

## 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、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、オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した際の造腫瘍性とともに、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を進めた。具体的には、C57BL/6J (B6) マウス由来の肺オルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、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) 由来の肺オルガノイド、*p53*ヘテロノックアウトマウス (BALB/c背景、陰性対照として野生型) 由来の肺/肝臓オルガノイド、あるいは*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肝臓オルガノイドに対して、遺伝毒性発がん物質としてアクリルアミド (AA)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてトリエタノールアミン (TEA) あるいは非遺伝毒性非発がん物質として1-メチルナフタレン (1-MN)、ペリラルデヒド (PA) について検討した。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造腫瘍性の有無を観察した結果、MNU処置した肝臓オルガノイドに造腫瘍性がみられた。また、AA、BaP及びTEA処置群においては、病理組織学的解析にてオルガノイド (上皮細胞) の多層化と浸潤性が認められ、これらの変化は化学物質非処置対照群と非遺伝毒性非発がん物質である1-MN処置群ではみられなかったことから、化学物質の発がん性の判定基準となり得るものと判断された。一方、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、対照群との差の有無について再確認が必要となった。

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て、その造腫瘍性あるいは病理組織学的エンドポイントにより、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に対策が必要であり、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、オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した際の造腫瘍性とともに、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を進めている。今年度は、C57BL/6J (B6) マウス由来の肺オルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、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) 由来の肺オルガノイド、

p53ヘテロノックアウトマウス (BALB/c背景、陰性対照として野生型) 由来の肺/肝臓オルガノイド、あるいはrasH2 (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肝臓オルガノイドに対して、遺伝毒性発がん物質としてアクリルアミド (AA)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてトリエタノールアミン (TEA) あるいは非遺伝毒性非発がん物質として1-メチルナフタレン (1-MN)、ペリラルデヒド (PA) を用いた検討を行った。

## 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砕して継代
- ) 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]

- ) 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
- ) rasH2マウス由来オルガノイド：rasH2およびnon-Tgマウスを使用
- ) LSL-Kras<sup>G12D</sup>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、皮下腫瘤を摘出
- ) 腫瘤を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

- ) 被験物質と適用オルガノイド：  
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は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、初回オルガノイドの播種後にCreまたはpLK0.1の同夕を行い、その後化学物質暴露を行った。
- ) 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) ヌードマウス皮下にてオルガノイドにより形成された組織に対する免疫組織化学による検討

1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価  
熟練した技術者によりヌードマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、皮下から結節/腫瘤あるいはオルガノイド摂取部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて1日程度固定した。常法に従い、パラフィン包埋した後、4 μm程度の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

2) サイトケラチン (CK) 19に対する免疫組織化学  
パラフィン包埋切片に対し、脱パラフィン後にクエン酸緩衝液 (pH6.0) にて10分間オートクレーブ処

置して抗原不活化を行った。一次抗体として抗CK19ウサギモノクローナル抗体( abcam社製 )を用いてABC法により染色した。発色はペルオキシダーゼによるジアミノベンチジンにより行った。

#### (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) アクリルアミド

#### 1) 肉眼所見

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。

#### 2) 病理組織学的所見

*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドでは、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた(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

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてsh*Luc* とsh*Pten*ともにベンゾ[a]ピレン処置による明らかな肉眼的変化を示さなかった

#### 2) 病理組織学的所見

sh*Luc* とsh*Pten*ともに、0  $\mu$ M群に比しBaP処置群では、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた(図2)。

### (3) N-メチル-N-ニトロソ尿素

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、*p53*ヘテロノックアウトでは200  $\mu$ Mで肥大し、野生型では1000  $\mu$ Mで白色化(組織充実化)傾向がみられた。

#### 2) 病理組織学的所見

野生型の200  $\mu$ M処置群では、0  $\mu$ M処置群に比し、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  $\mu$ M処置群では、がん組織様増殖組織の形成が確認された。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  $\mu$ M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  $\mu$ M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

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてトリエタノールアミン処置による腫瘍形成能は認められなかった。

#### 2) 病理組織学的所見

*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型ともに、0  $\mu$ M群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  $\mu$ M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  $\mu$ M処置群では、0  $\mu$ Mおよび1000  $\mu$ M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。

### (5) 1-メチルナフタレン

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において1-メチルナフタレン処置による腫瘍形成能は認められなかった。

#### 2) 病理組織学的所見

pLK0.1群に比しCre群では、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0  $\mu$ M群との比較において1-メチルナフタレン処置群では、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

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてペリルアルデヒド処置による腫瘍形成能は認められなかった。

#### 2) 病理組織学的所見

rasH2、non-Tgともに0  $\mu$ M群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。ペリルアルデヒド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。また、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、200、500  $\mu$ M濃度、nonTgマウスでは0、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、ペリルアルデヒド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、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。

(7) 膀胱オルガノイドのマウス皮下増殖形態

B6マウス由来のオルガノイドに、*Pten* shRNAをレンチウイルスで導入したものに、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドを用いる検討を進めた。膀胱上皮は肺や肝臓に比し増殖速度が遅いが、*p53*ヘテロノックアウトあるいは野生型のBALB/c背景マウスにおいて比較的良好な増殖を示した。膀胱由来のオルガノイドは、他臓器由来のオルガノイドと同様に上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織として確認された。

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、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）

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。

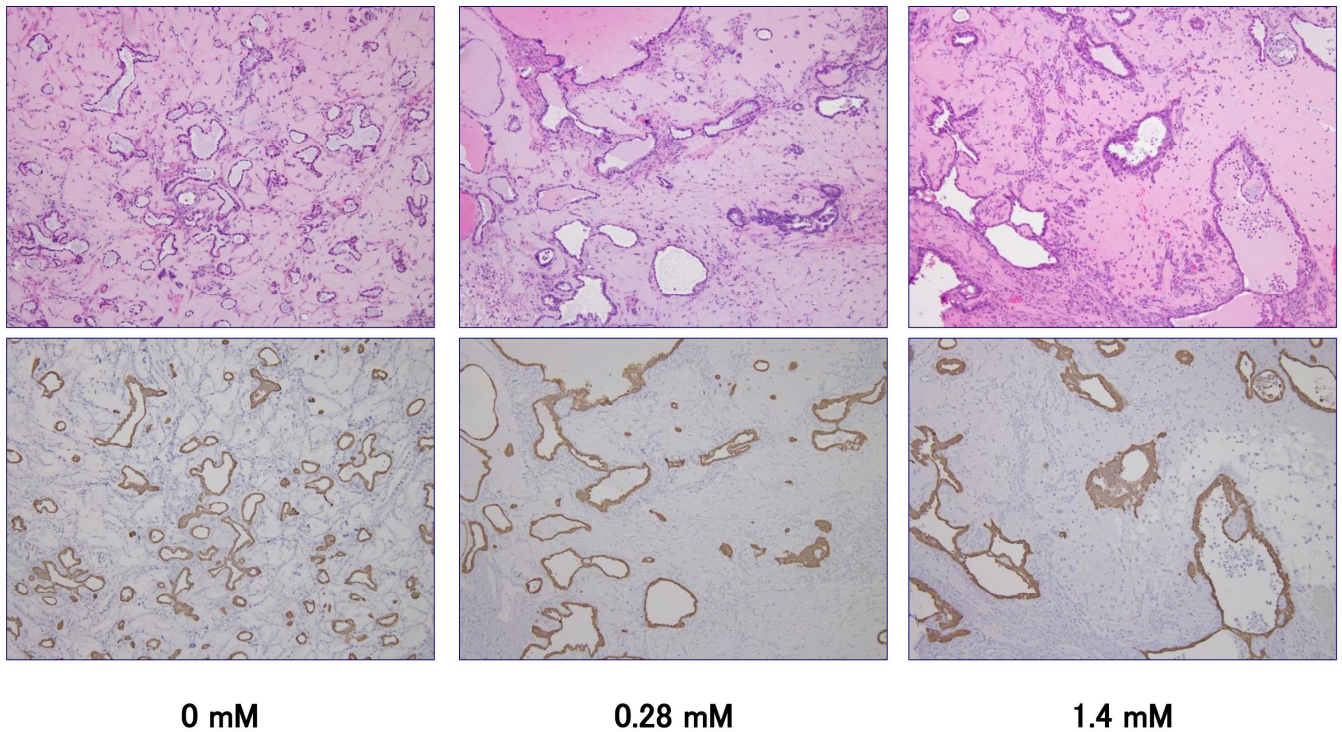
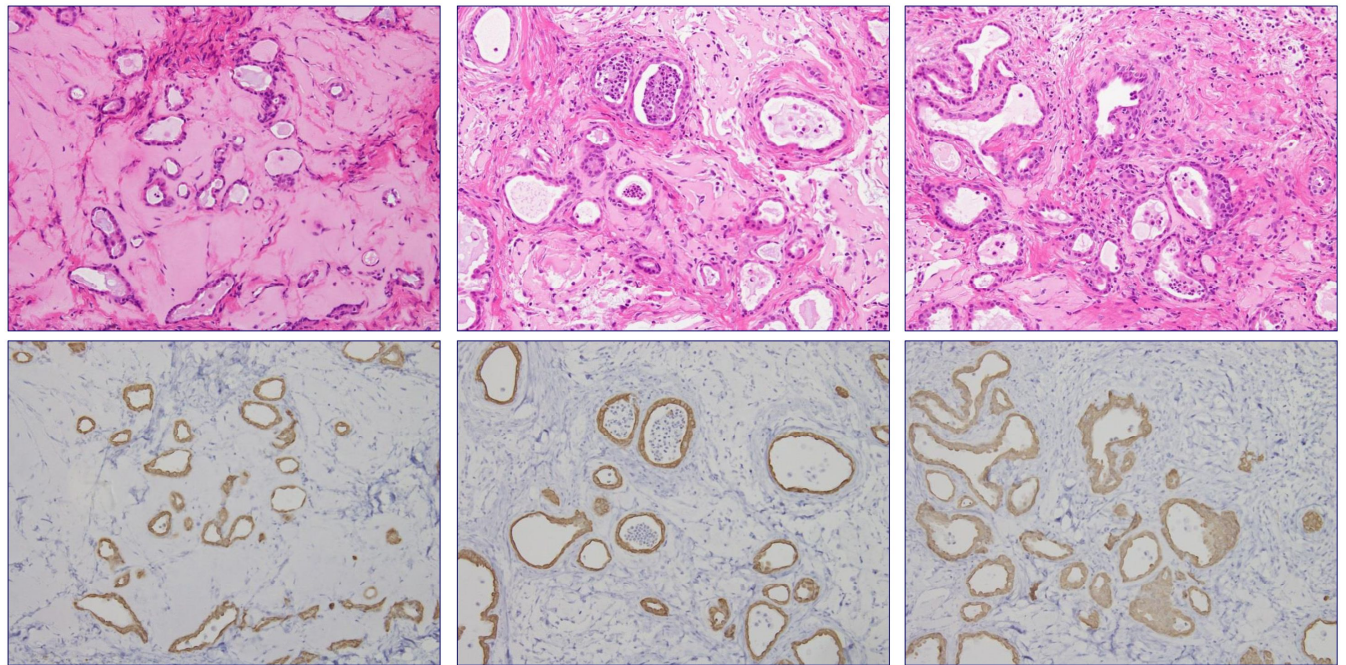


図1 *p53*ヘテロノックアウトマウスの肺から調製したオルガノイドにおけるアクリルアミドの影響解析  
 (ヌードマウス皮下：上段、ヘマトキシリン・エオジン染色；下段、CK19免疫染色) (上段、0 mM) 比較的小型で単層の上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織がみられる。(同、0.28 mM) 0 mMに比し嚢胞状組織の大型化と一部上皮細胞の重層化がみられる。(同、1.4 mM) 0.28 mMに比し、上皮細胞の重層化が高頻度で見られるとともに、周囲組織への浸潤性が認められる。上皮細胞の核は大型化し、刷り硝子様を呈する。また、周囲組織においては反応性の間質細胞の中等度の増生がみられる。(下段、0 mM) 上皮細胞がCK19に強陽性を示している。(同、0.28 mM) 上皮細胞の重層化部位がヘマトキシリン・エオジン染色標本と対応し、明瞭に示されている。(同、1.4 mM) 0.28 mMに比し、上皮細胞の重層化が顕著に示され、当該部位では周囲組織に浸潤性を示す上皮細胞が水滴状に認められる。



0  $\mu$ M

0.4  $\mu$ M

2.0  $\mu$ M

図2 B6マウス由来の肺オルガノイド + shLuc (陰性対照)におけるベンゾ[a]ピレンの影響解析 (ヌードマウス皮下: 上段、ヘマトキシリン・エオジン染色; 下段、CK19免疫染色) (上段、0  $\mu$ M) 比較的小型で単層の上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織がみられる。(同、0.4  $\mu$ M) 0  $\mu$ Mに比し嚢胞状組織の大型化がみられる。また、周囲組織において間質細胞が軽度に増生している。(同、2.0  $\mu$ M) 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る。この写真には示されていないが、乳頭状増殖もみられた。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る。(下段、0  $\mu$ M、0.4  $\mu$ M) 上皮細胞がCK19に強陽性を示している。(同、2.0  $\mu$ M) 上皮細胞の重層化部位がヘマトキシリン・エオジン染色標本と対応し、明瞭に示されている。また、一部では周囲組織に浸潤性を示す上皮細胞が突起状に認められる。