

オルガノイドの調製、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 今井俊夫 国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本分担研究課題においては、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、バリデーション試験において使用する陽性および陰性対照物質の選択と発がん感受性に対するオルガノイド樹立に使用するマウス系統差を明らかにするための解析を行っている。今年度は、陽性対照物質として遺伝毒性発がん物質であるメタンスルホン酸エチル（EMS）、アクリルアミド（AA）およびジエチルニトロソアミン（DEN）を用い、マウス系統としてCByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnon-Tgマウスを用いて、肺および肝臓（胆管）オルガノイドに対する化学物質による発がん作用を検討した。結果として、rasH2マウス由来肺オルガノイドと肝臓（胆管）オルガノイドのEMS高濃度処置群、rasH2マウス由来肺オルガノイドのAA高濃度処置群で発がん性を示す上皮細胞の重層化／浸潤性／異型性が1/4～2/4の頻度でみられたが有意差はなかった。non-Tgマウス由来オルガノイドでは、DEN高濃度処置した肝臓（胆管）オルガノイドで1/4で変化がみられたのみであった。以上より、rasH2マウス由来肺および肝臓（胆管）オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、平成30年度に用いたC57BL (B6) 背景あるいはBALB/c 背景の *Trp53* ヘテロノックアウトマウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。

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既知の発がん物質による造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化・浸潤性・異型性の誘発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C57BL (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）からオルガノイドを調製して研究に供した。今年度は、マウス系統差を明らかにする一環として、CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnon-Tgマウス由来のオルガノイドを用いた解析を行った。

具体的には、平成27～29年度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）「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の開発」においてオルガノイドに対する*in vitro* 処理により発がん性を示す形態学的変化を誘発することを明らかにしたメタンスルホン酸エチル（EMS）、アクリルアミド（AA）を陽性対照物質とし、更にジエチルニトロサミン（DEN）を加え、陰性対照物質としては安息香酸ナトリウム（SB）を用いた。rasH2マウスとnon-Tgマウスの肺オルガノイドにはEMS、AA、SBを、同系統マウスの肝臓（胆管）オルガノイドにはEMS、DEN、SBを*in vitro*で処置した。各化学物質の発がん性評価は、オルガノイドをヌードマウス皮下に接種後8週間経過後に採取した組織の病理組織学的解析により行った。

rasH2マウスはヒトプロト型*Hras*遺伝子の3コピーがタンデムに挿入されたマウスであり（Tamaoki N. *Toxicol Pathol* 29(Suppl.)81-89, 2001）、遺伝毒性発がん物質のみならず非遺伝毒性発がん物質を26週間投与することでそれらの発がん性が検出可能であることが示されている。今年度の本研究課題においては、rasH2マウスの正常組織由来オルガノイドにお

いても、遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置により発がん性が示されることを期待して行った。しかしながら、結果としてrasH2マウス由来肺および肝臓(胆管)オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、平成30年度に用いたC57BL (B6) 背景あるいはBALB/c背景の*Trp53* ヘテロノックアウトあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。この結果を受け、活性型*Kras*遺伝子を導入したLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドを用いる*in vitro* 処置による発がん性の再現性検証とともに、オルガノイドにおける発がん感受性に差がみられる機序解析を開始した。

B. 研究方法

(1) マウス正常組織からのオルガノイドを樹立および樹立したオルガノイドに対する化学物質の*in vitro*暴露

1) オルガノイドの調製

CB6F1 背景である CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnon-Tgマウスの肺および肝臓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]

- i) 肺・肝臓を摘出、細切、酵素処理
- ii) 12ウェルプレートにマトリゲルを滴下、37°Cで固まらせた上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

- i) 液体培地を除きマトリゲルを重層
- ii) 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)]

- i) マトリゲルを除きオルガノイドを軽く破碎して継代
- ii) 1日目、2日目と同様の操作により培養継続
- iii) 継代・培養を3回程度繰返し

2) 凍結保存したオルガノイドの解凍・培養

平成30年度に調製したLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドについては、ラボバンカー2 (十慈フィールド) にて凍結後マイナス80°Cにて保存したものを解凍して用いた。

[解凍および培養]

- i) 37°Cの温浴槽にて速やかに融解後、D-PBS(-)にて2回洗浄
- ii) オルガノイドとマトリゲルを混和してプレート上に滴下し固まらせ、液体培地にて培養
- iii) 上記のrasH2マウス由来オルガノイドと同様に2

~3回継代して死細胞などを除去

3) オルガノイドへの化学物質暴露

i) 被験物質と適用オルガノイド:

メタンスルホン酸エチル (EMS) ;平成30年度においてB6およびBALB/c背景*Trp53* ヘテロノックアウト・野生型マウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドに対して処置した際と同条件で比較するため、今年度のrasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドに対しても0、0.05、0.2 mM (+S9 mix 添加なし) 濃度にて暴露した。

ジエチルニトロサミン (DEN) ; rasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドに対して、0、0.2、1.0 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

アクリルアミド (AA) ; rasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドに対して、0、0.28、1.4 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

安息香酸ナトリウム (SB) ; rasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドに対して、0、5、20 mM (+S9 mix) 濃度にて暴露した。

ii) 処置:各オルガノイドに対する化学物質曝露は、3回にわたる継代時において、分散したオルガノイドを播種した2時間後に開始し、24時間後のマトリゲル重層時まで行った。なお、化学物質を添加した培地には更にS9mixを加えた(代謝活性化を要さないEMSを除く)。

iii) LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来の肺オルガノイドに対してはEMS、AA、SBにて上記濃度にて処置した。

4) オルガノイドのヌードマウス皮下への接種

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

- i) オルガノイドをマトリゲルとともに回収し、等量のマトリゲルを混和した。
- ii) イソフルランによる麻酔下にて1ウェル分のオルガノイドを背部皮下1カ所に、1匹あたり左右2カ所に接種した。

(2) ヌードマウス皮下に接種したオルガノイドから形成された組織に対する病理組織学的評価

1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価

接種8週後に熟練した技術者によりヌードマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、皮下から結節/腫瘍あるいはオルガノイド接種部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて1日固定した。常法に従い、パラフィン包埋した後、4 μmの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成

29年最終改正法律第51号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正)」を遵守した。また、「国立研究開発法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、理事長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、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、平成29年最終改正法律第41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

(1) メタンスルホン酸エチル(EMS)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドについて、EMS処置群と非処置群ともに長径2.7~5.5 mm程度の白色~乳白色透明の結節としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-1)。肝臓(胆管)オルガノイドについても、EMS処置群と非処置群ともに長径4.2~9.2 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕または透明嚢胞を含む)としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-2)。

2) 病理組織学的所見

rasH2マウス由来の肺オルガノイドのEMS高濃度処置群1/4例において、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性がみられたものの(写真2-1)有意ではなかった。肝臓(胆管)オルガノイドについても、EMS高濃度処置群2/4例において重層化/浸潤性がみられたものの(写真2-2)有意ではなかった。

(表1)

(2) ジエチルニトロサミン(DEN)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドについて、DEN処置群と非処置群ともに長径4.6~8.9 mm程度の無色透明~白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕または透明嚢胞を含む)としてみられた。rasH2マウス由来オルガノイドのDEN低濃度処置群1/4例において径8 mm程度の大型嚢胞がみられたが、

DEN処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-3)。

2) 病理組織学的所見

rasH2マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドのDEN低濃度処置群1/4例にみられた肉眼的に大型嚢胞として認められた部位において、上皮細胞の重層化と乳頭状増殖がみられ発がん性を示唆する所見と考えられたが(写真2-3)、DEN処置濃度に対応した変化ではなかった。non-Tgマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドについては、DEN高濃度処置群1/4例において重層化/浸潤性がみられたものの有意ではなかった。(表1)

(3) アクリルアミド(AA)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドについて、AA処置群と非処置群ともに長径3.5~8.0 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕を含む)としてみられ、AA処置による明らかな違いは認められなかった(写真1-4)。

2) 病理組織学的所見

rasH2マウス由来の肺オルガノイドのAA高濃度処置群2/4例において、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性がみられたものの(写真2-4)有意ではなかった。(表1)

(4) 安息香酸ナトリウム(SB)

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下におけるrasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドについて、SB処置群と非処置群ともに長径3.7~8.6 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色~黒色出血痕を含む)としてみられ、SB処置による明らかな違いは認められなかった。肝臓(胆管)オルガノイドについても、EMS処置群と非処置群ともに長径3.2~14.7 mm程度の白色~乳白色透明の結節(一部赤褐色出血痕または黒色液を容れる大型嚢胞を含む)としてみられ、EMS処置による明らかな違いは認められなかった

2) 病理組織学的所見

rasH2およびnon-Tgマウス由来の肺オルガノイドおよび肝臓(胆管)オルガノイドについて、SB処置による影響はみられなかった。

以上、rasH2マウス由来肺および肝臓(胆管)オルガノイドは遺伝毒性発がん物質の*in vitro* 処置に対して軽度の発がん感受性を示すものの、平成30年度に用いたC57BL(B6)背景あるいはBALB/c背景の*Trp53*ヘテロノックアウトマウスあるいはLSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドに比しその感受性が低いことが示された。

平成30年度の本研究課題において、被験物質により発がん性を示す病理組織学的変化にマウス系統差がみられることが明らかとなったことを受け、今年度

はrasH2マウスの正常組織由来のオルガノイドを中心に検討を進め、上記の結果を得た。昨年度は更に技術的な課題として、SBの評価を行ったBALB/c背景野生型マウス由来の肺オルガノイド、BALB/c背景 *Trp53* ヘテロノックアウトマウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドなどでは化学物質非処置群において一定頻度で上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性がみられたことを挙げた。その詳細な原因は不明であったが、マウス組織から樹立したオルガノイドを一旦凍結保存、その後融解したものを使用することをその可能性の一つとして考えていた。今年度を使用したrasH2マウスおよびnon-Tgマウス由来の肺および肝臓(胆管)オルガノイドについては凍結を経ないもののみを使用し、昨年度のSB群の化学物質非処置オルガノイドで観察されたような上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性は観察されなかった。一方、LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイドについては今年度に凍結後解凍したものの再培養を開始しており、引続き観察を続けることとする。

本分担研究課題における活動の一部として、2019年9月にフィンランド、ヘルシンキで開催されたEuroTox2019で研究成果の一部をポスター発表した。同じフロアにて肝臓オルガノイドあるいは腸管オルガノイドを使用した毒性試験、毒性機序解析の発表があり、情報交換をすることができた。本研究課題における多施設での技術共有に関しては、日本国内における毒性学分野での三次元培養法の活用・発展に寄与するものと考えている。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Machida, Y., Sudo, Y., Uchiya, N., Imai, T.: Increased susceptibility to mammary carcinogenesis and an opposite trend in endometrium in *Trp53* heterozygous knockout female mice by back-crossing the BALB/c strain onto the background C3H strain. *J. Toxicol. Pathol.* 32, 197-203 (2019)
- (2) Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based ex vivo reconstitution of *Kras*-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgz122 (2019)
- (3) Moro, H., Hattori, N., Nakamura, Y., Kimura, K., Imai, T., Maeda, M., Yashiro, M., Ushijima, T. Epigenetic priming sensitizes gastric cancer cells to irinotecan and cisplatin by restoring multiple pathways. *Gastric Cancer* 23, 116-117 (2020)
- (4) Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro*

chemical treatment. *Carcinogenesis* doi: 10.1093/carcin/bgaa011 (In press)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫, 増井亮一、中西もも、中西り、町田雪乃、成瀬美衣: BALB/c 背景 p53(+/-)マウス乳腺オルガノイドに対する DMBA の発がん作用. 第 66 回日本実験動物学会総会(2019年5月、福岡)
- (2) Imai T., Masui R, Nakanishi R, Machida Y, Ochiai M, Naruse M: *In vitro* treatment of DMBA to murine mammary tissue-derived organoids induced adenocarcinomas/squamous cell carcinomas after their subcutaneous injection to nude mice. EuroTox 2019 (2019年9月、ヘルシンキ)
- (3) 今井俊夫, 町田雪乃、落合雅子、成瀬美衣: DMBA の *in vitro* 処置により誘発されたマウス乳がんの遺伝子変異解析. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019年9月、京都)

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

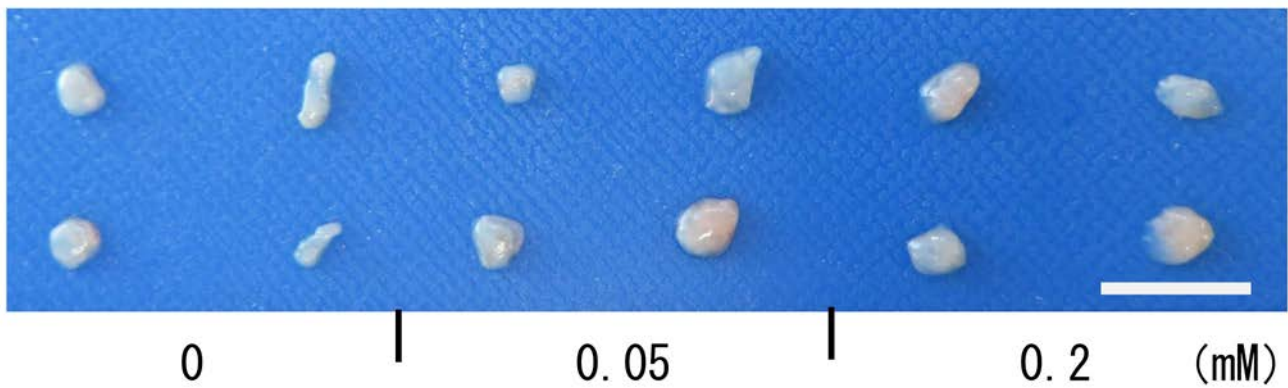
該当なし。

(表1)

マウス肺/肝由来オルガノイドに対する化学物質処置によるヌードマウス皮下での病理組織学的変化(上皮浸潤性/重層化)

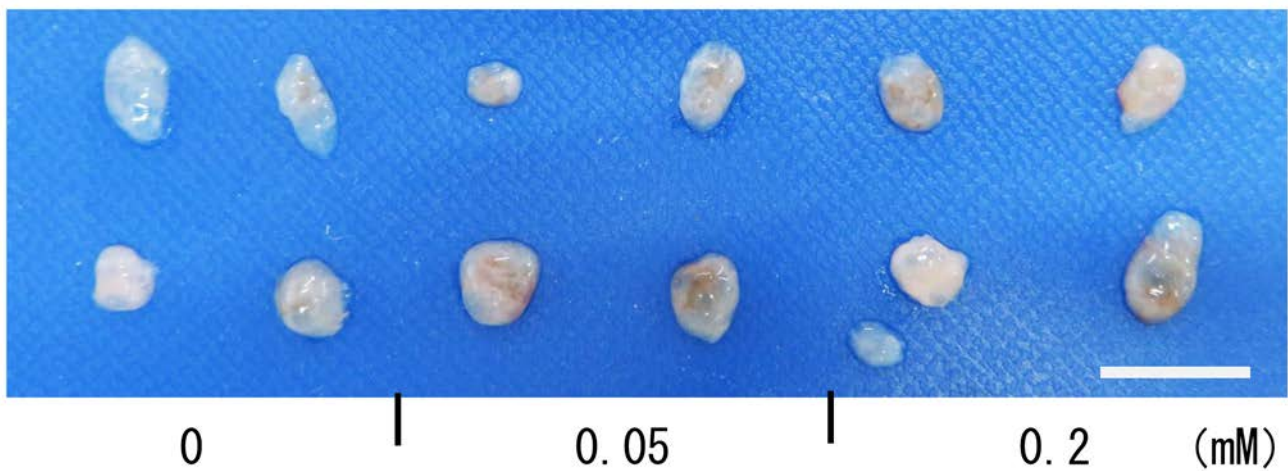
マウス系統	遺伝子型	臓器	被験物質											
			メタンサルホン酸エチル			ジエチルニトロサミン			アクリルアミド			安息香酸ナトリウム(陰性対照)		
			対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度
CB6F1	non-Tg	肺	0/4	0/4	0/4				0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	rasH2		0/4	0/4	1/4				0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4
CB6F1	non-Tg	肝	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4				0/4	0/4	0/4
	rasH2		0/4	0/4	2/4	0/4	1/4*	0/4				0/4	0/4	0/4

* 乳頭状増殖



rasH2マウス由来肺オルガノイドーEMS処置実験
Bar = 1 cm

(写真1-1) EMS処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



rasH2マウス由来肝臓 (胆管) オルガノイドーEMS処置実験
Bar = 1 cm

(写真1-2) EMS処置したrasH2マウス由来の肝臓 (胆管) オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



0 0.2 1.0 (mM)

rasH2マウス由来肝臓（胆管）オルガノイドーDEN処置実験
Bar = 1 cm

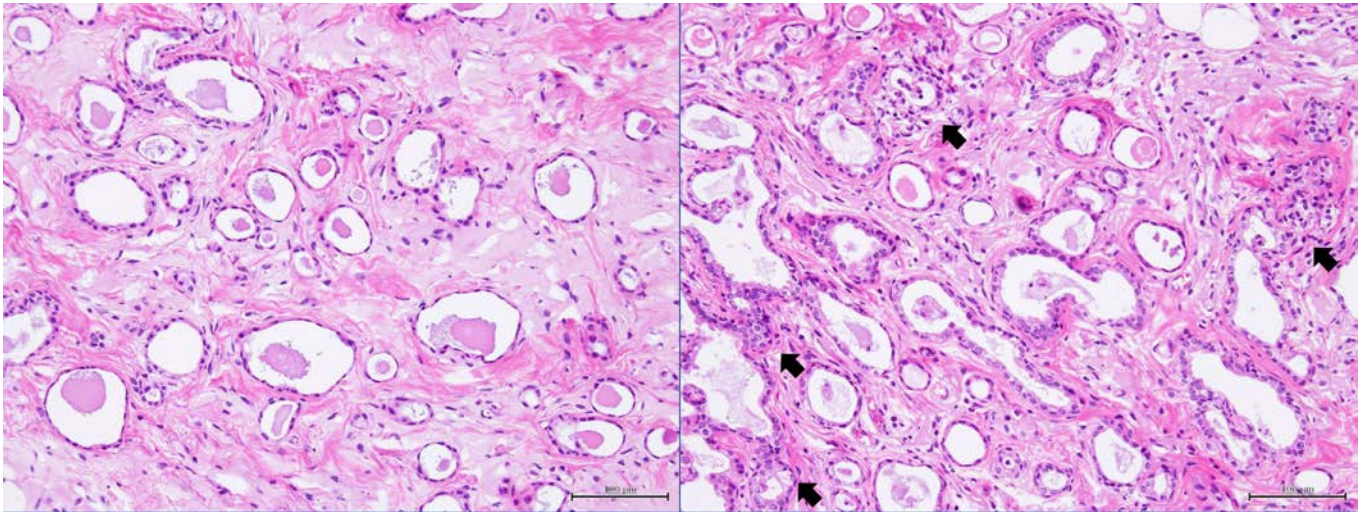
（写真1-3）DEN処置したrasH2マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



0 0.28 1.4 (mM)

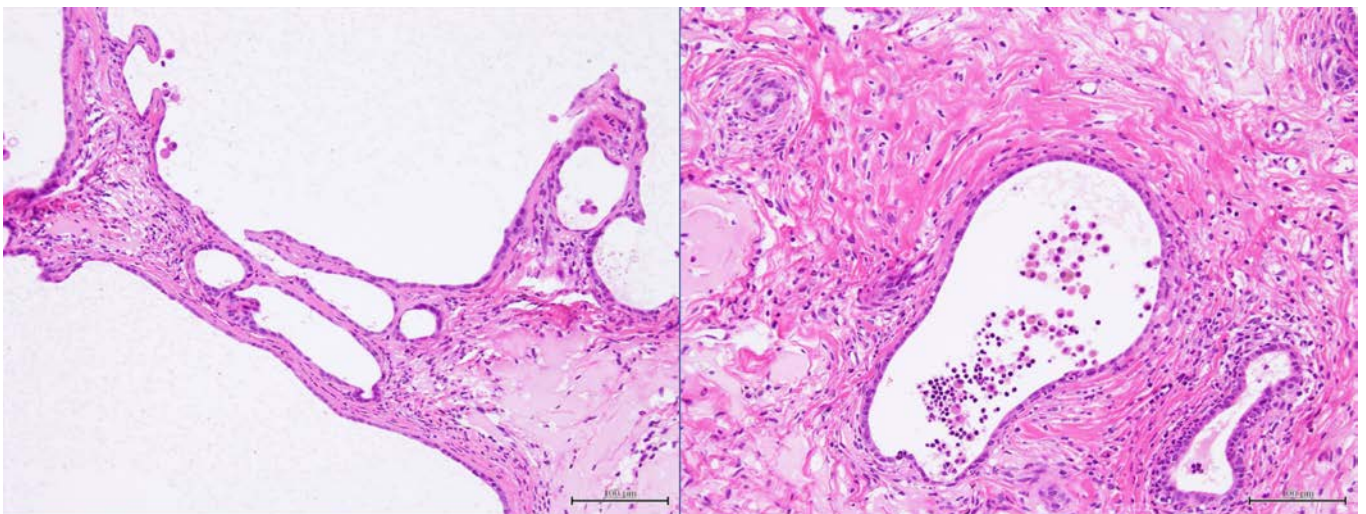
rasH2マウス由来肺オルガノイドーAA処置実験
Bar = 1 cm

（写真1-4）AA処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の肉眼像。



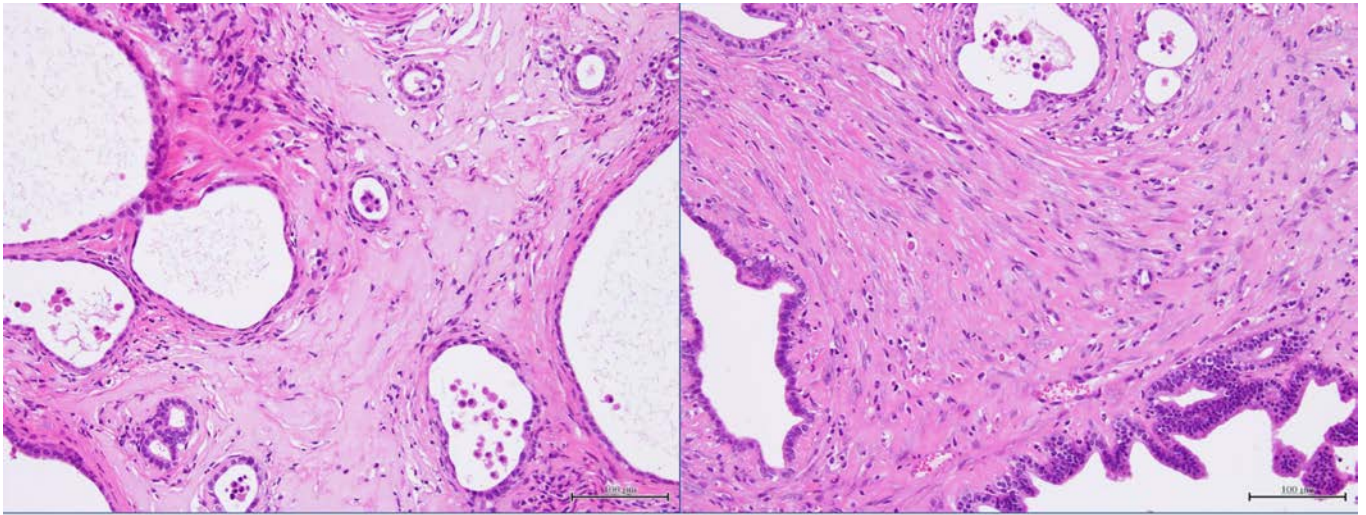
rasH2マウス由来肺オルガノイドーEMS処置実験
 (左、対照群 0 mM : 右、高濃度群 0.2 mM)
 Bar = 100 μ m

(写真2-1) EMS処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群(左)では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。EMS高濃度群(右)では上皮細胞が一部多層化し、周囲組織に浸潤する像がみられる(矢印)。



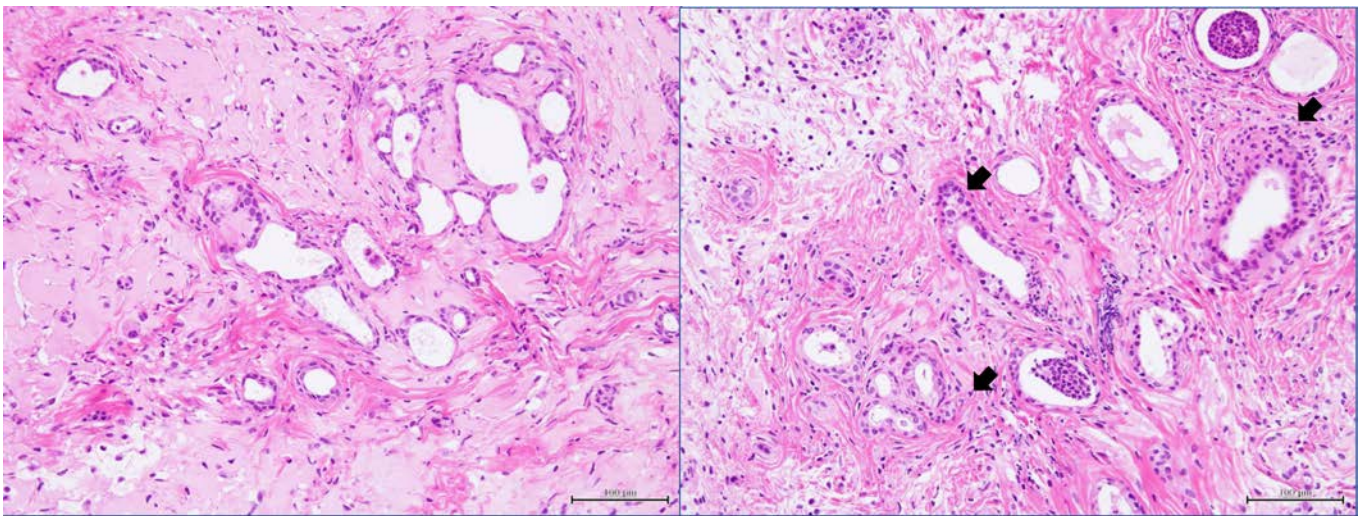
rasH2マウス由来肝臓(胆管)オルガノイドーEMS処置実験
 (左、対照群 0 mM : 右、高濃度群 0.2 mM)
 Bar = 100 μ m

(写真2-2) EMS処置したrasH2マウス由来の肝臓(胆管)オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群(左)では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。EMS高濃度群(右)では上皮細胞が一部多層化し、周囲組織に浸潤し炎症細胞が反応している像がみられる。



rasH2マウス由来肝臓（胆管）オルガノイド-DEN処置実験
 （左、対照群 0 mM : 右、低濃度群 0.2 mM）
 Bar = 100 μm

（写真2-3）DEN処置したrasH2マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群（左）では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。DEN低濃度群（右）では上皮細胞が一部多層化し、乳頭状に増殖している像がみられる。



rasH2マウス由来肺オルガノイド-AA処置実験
 （左、対照群 0 mM : 右、高濃度群 1.4 mM）
 Bar = 100 μm

（写真2-4）AA処置したrasH2マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群（左）では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。AA高濃度群（右）では上皮細胞が一部多層化し、周囲組織に浸潤する像がみられる（矢印）。