

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82718

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08063

研究課題名(和文)肝代謝系を導入した新規Bhas42細胞形質転換試験法の開発

研究課題名(英文) The development of the Bhas42 cell transformation assay incorporating the human hepatic metabolic system for predicting a carcinogenicity of chemicals via hepatic metabolism

研究代表者

廣岡 孝志(Hirooka, Takashi)

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・食品機能性評価グループ・研究員(任期有)

研究者番号：50397519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Bhas42細胞形質転換試験法(Bhas42 CTA)は、国際認定された発がん活性予測のためのin vitro試験法である。本研究では、肝代謝による発がん活性への影響も考慮したBhas42 CTAを確立するためにBhas42細胞とヒト肝細胞株との共培養を検討した。その結果、両細胞の共培養系の構築に利用の可能性が示唆される改変Bhas42 CTA培地を作成できた。また、Bhas42細胞の代謝酵素CYPの発現をタンパク発現レベルおよび酵素活性で示し、3-methylcholanthreneによるフォーカス形成への寄与も提示する事が出来た。

研究成果の概要(英文)：The Bhas42 cell transformation assay (Bhas42 CTA) has been internationally certified as an in vitro test method for predicting of chemical carcinogenicity. The purpose of this study is the development of the cell transformation assay using Bhas42 cells co-cultured with human hepatocytes for predicting the carcinogenicity of chemicals metabolized by hepatic metabolism system. We made the modified Bhas42 CTA medium, in which the CYP 3A4 activity of the human hepatocyte could be maintained at a detectable level for 10 days. Moreover, significantly increase in the formation of focus wasn't observed in Bhas42 cells cultured with the modified CTA medium in the absence of test chemicals. On the other hand, we showed the expression of CYP1A1, 1A2 and 2B6 in Bhas42 cells by western blot analysis and CYP activity assay, and further demonstrated the contribution of CYP activities to focus formation of Bhas42 cells in initiation assay of 3-methylcholanthrene.

研究分野：環境毒性学

キーワード：発がん性予測試験 細胞形質転換試験 Bhas42 細胞 肝代謝 ヒト肝細胞株 発がんプロモーター 代謝活性化 CYP酵素

1. 研究開始当初の背景

我が国のがん（悪性新生物）による死亡率は非常に高く、その対策は公衆衛生上の重要な課題となっている。従って、化学物質の安全性評価においても発がん性の予測は非常に重要な項目である。

化学物質による正常細胞のがん細胞への転換、そして悪性腫瘍形成は多段階発がん機構によって進行する。初めに遺伝毒性物質による DNA 損傷により、正常細胞は前がん細胞へと変化する。これはイニシエーションと呼ばれ、不可逆的に進行する。次に前がん細胞は、化学物質の刺激を受けることにより、異常な増殖能を獲得したがん細胞へと転換され、その後、腫瘍が形成される。これはプロモーションと呼ばれる。イニシエーションを引き起こす化学物質をイニシエーター、そしてプロモーションを引き起こす化学物質はプロモーターと呼ばれる。化学物質による発がんリスクを低減するためには、イニシエーターだけではなくプロモーターからの曝露を避け、腫瘍の形成をなくすことが重要である。現在、化学物質の発がん性を予測する *in vitro* 試験法として設定されている Ames 試験は、化学物質のイニシエーション活性を予測することができるが、プロモーション活性を予測することはできない。

細胞形質転換試験法は、BALB/c3T3 細胞や C3H10T1/2 細胞などの動物培養細胞を用いて化学物質の発がん性を予測する *in vitro* 試験法である。細胞形質転換試験法では、細胞の腫瘍形成能の獲得に伴う異常な細胞の集積（フォーカス形成）をエンドポイントとして被験物質の発がん性の予測を行う。しかしながら、BALB/c3T3 細胞などを用いた従来の細胞形質転換試験法では、プロモーション活性を予測するためには、予め細胞に形質転換を誘発しない量のイニシエーターを曝露させた後、プロモーターの処理を行う必要があり試験期間が長いこと、および培養に手間がかかることが問題であった。

BALB/c3T3 細胞にがん遺伝子 *v-Ha-ras* を導入することにより予めイニシエーションされた Bhas42 細胞（*v-Ha-ras* 導入 BALB/c3T3 クローン）が佐々木らにより樹立された（Sasaki et al., Jpn. J. Cancer Res., 79, 921-930, 1988）。この Bhas42 細胞を用いた、簡便かつ短期間の細胞形質転換試験法（Bhas42 cell transformation assay: **Bhas42 CTA**）が神奈川県衛生研究所の大森らにより開発された（Ohmori et al., Mutat. Res., 557, 191-202, 2004）。Bhas42 CTA は、BALB/c3T3 細胞を用いた試験法よりも高感度に化学物質の発がんプロモーション活性の検出が可能であり、室間再現性（Ohmori et al., Alternative to

laboratory animals, 33, 619-639, 2005）も良好であることから、OECD（The Organization for Economic Cooperation and Development）の国際標準試験法としての認定に向けての検討が進められ、2016 年 1 月に発がん性物質の細胞試験法のガイダンスドキュメントとして認定された。

多環芳香族炭化水素のように化学物質の中には、生体内に取り込まれたのち、代謝活性化を受けて発がんイニシエーション活性を発現するものが存在する。この代謝活性化によるイニシエーション活性は、S9mix などの代謝系による前処理を追加した Ames 試験などで予測が可能になっている。

一方、Bhas42 CTA では、生体内代謝による発がん活性を考慮した試験法はまだ確立されていない。例えば Bhas42 CTA に S9mix、肝ミクロソームおよび肝細胞の前処理を利用する場合、S9mix や肝ミクロソームは、主としてラットなどの実験動物から作成されたものを使用するため、化学物質に対するヒトと実験動物種との種差が問題となる。また、S9mix では、その溶液成分の細胞毒性が問題になる。さらに肝細胞の利用については、他の細胞を用いた試験で肝細胞との混合培養を用いた報告例があるが、肝細胞と Bhas42 細胞との接触が Bhas42 細胞のフォーカス形成に与える影響が懸念される。

以上の見知から申請者はヒト肝細胞と Bhas42 細胞を非接触的に共培養することができるトランスウエルを用いてヒト肝代謝を考慮した Bhas42 細胞形質転換試験法を開発することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト肝細胞-Bhas42 共培養系を用いることにより化学物質のヒト肝代謝による発がん活性も予測可能な Bhas42 CTA を開発することである。そこで、(1) Bhas42 CTA 培地中におけるヒト肝細胞株の細胞増殖および薬物代謝能の検討、(2) トランスウエル共培養法によるヒト肝細胞株の Bhas42 CTA への導入方法の検討、および、(3) Bhas42 細胞自身が持つ薬物代謝機能について、CYP のタンパク発現と酵素活性を検討した。

3. 研究の方法

(1) Bhas42 細胞形質転換試験 (**Bhas42 CTA**):

OECD Series on Testing & Assessment
No. 231 GUIDANCE DOCUMENT ON

THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY に従った。プロモーションアッセイでは、発がんプロモーターとして 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)を用いた。イニシエーションアッセイでは発がんイニシエーターとして 3-methylcholanthrene (3-MCA) を単独処理、もしくは各種 CYP 活性阻害剤で併用処理した。各アッセイの溶媒対照は DMSO を用いた。

(2) ヒト肝細胞株の培養および Bhas42 細胞との共培養：

HepG2, CYP3A4 強制発現 HepG2 (CYP3A4-HepG2) およびヒト肝細胞株 A をトランスウエルまたは培養ウエルプレートに播種し、それぞれの培養プロトコルに従い前培養した。トランスウエルで前培養後、単独培養もしくは Bhas42 細胞とのトランスウエル共培養条件下で 3-10 日間培養した。

(3) CYP のタンパク発現および酵素活性試験：

各処理を行ったヒト肝細胞株および Bhas42 細胞から抽出した total タンパク質を用い、western blot 法により各 CYP のタンパク発現レベルを調べた。CYP3A4 活性は testosterone-6 β 水酸化活性、CYP1A1/1A2 活性は 7-ethoxyresorufin o-deethylase(EROD)活性、および CYP2B6 活性は 7-benzyloxyresorufin o-debenzylase (BROD)活性により評価した。

4. 研究成果

(1) Bhas42 CTA 培地中におけるヒト肝細胞株の細胞増殖および薬物代謝機能

ヒト肝細胞株 HepG2, CYP3A4 強制発現 HepG2 (CYP3A4-HepG2) およびヒト肝細胞株 A について、Bhas42 CTA 培地を用いたトランスウエル単独培養下での細胞増殖および薬物代謝機能を調べた。培養時間は Bhas42 CTA プロモーションアッセイの化学物質処理期間である 10 日間とした。その結果、3 種のヒト肝細胞株の細胞増殖は Bhas42 CTA 培地中でも維持された。ただし、ヒト肝細胞株 A では培養経過に伴った細胞形態の敷石状から若干の紡錘形への変化が認められた。

薬物代謝機能は、肝細胞に特異的に発現する CYP3A4 のタンパク発現とその酵素活性レベルで評価した。実験の結果、HepG2 では CYP3A4 のタンパク発現およびその酵素活性は検出されなかった。

CYP3A4-HepG2 の CYP3A4 のタンパク

発現と酵素活性は、10 日間培養で検出可能なレベルに保たれていた。一方、ヒト肝細胞株 A の CYP3A4 のタンパク発現および酵素活性は、培養開始時では CYP3A4-HepG2 よりも高いレベルを示したが、培養 3 日目以降、そのタンパク発現と酵素活性は検出できなかった。

(2) トランスウエル共培養法によるヒト肝細胞株の Bhas42 CTA への導入方法の検討

CYP3A4-HepG2 の導入方法の検討

Bhas42 CTA 培地中、トランスウエル単独培養下において細胞増殖および CYP3A4 活性の維持が観察された CYP3A4-HepG2 について、Bhas42 CTA への導入方法の検討を行った。まず、CYP3A4-HepG2 と Bhas42 細胞とのトランスウエル共培養における両細胞間の相互影響を調べた。被験物質非存在下、10 日間のトランスウエル共培養では、CYP3A4-HepG2 の CYP3A4 タンパク発現と酵素活性レベルに対する Bhas42 細胞との共培養の影響は認められなかった。一方、Bhas42 細胞のフォーカス形成は CYP3A4-HepG2 との共培養により強く抑制された。しかし、3 日間(イニシエーションアッセイ条件)の共培養では、フォーカス形成の抑制は観察されなかった。最後に、CYP3A4 代謝による発がん活性が疑われる Tamoxifen, 17 β -estradiol, diethylstilbestrol および 17 β -ethinyl-estradiol について CYP3A4-HepG2 とトランスウエル共培養した Bhas42 細胞を用いたプロモーションおよびイニシエーションアッセイを実施した。しかし、CYP3A4-HepG2 導入に起因すると考えられる明確な Bhas42 細胞のフォーカス形成数の増加は確認できなかった。

ヒト肝細胞株 A の導入方法の検討

ヒト肝細胞株 A は、その推奨培地による培養では CYP3A4-HepG2 より高い CYP3A4 活性を示す。しかしながら Bhas42 CTA 培地による培養では、培養開始時に CYP3A4-HepG2 より高い CYP3A4 活性を示すが、その活性は培養 3 日以降に検出できなくなることが問題となっていた。そこでまず、ヒト肝細胞株 A の CYP3A4 活性を 10 日間維持できる培養条件を検討した。その結果、トランスウエル培養したヒト肝細胞株 A の CYP3A4 活性を 10 日間培養後でも検出可能なレベルに保つことができる改変 Bhas42 CTA 培地を作成した。また、この改変 Bhas42 CTA 培地での培養が Bhas42 細胞に与える影響を調べた。その結果、被験物質非存在下、改変 Bhas42 CTA 培地を用いた

Bhas42 細胞の単独培養では、改変 CTA 培地への変更に起因する Bhas42 細胞のフォーカス形成数の有意な増加は認められなかった。

改変 Bhas42 CTA 培地で 10 日間培養したヒト肝細胞株 A の CYP3A4 活性は、通常の Bhas42 CTA 培地で 10 日間培養した CYP3A4-HepG2 の CYP3A4 活性よりも低値を示した。しかし、CYP3A4-HepG2 とヒト肝細胞株 A の薬物代謝機能を正確に比較するためには培養期間中における各細胞株の CYP3A4 活性レベルの経時的変化の比較、および CYP3A4 以外の代謝酵素タンパクの発現と活性レベルの比較が必要である。

本研究の目的であるヒト肝細胞株との共培養系を用いた Bhas42 CTA の開発には、Bhas42 細胞に対し低毒性かつフォーカス形成への影響が少ない、さらにヒト肝細胞株の代謝機能を 10 日間維持できる培地が必要である。これらの条件を満たす培地の探索が研究の律速となってきたが、最終年度の検討によりそれらの条件に近づく改変 Bhas42 CTA 培地を作成することができた。今後、この改変培地について、実験結果の再現性、さらに Bhas42 細胞とヒト肝細胞株の共培養下における両細胞間での相互影響を検討することによりヒト肝代謝を考慮した Bhas42 細胞形質転換試験法の確立が期待できる。

(3) Bhas42 細胞の薬物代謝機能：

ヒト肝代謝を考慮した Bhas42 CTA の開発に向けて、ヒト肝細胞株だけでなく Bhas42 細胞の薬物代謝機能についても知っておく必要がある。Bhas42 細胞の薬物代謝機能については、現時点までに多環芳香族炭化水素による CYP1A1 mRNA の発現誘導が報告されている。しかし、Bhas42 細胞の CYP1A1 のタンパク発現および他の CYP サブタイプのタンパク発現とそれらの酵素活性の有無についてはまだ報告されていない。

本研究では、まず Bhas42 CTA イニシエーションアッセイ条件下、溶媒対照 DMSO で処理した Bhas42 細胞について CYP のタンパク発現を調べた。その結果、CYP2B6 のタンパク発現が確認された。一方、発がんイニシエーターであり、CYP1A1,1A2 および 1B1 の発現誘導剤でもある 3-MCA で処理した Bhas42 細胞では CYP1A1, CYP1A2 および CYP2B6 のタンパク発現が確認された。さらに、Bhas42 細胞の CYP1A1, CYP1A2 および CYP2B6 は酵素活性を有していることも分かった。3-MCA は Aryl hydrocarbon receptor (AhR) との結合を介して CYP 発現を誘導することが分かっている。実際、3-MCA と AhR 拮抗剤で併用処理した

Bhas42 細胞では CYP1A1 と CYP1A2 のタンパク発現レベルは、3-MCA 単独処理に比べて有意に低下した。

3-MCA は、生体内では CYP1A1,1A2 および 1B1 により代謝活性化され DNA を障害することが分かっている。Bhas42 CTA イニシエーションアッセイにおいて 3-MCA はフォーカス形成を誘発することが確認されている。そこで、CYP1A1 および 1A2 に対する発現阻害剤(AhR 拮抗剤)および非特異的 CYP 活性阻害剤を用いて、3-MCA のフォーカス形成に対する CYP1A1, CYP1A2 および CYP2B6 活性の寄与を検討した。その結果、AhR 拮抗剤は 3-MCA による CYP1A1 と 1A2 の発現誘導を抑制し、これらの酵素活性を最大 80% 阻害した。一方、CYP2B6 のタンパク発現レベルの変化は確認されなかったが、その酵素活性の最大 50% が阻害された。さらに、AhR 拮抗剤で Bhas42 細胞のフォーカス形成を阻害したところ、その阻害率は最大で 50% 程度であった。一方、非特異的 CYP 活性阻害剤は、CYP1A1 と CYP1A2 の酵素活性および CYP2B6 の酵素活性をそれぞれ最大 90% および 99% 阻害したが、フォーカス形成の阻害率は最大で 60% 程度であった。これらの結果は、3-MCA の AhR 活性化を介した CYP1A1/1A2 発現誘導とその代謝活性化が、3-MCA による Bhas42 細胞のフォーカス形成に参与していることを示唆している。また、CYP1A1 と 1A2 の発現と酵素活性を主として阻害する AhR 拮抗剤によるフォーカス形成の最大阻害率と CYP2B6 を含む全ての CYP の活性を阻害する非特異的 CYP 活性阻害剤によるフォーカス形成の最大阻害率の差が 10% 程度であった。この結果は、Bhas42 細胞で発現している CYP タンパクの中で、3-MCA による Bhas42 細胞のフォーカス形成には、主として CYP1A1 と 1A2 が寄与しており、CYP2B6 および本研究で検出されなかった他の CYP の寄与は CYP1A1/1A2 よりも小さいことを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

廣岡孝志、阿部啓子、大森清美、Bhas42 細胞の薬物代謝酵素 CYP 発現解析と化学物質による細胞形質転換誘導における役割、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日、仙台。

廣岡孝志、阿部啓子、大森清美、3-methylcholanthrene による Bhas42 細胞の

形質転換フォーカス形成における薬物代謝酵素 CYP1A1,1A2 および 2B6 の寄与，日本動物実験代替法学会第 30 回大会，2018 年 11 月 24 日，東京。

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

廣岡 孝志 (Hirooka Takashi)

地方独立行政法人神奈川県産業技術総合研究所・食品機能性評価グループ・研究員
研究者番号：50397519

(2)研究分担者

大森 清美 (Ohmori kiyomi)

神奈川県衛生研究所・理化学部・主任研究員
研究者番号：20416069