

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

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には、今年度は主に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B6マウス由来のオルガノイドにshPtenを導入したものをを用いた。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（+S9 mix）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メタンスルホン酸エチル（EMS）、1,2-ジメチルヒドラジン（DMH）およびN-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン（BBN）、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。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、肺あるいは大腸由来オルガノイドを用いた検討でEMSおよびDMHでは発がん性を示す結果が得られた。一方、膀胱オルガノイドを用いたBBNにおいては対照群を含む各群にオルガノイドの増殖がみられず評価できなかった。安息香酸ナトリウムについては対照群に比しオルガノイドの増数がみられたが、発がん性を示す所見は得られなかった。

以上、マウスの肺や大腸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が、膀胱由来オルガノイドについてはヌードマウス皮下で増殖するような条件検討が必要であった。

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、LSL-Kras^{G12D}マウスあるいはp53ヘテロノックアウトマウス由来のオル

ガノイド、あるいはB6マウス由来のオルガノイドにshPtenを導入したのに対し、各種化学物質で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

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、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）の大腸、膀胱、あるいはB6マウス（shPten導入あるいは陰性対照としてshLuc導入）の肺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) 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回の継代時を合わせて3回の化学物質暴露を行った。LSL-Kras^{G12D}マウス (B6背景) 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pLK0 (対照) またはCreを導入、B6マウス由来オルガノイドでは同様にshPtenまたはshLucを導入 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メタンスルホン酸エチル (EMS)、ジメチルヒドラジン (DMH) およびN-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN)、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を用いた。EMSはマウス長期発がん性試験において、肺と腎臓に (IARC, vol.7, 1974) DMHは大腸に、BBNは膀胱に発がん性を示すことが報告されている。

C. 研究結果と考察

今年度に解析を開始した4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試験を行った。EMSについてはLSL-Kras^{G12D}マウス (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用いて濃度設定試験を行ったところ、pLK0.1、Creともに対照群 (0 mM) に比し、0.4 mMにおいても細胞増加抑制がみられたことから (図1)、本試験では0.1 mM (100 μ M) と0.3 mM (300 μ M) を選択した。

EMSの発がん性を検討するためpLK0.1-LSL-Kras^{G12D}マウスとCre-Kras^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドを用いて行った解析では、pLK0.1-LSL-Kras^{G12D}マウスについては0 μ M群のみならず100および300 μ M群においてもヌードマウス皮下にてオルガノイドの増殖はみられなかった。一方、Cre-Kras^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析では、0 μ M群ではヌードマウス皮下にてオルガノイドの増殖はみられなかったが、100 μ M群では造腫瘍性がみられた。EMSの300 μ M濃度での3回処置では、pLK0.1-LSL-Kras^{G12D}マウスとCre-Kras^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドに対して毒性が強かったことが示されたことから、追加試験において10および30 μ M処置による発が

ん性の検討が必要と考えられた。一方、Cre-Kras^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析では、100 μ M群にて発がん性が検出できた。

DMHについては野生型 (Wt) BALB/cマウスとBALB/c-p53 +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においてはWt-BALB/cマウスの500 μ M群にて、BALB/c-p53 +/-マウスの250および500 μ M群にて測定開始48時間以降の細胞数増加が頭打ちとなったことから (図2)、本試験では100と500 μ Mを選択した。

DMHの発がん性を検討するためのWt-BALB/cマウスとBALB/c-p53 +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた解析では、ヌードマウス皮下に形成された結節について、肉眼的にはDMH処置による明らかな変化はみられなかったが、病理組織学的に500 μ M群で発がん性を示す所見が認められた。

BBNについてはWt-BALB/cマウスとBALB/c-p53 +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においてはWt-BALB/cマウスの6 μ M以上、BALB/c-p53 +/-マウスの3 μ M以上の群にて対照 (0 μ M) 群に比し明らかな細胞増殖抑制作用がみられたことから (図3)、本試験では、Wt-BALB/cマウス由来膀胱オルガノイドについては3および15 μ M、BALB/c-p53 +/-マウスについては1および3 μ Mを選択した。

BBNの発がん性を検討するためのWt-BALB/cマウスとBALB/c-p53 +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いた解析では、ヌードマウス皮下において何れの系統、処置群においてもオルガノイドの増殖がみられなかった。本結果を受けて、膀胱オルガノイドを用いる検討についてはWt-BALB/cマウスあるいはBALB/c-p53 +/-マウス以外の系統のマウスを用いた追加検討が必要となった。

安息香酸ナトリウムについては、pLK0.1-LSL-Kras^{G12D}マウスとCre-Kras^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においては、培地のpHに影響を与える高濃度においても細胞増殖に及ぼす影響は殆どみられなかったことから、5,000および20,000 μ Mを選択した。

安息香酸ナトリウムの発がん性を検討するためのB6マウスの肺オルガノイドに対してshLuc (対照) とshPtenで前処理したのちに被験物質を曝露した解析では、ヌードマウス皮下において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。

以上の結果を表1にまとめた。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^{G12D}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^{G12D}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 in vitro 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。

(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) 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

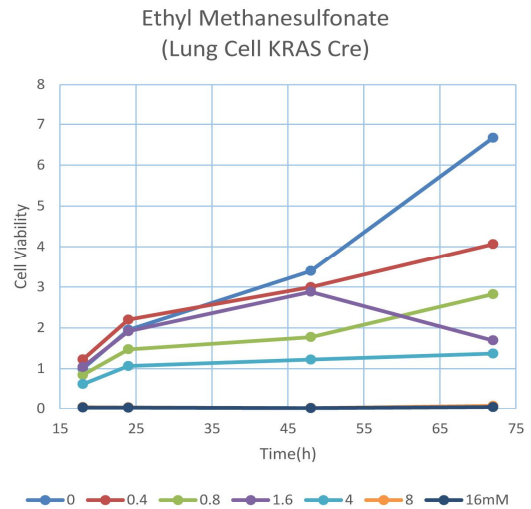
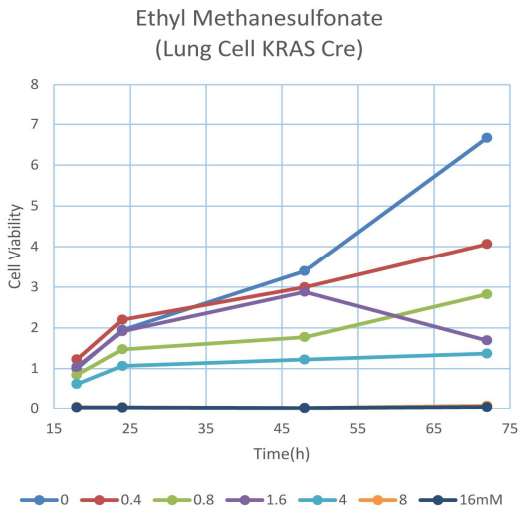


図1 メタンスルホン酸エチルの濃度設定試験 ($Kras^{G12D}$ マウス肺オルガノイド)

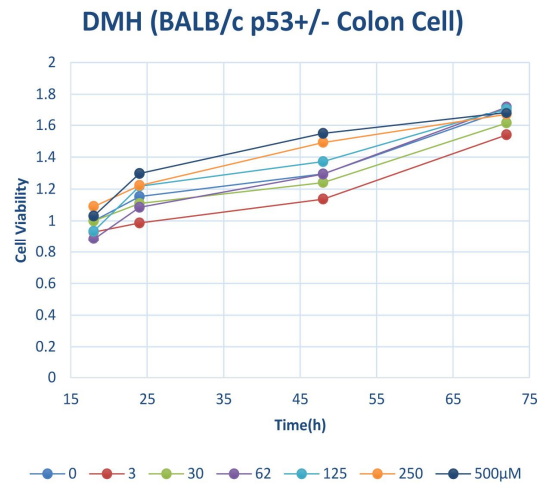
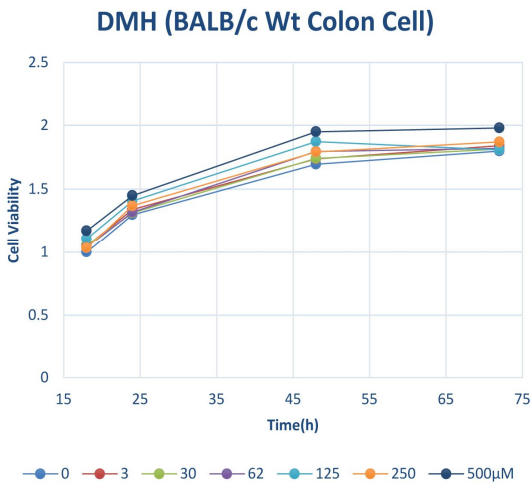


図2 1,2-ジメチルヒドラジンの濃度設定試験 ($p53 +/-$ マウス大腸オルガノイド)

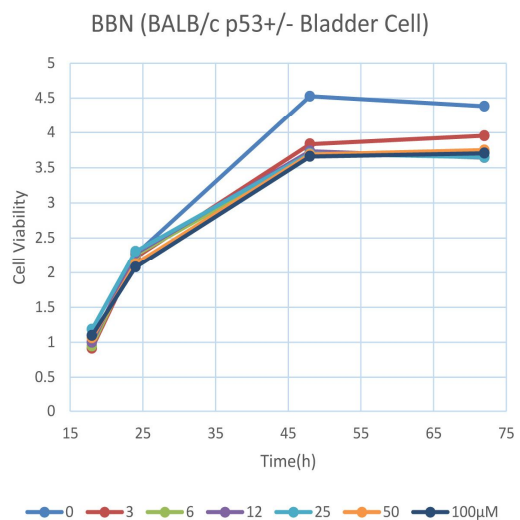
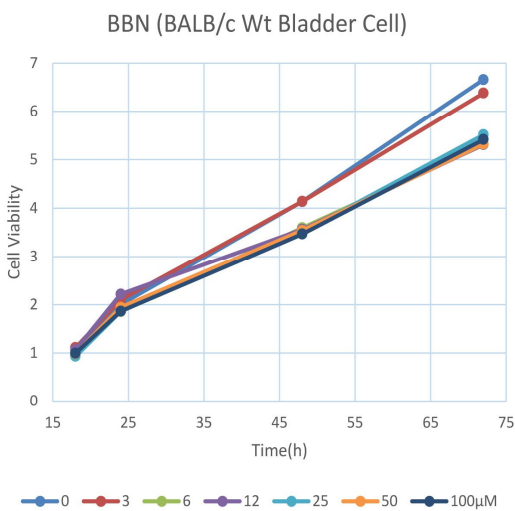


図3 *N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンの濃度設定試験 ($p53 +/-$ マウス膀胱オルガノイド)

表 1 発がん性試験の結果のまとめ

Chemical	Organ	Strain	濃度 (μ M)	肉眼/組織所見
EMS	Lung	pLKO.1, Kras ^{G12D}	0, 100, 300	造腫瘍性
DMH	Colon	Wt-BALB/c, p53+/-	0, 100, 500	異型性、多層性、浸潤性
BBN	Bladder	Wt-BALB/c	0, 3, 15	増殖認めず
		p53+/-	0, 1, 3	同上
安息香酸Na	Lung	pLKO.1, Kras ^{G12D}		増殖促進(異型性なし)