

総括研究報告書

食品含有・残留化学物質のがん悪性転化毒性評価法の開発

研究代表者 芳賀 優弥 大阪大学大学院薬学研究科

研究要旨

一般に多段階発がん説は、①Initiation→②Promotion→③Progression→④Malignant change (悪性転化) という過程を辿る。食品・農薬に含まれる「食品含有・残留化学物質」の安全性評価に際しては、①~③を中心として評価されている一方で、抗がん剤耐性・転移能などがんによる死亡原因の殆どを占める④悪性転化に与える影響は、十分に理解されておらず、評価法確立は遅々として進んでいない。そこで本研究では、食品含有・残留化学物質によるがん悪性転化機序の解明に基づく、「がん悪性転化毒性評価法」の確立を目指すものである。まず、がん悪性転化の機序解明に基づいて表現系・変動分子を選定し、がん悪性転化を鋭敏に評価可能な試験法確立する。そのうえで、食品添加物・食品残留農薬等の悪性転化誘発性の情報集積を目指す。本年度は、モデル食品含有・残留化学物質のがん悪性転化に与える影響評価と、次年度に先駆けてがん悪性転化を反映するレポーター細胞の樹立に取り組んだ。以下に詳細を紹介する。

A. 研究目的

食品に含まれるアフラトキシンB1などに加え、農薬などの「食品含有・残留化学物質」にも、発がん物質が含まれることが知られている。一般に多段階発がん説は、①Initiation (発がん) →②Promotion (発がん促進) →③Progression (異形性変化) →④Malignant change (悪性転化) という4つの過程を辿る。このうち③Progressionは、①②を経た細胞が「前がん病変が、がんに至ること」を指す。他方、④悪性転化は、抗がん剤耐性・転移能など、悪性度が増す変化を指す。一般に化学物質の発がん性については、Initiation・Promotion作用が評価され、最近ではProgression作用も病理学的に評価されている。一方で、がんによる死亡原因の殆どは、転移や薬剤耐性であるにも関わらず、④悪性転化は十分に理解されておらず、「悪性転化毒性評価法」確立は遅々として進んでいない。

この点で近年、食品含有・残留化学物質が乳がんの悪性転化を促進することが疫学的に報告され (Koual et al., Environ Health., 2020)、さらに、④悪性転化のみに関与する遺伝子が同定された (Lambert et al., Cell, 2017) ことから食品含有・残留化学物質の悪性転化への影響が懸念されている。従って、①食品含有・残留化学物質によるがん悪性転化機序の解明に基づく、②「悪性転化毒性評価法」の確立が必須である。そのうえで、③動物試験との整合性評

価や、④食品添加物や食品残留農薬のがん悪性転化作用の評価は、国民の「食の安全・安心」の更なる向上を達成するものであり、社会的ニーズや産業界の要請に答えるものである。

その点、これまでに研究代表者は、転移性や薬剤耐性に着目した研究を先駆けて推進しており、「悪性腫瘍が増悪化する(悪性転化)」過程における変動分子の同定・機能解明を進めてきた (Cancer Res., 2021, Sci Signal., 2021, Cell Rep., 2019)。さらに食用オイルやおこげに含まれるベンゾピレンが乳がん細胞の悪性転化を誘発する可能性を見出している。そこで本研究では、(1) -① がん悪性転化の表現系・変動分子の選定 (1年目)、(2)-②③ がん悪性転化を鋭敏に評価可能な試験法確立と共に、動物試験との関係性を追求する (2,3年目)。そのうえで、(3) -④食品添加物・食品残留農薬等の悪性転化誘発性の情報集積を目指す (3年目)。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト乳がん細胞株であるHs578Tは、ATCC (Manassas, VA, USA) より、MCF7は、JCRB細胞バンク (Japanese Collection of Research Biosources Cell Bank, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Osaka, Japan) より購入した。また、ヒト胎児腎細胞由来

細胞株であるHEK293Tは、ATCCより購入した。細胞の維持培養には、56°C、30分間の非働化処理を行った10%ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum; FCS; Biosera; NUAILE, France)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液 (Wako Pure Chemical Industries; Osaka, Japan) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Wako Pure Chemical Industries) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。

2. 被験化学物質

BisphenolAは、nacalai tesque (Kyoto, Japan)より、Benzo[a]pyreneは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。それぞれ、ジメチルスルホキシド (DM SO, Wako Pure Chemical Industries) に溶解し、ストック溶液を作製した。実験に供する際、メディウムに溶解して希釈し細胞に曝露させ、1週間培養した。

3. Western Blottingによるタンパク質発現評価

細胞をPBSで洗浄後、RIPAバッファー(50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 1mM EDTA, Protease Phosphatase inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA))にて溶解し、15分氷上でインキュベートした後、16,000 x g, 4°Cで30分間遠心した。上清を回収し、BCA assay (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク質量を標準化した後に、6x SDS sample buffer (0.375M Tris pH 6.8, 12% SDS, 60% glycerol, 0.6M DTT, 0.06% bromophenol blue) と混合し、95°Cで5分処理した後、各試料をSodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)した。SDS-PAGEは、ゲル1枚当たり14 mAで10分間電気泳動した後、40 mAの定電流で1時間電気泳動した。電気泳動後のゲルをimmobilon-P Transfer membrane (PVDF膜; MERCK MILLIPORE, MA, USA) にウェット式にて1.5時間転写し、5% Skim milk (Wako Pure Chemical Industries) /TBST (0.05% Tween 20 を含むTBS) を添加してブロッキングした。1次抗体 (Vimentin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p53 (Abcam, Cambridge, UK), AhR (Cell Signaling Technology), ER α (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), GAPDH (Cell Signaling Technology)) を3% BSA (Sigma-Aldrich) /TBST で希釈し、4°Cで一晩反応させた。TBSTで洗浄後、2次抗体としてHRP/anti-rabbit IgG

(Cell Signaling Technology)、HRP/anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) を室温で1時間反応させた。TBSTで洗浄後、PVDF膜をImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries) で処理し、発光像をLAS-4000 (FUJI Film, Tokyo, Japan) により撮影した。

4. CRISPR-Cas9によるノックイン細胞の樹立

CRISPR-Cas9による蛍光タンパク質のノックインについて、eFlut法を参考にして、実施した (Stewart-Ornstein, et al., Cell Rep., 2016)。Cas9とsingle guide RNA (sgRNA) の発現には、pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (#62988, Addgene, Watertown, MA, USA)を用い、gRNAはVimentinのCoding sequenceのStop codonの直後となるよう、CRISPRdirect (Naoto, et al., Bioinformatics, 2015)を用いて設計した (CCTTGAATAAAAATTGCACACAC、下線部はPAM配列)。使用したプライマーの配列情報をTable 1に示す。

なお、挿入した蛍光タンパク質 (Superfolder GFP (sfGFP)) と耐性遺伝子 (Blasticidin) のDNAはTwist Bioscience (South San Francisco, CA, USA) より購入し、下記に示す通りである。

```
ggagctggtgcaggcgtggagccggtgccatgagcaa
aggagaagaacttttctactggagttgtcccaattctgtt
gaattagatggtgatgtaaatgggcacaaatcttctgtcc
gtggagagggtgaaggatgctacaaacggaaaact
caccctaaatattttgactactggaactactctgttc
ctggccaacacttgcactactctgacctatggtgttca
atgcttttccggtatccggatcacatgaaacggcatgac
ttttcaagagtgccatgccgaagggtatgtacaggaa
cgcactatatcttcaaagatgacgggacactacaagacg
cgtgctgaagtaagttgaaggtgataccttgttaatc
gtatcgagttaaagggtattgattttaaagaagatgga
aacattcttgacacaaactcgagtacaactttaactca
cacaatgtatacatcacggcagacaaacaaaagaatg
gaatcaaagctaacttcaaaattcgccacaacgttgaa
gatggttccgttcaactagcagaccattatcaacaaaat
actccaattggcgatggccctgtcttttaccagacaacc
attacctgtcgacacaactctgtcttcttgaagaatcccaa
cgaaaagcgtgaccacatggtctcttctgagtttgaact
gctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaaa
ggaagcggagccacgaacttctctgtttaaagcaagca
ggagatggtgaagaaaaccccggtctatggccaagcc
tttctcaagaagaatccacctcattgaaagagcaac
ggctacaatcaacagatccccatctctgaagactacag
cgtcgccagcgcagctctctctagcgacggccgcatctt
actggtgtaatgtatatcattttactgggggacctgtg
cagaactcgtggtgctgggactgctgctgctcgggcag
ctggcaacctgactgtatcgtcgcatcggaatgaga
acagggcatcttgagccctcgccgacggtgccgacag
```

gtgcttctcgatctgcatctgggatcaaagccatagtgaggacagatggacagccgacggcagttgggattcgtgaattgtgcctctggttatgtgtgggagggctaa

Table 1に示すHomology Arm用のプライマーを供し、ドナーベクターをPCRにより増幅することで作製した。作製したプラスミドとドナーベクターをHEK293TにFugene HD (Promega, Madison, WI, USA)を用いてトランスフェクションし、48時間後にBlasticidin (Wako Pure Chemical Industries)を用いてセクションし、1週間培養した。残存した細胞群を限界希釈法により96 wellプレートに播種し、単一細胞を分取した。得られたクローンについて、蛍光観察 (ハイスループット細胞機能探索システム CellVoyagerCV8000 (Yokogawa, Tokyo, Japan)) やWestern blotting (Vimentin, Cell Signaling Technology)、PCR (Forward: GTCTTTGGCATGTGGCATTA, Reverse: TCTTGCGCTCCTGAAAACT) によりバリデーションを実施した。

5. Migration assayによる遊走能評価

FCS不含有のRPMI-1640で懸濁した各細胞を、 1.0×10^4 cells/0.1 ml/well (Hs578T)もしくは 5.0×10^4 cells/0.1 ml/well (MCF7)の細胞濃度で、24 wellプレート (CORNING, Corning, NY, USA) に配置した孔径8 μ mのトランスウェルチャンバー (CORNING) の上部に播種した。チャンバーの下部は、10% FCSを含むRPMI-1640を0.7 ml満たした。37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で24時間培養した後、トランスウェルメンブレンの裏側に侵入している細胞を4% パラホルムアルデヒド (PFA, Wako Pure Chemical Industries) で固定し、クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich) を用いて染色した。オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X800 (Keyence, Osaka, Japan) により撮影した。

6. MTT assayによる細胞生存率評価

細胞生存率は、3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Tokyo Chemical Industry; Tokyo, Japan) を用いて評価した。細胞を96 wellプレート (Thermo Fisher Scientific) に2000 cells/wellで播種し、24時間培養後、Doxorubicinを処置し、72時間培養した。その後、MTT溶液を終濃度が0.5 mg/mLになるように加え、3時間37°C条件下で培養した後、DMSOにより溶解させた。570 nmの波長の吸光度を測定し、未処置群を100%として細胞生存率を算出した。

7. 統計解析

統計解析には、Prism 9 for macOS (GraphPad, Boston, MA, USA)を用いて評価し、統計学的有意差は、 $p < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【倫理面への配慮】

本研究は次年度以降、動物実験を避け得ないが、動物愛護の精神を遵守しつつ行うものである。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学の各所属研究科の動物実験規程に則り行う。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属部署の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受ける (関連研究は既に承認を受けている)。

また、本研究計画では効果的な安全性評価研究の実施に際して、遺伝子組換え実験を行う可能性があるが、「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」に基づいて適切に実施すると共に、所属機関の組換えDNA実験委員会の承認を受ける (関連研究は既に機関承認実験として承認されている)。

C. 研究結果

1. 食品含有モデル化学物質曝露による分子発現変動

食品に含まれる化学物質の悪性転化誘発性を精査する上で、モデル化学物質として、これまでに発がん性については議論がなされているものの、がん悪性転化についてはほとんど未解明な部分が多いBenzo[a]pyrene及びBisphenol Aを選定した。がん悪性転化形質にはいくつか種類があると考えられ、主に転移を亢進させる遊走性、浸潤性や、治療を続けていくうちに生じる薬剤耐性の獲得が挙げられる。特に遊走性亢進を始めた転移に深く関わるとされる上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) に着目し、上皮系の細胞で増加し、EMTのマーカースとして知られるVimentinを選択した。さらに、他にもがんの悪性度や薬剤耐性に関わるp53、Benzo[a]pyrene及びBisphenol Aの結合分子として知られるAryl Hydrocarbon Receptor (AhR)、乳がんの中でも治療標的として確立されており、薬剤感受性に関わるエストロゲン受容体 (ER α) を選択した。1週間化学物質を曝露させた2種類の乳がん細胞 (Hs578T, MCF7) について、分子変動を評価したところ、Hs578TにBisphenol Aを曝露させると、EMT関連分子であるVimentinの発現増加が認められた。さらに、MCF7にBenzo[a]pyreneを曝露させると、がん抑制遺伝

子であるp53の発現低下が認められた。また、MCF7に化学物質 (Benzo[a]pyrene, Bisphenol A) を曝露させると、ER α の発現低下が認められた (図1A)。これらのことより、化学物質ごとにその反応性が異なることや、乳がん細胞株間で同じ化学物質に対する反応性が異なることが示唆された。現在、他の化学物質や、数週間から数ヶ月といった長期間曝露した際の影響について、精査中である。

2. 食品含有モデル化学物質曝露が遊走性・薬剤感受性に与える影響

EMTやがん抑制遺伝子に関わる分子の発現変動が認められたことから、次にごん悪性転化の表現系である細胞の遊走性に与える影響や、薬剤感受性に及ぼす影響について評価した。これらを解析することで、培養細胞レベルにおける食品含有化学物質の悪性転化に及ぼす影響を評価可能となる。まず、3.1.と同様にBenzo[a]pyrene及びBisphenol Aを1週間曝露させ、Transwellを用いてMigration assayを実施し、遊走性を評価した。その結果、さらに低濃度や曝露期間を変更した検討が必要ではあるものの、MCF7におけるBisphenol A曝露によって、遊走性が亢進することが示唆された (図1B)。次に、化学物質を曝露させた際の薬剤感受性について、評価した。本検討では、乳がん治療において用いられている化学療法剤であるDoxorubicinを用いた。上記と同様に各化学物質を1週間曝露させた後、Doxorubicinへの感受性 (薬剤曝露後の細胞生存率) を評価したところ、どちらの細胞株においても、各化学物質の高濃度曝露群において、わずかな薬剤感受性の亢進が示唆された (Benzo[a]pyrene; 2.5 μ M, Bisphenol A; 50 μ M, 図1C)。これらのことより、本条件下では、食品含有化学物質のがん細胞への曝露によって、わずかな表現系の変化は認められたものの、顕著な変化は認められなかった。3.1.の分子変動の解析結果と合わせても、より長期間曝露した後の解析や、濃度を広範囲に振った検討を実施することで分子変動と表現系の連関について精査していく予定である。また、将来的には、in vivoでの検討を合わせて評価し、がん細胞のみならず、がん細胞を取り巻く周囲環境 (がん微小環境) の影響も鑑みた評価を実施する。

3. Vimentinを標識したレポーター細胞の構築

本年度は、来年度に実施予定であった、レポーター細胞の構築に向けた検討に先行的に着手した。食品含有化学物質のがん悪性転化誘発性を簡便に測定可能な評価法を樹

立することを目指し、本研究ではCRISPR-Cas9システムを用いたレポーター細胞の構築を試みる。内在性のマーカー蛋白質に対し、蛍光蛋白質をタグ付けすることで、偽陽性を低減した評価法の構築を目指す。そこで、まず、既報 (Cell Rep., 2016) を参考にして3.1.において変化が認められたEMT関連分子であるVimentinに蛍光蛋白質をタグ付けすることを試みた。まず、乳がん細胞での検討の前に遺伝子導入効率が極めて高いHEK293T細胞 (ヒト胎児腎細胞由来細胞株) を用いて事前検討を実施した。Cas9を発現するベクターにVimentinのStop codon直前を標的としたgRNAを設計・挿入し、Stop codon前後にHomology armを設計し、sfGFPと耐性遺伝子 (Blasticidin) を含むDNAフラグメントを鋳型にPCRにて増幅した。作製したプラスミドとドナーベクターをHEK293Tにトランスフェクションし、抗生物質によるセレクションと限界希釈法によって、単一細胞由来クローンを得た。得られたクローンについて、PCR及びWester Blottingによって妥当性評価を実施したところ、Heterozygousではあるものの、蛍光蛋白質の挿入が確認された (図2A, B)。将来的には、その蛍光強度や細胞内局在を指標に評価することから、共焦点顕微鏡を用いてその蛍光を観察したところ、細胞骨格蛋白質であるVimentinが緑色蛍光によってタグ付けしている様子が認められた (図2C)。現在、乳がん細胞であるMCF7, Hs578T細胞への導入を実施している。

D. 考察

これまで食品含有化学物質を含む生体外化学物質ががん悪性転化に促進的に関与している報告は、in vitro, in vivo, 疫学の観点から報告されている (Koual, et al., Environ Health, 2020)。今回見出された結果から、検討した化学物質ごとにその反応性 (分子変動・表現系の観点) が異なることや、同じ乳がん細胞株間でも同じ化学物質に対する反応性が異なることが示唆された。本条件下では、1週間というヒトの曝露機会を考えると比較的短い期間で検討したが、今後は数ヶ月単位の変動評価が必須と考えられる。さらに、次年度に向けたレポーター細胞の樹立に関して、トランスフェクション効率の高い細胞株で系の確立が確認された。今後は、乳がん細胞を用いて、Vimentinとは異なる細胞株に対しても同様の検討を実施し、本研究の目的の一つであるレポーター細胞の構築を図る。

E. 結論

国民の「食の安全・安心」に対する関心の高

まりを鑑みると、食品含有化学物質・残留農薬などに対する安全性は常に高度に保証される必要があると考えられる。その点、食を介して曝露し得る化学物質の発がん性評価は、その前期過程 (Initiation・Promotionなど) に集中している。一方、がん患者の死亡原因のほとんどは、その後期過程 (がん悪性転化過程) に発生する転移や薬剤耐性などであるものの、化学物質等の評価は進んでいない。その点、本研究は、食品含有・残留化学物質によるがん悪性転化機序の解明に基づく、「がん悪性転化毒性評価法」の確立を目指している。本年度得られた知見は、低濃度かつ短期間の曝露によっても分子変動や表現系に微細な変化をもたらすことを示唆するものである。一方、細胞株の種類や化学物質の種類などを増やした検討が必須であり、今回の結果だけでは議論の余地がある。今後、さらに網羅的な分子変動や化学物質を検討することで、食品含有化学物質のリスク管理に資する知見の提供を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

2. 学会発表

国内学会発表 合計1件

1. 北本夏子, 芳賀優弥, 辻井勇氣, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 乳がんの悪性転化におけるベンゾピレン誘導性細胞老化の分子機序解明., 日本薬学会第143年会., 札幌 (北海道), 2023年3月 (採択済み) .

国際学会発表 合計1件

1. Kitamoto N., Haga Y., Tsujii Y., Higashisaka K., Tsujino H., Tsutsumi Y. : The effect of benzopyrene-mediated cellular senescence on malignant change of breast cancer., EACR 2022 Congress, Seville (Spain), 20-23 June, 2022.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Table 1

Primer Vimentin gRNA Forward	CACCGGTGTGTGCAATTTTATTCA
Primer Vimentin gRNA Reverse	AAACTGAATAAAAAATTGCACACACC
Primer Vimentin Homology Arm Forward	GGTTATCAACGAAACTTCTCAGCATCACGATGACCTTGAAggagctggtgcaggcgctgg
Primer Vimentin Homology Arm Reverse	GCTGGTAATATATTGCTGCACTGAGTGTGTGCAATTTTAttgacctccacacataac

図2

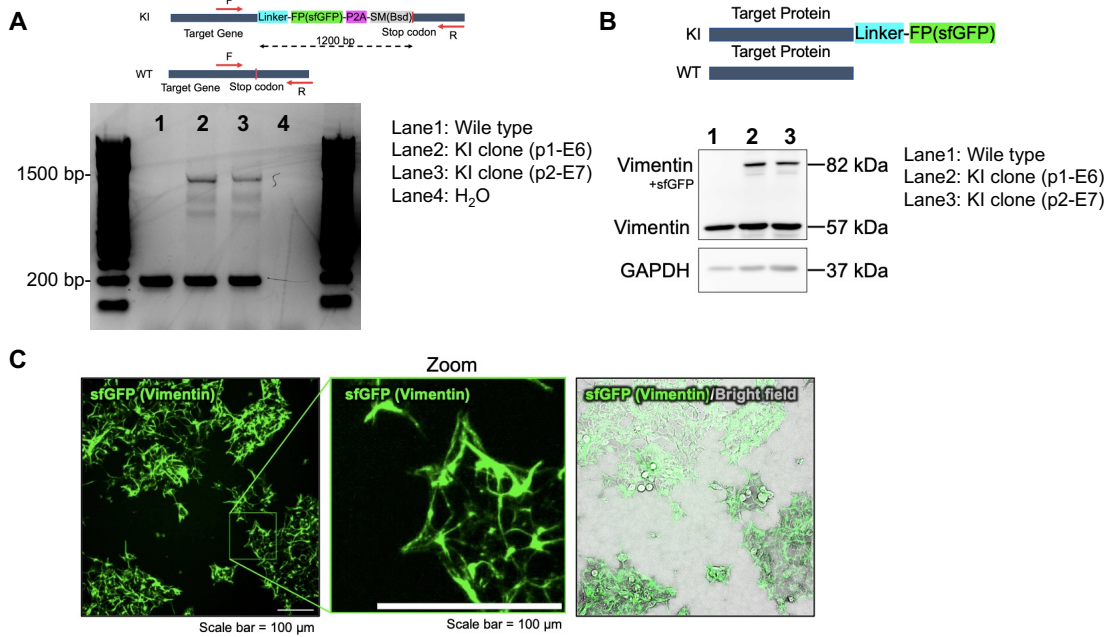
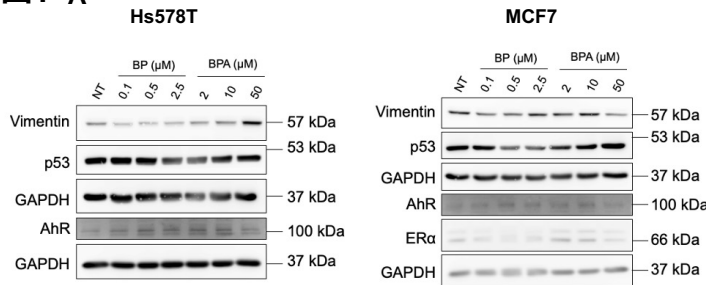


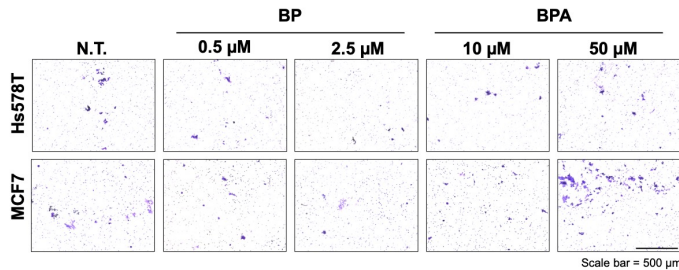
図2. Vimentin蛍光標識レポーター細胞の樹立

(A) HEK293Tを用いて、研究方法2.4.の通りにVimentinに蛍光タンパク質 (sfGFP) をノックインした細胞を樹立した。VimentinのStop codon付近にプライマーを設計し (F: Forward, R: Reverse)、PCRによる増幅後、ゲル電気泳動によりPCR産物の長さを評価した。(B) 同様に、樹立したレポーター細胞のタンパク質を回収し、Western Blottingにより、回収したタンパク質におけるVimentinの発現を評価した。内部標準にはGAPDHを用いた。(C) 樹立したレポーター細胞クローンのうち、p2-E7について共焦点顕微鏡を用いてその蛍光を評価した。左から緑色蛍光、その拡大図、緑色蛍光と明視野のMergeを示す。KI: Knock-In, WT: Wild type, FP: Fluorescent protein, sfGFP: Superfolder GFP, SM: Selection marker,

図1 A



B



C

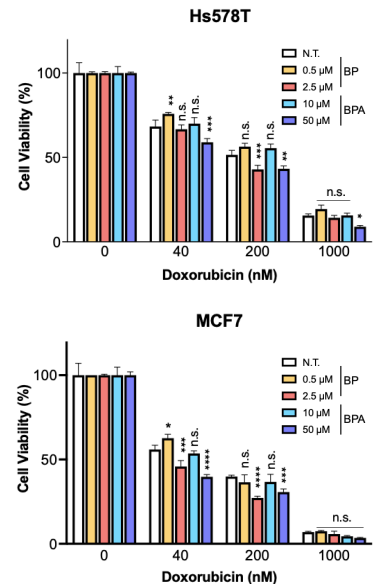


図1. 乳がん細胞に対する化学物質曝露による分子発現変動と表現系解析

(A) Hs578T及びMCF7に対し、各濃度のBisphenolA (BPA) 及びBenzol[a]pyrene (BP) を1週間曝露し、細胞よりタンパク質を回収した。Western Blottingにより、回収したタンパク質におけるVimentin, p53, AhR, ER α の発現を評価した。内部標準にはGAPDHを用いた。(B) Hs578T及びMCF7に対し、各濃度のBisphenolA及びBenzol[a]pyreneを1週間曝露し、孔径8 μ mのトランスウェルチャンパーを用いてMigration assayを実施した。トランスウェルメンブレンの裏側に侵入している細胞を4% PFAで固定し、クリスタルバイオレットを用いて染色し、BZ-X800を用いて撮影した。(C) Hs578T及びMCF7に対し、各濃度のBisphenolA及びBenzol[a]pyreneを1週間曝露し、細胞を96 wellプレートに播種し、24時間培養後、Doxorubicinを処置し、72時間培養した。その後、MTT assayにより細胞生存率を測定し、未処置群を100%として細胞生存率を算出した。n.s., not significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001 by Dunnett's multiple comparisons test vs N.T. (non-treated).