

オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備

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。昨年度は、発がんの非標的臓器である肝臓由来の胆管系のオルガノイドを作成し、PhIPの遺伝毒性を解析したところ、変異頻度の上昇が観察された。PhIPの発がん標的臓器である大腸に比べると、胆管系オルガノイドでの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。今年度は、同様に作成した肺オルガノイドに、加熱食品中に含まれるアクリルアミド(AA)を0, 0.28, 1.4 mMの濃度、S9mix存在下で曝露したところ、高用量曝露群において形態変化が観察されたことから、AAに曝露した肺オルガノイドのDNAを常法に則って回収し、*gpt*遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。その結果、AAの濃度依存的に変異頻度が上昇する傾向が見られた。今後は、肺オルガノイドのAAに対する変異スペクトルを解析し、*in vivo*試験結果との比較を行うことにより、本試験系の妥当性の検討を行う予定である。

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、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AAを曝露し、変異原性試験を行い、当試験の妥当性についてさらなる検討を行った。

B. 研究方法

① 肺オルガノイドへの被験物質の曝露
昨年度、*gpt delta*マウスより樹立した肺オルガノイドを用い、継代のタイミングでセルカウントし、12wellプレートへ 1.0×10^5 /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。

② *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AA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 λ 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、 λ 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°C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。

C. 研究結果

①肺オルガノイドへの被験物質の曝露
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、1.4 mMで形態変化が表れた。曝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、0 mM、0.28 mM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、1.4 mM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1)。しかし、変異原性試験用に2回の継代をすると、1.4 mMで見られた形態変化したオルガノイドの数が減少した。

③ *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験
常法に則って肺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、AA曝露によって変異頻度は0 mMと比べて0.28 mM (n=3)でおよそ2倍、1.4 mM (n=3)で約8倍と増加傾向が見られた(図2)。

(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、3Rの原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

図1 肺オルガノイドの形態変化

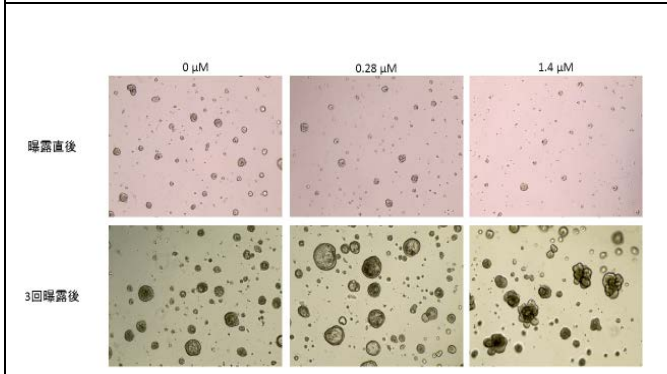
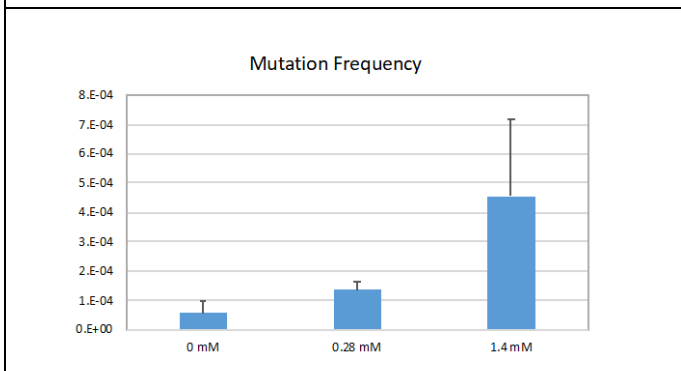


図2 肺オルガノイドを用いたAAの遺伝子変異原性試験



D. 研究発表

1. 論文発表

1. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review., *Mutation Res*, 2020, Feb - Mar;850-851:503148.
2. 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*. 2019 Nov;847:403022.
3. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 2019 Aug 19; 32 (8): 1515-1527.
4. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 2019

Sep 20; 34 (3): 279-287.

5. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20.
2. 学会発表
 1. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
 2. Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
 3. Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
 4. Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム。(京都、2019年9月)
 5. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Oractice of Cancer Prevention and Control (石家庄、2019年7月)
 6. Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
 7. 戸塚ゆ加里 ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 —JRC 会議に参加して— MMS 定例会 (京都、2019年6月)
 8. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 日本毒性学会シンポジウム (徳島、2019年6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