

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、食品添加物等の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。昨年度は、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と調製条件の違いによる試験結果のばらつきをなくすための検討を行い、マウスの組織採取時週齢に注意を要することを明らかにした。更に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の発現を変化させることによる発がんへの影響を解析した。また、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-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の発がん性を検討し、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た。遺伝毒性については、*gpt* deltaマウス由来の肝臓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。今年度は、胆嚢、子宮のオルガノイド調製法の検討を行うとともに、遺伝毒性発がん物質としてacrylamide (AA)、benzo[*a*]pyrene (BaP)、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてtriethanolamine (TEA)、非遺伝毒性非発がん物質として1-methylnaphthalene (1-MN)、perillaldehyde (PA) について検討した。肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でAA、BaP、MNU及びTEAでは発がん性を示す結果が得られた。一方、1-MNについては対照群と差がみられず、PAについては対照群との差の有無について再確認が必要であった。本試験系では、オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、最長8週間後の皮下組織について病理組織学的解析を行うが、発がん性の評価には造腫瘍性のほか、上皮細胞の多層性や浸潤性が指標になり得ることが示された。遺伝毒性については、PhIPを被験物質とし、変異頻度と変異スペクトルを指標とした場合、大腸オルガノイドを用いる方法とin vivo試験法と同様の結果が得られることを示した。

以上、マウス由来オルガノイドを用いるin vitro化学物質暴露系を用いることで、遺伝毒性発がん物質のみならず、非遺伝毒性発がん物質についても、それらの発がん性を検出可能であることを示唆する結果が得られ、遺伝毒性についてもin vivo試験法との同等性を示された。

### 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) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性とともに、病理組織学的に発がん性の有無を判定する際の形態学的特徴を明らかにするための解析

### 1) オルガノイドの調製

C57BL/6J (B6) マウス、*p53*ヘテロノックアウトマウス、*rasH2*マウスおよびLSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスの肺、肝臓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]

- ) 肺・肝臓・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ね
- ) 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など]

- ) B6マウス由来オルガノイド：がん抑制遺伝子の*Pten* shRNA(*shPten*)と陰性対照としての*shLuc*を導入
- ) *p53*ヘテロノックアウトマウス(BALB/c背景)由

来オルガノイド：*p53*ヘテロノックアウトと野生型マウスを使用(遺伝子導入なし)

- ) *rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウス由来オルガノイド：*rasH2*およびnon-Tgマウスを使用(遺伝子導入なし)
- ) LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス(B6背景)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と陰性対照としてのpLK0.1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4~8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

- ) 適用オルガノイドと被験物質：
  - アクリルアミド；*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肺オルガノイド(0, 0.28, 1.4 mM +S9 mix)
  - ベンゾ[a]ピレン；B6マウス由来の肺オルガノイド +*shPten*(0, 0.6, 3.0 μM +S9 mix) または *shLuc*(陰性対照)(0, 0.4, 2.0 μM +S9 mix)
  - N-メチル-N-ニトロソ尿素；*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肝臓(Liv-H)オルガノイド(0, 200, 1000 μM, S9 mixなし)
  - トリエタノールアミン；*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肺オルガノイド(0, 1,000, 3,000 μM +S9 mix)
  - 1-メチルナフタレン；LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス(B6背景)由来の肺オルガノイド +Cre(0, 10, 50 μM) あるいは +pLK0.1(陰性対照)(0, 4, 20 μM)
  - ペリラルデヒド；*rasH2*およびnon-Tgマウス由来の肝臓(Liv-C)オルガノイド - *rasH2*マウス(0, 200, 1000 μM)、nonTgマウス(0, 50, 250 μM)
- ) 処置：オルガノイドの播種後に加え、2回の継代時を合わせて3回の化学物質暴露を行った。B6マウス由来のオルガノイドについては、初回オルガノイドの播種後にがん抑制遺伝子である*Pten*のshRNAまたは*shLuc*の導入を行い、LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスについては、同様にCreまたはpLK0.1の導入を行い、その後化学物質暴露を行った。
- ) 濃度設定：化学物質のオルガノイドに対する細胞毒性を、NADの還元能を指標とした96 well plateベースの細胞生存性測定試験(同じplateを用いて、3日間以上の連続した解析が可能)を用いて解析した。
- ) ヌードマウス皮下接種：化学物質の3回目の暴露

終了後1週間程度オルガノイドを増殖させた後、ヌードマウス皮下に移植し、4~8週間での腫瘍形成能及び病理組織学的変化の有無を解析した。

## (2) 胆嚢および子宮のオルガノイド調製法の検討

### 1) オルガノイドの調製

LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスあるいはLSL-*Pik3ca*変異型マウスの胆嚢と子宮からオルガノイドを調製した。調製手順は(1)1)に準じた。

## (3) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製と化学物質誘発性の変異頻度と変異スペクトルの検討

### 1) 大腸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)の大腸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) 変異スペクトル解析

PhIP暴露(5, 10  $\mu$ M)をまとめたPhIP暴露群のDNAの*gpt*遺伝子をPCR増幅させてダイレクトシーケンシングを行い、Masumura K.ら(Carcinogenesis 21:2049-56, 2000)により報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験の結果と比較した。

### (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。

## 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腫瘍性とともに、病理組織学的に発がん性の有無を判定する際の形態学的特徴を明らかにするための解析

### 1) 化学物質の濃度設定のための予備実験

今年度に解析を開始した6種類の化学物質の各種オルガノイドに対する発がん性の解析に先立ち、各化学物質の濃度設定を行う予備実験を行った。N-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU)に対しては、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドに比し、肝臓オルガノイドが4倍程度高い毒性感受性を示し、*rash2*マウスについても肺オルガノイドに比し肝臓由来のオルガノイドでは毒性感受性が高い傾向が示されたことから、各化学物質について、マウス系統毎、臓器毎の濃度設定予備実験が必要であった。また、アクリルアミド(AA)の各濃度に対する*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドの細胞生存性測定結果に示されるように、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響に加え、化学物質はその処置時間中においても細胞生存性に影響を与えることを示す結果が得られた。即ち、NADの還元能測定開始時において濃度依存的な細胞数の違いがみられた。(分担報告書(落合)図1: グラフの横軸は測定試薬添加後の時間を示す。)AAの発がん性を検討するため*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドを用いて1回目に行った解析では、主に化学物質処置後の細胞数推移に対する影響結果に基づき、0、1.4及び3.5 mMの濃度にて実施した。その結果、3.5 mM濃度処置したオルガノイドについては、ヌードマウス皮下移植後に当該部位にて確認された細胞数は僅少であった。そこで2回目の解析では、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響を考慮し、0、0.28及び1.4 mMの濃度にて実施した。その結果、ヌードマウス皮下においてAA処置による腫瘍形成能は認められなかったが、病理組織学的解析において、発がん性を示唆する所見がみられた。これらの結果より、正常マウスの臓器から調製するオルガノイドを用いる本法において、化学物質の濃度設定を行う際には、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響だけでなく、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響についても考慮することが重要であることが示され、以降に実施したAA以外の化学物質についても同様に濃度設定を行った。

### 2) オルガノイドへの化学物質暴露と発がん性評価

#### 1) アクリルアミド(AA)

前述の通り、発がん性の評価を*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肺オルガノイドについて、0(対照)、0.28及び1.4 mMの濃度にて実施した。

ヌードマウス皮下においてアクリルアミド処置による腫瘍形成能は認められなかった。一方、病理組織学的解析では、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドについては、0.28 mM処置により嚢胞状を呈するオルガノイド(上皮細胞)により形成された組織が対照と比し大型化ならびに一部上皮細胞は

重層化を示し、1.4 mM処置により上皮細胞の重層化がより高頻度で見られるとともに、乳頭状増殖あるいは周囲組織への浸潤性が認められた。上皮細胞の核は大型化し、刷り硝子様を呈した。また、周囲組織においては反応性の間質細胞の中等度の増生がみられた（分担報告書（今井）図1）。野生型マウス由来のオルガノイドについては、明らかな影響は認められなかった。

## 2) ベンゾ[a]ピレン (BaP)

BaPの発がん性を検討するためのsh*Pten*と対照としてsh*Luc*を導入したB6マウス由来の肺オルガノイドに対する細胞生存性を測定した結果、0.2~2.0 μMではBaP処置時間中における細胞生存性への明らかな影響はみられなかった。一方、処置後の細胞数推移に対する影響については、sh*Luc*では0 μMに比し2.0 μMで抑制がみられたが、sh*Pten*では2.0 μMでも0 μMに比し明らかな抑制を示さなかったことから、発がん性の検討は、sh*Luc*では0（対照）、0.4、2.0 μM、sh*Pten*では0、0.6、3.0 μMで実施した（分担報告書（落合）図2）。

ヌードマウス皮下への移植59日後の皮下結節については、sh*Luc*とsh*Pten*ともにBaP処置による明らかな肉眼的変化を示さなかった（分担報告書（落合）図3）。

一方、病理組織学的解析では、対照に比し0.4 μM (sh*Luc*)あるいは0.6 μM (sh*Pten*)では、嚢胞状組織の大型化がみられ、周囲組織において間質細胞が軽度に増生していた。2.0 μM (sh*Luc*)あるいは3.0 μM (sh*Pten*)では、上皮細胞の明らかな重層化が高頻度で見られるとともに、一部周囲組織への浸潤性が認められた。上皮細胞の核は大型化し、核小体が目立つ特徴も観察された。また、周囲組織において間質細胞が中等度に増生していた（分担報告書（今井）図2）。

## 3) N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)

MNUの発がん性を検討するため、p53ヘテロノックアウトと対照としての野生型マウス由来の肝臓 (Liv-H) オルガノイドに対する細胞生存性を測定した結果、p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0 μMに比し何れの処置濃度においてもMNU処置時間中における細胞生存性への明らかな影響はみられなかった。また、処置後の細胞数推移に対する影響についても、p53ヘテロノックアウトでは1000 μMにて僅かな抑制傾向がみられたが、野生型マウスとともに濃度依存的な明らかな抑制作用はみられなかったことから（分担報告書（落合）図4）、発がん性の検討は、p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0（対照）、200、1000 μMで実施した。

処置後のオルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、56日後の皮下結節については p53ヘテロノックアウトでは対照に比し200 μMで肥大し、野生型では

1000 μMで白色化（組織充実化）傾向がみられた（分担報告書（落合）図5）。病理組織学的解析の結果、野生型の200 μM処置群では、対照に比し、上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織の増数がみられた。また、野生型の1000 μM処置群では、がん組織様増殖組織の形成が確認された（分担報告書（落合）図6）。一方、p53ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドについては、対照に比し200 μMで嚢胞状組織の大型化と上皮細胞の肥大がみられたが、1000 μM処置群で確認された細胞数は僅少であった。

## 4) トリエタノールアミン (TEA)

TEAについては、p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肺オルガノイドの細胞生存性に明らかな影響を及ぼさなかったが、pH変化（培地の変色）を指標として0（対照）、1,000、3,000 μM濃度で発がん性の検討を行った。

ヌードマウス皮下に移植した組織について、TEA処置による明らかな肉眼的変化はみられなかったが、病理組織学的解析の結果、p53ヘテロノックアウトおよび野生型ともに、対照では扁平な上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織が観察されたのに対し、1000 μM処置群では、上皮細胞が一部立法状に肥大し、更に重層化/浸潤性がみられた。3000 μM処置群では、対照および1000 μM処置群に比し細胞数が減少していたが、細胞の重層化及び浸潤性が散見された（分担報告書（落合）図7）。

## 5) 1-メチルナフタレン (1-MN)

1-MNについては、LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス (B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入)の肺オルガノイドの細胞生存性試験の結果に基づき、Cre群では0（対照）、10、50 μM濃度、pLK0.1群では0（対照）、4、20 μM濃度で発がん性の検討を行った。

ヌードマウス皮下に移植した組織について、1-MN処置による明らかな肉眼的変化はみられなかった。病理組織学的には、pLK0.1群に比しCre群では、対照に比し、腺管の大型化と軽度の浸潤性を示したが、Cre群およびpLK0.1群ともに対照との比較において1-MN処置群では、発がん性を示唆する変化はみられなかった。

## 6) ペリルアルデヒド (PA)

PAについては、rasH2およびnon-Tgマウスの肝臓 (Liv-C) オルガノイドの細胞生存性試験の結果に基づき、rasH2マウスでは0（対照）、200、1000 μM濃度、nonTgマウスでは0（対照）、50、250 μM濃度で発がん性の検討を行った。

ヌードマウス移植前の培養段階において、rasH2マウス-1000 μM処置群では細胞が死滅・消失した。ヌードマウス皮下に移植した組織について、PA処置による明らかな肉眼的変化はみられなかった。病理組織学的には、rasH2、non-Tgともに対照においても上皮細

胞の一部多層化や軽度に核が肥大・活性化している状態がみられた。PA処置群においては更に浸潤性を示し、核の活性化が増強する傾向を示した。

別途培養した肝臓(Liv-H)オルガノイドについても、*rash2*マウスでは0(対照)、200、500  $\mu$ M濃度、*nonTg*マウスでは0(対照)、40、200  $\mu$ M濃度で発がん性の検討を行った。ヌードマウス皮下に移植した組織の病理組織学的検査の結果、PA処置群については細胞数の増加、核の活性化傾向がみられた。これらの結果より、PAについては、対照群との差の有無について再確認が必要と判断された。

## (2) 胆嚢および子宮のオルガノイド調製法の検討

*LSL-Kras<sup>G12D</sup>*マウスあるいは*LSL-Pik3ca*変異型ウスの胆嚢と子宮について、*Cre*の導入により*Kras*および*Pik3ca*の活性化を行ったところ、それら単独では腫瘍系性に至らなかった。そこで、がん抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせたところ、特定の遺伝子との組み合わせでのみ腺がん類似の組織像を呈する腫瘍が誘導された。これらの細胞も化学物質の発がん性検出に利用可能と考えられた。

## (3) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製と化学物質誘発性の変異頻度と変異スペクトルの検討

被験物質として2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン(PhIP)を用いて検討した。変異頻度は0  $\mu$ M (n=2)で $3.0 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ 、5  $\mu$ M (n=2)で $38 \pm 1.7 \times 10^{-6}$ 、10  $\mu$ M (n=1)で $46 \times 10^{-6}$ であり、PhIPの曝露によって変異頻度が10倍以上に上昇することが確認され、更に、PhIPの曝露濃度依存的に変異頻度が上昇する傾向が観察された(分担報告書(戸塚)図1)。次に、標的遺伝子のシークエンス解析を行った結果、解析が可能なクローン数が限定されていたことから、PhIP曝露(5、10  $\mu$ M)をまとめたPhIP曝露群と、Masumuraらにより報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験との比較を行った(分担報告書(戸塚)図2)。PhIPを投与した*gpt delta*マウスの大腸粘膜では*non-Tg*マウスと比べG:C->T:Aトランスバージョンが顕著に増加していた。これに加え、G:C->C:Gトランスバージョン変異も観察された。一方、大腸由来のオルガノイドにPhIPを曝露した場合には、G:C->C:Gトランスバージョン変異は観察されなかったが、G:C->A:Tトランジション及びG:C->T:Aトランスバージョンが主な変異スペクトルとなっており、*in vivo*試験で観察された結果と大きくは矛盾しないことが示された。

## D. 考察

今年度は、オルガノイドを用いる*in vitro*被験物質曝露系による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検証の一環として、遺伝毒性発がん物質を3物質、非遺伝毒性発がん物質を1物質、非遺伝毒性非発がん物質を2物質選択して検討した。一つの成果として、化学物質の濃度設定を行う際、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響だけでなく、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響についても考慮することが重要であることを示す結果が得られた。また、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討で遺伝毒性発がん物質とされる3物質のみならず非遺伝毒性発がん物質とされる1物質についてもヌードマウス皮下での造腫瘍性あるいは病理組織学的評価における上皮細胞の重層化や浸潤性を指標として発がん性を検出可能であることが示された。特に非遺伝毒性発がん物質のトリエタノールアミンについては、長期間投与による*in vivo*発がん性試験法においてマウスでは肝臓(Stout M.D. et al., *Toxicol Pathol* 36; 783-94, 2008; NTP, *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 518; 5-163, 2004)、ラットでは腎臓が発がん標的であることが示されている。それに対し、今回は肺オルガノイドにて発がん性を示す結果が得られたことから、オルガノイドを用いる*in vitro*被験物質曝露系による試験法では、*in vivo*発がん性試験法における発がん標的性に因らない検出法としての探索の可能性もあると考えられた。また、非遺伝毒性非発がん物質とされるペリルアルデヒドについては対照群との差の有無について再確認が必要と判断された。当該物質についてはEFSAにより2015年、遺伝毒性を示すことが懸念されるとされ、本研究課題においても引き続き慎重に評価してゆく必要がある。

これまで化学物質の発がん性評価に用いてきたマウスの肺、肝臓、膀胱などに由来するオルガノイドのほか、今年度は胆嚢、子宮のオルガノイド調製法の検討を行った結果、オルガノイド調製に適した条件を明らかにすることができたことから、今後の発がん性評価に応用可能であると考えられた。

遺伝毒性については、PhIPを被験物質とし、変異頻度と変異スペクトルを指標とした場合、大腸オルガノイドを用いる方法と*in vivo*試験法と同様の結果が得られることを示し、オルガノイドを用いる系が遺伝毒性試験法として適用可能であることを示唆する結果が得られたが、今後、他の被験物質での検討を要する。

## E. 結論

マウス由来オルガノイドを用いる*in vitro*化学物質曝露系を用いることで、遺伝毒性発がん物質のみならず、非遺伝毒性発がん物質についても、それらの発がん性を検出可能であることを示唆する結果が得られ、遺伝毒性についても*in vivo*試験法との同等性を示された。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, Ochiai M, Hippo Y, Hayashi SM, Shibutani M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. *Food Chem Toxicol.* 100:103-114. 2017
- (2) Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H. Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. *Gynecol Oncol.* 144(2):377-383. 2017
- (3) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol.* 1422:13-21. 2016
- (4) Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 37:817-26, 2016.

2. 学会発表

- (1) 落合雅子、松浦哲也、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常上皮細胞の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 23 回日本がん予防学会総会( 2016 年 7 月、名古屋 )
- (2) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫 . マウス正常大腸上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 .第 75 回日本癌学会学術総会, ( 2016 年 10 月、横浜 )
- (3) 筆宝義隆、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫 ( 英語口演 ) オルガノイドを用いた胆嚢発がんモデルの確立 . 第 75 回日本癌学会学術総会 ( 2016 年 10 月、横浜 )
- (4) 丸喜明、落合雅子、今井俊夫、筆宝義隆 ( 口演 ) オルガノイドを用いた卵巣がんモデルの開発 . 第 75 回日本癌学会学術総会 ( 2016 年 10 月、横浜 )
- (5) Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (2016 年 6 月、リヨン)

H. 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。

