

## オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備

研究分担者 平田暁大 岐阜大学・応用生物科学部・助教

## 研究要旨

本分担研究課題の目的は、マウス正常組織由来オルガノイドを用いるin vitro発がん性短中期試験を多施設で実施可能な方法として確立することである。本年度は、①施設間でのオルガノイドの最適な輸送方法を確立するため、他施設にて樹立後に-80度で保存されたオルガノイドを凍結した状態で輸送し、輸送先でin vitro発がん性試験に用いることができるか検討した。さらに、②発がん物質処理後にオルガノイドに生じた形態変化を定量的に解析し、発がん性評価に有用であるか検討した。①については、6系統の肺由来オルガノイドを冷凍した状態で輸送し、輸送先において培養の可否を検討した。2系統については解凍後に培養が可能であり、1系統では発がん性試験の実施が可能であった。一方、4系統では培養が不可能であった。②については、野生型マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド（0、0.28、1.4mM）を3回処置し、病理組織学的にオルガノイドの形態変化を解析したところ、アクリルアミド処置後、オルガノイドのサイズが濃度依存的に有意に増加し、高濃度のアクリルアミドに暴露したオルガノイドでは壁の重層化が観察された。一方、増殖細胞マーカーであるKi-67陽性細胞の比率に有意な差は認められなかった。

以上より、①オルガノイドの凍結、保存、培養の工程に改善の余地があるものの、凍結保存されたオルガノイドを輸送して、in vitro発がん性短中期試験に用いることが可能であることが明らかとなった。また、②化学物質投与後に生じるオルガノイドの形態変化の定量的な解析は被検物資の発がん性の評価に有用であると考えられた。

## 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されたこと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が必要である。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る。

昨年度までに、本分担研究課題において、基幹施設（国立がん研究センター）で調整されたオルガノイドを研究分担者の所属施設（岐阜大学）に常温で輸送し、培養・継代できることを明らかにした。一方で、国内の気温の変動を考えると、季節を問わない安定した輸送方法が求められる。そのため、昨年度は、安定したオルガノイドの輸送方法を確立することを目的として、冷蔵での輸送を試みたが、輸送の2日後にはほぼすべてのオルガノイドが崩壊し、継代は不可能であった。そこで、本年度は、樹立後に-80度で保存されたオルガノイドを凍結した状態で輸送し、in vitro発がん性試験に用いることができるか検討した。

さらに、昨年度、肺発がん性物質であるアクリルアミドの処置により肺由来オルガノイドに形態変化が生じることを見出した。今年度は、細胞増殖活性の評価を加えるとともに、その形態変化を定量的に解析し、発がん性評価に有用であるか検討した。

## B. 研究方法

### ① 凍結保存オルガノイドを用いた発がん性短中期試験の検討

#### ①-1. 冷凍輸送後のオルガノイドの培養

国立がん研究センターにて樹立後に-80度で保存されたオルガノイドを岐阜大学に冷凍輸送し、培養の可否を検討した。

オルガノイドは6系統の異なるマウス（野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス、野生型および *p53* (+/-) 型 BALB/c マウス、野生型および *rasH2* トランスジェニック CB6F1 マウス)の肺から樹立した。オルガノイドの凍結保存には培養細胞用の凍結保存液（ラボバンカー2、倉敷紡績株式会社）を用いた。輸送時はドライアイスと同梱して、オルガノイドを凍結した状態で輸送した。岐阜大学に到着したオルガノイドは、-80度で短期間保存されたのち、解凍して、マトリゲル内に包埋して培養し、その後の増殖および継代の可否について検討した。

#### ①-2. 凍結輸送後のオルガノイドを用いた発がん性短中期試験

輸送後に培養・継代が可能であった野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス肺由来オルガノイドにアクリルアミド (0, 0.28, 1.4mM) を3回処置し、オルガノイドを増殖させた後、ヌードマウス(各濃度2匹)の両側の腹側部皮下に、マトリゲルと混和したオルガノイドを接種した。接種後、8週間飼育し、接種部位の組織を病理組織学的に解析した。

### ②アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの形態評価

野生型CB6F1マウスの肺由来オルガノイドにアクリルアミド (0, 0.28, 1.4mM) を3回処置したのち、2度継代し、その形態変化を解析した。iPge11 (ジェノスタッフ社) を用いてオルガノイドを集め、ホルマリン固定後、定法に従い、パラフィン包埋切片を作製し、H&E染色を施し観察した。パラフィン切片はKi-67に対する免疫染色にも用いた。一次抗体に、抗Ki-67モノクローナル抗体(希釈倍率: ×100, Clone: SP6, Abcam, イギリス)を用いて、定法に従って免疫染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### ① 凍結保存オルガノイドを用いた発がん性短中期試験の検討

#### ①-1. 冷凍輸送後のオルガノイドの培養

2系統(野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス)については、輸送先である岐阜大学において培養・継代が可能であった(図1)。一方、4系統(野生型および *p53* (+/-) 型 BALB/c マウス、野生型および *rasH2* トランスジェニック CB6F1 マウス)は培養が不可能であった(図2)。したがって、オルガノイドの凍結、保存、解凍後の培養の工程に改善の余地があるものの、凍結保存されたオルガノイドを輸送して培養することは可能であることが示された。

#### ①-2. 凍結輸送後のオルガノイドを用いた発がん性短中期試験

培養が可能であった野生型および *p53* (+/-) 型 C57BL/6J マウス肺由来オルガノイドを用いて、SOPに従って発がん性短中期試験を実施したが、野生型オルガノイドについては、アクリルアミド処置後の増殖過程で崩壊するオルガノイドが多かったため、マウスへの投与は中止した。*p53* (+/-) 型オルガノイドは皮下接種8週間後には、肉眼的に明らかな腫瘍形成は認められず、従来の結果と一致していた(図3)。

以上より、凍結保存されたオルガノイドを輸送して、*in vitro* 発がん性短中期試験に用いることが可能であることが明らかとなった。凍結保存されたオルガノイドを用いることができれば、必要に応じて随時試験を開始することができ、また、各施設でオルガノイドを調整する必要がなくなるため、試験の普及、安定化の面からメリットは大きい。

### ②アクリルアミド処置後の肺オルガノイドの形態評価

#### ②-1. 病理組織学的解析

アクリルアミド処置後、オルガノイドの壁の重層化が観察された(図4)。HE標本上で、各群20個のオルガノイドについて、多層化の頻度および程度を評価した。壁が最も肥厚した部分の層数を計数したところ、3回暴露終了後2度目の継代時点で対照群と比較して1.4 mM AA暴露群で多層化の程度が有意に上昇していた(表1)。また、有意差は認められなかったものの、AA濃度依存的に多層化したオルガノイドの出現頻度が高くなる傾向が認められた(表1)。Ki-67免疫染色による細胞増殖活性の評価では、予想に反して、多層化したオルガノイドで必ずしも陽性細胞が増加してはならず、また多層化していないオルガノイドにおいて高い陽性率を示すものも認められた(図5)。対照群と比較してAA暴露群でKi-67陽性率は高かったが、有意差は認められなかった(図6)。

以上より、化学物質投与後のオルガノイドの形態変化の観察及びその定量的な評価が発がん性の評価に有用である可能性が示唆された。今回、アクリルアミド3回暴露+2回継代後の形態変化を観察したが、どのタイミングで評価するのが最適か検討していく必要がある。また、今後、他の発がん性物質でも同様の

変化が誘導されるか検討していく必要がある。マウスオルガノイドを用いたin vitro発がん性短中期試験の標準プロトコールでは、化学物質処置後のオルガノイドをヌードマウスに皮下移植して評価しているが、オルガノイド自体の評価で被検物質の発癌性を評価できるようになれば、動物数の削減につながり、動物福祉の面からメリットは大きい。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Arioka Y, [Hirata A](#), Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare *RELN* deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. *Schizophrenia Res.* 216:511-515, 2020
- (2) Ishida K, Tomita H, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Kawaguchi M, Miyai M, Matsuo M, Imaizumi Y, Nakashima T, Kato K, Hatano Y, [Hirata A](#), Okada H, Shibata T, Hara A. Specific deletion of p16<sup>INK4a</sup> with retention of p19<sup>ARF</sup> enhances the development of invasive oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 190: 1332-1342, 2020
- (3) Tashita C, Hoshi M, [Hirata A](#), Kubo H, Nakamoto K, Hattori T, Yamamoto Y, Tomita H, Hara A, and Saito K. Kynurenine Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice. *World J. Gastroenterol.* 7;26(9):918-932. 2020
- (4) Kurihara T, [Hirata A](#), Yamaguchi T, Okada H, Kameda M, Sakai H, Haridy M, Yanai T. Avipoxvirus infection in two captive Japanese cormorants (*Phalacrocorax capillatus*). *J. Vet. Med. Sci.* 82(6) :817-822, 2020
- (5) Yamazaki A, Nakamura T, Miyabe-Nishiwaki T, [Hirata A](#), Inoue R, Kobayashi K, Miyazaki Y, Hamasaki Y, Ishigami A, Nagata N, Kaneko A, Koizumi M, Ohta H, Okano HJ, Murata T. The production profile of lipid metabolites in urine of marmoset with wasting syndrome. *PLoS One* 15(6): e0234634, 2020
- (6) Yoshizaki K, [Hirata A\\*](#), Nishii N, Kawabe M, Goto M, Mori T, and Sakai H. Familial Adenomatous Polyposis in Dogs: Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers with Germline *APC* Mutations. *Carcinogenesis*, 42(1), 70-79, 2021

- (7) Miyai M, Kanayama T, Hyodo F, Kinoshita T, Ishihara T, Okada H, Suzuki H, Takashima S, Wu Z, Hatano Y, Egashira Y, Enomoto Y, Nakayama N, Soeda A, Yano H, [Hirata A](#), Niwa M, Sugie S, Mori T, Maekawa Y, Iwama T, Matsuo M, Hara A, Tomita H. Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment. *Neurooncol. Adv.*3(1):1-15, 2021
- (8) Yoshizaki K, [Hirata A\\*](#), Matsushita H, Nishii N, Kawabe M, Mori T, and Sakai H. PCR-based Genotyping Assays to Detect Germline *APC* Variant Associated with Hereditary Gastrointestinal Polyposis in Jack Russell Terriers. *BMC Vet. Res.* 17(1):32, 2021
- (9) Tomita H, Tanaka K, [Hirata A](#), Okada H, Imai H, Shirakami Y, Onishi K, Sugie S, Aoki H, Hatano Y, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Suzui N, Miyazaki T, Tanaka T, Akiyama H, Shimizu M, Yoshida K, and Hara A. Inhibition of FGF10-ERK signal activation suppresses intraductal papillary neoplasm of the bile duct and its associated carcinomas. *Cell Rep.* 34(8):108772, 2021
- (10) Goto M, [Hirata A](#), Murakami M, Minami N, and Sakai H. What's your diagnosis? Subcutaneous mass on the head of a dog. *Vet. Clin. Pathol.* in press

### 2. 学会発表

- (1) 入澤祐太、平田暁大、酒井洋樹、今井俊夫：アクリルアミド暴露後の肺オルガノイドの病理組織学的変化。第37回日本毒性病理学会（2021年1月、Web開催）

## 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。



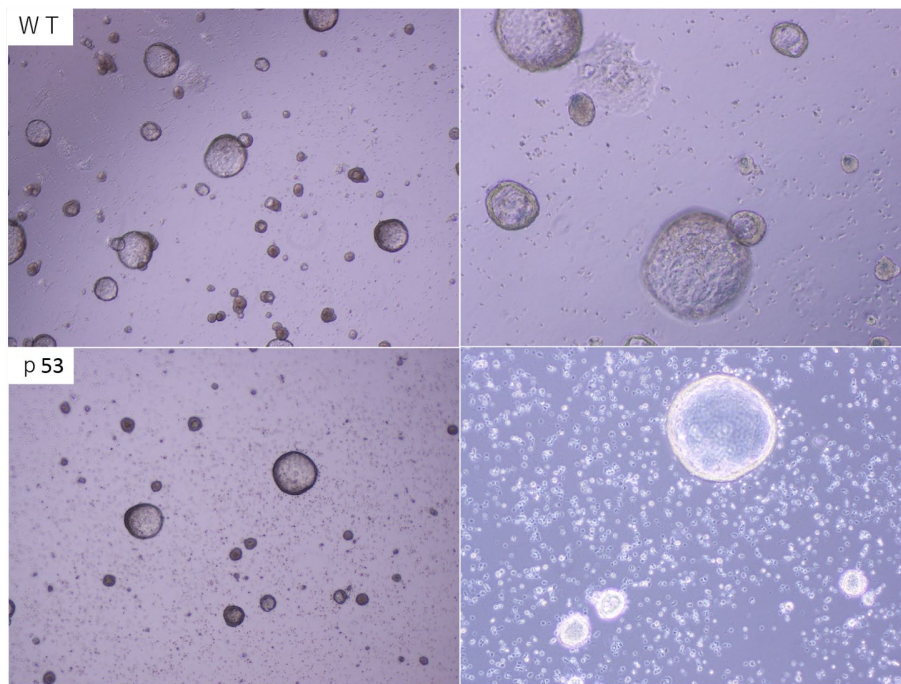


図 1. 解凍後6日目の野生型 (WT) および  $p53 (+/-)$  型 ( $p53$ ) C57BL/6マウス由来オルガノイド

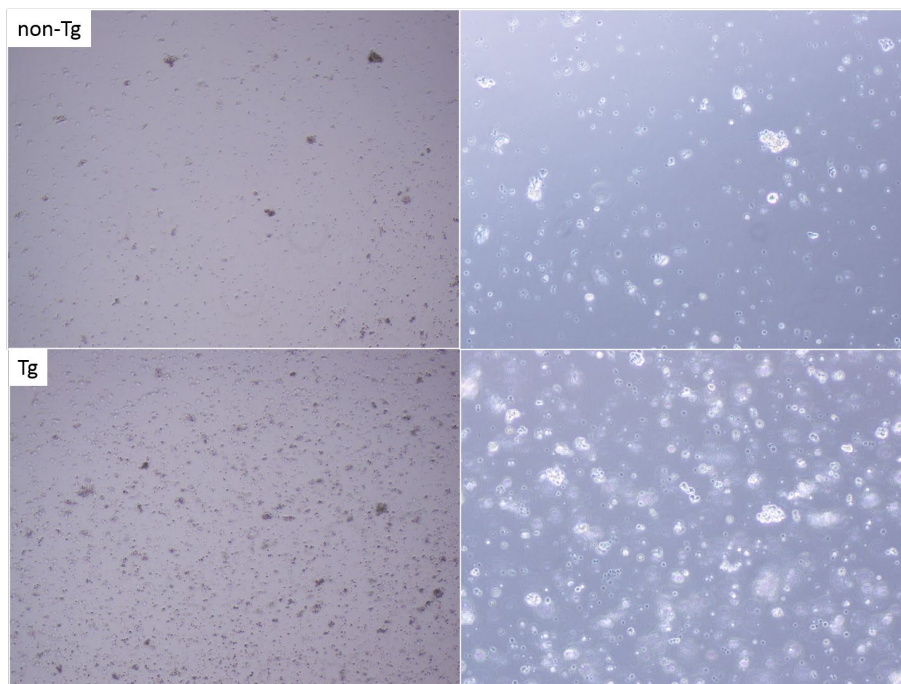


図 2. 解凍後8日目の野生型 (non-Tg) および  $rasH2$  トランスジェニック (Tg) マウス由来オルガノイド

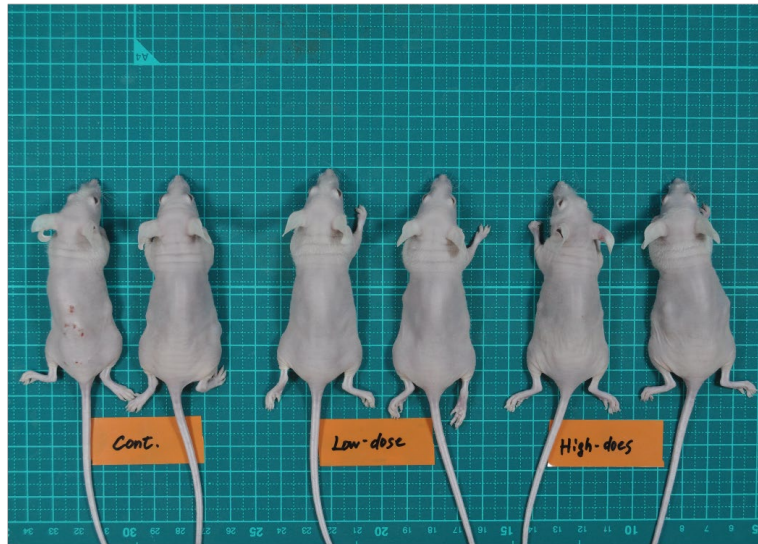


図3. アクリルアミド処置後のオルガノイドのヌードマウスにおける造腫瘍性の検討

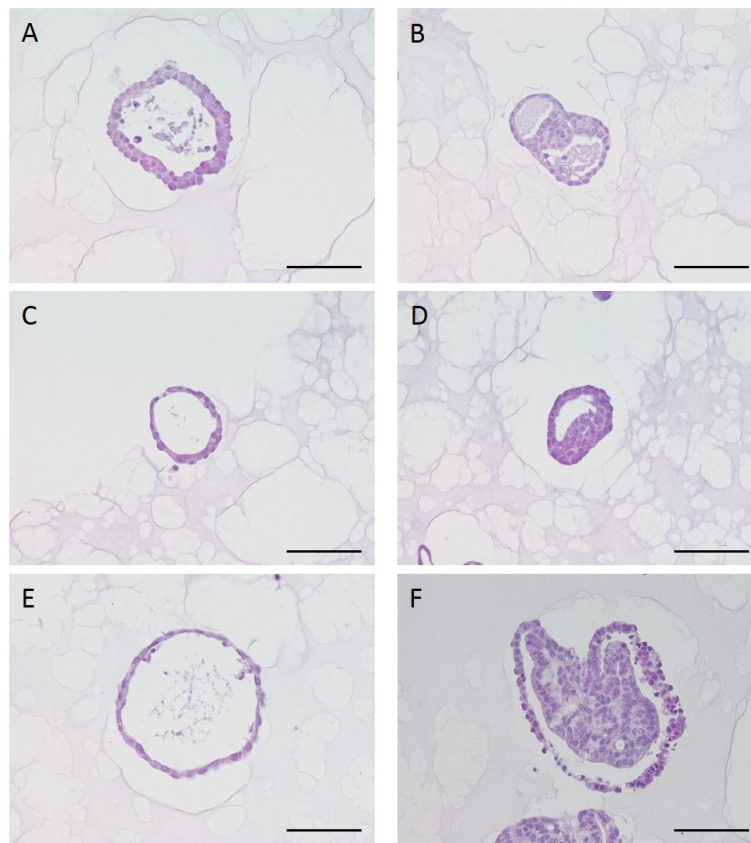


図4. アクリルアミド3回暴露後2回継代時点の野生型CB6F1マウス由来オルガノイド組織像(HE染色)  
 (A) 0 mM アクリルアミド(AA)暴露オルガノイド。多くは単層から2層の壁を有するシスト様構造を示す。  
 (B) 0 mM AA暴露オルガノイド。壁の一部が多層性に肥厚したものが散見される。  
 (C) 0.28 mM AA暴露オルガノイド。多くは単層から2層の壁を有するシスト様構造を示す。  
 (D) 0.28 mM AA暴露オルガノイド。壁の一部が多層性に肥厚したものが散見される。  
 (E) 1.4 mM AA暴露オルガノイド。単層から2層の壁を有するオルガノイドが認められる。  
 (F) 1.4 mM AA暴露オルガノイド。壁の一部が高度に肥厚したものがしばしば認められる。スケールバー: 50  $\mu$ m

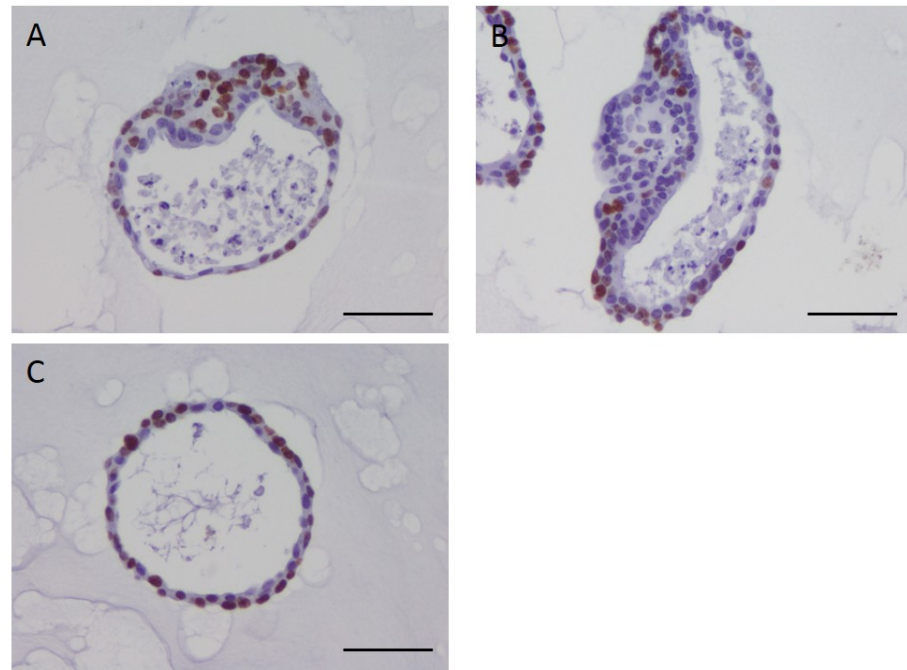


図5. アクリルアミド3回暴露後2回継代時点の野生型CB6F1マウス由来オルガノイドのKi-67免疫染色(1.4mM暴露群)  
 (A)多層化した壁において多くの細胞が核陽性を示す。(B)多層化した壁において多くの細胞が陰性を示す。  
 (C)多層化を示さないオルガノイドでも陽性率の高いものが観察される。  
 スケールバー: 50  $\mu$ m

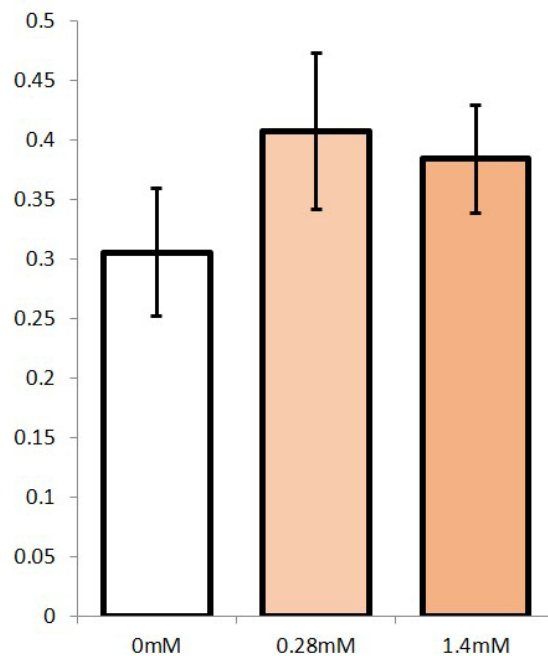


図6. アクリルアミド3回暴露後2回継代時点の野生型CB6F1マウス由来オルガノイドのKi-67陽性率(平均 $\pm$ 標準誤差)

表 1. アクリルアミド 3 回暴露後 2 回継代時点の野生型 CB6F1 マウス由来オルガノイドの多層化の頻度と程度

	AA濃度(mM)		
	0	0.28	1.4
多層化の頻度	8/20	9/20	15/20
多層化の程度 (層)	2.7±0.30	2.7±0.25	4.5±0.60*

多層化の程度は各オルガノイドの最肥厚部の層数の平均±標準誤差を示す。

\*p<0.05 by Steel-Dwass