

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。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. 細胞株および培養条件

使用細胞株は以下の通りである。ヒト乳がん細胞株 Hs578T および 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) より購入した。非小細胞肺癌細胞株 PC9 およびヒト胎児腎細胞由来の HEK293T は ATCC より購入した。細胞の維持培養には、56°C で 30 分間の非働化处理を施した 10% ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum; FCS; Biosera; NUAILLE, France) および 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) もしくは RPMI-1640 (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

Bisphenol A (BPA) は nacalai tesque (Kyoto, Japan)、Benzo[a]pyrene (BaP) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。各化学物質はジメチルスルホキシド (DMSO, Wako Pure Chemical Industries) に溶解し、ストック溶液を調製した。

3. Western Blotting

細胞は PBS で洗浄後、以下の成分を含む RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP40、0.1% SDS、0.5% sodium deoxycholate、1 mM EDTA、Protease Phosphatase inhibitor (Thermo Fisher Scientific)) にて溶解し、15 分間氷上でインキュベートした。16,000 × g、4°C で 30 分間遠心後、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。タンパク質試料は 6x SDS サンプルバッファー (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 分加熱した後、SDS-PAGE (14 mA で 10 分、続いて 40 mA で 1 時間) を行った。電気泳動後、Immobilon-P PVDF 膜 (MERCK MILLIPORE) へ 1.5 時間ウェット転写した。膜は 5% スキムミルク/TBST でブロッキングし、1 次抗体を 3% BSA/TBST 希釈液で 4°C 一晩インキュベートした。洗浄後、HRP 標識 2 次抗体 (anti-rabbit IgG、anti-mouse IgG) を室温で 1 時間反応させ、ImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries) により発光検出し、LAS-4000 (FUJI Film) で撮影した。

4. CRISPR-Cas9 によるノックイン細胞株の作製

蛍光タンパク質 Superfolder GFP (sfGFP) を Vimentin 遺伝子の Stop コドン直後にノックインするため、eFlut 法 (Stewart-Ornstein et al., Cell Rep., 2016) を参考に改変して実施した。Cas9 および single guide RNA (sgRNA) の発現には pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 プラスミド (Addgene #62988) を用い、gRNA 配列 (CCTTGAATAAAAAATTGCACACAC、PAM 配列含む) は CRISPRdirect (Naoto et al., Bioinformatics, 2015) で設計した (プライマー配列は Table 1 参照)。sfGFP および Blasticidin 耐性遺伝子の DNA は Twist Bioscience より調達し、Homology Arm 用プライマー (Table 1) を用いてドナーベクターを PCR 増幅により作製した。HEK293T 細胞に Eugene HD (Promega) を用いてトランスフェクション後、48 時間で Blasticidin によるセクションを 1 週間行った。限界希釈法で単一細胞を 96 ウェルプレートに播種し、蛍光顕微鏡 (CellVoyager CV8000, Yokogawa) および Western blotting、PCR によってノックインのバリデーションを実施した。

5. Migration Assay

FCS を含まない培地で細胞を懸濁し、Hs578T は 1.0×10^4 cells/0.1 mL/well、MCF7 は 5.0×10^4 cells/0.1 mL/well、HCC1806 および PC9 は 1.0×10^5 cells/0.1 mL/well の濃度で、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。下部には 10% FCS 含有培地を 0.7 mL 充填し、37°C、5% CO₂ 条件で一定時間培養した。培養終了後、メンブレン裏面に浸潤した細胞を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich) で染色した。蛍光顕微鏡 (BZ-X800, Keyence) で撮影し、遊走能を評価した。

6. MTT アッセイによる細胞生存率評価

細胞を 96 ウェルプレートに 2000 cells/well で播種し、24 時間培養後、Doxorubicin を添加して 72 時間曝露した。続いて 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Tokyo Chemical Industry) 溶液を最終濃度 0.5 mg/mL で添加し、37°C で 3 時間インキュベートした。溶解には DMSO を用い、吸光度を 570 nm で測定した。未処置群を 100% として細胞生存率を算出した。

7. RNA-seq による遺伝子発現解析

HCC1806 細胞に対し、BPA を 10 nM および 10 μ M で 1 週間または 4 週間曝露後、細胞を回収し、FastGene™ RNA Basic Kit (Nippon Genetics) を用いて RNA 抽出を行った。抽出 RNA は RNA-seq 解析に供し、網羅的な遺伝子発現変動を評価した。RNA シーケンスは、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。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。

8. 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)。

9. 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 (下記)

Forward:

TTCAAAATTTTATCGGCCCGTTAGGT
CCCTCGA,

Reverse:

CGGTGGATCCTCTAGGCTCGGCCGGC
TCGCGGT

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。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。

10. 統計解析

すべての実験データは Prism 9 for macOS (GraphPad) を用いて統計解析を行い、p 値<0.05 を有意差の基準とした。

11. 倫理的配慮

本研究における動物実験は、文部科学省の「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」および大阪大学の動物実験規程に準拠し、所属の動物実験委員会による倫理審査の承認を得て実施する。遺伝

子組換え実験についても、「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」および所属機関の組換え DNA 実験委員会の承認のもとで行う。

C. 研究結果

1. 食品含有モデル化学物質曝露による遺伝子発現変動解析

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 Bisphenol A を選定した。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、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、濃度については低濃度に設定 (10 nM, 10 μ M) し、実際の曝露濃度を想定した検討を実施した。Volcano plot 等を用いて変動遺伝子を絞り込んだ結果、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。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 p 値の低い経路の絞り込みが認められた。中には、Alpha-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, PG 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. 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 μ 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こととした。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 μ 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。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

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とし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 のマーカーとして知られる Vimentin を選択した。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 (Stewart-Ornstein et al., Cell Rep., 2016) を参考に、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 Western 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。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、レポーター細胞の樹立には至らなかったものの、鋭敏なレポーター細胞の樹立基盤を確立したと考えられる。

4. Vimentin のプロモーター活性を活用したレポーター細胞の構築

トランスフェクション効率が極めて低い細胞株においてもレポーター細胞を樹立すべく、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、それぞれの細胞株に緑色

蛍光が認められた。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、緑色蛍光のわずかな増加が認められた。更なる妥当性評価を重ね、本レポーター細胞を今後のスクリーニングに活用予定である。

D. 考察

低濃度の BPA 曝露によりがん細胞で悪性化関連遺伝子の変動や遊走性の増加が確認され、化学物質によるがん悪性形質への影響を評価する必要性が示唆された。レンチウイルスを用いたレポーター細胞系は多くのがん細胞に適用可能であり、今後の応用が期待される。今後は長期間の評価や他の乳がん細胞株への展開を通じて、Vimentin 以外のマーカーを用いたレポーター細胞系の確立を目指す。

E. 結論

食品含有化学物質や残留農薬の発がん性評価は初期過程 (Initiation・Promotion) に集中している一方で、死亡要因となる転移や薬剤耐性など後期過程 (がん悪性転化) に関する評価は進んでいない。本研究では、がん悪性転化機序の解明を通じた毒性評価法の確立を目指し、低濃度・短期間の曝露でも分子レベルや表現型に変化を引き起こす可能性を見出した。今後は化学物質や細胞株の多様性を取り入れた検討と、レポーター細胞を活用した多角的評価系の構築により、食品含有化学物質のリスク管理に資する知見の創出を目指す。

F. 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

- 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.
- ② 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会., 横浜 (神奈川), 2023 年 6 月.
- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.

- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.
- ⑬ 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.
- ⑭ 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.
- ⑮ 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.

国際学会

- 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.

- ② Kitamoto N., Haga Y., Tsujii Y., Tsujino H., Higashisaka K.,

Tsutsumi Y. : Investigation of the mechanisms of benzopyrene-induced cellular senescence in breast cancer., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況
該当なし。

Table. 1

Primer Vimentin gRNA Forward	CACCGGTGTGTGCAATTTTATTCA
Primer Vimentin gRNA Reverse	AAACTGAATAAAAAATGACACACACC
Primer Vimentin Homology Arm Forward	GGTTATCAACGAAACTTCTCAGCATCACGATGACCTTGAAAggagctggcgagcgctgg
Primer Vimentin Homology Arm Reverse	GCTGGTAATATATTGCTGCACTGAGTGTGTGCAATTTTATTtagccctccacacataac

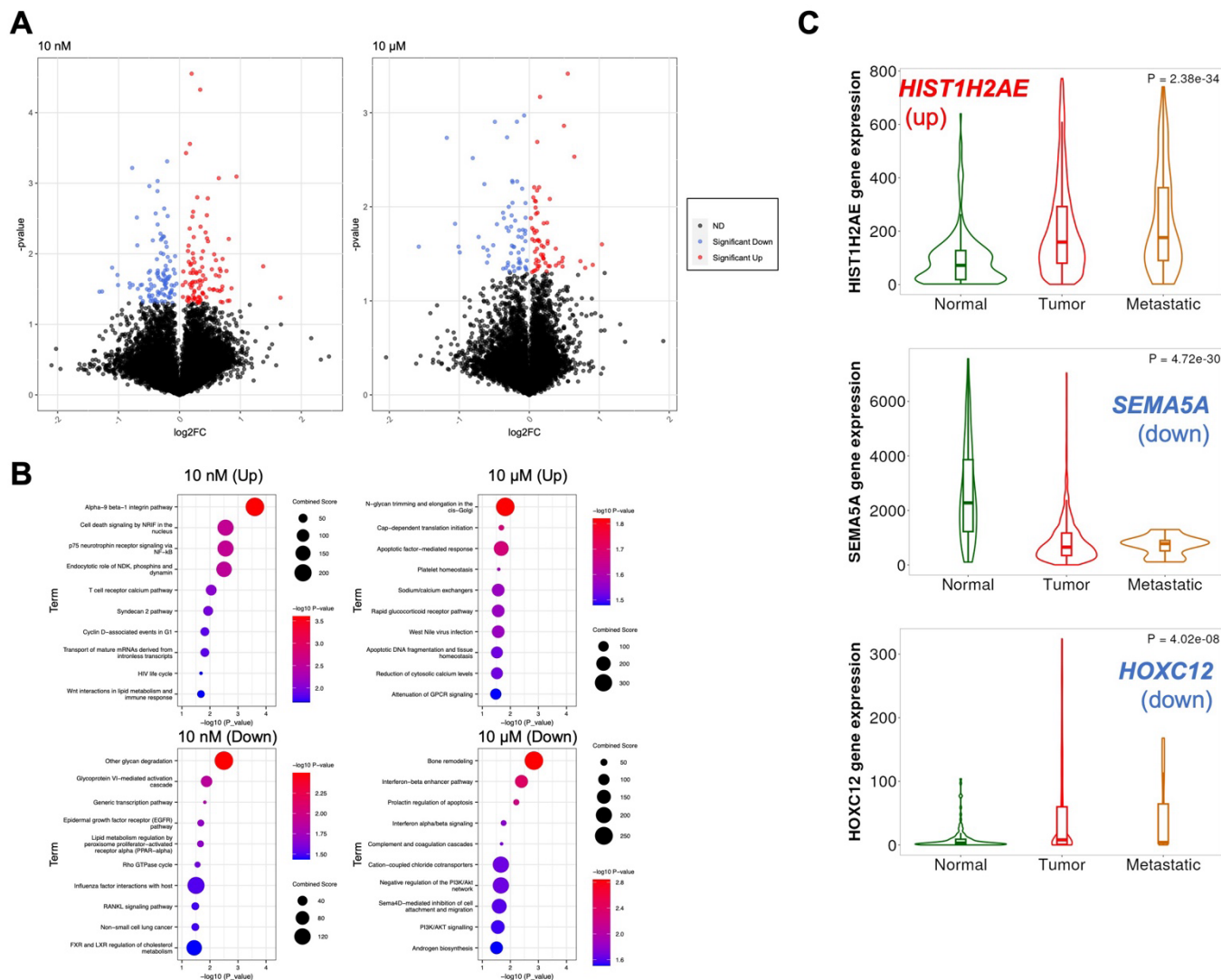


図1. HCC1806細胞に対するBisphenol A曝露時における網羅的遺伝子発現変動

HCC1806に対し、10 nMもしくは10 μ MのBisphenol A (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。

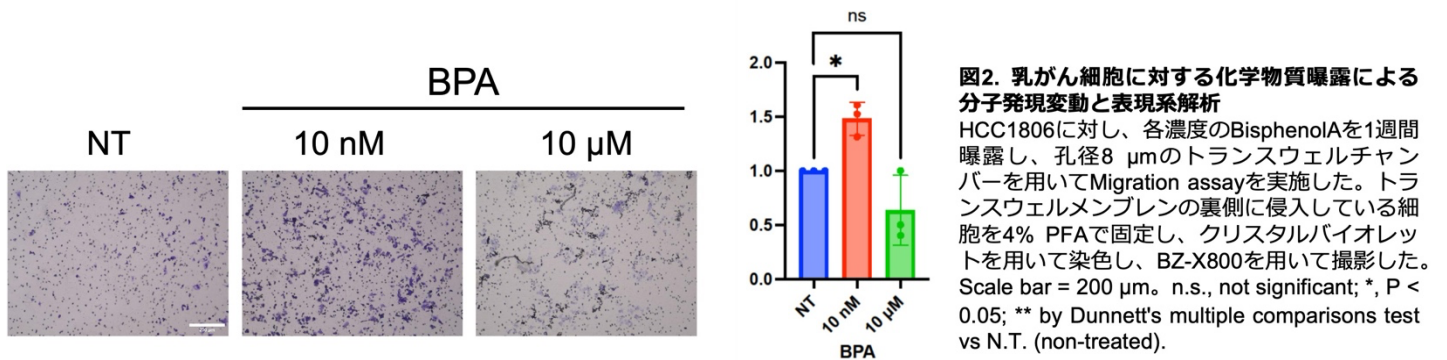


図2. 乳がん細胞に対する化学物質曝露による分子発現変動と表現系解析
HCC1806に対し、各濃度のBisphenolAを1週間曝露し、孔径8 μmのトランスウェルチャンバーを用いてMigration assayを実施した。トランスウェルメンブレンの裏側に侵入している細胞を4% PFAで固定し、クリスタルバイオレットを用いて染色し、BZ-X800を用いて撮影した。Scale bar = 200 μm。n.s., not significant; *, P < 0.05; ** by Dunnett's multiple comparisons test vs N.T. (non-treated).

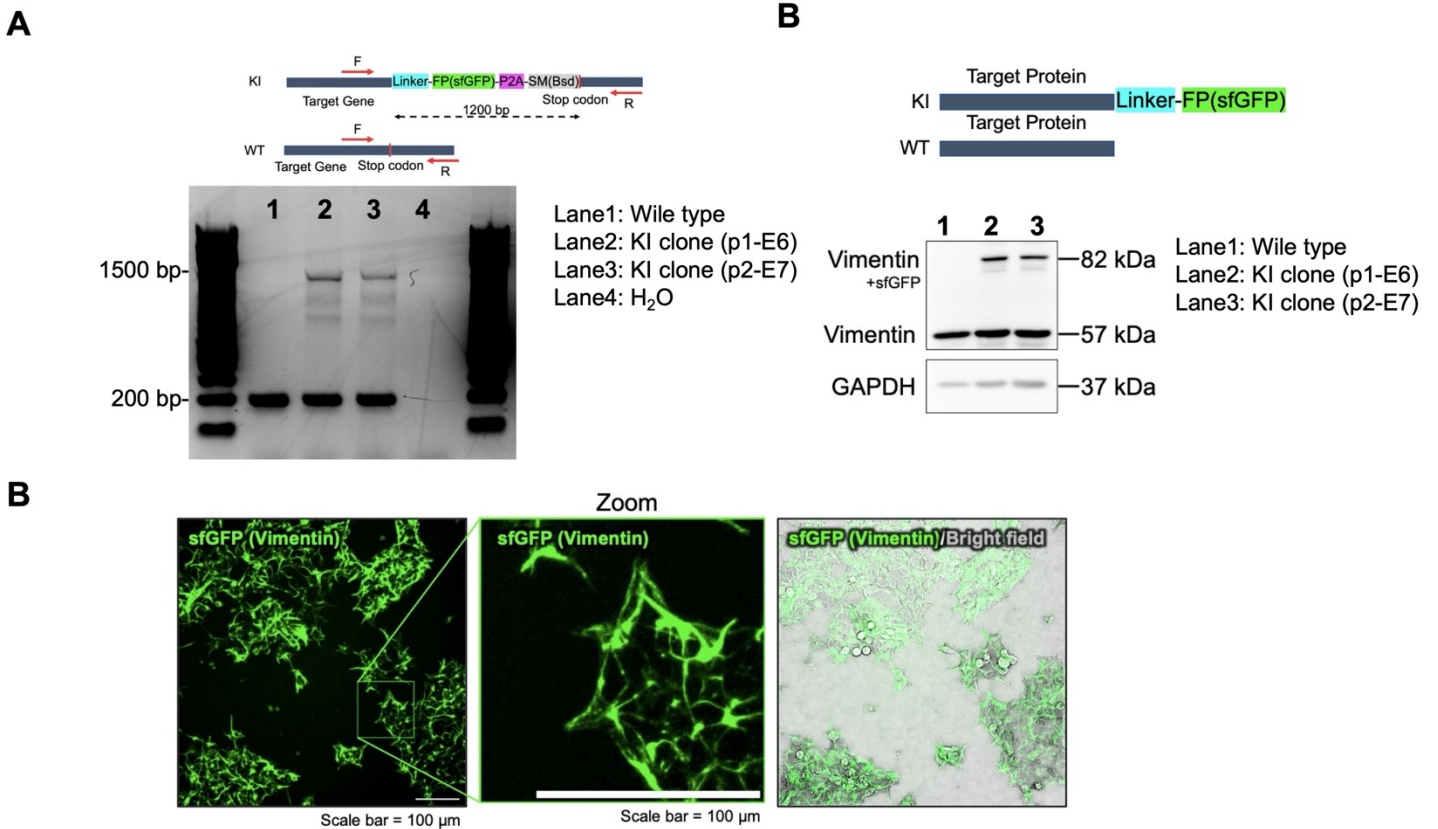


図3. Vimentin蛍光標識レポーター細胞の樹立

(A) HEK293Tを用いて、Vimentinに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、PCRによる増幅後、ゲル電気泳動によりPCR産物の流れを評価した。(B) 同様に、樹立したレポーター細胞の蛋白質について、Vimentinの発現を評価した。(C) クローンp2-E7について、その蛍光を共焦点顕微鏡により評価した。

KI: Knock-In, WT: Wild Type, FP: Fluorescent Protein, sfGFP: Superfolder GFP, SM: Selection Marker

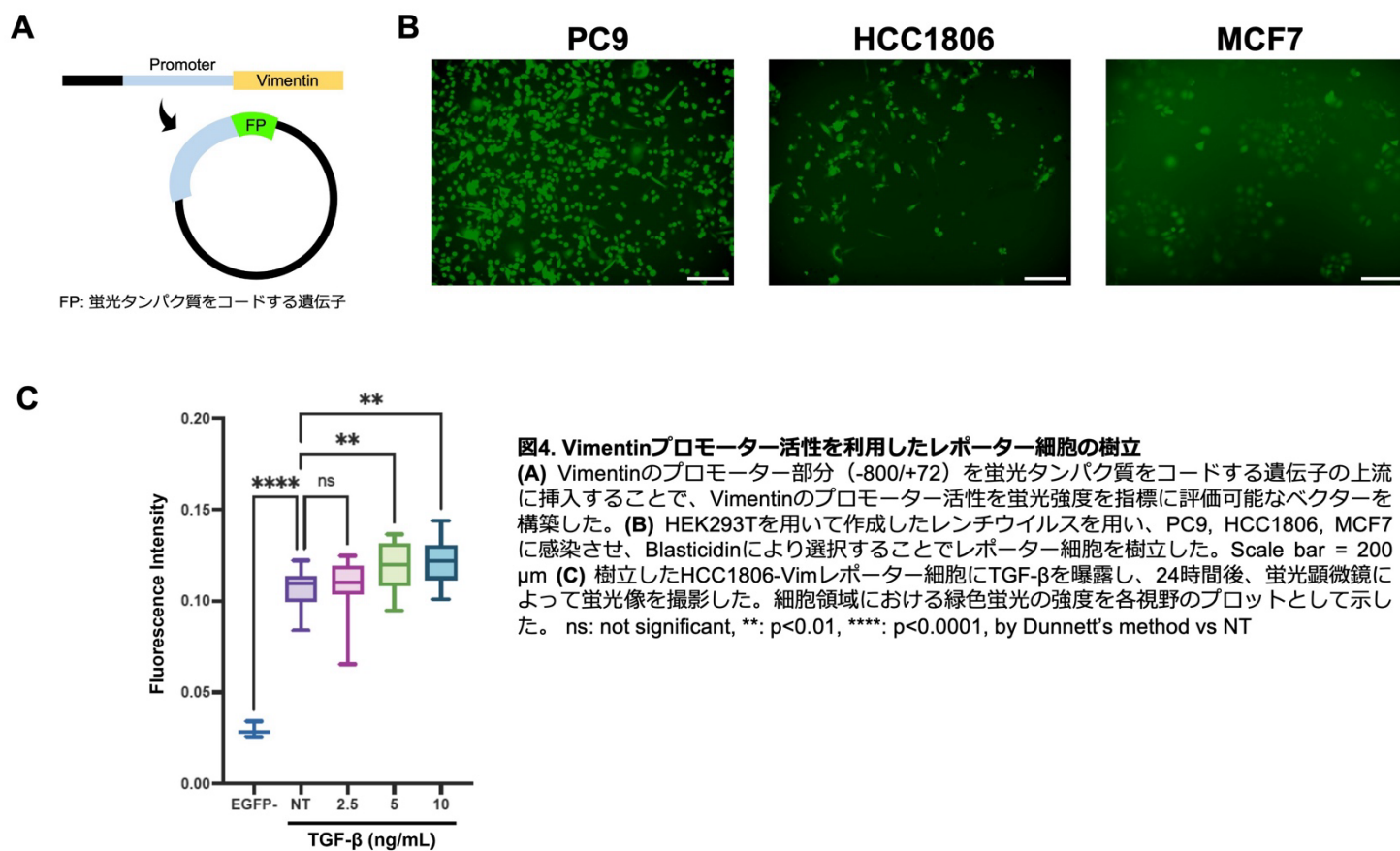


図4. Vimentinプロモーター活性を利用したレポーター細胞の樹立

(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 (C) 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。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