

別添 1

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 28 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 . In vitro発がん再構成系の確立およびその応用研究 | ----- | 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 |

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、食品添加物等の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。昨年度は、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と調製条件の違いによる試験結果のばらつきをなくすための検討を行い、マウスの組織採取時週齢に注意を要することを明らかにした。更に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の発現を変化させることによる発がんへの影響を解析した。また、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-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の発がん性を検討し、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た。遺伝毒性については、*gpt* deltaマウス由来の肝臓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。今年度は、胆嚢、子宮のオルガノイド調製法の検討を行うとともに、遺伝毒性発がん物質としてacrylamide (AA)、benzo[*a*]pyrene (BaP)、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてtriethanolamine (TEA)、非遺伝毒性非発がん物質として1-methylnaphthalene (1-MN)、perillaldehyde (PA) について検討した。肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でAA、BaP、MNU及びTEAでは発がん性を示す結果が得られた。一方、1-MNについては対照群と差がみられず、PAについては対照群との差の有無について再確認が必要であった。本試験系では、オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、最長8週間後の皮下組織について病理組織学的解析を行うが、発がん性の評価には造腫瘍性のほか、上皮細胞の多層性や浸潤性が指標になり得ることが示された。遺伝毒性については、PhIPを被験物質とし、変異頻度と変異スペクトルを指標とした場合、大腸オルガノイドを用いる方法とin vivo試験法と同様の結果が得られることを示した。

以上、マウス由来オルガノイドを用いるin vitro化学物質暴露系を用いることで、遺伝毒性発がん物質のみならず、非遺伝毒性発がん物質についても、それらの発がん性を検出可能であることを示唆する結果が得られ、遺伝毒性についてもin vivo試験法との同等性を示された。

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) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し造腫瘍性とともに、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

1) オルガノイドの調製

C57BL/6J (B6) マウス、*p53*ヘテロノックアウトマウス、*rasH2*マウスおよびLSL-*Kras*^{G12D}マウスの肺、肝臓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]

-) 肺・肝臓・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など]

-) B6マウス由来オルガノイド：がん抑制遺伝子の*Pten* shRNA(*shPten*)と陰性対照としての*shLuc*を導入
-) *p53*ヘテロノックアウトマウス(BALB/c背景)由

来オルガノイド：*p53*ヘテロノックアウトと野生型マウスを使用(遺伝子導入なし)

-) *rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウス由来オルガノイド：*rasH2*およびnon-Tgマウスを使用(遺伝子導入なし)
-) LSL-*Kras*^{G12D}マウス(B6背景)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と陰性対照としてのpLK0.1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4~8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

-) 適用オルガノイドと被験物質：
 - アクリルアミド；*p53*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(0, 0.28, 1.4 mM +S9 mix)
 - ベンゾ[a]ピレン；B6マウス由来の肺オルガノイド +*shPten*(0, 0.6, 3.0 μM +S9 mix) または *shLuc*(陰性対照)(0, 0.4, 2.0 μM +S9 mix)
 - N-メチル-N-ニトロソ尿素；*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肝臓(Liv-H)オルガノイド(0, 200, 1000 μM, S9 mixなし)
 - トリエタノールアミン；*p53*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(0, 1,000, 3,000 μM +S9 mix)
 - 1-メチルナフタレン；LSL-*Kras*^{G12D}マウス(B6背景)由来の肺オルガノイド +Cre(0, 10, 50 μM) あるいは +pLK0.1(陰性対照)(0, 4, 20 μM)
 - ペリラルデヒド；*rasH2*およびnon-Tgマウス由来の肝臓(Liv-C)オルガノイド - *rasH2*マウス(0, 200, 1000 μM)、nonTgマウス(0, 50, 250 μM)
-) 処置：オルガノイドの播種後に加え、2回の継代時を合わせて3回の化学物質暴露を行った。B6マウス由来のオルガノイドについては、初回オルガノイドの播種後にがん抑制遺伝子である*Pten*のshRNAまたは*shLuc*の導入を行い、LSL-*Kras*^{G12D}マウスについては、同様にCreまたはpLK0.1の導入を行い、その後化学物質暴露を行った。
-) 濃度設定：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。
-) ヌードマウス皮下接種：化学物質の3回目の暴露

終了後1週間程度オルガノイドを増殖させた後、ヌードマウス皮下に移植し、4~8週間での腫瘍形成能及び病理組織学的変化の有無を解析した。

(2) 胆嚢および子宮のオルガノイド調製法の検討

1) オルガノイドの調製

LSL-*Kras*^{G12D}マウスあるいはLSL-*Pik3ca*変異型マウスの胆嚢と子宮からオルガノイドを調製した。調製手順は(1)1)に準じた。

(3) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製と化学物質誘発性の変異頻度と変異スペクトルの検討

1) 大腸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)の大腸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) 変異スペクトル解析

PhIP暴露(5, 10 μ M)をまとめたPhIP暴露群のDNAの*gpt*遺伝子をPCR増幅させてダイレクトシーケンシングを行い、Masumura K.ら(Carcinogenesis 21:2049-56, 2000)により報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験の結果と比較した。

(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。

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

1) 化学物質の濃度設定のための予備実験

今年度に解析を開始した6種類の化学物質の各種オルガノイドに対する発がん性の解析に先立ち、各化学物質の濃度設定を行う予備実験を行った。N-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU)に対しては、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドに比し、肝臓オルガノイドが4倍程度高い毒性感受性を示し、*rash2*マウスについても肺オルガノイドに比し肝臓由来のオルガノイドでは毒性感受性が高い傾向が示されたことから、各化学物質について、マウス系統毎、臓器毎の濃度設定予備実験が必要であった。また、アクリルアミド(AA)の各濃度に対する*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドの細胞生存性測定結果に示されるように、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響に加え、化学物質はその処置時間中においても細胞生存性に影響を与えることを示す結果が得られた。即ち、NADの還元能測定開始時において濃度依存的な細胞数の違いがみられた。(分担報告書(落合)図1: グラフの横軸は測定試薬添加後の時間を示す。) AAの発がん性を検討するため*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドを用いて1回目に行った解析では、主に化学物質処置後の細胞数推移に対する影響結果に基づき、0、1.4及び3.5 mMの濃度にて実施した。その結果、3.5 mM濃度処置したオルガノイドについては、ヌードマウス皮下移植後に当該部位にて確認された細胞数は僅少であった。そこで2回目の解析では、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響を考慮し、0、0.28及び1.4 mMの濃度にて実施した。その結果、ヌードマウス皮下においてAA処置による腫瘍形成能は認められなかったが、病理組織学的解析において、発がん性を示唆する所見がみられた。これらの結果より、正常マウスの臓器から調製するオルガノイドを用いる本法において、化学物質の濃度設定を行う際には、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響だけでなく、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響についても考慮することが重要であることが示され、以降に実施したAA以外の化学物質についても同様に濃度設定を行った。

2) オルガノイドへの化学物質暴露と発がん性評価

1) アクリルアミド(AA)

前述の通り、発がん性の評価を*p53*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、0(対照)、0.28及び1.4 mMの濃度にて実施した。

ヌードマウス皮下においてアクリルアミド処置による腫瘍形成能は認められなかった。一方、病理組織学的解析では、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドについては、0.28 mM処置により嚢胞状を呈するオルガノイド(上皮細胞)により形成された組織が対照と比し大型化ならびに一部上皮細胞は

重層化を示し、1.4 mM処置により上皮細胞の重層化がより高頻度で見られるとともに、乳頭状増殖あるいは周囲組織への浸潤性が認められた。上皮細胞の核は大型化し、刷り硝子様を呈した。また、周囲組織においては反応性の間質細胞の中等度の増生がみられた（分担報告書（今井）図1）。野生型マウス由来のオルガノイドについては、明らかな影響は認められなかった。

2) ベンゾ[a]ピレン (BaP)

BaPの発がん性を検討するためのsh*Pten*と対照としてsh*Luc*を導入したB6マウス由来の肺オルガノイドに対する細胞生存性を測定した結果、0.2~2.0 μMではBaP処置時間中における細胞生存性への明らかな影響はみられなかった。一方、処置後の細胞数推移に対する影響については、sh*Luc*では0 μMに比し2.0 μMで抑制がみられたが、sh*Pten*では2.0 μMでも0 μMに比し明らかな抑制を示さなかったことから、発がん性の検討は、sh*Luc*では0（対照）、0.4、2.0 μM、sh*Pten*では0、0.6、3.0 μMで実施した（分担報告書（落合）図2）。

ヌードマウス皮下への移植59日後の皮下結節については、sh*Luc*とsh*Pten*ともにBaP処置による明らかな肉眼的変化を示さなかった（分担報告書（落合）図3）。

一方、病理組織学的解析では、対照に比し0.4 μM (sh*Luc*)あるいは0.6 μM (sh*Pten*)では、嚢胞状組織の大型化がみられ、周囲組織において間質細胞が軽度に増生していた。2.0 μM (sh*Luc*)あるいは3.0 μM (sh*Pten*)では、上皮細胞の明らかな重層化が高頻度で見られるとともに、一部周囲組織への浸潤性が認められた。上皮細胞の核は大型化し、核小体が目立つ特徴も観察された。また、周囲組織において間質細胞が中等度に増生していた（分担報告書（今井）図2）。

3) N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)

MNUの発がん性を検討するため、*p53*ヘテロノックアウトと対照としての野生型マウス由来の肝臓 (Liv-H) オルガノイドに対する細胞生存性を測定した結果、*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0 μMに比し何れの処置濃度においてもMNU処置時間中における細胞生存性への明らかな影響はみられなかった。また、処置後の細胞数推移に対する影響についても、*p53*ヘテロノックアウトでは1000 μMにて僅かな抑制傾向がみられたが、野生型マウスとともに濃度依存的な明らかな抑制作用はみられなかったことから（分担報告書（落合）図4）、発がん性の検討は、*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0（対照）、200、1000 μMで実施した。

処置後のオルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、56日後の皮下結節については *p53*ヘテロノックアウトでは対照に比し200 μMで肥大し、野生型では

1000 μMで白色化（組織充実化）傾向がみられた（分担報告書（落合）図5）。病理組織学的解析の結果、野生型の200 μM処置群では、対照に比し、上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織の増数がみられた。また、野生型の1000 μM処置群では、がん組織様増殖組織の形成が確認された（分担報告書（落合）図6）。一方、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドについては、対照に比し200 μMで嚢胞状組織の大型化と上皮細胞の肥大がみられたが、1000 μM処置群で確認された細胞数は僅少であった。

4) トリエタノールアミン (TEA)

TEAについては、*p53*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の細胞生存性に明らかな影響を及ぼさなかったが、pH変化（培地の変色）を指標として0（対照）、1,000、3,000 μM濃度で発がん性の検討を行った。

ヌードマウス皮下に移植した組織について、TEA処置による明らかな肉眼的変化はみられなかったが、病理組織学的解析の結果、*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型ともに、対照では扁平な上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織が観察されたのに対し、1000 μM処置群では、上皮細胞が一部立法状に肥大し、更に重層化/浸潤性がみられた。3000 μM処置群では、対照および1000 μM処置群に比し細胞数が減少していたが、細胞の重層化及び浸潤性が散見された（分担報告書（落合）図7）。

5) 1-メチルナフタレン (1-MN)

1-MNについては、LSL-*Kras*^{G12D}マウス (B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入)の肺オルガノイドの細胞生存性試験の結果に基づき、Cre群では0（対照）、10、50 μM濃度、pLK0.1群では0（対照）、4、20 μM濃度で発がん性の検討を行った。

ヌードマウス皮下に移植した組織について、1-MN処置による明らかな肉眼的変化はみられなかった。病理組織学的には、pLK0.1群に比しCre群では、対照に比し、腺管の大型化と軽度の浸潤性を示したが、Cre群およびpLK0.1群ともに対照との比較において1-MN処置群では、発がん性を示唆する変化はみられなかった。

6) ペリルアルデヒド (PA)

PAについては、*rasH2*およびnon-Tgマウスの肝臓 (Liv-C) オルガノイドの細胞生存性試験の結果に基づき、*rasH2*マウスでは0（対照）、200、1000 μM濃度、nonTgマウスでは0（対照）、50、250 μM濃度で発がん性の検討を行った。

ヌードマウス移植前の培養段階において、*rasH2*マウス-1000 μM処置群では細胞が死滅・消失した。ヌードマウス皮下に移植した組織について、PA処置による明らかな肉眼的変化はみられなかった。病理組織学的には、*rasH2*、non-Tgともに対照においても上皮細

胞の一部多層化や軽度に核が肥大・活性化している状態がみられた。PA処置群においては更に浸潤性を示し、核の活性化が増強する傾向を示した。

別途培養した肝臓(Liv-H)オルガノイドについても、*rash2*マウスでは0(対照)、200、500 μ M濃度、*nonTg*マウスでは0(対照)、40、200 μ M濃度で発がん性の検討を行った。ヌードマウス皮下に移植した組織の病理組織学的検査の結果、PA処置群については細胞数の増加、核の活性化傾向がみられた。これらの結果より、PAについては、対照群との差の有無について再確認が必要と判断された。

(2) 胆嚢および子宮のオルガノイド調製法の検討

*LSL-Kras^{G12D}*マウスあるいは*LSL-Pik3ca*変異型ウスの胆嚢と子宮について、*Cre*の導入により*Kras*および*Pik3ca*の活性化を行ったところ、それら単独では腫瘍系性に至らなかった。そこで、がん抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせたところ、特定の遺伝子との組み合わせでのみ腺がん類似の組織像を呈する腫瘍が誘導された。これらの細胞も化学物質の発がん性検出に利用可能と考えられた。

(3) *gpt delta*マウスを用いるオルガノイドの調製と化学物質誘発性の変異頻度と変異スペクトルの検討

被験物質として2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-*b*]ピリジン(PhIP)を用いて検討した。変異頻度は0 μ M (n=2)で $3.0 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ 、5 μ M (n=2)で $38 \pm 1.7 \times 10^{-6}$ 、10 μ M (n=1)で 46×10^{-6} であり、PhIPの曝露によって変異頻度が10倍以上に上昇することが確認され、更に、PhIPの曝露濃度依存的に変異頻度が上昇する傾向が観察された(分担報告書(戸塚)図1)。次に、標的遺伝子のシークエンス解析を行った結果、解析が可能なクローン数が限定されていたことから、PhIP曝露(5、10 μ M)をまとめたPhIP曝露群と、Masumuraらにより報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験との比較を行った(分担報告書(戸塚)図2)。PhIPを投与した*gpt delta*マウスの大腸粘膜では*non-Tg*マウスと比べG:C->T:Aトランスバージョンが顕著に増加していた。これに加え、G:C->C:Gトランスバージョン変異も観察された。一方、大腸由来のオルガノイドにPhIPを曝露した場合には、G:C->C:Gトランスバージョン変異は観察されなかったが、G:C->A:Tトランジション及びG:C->T:Aトランスバージョンが主な変異スペクトルとなっており、*in vivo*試験で観察された結果と大きくは矛盾しないことが示された。

D. 考察

今年度は、オルガノイドを用いる*in vitro*被験物質曝露系による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検証の一環として、遺伝毒性発がん物質を3物質、非遺伝毒性発がん物質を1物質、非遺伝毒性非発がん物質を2物質選択して検討した。一つの成果として、化学物質の濃度設定を行う際、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響だけでなく、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響についても考慮することが重要であることを示す結果が得られた。また、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討で遺伝毒性発がん物質とされる3物質のみならず非遺伝毒性発がん物質とされる1物質についてもヌードマウス皮下での造腫瘍性あるいは病理組織学的評価における上皮細胞の重層化や浸潤性を指標として発がん性を検出可能であることが示された。特に非遺伝毒性発がん物質のトリエタノールアミンについては、長期間投与による*in vivo*発がん性試験法においてマウスでは肝臓(Stout M.D. et al., *Toxicol Pathol* 36; 783-94, 2008; NTP, *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 518; 5-163, 2004)、ラットでは腎臓が発がん標的であることが示されている。それに対し、今回は肺オルガノイドにて発がん性を示す結果が得られたことから、オルガノイドを用いる*in vitro*被験物質曝露系による試験法では、*in vivo*発がん性試験法における発がん標的性に因らない検出法としての探索の可能性もあると考えられた。また、非遺伝毒性非発がん物質とされるペリルアルデヒドについては対照群との差の有無について再確認が必要と判断された。当該物質についてはEFSAにより2015年、遺伝毒性を示すことが懸念されるとされ、本研究課題においても引き続き慎重に評価してゆく必要がある。

これまで化学物質の発がん性評価に用いてきたマウスの肺、肝臓、膀胱などに由来するオルガノイドのほか、今年度は胆嚢、子宮のオルガノイド調製法の検討を行った結果、オルガノイド調製に適した条件を明らかにすることができたことから、今後の発がん性評価に応用可能であると考えられた。

遺伝毒性については、PhIPを被験物質とし、変異頻度と変異スペクトルを指標とした場合、大腸オルガノイドを用いる方法と*in vivo*試験法と同様の結果が得られることを示し、オルガノイドを用いる系が遺伝毒性試験法として適用可能であることを示唆する結果が得られたが、今後、他の被験物質での検討を要する。

E. 結論

マウス由来オルガノイドを用いる*in vitro*化学物質曝露系を用いることで、遺伝毒性発がん物質のみならず、非遺伝毒性発がん物質についても、それらの発がん性を検出可能であることを示唆する結果が得られ、遺伝毒性についても*in vivo*試験法との同等性を示された。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

F . 健康危険情報

該当なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

(1) Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, Ochiai M, Hippo Y, Hayashi SM, Shibutani M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. *Food Chem Toxicol*. 100:103-114. 2017

(2) Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H. Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. *Gynecol Oncol*. 144(2):377-383. 2017

(3) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*. 1422:13-21. 2016

(4) Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 37:817-26, 2016.

2. 学会発表

(1) 落合雅子、松浦哲也、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常上皮細胞の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 23 回日本がん予防学会総会(2016 年 7 月、名古屋)

(2) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫 . マウス正常大腸上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 .第 75 回日本癌学会学術総会, (2016 年 10 月、横浜)

(3) 筆宝義隆、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫 (英語口演) オルガノイドを用いた胆嚢発がんモデルの確立 . 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月、横浜)

(4) 丸喜明、落合雅子、今井俊夫、筆宝義隆 (口演) オルガノイドを用いた卵巣がんモデルの開発 . 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月、横浜)

(5) Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (2016 年 6 月、リヨン)

H . 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。

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、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た。具体的には、C57BL/6J (B6) マウス由来の肺オルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、LSL-*Kras*^{G12D} マウス (B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入) 由来の肺オルガノイド、*p53*ヘテロノックアウトマウス (BALB/c背景、陰性対照として野生型) 由来の肺/肝臓オルガノイド、あるいは*ras*H2 (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肝臓オルガノイドに対して、遺伝毒性発がん物質としてアクリルアミド (AA)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてトリエタノールアミン (TEA) あるいは非遺伝毒性非発がん物質として1-メチルナフタレン (1-MN)、ペリラルデヒド (PA) について検討した。オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、最長8週間後の皮下組織について造腫瘍性の有無を観察した結果、MNU処置した肝臓オルガノイドに造腫瘍性がみられた。また、AA、BaP及びTEA処置群においては、病理組織学的解析にてオルガノイド (上皮細胞) の多層化と浸潤性が認められ、これらの変化は化学物質非処置対照群と非遺伝毒性非発がん物質である1-MN処置群ではみられなかったことから、化学物質の発がん性の判定基準となり得るものと判断された。一方、PA処置群については細胞数の増加、核の活性化傾向がみられ、対照群との差の有無について再確認が必要となった。

以上、マウス由来オルガノイドを用いる *in vitro* 化学物質暴露系を用いて、その造腫瘍性あるいは病理組織学的エンドポイントにより、遺伝毒性発がん物質のみならず、非遺伝毒性発がん物質についても、それらの発がん性を検出可能であることを示唆する結果が得られた。

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、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。今年度は、C57BL/6J (B6) マウス由来の肺オルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、LSL-*Kras*^{G12D} マウス (B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入) 由来の肺オルガノイド、

p53ヘテロノックアウトマウス (BALB/c背景、陰性対照として野生型) 由来の肺/肝臓オルガノイド、あるいはrasH2 (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肝臓オルガノイドに対して、遺伝毒性発がん物質としてアクリルアミド (AA)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてトリエタノールアミン (TEA) あるいは非遺伝毒性非発がん物質として1-メチルナフタレン (1-MN)、ペリラルデヒド (PA) を用いた検討を行った。

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

1) オルガノイドの調製

C57BL/6J (B6) マウス、p53ヘテロノックアウトマウス、rasH2マウスおよびLSL-Kras^{G12D}マウスの肺、肝臓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]

-) 肺・肝臓・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砕して継代
-) 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]

-) B6マウス由来オルガノイド：がん抑制遺伝子のPten shRNA (shPten) と陰性対照としてのshLucを導入
-) p53ヘテロノックアウトマウス由来オルガノイド：p53ヘテロノックアウトと野生型マウスを使用
-) rasH2マウス由来オルガノイド：rasH2およびnon-Tgマウスを使用
-) 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と陰性対照としてのpLK0.1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4~8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

-) 被験物質と適用オルガノイド：
アクリルアミド；p53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 (0, 0.28, 1.4 mM +S9 mix)
ベンゾ[a]ピレン；B6マウス由来の肺オルガノイド +shPten (0, 0.6, 3.0 μM +S9 mix) または shLuc (陰性対照) (0, 0.4, 2.0 μM +S9 mix)
N-メチル-N-ニトロソ尿素；p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウス由来の肝臓 (Liv-H) オルガノイド (0, 200, 1000 μM, S9 mixなし)
トリエタノールアミン；p53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 (0, 1,000, 3,000 μM +S9 mix)
1-メチルナフタレン；LSL-Kras^{G12D}マウス (B6背景) 由来の肺オルガノイド +Cre (0, 10, 50 μM) あるいは +pLK0.1 (陰性対照) (0, 4, 20 μM)
ペリラルデヒド；rasH2およびnon-Tgマウス由来の肝臓 (Liv-C) オルガノイド - rasH2マウス (0, 200, 1000 μM)、nonTgマウス (0, 50, 250 μM)
-) 処置：オルガノイドの播種後に加え、2回の継代時を合わせて3回の化学物質暴露を行った。B6マウス由来のオルガノイドについては、初回オルガノイドの播種後にはがん抑制遺伝子であるPtenのshRNAまたはshLucの導入を行い、LSL-Kras^{G12D}マウスについては、初回オルガノイドの播種後にCreまたはpLK0.1の同夕を行い、その後化学物質暴露を行った。
-) ヌードマウス皮下接種：化学物質の3回目の暴露終了後1週間程度オルガノイドを増殖させた後、ヌードマウス皮下に移植し、4~8週間での腫瘍形成能及び病理組織学的変化の有無を解析した。

(2) ヌードマウス皮下にてオルガノイドにより形成された組織に対する免疫組織化学による検討

1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価
熟練した技術者によりヌードマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、皮下から結節/腫瘍あるいはオルガノイド摂取部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて1日程度固定した。常法に従い、パラフィン包埋した後、4 μm程度の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

2) サイトケラチン (CK) 19に対する免疫組織化学
パラフィン包埋切片に対し、脱パラフィン後にクエン酸緩衝液 (pH6.0) にて10分間オートクレーブ処

置して抗原不活化を行った。一次抗体として抗CK19ウサギモノクローナル抗体(abcam社製)を用いてABC法により染色した。発色はペルオキシダーゼによるジアミノベンチジンにより行った。

(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。

C. 研究結果

(1) アクリルアミド

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてアクリルアミド処置による腫瘍形成能は認められなかった。

2) 病理組織学的所見

*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドでは、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた(図1)。野生型マウス由来のオルガノイドについては、明らかな影響は認められなかった。

(2) ベンゾ[a]ピレン

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてsh*Luc* とsh*Pten*ともにベンゾ[a]ピレン処置による明らかな肉眼的変化を示さなかった

2) 病理組織学的所見

sh*Luc* とsh*Pten*ともに、0 μ M群に比しBaP処置群では、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた(図2)。

(3) N-メチル-N-ニトロソ尿素

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、*p53*ヘテロノックアウトでは200 μ Mで肥大し、野生型では1000 μ Mで白色化(組織充実化)傾向がみられた。

2) 病理組織学的所見

野生型の200 μ M処置群では、0 μ M処置群に比し、上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織の増数がみられた。また、野生型の1000 μ M処置群では、がん組織様増殖組織の形成が確認された。一方、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドについては、対照に比し200 μ Mで嚢胞状組織の大型化と上皮細胞の肥大がみられたが、1000 μ M処置群で確認された細胞数は僅少であった。

(4) トリエタノールアミン

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてトリエタノールアミン処置による腫瘍形成能は認められなかった。

2) 病理組織学的所見

*p53*ヘテロノックアウトおよび野生型ともに、0 μ M群では扁平な上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織が観察されたのに対し、1000 μ M処置群では、上皮細胞が一部立法状に肥大し、更に重層化/浸潤性がみられた。3000 μ M処置群では、0 μ Mおよび1000 μ M処置群に比し細胞数が減少していたが、細胞の重層化及び浸潤性が散見された。

(5) 1-メチルナフタレン

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において1-メチルナフタレン処置による腫瘍形成能は認められなかった。

2) 病理組織学的所見

pLK0.1群に比しCre群では、腺管の大型化と軽度の浸潤性を示したが、Cre群およびpLK0.1群ともに0 μ M群との比較において1-メチルナフタレン処置群では、発がん性を示唆する変化はみられなかった。

(6) ペリルアルデヒド

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてペリルアルデヒド処置による腫瘍形成能は認められなかった。

2) 病理組織学的所見

rasH2、non-Tgともに0 μ M群においても上皮細胞の一部多層化や軽度に核が肥大・活性化している状態がみられた。ペリルアルデヒド処置群においては更に浸潤性を示し、核の活性化が増強する傾向を示した。また、別途培養した肝臓(Liv-H)オルガノイドについても、rasH2マウスでは0、200、500 μ M濃度、nonTgマウスでは0、40、200 μ M濃度で発がん性の検討

を行った。ヌードマウス皮下に移植した組織の病理組織学的検査の結果、ペリルアルデヒド処置群については細胞数の増加、核の活性化傾向がみられた。これらの結果より、ペリルアルデヒドについては、対照群との差の有無について再確認が必要と判断された。

(7) 膀胱オルガノイドのマウス皮下増殖形態

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たものに、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドを用いる検討を進めた。膀胱上皮は肺や肝臓に比し増殖速度が遅いが、*p53*ヘテロノックアウトあるいは野生型のBALB/c背景マウスにおいて比較的良好な増殖を示した。膀胱由来のオルガノイドは、他臓器由来のオルガノイドと同様に上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織として確認された。

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、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常上皮細胞の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23回日本がん予防学会総会（2016年7月、名古屋）
- (2) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常大腸上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発、第75回日本癌学会学術総会、（2016年10月、横浜）

E. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

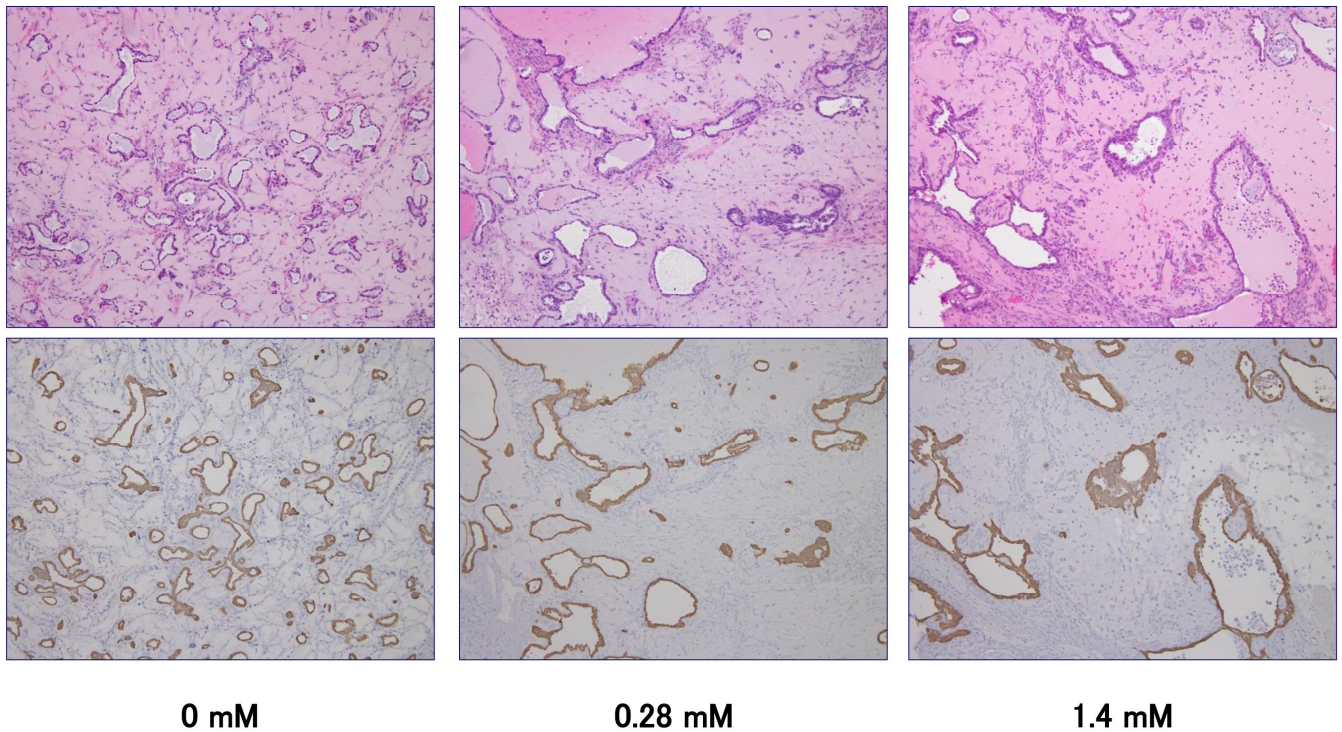
該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

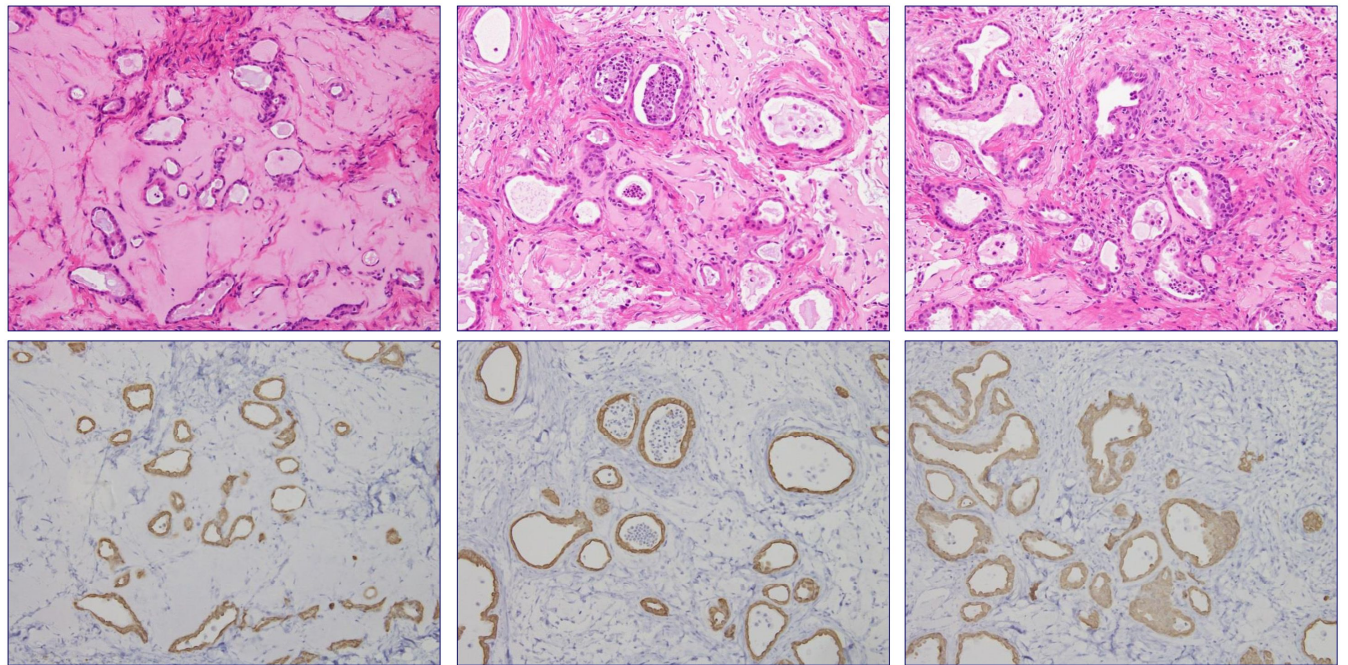


0 mM

0.28 mM

1.4 mM

図1 *p53*ヘテロノックアウトマウスの肺から調製したオルガノイドにおけるアクリルアミドの影響解析（ヌードマウス皮下：上段、ヘマトキシリン・エオジン染色；下段、CK19免疫染色）（上段、0 mM）比較的小型で単層の上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織がみられる。（同、0.28 mM）0 mMに比し嚢胞状組織の大型化と一部上皮細胞の重層化がみられる。（同、1.4 mM）0.28 mMに比し、上皮細胞の重層化が高頻度で見られるとともに、周囲組織への浸潤性が認められる。上皮細胞の核は大型化し、刷り硝子様を呈する。また、周囲組織においては反応性の間質細胞の中等度の増生がみられる。（下段、0 mM）上皮細胞がCK19に強陽性を示している。（同、0.28 mM）上皮細胞の重層化部位がヘマトキシリン・エオジン染色標本と対応し、明瞭に示されている。（同、1.4 mM）0.28 mMに比し、上皮細胞の重層化が顕著に示され、当該部位では周囲組織に浸潤性を示す上皮細胞が水滴状に認められる。



0 μ M

0.4 μ M

2.0 μ M

図2 B6マウス由来の肺オルガノイド + shLuc (陰性対照)におけるベンゾ[a]ピレンの影響解析 (ヌードマウス皮下: 上段、ヘマトキシリン・エオジン染色; 下段、CK19免疫染色) (上段、0 μ M) 比較的小型で単層の上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織がみられる。(同、0.4 μ M) 0 μ Mに比し嚢胞状組織の大型化がみられる。また、周囲組織において間質細胞が軽度に増生している。(同、2.0 μ M) 上皮細胞の明らかな重層化が高頻度で見られるとともに、一部周囲組織への浸潤性が認められる。この写真には示されていないが、乳頭状増殖もみられた。上皮細胞の核は大型化し、核小体が目立つ特徴も観察された。また、周囲組織において間質細胞が中等度に増生している。(下段、0 μ M、0.4 μ M) 上皮細胞がCK19に強陽性を示している。(同、2.0 μ M) 上皮細胞の重層化部位がヘマトキシリン・エオジン染色標本と対応し、明瞭に示されている。また、一部では周囲組織に浸潤性を示す上皮細胞が突起状に認められる。

In vitro発がん再構成系の確立およびその応用研究

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

マウス由来の小腸や肺オルガノイドに種々の遺伝子異常を導入した上で、発がん性化学物質を投与することで、従来in vivoで行われていた発がん性試験を代替可能か検討した。Apc遺伝子をノックダウンした小腸オルガノイドに対するPhIPの投与では発がん性の亢進が確認された。一方、p16, Pten等をノックダウンした肺オルガノイドではNNKの投与による顕著な発がん性の亢進は今の所確認できず、発がん性の検出には条件検討が必要と考えられた。また、新規の発がんモデル系として胆のうおよび子宮由来のオルガノイドからも発がん誘導が可能であることを確認し、今後種々の化学物質のアッセイへの利用に有用な実験系と考えられた。

A. 研究目的

個々の化学物質の発がん性は、従来もっぱら個体レベルでの長期間の投与や観察により評価をされていた。一方、オルガノイドを用いた細胞レベルの発がんモデル実験系は、種々の遺伝子異常を導入した上で化学物質を投与することで、短期間かつ高感度に化学物質の協調的な発がん性を検出することが期待される。そこで、こうしたコンセプトの正しさを実際に証明することを目的とした。また、アッセイ可能な臓器の種類を増やす目的で他の組織由来のオルガノイドからも発がん誘導が可能であるか検討した。

B. 研究方法

マウスから各種臓器を単離した上で、酵素的および物理的に細胞の分散を行った上で、マトリゲルを用いた3次元培養を行った。オルガノイドの培養にはEGF, Noggin, R-spondinなどを添加したメディウムを用い、遺伝子の導入にはレンチウイルスベクターを用いた。shRNAの導入後には標的遺伝子のノックダウンを確認し、PhIPやNNKなどの投与を種々の濃度で行った。また、新規の発がんモデル系を確立するために胆のうと子宮について、遺伝子変異の組み合わせによる発がん性誘導の検証を行った。

C. 研究結果

1. 小腸オルガノイド

大腸発がん物質であるPhIPはマウスではリンパ腫を発症させるため、これまで腸管での発がん性を調べることは技術的に困難だった。B6マウス由来の小腸細胞について、shApcおよびshLuc(陰性対照)を導入したのちにS9mixの存在下でPhIPを種々の条件で投与してヌードマウス皮下に移植したところ、shApcの存在下でのみ腫瘍が形成される場合があることを見出した。左右の両側に移植しても片側のみ腫瘍が形成される場合もあることから、Apc変異、PhIPの変異原性、皮下組織の微小環境の間で確率的に発がん協調作用が成立している可能性が示唆された。現在症例を増やして腫瘍発生率の計測を進めている。

2. 肺オルガノイド

NNKはタバコ中の主要な発がん物質であり、げっ歯類への投与により肺腺癌を誘導することが知られている。また、特にAJマウスへの投与ではKras変異を高率に誘導することから、肺オルガノイドへの投与でも同様の効果が期待される。肺オルガノイドへのKras変異誘導は単独では発がん性を持たず、p16やPtenなどのノックダウンを必要とすることから、あらかじめこれらの遺伝子をshRNAでノックダウンしておくことで、NNKによる変異導入を高感度で検出することが可能になると予測した。IC50のNNK濃度で投与を3回繰り返したのちに、ヌードマウス皮下へ移植したところ、NNKの有無による発がんへの顕著な効果を見られなかった。より低濃度で長期間暴露した場合に発がん性が検出可能となると推測して、現在経過観察を行っている。

3. 新規発がんモデルの確立

胆のうと子宮について、それぞれマウスより単離してオルガノイド培養を行った。それぞれCreの導入によりKrasおよびPik3caの活性化を行ったところ、それら単独では腫瘍系性に至らなかった。そこで、がん抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせたと、特定の遺伝子との組み合わせでのみ腺癌類似の組織像を呈する腫瘍が誘導された。これらの細胞も化学物質の発がん性検出に利用可能と考えられた。

(倫理面への配慮)

動物実験計画は千葉県がんセンター内の動物実験研究委員会の承認を得た上で行い、動物愛護への十分な配慮を行った上で遂行した。ヒト検体を用いた実験を行っていない

D. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, Ochiai M, Hippo Y, Hayashi SM, Shibutani M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. *Food Chem Toxicol*. 100:103-114. 2017

(2) Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H. Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. *Gynecol Oncol*. 144(2):377-383. 2017

(3) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, 1422:13-21. 2016

2. 学会発表

(1) 筆宝義隆、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫（英語口演）オルガノイドを用いた胆嚢発がんモデルの確立。第75回日本癌学会学術総会（横浜）2016年10月

(2) 丸喜明、落合雅子、今井俊夫、筆宝義隆（口演）オルガノイドを用いた卵巣がんモデルの開発。第75回日本癌学会学術総会（横浜）2016年10月

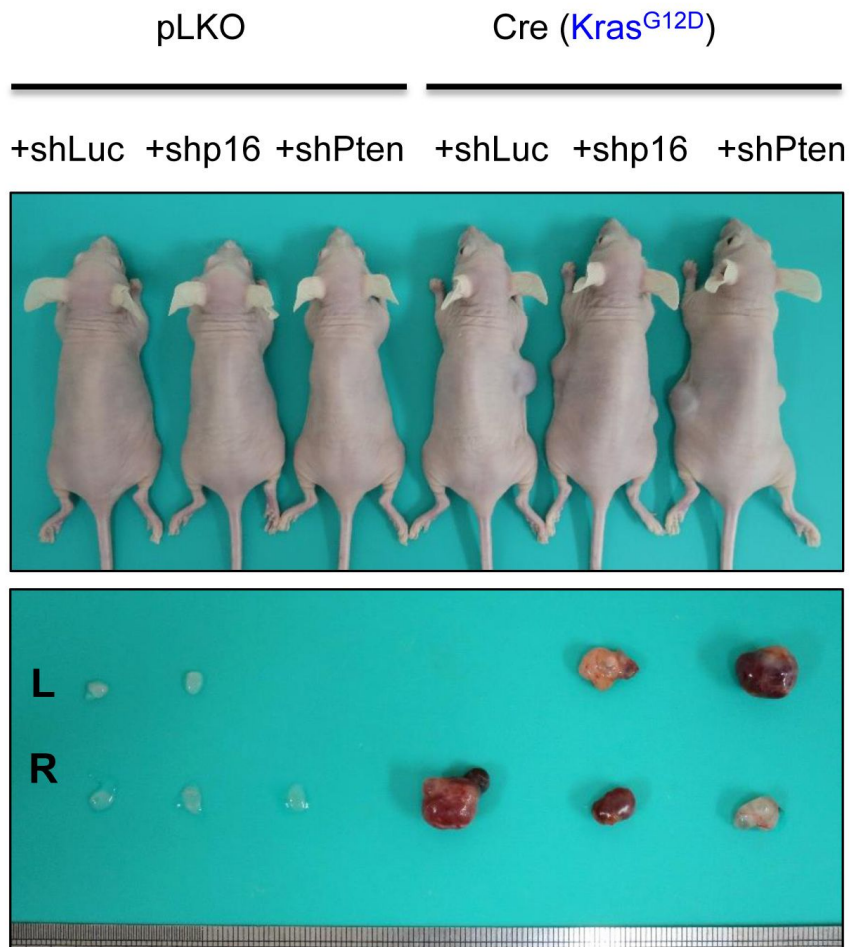
(3) 落合雅子、松浦哲也、中釜斉、筆宝義隆、今井俊夫。マウス正常大腸上皮細胞の3次元培養による in vitro 発がんモデルの開発。第75回日本癌学会学術総会（横浜）2016年10月
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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



pLKO+shp16

Cre+shp16

Cre+shp16
(再移植)

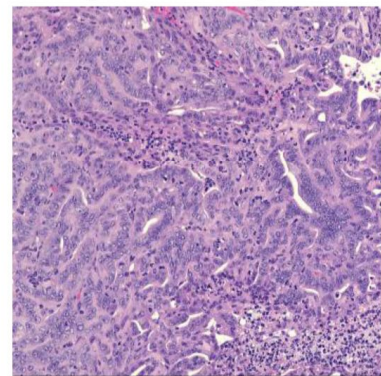
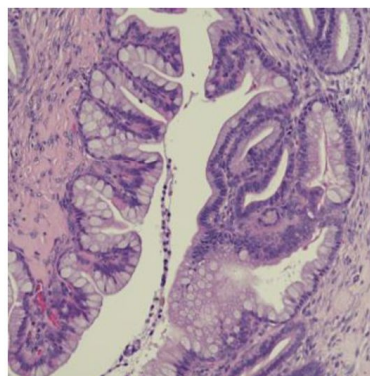
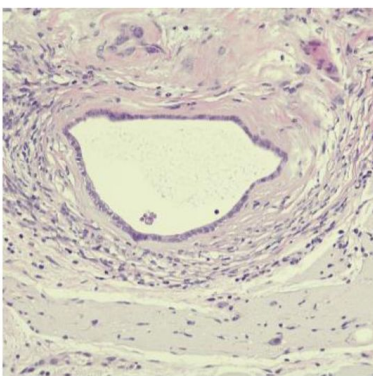


図1 LSL-*Kras*^{G12D}マウス胆のうオルガノイド由来皮下腫瘍

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大腸を切り出し細切、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。作成した大腸オルガノイドに既知の遺伝毒性発がん物質であるPhIPを0, 5, 10 μM の濃度で、S9mixの存在下で曝露した。オルガノイドより常法に則ってゲノム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、変異頻度はPhIP曝露群で上昇することを確認した。さらに、変異スペクトルの解析をした結果、大腸オルガノイドにPhIPを曝露した群では、G:C→A:T, G:C→T:Aが主な変異スペクトルとなっており、既報の *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 試験結果とほとんど矛盾していなかった。今後、更にサンプル数を追加して解析を行うとともに、PhIP以外の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質を用いて解析を行う予定である。また、肺や膀胱などの大腸・肝臓以外の臓器についてもオルガノイドを作成し、食品添加物などの、各種臓器を対象とした *in vitro* 遺伝毒性試験法の確立を目指す。

(具体的かつ詳細に記入すること)

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。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た。今年度は、食品由来の既知遺伝毒性発がん物質であるPhIPの遺伝毒性を大腸オルガノイドを用いて解析し、*in vitro* 遺伝毒性試験結果との比較を行うことでその妥当性について評価した。

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しオルガノイドを得た。大腸より作成したオルガノイドに食品由来の既知遺伝毒性発がん性物質として知られている PhIP を代謝活性化酵素 (S9 mix) の存在下で 0, 5, 10 μM の濃度で曝露し、点突然変異頻度及び変異スペクトルの解析を行った。

C . 研究結果

常法に則ってゲノム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、変異頻度は0 μM (n=2)で $3.0 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ 、5 μM (n=2)で $38 \pm 1.7 \times 10^{-6}$ 、10 μM (n=1)で 46×10^{-6} であり、PhIPの曝露によって変異頻度が10倍以上に上昇することを確認した（図1）。さらに、PhIPの曝露濃度依存的に変異頻度が上昇する傾向が観察された。次に、標的遺伝子のシーケンス解析を行った。シーケンス解析が可能なクローン数が限定されていたことから、PhIP曝露(5, 10 μM)をまとめたPhIP曝露群と、増村らにより報告されている *gpt delta mouse* を用いた *in vivo* 試験との比較をしてみた。その結果を図2に示す。PhIPを投与した *gpt delta* マウスの大腸粘膜ではコントロール動物と比べてG:C→T:Aトランスバージョンが顕著に増加していた。これに加え、G:C→C:Gトランスバージョン変異も観察されていた。一方、大腸由来のオルガノイドにPhIPを曝露させた場合には、G:C→C:Gトランスバージョン変異の観察は見られなかったが、G:C→A:Tトランスバージョン及びG:C→T:Aトランスバージョンが主な変異スペクトルとなっており、*in vivo* 試験で観察された結果と大きくは矛盾しないことがわかった。

肝臓から作成したオルガノイドはPhIPの曝露が済んでいるため近日中に変異頻度及びスペクトルの解析を行う予定である。今後、更にサンプル数を追加して解析を行うとともに、PhIP以外の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質を用いて解析を行う予定である。また、肺や膀胱などの大腸・肝臓以外の臓器についてもオル

ガノイドを作成し、食品添加物などの、各種臓器を対象とした*in vitro*遺伝毒性試験法の確立を目指す。

(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。

図1 大腸オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

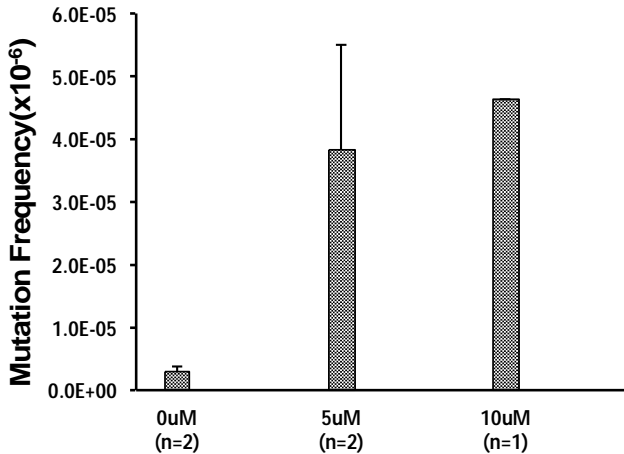
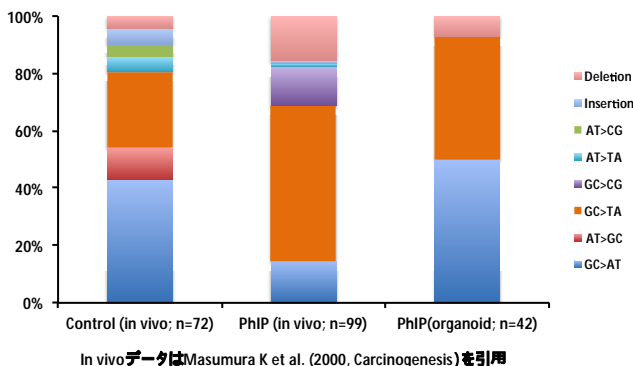


図2 変異スペクトル解析結果



D. 研究発表

1. 論文発表

- Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and Unique Mutational Signatures of Occupational Cholangiocarcinoma in Printing Workers Exposed to Haloalkanes. *Carcinogenesis* 2016 37:817-26.

2. 学会発表

- Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y,

Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (リヨン、2016年6月)

- Totsuka Y, Watanabe M, Hayashi K, Nakae D: Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (コペンハーゲン、2016年8月)
- 戸塚ゆかり、林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉: DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第75回日本癌学会学術総会 (横浜 2016年10月)
- 伴野 勲、山地太樹、岩崎 基、成島大智、加藤 護、戸塚ゆかり、三好規之、今井俊夫: 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性 第75回日本癌学会学術総会 (横浜 2016年10月)
- 三牧幸代、中森正二、久保正二、木下正彦、戸塚ゆかり、中釜 斉、落合淳志、江角浩安、土原一哉: 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較 第75回日本癌学会学術総会 (横浜 2016年10月)
- 戸塚ゆかり: ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第59回日本放射線影響学会。(広島 2016年10月)
- 佐藤 春菜、坂本義光、中江 大、戸塚ゆかり: 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響 第45回日本環境変異原学会 (つくば、2016年11月)
- 前迫裕也、善家 茜、古川英作、加藤 護、椎崎一宏、中釜 斉、戸塚ゆかり: 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第45回日本環境変異原学会 (つくば、2016年11月)
- 戸塚ゆかり、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第45回日本環境変異原学会 (つくば、2016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。)

- 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

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製し、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。

化学物質の発がん性の解析は、C57BL/6J (B6) マウス由来のオルガノイドにsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入、LSL-*Kras*^{G12D} マウス (B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入)、*p53*ヘテロノックアウトマウス (BALB/c背景、陰性対照として野生型) 由来のオルガノイド、あるいは*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスのオルガノイドを用いた。各オルガノイドへの化学物質暴露は、継代・播種時の培地への添加による1日処置を3回行った。また、濃度設定は、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による細胞毒性の用量反応性の解析により行った。

遺伝毒性発がん物質としてアクリルアミド (AA)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、非遺伝毒性発がん物質としてトリエタノールアミン (TEA)、非遺伝毒性非発がん物質として1-メチルナフタレン (1-MN)、ペリルアルデヒド (PA) について検討した。オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、最長8週間後の皮下組織について病理組織学的解析を行った結果、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でAA、BaP、MNU及びTEAでは発がん性を示す結果が得られた。一方、1-MNについては対照群と差がみられず、PAについては対照群との差の有無について再確認が必要であった。

以上、マウス由来オルガノイドを用いるin vitro化学物質暴露系を用いることで、遺伝毒性発がん物質のみならず、非遺伝毒性発がん物質についても、それらの発がん性を検出可能であることを示唆する結果が得られた。

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製し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後、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。

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、膀胱等についてもオルガノイド系の調製法を確立している。今年度は、C57BL/6Jマウス由来のオルガノイドにsh*Pten*を導入したオルガノイド、*p53*ヘテロノックアウトマウスあるいは*rasH2*マウス由来のオルガノイドに対し、各種化学物質を処置した後にヌードマウス皮下へ移植することにより、腫瘍形成能あるいは病理組織学的変化の有無を確認した。同時に、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た。

B. 研究方法

C57BL/6J (B6) マウスの肺あるいは肝臓からオルガノイドを作成し、sh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入した。LSL-*Kras*^{G12D} マウス (B6背景、Cre導入ある

いは陰性対照としてpLK0.1導入)の肺、BALB/c背景の*p53*ヘテロノックアウト (陰性対照として野生型) マウスの肺及び肝臓、あるいは*rasH2* (Jic:CB6F1-TgrasH2) マウスの肺または肝臓からオルガノイドを調製した。

オルガノイドへの化学物質の暴露は、オルガノイドの播種・継代時に行った。各化学物質の濃度設定を行う際には、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、MNU処置時を除く) 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。各化学物質の発がん性評価の際には、オルガノイドの播種後に加え、2回の継代時を合せて3回の化学物質暴露を行った。B6マウス由来のオルガノイドについては、初回オルガノイドの播種後にがん抑制遺伝子である*Pten*のshRNAまたはsh*Luc*の導入を行い、その後化学物質暴露を行った。化学物質の3回目の暴露終了後1週間程度オルガノイドを増殖させた後、ヌードマウス皮下に移植し、4~8週間での腫瘍形成能及び病理組織学的変化の有無を解析した。

被験物質として今年度は、遺伝毒性発がん物質とされるアクリルアミド (AA)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、非遺伝毒性発がん物質とされるトリエタノールアミン (TEA)、非遺伝

毒性非発がん物質とされる1-メチルナフタレン (1-MN) ペリルアルデヒド (PA) を用いた。AAはマウス長期発がん性試験において、肺のほか、ハーダ腺、胃、乳腺、卵巣、皮膚に (NTP, TR575, 2012)、BaPは肺のほか、前胃、肝臓、皮膚、投与部位 (間葉系組織) (IARC monograph, vol 100F, 2012) に発がん性を示すことが報告されている。MNUはラットへの経口投与により脳、脊髄、前胃、腎臓などに、新生児マウスへの皮下投与により肺にも腫瘍を誘発する (IARC monograph, vol 17, 1978)。TEAには遺伝毒性はないが (IARC monograph, vol 77, 2000) 肝臓に発がん性を示すとされている (Stout MD et al., Toxicol Pathol 36, 783-79, 2008)。

肺と肝臓のほか、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たものに、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドを用いる検討を進めた。また、肝臓に含まれる肝前駆細胞は胆管上皮細胞と肝細胞への分化能をもつと考えられているが、従前のオルガノイド調製法では主に胆管上皮細胞への分化傾向 (LivC) がみられている。今年度は肝細胞への分化傾向を示す (LivH) オルガノイド調製法について検討を開始した。

C. 研究結果

今年度に解析を開始した6種類の化学物質の各種オルガノイドに対する発がん性の解析に先立ち、各化学物質の濃度設定を行う予備実験を行った。MNUに対しては、*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドに比し、肝臓オルガノイドが4倍程度高い毒性感受性を示し、*rasH2*マウスについても肺オルガノイドに比し肝臓由来のオルガノイドでは毒性感受性が高い傾向が示されたことから、各化学物質について、マウス系統毎、臓器毎の濃度設定予備実験が必要であった。また、AAの各濃度に対する*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドの細胞生存性測定結果に示されるように、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響に加え、化学物質はその処置時間中においても細胞生存性に影響を与えることを示す結果が得られた。即ち、NADの還元能測定開始時 (グラフの横軸は測定試薬添加後の時間を示す) において濃度依存的な細胞数の違いがみられた。(図1)。

AAの発がん性を検討するため*p53*ヘテロノックアウトマウス由来の肺オルガノイドを用いて1回目に行った解析では、主に化学物質処置後の細胞数推移に対する影響結果に基づき、0、1.4及び3.5 mMの濃度にて実施した。その結果、3.5 mM濃度処置したオルガノイドについては、ヌードマウス皮下移植後に当該部位にて確認された細胞数は僅少であった。そこで2回目の解析では、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響を考慮し、0、0.28及び1.4 mMの濃度にて実施した。その結果、ヌードマウス皮下においてAA処置による腫瘍形成能は認められなかったが、病理組織学的解析において、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた。これらの結果より、正常マウスの臓器から調製するオルガノイドを用いる本法において、化学物質の濃度設定を行う際には、化学物質処置後の細胞数推移に対する影響だけでなく、化学物質の処置時間中において細胞生存性に与える影響についても考慮するこ

とが重要であることが示され、以降に実施したAA以外の化学物質についても同様に濃度設定を行った。

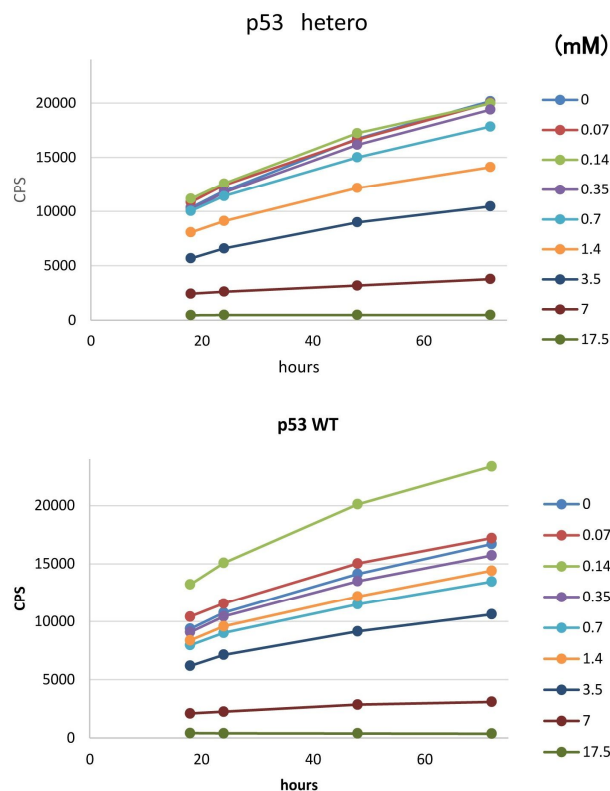


図1 アクリルアミドの*p53*ヘテロノックアウトマウス由来肺オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

BaPの発がん性を検討するためのsh*Pten*と対照としてsh*Luc*を導入したB6マウス由来の肺オルガノイドに対する細胞生存性測定結果を図2に示した。

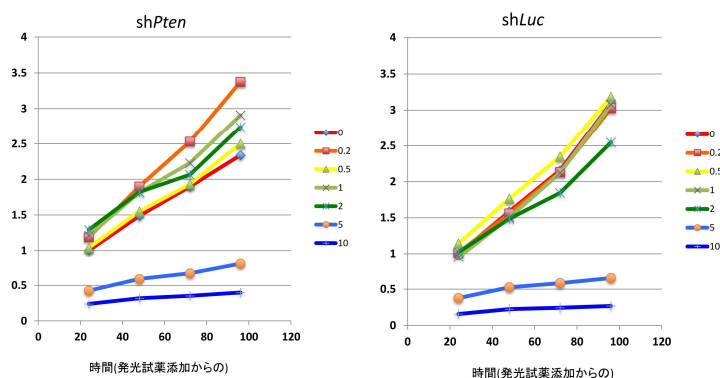


図2 ベンゾ[a]ピレンのC57BL/6マウス由来肺オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

0.2~2.0 μMではBaP処置時間中における細胞生存性への明らかな影響はみられなかった。一方、処置後の細胞数推移に対する影響については、sh*Luc*では0 μMに比し2.0 μMで抑制がみられたが、sh*Pten*では2.0 μMでも0 μMに比し明らかな抑制を示さなかったことから、発がん性の検討は、sh*Luc*では0、0.4、2.0 μM、sh*Pten*では0、0.6、3.0 μMで実施した。処置後のオルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、59日後の皮下結節については sh*Luc* とsh*Pten*とも

にBaP処置による明らかな肉眼的変化を示さなかったが(図3)、病理組織学的解析の結果、0 μ M群に比しBaP処置群では、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた。

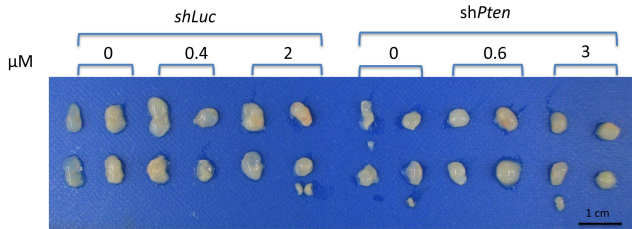


図3 ベンゾ[a]ピレン処置したC57BL/6Jマウス由来肺オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼所見

MNUの発がん性を検討するためp53ヘテロノックアウトと対照としての野生型マウスの肝臓(Liv-H)オルガノイドに対する細胞生存性測定結果を図4に示した。

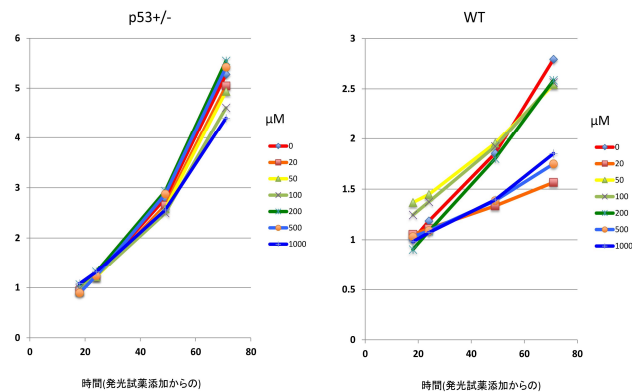


図4 N-メチル-N-ニトロソ尿素のp53ヘテロノックアウトマウス由来肝臓オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0 μ Mに比し何れの処置濃度においてもMNU処置時間中における細胞生存性への明らかな影響はみられなかった。また、処置後の細胞数推移に対する影響についても、p53ヘテロノックアウトでは1000 μ Mにて僅かな抑制傾向がみられたが、野生型マウスとともに濃度依存的な明らかな抑制作用はみれなかったことから、発がん性の検討は、p53ヘテロノックアウトおよび野生型マウスともに、0、200、1000 μ Mで実施した。処置後のオルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、56日後の皮下結節についてはp53ヘテロノックアウトでは200 μ Mで肥大し、野生型では1000 μ Mで白色化(組織充実化)傾向がみられた(図5)。病理組織学的解析の結果、野生型のMNU200 μ M処置群では、発がん性を示すがん組織様増殖組織がみられた(図6)。

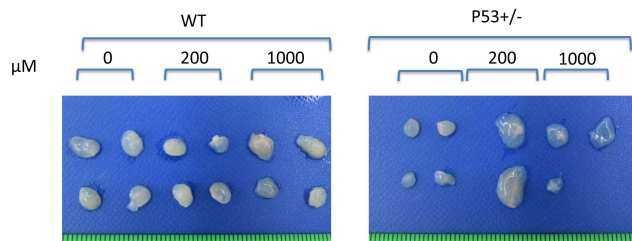


図5 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置したp53ヘテロノックアウトと野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼所見

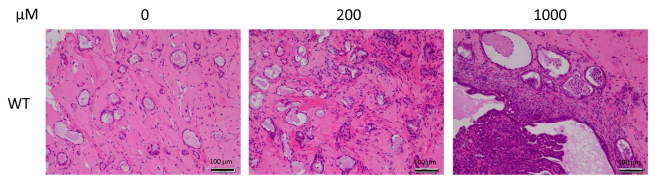


図6 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置した野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での組織所見

TEAについては、p53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の細胞生存性に明らかな影響を及ぼさなかったが、pH変化(培地の変色)を指標として0、1,000、3,000 μ M濃度で発がん性の検討を行った。ヌードマウス皮下に移植した組織について、TEA処置による明らかな肉眼的変化はみられなかったが、病理組織学的解析の結果、p53ヘテロノックアウトおよび野生型ともに、0 μ M群に比しTEA処置群では、発がん性を示唆する上皮細胞の重層化及び浸潤性がみられた(図7)。

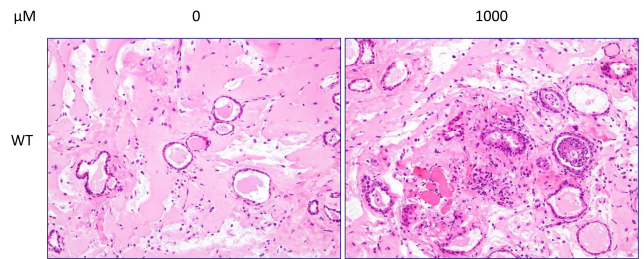


図7 トリエタノールアミン処置した野生型マウス由来肺オルガノイドのヌードマウス皮下での組織所見

1-MNについては、LSL-Kras^{G12D}マウス(B6背景、Cre導入あるいは陰性対照としてpLK0.1導入)の肺オルガノイドの細胞生存性試験の結果に基づき、Cre群では0、10、50 μ M濃度、pLK0.1群では0、4、20 μ M濃度で発がん性の検討を行った。ヌードマウス皮下に移植した組織について、1-MN処置による明らかな肉眼的変化はみられなかった。病理組織学的には、pLK0.1群に比しCre群では、腺管の大型化と軽度の浸潤性を示したが、Cre群およびpLK0.1群ともに0 μ M群との比較において1-MN処置群では、発がん性を示唆する変化はみられなかった。

PAについては、rasH2およびnon-Tgマウスの肝臓(Liv-C)オルガノイドの細胞生存性試験の結果に基づき、rasH2マウスでは0、200、1000 μ M濃度、nonTgマウスでは0、50、250 μ M濃度で発がん性の検討を行った。ヌードマウス移植前の培養段階において、rasH2マウス-1000 μ M処置群では細胞が死滅・消失した。ヌードマウス皮下に移植した組織について、PA処置による明らかな肉眼的変化はみられなかった。病理組織学的には、rasH2、non-Tgともに0 μ M群においても上皮細胞の一部多層化や軽度に核が肥大・活性化している状態がみられた。PA処置群においては更に浸潤性を示し、核の活性化が増強する傾向を示した。また、別途培養した肝臓(Liv-H)オルガノイドについても、rasH2マウスでは0、200、500 μ M濃度、nonTgマウスでは0、40、200 μ M濃度で発がん性の検討を行った。ヌードマウス皮下に移植した組織の病理組織学的検査の結果、PA処置群については細胞数の増加、核の活性化傾向がみられた。これらの結果より、PAについては、対照群との差の有無について再確認が必要と

判断された。

以上、遺伝毒性発がん物質としてAA、BaP、MNU、非遺伝毒性発がん物質としてTEA、非遺伝毒性非発がん物質として1-MN、PAの発がん性について正常マウスの各種臓器から調製したオルガノイドを用いて検討した。その結果を表1にまとめた。オルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、最長8週間後の皮下組織について病理組織学的解析を行った結果、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でBaP、MNU、AA及びTEAでは発がん性を示す結果が得られた。一方、1-MNについては対照群と差がみられず、PAについては対照群との差の有無について再確認が必要であった。

表1 マウス正常臓器由来オルガノイドを用いる化学物質の発がん性評価

| Chemical | Organ | Strain | 濃度 (μM) | 組織所見 |
|----------|-------|---------------|-----------------|--------------|
| AA | Lung | P53+/-, WT | 0, 0.28, 1.4 | 重層化/浸潤性 |
| B(a)P | Lung | B6-shPten | 0, 0.4, 2.0 | 重層化/浸潤性 |
| MNU | LivH | P53+/-, WT | 0, 200, 1,000 | 1000-腫瘍様組織形成 |
| | Lung | P53+/-, WT | 0, 200, 1,000 | WT1000-腺管大型化 |
| TEA | Lung | P53+/-, WT | 0, 1,000, 3,000 | 重層化/浸潤性 |
| 1-MN | Lung | LSL-Kras | 20 50 まで | 0で変化有り |
| PA | LivC | rasH2, Non-Tg | | 影響あり? |

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たものに加え、p53ヘテロノックアウトマウス由来のオルガノイドを用いる検討を進めた。膀胱上皮は肺や肝臓に比し増殖速度が遅いが、p53ヘテロノックアウトあるいは野生型のBALB/c背景マウスにおいて比較的良好な増殖を示した。また、肝臓に含まれる肝前駆細胞は胆管上皮細胞と肝細胞への分化能をもつと考えられているが、従前のオルガノイド調製法では主に胆管上皮細胞への分化傾向(LivC)がみられている。今年度は、既報

(Katsuda T et al., Cell Stem Cell 20(1), 2017)などを参考にし、肝細胞への分化傾向を示す(LivH)オルガノイド調製法について検討を行い、前述の如く化学物質の発がん性評価への応用を開始した。

(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
なし

2. 学会発表

- 1) 落合雅子、松浦哲也、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常上皮細胞の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23回日本がん予防学会総会 2016/7/1(名古屋)
- 2) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常大腸上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発。第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/7(横浜)

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 |
|--|--|-------------------|--------|---------|------|
| Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, <u>Ochiai M</u> , <u>Hippo Y</u> , Hayashi SM, Shibusani M. | Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. | Food Chem Toxicol | 100 | 103-114 | 2017 |
| Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, <u>Hippo Y</u> , Nagase H | Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. | Gynecol Oncol | 144(2) | 377-383 | 2017 |
| Maru Y, Orihashi K, <u>Hippo Y</u> | Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. | Methods Mol Biol | 1422 | 13-21 | 2016 |
| Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. | Hypermutation and Unique Mutational Signatures of Occupational Cholangiocarcinoma in Printing Workers Exposed to Haloalkanes. | Carcinogenesis | 37 | 817-26 | 2016 |