

オルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法の確立

オルガノイド培養・エピゲノム変異解析

研究分担者： 成瀬 美衣 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨

化学物質の開発には、安全性評価が不可欠であり、そのために実験動物を用いた反復投与試験等の実施が必要とされ、その結果が重視されることが多い。一方、動物愛護の観点から、化学物質の発がん性予測等の安全性評価の動物実験代替法の開発・導入が求められている。

私たちはこれまでに、マウス正常組織由来のオルガノイドを用いた発がん性試験法を開発し、化学物質の安全性評価に妥当・有用であることを見出している。さらに、化学物質による毒性・発がん性は共存する免疫系細胞や間質細胞等の影響を受けることが知られていることから、それらの細胞群とオルガノイドとの共培養による生体微小環境の構築を目的とした試験系の樹立にも取り組んでいる。

以上の背景より、本研究では、これら先行研究により有用性が示されたオルガノイドおよびその共培養系を用いた化学物質の新規 *in vitro* 有害性評価手法、またエピゲノム変化評価系の構築を目指す。

A. 研究目的

肝臓をはじめとしたマウス正常組織由来オルガノイドを用いた *in vitro* 化学物質評価系の構築を行い、安全性評価の動物実験代替法の導入の実現を目指す。また、評価過程で、オルガノイドの形態的变化、エピゲノム変化等の検出を行い、評価法のエンドポイントとなる新規の指標を決定する。

B. 研究方法

マウス臓器由来オルガノイドに化学物質を反復曝露した後、病理組織的な変化を指標、およびゲノム・エピゲノム変化を同定し、*in vivo* 試験による既存の結果との比較を行う。

(1) DEN誘発肝腫瘍と*in vitro* DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

C57BL/6Jマウスへのジエチルニトロソアミン(DEN)の投与により誘発した肝腫瘍試料を作製し、これまでに行なった*in vitro*発がん性試験の試料との比較をWESによる比較を行った。腫瘍の誘発については、2週齢C57BL/6J雄マウスへのジエチルニトロソアミンの投与(生食コントロール飲水1回投与3匹、DEN飲水1回投与6匹)を行った。*in vitro*系については、*Trp53*ヘテロノックアウトマウス(C57BL/6J)の肝臓由来無処置のオルガノイド、DNE処置(0.2nM)したオルガノイドおよびヌードマウス皮下に形成された増殖性病変(Naruse M, Imai Tら、2020)を用いた。それぞれからDNA抽出を行い、WES解析については、SureSelect(Agilent Technology)を用いてライブラリを作製し、150bp ペアエンドシーケンスをHiSeqを用いて行った。マウスmm10ゲノムをリファレンスゲノムとしてマッピングを行い、それぞれのSNVを検出し、無処置オルガノイドをコントロールとし、コントロールにないSNVをDEN処置オルガノイド、ヌードマウス

皮下増殖性病変、DEN誘発肝腫瘍それぞれについて抽出し、それらの結果を比較した。結果の確認はIGVを用いて確認を行った。

(2) ベンゾ[α]ピレン誘発肺腫瘍と*in vitro* DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

*Trp53*ヘテロノックアウトマウスにベンゾ[α]ピレン投与により誘発した肺腫瘍と、*in vitro*発がん性試験のサンプルの比較のための肺腫瘍の試料を作製した。6-7週齢雄*Trp53*ヘテロノックアウトマウスおよび野生型マウスへのベンゾ[α]ピレン投与(各ゴマ油control 8回投与3匹、ベンゾ[α]ピレン8回投与3匹)を行った。

(3) *in vitro* 一般毒性試験法におけるエピゲノム解析のための検討

メチル化解析の手法はRRBS法(Reduced representation of bisulfite sequencing)を用いることとした。エピゲノム変化のためのサンプリングの条件検討を、カルバミン酸エチル(ウレタン)を被験物質とし、C57BL/6Jマウスの肺由来オルガノイドについて行った。ウレタンの2,500 μMおよび10,000 μM、対照(0 μM)について、3回処置後72時間のメチル化解析を行う予定で、1回処置後72時間のサンプル量で検討を行った。

(倫理面の配慮)

これらの実験は、「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従って行う。動物福祉並びに動物実験倫理の観点から、適切なエンドポイントを設定し、安楽死させることにより苦痛軽減に配慮している。

C. 研究結果

(1) DEN誘発肝腫瘍と*in vitro* DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

マウスへのDEN引水投与後およそ9ヶ月経過し、DEN飲水

マウスへのDEN引水投与後およそ9ヶ月経過し、DEN飲水群で1匹肝腫瘍の形成が見られ、以降のWES解析に用いた。肝臓由来無処置オルガノイド、DNE処置オルガノイド、DNE処置オルガノイドを移植しヌードマウス皮下に形成された増殖性病変、DEN誘発肝腫瘍のWES解析を行い、SNPの抽出を行った。無処置オルガノイドをコントロールとし、コントロールにないSNPを抽出した（各1サンプル）。それぞれ、161, 17983, 1588箇所のSNPがコントロールに対して検出された。そのうち、少なくとも2サンプルに共通するSNPについてIGVを用いた目視による確認を行い、DNE処置オルガノイド、DNE処置オルガノイドを移植しヌードマウス皮下に形成された増殖性病変に共通するSNP1箇所、DNE処置オルガノイド以外に共通するSNP4箇所、全てに共通するSNP7箇所を同定した。

(2) ベンゾ [α] ピレン誘発肺腫瘍と *in vitro* DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

およそ1年でTrp53KOマウスとWTマウス各1匹に肺結節発生を確認した。WTは途中死亡、死後硬直ありの状態であった。

(3) *in vitro* 一般毒性試験法におけるエピゲノム解析のための検討

ウレタン1回処置後72時間のサンプルで1wellから見積もり、3回処置後72時間ではRRBS解析、その確認実験に必要なDNA量の不足が見込まれた。

D. 考察

(1) DEN誘発肝腫瘍と *in vitro* DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

オルガノイドをDENで処置する段階、および処置後のオルガノイドをヌードマウス皮下への移植後の段階の各々で誘発・選択される遺伝子異常の中で、オルガノイドを用いた *in vitro* 発がん試験系と、*in vivo* で同じDNA部位のSNPがあることを明らかにした。サンプル数が限られた中での結果であるため、追試が必要と思われるが、この結果は、オルガノイドを用いた *in vitro* 発がん性試験が動物実験の代替法として用い得ることを示すデータである。今後DNA変異部位の詳細な解析を進め、関連遺伝子の機能との関連、発がんメカニズムの解明につながるよう、解析を進める予定である。

(2) ベンゾ [α] ピレン誘発肺腫瘍と *in vitro* DNA発がん性試験のWESによるDNA変異の比較

Trp53KOマウスとWTマウス各1匹に肺結節発生を確認した。WTは途中死亡、死後硬直ありの状態であったため、DNAの品質チェックを行い、WESに用いることが可能かを確認する必要がある。*in vitro* 発がん性試験の有効性の確認、発がんメカニズム解明のために試料を揃えて *in vivo* と *in vitro* の比較を引き続き行う。

(3) *in vitro* 一般毒性試験法におけるエピゲノム解析のための検討

評価法のエンドポイントとなる指標の同定のため、エピ

ゲノム変化領域を同定する。化学物質処理とエピゲノムの変化については不明な点が多いため、変化を精査するため、効率よくゲノムワイドにCpG領域のシーケンスを行うことが可能なRRBS法を用いる。本年度はウレタン処置の肺オルガノイドについてメチル化解析を行う予定であったが、継代毎の3回処置後72時間のタイムポイントではDNA量の不足が見込まれる結果となった。エピゲノムの変化は回復までの時間がかかると思われるため、72時間後ではなく、オルガノイドのサイズを大きくした後に回収して検出することもふまえて、次年度条件検討を引き続き行う。通常一般毒性の動物実験でのサンプリングは、投与後の回復が生じることを考慮して速やかに行われるため、処置後のサンプリングの時間を長くできるのであれば、エピゲノムを指標とする試験法を用いる利点ともなり条件検討が重要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Imai T, et al. Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett.* May 23;24(1):221.

(2) Ishigamori R, et al. The potential of organoids in toxicologic pathology: Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J Toxicol Pathol.* 2022 Jul;35(3):211-223.

(3) Imai T, et al. Feeding a High-Fat Diet for a Limited Duration Increases Cancer Incidence in a Breast Cancer Model. *Nutr Cancer.* 2022 Oct 20:1-13.

2. 学会発表

今井俊夫、石ヶ守里加子、成瀬美衣：オルガノイドを用いる化学発がんモデルによる発がん早期過程の分子機序解析. 第81回日本癌学会学術総会(2022年9月、横浜)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

1. その他

なし