

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。今年度は、発がんの非標的臓器である肝臓を用いて、PhIPの遺伝毒性を解析した。5週齢の*gpt delta*マウスから肝臓を切り出し細切、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  $\mu\text{M}$ 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、PhIP曝露によって変異頻度が上昇したが、濃度依存的な上昇は観察されなかった。PhIPの発がん標的臓器である大腸に比べると、変異頻度の上昇率が大きく、*in vivo*試験とは異なる様相を呈した。オルガノイドにすることで細胞増殖頻度が増加し、変異が蓄積しやすくなったと考えており、現在、肝臓、大腸オルガノイドについて、細胞増殖やPhIP-DNA付加体の解析を行う準備を進めている。また、同様に作成した肺オルガノイドを用いて、加熱食品中に含まれるアクリルアミド(AA)を0, 0.28, 1.4  $\mu\text{M}$ の濃度でS9 mix存在下で曝露した結果、高用量曝露によってオルガノイドの形態変化が観察された。

## 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てきた。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、発がん非標的臓器である肝臓オルガノイドを用いて解析し、*in vivo*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。さらに、オルガノイドを用いた遺伝毒性試験法が、他施設間で一致した結果が得られるか検証するために、同一個体の肺から作成したオルガノイドを静岡県立大学へ分与し、同じプロトコルでAAを曝露させた。

## B．研究方法

## オルガノイドの作成と被験物質の曝露

5週齢の雄性マウスから肝臓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。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  $\mu\text{M}$  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。

## 肺オルガノイドへのAA曝露

5週齢の雄性マウスから肺を切り出し細切、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しオルガノイドを得た。継代のタイミングでセルカウントし、12wellプレートへ $1.0 \times 10^5$ /wellに調製して播種した。そこへ、S9mixとAAを混合したものを加え、24時間曝露させた。曝露後、PBS(-)で1回洗浄し、マトリゲルを重層して液体培地を加え、約1週間培養した。これを合計3回繰り返し、*gpt*変異解析用に2回、6wellになるまで継代した。増殖させたオルガノイドからマトリゲルを除いて回収し、DNA抽

出まで-80 で保存した。

### C. 研究結果

常法に則って肝臓由来オルガノイドからゲノム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、PhIP曝露によって変異頻度は0 μM (n=4)で $1.1 \pm 1.4 \times 10^{-5}$ 、5 μM (n=3)で $8.9 \pm 12 \times 10^{-5}$ 、10 μM (n=4)で $7.7 \pm 7.6 \times 10^{-5}$ であった。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、5、10μMでは約8倍程度に上昇する傾向が観察された(図1)。増村らによる*in vivo*試験の結果では、PhIPは発がん非標的臓器である肝臓でも変異頻度の上昇を認めている(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。しかしながら、今回の肝臓オルガノイドを用いた系では、先行研究で得られた発がん標的臓器である大腸よりも変異頻度が上昇していた。大腸由来オルガノイドでの突然変異頻度を図2に示す。生体内では、肝臓よりも大腸の方が細胞増殖の頻度が高いが、オルガノイドにすることで増殖頻度が増加し、変異が蓄積しやすくなったことが変異頻度の上昇につながったのではないかと考えており、現在、肝臓、大腸オルガノイドについて、細胞増殖のマーカーであるKi-67を調べることで説明できると考え、準備を進めている。また同時に、PhIP-DNA付加体の解析も行う予定である。

#### 肺オルガノイドのAA曝露

継代毎に細胞数を揃えた肺オルガノイドへAAを曝露した結果、1.4μMで形態変化が表れた。露直後ではいずれも形態変化を起こさなかったが、曝露後1週間の培養中に、0μM、0.28μMではオルガノイドのバルーン形状を保ったままであったが、1.4μMではバルーン形状が崩れ、辺縁が波立った形態へと変化した。(図3)しかし、変異原性試験用に2回の継代をすると、1.4Mで見られた形態変化したオルガノイドの数が減少した。AA曝露後に増殖させ、凍結保存したオルガノイドについては来年度以降、DNA抽出、変異原性試験および変異スペクトラム解析を行う。静岡県立大学での結果とあわせて、新規遺伝毒性評価法として有用か評価する。

#### (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 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

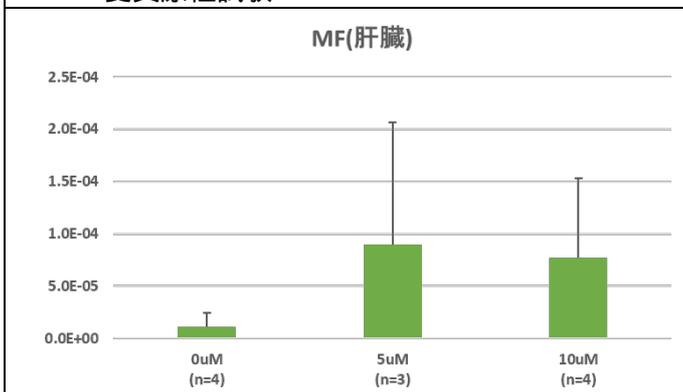


図2 大腸由来オルガノイドを用いたPhIP遺伝子変異原性試験 (参考資料)

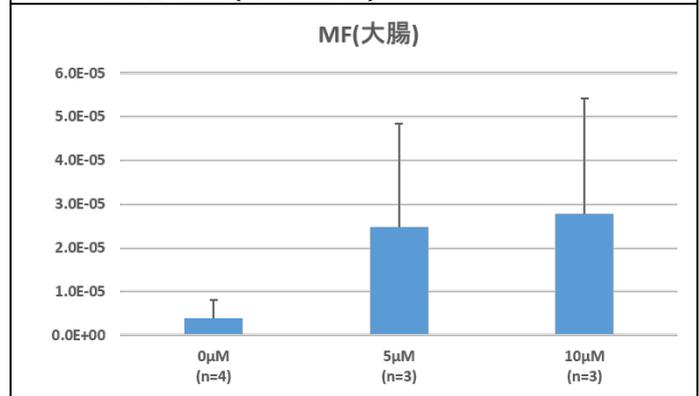
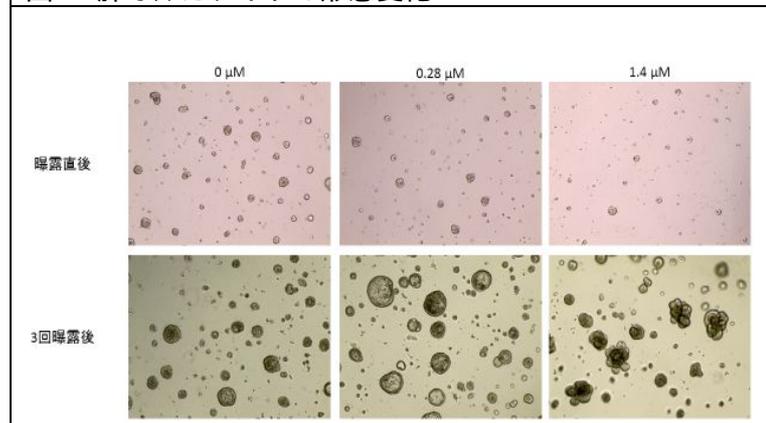


図3 肺オルガノイドの形態変化



### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res.* in press, 2019.
- 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.
- Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.  $\gamma$ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2018, 38:537-543.

#### 2. 学会発表

- 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)
2. 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
  3. 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二: 芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
  4. Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H: Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
  5. 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
  6. 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊: Fe<sup>3</sup>O<sub>4</sub> ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のプロファイリングについて (II) 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
  7. 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治: 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
  8. 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47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
  9. 前迫有也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里: 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
  10. 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里: ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
  11. 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里: ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第47回日本環境変異原

学会 (京都、2018年11月)

12. 石野孔祐、前迫有也、内藤善哉、戸塚ゆ加里: 質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11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