

オルガノイド皮下移植系実験

研究分担者 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

研究要旨

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を開発する。正常マウスの各種臓器からオルガノイドを調製し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後に、ヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を解析する試験を担当した。

化学物質の発がん性の解析は、C57BL/6J (B6) マウス由来のオルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、LSL-*Kras*^{G12D} マウス (B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入)、*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) 由来のオルガノイド、あるいは*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスのオルガノイドを用いた。各オルガノイドへの化学物質暴露は、継代・播種時の培地への添加による1日処置を3回行った。また、濃度設定は、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による細胞毒性の用量反応性の解析により行った。

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)、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)、ペリルアルデヒド (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病理組織学的解析を行った結果、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。

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た。

A. 研究目的

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を開発する。正常マウスの各種臓器からオルガノイドを調製し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後、ヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を解析する試験を担当した。

マウス小腸オルガノイドを用いて、レンチウイルスを用いたがん抑制遺伝子shRNAの導入により、遺伝的再構成を行い、ヌードマウス皮下に移植すると腫瘍様組織を形成可能であることは既に報告した (Onuma K et al., PNAS, 2013)。他臓器に関しては、大腸、肺、膀胱等についてもオルガノイド系の調製法を確立している。今年度は、C57BL/6Jマウス由来のオルガノイドにsh*Pten*を導入したオルガノイド、*p53*ヘテロノックアウトマウスあるいは*rasH2*マウス由来のオルガノイドに対し、各種化学物質を処置した後にヌードマウス皮下へ移植することにより、腫瘍形成能あるいは病理組織学的変化の有無を確認した。同時に、化学物質の暴露方法や用量設定の手法を検討し、遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発のための基礎的データを得た。

B. 研究方法

C57BL6/J(B6)マウスの肺あるいは肝臓からオルガノイドを作成し、sh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入した。LSL-*Kras*^{G12D}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、BALB/c背景の*p53*ヘテロノックアウト (陰性対照として野生型) マウスの肺及び肝臓、あるいは*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肺または肝臓からオルガノイドを調製した。

オルガノイドへの化学物質の暴露は、オルガノイドの播種・継代時に行った。各化学物質の濃度設定を行う際には、オルガノイドの播種から2時間後に、S9 mix (化学物質の代謝活性化のため、MNU処置時を除く) 存在下、24時間化学物質に暴露させた。暴露終了時に測定試薬を含む培地と交換し、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。各化学物質の発がん性評価の際には、オルガノイドの播種後に加え、2回の継代時を合せて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sh*Luc*の導入を行い、その後化学物質暴露を行った。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。

被験物質として今年度は、遺伝毒性発がん物質とされるアクリルアミド (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されるトリエタノールアミン (TEA)、非遺伝

毒性非発がん物質とされる1-メチルナフタレン (1-MN) ペリルアルデヒド (PA) を用いた。AAはマウス長期発がん性試験において、肺のほか、ハーダ腺、胃、乳腺、卵巣、皮膚に (NTP, TR575, 2012)、BaPは肺のほか、前胃、肝臓、皮膚、投与部位 (間葉系組織) (IARC monograph, vol 100F, 2012) に発がん性を示すことが報告されている。MNUはラットへの経口投与により脳、脊髄、前胃、腎臓などに、新生児マウスへの皮下投与により肺にも腫瘍を誘発する (IARC monograph, vol 17, 1978)。TEAには遺伝毒性はないが (IARC monograph, vol 77, 2000) 肝臓に発がん性を示すとされている (Stout MD et al., Toxicol Pathol 36, 783-79, 2008)。

肺と肝臓のほか、膀胱に関しても、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加え、*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。また、肝臓に含まれる肝前駆細胞は胆管上皮細胞と肝細胞への分化能をもつと考えられているが、従前のオルガノイド調製法では主に胆管上皮細胞への分化傾向 (LivC) がみられている。今年度は肝細胞への分化傾向を示す (LivH) オルガノイド調製法について検討を開始した。

C. 研究結果

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。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、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 (グラフの横軸は測定試薬添加後の時間を示す) において濃度依存的な細胞数の違いがみられた。(図1)。

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上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた。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。

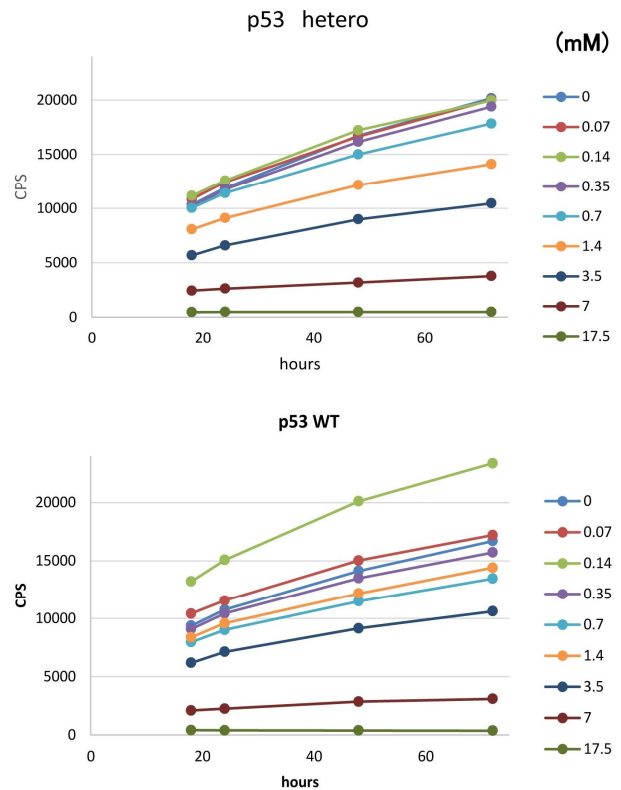


図1 アクリルアミドの*p53*ヘテロノックアウトマウス由来肺オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

BaPの発がん性を検討するための*shPten*と対照として*shLuc*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測定結果を図2に示した。

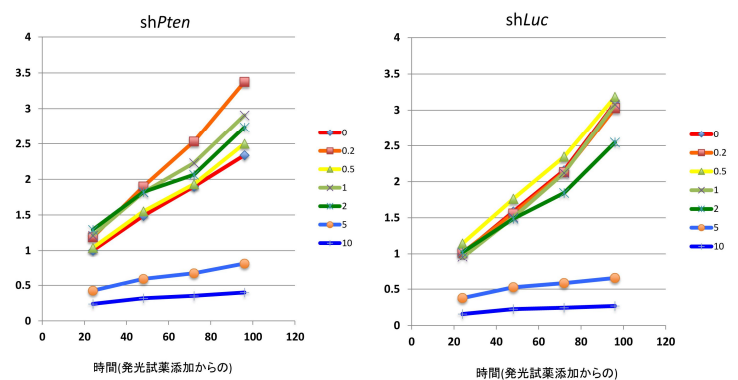


図2 ベンゾ[a]ピレンのC57BL/6マウス由来肺オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

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、*shLuc*では0 μMに比し2.0 μMで抑制がみられたが、*shPten*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、*shLuc*では0、0.4、2.0 μM、*shPten*では0、0.6、3.0 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、59日後の皮下結節については *shLuc* と*shPten*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が(図3)、病理組織学的解析の結果、0 μ 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。

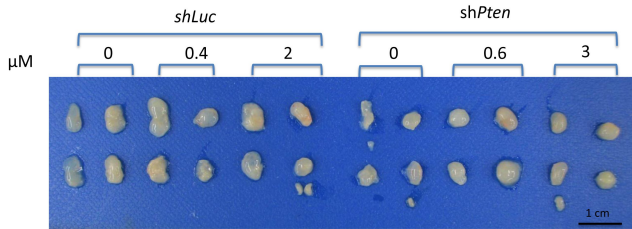


図3 ベンゾ[a]ピレン処置したC57BL/6Jマウス由来肺オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼所見

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の肝臓(Liv-H)オルガノイドに対する細胞生存性測定結果を図4に示した。

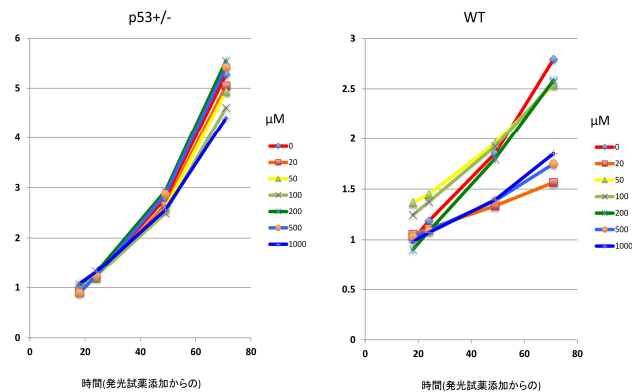


図4 N-メチル-N-ニトロソ尿素のp53ヘテロノックアウトマウス由来肝臓オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0 μ M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 μ M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れなかったことから、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、200、1000 μ M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200 μ Mで肥大し、野生型では1000 μ Mで白色化(組織充実化)傾向がみられた(図5)。病理組織学的解析の結果、野生型のMNU200 μ M処置群では、発がん性を示すがん組織様増殖組織がみられた(図6)。

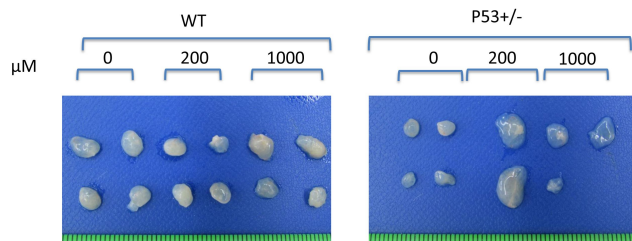


図5 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置したp53ヘテロノックアウトと野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼所見

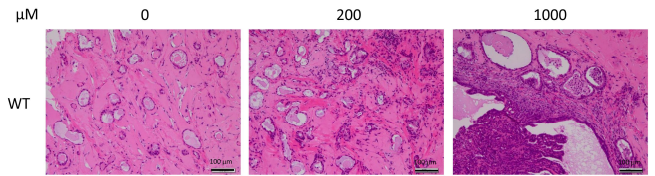


図6 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置した野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での組織所見

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、1,000、3,000 μ 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、0 μ M群に比しTEA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7)。

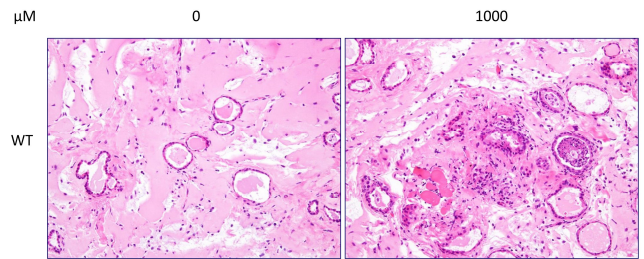


図7 トリエタノールアミン処置した野生型マウス由来肺オルガノイドのヌードマウス皮下での組織所見

1-MNについては、LSL-Kras^{G12D}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、10、50 μ M濃度、pLK0.1群では0、4、20 μ 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、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 μ M群との比較において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。

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、200、1000 μ M濃度、nonTgマウスでは0、50、250 μ M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 μ M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0 μ 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。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。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 μ M濃度、nonTgマウスでは0、40、200 μ 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。

以上、遺伝毒性発がん物質としてAA、BaP、MNU、非遺伝毒性発がん物質としてTEA、非遺伝毒性非発がん物質として1-MN、PAの発がん性について正常マウスの各種臓器から調製したオルガノイドを用いて検討した。その結果を表1にまとめた。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病理組織学的解析を行った結果、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でBaP、MNU、AA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。

表1 マウス正常臓器由来オルガノイドを用いる化学物質の発がん性評価

Chemical	Organ	Strain	濃度 (µM)	組織所見
AA	Lung	P53+/-, WT	0, 0.28, 1.4	重層化/浸潤性
B(a)P	Lung	B6-shPten	0, 0.4, 2.0	重層化/浸潤性
MNU	LivH	P53+/-, WT	0, 200, 1,000	1000-腫瘍様組織形成
	Lung	P53+/-, WT	0, 200, 1,000	WT1000-腺管大型化
TEA	Lung	P53+/-, WT	0, 1,000, 3,000	重層化/浸潤性
1-MN	Lung	LSL-Kras	20 50 まで	0で変化有り
PA	LivC	rasH2, Non-Tg		影響あり?

膀胱に関しても、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加え、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。また、肝臓に含まれる肝前駆細胞は胆管上皮細胞と肝細胞への分化能をもつと考えられているが、従前のオルガノイド調製法では主に胆管上皮細胞への分化傾向(LivC)がみられている。今年度は、既報

(Katsuda T et al., Cell Stem Cell 20(1), 2017)などを参考にし、肝細胞への分化傾向を示す(LivH)オルガノイド調製法について検討を行い、前述の如く化学物質の発がん性評価への応用を開始した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認を得た。

D. 研究発表

1. 論文発表
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 2016/7/1(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, 2016/10/7(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
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし