

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は、C57BL/6J (B6) マウス由来のオルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、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*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスのオルガノイドを用いた。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)、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)、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)、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)、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、大腸、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でPhIP、AA、BaP、MNU、EMS、DMH、TEAでは発がん性を示す結果が得られた。一方、1-MNと安息香酸ナトリウムについては対照群と差がみられなかった。BBNについては

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、C57BL/6Jマウス由来のオルガノイドにsh*Pten*を導入したオルガノイド、*p53*ヘテロノックアウトマウスあるいは*rasH2*マウス由来のオルガノイドに対し、各種化学物質を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

C57BL6/J(B6) マウスの肺あるいは肝臓からオルガ

ノイドを作成し、sh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入した。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、BALB/c背景の*p53*ヘテロノックアウト (陰性対照として野生型) マウスの肺及び肝臓、あるいは*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肺または肝臓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、MNU処置時を除く) 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。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、遺伝毒性発がん物質とされる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)、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)、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)、非遺伝毒性発がん物質とされるトリエタノールアミン (TEA)、非遺伝毒性非発がん物質とされる1-メチルナフタレン (1-MN)、安息香酸ナトリウムを用いた。PhIPはマウスでは大腸に発がん性を示し、AAはマウス長期発がん性試験において、肺のほか、ハーダー腺、胃、乳腺、卵巣、皮膚に (NTP, TR575, 2012)、BaPは肺のほか、前胃、肝臓、皮膚、投与部位 (間葉系組織) (IARC monograph, vol 100F, 2012) に発がん性を示すことが報告されている。MNUはラットへの経口投与により脳、脊髄、前胃、腎臓などに、新生児マウスへの皮下投与により肺にも腫瘍を誘発する (IARC monograph, vol 17, 1978)、TEAには遺伝毒性はないが (IARC monograph, vol 77, 2000) 肝臓に発がん性を示すとされている (Stout MD et al., Toxicol Pathol 36, 783-79, 2008)、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。

肺と肝臓に関しては、B6マウス由来のオルガノイドに、*Pten* shRNAをレンチウイルスで導入したものをを用いた。*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドについては、肺と肝臓のほか、大腸と膀胱を用いて検討を進めた。また、肝臓に含まれる肝前駆細胞は胆管上皮細胞と肝細胞への分化能をもつと考えられているが、従前のオルガノイド調製法では主に胆管上皮細胞への分化傾向 (LivC) がみられている。今年度は肝細胞への分化傾向を示す (LivH) オルガノイド調製法についても検討した。

C. 研究結果

10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実験を行った。MNUに対しては、*p53*ヘテロノックアウト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であった。また、AAの各濃度に対する*p53*ヘテロノックアウト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 (グラフの横軸は測定試薬添加後の時間を示す) において濃度依存的な細胞数の違いがみられた。(図1)。

AAの発がん性を検討するため*p53*ヘテロノックアウト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

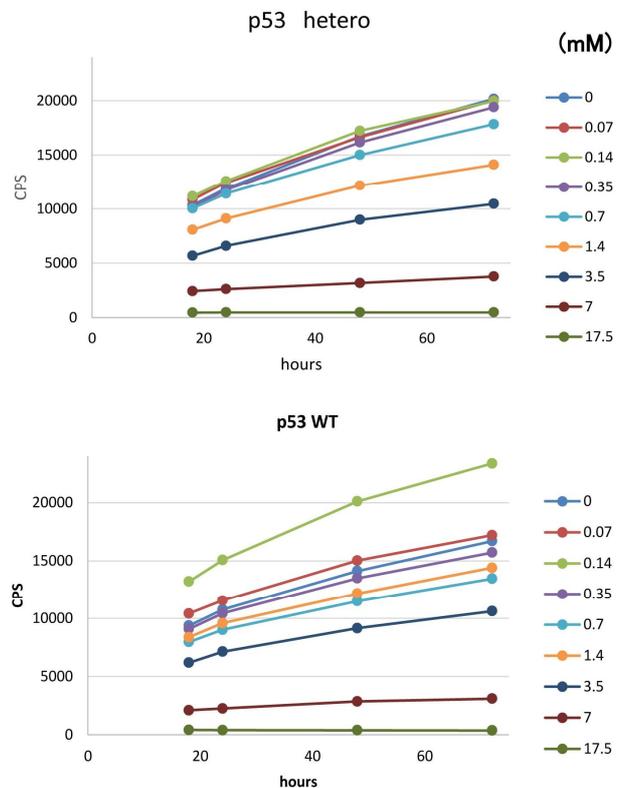


図1 アクリルアミドの*p53*ヘテロノックアウトマウス由来肺オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

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上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた。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の発がん性を検討するためのsh*Pten*と対照としてsh*Luc*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測定の結果、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、sh*Luc*では0 μ Mに比し2.0 μ Mで抑制がみられたが、sh*Pten*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、sh*Luc*では0、0.4、2.0 μ M、sh*Pten*では0、0.6、3.0 μ M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、59日後の皮下結節についてはsh*Luc*とsh*Pten*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が、病理組織学的解析の結果、0 μ M群に比しBaP処置群では、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた。

MNUの発がん性を検討するためp53ヘテロノックアウトと対照としての野生型マウスの肝臓(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ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、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ヘテロノックアウトでは1000 μ Mにて僅かな抑制傾向がみられたが、野生型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ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0、200、1000 μ M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ヘテロノックアウトでは200 μ Mで肥大し、野生型では1000 μ Mで白色化(組織充実化)傾向がみられた(図2)。病理組織学的解析の結果、野生型のMNU200 μ M処置群では、発がん性を示すがん組織様増殖組織がみられた(図3)。

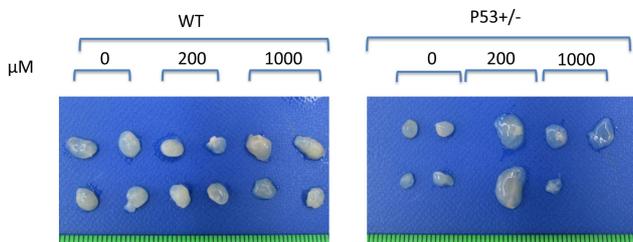


図2 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置した p53ヘテロノックアウトと野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼所見

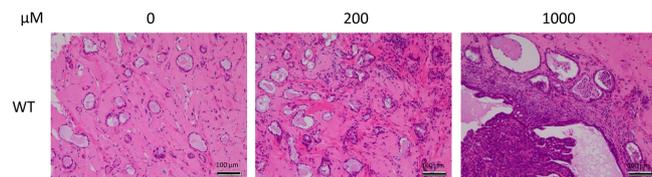


図3 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置した野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での組織所見

TEAについては、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、1,000、3,000 μ M濃度で発がん性の検討を行った。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ヘテロノックアウトおよび野生型ともに、0 μ M群に比しTEA処置群では、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた。

1-MNについては、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。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、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0 μ M群との比較において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。

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、遺伝毒性発がん物質としてPhIP、AA、BaP、MNU、EMS、DMH、非遺伝毒性発がん物質としてTEA、非遺伝毒性非発がん物質として1-MN、安息香酸ナトリウムの発がん性について正常マウスの各種臓器から調製したオルガノイドを用いて検討した。化学物質処置

後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、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でBaP、MNU、AA、EMS及びTEAでは発がん性を示す結果が得られた。PhIPとDMHは大腸オルガノイドに同様の所見が得られた。一方、1-MNと安息香酸ナトリウムについては対照群と差がみられなかった。

(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) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。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、がん予防学術大会2015さいたま、さいたま、2015年6月。

2) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。マウス正常腸管上皮の3次元培養法を用いる発がん再構成系に対するPhIPの修飾作用、第30回発癌病理研究会、小豆島、2015年8月。

3) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。マウス正常腸管上皮の3次元培養法を用いる発がん再構成系に対するPhIPの修飾作用、第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。

4) 落合 雅子、中釜 斉。マウス正常上皮細胞の3次元培養法を用いる*in vitro*発がんモデルの開発、日本環境変異原学会第44回大会、福岡、2015年11月。

5) 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 2016/7/1(名古屋)

6) 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、2016/10/7(横浜)

7) 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)

8) 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)

9) 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

マウス由来オルガノイドを用いる in vitro 化学物質暴露系による実験結果一覧

| 化学物質名 | 遺伝毒性 | 発がん性 | Organ | Strain | 濃度 (μM) | 組織所見 |
|---------------|------|-----------------------|---------|--------------|------------------|------------------|
| ベンゾ(a)ピレン | + | 肺、前胃、肝臓 | Lung | B6-shPten | 0, 0.4, 2.0 | 重層化/浸潤性 |
| N-メチルニトロソ尿素 | + | 脳神経、胃 | LivH | p53+/-, WT | 0, 200, 1,000 | 1000-腫瘍様組織形成 |
| | | | Lung | p53+/-, WT | 0, 200, 1,000 | WT1000-腺管大型化 |
| 1,2-ジメチルヒドラジン | + | 大腸 | Colon | p53+/-, WT | | 重層化/異型性 |
| BBN | + | 膀胱 | Bladder | p53+/-, WT | | 要再実験 |
| アクリルアミド | + | 肺、前胃、乳腺 | Lung | p53+/-, WT | 0, 0.28, 1.4 | 重層化/浸潤性 |
| メタンサルホン酸エチル | + | 肺、腎臓 | Lung | LSL-Kras | 0, 100, 300 | Kras-100-腫瘍様組織形成 |
| PhIP | + | 小腸、(ラット大腸、乳腺) | Colon | B6-shPten | 0, 15, 75 | 75-腫瘍様組織形成 |
| トリエタノールアミン | - | (肝臓-Stout et al 2008) | Lung | p53+/-, WT | 0, 1,000, 3,000 | 重層化/浸潤性 |
| 1-メチルナフタレン | - | (肺-弱い) | Lung | LSL-Kras | 20 ~ 50まで | - |
| 安息香酸ナトリウム | - | - | Lung | LSL-Kras, WT | 0, 5,000, 20,000 | - |
| | | | | | | - : 陰性 |