別添４

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）
分担報告書

オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究

研究分担者　戸塚ゆ加里　国立がん研究センター研究所　発がん・予防研究分野　ユニット長

研究要旨

短・中期の発がん性が予測可能な簡便な*in vitro*試験法の確立を目的として、トランスジェニックマウスである*gpt* deltaマウスより各種臓器のオルガノイドを作成し、食品添加物の遺伝毒性評価に応用可能かどうかについて検討を行っている。今年度は、４～６週齢程度の*gpt* deltaマウスから肝臓及び膀胱を切り出し細切、コラゲナーゼ／ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養、継代を行ないオルガノイドの作成を行った。オルガノイドを用いた遺伝毒性試験法の手技手法の確立のため、高分子DNA抽出方法の検討及び背景データとして、spontaneousな変異頻度について確認を行なった。肝臓より作成したオルガノイド（約$1x10^7$ cell）より常法に従ってゲノムDNAを抽出したところ、高分子の状態の良いDNAが抽出できることを確認した。このゲノムDNAを用い、インビトロ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。その結果、変異頻度は6.70×10^{-6}であり、マウス肝臓より直接ゲノムDNAを抽出した場合の変異頻度（$4.26 \pm 2.10 \times 10^{-6}$）と同程度であることがわかった。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、オルガノイドの作成には至らなかった。現在、膀胱に最適な培養条件を検討しているところである。今後、大腸、肺などの肝臓以外の臓器についてもオルガノイドを作成し、被験物質曝露のない状態での変異頻度や突然変異スペクトラムの解析を行なう。変異頻度があまりにも高い場合には、オルガノイド調整の際のコンディションなどを再度検討するなどの工夫をする。更に、*gpt* deltaマウスの各種臓器から調製したオルガノイドに既知の遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を曝露し、遺伝毒性の有無を解析し、本試験の妥当性について検討を行う予定である。

A．研究目的

既存の食品添加物に対する*in vivo*遺伝毒性試験としては、小核試験（染色体異常試験）やレポーター遺伝子を標的とした遺伝子突然変異試験などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの試験のみでは食品添加物の発がん性の予測は難しい。通常、発がん性試験は大量の実験動物を用い、かつ長期間を要することから、短・中期の発がん性が予測可能な簡便な*in vitro*試験法が必要であると考える。本研究は、実験動物より作成した各臓器のオルガノイドを食品添加物の遺伝毒性及び発がん性の予測に用いることの妥当性について検討することを目的としている。今年度は、まず、遺伝毒性試験に汎用されているトランスジェニックマウスである*gpt* deltaマウスより大腸、肝臓、肺、膀胱を摘出し、安定してオルガノイドを作成可能かどうか、及びそれらオルガノイドから食品添加物の遺伝毒性試験に利用可能な高分子のゲノムDNAの収集が可能かどうかについて検討した。

B．研究方法

４～６週齢程度の雄性マウスから肝臓、大腸、膀胱を切り出しそれぞれ細切、コラゲナーゼ／ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養、継代を行なった。

C．研究結果

現在、トランスジェニックマウスからのオルガノイドの調整を行っており、近日中には遺伝毒性試験を開始できそうである。今年度はまず、オルガノイドを用いた遺伝毒性試験法の手技手法の確立のため、高分子DNA抽出方法や被験物質の曝露方法などの検討を行なった。肝臓より作成したオルガノイド（約$1x10^7$ cell）より常法に従ってゲノムDNAを抽出したところ、高分子の状態の良いDNAが200 μg程度抽出できた。このゲノムDNAを用い、インビトロ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。その結果、変異頻度は6.70×10^{-6}であり、マウス肝臓より直接ゲノムDNAを抽出した場合の変異頻度（$4.26 \pm 2.10 \times 10^{-6}$）と同程度であることがわかった。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、オルガノイドの作成には至らなかった。現在、膀胱に最適な培養条件を検討しているところである。今後、大腸、肺などの肝臓以外の臓器についてもオルガノイドを作成し、被験物質曝露のない状態での変異頻度や突然変異スペクトラムの解析を行なう。変異頻度があまりにも高い場合には、オルガノイド調整の際のコンディションなどを再度検討するなどの工夫をする。更に、*gpt* deltaマウスの大腸、肝臓、膀胱から調製したオルガノイドに既知の遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を曝露し、遺伝毒性の有無を解析し、本試験の妥当性について検討を行う予定である。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

D．研究発表

1. **論文発表**

1. 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. 2015, Feb 4;16(2):3474-92.
2. 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 Aug 27.

2. **学会発表**

1. **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 4**２回日本毒性学会学術大会**. 2015 **年** 7 **月**
2. 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)**日本癌学会学術総会**. 2015 **年** 10 **月**
3. **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**. 2015 **年** 12 **月**
4. **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**. 2015 **年** 12 **月**

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

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
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,
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.	106(11)	1499-505	2015