

## 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・残留化学物質ビスフェノールAのがん悪性転化関連遺伝子の変動に与える影響評価と、上皮間葉転換マーカーを活用した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HCC1806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)、非小細胞肺癌細胞株PC9はATCC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; NUAÏLLE, 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% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。

## 2. 被験化学物質

BisphenolAは、nacalai tesque (Kyoto, Japan)より購入し、ジメチルスルホキシド (DMSO, 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週間もしくは4週間培養した。

## 3. 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<sup>5</sup> cells/0.1 ml/wellの細胞濃度で、24 wellプレート (CORNING, Corning, NY, USA) に配置した孔径8 μm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% CO<sub>2</sub>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。

## 4. RNA-seqによる網羅的遺伝子変動解析

HCC1806に1週間、もしくは4週間の間、10 nMもしくは10 μMのBPAを曝露させ、それぞれのタイムポイントで回収したRNAを用い、RNA-seq解析を実施した。RNAは、FastGene™ RNA Basic Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) のプロトコルに従い回収した。RNAシーケンス (mRNA-Seq, 1000万 reads, single read) は、大阪大学微生物研究所遺伝情報実験センターに委託した。なお、解析においては、FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped reads)が0.5以下の遺伝子を除外し、R (R version 4.2.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>) を用いてグラフを作成した。

## 5. Vimentinプロモーター活性を利用した

## レポーター細胞の樹立

HCC1806のゲノムDNAをDNA回収kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて回収し、プライマー (Forward: TTCAAATTTTATCGGCCCGTTAGGTCCCTCGA, Reverse: CGGTGGATCCTCTAGGCTCGGC CGGCTCGCGGT) を用いてVimentinのプロモーター部分 (-800/+72, H Zhou, et al., *Oncol Lett.*, 2019を参考) を増幅した。XbaIとClaI (共にNEB, Ipswich, MA, US) を用いて制限酵素処理したpLU-CMV-GFP-pBLAST (Kerafast, Boston, MA, US) に、In-fusion kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いてライゲーションし、プロモーターがGFPの上流に挿入されたベクターを得た。本ベクターをレンチウイルスパッケージングプラスミドpsPAX2 (Addgene, Watertown, MA, US)、エンベローププラスミドpMD2.G (Addgene) と共にHEK293T (ATCC) にFugene HD (Promega, Madison, WI, US)を用い、本製品のプロトコルに従ってトランスフェクトした。72時間培養した後、ウイルス上清を0.45 μmフィルターで回収した。PC9, HCC1806, MCF7細胞にウイルス上清を感染させ、Blasticidinで7日間、培養することでレポーター細胞を得た。

## 6. 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. BPAにより発現変動する遺伝子の網羅

### 的解析

昨年度に引き続き、モデル化学物質としてBisphenol A (BPA)を選択し、がん悪性転化形質に与える影響を評価した。細胞株としては、Bisphenol Aの主要な受容体であるエストロゲン受容体を発現していないトリプルネガティブ乳がんの細胞株であるHCC1806 (Brian D. Lehmann, et al., *J Clin Invest.* 2011) を選択することで、エストロゲン受容体非依存的な遺伝子発現変動について解析を試みた。また、濃度については昨年度と比較してより低濃度に設定 (10 nM, 10  $\mu$ M、昨年度は2~50  $\mu$ M) し、実際の曝露濃度を想定した検討を実施した。さらに、1週間のみならず、4週間というより長期間の曝露期間を設けることで、長期的な影響評価を試みた。RNA-Seqによる網羅的変動解析の結果、10 nM, 10  $\mu$ Mどちらの濃度においても変動遺伝子が認められ (図1A, B)、1週間、4週間で共通して変動する遺伝子も認められた (図1C, D)。まず、1週間の時点で10 nM, 10  $\mu$ Mどちらにおいても発現が変動していた遺伝子は増加、減少それぞれ、29遺伝子、7遺伝子認められた (図1A)。4週間時点においては、両濃度において変動が認められた遺伝子は、増加、減少それぞれ12遺伝子、10遺伝子であった (図1B)。濃度別に見てみると、1週間、4週間共に10 nM BPA曝露にて変動していた遺伝子は、それぞれ1遺伝子ずつであった (図1C)。10  $\mu$ Mについては、1週間、4週間共に変動していた遺伝子は、増加、減少それぞれ55遺伝子、16遺伝子であった (図1D)。以上より、10  $\mu$ M BPA曝露群においてより多くの遺伝子変動が認められたものの、10 nM BPA曝露においても複数の遺伝子変動が認められた。特に変動遺伝子が多かった10  $\mu$ M BPA曝露群に着目し、変動遺伝子の絞り込みを機能面から実施したところ、興味深いことに細胞外マトリックスの分解によりがん細胞の浸潤・転移を促進するMMP13 (D.E. Kleiner, et al., *Cancer Chemother Pharmacol.*, 1999)、血管新生などを介して転移に関与するCXCL6 (EC Keeley, et al., *Adv Cancer Res.*, 2010)、がん細胞の免疫抑制機構に重要な役割を果たすIDO1 (Sewha Kim, et al., *J.Cancer*, 2017) などが見出された。今後は、これらをレポーター細胞の構築の候補遺伝子として選定し、後述するレポーター細胞を用いた評価系へと応用を進める予定である。

### 3. BPAがHCC1806細胞の細胞遊走性に及ぼす影響解析

これまでの結果において、10 nM, 10  $\mu$ MのBPA曝露により複数の遺伝子変動が認められた。そこで、低濃度のBPA曝露が、細胞

の悪性転化形質に及ぼす影響を評価するとした。これまでと同様にHCC1806細胞を用い、細胞遊走性を評価可能なMigration assayを用いて評価したところ、10 nM BPA 1週間曝露によって細胞の遊走性が有意に増加することが示された。一方、高濃度 (10  $\mu$ M) BPAによっては遊走性に顕著な変化は認められなかった (図2)。今後、浸潤性 (細胞外マトリックスを分解し、がん細胞が浸潤する性質) などを評価する必要があるものの、より低濃度 (10 nM) のBPAが遊走性を亢進させる可能性が示された。

### 3. Vimentinを標識したレポーター細胞の構築

昨年度の検討において、CRISPR-Cas9システムを用いたVimentinの発現を評価可能なレポーター細胞の樹立を試み、HEK293Tを用いたレポーター細胞の樹立を報告した。一方で、本年度に乳がん細胞などトランスフェクション効率が極めて低い細胞株に対して、検討を試みたものの、レポーター細胞の樹立には至らなかった。そこで、図4Aに示すように標的遺伝子のプロモーター領域を蛍光タンパク質をコードする遺伝子の上流に組み込むことで、レンチウイルスベクターを構築した。なお、本検討では上皮間葉転換 (EMT) マーカーの中でも代表的、かつ悪性転化することで発現が増加するVimentinを選択し、ベクターを構築した。作成したベクターを活用し、トランスフェクションが困難であった乳がん細胞 (MCF7, HCC1806)、非小細胞肺癌細胞 (PC9) を用いてレポーター細胞樹立を試みた。その結果、図4Bに示すようにそれぞれの細胞株に緑色蛍光が認められた。今後は、EMTを誘導することが知られているTGF- $\beta$ などで妥当性評価を実施する。

### D. 考察

10 nMという低濃度のBPAの曝露によって、がん細胞におけるがん悪性転化関連遺伝子の変動が認められ、遊走性の増加傾向が認められたことから、今後食品含有化学物質のがん悪性転化形質に与える影響を詳細に評価する必要があると考えられる。また、プロモーター活性を用いたレポーター細胞の樹立にはレンチウイルスを用いることから、ほとんど全てのがん細胞に導入可能であり、今後の応用が期待される。

### E. 結論

食品含有化学物質・残留農薬の発がん性評価は、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をレポーター細胞などの評価系に活用することで、より多角的ながん悪性転化毒性評価法の確立を目指す。

## 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: ベンゾピレン誘導性細胞老化ががん悪性転化へ及ぼす影響., 第50回日本毒性学会学術年

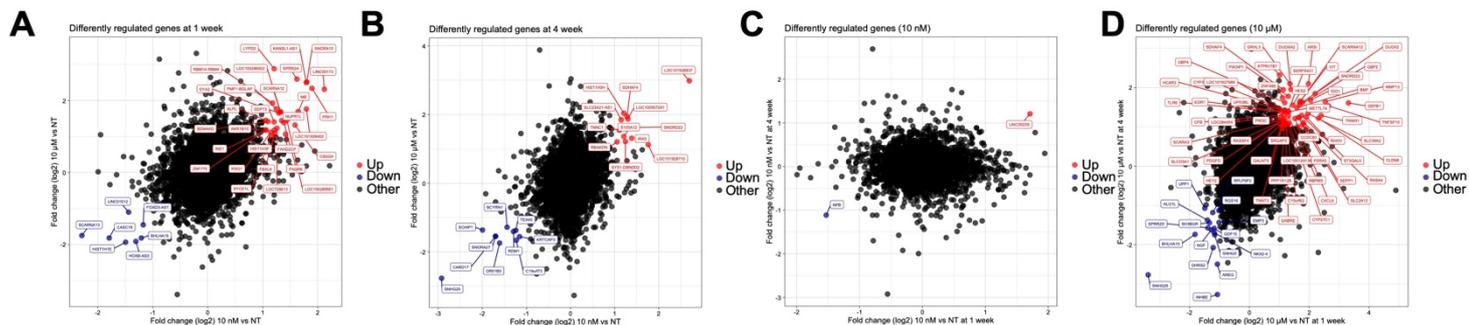
2. 会., 横浜 (神奈川), 2023年6月.
2. 久保美南海, 芳賀優弥, 北本夏子, 辻井勇氣, 東阪和馬, 堤 康央: 上皮間葉転換を介したがん悪性化の評価法確立., 第73回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫), 2023年10月.

#### 国際学会発表 合計1件

1. Kitamoto N., Haga Y., Tsujii Y., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Investigation of the mechanisms of benzo(a)pyrene-induced cellular senescence in breast cancer., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



**図1. HCC1806細胞に対するBisphenol A曝露時における網羅的遺伝子発現変動**

HCC1806に対し、10 nMもしくは10 μMのBisphenol A (BPA) を1週間、もしくは4週間曝露し、回収したRNAを用いてRNA-seq解析を実施した。それぞれの未処置群 (NT) に対し、発現比を算出した。なお、各解析において、FPKMが0.5以下のものは除外して評価した。(A) X軸に10 nM BPA 1週間曝露における発現変動比、Y軸に10 μM BPA 1週間曝露における発現変動比の値をプロットした。(B) X軸に10 nM BPA 4週間曝露における発現変動比、Y軸に10 μMBPA 4週間曝露における発現変動比の値をプロットした。(C) X軸に10 nM BPA 1週間曝露における発現変動比、Y軸に10 nMBPA 4週間曝露における発現変動比の値をプロットした。(D) X軸に10 μM BPA 1週間曝露における発現変動比、Y軸に10 μMBPA 4週間曝露における発現変動比の値をプロットした。なお、X軸、Y軸の値が共に1以上、もしくは1以下の遺伝子について、遺伝子名を赤 (Up) もしくは青 (Down) で表記した。

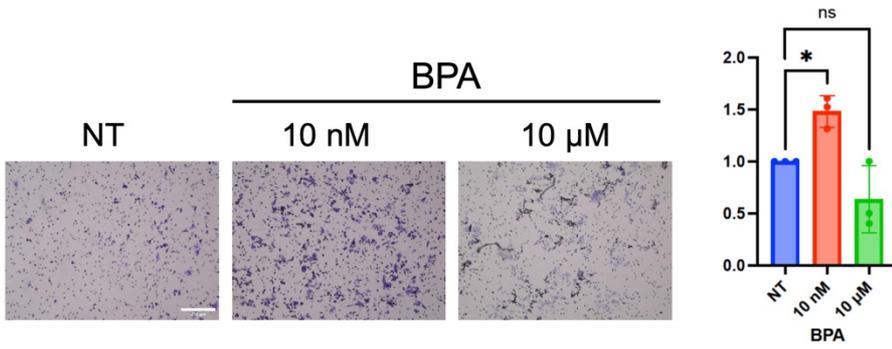
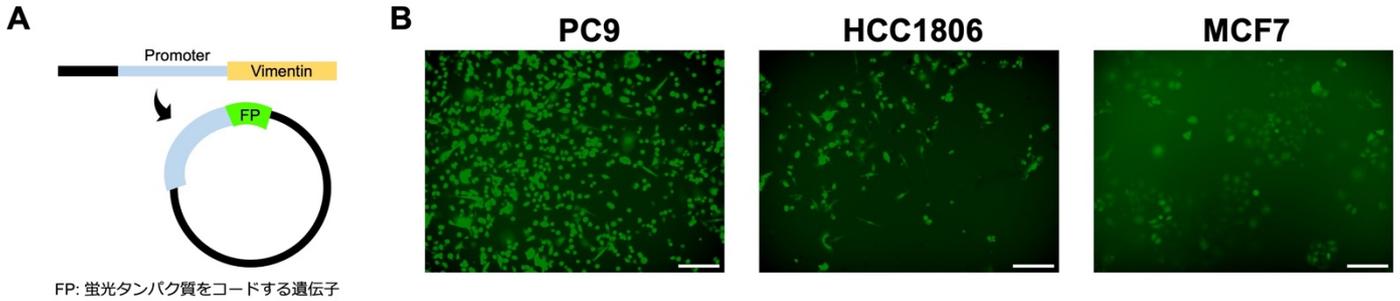


図2. 乳がん細胞に対する化学物質曝露による分子発現変動と表現系解析  
HCC1806に対し、各濃度のBisphenolAを1週間曝露し、孔径8 μmのトランスウェルチャンバーを用いてMigration assayを実施した。トランスウェルメンブレンの裏側に侵入している細胞を4% PFAで固定し、クリスタルバイオレットを用いて染色し、BZ-X800を用いて撮影した。Scale bar = 200 μm。n.s., not significant; \*, P < 0.05; \*\* by Dunnett's multiple comparisons test vs N.T. (non-treated).



FP: 蛍光タンパク質をコードする遺伝子

図3. Vimentinプロモーター活性を利用したレポーター細胞の樹立

(A) Vimentinのプロモーター部分(-800/+72)を蛍光タンパク質をコードする遺伝子の5'上流に挿入することで、Vimentinのプロモーター活性を蛍光強度を指標に評価可能なベクターを構築した。(B) HEK293Tを用いて作成したレンチウイルスを用い、PC9, HCC1806, MCF7に感染させ、Blasticidinにより選択することでレポーター細胞を樹立した。Scale bar = 200 μm。