

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究

分担研究課題名：オルガノイドの調製

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 外来研究員

研究要旨

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標として既知の発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）の肺と肝臓由来オルガノイドを調製し、他の分担研究者へ送付した。なお、今回は常温での輸送方法を探ったが、到着後速やかに培地を再添加して37℃、5%CO₂下に継続して培養できることが確認された。

A．研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質の検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質が腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする発がん性物質を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウス（Cre導入あるいは陰性対照としてpLKO.1導入）の正常組織として肺と肝臓（胆管）由来オルガノイドの調製を担当した。

B．研究方法

C57BL/6JJmsSlc-Tg (*gpt delta*) マウス（雄、4週齢）2匹を日本SLC社より購入し、1週間の順化期間後に安楽死させた後に肺と肝臓を摘出、以下の手順

に従ってオルガノイドを調製した。BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景LSL-*Kras*^{G12D}マウスについては自家繁殖した雄各2匹を5週齢時に使用した。

肺の肺門部、肝臓の肝門部を除いて細切し、PBS(-)中で強く撈拌した後に遠心した。DispaseII (Roche)、Collagenase P (Roche)を含む酵素液で37℃、30分間処置した後、ピペティングにて細胞を分散させ、Cell strainerを通して、12ウェルプレートを用いてMatrigel (Corning)上に播種し、BSAのほか、EGF (Peprotech)、Noggin (Peprotech)、Y27632 (和光純薬)、Jagged-1 (AnaSpec)など増殖因子を含む培地で37℃、5%CO₂下に1日間培養、Matrigelを重層化して更に培養した。1週間に1回程度継代しつつオルガノイドを増やした。継代方法については「マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書」として纏め（図1）、増やしたオルガノイドについては、12ウェルプレートとして常温にて宅配便で他の分担研究者へ送付した。

なお、B6-LSL-*Kras*^{G12D}マウスの肺および肝臓由来オルガノイドについては、Creリコンビナーゼ遺伝子配列が挿入されたLV-Cre pLKO.1 (Addgene plasmid 25997)と陰性対照としてLV-pLKO.1で処置した後、ピューロマイシン添加培地で選択増殖させたオルガ

ノイドを調製した。

C. 研究結果と考察

*gpt delta*マウス、BALB/c背景 *Trp53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス、およびB6背景 *LSL-Kras^{G12D}*マウスの肺及び肝臓（胆管）由来オルガノイドは、何れも3~5回程度継代すると12ウェル程度に増やすことができたが（図2）、他の分担研究者へ送付する目的、および今年度の施設間バリデーションを取る目的で使用する化学物質を選択するための実験に用いる目的で、更に継代を続けてオルガノイドを増やした。なお、今年度は他施設にオルガノイドを輸送する方法として、マトリゲル上加えた培地を除き12ウェルプレートとして常温にて送付したが、到着後速やかに培地を再添加して37℃、5%CO₂下にて継続して培養できることが確認された。

（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

- (1) Maru, Y., Onuma, K., Ochiai, M., Imai, T., Hippo, Y.: Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer Sci.* 110, 858-866 (2019)
- (2) Ochiai, M., Yoshihara, Y., Maru, Y., Tetsuya, M., Izumiya, M., Imai, T., Hippo, Y.: *Kras*-driven heterotopic tumor development

from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024 (2019)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆：マウス大腸オルガノイドにおける PhIP 誘発がん早期過程における遺伝子変異．第 65 回日本実験動物学会総会（2018 年 5 月、富山）
- (2) 今井俊夫、成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆：マウス正常上皮組織由来オルガノイドの化学発がん物質に対する反応性．第 25 回日本がん予防学会総会（2018 年 6 月、高松）
- (3) 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常上皮オルガノイドを用いた化学発がん過程の初期変化．第 45 回日本毒性学会学術年会（2018 年 7 月、大阪）
- (4) Imai T, Ochiai M, Naruse M, Hippo Y: Carcinogenic alteration of mouse tissue-derived organoids by chemical treatment. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2019年3月、ポルチモア、米国)

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

マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順

2018年10月29日 ver. 2.0

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)
香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の
開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究
(H30-食品一般-003)

II. オルガノイドを用いる評価系の確立に関する研究グループ

1. 送付するオルガノイドの概要

(1) BALB/c-WT と $p53^{+/-}$ マウス肺由来オルガノイド

- ・2018年6月11日 (♂、5週齢、1匹)から肺を摘出
- ・2018年8月10日 (passage 10)にて凍結(-80°C)

(2) *gpt delta*マウス肺由来オルガノイド

- ・2018年8月7日 (♂、5週齢、1匹)から肺を摘出
- ・2018年8月31日 (passage 4)にて凍結(-80°C)

2. 送付

(1) 常温輸送

・発送

12 wellプレートで培養したオルガノイド
→培地を回収、パラフィルムでシールしたプレートにキムタール
と梱包材で包んで発砲スチロール箱にいれ、常温送付(天地
無用扱い)

・受取

12 wellプレートに肺用(d1)培地 0.8~1 mL/well添加(フィル
ターチップを使用のこと)
→37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養

3. 解凍/培養

(2) 培養

・肺用d0培地とd1培地

肺オルガノイド用培地組成			
	単位	0d	1d
AD/F12+E	mL	1	1
Y	μL	0.2	-
A	μL	0.05	0.05
FGF10	μL	0.4	0.4
BSA7.5%液	μL	130	26

AD/F12+E: AD/F12(L-Glu+PSF) 40mLにEを20μL添加
AD/F12(L-Glu+PSF): L-Glu 1X, P-S 1X, F 2 μL/mL
E: 100 ng/μL - 0.1%BSA (740μL D-PBS + 10μL 7.5% BSA)にて希釈
Y: 5mM Y27632
A: 2.5mM A-83-01
FGF10: 100 μg/mL FGF10, Mouse

※各growth factorは0.1%BSA(7.5%BSA 10μL + D-PBS 740μL)で希釈、1.5mLチューブに
分注、凍結保存

4. 継代

(1) 継代(前半)

- ア) 培地を回収(省略可)
- イ) スクレイバーにてマトリゲルを回収(0.5 mL/wellのPBS(-)で2回洗う)
- ウ) 400g 3分遠心、上清を除き、1 mLのPBS(-)添加後必要に応じてボルト
テックス
- エ) 遠心、上清除き、Accumaxを0.8 mL/well添加し必要に応じてボルト
テックス、常温12分(または恒温槽37°C、5分)

(2) プレートの準備

12 wellプレートに 65 μL/wellのマトリゲルを添加
(AD/F12 + E培地などにてプレートを濡らしておく、p.6参照)
37°Cにて25分間固める

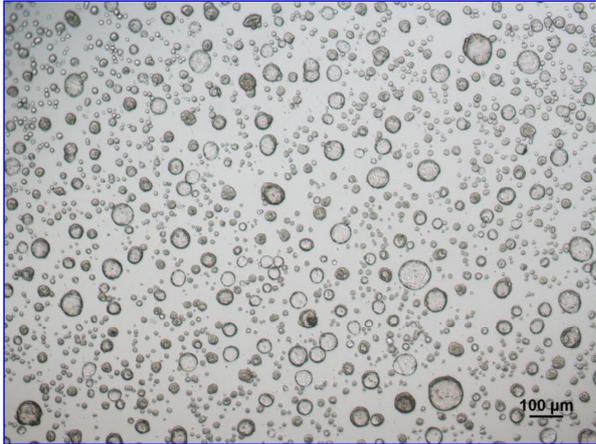
(3) 継代(後半)

- オ) PBS(-) 1 mLを加え遠心、更に1回洗浄
- カ) 肺用d0培地 0.65mL/wellにて懸濁後マトリゲル上に播種
- キ) 翌日に培地を回収し、70~80 μL/wellのマトリゲルを被せて37°Cで
25分間固めた後、肺用d1培地0.8~1 mL/wellを重ね

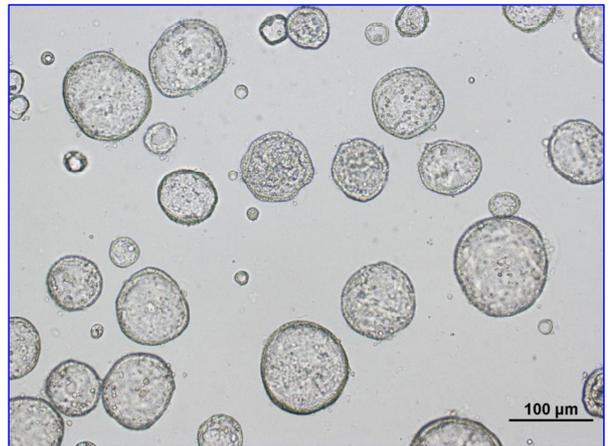
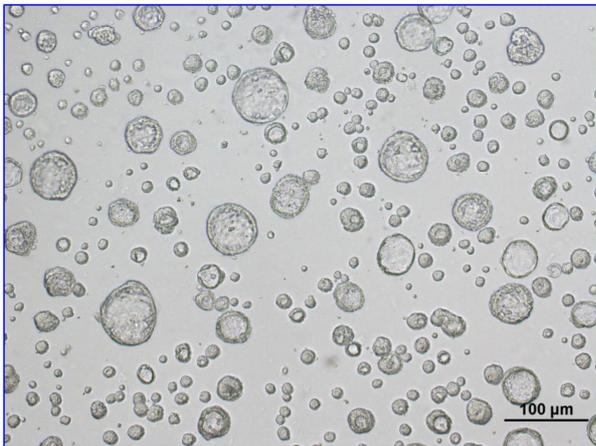
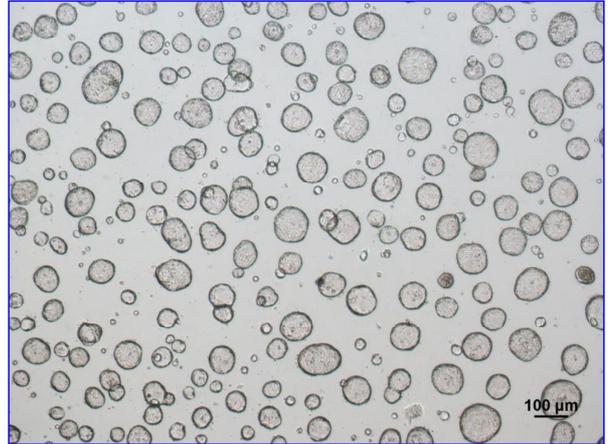


図1 マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書書(抜粋)

肺



肝臓(胆管)



1

図2 *gpt delta*マウスオルガノイド(4継代目)