

## オルガノイドを用いる遺伝毒性試験の技術整備

研究分担者 三好規之 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

## 研究要旨

本分担班では、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ている。一方、本分担課題における検討では、国立がん研究センターにて調製されたgpt deltaマウス肺オルガノイドを静岡県立大学へ輸送し、継代培養後に披験物質（アクリルアミド）を曝露した試料を用い遺伝子突然変異試験を実施することで、オルガノイドを用いた試験結果における施設間でのばらつきについて基礎的なデータを蓄積する目的とした。

## 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。本研究班では、遺伝毒性・発がん性短期包括的試験法の開発を目指しているが、最終的にその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。分担課題においては、オルガノイドを用いた試験結果における施設間でのばらつきについて基礎的なデータを蓄積することが目的である。昨年度までに、国立がん研究センターにて調製されたgpt deltaマウス肺オルガノイドを静岡県立大学へ輸送し、披験物質（アクリルアミド）の曝露後、細胞を凍結保存した。また、凍結した細

胞からDNAを抽出し、パッケージング操作およびコロニー数のカウントを行った。本年度は、これまでに取得したコロニーのシーケンス解析を行い、アクリルアミド処理による変異パターンを検討した。

## B. 研究方法

爪楊枝で採取したコロニーをPCR溶液に添加・懸濁した。PCRプライマーは、gptP1 forward; TAC CAC TTT ATC CCG CGT CAG GおよびgptP2 reverse; A CA GGG TTT GGC TCA GGT TTG Cを用いて、94℃ 4.5分ののち、94℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 2分を30サイクル後、72℃ 5分で、740 bpを増幅させた。アガロースゲル電気泳動にてシングルバンドであることを確認したPCR後の溶液1 μLと、シーケンスプライマー（9.6 pmol）混合し、シーケンス解析を行った（ユーロフィンジェノミクス株式会社）。シーケンスプライマー配列は以下である。gptA2 forward; T CT CGC GCA ACC TAT TTT CCC。シーケンス後のDNA配列を解析し、変異パターンを検討した。

## C. 研究結果

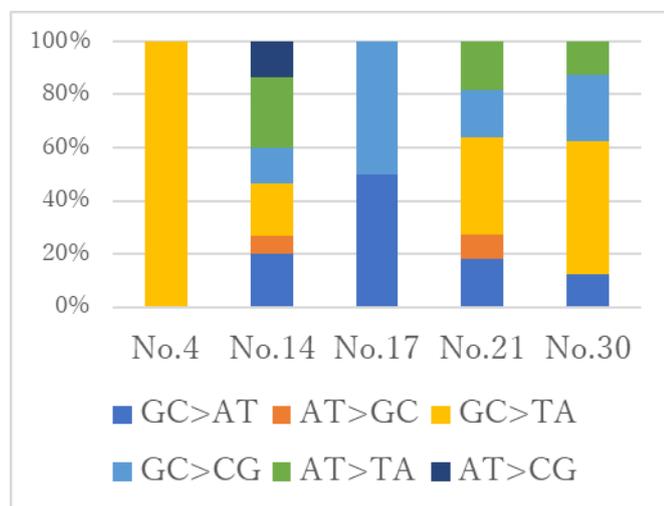
以下に計3回行ったアッセイで得られたコロニー数をまとめた表を示す。

Assay Date	Assay sample	6-TG(-)		Average	6-TG(+)					Total	Titer	Confirmation	MF
2020.02.14	Control_1	1	2	1.5	6	3	2	6	5	22	4,500	0	0
2020.02.14	Control_2	1	0	0.5	2	3	5	7	4	21	1,500	0	0
2020.02.14	Control_3	1	3	2	4	3	1	5	3	16	6,000	0	0
2020.02.14	0.28 mM AA_1	4	2	3	4	4	5	3	3	19	9,000	0	0
2020.02.14	0.28 mM AA_2	3	5	4	5	2	2	1	3	13	12,000	0	0
2020.02.14	0.28 mM AA_3	2	7	4.5	5	3	1	2	2	13	13,500	0	0
2020.02.14	1.4 mM AA_1	2	3	2.5	7	6	6	2	2	23	7,500	0	0
2020.02.14	1.4 mM AA_2	1	1	1	8	4	3	3	4	22	3,000	0	0
2020.02.14	1.4 mM AA_3	2	1	1.5	7	11	7	5	3	33	4,500	0	0

Assay Date	Assay sample	6-TG(-)		Average	6-TG(+)				Total	Titer	Confirmation	MF	
2019.11.12	Control_1	26	14	20	5	0	3	0	8	60000	0	0	
2019.11.12	Control_2	13	18	15.5	0	1	0	0	3	46500	0	0	
2019.11.30	Control_3	4	6	5	0	0	0	0	0	15000	0	0	
2019.11.12	0.28 mM AA_1	7	1	4	3	5	5	2	4	12000	0	0	
2019.11.12	0.28 mM AA_2	3	4	3.5	0	0	0	0	0	10500	0	0	
2019.11.30	0.28 mM AA_3	15	25	20	0	0	0	0	0	60000	0	0	
2019.11.12	1.4 mM AA_1	19	21	20	1	0	0	1	5	7	60000	0	
2019.11.30	1.4 mM AA_2	5	6	5.5	5	4	1	2	0	12	16500	6	0.000364
2019.11.30	1.4 mM AA_3	9	11	10	1	0	0	1	5	7	30000	2	6.67E-05

Assay Date	Assay sample	6-TG(-)		Average	6-TG(+)				Total	Titer	Confirmation	MF	
2019.10.11	Control_1	50	36	43	1	0	1	2	0	4	129000	0	0
2019.10.11	Control_2	25	20	22.5	0	1	0	0	0	1	67500	0	0
2019.10.11	Control_3	14	13	13.5	0	1	0	0	5	6	40500	0	0
2019.10.11	0.28 mM AA_1	9	4	6.5	1	0	1	4	2	8	19500	0	0
2019.10.11	0.28 mM AA_2	24	40	32	0	0	0	3	5	8	96000	0	0
2019.10.11	0.28 mM AA_3	84	338	211	2	3	0	0	0	5	633000	0	0
2019.10.11	1.4 mM AA_1	16	19	17.5	3	1	7	6	5	22	52500	0	0
2019.10.11	1.4 mM AA_2	9	11	10	18	21	22	28	19	108	30000	60	0.002
2019.10.11	1.4 mM AA_3	20	27	23.5	0	0	2	1	0	3	70500	0	0

コントロール、0.28 mMおよび1.4 mM アクリルアミド (AA) 曝露を各n=3で行うアッセイを3回繰り返した。いずれにおいてもコントロール (Control) および0.28 mM AA群におけるmutation frequency (MF) は0であった。1.4 mM AA群では計68のコロニーを確認したが、アッセイ試行毎の結果にばらつきが大きかった。これら68のコロニーのうち、釣菌可能な35コロニーについてPCR後シーケンス解析に供した。35シーケンスのうち5配列についての変異パターンを以下に示す。本解析で得られた主要な変異の一つG->Tが既存のデータとしておおむね一致している。今後、突然変異の検出に十分な数の変異コロニーを取得し、オルガノイドを用いた遺伝毒性試験について、基礎的なデータ蓄積を継続する。



## D. 研究発表

### 1. 論文発表

Zhou T, Hirayama Y, Tsunematsu Y, Suzuki N, Tanaka S, Uchiyama N, Goda Y, Yoshikawa Y, Iwashita Y, Sato M, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Isolation of new colibactin metabolites from wild-type *Escherichia coli* and *in situ* trapping of a mature colibactin derivative. *J. Am. Chem. Soc.*, (2021) in press

Matsuyama H, Tanaka W, Miyoshi N, Miyazaki T, Michimoto H, Sakakibara H. Beneficial effects of the consumption of sun-dried radishes

(*Raphanus sativus* cv. YR-Hyuga-Risou) on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Food Biochem.*, (2021) in press.

Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, \*Miyoshi N. *o*-anisidine dimer, 2-methoxy-*N*-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, (2021) **34**, 912-919.

Numata M, Hirano A, Yamamoto Y, Yasuda M, Miura N, Sayama K, Shibata MA, Asai T, Oku N, Miyoshi N, Shimoi K. Metastasis of breast cancer promoted by circadian rhythm disruption due to light/dark shift and its prevention by dietary quercetin in mice. *J. Circadian Rhythms*, (2021) **19**, 1-13.

Yamamoto S, Kato S, Senoo N, Miyoshi N, Morita A, Miura S. The difference of phosphatidylcholine profile and identification of characteristic phosphatidylcholine molecules in meat animal species and meat cut locations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2021) in press.

Hayakawa S, Ohishi T, Miyoshi N, Oishi Y, Nakamura Y, \*Isemura M. Anti-cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-gallate and Coffee Chlorogenic Acid. (Review) *Molecules*, (2020) **25**, 4553.

Watanabe D, Murakami H, Ohno H, Tanisawa K, Konishi K, Tsunematsu Y, Sato M, Miyoshi N, Wakabayashi K, Watanabe K, \*Miyachi M. Association between dietary intake and the prevalence of tumorigenic bacteria in the gut microbiota of middle-aged Japanese adults. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 15221.

\*Kato Y, Kishi Y, Okano Y, Kawai M, Shismizu M, Suga N, Yakemoto C, Kato M, Nagata A, Miyoshi N. Methylglyoxal binds to amines in honey matrix and 2'-methoxyacetophenone is released in gaseous form into headspace on heating of manuka honey. *Food Chemistry*, (2020) **337**, 127789.

Senoo N, Miyoshi N, Kobayashi E, Morita A, Tanihata J, Takeda S, \*Miura S. Glycerophospholipid profile alterations are associated with murine muscle-wasting phenotype. *Muscle Nerve*, (2020) **62**, 413-418.

\*Miyoshi N, Tanabe H, Suzuki T, Saeki K, Hara Y. Applications of a standardized green tea catechin preparation for viral warts and human papilloma virus-related and unrelated cancers. (Review) *Molecules*, (2020) **25**, 2588.

\*Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Matsuzaki N, Hirayama Y, Higashiguchi F, Sato M, Iwashita Y, Miyoshi N, Mutoh M, Ishikawa H, Sugimura H, Wakabayashi K, Watanabe K. Characterization of colibactin-producing *Escherichia coli* isolated from Japanese patients with colorectal cancer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, (2020) **73**, 437-442.

Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura T, Totsuka Y, Wakabayashi K, \*Miyoshi N. Novel *o*-toluidine metabolite in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, (2020) **33**, 1907-1914.

Sanada S, Suzuki T, Nagata A, Hashidume T, Yoshikawa Y, \*Miyoshi N. Intestinal microbial metabolite stercobilin involvement in the chronic inflammation of *ob/ob* mice. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 6479.

Shimba Y, Katayama K, Miyoshi N, Ikeda M, Morita A, \*Miura S.  $\beta$ -aminoisobutyric acid suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2020) **43**, 1016-1019.

Matsuzaki K, Iwai K, Yoshikawa Y, Shimamura Y, Miyoshi N, Hiramoto S, Asada K, Fukutomi R, Su H, \*Ohashi N. Wheat bran intake enhances to secrete bacteria-binding IgA into a lumen of the intestinal tract by the increment of short chain fatty acid production through the modulation of gut microbiota. *Nat. Prod. Commun.*, (2020) **15**, 1934578X2091779.

Uchikawa M, Kato M, Nagata A, Sanada S, Yoshikawa Y, Tsunematsu Y, Sato M, Suzuki T, Hashidume T, Watanabe K, Yoshikawa Y, \*Miyoshi N. Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-*A*<sup>l</sup> mice. *Sci. Rep.*, (2020) **10**, 5681.

\*Kawanishi M, Shimohara C, Oda Y, Hisatomi Y, Tsunematsu Y, Sato M, Hirayama Y, Miyoshi N, Iwashita Y, Yoshikawa Y, Sugimura H, Mutoh M,

Ishikawa H, Wakabayashi K, Yagi T, Watanabe K. Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of *Escherichia coli* strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms. *Genes and Environment*, (2020) **42**, 11.

Sarmales-Murga C, Akaoka F, Sato M, Takanishi J, Mino T, Miyoshi N, \*Watanabe K. A new class of dimeric product isolated from the fungus *Chaetomium globosum*: Evaluation of chemical structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, (2020) **73**, 320-323.

\*Kondo T, Saigo S, Ugawa S, Kato M, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Tanabe K. Prebiotic effect of fructooligosaccharides on the inner ear of DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss. *J. Nutr. Biochem.*, (2020) **75**, 108247.

## 2. 学会発表

市田日和、梅林脩平、赤堀拓、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、川名裕己、青木淳賢、藤井宣晴、眞鍋康子、亀井康富、三浦進司：LPGAT1が筋線維タイプにおけるリン脂質クオリティと機能の相違を生み出す、第62回日本脂質生化学会（東京）、2020年5/14-15

小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之：*o*-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索、日本環境変異原学会 第49回大会（沼津・オンライン）、2020年11/26-27

植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木孝司、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜：日本人腸がん患者から単離したコリバクチン産生大腸菌による小核誘導と遺伝毒性機構の解析、日本環境変異原学会 第49回大会（沼津・オンライン）、2020年11/26-27

川西優喜、小田美光、久富優太、植嶋亜衣、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木孝司、若林敬二、渡辺賢二：腸内細菌が産生する変異原物質コリバクチン、日本環境変異原学会 第49回大会（沼津・オンライン）、2020年11/26-27

松山弘希、田中航、三好規之、宮崎達雄、道本英之、榊原啓之：天日干しおよび生ダイコン摂取の血中トリグセド低下効果、JSOFF（宮崎・オンライン）、2020年11/28-29

小林琢磨、塩地雄大、吉田卓矢、小田切友佳、笹田達也、三好規之：スピルリナ摂取ラットにおけるタンパク質消化吸収・生体利用解析、日本農芸化学会2021（仙台・オンライン）、2021年3/18-21

松田真弥、恒松雄太、尾形勇二、蜂矢 志保実、岸本真治、三好規之、渡辺賢二：ヒト培養細胞を宿主とした抗生物質の生産、日本農芸化学会2021（仙台・オンライン）、2021年3/18-21

## 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