

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 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 30 ( 2018 ) 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	-----	14
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	-----	16
戸塚ゆ加里		
4 . オルガノイド皮下移植系実験	-----	19
落合雅子		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	24

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するとともに、遺伝毒性発がん物質として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)、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) など、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) について検討した。その結果、オルガノイド系を用いることにより、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の発がん性を短期間でそれらの発がん性を検出可能であることが示唆された。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、更に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、発がん標的である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。今年度は、子宮、卵管、胃由来のオルガノイド調製法の検討し、それらに対する遺伝子導入により発がん誘導可能なことを示し、化学物質の発がん性検出にも応用可能であると考えられた。また、遺伝毒性発がん物質としてメタンスルホン酸エチル (EMS)、ジメチルヒドラジン (DMH) および*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN) について、非遺伝毒性非発がん物質として安息香酸ナトリウムについて検討し、EMS、DMHについては発がん性を示す結果が得られ、BBNについては再検討が必要であった。また、陰性対照としての安息香酸ナトリウムについては対照群との差がなかった。遺伝毒性については、*gpt delta*マウス由来の (PhIPの発がん標的ではないとされる) 肝臓のオルガノイドについて、PhIPの高濃度処理により変異頻度が上昇傾向を示すことを明らかにし、同マウスを用いる*in vivo*試験法と矛盾のない結果であることを確認した。

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) 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およびLSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスの肺、大腸あるいは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)
- ) LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>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、あるいは陰性対照としてのpLK0.1を導入

### 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：メタンスルホン酸エチル(EMS)；LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイド +Creあるいは+pLK0.1(陰性対照)(0、100、300 μM+S9 mix)ジメチルヒドラジン(DMH)；*p53*+/-マウスおよびWtマウス由来の大腸オルガノイド(0、100、500 μM +S9 mix) *N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN)；*p53*+/-マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイド(Wt；0、3、15 μM +S9 mix、*p53*+/-；0、1、3 μM +S9 mix)安息香酸ナトリウム；B6マウス由来の肺オルガノイド +*shPten*あるいは +*shLuc*(陰性対照)(0、5,000、20,000 μM+S9 mix)
- ) 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*<sup>G12D</sup>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) 子宮、卵管および胃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*<sup>G12D</sup>マウスあるいはLSL-*Pik3ca*変異型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) 肝臓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  $\mu$ 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スを行い、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00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) 化学物質の濃度設定のための予備実験

今年度解析を開始した4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。EMSについてはLSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス(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を用いて濃度設定試験を行ったところ、pLK0.1、Creともに対照群(0 mM)に比し、0.4 mMにおいても細胞増加抑制がみられたことから、本試験では0.1 mM(100  $\mu$ M)と0.3 mM(300  $\mu$ M)を選択した(落合 - 分担研究報告書; 図1)。DMHについては野生型(Wt) BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においてはWt-BALB/cマウスの500  $\mu$ M群にて、BALB/c-*p53* +/-マウスの250および500  $\mu$ M群にて測定開始48時間以降の細胞数増加が頭打ちとなったことから、本試験では100と500  $\mu$ Mを選択した(落合 - 分担研究報告書; 図2)。BNIについては、Wt-BALB/cマウスの6  $\mu$ M以上、BALB/c-*p53* +/-マウスの3  $\mu$ M以上の群にて対照(0  $\mu$ M)群に比し明らかな細胞増殖抑制作用がみられたことから、本試験ではWt-BALB/cマウス由来膀胱オルガノイドについては3および15  $\mu$ M、BALB/c-*p53* +/-マウスについては1および3  $\mu$ Mを選択した(落合 - 分担研究報告書; 図3)。安息香酸ナトリウムについては、培地のpHに影響を与える高濃度においても細胞増殖に及ぼす影響は殆どみられなかったことから、5,000および20,000  $\mu$ Mを選択した。

### 2) オルガノイドへの化学物質暴露と発がん性評価

#### 1) メタンスルホン酸エチル(EMS)

pLK0.1-LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスとCre-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いて行った解析では、pLK0.1-LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスについては0  $\mu$ M群のみならず100および300  $\mu$ M群においてもヌードマウス皮下にてオルガノイドの増殖はみられなかった。一方、Cre-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析では、0  $\mu$ M群ではヌードマウス皮下にてオルガノイドの増殖はみられなかったが、100  $\mu$ M群では造腫瘍性がみられた。病理組織学的には、がん肉腫様組織の増殖として認められた。pLK0.1-LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドについては、EMSによる影響は認められなかった(今井 - 分担研究報告書; 写真1)。

#### 2) ジメチルヒドラジン(DMH);

Wt-BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた解析では、ヌードマウス皮下に形成された結節について、肉眼的にはDMH処置による明らかな変化はみられなかった。病理組織学的には、Wtマウス由来の大腸オルガノイドは、DMH 0  $\mu$ M 群では拡張した腺管状の増殖を示し、DMH 100  $\mu$ M処置により上皮の一部が重層化（扁平上皮化）する傾向がみられたが異型性は示さなかった。上皮の重層化がみられる部位では軽度な間質増生を伴っていた。一方、DMH 500  $\mu$ M処置群では上皮の一部が更に重層化し、上皮細胞には核の肥大/異型性がみられた。間質の増生も更に顕著であった（今井 - 分担研究報告書；写真2）。

### 3) *N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN)

Wt-BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いた解析では、ヌードマウス皮下において何れの系統、処置群においてもオルガノイドの増殖がみられなかった。例外的に*p53* +/-マウスの3  $\mu$ M群の一部に嚢胞状の上皮細胞の増生がみられた（今井 - 分担研究報告書；写真3）本結果を受けて、膀胱オルガノイドを用いる検討についてはWt-BALB/cマウスあるいはBALB/c-*p53* +/-マウス以外の系統のマウスを用いた追加検討が必要となった。

### 4) 安息香酸ナトリウム

B6マウスの肺オルガノイドに対してsh*Luc* (対照) とsh*Pten*で前処理したのちに被験物質を曝露した解析では、ヌードマウス皮下において高濃度群においてオルガノイドの増数がみられたが、上皮細胞に異型性は認められなかった。

## (2) 子宮、卵管および胃由来のオルガノイドの遺伝子導入による発がん

卵管と子宮内膜に関しては*Kras*<sup>G12D</sup>変異+sh*p16/p19*または*p53*KOによりがん肉腫 (CarcinomaとSarcomaの成分の両方を含む病変) が得られることを見出した。Sarcomaへの変化は不可逆的であり、上皮間葉転換とは異なる分子機序が想定された。また、子宮オルガノイドに関しては、*Kras*<sup>G12D</sup>変異+sh*Pten*および*Pik3ca*<sup>H1047R</sup>変異+sh*Pten*の両方で通常の腺がんと同様の組織像の腫瘍形成をみた。胆のうに関しては*Kras*<sup>G12D</sup>変異+sh*p16/p19*変異で通常の腺癌が得られた。いずれも単独の変異では腫瘍形成が見られなかった。また、胃に関しても*p53*KO、*Kras*<sup>G12D</sup>変異、sh*Cdh1*のそれぞれ単独では腫瘍が得られなかったものの、*p53*KO+sh*Cdh1*の導入により印環細胞を含む腫瘍が得られ、*Kras*<sup>G12D</sup>変異+*p53*KOにより腺管の分枝や腸上皮化生が顕著に認められる腫瘍の形成を認めた。これらの腫瘍は複数遺伝子変異の協調作用により初めて認められ、単独の変異では腫瘍形成に至らないこと

から、単独変異導入オルガノイドへの化学物質による変異導入を高感度に検出する実験系の構築に有用であると考えられた。

## (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

PhIP曝露によって変異頻度は0  $\mu$ M (n=4)で $1.5 \pm 1.7 \times 10^{-5}$ 、5  $\mu$ M (n=3)で $1.1 \pm 1.6 \times 10^{-5}$ 、10  $\mu$ M (n=4)で $5.6 \pm 7.8 \times 10^{-5}$ であり、5  $\mu$ Mでは変異頻度の上昇は見られなかった。データのバラツキが大きく、統計学的有意差はつかないものの、10  $\mu$ Mでは約5倍程度に上昇する傾向が観察された(戸塚 - 分担研究報告書；図1)。肝臓の標的遺伝子のシーケンス解析の結果については、解析数が少ないため参考程度でしかないが、変異頻度の上昇が観察された10  $\mu$ M曝露群では、欠失変異が主要な変異となっており、次いで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となっていた(戸塚 - 分担研究報告書；図2)。この変異スペクトルは大腸における変異スペクトルとは異なっているが、0及び5  $\mu$ Mでも欠失変異が多く観察されていることから、肝臓では欠失変異が背景に存在していることが示唆された。また、これら欠失変異のうち90%が5' -CC-3'上に存在することが確認された。増村らによると、欠失変異に占めるG:C塩基対の-1G欠失変異は88%であり、そのうち64%が5' -GGG-3'または5' -GG-3'上にあると報告されており、欠失変異が起きている部位は既報と矛盾していないと思われる(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。しかしながら、今回の変異スペクトル解析数は少な過ぎるため更に解析クローン数を増やして確認する必要がある。

## 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、非遺伝毒性非発がん物質を1物質選択して検討した。遺伝毒性発がん物質であるEMSについてはがん肉腫様組織を形成する造腫瘍性を、DMHについては病理組織学的にオルガノイドの上皮の一部が重層化し、上皮細胞には核の肥大/異型性がみられ、発がん性を示す結果が得られた。また、間質が顕著に増生していた。また、非遺伝毒性非発がん物質とされる安息香酸ナトリウムについては、病理組織学的にオルガノイドの増数がみられたが、培地のpHに影響する濃度での結果と推察された。また、上皮細胞に異型性は認められなかったことから、オルガノイド系を用いる発がん性の評価としては陰性と判定した。BBNの検討に用いた膀胱由来オルガノイドについては、昨年度、B6マウス由来の膀胱オルガノイドに*Pten* shRNAをレンチウイルスで導入したものの、*p53* +/-

マウス由来の膀胱オルガノイドを用いる基礎検討を実施したところ、膀胱上皮は肺や肝臓に比し増殖速度が遅いが、*p53* +/--あるいは*Wt*のBALB/c背景マウスにおいて比較的良好な増殖を示したことを報告した。また、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した。一方、今年度実施した検討ではBBNの0  $\mu$ M処置群においてもヌードマウス皮下でのオルガノイドの増殖がみられず、その原因についてはS9mixの影響など今後の検討を要する。

## E. 結論

遺伝毒性発がん物質であるEMSおよびDMHについては各々*Cre-Kras<sup>G12D</sup>*マウス由来の肺オルガノイドあるいはBALB/c-*p53* +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた検討にて造腫瘍性あるいは発がん性を示す病理組織学的変化がみられ、一方、遺伝毒性発がん物質である安息香酸ナトリウムについては*Cre-Kras<sup>G12D</sup>*マウス由来の肺オルガノイドを用いた検討にて発がん性を示す病理組織学的変化は認められなかった。以上より、マウス正常組織由来オルガノイド*in vitro*化学物質暴露系を用いることで、昨年度までに得られた結果とともに遺伝毒性を伴うあるいは伴わない発がん物質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。

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。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, Hippo Y, Usui T, Ohama T, and Sato K. SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness, *Mol. Cancer Res.* 16(3): 554-563, 2018

(2) Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y and Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncology Lett.* 14: 6863-6868, 2017

(3) Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D,

Totsuka, Y; Establishment of an *in vivo* simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 2018, 109, 1024-1031.

(4) Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, 2017, Nov 16.

(5) Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.

(6) Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39:12.

### 2. 学会発表

(1) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん過程の早期変化検出系。第76回日本癌学会学術総会(2017年9月、横浜)

(2) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん過程の早期変化検出系。第76回日本癌学会学術総会(2017年9月、横浜)

(3) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、筆宝義隆：マウス大腸オルガノイドを用いるPhIPの発がんメカニズムの解析。第34回日本毒性病理学会(2018年1月、那覇)

(4) 丸喜明、筆宝義隆(示説)オルガノイドへの遺伝子導入による子宮内膜発がん。第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月

(5) 筆宝義隆(英語シンポジウム：招待口演)オルガノイド移植モデルおよびPDXによる胆道・膵管発がん再構成。第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月

(6) 松浦哲也、加藤真吾、落合雅子、今井俊夫、中島淳、筆宝義隆：In vitroモデルが明らかにするマウス膵管発がんにおける微小環境の重要性。第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月

(7) 筆宝義隆(シンポジウム)3次元オルガノイド培養のがん研究への応用。第26回日本癌病態治療研究会(横浜)2017年6月

(8) 筆宝義隆(招待講演 Human Cell セミナー)オルガノイドを用いた発がん過程の*in vitro*再構成。第58回日本臨床細胞学会総会春季大会(大阪)2017年5月

(9) 丸喜明、田中尚武、筆宝義隆：オルガノイド培養を用いた細胞レベルの子宮体がん発がんモデルの開発。第58回日本臨床細胞学会総会春季大会(大阪)2017年5月

(10) 丸喜明、田中尚武、筆宝義隆：オルガノイ

ド培養を用いた卵巣がん発がんモデルの開発. 第106回日本病理学会総会(東京)2017年4月

(11) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里: マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第46回日本環境変異原学会(東京、2017年11月)

(12) 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里: モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会(東京、2017年11月)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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、昨年度までの肺/肝臓由来のオルガノイドに加えて、大腸/膀胱由来オルガノイドの解析を進めた。遺伝毒性発がん物質としてメタンスルホン酸エチル（EMS）に対してはLSL-Kras<sup>G12D</sup>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を、ジメチルヒドラジン（DMH）に対してはp53ヘテロノックアウト（p53 +/-）マウス（BALB/c背景、陰性対照として野生型）由来の大腸オルガノイドを、N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン（BBN）に対してはp53 +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いて解析した。また、非遺伝毒性非発がん物質（陰性対照）として安息香酸ナトリウムについては、C57BL/6J（B6）マウス由来の肺オルガノイドにshPten（陰性対照としてshLuc）を導入し検討した。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、EMS処置した肺オルガノイドに造腫瘍性がみられ、特に高濃度処置群ではがん肉腫様の組織像を呈したのが特徴的であった。また、DMH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）の多層化と異型性が認められ、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安息香酸ナトリウム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。膀胱オルガノイドを用いたBBNについては再検討が必要であった。

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、LSL-Kras<sup>G12D</sup>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）由来の大腸お

よび膀胱オルガノイドあるいは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*) を導入した系を用いて、遺伝毒性発がん物質としてメタンスルホン酸エチル (EMS)、ジメチルヒドラジン (DMH)、*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN) を、非遺伝毒性非発がん物質 (陰性対照) として安息香酸ナトリウムについて検討した。

## 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

LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> マウスの肺、*p53*ヘテロノックアウト (+/-) マウスの大腸、膀胱およびC57BL/6J (B6) マウスの肺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]

- ) *p53* +/- マウス由来オルガノイド: *p53* +/- マウス (BALB/c背景) と野生型 (Wt) BALB/cマウスを使用 (レンチウイルス処置なし)
- ) LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> 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、あるいは陰性対照としてのpLK0.1を導入
- ) B6マウス由来オルガノイド: がん抑制遺伝子の*Pten* shRNA (sh*Pten*) と陰性対照としてのsh*Luc*を導入

### 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

シン・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:

メタンスルホン酸エチル (EMS); LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> マウス由来の肺オルガノイド+Creあるいは+pLK0.1 (陰性対照) (0, 100, 300 μM+S9 mix) ジメチルヒドラジン (DMH); *p53* +/- マウスおよびWtマウス由来の大腸オルガノイド (0, 100, 500 μM +S9 mix)

*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN); *p53* +/- マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイド (Wt; 0, 3, 15 μM +S9 mix, *p53* +/-; 0, 1, 3 μM +S9 mix)

安息香酸ナトリウム; B6マウス由来の肺オルガノイド +sh*Pten*あるいは +sh*Luc* (陰性対照) (0, 5, 000, 20, 000 μM+S9 mix)

- ) 処置: 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。LSL-*Kras*<sup>G12D</sup> 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CreまたはpLK0.1の処置を行い、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。
- ) 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) メタンスルホン酸エチル(EMS)

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドについては0、100および300 μM群の何れにおいてもマトリゲルの痕跡がみられたのみであった。一方、Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドについては、100 μM群で造腫瘍性がみられた(写真1-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドでは、EMSの100 μM処置により、発がん性を示すがん肉腫様組織の増殖がみられた(写真1-2)。pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドについては、EMSによる影響は認められなかった。

### (2) ジメチルヒドラジン(DMH)

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてWtマウス由来の大腸オルガノイドは嚢胞状に増殖したが、DMH処置による明らかな肉眼的変化を示さなかった(写真2-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

Wtマウス由来の大腸オルガノイドは、DMH 0 μM群では拡張した腺管状の増殖を示し、DMH 100 μM処置により上皮の一部が重層化(扁平上皮化)する傾向がみられたが異型性は示さなかった。上皮の重層化がみられる部位では軽度な間質増生を伴っていた。一方、DMH 500 μM処置群では上皮の一部が更に重層化し、上皮細胞には核の肥大/異型性がみられた。間質の増生も更に顕著であった(写真2-2)。

### (3) N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN)

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、p53 +/-マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイドは何れの処置群(Wt; 0, 3, 15 μM+S9 mix, p53 +/-; 0, 1, 3 μM+S9 mix)においてもマトリゲルの痕跡がみられたのみであった(写真3-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

p53 +/-マウスおよびWtマウス由来の膀胱オルガノイドは何れの処置群においても、オルガノイド由来の上皮細胞の増殖はみられず、例外的にp53 +/-マウスの3 μM群の一部に嚢胞状の上皮細胞の増生がみられた(写真3-2)。昨年度、B6マウス由来の膀胱オルガノイドにレンチウイルスでPten shRNAを導入したものと、p53 +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いる基礎検討を実施したところ、膀胱上皮は肺や肝臓に比し増殖速度が遅いが、p53 +/-あるいはWtのBALB/c背景マウスにおいて比較的良好な増殖を示したことを報告した。また、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した。一方、今年度実施した検討ではBBNの0 μM処置群においてもヌードマウス皮下でのオルガノイドの増殖がみられず、その原因についてはS9mixの影響など今後の検討を要する。

### (4) 安息香酸ナトリウム

#### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてshPtenあるいはshLuc処置した肺オルガノイドともに、安息香酸ナトリウム0 μM群ではマトリゲルの痕跡がみられたのみであったが、安息香酸ナトリウム20,000 μM群ではマトリゲル内で組織が充実している傾向が認められた(写真4-1)。

#### 2) 病理組織学的所見

B6マウス由来のオルガノイドに対してPtenのshRNAまたはshLucの導入を行い、安息香酸ナトリウムで処置したところ、0 μM群に対し高濃度群においてオルガノイドの増数がみられたが、上皮細胞に異型性は認められなかった。

以上、遺伝毒性発がん物質であるEMSおよびDMHについては各々Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドあるいはBALB/c-p53 +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた検討にて造腫瘍性あるいは発がん性を示す病理組織学的変化がみられ、一方、遺伝毒性発がん物質である安息香酸ナトリウムについてはCre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いた検討にて発がん性を示す病理組織学的変化は認められ

なかった。以上より、マウス正常組織由来オルガノイドinvitro化学物質暴露系を用いることで、昨年度までに得られた結果とともに遺伝毒性を伴うあるいは伴わない発がん物質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。

#### D．研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん過程の早期変化検出系．第76回日本癌学会学術総会(2017年9月、横浜)
- (2) 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫：アクリルアミド暴露によるマウスオルガノイド培養系の形態変化．第76回日本癌学会学術総会

(2017年9月、横浜)

- (3) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、筆宝義隆：マウス大腸オルガノイドを用いるPhIPの発がんメカニズムの解析．第34回日本毒性病理学会(2018年1月、那覇)

#### E．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

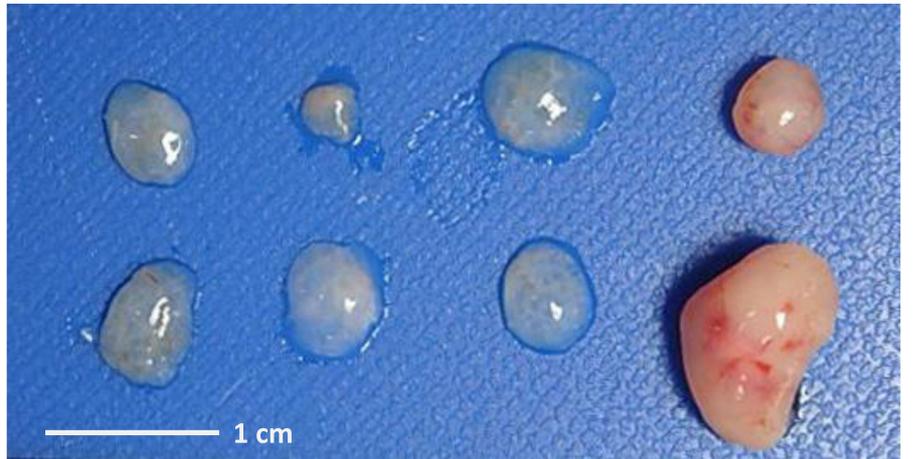
該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

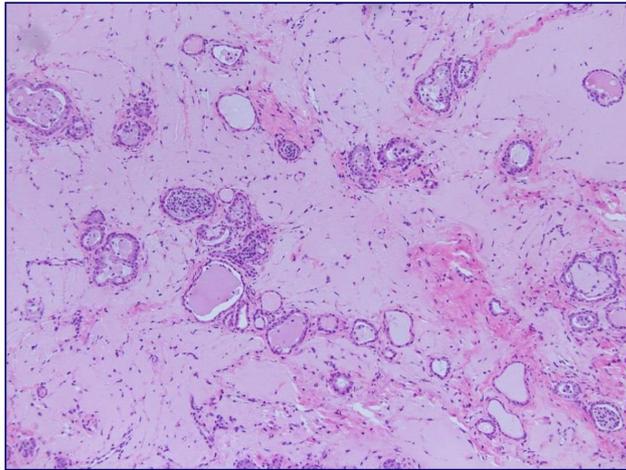
##### 3. その他

該当なし。

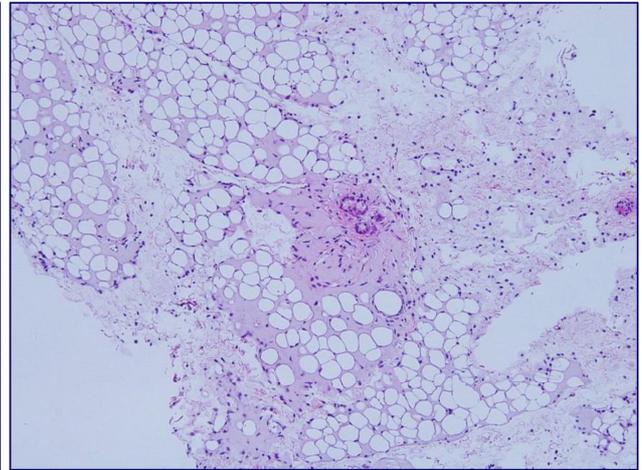


0 100 pLKO.1 | 0 100 (μM) Kras<sup>G12D</sup>

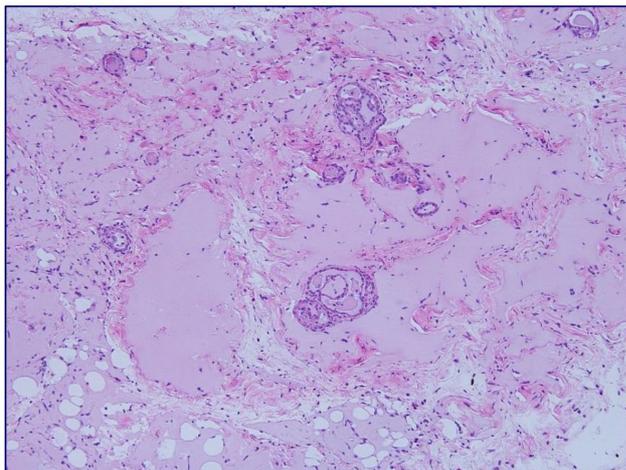
写真1-1 EMS処置したpLKO.1およびKras<sup>G12D</sup>マウス肺由来オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼像



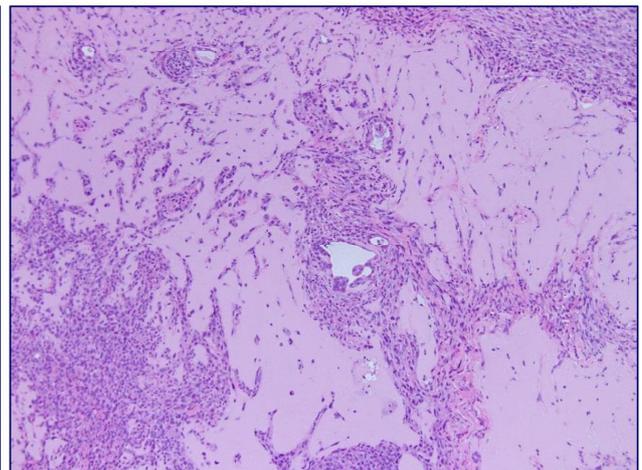
B6-pLKO.1-Lung (EMS 0μM)



B6-pLKO.1-Lung (EMS 100 μM)



Kras<sup>G12D</sup>-Lung (EMS 0μM)



Kras<sup>G12D</sup>-Lung (EMS 100 μM)

写真1-2 EMS処置したpLKO.1およびKras<sup>G12D</sup>マウス肺由来オルガノイドの病理組織像



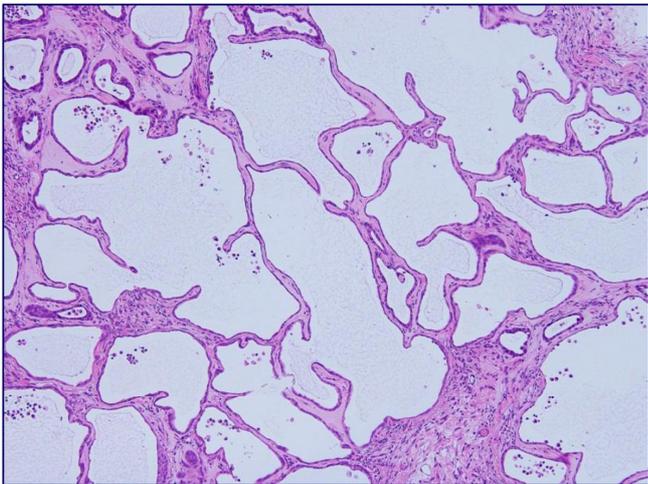
0

100

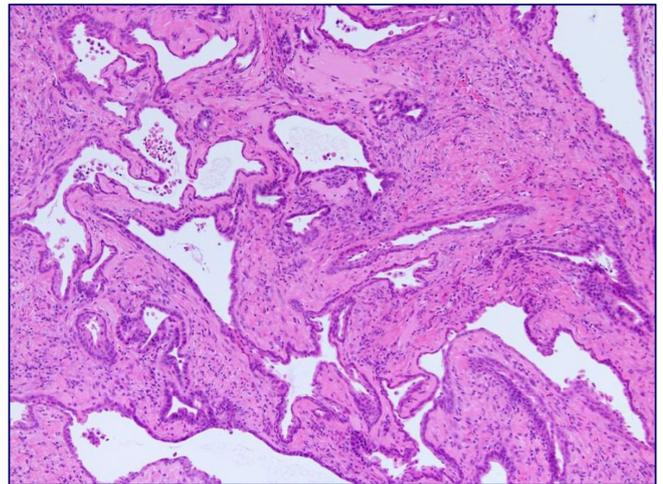
500

( $\mu$ M)

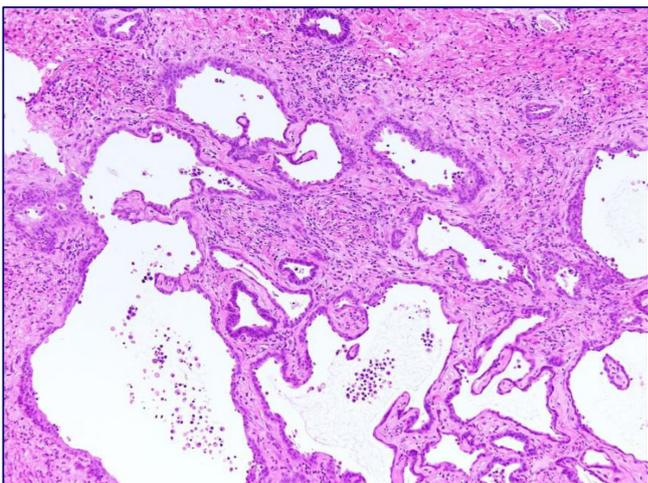
写真2-1 DMH処置したWt-BALB/cマウス大腸由来オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼像



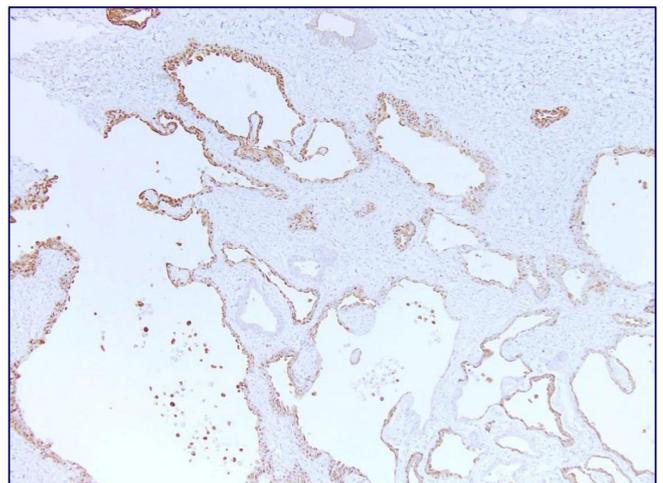
Wt-BALB/c-Colon (DMH 0 $\mu$ M)



Wt-BALB/c-Colon (DMH 100 $\mu$ M)



Wt-BALB/c-Colon (DMH 500 $\mu$ M)



Ck19-immunostaining of the left photo

写真2-2 DMH処置したWt-BALB/cマウス大腸由来オルガノイドの病理組織像

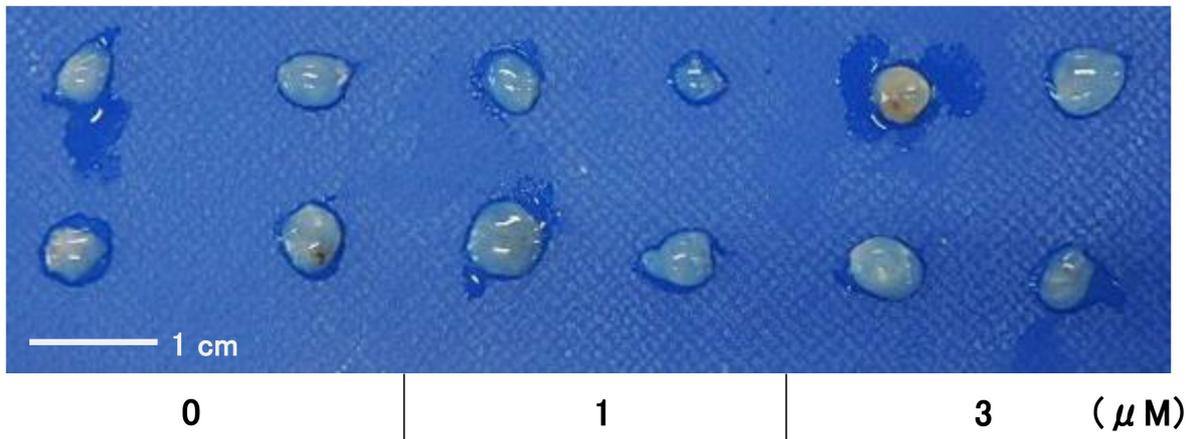
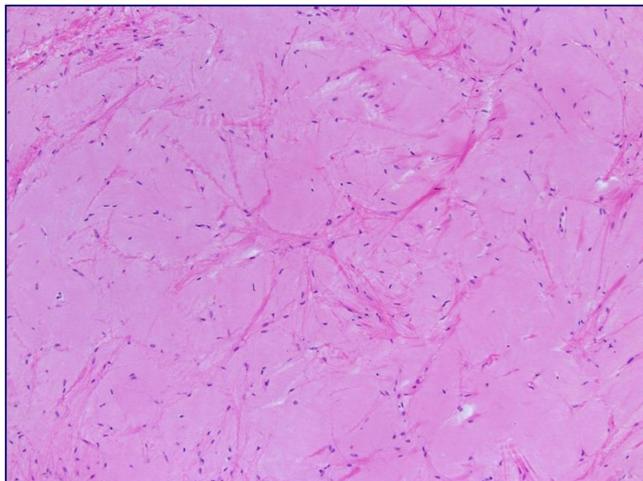
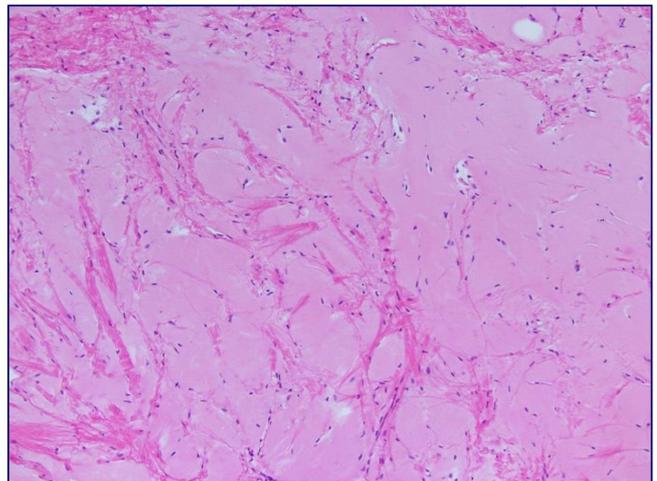


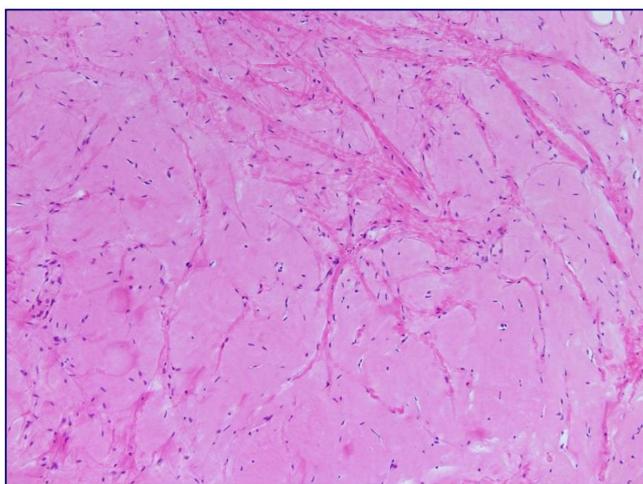
写真3-1 BBN処置したBALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>マウス膀胱由来オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼像



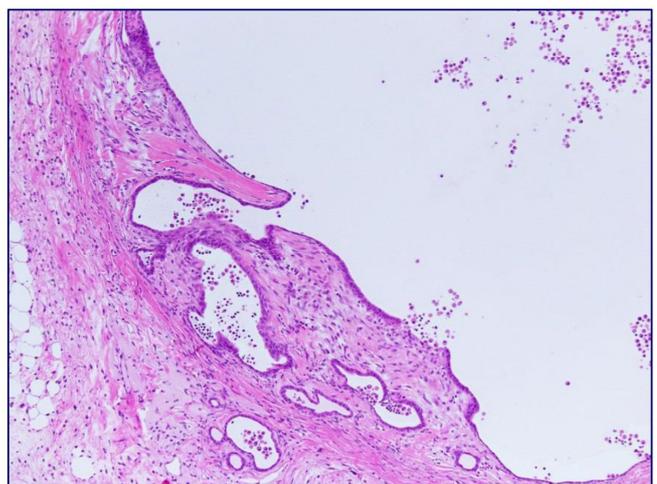
BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 0 μM)



BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 1 μM)



BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 3 μM)



BALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>-Bladder (BBN 3 μM)

写真3-2 BBN処置したBALB/c-*p53*<sup>+/-</sup>マウス膀胱由来オルガノイドの病理組織像

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）  
分担研究年度終了報告書

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複数導入することで発がん誘導が可能であることを確認している。本実験系を利用して、単独では発がんに不十分な遺伝子変異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 vitroで行われていた発がん性試験を代替可能か検討した。小腸におけるApcノックダウンとPhIPは発がん協調作用を検出したが、NNK投与では肺腫瘍形成に至らなかった。また、新規の発がんモデル系として胆のう、子宮、卵管、胃由来のオルガノイドへの遺伝子導入により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、本研究では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多数の組織由来のオルガノイドを用いて同様の発がんモデルの確立を進めることを目的とした。

B．研究方法

1. 遺伝子改変オルガノイドを用いた化学発がん

げっ歯類で発がん性が確認されているPhIP（大腸がん）およびNNK（肺がん）を当該臓器（小腸および肺）由来の遺伝子改変オルガノイド（Apc, Pten, p16, Kras変異等）に種々の濃度で投与してヌードマウス皮下へ移植した。腫瘍径の大きさや組織像の悪性化を指標にして、上記化学物質の発がん性の検出が可能か検討を行った。なお、コントロールとしては空バクターやLuciferaseに対するshRNAなどを用いた。

2. 新規発がんモデルの確立

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などを添加した血清非含有メディウムを用い、遺伝子の導入にはレンチウイルスベクターを用いた。Cre-recombinaseやshRNAの導入後には、Cre-LoxPによる当該遺伝子の組み替えや標的遺伝子のノックダウンをそれぞれゲノムPCRやWestern Blottingにより確認した。このようにして得られた遺伝子導入後のオルガノイドをヌードマウス皮下へ移植して、2ヶ月間観察を行い腫瘍形成能を評価した。得られた皮下腫瘍は組織学的な解析を行うと同時に再び3次元培養を行った。今年度は新規の発がんモデル系を確立するために胆のうと子宮、卵管、胃について単独および複数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. 遺伝子改変オルガノイドを用いた化学発がん

肺のshRNA導入オルガノイドへのNNK投与に関しては、投与回数、投与量、培養期間などのパラメーターを変更して実験を繰り返したものの、NNK投与による明確ながん悪性化の効果は確認できなかった。KrasG12D変異に関して同様の実験を行い、現在経過観察を行っている。腸管に関しては以前shApcとPhIPの発がん協調作用を検出しているため、Apc-KOおよびKrasG12D変異についてもPhIPの協調作用が検出されるか、現在解析を進めている。

2. 新規発がんモデルの確立

卵管と子宮内膜に関してはKras<sup>G12D</sup>変異+shp16/p19またはp53KOにより100%の確率で癌肉腫（Carcinomaと

Sarcomaの成分の両方を含む病変)が得られることを見出した。Sarcomaへの変化は不可逆的であり、上皮間葉転換とは異なる分子機序が想定された。また、子宮オルガノイドに関しては、Kras<sup>G12D</sup>変異+shPtenおよびPik3ca<sup>H1047R</sup>変異+shPtenの両方で通常の腺癌と同様の組織像の腫瘍形成をみた。胆のうに関してはKras<sup>G12D</sup>変異+shp16/p19変異で通常の腺癌が得られた。いずれも単独の変異では腫瘍形成が見られなかった。また、胃に関してもp53K0、Kras<sup>G12D</sup>変異、shCdh1のそれぞれ単独では腫瘍が得られなかったものの、p53K0+shCdh1の導入により印環細胞を含む腫瘍が得られ、Kras<sup>G12D</sup>変異+p53K0により腺管の分枝や腸上皮化生が顕著に認められる腫瘍の形成を認めた。これらの腫瘍は複数遺伝子変異の協調作用により初めて認められ、単独の変異では腫瘍形成に至らないことから、単独変異導入オルガノイドへの化学物質による変異導入を高感度に検出する実験系の構築に有用であると考えられた。

(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) Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, **Hippo Y**, Usui T, Ohama T, and Sato K. SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness, *Mol. Cancer. Res.* 16(3): 554-563, 2018
- (2) Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, **Hippo Y**, Shima H, Okada Y and Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncology Lett.* 14: 6863-6868, 2017

### 2. 学会発表

- (1) 丸 喜明、**筆宝 義隆** (示説)オルガノイドへの遺伝子導入による子宮内膜発がん.第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月
- (2) **筆宝 義隆**(英語シンポジウム:招待口演)オルガノイド移植モデルおよびPDXによる胆道・膵管発がん再構成.第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月
- (3) 松浦 哲也、加藤 真吾、落合 雅子、今井 俊夫、中島 淳、**筆宝 義隆** (示説)in vitro モデルが明らかにするマウス膵管発がんにおける微小環境の重要性.第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月
- (4) 丸喜明、**筆宝義隆**(口演)マウスオルガノイドを用いた子宮内膜発がん過程の再現.第32回発癌病理研究会(大津)2017年8月
- (5) **筆宝義隆**(シンポジウム)3次元オルガノイド培養のがん研究への応用、第26回日本癌病態治療研究会(横浜)2017年6月
- (6) **筆宝義隆**(招待講演 Human Cell セミナー)オルガノイドを用いた発がん過程のin vitro再構成.第58回日本臨床細胞学会総会春季大会(大阪)2017年5月
- (7) 丸 喜明、田中尚武、**筆宝義隆**(口演)オルガノイド培養を用いた細胞レベルの子宮体がん発がんモデルの開発.第58回日本臨床細胞学会総会春季大会(大阪)2017年5月
- (8) 丸 喜明、田中尚武、**筆宝義隆**(口演)オルガノイド培養を用いた卵巣がん発がんモデルの開発.第106回日本病理学会総会(東京)2017年4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

## 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、発がんの非標的臓器である肝臓を用いて、PhIPの遺伝毒性を解析した。4～6週齢程度の*gpt delta*マウスから肝臓を切り出し細切、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。作成した肝臓のオルガノイドに、既知の遺伝毒性発がん物質であるPhIPを0, 5, 10  $\mu\text{M}$ の濃度でS9mixの存在下のもと曝露した。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、肝臓では、0, 5 $\mu\text{M}$ では変異頻度に差はなかったが、10  $\mu\text{M}$ で有意差はつかないものの約5倍に上昇した。発がん非標的臓器の肝臓の変異頻度は既報の*in vivo*試験でもわずかな上昇が観察されており、本研究の結果は*in vivo*試験の結果と矛盾しないことが分かった。

## 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てきた。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、発がん非標的臓器である肝臓オルガノイドを用いて解析し、*in vivo*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

## オルガノイドの作成と被験物質の曝露

4～6週齢程度の雄性マウスから肝臓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。肝臓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  $\mu\text{M}$ 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。

*gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験

コントロールおよびPhIPを曝露したからオルガノイドからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージング法によって

トランスジーン EG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) とchloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地に播いて37℃で培養すると、プラスミド上の*gpt*遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。更に、変異スペクトラムを解析するために、変異体の*gpt*遺伝子をダイレクトシーケンス法により解析した。

## C．研究結果

常法に則って肝臓由来オルガノイドからゲノムDNAを抽出し、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果、PhIP曝露によって変異頻度は0  $\mu\text{M}$  (n=4)で $1.5 \pm 1.7 \times 10^{-5}$ 、5  $\mu\text{M}$  (n=3)で $1.1 \pm 1.6 \times 10^{-5}$ 、10  $\mu\text{M}$  (n=4)で $5.6 \pm 7.8 \times 10^{-5}$ であり、5 $\mu\text{M}$ では変異頻度の上昇は見られなかった。データのバラツキが大きく、統計学的有意差はつかないものの、10 $\mu\text{M}$ では約5倍程度に上昇する傾向が観察された(図1)。次に、肝臓の標的遺伝子のシーケンス解析の結果を図2に示す。解析数が少ないため参考程度でしかないが、変異頻度の上昇が観察された10 $\mu\text{M}$ 曝露群では、欠失変異が主要な変異となっており、次いで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となっていた。この変異スペクトルは大腸における変異スペクトルとは異なっているが、0及び5 $\mu\text{M}$ でも欠失変異が多く観察されていることから、肝臓では欠失変異が背景に存在しているのかもしれない。また、これら欠失変異のうち

90%が5'-CC-3'上に存在することが確認された。増村らによると、欠失変異に占めるG:C塩基対の-1G欠失変異は88%であり、そのうち64%が5'-GGG-3'または5'-GG-3'上にあると報告されており、欠失変異が起きている部位は既報と矛盾していないと思われる(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。しかしながら、今回の変異スペクトル解析数は少な過ぎるため更に解析クローン数を増やして確認する必要があると思われる。

(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。

図1 肝臓由来オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

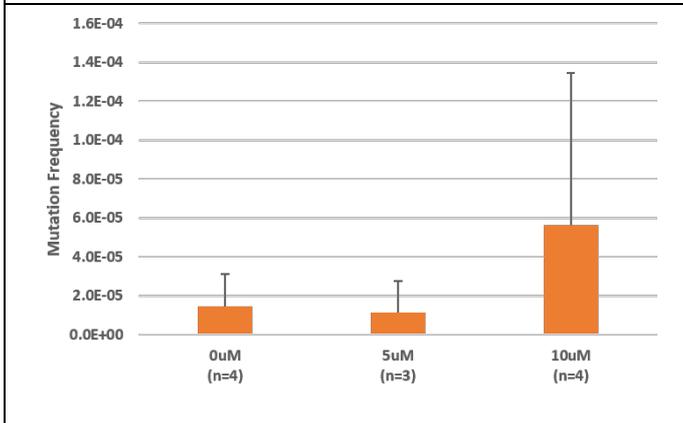
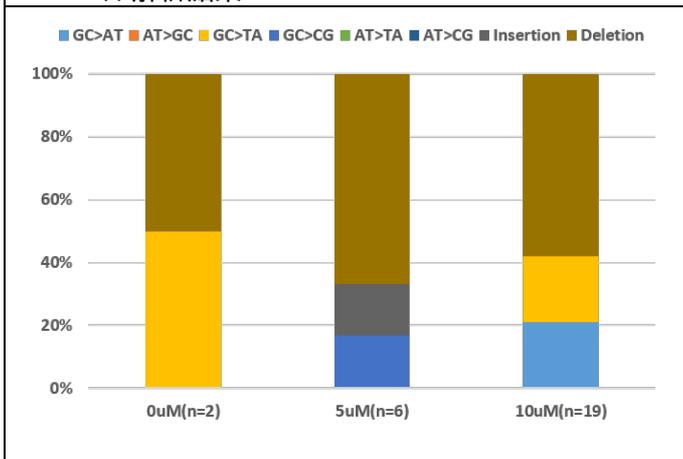


図5 肝臓由来オルガノイドを用いた変異スペクトル解析結果



#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka, Y. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 2018, 109, 1024-1031.

2. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.  $\gamma$ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 2017, Nov 16.
3. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.
4. Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39:12.

##### 2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里: DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会 (横浜 2017 年 7 月)
2. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ, 2017 年 9 月)
3. Totsuka Y: Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜 2017 年 9 月)
4. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆: マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん過程の早期変化検出系 第 76 回日本癌学会学術総会(横浜 2017 年 9 月)
5. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里: マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)
6. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里: 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 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)
7. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里: モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)

8. 神尾翔真、齋藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
9. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017(東京、2017年11月)
10. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis 12<sup>th</sup>ICEM-5<sup>th</sup>ACEM（仁川、2017年11月）
11. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017（つくば、2017年12月）
12. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics（コルカタ、2018年1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



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）  
分担研究報告書

## 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には、今年度は主にLSL-Kras<sup>G12D</sup>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B6マウス由来のオルガノイドにshPtenを導入したものをを用いた。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（+S9 mix）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メタンスルホン酸エチル（EMS）、1,2-ジメチルヒドラジン（DMH）およびN-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン（BBN）、非遺伝毒性非発がん物質（陰性対照）として安息香酸ナトリウムについて検討した。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、肺あるいは大腸由来オルガノイドを用いた検討でEMSおよびDMHでは発がん性を示す結果が得られた。一方、膀胱オルガノイドを用いたBBNにおいては対照群を含む各群にオルガノイドの増殖がみられず評価できなかった。安息香酸ナトリウムについては対照群に比しオルガノイドの増数がみられたが、発がん性を示す所見は得られなかった。

以上、マウスの肺や大腸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が、膀胱由来オルガノイドについてはヌードマウス皮下で増殖するような条件検討が必要であった。

## 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、レンチウィ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、LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウスあるいはp53ヘテロノックアウトマウス由来のオル

ガノイド、あるいはB6マウス由来のオルガノイドにshPtenを導入したのに対し、各種化学物質で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

LSL-Kras<sup>G12D</sup>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、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）の大腸、膀胱、あるいはB6マウス（shPten導入あるいは陰性対照としてshLuc導入）の肺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) 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回の継代時を合わせて3回の化学物質暴露を行った。LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス (B6背景) 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pLK0 (対照) またはCreを導入、B6マウス由来オルガノイドでは同様にshPtenまたはshLucを導入 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メタンスルホン酸エチル (EMS)、ジメチルヒドラジン (DMH) および*N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン (BBN)、非遺伝毒性非発がん物質 (陰性対照) として安息香酸ナトリウムを用いた。EMSはマウス長期発がん性試験において、肺と腎臓に (IARC, vol.7, 1974) DMHは大腸に、BBNは膀胱に発がん性を示すことが報告されている。

### C. 研究結果と考察

今年度に解析を開始した4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試験を行った。EMSについてはLSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス (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を用いて濃度設定試験を行ったところ、pLK0.1、Creともに対照群 (0 mM) に比し、0.4 mMにおいても細胞増加抑制がみられたことから (図1)、本試験では0.1 mM (100  $\mu$ M) と0.3 mM (300  $\mu$ M) を選択した。

EMSの発がん性を検討するためpLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウスとCre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いて行った解析では、pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウスについては0  $\mu$ M群のみならず100および300  $\mu$ M群においてもヌードマウス皮下にてオルガノイドの増殖はみられなかった。一方、Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析では、0  $\mu$ M群ではヌードマウス皮下にてオルガノイドの増殖はみられなかったが、100  $\mu$ M群では造腫瘍性がみられた。

EMSの300  $\mu$ M濃度での3回処置では、pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウスとCre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドに対して毒性が強かったことが示されたことから、追加試験において10および30  $\mu$ M処置による発が

ん性の検討が必要と考えられた。一方、Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析では、100  $\mu$ M群にて発がん性が検出できた。

DMHについては野生型 (Wt) BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においてはWt-BALB/cマウスの500  $\mu$ M群にて、BALB/c-*p53* +/-マウスの250および500  $\mu$ M群にて測定開始48時間以降の細胞数増加が頭打ちとなったことから (図2)、本試験では100と500  $\mu$ Mを選択した。

DMHの発がん性を検討するためのWt-BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた解析では、ヌードマウス皮下に形成された結節について、肉眼的にはDMH処置による明らかな変化はみられなかったが、病理組織学的に500  $\mu$ M群で発がん性を示す所見が認められた。

BBNについてはWt-BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においてはWt-BALB/cマウスの6  $\mu$ M以上、BALB/c-*p53* +/-マウスの3  $\mu$ M以上の群にて対照 (0  $\mu$ M) 群に比し明らかな細胞増殖抑制作用がみられたことから (図3)、本試験では、Wt-BALB/cマウス由来膀胱オルガノイドについては3および15  $\mu$ M、BALB/c-*p53* +/-マウスについては1および3  $\mu$ Mを選択した。

BBNの発がん性を検討するためのWt-BALB/cマウスとBALB/c-*p53* +/-マウス由来の膀胱オルガノイドを用いた解析では、ヌードマウス皮下において何れの系統、処置群においてもオルガノイドの増殖がみられなかった。本結果を受けて、膀胱オルガノイドを用いる検討についてはWt-BALB/cマウスあるいはBALB/c-*p53* +/-マウス以外の系統のマウスを用いた追加検討が必要となった。

安息香酸ナトリウムについては、pLK0.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウスとCre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドを用いた解析を行った。用量設定試験においては、培地のpHに影響を与える高濃度においても細胞増殖に及ぼす影響は殆どみられなかったことから、5,000および20,000  $\mu$ Mを選択した。

安息香酸ナトリウムの発がん性を検討するためのB6マウスの肺オルガノイドに対してshLuc (対照) とshPtenで前処理したのちに被験物質を曝露した解析では、ヌードマウス皮下において高濃度群においてオルガノイドの増数がみられたが、上皮細胞に異型性は認められなかった。

以上の結果を表1にまとめた。遺伝毒性発がん物質であるEMSおよびDMHについては各々Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オルガノイドあるいはBALB/c-*p53* +/-マウス由来の大腸オルガノイドを用いた検討にて造腫瘍性あるいは発がん性を示す病理組織学的変化がみられ、一方、遺伝毒性発がん物質である安息香酸ナトリウムについてはCre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来の肺オ

ルガノイドを用いた検討にて発がん性を示す病理組織学的変化は認められなかった。以上より、マウス正常組織由来オルガノイド in vitro 化学物質暴露系を用いることで、昨年度までに得られた結果とともに遺伝毒性を伴うあるいは伴わない発がん物質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。

(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) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん過程の早期変化検出系。第76回日本癌学会学術総会(2017年9月、横浜)

(2) 成瀬美衣、落合雅子、筆宝義隆、今井俊夫：アクリルアミド暴露によるマウスオルガノイド培養系の形態変化。第76回日本癌学会学術総会(2017年9月、横浜)

(3) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、筆宝義隆：マウス大腸オルガノイドを用いるPhIPの発がんメカニズムの解析。第34回日本毒性病理学会(2018年1月、那覇)

#### 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

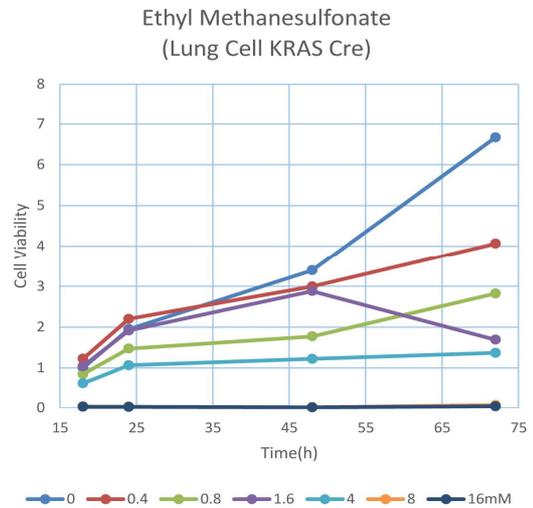
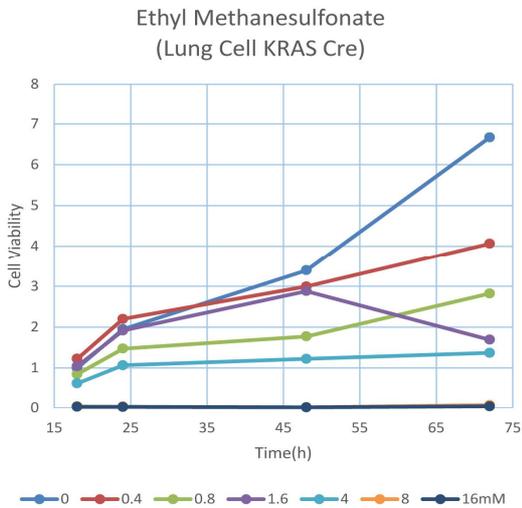


図1 メタンスルホン酸エチルの濃度設定試験 ( $Kras^{G12D}$ マウス肺オルガノイド)

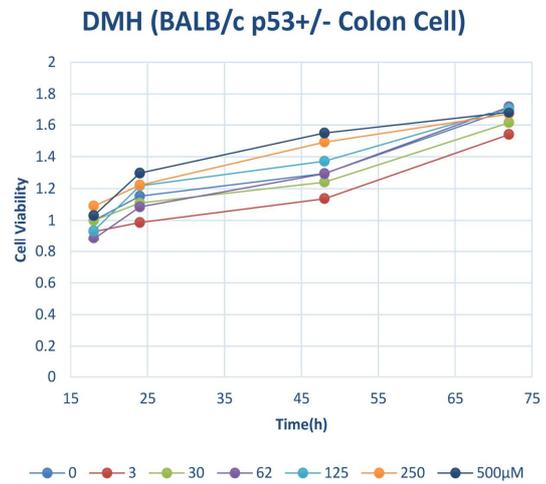
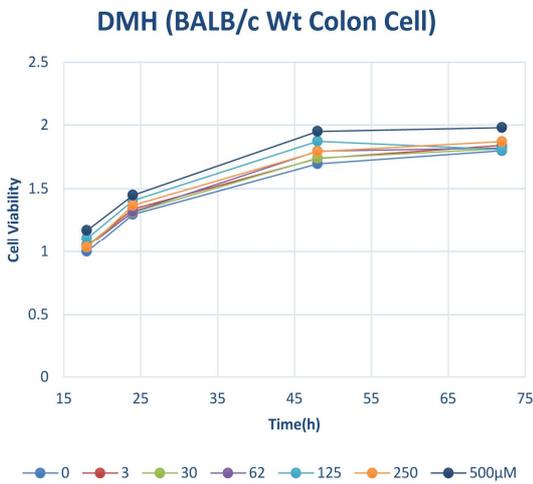


図2 1,2-ジメチルヒドラジンの濃度設定試験 ( $p53$  +/-マウス大腸オルガノイド)

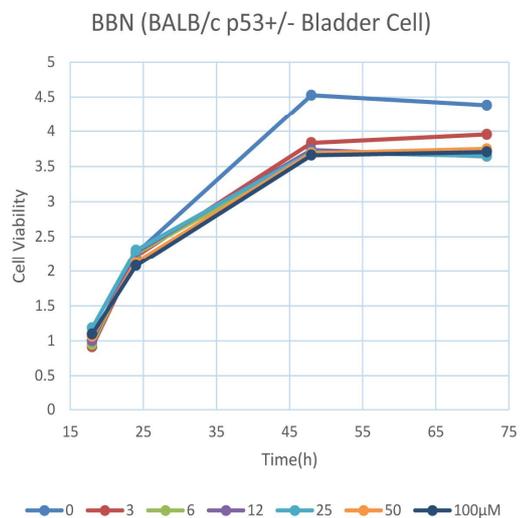
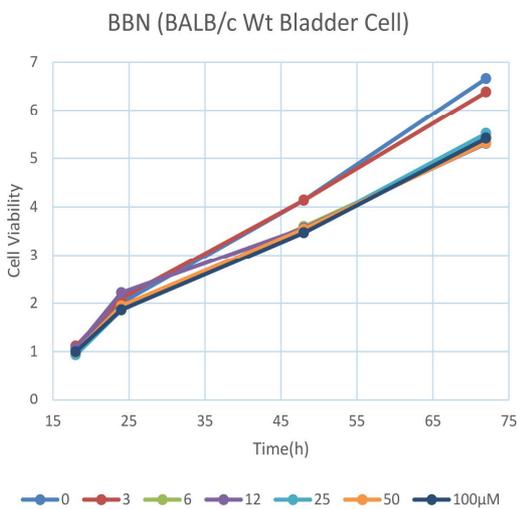


図3 *N*-ブチル-*N*-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンの濃度設定試験 ( $p53$  +/-マウス膀胱オルガノイド)

表 1 発がん性試験の結果のまとめ

Chemical	Organ	Strain	濃度 ( $\mu$ M)	肉眼/組織所見
EMS	Lung	pLKO.1, Kras <sup>G12D</sup>	0, 100, 300	造腫瘍性
DMH	Colon	Wt-BALB/c, p53+/-	0, 100, 500	異型性、多層性、浸潤性
BBN	Bladder	Wt-BALB/c	0, 3, 15	増殖認めず
		p53+/-	0, 1, 3	同上
安息香酸Na	Lung	pLKO.1, Kras <sup>G12D</sup>		増殖促進(異型性なし)

## 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
Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, <u>Hippo Y</u> , Usui T, Ohama T, and Sato K.	SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness	<i>Mol. Cancer. Res.</i>	16(3)	554-563	2018
Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, <u>Hippo Y</u> , Shima H, Okada Y and Tanuma N	Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells	<i>Oncology Lett</i>	14	6863-6868	2017
Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, <u>Totsuka Y</u>	Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes.	<i>Cancer Sci</i>	109	1024-1031	2018
Toyoda T, <u>Totsuka Y</u> , Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K	-H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two nonharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline	<i>J Appl Toxicol</i>		Nov. 16	2017
Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, <u>Totsuka Y</u>	Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane	<i>Mutagenesis</i>	32	455-462	2017

Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin	<i>Genes Environ</i>	39	12	2017
---	--	----------------------	----	----	------