

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：オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 平田暁大 岐阜大学・研究推進・社会連携機構・助教

### 研究要旨

本分担研究課題においては、マウス正常組織由来オルガノイドを用いる *in vitro* 発がん性短中期試験を多施設で実施可能な方法として確立することを目的に、施設間での輸送方法を検討するとともに、施設間での輸送がオルガノイドへ及ぼす影響について基礎的なデータを収集した。現在のところ、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。そのため、マウスの生体からオルガノイドを調製する工程が本試験系の普及の障害となる可能性がある。他施設で調整済みのオルガノイドを用いて試験を実施することができれば、試験の実施にあたり、各施設で生体からオルガノイドを調整する必要はなくなり、試験法の普及に繋がることが期待される。本年度は、基幹施設（国立がん研究センター）で調整されたオルガノイドを輸送し、研究分担者の所属施設（岐阜大学）において培養を行い、施設間での輸送がオルガノイドへ及ぼす影響を検討した。野生型BALB/cマウス及び*p53*ヘテロノックアウト（*p53* (+/-)）マウス（BALB/c背景）由来の胆管および肺オルガノイドを用い、オルガノイドは細胞培養用プレートでマトリゲルに挟まれた状態で基幹施設から輸送した。分担者の所属施設において、到着後、速やかに培地を添加し、培養を続けた。胆管オルガノイドについては1回、肺オルガノイドを3回の輸送を行い、いずれの場合も輸送後に培養・継代が可能であった。受け取ったオルガノイドは1週間毎に継代を行い、胆管オルガノイドについては7回、肺オルガノイドについては9回継代を行った後も、オルガノイドは培養可能で、大きな形態学的な変化も生じないことを確認した。また、輸送後の培養・継代において、野生型と*p53* (+/-) のオルガノイドの間に明らかな違いは認められなかった。

以上、今回確立した方法でマウス由来オルガノイドの輸送は可能であることが示された。輸送後に培養したオルガノイドに形態学的な変化は認められなかったが、今後、実際に *in vitro* 発がん性短中期試験に用いた場合に、試験結果を忠実に再現できるか検討する必要がある。

### 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。本研究では、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウス、レポーター遺伝子導入マウス等から調製したオルガノイド系あるいはそれらにshRNAを用いて発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系につき、遺伝毒性試験法としての適用性と腫瘍性病変をエンドポイントとする発がん性試験法としての

妥当性を検証し、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指す。また、最終的に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。

今年度は、他施設で調製されたオルガノイドを用いて *in vitro* 発がん性短中期試験が実施可能であるか検討するため、施設間での輸送方法を検討するとともに、施設間での輸送がオルガノイドへ及ぼす影

響について基礎的なデータを収集した。他施設で調製済みのオルガノイドを用いることが可能になれば、施設間での試験結果のばらつきを抑えたより再現性の高い試験となることが期待され、さらに、各実施機関で生体からオルガノイドを調整する必要がなくなるため、オルガノイドを用いた試験法の普及に繋がることが期待される。

また、*p53*(+/-)マウスを含めたがん関連遺伝子改変マウス由来のオルガノイドを用いることで、*in vitro*発がん性短中期試験の検出感度が高まることが期待される。一方、遺伝子可変マウス由来のオルガノイドは輸送ストレスへの感受性も高いことも予想されるため、遺伝子改変のオルガノイドの輸送に及ぼす影響を検討した。

## B. 研究方法

(1) 施設間で輸送がオルガノイドに及ぼす影響の解析

### 1) オルガノイドの調製

オルガノイドの調整は、国立がん研究センターにておこなった。野生型 BALB/cマウスおよび*p53*(+/-)マウス(BALB/c背景)の胆管、肺からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は次の通りである。

[1日目]

- ) 肝臓・肺を摘出、細切、酵素処理
- ) マトリゲル上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

- ) 液体培地を除きマトリゲルを重層
- ) マトリゲル上に液体培地を加え培養

[1週間目(オルガノイドの増殖程度で判断)]

- ) マトリゲルを除きオルガノイドを軽く破砕して継代
- ) 1日目、2日目と同様の操作により培養継続

### 2) オルガノイドの輸送

[1日目]

- ) 継代と同様の操作により軽く破砕したオルガノイドをマトリゲル上に播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

- ) 液体培地を除きマトリゲルを重層
- ) 細胞培養用プレートのまま、常温にて岐阜大学に送付

[3日目]

- ) 到着後、速やかにマトリゲル上に液体培地を加え培養

[1週間目]

- ) 国立がん研究センターと同様の操作により継代

) 1日目、2日目と同様の操作により培養継続

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

## C. 研究結果

胆管オルガノイドについては1回、肺オルガノイドを3回の輸送を行い、いずれの場合も輸送先の施設(岐阜大学)で培養が可能であった。いずれのオルガノイドについても、1週間毎に継代を行い、胆管オルガノイドについては7回、肺オルガノイドについては9回継代を行った後も、オルガノイドは培養可能で、大きな形態学的な変化も生じないことを確認した(写真1)。また、輸送後の培養・継代において野生型と*p53*(+/-)のオルガノイドの間に明らかな違いは認められなかった。また、これまで分担研究者はオルガノイドを培養した経験はなかったが、比較的容易にオルガノイドを培養することが可能であった。

以上より、今回確立した輸送方法により施設間のオルガノイドの受け渡しが可能で、他施設で調製されたオルガノイドを用いて*in vitro*発がん性短中期試験が実施可能であることが示唆された。今後、実際に*in vitro*発がん性短中期試験に用いた場合に、試験結果を忠実に再現できるか検討する必要がある。現在、輸送後、培養・継代された肺オルガノイドを用いてアクリルアミドに対する試験を実施し、基幹施設で行った試験の結果が再現できるか検討している。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Tsuchiya Y, Sakai H, [Hirata A](#), and Yanai T. Brazilian green propolis suppresses acetaminophen-induced hepatocellular necrosis by modulating inflammation-related factors in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 31(4), 275-82, 2018.
- (2) Tsuchiya Y, Sakai H, [Hirata A](#), and Yanai T. Effects of food restriction on the expression of genes related to acetaminophen-induced liver toxicity in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 31(4), 267-74, 2018.
- (3) Goto M, Yonemaru K, [Hirata A](#), Furuhashi H, Yanai T, and Sakai H. Lingual ganglioneuroma in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 80(3), 488-91, 2018.
- (4) [Hirata A](#)\*, Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J. Laryngeal B cell lymphoma in a juvenile Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Pathol. in press*

( 5 ) Goto M, Owaki K, Hirata A, Yanai T, and Sakai H. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis to canine hemangiosarcoma cells *in vitro*. *Vet. Comp. Oncol. in press*

( 6 ) Hirata A\*, Miyamoto Y, Kaneko A, Sakai H, Yoshizaki K, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, and Suzuki J. Hepatic Neuroendocrine Carcinoma in a Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). *J. Med. Primatol.*, 48(2), 137-40, 2019.

2. 学会発表  
該当なし

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。

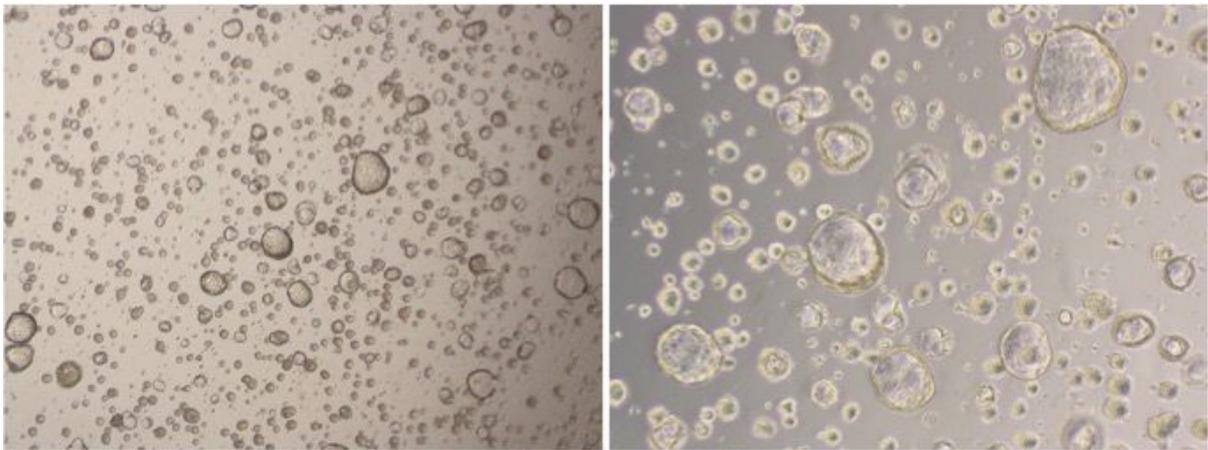


写真1. p53ヘテロノックアウトマウス由来肺オルガノイド(輸送後、8回培養後。左:低倍像、右:高倍像)。