

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）
総括研究報告書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の開発研究代表者 今井 俊夫
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本研究は、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変化を加えたオルガノイド系につき、食品添加物等の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標としている。

平成 27 年度；マウス正常器官・組織を用いて、主に小腸や大腸、肺などのオルガノイド調製法の検討と調製条件の違いによる試験結果のばらつきをなくすための検討を行い、マウスの組織採取時週齢に注意を要することを明らかにした。更に大腸のオルガノイドに対しレンチウイルスを用いて種々のがん関連遺伝子の発現を変化させることによる発がんへの影響を解析した。また、大腸については PhIP、肺については NNK の発がん性を検討し、PhIP については発がん性が確認され、NNK については検証を継続した。遺伝毒性については、*gpt delta* マウス由来の肝臓のオルガノイドについて、背景データとしての spontaneous な変異頻度は、肝臓組織から直接ゲノム DNA を抽出した場合の変異頻度と同程度であることを確認した。平成 28 年度；胆嚢、子宮のオルガノイド調製法の検討を行うとともに、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）について検討した。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なかった。遺伝毒性については、PhIP を被験物質とし、変異頻度と変異スペクトルを指標とした場合、大腸オルガノイドを用いる方法と *in vivo* 試験法と同様の結果が得られることを示した。平成 29 年度；子宮、卵管、胃由来のオルガノイド調製法の検討し、それらに対する遺伝子導入により発がん誘導可能なことを示し、化学物質の発がん性検出にも応用可能であると考えられた。また、遺伝毒性発がん物質としてメタンスルホン酸エチル（EMS）、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）について、非遺伝毒性非発がん物質として安息香酸ナトリウムについて検討し、EMS、DMH については発がん性を示す結果が得られ、BBN については再検討が必要であった。また、陰性対照としての安息香酸ナトリウムについては対照群との差がなかった。遺伝毒性については、*gpt delta* マウス由来の（PhIP の発がん標的ではないとされる）肝臓のオルガノイドについて、PhIP の高濃度処理により変異頻度が上昇傾向を示すことを明らかにし、同マウスを用いる *in vivo* 試験法と矛盾のない結果であることを確認した。

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、遺伝毒性についても *in vivo* 試験法との同等性が示された。

研究分担者

今井俊夫・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

筆宝義隆・千葉県がんセンター・研究所・発がん制御

研究部長

戸塚ゆ加里・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

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

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が、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、結果に重大な影響を及ぼす培養条件を明らかにする目的で、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。

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

C57BL/6J(B6)マウス、*p53*ヘテロノックアウト(+/-)マウス、*rasH2*マウスおよびLSL-*Kras*^{G12D}マウスの肺、肝臓、大腸あるいは膀胱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・肝臓・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など]

-) B6マウス由来オルガノイド：がん抑制遺伝子の*Pten* shRNA(*shPten*)と陰性対照としての*shLuc*を導入
-) *p53*^{+/-}マウス(BALB/c背景)由来オルガノイド：*p53*^{+/-}と野生型(Wt)マウスを使用(遺伝子導入なし)
-) *rasH2*(*Jic:CB6F1-TgrasH2*)マウス由来オルガノイド：*rasH2*および*non-Tg*マウスを使用(遺伝子導入なし)
-) LSL-*Kras*^{G12D}マウス(B6背景)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

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

-) 適用オルガノイドと被験物質：
2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-b]ピリジン(PhIP)；B6マウス由来の肺オルガノイド+*shPten*あるいは+*shLuc*(陰性対照)(0、3、10 μM+S9 mix)
アクリルアミド(AA)；*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(0、0.28、1.4 mM +S9 mix)
ベンゾ[*a*]ピレン(BaP)；B6マウス由来の肺オルガノイド+*shPten*(0、0.6、3.0 μM +S9 mix)または*shLuc*(陰性対照)(0、0.4、2.0 μM +S9 mix)
N-メチル-*N*-ニトロソ尿素(MNU)；*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肝臓(Liv-H)オルガノイド(0、200、1000 μM、S9 mixなし)
メタンスルホン酸エチル(EMS)；LSL-*Kras*^{G12D}

マウス由来の肺オルガノイド +Creあるいは +pLKO.1 (陰性対照) (0, 100, 300 μ M+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 μ M +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 μ M +S9 mix, p53 +/- ; 0, 1, 3 μ M +S9 mix)

トリエタノールアミン (TEA) ; 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 (0, 1,000, 3,000 μ M +S9 mix)

1-メチルナフタレン (1-MN) ; LSL-Kras^{G12D}マウス (B6背景)由来の肺オルガノイド +Cre (0, 10, 50 μ M) あるいは +pLKO.1 (陰性対照) (0, 4, 20 μ M)

安息香酸ナトリウム; B6マウス由来の肺オルガノイド +shPtenあるいは +shLuc (陰性対照) (0, 5,000, 20,000 μ M+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かん抑制遺伝子であるPtenのshRNAまたはshLucの導入を行い、LSL-Kras^{G12D}マウスについては、同様にCreまたはpLKO.1の導入を行い、その後化学物質暴露を行った。

) 濃度設定: 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。

) ノ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、ノ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) 胆嚢、子宮、卵管および胃のオルガノイド調製法の検討

1) オルガノイドの調製

LSL-Kras^{G12D}マウスあるいはLSL-Pik3ca変異型ウスの胆嚢、子宮、卵管あるいは胃からオルガノイドを調製した。調製手順は(1)1)に準じた。

(3) gpt deltaマウスを用いるオルガノイドの調製と化学物質誘発性の変異頻度と変異スペクトルの検討

1) 肝臓、大腸由来のオルガノイドの調製

gpt deltaマウス (日本エスエルシーより購入) の肝臓、大腸からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は(1)と同様とした。

2) DNA抽出、in vitroパッケージングと変異頻度解析

Masumuraらの方法 (1999) に準じてオルガノイドから高分子ゲノムDNAを抽出し、in vitro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。

3) 変異スペクトル解析

PhIP暴露 (5, 10 μ M) をまとめたPhIP暴露群のDNAのgpt遺伝子をPCR増幅させてダイレクトシーケンシングを行い、Masumura K. ら (Carcinogenesis 21:2049-56, 2000) により報告されているgpt delta mouseを用いたin vivo試験の結果と比較した。

(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) オルガノイドをノ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) 化学物質の濃度設定のための予備実験

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。その背景として、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU) に対しては、p53+/-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と判断した。また、アクリルアミド (AA) の各濃度に対する *p53* +/- 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において濃度依存的な細胞数の違いがみられた。AAの発がん性を検討するため *p53* +/- 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所見がみられた。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。

BaPについては、*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を測定した結果、0.2~2.0 μ M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 μ Mに比し2.0 μ Mで抑制がみられたが、*shPten*では2.0 μ Mでも0 μ M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 μ M、*shPten*では0、0.6、3.0 μ Mで実施した。

MNUの発がん性を検討するため、*p53* +/- マウスとWtマウス由来の肝臓 (Liv-H) オルガノイドに対する細胞生存性を測定した結果、*p53* +/- マウスおよびWt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* +/- マウスでは1000 μ Mにて僅かな抑制傾向がみられたが、Wtマウスとともに濃度依存的な明らかな抑制作用はみられなかったことから、発がん性の検討は、*p53* +/- マウスおよびWtマウスともに、0、200、1000 μ Mで実施した。

TEAについては、*p53* +/- マウスおよびWt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 (対照)、1,000、3,000 μ M濃度で発がん性の検討を行った。

1-MNについては、LSL-*Kras*^{G12D}マウス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。

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、本試験では0.1 mM (100 μ M) と0.3 mM (300 μ M) を選択した。

DMHについてはWtマウスと*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マウスの500 μ M群にて、*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、本試験では100と500 μ Mを選択した。

BBNについては、Wtマウスの6 μ M以上、*p53* +/- マウスの3 μ M以上の群にて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、本試験ではWt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、*p53* +/- マウスについては1および3 μ Mを選択した。安息香酸ナトリウムについては、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。

2) オルガノイドへの化学物質暴露と発がん性評価

1) アクリルアミド (AA)

前述の通り、発がん性の評価を*p53* +/- マウスおよびWtマウス由来の肺オルガノイドについて、 α (対照) 0.28及び1.4 mMの濃度にて実施した。

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。一方、病理組織学的解析では、*p53* +/- マウス由来のオルガノイドについては、0.28 mM処置により嚢胞状を呈するオルガノイド (上皮細胞) により形成された組織が対照と比し大型化ならびに一部上皮細胞は重層化を示し、1.4 mM処置により上皮細胞の重層化がより高頻度で見られるとともに、乳頭状増殖あるいは周囲組織への浸潤性が認められた。上皮細胞の核は大型化し、刷り硝子様を呈した。また、周囲組織においては反応性の間質細胞の中等度の増生がみられた。Wtマウス由来のオルガノイドについては、明らかな影響は認められなかった。

2) ベンゾ[a]ピレン (BaP)

ヌードマウス皮下への移植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。一方、病理組織学的解析では、対照に比し0.4 μM (*shLuc*) あるいは0.6 μM (*shPten*) では、嚢胞状組織の大型化がみられ、周囲組織において間質細胞が軽度に増生していた。2.0 μM (*shLuc*) あるいは3.0 μM (*shPten*) では、上皮細胞の明らかな重層化が高頻度でみられるとともに、一部周囲組織への浸潤性が認められた。上皮細胞の核は大型化し、核小体が目立つ特徴も観察された。また、周囲組織において間質細胞が中等度に増生していた。

3) N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)

p53 +/- マウスおよびWtマウスともに、0 (対照)、200、1000 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、56日後の皮下結節については *p53* +/- マウスではWtに比し200 μM で肥大し、野生型では1000 μM で白色化 (組織充実化) 傾向がみられた。病理組織学的解析の結果、Wtの200 μM 処置群では、対照に比し、上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織の増数がみられた。また、Wtの1000 μM 処置群では、がん組織様増殖組織の形成が確認された。一方、*p53* +/- マウス由来のオルガノイドについては、対照に比し200 μM で嚢胞状組織の大型化と上皮細胞の肥大がみられたが、1000 μM 処置群で確認された細胞数は僅少であった。

4) トリエタノールアミン (TEA)

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* +/- マウスおよびWtともに、対照では扁平な上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織が観察されたのに対し、1000 μM 処置群では、上皮細胞が一部立法状に肥大し、更に重層化/浸潤性がみられた。3000 μM 処置群では、対照および1000 μM 処置群に比し細胞数が減少していたが、細胞の重層化及び浸潤性が散見された。

5) 1-メチルナフタレン (1-MN)

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、対照に比し、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群ともに対照との比較において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。

6) メタンサルホン酸エチル (EMS)

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 μM 群のみならず100および300 μM 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 μM 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 μM 群では造腫瘍性がみられた。病理組織学的には、がん肉腫様組織の増殖として認められた。pLK0.1-LSL-*Kras*^{G12D} 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。

7) ジメチルヒドラジン (DMH)

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。病理組織学的には、Wtマウス由来の大腸オルガノイドは、DMH 0 μM 群では拡張した腺管状の増殖を示し、DMH 100 μM 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 μM 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。

8) N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN)

Wtマウスと*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。例外的に*p53* +/- マウスの3 μM 群の一部に嚢胞状の上皮細胞の増生がみられた。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マウスあるいは*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。

9) 安息香酸ナトリウム

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。

(2) 胆嚢、子宮、卵管および胃由来のオルガノイドの遺伝子導入による発がん

LSL-*Kras*^{G12D} マウスあるいはLSL-*Pik3ca*変異型ウスの胆嚢について、Creの導入により*Kras*および*Pik3ca*の活性化を行ったところ、それら単独では腫瘍系性に至らなかった。そこで、がん抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせたところ、特定の遺伝子との組み合わせでのみ腺がん類似の組織像を呈する腫瘍が誘導された。卵管と子宮内膜に関しては*Kras*^{G12D}変異+*shp16/p19*または*p53KO*によりがん肉腫 (CarcinomaとSarcomaの成分の両方を含む病変) が得られることを見出した。Sarcomaへの変化は不可逆的であり、上皮間葉転換とは異なる分子機序が想定された。また、子宮オルガノイドに関しては、*Kras*^{G12D}変異+*shPten*

および*Pik3ca*^{H1047R}変異+*shPten*の両方で通常の腺がんと同様の組織像の腫瘍形成をみた。胆のうに関しては*Kras*^{G12D}変異+*shp16/p19*変異で通常の腺癌が得られた。いずれも単独の変異では腫瘍形成が見られなかった。また、胃に関して*p53K0*、*Kras*^{G12D}変異、*shCdh1*のそれぞれ単独では腫瘍が得られなかったものの、*p53K0+shCdh1*の導入により印環細胞を含む腫瘍が得られ、*Kras*^{G12D}変異+*p53K0*により腺管の分枝や腸上皮化生が顕著に認められる腫瘍の形成を認めた。これらの腫瘍は複数遺伝子変異の協調作用により初めて認められ、単独の変異では腫瘍形成に至らないことから、単独変異導入オルガノイドへの化学物質による変異導入を高感度に検出する実験系の構築に有用であると考えられた。

(3) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製と化学物質誘発性の変異頻度と変異スペクトルの検討

被験物質として2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン(PhIP)を用いて、先ずは*in vivo*での発がん標的である大腸について検討した。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が確認され、更に、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結果、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、Masumuraらにより報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験との比較を行った。PhIPを投与した*gpt delta*マウスの大腸粘膜ではnon-Tgマウスと比べ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た。一方、大腸由来のオルガノイドにPhIPを曝露した場合には、G:C->C:Gトランスバージョン変異は観察されなかったが、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示された。更に発がん標的ではないとされる肝臓オルガノイドについて検討した結果、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。肝臓の標的遺伝子のシーケンス解析の結果については、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トランスバージョン及びG:C->T:Aトランスバ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ことが示唆された。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。

D. 考察

オルガノイドを用いる*in vitro*被験物質暴露系による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検証の一環として、遺伝毒性発がん物質を8物質、非遺伝毒性発がん物質を1物質、非遺伝毒性非発がん物質を2物質選択して検討した。遺伝毒性発がん物質であるMNU、PhIPとEMSについては造腫瘍性を、特にEMSについてはがん肉腫様組織を形成した。BaP、AA、TEAについては病理組織学的にオルガノイドの上皮の一部が重層化/浸潤性を示し、DMHについてはオルガノイドの上皮の一部が重層化し、上皮細胞には核の肥大/異型性がみられ、発がん性を示す結果が得られた。また、DMHについては間質が顕著に増生していた。また、非遺伝毒性非発がん物質とされる1-MNと安息香酸ナトリウムについては、病理組織学的にオルガノイドの増数がみられたる場合もあるが、上皮細胞に異型性は認められなかったことから、オルガノイド系を用いる発がん性の評価としては陰性と判定した。BBNの検討に用いた膀胱由来オルガノイドについては、B6マウス由来の膀胱オルガノイドに*Pten* shRNAをレンチウイルスで導入したものの、*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。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、BBNの0 μM 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。

E. 結論

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、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。

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、遺伝毒性についてもin vivo試験法との同等性を示された。

F . 健康危険情報

該当なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol* 1422:13-21 (2016)
- (2) Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 16(2):3474-92 (2015)
- (3) Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* (2015)
- (4) Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, Ochiai M, Hippo Y, Hayashi SM, Shibutani M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. *Food Chem Toxicol.* 100:103-114 (2017)
- (5) Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H. Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. *Gynecol Oncol.* 144(2):377-383 (2017)
- (6) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol.* 1422:13-21. 2016
- (7) 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* 37:817-26 (2016)
- (8) Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, Hippo Y, Usui T, Ohama T, and Sato K. SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness, *Mol. Cancer. Res.* 16(3):

554-563 (2018)

- (9) Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y and Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncology Lett.* 14: 6863-6868 (2017)
 - (10) 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.*, 109, 1024-1031 (2018)
 - (11) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, Nov 16 (2017)
 - (12) 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* 32:455-462 (2017)
 - (13) 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.*39:12 (2017)
- ##### 2. 学会発表
- (1) 今井俊夫、落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆：遺伝子改変マウス由来正常上皮細胞の3次元培養法を用いる新たな化学物質発がん性試験法の開発。第32回日本毒性病理学会ワークショップ「発癌研究の最新の動向」(香川、2016年1月)
 - (2) 筆宝義隆：3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立。第22回肝細胞研究会(米子、2015年6月)
 - (3) 松浦哲也、筆宝義隆：マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現。第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山、2015年6月)
 - (4) 筆宝義隆：3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立と個別化医療への応用。第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山、2015年6月)
 - (5) 筆宝義隆、松浦哲也、落合雅子、今井俊夫、折橋郁、丸喜明：3次元初代培養を用いた膵管・胆道発がんモデルの確立。第30回発がん病理研究会(小豆島、2015年8月)
 - (6) 筆宝義隆：In vitroでの発がん再構成。お茶の水がん学アカデミア第117回集会(東京、2015年9月)
 - (7) Yoshiaki Maru, Kaoru Orihashi, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor

- Induction from Murine Gastric Organoids. 第 74 回日本癌学会総会 (名古屋、2015 年 10 月)
- (8) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Direct transformation of primary murine pancreatic ductal cells in vitro. 第 74 回日本癌学会総会 (名古屋、2015 年 10 月)
- (9) Yoshitaka Hippo, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Toshio Imai. A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 第 74 回日本癌学会総会 (名古屋、2015 年 10 月)
- (10) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells. 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ (大津、2016 年 2 月)
- (11) Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor Induction from Upper Gastrointestinal Tract 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ (大津、2016 年 2 月)
- (12) 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 年 7 月、名古屋)
- (13) 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 年 10 月、横浜)
- (14) 筆宝義隆、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫 (英語口演) オルガノイドを用いた胆嚢発がんモデルの確立。第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月、横浜)
- (15) 丸喜明、落合雅子、今井俊夫、筆宝義隆 (口演) オルガノイドを用いた卵巣がんモデルの開発。第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月、横浜)
- (16) 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 (2016 年 6 月、リヨン)
- (17) 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)
- (18) 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)
- (19) 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)
- (20) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) オルガノイドへの遺伝子導入による子宮内膜発がん。第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017 年 9 月
- (21) 筆宝義隆 (英語シンポジウム：招待口演) オルガノイド移植モデルおよび PDX による胆道・膵管発がん再構成。第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017 年 9 月
- (22) 松浦 哲也、加藤 真吾、落合 雅子、今井 俊夫、中島 淳、筆宝 義隆：In vitro モデルが明らかにするマウス膵管発がんにおける微小環境の重要性。第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017 年 9 月
- (23) 筆宝義隆 (シンポジウム) 3 次元オルガノイド培養のがん研究への応用、第 26 回日本癌病態治療研究会 (横浜) 2017 年 6 月
- (24) 筆宝義隆 (招待講演 Human Cell セミナー) オルガノイドを用いた発がん過程の *in vitro* 再構成。第 58 回日本臨床細胞学会総会春季大会 (大阪) 2017 年 5 月
- (25) 丸喜明、田中尚武、筆宝義隆：オルガノイド培養を用いた細胞レベルの子宮体がん発がんモデルの開発。第 58 回日本臨床細胞学会総会春季大会 (大阪) 2017 年 5 月
- (26) 丸喜明、田中尚武、筆宝義隆：オルガノイド培養を用いた卵巣がん発がんモデルの開発。第 106 回日本病理学会総会 (東京) 2017 年 4 月
- (27) 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)
- (28) 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)

(発表誌名巻号・頁・発行年等七記入)

H. 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。

