

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06736

研究課題名(和文)新規ベンゾ(a)ピレンDNA付加体形成メカニズムの解明と遺伝毒性予防食品の探索

研究課題名(英文)Elucidation of novel benzo (a) pyrene DNA adduct formation mechanism and search for genotoxicity preventive foods.

研究代表者

宇野 茂之(UNO, Shigeyuki)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：90307851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：発がん物質であるベンゾ(a)ピレン(BaP)の遺伝子毒性(DNA付加体形成)にはCYP1A1以外の分子の関与を明らかになったことから、詳細なメカニズムの解明を試みた。また、手軽なDNA付加体検出法を確立した。光センシングシステムの導波モードセンサーを用いることで、迅速にBaP処理のマウス肝臓および培養細胞のBPDE DNA付加体の検出が可能になった。また、BaP DNA付加体形成の9,10-epoxy反応にCYP1A1以外の分子が関与していることが示された。更には抗がん作用があるニンニク成分DATSはBaP DNA付加体を増加させ、DNA付加体形成以外に作用することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BaPの遺伝毒性の主要因であるBPDEのDNA付加体形成の検出法は32Pポストラベル法が主流であるが、時間とコストがかかり、多量サンプルの解析に向いていない。本研究で確立した光センシングシステムの導波モードセンサーを利用した新たな簡便かつ迅速なBPDEのDNA付加体検出法は、マルチチャンネル型の導波モードセンサーの開発も可能であり1次スクリーニング法としては有用な検出法になると考える。また、がんに対する治療は、抗がん剤に対する抵抗性、再発など問題点が多く、がん予防の重要性が指摘されている。そこでDNA付加体形成の詳細な検討は予防法の確立を考える上で重要な知見になると考える。

研究成果の概要(英文)：Since the involvement of molecules other than CYP1A1 in the genotoxicity (DNA adduct formation) of the carcinogen benzo (a) pyrene (BaP) was clarified, we attempted to elucidate the detailed mechanism. We also established a simple DNA adduct detection method. By using the waveguide mode sensor of the optical sensing system, it became possible to quickly detect BPDE DNA adducts in BaP-treated mouse liver and cultured cells. It was also shown that molecules other than CYP1A1 are involved in the 9,10-epoxy reaction of BaP DNA adduct formation. Furthermore, DATS, a garlic component with anticancer activity, increased BaP DNA adducts. It was suggested that DATS acts on a mechanism other than DNA adduct formation.

研究分野：毒性学

キーワード：ベンゾ(a)ピレン DNA付加体

### 1. 研究開始当初の背景

多環芳香族化合物であるベンゾ(a)ピレン (BaP) は煙草、工場の排煙などに含まれ、国際がん研究機構によってグループ 1 に分類される発がん物質である。更に 1990 年以降、BaP がハンバーガーなどの過熱調理食品に含まれることが数多く報告され、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) はタバコを吸わない人の BaP の暴露源は加熱食品、燻製食品などであり、喫煙と同程度暴露していると推察しており、食品含有 BaP の健康への影響を懸念している。BaP は 1930 年にコールタールから発がん性物質として単離され、その後多くの研究者達によって BaP の発がんメカニズムへの関与が明らかにされてきた。BaP は細胞内で代謝され、その代謝産物である 7,8-OH 9,10-epoxy BaP (BPDE) の DNA 付加体形成が発がんイニシエーションの要因となり、BaP が AHR を介して誘導する CYP1A1 が BPDE の代謝物形成の主要分子であると報告され、BaP の発がんメカニズムは解明されたと思われていた。しかし、我々は Cyp1a1 遺伝子欠損マウスを用いた研究において、CYP1A1 が BPDE 産生の主要酵素ではないこと、BaP 長期経口暴露によってがんが誘発されることを示したが、詳細な BPDE 形成メカニズムは解明していない。BPDE 形成反応の解明は BaP の発がん予防を考える上で重要な課題である。

BaP の遺伝毒性の主要因である BPDE の DNA 付加体形成の検出法は変異原性のインディケーター試験にも使用されている <sup>32</sup>P ポストラベル法が主流である。しかしながら、高感度ではあるがアイソトープを使用すること、実験条件が難しく、解析に時間を要することなど、多くのサンプル解析には適していない。現在は LC/MS/MS や LC/MSI/MS/MS を用いた検出法が報告されているが、高額な測定機器が必要かつ、固相抽出など前処理が必要である。そこで短時間に DNA 付加体を検出できる 1 次スクリーニング検出法が確立できれば、メカニズム解析のみならず、変異原性のインディケーター試験がよりスムーズに遂行できる有用なツールになると考える。

### 2. 研究の目的

BaP は CYP1A1 によって遺伝子毒性 (DNA 付加体形成) を引き起こすと言われてきた。しかし、研究代表者らの CYP 1 ファミリー遺伝子欠損マウスを用いた結果は、BaP DNA 付加体形成には別の酵素の存在を明らかにしたが、分子の同定には至っていない。DNA 付加体検出は、アイソトープ使用や解析時間など大量サンプル解析には不向きであり、手軽な測定法の確立が求められる。そこで、ウイルス抗原・抗体検出が可能である光センシングシステムの導波モードセンサーを用いた迅速かつ簡便な DNA 付加体検出法が確立を試みた。また、BaP の発がん予防を考える上で知見となる BaP DNA 付加体形成メカニズムの解明、更にはファイトケミカルによる BaP DNA 付加体形成への影響についての解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 導波モードセンサーを用いた DNA 付加体検出法の確立

センサーチップ表面を C12Es (ヒドロキシスクシンイミドエステルドデカン二酸トリエトキシシラン化合物) と M3EG (メトキシトリエチレングリコールトリエトキシシラン化合物) で修飾後、抗 DNA 抗体を固定し、BaP DNA 付加体サンプルと反応後、ビオチン標識した抗 BPDE 抗体を反応させた。その後、ストレプトアビジン-polyHRP を結合させ AEC の反応を増幅させ導波モードセンサーによって検出した。

#### (2) DNA 付加体形成メカニズムの解明

BaP DNA 付加体形成メカニズムを解明するために、Cyp1a1 遺伝子欠損マウス胎児線維芽細胞、各種ヒト培養細胞を BaP と各種阻害剤を処理し、BaP DNA 付加体量をポストラベリング法、BaP 代謝物を HPLC で測定した。

#### (3) DNA 付加体形成に影響を及ぼすファイトケミカルの探索

ファイトケミカルによる予防法に注目し抗がん作用があるニンニク成分ジアリルトリスルフィド (DATS) と BaP をヒト肝癌細胞株 (HepG2) に処理し、BaP DNA 付加体量をポストラベリング法で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 導波モードセンサーを用いた DNA 付加体検出法の確立

BaP DNA 付加体検出をより簡便かつ迅速にする検出する為に、光センシングシステムの導波モードセンサーを利用した新たな DNA 付加体検出法の確立を試みた。最終的にセンサーチップへ

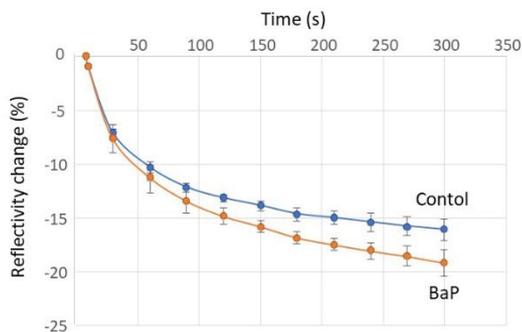


Fig 1. 導波モードセンサーによるHepG2細胞のBPDE DNA 付加体の検出

のサンプルの固定は、センサーチップに抗 DNA 抗体を固定し、BaP DNA 付加体含有 DNA と反応後、抗 BPDE 抗体を反応させるサンドイッチ法に決定した。検出法の改良として予めビオチン標識した抗 BPDE 抗体を用い、抗原抗体反応後、ストレプトアビジン-polyHRP を結合させ AEC の反応を増幅させ導波モードセンサーによって検出した。通常の ELISA 法では検出できなかった BaP 処理したマウス肝臓および HepG2 細胞の BaP DNA 付加体を検出することができた (Fig.1)。定量的には検出範囲が低く定性的な定量ではあるが、導波モードセンサーを用いた BaP DNA 付加体を検出する方法を確立できた。今後、多検体測定のためのマルチチャンネル型の導波モードセンサーの開発を行うことで1次スクリーニング法としては有用な検出法になると考える。

### (2) DNA 付加体形成メカニズムの解明

BaP DNA 付加体形成メカニズムを解明するために、Cyp1a1 遺伝子欠損マウス胎児線維芽細胞、各種ヒト培養細胞における各種阻害剤による BaP DNA 付加体への影響を検討したところ、全ての細胞において、CYP1A1 の活性を阻害しないある種のオキシゲナーゼ阻害剤 (inhibitor A) によって BaP DNA 付加体が抑制された (Fig.2)。また、HPLC による BaP 代謝物の検討から、inhibitor A によって 38 分のピークの量が有意に低下していた (Fig.3)。このピークは BPDE に相当することから 9,10-epoxy 反応には CYP1A1 以外の分子が関与していることが示された。現在ノックダウン細胞による分子の最終確認を行っており、早急に報告したいと考えている。

### (3) DNA 付加体形成に影響を及ぼすファイトケミカルの探索

ファイトケミカルによる予防法に注目し抗がん作用があるニンニク成分 DATS の BaP DNA 付加体形成への影響を検討した。予想に反して HepG2 細胞において DATS は BaP DNA 付加体を増加したことから (Fig.4) DATS の抗がん作用は付加体形成以外に作用していることが示唆された。現在、DNA 付加体形成予防に關するファイトケミカルを探索している。

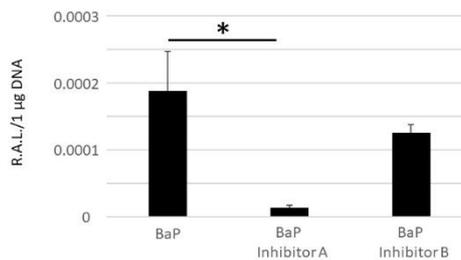


Fig2. CaCo2細胞における阻害剤のBaP DNA付加体への影響

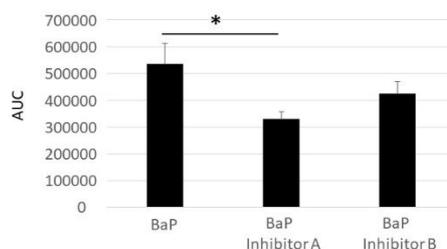
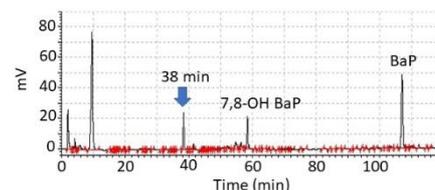


Fig3. CaCo2細胞における阻害剤のBaP代謝に及ぼす影響

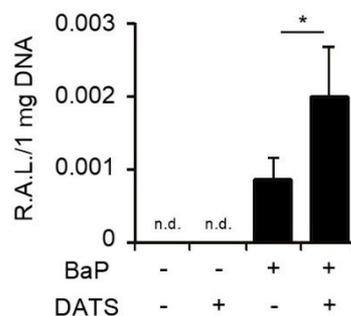


Fig4. HepG2細胞におけるDATSのBaP DNA付加体への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 UNO SHIGEYUKI、SAKAI MIZUKI、FUJINARI YUI、HOSONO TAKASHI、SEKI TAIICHIRO、MAKISHIMA MAKOTO	4. 巻 39
2. 論文標題 Diallyl Trisulfide Enhances Benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 Expression and Metabolic Activation in Hepatic HepG2 Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------