

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 がんモデル開発部門 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。昨年度は、作成した肺オルガノイドに、加熱食品中に含まれるアクリルアミド(AA)を0, 0.28, 1.4 mMの濃度、S9mix存在下で曝露したところ、高用量曝露群において形態変化が観察されたことから、AAに曝露した肺オルガノイドのDNAを常法に則って回収し、*gpt*遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。その結果、AAの濃度依存的に変異頻度が上昇する傾向が見られた。今年度は、肺オルガノイドのAAに対する変異スペクトルを解析し、*in vivo*試験結果との比較を行うことにより、本試験系の妥当性の検討を行った。

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。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、同様に作成した肺オルガノイドを用いて、加熱食品中に含まれるAAを曝露し、変異原性試験を行い、当試験の妥当性についてさらなる検討を行った。

B. 研究方法

① *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AA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λ 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組換え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、λ EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組換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°C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。

② 上記試験における変異スペクトルの解析および既報の*in vivo*試験結果との比較

①で得られた変異コロニーのシーケンス解析を行い、変異スペクトルを算出した。これらのデータとすでに報告のある*in vivo*実験の結果を照合し、当試験の妥当性の検討を行った。

C. 研究結果

① *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験

肺オルガノイドから抽出したゲノムDNAを用い、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、AA曝露によって変異頻度は0 mMと比べて0.28 mM (n=3)では差がなかったが、1.4 mM (n=3)で約4倍と増加傾向が見られた（図1）。

② 上記試験における変異スペクトルの解析および既報の*in vivo*試験結果との比較

①の変異原性試験で得られた変異コロニーの変異スペクトルの解析を行ったところ、変異頻度と同様にコントロールと0.28 mM曝露群に差は見られなかったが、1.4 mM曝露群においては、AT > TA、AT > CG、Insertion及びDeletionの有意な増加が認められた（図2）。

これらの変異スペクトルデータと既報（Y. Ishii *et al.* *Mutagenesis*, 2015,30,227-235）の*in vivo*試験結果と比較したところ、一部で同様の傾向を示した。

図1 肺オルガノイドを用いたAAの遺伝子変異原性試験

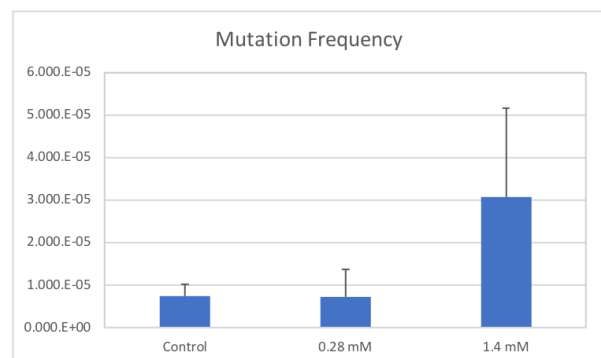
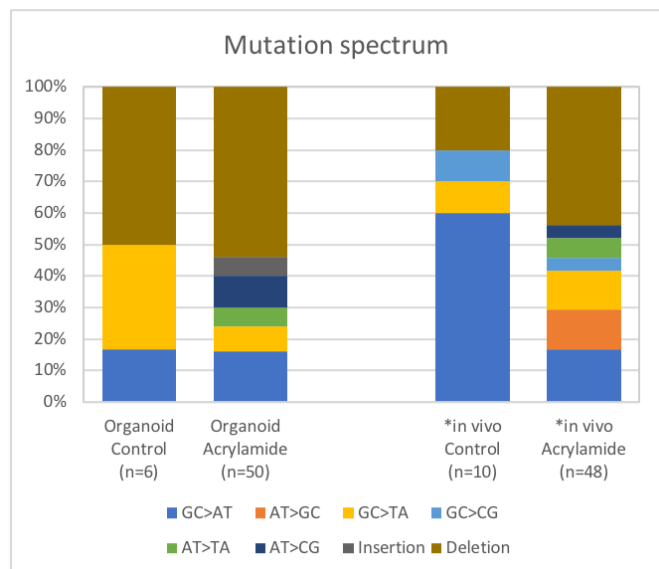


図2 肺オルガノイドを用いたAAの遺伝子変異原性試験の変異スペクトル



* Y. Ishii *et al.* *Mutagenesis*, 2015,30,227-235

(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、3Rの原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

D. 考察

初めてマウスにおけるアクリルアミドのがん原性が報告されて久しいが、最も汎用されている遺伝毒性試験であるAmes試験ではS9 mixの存在の有無にかかわらず陰性の結果となっている。しかし今回、オルガノイドを用いた実験では高濃度群において約4倍の変異頻度の上昇が観察された。この矛盾の理由として、代謝酵素であるCYP2E1の影響が考えられる。アクリルアミドは体内でCYP2E1により代謝を受け、グリシドアミドへと変化し、これがDNA付加体を形成しゲノム変異を誘発すると考えられている。事実、グリシドアミドはS9 mixの存在の有無にかかわらずAmes試験陽性と報告されている。Ames試験で汎用されているS9にはCYP2E1が殆ど含まれておらず、アクリルアミドの遺伝毒性の本態と考えられるグリシドアミドへの変換が起らないため、結果が陰性となるのではないかと考えられている。本研究では、Ames試験で使用しているS9と同じS9を用いているが、アクリルアミド高用量群で優位に変異頻度の上昇が観察された。このことから、使用したマウス由来の肺オルガノイドがCYP2E1を有していることが推測され、現在、この代謝酵素の発現について調べているところである。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G,

Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE., Kurane I. (2021) U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77.

- Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
- Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. (2020) Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96, 180-187.
- Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2020) Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33, 1907-1914.
- Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. (2020) Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42, 16.
- Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. (2020) Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 41, 368-376.

2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里 NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム(2020年6月 Web開催)
- 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会(2020年9月 Web開催)
- 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会(2020年10月、広島)
- 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要

- 因を解明する 第2回 三陸包括的緩和医療研究会 (2020年10月 Web 開催)
5. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回 環境変異原学会 (2020年9月、静岡)
6. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望 第37回 日本毒性病理学会 (2021年1月、Web 開催)
7. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望 第12回 JBF シンポジウム (2021年3月、Web 開催)
- (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
- G. 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