

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 ~ 29 年度 総合研究報告書

研究代表者 今井 俊夫

平成 30 ( 2018 ) 年 5 月

目 次

I . 総合研究報告		
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 . 総合（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	-----	9
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	-----	17
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	-----	21
戸塚ゆ加里		
4 . オルガノイド皮下移植系実験	-----	25
落合雅子		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	30

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。

平成 27 年度；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 PhIP、肺については 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。平成 28 年度；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) 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なかった。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。平成 29 年度；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*<sup>G12D</sup>マウスの肺、肝臓、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・肝臓・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*<sup>+/-</sup>マウス(BALB/c背景)由来オルガノイド：*p53*<sup>+/-</sup>と野生型(Wt)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*<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：  
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)；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、3、10 μM+S9 mix)  
アクリルアミド(AA)；*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(BaP)；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(MNU)；*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)  
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 +pLKO.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)

トリエタノールアミン (TEA) ; 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 (1-MN) ; LSL-Kras<sup>G12D</sup>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 +pLKO.1 (陰性対照) (0、4、20 μM)

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か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pLKO.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。

) ノ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、ノ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、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、子宮、卵管あるいは胃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、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) の肝臓、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 μM) 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) オルガノイドをノ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

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。その背景として、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU) に対しては、p53+/-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と判断した。また、アクリルアミド (AA) の各濃度に対する *p53* +/- 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。AAの発がん性を検討するため *p53* +/- 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。

BaPについては、*shPten*と対照として*shLuc*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  $\mu$ M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、*shLuc* では0  $\mu$ Mに比し2.0  $\mu$ Mで抑制がみられたが、*shPten*では2.0  $\mu$ Mでも0  $\mu$ M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、*shLuc* では0、0.4、2.0  $\mu$ M、*shPten*では0、0.6、3.0  $\mu$ Mで実施した。

MNUの発がん性を検討するため、*p53* +/- マウスとWt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* +/- マウスおよびWtマウスともに、0  $\mu$ 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* +/- マウスでは1000  $\mu$ Mにて僅かな抑制傾向がみられたが、Wt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、発がん性の検討は、*p53* +/- マウスおよびWtマウスともに、0、200、1000  $\mu$ Mで実施した。

TEAについては、*p53* +/- マウスおよびWt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  $\mu$ M濃度で発がん性の検討を行った。

1-MNについては、LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス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  $\mu$ M濃度、pLK0.1群では0、4、20  $\mu$ M濃度で発がん性の検討を行った。

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。

DMHについてはWtマウスと*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マウスの500  $\mu$ M群にて、*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。

BBNについては、Wtマウスの6  $\mu$ M以上、*p53* +/- マウスの3  $\mu$ M以上の群にて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、*p53* +/- マウスについては1および3  $\mu$ Mを選択した。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) アクリルアミド (AA)

前述の通り、発がん性の評価を*p53* +/- マウスおよびWtマウス由来の肺オルガノイドについて、 $\alpha$  (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AA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* +/- 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。Wt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)

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、*shLuc* と*shPten*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。一方、病理組織学的解析では、対照に比し0.4  $\mu$ M (shLuc) あるいは0.6  $\mu$ M (shPten) 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増生していた。2.0  $\mu$ M (shLuc) あるいは3.0  $\mu$ M (shPten) 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。

### 3) N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)

p53 +/- マウスおよびWtマウスともに、0 (対照)、200、1000  $\mu$ 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 +/- マウスではWtに比し200  $\mu$ M で肥大し、野生型では1000  $\mu$ M で白色化 (組織充実化) 傾向がみられた。病理組織学的解析の結果、Wtの200  $\mu$ M 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、Wtの1000  $\mu$ 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 +/- マウス由来のオルガノイドについては、対照に比し200  $\mu$ 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  $\mu$ 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 (TEA)

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 +/- マウスおよびWt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  $\mu$ M 処置群では、上皮細胞が一部立方形に肥大し、更に重層化/浸潤性がみられた。3000  $\mu$ M 処置群では、対照および1000  $\mu$ 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-MN)

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) メタンサルホン酸エチル (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。

### 7) 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。

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

Wtマウスと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。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マウスあるいは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。

### 9) 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。

### (2) 胆嚢、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

LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウスあるいはLSL-Pik3ca変異型ウスの胆嚢について、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。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+shPten

および*Pik3ca*<sup>H1047R</sup>変異+*shPten*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+*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*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。

(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、先ずは*in vivo*での発がん標的である大腸について検討した。変異頻度は0  $\mu\text{M}$  (n=2)で $3.0 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ 、5  $\mu\text{M}$  (n=2)で $38 \pm 1.7 \times 10^{-6}$ 、10  $\mu\text{M}$  (n=1)で $46 \times 10^{-6}$ 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。次に、標的遺伝子のシーケ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  $\mu\text{M}$ )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。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示された。更に発がん標的ではないとされる肝臓オルガノイドについて検討した結果、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。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  $\mu\text{M}$ 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トランスバージョン及び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

オルガノイドを用いる*in vitro*被験物質暴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8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。遺伝毒性発がん物質であるMNU、PhIPとEMSについては造腫瘍性を、特にEMSについてはがん肉腫様組織を形成した。BaP、AA、TEA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/浸潤性を示し、DMHについては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、DMHについては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1-MNと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る場合もあるが、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、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*<sup>+/+</sup>-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*<sup>+/+</sup>-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。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、BBNの0  $\mu\text{M}$ 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

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

(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)

(4) 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)

(5) 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)

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

(7) 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)

(8) 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)

(9) 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)

(10) 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.*, 109, 1024-1031 (2018)

(11) 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*, Nov 16 (2017)

(12) 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* 32:455-462 (2017)

(13) 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.*39:12 (2017)

##### 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)
- (12) 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)
- (13) 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)
- (14) 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)
- (15) 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)
- (16) 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)
- (17) 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)
- (18) 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)
- (19) 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)
- (20) 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
- (21) 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
- (22) 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
- (23) 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
- (24) 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
- (25) 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
- (26) 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
- (27) 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)
- (28) 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・発行年等七記入)

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、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。平成27年度：C57BL/6J (B6) マウス由来のsh*Pten* (陰性対照としてsh*Luc*) を導入した大腸オルガノイドを用いて、遺伝毒性発がん物質の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) の発がん性が確認された。平成28年度：B6マウス由来のsh*Pten*を導入した肺オルガノイド、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 (*p53* +/- ; 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 (陰性対照) として1-メチルピペラジン (1-MN) について検討した。その結果、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。平成29年度：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* +/- マウス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として安息香酸ナトリウムについては、B6マウス由来の肺オルガノイドにsh*Pten*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に対策が必要であり、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た。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*<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-Wt)由来の肺/肝臓/大腸/膀胱オルガノイド、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)、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)、安息香酸ナトリウム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* +/- マウス、rasH2 マウスあるいはLSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウスの肺、肝臓、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]

- ) 肺・肝臓・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]

- ) 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
- ) *p53* +/- マウス由来オルガノイド：*p53* +/- マウスとWt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*<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

- ) 被験物質と適用オルガノイド：
  - 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) ; 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, 3, 10 μM+S9 mix)
  - アクリルアミド (AA) ; *p53* +/- マウスおよびWt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 (BaP) ; B6マウス由来の肺オルガノイド +sh*Pten* (0, 0.6, 3.0 μM +S9 mix) またはsh*Luc* (陰性対照) (0, 0.4, 2.0 μM+S9 mix)
  - N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素 (MNU) ; *p53* +/- マウスおよび+Wt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 (TEA) ; *p53* +/- マウスおよびWt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 (1-MN) ; LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>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)
  - 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  $\mu$ M+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  $\mu$ M +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  $\mu$ M +S9 mix, p53 +/-; 0, 1, 3  $\mu$ M +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  $\mu$ M+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。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か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、初回オルガノイドの播種後にCreまたはpLK0.1を導入し、その後化学物質暴露を行った。

) ノ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、ノ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) ノ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ノ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  $\mu$ m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) 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)

1) 肉眼所見

ノードマウス皮下においてshLuc処置後のPhIP暴露により0  $\mu$ M群に比し10  $\mu$ M群で組織充実化がみられ、shPten処置後のPhIP暴露により造腫瘍性がみられた。

2) 病理組織学的所見

shLuc処置後のオルガノイドではPhIP暴露による影響はみられなかったが、shPten処置後のオルガノイドでは3  $\mu$ M群で異型性、10  $\mu$ M群で腺がん様組織がみられた。

(2) アクリルアミド (AA)

1) 肉眼所見

ノ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。

2) 病理組織学的所見

p53 +/--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)。Wt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。

(3) ベンゾ[a]ピレン (BaP)

1) 肉眼所見

ノードマウス皮下においてshLuc とshPten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

2) 病理組織学的所見

shLuc とshPtenともに、0  $\mu$ 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)。

(4) N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)

### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において、*p53*<sup>+/-</sup>マウスでは200  $\mu$ Mで肥大し、Wtでは1000  $\mu$ 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

Wtの200  $\mu$ M処置群では、0  $\mu$ 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、Wtの1000  $\mu$ 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*<sup>+/-</sup>マウス由来のオルガノイドについては、対照に比し200  $\mu$ 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  $\mu$ M処置群で確認された細胞数は僅少であった。

## (5) トリエタノールアミン (TEA)

### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下においてTEA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*<sup>+/-</sup>マウスおよびWtともに、0  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M処置群では、0  $\mu$ Mおよび1000  $\mu$ 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。

## (6) 1-メチルナフタレン (1-MN)

### 1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下において1-MN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  $\mu$ 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。

## (7) 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、EMS暴露の影響はみられなかった。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  $\mu$ M群で造腫瘍性がみられた。

### 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  $\mu$ M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（図3）。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。

### 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  $\mu$ 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。

## (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*<sup>+/-</sup>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  $\mu$ M+S9 mix, *p53*<sup>+/-</sup>; 0, 1, 3  $\mu$ M+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。

### 2) 病理組織学的所見

*p53*<sup>+/-</sup>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*<sup>+/-</sup>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。平成28年度の検討において、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*<sup>+/-</sup>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*<sup>+/-</sup>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。

## (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sh*Pten*あるいはsh*Luc*処置した肺オルガノイドとともに、安息香酸ナトリウム0  $\mu$ M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  $\mu$ M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 $\mu$ M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。

#### 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）
- (4) 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）

- (5) 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）
- (6) 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）
- (7) 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）
- (8) 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。



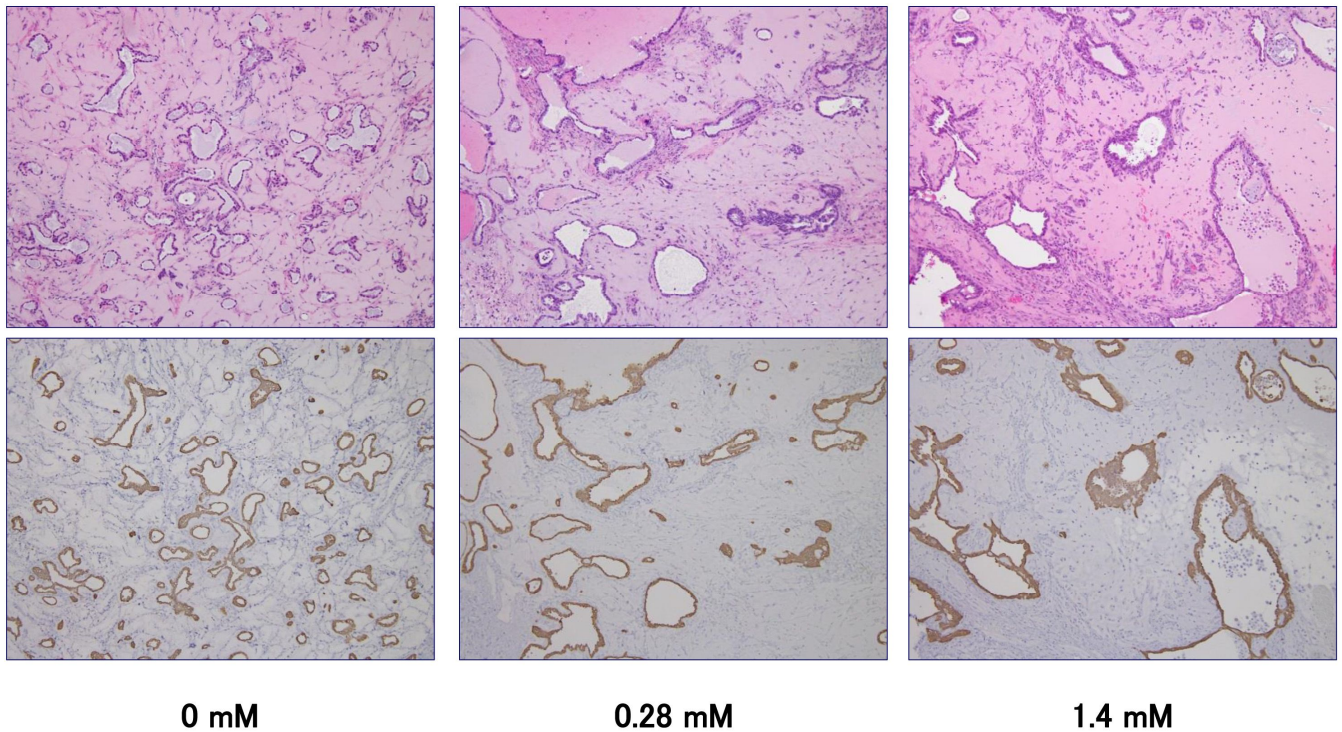
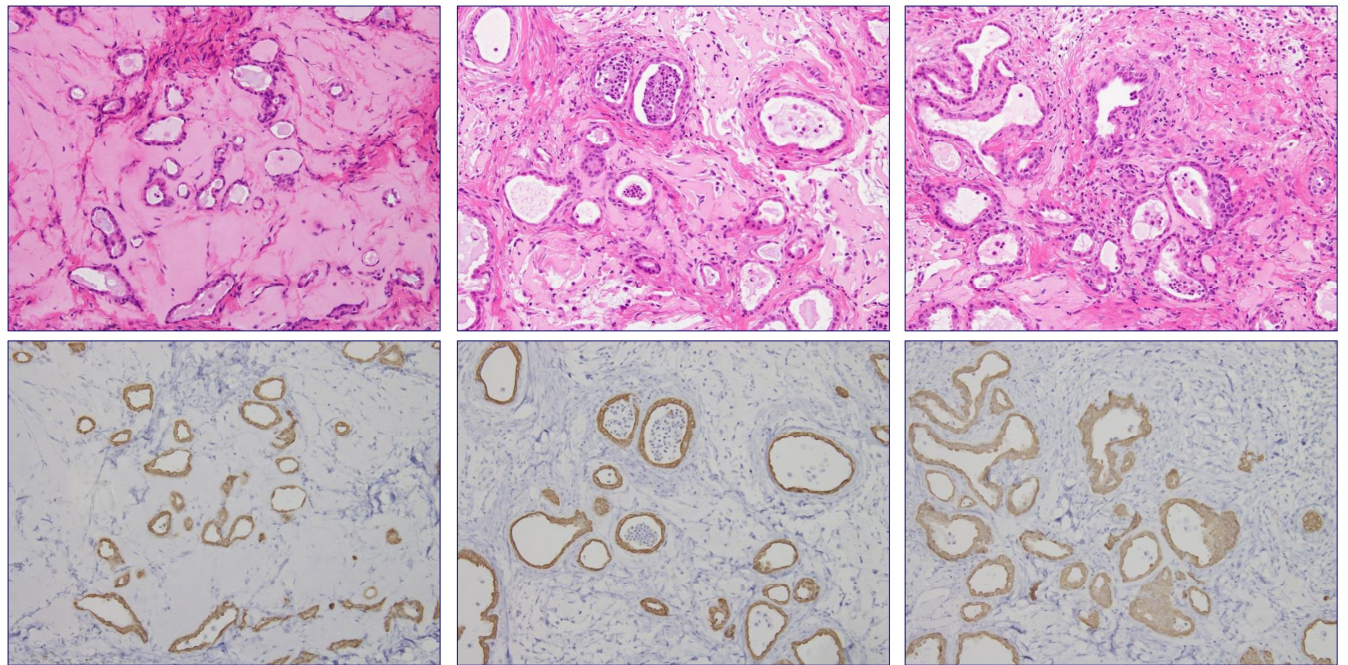


図1  $p53$  +/--マウスの肺から調製したオルガノイドにおけるアクリルアミドの影響解析（ヌードマウス皮下：上段、ヘマトキシリン・エオジン染色；下段、CK19免疫染色）（上段、0 mM）比較的小型で単層の上皮細胞で裏打ちされた嚢胞状組織がみられる。（同、0.28 mM）0 mMに比し嚢胞状組織の大型化と一部上皮細胞の重層化がみられる。（同、1.4 mM）0.28 mMに比し、上皮細胞の重層化が高頻度で見られるとともに、周囲組織への浸潤性が認められる。上皮細胞の核は大型化し、刷子硝子様を呈する。また、周囲組織においては反応性の間質細胞の中等度の増生がみられる。（下段、0 mM）上皮細胞がCK19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  $\mu$ M

0.4  $\mu$ M

2.0  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M) 0  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M、0.4  $\mu$ M) 上皮細胞がCK19に強陽性を示している。(同、2.0  $\mu$ 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。

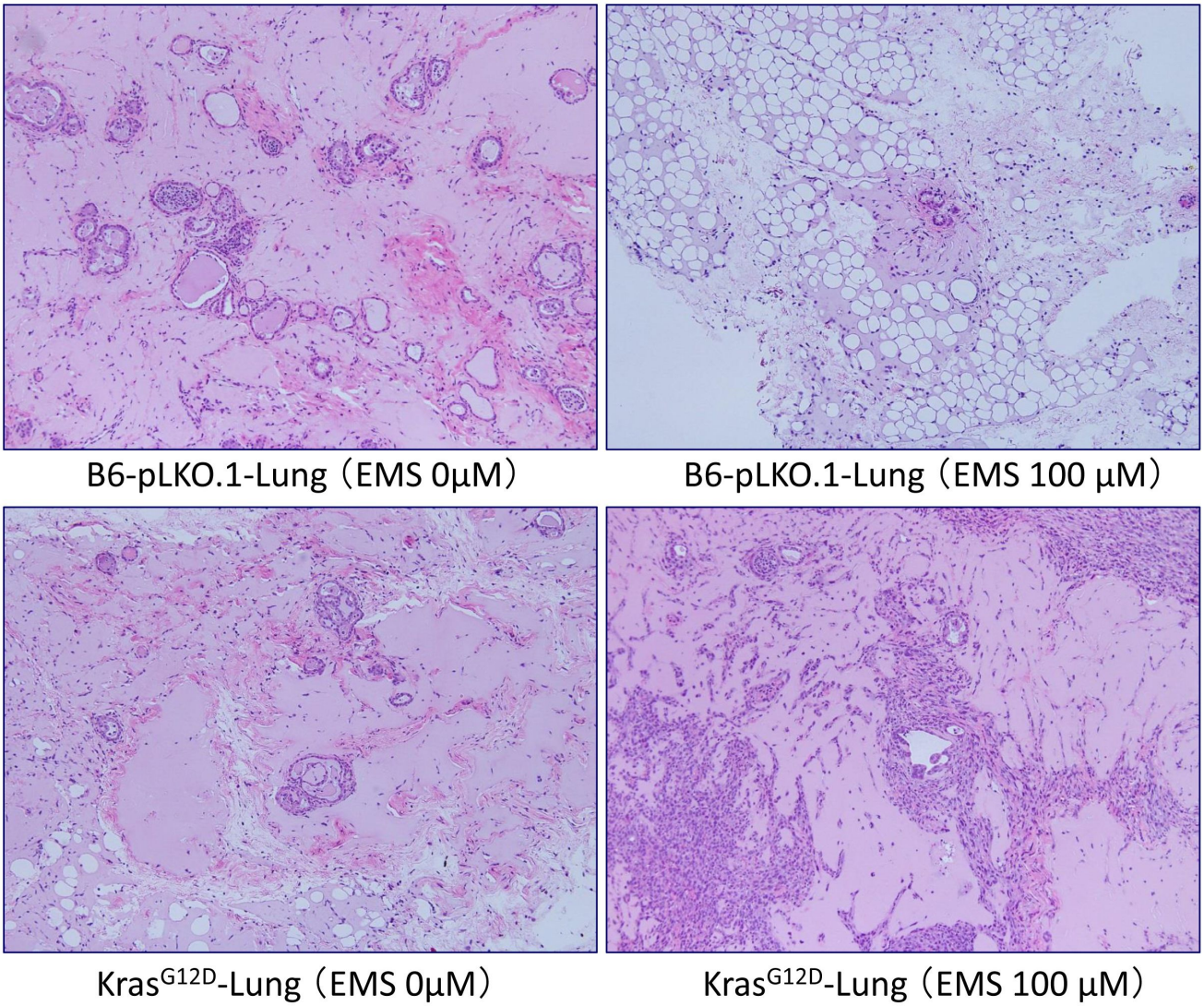


図3 pLKO.1-LSL-Kras<sup>G12D</sup>マウス (*Kras* 非活性) 由来肺オルガノイドではメタンスルホン酸エチル (EMS) 投与による影響はみられなかった (上段、0 μM; 100 μM)。一方、Cre-Kras<sup>G12D</sup>マウス由来のオルガノイドではEMS処置によりがん肉腫様組織により形成される造腫瘍性が確認された。

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）  
分担総合報告書

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でも個体レベルとほぼ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。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タバコ由来肺発がん物質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。今後化学物質の投与方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。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

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、上皮細胞オルガノイド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。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、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。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も目的とした。

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

1.1 腸管化学発がん 食事由来変異原でありラットで大腸発がん性が確認されているPhIPについて、マウスではリンパ腫を発症してしまい腸管発がん性の有無はこれまで検出不可能だ

った。腸管オルガノイドにおけるApcのノックダウンにより弱い腫瘍原性を認めることから、ApcノックダウンオルガノイドにS9mixにより代謝活性化を行ったPhIPを投与することにより、腫瘍原性の増強が認められるか、同様に検証した。

1.2 肺化学発がん タバコ由来変異原である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（以後NNK）はマウスへの投与で肺がんを誘発可能で、AJマウスに対してはKras変異を高頻度で誘発することが知られている。オルガノイドを用いた発がんモデルではKras変異は単独では腫瘍形成に不十分だが、p16やPtenのノックダウンを組み合わせた場合に腫瘍形成が誘導可能であることを確認している。そこで、p16やPtenのノックダウンをあらかじめ行った肺オルガノイドにNNKを0～5000 $\mu$ Mの濃度で1-3回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10<sup>5</sup>細胞ずつ接種した。

2．新規発がんモデルの確立

3次元培養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アウムを用い、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マトリゲルと混和してヌードマウス皮下へ移植して、2ヶ月間経過観察した。その際、コントロールと比較した腫瘍径、腫瘍形成率、組織像の変化を指標として腫瘍形成能を評価した。コントロールとしては空ベクターやLuciferaseに対するshRNAなどを用いた。得られた皮下腫瘍は組織学的な解析に供すると同時に同時に再び3次元培養を行った。これまでに腸管、肺、膵臓、胆道に関して発がんモデルを確立しているが、新規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

#### 1.1 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。

#### 1.2 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。

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充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。

## 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p53K0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)が見出された。上皮細胞から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。一方で、shPten単独では腫瘍形成に不充分であり、子宮特異的PtenK0のみで発がんしたとするin vivoモデルの過去の報告と乖離を認めた。子宮特異的な微笑環境の影響や間質でのPtenK0が協調的に発がんを促進していた可能性がある。

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が、単独の変異では腫瘍形成が見られなかった。Kras<sup>G12D</sup>変異にp53K0いずれも加えた場合には腺癌が誘導され、婦人科系腫瘍とは異なり癌肉腫の発症は認めなかった。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。興味深いことに胃特異的なKras<sup>G12D</sup>変異+p53K0では腫瘍形成が見られないことが知られている。一般的に化学発がんでは胃がんに誘導は容易ではないことと考え合わせると、in vivoでは発がん抑制因子が存在する可能性が示唆される。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)

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) 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) 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

(4) 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

(5) 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) 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

(9) 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

(10) 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

(11) 落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

(12) 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

(13) 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

(14) 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

(15) 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

(16) 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

(17) 落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

（18）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

（19）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

（20）落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

（21）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

（22）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

（23）落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

（24）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





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）  
分担総合報告書

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。本研究では、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。作成した大腸と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 μM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、大腸の変異頻度はPhIP曝露群で濃度依存的に上昇することを確認し、変異スペクトルの解析をした結果、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。また、変異のホットスポットにおいても*in vivo*試験と矛盾しない結果を得た。肝臓では、PhIPの5μM曝露では変異頻度の上昇は観察されなかったが、10 μMでは、有意差はないものの約5倍に上昇する傾向が観察された。肝臓の変異頻度は既報の*in vivo*試験でも若干の上昇を認めており、大腸と肝臓の上昇の傾向は矛盾しないことが分かった。このことから、オルガノイドを用いた化学物質の遺伝毒性試験法は既存の*in vitro*試験法を補完した発がん性予測試験として有用であることが示唆された。引き続き、作用点の異なる化学物質を用いて当該試験法の妥当性について検討を行うことが必要であると思われる。

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。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

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、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。大腸と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 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。

*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、大腸での変異頻度は

0  $\mu\text{M}$  (n=4)で $3.8 \pm 4.3 \times 10^{-6}$ 、5  $\mu\text{M}$  (n=3)で $25 \pm 24 \times 10^{-6}$ 、10  $\mu\text{M}$  (n=3)で $38 \pm 27 \times 10^{-6}$ であり、PhIPの曝露によって変異頻度が10倍に上昇することを確認した(図1)。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  $\mu\text{M}$ )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*試験との比較をした(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。その結果を図2に示す。PhIPを投与した*gpt delta mouse*の大腸粘膜ではコントロール動物と比べてG:C->T:Aトランスポージョンが顕著に増加していた。これに加え、G:C->C:Gトランスポ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トランスポージョン変異の観察は見られなかったが、G:C->A:Tトランシジョン及びG:C->T:Aトランスポ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。さらに、増村らの*in vivo*試験と今回のオルガノイドを使用した系で、*gpt*遺伝子上のどの部分にどの変異があるかマッピングして比較した(図3)。増村らは*gpt*遺伝子上に5カ所の変異ホットスポットがあると報告しているが、オルガノイドを用いた系ではそのうち3カ所が一致していることが分かった。大腸由来オルガノイドを用いた系では、変異頻度の上昇、変異パターン、変異のホットスポットにおいて、概ね*in vivo*と同じ傾向を示すことが観察された。

G:C->C:G変異は、自然突然変異及び変異原・がん原物質により誘発される変異の中でも非常に稀であることが知られている。このG:C->C:Gの変異の誘発には8-OH-dGのさらなる酸化によって生成するスピロイミノヒダントインやグアニジノヒダントインといったDNA付加体が関与することが報告されている(Kino K et al, 2001, Chem. Biol., Korniyushyna O, et al, 2002, Biochemistry)。このことから、*gpt delta mouse*の大腸内でPhIPの経口投与により誘発された炎症などの2次的な変化が、これらの酸化的損傷をDNAに起こし、G:C->C:Gの変異を誘発しているのではないかと推測した。PhIPを曝露したオルガノイドで、このような変異スペクトルが観察されなかった理由としては、オルガノイドを構成する細胞集団の中に炎症を惹起する細胞がほとんど存在していないことや、PhIPの曝露期間が短く、慢性的な影響が反映されないなどが考えられる。

肝臓由来オルガノイドを用いた同様の実験では、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、0  $\mu\text{M}$ と5  $\mu\text{M}$ は同程度であったが10  $\mu\text{M}$ では5倍程度に上昇した(図4)。次に、肝臓の標的遺伝子のシーケンス解析の結果を図5に示す。解析数が少ないため参考程度でしかないが、変異頻度の上昇を認めた10  $\mu\text{M}$ と、図2の大腸PhIP群を比較すると、G:C->A:Tトランシジョン及びG:C->T:Aトランスポージョンが主な変異スペクトルという傾向が一致していた。増村らにより報告されている*gpt delta mouse*を用いた*in vivo*試験の結果では、肝臓は大腸と比較すると1/4程度の上昇ではあるが、PhIP曝露によって変異頻度が上昇することが報告されている(Masumura K et al, 1999, Cancer Letters)。本法では大腸で10倍、肝臓で約5倍の変異頻度の上昇が確認されたことから、変異頻度の上昇幅の傾向としては*in vivo*と大きな差はないものと考えられる。また、増村らによると、deletionに占めるG:C塩基対のdeletion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いる(Masumura K et al, 2000, Carcinogenesis)。本研究では、大腸におけるdeletionのうち50%が5'-GGG-3'、5'-GG-3'上にあり、もう50%においても、反対鎖である5'-CCC-3'、5'-CC-3'上にdeletionが入っていることが確認された。肝臓では、deletionのうち90%において5'-CC-3'上のdeletionが確認された。insertionに関してはmutationの数が少ないため勘案していないが、以上のことから、mutationのパターンにおいて*in vivo*とオルガノイドの間に大きな矛盾はないものと考えられる。

既知の遺伝毒性発がん物質であるPhIPを、マウス正常組織由来オルガノイドに曝露させた。PhIPの標的臓器である大腸由来オルガノイドでは、変異頻度・変異スペクトル・変異ホットスポットのいずれにおいても*in vivo*と同じ傾向を示した。また、非標的組織である肝臓由来オルガノイドで変異頻度とスペクトルについて調べた結果、解析数が少ないものの、変異頻度においては*in vivo*と相関性のある結果を示した。変異スペクトルについてはデータ数が少ないのと、*in vivo*のデータが無いため比較できなかった。

#### (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 大腸由来オルガノイドを用いたPhIPの遺伝子変異原性試験

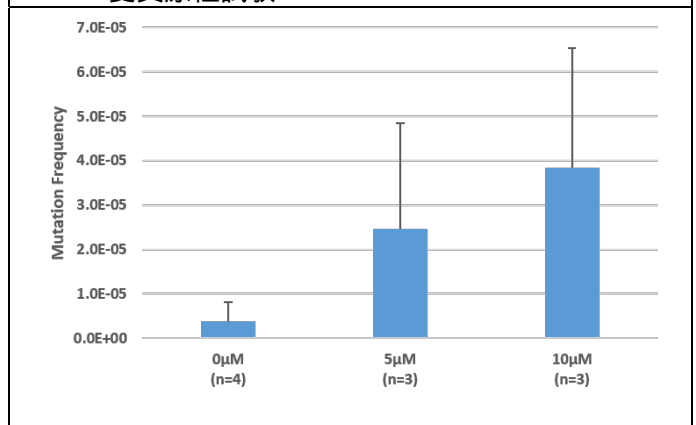


図2 大腸由来オルガノイドを用いた変異スペクトル解析結果

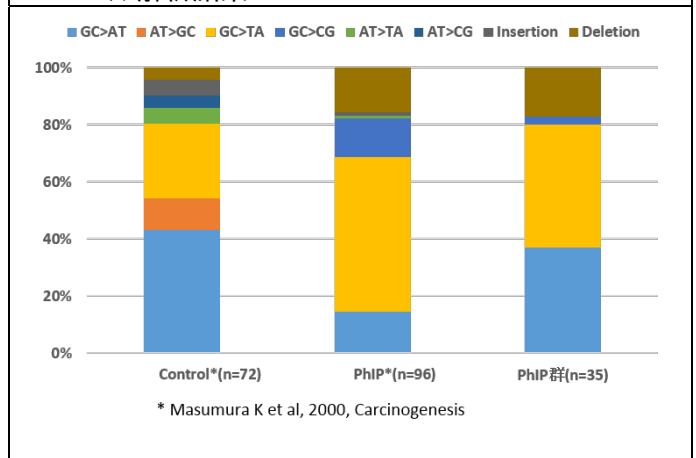
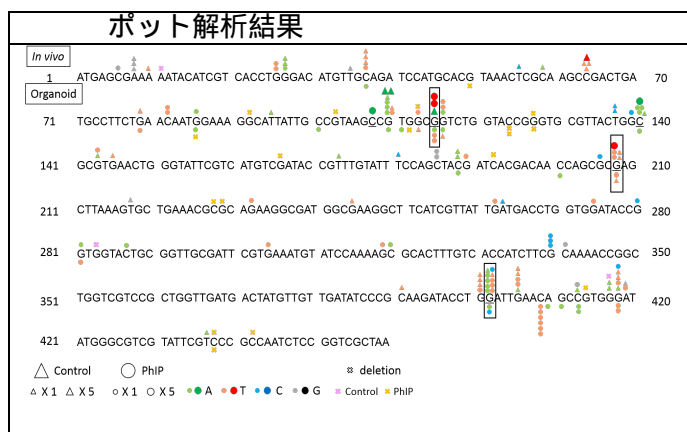
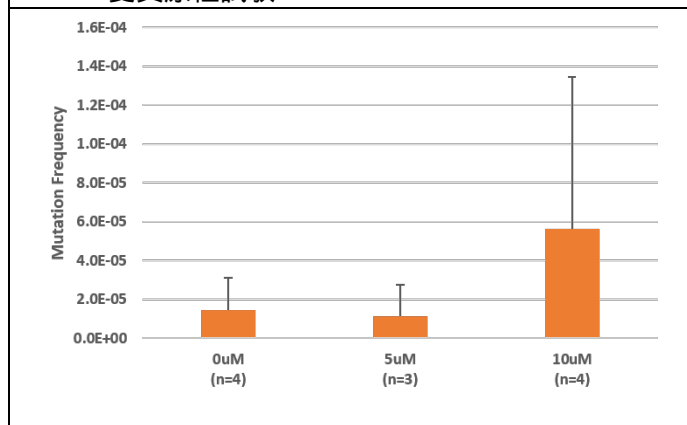


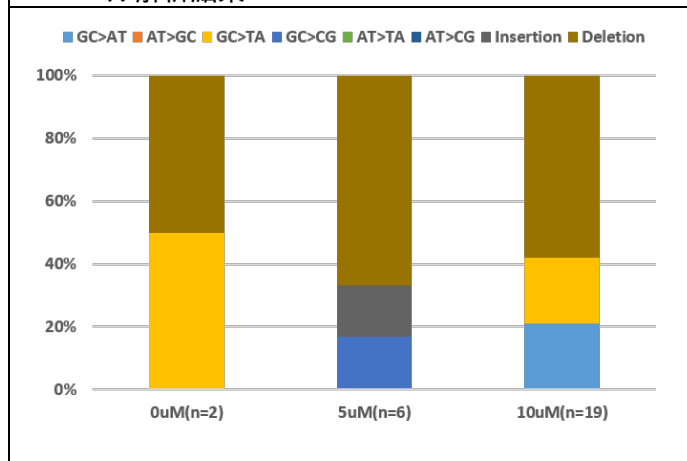
図3 大腸由来オルガノイドを用いた変異ホットス



**図4 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家庭の早期変化検出系 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、斎藤春吾、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

## 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*<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*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)、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)、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)、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、大腸、肺あるいは肝臓オルガノイドを用いた検討でPhIP、AA、BaP、MNU、EMS、DMH、TEAでは発がん性を示す結果が得られた。一方、1-MNと安息香酸ナトリウムについては対照群と差がみられなかった。BBNについては

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

C57BL6/J(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*<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、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、遺伝毒性発がん物質とされる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)、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)、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)、安息香酸ナトリウムを用いた。PhIPはマウスでは大腸に発がん性を示し、AAはマウス長期発がん性試験において、肺のほか、ハーダー腺、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)、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。

肺と肝臓に関しては、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を用いた。*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、肺と肝臓のほか、大腸と膀胱を用いて検討を進めた。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も検討した。

### C. 研究結果

10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

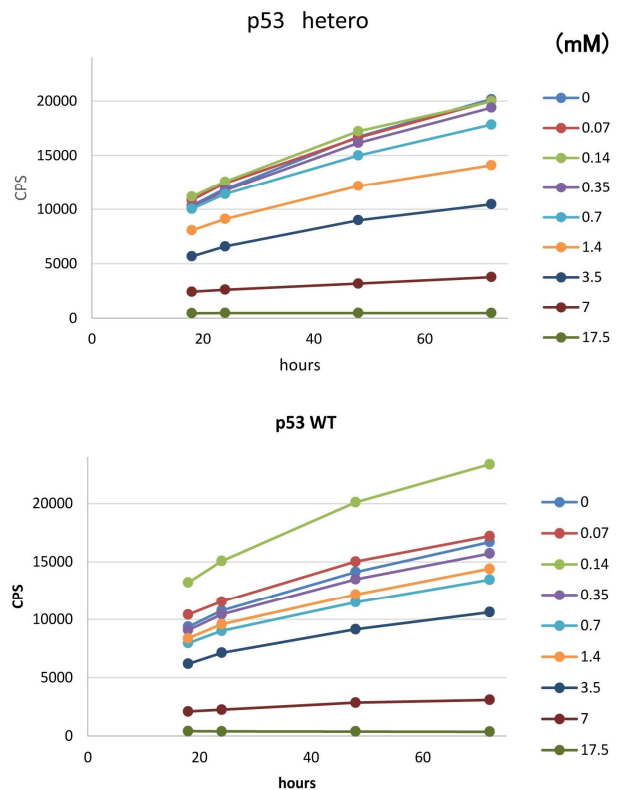


図1 アクリルアミドの*p53*ヘテロノックアウトマウス由来肺オルガノイドにおける細胞生存性測定結果

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。

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の結果、0.2~2.0  $\mu$ M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  $\mu$ Mに比し2.0  $\mu$ Mで抑制がみられたが、sh*Pten*では2.0  $\mu$ Mでも0  $\mu$ M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  $\mu$ M、sh*Pten*では0、0.6、3.0  $\mu$ 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、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、病理組織学的解析の結果、0  $\mu$ 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。

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、0μM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1000μM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、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、1000μM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200μMで肥大し、野生型では1000μMで白色化(組織充実化)傾向がみられた(図2)。病理組織学的解析の結果、野生型のMNU200μM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3)。

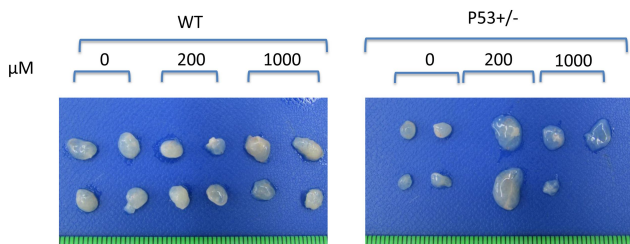


図2 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置した p53ヘテロノックアウトと野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での肉眼所見

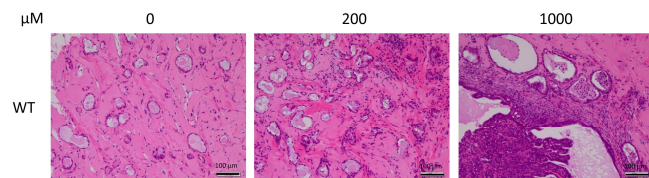


図3 N-メチル-N-ニトロソ尿素処置した野生型マウス由来肝臓オルガノイドのヌードマウス皮下での組織所見

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、3,000μM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、0μM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。

1-MNについては、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)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、50μM濃度、pLK0.1群では0、4、20μM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0μM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。

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0μM群のみならず100および300μM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、0μM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、100μM群では造腫瘍性がみられた。EMSの300μM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30μM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、100μM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500μM群にて、BALB/c-p53 +/-マウスの250および500μM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500μM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500μM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6μM以上、BALB/c-p53 +/-マウスの3μM以上の群にて対照(0μM)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15μM、BALB/c-p53 +/-マウスについては1および3μM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20,000μM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、遺伝毒性発がん物質としてPhIP、AA、BaP、MNU、EMS、DMH、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、安息香酸ナトリウム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。化学物質処置

後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、EMS及びTEAでは発がん性を示す結果が得られた。PhIPとDMHは大腸オルガノイドに同様の所見が得られた。一方、1-MNと安息香酸ナトリウムについては対照群と差がみられなかった。

(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、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。

5) 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)

6) 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)

7) 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)

8) 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)

9) 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



マウス由来オルガノイドを用いる in vitro 化学物質暴露系による実験結果一覧

化学物質名	遺伝毒性	発がん性	Organ	Strain	濃度 (μM)	組織所見
ベンゾ(a)ピレン	+	肺、前胃、肝臓	Lung	B6-shPten	0, 0.4, 2.0	重層化/浸潤性
N-メチルニトロソ尿素	+	脳神経、胃	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
1,2-ジメチルヒドラジン	+	大腸	Colon	p53+/-, WT		重層化/異型性
BBN	+	膀胱	Bladder	p53+/-, WT		要再実験
アクリルアミド	+	肺、前胃、乳腺	Lung	p53+/-, WT	0, 0.28, 1.4	重層化/浸潤性
メタンサルホン酸エチル	+	肺、腎臓	Lung	LSL-Kras	0, 100, 300	Kras-100-腫瘍様組織形成
PhIP	+	小腸、(ラット大腸、乳腺)	Colon	B6-shPten	0, 15, 75	75-腫瘍様組織形成
トリエタノールアミン	-	(肝臓-Stout et al 2008)	Lung	p53+/-, WT	0, 1,000, 3,000	重層化/浸潤性
1-メチルナフタレン	-	(肺-弱い)	Lung	LSL-Kras	20 ~ 50まで	-
安息香酸ナトリウム	-	-	Lung	LSL-Kras, WT	0, 5,000, 20,000	-
						- : 陰性

## 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	Methods Mol Biol	1422	13-21	2016
Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, <u>Totsuka Y</u>	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, <u>Totsuka Y</u> , 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
Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, <u>Ochiai M</u> , <u>Hippo Y</u> , 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

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	<i>Gynecol Oncol</i>	144(2)	377-383	2017
Maru Y, Orihashi K, <u>Hippo Y</u>	Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids	<i>Methods Mol Biol</i>	1422	13-21	2016
Mimaki S, <u>Totsuka Y</u> , 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	<i>Carcinogenesis</i>	37	817-26	2016
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, Watanaabe, 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 norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline	J Appl Toxicol	-	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	Mutagenesis	32	455-462	2017
Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, <u>Totsuka Y</u>	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin	Genes Environ	39	12	2017