

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大腸を切り出し細切、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。作成した大腸オルガノイドに既知の遺伝毒性発がん物質である PhIP を 0, 5, 10 μM の濃度で、S9mix の存在下で曝露した。オルガノイドより常法に則ってゲノムDNAを抽出し、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 PhIP 曝露群で上昇することを確認した。さらに、変異スペクトルの解析をした結果、大腸オルガノイドに PhIP を曝露した群では、G:C→A:T, G:C→T:A が主な変異スペクトルとなっており、既報の *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 試験結果とほとんど矛盾していなかった。今後、更にサンプル数を追加して解析を行うとともに、PhIP 以外の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質を用いて解析を行う予定である。また、肺や膀胱などの大腸・肝臓以外の臓器についてもオルガノイドを作成し、食品添加物などの、各種臓器を対象とした *in vitro* 遺伝毒性試験法の確立を目指す。

(具体的かつ詳細に記入すること)

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られる。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。昨年度までに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、肝臓を摘出し、オルガノイドの安定した作成手法を確立し、それらオルガノイドを食品添加物の遺伝毒性試験に利用することの妥当性について検討した。今年度は、食品由来の既知遺伝毒性発がん物質である PhIP の遺伝毒性を大腸オルガノイドを用いて解析し、*in vitro* 遺伝毒性試験結果との比較を行うことでその妥当性について評価した。

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しオルガノイドを得た。大腸より作成したオルガノイドに食品由来の既知遺伝毒性発がん性物質として知られている PhIP を代謝活性化酵素 (S9 mix) の存在下で 0, 5, 10 μM の濃度で曝露し、点突然変異頻度及び変異スペクトルの解析を行った。

C . 研究結果

常法に則ってゲノムDNAを抽出し、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 0 μM (n=2) で $3.0 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ 、5 μM (n=2) で $38 \pm 1.7 \times 10^{-6}$ 、10 μM (n=1) で 46×10^{-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を確認した（図1）。さらに、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。次に、標的遺伝子のシーケンス解析を行った。シーケンス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 μM) をまとめた PhIP 曝露群と、増村らにより報告されている *gpt delta mouse* を用いた *in vivo* 試験との比較を試みた。その結果を図2に示す。PhIP を投与した *gpt delta* マウスの大腸粘膜ではコントロール動物と比べて 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ていた。一方、大腸由来のオルガノイドに PhIP を曝露させた場合には、G:C→C:G トランスバージョン変異の観察は見られなかったが、G:C→A:T トランスバージョン及び 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わかった。

肝臓から作成したオルガノイドは PhIP の曝露が済んでいるため近日中に変異頻度及びスペクトルの解析を行う予定である。今後、更にサンプル数を追加して解析を行うとともに、PhIP 以外の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質を用いて解析を行う予定である。また、肺や膀胱などの大腸・肝臓以外の臓器についてもオル

ガノイドを作成し、食品添加物などの、各種臓器を対象とした*in vitro*遺伝毒性試験法の確立を目指す。

(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。

図1 大腸オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

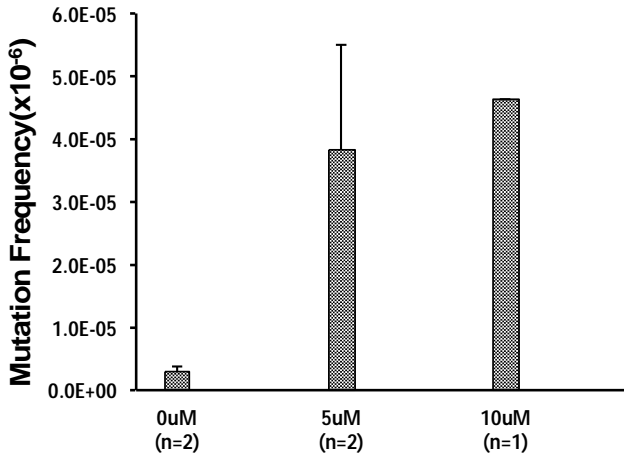
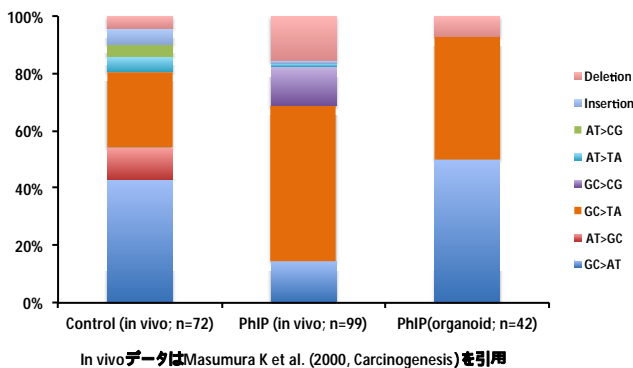


図2 変異スペクトル解析結果



D. 研究発表

1. 論文発表

- 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* 2016 37:817-26.

2. 学会発表

- 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 (リヨン、2016年6月)

- Totsuka Y, Watanabe M, Hayashi K, Nakae D: Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (コペンハーゲン、2016年8月)
- 戸塚ゆ加里、林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉: DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第75回日本癌学会学術総会 (横浜 2016年10月)
- 伴野 勲、山地太樹、岩崎 基、成島大智、加藤 護、戸塚ゆ加里、三好規之、今井俊夫: 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性 第75回日本癌学会学術総会 (横浜 2016年10月)
- 三牧幸代、中森正二、久保正二、木下正彦、戸塚ゆ加里、中釜 斉、落合淳志、江角浩安、土原一哉: 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較 第75回日本癌学会学術総会 (横浜 2016年10月)
- 戸塚ゆ加里: ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第59回日本放射線影響学会。(広島 2016年10月)
- 佐藤 春菜、坂本義光、中江 大、戸塚ゆ加里: 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響 第45回日本環境変異原学会 (つくば、2016年11月)
- 前迫裕也、善家 茜、古川英作、加藤 護、椎崎一宏、中釜 斉、戸塚ゆ加里: 職業性胆管がん発生に關与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第45回日本環境変異原学会 (つくば、2016年11月)
- 戸塚ゆ加里、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 次世代シーケンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第45回日本環境変異原学会 (つくば、2016年11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。)

- 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

