

## 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、昨年度までの肺/肝臓由来のオルガノイドに加えて、大腸/膀胱由来オルガノイドの解析を進めた。遺伝毒性発がん物質としてメタンスルホン酸エチル（EMS）に対しては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）由来の肺オルガノイドを、ジメチルヒドラジン（DMH）に対してはp53ヘテロノックアウト（p53 +/-）マウス（BALB/c背景、陰性対照として野生型）由来の大腸オルガノイドを、N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン（BBN）に対してはp53 +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いて解析した。また、非遺伝毒性非発がん物質（陰性対照）として安息香酸ナトリウムについては、C57BL/6J（B6）マウス由来の肺オルガノイドにshPten（陰性対照としてshLuc）を導入し検討した。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、EMS処置した肺オルガノイドに造腫瘍性がみられ、特に高濃度処置群ではがん肉腫様の組織像を呈したのが特徴的であった。また、DMH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）の多層化と異型性が認められ、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安息香酸ナトリウム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。膀胱オルガノイドを用いたBBNについては再検討が必要であった。

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な対策が必要であり、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、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）由来の大腸お

よび膀胱オルガノイドあるいは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*) を導入した系を用いて、遺伝毒性発がん物質としてメタンスルホン酸エチル (EMS)、ジメチルヒドラジン (DMH)、*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN) を、非遺伝毒性非発がん物質 (陰性対照) として安息香酸ナトリウムについて検討した。

## 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

LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> マウスの肺、*p53*ヘテロノックアウト (+/-) マウスの大腸、膀胱およびC57BL/6J (B6) マウスの肺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・大腸・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]

- ) *p53* +/- マウス由来オルガノイド: *p53* +/- マウス (BALB/c背景) と野生型 (Wt) BALB/cマウスを使用 (レンチウイルス処置なし)
- ) 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、あるいは陰性対照としてのpLK0.1を導入
- ) B6マウス由来オルガノイド: がん抑制遺伝子の*Pten* shRNA (sh*Pten*) と陰性対照としてのsh*Luc*を導入

### 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

シン・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:

メタンスルホン酸エチル (EMS); LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> マウス由来の肺オルガノイド+Creあるいは+pLK0.1 (陰性対照) (0, 100, 300 μM+S9 mix) ジメチルヒドラジン (DMH); *p53* +/- マウスおよびWtマウス由来の大腸オルガノイド (0, 100, 500 μM +S9 mix)

*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN); *p53* +/- マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイド (Wt; 0, 3, 15 μM +S9 mix, *p53* +/-; 0, 1, 3 μM +S9 mix)

安息香酸ナトリウム; B6マウス由来の肺オルガノイド +sh*Pten*あるいは +sh*Luc* (陰性対照) (0, 5,000, 20,000 μM+S9 mix)

) 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。LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> 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CreまたはpLK0.1の処置を行い、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。

) 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/腫瘍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) メタンサルホン酸エチル(EMS)

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドについては0、100および300  $\mu$ M群の何れにおいてもマトリゲルの痕跡がみられたのみであった。一方、Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドについては、100  $\mu$ M群で造腫瘍性がみられた(写真1-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドでは、EMSの100  $\mu$ M処置により、発がん性を示すがん肉腫様組織の増殖がみられた(写真1-2)。pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドについては、EMSによる影響は認められなかった。

### (2) ジメチルヒドラジン(DMH)

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてWtマウス由来の大腸オルガノイドは嚢胞状に増殖したが、DMH処置による明らかな肉眼的変化を示さなかった(写真2-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

Wtマウス由来の大腸オルガノイドは、DMH 0  $\mu$ M群では拡張した腺管状の増殖を示し、DMH 100  $\mu$ M処置により上皮の一部が重層化(扁平上皮化)する傾向がみられたが異型性は示さなかった。上皮の重層化がみられる部位では軽度な間質増生を伴っていた。一方、DMH 500  $\mu$ M処置群では上皮の一部が更に重層化し、上皮細胞には核の肥大/異型性がみられた。間質の増生も更に顕著であった(写真2-2)。

### (3) N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN)

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、p53 +/-マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイドは何れの処置群(Wt; 0, 3, 15  $\mu$ M+S9 mix, p53 +/-; 0, 1, 3  $\mu$ M+S9 mix)においてもマトリゲルの痕跡がみられたのみであった(写真3-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

p53 +/-マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイドは何れの処置群においても、オルガノイド由来の上皮細胞の増殖はみられず、例外的にp53 +/-マウスの3  $\mu$ M群の一部に嚢胞状の上皮細胞の増生がみられた(写真3-2)。昨年度、B6マウス由来の膀胱オルガノイドにレンチウイルスでPten shRNAを導入したものと、p53 +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いる基礎検討を実施したところ、膀胱上皮は肺や肝臓に比し増殖速度が遅いが、p53 +/-あるいはWtのBALB/c背景マウスにおいて比較的良好な増殖を示したことを報告した。また、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した。一方、今年度実施した検討ではBBNの0  $\mu$ M処置群においてもヌードマウス皮下でのオルガノイドの増殖がみられず、その原因についてはS9mixの影響など今後の検討を要する。

### (4) 安息香酸ナトリウム

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてshPtenあるいはshLuc処置した肺オルガノイドともに、安息香酸ナトリウム0  $\mu$ M群ではマトリゲルの痕跡がみられたのみであったが、安息香酸ナトリウム20,000  $\mu$ M群ではマトリゲル内で組織が充実している傾向が認められた(写真4-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

B6マウス由来のオルガノイドに対してPtenのshRNAまたはshLucの導入を行い、安息香酸ナトリウムで処置したところ、0  $\mu$ M群に対し高濃度群においてオルガノイドの増数がみられたが、上皮細胞に異型性は認められなかった。

以上、遺伝毒性発がん物質であるEMSおよびDMHについては各々Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドあるいはBALB/c-p53 +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた検討にて造腫瘍性あるいは発がん性を示す病理組織学的変化がみられ、一方、遺伝毒性発がん物質である安息香酸ナトリウムについてはCre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いた検討にて発がん性を示す病理組織学的変化は認められ

なかった。以上より、マウス正常組織由来オルガノイドinvitro化学物質暴露系を用いることで、昨年度までに得られた結果とともに遺伝毒性を伴うあるいは伴わない発がん物質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。

#### D．研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん過程の早期変化検出系．第76回日本癌学会学術総会(2017年9月、横浜)
- (2) 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫：アクリルアミド暴露によるマウスオルガノイド培養系の形態変化．第76回日本癌学会学術総会

(2017年9月、横浜)

- (3) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、筆宝義隆：マウス大腸オルガノイドを用いるPhIPの発がんメカニズムの解析．第34回日本毒性病理学会(2018年1月、那覇)

#### E．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

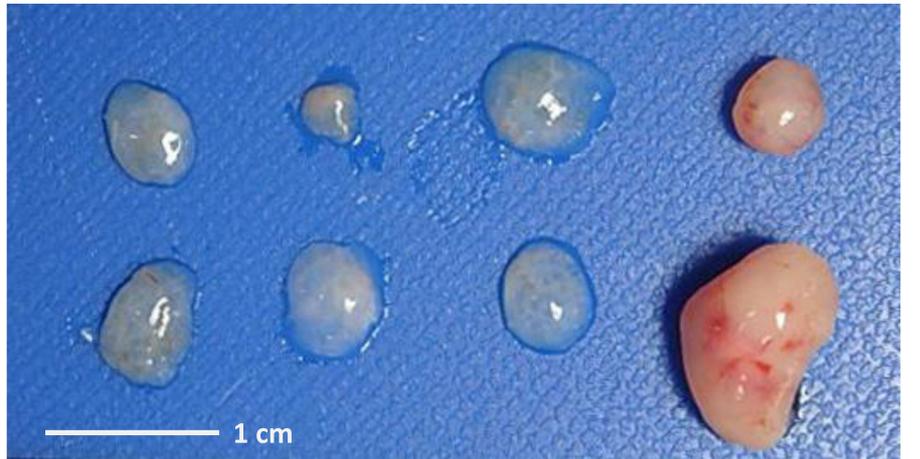
該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

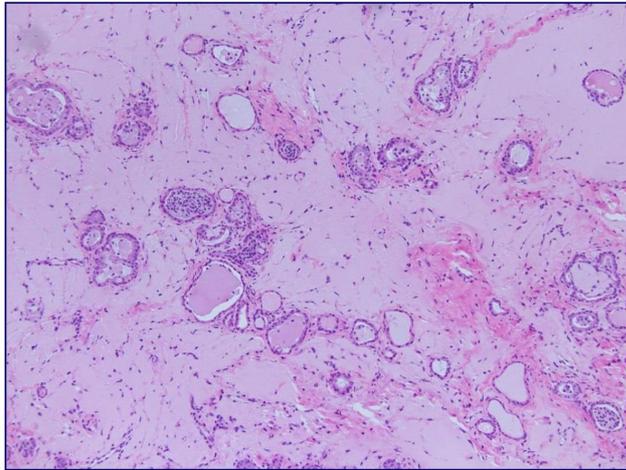
##### 3. その他

該当なし。

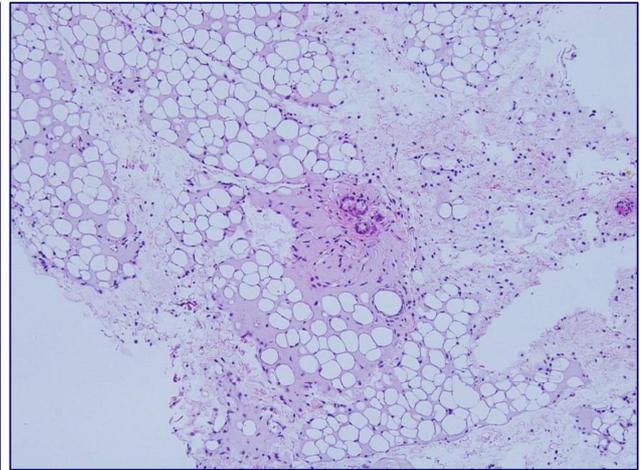


0 100 0 100 (μM)  
pLKO.1 Kras<sup>G12D</sup>

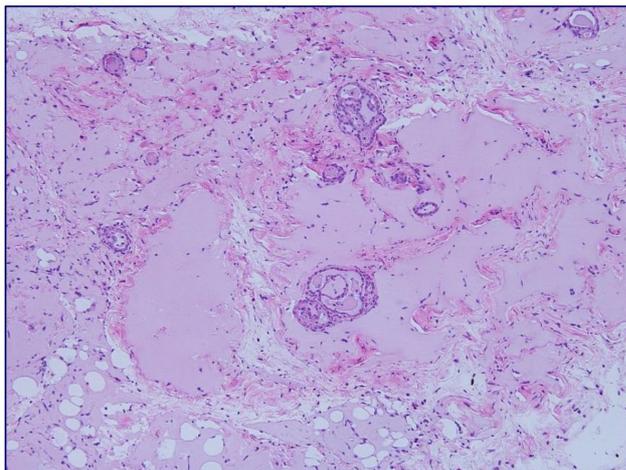
写真1-1 EMS処置したpLKO.1およびKras<sup>G12D</sup>マウス肺由来オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼像



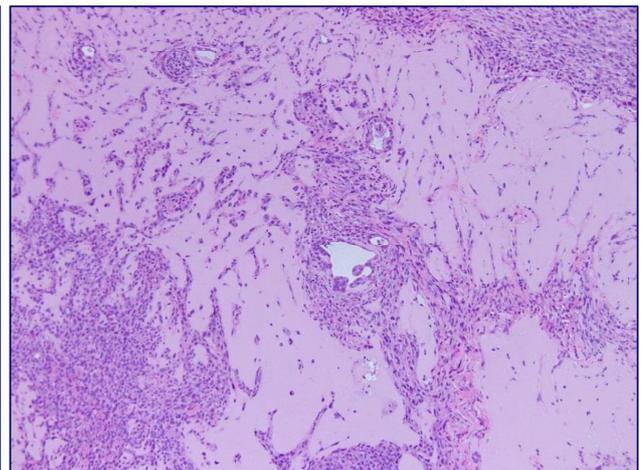
B6-pLKO.1-Lung (EMS 0μM)



B6-pLKO.1-Lung (EMS 100 μM)



Kras<sup>G12D</sup>-Lung (EMS 0μM)



Kras<sup>G12D</sup>-Lung (EMS 100 μM)

写真1-2 EMS処置したpLKO.1およびKras<sup>G12D</sup>マウス肺由来オルガノイドの病理組織像



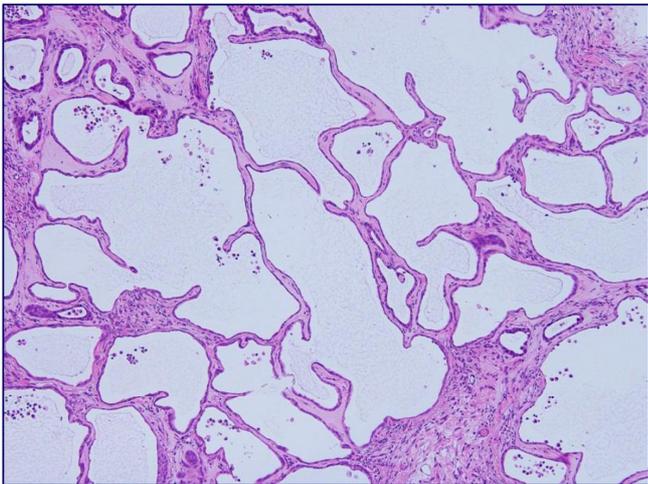
0

100

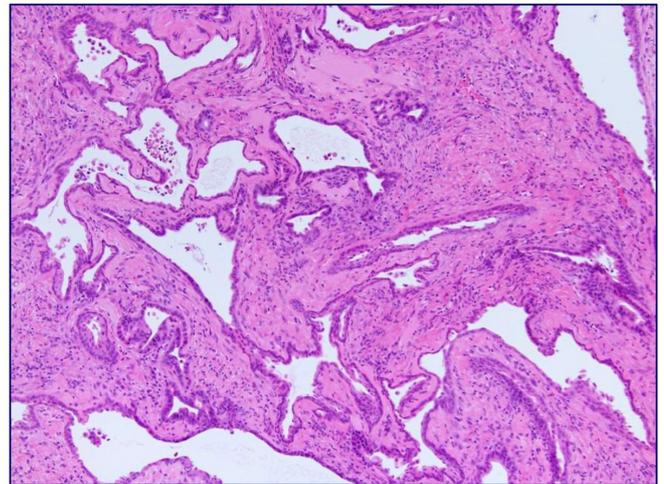
500

( $\mu$ M)

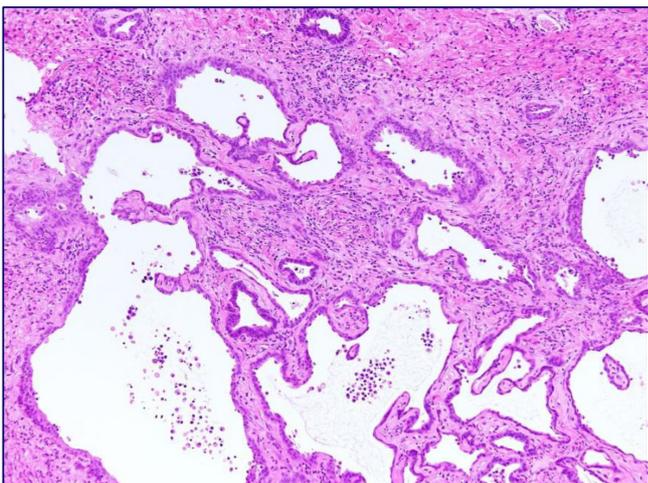
写真2-1 DMH処置したWt-BALB/cマウス大腸由来オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼像



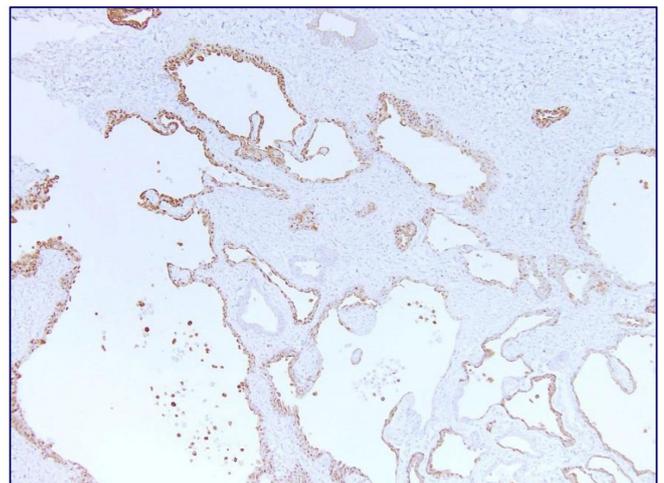
Wt-BALB/c-Colon (DMH 0 $\mu$ M)



Wt-BALB/c-Colon (DMH 100 $\mu$ M)



Wt-BALB/c-Colon (DMH 500 $\mu$ M)



Ck19-immunostaining of the left photo

写真2-2 DMH処置したWt-BALB/cマウス大腸由来オルガノイドの病理組織像

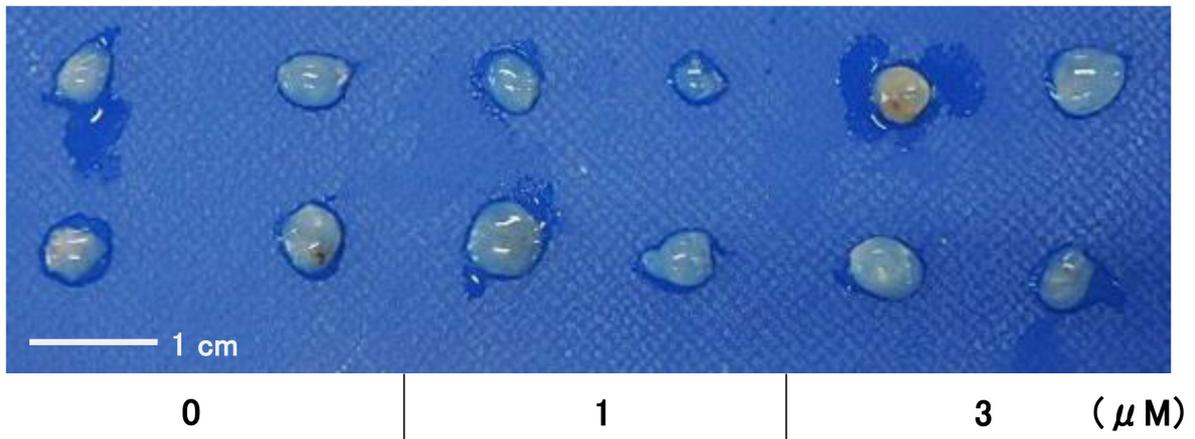
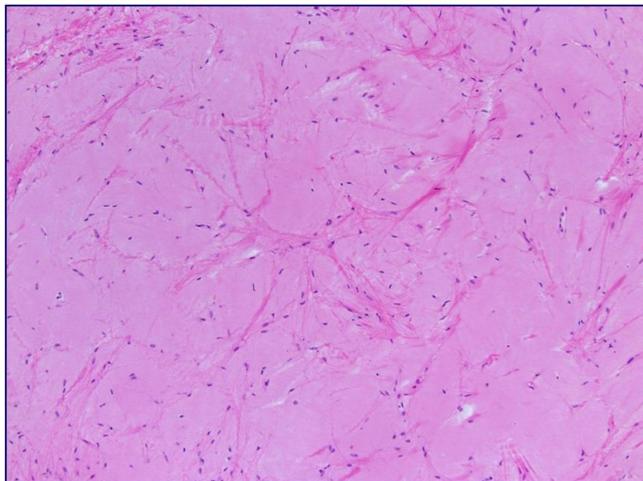
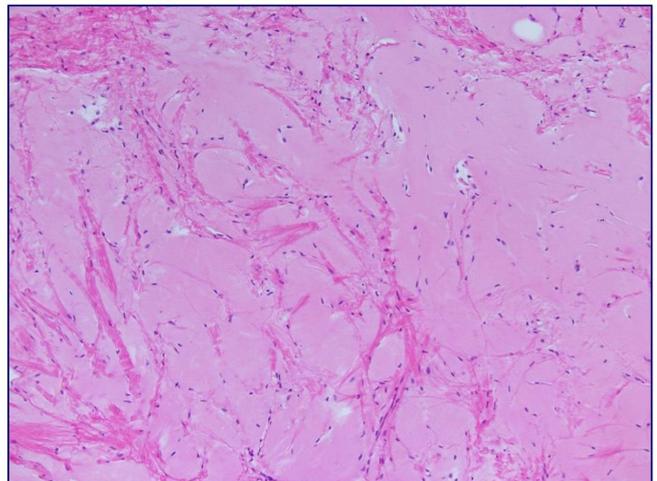


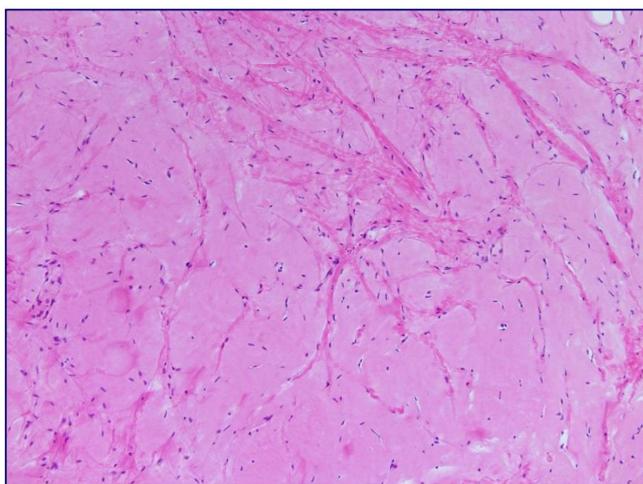
写真3-1 BBN処置したBALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>マウス膀胱由来オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼像



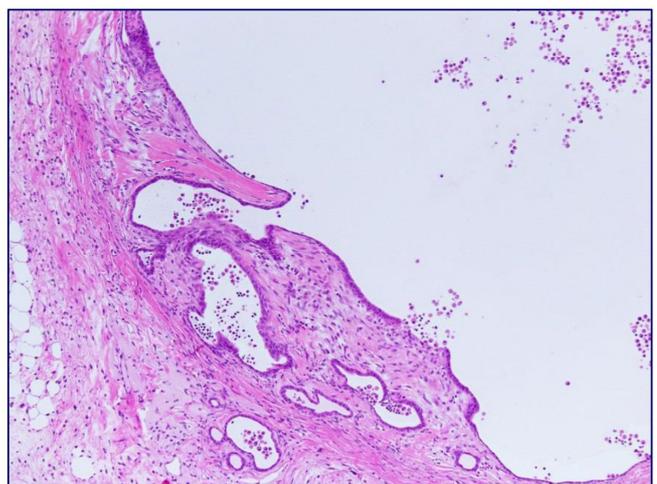
BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 0 μM)



BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 1 μM)



BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 3 μM)



BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 3 μM)

写真3-2 BBN処置したBALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>マウス膀胱由来オルガノイドの病理組織像