAを導入しなかったオルガノイドに比し腺管が拡大したことから、細胞増殖への影響が示唆された。

3) PhIP処置による大腸オルガノイドの造腫瘍性
shPten遺伝子導入なし PhIP-10 μM処置しヌード
マウス皮下に接種したオルガノイドの組織学的検査
結果はマイナスであった(図1A)。一方、shPten遺
伝子導入後 PhIP-0、3、10 μM処置しヌードマウス
皮下に接種したオルガノイドについては、1+、2
+、3+であった(図1B-D)。

(2) 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週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時に
おいて2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を図2
に示した。4 5 6週齢に従い持続的に発現上昇
した(図2の赤字1)40遺伝子の中にはcytochrome
P450ファミリーの2遺伝子とUridine 5'-diphospho-
glucuronosyl 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週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時に
おいて2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を図3
に示した。4 5 6週齢に従い持続的に発現上昇
した(図3の赤字1)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. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- (1) 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。第22回日本がん予防学会
(さいたま、2015年6月)
- (2) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、今井俊夫、
筆宝義隆：マウス正常腸管上皮細胞の3次元培
養系を用いる発がん再構成に対する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)
- (3) 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)

E. 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。

3. その他

該当なし。

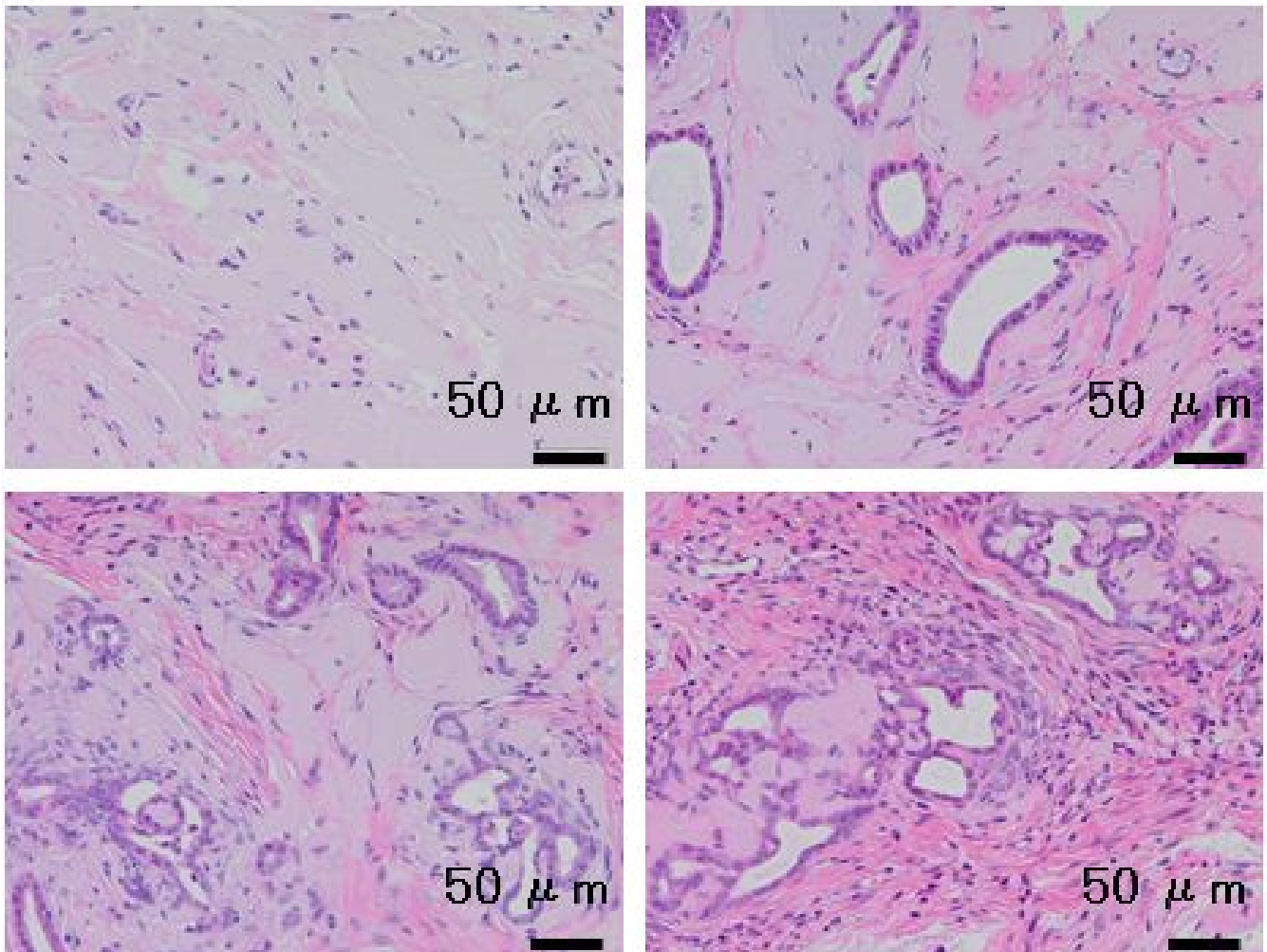


図1 C57BL/6J雄マウスの大腸から調製したオルガノイドにおけるPhIPの影響解析(ヌードマウス皮下)
 (A、左上) *shPten*遺伝子導入なし PhIP-10 μ M処置。上皮細胞は認められない。(B、右上) *shPten*遺伝子導入後 PhIP-0 μ M処置。腺管形成がみられるが異型性はない。(C、左下) *shPten*遺伝子導入後 PhIP-3 μ M処置。腺管形成、増生がみられる。一部の上皮細胞に軽度の核肥大/異型がみられる。(D、右下) *shPten*遺伝子導入後 PhIP-10 μ M処置。一部の腺管にて軽度に浸潤し、それに伴い間質細胞の反応がみられる。

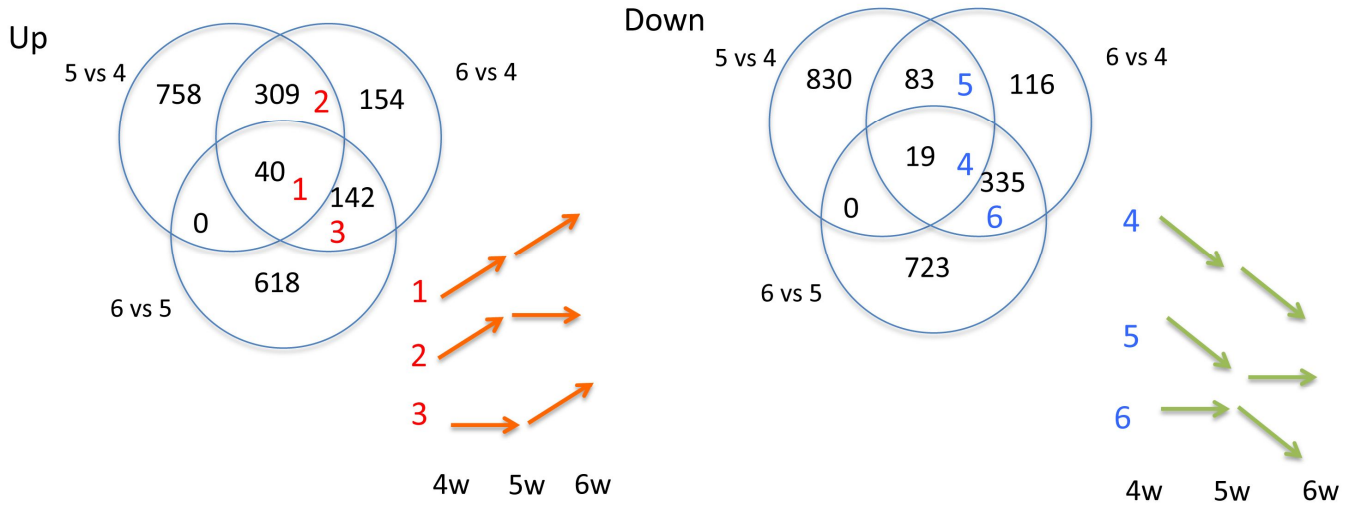


図2 C57BL/6J雄マウスの肝臓（胆管）から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時において2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を示す。

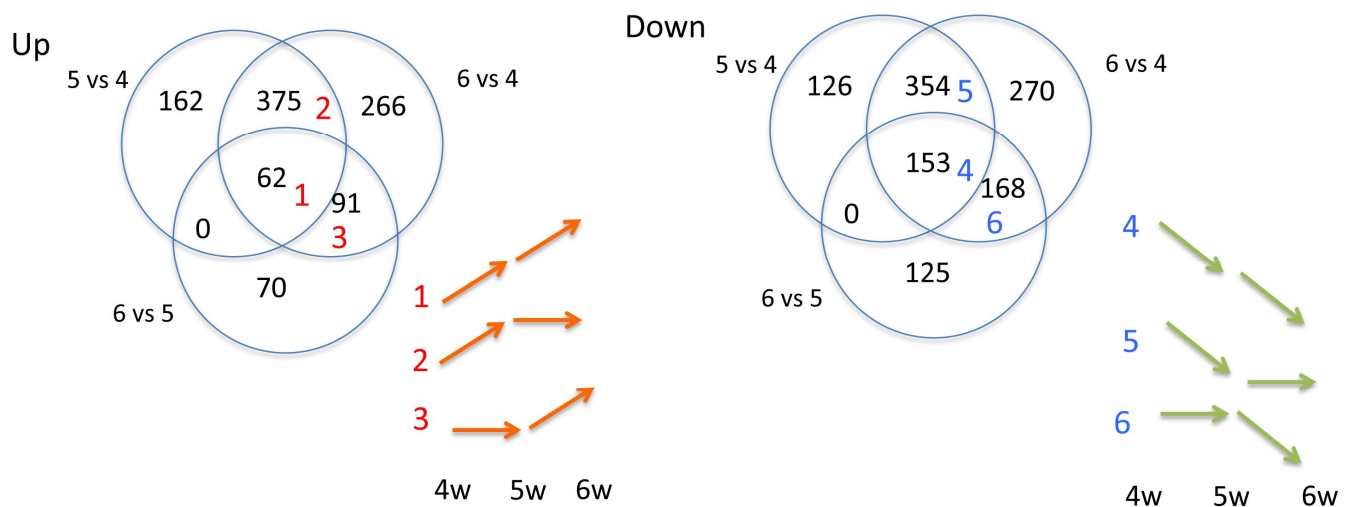


図3 *gpt delta*雄マウスの肺から製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時において2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし。						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当なし。				