

## 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 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検討では、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、継代培養後に披験物質（アクリルアミド）を曝露した試料を用い遺伝子突然変異試験を実施することで、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とした。

## 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、昨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、細胞を凍結保存した。本年度は、凍結試料からDNAを抽出し、

パッケージング操作およびコロニー数のカウントを行った。

## 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  $\mu$ L/wellの細胞懸濁液（d0培地、 $30.77 \times 10^4$  個/mL）を播種し、そこへS9 mix（50  $\mu$ g 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  $\mu$ L加えた。翌日、培地を回収しPBS（1 mL/well）で洗浄後、70  $\mu$ L/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）。

オルガノイドからのDNA抽出はRecoverEase DNA Isolation Kit（Agilent）を用いて行った。-80°Cで保存していたオルガノイドを lysis buffer 5 mLに懸濁した。Cell strainer を装着した50 mL tube に細胞懸濁液を移し、lysis buffer 3 mLで共洗ひした。遠心分離（4°C、4,500 rpm、20分）、上清を除去後、50 mL tube を逆さにして水分を除去した。さらに、付属の滅菌綿棒を用いて tube 内壁の水分を除いた。Digest solution（digestion buffer 98  $\mu$ L、Rnase-It cocktail 2  $\mu$ L/サンプル）を調製し、ペレットを剥がすように、digest solution 70  $\mu$ Lを添加した。50°Cのウォーターバスで45 min 反応させ、ペレットを溶解させた。反

応終了後、1×TE 300 μLを添加し、透析チューブにサンプルを移した。透析チューブに蓋をし、1×TE 500 mLに対し室温で72時間透析した。透析後、ワイドボアピペットチップを用いてDNA溶液を回収後、変異頻度の解析を行った。

*gpt*変異解析に使用した菌株は、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部の杉山圭一先生に分与頂いた。

20% (w/v) maltose 50 μL, kanamycin (25 mg/mL) 5 μLを加えたLB培地 5 mLにYG6020を植菌した。37°Cで一晩振盪培養後、滅菌グリセロールを900 μL加え、ボルテックスした。調製したストックを超低温用のバイアルに移し、-80°Cで凍結した。

試験前日に、LB培地 2 mL、20% (w/v) maltose 20 μL, kanamycin (25 mg/mL) 2 μL, YG6020 (グリセロールストック)を加え、37°Cで一晩振盪培養した。また、6-TG (-) plate、6-TG (+) plateをそれぞれ作製した。Bacto agar 6 gをMQ-water 360 mLに添加し、オートクレーブした。そこに、10×M9 salt (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 128 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 g, NaCl 10 gをMQ-waterに溶解し、1 Lに調製) 40 mL、50% (w/v) glycerol 8 mL、1M MgSO<sub>4</sub> 800 μL、1M CaCl<sub>2</sub> 40 μL、1% (w/v) thiamine 200 μL, amino acids (10 mg/mLプロリン、ロイシン、イソロイシン) 1.6 mL、chloramphenicol (25 mg/mL) 400 μLを加え、プレートに25 mLずつ分注し、6-TG (-) plateを作製した。また、Bacto agar 10.5 gをMQ-water 630 mLに添加し、オートクレーブした。そこに、10×M9 salt 70 mL、50% (w/v) glycerol 14 mL、1M MgSO<sub>4</sub> 1.4 mL、1M CaCl<sub>2</sub> 70 μL、1% (w/v) thiamine 350 μL, amino acids 2.8 mL, chloramphenicol (25 mg/mL) 700 μL、6-thioguanine (25 mg/mL) 700 μLを加え、プレートに25 mLずつ分注し、6-TG (+) plateを作製した。

試験当日、LB培地 16.8 mL、20% (w/v) maltose 168 μL, kanamycin (25 mg/mL) 16.8 μL、前培養菌液420 μLを加え、振盪培養した。

*In vitro*パッケージングは Transpack Packaging Extract (Agilent) を用いて行った。Packaging kit の red tube に、抽出したDNA 10 μLを添加し、37°Cで90分反応させた。反応終了後、Blue tube のファージ12 μLを red tubeに添加、ピペッティングし、37°Cで90分反応させた。反応終了後、SM buffer (NaCl 0.29 g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1 g, 1 M Tris-HCl 2.5 mL、2%ゼラチン溶液 0.25 mLをMQ-water 50 mLにメスアップ) 268 μLを添加、ボルテックスした。LB培地 198 μLに 1M MgSO<sub>4</sub> 1.98 μL, packaging 液 2 μLを加え、1/100 packaging 液を調製した。

振盪培養している菌液の濁度が OD<sub>600</sub>=1.0 になり次第、50 mL tube に回収し、遠心 (4°C、4,000 rpm、

10分)、上清を除去後、LB培地 8.4 mL、20% (w/v) maltose 84 μL, kanamycin (25 mg/mL) 8.4 μLを加え、菌液を調製した。

1サンプルあたり7本の15 mL tube を用意し、菌液を200 μLずつ分注した。7本中2本を 6-TG(-) とし、1/100 packaging 液を10 μL添加した。残りの5本を6-TG(+) とし、packaging 液を60 μl 添加した。37°Cで20分静置後、37°Cで30分振盪した。

6-TG(-) としたサンプルに、6-TG(-) soft agar (Bacto agar 0.6 g, NaCl 0.6 g にMQ-water 100 mLを加えオートクレーブ) 2.5 mLを加え、ボルテックス後、6-TG (-) plate に重層した。6-TG(+) としたサンプルに、6-TG(+) soft agar (Bacto agar 0.6 g, NaCl 0.6 g, にMQ-water 100 mLを加えオートクレーブ後、25mg/mL 6-thioguanine 100 μL を添加) 2.5 mLを加え、ボルテックス後、6-TG (+) plate に重層した。Soft agar が固まったら、転置し37°Cで4日間培養した。

各 plate に出現したコロニーをカウントし、6-TG (+) plate に生えたコロニーを confirmation した。1/15 M Na-K buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.57 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.82 gをMQ-water に溶解し、pH 7.4に調製後1 Lにメスアップ) 50 μl を 96 well plate に分注した。滅菌爪楊枝で6-TG (+) plate に生えたコロニーを掻き取り、分注した1/15 M Na/K buffer で洗浄後、6-TG (+) plate、6-TG (-) plate の順にストリークした。ストリークした plate は 37°C で4日間培養し、コロニーの有無を確認した。

## C. 研究結果

RecoverEase DNA Isolation Kitを用いて、アクリルアミドを曝露した*gpt delta*マウス肺オルガノイドのDNA抽出を行った。DNA濃度の測定結果は下記 (Table 1) のとおり。

Table 1 オルガノイドDNA抽出の結果

sample	A260	A260/A280	濃度(ng/ul)
control_1	0.21	1.64	103.5
control_2	0.30	1.65	150.0
control_3	0.13	1.67	62.5
0.28 mM アクリルアミド_1	0.20	1.76	99.5
0.28 mM アクリルアミド_2	0.24	1.69	119.0
0.28 mM アクリルアミド_3	0.19	1.79	96.5
1.4 mM アクリルアミド_1	0.31	1.73	157.0
1.4 mM アクリルアミド_2	0.29	1.70	147.0
1.4 mM アクリルアミド_3	0.17	1.76	83.5

次に、Transpack Packaging Extractを用いて*in vitro*パッケージングを行い、*gpt assay*を実施した。一回

目の試験の結果、6-TG(-) plate・6-TG(+) plate上に生育したコロニーが薄く、生育異常がみられた(図1左側)。そこで、グリセロールストックの再調製を行った。

20% (w/v) maltose 50  $\mu$ L、Kanamycin (25 mg/mL) 5  $\mu$ L を加えたLB培地 5 mLにYG6020を植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。菌液を50 ml tube に回収し、遠心(4°C、4,000 rpm、10分)、上清を除去後、kanamycin含有プレートに塗布した。37°Cで一晩培養後、独立したコロニーを釣菌し、20% (w/v) maltose 50  $\mu$ L、kanamycin (25 mg/mL) 5  $\mu$ Lを加えたLB培地 5 mLに植菌した。37°Cで一晩振盪培養後、滅菌グリセロールを900  $\mu$ L加え、ボルテックスした。調製したストックを超低温用のバイアルに移し、-80°Cで凍結した。

新しく調製したグリセロールストックを用いて二回目のgpt assayを実施した結果、生育阻害は見られなかった(図1右側)。

現在までに三回の試験を終えたが、突然変異の検出に十分な数の変異コロニーは得られていない。今後も試験を継続し、突然変異の検出を試みる。

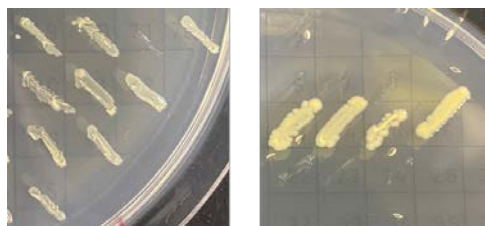


図1 Confirmation後のコロニー

(左：グリセロールストック再調製前、右：グリセロールストック再調製後)

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Intestinal microbial metabolite stercobilin involvement in the chronic inflammation of *ob/ob* mice. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 6479.

Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, Miura S.  $\beta$ -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2020) in press

Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, Ohashi N. Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota. *Nat. Prod. Commun.* (2020) in press

Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, Miyoshi N. Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-A<sup>y</sup> mice. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 5681.

Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of *Escherichia coli* strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms. *Genes and Environment*, (2020) **42**, 11.

Sarmales-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, Watanabe K. Novel class of dimeric product isolated from the fungus *Chaetomium globosum*: Evaluation of chemical structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, (2020) **73**, 320-323.

Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K. Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss. *J Nutr Biochem.*, (2020) **75**, 108247.

Kawanishi M, Hisatomi Y, Oda Y, Shimohara C, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M, Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. *J Toxicol Sci.*, (2019) **44**, 871-876.

Hirayama Y, Tsunematsu Y, Yoshikawa Y, Tamafune R, Matsuzaki N, Iwashita Y, Ohnishi I, Tanioka F, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Activity-based probe for screening of high-colibactin producers from clinical samples. *Org Lett.*, (2019) **21**, 4490-4494.

Shimba Y, Togawa H, Senoo N, Ikeda M, Miyoshi N, Morita A, Miura S. Skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  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) **93**, 753-764.

### 2. 学会発表

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：NASH - 肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析、第73回日本栄養・食糧学会大会(静岡)、2019年

5/17-19

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：NASH - 肝発がんモデルマウスの糞便中揮発性化合物による発がんバイオマーカー探索、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

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、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之：メタボローム解析による膀胱発がん性芳香族アミン化合物の活性代謝物の解明、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

恒松雄太、吉川悠子、三好規之、武藤倫弘、山地太樹、張萌琳、岩崎基、松田尚久、細見晃司、國澤純、若林敬二、石川秀樹、渡辺賢二：大腸発がんリスク因子コリバクチンの生産性を制御する要因の解明、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

佐藤道大、平山裕一郎、恒松雄太、東口ふみ、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：遺伝毒性物質コリバクチン生産菌の高感度多検体検出法の確立、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

吉川悠子、平山裕一郎、松崎信生、東口ふみ、恒松雄太、佐藤道大、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：大腸がん患者から分離した遺伝毒性物質コリバクチン合成遺伝子陽性大腸菌の解析、第26回日本がん予防学会（札幌）、2019年6/28-29

渡辺賢二、恒松雄太、平山裕一郎、東口ふみ、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、武藤倫弘、石川秀樹、若林敬二：大腸がんリスク因子コリバクチン産生菌の増殖抑制を目的としたパイロット介入試験、第26回日本がん予防学会（札幌）、

2019年6/28-29

Yuya Tajima, Takeshi Toyoda, Yuichiro Hirayama, Tsutomu Hashidume, Kohei Matsushita, Kumiko Ogawa, Kenji Watanabe, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Noriyuki Miyoshi : Analysis of urinary bladder carcinogen o-toluidine metabolites forming DNA adduct, ACEM/JEMS2019 (Tokyo)、2019/11/18-20

Ai Ueshima, Yuuta Hisatomi, Yoshimitsu Oda, Yuta Tsunematsu, Michio Sato, Yuichiro Hirayama, Noriyuki Miyoshi, Yuji Iwashita, Yuko Yoshikawa, Haruhiko Sugimura, Takashi Yagi, Keiji Wakabayashi, Kenji Watanabe, Masanobu Kawanishi : Genotoxicity of colibactin-producing E. coli isolated from Japanese colorectal cancer patient, ACEM/JEMS2019 (Tokyo)、2019/11/18-20

Mai Kato, Tsutomu Hashidume, Yutaka Shoji, Kumiko Shoji, Miki Igarashi, Sumio Hayakawa, Yuko Yoshikawa, Noriyuki Miyoshi : Analysis of fecal gaseous metabolites in NASH-hepatocellular carcinoma model mice、ICoFF2019 (Kobe)、2019/12/1-5

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