

分担研究報告書

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 研究員（非常勤）

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。令和元年度は、*rasH2*マウス、*non-Tg*マウスについては肺および肝臓（胆管）オルガノイドを新たに調製し、*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）の肺オルガノイドについては平成30年度に調製して凍結保存したものを解凍、2～3代培養・継代した。なお、分担研究者へ調整済みオルガノイドの送付する際、今年度は平成30年度に行った常温条件での輸送に加えて冷蔵条件での輸送も試みたが、一時的な冷蔵はオルガノイドにダメージを与えることが分かった。

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。今年度は、*rasH2*マウス、*non-Tg*マウスについては新たに肺および肝臓（胆管）オルガノイドの調製、および平成30年度に調製し凍結保存した*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）マウス由来の肺オルガノイドを解凍・培養して分担研究者に供給した。

B. 研究方法

CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (*rasH2*) および*non-Tg*マウス（雄、4～5週齢）各2匹を日本クレア社より購入した。1週間の順化期間後に安楽死させ、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。

肺の肺門部、肝臓の肝門部を除いて細切し、PBS(-)中で強く攪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、ピペッ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下にて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」として平成30年度に纏めたSOPの記載に従って進めた。

平成30年度に調製し、保存液（ラボバンカー2-無血清タイプ、十慈フィールド）を用いて凍結保存した*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) マウス由来の肺オルガノイドを解凍した。解凍後は*rasH2*マウス、*non-Tg*マウス由来オルガノイドと同様に培養、2~3回継代して死細胞などを除去しつつ増やした。

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または冷蔵条件下にて宅配便で他の分担研究者へ送付した。

C. 研究結果と考察

*rasH2*および*non-Tg*マウス各2匹から肺および肝臓 (胆管) オルガノイドが調製できたが、各マウス由来のオルガノイドの増殖速度や形態には個体差がみられた。増殖が速やかでかつオルガノイドの形態が球形に近く均一なものについて以降の化学物質処置実験に供した。各化学物質処置は、8~15継代目のオルガノイドを用いて開始した。

解凍後に培養を継続した*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由来の肺オルガノイドについては、死細胞を除去しつつ細胞数を増やすため2~3回程度継代し培養した。

増やしたオルガノイドの他施設への輸送に際しては、12ウェルプレートで培養中の状態から培地のみを除き、重層したマトリゲル中で維持したまま宅配便により送付する方法を採用している。今年度は平成30年度に行った常温条件での輸送に加えて冷蔵条件での輸送も試みたが、到着時のオルガノイドの形態には大きな変化は認められなかったものの、培地を添加し37℃、5%CO₂下で培養してもオルガノイドは死滅することが分かった。季節を問わず施設間のオルガノイドの輸送を可能にするため、今後は庫内を37℃程度に維持できる輸送箱の準備を進める必要があると考えられた。

(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) 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)
- (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)
- (3) 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) 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)
- (2) 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

なし

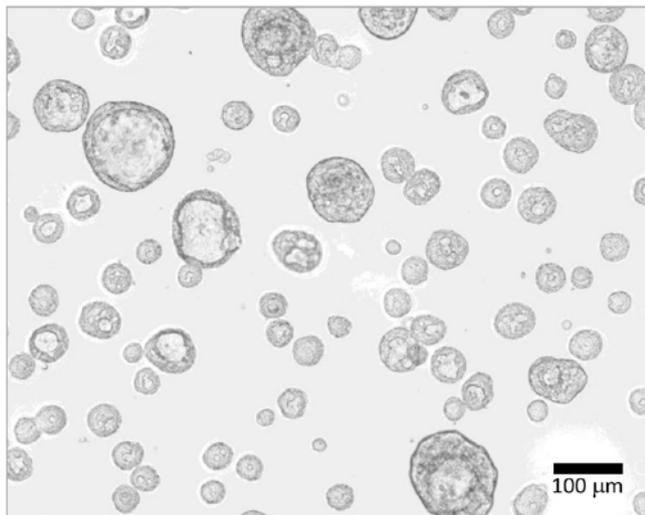
2. 実用新案登録

なし

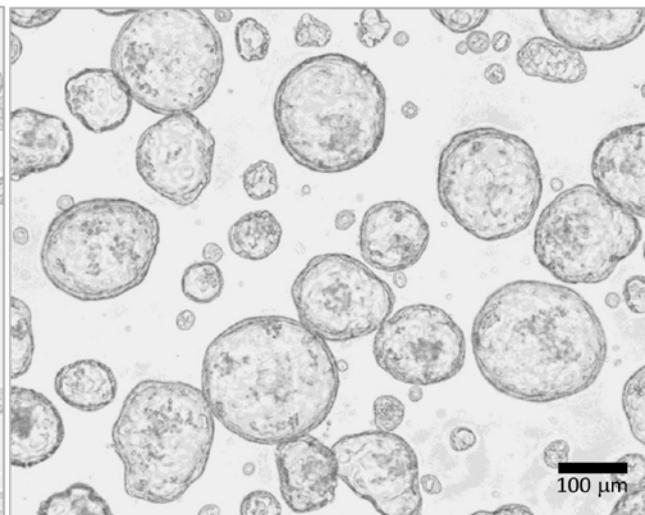
3. その他

なし

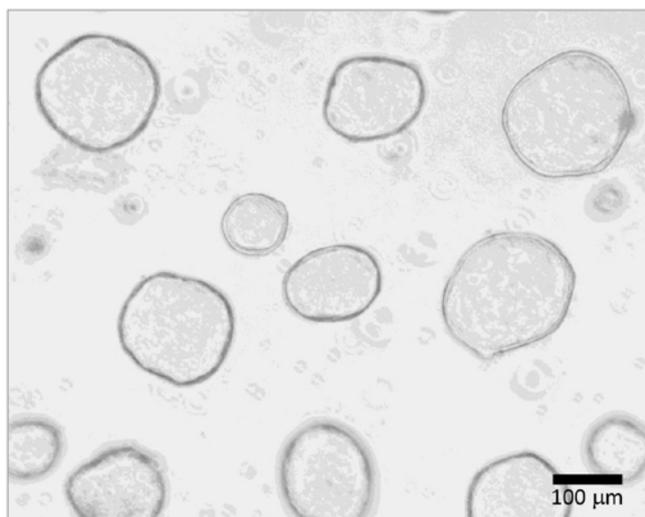
(写真) rasH2マウス、non-Tgマウス由来オルガノイド



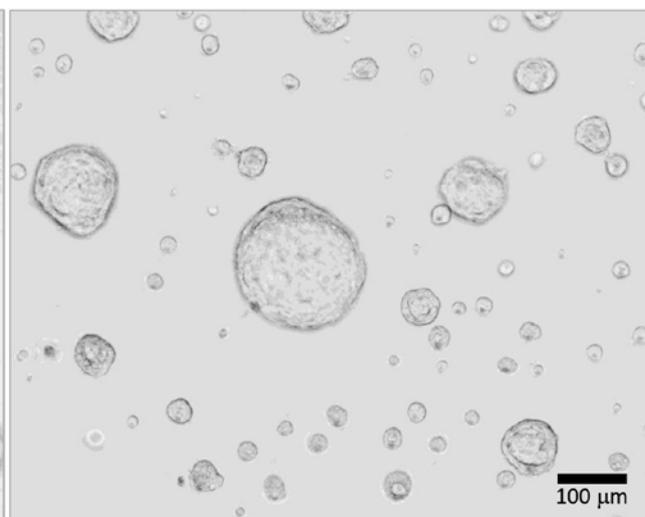
rasH2マウス由来肺オルガノイド
(EMS実験 - 対照 0 mM)



non-Tgマウス由来肺オルガノイド
(EMS実験 - 対照 0 mM)



rasH2マウス由来肝臓 (胆管) オルガノイド
(EMS実験 - 対照 0 mM)



non-Tgマウス由来肝臓 (胆管) オルガノイド
(SB実験 - 対照 0 mM)