

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

## オルガノイドの調製

研究分担者 落合 雅子 静岡県立大学 食品栄養環境科学研究所 客員共同研究員

## 研究要旨

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腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標として既知の発がん性物質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。令和2年度は、B6背景 *Trp53* ヘテロノックアウトおよび野生型マウスについては肺および肝臓（胆管）オルガノイドを新たに調製し、分担研究者へ調整済みオルガノイドを送付した。調整済みオルガノイドの送付は、12ウェルプレートでの常温輸送もしくは凍結保存したチューブの冷凍状態（-80℃）での輸送で行った。また、肺や肝臓（胆管）オルガノイドを中心に進めてきた化学物質の評価について、更に大腸を標的としたケースに対応するために、B6マウスの大腸由来オルガノイドの調製を検討した。

## 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が腫瘍様組織あるいは増殖活性・異型性・浸潤性を指標とする発がん性物質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。今年度は、C57BL/6(B6)背景 *Trp53* ヘテロノックアウトおよび野生型マウスの肺および肝臓（胆管）オルガノイドの調製を行い、分担研究者に供給した。また、肺や肝臓（胆管）オルガノイドを中心に進めてきた化学物質の評価について、更に大腸を標的としたケースに対応するために、大腸由来オルガノイドの調製の検討を行った。

## B. 研究方法

B6背景 *Trp53* ヘテロノックアウトおよび野生型マウスは、自家繁殖した雄各2匹を5週齢時に使用した。

安楽死後に、肺と肝臓を摘出し、以下の手順に従ってオルガノイドを調製した。

肺の肺門部、肝臓の肝門部を除いて細切し、PBS(-)中で強く攪拌した後に遠心した。DispaseII (Roche)、Collagenase P (Roche) を含む酵素液で37℃、30分間処置した後、ピペッティングにて細胞を分散させ、Cell strainerを通して、12ウェルプレートを用いてMatrigel (Corning) 上に播種し、BSAのほか、EGF (Peprotech)、Noggin (Peprotech)、Y27632 (和光純薬)、Jagged-1 (AnaSpec) など増殖因子を含む培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>下にて1日間培養、Matrigelを重層化して更に培養した。1週間に1回程度継代しつつオルガノイドを増やした。継代方法については「マウス正常組織由来オルガノイドの培養手順書」として平成30年度に纏めたSOPの記載に従って進めた。増やしたオルガノイドの一部は、保存液（ラボバンカー2-無血清タイプ、十慈フィールド）を用いて凍結保存した。

増やしたオルガノイドを他の分担研究者へ送付する際には、12ウェルプレートとして常温輸送、または凍結保存したチューブの冷凍状態（-80℃）での輸送として、宅配便で送付した。

大腸オルガノイドの調製は、B6マウス（雄、4週齢）各2匹を日本チャールス・リバー社より購入した。1週間の順化期間後に安楽死させ、大腸を摘出し、肺、肝臓（胆管）と同様の手順に従い、Matrigel上に播種し

た。培地の組成は、Wang Fらの論文(Gastroenterology, 145:383-95, 2013)の方法を改変し、最終的には、EGF, A 83-01(FCS), BSAを含む培地で培養した。継代方法は、上記のSOPの記載(Accumaxの代わりにAccutaseを使用)に従って進めた。

### C. 研究結果と考察

B6背景 *Trp53* ホモノックアウト、ヘテロノックアウトおよび野生型マウス各2匹から肺および肝臓(胆管)オルガノイドは何れも3~5回程度継代すると12ウェル程度に増やすことができたが(写真1)、他の分担研究者へ送付する目的で、更に継代を続けてオルガノイドを増やした。増やしたオルガノイドの一部は、保存液を用いて凍結保存した。

増やしたオルガノイドの他施設への輸送に際しては、12ウェルプレートで培養中の状態から培地のみを除き、重層したマトリゲル中で維持したまま宅配便により送付する、常温条件での輸送と、オルガノイドを凍結保存したチューブを-80℃(ドライアイス)の冷凍状態で宅配便により送付する方法を採用した。季節を問わず施設間の輸送を可能にするためには、庫内を37℃程度に維持できる輸送箱による方法も検討する必要があると考えられた。

B6マウス由来大腸オルガノイドの調製においては、2匹中1匹の検体で、10回の継代時に、12ウェル程度に増やすことができている(写真2、実験継続中)。しかし、安定的に供給するには、更に効率的にオルガノイドを増やす必要があり、培地条件等の検討が必要であると考えられる。

(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

- (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(4), 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(10), 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(1), 2077 (2021)

#### 2. 学会発表

- (1) 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆかり：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79回日本癌学会学術総会(2020年10月、広島)
- (2) 成瀬美衣、落合雅子、落合淳志、今井俊夫：大腸がんオルガノイドとCAFの共培養によりREG familyやdual oxidase genesの遺伝子発現が誘導される。第79回日本癌学会学術総会(2020年10月、広島)

### 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

(写真1) B6背景 *Trp53* ホモノックアウトマウス由来の肺 (左) および肝臓 (胆管) (右) オルガノイド

