

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・毒性評価

研究分担者： 今井 俊夫 国立がん研究センター 研究所 がんモデル開発部門長

研究要旨

B6 系統背景の *gpt delta* マウスの肺および肝臓オルガノイドを樹立し、継代回数の少ない状態で一部凍結保存した。B6 系統の野生型マウスの肺オルガノイドについては、凍結保存ストック細胞を融解、培養し、化学物質の一般毒性の評価系を構築するための検討に用いた。今年度は、従来の in vitro あるいは in vivo 遺伝毒性試験法および発がん性試験法で陽性を示すが、強い細胞毒性や急性毒性を示さないカルバミン酸エチル（ウレタン）を被験物質として検討を進めた。ウレタンの 2,500 μ M および 10,000 μ M 濃度処置により、対照（0 μ M）に比べてオルガノイドが不整形（発芽類似変化）を示す傾向がみられたが、引続き観察数を増やした検討が必要である。また、形態以外の毒性指標として、細胞分化マーカーを利用した細胞毎の増殖活性、構成細胞比率等について検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

化学物質の安全性評価において、実験動物を用いる反復投与毒性試験を始めとする各種試験が行われる。一方、動物実験における 3Rs (Re-placement・Reduction・Refinement) の観点から、動物実験代替法の開発・導入が求められている。しかし、実験動物に一定期間繰返して被験物質を投与する反復投与毒性試験やがん原性試験等については、現在のところ確立された in vitro 試験法がなく、多数の被験物質のヒトでの毒性を予測するためにも、革新的な試験法の開発が期待されている。

申請者らは、マウス正常組織由来のオルガノイドに対して、被験物質を in vitro で処置する方法を用いて、比較的短期間にその発がん性を検出できる可能性を見出し、当該評価系が化学物質の発がん性に加え、反復投与毒性試験等、他の毒性評価への適用が期待されることを報告した (Naruse M, Imai T ら, Carcinogenesis, 2020)。また、化学物質による in vivo における毒性、発がん性は標的細胞に対する直接作用に加え、免疫細胞等の間質細胞の影響を受ける場合があり、間質細胞とオルガノイドとの共培養系を用いることで、より in vivo 試験法に近い条件下での評価法の確立にも取り組んでいる。

本研究では、これまで取組んできた、マウス正常組織由来オルガノイドを用いる化学物質の発がん性評価法に加え、その反復処置による一般（反復）毒性試験法の確立を目指した検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

(1) C57BL/6J マウスまたは *gpt delta* マウス（5週齢、雄）を安楽死させた後、肺と肝臓を摘出し、ハサミで細切した後にコラゲナーゼPを含む酵素混合液で処理、ポアサイズ40 μ m のフィルターにかけた後に培地に懸濁してマトリゲル（コーニング社）上に播種し、37℃で培養した。培地は、肺についてはAdvanced DMEM/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、A83-01、FGF10等を加えたものを基本とし、肝臓についてはAdvanced DMEM/F12培地にmEGF、BSA、Y27632、CHIR-99021、ITS-G supplement等を

加えたものとした。各オルガノイドは、増殖の状態を確認しつつ、概ね1週間に1回、Accumaxを用いて細胞を単離した後に継代し、一部はLaboBanker2（トスク社）を用いて-80℃で凍結保存した。

(2) 肺オルガノイドに対する被験物質の in vitro 処置

今年度は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を用いる検討を行った。ウレタンは注射用蒸留水に溶解し、培地中最終濃度を10,000 μ M から公比2で156 μ M までの濃度で24時間処置、RealTime-Glo MT Cell Viability Assay キット（プロメガ社）を用いて発光強度により生細胞数の推移を測定する予備実験を行った。被験物質処置は、オルガノイドの継代時、単離した細胞をマトリゲル上に播種した2時間後からの24時間とした。また、最高濃度の10,000 μ M については、マウスにウレタンを600 mg/kg 体重の用量で週1回、3回または10回腹腔内投与した際に肺がんが誘発されるとの報告 (Ma X ら, Toxicol Lett, 2016) を参考に設定した。

被験物質の代謝活性化のため、S9 mixを50 μ g/mL の濃度で培地に加えた。本実験では同様に、肺オルガノイドに対し、ウレタンを10,000、2,500、および0（対照） μ M で24時間1回または3回処置した。

(3) 肺オルガノイドの形態学的観察

ウレタンにて1回または3回処置したマウス肺オルガノイドは、（最終）処置72時間後にiPGe11（ジェノスタッフ社）を用いてパラフィン包埋し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行って病理組織学的に観察した。

また、肺オルガノイドの構成細胞を解析する目的で、パラフィン包埋切片を用いて、気道上皮細胞およびII型肺胞上皮細胞の特異マーカーに対する免疫組織化学染色を行った。用いた一次抗体は、抗Uteroglobulin/CC10ウサギポリクローナル抗体、抗Naspin Aマウスモノクローナル抗体（プロテインテック社）、抗proSFPcウサギポリクローナル抗体（アブカム社）、シグナルの検出には、ヒストファインシンブルステインマウスMAX-PO (R) または同MAX-PO (M)（ニチレイバイオサイエンス社）とDAB発色法を用いた。

（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) マウス正常組織からのオルガノイド樹立および樹立したオルガノイドの培養

C57BL/6Jマウス由来オルガノイドについては、昨年度までに樹立して凍結ストック細胞を解凍して今年度の被験物質を処置する予備実験および本実験を行った。また、*gpt delta*マウス由来の肺と肝臓由来オルガノイドについては、概ねスケジュール通りに培養することができ、継代回数の少ない状態で一部凍結保存した。

(2) ウレタンの濃度設定のための予備実験

C57BL/6Jマウス由来肺オルガノイドに対して10,000 μM から156 μM までの濃度で24時間処置した後の生細胞数を測定した結果、中間濃度の1,250と2,500 μM では対照（0 μM ）に比べて明らかな生細胞数の増加がみられ、5,000 μM 以上では対照と同等の値まで低下した（図1）。この結果より、当該オルガノイドに対するウレタンへの最大耐量は10,000 μM より高い濃度と判断された。

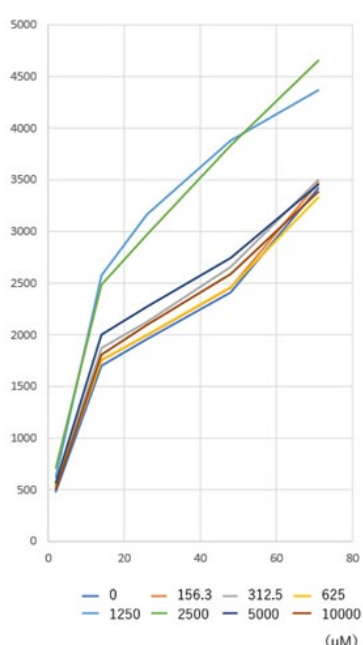


図1 ウレタン処置後のマウス肺オルガノイドの生細胞

数の推移

(3) ウレタンの24時間1回または3回処置による本実験

C57BL/6Jマウス由来肺オルガノイドに対して生細胞数を増加させる作用のあるウレタンの2,500 μM 濃度を低濃度群、その4倍量の10,000 μM を高濃度群とし、処置後のオルガノイドの形態学的変化をパラフィン包埋後のHE染色標本にて観察した。その結果、ウレタンの2,500 μM および10,000 μM 濃度処置により、対照（0 μM ）に比べてオルガノイドが不整形（発芽類似変化）を示す傾向がみられた（図2）。

パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学においては、マウス由来肺オルガノイドは、気道上皮のマーカーであるUteroglobin/CC10およびNaspin A陽性細胞が混在していたが、II型肺胞上皮細胞のマーカーであるppr oSFPC陽性細胞は認められなかった。

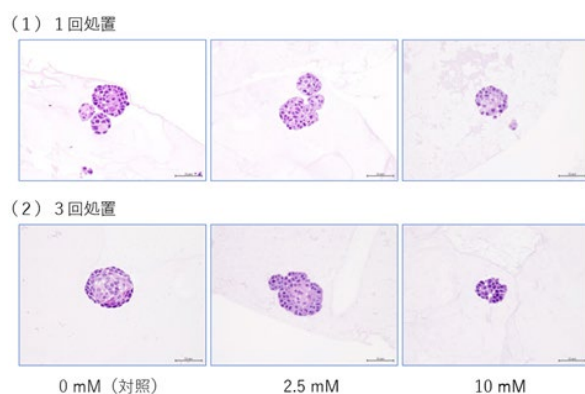


図2 ウレタン処置後のマウス肺オルガノイドの形態学的変化（Bar=50 μm ）

D. 考察

今年度、C57BL/6Jマウス由来オルガノイドについては、昨年度までに樹立して凍結ストック細胞を解凍して予備実験および本実験を行った。解凍時には速やかにPBSにて洗浄し、保存液であるLaboBanker2を除くことで問題なく起眠し、培養継続が可能であることを確認した。また、*gpt delta*マウス由来の肺と肝臓由来オルガノイドについては、これまで、C57BL/6Jマウスを含む複数系統の肺および肝臓オルガノイドを樹立する方法と同様に培養することで（Naruse M, Imai Tら、Carcinogenesis, 2020）、良好な培養成績が得られることを再確認した。なお、肺オルガノイドについては、これまでは肺の各葉の肺門部を除く末梢側組織のみを用いて培養したが、今回は肺葉の部位により形成されるオルガノイドの特性が異なるか否かを確認するため、肺門部のみを用いる培養も試みた。その結果、培養開始以降、細胞増殖が確認できるまでの時間が末梢側組織に比べて肺門部については時間を要し、得られたオルガノイドについては扁平上皮化生する傾向が確認された。マウスの末梢側組織にはヒト肺組織においては前駆細胞として位置づけられるCytokeratin 5 (CK5)などに陽性を示す基底細胞がなく、マウス肺オルガノイドにもCK5陽性細胞が認められないことから、今後、マウス肺の肺門部と末梢側組織由来のオルガノイドについて、各種化学物質に対する毒性感受性差などを検

討する必要があると考えられる。

マウス肺オルガノイドを用いてウレタンの毒性反応を解析する実験を行うため、マウスにウレタンを腹腔内投与した際に肺がんが誘発される用量を参考に設定した10,000 μM (Ma Xら、Toxicol Lett, 2016) を最高濃度として、1/64 倍の156.3 μM までの濃度幅で24時間、1回処置した際の70時間後までの生細胞数を測定した。中間濃度の2,500 および1,250 μM で示された生細胞数の増加が、ウレタンに関する既報にある遺伝毒性や発がん性に関連するか、あるいは毒性とは判断されない細胞の活性化に該当するののかについては今後の検討を要する。現段階においては、生細胞数を増加させる作用のあるウレタンの2,500 μM 濃度を低濃度群、その4倍量の10,000 μM を高濃度群として、1~3回処置した後、細胞分化/増殖マーカーに対する免疫組織化学を含む病理組織学的解析により毒性を評価することを目的として本実験を行った。

本実験では、ウレタンの2,500 μM および10,000 μM 濃度処置により、対照(0 μM) に比べてオルガノイドが不整形(発芽類似変化)を示す傾向がみられた。この変化は、予備実験で観察されたウレタン処置による生細胞数の増加と関連していることが示唆された。但し、当該観察については、(最終) 処置72時間後にオルガノイドを収集、パラフィン包埋、標本作製を行ったことから、オルガノイドの数が限定的であり、各オルガノイドを構成する細胞数も少なく、嚢胞状の形態を呈する前の段階の小型のものであったことから、引続き観察数を増やした検討が必要である。また、従前に我々がオルガノイドを用いる化学物質の発がん性を検出していた場合とことなり、反復投与毒性を含む一般毒性の検出に際しては被験物質処置後に時間経過と共に毒性が回復性を示すことを考慮することが必要であり、被験物質の(最終) 処置後の観察時点についても引続き検討が必要である。また、形態以外の毒性指標として、細胞分化マーカーを利用した細胞毎の増殖活性、構成細胞比率等についても更なる検討を要する。

以上、マウス正常組織由来オルガノイドを用いる一般(反復)毒性試験法として、被験物質をオルガノイドの継代時、単離した細胞をマトリゲル上に播種した2時間後からの24時間を1回および3回繰り返す方法により、少なくとも細胞増殖に対する影響を指標とする毒性評価には適用可能であることを示す結果が得られた。一方、幅広い被験物質の解析を可能とするために更に使用するマウス系統や対象臓器を絞り込む必要があり、引続き検討が必要と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai, T., Naruse, M., Machida, Y., Fujii, G., Mutoh, M., Ochiai, M., Takahashi, M., Nakagama, H.: Feeding a high-fat diet for a limited duration increases cancer incidence in a breast cancer model. *Nutr. and Cancer* 75, 713-725 (2023).
2. Kamimura, M., Sasaki, A., Otani, Y., Nakamura, Y., Nakamura, T., Kuramochi, K., Imai, T., Kubo, N., Okamoto, S.: Methylthioacetic acid, a derivative of

aroma compounds from *Cucumis melo* var. conomon dose-dependently triggers differentiation and apoptosis of RCM-1 human colorectal cancer cells. *J. Toxicol. Sci.* 48, 25-35 (2023)

3. OIshigamori, R., Naruse, M., Hirata, A., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T.: Featured Article : The Potential of Organoids in Toxicologic Pathology. Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. *J. Toxicol. Pathol.* 35 (3) 211-223 (2022)
4. OImai, T., Hippo, Y.: Editorial: Development of in vitro toxicology methods using organoid systems and toxicogenomic approaches. *Front Genet* 13, 1030580 (2022)
5. Imai, T., Naruse, M., Ochiai, M., Matsumoto, K., Ikeda, S., Kani, M., Kato, Y., Hirayama, A., Soga, T., Hori, Y., Yokoi, A., Ochiai, A: Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. *Oncol Lett* 24, 221 (2022)

2. 学会発表

1. 今井俊夫、石ケ守里加子、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)
2. 成瀬美衣、石ケ守里加子、今井俊夫：CRC患者由来の癌関連線維芽細胞を用いるゲノムワイドなDNAメチル化解析. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
3. 高橋真美、千脇史子、小松将之、松崎圭祐、平岡伸介、竹下文隆、佐々木博己、今井俊夫：患者由来膵がん細胞株におけるメラノコレチン4型受容体遺伝子近傍SNPのLOH及びアレル特異的遺伝子発現に関する解析. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
4. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第81回日本癌学会学術総会(2022)
5. 今井俊夫;正常組織由来オルガノイドを用いる毒性試験の有用性について. 第39回日本毒性病理学会(2023年1月25日、東京)ランチョンセミナー(株式会社新日本科学共催)

F. 知的財産権の出願・登録状況

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