

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

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成28(2016)年 5月

目 次

I . 総括研究報告		
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	-----	1
今井俊夫		
II . 分担研究報告		
1 . オルガノイド皮下移植系の病理学的評価	-----	7
今井俊夫		
2 . 3次元オルガノイド培養を用いたin vitroでの化学発がん研究	-----	13
筆宝義隆		
3 . オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究	-----	17
戸塚ゆ加里		
4 . オルガノイド皮下移植系実験	-----	21
落合雅子		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	27

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）
総括研究報告書

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

研究代表者 今井 俊夫
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

研究要旨

本研究は、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変化を加え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標としている。これまでは、マウス正常器官・組織を用いて、主に小腸や大腸、肺などのオルガノイド調製法の検討を行ってきた。今年度の本研究課題においては、大腸のオルガノイドに対しレンチウイルスを用いて種々のがん関連遺伝子発現の変化させることによる発がんへの影響を解析するとともに、大腸については2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)、肺については4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の発がん性を検討した。その結果、PhIPについては発がん性が確認され、NNKについては検証を継続している。遺伝毒性については、*gpt delta*マウス由来の肝臓及び膀胱のオルガノイドについて、背景データとしてのspontaneousな変異頻度について解析した。その結果、肝臓由来のオルガノイドにおける変異頻度は、肝臓組織から直接ゲノムDNAを抽出した場合の変異頻度と同程度であることを確認した。一方、膀胱由来の細胞は肝臓と同じ培養条件では殆ど増殖せず、引続きの条件検討を要する。また、オルガノイドを用いる試験法については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を生じさせない対策が必要であり、結果に重大な影響を及ぼす培養条件を明らかにする目的で、異なる条件下で調製したオルガノイドについて基盤的なデータを蓄積している。今年度は、4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓（胆管）由来のオルガノイドと*gpt delta*雄マウスの肺由来のオルガノイドについて発現遺伝子を比較した結果、前者では化学物質代謝に関連するCypファミリーやUDPGTファミリー関連遺伝子のほか、発がん進展に関連するとの報告があるtrefoil factor 2の発現において、後者では化学物質代謝に関連するN-acetyltransferase 1などの発現に週齢差がみられたことから、オルガノイド調製のためのマウスからの組織採取時期に注意を要することが示された。

研究分担者

今井俊夫・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・動物実験部門長

筆宝義隆・千葉県がんセンター・研究所・発がん制御研究部長

戸塚ゆ加里・国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

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・主任研究員

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が、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り、本研究課題においては、結果に重大な影響を及ぼす培養条件を明らかにする目的で、異なる条件下で調製したオルガノイドについて基盤的なデータ蓄積も併せて行う。

B. 研究方法

(1) C57BL/6Jマウスを用いるオルガノイドの調製とヌードマウス皮下移植による造腫瘍性の確認

1) 大腸、肺及び膀胱由来のオルガノイドの調製
C57BL/6J(B6J)マウス(野生型またはLSL-*Kras*^{G12D})の肺、大腸及び膀胱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]

-) 肺、大腸、膀胱摘出、細切、酵素処理
-) マトリゲル上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

-) 液体培地を除きマトリゲルを重層
-) 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)]

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

[レンチウイルスによる遺伝子導入]

-) B6Jマウス由来オルガノイド: がん抑制遺伝子のshRNA(*Apc* shRNA(*shApc*), *Pten* shRNA(*shPten*), *p16*(*shp16*)など)を導入
-) LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイド: Cre recombinase遺伝子を導入して*Kras*を活性化した後、がん抑制遺伝子shRNAを追加導入

2) オルガノイドのヌードマウス皮下への移植

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

-) イソフルランによる軽麻酔下にて背部皮下左右2カ所に接種
-) 移植後4~6週後に頸椎脱臼による安楽死後、皮下腫瘍を摘出
-) 腫瘍を10%中性緩衝ホルマリンにて固定、常法に従いパラフィン包埋切片を作製しヘマトキリン・エオジン染色を行い病理組織学的に評価

3) オルガノイドへの化学物質暴露

-) オルガノイド: B6Jマウス大腸または肺由来
-) 被験物質: PhIP(0, 3, 10 μ M)+S9 mix
NNK(0~5,000 μ M)+S9 mix

PhIPとNNKは、げっ歯類において各々大腸と肺に発がん性が示されている陽性対照として選択した。

(2) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製とspontaneousな変異頻度についての検討

1) 肝臓、大腸及び膀胱由来のオルガノイドの調製
*gpt delta*マウス(日本エスエルシーより購入)の肝臓、大腸及び膀胱からオルガノイドを調製した。調製手順の概略は(1)と同様とした。

2) DNA抽出、*in vitro*パッケージングと変異頻度解析

Masumuraらの方法(1999)に準じてオルガノイドから高分子ゲノムDNAを抽出し、*in vitro*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。

(3) 発がん性試験法としてオルガノイドを用いる際の最適化に関する解析

1) オルガノイドの調製

4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウス肺からオルガノイドを調製した。手順は(1)1)と同様に行ったが、レンチウイルスによる処置は行わなかった。4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)から調製したオルガノイドについては3~13日に1回、各々7、10、8回継代した。*gpt delta*マウスの肺から調製したオルガノイドについては7~10日に1回、各々7、7、6回継代した。

2) 総RNAの抽出

ISOGEN with Spin Column(日本ジーン製)を用いて肝臓(胆管)及び肺のオルガノイドから総RNAを抽出した。

3) DNAアレイによる遺伝子発現解析

Mouse Oligo chip 24k(東レ製)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。データ収集は東レに委託

し、解析は国立がん研究センター研究所動物実験部門においてGeneSpring (アジレント社製)により行った。

C. 研究結果

(1) C57BL/6Jマウスを用いるオルガノイドの調製とヌードマウス皮下移植による造腫瘍性の確認

1) B6Jマウス(野生型またはLSL-*Kras*^{G12D})大腸由来のオルガノイドの遺伝的再構成による発がん

マウス系統あるいはshRNA処置によりマウス皮下における増殖形態が異なっていた。組織判定は) マイナス(-;細胞を痕跡的に認める)、1+(細胞の増殖がみられるが異型性なし)、2+(異型性を伴う細胞増殖)、3+(周囲組織に浸潤性を認める)の4段階とした。

LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドについては、*Kras*活性化のみで(-)~(1+)、sh*Apc*を追加導入(*Kras*^{G12D} sh*APC*)しても同様であった。一方、*Kras*^{G12D} sh*Pten*で(2+)、*Kras*^{G12D} sh*Apc*+sh*p53*あるいは*Kras*^{G12D} sh*Apc*+sh*Pten*にて(3+)を示した。

B6Jマウス由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみで(-)~(1+)、sh*Apc* sh*Pten*、sh*Apc* sh*Pten*+sh*p53*により場合に(2+)を示し、*Kras*活性化と*Apc*の発現抑制に対し、更に*p53*あるいは*Pten*の発現抑制が加わることが発がん過程に効果的であることが示された。また、小腸オルガノイドの場合にはB6J由来オルガノイドの場合でもsh*Apc*のみで(2+)がみられるが、大腸ではsh*Apc*のみの場合とMOCK(陰性対照ベクター)の場合とで組織学的な違いは認められず、小腸由来オルガノイドに比し大腸オルガノイドでは発がんするまでに、より多くの遺伝子変化を必要とすることが示唆された。*Apc*変異を片側アレルにもつ*APC*^{Min}マウスでは、小腸に多数の自然発生腫瘍が発生するが、大腸には少ないことと関連するものと考えられた。

B6Jマウス由来膀胱オルガノイドについては、MOCK(陰性対照ベクター)の場合と比較して、sh*Pten*の導入により腺管が大きくなるなど細胞増殖への影響を示唆する結果が得られたが、*in vitro*での培養の段階での増殖が遅く、引続きの培養条件検討を要する。

2) 大腸由来のオルガノイドに対するPhIPと肺由来のオルガノイドに対するNNKの影響

PhIPについては、培養プレート 1 well当り5,000~10,000個の細胞を播種した際、NADの還元能を指標とする細胞生存性測定試験において細胞数に応じた増殖曲線を示したことから、細胞増殖を反映していると判断された。PhIPをS9mix存在下、0.05~10 μMの濃度で24時間暴露し、暴露終了0~72時間まで測定した。PhIPは用量依存的に細胞生存性に影響を与え

ることが示され、今回は0、3、10 μM濃度の単回処置により発がんへの影響を検討した。その結果、MOCK PhIP-10 μM処置では(-)であったが、sh*Pten* PhIP-0、3、10 μM処置により、ヌードマウス皮下に形成された組織は各々(1+)、(2+)、(3+)であり、大腸オルガノイドに対する*in vitro*でのPhIP処置により発がん性が示された。

NNKについては、S9mix存在下、0~5,000 μM濃度の1~3回処置により発がんへの影響を検討した。その結果、shRNA未処理のオルガノイドではNNKにて処置しても(-)であったことから、現在、sh*p16* sh*Pten*処置あるいは*Kras*活性化後のNNKの影響を検討している。一方、sh*Pten*処置後の肺オルガノイドは、通常であれば嚢胞状に増殖するところ充実性かつ乳頭状に変化し、オルガノイドの切片をヘマトキリン・エオジン染色下で観察すると扁平上皮化生を示す変化がみられた。これらの所見より、発がん物質処置により扁平上皮がんを誘導できる可能性が示唆され、タバコが扁平上皮がんの原因の一つであることを考え合わせると、その発生機序の解析系に応用できるか否か引続き検討する。

(2) *gpt* deltaマウスを用いるオルガノイドの調製とspontaneousな変異頻度についての検討

肝臓由来オルガノイドから常法に従い高分子のゲノムDNAを抽出した。*In vitro*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結果、変異頻度は 6.70×10^{-6} であり、マウス肝臓から直接抽出したゲノムDNAの変異頻度($4.26 \pm 2.10 \times 10^{-6}$)と同程度であることが明らかとなった。

(3) 発がん性試験法としてオルガノイドを用いる際の最適化に関する解析

1) 4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5 6週齢に従い持続的に2倍以上発現上昇した40遺伝子の中には、cytochrome P450ファミリーの2遺伝子とUridine 5'-diphosphoglucuronosyl-transferase2ファミリーの4遺伝子など化学物質代謝に関連するものの他、trefoil factor 2(Tff2)とTff3が含まれていた。Tff2は腸管が発がん標的の*Apc*(Min/+)マウスにおいて発がん促進に関与する可能性が示され(Fujimoto Kら、2015)、ヒト胆管がんにおいてもTFF2はEGFR/MAPKの活性化を介する増殖促進に寄与するとの報告もある(Kosriwong Kら、2011)ことから、オルガノイド調製のためのマウスからの組織採取時期に注意を要することが示された。

2) 4、5及び6週齢の*gpt* delta雄マウスの肺から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現

4 5 6 週齢に従い持続的に2倍以上発現上昇した62遺伝子の中には、化学物質代謝に関連するN-acetyltransferase 1や血管新生やがん細胞の浸潤に関連するmatrix metalloproteinase 2 (MMP2) が含まれていた。

(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24年最終改正法律第50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)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。

D. 健康危険情報

該当なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, in press.
- (2) Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 16(2):3474-92 (2015)
- (3) Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci*. (2015)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆：遺伝子改変マウス由来正常上皮細胞の3次元培養法を用いる新たな化学物質発がん性試験法の開発。第32回日本毒性病理学会ワークショップ「発癌研究の最新の動向」(香川、2016年1月)
- (2) 筆宝義隆：3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立。第22回肝細胞研究会(米子、2015年6月)
- (3) 松浦哲也、筆宝義隆：マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現。第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山、2015年6月)
- (4) 筆宝義隆：3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立と個別化医療への応用。第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山、2015年6月)
- (5) 筆宝義隆、松浦哲也、落合雅子、今井俊夫、折橋郁、丸喜明：3次元初代培養を用いた膵管・胆道発がんモデルの確立。第30回発がん病理研究会(小豆島、2015年8月)
- (6) 筆宝義隆：In vitroでの発がん再構成。お茶の水がん学アカデミア第117回集会(東京、2015年9月)
- (7) Yoshiaki Maru, Kaoru Orihashi, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor Induction from Murine Gastric Organoids. 第74回日本癌学会総会(名古屋、2015年10月)
- (8) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Direct transformation of primary murine pancreatic ductal cells in vitro. 第74回日本癌学会総会(名古屋、2015年10月)
- (9) Yoshitaka Hippo, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Toshio Imai. A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 第74回日本癌学会総会(名古屋、2015年10月)
- (10) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells. 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津、2016年2月)
- (11) Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor

Induction from Upper Gastrointestinal Tract 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津、2016年2月) 3. その他
該当なし。

- (12) 戸塚ゆ加里、中釜 斉：質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明 .第 42 回日本毒性学会学術大会(金沢、2015年7月)
- (13) Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) . 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋、2015年10月)
- (14) 戸塚ゆ加里 : ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索 .第 44 回日本環境変異原学会 .(福岡、2015年12月)
- (15) 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里 : 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響 .第 44 回日本環境変異原学会 .(福岡、2015年12月)
- (16) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫 : 正常上皮細胞の 3 次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研究への応用に向けて、がん予防学術大会 2015 さいたま (さいたま、2015年6月)
- (17) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫 : マウス正常腸管上皮の 3 次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用 .第 30 回発がん病理研究会 (小豆島、2015年8月)
- (18) 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫 : マウス正常腸管上皮の 3 次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用 .第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋、2015年10月)
- (19) 落合 雅子、中釜 斉 : マウス正常上皮細胞の 3 次元培養法を用いる *in vitro* 発がんモデルの開発 .日本環境変異原学会第 44 回大会 (福岡、2015年11月)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

F . 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。

オルガノイド皮下移植系の病理学的評価

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、主に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、(1)オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的特性に関する解析と、(2)発がん性試験法としてオルガノイドを用いる際の最適化に関する解析を進めた。具体的に(1)については、大腸と膀胱のオルガノイド調製法について検討し、更に大腸については2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)の影響を評価した。(2)については4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウスの肺からオルガノイドを調製し、臓器採取時週齢の違いによるオルガノイドの発現遺伝子の違いを検索し、化学物質の発がん性を検出する目的に則した採取条件の検討を行った。(1)の結果として、大腸由来オルガノイドは、オルガノイド調製に用いるマウス系統あるいはshRNA処置によりヌードマウス皮下における増殖形態が異なり、組織判定は()マイナス(-;細胞を痕跡的に認める)、1+(細胞の増殖がみられるが異型性なし)、2+(異型性を伴う細胞増殖)、3+(周囲組織に浸潤性を認める)の4段階に分類可能であった。膀胱由来オルガノイドは増殖性が弱く、培養条件検討の継続を要すると判断した。(2)の結果として、肝臓(胆管)由来オルガノイドでは化学物質代謝に関連するCypファミリーやUDPGTファミリー関連遺伝子や発がん進展に関連するとの報告があるtrefoil factor 2の発現に、肺由来オルガノイドでは化学物質代謝に関連するN-acetyltransferase 1などの発現に週齢差がみられたことから、オルガノイド調製のためのマウスからの組織採取時期に注意を要することが示された。

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な対策が必要であり、本研究課題においては、異なる条件下で調製したオルガノイドについて基盤的なデータ蓄積も併せて行う。

本分担研究課題においては、主に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、(1)オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的特性に関する解析と、(2)発がん性試験法としてオルガノイドを用いる際の最適化に関する解析を進めている。今年度は、大腸と膀胱のオルガノイド調製法について検討し、更に大腸については2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)の発がん性について検討した。(2)については4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウスの肺を用いてオルガノイドを調製し、臓器

採取時週齢の違いによるオルガノイドの発現遺伝子の違いを検索し、化学物質の発がん性を検出する目的に則した採取条件の検討を行った。

B. 研究方法

(1) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的解析

1) オルガノイドの調製

C57BL/6J (B6J) マウスおよびLSL-*Kras*^{G12D}マウスの大腸と膀胱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]

-) 大腸・膀胱摘出、細切、酵素処理
-) マトリゲル上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

-) 液体培地を除きマトリゲルを重層
-) 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)]

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

[レンチウイルスによる遺伝子導入]

-) B6Jマウス由来オルガノイド：がん抑制遺伝子のshRNA (*Apc* shRNA(*shApc*)、*Pten* shRNA(*shPten*) など)を導入
-) LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来オルガノイド：Cre recombinase遺伝子を導入して*Kras*を活性化した後、がん抑制遺伝子shRNAを追加導入

2) オルガノイドのヌードマウス皮下への移植

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

-) イソフルランによる軽麻酔下にて背部皮下左右2カ所に接種
-) 移植後4~6週後に頸椎脱臼による安楽死後、皮下腫瘍を摘出
-) 腫瘍を10%中性緩衝ホルマリンにて固定、常法に従いパラフィン包埋切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的に評価

3) オルガノイドへの化学物質暴露

-) オルガノイド：B6Jマウス大腸由来
-) レンチウイルス処置：sh*Pten*遺伝子導入
-) 被験物質：PhIP (0, 3, 10 μM) +S9 mix
-) 処置：レンチウイルス処置16日後、継代時に被験物質を6時間1回処置
-) ヌードマウス皮下接種：被験物質処置後48日後
-) 皮下腫瘍採取：皮下接種60日後

(2) 発がん性試験法としてオルガノイドを用いる

際の最適化に関する解析

1) オルガノイドの調製

4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)と*gpt delta*雄マウス肺からオルガノイドを調製した。手順は(1)1)と同様に行ったが、レンチウイルスによる処置は行わなかった。4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆管)から調製したオルガノイドについては3~13日に1回各々7、10、8回継代した。*gpt delta*マウスの肺から調製したオルガノイドについては7~10日に1回、各々7、7、6回継代した。

2) 総RNAの抽出

ISOGEN with Spin Column (日本ジーン製)を用いて肝臓(胆管)及び肺のオルガノイドから総RNAを抽出した。

3) DNAアレイによる遺伝子発現解析

Mouse Oligo chip 24k (東レ製)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。データ収集は東レに委託し、解析は国立がん研究センター研究所動物実験部門においてGeneSpring (アジレント社製)により行った。

C. 研究結果

(1) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性を確認する際の病理組織学的解析

1) 大腸オルガノイドのマウス皮下増殖形態

マウス系統あるいはshRNA処置によりマウス皮下における増殖形態が異なっていた。組織判定は) マイナス(-;細胞を痕跡的に認める)、1+(細胞の増殖がみられるが異型性なし)、2+(異型性を伴う細胞増殖)、3+(周囲組織に浸潤性を認める)の4段階とした。

LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドについては、*Kras*活性化のみで(-)~(1+)、*Kras*^{G12D} sh*Pten*で(2+)、*Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*p53*あるいは*Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*Pten*にて(3+)を示した。一方、B6Jマウス由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみで(-)~(1+)、sh*Apc* sh*Pten*、sh*Apc* sh*Pten* +sh*p53*により場合に(2+)を示し、*Kras*活性化と*Apc*の発現抑制に対し、更に*p53*あるいは*Pten*の発現抑制が加わることが発がん過程に効果的であることが示された。

2) 膀胱オルガノイドのマウス皮下増殖形態

B6Jマウス由来膀胱オルガノイドに対し、*Pten* shRNAを導入し、ヌードマウス皮下に移植後、大腸より長期間の8週間後に病理組織学的解析を行った。その結果、*Pten* shRNAを導入したオルガノイドではshRNAを導入しなかったオルガノイドに比し腺管が拡大したことから、細胞増殖への影響が示唆された。

3) PhIP処置による大腸オルガノイドの造腫瘍性
shPten遺伝子導入なし PhIP-10 μM処置しヌード
マウス皮下に接種したオルガノイドの組織学的検査
結果はマイナスであった(図1A)。一方、shPten遺
伝子導入後 PhIP-0、3、10 μM処置しヌードマウス
皮下に接種したオルガノイドについては、1+、2
+、3+であった(図1B-D)。

(2) 発がん性試験法としてオルガノイドを用いる
際の最適化に関する解析

1) 4、5及び6週齢のC57BL/6J雄マウスの肝臓(胆
管)から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時に
おいて2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を図2
に示した。4 5 6週齢に従い持続的に発現上昇
した(図2の赤字1)40遺伝子の中にはcytochrome
P450ファミリーの2遺伝子とUridine 5'-diphospho-
glucuronosyl transferase2ファミリーの4遺伝子など
化学物質代謝に関連するものの他、trefoil factor 2
(Tff2)とTff3が含まれていた。Tff2は腸管が発がん
標的のApc(Min/+)マウスにおいて発がん促進に関与
する可能性が示され(Fujimoto Kら、2015)、ヒト
胆管がんにおいてもTFF2はEGFR/MAPKの活性化を介す
る増殖促進に寄与するとの報告もある(Kosriwong K
ら、2011)ことから、オルガノイド調製のためのマウ
スからの組織採取時期に注意を要することが示され
た。

2) 4、5及び6週齢のgpt delta雄マウスの肺から
調製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時に
おいて2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を図3
に示した。4 5 6週齢に従い持続的に発現上昇
した(図3の赤字1)62遺伝子の中には化学物質代
謝に関連するN-acetyltransferase 1や血管新生や
がん細胞の浸潤に関連するmatrix
metalloproteinase 2(MMP2)が含まれていた。

(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
24年最終改正法律第50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)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。

D. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- (1) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、
今井俊夫：正常上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研
究への応用に向けて。第22回日本がん予防学会
(さいたま、2015年6月)
- (2) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、今井俊夫、
筆宝義隆：マウス正常腸管上皮細胞の3次元培
養系を用いる発がん再構成に対するPhIPの修飾
作用。第74回日本癌学会学術総会(名古屋、2015
年10月)
- (3) 今井俊夫、落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、
筆宝義隆：遺伝子改変マウス由来正常上皮細胞
の3次元培養法を用いる新たな化学物質発がん
性試験法の開発。第32回日本毒性病理学会ワー
クショップ「発癌研究の最新の動向」(香川、
2016年1月)

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。

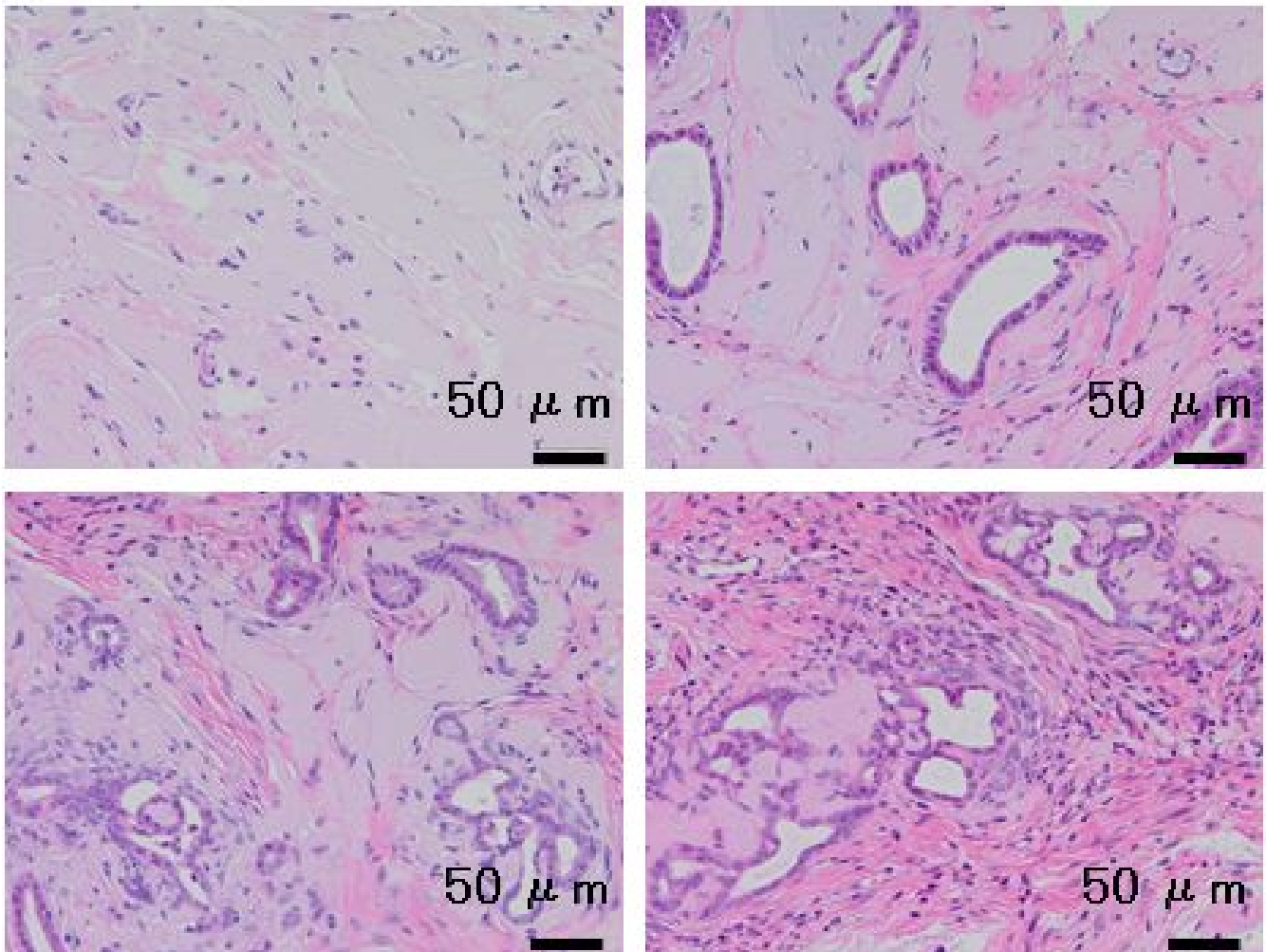


図1 C57BL/6J雄マウスの大腸から調製したオルガノイドにおけるPhIPの影響解析(ヌードマウス皮下)
 (A、左上) *shPten*遺伝子導入なし PhIP-10 μ M処置。上皮細胞は認められない。(B、右上) *shPten*遺伝子導入後 PhIP-0 μ M処置。腺管形成がみられるが異型性はない。(C、左下) *shPten*遺伝子導入後 PhIP-3 μ M処置。腺管形成、増生がみられる。一部の上皮細胞に軽度の核肥大/異型がみられる。(D、右下) *shPten*遺伝子導入後 PhIP-10 μ M処置。一部の腺管にて軽度に浸潤し、それに伴い間質細胞の反応がみられる。

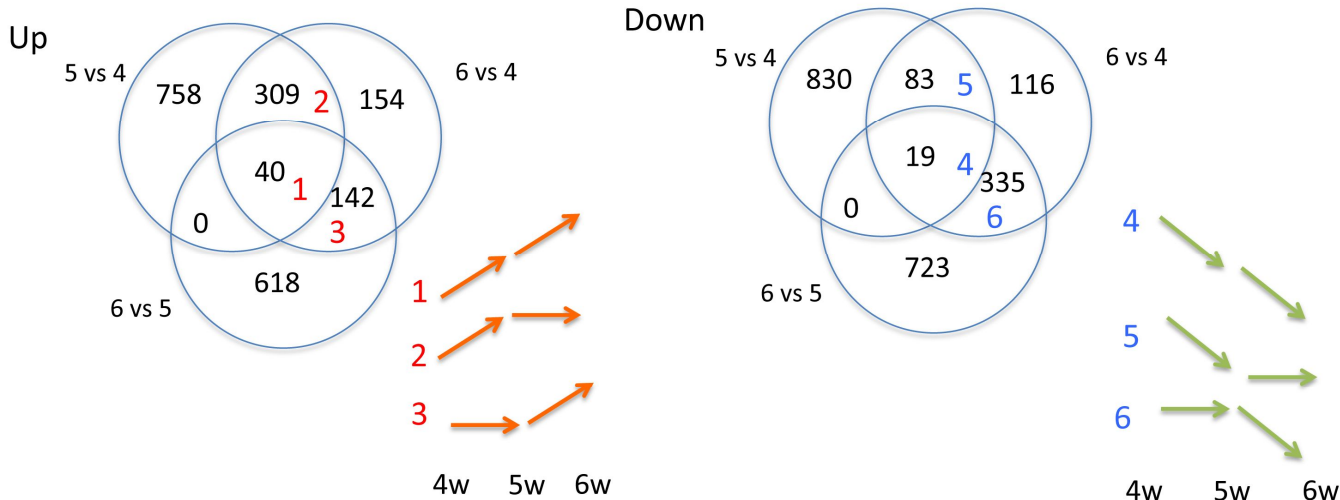


図2 C57BL/6J雄マウスの肝臓（胆管）から調製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時において2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を示す。

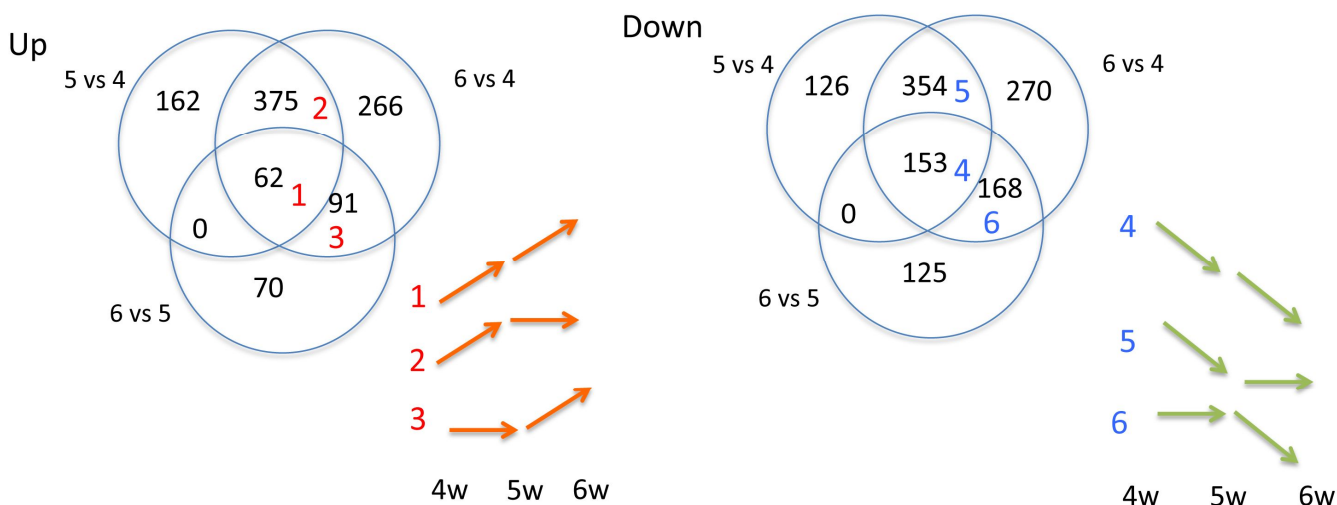


図3 *gpt delta*雄マウスの肺から製したオルガノイドにおける遺伝子発現
4 5週齢、5 6週齢あるいは4 6週齢時において2倍以上の発現変動を示した遺伝子数を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし。						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当なし。				

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）
分担報告書

3次元オルガノイド培養を用いたin vitroでの化学発がん研究

研究分担者 筆宝 義隆
千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨

化学発がん実験は従来げっ歯類を用いて個体レベルで行われてきたが、多大な時間と労力を要することなどから簡便かつ迅速な代替法の開発が求められていた。我々は以前、3次元培養下マウス初代培養上皮細胞への遺伝子導入により、in vitroでも個体レベルと同様の大腸がん発がん過程が再現可能であることを示したことから、本手法を化学発がん実験へ適用することを着想した。そこで、マウス由来肺オルガノイドに対してレンチウイルスベクター-shRNAを用いてがん抑制遺伝子をin vitroでノックダウンし、さらにタバコ由来肺発がん物質NNK(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)を投与することで、肺発がん過程が再現可能か検証を進めている。現在ヌードマウスに接種し、皮下腫瘍が形成されるか経過観察中である。今後化学物質の投与法を最適化するなどして新規発がん性試験としての確立を目指したい。

A．研究目的

化学物質の発がん性試験は通常マウスやラットを用いた長期試験により行われるため、莫大な時間と労力が必要とされる。また世界的な動物愛護意識の高まりもあり、動物実験の3Rの原則に照らし合わせて、何らかの代替法の開発が望まれていた。我々は以前、上皮細胞のみを用いても個体レベルと同様の発がん過程が3次元培養下で再現可能であることを示していることから、同手法を化学発がん実験へ応用することが可能か検討することを本研究の目的とした。

B．研究方法

C57BL/6Jマウス（野生型もしくはKras^{LSL-G12D/+}）の肺を単離後に、酵素処理などにより一細胞レベルまで分散させた。腸管と同様の培養条件を用いてマトリゲル3次元初代培養を行い、オルガノイドとして長期間にわたり培養・継代を行った。また、レンチウイルスを用いて野生型マウス由来正常オルガノイドにがん抑制遺伝子であるp16やPTEN などに対するshRNAを導入し、実際にタンパクレベルでノックダウンされていることを確認した。Kras^{LSL-G12D/+}マウス由来正常オルガノイドにはCre-recombinase遺伝子を導入し、Cre-loxPシステムを利用したSTOPコドンの除去による活性型変異アレルの発現を誘導した。肺オルガノイドに対してはタバコに含まれる代表的な発がん物質である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(以後NNK)を0~5000 μ M

の濃度で1-3回オルガノイドに投与した後に腫瘍原性の検証を行うためにヌードマウス皮下に10⁶細胞ずつ接種した。

C．研究結果

肺由来の上皮細胞はオルガノイドとして半永久的に培養・継代することが可能だった。レンチウイルスによる遺伝子導入効率も常に90%を超えており、またGFPを導入した際にも陽性細胞が数ヶ月にわたり培養されていたことから幹細胞のゲノムへ安定的に遺伝子が導入されたと結論付けた。遺伝子異常未導入の場合にはNNK投与後の肺由来オルガノイドは腫瘍を形成しなかったため、現在p16やPTENに対するshRNAを導入した肺オルガノイド、あるいはKrasを活性化した肺オルガノイドへNNKを投与したのちにヌードマウス皮下に移植し腫瘍形成能を検証している。本実験系においては、これまでにKras変異とp16やPTENに対するshRNAの導入により腺癌類似の腫瘍が誘導されている。一方、今回、PTENに対するshRNAを導入した肺オルガノイドでは、通常であれば嚢胞状の形態のところが高実性かつ乳頭状に変化し、組織学的にも扁平上皮化生が強く示唆される初見を見出したことから、発がん物質を投与することで扁平上皮癌を誘導できる可能性が浮上してきている。これまでに各種臓器由来の細胞から得られた腫瘍はすべて腺癌であり、扁平上皮癌は皆無であった。喫煙は扁平上皮癌のリスク因子であることから、PTENのノックダウンとNNK投与の組み合

わせにより扁平上皮癌の誘導に成功した場合、極めて新規性の高い結果となることから慎重に観察を進めていく予定である。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体を使用しておらず、動物実験およびDNA組み替え実験に関しては機関内の委員会に本研究の申請を行い、承認を得た後に、規定を遵守して研究を行った。

D. 研究発表

1. 論文発表

(1) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, in press

2. 学会発表

- (1) Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Yoshitaka Hippo (口演).
Lentivirus-based Tumor Induction from Upper Gastrointestinal Tract 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津)2016年2月
- (2) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津)2016年2月
- (3) Yoshitaka Hippo, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Toshio Imai. A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma (英語口演). 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (4) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Direct transformation of primary murine pancreatic ductal cells in vitro (口演). 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (5) Yoshiaki Maru, Kaoru Orihashi, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor Induction from Murine Gastric Organoids. 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (6) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、今井俊夫、筆宝義隆. マウス正常腸管上皮細胞の3次元培養系を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用. 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (7) 筆宝義隆(招待講演)「in vitroでの発がん再構成」お茶の水がん学アカデミア第117回集会(東京)2015年9月

- (8) 筆宝義隆、松浦哲也、落合雅子、今井俊夫、折橋郁、丸喜明(口演)「3次元初代培養を用いた膵管・胆道発がんモデルの確立」第30回発がん病理研究会(小豆島)2015年8月
- (9) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫(口演)「マウス正常腸管上皮の3次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用」第30回発がん病理研究会(小豆島)2015年8月
- (10) 筆宝義隆(口演)「3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立と個別化医療への応用」第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山)2015年6月
- (11) 松浦哲也、筆宝義隆「マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現」第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山)2015年6月
- (12) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫「正常上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研究への応用に向けて」第22回日本がん予防学会(さいたま)2015年6月
- (13) 筆宝義隆(口演)「3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立」第22回肝細胞研究会(米子)2015年6月

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

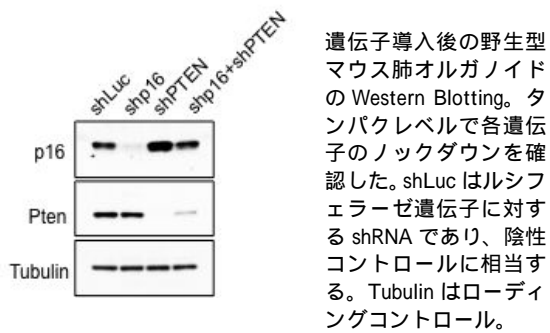
2. 実用新案登録

なし

3. その他

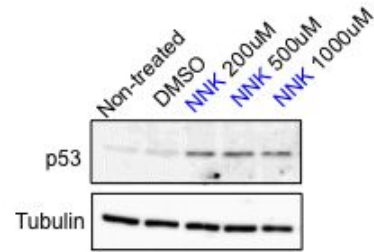
なし

図1 肺オルガノイドへの shRNA 導入による癌抑制遺伝子のノックダウン



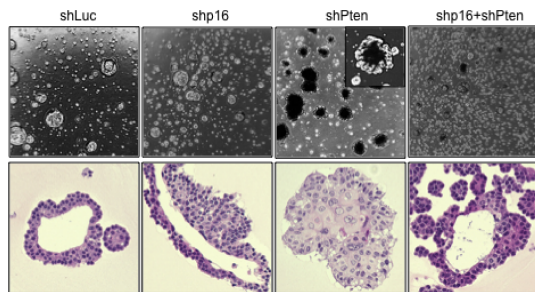
遺伝子導入後の野生型マウス肺オルガノイドの Western Blotting。タンパクレベルで各遺伝子のノックダウンを確認した。shLuc はルシフェラーゼ遺伝子に対する shRNA であり、陰性コントロールに相当する。Tubulin はローディングコントロール。

図3 肺オルガノイドに対する NNK 投与による p53 活性化



NNK を肺オルガノイド 3 次元培養の培養上清に添加後 24 時間でタンパクを回収して Western Blotting を行った。Tubulin はローディングコントロール。

図2 肺オルガノイドの形態変化



上段は 3 次元培養の位相差顕微鏡明視野画像。shPten のみ拡大したオルガノイドを示す。他では管腔構造を示す嚢胞性のオルガノイドだが shPten のみ充実性の形態に変化して大型で黒色の凝集塊となっている。下段は H&E 染色像であり、やはり shPten 導入オルガノイドのみ充実性であり扁平上皮化生が示唆される。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maru Y, Orihashi K, <u>Hippo Y.</u>	Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids.	<i>Methods Mol Biol</i>	in press		2016

オルガノイド遺伝毒性解析実験に関する研究

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。今年度は、4～6週齢程度の *gpt delta* マウスから肝臓及び膀胱を切り出し細切、コラゲナーゼ/ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養、継代を行ないオルガノイドの作成を行った。オルガノイドを用いた遺伝毒性試験法の手技手法の確立のため、高分子DNA抽出方法の検討及び背景データとして、spontaneousな変異頻度について確認を行なった。肝臓より作成したオルガノイド（約 1×10^7 cell）より常法に従ってゲノムDNAを抽出したところ、高分子の状態の良いDNAが抽出できることを確認した。このゲノムDNAを用い、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、変異頻度は 6.70×10^{-6} であり、マウス肝臓より直接ゲノムDNAを抽出した場合の変異頻度（ $4.26 \pm 2.10 \times 10^{-6}$ ）と同程度であることがわかった。一方、膀胱由来の細胞は肝臓と同じ培養条件では殆ど増殖せず、オルガノイドの作成には至らなかった。現在、膀胱に最適な培養条件を検討しているところである。今後、大腸、肺などの肝臓以外の臓器についてもオルガノイドを作成し、被験物質曝露のない状態での変異頻度や突然変異スペクトラムの解析を行なう。変異頻度があまりにも高い場合には、オルガノイド調整の際のコンディションなどを再度検討するなどの工夫をする。更に、*gpt delta* マウスの各種臓器から調製したオルガノイドに既知の遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を曝露し、遺伝毒性の有無を解析し、本試験の妥当性について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られる。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。今年度は、まず、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、肺、膀胱を摘出し、安定してオルガノイドを作成可能かどうか、及びそれらオルガノイドから食品添加物の遺伝毒性試験に利用可能な高分子のゲノムDNAの収集が可能かどうかについて検討した。

B．研究方法

4～6週齢程度の雄性マウスから肝臓、大腸、膀胱を切り出しそれぞれ細切、コラゲナーゼ/ディスパーゼ処理により細胞を単離後、マトリゲル中で三次元培養、継代を行なった。

C．研究結果

現在、トランスジェニックマウスからのオルガノイドの調整を行っており、近日中には遺伝毒性試験を開始

できそうである。今年度はまず、オルガノイドを用いた遺伝毒性試験法の手技手法の確立のため、高分子DNA抽出方法や被験物質の曝露方法などの検討を行なった。肝臓より作成したオルガノイド（約 1×10^7 cell）より常法に従ってゲノムDNAを抽出したところ、高分子の状態の良いDNAが $200 \mu\text{g}$ 程度抽出できた。このゲノムDNAを用い、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、変異頻度は 6.70×10^{-6} であり、マウス肝臓より直接ゲノムDNAを抽出した場合の変異頻度（ $4.26 \pm 2.10 \times 10^{-6}$ ）と同程度であることがわかった。一方、膀胱由来の細胞は肝臓と同じ培養条件では殆ど増殖せず、オルガノイドの作成には至らなかった。現在、膀胱に最適な培養条件を検討しているところである。今後、大腸、肺などの肝臓以外の臓器についてもオルガノイドを作成し、被験物質曝露のない状態での変異頻度や突然変異スペクトラムの解析を行なう。変異頻度があまりにも高い場合には、オルガノイド調整の際のコンディションなどを再度検討するなどの工夫をする。更に、*gpt delta* マウスの大腸、肝臓、膀胱から調製したオルガノイドに既知の遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を曝露し、遺伝毒性の有無を解析し、本試験の妥当性について検討を行う予定である。

（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、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

D . 研究発表

1. 論文発表

1. Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2015, Feb 4;16(2):3474-92.
2. Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 2015 Aug 27.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里、中釜 斉：質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明
第 42 回日本毒性学会学術大会. 2015 年 7 月
2. Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiko Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis)日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月
3. 戸塚ゆ加里：ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索, 第 44 回日本環境変異原学会 . 2015 年 12 月
4. 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第 44 回日本環境変異原学会 . 2015 年 12 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y.	Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles.	Int J Mol Sci.	16(2)	3474-92	2015,
Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M.	Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice.	Cancer Sci.	106(11)	1499-505	2015

オルガノイド皮下移植系実験

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 主任研究員

研究要旨

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を開発する。正常マウスの各種臓器からオルガノイドを調整し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後に、ヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を解析する試験を担当した。

大腸オルガノイドの腫瘍形成能の解析は、LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来オルガノイドの場合、*Kras*活性化のみでは皮下での上皮細胞の増殖は認められたが、異型性はなく、*Apc* shRNAを追加導入（*Kras*^{G12D} sh*Apc*）しても同様であった。*Kras*^{G12D} sh*Pten*では異型腺管の増殖が認められ、*Kras*^{G12D} sh*Apc* +shp53もしくは*Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*Pten*では、がん組織の増殖が認められた。B6由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみでは異型性のない上皮細胞の増殖が認められたのみで、sh*Apc* sh*Pten*、sh*Apc* sh*Pten* +shp53の場合に、異型腺管の増殖が認められた。膀胱に関しては、遺伝的再構成による発がんへの影響が示唆された。大腸オルガノイドへの腸管発がん物質PhIPの暴露をモデル系として、化学物質のオルガノイドへの細胞毒性の解析には、NADの還元能を指標とした96 well plateベースの細胞生存性測定試験が利用可能であり、化学物質暴露の際の用量設定に有用であることを示した。

各臓器からのオルガノイドの作成、遺伝的再構成による腫瘍形成能の確認、化学物質のオルガノイドへの細胞毒性の解析による用量設定は、試験法開発のための基礎的データとなる。次年度以降は、化学物質、臓器などの種類を増やして解析する予定である。

(具体的かつ詳細に記入すること)

A. 研究目的

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を開発する。正常マウスの各種臓器からオルガノイドを調整し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後に、ヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を解析する試験を担当する。

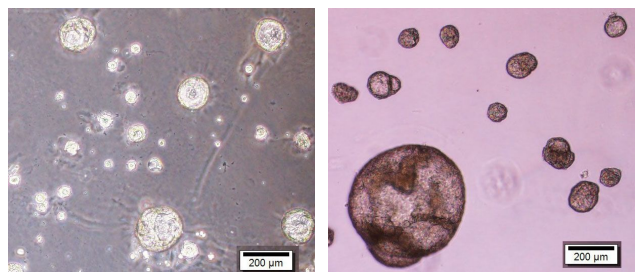
マウス小腸オルガノイドを用いて、レンチウイルスを用いたがん抑制遺伝子shRNAの導入により、遺伝的再構成を行い、ヌードマウス皮下に移植すると腫瘍様組織を形成可能であることは既に報告した（Onuma K et al., PNAS, 2013）。他臓器に関しては、大腸、肺、膀胱等は、オルガノイド系の調整法を確立している。まず、これらのオルガノイドにレンチウイルスを用いた遺伝子導入による遺伝的再構成を行い、ヌードマウス皮下への移植により、腫瘍形成能を確認する。同時に、オルガノイドへの化学物質の暴露方法や用量設定の手法を検討し、遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発のための基礎的データを得る。

B. 研究方法

B6マウスもしくは、LSL-*Kras*^{G12D}マウスの大腸及び膀胱からオルガノイドを作成した。図1に大腸及び膀胱オルガノイドの培養像を示す。

大腸に関しては、LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来のオルガノイドを用いた場合は、レンチウイルスにより、Cre recombinase遺伝子を導入して*Kras*を活性化した後に、がん抑制遺伝子shRNAを追加導入した。

図1 大腸及び膀胱オルガノイドの培養像



大腸

膀胱

C57BL6/J(B6)マウス由来大腸オルガノイドの場合は、まず、*Apc* shRNA(sh*Apc*)を導入した後に、他のがん抑制遺伝子shRNAの追加導入を行い、ヌードマウス皮下に移植後、4~6週間で腫瘍形成及び組織型の解析を行った。

膀胱に関しても、B6マウス由来のオルガノイドに、*Pten* shRNAをレンチウイルスで導入し、ヌードマウス皮下に移植後8週間で腫瘍形成及び組織型の解析を行った。

オルガノイドへの化学物質の暴露は、オルガノイドの継代時に行った。オルガノイドの播種から2時間後に、S9 mix（化学物質の代謝活性化のため）存在下、24時間化学物質に暴露させた。暴露終了時に測定試薬を含む培地と交換し、化学物質のオルガノイドに対する細胞毒性を、NADの還元能を指標とした96 well plateベースの細胞生存性測定試験（同じplateを用いて、3日間以上の連続した解析が可能）

を用いて解析した。

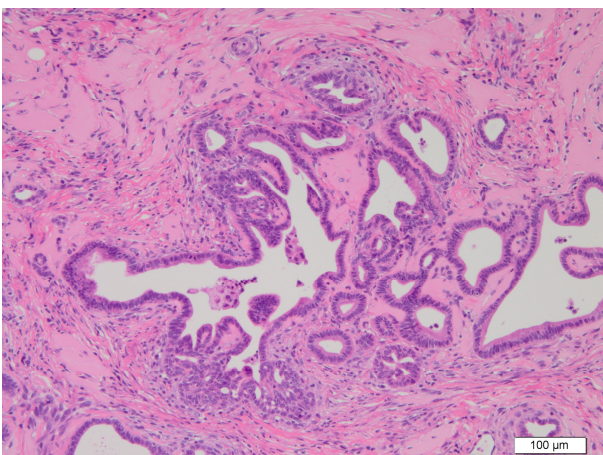
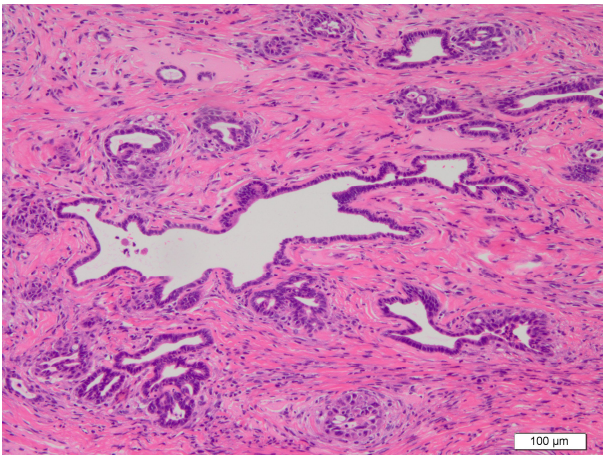
C. 研究結果

ヒト腸管発がんでは、大部分は大腸に腫瘍が発生するので、小腸のみならず、大腸由来のオルガノイドが利用可能かという点は非常に重要である。そこで、マウス正常大腸由来のオルガノイドに関して、腫瘍形成能を有するか否かを、遺伝的再構成による発がんから解析した。LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドの場合、*Kras*活性化のみでは皮下での上皮細胞の増殖は認められたが、異型性はなく、*Apc* shRNAを追加導入 (*Kras*^{G12D} sh*Apc*) しても同様であった。*Kras*^{G12D} sh*Pten* では異型腺管の増殖が認められ、*Kras*^{G12D} sh*Apc* +shp53 もしくは *Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*Pten* では、がん組織の増殖が認められた。ヌードマウス皮下腫瘍のマクロ像(図2a)と組織写真(図2b)を示す。

図2a LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドの遺伝的再構成-ヌードマウス皮下腫瘍のマクロ像



図2b:組織写真(上段1、下段2)



B6由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみでは異型性のない上皮細胞の増殖が認められたのみで、sh*Apc* sh*Pten*, sh*Apc* sh*Pten*+shp53の場合に、異型腺管の増殖が認められた。図3にヌードマウス皮下腫瘍の組織写真を示す。表1に小腸オルガノイドを用いた場合の遺伝的再構成による発がんの結果との比較を示す。例えば、小腸オルガノイドの場合には、B6でのsh*Apc*のみで異型腺管の増殖が認められる場合があるが、大腸オルガノイドでは、MOCKの場合と組織型は変わらず、大腸オルガノイドの方が腫瘍形成には、より多くの遺伝子変化を必要とする傾向が認められた。*Apc*^{flin}マウス(*Apc*変異を片方のアレルに持つ)での、腸管の自然発生腫瘍の発生個数が小腸に非常に多く、大腸では極く少ないこととも一致する。また、大腸オルガノイドでも、*Kras*活性化に加えてsh*Apc*の導入、更にshp53もしくはsh*Pten*を導入すれば、がん組織の増殖が認められたので、腫瘍形成能を有することが証明された。

表1 マウス正常小腸/大腸由来オルガノイドの遺伝的再構成による発がん

Mouse	遺伝的再構成	小腸 ^{*1,2}	大腸 ^{*2}
B6	MOCK	- ~ ±	- ~ ±
B6	sh <i>Apc</i>	± ~ +	- ~ ±
B6	shp53	NT	- ~ ±
B6	sh <i>Pten</i>	- ~ ±	±
B6	shp53 + sh <i>Pten</i>	- ~ ±	±
B6	sh <i>Apc</i> shp53	++	- ~ ±
B6	sh <i>Apc</i> sh <i>Pten</i>	++	+
B6	sh <i>Apc</i> shp53 + sh <i>Pten</i>	++	+

<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	MOCK	- ~ ±	- ~ ±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre	± ~ +	±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Apc</i>	++	±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre shp53	NT	±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Pten</i>	NT	+
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Apc</i> + shp53	NT	++
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Apc</i> + sh <i>Pten</i>	NT	++

*1 Onuma K et al., PNAS, 2013より

*2 組織型

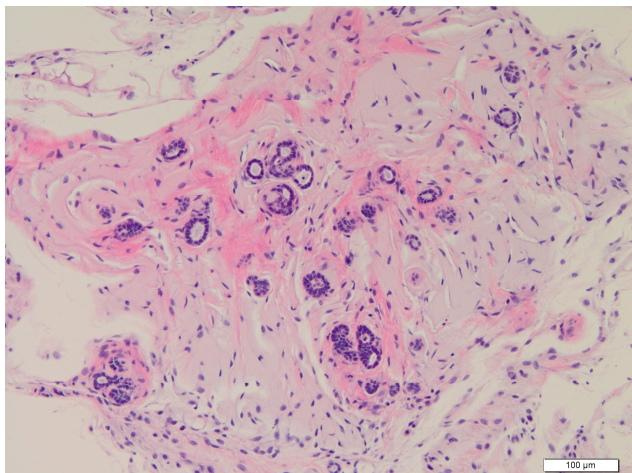
- ; No cells/organoids retention
- ± ; Proliferated glands without atypia
- + ; Dysplasia
- ++ ; Carcinoma
- NT ; Not tested

膀胱に関しても、B6マウスからオルガノイドを作成することが可能であるが、ヌードマウス皮下に移

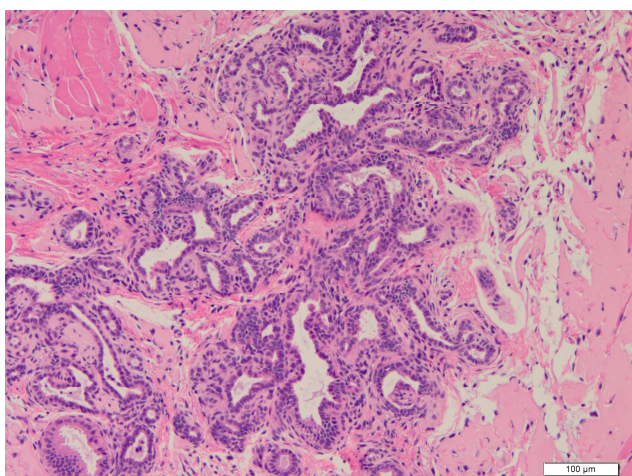
植した場合には、MOCKを導入しただけのオルガノイドの場合には、上皮細胞が若干認められたのみであった。*Pten* shRNAを導入したオルガノイドでは、腺管が大きくなるなどの細胞増殖への影響が認められ、遺伝的再構成による発がんへの影響が示唆された。

図3: B6由来大腸オルガノイドの遺伝的再構成- ノードマウス皮下腫瘍の組織写真

sh*Apc* sh*Luc*



sh*Apc* sh*p53*+sh*Pten*



化学物質のオルガノイドに対する細胞毒性の解析に関しては、齧歯類において、腸管への発がん性が報告されているPhIPをモデル化合物として用いて、大腸オルガノイドに暴露させる系において解析した。1 well当たり5000~10000個の細胞数を播種した場合に、NADの還元能を指標とする細胞生存性測定試験において、細胞数に応じた増殖曲線を示し、この試験が、細胞増殖を反映していることが示された。PhIPを0.05~10 μMの濃度で(S9mix存在下)、24時間暴露し、暴露終了時点から72時間まで測定した。72時間の時点で、0 μMに比して、1 μMまでは差が認められず、2~10 μMで約9割の細胞生存であったが、細胞増殖の停止などは認められなかった。PhIPが、用量依存性に細胞生存性に影響を与えることが示され、化学物質の暴露の際の用量設定の基礎的データ

となることが示された。今後、細胞生存性測定試験でのどのポイント(0 μMに比して8~9割の細胞生存か、細胞増殖の停止が誘発される用量か等)を最大用量とするかは、複数回暴露を行い、腫瘍形成能を解析した結果と比較して検討を行う必要がある。大腸オルガノイドを用いた解析結果を示したが、どの臓器由来のオルガノイドにもこの解析法は応用可能である。

各臓器からのオルガノイドの作成、遺伝的再構成による腫瘍形成能の確認、化学物質のオルガノイドへの細胞毒性の解析による用量設定は、試験法開発のための基礎的データとなる。次年度以降は、化学物質、臓器などの種類も増やして解析する予定である。

(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

なし

2. 学会発表

1. 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。正常上皮細胞の3次元培養による*in vitro*発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研究への応用に向けて、がん予防学術大会2015さいたま、さいたま、2015年6月。

2. 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。マウス正常腸管上皮の3次元培養法を用いる発がん再構成系に対するPhIPの修飾作用、第30回発癌病理研究会、小豆島、2015年8月。

3. 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。マウス正常腸管上皮の3次元培養法を用いる発がん再構成系に対するPhIPの修飾作用、第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。

4. 落合 雅子、中釜 斉。マウス正常上皮細胞の3次元培養法を用いる*in vitro*発がんモデルの開発、日本環境変異原学会第44回大会、福岡、2015年11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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし。						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maru Y, Orihashi K, Hippo Y	Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids.	Methods Mol Biol	in press		
Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y	Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles.	Int J Mol Sci	16 (2)	3474-92	2015,
Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M	Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice.	Cancer Sci	106 (11)	1499-505	2015