

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

本分担研究課題の目的は、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である。本年度は、①施設間でのオルガノイドの最適な輸送方法を確立するため、輸送時の温度変化がオルガノイドに及ぼす影響を検討するとともに、②肺由来オルガノイドにアクリルアミドを処置し、処置後の形態変化およびヌードマウスにおける造腫瘍性を解析した。①については、冷蔵状態でのオルガノイドの輸送を試みたが、輸送後の培養時に立体構造が崩壊することが明らかになった。また、実験的にCO₂非制御下（CO₂インキュベーターの庫外）に18時間放置した場合、低温でインキュベートするとオルガノイドの崩壊が観察された。一方、37°Cに近い温度で維持すれば、オルガノイドの立体構造に大きな影響は見られなかった。②については、野生型マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド（0、0.28、1.4mM）を3回処置し、病理組織学的にオルガノイドの形態変化を解析したところ、アクリルアミド処置後、オルガノイドの壁の重層化が観察された。高濃度処置後のオルガノイドにおいては、重度の重層化が認められ、内腔内に突出して増殖している像も観察された。一方、アクリルアミド処置後のオルガノイドをヌードマウスの皮下に接種し、8週間観察したところ、明瞭な腫瘍の形成は見られなかった。以上より、①オルガノイドは、培養条件に近い温度で輸送することが望ましく、また、②化学物質投与後の形態変化の観察が発がん性の評価に有用である可能性が示唆された。

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に対策が必要である。

昨年度、本分担研究課題において、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研究分担者の所属施設（岐阜大学）に常温で輸送し、培養・継代できることを明らかにした。一方で、国内の気温の変動を考えると、季節を問わない安定した輸送方法が求められる。そこで、今年度は、安定したオルガノイドの輸送方法を確立することを目的として、実際に冷蔵での輸送を行うとともに、輸送中の温度変化がオルガノイドに及ぼす影響について実験的に検討した。

さらに、今年度は、輸送したオルガノイドを用いて化学物質の評価を行なった際に分与元の施設と同じ評価結果が得られるかを検討するために、マウスに肺発がん性を示すアクリルアミドでオルガノイドを処置し、ヌードマウスに皮下移植した際の造腫瘍性を評価した。また、アクリルアミド処置後のオルガノイドの形態変化を病理組織学的に解析した。

B. 研究方法

① 輸送時の温度条件がオルガノイドに及ぼす影響の検討

①-1. 冷蔵輸送がオルガノイドに及ぼす影響の解析

国立がん研究センターにて調製されたマウス肺由来オルガノイドを継代2日後に岐阜大学に輸送した。オルガノイドはマトリゲル内に包埋され、液体培地を抜いた状態で、冷蔵または常温にて輸送した。輸送に要した時間はおよそ18時間であった。到着後、マトリゲル上に液体培地を添加し、その後の成長および継代の可否について検討した。

①-2. 温度変化がオルガノイドに及ぼす影響の解析

マウス肺由来オルガノイドを継代後3あるいは9日目にCO₂濃度非制御下(外気)で4℃あるいは36℃で液体培地を抜いた状態で18時間放置し、その後、通常条件(37℃、CO₂濃度5.0%)で培養を行ない、継代後11日目で観察した。継代後9日目のオルガノイドはコンフルエントの状態であった。4℃の維持は冷蔵庫内で行い、36℃の維持は細胞株の輸送に用いられるiP-Tec潜熱蓄熱材-36(株式会社サンブラテック)を用いて行なった。通常条件(37℃、CO₂濃度5.0%)で培養を続けたオルガノイドを対照とした。

② アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの解析

野生型マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド(0, 0.28, 1.4mM)を3回処置し、オルガノイドを増殖させた後、オルガノイドの病理組織学的解析およびヌードマウスにおける造腫瘍性の検討を行なった。

②-1. 病理組織学的解析

iPGell(ジェノスタッフ社)を用いてオルガノイドを集め、定法に従い、パラフィン包埋切片を作製し、H&E染色を施し観察した。

②-1. ヌードマウスにおける造腫瘍性の検討

ヌードマウスの腹側部皮下に、マトリゲルと混和したオルガノイドを接種した。接種後、8週間飼育した。さらに、接種部位の組織を病理組織学的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、本学の動物実験委員会の承認を得た後に実施し、飼育、実験に際し、実験動物に対する動物愛護について十分に配慮した。

C. 研究結果

① 輸送時の温度条件がオルガノイドに及ぼす影響の検討

①-1. 輸送時の温度条件がオルガノイドに及ぼす影響の検討(図1)

常温で輸送されたオルガノイドはrasH2、non-Tgともに正常に成長し、到着5日目に継代が可能であった。

一方冷蔵で輸送されたオルガノイドはrasH2、non-Tgともに到着時に形態的な変化は観察されなかったが、到着2日後にはほぼすべてのオルガノイドが崩壊してシート状を呈し、継代は不可能であった。したがって、冷蔵輸送はオルガノイドの輸送には適さないことが明らかとなった。

①-2. 温度変化がオルガノイドに及ぼす影響の解析(図2)

継代後3あるいは9日目に4℃条件下に置いた場合、崩壊したオルガノイド観察された。一方、36℃条件下に置いた場合、オルガノイドは立体構造をよく保っていた。したがって、今回用いた保温器具等を用いて、通常培養時との温度変化を少なくして輸送することが有効と考えられた。

② アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの解析

②-1. 病理組織学的解析(図3)

アクリルアミド処置後、オルガノイドの壁の重層化が観察された。濃度依存的に形態変化を示すオルガノイドの頻度が増加し、かつ形態変化も重度となった。高濃度処置後のオルガノイドにおいては、高度な重層化に加え、内腔内に突出する像も観察された。以上より、化学物質投与後のオルガノイドの形態変化の観察が発がん性の評価に有用である可能性が示唆された。今後、他の発がん性物質でも同様の変化が誘導されるか検討していく必要がある。

②-1. ヌードマウスにおける造腫瘍性の検討(図4・図5)

皮下接種8週間後には、肉眼的に明らかな腫瘍形成は認められなかった。組織学的解析では、接種部位においてオルガノイドが観察された(図5)。また、この結果は、オルガノイドの提供元である国立がん研究センターで行われた結果と一致していた。したがって、輸送したオルガノイドを用いて、分与先でも同じ試験結果が得られることが示された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) [Hirata A](#), Hatano Y, Niwa M, Hara A, and Tomita H. Heterogeneity in Colorectal Cancer Stem Cells. *Cancer Prev. Res.* 12(7), 413-420, 2019. Review
- (2) [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.
- (3) [Hirata A*](#), Kaneko A, Sakai H, Nakamura S, Yanai T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J. T-cell/Histiocyte-rich Large B-cell Lymphoma of the Larynx in a Juvenile Japanese Macaque (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Pathol.* 169, 1-4, 2019
- (4) Kanayama T, Tomita H, Binh NH, Hatano Y, Aoki H,

- Okada H, Hirata A, Fujihara Y, Kunisada T, and Hara A. Characterization of a BAC transgenic mouse expressing *Krt19*-driven iCre recombinase in its digestive organs. *PLoS One* 14(8):e0220818. 2019
- (5) Goto M, Hirata A, Murakami M, and Sakai H. Trimer of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand induces apoptosis in canine mammary tumor cells. *J. Vet. Med. Sci.* 81(12), 1791-1803, 2019
- (6) Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare *RELN* deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. *Schizophrenia Res. in press*
- (7) Nakashima T, Kato K, Hatano Y, Hirata A, Okada H, Shibata T, Hara A. Specific deletion of p16^{INK4a} with retention of p19^{ARF} enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol. in press*
- (8) Tashita C, Hoshi M, Hirata A, Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K. Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *World J. Gastroenterol.* 7;26(9):918-932. 2020
- (9) Kurihara T, Hirata A, Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T. Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (*Phalacrocorax capillatus*). *J. Vet. Med. Sci. in press*
2. 学会発表
- (1) 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫：マウス正常組織由来オルガノイドの施設間輸送の最適条件の検討. 第 36 回日本毒性病理学会 (2020 年 2 月、東京)
- 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。

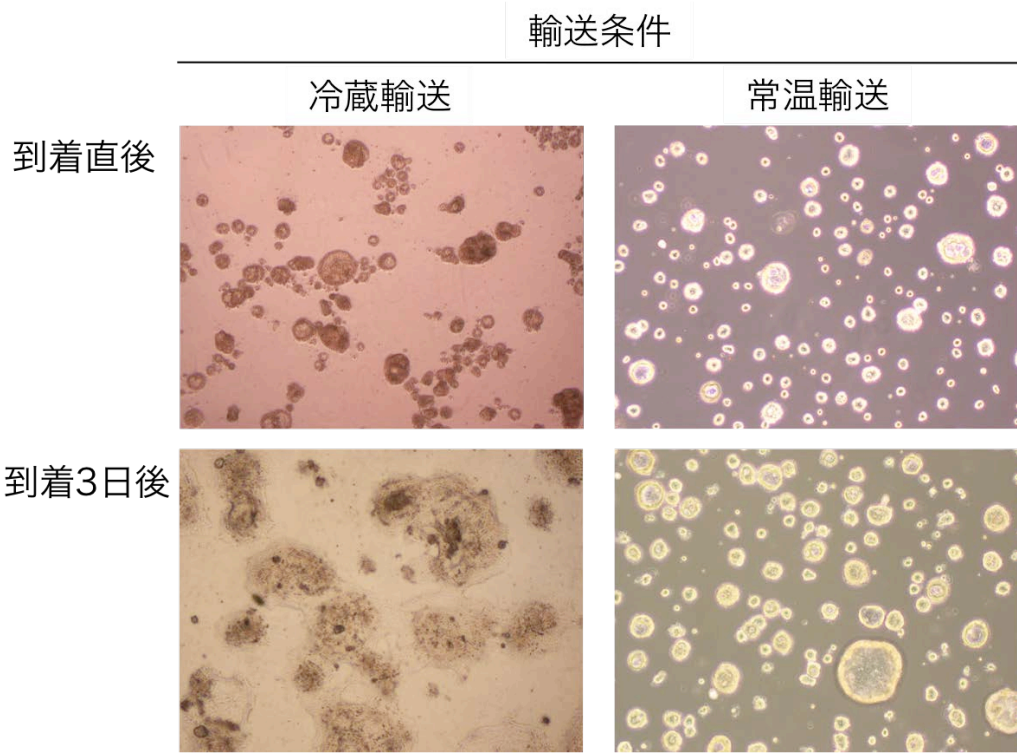


図1. 冷蔵輸送時と常温輸送時のオルガノイドの比較

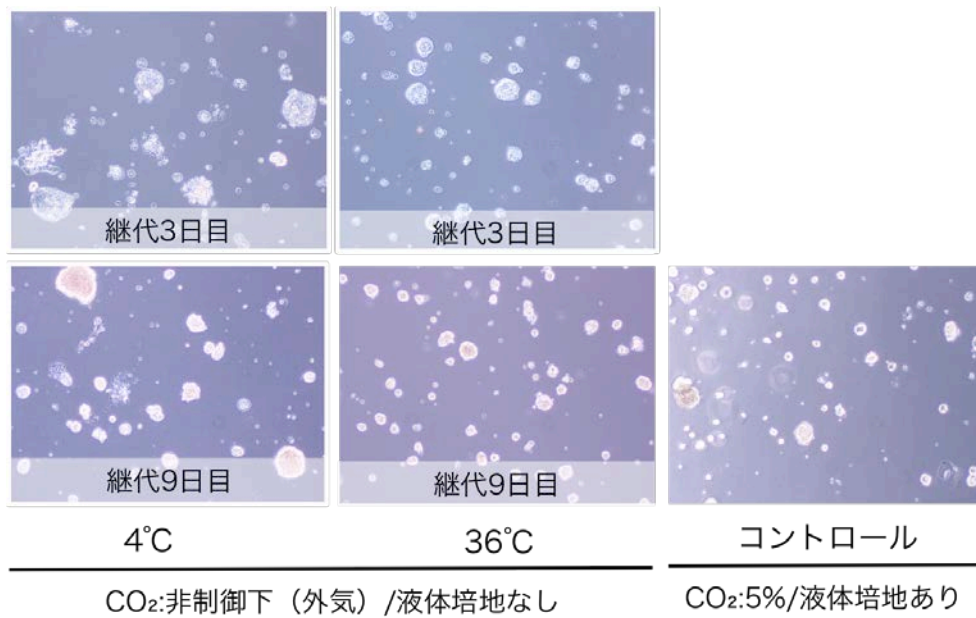


図2. 温度変化がオルガノイドに及ぼす影響

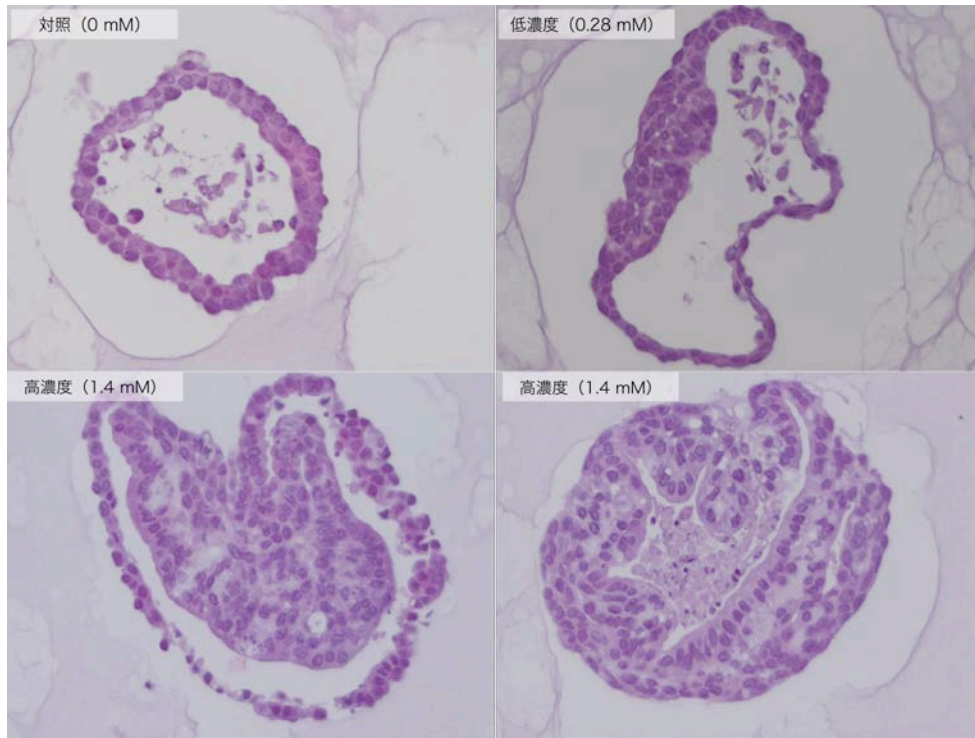


図3.アクリルアミド処置後のオルガノイドの形態変化



図4.アクリルアミド処置後のオルガノイドのヌードマウスにおける造腫瘍性の検討
(上段：ヌードマウス、下段：接種部組織)

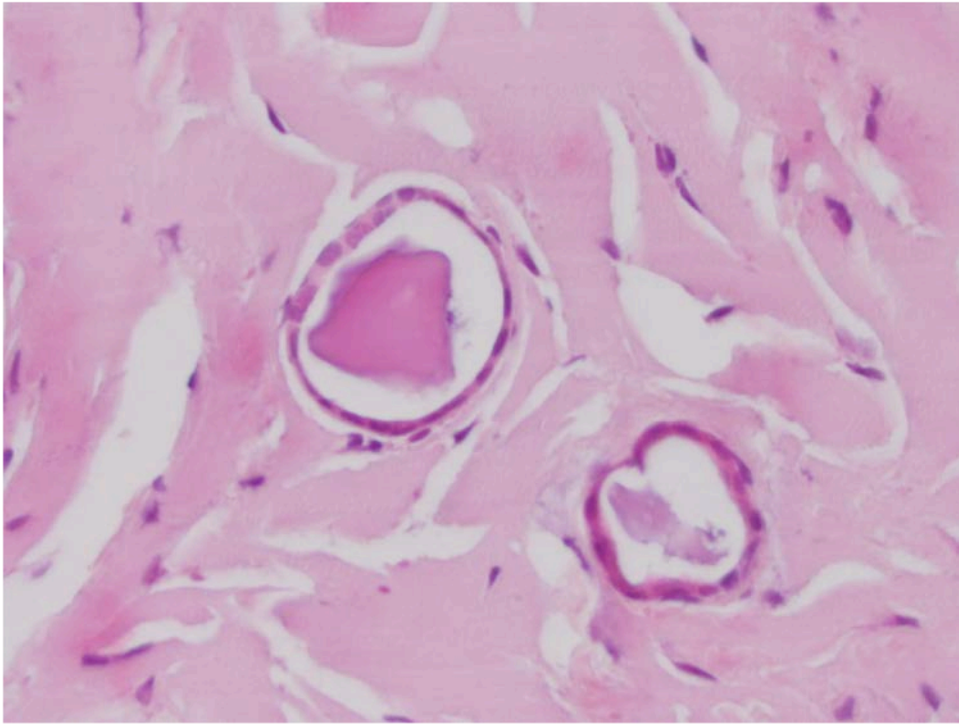


図5.ヌードマウス接種部の病理組織学的解析