

オルガノイドの調製、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 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、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的として、バリデーション試験において使用する陽性および陰性対照物質の選択と発がん感受性に対するオルガノイド樹立に使用するマウス系統差を明らかにするための解析を行っている。今年度は、C57BL (B6) 背景の野生型、*Trp53* ヘテロノックアウト (*Trp53* +/-) および *Trp53* ホモノックアウト (*Trp53* -/-) マウスを用いて肺および肝臓 (胆管) 由来のオルガノイドを調製し、陽性対照物質の遺伝毒性発がん物質としてはメチルニトロソ尿素 (MNU)、被験物質として遺伝毒性発がん物質とされるアセトアミドの発がん作用を検討した。結果として、高感受性を期待した *Trp53* -/- マウス由来オルガノイドではMNU、アセトアミドともに明らかな影響を示さなかったが、野生型および *Trp53* +/- マウス由来の特に肝臓 (胆管) オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した結果、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異型性 (一部微小がんを含む) が、各処置群の1用量あるいは2用量において3/4~4/4の頻度でみられた。以上より、B6背景の野生型および *Trp53* +/- マウスの肝臓 (胆管) 由来オルガノイドは遺伝毒性・非遺伝毒性発がん物質のMNUとアセトアミドの *in vitro* 処置に対して発がん感受性を示し、香料等の発がん性評価に有用であることが示された。

A. 研究目的

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究において、レポーター遺伝子導入マウスから3次元培養法により調製したオルガノイド系を用いることで既知の遺伝毒性物質を検出し、野生型マウス、がん関連遺伝子改変マウスあるいはshRNAにより発がん関連遺伝子の発現を変化させたオルガノイド系を用いることで既知の発がん物質による造腫瘍性あるいは上皮細胞の重層化・浸潤性・異型性の誘発を指標とする発がん性を検出する方法を確立する。本分担研究においては、マウスオルガノイド系を用いる遺伝毒性・発がん性短中期試験法として多施設で実施可能な標準法の確立を目的としている。平成30年度は、*gpt* deltaマウス、BALB/c背景およびC57BL (B6) 背景の *Trp53*ヘテロノックアウト (*Trp53* +/-) および野生型マウス、令和元年度は、CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (rasH2) およびnonTgマウスの正常組織として肺と肝臓 (胆管) からオルガノイドを調製して研究に供した。今年度は、マウス系統差を明らかにする一環として、B6背景の野生型、*Trp53* +/- および *Trp53* ホモノックアウト (*Trp53* -/-) のオルガノイドを用いる解析を行った。

具体的には、平成30年度にBALB/c背景およびB6背景の *Trp53* +/- および野生型マウス由来の肺および肝臓 (胆管) 由来オルガノイドを用いて3つの遺伝毒性発がん物質を用いる解析を行った結果、顕著な系統差がみられなかったことから、マウス背景系統としてはB6マウスとし、マウス個体での *in vivo* 発がん実験では遺伝毒性発がん物質に高感受性を示すが短期間でリンパ腫が発生し他臓器における発がん性が検出しづらい *Trp53* -/- マウスを加えることとした。また、遺伝毒性発がん物質としては *in vivo* 発がん実験では肺を含む多臓器で発がん性を示すメチルニトロソ尿素 (MNU) を、被験物質としては食品中に含まれラットの長期発がん性試験で肝臓に発がん性を示すアセトアミドを *in vitro* で処置した。各化学物質の発がん性評価は、オルガノイドをヌードマウス皮下に接種後8週間経過後に採取した組織の病理組織学的解析により行った。

B. 研究方法

(1) マウス正常組織からのオルガノイドを樹立および樹立したオルガノイドに対する化学物質の *in vitro* 暴露

1) オルガノイドの調製

国立がん研究センター研究所にて繁殖・維持しているB6背景の *Trp53*^{-/-}、*Trp53*^{+/-} および野生型の雄マウス（5週齢）の肺および肝臓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]

- i) 肺・肝臓を摘出、細切、酵素処理
- ii) 12ウェルプレートにマトリゲルを滴下、37°Cで固まらせた上に単離細胞を播種し液体培地にて1日間培養

[2日目]

- i) 液体培地を除きマトリゲルを重層
- ii) 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時期を判断）]

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

2) オルガノイドへの化学物質暴露

i) 被験物質濃度：

メチルニトロソ尿素（MNU）；1）で調製し96ウェルプレートに播種したB6背景の *Trp53*^{-/-}；*Trp53*^{+/-}；野生型マウス由来の肺および肝臓（胆管）オルガノイドに対して0、0.125～4.0 mM（+S9 mix 添加なし；発がんに代謝活性化を要さないため）濃度にてMNUを24時間暴露した後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay（プロメガ）により生細胞数を測定した。MNU処置直後と72時間後までの生細胞数から、本実験では、肺オルガノイドについては各系統とも0、0.125、0.5 mM、肝臓（胆管）オルガノイドについては *Trp53*^{-/-}；*Trp53*^{+/-}；野生型マウスについて各々0、0.125、0.5 mM；0、0.25、1.0 mM；0、0.5、2.0 mM（+S9 mix 添加なし）濃度で行うこととした。

アセトアミド；MNUと同様に予備検討を行い、2.0、4.0 mM濃度においても生細胞数に影響がみられなかったことから、本実験は0、0.5、2.0 mM（+S9 mix 添加あり）濃度で行うこととした。

ii) 被験物質処置：

肺および肝臓（胆管）オルガノイドは12ウェルプレートで培養し、約1週間毎の継代の際、1日目の播種後に培地に被験物質を添加、24時間暴露後の2日目にPBSで洗浄後マトリゲルを重層し培養を継続した。被験物質処置は連続3回の継代時に行った。

4) オルガノイドのヌードマウス皮下への接種

[オルガノイドの継代・培養を3回程度繰返し後]

- i) オルガノイドをマトリゲルとともに回収し、等量のマトリゲルを混和した。
- ii) イソフルランによる麻酔下にて1ウェル分のオルガノイドを背部皮下1カ所に、1匹あたり左右2カ所に接種した。

（2）ヌードマウス皮下に接種したオルガノイドから形成された組織に対する病理組織学的評価

1) パラフィン包埋切片の作製と病理組織学的評価

接種8週後に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接種部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて1日固定した。常法に従い、パラフィン包埋した後、4 μm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。

（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、令和元年最終改正法律第51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、平成29年最終改正法律第41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）メチルニトロソ尿素（MNU）

1) 肉眼所見

ヌードマウス皮下における *Trp53*^{-/-}、*Trp53*^{+/-} および野生型マウス由来の肺オルガノイドについて、MNU処置群と非処置群ともに長径2.7～9.0 mm程度の白色～乳白色透明の結節としてみられ、MNU処置による明らかな違いは認められなかった。肝臓（胆管）オルガノイドについても、MNU処置群と非処置群ともに長径2.9～9.8 mm程度の白色～乳白色透明の結節（一部赤褐色出血痕または透明嚢胞を含む）としてみられ、MNU処置による明らかな違いは認められなかった。

2) 病理組織学的所見

Trp53^{+/-} および野生型マウス由来の肝臓（胆管）

オルガノイドのMNU低濃度および高濃度処置群各3/4あるいは4/4部位において、発がん性を示す上皮細胞の重層化/浸潤性/異形成（高濃度群1/4部位では微小がん）がみられた（写真1）。*Trp53*^{-/-}マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドでは、MNU低濃度および高濃度処置群各1/4部位に同様の所見（低濃度処置群1/4部位では微小がん）がみられたが有意ではなかった。肺オルガノイドについては、各系統由来ともにMNU処置による影響はみられなかった。

（表1）

（2）アセトアミド

1）肉眼所見

ヌードマウス皮下における*Trp53*^{-/-}、*Trp53*^{+/-}および野生型マウス由来の肺オルガノイドについて、アセトアミド処置群と非処置群ともに長径2.7~9.0 mm程度の無色透明~白色~乳白色透明の結節としてみられた。肝臓（胆管）オルガノイドについても、アセトアミド処置群と非処置群ともに長径2.5~16.3 mm程度の結節がみられたが、明らかなアセトアミドの影響は認められなかった。

2）病理組織学的所見

Trp53^{-/-}マウス由来の肺オルガノイドには、アセトアミド高濃度処置群の2/4部位に浸潤性増殖がみられたが、有意ではなかった（写真2）。*Trp53*^{+/-}マウスと野生型マウス由来の肺オルガノイドにはアセトアミド処置による影響はみられなかった。野生型マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのアセトアミド低濃度および高濃度処置群各3/4部位および4/4部位において、上皮細胞の重層化と浸潤性増殖がみられ、発がん性を示唆する所見と考えられた。*Trp53*^{+/-}マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドのアセトアミド高濃度処置群においても2/4部位の微小がん、2/4部位には浸潤性がみられた（写真3）。*Trp53*^{-/-}マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドには、明らかなアセトアミド処置による影響はなかった。（表1）

以上、B6背景の*Trp53*^{+/-}マウスと野生型マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドは遺伝毒性発がん物質のMNUあるいは非遺伝毒性発がん物質とされるアセトアミドの*in vitro* 処置に対して発がん感受性を示した。一方、*Trp53*^{-/-}マウス由来の肝臓（胆管）オルガノイドはMNUに対し軽微な感受性を示したものの有意ではなく、アセトアミドには非感受性であった。また、B6背景の*Trp53*^{-/-}マウス由来の肺オルガノイドはアセトアミドに対して軽微な感受性を示したものの有意ではなく、*Trp53*^{+/-}マウスと野生型マウス由来の肺オルガノイドは非感受性であった。更に、何れの系統マウス由来の肺オルガノイドにおいてもMNUには非感受性であった。

肺における化学発がんに関し、B6マウスは感受性であることが示されているが（Kakehashi A et al., *Int J Mol Sci* 18, 2017）、一方でB6背景の*Trp53*^{-/-}

Trp53^{+/-}マウスに対するMNUの発がん性はリンパ腫および皮下などの肉腫などとする報告もあり（Ohgagi H et al., *Mol Carcinog* 28, 2000）、広範囲の化学物質に感受性を示すマウス系統については引続き検討を要すると考えられた。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Matsuura, T., Maru, Y., Izumiya, M., Hoshi, D., Kato, S., Ochiai, M., Hori, M., Yamamoto, S., Tasuno, K., Imai, T., Aburatani, H., Nakajima, A., Hippo, Y.: Organoid-based *ex vivo* reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 41, 490-501 (2020)
- (2) Naruse, M., Masui, R., Ochiai, M., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* 41, 1444-1453 (2020)
- (3) Naruse, M., Ochiai, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Yoshida, T., Ichikawa, H., Sakamoto, H., Kubo, T., Matsumoto, K., Ochiai, A., Imai, T. Re-expression of *REG* family and *DUOXs* genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs. *Sci. Rep.* 11:2077 (2021)
- (4) Yagishita, S., Kato, K., Takahashi, M., Imai, T., Yatabe, Y., Kuwata, T., Suzuki, M., Ochiai, A., Ohtsu, A., Shimada, K., Nishida, T., Hamada, A., Mano, H. Characterization of the large-scale Japanese patient-derived xenograft (J-PDX) library. *Cancer Sci.* (In press)

2. 学会発表

- (1) 今井俊夫、町田雪乃、成瀬美衣：マウス正常乳腺組織由来オルガノイドの特性. 第37回日本毒性病理学会学術総会（浜松（オンライン））：2021年1月

F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

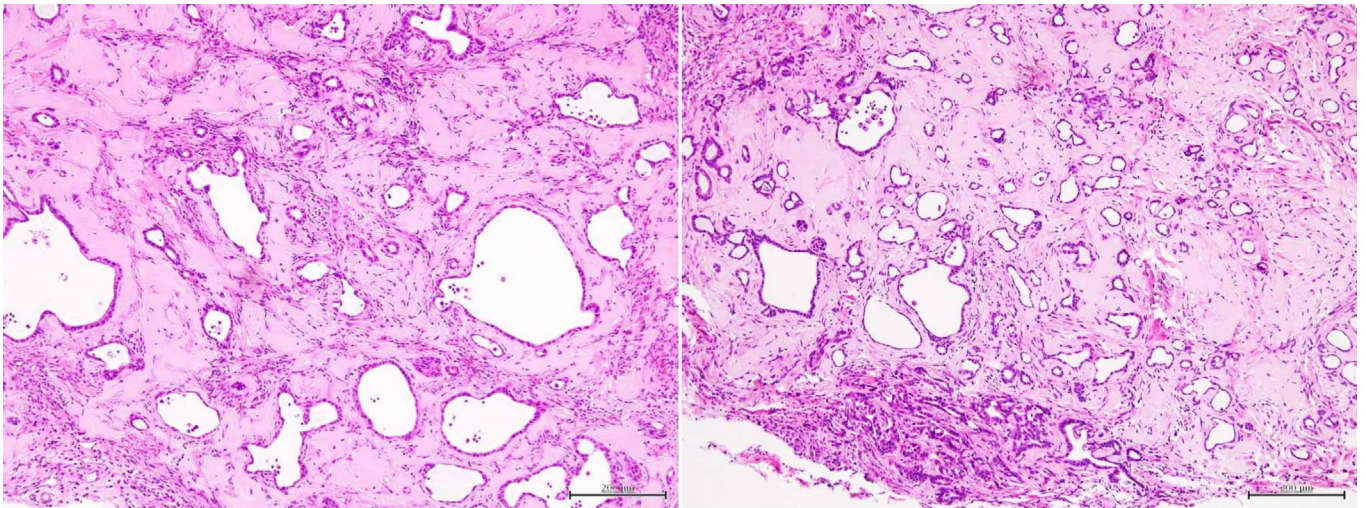
(表1)

マウス肺/肝由来オルガノイドに対する化学物質処置によるヌードマウス皮下での病理組織学的変化(上皮浸潤性/重層化)

年度	マウス系統	遺伝子型	臓器	被験物質						
				アセトアミド			N-メチル-N-ニトロソ尿素			
				対照	低濃度	高濃度	対照	低濃度	高濃度	
R2	B6	野生型	肺	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	 : $p=0.0025$: $p=0.012$: $p=0.018$: $p=0.072$: $p=0.091$ (mxn分割表)
		<i>Trp53</i> ^{+/-}		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
		<i>Trp53</i> ^{-/-}		0/4	0/4	2/4	0/4	0/4	0/4	
		野生型	肝 (肝内胆管)	0/4	3/4	4/4	1/4	3/4	4/4	
		<i>Trp53</i> ^{+/-}		1/4	0/4	4/4**	0/4	4/4	4/4*	
		<i>Trp53</i> ^{-/-}		0/4	0/4	0/4	0/4	1/4*	1/4	

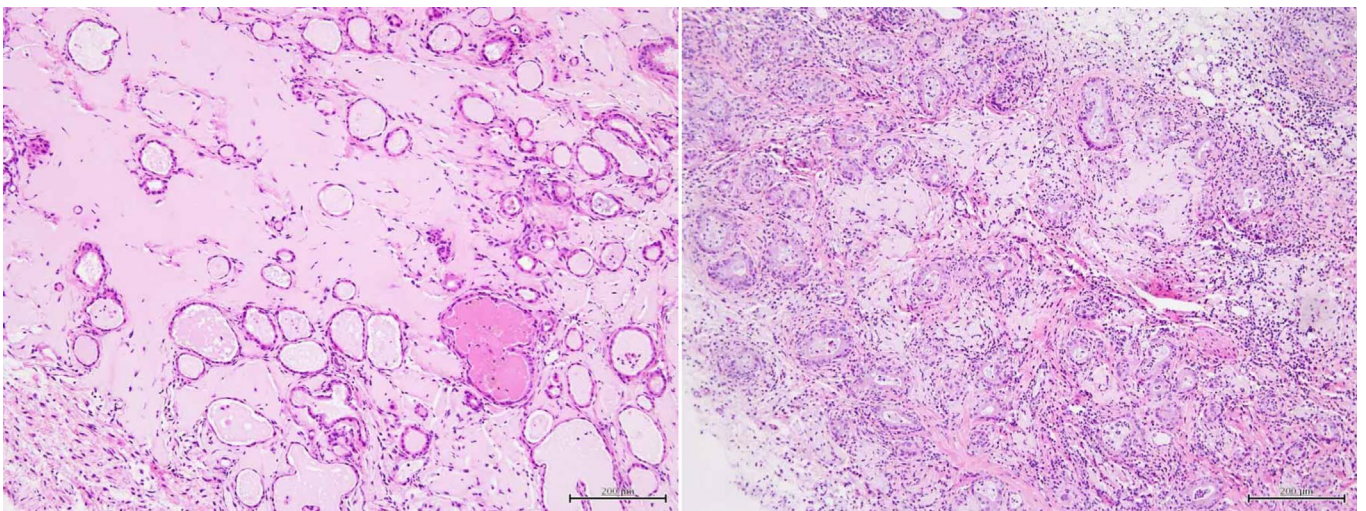
* 1/4造腫瘍性を含む

** 2/4造腫瘍性を含む

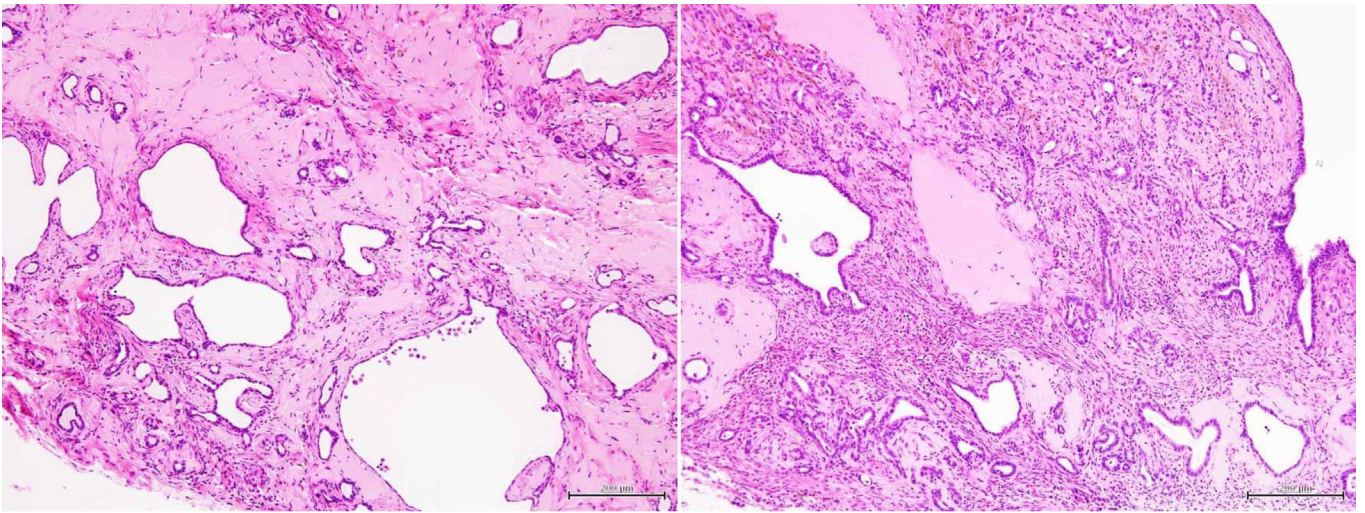


(写真1) MNU処置した *Trp53* +/- マウス由来の肝臓 (胆管) オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。

対照群 (左) では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。MNU高濃度群 (右) では写真下方に微小がんが、左上方には浸潤性を示す腺管が認められる。



(写真2) アセトアミド処置した *Trp53* -/- マウス由来の肺オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群 (左) では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。アセトアミド高濃度群 (右) では上皮細胞が立方上皮化し、さらに周囲組織に浸潤し炎症細胞が反応している像がみられる。



(写真3) アセトアミド処置した *Trp53* +/- マウス由来の肝臓 (胆管) オルガノイドのヌードマウス皮下接種後の病理組織像。対照群 (左) では単層の上皮細胞に裏打ちされたオルガノイドと線維細胞、膠原繊維、残存するマトリゲルなどで構成される。アセトアミド高濃度群 (右) では写真上方に隆起性の微小がんがみられる。