

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。本年度は、昨年度に引き続き、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) より購入した。細胞の維持培養には、56℃、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℃、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)より購入した。それぞれ、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週間培養した。

3. RNA-seqによる網羅的遺伝子変動解析

HCC1806に1週間の間、10 nMもしくは10 μ MのBPAを曝露させ、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。また、未処置群と比較した際のp値が、0.05以下の遺伝子を抽出し、増加もしくは減少している遺伝子群ごとにEnricher (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)を用いて、BioPlanet 2019のデータベースを用いてパスウェイ解析を実施した。

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 μ M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, Rev

erse: 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 μ mフィルターで回収した。HCC1806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. 遺伝子発現データベース解析

各遺伝子の正常組織、腫瘍組織、転移組織における発現解析には、TMNplot (<https://tnmplot.com/analysis/>) を用いた。TMNplotには、GEO, GTex, TCGA, and TARGET databasesから様々ながん種における発現データが集約されている (全がん種を合わせた症例数、正常組織: 15,648、腫瘍組織: 40,442、転移組織: 848)。

【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. RNA-seq解析によるBPA誘導性変動遺伝子の網羅的解析

昨年度に実施したRNA-seq解析の更なる妥当性評価を目的に、n数を増やし、再度RNA-seq解析を実施した。モデル化学物質としてはBisphenol A (BPA)を選択し、がん種としては食品含有化学物質とがん悪性転化の関連が示唆される乳がん (M Koual, et al., *Environ Health*, 2020) を選択し、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するべく細胞株としてはエストロゲン受容体の発現がほとんど認められないトリプルネガティブ乳がん細胞株であるHCC1806 (Brian D. Lehmann, et al., *J Clin Invest.* 2011) を用いた。現実的な曝露濃度として10 nMと10 μ Mを設定し、一週間の曝露後に変動する遺伝子群の解析を試みた。n数を増やしたことで、群間の有意差を考慮した検討が可能となり、Volcano plot等を用いて変動遺伝子を絞り込んだ。その結果、10 nM曝露群、10 μ M曝露群いずれにおいても多数の変動遺伝子が認められた(図1Aに増加(赤)、減少(青)した遺伝子群をプロットで示す)。さらに、有意な発現変動が認められた遺伝子群を対象に、昨年度は実施していなかったパスウェイ解析を実施した。その結果、10 nMの発現増加群において(図1Bの左上) p値の低い経路の絞り込みが認められた。中には、 α -9 beta-1 integrin pathwayやSyndecan 2 pathwayなどEMTを始めとした腫瘍の悪性化と関連のある経路が認められた (SK Gupta, et al., *Oncogene*, 2013, P G Loftus, et al., *Int J Cancer*, 2021など)。さらに、それぞれの変動遺伝子にも着目し、10 nM曝露群において、発現変動比が2倍以上、もしくは1/2以下に減少した遺伝子のうち、p値が0.05以下であった遺伝子の中から、HIST1H2AE (Up), SEMA5A (Down), HOXC12 (Down)の三遺伝子について、患者データベースを用いて正常組織、がん組織、転移組織における発現を評価した。TMNplotを用いて正常組織、腫瘍組織、転移組織における発現を評価した結果、乳腺組織において、BPAにより発現増加が示唆されたHIST1H2AEについては正常組織、腫瘍組織、転移組織と次第に発現が高くなる傾向を示し、悪性転化促進遺伝子である可能性が示された。一方、SEMA5Aについては、正常組織と比較して腫瘍組織もしくは転移組織で発現が低く腫瘍抑制遺伝子である可能性が示された。とHOXC12については、腫瘍組織と比較して転移組織において発現が低く、悪性転化抑制因子である可能性が示された。

2. レポーター細胞を用いた妥当性評価

次に、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上流に

組み込んだレンチウイルスベクターを用いて樹立したHCC1806-Vimレポーター細胞に関して更に妥当性を評価した。なお、本検討では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を標的遺伝子として採用した。TGF- β はEMTを誘導し細胞遊走性を亢進させるのみならず、その際にVimentinの遺伝子発現量を増加させることが知られている (MK Wendt, et al., *Future Oncol.*, 2009)。そこで、HCC1806-Vimレポーター細胞に対し血清飢餓処理を施した後、TGF- β を処置し、24時間後の蛍光強度を測定した。その結果、緑色蛍光の増加が認められた(図2A, 2B)。

D. 考察

10 nMという低用量のBPA曝露により、がん細胞における悪性転化に関与する遺伝子発現の変化が確認され、悪性形質との関連が示唆された。また、プロモーター活性を指標とするレポーター細胞の樹立にはレンチウイルスベクターを用いており、ほとんどのがん細胞系への導入が可能であることから、今後の幅広い応用が期待される。

E. 結論

食品含有化学物質や残留農薬の発がん性評価は主に初期段階に焦点が当てられてきたが、がんの致死的要因である転移や薬剤耐性といった後期過程に関する評価は進んでいない。本研究は、がん悪性転化機構の解明に基づき、それらを対象とした新たな毒性評価法の確立を目指すものであり、本年度の知見をレポーター細胞などに応用することで、将来的な評価系の構築が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Ikuno Y., Tsujino H., Haga Y., Manabe S., Idehara W., Hokaku M., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Polyethylene, whose surface has been modified by UV irradiation, induces cytotoxicity: A comparison with microplastics found in beaches., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 277: 116346, 2024.
- ② Simoni-Nieves A., Lindzen M., Giri S., Gupta N., Chatterjee R., Selvadurai B.-R., Van Daele M., Love D., Haga Y., Romaniello D., Salame T.-M., Zerbib M., Oren R., Tsutsumi Y., Lauriola M., Marrocco I.,

Yarden Y.: A bispecific antibody targeting EGFR and AXL delays resistance to osimertinib, *Cell Rep Med*, 5(9):101703., **2024**.

- ③ Manabe S., Haga Y., Tsujino H., Ikuno Y., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Treatment of polyethylene microplastics degraded by ultraviolet light irradiation causes lysosome-deregulated cell death., *Sci. Rep.*, 14(1):24008., **2024**. (Corresponding author)

2. 学会発表

国内学会発表 合計13件

- ① 芳賀優弥, 真鍋颯太, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央 : 食品中に含まれるマイクロプラスチックの細胞毒性への影響解析., 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会., 東京 (東京), **2024 年 5 月**.
- ② 芳賀優弥, 真鍋颯太, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央 : 表面性状に着目したポリ塩化ビニルマイクロプラスチックの細胞毒性理解に向けた検討., 第 51 回日本毒性学会学術年会., 福岡 (福岡), **2024 年 7 月**.
- ③ 北本夏子, 芳賀優弥, 辻井勇氣, 東阪和馬, 堤 康央 : ベンゾ[a]ピレンおよびベンゾ[a]ピレンジオールエポキシドは乳がん細胞に細胞老化を誘導する., 第 51 回日本毒性学会学術年会., 福岡 (福岡), **2024 年 7 月**.
- ④ 出原若葉, 芳賀優弥, 辻野博文, 真鍋颯太, 實閣美依, 生野雄大, 東阪和馬, 堤 康央 : マイクロ・ナノプラスチックの細胞内動態解明に向けた検討., 第 51 回日本毒性学会学術年会., 福岡 (福岡), **2024 年 7 月**.
- ⑤ 實閣美依, 芳賀優弥, 辻野博文, 出原若葉, 真鍋颯太, 田中厚資, 東阪和馬, 堤 康央 : 体内動態解析に向けた蛍光ナノプラスチックの作製., 第 51 回日本毒性学会学術年会., 福岡 (福岡), **2024 年 7 月**.
- ⑥ 芳賀優弥, 西村哲秀, 周末, 東阪和馬, 堤 康央 : 非小細胞肺癌における上皮成長因子受容体阻害剤抵抗性細胞の生存機構解明., 第 40 回日本 DDS 学会., つくば (千葉), **2024 年 7 月**.
- ⑦ 芳賀優弥, 西村哲秀, 東阪和馬, 堤 康央 : EGFR 変異陽性非小細胞肺癌におけるオシメルチニブ抵抗性細胞の生存機構解明, 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡 (福岡), **2024 年 9 月**.
- ⑧ 周末, 芳賀優弥, 東阪和馬, 堤 康央 : EGFR 変異陽性非小細胞肺癌におけ

る薬剤抵抗性細胞の細胞周期解析, 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡 (福岡), **2024 年 9 月**.

- ⑨ Aung BBP., Haga Y., Tsujino H., Manabe S., Idehara W., Hokaku M., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Study on DNA damage response caused by polyvinyl chloride (PVC) microplastics., 第 74 回日本薬学会関西支部総会・大会., 西宮 (兵庫), **2024 年 10 月**.
- ⑩ 實閣美依, 芳賀優弥, 辻野博文, 出原若葉, 真鍋颯太, 田中厚資, 東阪和馬, 堤 康央 : ナノプラスチックの動態評価系構築に向けた蛍光ナノプラスチックの作製., 第 74 回日本薬学会関西支部総会・大会., 西宮 (兵庫), **2024 年 10 月**.
- ⑪ 北本夏子, 芳賀優弥, 久保美南海, 東阪和馬, 堤 康央 : ベンゾ[a]ピレン誘導性細胞老化における AhR の役割解明., 日本薬学会第 145 年会., 福岡 (福岡), **2025 年 3 月**. (発表予定)
- ⑫ Phyoo Bo Bo Aung, 芳賀優弥, 真鍋颯太, 出原若葉, 本山裕大, 實閣美依, 森彩葉, 東阪和馬, 堤 康央 : Establishment of environmental relevant polyvinyl chloride nanoplastics considering physicochemical properties., 日本薬学会第 145 年会., 福岡 (福岡), **2025 年 3 月**.
- ⑬ 本山裕大, 芳賀優弥, Phyoo Bo Bo Aung, 出原若葉, 實閣美依, 真鍋颯太, 森彩葉, 東阪和馬, 堤 康央 : 実環境中における表面劣化を模したポリプロピレンナノプラスチックの作製., 日本薬学会第 145 年会., 福岡 (福岡), **2025 年 3 月**.

国際学会発表 合計6件

- ① Haga Y., Tsujino H., Ikuno Y., Manabe S., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Libraries of Micro- and Nanoplastics: Variations in Size, Shape, Surface Oxidation, and Fluorescent Labeling, EUROTOX Congress 2024, Copenhagen (Denmark), 8-11 September, 2024.
- ② Haga Y., Manabe S., Tsujino H., Asahara H., Tsutsumi R., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Towards Comprehensive Understanding and Analysis of Micro- and Nanoplastics Utilizing Libraries Reflecting Environmental Complexity: Cytotoxicity Study of

Surface Oxidated Micro- and Nanoplastics., SETAC North America 45th Annual Meeting, Fort Worth (USA), 20-24 October, 2024.

- ③ Hokaku M., Haga Y., Tsujino H., Idehara W., Manabe S., Tanaka K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Production of fluorescent polyethylene nanoplastics for dynamic analysis applications., The 40th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Busan (Korea), 4-6 November, 2024.
- ④ Haga Y., Manabe S., Tsujino H., Asahara H., Tsutsumi R., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Cytotoxicity assessment employing environmentally relevant micro- and nanoplastics libraries., ASCEPT, APFP & APSA Joint Congress, Melbourne (Australia), 1-4 December, 2024.

- ⑤ Kitamoto N., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Molecular mechanism of malignant change by Benzopyrene-induced cellular senescence., ASCEPT, APFP & APSA Joint Congress, Melbourne (Australia), 1-4 December, 2024.

- ⑥ Zhou M., Haga Y., Nishimura A., Tanahashi S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Variation in cell cycle of drug-tolerant persister cells in non-small cell lung cancer., ASCEPT, APFP & APSA Joint Congress, Melbourne (Australia), 1-4 December, 2024

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

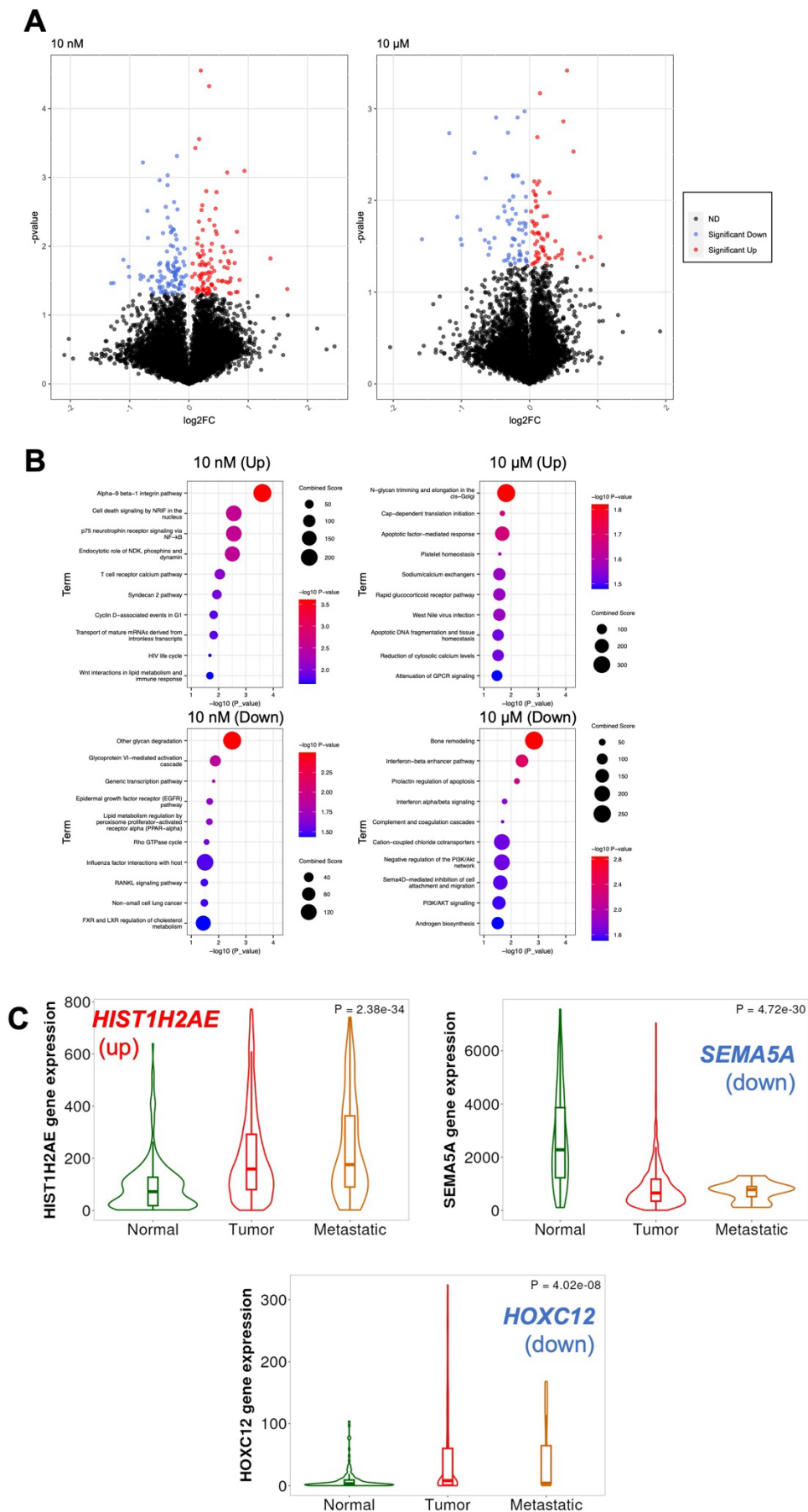


図1. HCC1806細胞に対するBisphenol A曝露時における網羅的遺伝子発現変動

HCC1806に対し、10 nMもしくは10 μMのBisphenolA (BPA) を1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軸に発現変動比 (log2)、Y軸にp値 (-log10) をプロットした。(B) NTと比較した際のp値が、0.05以下の遺伝子を抽出し、増加もしくは減少している遺伝子群ごとにEnricher (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)を用いて、BioPlanet 2019のデータベースを用いてパスウェイ解析を実施した。(C) TMNplotを用いて正常組織、腫瘍組織、転移組織における発現を解析した。

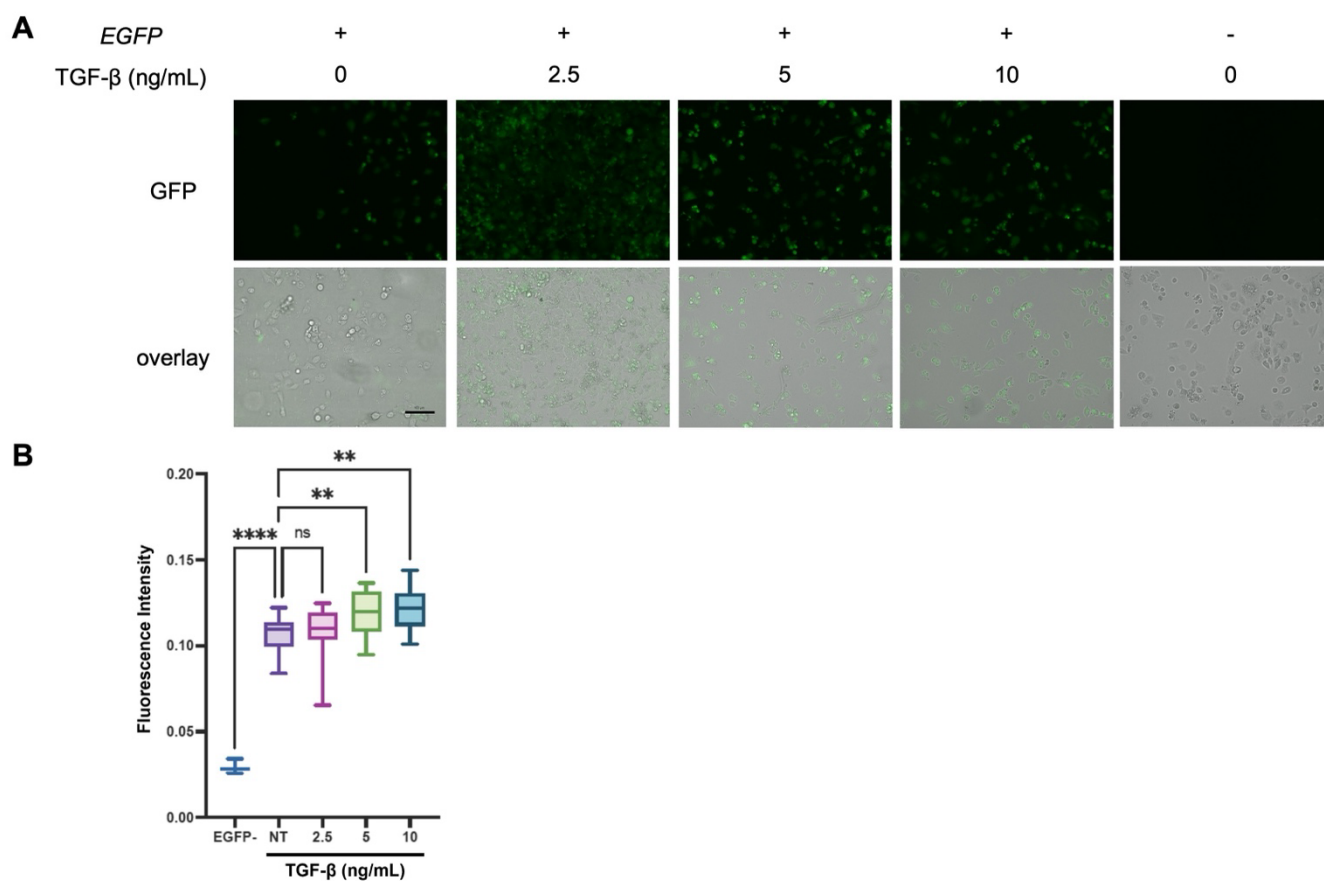


図2. HCC1806-Vimレポーター細胞の妥当性評価

(A) 樹立したHCC1806-Vimレポーター細胞にTGF- β を曝露し、24時間後、蛍光顕微鏡によって蛍光像を撮影した。Scale bar: 100 μ m (B) (A)の画像において細胞領域における緑色蛍光の強度を各視野のプロットとして示した。ns: not significant, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$, by Dunnett's method vs NT