

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、発がんの非標的臓器である肝臓を用いて、PhIPの遺伝毒性を解析した。4～6週齢程度の*gpt delta*マウスから肝臓を切り出し細切、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。作成した肝臓のオルガノイドに、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の存在下のもと曝露した。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、肝臓では、0, 5 μM では変異頻度に差はなかったが、10 μM で有意差はつかないものの約5倍に上昇した。発がん非標的臓器の肝臓の変異頻度は既報の*in vivo*試験でもわずかな上昇が観察されており、本研究の結果は*in vivo*試験の結果と矛盾しないことが分かった。

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てきた。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、発がん非標的臓器である肝臓オルガノイドを用いて解析し、*in vivo*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

オルガノイドの作成と被験物質の曝露

4～6週齢程度の雄性マウスから肝臓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。肝臓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。

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験

コントロールおよびPhIPを曝露したからオルガノイドからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージング法によって

トランスジーン EG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) とchloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地に播いて37℃で培養すると、プラスミド上の*gpt*遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。更に、変異スペクトラムを解析するために、変異体の*gpt*遺伝子をダイレクトシーケンス法により解析した。

C．研究結果

常法に則って肝臓由来オルガノイドからゲノム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、PhIP曝露によって変異頻度は0 μM (n=4)で $1.5 \pm 1.7 \times 10^{-5}$ 、5 μM (n=3)で $1.1 \pm 1.6 \times 10^{-5}$ 、10 μM (n=4)で $5.6 \pm 7.8 \times 10^{-5}$ であり、5 μM では変異頻度の上昇は見られなかった。データのバラツキが大きく、統計学的有意差はつかないものの、10 μM では約5倍程度に上昇する傾向が観察された(図1)。次に、肝臓の標的遺伝子のシーケンス解析の結果を図2に示す。解析数が少ないため参考程度でしかないが、変異頻度の上昇が観察された10 μM 曝露群では、欠失変異が主要な変異となっており、次いでG:C->A:Tトランジション及びG:C->T:Aトランスポージョンとなっていた。この変異スペクトルは大腸における変異スペクトルとは異なっているが、0及び5 μM でも欠失変異が多く観察されていることから、肝臓では欠失変異が背景に存在しているのかもしれない。また、これら欠失変異のうち

90%が5'-CC-3'上に存在することが確認された。増村らによると、欠失変異に占めるG:C塩基対の-1G欠失変異は88%であり、そのうち64%が5'-GGG-3'または5'-GG-3'上にあると報告されており、欠失変異が起きている部位は既報と矛盾していないと思われる(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。しかしながら、今回の変異スペクトル解析数は少な過ぎるため更に解析クローン数を増やして確認する必要があると思われる。

(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 肝臓由来オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

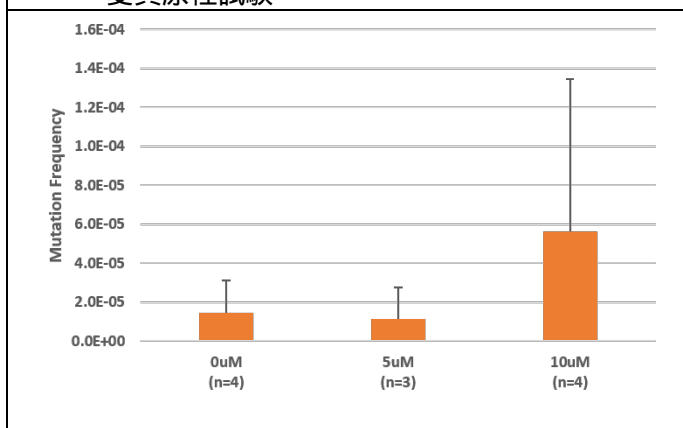
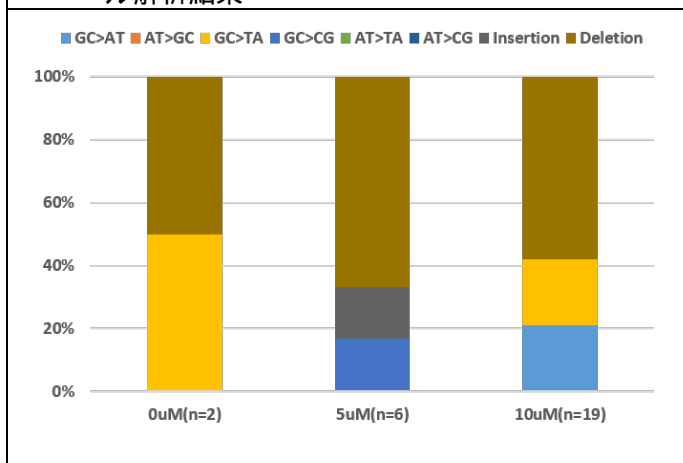


図5 肝臓由来オルガノイドを用いた変異スペクトル解析結果



D. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka, Y. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 2018, 109, 1024-1031.

2. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2017, Nov 16.
3. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.
4. Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39:12.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里: DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会 (横浜 2017 年 7 月)
2. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ, 2017 年 9 月)
3. Totsuka Y: Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜 2017 年 9 月)
4. 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 (横浜 2017 年 9 月)
5. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里: マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 46 回日本環境変異原学会 (東京, 2017 年 11 月)
6. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里: 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 46 回日本環境変異原学会 (東京, 2017 年 11 月)
7. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里: モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第 46 回日本環境変異原学会 (東京, 2017 年 11 月)

8. 神尾翔真、齋藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
9. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017(東京、2017年11月)
10. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis 12thICEM-5thACEM（仁川、2017年11月）
11. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017（つくば、2017年12月）
12. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics（コルカタ、2018年1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。）

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

