

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）
分担総合報告書

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。本研究では、4～6週齢程度の*gpt delta*マウスから肝臓及び大腸を切り出し細切、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。作成した大腸と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、大腸の変異頻度はPhIP曝露群で濃度依存的に上昇することを確認し、変異スペクトルの解析をした結果、G:C→A:T, G:C→T:Aが主な変異スペクトルとなっており、既報の*gpt delta*マウスを用いた*in vivo*試験結果とほとんど矛盾していなかった。また、変異のホットスポットにおいても*in vivo*試験と矛盾しない結果を得た。肝臓では、PhIPの5μM曝露では変異頻度の上昇は観察されなかったが、10 μMでは、有意差はないものの約5倍に上昇する傾向が観察された。肝臓の変異頻度は既報の*in vivo*試験でも若干の上昇を認めており、大腸と肝臓の上昇の傾向は矛盾しないことが分かった。このことから、オルガノイドを用いた化学物質の遺伝毒性試験法は既存の*in vitro*試験法を補完した発がん性予測試験として有用であることが示唆された。引き続き、作用点の異なる化学物質を用いて当該試験法の妥当性について検討を行うことが必要であると思われる。

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、大腸オルガノイドを用いて解析し、*in vitro*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、大腸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。大腸と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、大腸での変異頻度は

0 μM (n=4)で $3.8 \pm 4.3 \times 10^{-6}$ 、5 μM (n=3)で $25 \pm 24 \times 10^{-6}$ 、10 μM (n=3)で $38 \pm 27 \times 10^{-6}$ であり、PhIPの曝露によって変異頻度が10倍に上昇することを確認した(図1)。次に、標的遺伝子のシーケンス解析を行った。シーケンス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、増村らにより報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験との比較をした(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。その結果を図2に示す。PhIPを投与した*gpt delta mouse*の大腸粘膜ではコントロール動物と比べてG:C->T:Aトランスポージョンが顕著に増加していた。これに加え、G:C->C:Gトランスポージョン変異も観察されていた。一方、大腸由来のオルガノイドにPhIPを曝露させた場合には、G:C->C:Gトランスポージョン変異の観察は見られなかったが、G:C->A:Tトランシジョン及びG:C->T:Aトランスポ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わかった。さらに、増村らの*in vivo*試験と今回のオルガノイドを使用した系で、*gpt*遺伝子上のどの部分にどの変異があるかマッピングして比較した(図3)。増村らは*gpt*遺伝子上に5カ所の変異ホットスポットがあると報告しているが、オルガノイドを用いた系ではそのうち3カ所が一致していることが分かった。大腸由来オルガノイドを用いた系では、変異頻度の上昇、変異パターン、変異のホットスポットにおいて、概ね*in vivo*と同じ傾向を示すことが観察された。

G:C->C:G変異は、自然突然変異及び変異原・がん原物質により誘発される変異の中でも非常に稀であることが知られている。このG:C->C:Gの変異の誘発には8-OH-dGのさらなる酸化によって生成するスピロイミノヒダントインやグアニジノヒダントインといったDNA付加体が関与することが報告されている(Kino K et al, 2001, Chem. Biol., Korniyushyna O, et al, 2002, Biochemistry)。このことから、*gpt delta mouse*の大腸内でPhIPの経口投与により誘発された炎症などの二次的な変化が、これらの酸化的損傷をDNAに起こし、G:C->C:Gの変異を誘発しているのではないかと推測した。PhIPを曝露したオルガノイドで、このような変異スペクトルが観察されなかった理由としては、オルガノイドを構成する細胞集団の中に炎症を惹起する細胞がほとんど存在していないことや、PhIPの曝露期間が短く、慢性的な影響が反映されないなどが考えられる。

肝臓由来オルガノイドを用いた同様の実験では、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、0 μM と5 μM は同程度であったが10 μM では5倍程度に上昇した(図4)。次に、肝臓の標的遺伝子のシーケンス解析の結果を図5に示す。解析数が少ないため参考程度でしかないが、変異頻度の上昇を認めた10 μM と、図2の大腸PhIP群を比較すると、G:C->A:Tトランシジョン及びG:C->T:Aトランスポージョンが主な変異スペクトルという傾向が一致していた。増村らにより報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験の結果では、肝臓は大腸と比較すると1/4程度の上昇ではあるが、PhIP曝露によって変異頻度が上昇することが報告されている(Masumura K et al, 1999, Cancer Letters)。本法では大腸で10倍、肝臓で約5倍の変異頻度の上昇が確認されたことから、変異頻度の上昇幅の傾向としては*in vivo*と大きな差はないものと考えられる。また、増村らによると、deletionに占めるG:C塩基対のdeletion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いる(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。本研究では、大腸におけるdeletionのうち50%が5'-GGG-3'、5'-GG-3'上にあり、もう50%においても、反対鎖である5'-CCC-3'、5'-CC-3'上にdeletionが入っていることが確認された。肝臓では、deletionのうち90%において5'-CC-3'上のdeletionが確認された。insertionに関してはmutationの数が少ないため勘案していないが、以上のことから、mutationのパターンにおいて*in vivo*とオルガノイドの間に大きな矛盾はないものと考えられる。

既知の遺伝毒性発がん物質であるPhIPを、マウス正常組織由来オルガノイドに曝露させた。PhIPの標的臓器である大腸由来オルガノイドでは、変異頻度・変異スペクトル・変異ホットスポットのいずれにおいても*in vivo*と同じ傾向を示した。また、非標的組織である肝臓由来オルガノイドで変異頻度とスペクトルについて調べた結果、解析数が少ないものの、変異頻度においては*in vivo*と相関性のある結果を示した。変異スペクトルについてはデータ数が少ないのと、*in vivo*のデータが無いため比較できなかった。

(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 大腸由来オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

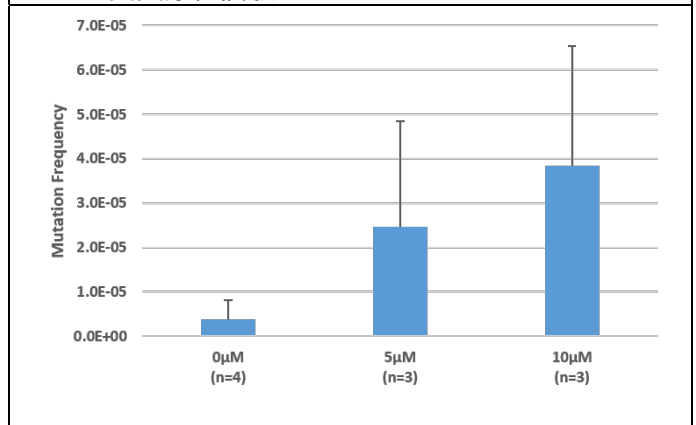


図2 大腸由来オルガノイドを用いた変異スペクトル解析結果

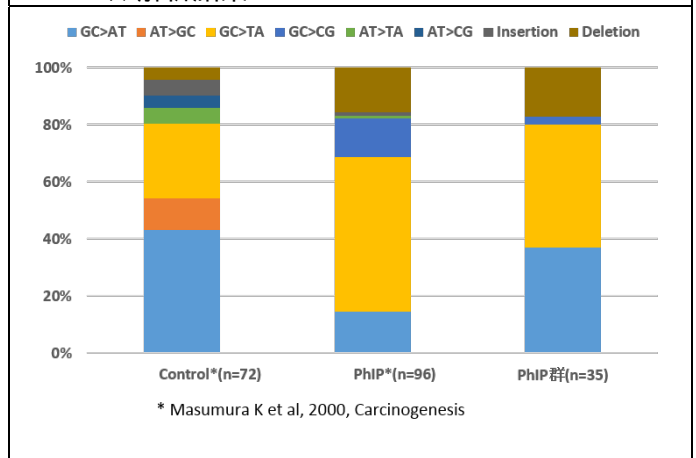


図3 大腸由来オルガノイドを用いた変異ホットス

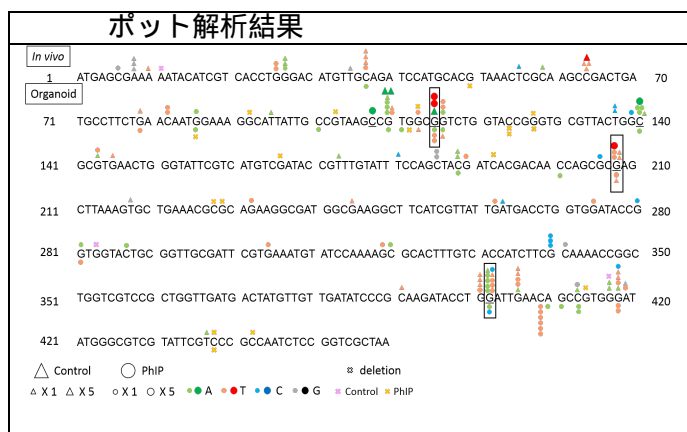


図4 肝臓由来オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

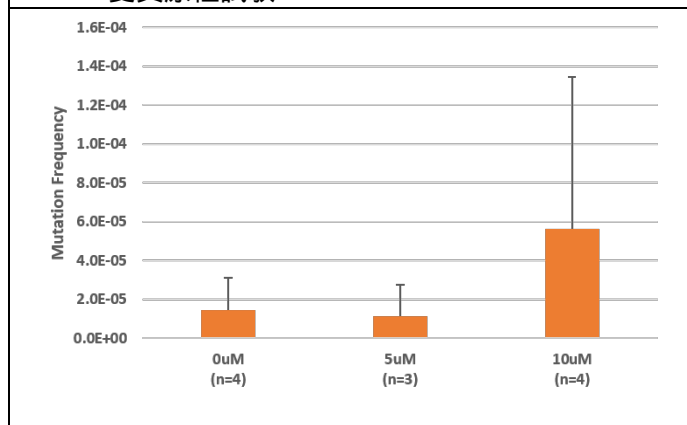
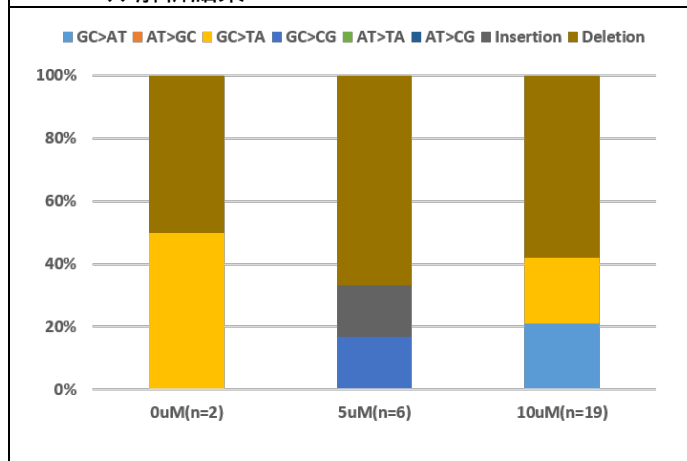


図5 肝臓由来オルガノイドを用いた変異スペクトル解析結果



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家庭の早期変化検出系 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、斎藤春吾、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