

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：オルガノイド皮下移植系の病理学的評価

研究分担者 三好規之 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

### 研究要旨

本分担班では、腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法に関連し、オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した際の造腫瘍性とともに、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を進めている。一方、本分担課題における本年度の検討では、オルガノイドを用いた試験結果における施設間でのばらつきについて基礎的なデータを蓄積する目的で、国立がん研究センターにて調製されたgpt deltaマウス肺オルガノイドを静岡県立大学へ輸送し、継代培養後に披験物質（アクリルアミド）を曝露することで、次年度実施予定の遺伝毒性試験の試料調製を行った。

### 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。本研究班では、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指しているが、最終的にその妥当性が検証されるとともに、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。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る。分担課題においては、オルガノイドを用いた試験結果における施設間でのばらつきについて基礎的なデータを蓄積する目的で、本年度は国立がん研究センターにて調製されたgpt deltaマウス肺オルガノイドを静岡県立大学へ輸送し、披験物質（アクリルアミド）の曝露後、細胞を

凍結保存することで次年度実施予定の試料を調製した。

### B．研究方法

gpt deltaマウス肺オルガノイドは、12 wellプレート4 well分に培養された状態で国立がん研究センターより輸送（室温）された。受け取り後、直ちに1 mL/well肺用（d1）培地を加え37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。披験物質（アクリルアミド）が送付されてくるまでの間、培地が黄色くなる4 - 5日毎に継代した（3倍希釈）。余分な細胞は凍結保存（-80 °C）した。披験物質（アクリルアミド）の曝露時には、12 wellプレートに調製したマトリゲル上に350 μL/wellの細胞懸濁液（d0培地、30.77×10<sup>4</sup> 個/mL）を播種し、そこへS9 mix（50 μg prtein/mL）と0 mM、0.28 mM、1.4 mMのアクリルアミドを含む肺用d0培地を350 μL加えた。翌日、培地を回収しPBS（1 mL/well）で洗浄後、70 μL/wellのマトリゲルを重層し37°Cで25分間固めた後、肺用d1培地（1 mL/well）を加えた。その後、培地が黄色くなる4 - 5日毎の継代時にアクリルアミド曝露を同様の方法で実施した（合計3回）。

### C．研究結果

合計3回の曝露後に、継代培養により各濃度あたり6well分の細胞を回収し、ペレットの状態での-80°C保存した。

### D．研究発表

#### 1. 論文発表

Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S. Skeletal muscle-specific PGC-1α

overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Sci. Rep.*, (2019) 9, 4077.

Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch. of Toxicol.*, (2019) in press

Hashidume T, Sakano T, Mochizuki A, Ito K, Ito S, Kawarasaki Y, Miyoshi N. Identification of soybean peptide leginsulin variants in different cultivars and their insulin-like activities. *Sci. Rep.*, (2018) 8, 16847.

Yagi M, Nakatsuji Y, Maeda A, Ota H, Kamikubo R, Miyoshi N, Nakamura Y, Akagawa M. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake. *PLoS One.*, (2018) 13, e0206748.

Yoshikawa Y, Katayanagi Y, Kamiya M, Yamamoto Y, Fukutomi R, Imai S, Miyoshi N, Ohashi N. Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses. *J. Funct. Foods*, (2018) 49, 458-464.

Hashidume T, Sasaki K, Hirata J, Kato M, Yoshikawa Y, Iwasaki Y, Arai H, Miura S, Miyoshi N. Effects of sanyaku and its constituent diosgenin on the fasted and postprandial hypertriglycerolemia in high-fat-diet-fed KK-*A*<sup>y</sup> mice. *J. Agric. Food. Chem.*, (2018) 66, 9968-9975.

Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Beneficial effects of green tea catechins on brain function. *Molecules*, (2018) 23, E1297.

Miyoshi N. Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its derivatives. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, (2018) 62, 107-114.

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. *J. Appl. Toxicol.*, (2018) 38, 537-543.

## 2. 学会発表

川上真由子、橋詰力、三好規之：キノコ抽出物における骨格筋萎縮予防化合物の探索，第41回日本分子生物学会（横浜），2018年11月28-30日

橋詰力、永田光風、佐藤隆一郎、三好規之：横浜大豆タンパク質 コングリシニン摂取時の脂質組成解析，第41回日本分子生物学会（横浜），2018年11月28-30日

永田光風、橋詰力、伊藤圭祐、三浦進司、三好規之：TRPA1・TRPM8 を介した脂質組成変動による口コモティブシンドローム予防法の検討，第41回日本分子生物学会（横浜），2018年11月28-30日

田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之：膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 Metabolomics and DNA adductome analysis of urinary bladder carcinogen *o*-toluidine，日本環境変異原学会第47回大会（京都），2018年11月1-2日

久富優太、小田美光、下原千晶、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、八木孝司、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜：コリバクチン産生大腸菌の *in vitro* 遺伝毒性試験，日本環境変異原学会第47回大会（京都），2018年11月1-2日

松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之：ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索，平成30年度日本栄養・食糧学会 九週・沖縄支部大会（宮崎），2018年10月20-21日

豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子：芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態，第77回日本癌学会学術総会（大阪），2018年9月27-29日

平山裕一郎、田島悠也、恒松雄太、三好規之、若林敬二、渡辺賢二：検出困難な遺伝毒性物質コリバクチンを見出すためのDNA付加体の解析，日本生薬学会第65回大会（広島），2018年9月16-17日

吉川祐人、鈴木悠、橋詰力、高垣晶子、平山裕一郎、岸本真治、渡辺賢二、中村順行、原征彦、三好規之：ラット尿中の緑茶カテキン由来腸内細菌代謝物一斉分析，第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会（京都），2018年9月7-8日

加藤麻衣、橋詰力、吉田卓矢、田村謙太郎、中村俊之、中村宜督、三好規之：自然薯および自然薯むかごにおける有効成分ジオスゲニンの定量分析，第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会（京都），2018年9月7-8日

松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之：ApoE 欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索，第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会（京都），2018年9月7-8日

日高楓、横山大悟、田中航、鈴木悠、三好規之、吹井伸二、杉田卓也、日高健太、窄野昌信、榊原啓之：マンゴ

ーに含まれる成分と抗酸化活性に及ぼす熟度の影響, 第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会・合同学術集会(京都), 2018年9月7-8日

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、亀井康富、三浦進司：骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明, 第73回日本体力医学会大会(福井), 2018年9月7-9日

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、亀井康富、三浦進司：骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明, 日本筋学会第4回学術集会(岡山), 2018年8月10-11日

三浦進司、妹尾奈波、梅林脩平、守田昭仁、三好規之、亀井康富：転写共役因子 PGC-1 によって制御される骨格筋リポオレチン, 日本筋学会第4回学術集会(岡山), 2018年8月10-11日

平山裕一郎、松崎信生、玉舟亮太、恒松雄太、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二大：腸がんリスク因子物質コリバクチンの生産菌検出に関する化学的研究, 第24回日本がん予防学会(高松), 2018年6月27-28日

豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子：膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物:ラットを用いた検討, 第24回日本がん予防学会(高松), 2018年6月27-28日

河合柚子、橋詰力、眞鍋康子、藤井宣晴、中村宜督、三

好規之：食品因子 isothiocyanate 類が結合した炎症性サイトカイン MIF の機能解析, 第72回日本栄養・食糧学会大会(岡山), 2018年5月11-13日

加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司(加藤)久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之：高脂肪食を摂取した NASH 肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析, 第72回日本栄養・食糧学会大会(岡山), 2018年5月11-13日

吉川悠子、恒松雄太、松崎信生、平山裕一郎、佐藤道大、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二：大腸がん患者から分離された遺伝毒性物質コリバクチン陽性菌の解析 Prevalence of colibactin-positive bacteria in colorectal cancer patients, 第91回日本細菌学会総会(福岡), 2018年5月11-13日

#### 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